

MÉTODOS SIMPLES DE FORMAÇÃO DE MONOCRISTAL DE SUBSTÂNCIA ORGÂNICA PARA ESTUDO ESTRUTURAL POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X<sup>#</sup>

Silvio Cunha

Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290 Salvador – BA, Brasil

Recebido em 7/1/08; aceito em 8/2/08; publicado na web em 10/3/08

SIMPLE METHODS OF MONOCRYSTAL FORMATION OF ORGANIC COMPOUNDS FOR X-RAY STRUCTURAL STUDIES.

This work presents three operationally simple laboratory protocols for monocrystal growth of small-molecule organic compounds, which have been applied with success in the last ten years for the formation of single crystals for X-ray structural studies. In addition, five structure hints were formulated as general guidelines for selecting a small-molecule organic compound as a candidate for monocrystal growth: molecular weight >200 D, melting point >100 °C, two or more aromatic rings in the structure, at least two sites for intermolecular hydrogen bond formation, and a halogen or other heavy atom in the structure.

Keywords: monocrystal growth; X-ray; structural studies.

Conhecer a estrutura de pequenas moléculas, tanto sintéticas quanto isoladas de fontes naturais, é uma das principais preocupações dos químicos e influencia diversas áreas da ciência. Assim, é necessário determinar o arranjo dos átomos nas moléculas para entender as propriedades químicas, físicas e biológicas. Em particular, a determinação estrutural de micromoléculas de substâncias orgânicas é atividade rotineira na pesquisa em química orgânica.<sup>1</sup> Para este fim, há uma variedade de técnicas químicas e físicas, estas últimas associadas principalmente aos métodos espectroscópicos e espectrométricos. Entretanto, poucos são os recursos disponíveis quando se faz necessário saber a distribuição espacial relativa dos átomos constituintes de uma dada molécula. Para isto, é necessário o emprego de uma técnica que nos auxilie na obtenção de informações ao nível da resolução atômica, permitindo obter, mesmo que indiretamente, a correspondente imagem. Dentre as alternativas existentes, uma das mais frutíferas é a que faz uso da difração dos raios X.

Apesar dos avanços nas técnicas espectrométricas empregadas na elucidação estrutural, notadamente em ressonância magnética nuclear, existem muitos casos em que a elucidação completa não se dá de maneira inequívoca. Como exemplo, basta citar alguns casos recentes de dedução estrutural equivocada de produtos naturais, cuja revisão tem sido necessária após a síntese total da estrutura proposta, onde as propriedades da substância sintetizada diferem do relatado como sendo o produto natural em questão.<sup>2-4</sup> Em outras situações, a elucidação das questões estereoquímicas, como a configuração absoluta de centros estereogênicos ou a disposição relativa de grupos de átomos na cadeia carbônica principal, só é possível através da determinação estrutural pelo método da difração de raios X. Dessa forma, a obtenção do monocrystal da micromolécula da substância orgânica sob estudo, ou de um derivado, passa a ser a etapa determinante da elucidação estrutural.<sup>5</sup> Adicionalmente, a obtenção de monocristais se faz necessária também para a obtenção da estrutura tridimensional cristalina e a determinação das interações intra e intermoleculares, tais como pontes de hidrogênio clássicas e não-clássicas, interações do tipo C-H... $\pi$ , determinação de sintons supramoleculares, etc.<sup>6</sup>

No nosso grupo de pesquisa em síntese orgânica e bioatividade molecular (GPSQ), tivemos que lançar mão, por diversas vezes, da determinação da estrutura cristalina para a elucidação estrutural inequívoca, bem como para obter informações sobre as interações intermoleculares e sua possível correlação com a atividade biológica dos compostos. Desta necessidade se estabeleceu uma frutífera colaboração entre o grupo de síntese orgânica do IQ-UFBA e o grupo de cristalografia do IF-UFG.<sup>7-22</sup> O crescimento de cristal passou a ser, então, atividade rotineira no GPSQ. Todavia, a falta de familiaridade do químico orgânico com as técnicas de crescimento de cristal representa uma lacuna na sua formação, e limita sobremaneira a possibilidade de explorar, em todos os detalhes possíveis, a estrutura da substância por ele sintetizada ou isolada de fonte natural. Apesar de existirem descrições muito didáticas sobre métodos de crescimento de cristais,<sup>23,24</sup> as técnicas apresentadas são relativamente sofisticadas para que sejam empregadas de forma disseminada entre químicos orgânicos, e, geralmente, foram desenvolvidas e exemplificadas no crescimento de monocristais de substâncias inorgânicas e compostos de coordenação, em que a cristalinidade é relativamente mais acentuada em função da atuação de forças iônicas. Para a maioria das substâncias orgânicas atuam apenas as forças de natureza covalentes, o que torna menos acentuada a cristalinidade. Por estes motivos, decidimos apresentar aqui três técnicas simples de crescimento de cristais de micromoléculas de substâncias orgânicas, que utilizamos com sucesso no nosso grupo de pesquisa e que são acessíveis a qualquer laboratório químico, com a intenção de contribuir para sanar esta lacuna na formação dos químicos orgânicos. Exemplos das aplicações dessas técnicas podem ser encontrados nas publicações do GPSQ.<sup>7-22</sup>

