MÓNICA SOTO MONSALVE

**Determinação Estrutural por Difração de Raios X de Pirrolidinas Poli-hidroxiladas
com Potencial Atividade Inibidora de Purina Nucleosídeo Fosforilase**

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MÓNICA SOTO MONSALVE

**Determinação Estrutural por Difração de Raios X de Pirrolidinas Poliidroxiadas
com Potencial Atividade Inibidora de Purina Nucleosídeo Fosforilase**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena de Almeida Santos.

Versão Corrigida

São Carlos

2017

Agradecimentos

Expresso aqui meus agradecimentos a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Especialmente:

- À profa. Dra. Regina Helena de Almeida pela orientação, apoio e confiança durante a realização deste trabalho;
- Ao prof. Dr. Julio Zukerman e a Profa. Dra. Ignez Caracelli pela cooperação e discussões do trabalho;
- Ao prof. Dr. Richard D`vries pelas cooperações e constantes sugestões durante a elaboração do projeto, assim como sua companhia, carinho e paciência;
- Ao prof. Dr. Manuel Chaur pela cooperação;
- À colega Sinara Freire pelos aportes e discussões;
- Ao prof. Dr. Alberico Borges por disponibilizar recursos e equipamentos;
- Ao pessoal da pós-graduação e da Química Teórica e Estrutural pela prestatividade.
- A minha família pelo incentivo e constante apoio incondicional;
- Aos amigos Martín, Cristina, David e especialmente ao Julio Cesar pelo apoio emocional e excelente companhia;
- Ao Instituto de Química de São Carlos pelo espaço e o apoio institucional;
- À CNPq pela bolsa concedida.

Conteúdo

Resumo	14
Abstract.....	15
1 Introdução	16
1.1 Aaçúcares e Purina Nucleosídeo Fosforilase	16
1.2 Docking Molecular	22
1.3 Difração de Raios X	24
1.4 Interações Intermoleculares	30
1.4.1 Ligação de Hidrogênio.....	30
1.4.2 Interações π	32
1.4.3 Superfícies de Hirshfeld.....	33
2 Objetivos	36
3 Metodologia.....	37
3.1 Coleta e Tratamento de Dados Cristalográficos.....	38
3.2 Superfícies de Hirshfeld	39
3.3 Docking Molecular.....	39
4 Resultados e Discussão.....	41
4.1 Determinação das Estruturas	41
4.1.1 4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato (A46).....	42
4.1.2 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A48).....	47
4.1.3 2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A53)	53
4.1.4 1-etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (A59)	59
4.1.5 5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1H-pirrolidin-1-carboxilato (NO2)	64
Comparação das Estruturas	69

4.2	Modelagem Molecular Frente a Enzima PNP	71
4.2.1	4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato (A46).....	80
4.2.2	1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A48).....	82
4.2.3	2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A53)	84
4.2.4	1-etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (A59)	86
4.2.5	5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1H-pirrolidin-1-carboxilato (NO2)	88
4.2.6	Comparação dos Resultados do Docking.....	90
5	Conclusões	94
6	Anexos.....	97
7	Apêndice.....	111
8	Referências	133

Lista de Abreviaturas

A46	4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato
A48	1-(Etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato
A53	2-(4-Metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato
A59	1-Etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato
dCK	Deoxicitidina quinase
dGMP	Deoxiguanosine monofosfato
dGTP	Deoxiguanosine-5-trifosfato
dGuo	2-Deoxiguanosine
DIH	3-Hidroxi-4-hidroximetil-1-(4-oxo-4,4A,5,7A-tetrahidro-3H-pirrolo[3,2]pirimidin-7-ilmetil)-pirrolidina
dNDP	Deoxinucleosídeo difosfato
dNTP	Deoxinucleosídeo trifosfato
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Docking
GUA	Guanina
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
HsPNP	Purina nucleosídeo fosforilase humana
K _i	Constante de inibição
MeS-DAD-Me-ImmH	7-(3-Hidroxi-4-metilsulfanilmetil-pirrolidin-1-ilmetil)-3,5-diidro-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-ona
MeS-ImmH	7-(3,4-Diidroxi-5-metilsulfanilmetil-pirrolidin-2-il)3,5-dihidro-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-ona
NDP	Nucleosídeo difosfato

NO2	5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1 <i>H</i> -pirrolidin-1-carboxilato
PDB	Protein Data Bank
PhS-ImmH	7-(3,4-Diidroxi-5-fenilsulfanilmetil-pirrolidin-2-il)-3,5-dihidro-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-ona
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PrS-DADMe-ImmH	7-(3-Hidroxi-4-propilsulfanilmetil-pirrolidin-1-ilmetil)-3,5-diidro-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-ona

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura trimérica da enzima HsPNP, representada como fita sólida.	17
Figura 2. Diagrama ilustrativo do processo de apoptose.....	19
Figura 3. Principais efeitos metabólicos da deficiência ou inibição da enzima PNP.	20
Figura 4. Inibidores da enzima PNP análogos da purina.....	21
Figura 5. Quantidade de publicações nos últimos 20 anos nas áreas de descoberta de fármacos, docking molecular e a união de ambas as áreas.....	22
Figura 6. Difração de raios X de um plano cristalino ilustrando a Lei de Bragg.....	25
Figura 7. Construção de um reflexão 3D a partir dos dados 2D.....	26
Figura 8. Geometrias de interação π e representação da atração eletrostática: a) C–H $\cdots\pi$ ou forma de T, b) paralela deslocada e c) face-a-face ou sanduiche.....	32
Figura 9. Representação das estruturas de Lewis dos precursores de azaçúcares A46, A48, A53, A59 e NO ₂	37
Figura 10. Representação ORTEP do composto A46 com os elipsoides a 50% de probabilidade.....	42
Figura 11. Ligação de hidrogênio (Å) entre a) C5–H5 $\cdots$ O4 (i) e b) C7–H7A $\cdots$ O1 (ii). Códigos de simetria: (i) 2-x,-y,1-z (ii) -1/2+x,-1/2-y,-1/2+z	43
Figura 12. Cadeias em zig-zag formadas pelas interações intermoleculares ao longo da direção [001]. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.	43
Figura 13. Representação do empacotamento cristalino do composto A46. Vista ao longo do eixo [100].	44
Figura 14. Superfície de Hirshfeld do composto A46, mostrando as ligações de hidrogênio e as interações C–H $\cdots\pi$	45
Figura 15. Gráficos de impressão digital 2D para o composto A46, mostrando a contribuição percentual de cada tipo de interação à superfície de Hirshfeld.....	46
Figura 16. Representação ORTEP do composto A48 sendo a) parte 1 e b) parte 2 com os elipsoides a 50% de probabilidade.	47
Figura 17. a) Ligação de hidrogênio entre C4–H4A $\cdots$ O6 e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: -x,1/2+y,1/2-z	48

Figura 18. a) Ligação de hidrogênio entre C11–H11C...O3A e b) Formação da cadeia ao longo da direção [001]. Código de simetria: $x, 3/2-y, -1/2+z$	49
Figura 19. a) Interação fraca entre C18–H18B ... π e b) Formação da cadeia ao longo da direção [100]. Código de simetria: $1-X, -1/2+Y, 1/2-Z$	49
Figura 20. Representação do empacotamento cristalino do composto A48. Vista ao longo do eixo b	50
Figura 21. Superfície de Hirshfeld para o composto A48.	51
Figura 22. Gráfico de impressão digital 2D para o composto A48	52
Figura 23. Representação ORTEP do composto A53 com os elipsoides a 50% de probabilidade	53
Figura 24. a) Ligação de hidrogênio entre C4–H4B...O7 e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: $1/2-x, -1/2+y, 1/2-z$	55
Figura 25. Ligação de hidrogênio não clássica entre C6–H6A...O1. Código de simetria: $-x, 1-y, -z$	55
Figura 26. Interação fraca entre C21–H21C... π	56
Figura 27. Representação do empacotamento cristalino do composto A53. Vista ao longo do eixo [010].	56
Figura 28. Superfície de Hirshfeld para o composto A53.	57
Figura 29. Gráfico de impressão digital 2D para o composto A53	58
Figura 30. Representação ORTEP do composto A59 com os elipsoides a 50% de probabilidade	59
Figura 31. Ligação de hidrogênio entre C9–H9B...O6. Código de simetria: $2-x, 2-y, 1-z$	60
Figura 32. a) Ligação de hidrogênio entre C11–H11A...O8 e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: $x, -1+y, z$	60
Figura 33. a) Ligação de hidrogênio bifurcada entre C3–H3...O1 (i) e C3–H3...O3 (i) e b) Formação da cadeia ao longo da direção [100]. Código de simetria: (i) $-1+x, y, z$	61
Figura 34. Representação do empacotamento cristalino do composto A59. Vista ao longo do eixo [010].	61
Figura 35. Superfície de Hirshfeld para o composto A59.	62
Figura 36. Gráfico de impressão digital 2D para o composto A59	63
Figura 37. Representação ORTEP do composto NO2 com os elipsoides a 50% de probabilidade	64

Figura 38. a) Ligação de hidrogênio entre C12–H12A...O4 (i) e C10–H10...O4 (i) e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: $x, -1+y, z$	65
Figura 39. Ligação de hidrogênio entre C8–H8A...O2 (i). Código de simetria: $-x, 1/2+y, -z$	66
Figura 40. a) Ligação de hidrogênio entre C14–H14B...O5 (i) e b) Formação da cadeia ao longo da direção [100]. Código de simetria: $1+x, -1+y, z$	66
Figura 41. Representação do empacotamento cristalino do composto NO ₂ , vista ao longo do eixo [010].	67
Figura 42. Superfície de Hirshfeld para o composto NO ₂	67
Figura 43. Gráficos de impressão digital 2D para o composto NO ₂	68
Figura 44. Distribuição porcentual das contribuições das diferentes interações à superfície de Hirshfeld dos compostos A46, A48, A53, A59 e NO ₂	70
Figura 45. Estrutura da enzima PNP 1RSZ com os ligantes DIH e sulfato. As moléculas de água foram retiradas para melhor visualização.	71
Figura 46. Fórmula estrutural do ligante DIH e os inibidores Mes-ImmH, PhS-ImmH, MeS-DADMe-ImmH e PrS-DAD-ImmH.	73
Figura 47. Superposição dos resultados do docking molecular dos inibidores.	74
Figura 48. Interações do ligante DIH com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	75
Figura 49. Interações do inibidor MeS-ImmH com a PNP. Alguns resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	76
Figura 50. Interações do inibidor PhS-ImmH com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	77
Figura 51. Interações entre o inibidor MeS-DADMe-ImmH com a PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	78
Figura 52. Interações entre o inibidor PrS-DADMe-ImmH e a PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	79
Figura 53. Interações entre o composto A46 e a PNP.	81
Figura 54. Interações do composto A48 com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	83
Figura 55. Interações do composto A53 com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	85
Figura 56. Interações do composto A59 com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.	87

Figura 57. Interações do composto NO2 com a enzima PNP.	89
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sítio ativo da enzima PNP com substratos e análogos (BZOWSKA et al., 2000).	18
Tabela 2. Características gerais das ligações de hidrogênio segundo sua força (GRABOWSKI, 2009).	31
Tabela 3. Dados cristalográficos e de refinamento para os azaçúcares.	41
Tabela 4. Distâncias (Å) e anglos (°) de ligação de hidrogênio para o composto A46.	42
Tabela 5. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto A8.	49
Tabela 6. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto A53.	54
Tabela 7. Distâncias (Å) e ângulos(°) de ligação de hidrogênio para o composto A59.	60
Tabela 8. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto NO2.	65
Tabela 9. Resultados do redocking rígido da PNP com DIH.	72
Tabela 10. Resultados do docking flexível do ligante DIH e os inibidores MeS-ImmH, PhS-ImmH, MeS-DADMe-ImmH e PrS-DADMe-ImmH.	74
Tabela 11. Interações do ligante cristalográfico DIH300 com a proteína PNP 1RSZ.	75
Tabela 12. Interações do inibidor MeS-ImmH com a enzima PNP.	76
Tabela 13. Interações entre o inibidor PhS-ImmH e a PNP.	77
Tabela 14. Interações entre o inibidor MeS-DADMe-ImmH e a PNP.	78
Tabela 15. Interações do inibidor PrS-DADMe-ImmH.	79
Tabela 16. Resultados do docking do composto A46 com a enzima PNP.	80
Tabela 17. Interações entre o composto A46 e a enzima PNP.	81
Tabela 18. Resultados do docking do composto A48 com a enzima PNP.	82
Tabela 19. Interações do composto A48 com a enzima PNP.	82
Tabela 20. Resultados do docking do composto A53 com a enzima PNP.	84
Tabela 21. Interações do composto A53 com a enzima PNP.	85

Tabela 22. Resultados do docking do composto A59 com a enzima PNP.	86
Tabela 23. Interações do composto A59 com a enzima PNP.	86
Tabela 24. Resultados do docking do composto NO2 com a enzima PNP.	88
Tabela 25. Interações do composto NO2 com a enzima PNP.	89
Tabela 26. Comparação dos resultados do score de todos os compostos estudados no docking flexível.	91
Tabela 27. Interações da enzima PNP encontradas a traves do docking molecular.	93

Lista de Esquemas

Esquema 1. Reação química catalisada pela enzima PNP.	16
---	----

Resumo

Foram determinadas por meio de difração de raios X as estruturas de cinco compostos azaçúcares. Foram estudadas as interações envolvidas na formação das redes cristalinas em cada um dos compostos analisados.

Foi encontrado que nos compostos azaçúcares estudados, as interações principais são as ligações de hidrogênio do tipo C–H...O e C–H... π . Este comportamento foi verificado usando ferramentas como as superfícies de Hirshfeld e os gráficos de impressão digital.

Realizou-se o estudo de docking molecular dos compostos azaçúcares com respeito à enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP). Foi determinado que estes compostos têm a capacidade de entrar no sítio ativo da PNP. O estudo das interações dos cinco azaçúcares com a PNP mostrou que estes compostos apresentam as mesmas interações presentes em inibidores da PNP já reportados.

Abstract

Structures of five azasugars were determined by X-ray diffraction. Crystal network interactions were analyzed for each compound.

The main interaction found for these azasugar compounds is hydrogen bond as C–H...O e C–H... π . This behavior was verified by tools as Hirshfeld surface and 2D finger print plots.

Molecular docking was performed for azasugar compounds in Purine Nucleoside phosphorylase (PNP). This study confirmed that these compounds are available to enter to the PNP active site. Interactions exploration showed the same interactions for the azasugars studied and for already known PNP inhibitors.

1 Introdução

1.1 Azaçúcares e Purina Nucleosídeo Fosforilase

Os azaçúcares são açúcares nos quais o átomo de oxigênio do anel é substituído por um átomo de nitrogênio, também são descritos como pirrolidinas e piperidinas poliidroxiladas. Estes compostos têm atraído grande interesse por sua capacidade de inibir enzimas, especialmente de glicosidases (CHAPMAN *et al.*, 2003). As glicosidases estão envolvidas em processos tais como a digestão, a biossíntese de glicoproteínas e o catabolismo de polissacarídeos e glicoconjugados (ASANO *et al.*, 1997 e BERGES *et al.*, 1999). Os inibidores de glicosidases têm mostrado extraordinárias potencialidades terapêuticas no tratamento de enfermidades metabólicas, na inibição de metástases tumorais e como substâncias antibacterianas e antivirais, incluindo a importante atividade contra o vírus de imunodeficiência humana (HIV) (DAVIS *et al.*, 1999 e HUWE; BLECHERT, 1997 e POITOUT *et al.*, 1996 e RUIZ *et al.*, 1999).

Além de serem potenciais inibidores das glicosidases, a presença do anel de cinco membros, semelhante à ribosa, faz dos azaçúcares potenciais inibidores da enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP, E.C. 2.4.2.1). Esta enzima catalisa a fosforólise de purina nucleosídeos de guanina, hipoxantina e compostos nucleosídeos como ilustrado no Esquema 1. Ela é inativa em substratos adenosinas ou pirimidina nucleosídeos (KIM *et al.*, 1968).

Esquema 1. Reações químicas catalisadas pela enzima PNP.

A estrutura da enzima PNP humana consiste em um homotrímero. Cada monômero apresenta um domínio alfa-/beta- que consiste em uma associação de folhas beta rodeadas por alfa hélices (Figura 1). O modelo contém uma folha beta de oito fitas mistas e uma folha beta de cinco fitas mistas que formam um barril beta distorcido. Sete hélices alfa cercam a estrutura de folhas beta. Os resíduos que compõem as oito fitas de folhas beta são 26–31, 46–48, 67–73, 76–82, 110–120, 128–138, 188–195 e 234–242. Os resíduos que compõem as cinco fitas de folhas beta são 116–120, 128–133, 188–193, 215–218 e 238–242. As hélices alfa estão compostas pelos resíduos 8–19, 99–103, 139–142, 168–180, 203–212, 222–231 e 263–281. O monômero da PNP humana (HsPNP) contém 288 aminoácidos e uma massa molecular de 32016,7 Da (CACERES et al., 2010 e TIMMERS et al., 2008).

Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura trimérica da enzima HsPNP, representada como fita sólida.

Fonte: CANDURI *et al.*, 2005

A partir das estruturas cristalográficas da enzima PNP com diferentes ligantes, foi determinado o sítio ativo encontrando pequenas diferenças entre eles.

Na Tabela 1 encontra-se a lista de resíduos de aminoácidos do sítio ativo.

Tabela 1. Sítio ativo da enzima PNP com substratos e análogos (*BZOWSKA et al., 2000*).

Resíduo de aminoácido no sítio ativo	Tipo de interação
SER33	Ligação de hidrogênio OG do aminoácido e O1 do fosfato e N da cadeia principal e O3 do fosfato.
ARG84	Ligação de hidrogênio do NH1 do aminoácido e O2 do fosfato.
HIS86	Liga-se à ribose por interações hidrófobas. Ligação de hidrogênio NE1 do aminoácido e O2 do fosfato.
TYR88	Ligação de hidrogênio OH da tirosina e O3 da ribose.
ALA116	Ligação de hidrogênio N da cadeia principal e O3 do fosfato; liga-se também à base por interações hidrófobas.
ALA117	Liga-se à base por interações hidrófobas.
GLY118	Liga-se à base por interações hidrófobas.
GLY119	Liga-se à base por interações hidrófobas.
PHE159 da cadeia vizinha	Liga-se à base e à ribose por interações hidrófobas.
TYR192	Ligação de hidrogênio OH da tirosina e O2 do fosfato a traves de uma molécula de água.
PHE200	Liga-se à base e à ribose por interações hidrófobas.
GLU201	Ligação de hidrogênio OE2 do aminoácido e N(1)±H da base; em análogos de Gua, OQ1 e C(2)±NH ₂ .
VAL217	Liga-se à base e à ribose por interações hidrófobas.
GLY218	Liga-se à base e à ribose por interações hidrófobas.
MET219	Ligação de hidrogênio N da cadeia principal e O(2) da ribose; e liga-se à base por interações hidrófobas.
SER220	Ligação de hidrogênio OG e O4 do fosfato.
TRH242	Ligação de hidrogênio OH e C(8)±NH ₂ da base em análogos de 8-aminoGua.
ASP243	Ligação de hidrogênio Nd e O6 e Od e N(7) e Nd2 e O6, ou Nd e N(7) da base.
LYS244	Ligação de hidrogênio N e O ₆ da base
HIS257	Ligação de hidrogênio Nd1 e O(5) da ribose.

A inibição desta enzima induz a apoptose de células T, podendo-se considerar os inibidores como potenciais fármacos no tratamento de doenças relacionadas às células T, tais como leucemia, artrite reumatoide e a rejeição de tecidos transplantados (FURMAN; HOELZER, 2007).

A apoptose é o processo de morte controlada das células, sua morfologia sugere que este processo é um fenômeno programado e pode ser iniciado ou inibido por diferentes estímulos, fisiológicos e patológicos.

As mudanças estruturais acontecem em duas fases. Na primeira é observada a condensação do núcleo e o citoplasma e o rompimento da célula em pequenos fragmentos bem conservados. Na segunda fase, estes corpos são despejados de superfícies revestidas epitelialmente ou fagocitados por outras células, onde são rapidamente degradados por enzimas lisossomais do fagócito (Figura 2) (KERR et al., 1972).

Figura 2. Diagrama ilustrativo do processo de apoptose.

Fonte: KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972.

Sob condições normais, os níveis de 2-deoxiguanosina (dGuo) no plasma são quase indetectáveis ($\sim 0,004\text{M}$). dGuo não se acumula porque é metabolizado pela PNP e convertido em guanina (Gua) e deoxiribose-1-fosfato. Nos casos de deficiência em PNP ou na presença de um inibidor de PNP, os níveis de dGuo no plasma incrementam a níveis entre 2 e 15 M. dGuo então é convertido em deoxiguanosina monofosfato (dGMP) e posteriormente em deoxiguanosina-5-trifosfato (dGTP) pela enzima deoxicitidina quinase (dCK). A acumulação de dGTP produz um desequilíbrio das reservas de deoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) devido à inibição de ribonucleotídeo redutase, que leva a erros no DNA e ativa a apoptose dividindo as células T (BZOWSKA et al., 2000 e CACERES et al., 2010 e FURMAN; HOELZER, 2007), este processo é ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Principais efeitos metabólicos da deficiência ou inibição da enzima PNP

Fonte: BZOWSKA; KULIKOWSKA; SHUGAR, 2000.

Muitos dos inibidores encontrados para a PNP são análogos à purina (Figura 4). O inibidor mais conhecido é a forodesina, também conhecido como immucillin-H. Immucillin-H e immucillin-G são inibidores aza-C nucleosídeos análogos ao estado de transição do substrato da PNP. Tem sido sintetizados diversos análogos immucillin modificando as posições 2'-, 3'-, ou 5'- da fração açúcar ou as posições 6-, 7-, ou 8- da deazapurina (BALAKRISHNAN *et al.*, 2006).

Figura 4. Inibidores da enzima PNP análogos da purina

Fonte: FURMAN; HOELZER, 2007; MOMPARLER, 2013.

1.2 Docking Molecular

O reconhecimento molecular é um problema fundamental da biologia estrutural. A interação das moléculas, sejam macromoléculas ou pequenas moléculas, é uma condição para todos os eventos biológicos. A modelagem destas interações tem sido um objetivo da química computacional por mais de um século. Para conseguir rapidamente o desenvolvimento de um novo agente terapêutico, é necessário entender e ter a capacidade de prever os detalhes estruturais do reconhecimento molecular implícito em um determinado evento biológico (GSCHWEND et al., 1996).

O desenvolvimento de novos fármacos é uma área de pesquisa em constante crescimento (“Web of Science [v.5.23] - Result Analysis”, 2017). Métodos computacionais têm se convertido em uma ferramenta vital no desenvolvimento de novos fármacos, como mostra a tendência na Figura 5. Suas aplicações vão desde a identificação de acontecimentos até a otimização e abordagens como as técnicas de triagem virtual baseada na estrutura usadas na descoberta de novos fármacos, podendo até diminuir custos, mesmo não criando novos medicamentos mas melhorando sua eficiência (KUMAR et al., 2006 e MATERI; WISHART, 2007). Uma metodologia chave é a modelagem de moléculas pequenas no sítio ativo de enzimas.

Figura 5. Quantidade de publicações nos últimos 20 anos nas áreas de descoberta de fármacos, docking molecular e a união de ambas as áreas.

Fonte: (“Web of Science [v.5.23] - Result Analysis”, 2017)

O processo de docking molecular consiste na predição da conformação e orientação (ou pose) de um ligante na proteína alvo. O processo inicia com a aplicação de algoritmos que posicionam a molécula pequena no sítio ativo. Isto por si só é um desafio, já que uma molécula orgânica simples pode apresentar vários graus de liberdade conformacional. O procedimento deve ser preciso o suficiente para identificar a conformação que melhor se corresponde ao receptor da estrutura, e rápido para permitir a avaliação de milhares de compostos em uma corrida de docking.

Os algoritmos são complementados por funções de pontuação (*scoring*), desenhadas para prever a atividade biológica através da avaliação das interações entre os compostos e os potenciais alvos. As primeiras funções de *scoring* avaliavam o ajuste dos compostos baseado em cálculos de forma aproximada e complementariedades eletrostáticas (KITCHEN *et al.*, 2004).

Os métodos de docking são classificados como rígido, semirrígido e flexível. O docking rígido considera só complementariedades geométricas/físico-químicas estáticas entre o ligante e o alvo ignorando a flexibilidade e modelos de ligação de ajuste induzido. Algoritmos mais avançados consideram diferentes conformações do ligante ou receptor ou ambos ao mesmo tempo. As simulações de docking rígido são usadas quando o tempo é crítico, por exemplo se houver um grande número de compostos para serem modelados. No entanto, dependendo da flexibilidade conformacional do composto, é necessário realizar posteriormente o docking flexível para refinar os resultados obtidos no docking rígido. Atualmente, como a evolução dos recursos computacionais, o docking semirrígido e flexível têm se convertido nos métodos mais comuns.

1.3 Difração de Raios X

Qualquer que seja a potencial aplicação de uma substância, o conhecimento da composição e do arranjo espacial das moléculas é de suma importância para o entendimento das propriedades e do comportamento dos compostos. A difração de raios X é uma das principais técnicas de caracterização de materiais, permitindo descrever tanto a fórmula estrutural quanto as interações intra e intermoleculares do sistema.

O requisito para usar difração de raios X na determinação da estrutura é ter um sistema organizado, como é o caso dos cristais. Os cristais são sistemas nos quais a unidade que o compõe (moléculas, átomos ou íons) está arranjado de forma regular que se repete em todas as direções do espaço tridimensional (JENNY PICKWORTH GLUSKER; KENNETH N. TRUEBLOOD, 2010). Cristais são objetos reais no espaço físico que podem ser idealizados por uma estrutura tridimensional periódica infinita no espaço pontual (espaço recíproco). Periodicidade tridimensional significa que existem translações ao longo das operações de simetria do objeto com os vectores de translação abrangendo um espaço tridimensional. O cristal também é definido como um sólido que apresenta um padrão de difração discreto (ARNOLD et al., 2002 e BEN-ABRAHAM, 2008).

Para a caracterização estrutural por raios X, a seleção do monocristal é um passo muito importante. A luz polarizada é uma ferramenta de grande ajuda na escolha do monocristal, já que serve para detectar a presença de cristais geminados (múltiplos cristais), fissuras e defeitos. Por possuírem uma estrutura regular, os cristais interagem com a luz, estas interações acontecem em determinados planos vibratórios que podem ser notados se entre o observador e a amostra se coloca um polarizador, permitindo passar a luz em um único plano, com isso é possível distinguir zonas brilhantes ou linhas, o que permite determinar se o cristal é geminado ou defeituoso. O tamanho do cristal também é importante para obter uma medida com boa qualidade. O tamanho deve ser preferencialmente de 0,1 mm até 0,2 mm em cada uma de suas dimensões.

O estudo preliminar de um cristal implica numa exploração parcial do espaço recíproco. Se são obtidos dados que correspondem a cada possível reflexão

em um volume suficiente do espaço recíproco, poderia ser calculado o espaçamento entre planos da rede cristalina para cada reflexão no espaço real e assim construir uma rede tridimensional de pontos reticulares. Esta rede deveria conter um motivo repetido, o qual poderia ser identificado por observação e representaria a cela unitária da amostra (BLAKE *et al.*, 2009). A forma como estão relacionadas as reflexões obtidas do espaço recíproco com a rede cristalina é explicada pela lei de Bragg. Esta lei determina as condições geométricas nas quais um feixe difratado pode ser observado. Na Figura 6 observam-se raios difratados dos planos reticulares dos quais se obtém interferência construtiva, a diferença no percurso deles é um número inteiro de comprimentos de onda. A lei de Bragg é expressa como:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{Equação (1)}$$

Onde θ é o ângulo de Bragg, n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios X e d é o espaçamento entre os planos.

Figura 6. Difração de raios X de um plano cristalino ilustrando a Lei de Bragg.

Fonte: BLAKE *et al.*, 2009

Na determinação da estrutura cristalina, deve-se coletar a maior quantidade de reflexões (hkl) únicas possíveis em um tempo razoável. Na lei de Bragg, a variação de d , representa a posição do cristal respeito ao feixe incidente, o ideal é coletar dados de difração para todas as orientações possíveis do cristal. No

Quando aplicadas todas as correções às medidas de intensidade, o fator de estrutura $|F_{hkl}|$ pode ser avaliado para cada conjunto de dados, obtendo assim a lista que relaciona cada h, k, l com o seu respectivo valor de $|F|$.

Cada reflexão está identificada pelos índices de Miller (hkl) e sua respectiva intensidade de difração, proporcionada pelo quadrado da amplitude ($|F_{hkl}|^2$).

