

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Departamento de Química e Bioquímica
Grupo de Investigação de Energética Molecular

**ESTUDO DO PROCESSO DE
CRISTALIZAÇÃO DA HORMONA
PRASTERONA A PARTIR DE SOLUÇÕES
DE TETRAHIDROFURANO, POR
SIMULAÇÕES DE DINÂMICA
MOLECULAR**

Aluna: Paula Domínguez Encinas

Orientador: Dr Carlos Eduardo Sabino Bernardes

Licenciatura em Química

Ano letivo 2020/2021

Resumo

Um processo crucial na formação de sólidos orgânicos e que define a estrutura final do composto é a cristalização. Este é um processo pouco compreendido e, como consequência, as suas características e particularidades não são completamente controladas. Para a sua melhor compreensão, pode-se recorrer a métodos de Dinâmica Molecular de forma a extrair informação microscópica sobre as estruturas obtidas através de um determinado método de síntese, do qual, ao serem sistemas gerados de forma computacional, são conhecidas as suas características.

Estudos anteriores mostraram que é possível preparar formas cristalinas diferentes da desidroepiandrosterona (DHEA) a partir de soluções de tetrahidrofurano (THF), através do controlo da velocidade de evaporação de solvente. Em concreto, se o solvente for removido da solução rapidamente utilizando vácuo é obtida a forma II, enquanto um processo lento realizado em condições ambiente, permitindo a absorção de água da atmosfera, leva à obtenção de uma mistura de um hidrato com a forma I. Dado que o mecanismo envolvido neste processo é desconhecido, pois são obtidas formas anidras distintas usando os dois procedimentos, neste trabalho foram utilizadas simulações de Dinâmica molecular para estudar dito processo de cristalização. Para realizar este tipo de simulações, é preciso aplicar um campo de forças adequado que permita descrever de forma efetiva as interações entre as moléculas. A validação do campo de forças pode ser realizada pela comparação dos valores experimentais e os obtidos através das simulações. Neste caso, utilizaram-se os parâmetros de malha das estruturas cristalinas do composto e dados de entalpia de sublimação. No trabalho realizado foi aplicado o campo de forças OPLS-AA, e pode-se concluir que este permite prever os parâmetros de malha de todos os polimorfos conhecidos da DHEA com um desvio inferior a 2.2 % relativamente aos dados experimentais, obtendo-se também diferenças inferiores a 5.1 kJ·mol⁻¹ entre as entalpias de sublimação experimentais e teóricas. Estes valores indicam que o OPLS-AA é um campo de forças eficaz para a descrição de sistemas contendo moléculas de DHEA.

De forma a estudar o processo de cristalização, foram realizados uma série de estudos de soluções de DHEA em THF com diferentes concentrações, na presença e na ausência de água, para assim analisar o efeito desta possível “impureza” no resultado da cristalização. Os resultados das simulações foram então investigados quanto à existência de estruturas formadas por moléculas de soluto, e como o tamanho destas estruturas varia

com a composição da solução. Os dados obtidos através desta análise mostraram, no entanto, que não existem alterações significativas nos resultados quando há presença de água em solução ou quando esta está ausente. Para além do estudo anterior, a organização local das moléculas de soluto foi ainda investigada quanto à sua orientação relativa, e os resultados obtidos foram comparados com resultados equivalentes calculados para as fases anidras I e II. Neste caso, verificou-se que em ambas as situações, à medida que a concentração da solução aumenta (processo equivalente ao de uma experiência de cristalização por evaporação de solvente), a orientação das moléculas evolui no sentido da observada na forma II para a observada na forma I. No entanto, este processo parece ser mais rápido na presença de moléculas de água. Assim, os resultados obtidos sugerem que, possivelmente, a obtenção de cristais da forma II quando a evaporação de solvente é feita em vácuo (evitando a absorção de água pela solução) resulta da prevalência de moléculas com este tipo de organização durante a cristalização.

Palavras-chave

Polimorfismo, Desidroepiandrosterona, Cristalização, Dinâmica Molecular, Campo de Forças.

Abstract

One of the most important process in the formation of organic solids and which defines the final structure of the compound is crystallization. This is a poorly understood process and, as a consequence, its characteristics and particularities are not completely controlled. For a better understanding, Molecular Dynamics methods can be used to extract microscopic information about the structures obtained through a certain synthesis method, whose characteristics are known, as they are computationally generated systems.

Previous studies have shown that it is possible to prepare different crystalline forms of dehydroepiandrosterone (DHEA) from tetrahydrofuran (THF) solutions by controlling the rate of solvent evaporation. Specifically, when the solvent is removed from the solution quickly using vacuum, form II is obtained, while a slow process under ambient conditions (allowing the absorption of water from the atmosphere) leads to obtaining a mixture of a hydrate with form I. The mechanism involved in this process is unknown, because different anhydrous forms are obtained using the two procedures. Therefore, in this work, Molecular Dynamics simulations were used to study this crystallization process. To perform this type of simulation, it is necessary to apply a valid force field that allows to describe effectively the interactions between the molecules. The validation of the force field can be performed by comparing experimental values with data obtained through simulations. In this work, lattice parameters of the crystal structures of the compound and enthalpy of sublimation data were used. To perform this work, the OPLS-AA force field was applied, and using this model, it is possible to conclude that it allows to predict the lattice parameter of DHEA polymorphs successfully. The obtained deviation for the lattice parameters is lower than 2.2% from the experimental data, while the differences between experimental and theoretical sublimation enthalpies was less than $5.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. These values indicate that OPLS-AA is an effective force field for describing systems containing DHEA molecules.

Aiming to analyze the crystallization process, some studies of DHEA solutions with different concentrations of THF, in the presence and absence of water, were performed, to explore the effect of this possible “impurity” on the crystallization result. The simulation results were investigated to examine the existence of structures formed by solute molecules, and how the size of these structures changes with the composition of the solution. The data obtained through this analysis showed that there are no

significant changes in the results for the solutions with and without water. Additionally, the local organization of solute molecules was investigated related to the relative orientation, and the results obtained compared with equivalent results calculated for anhydrous phases I and II. In this case, it was found that in both cases, as the concentration of the solution increases (a process equivalent to that of a crystallization experiment by solvent evaporation), the orientation of the molecules evolves from the structure observed in the form II to that observed in form I. However, this process appears to be faster in the presence of water molecules. Thus, the results obtained suggest that, possibly, obtaining form II crystals when solvent evaporation is carried out in a vacuum (avoiding the absorption of water by the solution) results from the prevalence of molecules with this type of organization during crystallization.

Key words

Polymorphism, Dehydroepiandrosterone, Crystallization, Molecular Dynamics, Force Field.

Índice de conteúdos

Resumo	i
Palavras-chave	ii
Abstract	iii
Key words	iv
1 – Introdução	1
1.1 – Fundamento teórico da Dinâmica Molecular:	5
2 – Métodos	7
2.1 – Validação do Campo de Forças	7
2.1.1 – Simulações em fase cristalina	7
2.1.2 – Simulações em fase gasosa	8
2.2 – Simulações das soluções de DHEA	9
2.2.1 – Análise da Estrutura da Solução	11
3 – Resultados e Discussão	13
3.1 – Validação do Campo de Forças	13
3.2 – Estudo das soluções de DHEA em THF	16
• Análise dos agregados de DHEA em solução	16
• Estudo da orientação relativa das moléculas de DHEA em solução	19
4 – Conclusão	21
5 – Referências	22
Anexos	26
Anexo A – Tabela com os valores de parâmetros de malha experimentais e os obtidos através das simulações	26

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de uma célula unitária com a identificação dos parâmetros de malha.	2
Figura 2: Estrutura molecular da desidroepiandrosterona.	3
Figura 3: Representação esquemática das variáveis consideradas no cálculo das funções de distribuição combinadas, mostrando os átomos de carbono (marcados a amarelo) usados para estabelecer a distância, $D(C\cdots C)$, entre as duas moléculas de DHEA, e o vetor calculado com base na posição dos átomos de oxigênio, de forma a estabelecer a orientação relativa entre as moléculas.....	12
Figura 4: Representação dos erros médios, máximos e mínimos obtidos para a determinação dos parâmetros de malha em cada uma das formas polimórficas, relativamente aos dados experimentais indicados na Tabela 1.	15
Figura 5: Representação da probabilidade de encontrar um agregado de DHEA em função do número de moléculas que o compõem. As curvas com as linhas solidas a e tracejado foram obtidas para as soluções com e sem água em solução, respetivamente.....	17
Figura 6: Representação do número médio de vizinhos de cada DHEA em função do número de moléculas no agregado, para diferentes frações molares de soluto, x_{DHEA} . As curvas com as linhas solidas a e tracejado foram obtidas para as soluções com e sem água em solução, respetivamente.....	18
Figura 7: Imagem dos agregados compostos por mais de duas moléculas, observados durante a simulação da solução com concentração de $x_{DHEA}=0.020$, na presença de água.	18

Índice de tabelas

Tabela 1: Estruturas cristalinas conhecidas da DHEA com a especificação de algumas características.....	4
Tabela 2: Características estruturais das caixas de simulação utilizadas nos cálculos....	8
Tabela 3: Diferenças (δ) entre os valores obtidos através das simulações e os valores experimentais obtidos para os parâmetros de malha para cada uma das fases cristalinas da DHEA.	15

Índice de abreviaturas

$\Delta_{\text{sub}}H_m^\circ$: entalpia de sublimação

$\Delta_{\text{trs}}H_m^\circ$: entalpia de transição de fase entre dois polimorfos.

