

Câmpus
Anápolis de Ciências
Exatas e Tecnológicas
Henrique Santillo



Universidade
Estadual de Goiás



Mestrado em Ciências
Moleculares

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM CIÊNCIAS MOLECULARES

LUIZ FELIPE NUNES NAVES

**ANÁLISE ESTRUTURAL SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM DERIVADO
DE TIOXOPIRIMIDINA**

ANÁPOLIS - GO

2021

LUIZ FELIPE NUNES NAVES

**ANÁLISE ESTRUTURAL SOBRE A ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE UM DERIVADO DE
TIOXOPIRIMIDINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares

Área de Concentração: Físico-Química Molecular

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Barbosa Napolitano

Coorientador: Dr. Jean Marcos Ferreira Custodio

Anápolis - GO

2021



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Dados do autor (a)

Nome Completo: LUIZ FELIPE NUNES NAVES

E-mail: luinnu@gmail.com

Dados do trabalho

Título: ANÁLISE ESTRUTURAL SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM
DERIVADO DE TIOXOPIRIMIDINA

Data da Defesa: 24/08/2021

Tipo

() Tese (X) Dissertação

Programa de Mestrado em Ciências Moleculares

Concorda com a liberação documento

[X] SIM

[] NÃO **Casos de impedimento:** Período de embargo por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo necessita de justificativa junto à coordenação do curso.

- [] Solicitação de registro de patente;
- [] Submissão de artigo em revista científica;
- [] Publicação como capítulo de livro;
- [] Publicação da dissertação/tese em livro.

_____ , 24 / 08 / 2021
Local Data

Luiz Felipe Nunes Naves
Assinatura do autor (a)

Romilda B. Nepolitano
Assinatura do orientador (a)

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N323 NAVES, LUIZ FELIPE NUNES
a Análise Estrutural Sobre a Atividade Biológica de um
Derivado de Tioxopirimidina / LUIZ FELIPE NUNES NAVES;
orientador Hamilton Barbosa Napolitano; co-orientador
Jean Marcos Ferreira Custodio. -- Anápolis, 2021.
55 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Moleculares) -- Câmpus
Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual
de Goiás, 2021.

1. Cristalografia. 2. Química supramolecular. 3.
Superfície de Hirshfeld. 4. Docking molecular. 5.
Tioxopirimidinas. I. Napolitano, Hamilton Barbosa,
orient. II. Custodio, Jean Marcos Ferreira, co-orient.
III. Título.

ANÁLISE ESTRUTURAL SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM DERIVADO DE TIOXOPIRIMIDINA

LUIZ FELIPE NUNES NAVES

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 24/08/2021 por:



Prof. Dr. Hamilton Barbosa Napolitano



Prof. Dr. Silvio do Desterro Cunha



Dr. Jean Marcos Ferreira Custodio

ANÁPOLIS – GO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar para o caminho certo e me dar forças para superar os desafios.

À minha família, por sempre estar comigo, me apoiar e me dar suporte para que meus sonhos fossem possíveis. Em especial à minha mãe, por todo cuidado, carinho e sacrifício.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hamilton Barbosa Napolitano, pelo incentivo, boa vontade, tranquilidade, plenitude e compaixão, sendo sempre um exemplo de ética, além de todo o aprendizado propiciado.

Ao meu coorientador, Dr. Jean Marcos Ferreira Custodio, pela paciência, profissionalismo, incentivo e zelo, sendo de grande contribuição para minha formação como pesquisador.

À Profa Dra Nádia Melo Borges, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, IFG, Brasil, pela colaboração nos estudos de *docking* molecular.

Aos membros do grupo de Química Teórica e Estrutural de Anápolis (QTEA), que compartilharam seus conhecimentos e suas vontades de estudar as ciências moleculares e a cristalografia, bem como as ferramentas para produzir trabalhos interdisciplinares de qualidade.

À Associação Latino-Americana de Cristalografia (LACA) pelo apoio na participação de sua segunda escola de cristalografia e de seu quarto encontro, mostrando como a cristalografia é trabalhada no mundo e como ela pode ser utilizada em diversas áreas da ciência.

À Universidade Estadual de Goiás e ao Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares por reunir, ao longo da minha trajetória, excelentes professores que possibilitaram um ambiente rico de aprendizagem e de pesquisa. Agradecimentos também pelo uso do Núcleo de Computação de alta-performance.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos que permitiu que o trabalho fosse desenvolvido.

RESUMO

As pequenas moléculas são as principais substâncias que regulam a inibição de proteínas nos organismos. Dentro desse grupo, as tioxopirimidinas se destacam por apresentarem derivados bioativos e por haver uma grande variedade de análogos que ainda não foram identificados. No estudo desses compostos, a cristalografia se apresenta como uma metodologia importante por ser capaz de descrever com precisão o arranjo dos átomos e das moléculas no cristal, o que possibilita inferir sobre suas propriedades físicas e químicas e simular sua afinidade com o sítio ativo de proteínas. Nesse trabalho foi estudado o composto 4-metil-2-fenil-6-tioxo-1,6-diidro-5-pirimidinacarboxilato de etila (MP-TDPy), com o objetivo de determinar sua estrutura cristalina, identificar e quantificar suas principais interações intermoleculares, analisar sua conformação, avaliar teoricamente sua reatividade e avaliar possíveis modificações estruturais para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial biológico. Para isso, foram utilizadas a metodologia cristalográfica a partir da difração de raios X por monocristais, análise da superfície de Hirshfeld, comparações de conformações no cristal e no sítio de ligação de proteína, cálculos teóricos de otimização geométrica, orbitais moleculares de fronteira e superfície de potencial eletroestático, além de *docking* molecular. A análise cristalográfica sugere que sua estrutura cristalina é estabilizada por ligações de hidrogênio coordenadas por moléculas de água, além de interações do tipo C—H...S e π - π . Os resultados do *docking* molecular mostram uma acomodação razoável da molécula no sítio de ligação da topoisomerase IV e que elas interagem principalmente por ligações de hidrogênio entre a porção de tioxopirimidina e os resíduos Glu198, Thr292 e Gly225, auxiliada por interações hidrofóbicas envolvendo o resto da molécula. Esses resultados sugerem uma relação entre a atividade antibacteriana apresentada principalmente com a porção 4-tioxopirimidina, sugerindo a investigação de novos compostos que utilizem esse fragmento molecular como base.

Palavras-chave: *tioxopirimidinas, difração de raios X, superfície de Hirshfeld.*

ABSTRACT

Small molecules are the main substances that regulate protein inhibition in organisms. Within this group, thioxopyrimidines stand out for having bioactive derivatives and because of the wide variety of analogues that have not yet been identified. In the study of these compounds, crystallography presents itself as an important methodology for being able to accurately describe the arrangement of atoms and molecules in the crystal, which makes it possible to infer about their physical and chemical properties and simulate their affinity with the active site of proteins. In this work, the compound ethyl 4-methyl-2-phenyl-6-thioxo-1,6-dihydro-5-pyrimidinecarboxylate (MP-TDPy) was studied in order to determine its crystal structure, identify and quantify its main intermolecular interactions, analyze their conformation, theoretically evaluate their reactivity and evaluate possible structural modifications for the development of new molecules with biological potential. For this, the crystallographic methodology will be used from single crystal X-ray diffraction, analysis of the Hirshfeld surface, comparisons of conformations in the crystal and in the protein binding site, theoretical calculations of geometric optimization, frontier molecular orbitals and molecular electrostatic potential, in addition to molecular docking. Crystallographic analysis suggests that its crystal structure is stabilized by hydrogen bonds coordinated by water molecules, in addition to C—H \cdots S and π - π interactions. The docking results show a reasonable accommodation of the molecule at the topoisomerase IV binding site and interact mainly by hydrogen bonds between the thioxopyrimidine portion with Glu198, Thr292, and Gly225, aided by hydrophobic interactions involving the rest of the molecule. These results suggest a relationship between the antibacterial activity shown and the 4-thioxopyrimidine portion, leading to the investigation of new compounds that use this scaffold.