Para avaliar se é exequível crescer um monocrystal de uma substância orgânica de massa molecular pequena, algumas diretrizes empíricas podem ser formuladas a título de guia geral. É importante destacar que os critérios apresentados a seguir não são exclutivos nem absolutos, e representam as nossas observações ao longo de uma década de experiência na avaliação do potencial de cristalinidade de micromoléculas de substâncias orgânicas. Dessa forma, para que uma substância orgânica venha a fornecer um monocrystal com as características adequadas à obtenção da estrutura cristalina via difração de raios X, ao menos dois dos critérios apresentados a seguir devem ser observados,<sup>7-22</sup> e quanto maior o

<sup>#</sup>Este artigo é dedicado, com admiração e estima, à Professora Helena M. C. Ferraz, a Grande Dama da Síntese Orgânica Brasileira.

\*e-mail: silviode@ufba.br

número de critérios atendidos maiores são as chances de se obter monocristal: massa molecular acima de 200 D; ponto de fusão superior a 100 °C; possuir dois ou mais anéis aromáticos; ter dois ou mais sítios de formação de pontes de hidrogênio intermoleculares; ter na estrutura átomo de halogênio ou outros átomos pesados.

### GENERALIDADES SOBRE OS EXPERIMENTOS DE CRESCIMENTO DE MONOCRISTAL

Os três métodos apresentados a seguir baseiam-se na lenta formação de uma solução saturada do sólido em estudo. Todos os experimentos de crescimento de monocristal podem ser realizados em bancadas típicas de laboratório de síntese, desde que não submetidas a vibrações de equipamentos, fiquem longe de correntes de ar e de fontes de aquecimento e, também, sem incidência direta de luz solar. Para solubilizar a amostra do sólido, emprega-se um solvente polar de ponto de ebulição maior que 50 °C. São solventes típicos, em ordem de preferência, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e 1,2-dicloroetano (DMSO e DMF apenas em casos extremos). Se forem observadas partículas em suspensão, a solução deve ser filtrada para um recipiente limpo, caso contrário pode haver crescimento de cristais geminados, na maioria das vezes inadequados para o experimento de difração de raios X. O solvente apolar indicado nas Figuras 1-2 refere-se a solvente de baixa polaridade e ponto de ebulição inferior a 50 °C. São solventes típicos, em ordem de preferência, pentano, éter de petróleo, hexano, éter etílico e, em caso extremo, diclorometano. Quando do uso do par de solventes, como nos Métodos 1 e 2 abaixo descritos, pares de solventes típicos são, para o Método 1, clorofórmio/pentano, clorofórmio/éter de petróleo, acetato de etila/pentano, acetato de etila/éter de petróleo, etanol/éter etílico; e, para o Método 2, clorofórmio/hexano, diclorometano/hexano, etanol/éter etílico. Adicionalmente, não se deve mover o recipiente de lugar após a introdução do segundo líquido, como especificado em cada caso. Em todos os procedimentos, o aparecimento de cristais pode durar semanas, sendo que, quando formados, devem ser removidos do seio da solução com o auxílio de uma espátula metálica, imediatamente depositados em papel absorvente e delicadamente envolvidos com este, para remoção do excesso do solvente, pois se deixados secar ao ar podem aparecer trincas no cristal.

#### Método 1

Baseia-se na saturação líquido-vapor de um líquido de polaridade superior pelo vapor de um segundo líquido de polaridade inferior e pressão de vapor superior ao primeiro. Assim, em função da volatilização preferencial do líquido de menor ponto de ebulição, a câmara de saturação fica enriquecida com os vapores deste líquido, que lentamente difundem na solução do sólido/líquido polar, o que diminui lenta e gradualmente a polaridade da solução, diminuindo a solubilidade da amostra e proporcionando a lenta formação de cristais.