$U_m^\circ(\text{g})$: energia interna molar na fase gasosa

$U_m^\circ(\text{cr})$: energia interna molar na fase cristalina

U_{intra} : contribuição intramolecular para energia potencial total

U_{inter} : contribuição intermolecular para a energia potencial total

R : constante dos gases ideais, em $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$

T : temperatura, em K

CSD: acrónimo em inglês da base de dados de estruturas cristalinas da Cambridge (*Cambridge Structural Database*)

DHEA: desidroepiandrosterona

FI: Forma polimórfica I da desidroepiandrosterona

FII: Forma polimórfica II da desidroepiandrosterona

SI: hidrato com estequiometria 4:1

MD: Dinâmica Molecular

OPLS-AA: acrónimo em inglês para o nome do campo de forças “Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atoms”.

THF: tetrahidrofurano

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

u.a.: unidades arbitrárias

x_{DHEA} : fração molar de DHEA em solução de THF

a : comprimento do vetor correspondente ao lado da célula unitária no eixo dos x

b : comprimento do vetor correspondente ao lado da célula unitária no eixo dos y

c : comprimento do vetor correspondente ao lado da célula unitária no eixo dos z

α : ângulo entre o vetor b e c na célula unitária

β : ângulo entre o vetor a e c na célula unitária

γ : ângulo entre o vetor a e b na célula unitária

δ : diferenças entre os dados experimentais e os valores obtidos através das simulações, para os parâmetros de malha da célula unitária.

Ref.: Referências

1 – Introdução

O polimorfismo é uma característica que apresentam muitos compostos orgânicos e que tem grande importância para a indústria da química fina, em particular para a indústria Farmacêutica. Este fenómeno, consiste na capacidade de um composto para poder cristalizar sobre a forma de mais do que uma fase cristalina, isto é, com empacotamentos diferentes.¹ Estas diferenças estruturais, conferem propriedades físicas distintas (por exemplo, cor, temperatura de fusão, solubilidade e biodisponibilidade)²⁻⁴ a cada uma das formas polimórficas, sendo considerados muitas vezes como materiais diferentes.⁵ Uma realidade muito importante e determinante no polimorfismo é que diferentes formas polimórficas podem habitualmente coexistir sobre as mesmas condições de pressão e temperatura e, com o tempo, podem reverter para a forma termodinamicamente mais estável.⁶ O controlo do polimorfismo em substâncias sólidas tornou-se assim uma questão fulcral para a indústria dado o seu impacto na produção, na estabilidade, no prazo de validade e até no patenteamento de, por exemplo, compostos ativos farmacêuticos.⁷

O exemplo mais conhecido relacionado com o acontecimento de variações nas propriedades físico-químicas em compostos ativos farmacêuticos é o do composto antiviral Ritonavir. Este fármaco é um inibidor da protéase antirretroviral e é utilizado em combinação com outros inibidores similares para o tratamento de pessoas com infeção por VIH-1 e doentes de SIDA.⁸ O fármaco foi comercializado inicialmente numa formulação que consistia numa cápsula contendo uma solução saturada do composto. Dois anos depois do início da sua comercialização surgiu uma nova forma termodinamicamente estável e substancialmente menos solúvel. Por esta razão, testes rotineiros de solubilidade do fármaco deixaram de ser positivos, inviabilizando a utilização da formulação inicial, o que provocou uma paragem na produção até à reformulação do medicamento.⁹

As estruturas cristalinas dos sólidos, são descritas através de uma unidade básica repetitiva da estrutura tridimensional, que é a célula unitária. Este elemento, por sua vez, é descrito por meio dos parâmetros de malha, que são grandezas que se referem a três comprimentos (a , b e c) e três ângulos (α , β e γ), relativos ao paralelepípedo ou prisma que forma a célula unitária.¹⁰ Na Figura 1, apresenta-se a estrutura de uma célula unitária

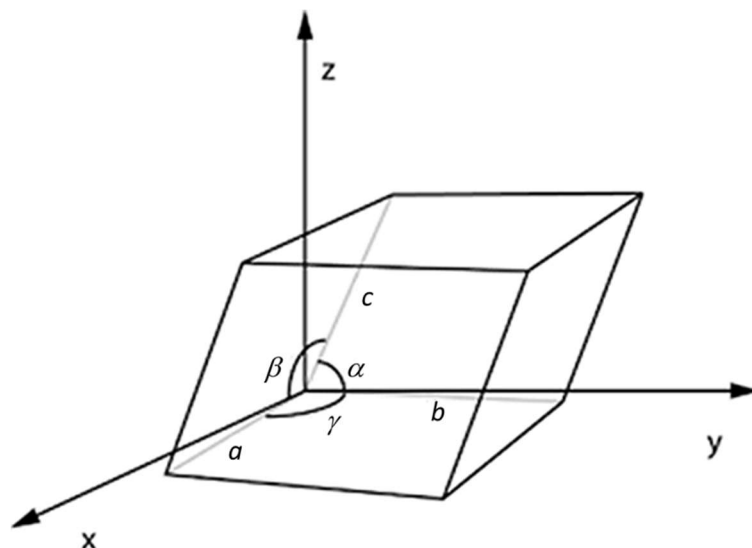


Figura 1: Esquema de uma célula unitária com a identificação dos parâmetros de malha.

com a designação de cada um dos parâmetros de malha referidos. É importante perceber que a estrutura do sistema cristalino tem uma estreita relação com o polimorfismo: as formas polimórficas existentes para um determinado composto, apresentam diferenças nos parâmetros de rede e conseqüentemente diferenças no arranjo, empacotamento e até conformação molecular.^{1,11}

Como referido, há um grande interesse da indústria no estudo dos sólidos orgânicos (e.g. compostos farmacêuticos ativos), e na aplicação de métodos teóricos para a investigação de fenómenos como o polimorfismo e o processo de formação destes materiais a partir de solução.^{12,13} De facto, o conhecimento atual sobre como os cristais se formam em solução é muito limitado, o que, tal como já mencionado, leva frequentemente a problemas relacionados com o polimorfismo durante as etapas de produção de cristais por cristalização. Neste âmbito, os métodos teóricos permitem ultrapassar as limitações técnicas na investigação dos processos de cristalização e facilitar a obtenção de informação microscópica e energética relativa á forma como as moléculas se juntam para formar um cristal.¹⁴ Desta forma, podem ser utilizadas simulações de dinâmica molecular (MD), onde campos de força são usados para descrever as interações entre as moléculas em solução.¹⁵⁻¹⁷ Assim, se obtermos uma compreensão detalhada do processo de cristalização, será possível alcançar um controlo sobre as fases sólidas que podem ser produzidas através de ditos processos. Neste trabalho, foram utilizadas este tipo de simulações computacionais para o estudo do polimorfismo e do processo de cristalização da molécula desidroepiandrosterona (DHEA; Figura 2).

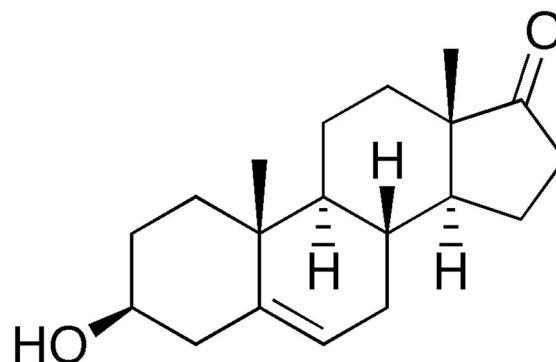


Figura 2: Estrutura molecular da desidroepiandrosterona.

A desidroepiandrosterona, vulgarmente conhecida por prasterona, é uma hormona produzida no corpo humano que atua como precursor das hormonas masculinas (andrógenos) e femininas (estrógenos). Esta hormona é o principal esteroide C19 produzido pelo córtex adrenal, e em pequenas quantidades pelo testículo e o ovário.¹⁸ A produção natural deste esteroide no corpo humano diminui gradualmente com a idade e está demonstrado que a presença do mesmo no organismo tem diversos efeitos fisiológicos. Por este motivo, a pesquisa e o interesse pela utilização de suplementos de DHEA está em constante crescimento. A DHEA é normalmente comercializada como suplemento dietético de venda livre e existem estudos que confirmam alguns dos benefícios da sua utilização tanto em mulheres como em homens.¹⁹ Um estudo realizado de forma aleatória a homens e mulheres com idades superiores a 55 anos afirma que uma suplementação diária de DHEA aumenta a densidade mineral óssea na coluna lombar nas mulheres e diminui significativamente a massa gorda nos homens.²⁰

Até o momento, foram isolados e caracterizados por difração de raios-X de cristal único, espectroscopia de IV e calorimetria diferencial de varrimento, cinco polimorfos (designados como forma I, II, III, VI e VII), três monohidratos (S2, S3 e S5), um hidrato com estequiometria 4:1 (S1), e um solvato de metanol (S4).²¹ A Tabela 1 apresenta as diferentes estruturas cristalinas da DHEA, com o correspondente grupo espacial, a temperatura à qual foi sintetizada cada estrutura, e o código de registo na base de dados da *Cambridge Structural Database* (CSD).²² A FI é considerada a forma mais estável e as FII e FIII foram consideradas metaestáveis.^{21,23}

Tabela 1: Estruturas cristalinas conhecidas da DHEA com a especificação de algumas características.