Keywords: *thioxopyrimidines, X-ray diffraction, Hirshfeld surface.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação dos parâmetros da cela unitária	17
Figura 2.2 – Representação das 14 redes de Bravais, organizadas por sistema cristalino	18
Figura 2.3 – Representação de um modelo para o espalhamento dos raios X por O e O'	19
Figura 2.4 – Representação da difração dos raios X sendo tratada como uma reflexão causada um plano que contém espalhadores eletrônicos pontuais	21
Figura 2.5 – Representação dos planos (111), (110) e (100). Note que na imagem a base de vetores utilizada foi escrita como x , y e z ao invés de a , b e c	23
Figura 3.1 – Representação ORTEP da unidade assimétrica da MP-TDPy	30
Figura 3.2 – Representação do MP-TDPy destacando os átomos desordenados	32
Figura 3.3 – Caminho de interações formado pelas ligações de hidrogênio N1—H1...O1 e O1—H1C...N2 (a), também estabilizadas por interações π - π (b)	33
Figura 3.4 – Empacotamento cristalino destacando as interações N—H...O, O—H...S e C—H...S	34
Figura 3.5 – Propriedade d_{norm} da superfície de Hirshfeld da MP-TDPy e diagramas fingerprint	35
Figura 3.6 – Propriedade <i>shape index</i> da superfície de Hirshfeld da MP-TDPy	36
Figura 3.7 – Sobreposição das conformações no estado cristalino e no <i>docking</i>	37
Figura 3.8 – Os FMO calculados para conformações cristalográfica (a) e do <i>docking</i> (b). O MEP para cada conformações é apresentado em (c)	37
Figura 3.9 – Resultados do <i>docking</i> para o composto MP-TDPy na estrutura cristalográfica da topoisomerase IV 1S14	38
Figura 3.10 – Representação bidimensional dos resultados do <i>docking</i> , mostrando o composto MP-TDPy fazendo ligações de hidrogênio (linha tracejada vermelha) e interações hidrofóbicas (círculos verdes)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Informações experimentais da MP-TDPy.....	31
Tabela 3.2 – Seleção de ângulos diedrais da MP-TDPy. Os ângulos com um asterisco são os correspondentes desordenados.....	32
Tabela 3.3 – Geometria das principais interações intermoleculares no cristal de MP-TDPy. Os hidrogênios das moléculas de água estão com uma distância D—H idealizada.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

07N – Novobiocina

B3LYP – Becke, 3 parâmetros, Lee – Yang – Parr

Cg1 – Anel aromático da MP-TDPy

Cg2 – Anel pirimidina da MP-TDPy

DFT – Teoria do Funcional de Densidade

D—H...A – Doador, hidrogênio e aceitador

FMO – Orbitais Moleculares de Fronteira

HOMO – Orbital Molecular ocupado mais alto

LUMO – Orbital Molecular desocupado mais baixo

MEP – Potencial Eletrostático Molecular

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MP-TDPy – 4-metil-2-fenil-6-tioxo-1,6-diidro-5-pirimidinacarboxilato de etila

PDB – Banco de dados de proteínas

QTEA – Química Teórica e Estrutural de Anápolis

RMSD – Desvio médio quadrático

LISTA DE SÍMBOLOS

\vec{a} , \vec{b} e \vec{c} – Vértices da cela unitária

\vec{a}^* , \vec{b}^* , e \vec{c}^* – vetores de base do espaço recíproco

A , B e C – Faces da cela unitária; Cela unitária centrada em uma das faces.

A_j – Amplitude da onda de um espalhador eletrônico pontual j

d_{norm} – Propriedade distância de contatos normalizada da superfície de Hirshfeld.

d_e – Distância entre o núcleo mais próximo da superfície externa e a própria superfície de Hirshfeld

d_i – Distância entre o núcleo mais próximo da superfície interna e a própria superfície de Hirshfeld

E_{gap} – Diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO

f – Fator de espalhamento atômico

F – Cela unitária centrada em todas as faces; amplitude total de um conjunto de ondas espalhadas

$F(\vec{s})$ – Fator de estrutura

$F(hkl)$ – Fator de estrutura discreto

\mathcal{F} – Operador transformada de Fourier

h , k e l – Índices de Miller

I – Cela unitária de corpo centrado

$L(\vec{r})$ – Função rede cristalina

$L^*(\vec{s})$ – Rede recíproca

N – Número de elétrons pontuais

O – Espalhador eletrônico pontual centrado na origem

O' – Espalhador eletrônico pontual

P – Cela unitária primitiva

r^{vdW} – Raio de Van der Waals

\vec{r} – Distância entre dois átomos ou entre dois espalhadores eletrônicos.

\vec{r}_0 – Vetor deslocamento pontual

$\vec{r}_{u,v,w}$ – Vetor deslocamento da cela unitária em três dimensões

R – Cela unitária romboédrica

\vec{s} – Vetor que define os planos e as direções no espelho recíproco

\vec{S} – Onda espalhada

\vec{S}_0 – Onda incidente

u, v e w – números inteiros que determinam a direção de $\vec{r}_{u,v,w}$

V – Volume da cela unitária; função que descreve o potencial eletrostático molecular

x, y e z – Coordenadas do espaço direto

α, β e γ – Ângulos formados entre os vértices da cela unitária

δ – Diferença de caminho óptico

λ – Comprimento de onda

$\rho(\vec{r})$ – Densidade eletrônica da cela unitária

$\rho_{amostra}(\vec{r})$ – Densidade eletrônica da amostra cristalina

ϕ – Diferença de fase

Ψ – Função da onda espalhada

ω – Ângulo diedral

$\omega(r)$ – Função que define a superfície de Hirshfeld, região onde $\omega = 0,5$

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO II – FUNDAMENTOS DA CRISTALOGRAFIA	16
2.1 SIMETRIA NOS CRISTAIS	16
2.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR CRISTAIS	18
2.3 INDICES DE MILLER E INDEXAÇÃO	22
2.4 REDE CRISTALINA E O TEOREMA DA CONVOLUÇÃO.....	24
2.5 DENSIDADE ELETRÔNICA E O PROBLEMA DA FASE.....	25
CAPÍTULO III – ESTUDO ESTRUTURAL SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA	27
3.2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	28
3.2.1 Superfície de Hirshfeld	28
3.2.2 Cálculos de estrutura eletrônica.....	29
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.3.1 Análise do estado sólido	30
3.3.2 Modelagem molecular	36
3.3.3 Arranjo supramolecular.....	38
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO I	45