#### Procedimento

Em um frasco de 10 mL de capacidade (tipo frasco de penicilina) solubilizar cerca de 10-20 mg do sólido na menor quantidade possível de um solvente polar. Para garantir que a solução não fique saturada, adicionar metade da quantidade inicial requerida. Se observar partículas em suspensão, filtrar para outro frasco de igual capacidade. Introduzir, com o auxílio de uma pinça metálica, o frasco contendo a solução no centro de outro recipiente de maior capacidade e que possa ser hermeticamente fechado (como frascos de vidro de alimento pastoso para bebês, ou frasco pequeno de vidro de café solúvel, maionese, etc.). Com uma pipeta, adicionar lentamente e com cuidado o líquido de menor ponto de ebulição na

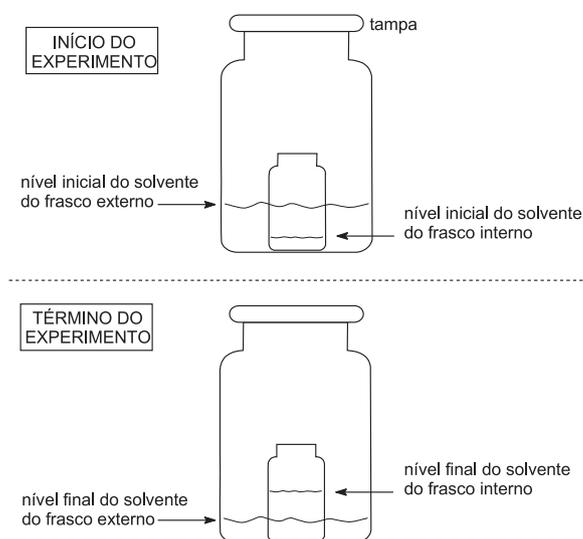


Figura 1. Representação esquemática do Método 1 de crescimento de monocristal

cavidade do recipiente maior, de tal forma que o nível do líquido que circunda o recipiente menor fique acima do nível da solução contida neste. Deve-se tomar cuidado para não adicionar uma quantidade excessiva do líquido de menor ponto de ebulição, para que a força empuxo não provoque o tombamento do recipiente menor contendo a solução. Fechar com cuidado o frasco maior, deixar o sistema em repouso e aguardar o aparecimento dos cristais.

#### Método 2

Baseia-se na difusão lenta de um líquido de menor polaridade em outro de maior polaridade, em função de pequena área superficial de contato entre eles, proporcionado pelo emprego de um tubo de vidro longo ( $\geq 15$  cm) e de diâmetro interno pequeno ( $< 1,0$  cm). Apesar de solúveis, a lenta adição do líquido apolar proporciona, no início do experimento, a formação de um menisco indicativo da interface de contato entre os líquidos. Em alguns casos, dependendo do par de solventes, este menisco pode não ser perceptível no fim do experimento.