O fator de estrutura para uma reflexão hkl é um número complexo que se expressa segundo a equação 3

$$F(HKL) = \sum_{j=1}^{atomos} f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad \text{Equação (3)}$$

Esta somatória é estendida em todos os átomos j , com x, y, z como suas posições expressas por coordenadas fracionárias (GIACOVAZZO *et al.*, 1992); f_j é o fator de dispersão do átomo j e depende do átomo e do ângulo de difração da reflexão correspondente (hkl).

A relação entre a estrutura de uma molécula e os fatores de estrutura possibilita encontrar de forma sistemática a estrutura de uma substância a partir das reflexões da amostra. Os fatores de estrutura e consequentemente as intensidades das reflexões estão relacionados com a densidade eletrônica de cada átomo da molécula pela transformada de Fourier na equação 4

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l f(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad \text{Equação (4)}$$

Desta forma o padrão de difração, uma imagem do espaço recíproco, é transformada para o espaço real, obtendo-se como resultado a densidade eletrônica para cada átomo, podendo-se finalmente com esta informação encontrar a estrutura da molécula. No entanto, no experimento acontece interferência construtiva e destrutiva e os resultados não oferecem informação da fase Φ , esta indeterminação é conhecida como o problema da fase. Os métodos utilizados na resolução da estrutura utilizam aproximações matemáticas para resolver este problema: método de Patterson e Métodos Diretos. Sistemas computacionais como SHELXS e SIR (SHELDRICK, 2015) permitem resolver o problema mediante a

aplicação destes métodos que recuperam um valor aproximado da fase dos fatores de estrutura.

A exatidão da determinação estrutural é definida por dois aspectos principais: a obtenção de uma estrutura quimicamente lógica e a concordância entre os fatores de estrutura observados e calculados. Esta concordância pode ser quantificada através do fator de discordância (R), expresso na equação 5

$$R = \frac{\sum ||F_0| - |F_c||}{\sum |F_0|} \quad \text{Equação (5)}$$

onde $|F_0|$ e $|F_c|$ são os fatores de estrutura observados e calculados respectivamente. Uma boa resolução é caracterizada por um valor de R baixo, o que indica alta concordância entre o modelo encontrado e os dados experimentais.

Para a obtenção de valores mais confiáveis as equações devem ser ponderadas de forma a "igualar" as contribuições de reflexões fracas e fortes gerar um coeficiente de discordância ponderado, ilustrado na equação 6

$$Rw = \left(\frac{\sum w[||F_0| - |F_c||]^2}{\sum F_0} \right)^{1/2} \quad \text{Equação (6)}$$

onde w é a função peso. O programa de refinamento da estrutura SHELXL define a função w como na equação 7

$$w = \frac{1}{\sigma^2(F_0) + q|F_0|^2} \quad \text{Equação (7)}$$

onde σ é o desvio padrão de F_0 e q é um valor ajustável.

A qualidade do ajuste (goodness on fit), representada como S é definida na equação 8

$$S = \frac{\sum w\Delta F^2}{n-m} \quad \text{Equação (8)}$$

Onde n e m são o número de reflexões e de parâmetros respectivamente.

O valor da densidade eletrônica residual $\Delta\rho$, é utilizado para determinar se o processo de resolução da estrutura está terminado, uma vez encontradas as posições de todos os átomos do modelo, a densidade eletrônica residual e portanto o valor de $\Delta\rho$ é pequeno e menor que a unidade.

1.4 Interações Intermoleculares

O trabalho do cristalógrafo consiste não só em determinar a estrutura tridimensional de uma molécula, senão também estudar suas propriedades físicas e químicas e interações tanto intra quanto intermoleculares. As interações intermoleculares são importantes para entender estruturas orgânicas, organometálicas e biomoleculares, usadas na química supramolecular, empacotamento cristalino, assim como seletividade e especificidade de uma reação, reconhecimento molecular e interações fármaco–receptor (GRABOWSKI, 2009). As interações intermoleculares são classificadas como ligações de hidrogênio, interações π , e interações de van der Waals, sendo estas últimas as mais fracas.

1.4.1 Ligação de Hidrogênio

A ligação de hidrogênio é um fenômeno de vital importância em química estrutural e biológica. A ligação de hidrogênio é formada quando um átomo de hidrogênio está ligado covalentemente a um átomo rico em elétrons como N, O e halogênios. Isto leva à polarização da ligação, fazendo com que o hidrogênio fique deficiente em elétrons atraindo os átomos ou regiões nucleófilas próximas, fazendo do primeiro grupo um doador de prótons (D) e o segundo um aceitador (A). De forma geral é representada como $D-H\cdots A$. No estado atual do entendimento de ligações de H considera-se que C–H pode estar envolvido em ligações de hidrogênio e que elétrons π podem agir como aceptadores de prótons em ligações de hidrogênio fracas que estabilizam diversos sistemas (GRABOWSKI, 2009).

A ligação de hidrogênio não é uma interação simples, é a soma de no mínimo quatro tipos de interações diferentes: eletrostáticas (ácido/base), polarização (duro/mole), van der Waals (dispersão/repulsão), e covalência (transferência de carga) (DESIRAJU, 2002). A ligação de hidrogênio é fraca, se comparada com a ligação covalente, porém é suficiente para estabilizar interações intermoleculares (CRAGG, 2010). Uma ligação de hidrogênio forte tem uma energia entre 15 e 40 kcal mol⁻¹. No caso de uma moderada ou convencional a faixa de energia está entre 4 a 15 kcal mol⁻¹. A ligação de hidrogênio fraca é de 1 a 4 kcal mol⁻¹ (GRABOWSKI, 2009). As características gerais destes três tipos de ligações de hidrogênio encontram-se listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características gerais das ligações de hidrogênio segundo sua força (GRABOWSKI, 2009).

Parâmetros	Forte	Moderada	Fraca
Tipo de interação	Fortemente covalente	Principalmente eletrostática	Eletrostática/ Dispersão
Distância de ligação H...Y (Å)	1,2–1,5	1,5–2,2	>2,2
Alongamento de X–H (Å)	0,08–0,25	0,02–0,08	<0,02
X–H Vs. H...Y	X–H $\approx$ H...Y	X–H < H...Y	X–H $\ll$ H...Y
Direcionalidade	Forte	Moderada	Fraca
Ângulo (°)	170–180	>130	>90
Energia (kcal mol ⁻¹)	15–40	4–15	<4

A ligação de hidrogênio tem a capacidade de controlar e direcionar o crescimento de redes devido ao fato de ser suficientemente forte, direcional e reproduzível (DESIRAJU; STEINER, 2001). Isto é muito importante na engenharia de cristais, já que as interações não covalentes são responsáveis pela existência, e funcionamento das supermoléculas. Isto é, a combinação da periodicidade do cristal com as interações intermoleculares é que determinam a topologia, energia e propriedades da supermolécula sólida. Baseando-se nisso, interações que combinam força e orientação permitem melhor controle do processo de agregação. Força é sinônimo de coesão e estabilidade, orientação implica controle da topologia e seletividade (MINGOS, 2004).

1.4.2 Interações π

As interações π são de grande importância na natureza. São responsáveis pela estabilização da dupla hélice do DNA, intercalação de fármacos no DNA, estrutura terciária das proteínas e contribuem nas propriedades das proteínas termofílicas, acredita-se que têm um papel importante na agregação de amiloide β na doença de Alzheimer, são vitais no reconhecimento molecular e no empacotamento cristalino (HUNTER; SANDERS, 1990 e WATERS, 2002).

O termo π stacking, foi definido por Hunter e Sanders basicamente como a atração entre anéis aromáticos onde existe contribuição de interações eletrostáticas, de van der Waals e indução, porém as duas primeiras são as mais importantes (HUNTER; SANDERS, 1990).

Existem três geometrias de interação π : C–H $\cdots\pi$ ou forma de T, paralela deslocada e face-a-face ou sanduiche (Figura 8).

Figura 8. Geometrias de interação π e representação da atração eletrostática: a) C–H $\cdots\pi$ ou forma de T, b) paralela deslocada e c) face-a-face ou sanduiche.

Fonte: WATERS, 2002

As interações de van der Waals dão uma contribuição importante às interações π , mas por serem proporcionais à área de superposição π , elas não podem ser a força que controla a geometria da interação. Se elas fossem as mais

importantes, a superposição π face-a-face seria maximizada e não se observaria deslocamento no empilhamento π (Figura 8. b).

Se a interação π é apresentada como duas nuvens de elétrons em cima e embaixo de uma região positiva σ , no empilhamento de anéis aromáticos, seria dominante a repulsão, no estudo de Hunter e Sanders encontrou-se que a atração σ - π em vez da π - π é a que leva a interações favoráveis. Então, os efeitos eletrostáticos determinam a geometria da interação, em quanto as interações de van der Waals contribuem principalmente à magnitude (HUNTER; SANDERS, 1990).

A natureza das interações π não é muito diferente de outras interações como as ligações de hidrogênio, só são complicadas devido ao grande número de grupos funcionais envolvidos. A principal diferença é que a superfície de contato intermolecular é ampla, então as interações de van der Waals e a indução ganham importância. Os princípios eletrostáticos que governam as ligações de hidrogênio aplicam também para as interações π . Há muitos mais pontos de contato onde deve ser considerada a interação eletrostática, isso dificulta a racionalização do comportamento destas interações com regras estritas como no caso das ligações de hidrogênio (HUNTER *et al.*, 2001).

1.4.3 Superfícies de Hirshfeld

Atualmente existem ferramentas que identificam as interações assim como sua classificação e ajudam a quantificar as contribuições de cada interação na formação da rede cristalina. Uma delas é mostrada pelas superfícies de Hirshfeld.

Estas superfícies mostram as áreas susceptíveis a interações fortes e fracas que podem ser identificadas por cores, curvatura côncava vermelha para região aceitadora de prótons ou com pares de elétrons livres, curvatura convexa azul para grupos doadores de prótons (HIRSHFELD, 1977 e SPACKMAN; MCKINNON, 2002).

As superfícies de Hirshfeld são construídas a partir da partição do espaço no cristal, em regiões onde a somatória das densidades eletrônicas esféricas de cada átomo é equivalente a uma molécula (a promolécula), a mesma somatória

corresponde ao cristal é definida como procrystal. A função de ponderação $w(r)$ de uma molécula pode ser definida como na equação 9 e na equação 10.

$$w(r) = \frac{\sum_{a \in \text{molécula}} \rho_a(r)}{\sum_{a \in \text{cristal}} \rho_a(r)} \quad \text{Equação (9)}$$

$$w(r) = \frac{\rho_{\text{promolécula}}}{\rho_{\text{procrystal}}} \simeq \frac{\rho_{\text{molécula}}}{\rho_{\text{cristal}}} \quad \text{Equação (10)}$$

onde $\rho_a(r)$ é a função de densidade eletrônica media esférica Hartree-Fock centrada no núcleo a (HIRSHFELD, 1977 e MCKINNON et al., 2004).

A superfície de Hirshfeld é definida em $w=0,5$. Desta forma as superfícies de Hirshfeld em particular não só envolvem a molécula, também definem o espaço onde a densidade eletrônica da promolécula supera a de todas as moléculas vizinhas. Assim, garante a máxima proximidade das superfícies vizinhas, porém nunca se superpõem pela natureza mesma da função de ponderação (SPACKMAN; JAYATILAKA, 2009). As superfícies de Hirshfeld e os volumes moleculares são muito maiores que outras superfícies e volumes convencionais, geralmente conseguem plotar no mínimo o 95% do volume do cristal. Esta metodologia representa o cristal de forma muito compacta. Diferente de outras partições ou esquemas de empacotamento, deixam poucos espaços intermoleculares. Consequentemente, as superfícies de Hirshfeld incorporam todo o espaço possível no cristal (SPACKMAN, 2013).

Embora esta superfície defina um volume molecular de forma semelhante a uma superfície de van der Waals ou uma superfície de densidade eletrônica, ela é diferente dessas outras superfícies. Essas superfícies são definidas unicamente pela própria molécula, em quanto a superfície de Hirshfeld é definida pela molécula e a vizinhança, assim contém informação acerca das interações intermoleculares. As superfícies de Hirshfeld são ideais para ilustrar propriedades como distâncias, densidade eletrônica e potenciais eletrostáticos (SPACKMAN, 2013).

A partir da superfície de Hirshfeld, é construído um gráfico chamado impressão digital 2D, onde é representado d_i vs d_e , sendo d_i a distância da superfície

até o átomo mais próximo no interior da mesma, e d_e a distância entre a superfície e o átomo mais próximo no exterior dela (SPACKMAN; MCKINNON, 2002). Nos gráficos de impressão digital é possível diferenciar a quantidade de pontos em uma determinada região por meio de um código de cor, azul<verde<vermelho. Existem também padrões que facilitam a identificação do tipo de interação no gráfico de impressão digital, por exemplo, as interações $C-H\cdots\pi$ parecem asas, interações $H\cdots H$ aparecem em regiões onde $d_e \approx d_i$ próximos do raio de van der Waals do átomo de hidrogênio. As ligações de hidrogênio por serem interações fortes, são observadas como pontas longas e afiadas (MCKINNON et al., 2004). Nesta impressão digital 2D identificam-se os aceptadores de hidrogênio por possuírem $d_i > d_e$ e os doadores de hidrogênio por possuírem $d_e > d_i$. É possível fazer estes gráficos para a molécula completa ou para só um ou dois tipos de átomos, podendo-se assim quantificar a contribuição percentual de cada interação na formação da rede (SPACKMAN; MCKINNON, 2002).

2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Determinar e descrever as estruturas dos compostos:
 - 4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato (**A46**),
 - 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (**A48**),
 - 2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (**A53**),
 - 1-etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (**A59**)
 - 5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1H-pirrolidin-1-carboxilato (**NO2**)
- Descrever as interações intermoleculares que conformam a rede cristalina usando diferentes ferramentas como Platon, Mercury e as superfícies de Hirshfeld.
- Realizar a modelagem das interações dos compostos com a enzima PNP usando a técnica de docking molecular.
 - Definir as interações dos compostos com a enzima PNP.
 - Comparar os resultados com inibidores conhecidos para determinar seu potencial inibidor da PNP.

3 Metodologia

A estrutura dos compostos do tipo azaçúcar 4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato (A46), 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil) pirrolidin-3,4-diildiacetato (A48), 2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil) pirrolidin-3,4-diildiacetato (A53), 1-etil-2-metil-3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (A59) e 5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1H-pirrolidin-1-carboxilato (NO2), cujas fórmulas estruturais são ilustradas na Figura 9, foram determinadas por difração de raios X de monocristal e modelados no sítio ativo da enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) para determinar seu potencial inibitório.

Figura 9. Representação das estruturas de Lewis dos precursores de azaçúcares A46, A48, A53, A59 e NO2.

3.1 Coleta e Tratamento dos Dados Cristalográficos

A síntese dos cinco compostos estudados foi realizada no grupo de pesquisa do professor Carlos Roque da UNICAMP (GARCIA, 2008). Os dados dos compostos A46, A48, A59 e NO₂ foram coletados a temperatura ambiente (293 K) em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD usando radiação MoK α (0,71073 Å) monocromado por grafite. A determinação dos parâmetros de cela foi realizada usando todas as reflexões com os softwares Collect (NONIUS, 1998) e Scalepack (OTWINOWSKI; MINOR, 1997). A redução e integração dos dados foram realizadas usando os softwares Denzo e Scalepack (OTWINOWSKI; MINOR, 1997).

Os dados do composto A53 foram coletados a temperatura ambiente (296 K) em um difratômetro Bruker APEX-II CCD usando radiação MoK α (0,71073 Å) monocromado por grafite. A determinação dos parâmetros de cela foi realizada usando todas as reflexões com o software Bruker SAINT (BRUKER, 2012a) incluído no sistema APEX2 (BRUKER, 2012b). A redução e integração dos dados foram realizadas usando o software Bruker SAINT (BRUKER, 2012a).

As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas utilizando o software SHELXS-2013 (SHELDRICK, 2015), usando os sistemas WinGX (FARRUGIA, 2012) e Olex-2 (DOLOMANOV *et al.*, 2009). Os átomos não hidrogênios foram refinados anisotropicamente, excetuando-se aqueles que apresentaram desordem.

As representações gráficas das moléculas foram feitas com ORTEP-3 para Windows (FARRUGIA, 2012) e Diamond (BRANDERBURG, 2014). Análises de geometria e interações foram realizadas usando o programa Platon (SPEK, 2003). Para a exploração das interações intermoleculares, foi usado Mercury (MACRAE *et al.*, 2008).

3.2 Superfícies de Hirshfeld

As superfícies de Hirshfeld e os gráficos de impressão digital 2D foram realizados usando CrystalExplorer (HIRSHFELD, 1977). As superfícies foram geradas escolhendo a opção **surface generation** e selecionando em alta resolução Hirshfeld como a superfície a ser criada e sem selecionar nenhuma propriedade. Depois de obtida a superfície, foi eleita a opção “shape index” como a propriedade da superfície.

Na obtenção dos gráficos de impressão digital 2D, foi selecionada a opção de graficar por elemento incluindo os contatos recíprocos

3.3 Docking Molecular

O primeiro passo para a realização do docking é a escolha da proteína a ser utilizada na modelagem. Foi realizada a busca na bases de dados de proteínas PDB (Protein Data Bank) (BERMAN et al., 2000). Os critérios para a escolha da estrutura da proteína foram: a estrutura devia ser a PNP humana, não mutante, que a estrutura fosse determinada por difração de raios X e que o tamanho do ligante estivesse o mais próximo do tamanho das moléculas a serem trabalhadas neste estudo. Assim a estrutura escolhida foi a 1RSZ (SHI et al., 2005).

Devido ao fato de no sítio ativo da enzima existem interações com resíduos de aminoácidos do monômero vizinho, o docking foi realizado usando o dímero. Para a realização do docking, foram removidas as moléculas de água e a molécula que seria modelada foi posicionada no lugar ocupado pelo ligante cristalográfico para uma cavidade de 6 Å em volta da cavidade deixada pelo ligante extraído e considerando o ligante como flexível.

A modelagem molecular foi realizada com o software GOLD 5.4.0 (Genetic Optimisation for Ligand Docking) (JONES et al., 1997), usando a função de scoring GoldScore, que é uma função de mecânica molecular com quatro termos (equação 11):

$$GOLD\ fitness = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int} \quad \text{Equação (11)}$$

Onde S_{hb_ext} é o score das ligações de hidrogênio proteína–ligante, S_{vdw_ext} é o score de van der Waals proteína–ligante. S_{hb_int} e S_{vdw_int} são as contribuições de ligação

de hidrogênio e interações de van der Waals intramoleculares do ligante respectivamente (VERDONK *et al.*, 2003).

A avaliação das interações dos compostos e ligantes com os resíduos de aminoácidos da PNP foi feita usando o programa Discovery Studio 3.5 Visualizer (Discovery Studio, 2005). Este programa permite encontrar ligações de hidrogênio, interações $\pi \cdots \pi$ e $C-H \cdots \pi$.

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação das Estruturas

Os dados de coleta de dados e da determinação e refinamento das 5 estruturas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados cristalográficos e de refinamento para os açúcares.

Código	A46	A48	A53	A59	NO2
Formula	$C_{12}H_{12}N_2O_4$	$C_{18}H_{20}NO_7$	$C_{23}H_{24}N_2O_9$	$C_{13}H_{19}NO_8$	$C_{28}H_{32}N_2O_5$
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	296(2)	293(2)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/n$	$P2_1/c$	$C2/c$	$P\bar{1}$	$P2_1$
a(Å) b(Å) c(Å)	9,0298(5) 2,2340(10) 10,5298(9)	9,9394(9) 9,3799(6) 20,7631(10)	23,6396(5) 8,2906(2) 24,7683(5)	6,8316(9) 7,8728(9) 15,848(2)	10,3033(10) 6,1055(9) 20,820(2)
$\alpha(^{\circ})$ $\beta(^{\circ})$ $\gamma(^{\circ})$	96,17(0)	91,502(6)	110,0130(10)	101,5640(10) 98,3970(10) 105,0670(10)	92,759(10)
Volume (Å ³)	1156,49(15)	1935,1(2)	4561,13(18)	788,46(17)	1308,2(3)
Z	4	4	8	2	4
D calculada (mgm ⁻³)	1,426	1,244	1,376	1,336	2,420
μ (mm ⁻¹)	0,109	0,096	0,107	0,112	0,166
F(000)	520	764	1984	336	1016
Reflexões coletadas	3493	6565	22357	4880	4246
Reflexões independentes	3332 [R(int) = 0,0352]	5599 [R(int) = 0,0111]	4174 [R(int) = 0,0196]	4573 [R(int) = 0,0201]	4145 [R(int) = 0,0607]
S	0,949	1,015	1,009	0,957	1,091
Índice R final [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0536 wR2 = 0,1264	R1 = 0,0784 wR2 = 0,2303	R1 = 0,0437 wR2 = 0,1068	R1 = 0,0419 wR2 = 0,0995	R1 = 0,0602 wR2 = 0,1437
Índice R (todos os dados)	R1 = 0,2223 wR2 = 0,1968	R1 = 0,1927 wR2 = 0,2913	R1 = 0,0495 wR2 = 0,111	R1 = 0,1099 wR2 = 0,1236	R1 = 0,1436 wR2 = 0,1752

4.1.1 4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato (A46)

A molécula A46 cristaliza-se no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1$. Possui dois anéis, sendo um deles aromático que se liga ao grupo $-NO_2$, e um anel de cinco membros com uma dupla ligação entre os átomos C11 e C12. O ângulo de torção entre os átomos C6–C1–N1–O1 é de $5,96(51)^\circ$. O ângulo de torção entre o anel aromático e o restante da molécula é de $-5,53(47)^\circ$, medido entre os átomos C3–C4–C7–O3. O segundo anel, de cinco membros, apresenta um ângulo de torção de $-174,56(30)^\circ$, medido entre os átomos O3–C8–N2–C9 (Figura 10).

Figura 10. Representação ORTEP do composto A46 com os elipsoides a 50% de probabilidade.

Na construção da rede cristalina, formam-se dímeros por meio da ligação de hidrogênio entre C5–H5...O4 com uma distância de $3,314(43)$ Å. Esta interação se apresenta na direção cristalográfica $[301]$, e posiciona os dímeros sobre o plano (001) . Estes dímeros ligam-se entre si por meio da interação entre C7–H7...O2 com $3,649(53)$ Å de distância C...O (Figura 11). Esta interação faz a rede crescer na direção $[001]$, formando cadeias em zig-zag apresentadas na Figura 12. Estas interações estão detalhadas na Tabela 4.

Tabela 4. Distâncias (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligação de hidrogênio para o composto A46.

D–H...A	d(D–H)	D(H...A)	d(D...A)	$\angle(DHA)$
C5–H5...O4	0,93	2,46	3,144(3)	152
C7–H7A...O1	0,97	2,71	3,6495(4)	162

Figura 11. Ligação de hidrogênio (Å) entre a) C5–H5...O4 (i) e b) C7–H7A...O1 (ii).
Códigos de simetria: (i) $2-x, -y, 1-z$ (ii) $-1/2+x, -1/2-y, -1/2+z$

Figura 12. Cadeias em zig-zag formadas pelas interações intermoleculares ao longo da direção [001]. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

Figura 13. Representação do empacotamento cristalino do composto A46. Vista ao longo do eixo [100].

Na superfície de Hirshfeld (Figura 14) é claramente observada a presença das interações intermoleculares descritas, em vermelho e com uma curvatura côncava são observados os grupos aceptores de hidrogênio, e em azul e com uma curvatura convexa os grupos doadores de hidrogênio. Neste caso os aceptores de hidrogênio são os átomos de oxigênio e nitrogênio, os doadores de hidrogênio são o grupos C–H. Na superfície de Hirshfeld são observadas também outras interações com o anel aromático como a C9–H9A $\cdots\pi$, com a distância entre o carbono e o centroide de 3,669 Å, ângulo C–H $\cdots\pi$ de 124,47° e a interação C12–H12B $\cdots\pi$ com a distância entre o carbono e o centroide de 4,057 Å e ângulo de 151,68° respectivamente, que posiciona uma molécula encima de outra ao longo do eixo **c**.

Nos gráficos de impressão digital 2D (Figura 15) observa-se que a interação que mais contribui à construção da superfície de Hirshfeld é do tipo H $\cdots$ H com 39,0% que corresponde a interações de van der Waals, seguida das interações

O $\cdots$ H correspondentes às ligações de hidrogênio com 33,8%, as interações C $\cdots$ H que incluem as C–H $\cdots$ π contribuem com 15,2%, é observada a presença de interações do tipo C $\cdots$ O, O $\cdots$ O, C $\cdots$ C, C $\cdots$ N, N $\cdots$ N e N $\cdots$ O com contribuições menores a 4%. Existem também interações H $\cdots$ N, porém elas não correspondem à ligação de hidrogênio, pois o perfil do gráfico de impressão digital 2D não apresenta os dois picos compridos finos descendentes característicos das ligações de hidrogênio, observados no gráfico das interações O $\cdots$ H (SPACKMAN; MCKINNON, 2002), podendo ser atribuída a interações de van der Waals.

Figura 14. Superfície de Hirshfeld do composto A46, mostrando as ligações de hidrogênio e as interações C–H $\cdots$ π .

Figura 15. Gráficos de impressão digital 2D para o composto A46, mostrando a contribuição percentual de cada tipo de interação à superfície de Hirshfeld.

4.1.2 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A48)

O composto 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidine-3,4-diildiacetato (A48) cristaliza-se no sistema cristalino monoclinico, grupo espacial $P2_1/c$. A estrutura apresenta desordem estrutural localizada nos átomos C17, C18 e O3, que foram refinados isotropicamente como parte 1 e parte 2 (Figura 16). O anel central de cinco membros encontra-se na configuração de meia cadeira (CREMER; POPLE, 1975), substituído no N1 pelo grupo etoxicarbonil em posição equatorial, no C1 por um grupo 4-metoxifenil em posição bi-seccional, e nos C2 e C3 pelo acetato em posição equatorial e axial respectivamente (CREMER, 1980).

No empacotamento cristalino não são observadas interações fortes de ligação de hidrogênio. Observam-se interações fracas de $C-H\cdots O$ e $CH_3 \cdots \pi$ que contribuem ao crescimento do cristal.

Figura 16. Representação ORTEP do composto A48 sendo a) parte 1 e b) parte 2 com os elipsoides a 50% de probabilidade.

A interação $C4-H4A\cdots O6$ conecta as moléculas nas direções $[341]$ e $[\bar{3}41]$. A distância correspondente a esta interação é de 3,293(4) Å. Esta interação faz a rede crescer na direção do eixo **b** (Figura 17).

Figura 17. a) Ligação de hidrogênio entre C4–H4A...O6 e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: $-x, 1/2+y, 1/2-z$

A interação C11–H11C...O3A liga cada unidade assimétrica a mais duas moléculas nas direções $[140]$ e $[1\bar{4}0]$, formando uma cadeia em zig-zag. A distância desta interação é de 3,070(8) Å. Esta interação faz a rede crescer na direção do eixo **c** (Os parâmetros das ligações de hidrogênio observadas, estão resumidas na Tabela 5 e a Figura 20 mostra o empacotamento na cela unitária visto ao longo do eixo **b**.

Tabela 5. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto A8.

D–H...A	d(D–H)	D(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
C4–HA...O6	0,97	2,56	3,2930(3)	133

C11–H11C...O3A	0,96	2,40	3,0689(3)	126
C118A–H18B...Cg1	0,96	2,83	3,6458(3)	143

Figura 18).

Finalmente, existe a interação fraca entre C18–H18B e o anel aromático, esta interação apresenta uma distância de 3,6458(3) Å entre C18 e o centroide do anel, e está orientada na direção [441] fazendo a rede cristalina crescer na direção do eixo **a**, completando a estrutura tridimensional (Figura 19). Os parâmetros das ligações de hidrogênio observadas, estão resumidas na Tabela 5 e a Figura 20 mostra o empacotamento na cela unitária visto ao longo do eixo **b**.

Tabela 5. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto A8.

D–H...A	d(D–H)	D(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
C4–HA...O6	0,97	2,56	3,2930(3)	133
C11–H11C...O3A	0,96	2,40	3,0689(3)	126
C118A–H18B...Cg1	0,96	2,83	3,6458(3)	143

Figura 18. a) Ligação de hidrogênio entre C11–H11C...O3A e b) Formação da cadeia ao longo da direção [001]. Código de simetria: $x, 3/2-y, -1/2+z$

Figura 19. a) Interação fraca entre C18–H18B $\cdots$ π e b) Formação da cadeia ao longo da direção [100]. Código de simetria: 1-X,-1/2+Y,1/2-Z.