Forma	Código CSD	Grupo	T/K	a/Å	b/Å	c/Å	$\alpha/^\circ$	$\beta/^\circ$	$\gamma/^\circ$	Ref.
FI	ZOYMOP	P2 ₁	295	6.208	44.437	6.27	90	107.1	90	21
FII	ZOYMOP01	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	295	6.641	11.442	22.085	90	90	90	24
FIII	ZOYMOP07	P2 ₁	295	14.534	10.379	11.825	90	111.56	90	25
FVI	ZOYMOP02	P2 ₁	295	6.178	21.797	6.288	90	106.90	90	26
FVII	ZOYMOP06	P2 ₁	295	13.105	5.903	10.829	90	97.64	90	25
SI	ZOYMUUV	C2	295	22.698	7.331	20.241	90	93.01	90	21
S2	VEFPUR	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	295	22.545	22.673	6.819	90	90	90	27
S5	VEFPUR01	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	295	22.506	11.197	6.809	90	90	90	25
S4	ZOYNAC	C222 ₁	295	6.760	12.558	41.00	90	90	90	25

Este trabalho foi enquadrado num estudo experimental realizado recentemente no laboratório de Energética Molecular do Centro de Química Estrutural do Departamento de Química e Bioquímica da FCUL. Nesse trabalho, foi investigado o efeito do polimorfismo nas propriedades físico-químicas da DHEA, e como diferentes condições de cristalização influenciam a produção de cada forma.²³ Com base nos dados obtidos na investigação referida, verificou-se que a cristalização do composto a partir de tetrahidrofurano (THF), leva à precipitação de polimorfos diferentes quando o processo de preparação do composto envolve uma evaporação lenta ou rápida do solvente. Em concreto, a evaporação lenta do solvente leva à precipitação da forma I com vestígios do hidrato S2, enquanto que a remoção rápida do THF sob condições de vácuo, permite obter cristais da forma II. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi, utilizando métodos de dinâmica molecular, investigar os possíveis mecanismos por trás deste comportamento. Em concreto, estudar a razão que leva à precipitação da forma I ou II da DHEA quando são usados processos de evaporação diferentes. Dado que o THF é higroscópico e a cristalização por evaporação lenta de solvente foi realizada em condições ambiente, estando a solução em contacto com o ar durante vários dias, é expectável que esta possa absorver grandes quantidades de vapor de água presente no ar. Por esta razão, foi detetada a presença do hidrato S2 na amostra precipitada. Assim, neste trabalho foi avaliado se a presença de água na solução pode originar alterações na organização das moléculas de soluto, levando à precipitação de um polimorfo diferente relativamente a um processo de cristalização onde a água não está presente.

1.1 – Fundamento teórico da Dinâmica Molecular:

Como mencionado, neste trabalho foram utilizados métodos teóricos para analisar e estudar o polimorfismo e as soluções da DHEA. Mais concretamente, foram utilizadas simulações de Dinâmica Molecular para investigar a influência de diferentes aspetos relacionados com o processo de cristalização desta molécula.

Os métodos de Dinâmica Molecular, permitem estudar os movimentos moleculares numa escala de tempo, tipicamente, dos nano– aos microssegundos, usando caixas de simulação com alguns nanómetros de lado. Como resultado, é obtida uma trajetória das moléculas em função do tempo que, após ser analisada, permite estudar e determinar as propriedades da matéria.¹⁷

Para realizar este tipo de estudos, define-se um potencial que descreve os átomos com duas perspetivas: uma intramolecular (U_{intra}) que explica como os átomos interagem dentro de uma molécula, e outra intermolecular (U_{inter}) que trata das interações entre átomos não ligados por ligações químicas (e.g. entre moléculas diferentes), de forma que a energia interna do sistema, U , é dada por:

$$U = U_{inter} + U_{intra} \quad (1)$$

Neste trabalho, foi utilizado o campo de forças OPLS-AA²⁸ para descrever as interações entre as moléculas. Este campo de forças foi especificamente desenvolvido para descrever moléculas orgânicas em fase líquida,²⁸ tendo sido demonstrado recentemente que também permite modelar o comportamento de sólidos com alguma eficiência.²⁹ O campo de Forças OPLS-AA é definido pelas expressões de potencial:

$$U_{intra} = \sum_{ij} \frac{k_{r,ij}}{2} (r_{ij} - r_{o,ij})^2 + \sum_{ijk} \frac{k_{\theta,ijk}}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{o,ijk})^2 + \sum_{ijkl} \sum_{n=1}^3 \frac{V_{n,ijkl}}{2} [1 + (-1)^{n+1} \cos(n\phi_{ijkl})] \quad (2)$$

$$U_{inter} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3)$$

As componentes da equação 2 correspondem às interações intramoleculares, onde as ligações e os ângulos são descritos por um oscilador harmônico, sendo $k_{r,ij}$ a constante de força da ligação, $k_{\theta,ijk}$ a constante de força do ângulo, r_{ij} e θ_{ijk} a distância e ângulo ao qual está um determinado átomo e $r_{o,ij}$ e $\theta_{o,ijk}$ é a distância e o ângulo de equilíbrio entre os átomos. O terceiro termo na equação 2 representa a rotação dos diedros, que consiste na descrição do movimento natural de rotação ao longo dum eixo por parte dos átomos que se encontram ligados. Este movimento é descrito por uma série de Fourier que se baseia num somatório de cossenos, onde φ_{ijkl} é o ângulo diedro entre os átomos i, j, k e l , e $V_{n,ijkl}$ é a constante de Fourier.

A equação 3 permite calcular as componentes de interação intermoleculares, considerando potenciais de interações de Van der Waals e de Coulomb. O primeiro termo consiste numa equação de potencial de Lennard-Jones, que descreve as interações repulsiva e atrativa que existem entre duas partículas a uma determinada distância. Com este tipo de potencial podemos confirmar a existência de uma grande repulsão a distâncias muito pequenas, a existência de uma distância ideal para ambas partículas e a diminuição de energia de interação à medida que as partículas se distanciam. Neste termo, ε_{ij} e σ_{ij} são a energia mínima e a dimensão do átomo a potencial nulo respetivamente. No caso da descrição do potencial de Coulomb, é determinado considerando duas cargas pontuais (q_i e q_j) centradas no núcleo dos dois átomos.³⁰

2 – Métodos

As simulações de Dinâmica Molecular foram realizadas utilizando diferentes programas. O critério de escolha usado na seleção de cada programa foi uma combinação entre a análise do tempo de cálculo e as capacidades dos métodos implementados em cada software. O trabalho foi dividido em duas partes: a primeira consistiu na validação do campo de forças no que toca à sua capacidade de simular as propriedades da DHEA em fase cristalina, e a segunda compreendeu o estudo das soluções deste composto em THF, de forma a investigar o processo de cristalização da DHEA.

2.1 – Validação do Campo de Forças

Como referido na seção anterior, foi utilizado o campo de forças OPLS-AA para definir uma parametrização que permitisse descrever o movimento dos átomos na molécula de DHEA que se pretende estudar. A validação do campo de forças foi realizada através de uma série de simulações com o programa LAMMPS,³¹ usando ficheiros input criados com o software DLPGEN.³² Estas simulações foram efetuadas tendo em conta os dados de raios-X de cristal único existentes na CSD (Tabela 1).²²

Para chegar ao valor de entalpia de sublimação molar padrão da DHEA, foram realizados dois tipos de simulações distintos com o objetivo de obter a energia interna da molécula de DHEA para os diferentes polimorfos e também a energia interna para uma molécula isolada na fase gasosa.

2.1.1 – Simulações em fase cristalina

Para a realização deste conjunto de simulações, foram empilhadas várias células unitárias ao longo dos eixos de forma a obter caixas de simulação de aproximadamente 40 Å de lado. Existem dois polimorfos que apresentam duas moléculas de DHEA na unidade assimétrica e também existem determinadas operações de simetria presentes na estrutura de cada polimorfo. É necessário ter em consideração esses aspetos na preparação das simulações e na especificação das características de cada sistema. Os aspetos mais relevantes das caixas de simulação utilizadas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Características estruturais das caixas de simulação utilizadas nos cálculos.