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

As pequenas moléculas desempenham um importante papel no estudo e desenvolvimento de fármacos (SCHREIBER, 2000) por frequentemente serem responsáveis no regulamento do metabolismo através do processo de inibição de proteínas (BERG, 2008), por exemplo. Por esse motivo elas têm sido alvo de investigações de diversos pesquisadores (TEICHMANN et al., 2001). No processo de investigação de pequenas moléculas para potencial uso farmacêutico é necessário conhecer detalhadamente a substância, desde a forma de sintetizá-la, sua caracterização, sua ação *in vitro*, até sua toxicidade, antes de ser considerada para testes *in vivo* (MOHS; GREIG, 2017). Uma etapa importante deste processo é a descrição de sua estrutura cristalina, o que permite determinar quais interações a molécula tende a realizar no estado sólido, comportamento que pode se replicar em sistemas biológicos, além de ser um dos métodos de caracterização mais precisos (DESIRAJU, G. R., 2001). O conhecimento da estrutura cristalina permite também comparações com modelos teóricos e ajudam na sua validação, permitindo comparações entre a molécula isolada e no estado cristalino (THOMAS et al., 2012). Com essas informações, é possível simular a atividade da molécula em sistemas biológicos através do *docking* molecular e assim direcionar a escolha de novas moléculas no desenvolvimento de fármacos (TAYLOR; JEWSBURY; ESSEX, 2002). Uma comparação entre o padrão de interações do *docking* e da estrutura cristalina permite, por exemplo, cogitar a troca de substituintes para melhorar as propriedades observadas (MEIRA et al., 2018). A própria estrutura cristalina permite também o cálculo de propriedades óticas lineares ou não lineares (MASSE; ZYSS, 1991).

Considerando isso, o grupo de Química Teórica e Estrutural de Anápolis (QTEA) vem se consolidando no estudo de pequenas moléculas permitindo um espaço de colaboração entre diversas áreas relacionadas às ciências moleculares, como a Química Orgânica, Espectroscopia, Química Teórica e Cristalografia. O grupo já apresenta trabalhos de determinação e análise de estruturas cristalinas de pequenas moléculas em conjunto com sua síntese, caracterização e testes biológicos (TERNAVISK et al., 2014), propriedades óticas não lineares (VAZ et al., 2016), *docking* molecular (SALLUM et al., 2019), entre outros.

Para um melhor entendimento dos fundamentos da análise estrutural de pequenas moléculas, no capítulo II dessa monografia são apresentados alguns tópicos básicos sobre a Cristalografia, que podem ser divididos em: simetria dos cristais, que são as formas como a matéria se organiza no espaço no estado cristalino; difração de raios X por monocristais, o fenômeno físico resultado da interação da radiação X com uma amostra cristalina que permite determinar a distribuição do seu conteúdo eletrônico; e a Síntese e Transformada de Fourier, as ferramentas matemáticas que tornam possível correlacionar a distribuição eletrônica da amostra com o padrão de difração. Além disso, o capítulo traz também alguns conceitos importantes para o entendimento do método cristalográfico como a indexação.

Como exemplo de aplicação da Cristalografia, o autor participou como coautor de dois artigos em que pode contribuir com a análise cristalográfica, dos quais analisou as estruturas de um derivado de chalcona (MICHELINI et al., 2018) e dois derivados de quinolinona (MICHELINI et al., 2020). Além disso, o Capítulo III desta monografia apresenta um estudo recentemente publicado pelo autor (NAVES et al., 2021) sobre a estrutura de um derivado de tioxopirimina, a 4-metil-2-fenil-6-tioxo-1,6-diidro-5-pirimidinacarboxilato de etila (MP-TDPy), também disponível na íntegra no Anexo I. Esse trabalho foi motivado por um artigo anterior (CUNHA et al., 2007) em que um conjunto de compostos baseados em tioxopirimidina apresentou resultados antibacterianos, de forma que esse fragmento da estrutura poderia ser o responsável. Dentre elas, a MP-TDPy obteve melhores resultados e, por já ter disponível a estrutura cristalina, foi escolhida como objeto de estudo. Assim, foram feitos um novo refinamento e a análise estrutural, suportado por cálculos teóricos e *docking* molecular. Portanto, este trabalho procura descrever e analisar a estrutura cristalina da MP-TDPy e relacionar essas informações com os resultados encontrados nos cálculos teóricos, *docking* e testes biológicos, com o objetivo de identificar o padrão de interação da molécula e criar esqueletos base para a busca de novas moléculas bioativas.

CAPÍTULO II – FUNDAMENTOS DA CRISTALOGRAFIA

O conhecimento do arranjo tridimensional dos átomos no espaço é de grande interesse no estudo de pequenas moléculas, uma vez que permite calcular várias de suas propriedades químicas, físico-químicas e biológicas. Uma vez conhecida a estrutura da matéria a nível atômico é possível inferir várias de suas propriedades. Porém, o ser humano é incapaz de enxergar os átomos com seu sistema óptico. Isso acontece porque a visão humana é compatível apenas com ondas eletromagnéticas com comprimento de onda entre 4000 e 7000 Ångströms aproximadamente, incompatíveis com as distâncias interatômicas, da ordem de 1 Ångström. Dessa forma, devemos recorrer a métodos alternativos para “enxergar” os átomos. Para isso, uma metodologia bastante utilizada é a difração de raios X por monocristais. A metodologia cristalográfica pode ser descrita por três pilares: a simetria, que permite representar toda a amostra por uma pequena parte que se repete de forma ordenada; a difração de raios X por cristais, o fenômeno físico que é específico de cada estrutura cristalina; e a transformada de Fourier, a matemática que permite relacionar a conteúdo eletrônico da amostra com o padrão de difração observado (NAPOLITANO; CAMARGO; MASCARENHAS, 2007).

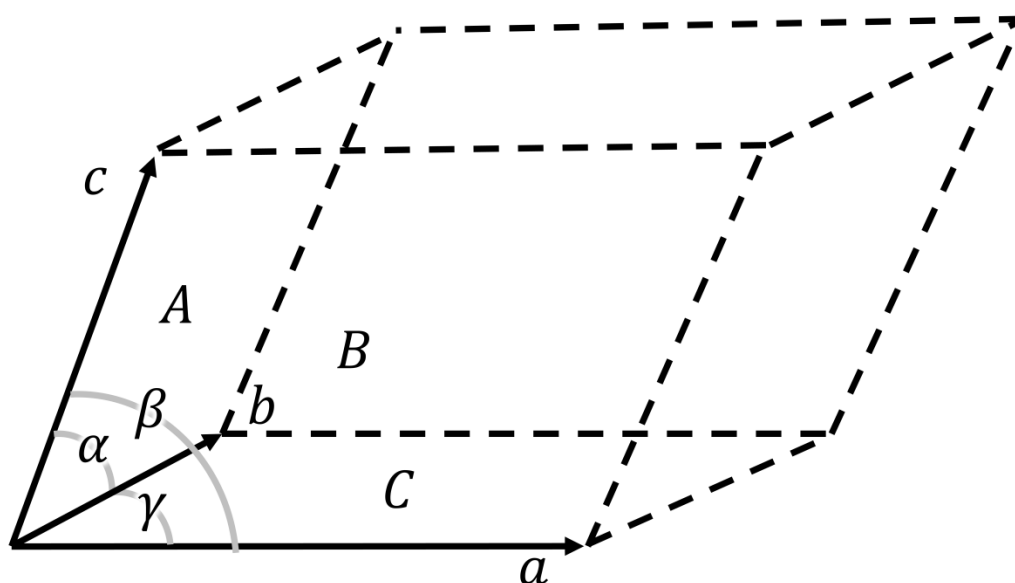
2.1 SIMETRIA NOS CRISTAIS

A matéria pode se apresentar em diferentes estados de agregação, como o sólido, líquido e gasoso. Porém, é difícil utilizar essa descrição para certos materiais, como o vidro, que consiste em um sólido que apresenta viscosidade e tem um carácter líquido. Uma outra forma de descrever um material é como amorfo, onde seu conteúdo atômico não apresenta uma ordem definida de distribuição, e cristalino, que do contrário apresenta ordem e simetria (MAVRAČIĆ et al., 2018).