Figura 20. Representação do empacotamento cristalino do composto A48. Vista ao longo do eixo **b**.

Na superfície de Hirshfeld (Figura 21) são observadas as regiões onde se apresentam as interações intermoleculares descritas, em vermelho e com uma curvatura côncava são observados os grupos aceptores de hidrogênio, neste caso os átomos de oxigênio e nitrogênio. Em azul e com uma curvatura convexa são observados os grupos doadores de hidrogênio, que correspondem aos grupos C–H.

Figura 21. Superfície de Hirshfeld para o composto A48.

Nos gráficos de impressão digital 2D (

Figura 22) observa-se que a interação que mais contribui à formação da superfície de Hirshfeld é do tipo $H\cdots H$ com 51,5% atribuída a interações de van der Waals, seguida das ligações de hidrogênio $O\cdots H$ com uma contribuição de 32,5%. As interações $C\cdots H$ contribuem com 12,5%, e é observada a forma de “asas” no gráfico, indicando que existem interações $C-H\cdots\pi$. Também é observada a presença de interações do tipo $C\cdots O$, $C\cdots C$ e $O\cdots O$ com contribuições menores que 2%. Verifica-se a presença de interação $H\cdots N$ (0,3%), entretanto o perfil do gráfico de impressão digital 2D não corresponde ao de ligação de hidrogênio, já que não apresenta os dois picos alongados finos descendentes característicos das ligações de hidrogênio (SPACKMAN; MCKINNON, 2002), sendo então atribuída a interações de van der Waals.

Figura 22. Gráfico de impressão digital 2D para o composto A48.

4.1.3 2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A53)

O composto A53, mostrado na Figura 23 com os átomos identificados, cristaliza-se no grupo espacial monoclinico C2/c. A estrutura apresenta desordem no carbono C19, que foi refinado isotropicamente como parte 1 e parte 2, com fator de ocupação fixado em 45 % e 5% respectivamente mostrados na Figura 23 como C19A e C19B. O anel de cinco membros possui conformação de meia cadeira. Os carbonos C2 e C3 do anel de cinco membros estão ligados com um acetato cada, em posição equatorial e axial respectivamente. O carbono C1 está ligado ao grupo anisol em orientação biseccional, O máximo ângulo de torção entre os dois anéis é 134,42°, medido entre os átomos N1–C1–C13–C14. O p-nitrobenzilformato é ligado ao N1 com orientação equatorial. O ângulo de torção entre este anel aromático e o grupo nitro é de -163,45°, medido entre os átomos O3–N2–C10–C11.

Figura 23. Representação ORTEP do composto A53 com os elipsoides a 50% de probabilidade.

Na formação da rede cristalina não existem ligações fortes de hidrogênio, porém existem ligações de hidrogênio não clássicas. A interação C4–H4B...O7 tem distância de 3,129(3) Å e gera uma cadeia infinita ao longo da direção [010] (

Figura 24). A interação C6–H6A...O1 com distância de 3,249(3) Å forma dímeros no plano (001) (Figura 25). A interação fraca C21–H21C... π aparece nas direções [01 $\bar{1}$] e [$\bar{1}$ 07] com distância de 3,577Å entre o átomo de carbono e o centroide Cg1, formando um dímero no plano (010) (Figura 26). Os parâmetros destas interações são apresentados na Tabela 6.

A Figura 27 é uma representação do empacotamento cristalino na cela unitária.

Tabela 6. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto A53.

D–H...A	d(D–H)	D(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
C4–HB...O7	0,97	2,60	3,129(3)	115
C6–H6A...O1	0,97	2,54	3,249(3)	130
C21–H21C...Cg1	0,96	3,29	3,577(3)	99

Figura 24. a) Ligação de hidrogênio entre C4–H4B...O7 e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: $1/2-x, -1/2+y, 1/2-z$

Figura 25. Ligação de hidrogênio não clássica entre C6–H6A...O1. Código de simetria: -x,1-y,-z

Figura 26. Interação fraca entre C21–H21C...π.

Figura 27. Representação do empacotamento cristalino do composto A53. Vista ao longo do eixo [010].

Na superfície de Hirshfeld (Figura 28) são observadas as regiões onde apresentam-se as interações intermoleculares descritas, em vermelho e com uma curvatura côncava são observados os grupos aceptadores de hidrogênio, neste caso os átomos de oxigênio e nitrogênio assim como o anel aromático. Em azul e com uma curvatura convexa são observados os grupos doadores de hidrogênio, que correspondem aos grupos C–H.

Figura 28. Superfície de Hirshfeld para o composto A53.

Dos gráficos de impressão digital 2D (Figura 29) encontra-se que a interação que mais contribui à formação da superfície de Hirshfeld é do tipo $H\cdots H$ com 43,2%, relacionada com as interações de van der Waals, seguida das interações $O\cdots H$ atribuídas às ligações de hidrogênio com 36,6 %. As interações $C\cdots H$ contribuem com 14,8%, é observado o formato de “asas” no gráfico, indicando que existem interações $C-H\cdots\pi$. É observada a presença de interações do tipo $C\cdots O$, $O\cdots O$, $C\cdots C$, $C\cdots N$, e $N\cdots O$ com contribuições menores que 3%. Também é observada a presença da interação $H\cdots N$, mas o perfil do gráfico de impressão digital 2D mostra que elas não são ligações de hidrogênio, já que não apresenta os dois picos compridos finos descendentes característicos das ligações de hidrogênio (SPACKMAN; MCKINNON, 2002), sendo então atribuída a interações de van der Waals.

Figura 29. Gráfico de impressão digital 2D para o composto A53.

4.1.4 1-etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (A59)

O composto A59 cristalizou no grupo espacial triclínico $P\bar{1}$. A estrutura consiste em um anel heterocíclico de cinco membros em forma de meia cadeira, o nitrogênio N1 liga-se a um grupo etilformato em posição equatorial, o carbono C1 ao metilformato, e os carbonos 2 e 3 a acetatos em posições axiais (Figura 30).

Figura 30. Representação ORTEP do composto A59 com os elipsoides a 50% de probabilidade.

Não existem interações fortes na formação da rede cristalina. Foi identificada uma ligação de hidrogênio não clássica entre C9–H9B ...O6 na direção [021] com uma distância C...O de 3,405 Å que leva à formação de um dímero (

Figura 31). Também apresenta-se a ligação de hidrogênio não clássica C11–H11A...O8 com uma distância de 3,3310(4) Å gerando uma cadeia infinita que cresce ao longo da direção [010] (Figura 32). E finalmente para completar a rede tridimensional, a ligação de hidrogênio bifurcada não clássica C3–H3...O1 e C3–H3...O3 com distâncias C...O de 3,4539(5) Å e 3,4202(5) Å respectivamente, formam cadeias infinitas ao longo da direção [100] (Figura 33). Estes parâmetros estão detalhados na Tabela 7. A Figura 34 mostra o empacotamento das moléculas na cela unitária.

Tabela 7. Distâncias (Å) e ângulos(°) de ligação de hidrogênio para o composto A59.

D–H...A	d(D–H)	D(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
C3–H3...O1	0,97	2,61	3,4539(5)	144
C3–H3...O3	0,97	2,62	3,2402(5)	139
C9–H9B...O6	0,96	2,53	3,4053(4)	151
C11–H11A...O8	0,96	2,67	3,3310(4)	127

Figura 31. Ligação de hidrogênio entre C9–H9B...O6. Código de simetria: 2-x,2-y,1-z **Figura 32.** a) Ligação de hidrogênio entre C11–H11A...O8 e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: x,-1+y,z.

Figura 33. a) Ligação de hidrogênio bifurcada entre C3–H3...O1 (i) e C3–H3...O3 (i) e b) Formação da cadeia ao longo da direção [100]. Código de simetria: (i) $-1+x,y,z$.

Figura 34. Representação do empacotamento cristalino do composto A59. Vista ao longo do eixo [010].

Na superfície de Hirshfeld (Figura 35) são observadas as regiões onde aparecem as interações intermoleculares C–H...O descritas, em vermelho e com uma curvatura côncava são observados os grupos aceptores de hidrogênio, neste

caso os átomos de oxigênio e nitrogênio. Em azul e com uma curvatura convexa são observados os grupos doadores de hidrogênio, que correspondem aos grupos C–H.

Figura 35. Superfície de Hirshfeld para o composto A59.

Os gráficos de impressão digital 2D (Figura 36) permitem quantificar a contribuição de cada contato para a superfície de Hirshfeld. Encontrou-se que a interação que mais contribui é a interação $H\cdots H$ com 55,7% atribuída a interações de

van der Waals, seguida das interações $O\cdots H$ correspondentes às ligações de hidrogênio com 37,0 %. As interações $C\cdots H$ contribuem com 2,7%, sendo esta contribuição de valor baixo quando comparada à apresentada nos demais compostos e falta de contatos $C\cdots C$ pode ser devida a ausência de anéis aromáticos e em consequência as interações tipo π . É observada a presença de interações do tipo $C\cdots O$ e $O\cdots O$ com contribuições menores a 3%. É observada também a presença da interação $H\cdots N$ com uma contribuição de 0,5%, porém o perfil do gráfico de impressão digital 2D não corresponde à ligação de hidrogênio, já que não apresenta os dois picos finos descendentes característicos das ligações de hidrogênio (SPACKMAN; MCKINNON, 2002), sendo então atribuída a interações de van der Waals.

Figura 36. Gráfico de impressão digital 2D para o composto A59.

4.1.5 5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1*H*-pirrolidin-1-carboxilato (NO2)

A molécula NO2 cristalizou no sistema monoclinico, no grupo espacial P2₁. O anel de cinco membros possui geometria próxima da planar devido à ligação dupla entre os carbonos C19 e C20, sendo o maior angulo de torção igual a -6.23°, medido entre os átomos C19–C18–N2–C21.

O anel ciclohexil apresenta conformação de cadeira. O grupo metila ligado ao C13 e o (4-nitrofenil)propan-2-il ligado ao C10 encontram-se em orientação equatorial.

O grupo NO2 apresenta um ângulo de torção de -4,47° com respeito ao anel aromático, que foi medido entre os átomos C6–C1–N1–O1. O grupo O–CH3 apresenta um ângulo de torção de 3,21° em relação ao anel aromático, medido entre os átomos C26–C25–O5–C28 (Figura 37).

Figura 37. Representação ORTEP do composto NO2 com os elipsoides a 50% de probabilidade.

As interações que levam à formação da rede cristalina são de ligação de hidrogênio C–H...O. O O4 interage com dois átomos de hidrogênio do ciclohexil; uma interação é a C12–H12A...O4 na direção [081] com distância C...O de 3,467(6) Å, e a outra é a interação C10–H10...O4 na direção [1 $\bar{2}$ 0] com comprimento C...O de 3,581(5) Å. Estas interações formam cadeias ao longo do eixo **b** (

Figura 38). Estas cadeias estão ligadas entre si pela interação C8–H8A...O2 na direção do eixo *c* (Figura 39).

Finalmente, para completar a rede tridimensional, a interação C14–H14B...O5 com distância de 3,592(6) Å, forma cadeias ao longo da direção [100] (Figura 40). As distâncias e ângulos das interações são apresentadas na Tabela 8. O empacotamento cristalino encontra-se na Figura 41.

Tabela 8. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para o composto NO2.

D–H...A	d(D–H)	D(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
C8–H8A...O2	0,96	2,77	3,7115(6)	166
C10–H10...O4	0,98	2,69	3,5808(5)	151
C12–H12A...O4	0,97	2,59	3,4674(5)	150
C14–H14B...O5	0,97	2,63	3,5915(5)	172

Figura 38. a) Ligação de hidrogênio entre C12–H12A...O4 (i) e C10–H10...O4 (i) e b) Formação da cadeia ao longo da direção [010]. Código de simetria: *x*, -1+*y*, *z*.

Figura 39. Ligação de hidrogênio entre C8–H8A...O2 (i). Código de simetria: $-x, 1/2+y, -z$.

Figura 40. a) Ligação de hidrogênio entre C14–H14B...O5 (i) e b) Formação da cadeia ao longo da direção [100]. Código de simetria: $1+x, -1+y, z$.

Figura 41. Representação do empacotamento cristalino do composto NO₂, vista ao longo do eixo [010].

Na superfície de Hirshfeld (Figura 42) são observadas as regiões onde se apresentam as interações intermoleculares descritas, em vermelho e com uma curvatura côncava estão os grupos aceptadores de hidrogênio, neste caso os átomos de oxigênio e nitrogênio. Em azul e com uma curvatura convexa são observados os grupos doadores de hidrogênio, que correspondem aos grupos C–H.

Figura 42. Superfície de Hirshfeld para o composto NO₂.

Nos gráficos de impressão digital 2D (Figura 43) observa-se que a interação que mais contribui à construção da superfície de Hirshfeld é do tipo $H\cdots H$ com 61,8% atribuída a interações de van der Waals, seguida das interações $O\cdots H$ correspondentes às ligações de hidrogênio com 23,8 %. Observando o perfil do gráfico de impressão digital 2D para os contatos $O\cdots H$, pode-se inferir que as interações não são fortes, pois apresenta a forma de picos são largos, contrário aos picos finos descendentes característicos das ligações de hidrogênio fortes. As interações $C\cdots H$ contribuem com 12,3%. É observada a presença de interações do tipo $C\cdots C$, $C\cdots O$ e $O\cdots O$ com contribuições menores a 2%. É observada também a presença da interação $H\cdots N$ com uma contribuição de 1,1%, porém o perfil do gráfico de impressão digital 2D não corresponde à ligação de hidrogênio, já que não apresenta os dois picos longos descendentes característicos das ligações de hidrogênio (SPACKMAN; MCKINNON, 2002), sendo então atribuída a interações de van der Waals.

Figura 43. Gráficos de impressão digital 2D para o composto NO2.

Comparação das Estruturas

Os cinco compostos azaçúcares foram refinados com sucesso. Observa-se que todos eles formaram redes cristalinas principalmente a partir de ligações de hidrogênio C–H...O. Nos compostos A46 e A59 foi observada a formação de dímero. Os compostos com anéis aromáticos em sua estrutura apresentaram interações C–H... π , com exceção do NO₂.

No caso dos compostos A46, A48, A53 e NO₂, observam-se na superfície de Hirshfeld áreas vermelhas e azuis sobre os anéis aromáticos, indicando a presença de interações π , porém as curvaturas das superfícies nessas regiões não são bem definidas, devido a que estas interações são muito fracas, uma vez que as interações π ... π apresentam uma distância maior que 3,8 Å, e as interações C–H... π são da ordem dos 3,5 aos 3,6 Å.

Observando os gráficos de impressão digital dos contatos, verifica-se que as interações não são fortes, uma vez que os picos característicos de ligações de hidrogênio observados não são compridos como nos casos de ligações de hidrogênio fortes (SPACKMAN; MCKINNON, 2002). A formação da rede tridimensional é dominada por ligações de hidrogênio não C–H...O, já que contribuem à superfície de Hirshfeld com 33,8%, 32,4%, 36,6%, 37,1% e 23,8% para os compostos A46, A48, A53, A59 e NO₂ respectivamente. Sendo as interações que mais contribuem depois das interações H...H, classificadas como van der Waals, que correspondem a 39,0%, 51,5%, 43,2%, 55,7% e 61,8% para os compostos A46, A48, A53, A59 e NO₂ respectivamente. O restante de interações possíveis corresponde a menos de 16% da superfície (Figura 44). Observa-se que a contribuição de contatos C...H é muito menor no caso do composto A59 comparado com os demais compostos, onde esta contribuição é maior que 10%. Este fato é devido a que o composto A59 não tem um anel aromático para fazer interações C–H... π .

Os compostos que apresentam uma maior quantidade de contatos O...H são A59 e A53, isto devido a que além de possuírem maior número de átomos de oxigênio, pela sua geometria molecular os átomos de oxigênio encontram-se mais expostos, e com isso mais susceptível a interagir com as moléculas vizinhas.

Figura 44. Distribuição porcentual das contribuições das diferentes interações à superfície de Hirshfeld dos compostos A46, A48, A53, A59 e NO2.

4.2 Modelagem Molecular Frente a Enzima PNP

Para realizar a modelagem molecular, foi utilizada a estrutura da proteína PNP reportada no PDB como 1RSZ (SHI *et al.*, 2005) (Figura 45), cristalizada com o ligante 3-hidroxi-4-hidroximetil-1-(4-oxo-4,4A,5,7A-tetraidro-3H-pirrólo[3,2]pirimidin-7-ilmetil)-pirrolidina (DIH), conhecido também como DADMe-Immucillin-H (Figura 46), no sítio ativo, e íons sulfatos usados na precipitação da proteína. O composto DIH apresenta uma constante de inibição K_i de $1,10 \pm 0,12$ nM (MURKIN *et al.*, 2008).

Figura 45. Estrutura da enzima PNP 1RSZ com os ligantes DIH e sulfato. As moléculas de água foram retiradas para melhor visualização.

Inicialmente foi realizado o redocking rígido da PNP 1RSZ com o ligante DIH para verificar que a função GOLDScore funciona neste sistema. Foram obtidos três resultados com um score médio de 61,49 como apresentado na Tabela 9. Este procedimento confirmou que a função GOLDScore funciona para este

sistema, uma vez que os três resultados são semelhantes, o desvio padrão é de 0,082.

Tabela 9. Resultados do redocking rígido da PNP com DIH.

Molécula No.	Score	S(hb_ext)	S(vdw_ext)
1	61,60	12,58	35,65
2	61,48	12,60	35,55
3	61,40	12,54	35,53
Média	61,49	12,57	35,57

Posteriormente foi realizado o docking flexível tanto com o ligante DIH como com mais quatro compostos cuja constante de inibição é conhecida com a finalidade de examinar as interações que cada um deles apresenta com a PNP para posterior comparação com os compostos estudados neste trabalho. Os quatro compostos são 7-(3,4-Diidroxi-5-metilsulfanilmetil-pirrolidin-2-il)-3,5-dihidro-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-4-ona (MeS-ImmH) com constante de inibição $K_i = 101 \pm 4$ nM, 7-(3,4-diidroxi-5-fenilsulfanilmetil-pirrolidin-2-il)-3,5-dihidro-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-4-ona (PhS-ImmH) com constante de inibição $K_i = 160 \pm 15$ nM, 7-(3-hidroxi-4-metilsulfanilmetil-pirrolidin-1-ilmetil)-3,5-diidro-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-4-ona (MeS-DADMe-ImmH) com constante de inibição $K_i = 0,1 \pm 0,02$ nM e 7-(3-hidroxi-4-propilsulfanilmetil-pirrolidin-1-ilmetil)-3,5-diidro-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-4-ona (PrS-DADMe-ImmH) com constante de inibição $K_i = 0,117 \pm 0,015$ nM (MURKIN *et al.*, 2008) ilustrados na Figura 46.

Dos resultados obtidos, foi escolhido para avaliar as possíveis interações aquele resultado que tem a orientação que se apresenta com maior frequência, e que no grupo de resultados mais frequentes apresenta o melhor valor de score.

Para o ligante DIH foram obtidos três resultados com score médio de 63,42. Para avaliar as interações foi usada a estrutura obtida do PDB. Para o inibidor MeS-ImmH foram obtidos dez resultados com score médio de 65,59 e na avaliação das interações foi utilizado o resultado número 6. No caso do inibidor PhS-ImmH foram obtidos oito resultados com score médio de 70,02 e na exploração das

interações foi usado o resultado número oito. No docking do inibidor MeS-DADMe-ImmH foram achados quatro resultados com score médio de 67,94 e para determinar as interações foi empregado o resultado número três. Para o inibidor PrS-DADMe-ImmH foram encontrados seis resultados com score médio de 67,98 e para estudar suas interações com a PNP foi selecionado o resultado número cinco. Estes resultados são resumidos na Tabela 10, a superposição dos resultados obtidos encontra-se na Figura 47.

Figura 46. Fórmula estrutural do ligante DIH e os inibidores Mes-ImmH, PhS-ImmH, MeS-DADMe-ImmH e PrS-DADMe-ImmH.

Fonte: MURKIN *et al.*, 2008

Tabela 10. Resultados do docking flexível do ligante DIH e os inibidores MeS-ImmH, PhS-ImmH, MeS-DADMe-ImmH e PrS-DADMe-ImmH.

Composto	No. De Resultados	Score Médio	Desvio Padrão	Resultado Escolhido
DIH	3	64,32	0,88	-
MeS-ImmH	10	65,59	1,41	6
PhS-ImmH	8	70,02	2,75	8
MeS-DADMe-ImmH	4	67,94	2,92	3
PrS-DADMe-ImmH	6	67,98	3,04	5

Figura 47. Superposição dos resultados do docking molecular dos inibidores.

O ligante DIH interage com os resíduos de aminoácidos da PNP por meio de ligações de hidrogênio C-H $\cdots$ O, N-H $\cdots$ O, O-H $\cdots$ O e C-H $\cdots$ π . Estas interações encontram-se detalhadas na Tabela 11 e ilustradas na

Figura 48.

Observa-se um contato entre o ligante e o resíduo PHE159 da cadeia vizinha por meio de uma interação C–H... π onde os elétrons π são da nuvem eletrônica do anel aromático do resíduo PHE159, este comportamento foi observado também em outras estruturas da PNP. Por este motivo que na modelagem molecular, foram utilizadas duas unidades do trímero da PNP.

Tabela 11. Interações do ligante cristalográfico DIH300 com a proteína PNP 1RSZ.

D–H...A	d D–H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D–H...A (°)
TYR88:HE2...DIH:O3'	1,090	2,910	3,547	117,41
PHE200:HE1...DIH300:cent2	1,090	2,792	3,739	154,17
PHE200:HZ...DIH300:O5'	1,090	2,739	3,797	163,64
ASN243:HD22...DIH300:O6	1,015	1,934	2,938	154,98
VAL245:HG13...DIH300:O6	1,090	2,359	3,374	154,26
HIS257:HD1...DIH300:O5'	1,015	1,716	2,756	162,69
DIH300:H8...TYR88:OH	0,993	2,369	2,896	109,66
B:PHE159:cent...DIH300:H3	1,090	2,718	3,785	166,03

Figura 48. Interações do ligante DIH com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

No caso do inibidor MeS-ImmH, como dito anteriormente, a avaliação das interações foi realizada usando o resultado número seis. Isto devido a que esta

orientação é a mais frequente entre os dez resultados obtidos (três resultados iguais), e que dentro do grupo com a mesma orientação apresenta o melhor score. Para esta molécula são observadas interações C–H $\cdots$ π , C–H $\cdots$ O, N–H $\cdots$ O e C–H $\cdots$ N, neste caso não há interações com o resíduo PHE159 do monômero vizinho. As interações podem ser visualizadas na

Figura 49, os detalhes das interações encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Interações do inibidor MeS-ImmH com a enzima PNP.

D–H $\cdots$ A	d D–H (Å)	d H $\cdots$ A (Å)	d D $\cdots$ A (Å)	< D–H $\cdots$ A (°)
TYR88:HE2 $\cdots$ MeS-ImmH:O3'	1,090	3,054	3,850	130,40
PHE200:HE1 $\cdots$ MeS-ImmH:cent1	1,090	3,039	4,032	151,82
ASN243:HD21 $\cdots$ MeS-ImmH:O6	1,015	1,955	2,950	166,09
VAL245:HG13 $\cdots$ MeS-ImmH:O6	1,090	2,615	3,596	149,56

Figura 49. Interações do inibidor MeS-ImmH com a PNP. Alguns resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

O inibidor PhS-ImmH apresenta interações tipo C–H $\cdots$ π , C–H $\cdots$ O, N–H $\cdots$ O, N–H $\cdots$ π , e N–H $\cdots$ S. Neste caso não há interação com o monômero vizinho. Para encontrar estas interações foi usado o resultado número 8. Este resultado apresenta a orientação mais comum encontrada no docking, sendo que três resultados aparecem nesta orientação, de um total de oito. Além disso, esta

orientação apresenta o melhor score do grupo, sendo este de 74,24. As interações estão detalhadas na Tabela 13 e podem ser observadas na

Figura 50.

Tabela 13. Interações entre o inibidor PhS-ImmH e a PNP.

D-H...A	d D-H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D-H...A (°)
ALA117:HA...PhS-ImmH:cent1	1,090	2,391	3,250	134,73
GLY118:H...PhS-ImmH:cent2	1,015	3,008	3,472	1108,86
PHE200:HE1...PhS-ImmH:cent2	1,090	3,059	4,018	147,26
ASN243:HD21...PhS-ImmH:O6	1,015	1,951	2,923	159,39
VAL245:HG13...PhS-ImmH:O6	1,090	2,391	3,380	150,24

Figura 50. Interações do inibidor PhS-ImmH com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

Para o inibidor MeS-DADMe-ImmH foram encontradas interações tipo C-H... π , C-H...O, N-H...O, N-H... π , e O-H...S. Neste caso também não são observadas interações com o monômero vizinho. Para encontrar estas interações foi usado o resultado número três. Dos quatro resultados, três apresentam a mesma

orientação, e desses três, o melhor score é apresentado pelo resultado número três, de 69,99. As interações estão detalhadas na

Tabela 14 e ilustradas na

Figura 51.

Tabela 14. Interações entre o inibidor MeS-DADMe-ImmH e a PNP.

D-H...A	d D-H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D-H...A (°)
TYR88:HH...MeS-DADMe-ImmH:S1	0,993	2,931	3,156	93,76
ALA116:H...MeS-DADMe-ImmH:O3`	1,015	2,250	3,254	169,87
GLY118:H...MeS-DADMe-ImmH:cent1	1,015	3,030	3,572	114,47
PHE200:HE1...MeS-DADMe-ImmH:cent1	1,090	3,166	4,145	150,01
ASN243:HD21...MeS-DADMe-ImmH:O6	1,015	2,028	3,029	168,30
VAL245:HG13...MeS-DADMe-ImmH:O6	1,090	2,745	3,730	150,20

Figura 51. Interações entre o inibidor MeS-DADMe-ImmH com a PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

A avaliação das interações do inibidor PrS-DADMe-ImmH com a PNP foi feita com o resultado número cinco. Este resultado apresenta o melhor score (71,58) dos quatro resultados que apresentam a mesma orientação espacial. Foram encontradas interações tipo C–H $\cdots$ π , N–H $\cdots$ π , C–H $\cdots$ O e N–H $\cdots$ O. Neste caso existe a interação com o monômero vizinho por meio do resíduo de aminoácido PHE159. As interações estão detalhadas na

Tabela 15 e ilustradas na

Figura 52.

Tabela 15. Interações do inibidor PrS-DADMe-ImmH.

D–H $\cdots$ A	d D–H (Å)	d H $\cdots$ A (Å)	d D $\cdots$ A (Å)	< D–H $\cdots$ A (°)
TYR88:HH $\cdots$ PrS-DADMe-ImmH:O3`	0,993	2,863	2,986	87,32
ALA117:HA $\cdots$ PrS-DADMe-ImmH:cent1	1,090	2,532	3,322	128,57
GLY118:H $\cdots$ PrS-DADMe-ImmH:cent2	1,015	3,170	3,574	105,27
PHE200:HE1 $\cdots$ PrS-DADMe-ImmH:cent2	1,090	3,061	4,076	155,38

ASN243:HD21...PrS-DADMe-ImmH:O6	1,015	1,974	2,937	164,58
VAL245:HG13...PrS-DADMe-ImmH:O6	1,090	2,619	3,548	142,78
B:PHE159:HE1...PrS-DADMe-ImmH:O3'	1,090	2,691	2,991	95,03

Figura 52. Interações entre o inibidor PrS-DADMe-ImmH e a PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

4.2.1 4-nitrobenzil-2,3-diidro-1H-pirrol-1-carboxilato (A46)

No estudo por docking do composto A46 foram obtidos dez resultados com score médio de 46,65 com desvio padrão entre eles de 0,64 (Tabela 16). Desses resultados, cinco apresentam a mesma orientação. Destas cinco orientações, foi escolhido o resultado número quatro para avaliar as interações do composto A46 com a PNP. Esta orientação tem um score de 46,81.

Tabela 16. Resultados do docking do composto A46 com a enzima PNP.

Molécula No.	Score	S(hb_ext)	S(vdw_ext)
1	47,53	0,15	34,80
2	46,16	4,18	32,00
3	46,59	1,06	34,24
4	46,81	1,36	34,03
5	46,32	0,32	34,37
6	46,07	1,46	32,63
7	46,47	1,42	33,55
8	46,44	1,22	34,52
9	48,11	0,00	36,25
10	46,03	0,83	33,96
Média	46,65	1,20	34,03

Foram encontradas interações do tipo C–H $\cdots$ π , entre o resíduo PHE200 e o anel aromático do composto A46; do tipo C–H $\cdots$ O entre o resíduo VAL245 e o O2 do grupo nitro; e do tipo N–H $\cdots$ O entre o resíduo ASN243 e o O2 do grupo nitro. Neste caso não foi encontrada a interação com o monômero vizinho. As interações podem ser observadas na Figura 53 os parâmetros das interações estão detalhados na Tabela 17.