Forma polimórfica	Código CSD	Repetições ($x \times y \times z$)	Número de operações de simetria	Número de moléculas na unidade assimétrica	Número de moléculas na caixa de simulação
I	ZOYMOP	7 x 1 x 7	2	2	196
II	ZOYMOP01	6 x 4 x 3	4	1	288
III	ZOYMOP07	3 x 4 x 4	2	2	192
VI	ZOYMOP02	7 x 2 x 7	2	1	196
VII	ZOYMOP06	3 x 7 x 4	2	1	168

As simulações dos cristais foram efetuadas a partir destas caixas de simulação em dois passos: uma equilibração prévia do sistema e a posterior simulação final dos cristais. A etapa de equilibração consistiu numa rampa de temperatura onde o sistema é aquecido desde os 10 K até aos 298.15 K, durante 1 ns. A simulação em si, foi realizada na etapa de produção, que consistiu na manutenção do sistema a 298.15 K e a 1 bar durante 1 ns, e onde as propriedades médias do sistema foram calculadas. Em ambos os casos, foi utilizado um tempo de passo de 2 fs. As condições de pressão e temperatura foram controladas através de um baróstato anisotrópico e de um termostato Noose-Hoover, usando constantes de relaxamento de X e Y ps, respetivamente³³.

Como é natural e habitual neste tipo de simulações, para o controlo das interações intermoleculares foi estabelecido um raio de corte, que consiste na definição de uma distância à qual se assume que existem interações da molécula em estudo com a sua vizinhança. Desta forma, é possível reduzir o número de interações que serão contabilizadas para os cálculos de energia; pois está a ser estudada a interação de uma molécula com as restantes no sistema e com a imposição de um raio de corte evita-se o cálculo de todas as interações existentes no sistema. O raio de corte estabelecido para as simulações realizadas foi de 15.0 Å, sendo que no caso das interações de Coulomb, as que acontecem para além deste limite foram calculadas considerando correções de Ewald.

2.1.2 – Simulações em fase gasosa

Para a realização deste passo, foi situada uma única molécula de DHEA numa caixa cúbica com 1000 Å de lado, de forma a determinar o valor da energia interna da molécula num gás ideal. Dado que independentemente do polimorfo estudado a fase gasosa do composto é sempre a mesma, a energia obtida será igual seja qual for a forma cristalina em estudo.

Para além das modificações na caixa, também foi preciso alterar algumas das condições da simulação, nomeadamente: (i) aumento do tempo de simulação para 10 ns; (ii) eliminação das correções de Ewald através do estabelecimento de um raio de corte de 50 Å, que permite contabilizar todas as interações entre os átomos do sistema; e (iii) utilização apenas de um termostato Noose-Hoover, de forma a realizar a simulação considerando um conjunto canónico isotérmico-isocórico (com quantidade de substância, temperatura e volume constante, NVT)³³. Para além disso, dado as limitações estatísticas relacionadas com a simulação de apenas uma molécula na caixa, foram realizadas 20 simulações para obter um valor médio de energia interna.

2.2 – Simulações das soluções de DHEA

Para a realização das simulações da DHEA em solução de THF foram encontrados alguns problemas iniciais. Experimentalmente, o processo de cristalização que se pretendeu estudar envolve a evaporação de solvente, acontecimento que não é possível reproduzir numa simulação de dinâmica molecular. Para além disso, nos estudos reportados, não se conhece a concentração inicial da solução, assim como a quantidade de água que é absorvida pelo THF durante o processo de cristalização realizado à temperatura ambiente.

Para construir as caixas de simulação, foram consideradas duas situações onde se investigaram soluções com e sem água. De forma a determinar a quantidade inicial de água no THF, foi identificada uma concentração de água tipicamente presente num solvente de elevada pureza de THF. Neste caso verificou-se que o solvente comercializado pela Merk apresentava uma quantidade de água de $\sim 0.005\%$ (m/m).³⁴ Desta forma, considerou-se arbitrariamente que o processo de cristalização parte de uma solução diluída de DHEA com fração molar de $x_{DHEA} = 0.005$, contendo 0.005% (m/m) de água. Para avaliar o processo de evaporação, foram então consideradas duas soluções adicionais mais concentradas ($x_{DHEA} = 0.015$ e $x_{DHEA} = 0.022$), de forma a verificar como o aumento de concentração causado pela evaporação do solvente, influência a organização das moléculas em solução. Relativamente à quantidade de água, considerou-se o caso limite em que o número de moléculas de água inicialmente presente em solução se mantém constante, isto é, não existe absorção adicional de água durante o processo de evaporação. Para comparação, foram ainda consideradas soluções com a mesma fração

molar de DHEA, mas neste caso em ausência de água. As composições consideradas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição do número de moléculas de DHEA, THF e água para cada solução construída para a realização das simulações em estado líquido.

Tipo de solução	x_{DHEA}	Moléculas de DHEA	Moléculas de THF	Moléculas de água
Sem água	0.005	60	11800	0
	0.015	60	3950	0
	0.022	60	2640	0
Com água	0.005	60	11800	236
	0.014	60	3950	236
	0.020	60	2640	236

A configuração inicial das caixas de simulação foi obtida através de uma distribuição aleatória das moléculas, de forma a obter uma densidade inicial do sistema de $0.5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Seguidamente, foi realizado um processo de equilibração, que consistiu na realização de várias simulações com uma duração de 2 ns onde a temperatura e a pressão foi modificada sequencialmente, até obter uma solução com densidade aproximadamente constante à temperatura final de 298.15 K e à pressão de 1bar. Com este passo realizado, foi possível realizar a simulação final com 50 ns, onde a configuração do sistema foi guardada a cada 1000 ps. Um passo de 2 fs foi utilizado em todas as simulações. Neste caso, a temperatura foi regulada com um termostato Nose-Hoover (constante de relaxamento de 1 ps),³³ e para a regulação da pressão recorreu-se a um baróstato Parrinello-Rahman (constante de relaxamento de 5 ps).³⁵

Na realização destas simulações, foi utilizado o campo de forcas OPLS-AA²⁸ para modelar o THF e a DHEA, e o modelo TIP4P-2005³⁶ foi o considerado para as moléculas de água.

Analogamente às simulações em fase cristalina e em fase gasosa, foi utilizado o software DLPGEN³² para a obtenção dos ficheiros input, tendo-se utilizado, no entanto, o programa PACKMOL³⁷ para obter a configuração das caixas de simulação iniciais. Por sua vez, as simulações foram realizadas utilizando o programa GROMACS.³⁸

2.2.1 – Análise da Estrutura da Solução

Para analisar os dados obtidos através das simulações anteriores foi utilizado o programa AGGREGATES.³⁹ Este, analisa os ficheiros de trajetória obtidos a partir das simulações de Dinâmica Molecular e fornece dados sobre a formação de estruturas (agregados moleculares), a organização e a conformação molecular dos sistemas em estado sólido e líquido.

Foram realizados neste trabalho os seguintes estudos: (i) avaliação da distribuição do tamanho de agregados de DHEA que se formam em solução; e (ii) análise da orientação relativa das moléculas nos agregados.

Para realizar a análise dos agregados, foram avaliadas as distâncias entre as moléculas de DHEA de forma a verificar se duas moléculas se encontram em contacto. Para isso, considerou-se que dois átomos estavam em contacto se a sua distância fosse menor que a soma dos seus raios de van der Waals mais 0.5 Å. Com base nesta análise, foi possível calcular a probabilidade de encontrar um agregado composto por um determinado número de moléculas. Para além disso, foi ainda calculado o número médio de vizinhos que tem cada molécula de DHEA em função do tamanho do agregado, de forma a avaliar o nível de aglomeração das moléculas.

Para o estudo da orientação relativa das moléculas foram calculadas funções de distribuição combinadas. Para isso, correlacionou-se a distância entre duas moléculas adjacentes, medida como a distância $D(C\cdots C)$ entre dois átomos centrais da DHEA (marcados a amarelo na Figura 3), com o ângulo, ϕ , formado entre os vetores \vec{v}_1 definidos para cada uma das moléculas com base nas posições dos seus átomos de oxigénio (ver Figura 3). Estes estudos foram realizados para todas as soluções estudadas neste trabalho, e a organização observada foi comparada com resultados equivalentes calculados para as formas cristalinas de interesse, nomeadamente a forma I e II. A análise dos dados obtidos através deste tipo de estudo foi realizada com o programa Origin 2018,⁴⁰ que permite a representação gráfica de distribuições com três variáveis.