Os cristais podem ser definidos a partir da chamada cela unitária, uma parte do material que se repete ao longo da estrutura em todas as direções. Logo, as propriedades dessa pequena parte se estendem para toda o cristal. A cela unitária apresenta vários elementos de simetria que a caracterizam. Analisando apenas a métrica, ela é definida a partir de 6 parâmetros: os vértices a , b , c e os ângulos entre eles, α , β e γ (GIACOVAZZO et al., 2013), como pode ser visto na Figura 2.1. Uma amostra cristalina possui a vantagem de poder ser descrita por uma pequena parte dela que representa todo o material. Em cálculos teóricos, por exemplo, ao invés de computar uma quantidade

imensurável de átomos para calcular suas propriedades, basta calcular as propriedades dessa parte que representa o todo e estendê-las para o cristal.

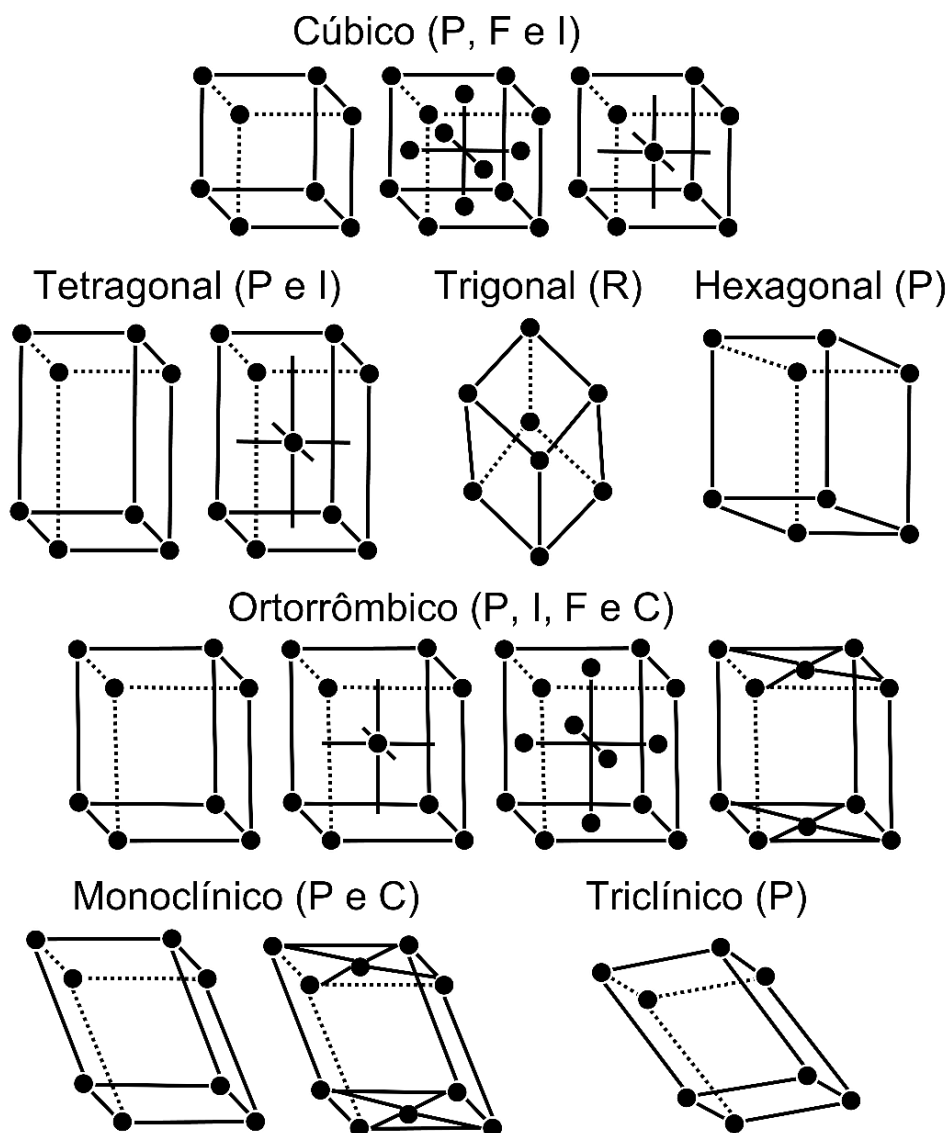
Figura 2.1 – Representação dos parâmetros da cela unitária



Existe uma quantidade limitada de formas como que os compostos podem se organizar no espaço quando cristalizados. Analisando apenas os parâmetros da cela unitária, existem apenas 7 formas de organização, que são chamados os sistemas cristalinos: triclínico, com $a \neq b \neq c$ e $\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$; monoclínico, com $a \neq b \neq c$, $\alpha \neq 90^\circ$ e $\beta, \gamma = 90^\circ$; ortorrômbico, com $a \neq b \neq c$ e $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$; tetragonal, com $a = b \neq c$ e $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$; trigonal, com $a = b = c$ e $\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$; hexagonal, com $a = b \neq c$, $\alpha, \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; cúbico, com $a = b = c$ e $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$. Além disso, a cela unitária pode estar centrada na origem sendo primitiva (P); ser de corpo centrado (I), centrado em uma face (A, B ou C), centrado em todas as faces (F), ou romboédrica (R), causando uma degenerescência na simetria que resulta nas chamadas 14 redes de Bravais (DONNAY; HARKER, 1937), que podem ser vistas na Figura 2.2.

Os cristais podem apresentar também simetria dentro da cela unitária relacionada à organização das unidades assimétricas, originando a simetria pontual, descrita pelos 32 grupos pontuais. A combinação de todos esses elementos de simetria resulta nos 230 grupos espaciais, que contemplam todas as formas únicas de como a matéria pode se organizar no estado cristalino (HAHN, 2006). Assim, os cristais se mostram muito vantajosos para o estudo de propriedades físicas e químicas, pois uma pequena fração do material cristalino, a cela unitária, contém toda a informação da amostra.