Figura 53. Interações entre o composto A46 e a PNP. **Tabela 17.** Interações entre o composto A46 e a enzima PNP.

D-H...A	d D-H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D-H...A (°)
PHE200:HE1...A46:cent1	1,090	2,784	3,764	149,59
ASN243:HD21...A46:O1	1,015	1,548	2,443	143,87
VAL245:HG13...A46:O2	1,090	3,162	4,238	169,40

4.2.2 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A48)

A partir do docking do composto A48 foram obtidos três resultados com score médio de 65,06, o desvio padrão entre eles é de 0,16 (Tabela 18). Estes três resultados apresentam orientações semelhantes, porém não iguais, sendo que o maior valor de RMSD é de 0,2. Destas três orientações, foi escolhido o resultado número três para avaliar as interações com a PNP, por apresentar o melhor score (65,25). No entanto por não existir uma tendência clara na orientação preferencial, o resultado da modelagem obtido para este composto não é conclusivo.

Tabela 18. Resultados do docking do composto A48 com a enzima PNP.

Molécula No.	Score	S(hb_ext)	S(vdw_ext)
1	65,08	0,00	49,08
2	64,86	0,00	48,94
3	65,25	0,00	49,08
Média	65,06	0,00	48,98

No estudo foram encontradas interações tipo C–H $\cdots\pi$, entre o resíduo PHE200 e o anel aromático do composto A48; do tipo N–H $\cdots$ O entre a TYR88 e o O5, a ALA116 e o O6, a GLY118 e o O1, a ASN243 e o O1 e a HIS257 e o O2; e do tipo O–H $\cdots$ O entre a TYR88 e o O5. Não foram encontradas interações com o monômero vizinho. Estas interações podem ser observadas na Figura 54, os parâmetros das interações estão detalhados na Tabela 19.

Tabela 19. Interações do composto A48 com a enzima PNP.

D–H $\cdots$ A	d D–H (Å)	d H $\cdots$ A (Å)	d D $\cdots$ A (Å)	< D–H $\cdots$ A (°)
TYR88:HH $\cdots$ A48:O5	0,993	1,861	2,163	93,59
ALA116:H $\cdots$ A48:O6	1,015	2,716	3,476	131,78
GLY118:H $\cdots$ A48:O1	1,015	2,434	2,781	99,13
PHE200:HE1 $\cdots$ A48:cent1	1,090	2,848	3,932	173,81
ASN243:HD21 $\cdots$ A48:O1	1,015	3,292	4,202	150,02
HIS257:HD1 $\cdots$ A48:O2	1,015	2,889	3,570	125,03

Figura 54. Interações do composto A48 com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

4.2.3 2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (A53)

Na modelagem do composto A53 foram obtidos dez resultados com score médio de 52,65, o desvio padrão entre eles é de 9,35. Este desvio é grande devido ao fato do resultado número oito apresentar um score baixo comparado aos demais resultados (Tabela 20). Foi escolhido o resultado número 1 para avaliar as interações com a PNP, devido a que foi observada uma preferência por esta orientação, cinco de dez resultados tem orientação similar à do resultado número 1 que apresenta o melhor score entre esses cinco (59,87).

Tabela 20. Resultados do docking do composto A53 com a enzima PNP.

Molécula No.	Score	S(hb_ext)	S(vdw_ext)
1	59,87	0,61	44,58
2	56,00	0,00	45,53
3	51,36	0,96	38,84
4	59,87	0,00	49,32
5	52,35	1,28	39,84
6	51,54	1,26	4,18
7	61,76	0,10	47,01
8	27,35	0,07	23,60
9	49,20	2,15	42,70
10	57,19	0,00	46,28
Média	52,65	0,64	42,19

Foram encontradas interações tipo C–H $\cdots$ π , entre o resíduo PHE200 e o anel aromático do composto A53; C–H $\cdots$ O, entre o resíduo VAL217 e o O3; do tipo N–H $\cdots$ O entre a TYR88 e o O5, a ALA116 e o O8, a GLY118 e o O3 do grupo nitro, e a HIS257 e o O1; e do tipo O–H $\cdots$ N entre a TYR88 e o N1. Não foram encontradas interações com o monômero vizinho. Estas interações podem ser observadas na Figura 55, os parâmetros das interações estão detalhados na Tabela 21.

Tabela 21. Interações do composto A53 com a enzima PNP.

D–H...A	d D–H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D–H...A (°)
TYR88:HH...A53:N1	0,993	3,121	3,464	101,87
PHE200:HE1...A53:cent1	1,090	2,019	3,027	152,57
VAL217:HG23...A53:O3	1,090	2,753	3,653	139,80
HIS257:HD1...A53:O1	1,015	3,064	3,529	109,17

Figura 55. Interações do composto A53 com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

4.2.4 1-etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (A59)

Na modelagem do composto A59 foram obtidos três resultados com score médio de 53,61, o desvio padrão entre eles é de 0,98 (Tabela 22), estes três resultados apresentam orientações semelhantes, porém só duas são iguais. A avaliação das interações foi realizada a partir do resultado número três, pois apresenta o melhor score (54,33) e apresenta a orientação preferencial.

Tabela 22. Resultados do docking do composto A59 com a enzima PNP.

Molécula No.	Score	S(hb_ext)	S(vdw_ext)
1	52,24	0,15	40,14
2	52,26	0,14	39,73
3	54,33	0,14	40,93
Média	53,61	0,14	40,27

Foram encontradas só três interações, uma do tipo C–H...O, entre o resíduo PHE200 e o O7; e duas do tipo N–H...O entre a ASN243 e o O8, e a HIS257 e o O6. Não foram achadas interações com o monômero vizinho. Estas interações podem ser observadas na Figura 56, os parâmetros das interações estão detalhados na Tabela 23.

Tabela 23. Interações do composto A59 com a enzima PNP.

D–H...A	d D–H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D–H...A (°)
PHE200:HE1...A59:O7	1,090	2,530	3,567	158,95
ASN243:HD21...A59:O8	1,015	3,139	3,726	118,09
HIS257:HD1...A59:O6	1,015	2,705	3,437	129,21

Figura 56. Interações do composto A59 com a enzima PNP. Os resíduos de aminoácidos foram cortados para melhor visualização.

4.2.5 5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1*H*-pirrolidin-1-carboxilato (NO2)

Na modelagem do composto NO2 foram encontrados dez resultados com score médio de 66,43, observou-se uma grande diferença entre os scores dos resultados, sendo o desvio padrão entre eles é de 12,81 (Tabela 24). Esta diferença está relacionada à flexibilidade que a molécula possui, podendo assumir diversas orientações espaciais, e com isso a modelagem encontrou só três orientações iguais. As interações com a PNP foram avaliadas usando o resultado número cinco, devido a que dos três resultados iguais entre si, este apresenta o melhor score (72,34).

Tabela 24. Resultados do docking do composto NO2 com a enzima PNP.

Molécula No.	Score	S(hb_ext)	S(vdw_ext)
1	78,31	1,82	58,69
2	45,07	0,05	33,53
3	77,32	1,51	56,05
4	48,17	0,06	37,94
5	72,34	1,72	53,64
6	76,87	1,98	56,45
7	66,14	1,20	49,32
8	80,40	1,68	58,71
9	50,73	0,00	43,31
10	68,97	1,90	51,81
Média	66,43	1,19	49,95

Foram encontradas interações do tipo C–H $\cdots$ π , entre os resíduo ALA117 e PHE200 e o anel aromático nitrobenzeno do composto NO2; do tipo C–H $\cdots$ O, entre os resíduos GLY118, VAL217 e VAL245 e os oxigênios do grupo nitro e a HIS257 e o O3; do tipo N–H $\cdots$ O entre o resíduo ASN243 e o O2 do grupo nitro; e do tipo O–H $\cdots$ N entre a TYR88 e o N2. Foi observada a interação com o monômero vizinho a traves da interação C–H $\cdots$ N entre o resíduo PHE159 e o N2. Estas interações podem ser observadas na Figura 57, e os parâmetros das interações estão detalhados na Tabela 25.

Tabela 25. Interações do composto NO₂ com a enzima PNP.

D–H...A	d D–H (Å)	d H...A (Å)	d D...A (Å)	< D–H...A (°)
TYR88:HH...NO ₂ :N2	0,993	2,572	3,000	105,91
GLY118:HA1...NO ₂ :O1	1,090	2,598	3,365	126,78
PHE200:HE1...NO ₂ :cent1	1,090	2,211	3,278	165,97
VAL217:HG11...NO ₂ :O1	1,090	2,015	2,834	129,40
ASN243:HD21...NO ₂ :O2	1,015	1,410	2,414	168,73
VAL245:HG13...NO ₂ :O2	1,090	2,645	3,645	152,40
B:PHE159:HZ...NO ₂ :N2	1,090	2,698	3,491	129,35

Figura 57. Interações do composto NO₂ com a enzima PNP.

4.2.6 Comparação dos Resultados do Docking

A modelagem molecular fornece uma ideia de quais compostos podem ser potenciais inibidores da PNP, mostrando as diferentes interações que os compostos podem apresentar se colocados no sítio ativo da enzima. Para determinar se os compostos estudados podem ou não agir como inibidores, é necessária a comparação com inibidores já conhecidos. Como mencionado anteriormente, foram escolhidos dois inibidores com K_i baixo, o MeS-DADMe-ImmH e o PrS-DADMe-ImmH, e dois inibidores com K_i alto, o MeS-ImmH e o PhS-ImmH, além de conhecer a constante de inibição do ligante cristalográfico.

Na Tabela 26 são comparados os dados de score obtidos a través do docking. No score tem-se como referência o ligante cristalográfico, neste caso o DIH, já que é possível observar experimentalmente a presença deste ligante no sítio ativo por meio dos dados cristalográficos da proteína. Observa-se que não existe uma relação direta entre o valor do score e a capacidade inibitória, pois o inibidor PhS-ImmH que apresenta a menor inibição tem score na mesma ordem dos outros inibidores com K_i maior.

Neste caso o score é um indicativo da possibilidade da molécula poder ser posicionada no sítio ativo, por seu tamanho e geometria. Encontrou-se que todas elas têm a capacidade de estar no sítio ativo. De todas, o menor score foi o da molécula A46, aquela que tem o menor volume. Das moléculas problema, a que apresentou o melhor score foi a NO2, aquela com maior volume. Isto sugere que o volume do composto NO2 é mais próximo do volume do sítio ativo. Esta diferença também pode ser devida ao fato do composto NO2 tem maior flexibilidade, e pode adotar um maior número de orientações diferentes quando comparado com o composto A46.

Tabela 26. Comparação dos resultados do score de todos os compostos estudados no docking flexível.

Composto	Score Médio	Desvio Padrão	Score do Melhor resultado	Constante de Inibição (nM)
DIH	64,32	0,88	65,03	1,10±0,12
MeS-ImmH	65,59	1,41	64,78	101±4
PhS-ImmH	70,02	2,75	74,24	160±15
MeS-DADMe-ImmH	67,94	2,92	69,99	0,10±0,02
PrS-DADMe-ImmH	67,98	3,04	71,58	0,117±0,015
A46	46,65	0,64	46,81	-
A48	65,06	0,16	65,25	-
A53	52,65	9,35	59,87	-
A59	53,61	0,98	54,33	-
NO2	66,43	12,81	72,34	-

Com a finalidade de determinar se os compostos estudados são potenciais inibidores da PNP, foi feita a comparação das interações da enzima PNP com os inibidores e com os compostos A46, A48, A53, A59 e NO2. Segundo descrito em trabalhos já publicados, a ligação de hidrogênio do inibidor com o resíduo HIS257 está relacionada à capacidade inibitória, já que possui um papel importante no estado de transição do complexo enzima-substrato formando a ligação de hidrogênio com a hidroxila 5'-OH. A ausência desta interação pode diminuir a afinidade de ligação em inibidores que não são análogos ao estado de transição do substrato (KLINE; SCHRAMM, 1993 e MURKIN et al., 2008). Também é conhecida a importância da ligação de hidrogênio com o resíduo ASN243 para a eficácia dos inibidores competitivos por estarem presentes tanto no complexo enzima-substrato como no estado de transição (EALICK et al., 1991 e ERION et al., 1997).

Observou-se que em todos os casos avaliados, mostrados na Tabela 27, existe a ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido ASN243, excetuando-se o composto A53. Este fato pode levar à diminuição da capacidade inibitória do composto.

A ligação de hidrogênio com o resíduo de HIS257 foi observada nos compostos A48, A53 e A59, assim como nos inibidores DIH e PhS-ImmH. Os inibidores MeS-DADMe-ImmH e PrS-DADMe-ImmH que apresentam a melhor inibição entre os inibidores, utilizados para comparação, não apresentam esta interação, porém eles são análogos ao estado de transição, e por isso há a pequena influência desta ligação de hidrogênio em sua capacidade inibitória. Nos compostos A46 e NO2 não foi observada a existência desta interação, indicando que eles podem não ser bons inibidores da enzima PNP. Baseando-se na influência da ligação de hidrogênio com a HIS257, estes compostos poderiam apresentar atividade inibidora, porém, menor o que no caso dos compostos A48, A53 e A59.

A ligação de hidrogênio com o resíduo de TYR88, está presente nos inibidores DIH, MeS-DADMe-ImmH e PrS-DADMe-ImmH, que apresentam alta inibição da PNP, e não é encontrada nos inibidores MeS-ImmH e PhS-ImmH que apresentam inibição baixa. Isto indica que esta ligação de hidrogênio influencia positivamente a inibição. Esta interação é encontrada nos compostos A48, A53 e NO2.

Em todos os casos estudados foi observada a interação C-H... π entre o resíduo PHE200 e um anel aromático ou uma dupla ligação. Diferentemente do caso do composto A59, onde se observa a interação a C-H...O, que existe também no inibidor DIH.

Os compostos A46 e A59 apresentam só três interações com a PNP. No entanto, são observadas as duas ligações de hidrogênio que são conhecidas por sua importância na inibição como em ASN243 e HIS257, assim como a interação com o resíduo PHE200 que está presente em todos os inibidores. A ausência de interações pode ser devida à geometria da molécula, já que os grupos aceitadores de hidrogênio não estão expostos, mas sim os grupos metila, sendo que o tamanho dos substituintes impede uma maior interação com o nitrogênio da pirrolidina.

O composto NO2 apresentou um maior número de interações com a PNP que os demais compostos estudados. Isto pode ser atribuído à presença de vários grupos aceitadores que estão afastados entre si, assim como a presença de anéis aromáticos. Este foi o único composto de trabalho que apresentou interação

com o resíduo PHE159 do monômero vizinho. Também apresentou a interação C–H...O no resíduo GLY118, presente no inibidor DIH como ligação de hidrogênio e que interage no modo $\sigma \cdots \pi$ no caso dos dois inibidores fortes MeS-DADMe-ImmH e PrS-DADMe-ImmH.

Com estes resultados, todos os compostos estudados são candidatos a futuros estudos onde seja determinada a constante de inibição, já que todos eles apresentam várias interações no sítio ativo comuns aos diferentes inibidores reportados.

Tabela 27. Interações da enzima PNP encontradas a traves do docking molecular.

	Y88	A116	A117	G118	F200	V217	N243	V245	H257	F159
DIH	H,H	-	-	-	S,C	-	H	C	H	S
1	C	-	-	-	S	-	H	C	-	-
2	-	-	-	S	S	-	H	C	-	-
3	H	H	-	S	S	-	H	C	-	-
4	H	-	S	S	S	-	H	C	-	C
A46	-	-	-	-	S	-	H	C	-	-
A48	H	H	-	H	S	-	H	-	H	-
A53	H	-	-	-	S	C	-	-	H	-
A59	-	-	-	-	C	-	H	-	H	-
NO2	H	-	-	C	S	C	H	C	-	C

1=MeS-ImmH, 2=PhS-ImmH, 3= MeS-DADMe-ImmH, 4=PrS-DADMe-ImmH H=ligação de hidrogênio C=C-H---X P= pi-pi S=sigma-pi

5 Conclusões

Foram determinadas as estruturas de cinco compostos azaçúcares: 4-nitrobenzilpirrolidin-1-carboxilato (**A46**), 1-(etoxicarbonil)-2-(4-metoxifenil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (**A48**), 2-(4-metoxifenil)-1-(((4-nitrobenzil)oxi)carbonil)pirrolidin-3,4-diildiacetato (**A53**), 1-etil- 2-metil- 3,4-diacetoxipirrolidin-1,2-dicarboxilato (**A59**) e 5-metil-2-(2-(4-nitrofenil)propan-2-il)cicloexil-2-(4-metoxifenil)-2,5-diidro-1*H*-pirrolidin-1-carboxilato (**NO2**). Em todos os casos o índice de discordância *R* foi menor que 8% e o parâmetro *S* foi próximo de 1, indicando que realmente os modelos encontrados estão de acordo com os dados obtidos na difração.

Nas superfícies de Hirshfeld observaram-se as regiões susceptíveis de interações intermoleculares de acordo com a forma da superfície. Isso significa que as regiões côncavas interagem com as regiões convexas. Observou-se que aquelas regiões que possuem pares de elétrons livres, como no caso dos átomos de oxigênio, são convexas e de cor azul. As áreas das ligações C-H são côncavas e de cor vermelha. Isso demonstra que as interações que levam à formação da rede cristalina nos compostos azaçúcares, estudados neste trabalho, são principalmente do tipo C-H...O. No caso dos compostos A46, A48, A53 e NO2, foram observadas na superfície áreas vermelhas e azuis sobre os anéis aromáticos, indicando possíveis interações π . No entanto as curvaturas das superfícies nessas regiões não são bem resolvidas devido a que estas interações são fracas, uma vez que as interações $\pi \cdots \pi$ apresentam distância maior que 3,8 Å, e as interações C-H... π têm valores entre 3,5 e 3,6 Å.

Por meio da análise das superfícies de Hirshfeld e dos gráficos de impressão digital, foi encontrado que estes cinco compostos apresentam um comportamento semelhante quanto à importância das interações na formação da rede cristalina, sendo que a ordem de contribuição delas é H...H > O...H > C...H > C...O > C...C > N...O. A ausência de interações fortes não permitiu que fosse determinada a topologia das redes cristalinas formadas por estes compostos.

A formação da rede tridimensional é dominada por ligações de hidrogênio C-H...O, que contribuem à superfície de Hirshfeld com 33,8%, 32,4%,

36,6%, 37,1% e 23,8% para os compostos A46, A48, A53, A59 e NO2 respectivamente. Estas são as interações que mais contribuem para a formação da superfície de Hirshfeld depois das interações H...H, atribuídas a interações de van der Waals e que correspondem a 39,0%, 51,5%, 43,2%, 55,7% e 61,8% para os compostos A46, A48, A53, A59 e NO2 respectivamente. As interações C-H... π , observadas nos gráficos de impressão digital 2D, nos contatos correspondentes a C...H, têm contribuição de 15,2%, 12,5%, 14,8%, 2,7% e 12,3% para os compostos A46, A48, A53, A59 e NO2 respectivamente. Isto mostra que a importância destas interações é semelhante em todos os casos onde existe anel aromático na molécula. O restante das interações possíveis correspondem a menos de 3% da superfície cada.

O docking molecular dos açúcares mostrou que as principais interações que estes apresentam com a enzima PNP são de ligação de hidrogênio, ou seja O-H...O, N-H...O ou C-H...O. Foram também observadas interações do tipo σ ... π como C-H... π .

Ao comparar os resultados obtidos para os açúcares e inibidores conhecidos, foram encontrados valores de score da mesma ordem, indicando que o volume dos açúcares é apropriado para entrar no sítio ativo da enzima PNP. Só no caso do composto A46 observou-se uma diferença. Para este composto foi obtido o menor score, que pode ser devido a menor flexibilidade para adotar uma orientação ótima que lhe permita adequar-se melhor no sítio ativo. No caso do composto A48, os resultados obtidos não apresentam uma orientação preferencial o que diminui a confiabilidade do resultado e consequentemente a análise das interações realizada com ele.

A avaliação das interações dos diferentes compostos com a enzima PNP mostrou que o açúcar que apresenta o melhor comportamento é o NO2 pois apresenta um maior número de interações com relação aos outros açúcares, entre elas a ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido TYR88 e ASN243 e a interação C-H...O com a HIS257, que estão presentes nos inibidores mais potentes usados na comparação e que são reportadas na literatura como importantes no mecanismo da reação (EALICK et al., 1991 e ERION et al., 1997 e KLINE; SCHRAMM, 1993 e MURKIN et al., 2008)

Segundo os resultados obtidos, o composto A46 pode apresentar inibição, pois são observadas as mesmas interações que estão presentes nos inibidores, mas esta capacidade inibidora pode ser reduzida pela ausência da ligação de hidrogênio com a TYR88 e a HIS257.

No caso do composto A48 foram encontradas também as interações mais importantes para um inibidor da PNP, contudo, é necessário um estudo mais detalhado deste composto, já que como mencionado anteriormente, a orientação utilizada para avaliar as interações não se apresentou com maior frequência que as outras duas obtidas na modelagem.

O composto A53 foi o único que não exibiu ligação de hidrogênio com o resíduo ASN243, isto pode comprometer o seu potencial inibidor da PNP, pois é conhecida a importância desta interação na formação do complexo enzima-substrato e no estado de transição. Mesmo assim ele não deve ser descartado como potencial inibidor uma vez que apresenta também interação com outros resíduos de aminoácido como TYR88, GLY118 e HIS257.

O composto A59 foi o que apresentou menos interações com a PNP, somente três, no entanto, estas interações são características de bons inibidores como a ligação de hidrogênio com os resíduos ASN243 e HIS257, e também a interação C–H...O com o resíduo PHE200, aminoácido que interagiu com todos os compostos estudados incluindo os inibidores. Por isso não deveria ser descartado como um potencial inibidor da PNP.

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os compostos açúcares estudados são potenciais inibidores da enzima PNP e que a continuidade deste trabalho pode trazer resultados interessantes para a química medicinal.

6 Anexos

Anexo A. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento térmico isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para A46.

	x	y	z	U(eq)
C(1)	4381(3)	-2111(2)	2892(2)	45(1)
C(2)	4044(3)	-1021(2)	2941(3)	51(1)
C(3)	5144(3)	-299(2)	3398(3)	49(1)
C(4)	6568(3)	-660(2)	3792(2)	45(1)
C(5)	6871(3)	-1773(2)	3738(3)	53(1)
C(6)	5781(3)	-2502(2)	3292(3)	52(1)
C(7)	7817(3)	84(2)	4305(3)	54(1)
C(8)	8311(3)	1948(2)	4672(3)	50(1)
C(9)	8601(3)	3931(2)	4943(3)	57(1)
C(10)	7569(3)	4882(2)	4525(3)	63(1)
C(11)	6169(3)	4337(2)	3978(3)	61(1)
C(12)	6298(3)	3274(2)	4020(3)	56(1)
N(1)	3222(3)	-2887(2)	2410(2)	60(1)
N(2)	7712(2)	2958(2)	4591(2)	51(1)
O(1)	3499(2)	-3863(2)	2476(2)	78(1)
O(2)	2025(2)	-2534(2)	1968(3)	96(1)
O(3)	7308(2)	1190(1)	4189(2)	55(1)
O(4)	9565(2)	1745(2)	5113(2)	73(1)

Anexo B. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto A46.

C(1)-C(2)	1.370(4)	C(2)-C(1)-C(6)	121.9(2)
C(1)-C(6)	1.374(3)	C(2)-C(1)-N(1)	119.4(2)
C(1)-N(1)	1.463(3)	C(6)-C(1)-N(1)	118.7(2)
C(2)-C(3)	1.377(3)	C(1)-C(2)-C(3)	118.8(2)
C(3)-C(4)	1.380(3)	C(2)-C(3)-C(4)	120.9(2)
C(4)-C(5)	1.390(4)	C(3)-C(4)-C(5)	118.8(2)
C(4)-C(7)	1.505(3)	C(3)-C(4)-C(7)	123.5(2)
C(5)-C(6)	1.373(3)	C(5)-C(4)-C(7)	117.6(2)
C(7)-O(3)	1.430(3)	C(6)-C(5)-C(4)	120.9(2)
C(8)-O(4)	1.203(3)	C(5)-C(6)-C(1)	118.7(2)
C(8)-N(2)	1.348(3)	O(3)-C(7)-C(4)	108.7(2)
C(8)-O(3)	1.356(3)	O(4)-C(8)-N(2)	124.6(2)
C(9)-N(2)	1.461(3)	O(4)-C(8)-O(3)	124.6(2)
C(9)-C(10)	1.526(4)	N(2)-C(8)-O(3)	110.8(2)
C(10)-C(11)	1.489(4)	N(2)-C(9)-C(10)	104.3(2)
C(11)-C(12)	1.307(4)	C(11)-C(10)-C(9)	103.7(2)
C(12)-N(2)	1.405(3)	C(12)-C(11)-C(10)	111.3(3)
N(1)-O(2)	1.210(3)	C(11)-C(12)-N(2)	111.2(2)
N(1)-O(1)	1.220(3)	O(2)-N(1)-O(1)	122.7(2)
		O(2)-N(1)-C(1)	118.6(3)
		O(1)-N(1)-C(1)	118.8(2)
		C(8)-N(2)-C(12)	128.2(2)
		C(8)-N(2)-C(9)	121.7(2)
		C(12)-N(2)-C(9)	109.5(2)
		C(8)-O(3)-C(7)	114.7(2)

Anexo C. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para A48.

	x	y	z	U(eq)
C(17A)	-3551(10)	356(16)	7220(10)	68(3)
C(18A)	-4244(19)	-1067(19)	7015(8)	124(7)
O(3A)	4068(5)	-1564(4)	8799(4)	76(2)
C(17B)	-3441(7)	73(11)	7038(6)	58(3)
C(18B)	-3403(7)	-816(7)	6579(3)	97(3)
O(3B)	4322(8)	-1569(8)	8482(6)	82(3)
C(1)	1198(3)	537(3)	7747(1)	54(1)
C(2)	1895(3)	-310(3)	8292(1)	55(1)
C(3)	852(3)	-405(3)	8814(1)	61(1)
C(4)	-422(3)	-674(3)	8428(1)	60(1)
C(5)	1782(3)	221(3)	7096(1)	52(1)
C(6)	1486(3)	-1014(3)	6758(1)	63(1)
C(7)	2047(4)	-1285(4)	6170(2)	72(1)
C(8)	2910(4)	-313(4)	5914(2)	71(1)
C(9)	3237(3)	921(4)	6247(2)	71(1)
C(10)	2662(3)	1180(3)	6830(2)	60(1)
C(11)	3127(6)	-1558(5)	4912(2)	124(2)
C(12)	4155(3)	-314(4)	8702(2)	71(1)
C(13)	5286(4)	598(5)	8942(2)	105(1)
C(14)	1316(4)	1210(5)	9686(2)	82(1)
C(15)	1174(5)	2724(5)	9898(2)	114(2)
C(16)	-1183(3)	511(3)	7402(2)	59(1)
N(1)	-201(2)	78(3)	7818(1)	56(1)
O(1)	3530(3)	-438(3)	5329(1)	105(1)
O(2)	3093(2)	455(2)	8502(1)	65(1)
O(4)	720(2)	1000(2)	9110(1)	70(1)
O(5)	1899(4)	292(4)	9980(1)	121(1)
O(6)	-1035(2)	1302(2)	6958(1)	72(1)
O(7)	-2374(2)	-84(3)	7555(1)	75(1)

Anexo D. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto A48.