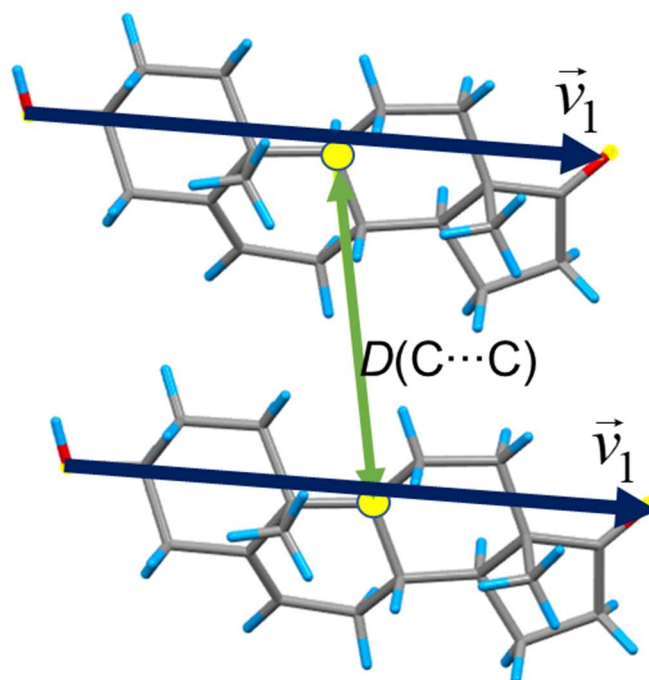


Figura 3: Representação esquemática das variáveis consideradas no cálculo das funções de distribuição combinadas, mostrando os átomos de carbono (marcados a amarelo) usados para estabelecer a distância, $D(C\cdots C)$, entre as duas moléculas de DHEA, e o vetor calculado com base na posição dos átomos de oxigênio, de forma a estabelecer a orientação relativa entre as moléculas.

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Validação do Campo de Forças

Como mencionado na seção de Métodos, foram realizadas uma série de simulações para avaliar se o Campo de Forças OPLS-AA permite descrever corretamente o comportamento da DHEA. Para o efeito, foram comparados valores de entalpia de sublimação molar padrão, $\Delta_{\text{sub}}H_m^\circ$, e parâmetros da célula unitária obtidos experimentalmente (Tabela 1), com resultados calculados com base no modelo usado neste trabalho, para cada um dos polimorfos conhecidos.

Relativamente ao dados energéticos, estudos anteriores realizados por Microcalorimetria Calvet no Laboratório de Energética Molecular do Centro de Química Estrutural, permitiram determinar o valor da entalpia de sublimação para a Forma I, sendo esta $\Delta_{\text{sub}}H_m^\circ(\text{I}) = 132.5 \pm 2.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.²³ Dado que a entalpia de transição de fase entre os dois polimorfos é conhecida com base em medidas de entalpia de dissolução como $\Delta_{\text{trs}}H_m^\circ(\text{II} \rightarrow \text{I}) = -0.807 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta_{\text{trs}}H_m^\circ(\text{III} \rightarrow \text{I}) = -1.533 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, é possível concluir que $\Delta_{\text{sub}}H_m^\circ(\text{II}) = 131.7.5 \pm 2.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta_{\text{sub}}H_m^\circ(\text{III}) = 131.0 \pm 2.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.²¹

Como mencionado anteriormente, com os resultados das simulações realizadas em fase cristalina e em fase gasosa, é possível chegar ao valor da entalpia de sublimação molar padrão para cada polimorfo, através da expressão:

$$\Delta_{\text{sub}}H_m^\circ = U_m^\circ(\text{g}) - U_m^\circ(\text{cr}) + RT \quad (4)$$

onde $U_m^\circ(\text{cr})$ é a energia interna molar na fase cristalina, $U_m^\circ(\text{g})$ é a energia interna molar na fase gasosa, e $RT \approx 2.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, é o termo de conversão de energia interna para entalpia assumindo um gás perfeito; onde $R = 8.3144621 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ é a constante dos gases perfeitos, e $T = 298.15 \text{ K}$ é a temperatura.

Os resultados obtidos a partir dos cálculos mencionados acima (correspondentes aos dados experimentais), assim como os valores das entalpias de sublimação obtidos com as simulações e as diferenças entre ambos, estão apresentados na Tabela 3. Desta forma, analisando os dados obtidos, verifica-se que as diferenças entre a entalpia experimental e o valor de entalpia obtido através das simulações de dinâmica molecular são de 5.1, 0.4 e 4.4 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a forma I, II e III respetivamente. Os resultados obtidos

com as simulações apresentam valores muito próximos dos valores experimentais, o que mostra que o campo de forças aplicado é eficaz na descrição do sistema. Observando os resultados, pode-se verificar que a ordem de estabilidade dos três polimorfos é diferente para os valores experimentais e para os valores obtidos com as simulações: no caso dos valores experimentais temos que FI>FII>FIII, e no caso dos valores obtidos teoricamente temos que FI>FIII>FII. Este facto pode ser detetado com uma questão negativa para o método teórico utilizado mas, analisando os erros obtidos, pode-se concluir que o método consegue descrever com uma efetividade significativa o que acontece experimentalmente. Isto é, os erros obtidos com as simulações se encontram em perfeito acordo com os erros correspondentes à determinação experimental, pelo que se pode confirmar que nos encontramos no limite de sensibilidade do método teórico utilizado e que este consegue efetuar uma boa descrição do sistema.

Tabela 3: Resultados experimentais e simulados das entalpias de sublimação com a respetiva comparação de ambos.

Forma	$\Delta_{\text{sub}} H_m^{\circ}$ experimental	$\Delta_{\text{sub}} H_m^{\circ}$ simulada	Diferença (δ)
I	132.5±2.6	137.6±3.7	5.1
II	131.7±2.6	132.1±3.7	0.4
III	131.0±2.6	135.4±3.7	4.4
VI	-	134.6±3.7	-
VII	-	139.7±3.7	-

Para além dos dados energéticos, com as simulações também foram obtidos os valores dos parâmetros de malha de cada uma das células unitárias correspondentes a cada polimorfo (ver Tabela em Anexo 1). As diferenças, δ , entre os dados experimentais dos parâmetros de malha relativamente aos valores calculados estão apresentadas na Tabela 4. Para uma melhor avaliação da validade dos valores obtidos, foi também calculado o erro relativo associado a cada uma destas determinações, que estão representados graficamente na Figura 3. Para o conjunto dos parâmetros de malha, observam-se desvios muito baixos para todas as formas estudadas, sendo o maior desvio correspondente ao parâmetro β da Forma III, $\delta = -1.979 \text{ \AA}$. Relativamente aos erros associados a esta determinação, são considerados aceitáveis, pois não ultrapassam os 2.5%. Neste contexto, analisando outros estudos, é possível verificar que o erro obtido tipicamente neste tipo de simulações é menor do que 4%,³² e desta forma, pode concluir-

se que o campo de forças escolhido consegue descrever corretamente as propriedades das estruturas dos polimorfos da DHEA.

Analisando os desvios da componente energética e estrutural, é possível determinar que o Campo de Forças escolhido é adequado para a descrição da molécula. O erro médio obtido para ambas determinações é significativamente baixo, significa que o Campo de Forças OPLS-AA descreve corretamente as interações (intermoleculares e intramoleculares) presentes num sistema formado por moléculas de DHEA e que pode ser utilizado para a parametrização de ditas interações.

Tabela 3: Diferenças (δ) entre os valores obtidos através das simulações e os valores experimentais obtidos para os parâmetros de malha para cada uma das fases cristalinas da DHEA.

Forma	$\delta a/\text{Å}$	$\delta b/\text{Å}$	$\delta c/\text{Å}$	$\delta \alpha/^\circ$	$\delta \beta/^\circ$	$\delta \gamma/^\circ$
I	0.086	0.601	0.052	-0.002	-0.309	0.001
II	0.038	0.438	0.379	0.010	0.000	0.001
III	-0.065	0.108	-0.023	-0.020	-1.979	0.060
VI	0.068	0.324	0.135	-0.002	0.015	0.001
VII	0.098	0.034	-0.010	-0.002	0.990	0.001

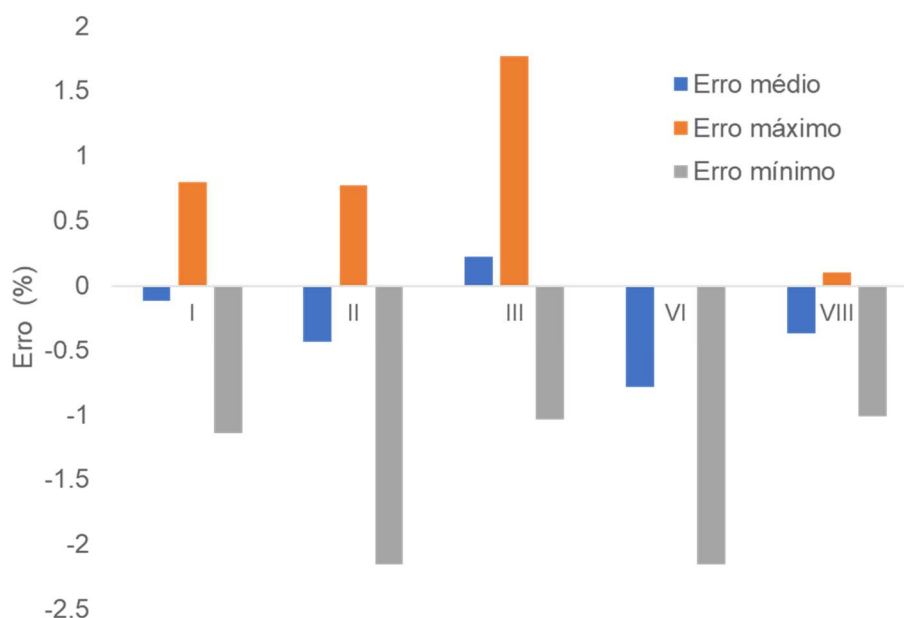


Figura 4: Representação dos erros médios, máximos e mínimos obtidos para a determinação dos parâmetros de malha em cada uma das formas polimórficas, relativamente aos dados experimentais indicados na Tabela 1.