Figura 2.2 – Representação das 14 redes de Bravais, organizadas por sistema cristalino



2.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR CRISTAIS

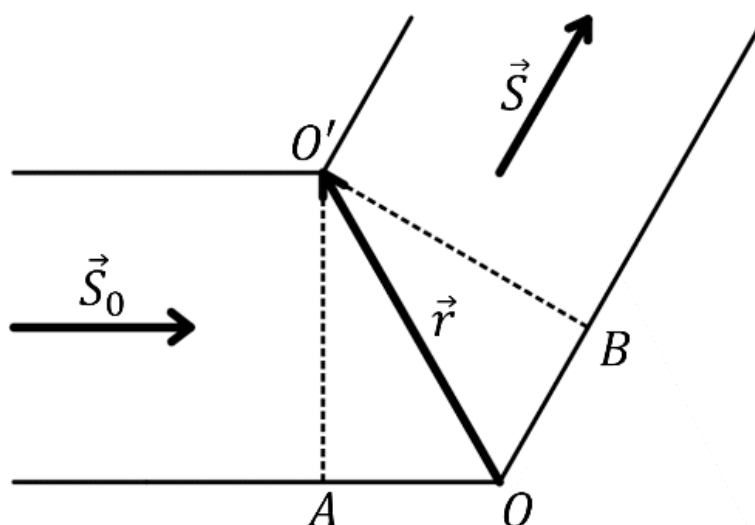
No experimento de análise de estruturas cristalinas por raios X, a amostra é completamente atravessada por um feixe de raio X coerente, polarizado e monocromático. Os elétrons dos átomos, por possuírem carga e serem suficientemente leves, absorvem essa radiação eletromagnética e são acelerados, passando a serem fontes secundárias dessa radiação, emitindo raios X em todas as direções (WILLIAM et al., 2010).

Para cristalografia é suficiente descrever esse fenômeno pelo espalhamento de Thomson (JOHNSON; NILSEN; CHENG, 2012) usando teoria clássica do eletromagnetismo. Se a amostra submetida a esse feixe de raios X for amorfa, como seus

elétrons estão distribuídos desordenadamente, as ondas espalhadas por eles não causam interferências construtivas ou destrutivas significativas. Por outro lado, se a amostra for cristalina, ainda que os elétrons não possuam uma posição definida, eles estão concentrados nos átomos que possuem uma distribuição ordenada e periódica ao longo do cristal. Nesse caso, ocorrem interferências construtivas intensas em determinadas direções que resultam no padrão de difração do cristal, que depende de sua simetria, enquanto a distribuição das intensidades dos picos depende do conteúdo eletrônico da amostra. Um modelo para descrever a difração dos raios X é mostrado a seguir (GIACOVAZZO et al., 2013).

A princípio, sejam considerados dois elétrons espalhadores pontuais, sendo O centrado na origem e em O' separado de O pelo vetor \vec{r} , como mostra a Figura 2.3.

Figura 2.3 – Representação de um modelo para o espalhamento dos raios X por O e O'



Se uma onda definida pelo vetor unitário \vec{S}_0 com frente de onda plana excitar esses espalhadores, eles se tornam fontes secundárias de espalhamento e passam a espalhar em todas as direções. Na direção dada pela onda \vec{S} , a diferença de caminho óptico δ entre as ondas espalhadas por O e O' é

$$\delta = \overline{OA} + \overline{OB} \quad (2.1)$$

Observando a Figura 2.3, se considerarmos a distância entre os espalhadores como $|\vec{r}|$, podemos definir os vetores \vec{S}_0 e \vec{S} da seguinte forma:

$$\overline{OA} = -\vec{r} \cdot \vec{S}_0 \quad (2.2)$$

$$\overline{OB} = \vec{r} \cdot \vec{S} \quad (2.3)$$

Dessa forma, a diferença de fase ϕ entre as ondas será

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta \quad (2.4)$$

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \vec{r}(\vec{S} - \vec{S}_0) \quad (2.5)$$

Definindo o vetor \vec{s} como

$$\vec{s} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda} \quad (2.6)$$

temos $\phi = 2\pi(\vec{r} \cdot \vec{s})$.

Dessa forma, podemos descrever a onda espalhada por O' nessa direção como $\Psi = A_{O'} e^{2\pi i(\vec{r} \cdot \vec{s})}$, sendo A a amplitude da onda espalhada (GLAZER, 1978). Considerando agora o espalhamento de N elétrons pontuais, podemos então definir a amplitude total F como a síntese de Fourier desse conjunto de ondas:

$$F(\vec{s}) = \sum_{j=1}^N A_j e^{2\pi i(\vec{s} \cdot \vec{r}_j)} \quad (2.7)$$

Se esses espalhadores são elétrons de átomos em um cristal, a função $F(\vec{s})$ descreve o padrão de difração do cristal e recebe o nome de fator de estrutura (SHMUELI, 2008). Nesse caso, a amplitude de cada onda será determinada pelo fator de espalhamento atômico f , característico de cada elemento químico. Dessa forma, a Equação 2.7 torna-se

$$F(\vec{s}) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(\vec{s} \cdot \vec{r}_j)} \quad (2.8)$$

Considerando uma distribuição contínua da densidade eletrônica, a onda espalhada pode ser descrita por

$$\Psi = \rho(\vec{r}) d\vec{r} e^{2\pi i(\vec{r} \cdot \vec{s})} \quad (2.9)$$

Assim, a amplitude total da onda espalhada por átomos contidos em uma cela unitária de volume V é dada por:

$$F(\vec{s}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i(\vec{s} \cdot \vec{r})} d\vec{r} \quad (2.10)$$

Observando a Equação 2.10, podemos considerar que a amplitude da onda espalhada é a transformada de Fourier da densidade eletrônica, onde \mathcal{F} é o operador transformada de Fourier.

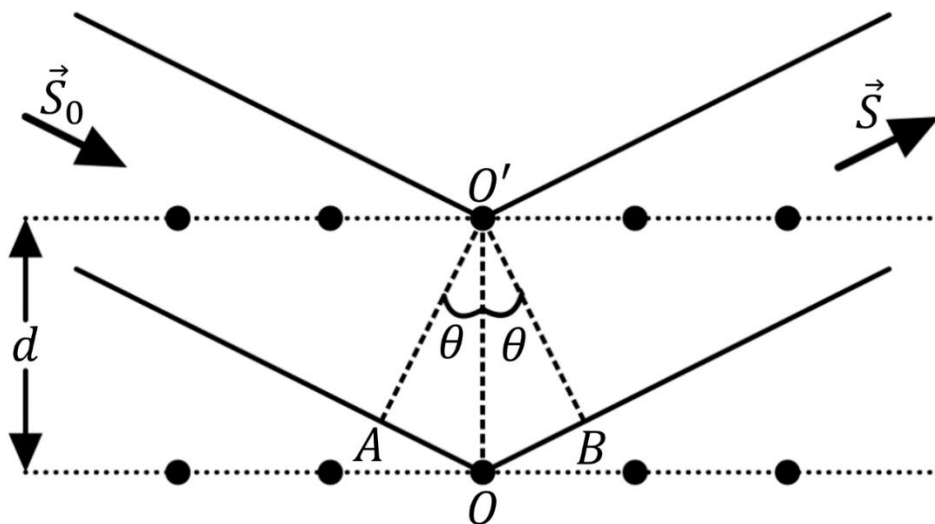
$$F(\vec{s}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i(\vec{s} \cdot \vec{r})} d\vec{r} = \mathcal{F}\{\rho(\vec{r})\} \quad (2.11)$$

Usando a propriedade da transformada de Fourier inversa, temos que

$$\rho(\vec{r}) = \int_{V^*} F(\vec{s}) e^{-2\pi i(\vec{s} \cdot \vec{r})} d\vec{s} = \mathcal{F}^{-1}\{F(\vec{s})\} \quad (2.12)$$

Dessa forma, é possível determinar a densidade eletrônica da cela unitária a partir do fator de estrutura (GIACOVAZZO et al., 2013). Uma forma mais simples de descrever a condição de difração é tratar o feixe difratado como uma reflexão. Considerando a Figura 2.3, se for traçado planos perpendiculares ao vetor \vec{r} que cortam os espalhadores O e O' , podemos tratar a onda espalhada como se estivesse sendo refletida por esses planos, onde 2θ é o ângulo entre o feixe incidente e o feixe refletido e d é a distância entre esses planos.