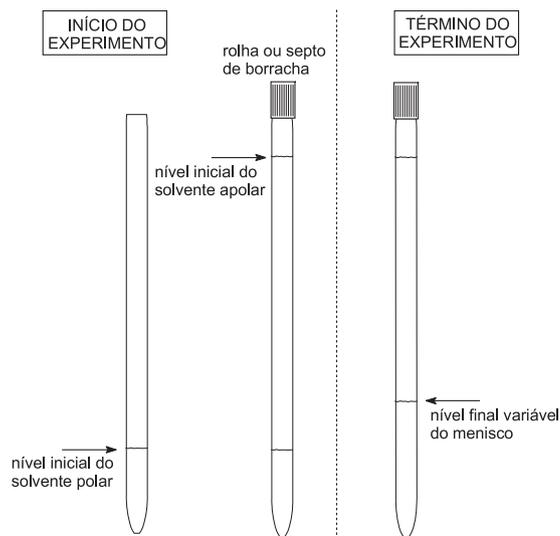


Figura 2. Representação esquemática do Método 2 de crescimento de monocristal

### Procedimento

Preparar uma solução de 10-20 mg do sólido na menor quantidade possível de um solvente polar. Para garantir que a solução não fique saturada, adicionar metade da quantidade inicial requerida. Se observar partículas em suspensão, filtrar para outro frasco. Fixar na posição vertical um tubo de vidro longo e estreito. Com o auxílio de uma pipeta, transferir uma parte da solução, não deixando que gotas da solução toquem nas paredes do tubo de vidro. Para isto, introduzir a pipeta até quase o fundo do tubo, e só então deixar escoar lentamente a solução, até que o volume escoado não ultrapasse um quinto (1/5) do comprimento do tubo. Com uma pipeta de Pasteur de ponta longa e estreita, adicionar cuidadosamente um solvente de menor polaridade, tocando a ponta da pipeta na parede interna do tubo de vidro e deixando escoar o líquido, lentamente no início da transferência de tal forma a não provocar turbilhamento no contato entre os líquidos, e mais rapidamente após a formação do menisco. Adicionar o líquido de menor polaridade até que o nível atinja a parte superior do tubo. Fechar hermeticamente o tubo com uma rolha ou septo de borracha, deixar o sistema em repouso e aguardar o aparecimento dos cristais, que são formados na interface dos solventes, no menisco, e são coletados por meio de uma espátula fina e comprida (esta espátula longa pode ser construída empregando-se um pedaço de arame flexível, usado em construção civil, com uma das extremidades amassada, arredondada e levemente curvada).

### Método 3

É o método operacionalmente mais simples, e se baseia na evaporação lenta do solvente da solução do sólido em estudo, com saturação lenta desta solução. Também é o método mais demorado.

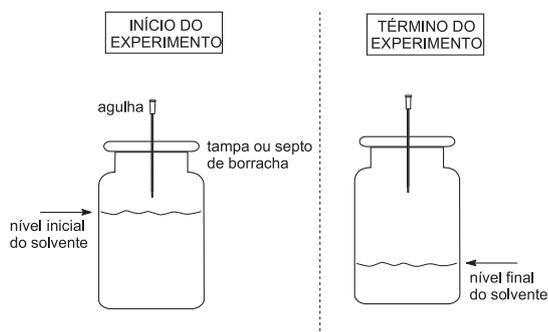


Figura 3. Representação esquemática do Método 3 de crescimento de monocristal

### Procedimento

Em um frasco de 10 mL de capacidade (tipo frasco de penicilina) solubilizar cerca de 10-20 mg do sólido na menor quantidade possível de um solvente de ponto de ebulição não superior a 80 °C. Para garantir que a solução não fique saturada, adicionar metade da quantidade inicial requerida. Se observar partículas em suspensão, filtrar para outro frasco de igual capacidade. Fechar hermeticamente o frasco com uma tampa ou septo de borracha e introduzir uma agulha no centro da tampa, deixando a ponta da agulha quase tocar na superfície do líquido. Deixar o sistema em repouso e aguardar o aparecimento dos cristais.

A escolha do método a ser empregado não é uma decisão trivial. No nosso grupo de pesquisa, quando não há grande limitação da quantidade de sólido em estudo, empregamos simultaneamente os três métodos. Quando o tempo não é limitante, empregamos o Método 3 com uma variedade de solventes. Se o tempo e/ou a massa

for o fator limitante, o Método 2 é o de escolha. Todavia, faz-se necessário enfatizar que os Métodos acima descritos não são infalíveis. Apesar do sucesso do nosso grupo na aplicação destas técnicas, ilustrado através do representativo número de publicações de estudo estrutural por difração de raios X,<sup>7-22</sup> muitos também foram os exemplos de tentativas sucessivas de um mesmo Método para uma dada amostra, até a obtenção do monocristal, e também muitos foram os casos de insucesso, mesmo quando a maioria das cinco características acima descritas como indicativas de cristalinidade era contemplada na estrutura da substância em estudo. Como toda ciência experimental, o crescimento de um monocristal requer obediência à técnica, destreza, perseverança, paciência e sorte.