3.2 – Estudo das soluções de DHEA em THF

Uma vez realizadas as simulações para cada solução, foi possível analisar os resultados de modo a obter informação organizacional das moléculas de DHEA. Como mencionado na seção de Métodos, foram realizados dois tipos de análises: (i) estudo da agregação das moléculas de DHEA; e (ii) avaliação da sua orientação relativa. O objetivo destes estudos foi obter informação acerca das diferenças de organização adotada pelas moléculas em solução quando na presença ou ausência de água. Desta forma, espera-se avaliar a influência deste aspeto na organização das moléculas durante o processo de cristalização.

As representações realizadas para os estudos de agregação em solução, foram estruturadas de forma a comparar cada tipo de solução (com água e sem água), a diferentes concentrações, o que tenta reproduzir um processo de cristalização por evaporação de solvente (THF). Desta forma, foram representados os dados de agregação, nomeadamente os dados da distribuição de tamanhos dos agregados e o número de vizinhos.

Por último, para concluir os estudos realizados sobre as soluções, realizou-se uma análise da organização das moléculas nos agregados, de forma a avaliar a orientação relativa entre as moléculas de DHEA em função da distância entre si. Com este estudo, obtiveram-se uma série de dados que fornecem valores de probabilidade de se observar um determinado ângulo entre as moléculas em função da sua distância. Os dados obtidos foram representados em gráficos de contorno.

- **Análise dos agregados de DHEA em solução**

Os resultados obtidos a partir dos estudos de agregação estão apresentados na Figura 5. De uma forma geral, não foram observadas diferenças significativas nos dados obtidos para as soluções com e sem água. Ou seja, não há diferenças na variação da distribuição de probabilidade em função do número de moléculas que formam um agregado quando em solução existe água ou esta está ausente. Observa-se também, como seria de esperar, que à medida que se aumenta a concentração, a probabilidade de encontrar agregados contendo um número cada vez maior aumenta. Ao mesmo tempo, existe uma diminuição do número de moléculas de DHEA que se encontram isoladas umas das outras. Desta forma, verifica-se que a presença de água no sistema não tem

efeito na distribuição do tamanho dos agregados. Para observar de forma mais detalhada os resultados obtidos, apresenta-se nesta figura uma ampliação dos dados na zona dos agregados mais pequenos. Esta representação mostra variações mínimas na distribuição dos tamanhos dos agregados para os sistemas que apresentam água e os que não.

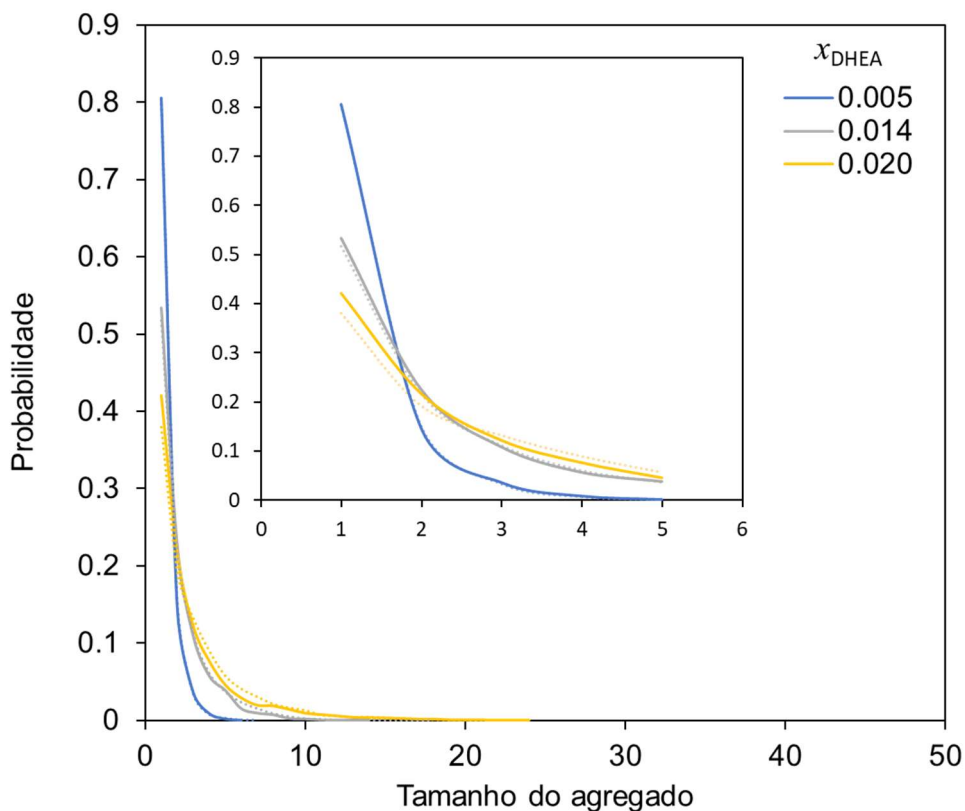


Figura 5: Representação da probabilidade de encontrar um agregado de DHEA em função do número de moléculas que o compõem. As curvas com as linhas solidas a e tracejado foram obtidas para as soluções com e sem água em solução, respetivamente.

De forma a perceber melhor a estrutura formada pelas moléculas nestes agregados, representou-se a média do número de vizinhos que cada molécula de DHEA tem em função do número de moléculas no agregado. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6. Observa-se uma similaridade geral no valor do número de vizinhos quando se comparam os resultados obtidos para soluções com concentração semelhante com e sem água. As variações observadas no caso dos agregados contendo um maior número de moléculas de DHEA, muito provavelmente, são devidas a erros estatísticos.

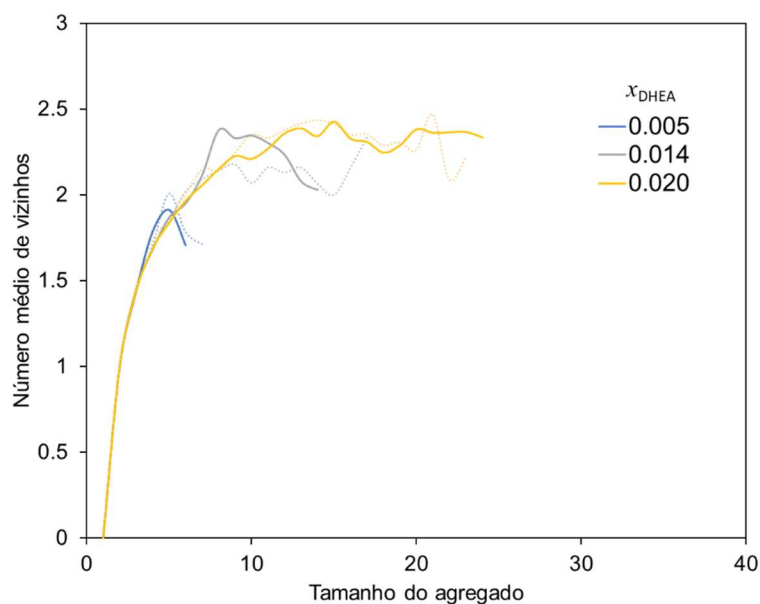


Figura 6: Representação do número médio de vizinhos de cada DHEA em função do número de moléculas no agregado, para diferentes frações molares de soluto, x_{DHEA} . As curvas com as linhas solidas a e tracejado foram obtidas para as soluções com e sem água em solução, respetivamente.

Os dados apresentados na Figura 6 mostram que, em média, cada molécula tem de 2 a 2.5 vizinhos. Isto quer dizer que os agregados moleculares que se formam no sistema, deverão ter uma forma alongada e pouco ramificada, ou seja, longe de uma forma globular. Este facto pode ser claramente observado na Figura 7, que apresenta a forma dos agregados num instante da simulação realizada para uma das soluções.

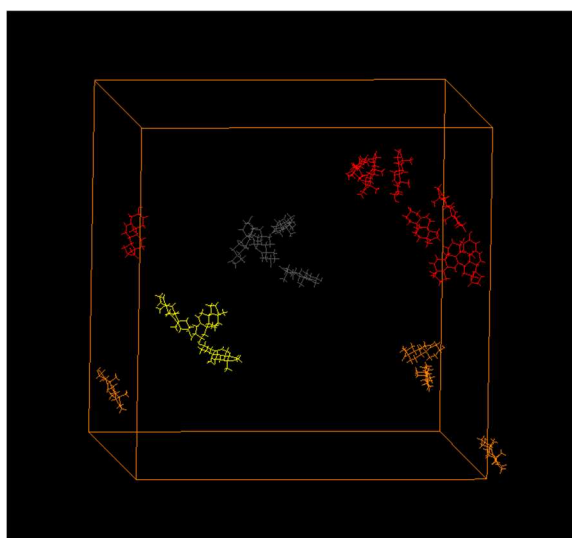


Figura 7: Imagem dos agregados compostos por mais de duas moléculas, observados durante a simulação da solução com concentração de $x_{DHEA}=0.020$, na presença de água.