Figura 2.4 – Representação da difração dos raios X sendo tratada como uma reflexão causada um plano que contém espalhadores eletrônicos pontuais



A partir da Figura 2.4, usando trigonometria, deriva-se que

$$\overline{OA} = \overline{OB} = d \sin \theta \quad (2.13)$$

Dessa forma, a diferença de caminho óptico δ também pode ser descrita como

$$\delta = 2d \sin \theta \quad (2.14)$$

Para que ocorra interferência construtiva máxima entre as ondas espalhadas por O e O' , é necessário que ambas possuam a mesma fase. Para isso, a diferença de caminho óptico deve ser múltipla do comprimento de onda. Logo:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.15)$$

A Equação 2.15 é a chamada lei de Bragg (ELTON; JACKSON, 1966; WILKINS, 2013) formulada por William Lawrence Bragg e seu pai William Henry Bragg em 1913, que lhes renderam o prêmio Nobel de Física em 1915 (BRAGG, 1922). Ela permite relacionar o ângulo do feixe de raios X difratado com a distância entre planos de reflexão que coincidem com a localização dos átomos.

2.3 INDICES DE MILLER E INDEXAÇÃO

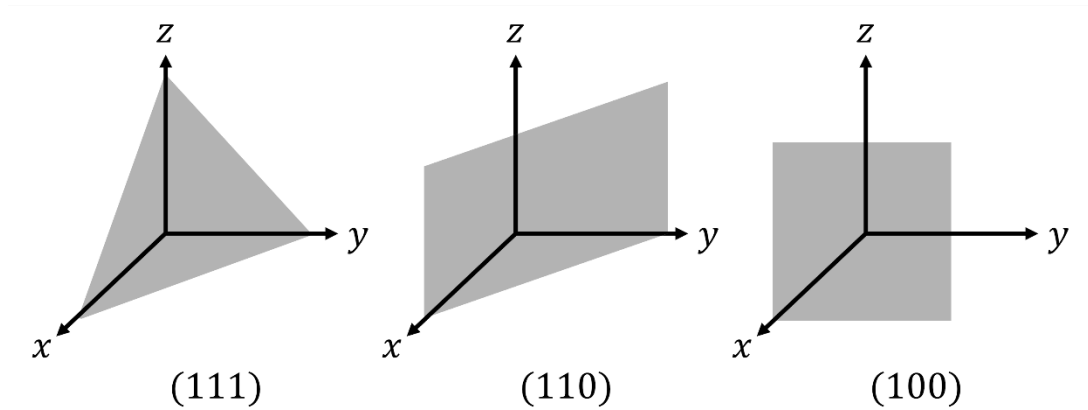
Como consequência da formulação matemática apresentada até agora, podem ser definidos dois espaços (GLUSKER; LEWIS; ROSSI, 1995). O primeiro descreve a localização dos átomos na cela unitária e é chamado de espaço direto, sendo que este pode ser estar em função do vetor \vec{r} . Esse espaço é definido em um sistema de coordenadas que se baseia nos vetores \vec{a} , \vec{b} e \vec{c} , que definem a cela unitária, mostrados anteriormente na Figura 2.1. Logo, \vec{r} pode ser escrito como

$$\vec{r} = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c} \quad (2.16)$$

O outro espaço descreve as direções das reflexões e é chamado de espaço recíproco, estando em função do vetor \vec{s} . Este localiza os pontos do padrão de difração. Uma forma de correlacionar o espaço direto e o espaço recíproco é através dos índices de Miller (NESPOLO, 2015), que identificam os planos de reflexão descritos na Lei de Bragg dentro da cela unitária.

Os índices de Miller, h , k e l , são um conjunto números inteiros que definem um plano na rede cristalina. Eles são escritos como (hkl) , onde cada índice define a interseção entre o plano e a fração dos eixos \vec{a} , \vec{b} e \vec{c} do espaço direto, respectivamente. A Figura 2.5 traz alguns exemplos de representações de planos utilizando os índices de Miller.

Figura 2.5 – Representação dos planos (111), (110) e (100). Note que na imagem a base de vetores utilizada foi escrita como x , y e z ao invés de \vec{a} , \vec{b} e \vec{c}



Esses índices podem definir também uma família de planos quando representados entre chaves, $\{hkl\}$, ou uma direção em relação ao espaço direto quando entre colchetes, $[hkl]$. Podemos usar esses índices como forma de indexar o vetor \vec{s} descrito na Equação 2.6, de forma que esse vetor seja perpendicular ao plano (hkl) , tomando a seguinte forma:

$$\vec{s} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* \quad (2.17)$$

onde \vec{a}^* , \vec{b}^* , e \vec{c}^* são os vetores de base do espaço recíproco, definidos por

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{V}; \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{V}; \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{V} \quad (2.18)$$

e V é o volume dado por

$$V = \vec{a} \cdot \vec{b} \times \vec{c} \quad (2.19)$$

Dessa forma, o vetor \vec{s} carrega tanto a informação da distância entre planos de difração como a direção do feixe difratado. Podemos derivar também da Figura 2.4 que

$$|\vec{s}| = \frac{1}{d} \quad (2.20)$$

A partir da nova definição para o vetor \vec{s} , podemos relacionar os vetores que descrevem o espaço direto e o espaço recíproco:

$$\vec{r} \cdot \vec{s} = hx + ky + lz \quad (2.21)$$

Isso permite descrever cada reflexão em função dos índices de Miller, que estão também relacionados com a cela unitária. Consequentemente, o fator de estrutura descrito anteriormente pela 2.8 pode ser escrito como

$$F(hkl) = \sum_{hkl} f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.22)$$

Portanto, considerando uma distribuição discreta da densidade eletrônica na cela unitária, podemos escrever ela pela Equação 2.23.