Por fim, a associação entre químicos orgânicos e cristalógrafos resulta numa fecunda troca de experiências e percepções sobre as propriedades do estado sólido, principalmente acerca das forças intermoleculares que regem o reconhecimento molecular e que resultam na formação de um monocristal de micromoléculas orgânicas. Entretanto, crucial para o sucesso desta parceria é a destreza do químico na obtenção do monocristal com qualidade para o estudo estrutural por difração de raios X. Os métodos aqui descritos são simples e passíveis de emprego em qualquer laboratório de química orgânica, inclusive de graduação. Desta forma, espera-se que o químico orgânico possa empregá-los de forma rotineira na solução da estrutura tridimensional das substâncias por ele sintetizadas ou isoladas de fontes naturais. Mais ainda, que ao se associar com o cristalógrafo passe a incorporar parte do arcabouço cognitivo desta poderosa ciência, e aprenda que muita química emerge da cristalografia.<sup>25</sup>

### AGRADECIMENTOS

O autor tem uma dívida de gratidão com os Profs. I. Vencato, C. Lariucci, H. B. Napolitano e J. R. Sabino pela generosa jornada cristalográfica e, também, com o dedicado grupo de estudantes, cujos nomes aparecem nas referências, que tornaram possível o emprego dos métodos aqui apresentados. Agradece ainda o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

### REFERÊNCIAS E NOTAS

1. Para uma perspectiva histórica da determinação estrutural, ver: Jensen, W. P.; Palenik, G. J.; Suh, I.-H.; *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 753.
2. Gao, X.; Snider, B. B.; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5517.
3. Chan, J.; Jamison, T. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10682.
4. Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Huang, X.; Simonsen, K. B.; Koumbis, A. E.; Bigot, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10162.
5. Para um contraponto ao uso de difração de raios X como prova estrutural em detrimento de outras técnicas, ver: Labinger, J. A.; Weininger, S. J.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2612.
6. Moulton, B.; Zaworotko, M. J.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1629.
7. Cunha, S.; Costa, M. B.; Napolitano, H. B.; Lariucci, C.; Vecanto, I.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1671.
8. Cunha, S.; Silva, V. C.; Napolitano, H. B.; Lariucci, C.; Vencato, I.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 107.
9. Cunha, S.; Rodrigues Jr., M. T.; Silva, C. C.; Napolitano, H. B.; Vencato, I.; Lariucci, C.; *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10536.
10. Cunha, S.; Oliveira, S. M.; Rodrigues Jr., M. T.; Bastos, R. M.; Ferrari, J.; Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Napolitano, H. B.; Vencato, I.; Lariucci, C.; *J. Mol. Struct.* **2005**, *752*, 32.
11. Cunha, S.; Bastos, R. M.; Silva, P. O.; Costa, G. A. N.; Vencato, I.; Lariucci, C.; Napolitano, H. B.; Oliveira, C. M. A.; Kato, L.; Silva, C. C.; Menezes, D.; Vannier-Santos, M. A.; *Monatsh. Chem.* **2007**, *138*, 111.
12. Cunha, S.; Macedo Jr, F. C.; Costa, G. A. N.; Rodrigues Jr, M. T.; Verde, R. B. V.; Souza Neta, L. C.; Vencato, I.; Lariucci, C.; Sá, F. P.; *Monatsh. Chem.* **2007**, *138*, 511.

13. Vencato, I.; Cunha, S.; Rocha, V.; Rocha, Z. N.; Lariucci, C.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2004**, *60*, o1704.
14. Vencato, I.; Cunha, S.; Ferrari, J.; Napolitano, H. B.; Lariucci C.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2004**, *60*, o2479.
15. Vencato, I.; Cunha, S.; Ferrari, J.; Lariucci, C.; Xavier, L. C.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o3581.
16. Vencato, I.; Cunha, S.; Ferrari, J.; Sabino, J. R.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o4062.
17. Cunha, S.; Vencato, I.; Rodrigues Jr, M. T.; Macedo Jr, F. C.; Sabino, J. R.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o1408.
18. Sabino, J. R.; Cunha, S.; Bastos, R. M.; Vencato, I.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o3918.
19. Sabino, J. R.; Vencato, I.; Bastos, R. M.; Cunha, S.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2007**, *63*, o2852.
20. Sabino, J. R.; Vencato, I.; Bastos, R. M.; Cunha, S.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2007**, *63*, o2851.
21. Sabino, J. R.; Lariucci, C.; Bastos, R. M.; Cunha, S.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2007**, *63*, o2850.
22. Sabino, J. R.; Damasceno, F.; Cunha, S.; *Acta Crystallogr., Sect E: Struct. Rep. Online* **2007**, *63*, o1913.
23. Flint, E.; *Principes de Cristallographie*, Éditions de la Paix: Moscou, sd, cap. 2 (disponível na Biblioteca Central da Universidade Federal de Uberlândia).
24. [http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/xtal/cristal\\_wfa.pdf](http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/xtal/cristal_wfa.pdf), acessada em Dezembro 2007.
25. Desiraju, G. R.; *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 270.