Analisando todos os resultados anteriores em conjunto, não se encontram evidências para um possível efeito da presença de água na obtenção de cristais das formas I e II da DHEA a partir de soluções de THF.

- **Estudo da orientação relativa das moléculas de DHEA em solução**

Dado que a distribuição do tamanho do agregado não sofre alterações com a presença ou ausência de água, procurou-se compreender se este fator pode influenciar a orientação relativa das moléculas em solução. Como mencionado na seção de Métodos, foi analisado o ângulo, ϕ , entre os vetores definidos com base na posição dos átomos de oxigênio de moléculas adjacentes de DHEA, em função da sua distância relativa entre ditas moléculas, $D(C\cdots C)$, (ver Figura 3). Os resultados obtidos para cada uma das soluções foram então comparados com representações equivalentes, calculadas com base nas simulações realizadas para as formas I e II do composto. Desta forma, se compararmos os dois tipos de resultados, podemos associar uma estrutura cristalina a um determinado método de síntese.

Para perceber os resultados obtidos, foram criados gráficos de contorno onde são representados dados de probabilidade de encontrar duas moléculas a uma dada distância e formando um ângulo entre si, com base num código de cores. Estas representações encontram-se na Figura 7, sendo mostradas as representações para as 3 soluções com e sem água e para as duas formas cristalinas estudadas (forma I e II). Olhando para as representações, é simples perceber que, para os dois sólidos, existem orientações relativas substancialmente diferentes. Por um lado, na forma I, verifica-se que para distâncias menores de 14 Å, todas as moléculas estão orientadas a $\sim 180^\circ$. No caso da forma II, observa-se que a maioria das moléculas formam um ângulo de 180° entre si, mas existem outras orientações às quais as moléculas se dispõem, formando ângulos menores de 30° . Assim, a presença ou ausência de moléculas com uma orientação aproximadamente paralela em solução poderá ser um fator importante para a observação da precipitação de uma ou outra forma.

Considerando agora os resultados para as soluções mais diluídas (A e D, na Figura 7), que representam a fase inicial do processo de cristalização por evaporação de solvente, verifica-se que têm uma distribuição de probabilidade de orientações relativas muito vasta, sendo possível encontrar moléculas orientadas de muitas formas diferentes. À medida que concentração do soluto vai aumentando, observa-se uma evolução da

distribuição de probabilidade até esta ser muito semelhante às dos sólidos, isto é, apenas com moléculas orientadas em ângulos perto de 0° e 180° . Olhando para as representações das soluções mais concentradas com e sem água, sendo C e F respectivamente na Figura 7, pode-se verificar que existe uma maior probabilidade de ter moléculas formando um ângulo próximo dos 180° no caso da solução com água. Isto sugere que, na presença de água poderá ser mais difícil obter a forma II, dado o menor número de moléculas orientadas a ângulos próximos de 0° .

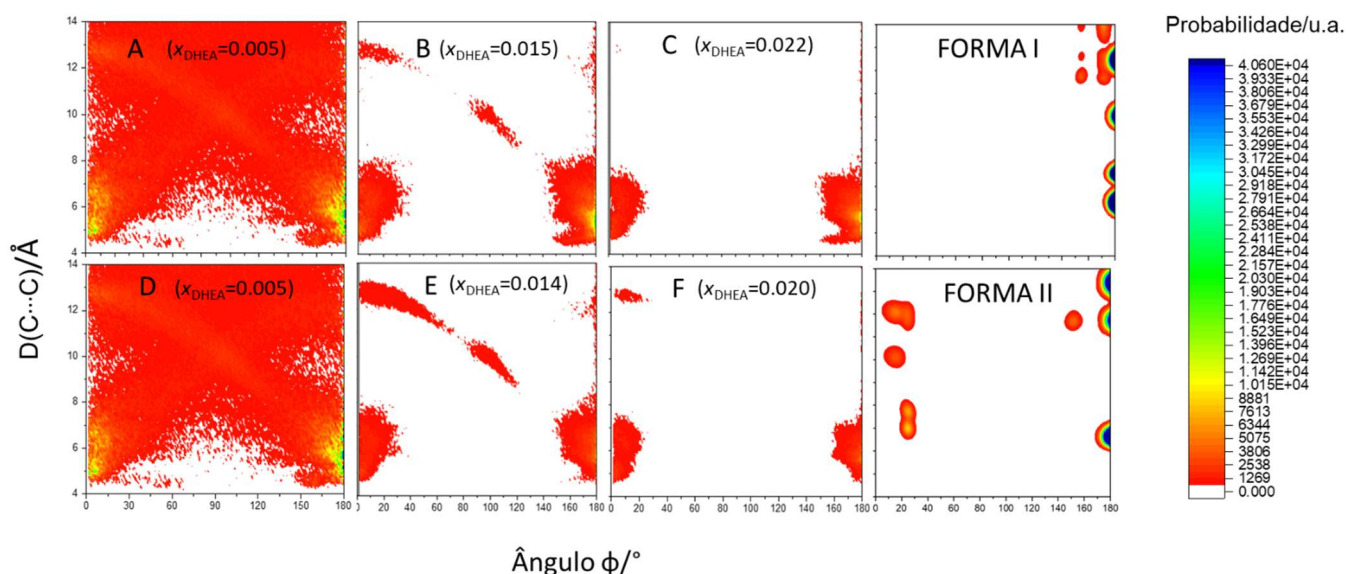


Figura 7: Representações gráficas da probabilidade de encontrar duas moléculas a uma dada distância, $D(C\cdots C)$, formando um ângulo, ϕ , entre si. A a C, representações obtidas para as soluções com fração molar $x_{\text{DHEA}} = 0.005$, $x_{\text{DHEA}} = 0.014$, $x_{\text{DHEA}} = 0.020$, na presença de água em solução; D a F, representações obtidas para as soluções com fração molar $x_{\text{DHEA}} = 0.005$, $x_{\text{DHEA}} = 0.015$, $x_{\text{DHEA}} = 0.022$, sem a presença de água. Os painéis da direita correspondem às representações obtidas para a Forma I e II da DHEA.

4 – Conclusão

É evidente e indiscutível que o método de síntese para a obtenção de qualquer tipo de cristal, tem uma influência direta na forma polimórfica que é obtida, pois as condições experimentais têm efeitos significativos na formação dos cristais. A intenção deste trabalho de projeto foi analisar como a presença de água pode influenciar a forma cristalina da DHEA que cristaliza a partir de uma solução de THF. Com as simulações realizadas tentaram-se reproduzir as condições de cristalização utilizadas no laboratório, sendo obtidos resultados que permitiram chegar a uma possível explicação para o mecanismo de cristalização.

Os dados obtidos através dos estudos de agregação ditaram que a presença de água não tem qualquer efeito nas estruturas formadas pelas moléculas de DHEA em relação a sua distribuição de tamanhos. Ou seja, os resultados obtidos foram similares para as soluções sem água e com água, o que permite concluir que a presença da mesma não influencia este aspeto estrutural.

Por outro lado, o estudo da orientação relativa das moléculas nestes agregados foram mais esclarecedoras. Em concreto, verificou-se que quando a água está presente no sistema, com a evaporação do solvente existe um maior número de moléculas orientadas do mesmo modo que na forma I. Assim, é possível especular que num processo de evaporação onde o solvente é evaporado lentamente e ao mesmo tempo podem ser absorvidas grandes quantidades de vapor de água pela solução, seja mais provável obter cristais da forma I (para além do hidrato que, tal como referido em cima, também foi detetado nestas experiências). Por outro lado, com a evaporação do solvente rapidamente em vácuo sem permitir a absorção de água, é possível obter um maior número de moléculas em solução com uma conformação compatível com a observada na forma II, sendo por isso mais provável a precipitação desta forma.

5 – Referências

- (1) Bernardes, C. E. S.; Minas Da Piedade, M. E.; Canongia Lopes, J. N. Polymorphism in 4'-Hydroxyacetophenone: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (17), 5179–5184.
- (2) Dos Reis Luís, J. P. Polimorfismo e Co-Cristalização de Ativos Farmacêuticos. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Julho 2014.
- (3) Sánchez, G.; Jung C.; Yépez M.; Hernández-Abad, V. Relevancia del Polimorfismo en el Área Farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **2007**, *38* (2), 57-76.
- (4) Yu, L. Polymorphism in Molecular Solids: An Extraordinary System of Red, Orange, and Yellow Crystals. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (9), 1257–1266.
- (5) Brittain, H. G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids: Second Edition* **2009**, *192*, 1–640.
- (6) Bernstein, J. Polymorphism - A Perspective. *Crystal Growth and Design* **2011**, *11* (3), 632–650.
- (7) Simões, R. G.; Lopes, C. S. D.; Piedade, M. F. M.; Bernardes, C. E. S.; Diogo, H. P.; Minas Da Piedade, M. E. Conformational and Nonconformational Polymorphism in 4'-Hydroxyvalerophenone: A Structure-Energetics-Dynamics Perspective. *Crystal Growth and Design* **2020**, *20* (4), 2321–2336.
- (8) P, V.; JA, M.; ML, P.; MB, H.; TR, S.; MJ, Z. Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-Crystals from Polymorphic Active Pharmaceutical Ingredients. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2005**, No. 36, 4601–4603.
- (9) Chemburkar, S. R.; Bauer, J.; Deming, K.; Spiwek, H.; Patel, K.; Morris, J.; Henry, R.; Spanton, S.; Dziki, W.; Porter, W.; Quick, J.; Bauer, P.; Donaubaer, J.; Narayanan, B. A.; Soldani, M.; Riley, D.; McFarland, K., Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4* (5), 413-417.
- (10) Müller, U. Symmetry Relationships between Crystal Structures : Applications of Crystallographic Group Theory in Crystal Chemistry. **2013**.
- (11) Bauer, J.; Spanton, S.; Henry, R.; Quick, J.; Dziki, W.; Porter, W.; Morris, J. Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18* (6), 859–866.