C(17A)-O(7)	1.406(9)	O(2)-C(2)-C(3)	112.7(2)
C(17A)-C(18A)	1.56(2)	O(2)-C(2)-C(1)	108.5(2)
O(3A)-C(12)	1.193(5)	C(3)-C(2)-C(1)	104.6(2)
C(17B)-C(18B)	1.268(15)	O(4)-C(3)-C(4)	107.0(2)
C(17B)-O(7)	1.496(8)	O(4)-C(3)-C(2)	108.5(2)
O(3B)-C(12)	1.275(9)	C(4)-C(3)-C(2)	102.1(2)
C(1)-N(1)	1.467(4)	N(1)-C(4)-C(3)	103.7(2)
C(1)-C(5)	1.515(4)	C(10)-C(5)-C(6)	118.1(3)
C(1)-C(2)	1.533(4)	C(10)-C(5)-C(1)	119.5(3)
C(2)-O(2)	1.447(3)	C(6)-C(5)-C(1)	122.4(3)
C(2)-C(3)	1.522(4)	C(7)-C(6)-C(5)	121.2(3)
C(3)-O(4)	1.461(4)	C(8)-C(7)-C(6)	119.6(3)
C(3)-C(4)	1.502(4)	C(7)-C(8)-O(1)	125.7(3)
C(4)-N(1)	1.471(4)	C(7)-C(8)-C(9)	120.3(3)
C(5)-C(10)	1.379(4)	O(1)-C(8)-C(9)	114.0(3)
C(5)-C(6)	1.382(4)	C(10)-C(9)-C(8)	119.4(3)
C(6)-C(7)	1.379(5)	C(9)-C(10)-C(5)	121.4(3)
C(7)-C(8)	1.369(5)	O(3A)-C(12)-O(2)	121.6(3)
C(8)-O(1)	1.381(4)	O(3B)-C(12)-O(2)	119.7(4)
C(8)-C(9)	1.383(5)	O(3A)-C(12)-C(13)	124.4(4)
C(9)-C(10)	1.373(4)	O(3B)-C(12)-C(13)	123.1(5)
C(11)-O(1)	1.413(5)	O(2)-C(12)-C(13)	112.2(3)
C(12)-O(2)	1.337(4)	O(5)-C(14)-O(4)	123.2(4)
C(12)-C(13)	1.488(5)	O(5)-C(14)-C(15)	125.6(4)
C(14)-O(5)	1.196(5)	O(4)-C(14)-C(15)	111.2(4)
C(14)-O(4)	1.335(4)	O(6)-C(16)-N(1)	125.4(3)
C(14)-C(15)	1.495(6)	O(6)-C(16)-O(7)	124.2(3)
C(16)-O(6)	1.197(4)	N(1)-C(16)-O(7)	110.4(3)
C(16)-N(1)	1.350(4)	C(16)-N(1)-C(1)	121.3(2)
C(16)-O(7)	1.354(4)	C(16)-N(1)-C(4)	125.0(3)
		C(1)-N(1)-C(4)	113.0(2)
O(7)-C(17A)-C(18A)	103.9(11)	C(8)-O(1)-C(11)	118.5(4)
C(18B)-C(17B)-O(7)	116.1(8)	C(12)-O(2)-C(2)	117.6(2)
N(1)-C(1)-C(5)	114.7(2)	C(14)-O(4)-C(3)	117.8(3)
N(1)-C(1)-C(2)	100.6(2)	C(16)-O(7)-C(17A)	119.0(5)
C(5)-C(1)-C(2)	112.4(2)	C(16)-O(7)-C(17B)	113.5(4)

Anexo E. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento térmico isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para A53.

	x	y	z	U(eq)
C(19A)	-449(3)	15300(7)	1609(5)	55(2)
C(19B)	-536(3)	15211(7)	1358(5)	64(2)
C(1)	889(1)	8345(2)	1779(1)	31(1)
C(2)	1493(1)	8340(2)	2277(1)	34(1)
C(3)	1822(1)	6856(2)	2183(1)	38(1)
C(4)	1667(1)	6864(2)	1539(1)	40(1)
C(5)	671(1)	7097(2)	813(1)	35(1)
C(6)	-327(1)	7142(3)	195(1)	53(1)
C(7)	-883(1)	8154(2)	49(1)	42(1)
C(8)	-1431(1)	7419(3)	-221(1)	57(1)
C(9)	-1953(1)	8306(3)	-409(1)	64(1)
C(10)	-1922(1)	9940(3)	-326(1)	53(1)
C(11)	-1388(1)	10712(3)	-51(1)	54(1)
C(12)	-866(1)	9804(3)	139(1)	49(1)
C(13)	632(1)	10020(2)	1645(1)	32(1)
C(14)	138(1)	10466(2)	1785(1)	43(1)
C(15)	-83(1)	12033(2)	1699(1)	51(1)
C(16)	193(1)	13167(2)	1467(1)	44(1)
C(17)	687(1)	12730(2)	1321(1)	41(1)
C(18)	903(1)	11176(2)	1410(1)	37(1)
C(20)	1821(1)	8957(2)	3267(1)	41(1)
C(21)	1627(1)	9075(3)	3778(1)	64(1)
C(22)	1884(1)	4653(2)	2814(1)	42(1)
C(23)	1572(1)	3152(3)	2890(1)	57(1)
N(1)	1061(1)	7582(2)	1323(1)	35(1)
N(2)	-2483(1)	10890(4)	-536(1)	73(1)
O(1)	801(1)	6222(2)	481(1)	46(1)
O(2)	120(1)	7740(2)	711(1)	39(1)
O(3)	-2960(1)	10170(3)	-656(1)	110(1)
O(4)	-2440(1)	12332(3)	-585(1)	89(1)
O(5)	23(1)	14748(2)	1368(1)	65(1)
O(6)	1373(1)	8383(2)	2804(1)	41(1)
O(7)	2302(1)	9320(2)	3250(1)	63(1)

O(8)	1560(1)	5428(2)	2334(1)	44(1)
O(9)	2363(1)	5104(2)	3129(1)	68(1)

Anexo F. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto A53.

C(19A)-O(5)	1.505(7)	N(2)-O(3)	1.220(3)
C(19B)-O(5)	1.368(5)		
C(1)-N(1)	1.468(2)	N(1)-C(1)-C(13)	115.19(14)
C(1)-C(13)	1.507(2)	N(1)-C(1)-C(2)	101.03(13)
C(1)-C(2)	1.535(2)	C(13)-C(1)-C(2)	111.90(13)
C(2)-O(6)	1.429(2)	O(6)-C(2)-C(3)	115.68(14)
C(2)-C(3)	1.516(2)	O(6)-C(2)-C(1)	108.21(13)
C(3)-O(8)	1.444(2)	C(3)-C(2)-C(1)	105.28(14)
C(3)-C(4)	1.511(3)	O(8)-C(3)-C(4)	107.91(15)
C(4)-N(1)	1.473(2)	O(8)-C(3)-C(2)	109.73(14)
C(5)-O(1)	1.213(2)	C(4)-C(3)-C(2)	101.92(14)
C(5)-N(1)	1.344(2)	N(1)-C(4)-C(3)	103.86(14)
C(5)-O(2)	1.348(2)	O(1)-C(5)-N(1)	124.28(17)
C(6)-O(2)	1.438(2)	O(1)-C(5)-O(2)	124.19(16)
C(6)-C(7)	1.496(3)	N(1)-C(5)-O(2)	111.51(15)
C(7)-C(8)	1.381(3)	O(2)-C(6)-C(7)	109.79(16)
C(7)-C(12)	1.384(3)	C(8)-C(7)-C(12)	119.01(19)
C(8)-C(9)	1.373(3)	C(8)-C(7)-C(6)	118.11(19)
C(9)-C(10)	1.368(4)	C(12)-C(7)-C(6)	122.74(18)
C(10)-C(11)	1.372(3)	C(9)-C(8)-C(7)	120.9(2)
C(10)-N(2)	1.475(3)	C(10)-C(9)-C(8)	118.9(2)
C(11)-C(12)	1.383(3)	C(9)-C(10)-C(11)	122.0(2)
C(13)-C(14)	1.377(3)	C(9)-C(10)-N(2)	118.7(2)
C(13)-C(18)	1.387(2)	C(11)-C(10)-N(2)	119.3(2)
C(14)-C(15)	1.389(3)	C(10)-C(11)-C(12)	118.5(2)
C(15)-C(16)	1.378(3)	C(11)-C(12)-C(7)	120.6(2)
C(16)-O(5)	1.369(2)	C(14)-C(13)-C(18)	118.19(16)
C(16)-C(17)	1.382(3)	C(14)-C(13)-C(1)	120.41(16)
C(17)-C(18)	1.376(3)	C(18)-C(13)-C(1)	121.30(15)
C(20)-O(7)	1.191(2)	C(13)-C(14)-C(15)	121.33(18)
C(20)-O(6)	1.353(2)	C(16)-C(15)-C(14)	119.70(18)
C(20)-C(21)	1.489(3)	O(5)-C(16)-C(15)	125.15(19)
C(22)-O(9)	1.194(2)	O(5)-C(16)-C(17)	115.34(18)
C(22)-O(8)	1.337(2)	C(15)-C(16)-C(17)	119.50(17)
C(22)-C(23)	1.490(3)	C(18)-C(17)-C(16)	120.31(18)
N(2)-O(4)	1.209(3)	C(17)-C(18)-C(13)	120.97(17)

O(7)-C(20)-O(6)	122.60(18)	O(4)-N(2)-O(3)	124.1(2)
O(7)-C(20)-C(21)	126.11(18)	O(4)-N(2)-C(10)	117.9(2)
O(6)-C(20)-C(21)	111.28(17)	O(3)-N(2)-C(10)	118.0(3)
O(9)-C(22)-O(8)	123.74(19)	C(5)-O(2)-C(6)	113.52(14)
O(9)-C(22)-C(23)	125.35(19)	C(19B)-O(5)-C(16)	119.7(3)
O(8)-C(22)-C(23)	110.89(17)	C(16)-O(5)-C(19A)	115.7(3)
C(5)-N(1)-C(1)	124.72(14)	C(20)-O(6)-C(2)	116.07(14)
C(5)-N(1)-C(4)	119.32(15)	C(22)-O(8)-C(3)	117.33(14)
C(1)-N(1)-C(4)	112.69(13)		

Anexo G. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento térmico isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para A59.

	x	y	z	U(eq)
C(1)	7369(2)	6701(2)	2691(1)	37(1)
C(2)	9699(2)	6970(2)	2918(1)	36(1)
C(3)	9846(2)	5043(2)	2669(1)	39(1)
C(4)	8185(2)	4148(2)	1832(1)	43(1)
C(5)	4815(2)	4765(2)	1380(1)	43(1)
C(6)	2578(3)	2687(3)	97(1)	63(1)
C(7)	2593(4)	1048(4)	-553(2)	82(1)
C(8)	6280(2)	6303(2)	3435(1)	41(1)
C(9)	6042(4)	7593(4)	4876(1)	77(1)
C(10)	12602(3)	9004(2)	2630(1)	46(1)
C(11)	13345(3)	10047(3)	1997(2)	70(1)
C(12)	9350(3)	2656(2)	3424(1)	50(1)
C(13)	8627(4)	2145(3)	4211(2)	70(1)
N(1)	6675(2)	5162(2)	1926(1)	43(1)
O(1)	4855(2)	4995(2)	3377(1)	59(1)
O(2)	7112(2)	7662(2)	4155(1)	50(1)
O(3)	3607(2)	5642(2)	1456(1)	57(1)
O(4)	4514(2)	3263(2)	735(1)	51(1)
O(5)	10610(2)	7964(2)	2331(1)	42(1)
O(6)	13600(2)	9055(2)	3326(1)	66(1)
O(7)	9276(2)	4345(2)	3407(1)	43(1)
O(8)	9876(3)	1726(2)	2861(1)	76(1)

Anexo H. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto A59.

C(1)-N(1)	1.4523(19)	N(1)-C(1)-C(8)	111.47(13)
C(1)-C(8)	1.524(2)	N(1)-C(1)-C(2)	102.31(12)
C(1)-C(2)	1.528(2)	C(8)-C(1)-C(2)	113.25(13)
C(2)-O(5)	1.4385(18)	O(5)-C(2)-C(3)	108.78(12)
C(2)-C(3)	1.522(2)	O(5)-C(2)-C(1)	106.71(13)
C(3)-O(7)	1.4500(19)	C(3)-C(2)-C(1)	103.22(12)
C(3)-C(4)	1.522(2)	O(7)-C(3)-C(4)	111.79(12)
C(4)-N(1)	1.465(2)	O(7)-C(3)-C(2)	102.26(12)
C(5)-O(3)	1.210(2)	C(4)-C(3)-C(2)	103.56(13)
C(5)-O(4)	1.346(2)	N(1)-C(4)-C(3)	103.34(12)
C(5)-N(1)	1.351(2)	O(3)-C(5)-O(4)	125.07(15)
C(6)-O(4)	1.446(2)	O(3)-C(5)-N(1)	124.94(15)
C(6)-C(7)	1.485(3)	O(4)-C(5)-N(1)	109.99(14)
C(8)-O(1)	1.1967(19)	O(4)-C(6)-C(7)	106.75(17)
C(8)-O(2)	1.332(2)	O(1)-C(8)-O(2)	124.89(16)
C(9)-O(2)	1.446(2)	O(1)-C(8)-C(1)	125.34(15)
C(10)-O(6)	1.195(2)	O(2)-C(8)-C(1)	109.73(13)
C(10)-O(5)	1.3505(19)	O(6)-C(10)-O(5)	122.71(16)
C(10)-C(11)	1.484(3)	O(6)-C(10)-C(11)	125.62(17)
C(12)-O(8)	1.195(2)	O(5)-C(10)-C(11)	111.67(17)
C(12)-O(7)	1.349(2)	O(8)-C(12)-O(7)	122.75(19)
C(12)-C(13)	1.495(3)	O(8)-C(12)-C(13)	126.77(18)
		O(7)-C(12)-C(13)	110.45(17)
		C(5)-N(1)-C(1)	121.31(13)
		C(5)-N(1)-C(4)	125.78(13)
		C(1)-N(1)-C(4)	112.90(12)
		C(8)-O(2)-C(9)	115.74(15)
		C(5)-O(4)-C(6)	115.88(14)
		C(10)-O(5)-C(2)	116.21(13)
		C(12)-O(7)-C(3)	118.17(13)

Anexo I. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento térmico isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para NO₂.

	x	y	z	U(eq)
C(1)	1698(4)	6068(9)	408(2)	57(1)
C(2)	1060(4)	4119(9)	438(2)	62(1)
C(3)	236(4)	3765(8)	935(2)	54(1)
C(4)	43(3)	5350(7)	1398(2)	43(1)
C(5)	702(4)	7328(7)	1340(2)	53(1)
C(6)	1537(4)	7692(8)	850(2)	58(1)
C(7)	-932(3)	5049(7)	1929(2)	43(1)
C(8)	-1361(4)	2645(7)	1981(2)	54(1)
C(9)	-2142(4)	6401(8)	1707(2)	57(1)
C(10)	-346(3)	5901(6)	2590(2)	39(1)
C(11)	630(3)	4345(6)	2920(2)	41(1)
C(12)	1256(4)	5302(7)	3524(2)	48(1)
C(13)	252(4)	5888(9)	4014(2)	58(1)
C(14)	-752(4)	7390(8)	3692(2)	62(1)
C(15)	-1371(4)	6431(9)	3081(2)	57(1)
C(16)	893(5)	6882(12)	4616(2)	90(2)
C(17)	2199(3)	1868(7)	2544(2)	43(1)
C(18)	4004(4)	-357(7)	2191(2)	51(1)
C(19)	4855(4)	60(10)	1642(2)	67(1)
C(20)	4691(4)	1995(10)	1390(2)	69(2)
C(21)	3684(4)	3288(8)	1719(2)	56(1)
C(22)	4710(4)	-752(7)	2831(2)	49(1)
C(23)	5539(4)	843(8)	3109(2)	59(1)
C(24)	6127(4)	552(9)	3703(2)	65(1)
C(25)	5918(4)	-1360(8)	4048(2)	55(1)
C(26)	5136(4)	-2946(9)	3781(2)	62(1)
C(27)	4544(4)	-2627(8)	3176(2)	57(1)
C(28)	6375(7)	-3407(13)	5010(3)	104(2)
N(1)	2590(4)	6459(11)	-111(2)	81(1)
N(2)	3240(3)	1678(5)	2180(2)	48(1)
O(1)	3085(5)	8231(10)	-152(2)	121(2)
O(2)	2744(5)	5015(10)	-494(2)	117(2)
O(3)	1651(2)	3871(4)	2476(1)	44(1)

O(4)	1807(3)	436(5)	2880(2)	62(1)
O(5)	6523(3)	-1467(7)	4651(1)	71(1)

Anexo J. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto NO₂.

C(1)-C(2)	1.363(7)	N(1)-O(1)	1.201(7)
C(1)-C(6)	1.368(7)	N(1)-O(2)	1.204(6)
C(1)-N(1)	1.471(6)		
C(2)-C(3)	1.388(6)	C(2)-C(1)-C(6)	121.9(4)
C(3)-C(4)	1.386(6)	C(2)-C(1)-N(1)	119.7(5)
C(4)-C(5)	1.394(6)	C(6)-C(1)-N(1)	118.5(5)
C(4)-C(7)	1.541(5)	C(1)-C(2)-C(3)	119.0(4)
C(5)-C(6)	1.383(6)	C(4)-C(3)-C(2)	121.5(4)
C(7)-C(8)	1.538(6)	C(3)-C(4)-C(5)	117.3(3)
C(7)-C(9)	1.547(5)	C(3)-C(4)-C(7)	122.4(4)
C(7)-C(10)	1.565(5)	C(5)-C(4)-C(7)	120.2(3)
C(10)-C(11)	1.523(5)	C(6)-C(5)-C(4)	121.7(4)
C(10)-C(15)	1.539(5)	C(1)-C(6)-C(5)	118.6(4)
C(11)-O(3)	1.463(4)	C(8)-C(7)-C(4)	111.4(3)
C(11)-C(12)	1.504(5)	C(8)-C(7)-C(9)	107.5(3)
C(12)-C(13)	1.529(5)	C(4)-C(7)-C(9)	105.4(3)
C(13)-C(14)	1.515(6)	C(8)-C(7)-C(10)	110.8(3)
C(13)-C(16)	1.515(6)	C(4)-C(7)-C(10)	110.8(3)
C(14)-C(15)	1.512(6)	C(9)-C(7)-C(10)	110.9(3)
C(17)-O(4)	1.202(5)	C(11)-C(10)-C(15)	106.9(3)
C(17)-N(2)	1.348(5)	C(11)-C(10)-C(7)	114.0(3)
C(17)-O(3)	1.352(4)	C(15)-C(10)-C(7)	114.0(3)
C(18)-N(2)	1.470(5)	O(3)-C(11)-C(12)	108.2(3)
C(18)-C(19)	1.494(6)	O(3)-C(11)-C(10)	108.5(3)
C(18)-C(22)	1.508(6)	C(12)-C(11)-C(10)	112.5(3)
C(19)-C(20)	1.301(7)	C(11)-C(12)-C(13)	111.8(3)
C(20)-C(21)	1.496(6)	C(14)-C(13)-C(16)	112.6(4)
C(21)-N(2)	1.462(5)	C(14)-C(13)-C(12)	108.4(3)
C(22)-C(27)	1.366(6)	C(16)-C(13)-C(12)	111.3(4)
C(22)-C(23)	1.402(6)	C(15)-C(14)-C(13)	112.9(4)
C(23)-C(24)	1.363(6)	C(14)-C(15)-C(10)	111.4(3)
C(24)-C(25)	1.392(7)	O(4)-C(17)-N(2)	124.3(4)
C(25)-C(26)	1.361(6)	O(4)-C(17)-O(3)	124.6(3)
C(25)-O(5)	1.377(5)	N(2)-C(17)-O(3)	111.0(3)
C(26)-C(27)	1.387(6)	N(2)-C(18)-C(19)	100.2(4)
C(28)-O(5)	1.412(7)	N(2)-C(18)-C(22)	112.6(3)

C(19)-C(18)-C(22)	115.3(3)	O(5)-C(25)-C(24)	115.8(4)
C(20)-C(19)-C(18)	113.2(4)	C(25)-C(26)-C(27)	119.8(5)
C(19)-C(20)-C(21)	111.9(4)	C(22)-C(27)-C(26)	122.3(4)
N(2)-C(21)-C(20)	101.1(4)	O(1)-N(1)-O(2)	122.8(5)
C(27)-C(22)-C(23)	117.0(4)	O(1)-N(1)-C(1)	118.8(5)
C(27)-C(22)-C(18)	122.1(4)	O(2)-N(1)-C(1)	118.3(5)
C(23)-C(22)-C(18)	120.8(4)	C(17)-N(2)-C(21)	126.4(3)
C(24)-C(23)-C(22)	121.3(5)	C(17)-N(2)-C(18)	120.3(3)
C(23)-C(24)-C(25)	120.3(5)	C(21)-N(2)-C(18)	113.2(3)
C(26)-C(25)-O(5)	124.9(5)	C(17)-O(3)-C(11)	115.0(3)
C(26)-C(25)-C(24)	119.3(4)	C(25)-O(5)-C(28)	117.8(4)

7 Apêndice

Apêndice A. Trabalhos Realizados em Paralelo

Paralelamente à realização do trabalho apresentado nesta tese, foi feito o trabalho de caracterização estrutural de cinco compostos do tipo hidrazonas. As hidrazonas são compostos tipo iminas com a fórmula geral $R_1R_2C=N-NR_3R_4$. As propriedades e aplicações dependem da natureza dos substituintes R. Além de apresentar atividade biológica como foi mencionado anteriormente, as hidrazonas chamam a atenção por seu potencial uso como sistemas moleculares, capazes de mudar reversivelmente sua configuração e isomerização (SU; APRAHAMIAN, 2014 e TATUM et al., 2014). Estes compostos podem apresentar coordenação dinâmica, comportando-se como um sistema de trava e destrava controlado por íons metálicos (CHAUR et al., 2011). Todas essas propriedades permitem que as hidrazonas sejam usadas em química supramolecular (SU; APRAHAMIAN, 2014), interruptores moleculares (CNOSSEN et al., 2014 e YAMAMURA et al., 1992), montagens metálicas (RUBEN et al., 2006 e ULRICH; LEHN, 2009) e sensores de cátions e ânions (SU; APRAHAMIAN, 2014 e TATUM et al., 2014).

Este trabalho deu como resultado três publicações em revistas internacionais e um artigo está sendo preparado para submissão. Os artigos publicados são:

- Synthesis and characterization of (6-([2-(pyridin-2-yl)hydrazinylidene]methyl)pyridin-2-yl)- methanol: a supramolecular and topological study. (*Acta Cryst.* (2015). C71, 631–635)
- Theoretical and experimental comparative study of a derivative from 2-pyridinecarboxaldehyde which exhibits configurational dynamics. (*J. Mol. Struct.* 1119 (2016) 286-295)
- New pyrazolino and pyrrolidino[60]fullerenes: the introduction of the hydrazone moiety for the formation of metal complexes. (*J. Phys. Org. Chem.* (2016). e361)

Synthesis and characterization of (6-[[2-(pyridin-2-yl)hydrazinylidene]methyl]pyridin-2-yl)-methanol: a supramolecular and topological study

Monica Soto-Monsalve,^a Andrea Cabrera-Espinoza,^b Carlos D. Grande,^c Richard F. D'Vries^d and Manuel N. Chaur^{b*}

Received 17 March 2015

Accepted 23 May 2015

Edited by A. R. Kennedy, University of Strathclyde, Scotland

Keywords: reversible photo-induced *E/Z* isomerization; methanol; hydrazinylidene; crystal structure; hydrogen bonding; topology; Hirshfeld surface; **hcb** network; dynamic combinatorial chemistry.

CCDC reference: 1402540

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/c

^aInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, São Carlos, SP 13566-590, Brazil, ^bDepartamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, AA-25360 Cali, Colombia, ^cPrograma de Ingeniería Agroindustrial, Universidad San Buenaventura, AA 7154 Cali, Colombia, and ^dInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, São Carlos, SP 13566-590, Brazil. *Correspondence e-mail: manuel.chaur@correounivalle.edu.co

Hydrazone exhibit a versatile chemistry and are of interest for their potential use as functional molecular systems capable of undergoing reversible changes of configuration, *i.e.* *E/Z* isomerization. The title compound, C₁₂H₁₂N₄O, has an *E* configuration with respect to the hydrazone C=N bond. The crystal packing is formed by N—H...N and O—H...N hydrogen bonds that give a two-dimensional layer structure and C—H...C interactions associated with layer stacking to produce the three-dimensional supramolecular structure. These intermolecular interactions were analyzed and quantified by the Hirshfeld surface method and the two-dimensional supramolecular arrangement was topologically simplified as a **hcb** network.

1. Introduction

Hydrazone are imine-type compounds with an $R^1R^2C=N-NR^3R^4$ framework. Depending on the nature of the *R* substituents, these compounds exhibit a versatile chemistry. In general, hydrazones have attracted attention for their potential use as functional molecular systems capable of undergoing reversible changes of configuration, *i.e.* *E/Z* isomerization (Su & Aprahamian, 2014; Tatum *et al.*, 2014). These compounds may exhibit coordination dynamics due to the presence of coordination sites in the chemical structure (Ghosh *et al.*, 2011). This feature can allow metal-ion-controlled locking and unlocking, and therefore the reversible transformation of different states (Chaur *et al.*, 2011). Such properties are those regarded as suitable for dynamic combinatorial chemistry (DCC).

The aforementioned properties of hydrazones have enabled them to be used in supramolecular chemistry (Su & Aprahamian, 2014), for example, as molecular switches (Cnossen *et al.*, 2014; Yamamura *et al.*, 1992), metallo-assemblies (Lehn & Ulrich, 2009; Ruben *et al.*, 2006; Hardy, 2013) and sensors (Su & Aprahamian, 2014; Tatum *et al.*, 2014) of both cations and anions. Likewise, other systems, including light-driven molecular motors, have been developed (Cnossen *et al.*, 2014) and in that sense many of these systems can be implemented as digital molecular information storage systems due to the multiple dynamics that they exhibit in a reversible fashion.

A search in the Cambridge Structural Database (Groom & Allen, 2014) reveals that hydrazones derived from 6-[[2-

© 2015 International Union of Crystallography

research papers

Table 1
Experimental details.

Crystal data	
Chemical formula	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O
<i>M_r</i>	228.26
Crystal system, space group	Monoclinic, <i>C2/c</i>
Temperature (K)	291
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	23.461 (5), 5.5965 (13), 17.068 (3)
β (°)	96.544 (13)
<i>V</i> (Å ³)	2226.4 (8)
<i>Z</i>	8
Radiation type	Mo Kα
μ (mm ⁻¹)	0.09
Crystal size (mm)	0.2 × 0.1 × 0.05
Data collection	
Diffractometer	Nonius KappaCCD diffractometer
No. of measured, independent and observed [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)] reflections	21975, 2255, 1116
<i>R</i> _{int}	0.134
(sin θ/λ) _{max} (Å ⁻¹)	0.624
Refinement	
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²)], <i>wR</i> (<i>F</i> ²), <i>S</i>	0.043, 0.109, 0.83
No. of reflections	2250
No. of parameters	156
H-atom treatment	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
Δρ _{max} , Δρ _{min} (e Å ⁻³)	0.16, -0.14

Computer programs: *COLLECT* (Nonius, 1998), *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997), *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997), *SHELXS2013* (Sheldrick, 2015), *SHELXL2014* (Sheldrick, 2015), *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 2012), *Mercury* (Macrae *et al.*, 2008), *TOPOS* (Blatov *et al.*, 2014), *CrystalExplorer* (McKinnon *et al.*, 2004) and *WinGX* (Farrugia, 2012).

(pyridin-2-yl)hydrazinylidene]methyl]pyridine have been used in the synthesis of several complexes (79 hits). The presence of at least three coordinatively active N-atom positions and the possibility of functionalizing the aromatic rings makes this a very interesting template. Compounds with divalent transition metals, such as Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ and Ru²⁺ (Ghosh *et al.*, 2011, 2013; Rojo *et al.*, 1988; Chaur *et al.*, 2011; Chiumia *et al.*, 1999; Stadler *et al.*, 2010), have been observed. Also, these kinds of derivatives are found coordinated to metals such as Pb²⁺, Yb³⁺, Hg²⁺ and Mo⁰ (Ulrich *et al.*, 2009; Baraniak *et al.*, 1976; Ulrich & Lehn, 2009; Bruce *et al.*, 1974). The crystallographic data of only a few organic compounds derived from 2-hydrazinylpyridine have been reported (13 hits). The compound reported by Ulrich *et al.* (2009), namely (*E*)-[2-(2-[[4-([[(*tert*-butyl)dimethylsilyl]oxy)methyl]pyridin-2-yl)methylidene]hydrazinyl]pyridin-4-yl]methanol, is the most relevant here, with the crystal packing formed by O—H...N and N—H...N interactions.

Our group has paid special attention to hydrazones derived from pyridine-2-carbaldehyde and 2-hydrazinylpyridine, since this type of compound exhibits the well-known reversible photo-induced *E/Z* isomerization, coordination to metal centres and they possess an acidic N—H hydrogen. The latter allows the formation of intramolecular hydrogen bonds, adding special properties and new supramolecular architectures. Herein we report the synthesis, crystallographic characterization, topology and Hirshfeld surface calculation of (6-[[2-(pyridin-2-yl)hydrazinylidene]methyl]pyridin-2-yl)-

methanol, (2), a potential molecule for use in dynamic supramolecular chemistry.