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F(hkl) e^{-2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.23)$$

2.4 REDE CRISTALINA E O TEOREMA DA CONVOLUÇÃO

A convolução da função $f(x)$ e $g(x)$, denotada por $f(x) * g(x)$, é definida por:

$$f(x) * g(x) = \int_S f(x)g(u - x)dx \quad (2.24)$$

Isso cria o efeito de repetir a função $f(x)$ periodicamente em função do deslocamento $g(x)$. Uma das propriedades da convolução é que dada uma função Delta de Dirac $g(x - x_0)$, quando em convolução com uma função qualquer $f(x)$ resulta em uma função periódica que depende do deslocamento $x - x_0$.

$$g(x - x_0) * f(x) = f(x - x_0) \quad (2.25)$$

Podemos usar essa propriedade em três dimensões. Considerando o vetor $\vec{r} = \vec{x} + \vec{y} + \vec{z}$ e \vec{r}_0 o vetor que descreve o deslocamento, temos:

$$g(\vec{r} - \vec{r}_0) * f(\vec{r}) = f(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (2.26)$$

Considerando essa propriedade matemática no contexto da cristalografia (AUBERT; LECOMTE, 2007), podemos definir a função de deslocamento como a função rede cristalina $L(\vec{r})$ que desloca os átomos localizados por \vec{r} , onde esse deslocamento é dado pelo vetor $\vec{r}_{u,v,w} = ua + vb + wc$, em que u , v e w são inteiros. Dessa forma, a convolução da rede pela cela é dada por

$$L(\vec{r}) * \rho(\vec{r}) = \sum_{u,v,w=-\infty}^{+\infty} \delta(\vec{r} - \vec{r}_{u,v,w}) * \rho(\vec{r}) \quad (2.27)$$

$$L(\vec{r}) * \rho(\vec{r}) = \sum_{u,v,w=-\infty}^{+\infty} \rho(\vec{r} - \vec{r}_{u,v,w}) \quad (2.28)$$

$$L(\vec{r}) * \rho(\vec{r}) = \rho_{amostra}(\vec{r}) \quad (2.29)$$

Portanto, a função densidade eletrônica em três dimensões $\rho_{amostra}(\vec{r})$ pode ser considerada a convolução da função densidade eletrônica da cela unitária $\rho(\vec{r})$ pela função periódica rede cristalina $L(\vec{r})$. Já o teorema da convolução diz que a transformada de Fourier da convolução entre duas funções é igual ao produto das transformadas de Fourier entre essas funções:

$$\mathcal{F}\{f(x) * g(x)\} = \mathcal{F}\{f(x)\} \cdot \mathcal{F}\{g(x)\} \quad (2.30)$$

Aplicando isso na 2.29, temos:

$$\mathcal{F}\{L(\vec{r}) * \rho(\vec{r})\} = \mathcal{F}\{\rho_{amostra}(\vec{r})\} \quad (2.31)$$

$$\mathcal{F}\{L(\vec{r})\} \cdot \mathcal{F}\{\rho(\vec{r})\} = \mathcal{F}\{\rho_{amostra}(\vec{r})\} \quad (2.32)$$

$$L^*(\vec{s}) \cdot F(\vec{s}) = F_{amostra}(\vec{s}) \quad (2.33)$$

Dessa forma, medindo o padrão de difração da amostra $F_{amostra}(\vec{s})$ podemos obter o fator de estrutura da cela $F(\vec{s})$, pois este está envolvido em um simples produto com a rede recíproca $L^*(\vec{s})$ (AUBERT; LECOMTE, 2007). Em seguida, podemos obter $\rho(\vec{r})$ utilizando a transformada de Fourier inversa de $F(\vec{s})$, conforme a Equação 2.12.

2.5 DENSIDADE ELETRÔNICA E O PROBLEMA DA FASE

Considerando a Equação 2.22, o fator de estrutura pode também ser expresso como

$$F(hkl) = |F(hkl)|e^{i\phi_{hkl}} = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.34)$$

Logo, a 2.23 torna-se

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.35)$$

Um problema que a cristalografia enfrenta é que no experimento de difração de raios X são coletados apenas a direção das reflexões, indexadas pelos índices de Miller, e suas intensidades, dos quais se obtém $|F(hkl)|$. Não são obtidas as informações sobre as fases ϕ_{hkl} das ondas espalhadas pelos átomos no cristal. Dessa forma, é muito mais

difícil resolver essa equação, de forma que este é o chamado problema da fase (TAYLOR, 2003).

Uma forma de resolver esse problema são os chamados métodos diretos, que consiste em um conjunto de métodos usados para estimar as fases a partir das intensidades das reflexões, explorando relações estatísticas de correlação e restrição entre elas (HAUPTMAN, 1950). Em 1985, Hauptman e Karle receberam o prêmio Nobel em Química por suas contribuições em solucionar várias dessas relações entre fases (HAUPTMAN, 1986; KARLE, 1986). Obtendo um conjunto de fases satisfatório, é possível determinar um mapa inicial da função densidade eletrônica, que muitas vezes é o suficiente para começar o trabalho cristalográfico.

CAPÍTULO III – ESTUDO ESTRUTURAL SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA

Compostos à base de tioxopirimidinas estão atualmente relacionados a algumas atividades biológicas, como anticâncer (AL-ABDULLAH, 2011; LEE et al., 2008), antimicrobiana (ABDEL-RAHMAN et al., 2007; EL-AGRODY et al., 2006) e antioxidante (PADMAJA et al., 2009). Motivados por esses fatos, estudos estruturais têm sido desenvolvidos para compreender os detalhes moleculares responsáveis pelas interações intra e intermoleculares que podem estar relacionadas às bioatividades observadas (COSSAR et al., 2018; PEKPARLAK et al., 2020; SAŞIADEK et al., 2019; STOLARCZYK et al., 2018). Em um estudo anterior sobre a síntese e propriedades antimicrobianas das 4-tioxopirimidinas (CUNHA et al., 2007), um conjunto de moléculas testadas contra o *Trypanosoma cruzi* apresentou atividade moderada, o que sugere a investigação estrutural do fragmento molecular 4-tioxopirimidina. Entre essas moléculas, o 4-metil-2-fenil-6-tioxo-1,6-diidro-5-pirimidinacarboxilato de etila (MP-TDPy) também apresentou atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus* com valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 100 µg/cm³ pelo método de microdiluição em caldo. Como a enzima topoisomerase IV complexada com o ligante novobiocina mostrou atividade inibitória contra *M. luteus* e *E. coli* (BELLON et al., 2004), ela foi usada como alvo para estudos *in vitro*.

A topoisomerase IV é um alvo aprovado para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Ela desempenha um papel significativo na decatenação cromossômica durante a replicação do DNA e sua estrutura possui vários locais de ligação que foram explorados como alvos. A classe de quinolonas usadas como antibióticos prescritos clinicamente inibem as enzimas topoisomerase IV e DNA girase levando à morte celular da bactéria. No entanto, o aumento da resistência às quinolonas levou os pesquisadores a procurar uma nova classe de bactericidas (BUTLER; PATERSON, 2020; DURCIK et al., 2019; FIEF et al., 2019; ISMAIL et al., 2020; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

Uma análise estrutural foi realizada para mapear o aspecto supramolecular de MP-TDPy no estado sólido, entender seu padrão de interações no cristal e investigar potenciais semelhanças entre as interações intermoleculares e as apresentadas no sítio ativo da topoisomerase IV. Cálculos teóricos também foram realizados para descrever a

molécula isolada do campo cristalino e para comparar sua conformação e propriedades elétricas com a conformação adotada no sítio ativo. Este estudo tem como objetivo descrever a estrutura do MP-TDPy e fornecer informações sobre as regiões da molécula que podem ser responsáveis pelas interações de ligação com o sítio ativo da topoisomerase IV, bem como propor um novo fragmento molecular para futuros estudos de drogas à base de tioxopirimidina.