- (12) Bernardes, C. E. S.; Joseph, A. Evaluation of the OPLS-AA Force Field for the Study of Structural and Energetic Aspects of Molecular Organic Crystals. *Journal of Physical Chemistry A* **2015**, *119* (12), 3023–3034.
- (13) Price, S.; Veessler, S.; Pan, H.; Lewtas, K.; Smets, M.; Rimez, B.; Myerson, A.; Hughes, C.; Hare, A.; Zhang, F.; Meekes, H.; Mazzotti, M.; Rosbottom, I.; Khamar, D.; Ende, J. van den; Fabian, L.; Black, S.; Taulelle, F.; Gich, M.; Vekilov, P.; Toroz, D.; Bertran, C. A.; Sefcik, J.; Schroeder, S.; Booth, S.; Rasmuson, A.; Breynaert, E.; Simone, E.; Hammond, R.; Sear, R.; Yoreo, J. de; Davey, R.; Anwar, J.; Ristic, R.; Corzo, D. M. C.; Roberts, K.; Harris, K.; Colfen, H.; Turner, T. Molecular Self-Assembly and Clustering in Nucleation Processes: General Discussion. *Faraday Discussions* **2015**, *179* (0), 155–197.
- (14) Simões, R. G.; Melo, P. L. T.; Bernardes, C. E. S.; Heilmann, M. T.; Emmerling, F.; Piedade, M. E. M. da. Linking Aggregation in Solution, Solvation, and Solubility of Simvastatin: An Experimental and MD Simulation Study. *Crystal Growth & Design* **2020**, *21* (1), 544–551.
- (15) Kaminski, G.; Jorgensen, W. L. Performance of the AMBER94, MMFF94, and OPLS-AA Force Fields for Modeling Organic Liquids. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100* (46), 18010–18013.
- (16) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (45), 11225–11236.
- (17) Allen, M. P.; Tildesley, D. J. Computer Simulation of Liquids: Second Edition. *Computer Simulation of Liquids: Second Edition* **2017**, 1–626.
- (18) Labrie, F.; Luu-The, V.; Belanger, A.; Lin, S. X.; Simard, J.; Pelletier, G.; Labrie, C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol* **2005**, *187* (2), 169-96.
- (19) Wolkowitz, O. M.; Reus, V. I.; Roberts, E.; Manfredi, F.; Chan, T.; Raum, W. J.; Ormiston, S.; Johnson, R.; Canick, J.; Brizendine, L.; Weingartner, H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Treatment of Depression. *Biological Psychiatry* **1997**, *41* (3), 311–318.
- (20) Jankowski, C. M.; Wolfe, P.; Schmiede, S. J.; Nair, K. S.; Khosla, S.; Jensen, M.; von Muhlen, D.; Laughlin, G. A.; Kritz-Silverstein, D.; Bergstrom, J.; Bettencourt, R.; Weiss, E. P.; Villareal, D. T.; Kohrt, W. M. Sex-Specific Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Bone Mineral Density and Body Composition: A Pooled Analysis of Four Clinical Trials. *Clinical Endocrinology* **2019**, *90* (2), 293–300.
- (21) Chang, L. -C; Caira, M. R.; Guillory, J. K. Solid State Characterization of Dehydroepiandrosterone. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1995**, *84* (10), 1169–1179.

- (22) The Cambridge Structural Database (CSD) - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-core/components/csd/> (data de acesso 2021 -06 -28).
- (23) Mehta, S.; *Study of Polymorphs and Solvates / Hydrates of DHEA*. Master Thesis. Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, e Justus-Liebig-Universität Giessen, Alemanha; 2021.
- (24) Bhacca, N. S.; Fronczek, F. R.; Sygula, A. Investigations of Dehydroepiandrosterone. Part I: Crystal Structure of Sublimed DHEA. *Journal of Chemical Crystallography* 1996 26:7 **1996**, 26 (7), 483–487.
- (25) Chernyshev, V. V.; Morozov, Y. N.; Bushmarinov, I. S.; Makoed, A. A.; Sergeev, G. B. New Polymorph of Dehydroepiandrosterone Obtained via Cryomodification. *Crystal Growth and Design* **2016**, 16 (2), 1088–1095.
- (26) Stahly, G. P.; Bates, S.; Andres, M. C.; Cowans, B. A. Discovery of a New Polymorph of Dehydroepiandrosterone (Prasterone) and Solution of Its Crystal Structure from X-Ray Powder Diffraction Data. *Cryst Growth Des* **2006**, 6, 925–932.
- (27) Cox, P. J.; MacManus, S. M.; Gibb, B. C.; Nowell, I. W.; Howie, R. A., Structure of 3 β - hydroxy-5-androsten-17-one (DHEA) monohydrate. *J Acta Crystallographica* **1990**, 46 (2), 334- 336.
- (28) William L. Jorgensen; David S. Maxwell, and; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118 (45), 11225–11236.
- (29) Santos, C. R.; Bernardes, C. E. S.; Diogo, H. P.; Minas da Piedade, M. F.; Canongia Lopes, J. N.; Minas da Piedade, M. E. Energetics of the Thermal Dimerization of Acenaphthylene to Heptacyclene. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, 110 (6), 2299–2307.
- (30) Szabo, A.; Ostlund, N. L. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications, INC: Mineola, New York, 1996.
- (31) Plimpton, S. Short-Range Molecular Dynamics. *Journal of Computational Physics* **1997**, 117 (6), 1–42.
- (32) Bernardes, C. E. S.; Joseph, A. Evaluation of the OPLS-AA Force Field for the Study of Structural and Energetic Aspects of Molecular Organic Crystals. *Journal of Physical Chemistry A* **2015**, 119 (12), 3023–3034.
- (33) Martyna, G. J.; Klein, M. L.; Tuckerman, M. Nosé-Hoover Chains: The Canonical Ensemble via Continuous Dynamics. *The Journal of Chemical Physics* **1992**, 97 (4), 2635–2643.

- (34) Tetrahydrofuran anhydrous, $\geq 99.9\%$, inhibitor-free | 109-99-9
https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sial/401757?gclid=Cj0KCQjw_dWGBhDAARIsAMcYuJy1lvec52E5nXszzN86HfSZSuaHXDPB766wgS5z2S6OAUx4KUmEXIaAvJHEALw_wcB (data de acesso 2021 -06 -25).
- (35) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1998**, *52* (12), 7182.
- (36) Abascal, J. L. F.; Vega, C. A General Purpose Model for the Condensed Phases of Water: TIP4P/2005. *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *123* (23), 234505.
- (37) L, M.; R, A.; EG, B.; JM, M. PACKMOL: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. *Journal of computational chemistry* **2009**, *30* (13), 2157–2164.
- (38) GROMACS - Gromacs https://www.gromacs.org/About_Gromacs (data de acesso 2021 -06 -25).
- (39) Bernardes, C. E. S. AGGREGATES: Finding Structures in Simulation Results of Solutions. *Journal of Computational Chemistry* **2017**, *38* (10), 753–765.
- (40) OriginLab - Origin and OriginPro - Data Analysis and Graphing Software <https://www.originlab.com/> (data de acesso 2021 -06 -29).

Anexos

Anexo A – Tabela com os valores de parâmetros de malha experimentais e os obtidos através das simulações.

ZOYMOP03 - FI						
Método	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ
Experimental	6.208	44.437	6.270	90	107.1	90
OPLS	6.241	44.945	6.259	89.997	106.24	90.001

ZOYMOP04 – FVI						
Método	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ
Experimental	6.178	21.797	6.288	90	106.897	90
OPLS	6.246	22.121	6.423	89.998	106.912	90.001

ZOYMOP06 – FVII						
Método	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ
Experimental	13.105	5.903	10.829	90	97.64	90
OPLS	13.203	5.937	10.819	89.998	98.63	90.001

ZOYMOP07 – FIII						
Método	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ
Experimental	14.534	10.379	11.825	90	111.559	90
OPLS	14.469	10.488	11.802	89.98	109.58	90.06

ZOYMOP08 – FII						
Método	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ
Experimental	6.641	11.442	22.085	90	90	90
OPLS	6.589	11.689	22.350	90.01	90	90.001