2. Experimental

2.1. Synthesis and crystallization

The title compound, (2), was prepared by the condensation reaction between 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carbaldehyde, (1), and 2-hydrazinylpyridine in ethanol, resulting in a yellow solid in 82% yield (see Scheme 1).

Scheme 1

2.1.1. Preparation of 6-(hydroxymethyl)picolinaldehyde, (1). A solution of (pyridine-2,6-diyl)dimethanol (140 mg, 1 mmol) in chloroform (5 ml) was stirred with manganese dioxide (440 mg, 5 mmol) at room temperature for 6 h. The reaction mixture was filtered through Celite and the solvent was removed by evaporation, giving a yellow oil which was purified by column chromatography using silica gel as the stationary phase and a mixture of chloroform–methanol (9:1 v/v) as eluent to obtain the desired product as a colourless oil (55% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.94 (s, 1H), 8.06 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.67 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 194.19, 163.38, 151.88, 138.66, 125.41, 120.53, 64.37.

2.1.2. Preparation of (6-[[2-(pyridin-2-yl)hydrazinylidene]methyl]pyridin-2-yl)methanol, (2). A solution of 2-hydrazinylpyridine (110 mg, 1 mmol) in ethanol (1 ml) was added to a solution of (1) (138 mg, 1 mmol) in ethanol (1 ml) containing a catalytic amount of acetic acid. The resulting precipitate was washed several times with small portions of cold chloroform and was recrystallized from absolute ethanol to afford yellow needles (m.p. 463.2–464.0 K, 82% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 11.13 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.84–7.77 (m, 2H), 7.66 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.83–6.78 (m, 1H), 5.41 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 162.07, 157.18, 153.78, 148.32, 139.78, 138.55, 137.45, 119.75, 117.47, 116.05, 107.04, 64.63. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3421 (O—H), 3201 (N—H), 2924 and 2851 (C—H), 1602 (C=C), 1578 (C=N), 1090 (C—O). MS (EI, 70 eV) *m/z* (%): 228 (*M*⁺, 13). Analysis calculated for C₁₂H₁₂N₄O: C 63.15, H 5.30, N 24.55%; found: C 62.77, H 5.38, N 24.32%.

Figure 1
The molecular structure of the title compound, (2), showing the atom-labelling scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

2.2. Refinement

Crystal data, data collection and structure refinement details are summarized in Table 1. H atoms bonded to N and O atoms were located in difference Fourier maps and were refined isotropically. All H atoms bound to C atoms were placed in idealized positions, with C—H bond lengths fixed at 0.93 (aromatic) or 0.97 Å (methylene). All such H atoms were refined in riding mode, with displacement parameters calculated as $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$.

3. Results and discussion

The molecular structure of the title compound, (2), is illustrated in Fig. 1. This compound crystallized in the monoclinic space group $C2/c$ and presents an *E* configuration with respect to the $C7=N2$ bond of the hydrazone framework. The two pyridine rings present torsion angles of -171.33 (15) and 176.72 (14)° for $N1-C6-C7-N2$ and $N4-C8-N3-N2$, respectively.

The crystal packing is formed around hydrogen bonds (Table 2). The two self-complementary $N3-H3\cdots N4^i$ inter-

Table 2
Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
$N3-H3A\cdots N4^i$	0.96 (2)	2.08 (2)	3.045 (2)	180 (2)
$O1-H1\cdots N1^{ii}$	0.94 (2)	1.98 (3)	2.912 (2)	170 (2)

Symmetry codes: (i) $-x, -y+1, -z+1$; (ii) $-x+\frac{1}{2}, y-\frac{1}{2}, -z+\frac{1}{2}$.

Figure 3
The crystal packing of the title compound.

actions, with an $N\cdots N$ distance 3.045 (2) Å, give rise to dimers and generate the $R_2^2(8)$ homosynthon (Fig. 2). Neighbouring dimers are connected to each other by $O1-H1\cdots N1^{ii}$ interactions, with an $O\cdots N$ distance of 2.912 (2) Å (Fig. 2). This geometry joins the dimeric subunits along the $[111]$ and $[010]$ directions, giving rise to layers parallel to the $(10\bar{1})$ plane. Only weak interactions join the layers which stack to give the packing structure shown in Fig. 3. The contribution of these weak interactions is quantified below.

The two-dimensional supramolecular arrangement was topologically simplified. Each molecule is interconnected by hydrogen bonds acting as 3-connected nodes. This connectivity give rise to the two-dimensional network type **hcb**

Figure 2
A representation of the dimers formed by $N-H\cdots N$ interactions and $O-H\cdots N$ interdimer interactions. [Symmetry codes: (i) $-x, -y+1, -z+1$; (ii) $-x+\frac{1}{2}, y-\frac{1}{2}, -z+\frac{1}{2}$]

research papers

Figure 4
Topological simplification of the title hydrazone compound. [Figure corrupted; please provide replacement]

[Shubnikov hexagonal plane net/(6,3)] (Fig. 4) with point symbol (6³) (Blatov *et al.*, 2014).

An analysis of the Hirshfeld surface supports the results of the supramolecular and topological analysis. This surface shows the areas susceptible to strong and weak contacts. The colour pattern on the surface identifies as concave red curvatures the acceptor regions around the N and O atoms with their free electron pairs (Figs. 5a and 5b). The convex blue curvature for the donor groups is observed mainly in the N—H, O—H and C—H regions (McKinnon *et al.*, 2004; Hirshfeld, 1977). The fingerprint graphic (Fig. 6) presents a symmetric behaviour where the two sharp peaks projecting towards the bottom of the fingerprint plot are due to strong N—H...N interactions (acceptor = lower peak $d_e < d_i$) and

O—H...N (donor = top peak $d_e > d_i$) (Spackman & McKinnon, 2002). The most important interactions can be evaluated by overlapping contributions from the hydrogen-bond interactions, which includes N...H, H...N, H...H, O...H and C...H (Fig. 6). This analysis shows that the H...H and C...H interactions contribute the largest amount to the Hirshfeld surface with 44.7 and 14.3%, respectively. The N...H interactions that correspond to the homosynthon formation where the N atom acts as a hydrogen-bond acceptor contribute to 10.1% of the surface, whilst the N—H...N donor interaction involved in dimer connectivity and other interactions contribute to 7.4%. Finally, the strong O...H interaction contributes to 3.5% of the surface.

In conclusion, we have synthesized and structurally characterized the novel compound (6-[[2-(pyridin-2-yl)hydrazinylidene]methyl]pyridin-2-yl)methanol. The crystal structure presents weak intermolecular interactions, as well as hydrogen bonds, forming homosynthon subunits that build a two-dimensional arrangement. The molecule was topologically simplified as the two-dimensional network type **hcb**. Hirshfeld surface analysis supports the importance of N...H intermolecular interactions as being responsible for the formation of the two-dimensional arrangement. This analysis also revealed that weak H...H and C...H interactions are involved in the stacking of the layers, giving rise to three-dimensional molecular close packing. As the synthesized hydrazone molecule should be able to coordinate to metal centres, it will have potential use in supramolecular dynamic systems, molecular machines and information storage devices.

Acknowledgements

ACE and MNC thank the Vicerrectoría de Investigaciones of the Universidad del Valle, the Banco de la República, COLCIENCIAS and the Center of Excellence for Novel Materials (CENM) for the economic support to conduct this research. RD and MSM acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho

Figure 5
(a) A molecular representation in the same orientation as (b) the Hirshfeld surface.

Figure 6
Bidimensional fingerprint plots for the whole molecule and for the H...H, C...H, N...H, H...N and H...O close contacts

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the CNPq and CAPES/PNPD scholarships from the Brazilian Ministry of Education.

References

- Baraniak, E., Bruce, R. S. L., Freeman, H. C., Hair, N. J. & James, J. (1976). *Inorg. Chem.* **15**, 2226–2230.
- Blatov, V. A., Shevchenko, A. P. & Proserpio, D. M. (2014). *Cryst. Growth Des.* **14**, 3576–3586.
- Bruce, R. S. L., Cooper, M. K., Freeman, H. C. & McGrath, B. G. (1974). *Inorg. Chem.* **13**, 1032–1037.
- Chaur, M. N., Collado, D. & Lehn, J.-M. (2011). *Chem. Eur. J.* **17**, 248–258.
- Chiumia, G. C., Craig, D. C., Phillips, D. J., Rae, A. D. & Kaifi, F. M. Z. (1999). *Inorg. Chim. Acta*, **285**, 297–300.
- Cnossen, A., Browne, W. R. & Feringa, B. L. (2014). *Molecular Machines and Motors: Unidirectional Light-Driven Molecular Motors Based on Overcrowded Alkenes*, edited by A. Credi, S. Silvi, M. Venturi, pp. 139–162. Berlin: Springer-Verlag.
- Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 849–854.
- Ghosh, K., Kumar, P., Tyagi, N., Singh, U. P. & Goel, N. (2011). *Inorg. Chem. Commun.* **14**, 489–492.
- Ghosh, K., Mohan, V., Kumar, P. & Singh, U. P. (2013). *Polyhedron*, **49**, 167–176.
- Groom, C. R. & Allen, F. H. (2014). *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 662–671.
- Hardy, J. G. (2013). *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7881–7899.
- Hirshfeld, F. L. (1977). *Theor. Chim. Acta*, **44**, 129–138.
- Lehn, J. M. & Ulrich, S. J. (2009). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5546–5559.
- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J. & Wood, P. A. (2008). *J. Appl. Cryst.* **41**, 466–470.
- McKinnon, J. J., Spackman, M. A. & Mitchell, A. S. (2004). *Acta Cryst.* **B60**, 627–668.
- Nonius (1998). *COLLECT*. Nonius BV, Delft, The Netherlands.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods in Enzymology*, Vol. 276, Macromolecular Crystallography, Part A, edited by C. W. Carter Jr & R. M. Sweet, pp. 307–326. New York: Academic Press.
- Rojó, T., Mesa, J. L., Arriortua, M. I., Savariault, J. M., Galy, J., Villeneuve, G. & Beltran, D. (1988). *Inorg. Chem.* **27**, 3904–3911.
- Ruben, M., Lehn, J.-M. & Müller, P. (2006). *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1056–1067.
- Sheldrick, G. M. (2015). *Acta Cryst.* **C71**, 3–8.
- Spackman, M. A. & McKinnon, J. J. (2002). *CrystEngComm*, **4**, 378–392.
- Stadler, A.-M., Puntoriero, F., Nastasi, F., Campagna, S. & Lehn, J.-M. (2010). *Chem. Eur. J.* **16**, 5645–5660.
- Su, X. & Aprahamian, I. (2014). *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1963–1981.
- Tatum, L., Su, X. & Aprahamian, I. (2014). *Acc. Chem. Res.* **47**, 2141–2149.
- Ulrich, S., Buhler, E. & Lehn, J.-M. (2009). *New J. Chem.* **33**, 271–292.
- Ulrich, S. & Lehn, J.-M. (2009). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5546–5559.
- Yamamura, S., Tamaki, T., Seki, T., Sakuragi, M., Kawanishi, Y. & Ichimura, K. (1992). *Chem. Lett.* **21**, 543–546.

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/molstruc>

Theoretical and experimental comparative study of a derivative from 2-pyridinecarboxaldehyde which exhibits configurational dynamics

Mónica A. Gordillo^a, Mónica Soto-Monsalve^b, Gustavo Gutiérrez^c, Richard F. D'vries^d,
Manuel N. Chaur^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidad del Valle, 760032, Cali, Colombia

^b Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-590, São Carlos, Brazil

^c Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Icesi, Cali, Colombia

^d Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-590, São Carlos, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2015

Received in revised form

17 April 2016

Accepted 18 April 2016

Available online 21 April 2016

Keywords:

Acylhydrazone

Photoisomerization

NMR

DFT

HF

X-ray crystal diffraction

ABSTRACT

The (E)-4-nitro-N'-(pyridine-2-ylmethylene)benzohydrazide, a derivative from 2-pyridinecarboxaldehyde, displays E/Z isomerization induced by ultraviolet radiation in which the process of photoisomerization was evidenced and followed by 1D ¹H NMR. The structure of the compound was determined by FT-IR and NMR techniques and confirmed by single-crystal X-ray diffraction. The results in terms of bond angle and length, chemical shift (¹³C and ¹H) and vibrational frequencies obtained experimentally were compared to computed values at two levels of theory (Restricted Hartree–Fock and Density Functional Theory) using different basis set. The understanding of spectroscopy and dynamic properties of these type of compounds is of importance in view of their potential use in molecular machines and electronic devices.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acyl-hydrazones exhibit a large number of applications, among them, we can highlight the information storage. This functional group presents a weak double bond that is able to allow constitutional changes, through substituents interchange [1] establishing itself as a long term information storage strategy. Furthermore, acyl-hydrazones presents dynamical responses to diverse types of stimulus, both chemical (pH and conformational changes induced by metallic ions) and physical (pressure, heat and radiation) [2–5].

From a wide variety of possible stimuli, probably the most feasible is the luminous radiation (especially in UV spectral region) since the energy investment is lower compared to heat or pressure application and it has a higher practical applicability, interruption of stimulus once the system has reached the expected response using changes in the pH solution or the addition of metallic ions, is one of them and systems showing this on/off behavior are commonly known as molecular switches. Herein we present the

synthesis, photochemistry and spectroscopy comparison to theoretical calculations of an acyl-hydrazone derivative from 2-pyridinecarboxaldehyde capable of responding to UV radiation through a process of reversible E/Z photoisomerization where the product is stabilized by an intramolecular hydrogen bond.

2. Experimental and computational methods

The starting materials were purchased from Sigma–Aldrich and Alfa Aesar, they were used without any further purification. ¹H and ¹³C NMR spectra were taken in a 400 MHz Bruker Ultra Shield spectrometer and the FT-IR spectra were recorded on a Shimadzu FTIR-8400 instrument.

2.1. Synthesis A-1

An equivalent of 2-pyridinecarboxaldehyde was added to an ethanol solution (7 mL) of 4-nitrobenzohydrazide (1eq) and a trace amount of glacial acetic acid. This mixture was heated under reflux for 3 h, the appearance of precipitate was observed after the first 10 min of reaction. The white solid was filtered and recrystallized

* Corresponding author.

E-mail address: manuelchaur@correounivalle.edu.co (M.N. Chaur).

from ethanol (96% yield). M. p.: 227–228 °C. FT-IR (ν/cm^{-1}): 3221 (N–H), 1659 (C=O), 1595 (C=N). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ/ppm : 12.31 (s, 1 H), 8.64 (d, $J = 4.29$ Hz, 1 H), 8.49 (s, 1 H), 8.39 (d, $J = 8.59$ Hz, 2 H), 8.17 (d, $J = 8.59$ Hz, 2 H), 8.01 (d, $J = 7.80$ Hz, 1 H) 7.94–7.87 (m, 1 H) 7.47–7.42 (m, 1 H). ^{13}C NMR (100.60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ/ppm : 161.76, 152.96, 149.59, 149.38, 149.12, 138.80, 136.95, 129.26, 124.65, 123.69, 120.08. Elemental analysis calculated. (%) for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3$: C, 57.78; H, 3.73; N, 20.73; found: C, 57.86; H, 3.72; N, 20.62.

2.2. Photoisomerization of (*E*)-4-nitro-*N'*-(pyridine-2-ylmethylene) benzohydrazide

A solution of A-1 (in $\text{DMSO}-d_6$), in a NMR Quartz tube was placed 20 cm from a mercury-vapor lamp and was irradiated. Spectra were taken every 10 min starting from zero up to 90 min.

2.3. Crystallography

Single crystal X-Ray diffraction data were collected at Bruker

Fig. 1. ^{13}C NMR signals assignments of A-1.

Fig. 2. ^1H NMR signals assignments of A-1.

APEX-II CCD diffractometer with MoK α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) monochromated by graphite at 298 K. Data integration, cell and cell parameters determination was carried out using Bruker SAINT [6]. The structure was solved using the software SHELXS-2013, and then refined using SHELXL-2013, included in WinGX [7] and Olex2-1.2 [8]. CCDC 1424366 contains the supplementary crystallographic data for this paper.

2.4. Computational details

The theoretical studies were performed employing GaussView 5.0 [9] as graphic interface and Gaussian 09 [10] for computing. Determination of minimum energy geometry at ground state was carried out at two levels of theory: Density Functional Theory (RB3LYP method) and Restricted Hatree–Fock testing accuracy of three basis set: 6-31G+, 6-311G+ and 6-311G (d, p). Cartesian coordinates for optimized structures are provided in supplementary materials (see Tables S1–S12). As expected, the best theoretical–experimental correlation was achieved with the DFT: B3LYP method [11], for this reason DFT: B3LYP/6-311G (d, p) is used henceforth for frequency calculations where the absence of imaginary frequencies confirmed that the minimum energy structure was achieved [12]. NMR ^{13}C and ^1H chemical shift using TMS DFT: B3LYP/6-311G+ (d, p) internal Gaussian's 09 reference, additionally, DFT results was contrasted with RHF/6-311G (d, p) calculations. All chemical shifts were calculated using gauge-including atomic orbitals (GIAO) method without any solvent or solvation effect considerations.

3. Results and discussion

3.1. Nuclear magnetic resonance studies and computational chemical shifts calculations

Firstly, the molecular structure determination was carried out by NMR (^1H and ^{13}C), the assignments presented in Figs. 1 and 2 are supported both by literature information about typical chemical shift as well as experiments of homo and heteronuclear correlation NMR spectroscopy (COSY, HMBC and HSQC). Theoretical chemical shift for ^{13}C and ^1H was performed at two theory levels (DFT: B3LYP and RHF) using 6-311G (d, p) basis set with internal Gaussian's reference TMS DFT: B3LYP/6-311G+ (d, p) using gauge-including atomic orbitals (GIAO) method.

^{13}C NMR chemical shifts show an acceptable correlation with experimental data (see Table 1). DFT: B3LYP/6-311G (d, p) computed values show a clear tendency to overestimate, where biggest discrepancy comes from signal C-11: experimental spectrum presents two equivalent carbons (strong signal at 123.70 ppm) while theoretical spectrum shows two different signals (126.92 ppm and 135.85 ppm, 2.95 and 9.82% error, respectively). On the other hand, RHF/6-311G (d, p) computed values are totally underestimated and show significantly lower accuracy.

The biggest difference between experimental and calculated data was presented in C-7 signal, 149.13 ppm experimental value respect to 129.67 ppm computed value (13.05 absolute percent error), even the second greatest deviation in C-5 signal is near to the biggest deviation in DFT: B3LYP/6-311G (d, p) calculations (experimental 124.66 ppm respect to 112.92 ppm computed value, 9.42 absolute percent error).

Furthermore, prediction capacity of these theory level and basis set combination for ^1H NMR chemical shifts was unacceptable. The main source of error is signal 8 (see Fig. 2), N–H proton appears at 12.31 ppm in experimental ^1H NMR spectrum but at 8.20 ppm (DFT: B3LYP/6-311G (d, p), 33.41% error) and 6.64 ppm (RHF/6-311G (d, p), 46.06% error) in computed spectra. This sharp discrepancy

Table 1

NMR chemical shifts (^{13}C and ^1H): theoretical–experimental comparison.

^{13}C NMR chemical shifts		
Experimental (ppm)	DFT: B3LYP/6-311G (d, p)	RHF/6-311G (d, p)
149.39	155.43	149.08
124.66	126.00	112.92
136.96	138.90	131.93
120.09	128.28	113.02
152.97	157.34	144.52
149.13	143.39	129.67
161.77	161.17	149.31
138.81	144.61	134.38
123.70	135.85	123.80
129.27	128.14	119.27
149.60	155.67	138.87
129.27	126.92	117.80
Linear regression parameters		
Intercept	16.379	5.7139
Slope	0.9032	0.8978
R ²	0.8764	0.8527
^1H -NMR chemical shifts		
Experimental (ppm)	DFT: B3LYP/6-311G (d, p)	RHF/6-311G (d, p)
8.64	9.00	8.58
7.45	7.09	6.80
7.91	7.66	7.53
8.01	7.12	6.70
8.50	7.70	7.14
12.31	8.20	6.64
8.17	8.36	8.07
8.39	8.46	8.40
8.17	7.52	7.23
8.39	8.37	8.31
Linear regression parameters ^a		
Intercept	5.4683	5.9871
Slope	1.6481	1.6816
R ²	0.7377	0.6814

^a Regression data set excluding signals 8 and 9.

Table 2

Crystal data and structure refinement parameters.

Identification code	A-1
Empirical formula	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₄
Formula weight	288.27
Temperature/K	296 (2)
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
a/Å	7.3756 (3)
b/Å	13.1398 (5)
c/Å	14.7835 (6)
$\alpha/^\circ$	109.128 (2)
$\beta/^\circ$	90.531 (2)
$\gamma/^\circ$	101.107 (2)
Volume/Å ³	1324.21 (9)
Z	4
ρ_{calc} mg/mm ³	1.446
μ mm ⁻¹	0.110
F (000)	600
Crystal size/mm ³	0.242 × 0.175 × 0.112
2 θ range for data collection	1.462–26.494°
Index ranges	−9 ≤ h ≤ 9, −16 ≤ k ≤ 16, −17 ≤ l ≤ 18
Reflections collected	16449
Independent reflections	5290 [R (int) = 0.0195]
Data/restraints/parameters	5290/0/403
Goodness-of-fit on F ²	1.024
Final R indices [I > 2sigma(I)]	R1 = 0.0465, wR2 = 0.1191
R indices (all data)	R1 = 0.0724, wR2 = 0.1377
Largest diff. Peak/hole/e Å ⁻³	0.213/−0.204 e Å ⁻³

may not be entirely related to the accuracy of the computational method used, since the variability of this particular signal in ^1H

NMR experiments is remarkable, in fact, it is highly dependent on the solvent in which the spectrum was taken [13], similarly H—C=N proton (signal 7 in Fig. 2 and 8.50 ppm) shows significant deviation at both levels of theory: 7.70 ppm (DFT: B3LYP/6-311G (d, p), 9.42% error) and 7.14 ppm (RHF/6-311G (d, p), 16.00% error) explained by a high electronic environment dependence since this signal can appear from ~ 6–9.50 ppm [14]. Finally, another important source of error, as well as in computed ^{13}C NMR chemical shifts, was the presence of separate signals for equivalent protons in the theoretical spectrum: signal 11, a doublet at 8.16–8.18 ppm appears in theoretical spectra like two signals at 8.36 ppm and 7.52 ppm, 2.33 and 7.96% error, respectively for DFT: B3LYP/6-311G (d, p) calculations and 8.07 ppm and 7.23 ppm, 1.22 and 11.51% error for RHF/6-311G (d, p).

3.2. Crystallographic study and optimized structure

Non-hydrogen atoms of the molecules were clearly resolved, and the full-matrix least-squares refinements of these atoms with anisotropic thermal parameters were carried out. All hydrogen atoms were stereochemically positioned and refined with the riding model [15]. Hydrogen atoms bonded to N and O atoms were localized in the density map. ORTEP diagram was prepared with ORTEP-3 [16]. Mercury [17] software was used to prepare the artwork. Crystal data, data collection and structure refinement details are summarized in Table 2.

Compound A-1 crystallized in the triclinic space group P-1. There are two molecules of A-1 per asymmetric unit, where the pyridinic ring has rotated over the C₁₄–C₁₉ or C₅–C₆ bond generating two different conformers. This behavior generates a pseudo-translational symmetry element in (0.027, 0.508 and 0.012). When both conformers are refined in the same configuration, R₁ and WR₂ values are 0.0915 and 0.2166 respectively, compared with the values (0.0465 and 0.1191) obtained when the structure was refined as different conformers. It means that the model of two different conformers is closer to the experimental data.

Nitro and amide groups for the conformer 2 present torsion

angles of 1.28 (1)° and 158.18 (1)° for C₁₂–C₁₁–N₄–O₂ and O₁–C₇–C₈–C₉ bonds, respectively; in conformer 1, the same torsion angles are –14.65 (1)° and –172.94 (1)° for C₂₅–C₂₄–N₈–O₅ and O₄–C₂₀–C₂₁–C₂₆ bonds respectively (see Fig. 3).

The structure exhibits strong hydrogen bonds between A-1 and water molecules. These interactions enable to join the conformers, in an alternating way, giving rise to infinite chains along [010]. Hydrogen bonds parameters are listed in Table 3. O2w–H4w...N5, O2w–H3w...O4 with a distance of 2.9848 (1) Å, 2.8289 (1) Å respectively, form a R²₂(10) motif. N3–H3...O2w, O1w–H1w...O1 and N7–H7A...O1w form graph sets type D²₂(4) (see Fig. 4).

π – π stacking interactions between pyridinic and benzene rings are observed among molecules of the same conformer. The first conformer presents inter-centroid distances (cg1...cg2 and cg2...cg1) of 3.7562 (2) Å and 3.7405 (2) Å, while the second conformer presents distances (cg3...cg4 and cg4...cg3) of 3.6582 (1) Å and 3.7560 (2) Å, joining the chains along [100] direction (see Fig. 5).

Very weak C–H...O interactions between C2–H2...O3 and C17–H17...O6 with a distance of 3.530 (1) Å and 3.492 (1) Å, respectively, give rise to infinite chains along the [111] direction to complete the 3D supramolecular crystal packing (see Fig. 6 and 7).

The Hirshfeld surface shows the susceptible areas to strong and

Table 3
Hydrogen bonds for A-1.

D–H...A	d (D–H)	d (H...A)	d (D...A)	<(DHA)
O (1W)–H (1W) ... N (2) ^a	0.82 (3)	2.59 (3)	3.226 (2)	135 (3)
O (1W)–H (1W) ... O (1) ^a	0.82 (3)	2.08 (3)	2.842 (2)	155 (3)
O (1W)–H (2W) ... O (2W) ^b	0.79 (4)	2.41 (4)	3.170 (3)	161 (4)
N (3)–H (3A) ... O (2W) ^c	0.87 (2)	2.02 (2)	2.887 (3)	173 (2)
N (7)–H (7A) ... O (1W) ^d	0.87 (3)	2.02 (2)	2.860 (3)	164 (2)

^a –x, –y, –z+1.

^b –x+1, –y+1, –z+1.

^c –x, –y+1, –z+1.

^d 1–x, –y, 1–z.

Fig. 3. ORTEP representation of asymmetric unit of A-1. Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability level.

weak contacts (see Fig. 8). The map of shape index on the Hirshfeld surface can be used to find complementary regions (concave red curvature for H acceptor groups and convex blue curvature for H donor groups) where two molecular Hirshfeld surfaces touch each other [18,19]. In this case, concave red curvature is placed around N and O atoms with free electron pairs. The convex blue curvature was found mainly in N–H and C–H region. Over the aromatic rings are observed blue and red regions that evidence the π – π stacking.

The fingerprints graphic (see Fig. 9) presents a symmetric behavior where the two sharp peaks projecting downwards of the fingerprint are due to the strong O...H and N...H interactions [20]. The most important interaction can be evaluated by overlapping contributions from the hydrogen interactions which includes N...H, H...N, H...H, O...H and C...H. This analysis shows that the strong O...H interactions contribute the most to the Hirshfeld Surface with 33.1% followed by H...H with 29.7%, C...C that corresponds to π – π stacking contributes with 12.1%, while the strong N...H interactions contribute with 7.5% and C...H with 8.8%.

Optimization of molecular structure was performed at two levels of theory: Density Functional Theory (DFT) and Restricted Hartree–Fock (RHF), using different basis sets.

In concordance to experimental results, all computed structures show a essentially planar configuration in acyl-hydrazone bridge and pyridine ring while the nitro-benzene moiety shows a notable deviation respect to the observed planarity in molecular structure determined via single-crystal X-ray diffraction (see Fig. 10b). These deviations represent dihedral angles between acyl-hydrazone bridge and benzene ring ($N_3-C_7-C_8-C_9$) of 152.3° and ($N_3-C_7-C_8-C_{13}$) -30.4° (DFT B3LYP/6-311G) in contrast to experimental values -174.0° and 6.6° , respectively. Since this optimized geometry was calculated for an isolated molecule in gas phase, the conformational difference is explained by the absence of intermolecular interactions that modifies the orientation in solid state (see Fig. 10).

Another trend in computed optimized geometries is the presence of a possible resonant structure evidenced in dotted line over N_3-C_7 bond (see Fig. 10a) probably product of a keto-enol

Fig. 5. π – π stacking between pyridinic and benzene rings and growth along [100] direction.

tautomerization process [21]. This explanation is supported in ^1H NMR subtle evidence, where small shoulders next to almost all signals, suggest the existence of the tautomer in mention (see Fig. 2).

Fig. 4. a) Hydrogen bonds between A-I and water forming a $R^2_2(10)$ and two $D^2_2(4)$ graph sets, b) Hydrogen bonds between A-I and water forming a $D^2_2(4)$ graph set and c) Infinite chain along [010] direction.

Fig. 6. Weak C – H ... O interactions and growth along [111] direction.

Fig. 7. Crystal packing representation of A-1 view along [100] direction.

Fig. 8. Hirshfeld surface of A-1 without water.

For the purpose of determining the suitability of the application of computational methods for predicting bond length and angle in this particular system, two levels of theory and different basis set were tested and compared with selected crystallographic data values via linear regression using experimental data as independent variable and computed values as response, which are shown below in Table 4. Selected geometrical parameters used in linear regressions analysis are detailed in the supplementary information (see Tables S13 and S14).

Linear regression provides important information for evaluation of the general accuracy of these calculations because the slope is a proportion between experimental and theoretical data variation [22], estimating in this way the difference between both data sets. A perfect experimental-computed data correlation represents a slope equal to one, values greater or less than one represent over- or underestimated response, respectively. On the other hand, the intercept value provides quantitative information about deviation because this parameter is defined as the value of the response when the input variable is zero. In the same vein, the intercept determines, in average, in what extent the answer is over or underestimated. Finally, R^2 value provides the percentage of response variability that is explained by the variation of the independent variable, an indirect measure of the reliability of the parameters: slope and intercept [23].

Fig. 9. Bidimensional fingerprint plot for whole molecule and O...H, N...H, N...H, C...C, C...H and H...H close contacts.

Fig. 10. Optimized geometry for conformer 2: DFT: B3LYP 6-311G (d, p). (a) Frontal view; (b) Side view.

For conformer 2, the Restricted Hartree–Fock approximation showed considerable accuracy using 6-311G (d, p) basis set for determining the bond length with a lower computational cost, while DFT showed a high accuracy in the determination of the bond angles, however, since both of the calculations cannot be carried out separately, the level of theory with the greatest correlation was DFT, thus, DFT: B3LYP/6-311G (d, p) is a suitable option for theoretical prediction of molecular structure: $R^2 = 0.99272$ and 0.97648 for bond angles and lengths, respectively. The biggest discrepancy at this level of theory and basis set was the N_3-C_7 bond length (calculated length = 0.040 Å longer than X-ray determined length, 2.97% error) and $N_2-N_3-C_7$ bond angle (calculated angle is 3.1° higher than X-ray determined angle, 2.63% error).

On the other hand, structure optimization for conformer 1 showed similar theoretical–experimental correlation trends regarding conformer 2 (see Table 4). Nevertheless, the correlation for bond angle calculations showed a notably minor quality fit at all

basis set and levels of theory. These differences between one or other conformer using the same optimization routine are probably associated with intrinsic stability of each conformation, this affirmation is supported by a subtle minor energy for conformer 2 and one order of magnitude of difference between RMS gradients (see Table 5.) pointing out that the structure for this conformer is closer to an absolute optimization than conformer 1 and therefore has a greater stability.

3.3. FT-IR vibrational analysis

The Infrared spectrum was recorded on a Shimadzu FTIR 8400 spectrophotometer. The condensation reaction between 2-pyridinecarboxaldehyde and 4-nitrophenylhydrazine was evidenced by the disappearance of a $2823\text{--}2841\text{ cm}^{-1}$ band corresponding to aldehyde C–H stretching and occurrence of a weak signal at 3062 cm^{-1} corresponding to C–H stretching in the N=CH

Table 4
Linear regression fit parameters for bond angle and length data correlation.

Theory level/Basis set	Conformer 2			Conformer 1		
	Slope	Intercept	R ²	Slope	Intercept	R ²
Bond length linear regressions						
RHF/6-31 G+	0.9258	0.0898	0.99878	0.9211	0.0981	0.99936
DFT: B3LYP/6-31G+	0.8699	0.1846		0.8607	0.1992	0.99275
RHF/6-311 G+	0.9301	0.0836	0.99804	0.9235	0.0934	0.99884
DFT: B3LYP/6-311G+	0.8910	0.1407		0.8764	0.1770	0.99325
RHF/6-311 G (d, p)	1.0846	−0.1339	0.99870	1.0829	0.1305	0.99462
DFT: B3LYP/6-311G (d, p)	1.0225	−0.0336		1.0179	0.0261	0.97884
Bond angle linear regressions						
RHF/6-31 G+	0.7665	28.247	0.90213	0.6880	37.637	0.75325
DFT: B3LYP/6-31G+	0.9189	9.8312		0.8268	20.934	0.94956
RHF/6-311 G+	0.8433	18.944	0.95548	0.6972	36.527	0.76970
DFT: B3LYP/6-311G+	1.0182	2.0043		0.8190	21.885	0.94862
RHF/6-311 G (d, p)	1.2378	28.218	0.99625	1.0681	7.7680	0.88256
DFT: B3LYP/6-311 G (d, p)	1.2710	32.207		1.1000	11.594	0.92603
0.99272						

Table 5
Energy and RMS gradient values for both conformers.

Level of theory/Basis set	Conformer 2		Conformer 1	
	Energy ^a	RMS gradient	Energy ^a	RMS gradient
RHF/6-311 G (d, p)	−940.55564	0.00001685	−940.565634	0.00000861
DFT: B3LYP/6-311 G (d, p)	−945.88865	0.00000062	−946.201184	0.00000851

^a Energy values are provide in Hartrees.

moiety, finally the disappearance of H–N–H symmetrical stretch signal in 4-nitrophenylhydrazine IR spectra at 3322 cm^{−1} corresponding to hydrazine also notes that the expected reaction occurred.

Computed frequencies using DFT: B3LYP/6-311 G (d, p) were scaled (scale factor = 0.9679) [24] and compared with experimental data below in Table 6.

Vibrational frequencies correlation between experimental and computed frequencies evaluated via linear regression. Experimental data showed good agreement ($R^2 = 0.99259$), with a slight tendency to underestimate (slope = 0.9812 and intercept = 43.86).

Table 6
Selected signals in experimental IR and correlation with computed frequencies.

Assignments	Experimental/cm ^{−1}	DFT: B3LYP/6-311 G (d, p)
O=N–O Asym. Stretch	1543.05	1598.19
O=N–O Sym. Stretch	1344.38	1380.20
N–H Stretch	3221.12	3372.56
C–H stretch (N=CH)	3062.96	2909.69
C=O Stretch	1658.78	1726.99
C=N Stretch	1595.13	1623.50
C–H stretch (Ar–H)	3221.12	3123.25
N–H Rock	1514.12	1506.26
N–N Stretch	1056.99	1120.17
Py skeletal vibration	601.79	614.79
Benzene skeletal vibration	661.58	621.97

Largest deviation found comparing the two sets of data occurs in the bond stretching frequency N–N (5.98% error).

3.4. Photoisomerization

A solution of A-1 in DMSO-*d*₆ was irradiated by a mercury vapor lamp and several spectra were taken through time (see Fig. 11).

From the figure above we can observe the apparition of new signals after 5 min of UV light irradiation, which is an indicative of Z isomer formation. The percentages were calculated using proton 8 (–NH–) as a reference due to the appearance of a new – isolated and easy to integrate-signal at 15.84 ppm corresponding to the –NH– proton, which is part of an hydrogen bond in the metastable Z isomer. From this data and the rate law expression $rate = k[E_{isomer}]^2$, we found that the conversion from E to Z isomer follows a second order kinetics, having a rate constant of $k = 0.147 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Here we cannot say if the photoisomerization proceed via the rotation or inversion mechanism since it was not performed in a wide variety of solvents. However, this mechanism has been extensively studied for imines and hydrazones (lesser extent), having different results, some suggest that inversion is the mechanistic pathway followed for this kind of compounds, others supported in theoretical calculations have found that photoisomerization may occur by out-of-plane rotation. Therefore, more experimentation is needed in order to completely understand

Fig. 11. 1D ¹H NMR results of photoisomerization assay in DMSO-*d*₆.

the *E* to *Z* isomerization mechanism in hydrazones [25,26]. For acylhydrazones, nevertheless, it is known that photoisomerization proceeds through the weakening of the C=N bond because of the electronic transition from the π orbital of the amine moiety to the π^* orbital of the entire molecule, commonly named, the $\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$ transition. [27]

4. Conclusions

The structure of A-1 was confirmed by single crystal X-ray diffractions studies, thus showing that isomer E is the most stable configuration. Additionally, two conformers were found in the asymmetric unit differing on the rotation of the pyridinic ring over the C₁₄–C₁₉ or C₅–C₆ bond. Also, the configurational dynamics of A-1 was confirmed by the formation of Z isomer when UV light was applied, which was evidenced for the apparition of new signals in the spectrum and specially the one, low field shifted, corresponding to the –NH– being part of a hydrogen bond. Therefore, it was found that photoisomerization follows a second order kinetics, having a rate constant of $k = 0.147 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Determination of optimized structure using *ab initio* methods was achieved with good theoretical–experimental correlation; minimum energy structure (global minima) was demonstrated due to the absence of imaginary frequency in IR theoretical calculations (with good theoretical–experimental correlation). The best interrelation with experimental values was accomplished at DFT: B3LYP/6-311G + level of theory. On the other hand, calculated ¹³C NMR chemical shift showed acceptable theoretical–experimental correlation ($R^2 = 0.8764$ and 0.8527 for DFT and RHF, respectively)

while ¹H NMR chemical shift showed unacceptable correlation with experimental data, probably because solvation effect was not included in the calculation method.

Acknowledgments

M.N.C., M.A.G. and G.A.G. greatly thanks the Universidad del Valle, COLCIENCIAS and the Banco de la República for their generous financial support. M.S-M and R. D. Acknowledges FAPESP (2009/54011-8) for provide equipment, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the CNPq and CAPES/PNPD scholarships from the Brazilian Ministry of Education.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.04.055>.

References

- [1] P.T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K.R. West, J.L. Wietor, J.K. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* 106 (2006) 3652–3711.
- [2] M.N. Chaur, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* 69 (2012) m27–m27.
- [3] M.A. Fernández, J.C. Barona, D. Polo-Cerón, M.N. Chaur, *Rev. Colomb. Quím.* 43 (2014) 5–11.
- [4] M.N. Chaur, D. Collado, J.M. Lehn, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 248–258.
- [5] E.L. Romero, R.F. D'Vries, F. Zuluaga, M.N. Chaur, *J. Braz. Chem. Soc.* 6 (2015) 1265–1273.
- [6] APEX2, SAINT, v.6.28A, Bruker-AXS, Madison, WI, 2006. Bruker-Siemens: Madison, WI, 1997.
- [7] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849–854.

- [8] O.V. Dolomanov, I.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* 42 (2009) 339–341.
- [9] D. Roy, K. Todd, M. John, Gauss View, Version 5, Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS, USA, 2009.
- [10] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, et al., Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2010.
- [11] M.Y. Amusia, A.Z. Msezane, V.R. Shaginyan, *Phys. Scr.* 6 (2003) C13.
- [12] Ochterski, J.W. *Vibrational Analysis in Gaussian*. Available online: <http://www.gaussian.com/>.
- [13] H. Friebolin, 5th ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1993, 51.
- [14] D. J. Hutchinson, L.R. Hanton, S.C. Moratti, *Inorg. Chem.* 5 (2013) 2716–2728.
- [15] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8.
- [16] I.J. Farnugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997), 565–565.
- [17] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P.A. Wood, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 466–470.
- [18] J.J. McKinnon, M.A. Spackman, A.S. Mitchell, *Acta Crystallogr. B* 60 (2004) 627–668.
- [19] F.L. Hirshfeld, *Theor. Chim. Acta* 44 (1977) 129–138.
- [20] M.A. Spackman, J.J. McKinnon, *CrystEngComm* 4 (2002) 378–392.
- [21] A. Ramakrishnan, S.S. Chourasiya, P.V. Bharatam, *RSC Adv.* 5 (2015).
- [22] D. Stöckl, K. Dewitte, L.M. Thienpont, *Clin. Chem.* 11 (1998) 2340–2346.
- [23] J.O. Westgard, M.R. Hunt, *Clin. Chem.* 3 (2008) 49–57.
- [24] M.P. Andersson, P. Uvdal, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 2937–2941.
- [25] S.M. Landge, E. Tkatchouk, D. Benitez, D.A. Lanfranchi, M. Elhabiri, W.A. Goddard, I. Aprahamian, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 9812–9823.
- [26] J.M. Lehn, *Chemistry* 12 (2006) 5910–5915.
- [27] D.G. Belov, B.G. Rogachev, L.I. Tkachenko, V.A. Smirnov, S.M. Aldoshin, *Russ. Chem. Bull.* 49 (2000) 666–668.

New pyrazolino and pyrrolidino[60]fullerenes: the introduction of the hydrazone moiety for the formation of metal complexes

Elkin L. Romero^a, Andrea Cabrera-Espinoza^a, Nathaly Ortiz-Peña^a,
Mónica Soto-Monsalve^b, Fabio Zuluaga^a, Richard F. D'Vries^c and
Manuel N. Chaur^{a*}

The [3 + 2] cycloaddition reaction of C₆₀ with pyridine-derived hydrazones (acting as dipolar reagents) was successfully conducted resulting in fullerene derivatives 5a–b. The compounds were characterized by means of NMR, UV–Vis spectroscopy, and X-ray crystallography. The electrochemical behavior was also investigated. The fulleropyrazoline 5a exhibits anodically shifted reduction potentials of about 100 mV when compared with those for C₆₀, whereas 5b exhibits cathodic shifts relative to pristine C₆₀. The complexation reaction of 5b with metallic ions (Zn²⁺, Cd²⁺, and Fe²⁺) was achieved. Job and Benesi–Hildebrand analysis confirmed the formation of complexes with a molar ratio of 1:1 and binding constants between 2.26×10^5 and $1.59 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Electrochemistry of these complexes showed a marked influence of the metal ion on the reduction potentials. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: 1,3-dipolar cycloaddition; fullerene derivatives; hydrazone derivatives; pyrazolino[60]fullerene; pyrrolidino[60]fullerene

INTRODUCTION

Since the discovery of fullerenes in 1985 by Kroto, Curl, and Smalley^[1] and subsequent large-scale preparation in 1990,^[2] this type of molecules have attracted great interest in supramolecular chemistry.^[3] Many attempts to exohedrally functionalize C₆₀ with different molecules^[4–7] have resulted in the preparation of supramolecular systems, which increase its solubility and expand its applications in materials science as a result of the unique electrochemical and photophysical properties of these systems.^[8] One of the most widely used reactions for exohedral functionalization of C₆₀ is the 1,3-dipolar cycloaddition with azomethine ylides to form fulleropyrrolidines^[9]; however, a drawback is that it typically leads to mixtures of enantiomers and multiple additions; the latter can be overcome by controlled reaction conditions. Therefore, the functionalization of C₆₀ with 1,3-nitrile imines, generated *in situ* from the corresponding hydrazone derivative and N-bromosuccinimide (NBS), has shown to be an effective tool for controlling the formation of stereoisomers and to obtain a wide variety of fulleropyrazolines able to exhibit unique properties.^[10]

On the other hand, it is well known that hydrazones have physical and chemical properties able to be reversibly modulated in response to external stimuli such as those caused by light, heat, and pH variation.^[11] In addition, hydrazone derivatives from 2-pyridinecarboxaldehyde have shown to be good ligands as a result of the presence of coordination sites in their structures.^[12] The latter has been specially exploited in the design of metallogrids and molecular motors.^[11,13] Thereby, we report the preparation of two fullerene derivatives 5a and b through the 1,3-dipolar cycloaddition between C₆₀ and dipolar reagents containing hydrazone moieties. The preparation of 5a and b establishes the first step in obtaining supramolecular

systems, which take advantage not only of the electrochemical and photophysical properties of C₆₀ but also the coordination and photochemical properties of the hydrazone derivatives. Thus, the binding study of this type of compounds with metal ions is essential in order to explore their potential use in more complex systems.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and purification of precursors

Fullerene derivatives 5a–b were prepared in a multistep synthetic procedure, where the first step required the preparation of the aldehyde derivatives 2a–b as depicted in Scheme 1. Partial oxidation of hydroxymethyl-pyridines 1a–b with oxidizing reagents (pyridinium chlorochromate, PCC, or MnO₂)^[14] led to the formation of the corresponding aldehyde derivatives 2a–b in acceptable yields (50–55%). Once compounds 2a–b were obtained, the formation of the corresponding E-hydrazone derivatives 4a–b was

* Correspondence to: Prof. Dr. Manuel N. Chaur, Departamento de Química, Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia.
E-mail: manuel.chaur@correounivalle.edu.co

a E. L. Romero, A. Cabrera-Espinoza, N. Ortiz-Peña, F. Zuluaga, M. N. Chaur
Departamento de Química, Universidad del Valle, A.A. 25360, Cali, Colombia

b M. Soto-Monsalve
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-590, São Carlos, Brazil

c R. F. D'Vries
Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-590, São Carlos, Brazil

Scheme 1. Synthesis of fullerene derivatives **5a–b**. (a) Pyridinium chlorochromate, CH_2Cl_2 , RT; (b) ethanol, reflux; (c) C_{60} , Et_3N -Pyridine, Toluene, RT; (d) MnO_2 , CHCl_3 , RT; (e) MnO_2 , CHCl_3 , reflux; (f) C_{60} , *N*-ethylvalicine, reflux; (g) $[\text{M}]^{2+}$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}, \text{Fe}$), methanol, reflux.

performed by condensation with hydrazine derivatives **3a-b**, in good to very good yields (61–81%). Hydrazone **4b** was stirred with MnO₂ in CHCl₃ in order to synthesize **4c** (Scheme 1),^[15] which was obtained in an acceptable yield (53%). All compounds were fully characterized by spectroscopic techniques such as IR and 1D- and 2D-NMR (refer to Experimental Section). The structural elucidation of these compounds was further confirmed by single crystal X-ray diffraction of the **2a** and **4a** compounds (refer to Fig. 1).

Compound **2a** crystallizes in a monoclinic space group P_2 , and the molecule is almost planar, based on the maximum torsion angle $-4.3(7)^\circ$ for C5–C4–C6–O1, between the aromatic ring and the aldehyde group (Supporting Information S2). Compound **4a** crystallizes in the orthorhombic space group $P22121$. The aromatic and pyridinic rings have a torsion angle of 10.96° and 1.63° for the C8–C7–N3–N2 and C3–C4–C6–N2 bonds, respectively. Weak N3–H3O...N1 intermolecular interactions with a distance of $3.403(7)$ Å allows the formation of chains along the [010] direction. Weak π – π interactions are also

observed with a distance of 3.853(2) Å between the centroids of the aromatic rings. These interactions pack the chains along the [001] direction. Finally, very weak C3–H3... π interactions with a distance of 3.696(6) Å and an angle of 130.28(3)° give rise to the three-dimensional crystal packing shown in Fig. 2.

[3 + 2] Cycloaddition reaction on C₆₀: synthesis and purification of adducts

The synthetic procedure to attach the hydrazone to C_{60} via a 1,3-dipolar cycloaddition is similar to those reported previously.^[9,10] The synthesis of **5a** was carried out by the cycloaddition of the *in situ* generated nitylimine to C_{60} under an inert atmosphere at room temperature. Meanwhile, **5b** was synthesized by the cycloaddition of the *in situ* generated azomethine ylide to C_{60} by heating to reflux under an inert atmosphere. Thus, two different mixtures (**4a**, NBS, and NEt_3 for **5a** and **4c** and *N*-ethylglycine for **5a**) in toluene were added under argon bubbling into a toluene solution of C_{60} , the typical 1,3-dipolar cycloaddition procedure. The color of the reaction mixtures changed from purple to brown, confirming the formation of the products. The symmetry of C_{60} allows the formation of multi-addition products; so, the reaction was constantly monitored by thin-layer chromatography (TLC) in order to avoid such subproducts, which have lower retention coefficients.^[16] Once the reactions were completed, the fullerene derivatives were isolated and purified by column chromatography with yields of

Figure 1. ORTEP drawing of the asymmetric units of (a) 2-Chloro-5-pyridinecarboxaldehyde **2a**, (b) (*E*)-2-Chloro-5-pyridinecarboxaldehyde-phenylhydrazone **4a**. Ellipsoids are displayed at the 50% probability level

Figure 2. Representation of the (a) N3–H30...N1, (b) π – π , and (c) C3–H3... π supramolecular interactions for compound **5a**

32% for **5a** and 25% for **5b**. Details of the synthesis are shown in Scheme 1 and described in the Experimental Section.

The ^1H -NMR spectra revealed the formation of **5a-b** and the disappearance of the imine proton (signal at δ 7.89 ppm for **4a**) in the fulleropyrazoline **5a** and the formyl proton (signal at δ 9.97 ppm for **4c**) in the fulleropyrrolidine **5b**. It was possible to observe the appearance of new signals at 5.38, 5.18, and 4.28 ppm, corresponding to the protons of the pyrrolidine ring (refer to Fig. S3). The ^{13}C -NMR spectrum of **5a** showed the expected signals between 142 and 146 ppm and about 42 signals in total, where the eight signals of the pyrazoline ring were preserved. The UV–Vis spectra of both fullerene derivatives along with that for pristine C_{60} are shown in Fig. 3. The spectra of compounds **5a-b** show three absorptions centered at 336, 430, and 710 nm, which are typical of fullerene [6,6]-adducts.^[17] Both adducts showed an hypsochromic shift of about 336 nm in comparison to C_{60} as a result of the disruption of the π system by the elimination of a double bond $\text{C}=\text{C}$.^[18]

We also investigated whether it would be possible to substitute the chloro atom of **5a** with hydrazine to obtain the hydrazine derivative. Unfortunately, adding the hydrazine monohydrate solution to **5a** under several conditions always resulted in reduction of the C_{60} moiety.^[19]

Figure 3. UV–Vis spectra of C_{60} and fullerene derivatives **5a-b** in chloroform (2.0×10^{-5} M)

Complexation of **5b** with transition metals

Metal complexes were obtained through the reaction of **5b** with divalent transition metal salts (Zn^{II} , Cd^{II} , and Fe^{II}) in methanol (refer to Scheme 1). After precipitation, these compounds were washed with ethyl ether and methanol. As shown in Fig. 4, the complexation between the metal ions with **5b** causes a bathochromic shift of about 313 nm and a decrease of the energy of charge transfer and a decrease in the intensity in the UV–Vis and fluorescence spectra, respectively as a result of the delocalization of the lone pairs of the nitrogen atoms.^[20]

The binding constants of the complexes were determined by the Benesi–Hildebrand method.^[21] As shown in Fig. 5, the titration curves show the variation of the 390 nm absorbance as a function of added equivalents of M^{2+} . The absorbance increased as a result of charge transfer from the pyridine and imine nitrogen atoms to the metal ion.^[20] The equilibrium constants and the change of the molar absorptivity (K and $\Delta\epsilon$) were calculated from the plots of ΔA^{-1} versus $[\text{M}^{2+}]^{-1}$. The results showed that **5b** exhibits better affinity for metal centers with larger ionic radii (refer to Table 1), as a consequence of the low strain angle and high stability acquired by the five-membered rings formed by chelation with the larger ions.^[22]

Electrochemistry of fullerene derivatives

The electrochemical properties of compounds **5a-b** and the respective M^{2+} ($\text{M} = \text{Fe}$, Zn , and Cd) complexes of **5b** were studied by cyclic voltammetry and Osteryoung square wave voltammetry. Compound **5a** exhibits five reduction peaks within the solvent window (Table 2). The reductions are anodically shifted approximately ~ 0.09 V when compared with C_{60} ; in contrast, compound **5b** exhibits cathodic shifts for the reduction peaks.^{10c} The latter is understood on the basis of saturation of the $\text{C}=\text{C}$ double bond, which raises the energy of the lowest unoccupied molecular orbital, and therefore increases the highest occupied molecular orbital–lowest unoccupied molecular orbital (HOMO–LUMO) energy gap of the compound.^{10e} This behavior shows the effect of the exohedral moiety over the electrochemical properties of C_{60} . In that sense, the results show how the type of functionalization affects the redox potential of the derivative with respect to pristine C_{60} . Noteworthy, such ability to modulate the redox properties of fullerene derivatives can

Figure 4. Absorption (dash line) and emission (solid line) spectra of **5a** and $[\text{M}(\text{5a})]^{2+}$ in toluene ($\sim 1.1 \times 10^{-5}$ M)

Figure 5. Titration of **5b** (1.2×10^{-5} M) with M^{2+} in Toluene:MeOH 10%. (a) $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; (b) $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; (c) $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Wavelength in nanometers

Table 1. Results from linearization of graphics of $1/\Delta A$ versus $1/C_{M^{2+}}$ ($T = 26^\circ\text{C}$)

M^{2+}	m (10^{-5} M)	a	R	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	K (10^5M^{-1})	r_{ion} ($\text{\AA}$) ^[23]
Fe^{2+}	4.21 ± 0.08	6.68 ± 0.04	0.9958	12720 ± 151	1.59 ± 0.03	0.70
Zn^{2+}	3.72 ± 0.05	8.39 ± 0.03	0.9977	10128 ± 107	2.26 ± 0.03	0.74
Cd^{2+}	2.40 ± 0.03	7.40 ± 0.02	0.9976	11477 ± 119	3.09 ± 0.04	0.95

Table 2. Redox potentials of fullerene derivatives **5a** and **b** versus ferrocene in THF (V)¹

Compound	$E_{1/2\text{Red}}^1$	$E_{1/2\text{Red}}^2$	$E_{1/2\text{Red}}^3$	$E_{1/2\text{Red}}^4$	$E_{1/2\text{Red}}^5$
5a	−0.82	−1.31	−1.92	−2.21	−2.52
5b	−0.98	−1.49	−2.14	−2.65	
C₆₀	−0.91	−1.46	−2.01	−2.30	

¹Working electrode: glassy carbon; counter electrode: Pt wire; pseudoreference electrode: Ag wire. Supporting electrolyte: TBAPF₆. Scan rate: 0.1 V s^{-1} .

be potentially used for the development of solar cells and molecular electronics.

On the other hand, complexation seems to have a strong influence on the redox properties of the studied compounds. $\text{Fe}[\mathbf{5b}]^{2+}$ exhibits a first reduction potential around -0.43 V which presumably corresponds to the hydrazone moiety and four additional reduction potentials which are anodically shifted when compared with those for **5b**. In contrast, reduction potentials of $\text{Cd}[\mathbf{5b}]^{2+}$ do not seem to be very dif-

ferent from those of **5b**, while compound $\text{Zn}[\mathbf{5b}]^{2+}$ exhibits reduction potentials cathodically shifted with respect to **5b** (Table 3).

CONCLUSIONS

We have synthesized new fulleropyrrolidine and fulleropyrazoline derivatives via 1,3-dipolar cycloadditions to C_{60} . Additionally, metal complexes of **5b** were obtained. These compounds were fully characterized, and their electronic and electrochemical properties were studied. The binding constants of M^{2+} ($M = \text{Fe}$, Zn , and Cd) with **5b** were determined by Benesi–Hildebrand methods. The metal affinities are directly correlated with the ionic radii ($\text{Fe}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$) favoring the larger ones. On the other hand, electrochemistry of **5a–b** showed that reduction potentials can be either anodically or cathodically shifted by varying the exohedral moiety.

EXPERIMENTAL SECTION

All starting reagents were acquired from Sigma–Aldrich and were used without additional purification. The FT-IR, NMR (mono and bi-dimensional), UV–Vis, and fluorescence spectra were taken in Shimadzu FTIR-8400 spectrophotometer, NMR 400 MHz Bruker Ultra Shield, Pharma Spec Shimadzu UV–Vis UV-1700 spectrophotometer, and Jasco FP-8500 spectrofluorimeter, respectively. The mass spectra were obtained on a Hewlett Packard HP Engine-5989 spectrometer (equipped with a direct inlet probe) operating at 70 eV . The elemental analyses were obtained using a Thermo-Finnigan Flash EA1112 CHN (Elemental Microanalysis Ltd, Devon, UK) elemental analyzer. Cyclic voltammograms were recorded in a bipotentiostat model 700 B series electrochemical Analyzer/Workstation from CHI Instruments coupled to a computer.

Table 3. Redox Potentials of **5b** and its metal complexes versus ferrocene in THF (V)¹

Compound	$E_{1/2\text{Red}}^1$	$E_{1/2\text{Red}}^2$	$E_{1/2\text{Red}}^3$	$E_{1/2\text{Red}}^4$
5b	−0.98	−1.49	−2.14	−2.65
$\text{Fe}[\mathbf{5b}]^{2+}$	−0.43	−0.85	−1.10	−2.09
$\text{Zn}[\mathbf{5b}]^{2+}$	−1.03	−1.69	−2.46	
$\text{Cd}[\mathbf{5b}]^{2+}$	−0.99	−1.42	−2.18	−2.61

¹Working electrode: glassy carbon; counter electrode: Pt wire; pseudoreference electrode: Ag wire. Supporting electrolyte: TBAPF₆. Scan rate: 0.1 V s^{-1} .

2-Chloro-5-pyridinecarboxaldehyde (2a)

Pyridinium chlorochromate (2 equiv) was added to a solution of 2-chloro-5-hydroxymethyl-pyridine **1a** (1 equiv) in CH_2Cl_2 , and the mixture was agitated for 6 h to room temperature. Once the reaction was finished, the mixture was filtered and washed with CH_2Cl_2 ($2 \times 3.0 \text{ mL}$). Then, the resulting filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure, and the crude obtained was purified by column chromatography on silica gel by using CHCl_3 as a white solid; yield 50%. M.P. 181–182 °C; FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 2970 (C–H), 2847 (=C–H), 1714 (C=O), 1603 and 1595 (C=C and C=N), 1054 (C–O). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.10 (s, 1H, CHO), 8.87 (d, $J=2.26 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 8.14 (dd, $J=2.26 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 7.53 (d, $J=2.26 \text{ Hz}$, 1H, H-3), ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 189.97, 157.16, 152.14, 138.72, 125.680. MS (EI 70 eV) m/z (%): 141/143 [M^+] (42/15), 91 (100), 78 (100). Elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_6\text{H}_4\text{ClNO}$: C 50.91, H 2.85, N 9.90; found: C 49.47, H 2.76, N 8.90.

6-(hydroxymethyl)-2-pyridinecarboxaldehyde (2b)

MnO_2 (5 equiv) was added to a solution of 2,6-dihydroxymethyl-pyridine **1b** (1 equiv) in CHCl_3 and stirred at room temperature for 6 h. Once the reaction finished, methanol (3.0 mL) was added twice, and the solid formed was removed by filtration and discarded. Then, the resulting filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure, and the crude obtained was purified by column chromatography on silica gel by using a mixture of CHCl_3 :MeOH (25:1) as a yellow oil; yield 55%. FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3447 (O–H and N–H), 2921 (C–H), 2847 (=C–H), 1714 (C=O), 1603 and 1595 (C=C and C=N), 1054 (C–O). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 9.94 (s, 1H, CHO), 8.06 (t, $J=7.7 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 7.82 (d, $J=7.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 7.79 (d, $J=7.8 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 5.67 (t, $J=5.7 \text{ Hz}$, 1H, O–H), 4.69 (d, $J=5.6 \text{ Hz}$, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 194.2, 163.4, 151.9, 138.7, 125.4, 120.5, 64.4. MS (EI 70 eV) m/z (%): 137 [M^+] (100), 120 (40), 108 (84), 91 (100), 78 (100).

(E)-2'-Chloro-5'-pyridinecarboxaldehyde-phenylhydrazone (4a)

Phenylhydrazine **3a** (1 equiv) was added to a solution of 2-chloro-5-pyridinecarboxaldehyde **2a** (1 equiv) in ethanol; subjected to reflux during 3 h, the precipitate was collected by vacuum filtration and washed with cold ethanol to obtain the pure product in 61% as a yellow solid. M.P. 185–186 °C; FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3421 (O–H), 3201 (N–H), 2924 y 2851 (C–H), 1602 (C=C) 1578 (C=N), 1090 (C–O). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.49 (d, $J=2.26 \text{ Hz}$, 1H), 8.01–8.08 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.27–7.36 (m, 3H), 7.13 (s, 2H), 6.93 (t, $J=7.40 \text{ Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 150.5, 147.6, 143.9, 135.0, 131.9, 130.5, 129.4, 124.4, 120.9, 112.9. 64.63. MS (70 eV) m/z (%): 231/233 [M^+] (79/27), 92 (100). Elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3$: C 62.21, H 4.35, N 18.14; found: C 61.51, H 4.14, N 18.04.

(E)-6'-hydroxymethyl-2'-pyridinecarboxaldehyde-2-pyridyl-hydrazone (4b)

A solution of 2-hydrazinylpyridine **3b** (1 equiv) in ethanol (1 mL) was added to a solution of **2b** (1 equiv) in ethanol (1 mL) containing two drops of dilute acetic acid. The resulting precipitate was washed several times with small portions of chloroform, then it

was recrystallized from absolute ethanol to afford the pure product in 82% as beige solid. M.P. 190–191 °C; FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3421 (O–H), 3201 (N–H), 2924 y 2851 (C–H), 1602 (C=C) 1578 (C=N), 1090 (C–O). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 11.13 (s, 1H, N–H), 8.13 (d, $J=4.9 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 8.03 (s, 1H, H_{im}), 7.84–7.76 (m, 2H, H-4' and H-5'), 7.66 (t, $J=7.8 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 7.37 (d, $J=8.4 \text{ Hz}$, 1H, H-3'), 7.29 (d, $J=7.8 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 6.84–6.78 (m, 1H, H-5), 5.41 (t, $J=5.9 \text{ Hz}$, 1H, O–H), 4.56 (d, $J=5.8 \text{ Hz}$, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 162.1, 157.2, 153.8, 148.3, 139.8, 138.6, 137.5, 119.8, 117.5, 116.1, 107.0, 64.6. MS (70 eV) m/z (%): 228 [M^+] (13), 120 (100). Elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$: C 63.15, H 5.30, N 24.55; found: C 62.77, H 5.38, N 24.32.

(E)-6'-carboxaldehyde-2'-pyridinecarboxaldehyde-2-pyridyl-hydrazone (4c)

A solution of **4b** (1 equiv) in CHCl_3 (2 mL) was shaken with MnO_2 (5 equiv) and heated under reflux for 4 h. Once the reaction finished, methanol (3.0 mL) was added, and the solid formed was removed by filtration and discarded. Then, the resulting filtrate was concentrate to dryness under reduced pressure, and the crude obtained was purified by column chromatography on silica gel by using a mixture CHCl_3 :MeOH (9:1) as eluent and obtained in 53% as a yellow solid. M.P. 196–197 °C; FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3210 (N–H), 2983 (=C–H), 1759 (C=O) 1603, 1595 (C=C and C=N). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 11.36 (s, 1H, N–H), 9.97 (s, 1H, CHO), 8.24 (d, $J=8.0 \text{ Hz}$, 1H, H-5'), 8.16–8.14 (m, 2H, H_{im} and H-6), 8.03 (t, $J=7.8 \text{ Hz}$, 1H, H-4'), 7.82 (d, $J=7.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3'), 7.69 (d, $J=8.7$, 1H, H-4), 7.34 (d, $J=8.4 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 6.86–6.81 (m, 1H, H-5). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 193.9, 156.9, 155.6, 152.5, 148.3, 138.6, 138.4, 138.3, 123.7, 121.3, 116.1, 107.2. MS (70 eV) m/z (%): 226 [M^+] (20), 197 (29), 120 (100). Elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$: C 47.68, H 3.27, N 20.22; found: C 47.14, H 3.18, N 19.84.

(6-6-(2'-Phenyl-3'-(6-chloropyridinyl))-1,9-fulleropyrazoline (5a)

A solution of **4a** (1 equiv), pyridine (2 equiv), and NBS (2 equiv) in 40 mL of toluene was cooled to 0 °C and added in 100 mL solution of C_{60} (1 equiv) and Et_3N (1 equiv) in toluene. The reaction mixture was stirred for 2 h in inert atmosphere until a color change from violet to dark brown was observed. The thin-layer chromatography showed two different spots corresponding to the pristine fullerene and desired product. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by flash chromatography using a mixture of toluene:hexane (3:1) as eluent and obtained in 25% as a brown solid. FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3025–2966 (=C–H), 1605 (C=N), 1431 (C=C C_{60}), 1310 (C–N), 1164 (C=C C_{60}), 581 (C=C C_{60}), 517 (C=C C_{60}). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.40 (d, $J=2.26 \text{ Hz}$, 1H), 8.57–8.64 (m, 1H), 7.91–8.00 (m, 2H), 7.45–7.56 (m, H), 7.18 (d, $J=7.28 \text{ Hz}$, H), ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 151.82, 148.89, 147.69, 147.29, 146.43, 146.33, 146.08, 146.01, 145.92, 145.73, 145.57, 145.40, 145.34, 145.26, 145.23, 145.01, 144.61, 144.30, 144.17, 143.22, 143.13, 142.96, 142.92, 142.45, 142.42, 142.23, 142.19, 141.94, 140.52, 139.89, 139.84, 138.22, 137.90, 136.77, 136.30, 129.48, 129.07, 128.26, 127.88, 125.83, 125.33, 124.53, 124.14. Elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{72}\text{H}_8\text{ClN}_3$: C 91.00, H 0.85, N 4.42; found: C 90.21, H 1.04, N 4.19.

N-Ethyl-2-(6-((2-(pyridin-2-yl)hydrazono)methyl)pyridine)-3,4-fulleropyrrolidine (5b)

A solution of C₆₀ (1 equiv), 4c (5 equiv), and N-ethylglycine (5 equiv) in 70 mL of toluene was heated under reflux for 30 min in inert atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by flash chromatography using mixture of toluene:ethyl acetate (9:1) as eluent and obtained in 32% as a brown solid. FT-IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3212 (N-H), 3340-2966 (=C-H), 2905-2761 (C-H), 1605 (C=N), 1425 (C=C C₆₀), 1305 (C-N), 1178 (C=C C₆₀), 573 (C=C C₆₀), 520 (C=C C₆₀). ¹H NMR (400 MHz, CS₂-CDCl₃ 10:1) δ ppm: 9.88 (s, 1H, N-H), 8.06 (ddd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.7 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-6), 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3 and H-5), 7.92 (s, 1H, H_{im}), 7.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4), 7.63 (ddd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-4'), 7.38 (d, *J* = 8.5, 1H, H-3'), 6.80 (ddd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H-5'), 5.38 (s, 1H, H_d), 5.18 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H_c), 4.28 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H_c'), 3.40 (dq, *J* = 7.4 Hz, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_b'), 2.80 (dq, *J* = 7.3 Hz, *J* = 11.4 Hz, 1H, H_b), 1.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃). Elemental analysis calcd (%) for C₇₅H₁₇N₅: C 91.18, H 1.73, N 7.09; found: C 90.73, H 1.74, N 6.99.

Acknowledgements

The authors greatly thank the Vicerrectoría de Investigaciones of the Universidad del Valle, COLCIENCIAS, and the Center of Excellence for Novel Materials (CENM) for the economic support to conduct this research. R. D. and M.S.-M. acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico y Tecnológico for the CAPES/PNPD and CNPq scholarship from Brazilian Ministry of Education. The authors are grateful to prof. Luis Echegoyen for his valuable comments for improving the manuscript.

REFERENCES

- [1] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* **1985**, 318, 162–163.
- [2] W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, R. D. Huffman, *Nature* **1990**, 347, 354–358.
- [3] a) J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 89–112; b) C. Bingel, *Chem. Ber.* **1993**, 126, 1957–1959; c) A. Hirsch, I. Lamparth, H. R. Karfunkel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 437–438.
- [4] a) M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9798–9799; b) M. Prato, M. Maggini, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 519–526; c) M. Prato, T. Suzuki, H. Foroudian, Q. Li, K. Khemani, F. Wudl, J. Leonetti, R. D. Little, T. White, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 1594–1595; d) K. V. Gothelf, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 863–909.
- [5] a) E. Beer, M. Feuerer, A. Knorr, A. Mirlach, J. Daub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 1087–1089; b) K. F. Liou, C. H. Cheng, *Chem. Commun.* **1996**, 12, 1423–1424; c) S. Wu, W. Sun, D. Zhang, L. Shu, H. Wu, J. Xu, X. Lao, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, 1, 1733–1738; d) X. Zhang, A. Fan, C. S. Foote, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5456–5461.
- [6] a) A. Hirsch, M. Brettlich, *The Chemistry of Fullerenes*. Wiley-VCH, Weinheim, **2005**; b) N. Martin, *Chem. Commun.* **2006**, 20, 2093–2104; c) I. Coldham, R. Hufton, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2765–2810.
- [7] a) N. Martin, J. F. Nierengarten, *Supramolecular Chemistry of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Wiley, Singapore, **2012**; b) D. M.

- Guldi, N. Martin, *Comprehensive Nanoscience and Technology*. Elsevier, Amsterdam, **2011**.
- [8] L. Pasimeni, A. Hirsch, I. Lamparth, A. Herzog, M. Maggini, M. Prato, C. Corvaja, G. Scorrano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12896–12901.
- [9] a) K. Matsumoto, K. Hashimoto, M. Kamo, Y. Uetani, S. Havase, M. Kawatsura, T. Itoh, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 9226–9230; b) A. Ruiz, J. Coro, L. Almagro, J. A. Ruiz, D. Molero, E. E. Maroto, S. Filippone, M. A. Herranz, R. Martínez-Alvares, J. C. Sancho-García, F. Di Melo, M. Suartes, N. Martin, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2819–2826; c) M. Karakawa, T. Nagai, K. Adachi, Y. Ie, Y. Aso, *J. Mater. Chem. A* **2014**, 2, 20889–20895.
- [10] a) E. Espildora, J. L. Delgado, P. de la Cruz, A. de la Hoz, V. Lopez-Arza, F. Langa, *Tetrahedron* **2002**, 58, 5821–5826; b) J. Modin, H. Johansson, H. Grennberg, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3977–3979; c) J. L. Delgado, N. Martin, P. de la Cruz, F. Langa, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5332–5241; d) R. N. Rutte, T. B. Parsons, B. G. Davi, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12297–12299; e) M. Maggini, A. Karlson, G. Scorrano, G. Sandoma, G. Farnia, M. Prato, *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 5, 589–590.
- [11] a) X. Su, I. Aprahamian, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1963–1981; b) L. Tatum, X. Su, I. Aprahamian, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 2141–2149.
- [12] a) M. N. Chaur, D. Collado, J. M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 248; b) X. Su, T. F. Robbins, I. Aprahamian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1841–1844; c) S. C. Burdette, *Nat. Chem.* **2012**, 4, 695–696; d) J. T. Foy, D. Ray, I. Aprahamian, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 209–213; e) E. L. Romero, R. F. D'vries, F. Zuluaga, M. N. Chaur, *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 26(6), 1265–1273.
- [13] a) S. M. Landge, E. Tkatchouk, D. Benítez, D. A. Lanfranchi, M. Elhabiri, W. Goddard, I. Aprahamian, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 9812–9823; b) X. Su, S. Voskian, R. P. Hughes, I. Aprahamian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10734–10739; c) M. A. Fernandez, J. C. Barona, D. Polo, M. N. Chaur, *Rev. Col. Quím.* **2014**, 43(1), 5–11.
- [14] a) G. Tojo, M. Fernández, *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones*. Springer, New York, **2006**; b) R. Artali, M. Botta, C. Cavallotti, G. Giovannina, G. Palmisano, M. Sisti, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2441–2447.
- [15] S. Ulrich, E. Buhler, J. M. Lehn, *New J. Chem.* **2009**, 33, 271–292.
- [16] L. Dai, *Carbon Nanotechnology: Recent Developments in Chemistry, Physics, Materials Science and Device Applications*. 1st edn. Elsevier, Amsterdam, **2006**.
- [17] G. D. Han, W. R. Collins, T. L. Andrew, V. Bulović, T. M. Swager, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 23, 3061–3069.
- [18] a) D. M. Guldi, K. D. Asmus, *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 1472–1481; b) A. Akbari, Z. Alinia, *Turkish J. Chem.* **2013**, 37, 867–878.
- [19] a) W. E. Billups, W. Luo, A. Gonzalez, D. Arguello, L. B. Alemany, T. Marriott, M. Saunders, H. A. Jiménez-Vázquez, A. Khong, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 171–174; b) Y. He, C. Zhong, Y. Zhou, H. Zhang, *J. Chem. Sci.* **2009**, 121, 407–412; c) J. A. Kemlo, T. M. Shepherd, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, 47, 158–162; d) A. W. Varnes, R. B. Dodson, E. L. Wehry, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 946–950.
- [20] a) L. A. Saghatforoush, A. Aminkhani, S. Ershad, G. Karimnezhad, S. Ghammami, R. Kabiri, *Molecules* **2008**, 13, 804–811; b) S. S. Tandon, S. Chander, L. K. Thompson, *Inorganic Chem. Acta* **2000**, 302, 683–692.
- [21] A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703–2707.
- [22] a) R. D. Hancock, *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 615–621; b) K. R. Graham, J. Mei, R. Stalder, J. W. Shim, H. Cheun, F. Steffy, F. So, B. Kippelen, J. R. Reynolds, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, 3, 1210–1215; c) B. Kippelen, J. L. Bredas, *Energy Environ. Sci.* **2009**, 2, 251–261.
- [23] G. W. C. Kaye, T. H. Laby, *Tables of Physical and Chemical Constants*. 16th edn. Longman, London, **1995**.

Supporting information

Additional supporting information can be found in the online version of this article at the publisher's website.

8 Referências

ARNOLD, H. et al. International Tables for Crystallography. 5. ed. The Netherlands: Springer, 2002. v. A

ASANO, N.; NISHIDA, M. KIZU, H.; MATSUI, K. Homonojirimycin isomers and glycosides from *aglaonema treubii*. Journal of Natural Products, v. 60, n. 2, p. 98–101, 1997.

BALAKRISHNAN, K.; NIMMANPALLI, R.; RAVANDI, F.; KEATING, M. J.; GANDHI, V. Forodesine, an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, v. 108, n. 7, p. 2392–2398, 2006.

BEN-ABRAHAM, S. I. What is a crystal? Zeitschrift für Kristallographie, v. 222, n. 6, p. 310–310, 2008.

BERGES, D. A.; ZHANG, N.; HONG, L. Bicyclic azasugars containing a glycosidic heteroatom 2: D-lyxose analogues. Tetrahedron, v. 55, n. 50, p. 14251–14260, 1999.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; Gilliland, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The protein data bank. Nucleic Acids Research. v. 28, n. 1, p. 235–242. 2000.

BLAKE, A. J.; CLEGG, W.; COLE, J. M.; EVANS, J. S. O.; MAIN, P.; PARSONS, S.; WATKIN, D. J. Crystal structure analysis: principles and practice. 2. ed. Oxford: Oxford University, 2009. p.1-8.

Crystal Impact. Diamond. Bonn, Germany: Crystal Impact, 2014. Programa de computador.

BRUKER. SAINT. Madison, Wisconsin, USA: Bruker AXS. 2012a. Programa de computador.

BRUKER. APEX2. Madison, Wisconsin, USA: Bruker AXS. 2012b. Programa de computador.

- BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E.; SHUGAR, D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 88, n. 3, p. 349–425, 2000.
- CACERES, R. A.; TIMMERS, L. F.; PAULI, I.; GAVA, L. M.; DUCATI, R. G.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DE AZEVEDO, W. F. Jr. Crystal structure and molecular dynamics studies of human purine nucleoside phosphorylase complexed with 7-deazaguanine. *Journal of Structural Biology*, v. 169, n. 3, p. 379–388, 2010.
- CANDURI, F.; SILVA, R. G.; DOS SANTOS, D. M.; PALMA, M. S.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DE AZEVEDO, W. F. Jr et al. Structure of human PNP complexed with ligands. *Acta Crystallographica Section D*, v. 61, n. 7, p. 856–862, 2005.
- CHAPMAN, T. M.; COURTNEY, S.; HAY, P.; DAVIS, B. G. Highly diastereoselective additions to polyhydroxylated pyrrolidine cyclic imines: ready elaboration of aza-sugar scaffolds to create diverse carbohydrate-processing enzyme probes. *Chemistry – A European Journal*, v. 9, n. 14, p. 3397–3414, 2003.
- CHAUR, M. N.; COLLADO, D.; LEHN, J.-M. Configurational and constitutional information storage: multiple dynamics in systems based on pyridyl and acyl hydrazones. *Chemistry – A European Journal*, v. 17, n. 1, p. 248–258, 2011.
- CNOSSEN, A.; BROWNE, W. R.; FERINGA, B. L. Unidirectional light-driven molecular motors based on overcrowded alkenes. *Topics in Current Chemistry*, v. 354, p. 139–162, 2014.
- CRAGG, P. . *Supramolecular chemistry: from biological inspiration to biomedical applications*. New York: Springer, 2010. p. 12.
- CREMER, D. A general definition of ring substituent positions. *Israel Journal of Chemistry*, v. 20, n. 1–2, p. 12–19, 1980.
- CREMER, D.; POPLE, J. A. General definition of ring puckering coordinates. *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, n. 6, p. 1354–1358, 1975.
- DAVIS, B. G.; BRANDSTETTER, T. W.; HACKETT, L.; WINCHESTER, B. G.; NASH, J.; WATSON, A. A.; GRIFFITHS, R. C.; SMITH, C. FLEET, G. W. J. Tetrazoles of

manno- and rhamno-pyranoses: Contrasting inhibition of mannosidases by [4.3.0] but of rhamnosidase by [3.3.0] bicyclic tetrazoles. *Tetrahedron*, v. 55, n. 14, p. 4489–4500, 1999.

DESIRAJU, G. R. Hydrogen bridges in crystal engineering: interactions without borders. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 7, p. 565–573, 2002.

DESIRAJU, G. R.; STEINER, T. The weak hydrogen bond: in structural chemistry and biology. 1. ed. Oxford: Oxford University, 2001. p.5-16.

Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio. San Diego, florida, USA: Dassault Systèmes, 2005.

DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, E. J.; HOWARD, J. A. K.; PUSCHMANN, H. OLEX2 : a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*, v. 42, n. 2, p. 339–341, 2009.

EALICK, S. E.; BABU, Y. S.; BUGG, C. E.; ERION, M. D.; GUIDA, W. C.; MONTGOMERY, J. A.; SECRIST, J. A. Application of crystallographic and modeling methods in the design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 24, p. 11540–11544, 1991.

ERION, M. D.; STOECKLER, J. D.; GUIDA, W. C.; WALTER, R. L.; EALICK, S. E. Purine nucleoside phosphorylase. 2. Catalytic mechanism. *Biochemistry*, v. 36, n. 39, p. 11735–11748, 1997.

FARRUGIA, L. J. WinGX and ORTEP for Windows : an update. *Journal of Applied Crystallography*, v. 45, n. 4, p. 849–854, 2012.

FURMAN, R. R.; HOELZER, D. Purine nucleoside phosphorylase inhibition as a novel therapeutic approach for B-cell lymphoid malignancies. *Seminars in Oncology*, v. 34, n. 6 Suppl 5, p. S29-34, 2007.

GARCIA, Ariel. Reação de arilação de Heck com sais de arenodiazonio : aplicações nas sínteses totais de prolinas e pirrolidinas poliidroxiladas, rolipram e analogos do baclofeno, e na síntese formal de prepolicitrina A e policitrina A. 2008. 784. Tese

(doutorado em Ciências) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

GIACOVAZZO, C.; MONACO, H. L.; ARTIOLI, G.; VITERBO, D.; FERRARIS, G.; GILLI, G.; ZANOTTI, G.; CATTI, M. Fundamentals of crystallography. Oxford: Oxford University, 1992. p.91-104.

GRABOWSKI, S. Hydrogen bonding: new insights. New York: Springer, 2009. p.1-59.

GSCHWEND, D. A.; GOOD, A. C.; KUNTZ, I. D. Molecular docking towards drug discovery. Journal of Molecular Recognition: JMR, v. 9, n. 2, p. 175–186, 1996.

HIRSHFELD, F. L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. Theoretica Chimica Acta, v. 44, n. 2, p. 129–138, 1977.

HUNTER, C. A.; LAWSON, K. R.; PERKINS, J. URCH, C. Aromatic interactions. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. n. 5, p. 651–669, 2001.

HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The nature of .pi.-.pi. interactions. Journal of the American Chemical Society, v. 112, n. 14, p. 5525–5534, 1990.

HUWE, C. M.; BLECHERT, S. A flexible synthesis of azasugars and homoazasugars via olefin metathesis. Synthesis, v. 1997, n. 01, p. 61–67, 1997.

GLUSKER, J. P.; TRUEBLOOD, K. N. Crystal structure analysis: a primer. 3. ed. Oxford: Oxford University, 2010. p. 3-25

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. Journal of Molecular Biology, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

KABSCH, W. Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. Journal of Applied Crystallography, v. 21, n. 6, p. 916–924, 1988.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.

KIM, B. K.; CHA, S.; PARKS, R. E. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes ii. Kinetic analysis and substrate-binding studies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 243, n. 8, p. 1771–1776, 1968.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KLINE, P. C.; SCHRAMM, V. L. Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction. *Biochemistry*, v. 32, n. 48, p. 13212–13219, 1993.

KUMAR, N.; HENDRIKS, B. S.; JANES, K. A.; DE GRAAF, D. LAUFFENBURGER, D. A. Applying computational modeling to drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 17–18, p. 806–811, 2006.

MACRAE, C. F. BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E. RODRIGUEZ-MONGUE, L.; TAYLOR, R.; VAN DE STREEK, J.; WOOD, P.A. Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 41, n. 2, p. 466–470, 2008.

MATERI, W.; WISHART, D. S. Computational systems biology in drug discovery and development: methods and applications. *Drug Discovery Today*, v. 12, n. 7–8, p. 295–303, 2007.

MCKINNON, J. J.; SPACKMAN, M. A.; MITCHELL, A. S. Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*, v. 60, n. 6, p. 627–668, 2004.

MINGOS, D. M. P. *Supramolecular assembly via hydrogen bonds II*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. v. 111

MOMPARLER, R. L. Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology*, v. 2, p. 20, 2013.

MURKIN, A. S.; CLINCH, K.; MASON, J. M.; TYLER, P. C.; SCHARAMM, V. L. Immucillins in custom catalytic-site cavities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, n. 22, p. 5900–5903, 2008.

NONIUS. COLLECT. Delft, The Netherlands: Nonius BV, 1998. Programa de computador.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. [20] processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, v. 276p. 307–326. 1997.

POITOUT, L.; LE MERRER, Y.; DEPEZAY, J.-C. Synthesis of azasugars. Part 1 isomerization of polyhydroxylated piperidines. *Tetrahedron Letters*, v. 37, n. 10, p. 1609–1612, 1996.

RUBEN, M.; LEHN, J.-M.; MÜLLER, P. Addressing metal centres in supramolecular assemblies. *Chemical Society Reviews*, v. 35, n. 11, p. 1056–1067, 2006.

RUIZ, M.; RUANOVA, T. M.; OJEA, V.; QUINTELA, J. M. Amino and hydroxy acid based diastereoselective synthesis of 1-deoxygalactostatin and its imino acid derivative. *Tetrahedron Letters*, v. 40, n. 10, p. 2021–2024, 1999.

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry*, v. 71, n. 1, p. 3–8, 2015.

SHI, W.; LEWANDOWICZ, A.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; ALMO, S. C.; SCHRAMM, V. L. 1RSZ: structure of human purine nucleoside phosphorylase in complex with dadme-immucillin-h and sulfate. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1RSZ>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

SPACKMAN, M. A. Molecules in crystals. *Physica Scripta*, v. 87, n. 4, p. 048103, 2013.

SPACKMAN, M. A.; JAYATILAKA, D. Hirshfeld surface analysis. v. 11, n. 1, p. 19–32, 2009.

SPACKMAN, M. A.; MCKINNON, J. J. Fingerprinting intermolecular interactions in molecular crystals. *CrystEngComm*, v. 4, n. 66, p. 378–392, 2002.

SPEK, A. L. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, n. 1, p. 7–13, 2003.

SU, X.; APRAHAMIAN, I. Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. *Chemical Society Reviews*, v. 43, n. 6, p. 1963–1981, 2014.

TATUM, L. A.; SU, X.; APRAHAMIAN, I. Simple hydrazone building blocks for complicated functional materials. *Accounts of Chemical Research*, v. 47, n. 7, p. 2141–2149, 2014.

TIMMERS, L. F.; CACERES, R. A.; VIVAN, A. L.; GAVA, L. M.; DIAS, R. DUCATI, R. G.; BASSO, L. A.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Structural studies of human purine nucleoside phosphorylase: Towards a new specific empirical scoring function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 479, n. 1, p. 28–38, 2008.

ULRICH, S.; LEHN, J.-M. Adaptation to shape switching by component selection in a constitutional dynamic system. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 15, p. 5546–5559, 2009.

VERDONK, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 52, n. 4, p. 609–623, 2003.

WATERS, M. L. Aromatic interactions in model systems. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, n. 6, p. 736–741, 2002.

Web of Science [v.5.23] - Result Analysis. Disponível em:
<<http://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

YAMAMURA, S.; TAMAKI, T.; SEKI, T.; SAKURAGI, M.; KAWANISHI, Y.;
ICHIMURA, K. α -Hydrazono- β -keto esters as command molecules. *Chemistry Letters*, n. 4, p. 543–546, 1992.