3.2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.2.1 Superfície de Hirshfeld

Cunha *et al.* (2007) relataram anteriormente a síntese e cristalização do MP-TDPy. Os dados do cristal foram depositados no banco de estruturas cristalográficas *Cambridge Crystallographic Data Centre* (GROOM *et al.*, 2016) com código de identificação 601662, onde um novo refinamento foi realizado. Os programas Mercury (MACRAE *et al.*, 2020) e Platon (SPEK, 2009) foram utilizados para detalhar os principais parâmetros geométricos da estrutura e mapear os contatos. O cálculo da superfície de Hirshfeld (MCKINNON; SPACKMAN; MITCHELL, 2004) foi realizado pelo programa CrystalExplorer17 (TURNER *et al.*, 2017) e usado para identificar as principais interações intermoleculares. Essa superfície é definida pela região ao redor da molécula onde a contribuição da densidade eletrônica da molécula no cristal (*promolecule*) é maior do que a contribuição das outras moléculas (*procrystal*) no cristal, conforme descrito na Equação 3.1.

$$\omega(r) = \frac{\rho_{promolecule}(r)}{\rho_{procrystal}(r)} \quad (3.1)$$

Duas propriedades essenciais dessa superfície são: a distância entre o núcleo mais próximo da superfície externa e a própria superfície de Hirshfeld, d_e ; e a distância entre o núcleo mais próximo da superfície interna e a própria superfície de Hirshfeld, d_i . Essas propriedades são combinadas na distância de contato normalizada, d_{norm} (MCKINNON; JAYATILAKA; SPACKMAN, 2007), que correlaciona ambas e as normaliza pelo raio de Van der Waals, r^{vdW} (Equação 3.2).

$$d_{norm} = \frac{d_i - r_i^{vdW}}{r_i^{vdW}} + \frac{d_e - r_e^{vdW}}{r_e^{vdW}} \quad (3.2)$$

Os átomos envolvidos em interações intermoleculares mais próximas do que o raio de Van der Waals apresentam uma mancha vermelha na superfície d_{norm} , que é uma forma útil de confirmar contatos significativos entre as moléculas. Além disso, outra propriedade da superfície de Hirshfeld chamada *shape index* (SPACKMAN; JAYATILAKA, 2009) foi usada para pesquisar interações π - π , que nela se apresentam como manchas vermelhas e azuis em forma de “gravata borboleta” nas superfícies localizadas entre anéis aromáticos. Além disso, a frequência de cada combinação de d_i e d_e sobre a superfície foi mapeada utilizando o recurso *2D fingerprint* (SPACKMAN; MCKINNON, 2002), uma espécie de impressão digital da superfície de Hirshfeld. Este diagrama indica os locais de interação intermolecular e a área da superfície de Hirshfeld correspondente a cada tipo de interação.

3.2.2 Cálculos de estrutura eletrônica

As energias de ambos os Orbitais Moleculares de Fronteira (FMO) e o mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) foram calculados usando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) implementada pelo Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009), aplicando o funcional B3LYP (Becke, 3 parâmetros, Lee – Yang – Parr) com o conjunto de bases 6-311+G(2d,p). Os elétrons e núcleos produziram uma superfície de potencial eletrostático a uma distância qualquer r dada pela Equação 3.3.

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r')dr'}{|r' - r|} \quad (3.3)$$

Os diferentes potenciais eletrostáticos são representados no espectro de cores, sendo em vermelho os locais mais densos em elétrons e em azul escuro os locais menos densos em elétrons. Além disso, as cores amarela e verde representam valores intermediários.

Adicionalmente os estudos de *docking* molecular do MP-TDPy foram realizados usando o programa Auto Dock Vina implementado pelo UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004; TROTT; OLSON, 2010). A ferramenta *Dock Prep* foi usada para a preparação do receptor e ligante, onde as moléculas de solvente foram excluídas e as cadeias laterais incompletas foram substituídas usando a biblioteca de rotâmeros Dunbrack 2010 (SHAPOVALOV; DUNBRACK, 2011). Todos os hidrogênios foram adicionados e cargas de Gasteiger foram adicionadas a cada átomo de resíduos e ligantes usando o campo de força AMBER ff14SB e computados pelo Antechamber (WANG et al., 2006). O recurso

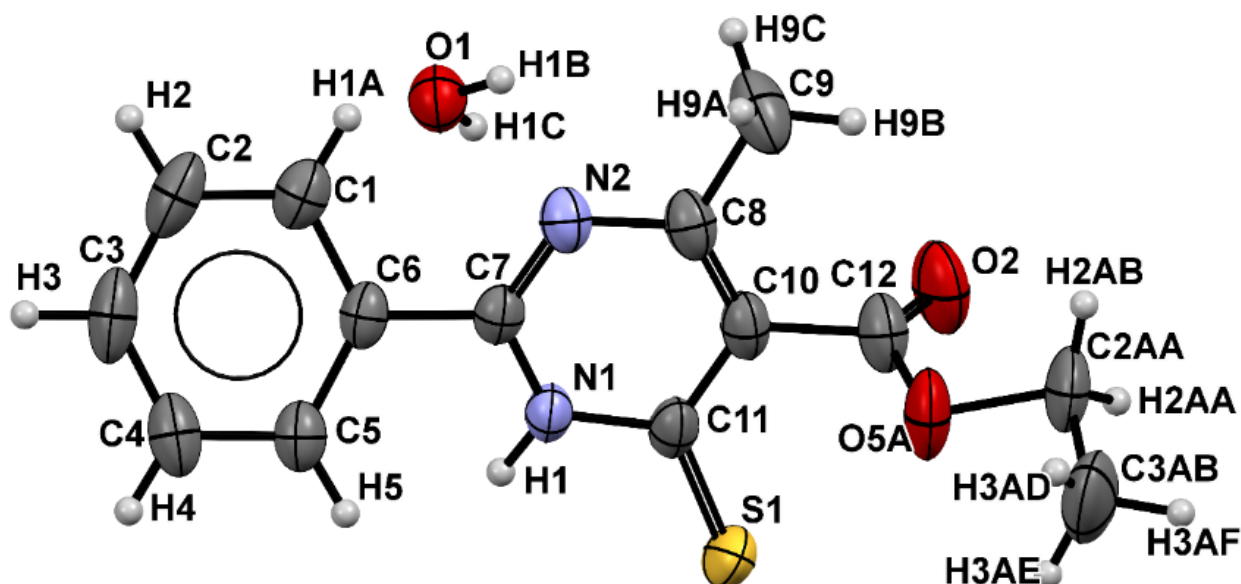
AutoGrid foi então usado para criar um volume de pesquisa de receptor centralizado no ponto geométrico (56,35 Å, 64,52 Å, 57,55 Å) com um tamanho de 17 Å³. Todas as outras configurações foram mantidas como padrão.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise do estado sólido

O MP-TDPy é um derivado de pirimidina com os grupos hidro, fenil, metil, metanoato de etila e tioxo substituídos nas posições 1, 2, 4, 5 e 6, respectivamente, e cristalizado no grupo espacial monoclinico centrossimétrico $P2_1/c$, com uma molécula independente de MP-TDPy e uma molécula de água estrutural por unidade assimétrica (Figura 3.1). A estrutura encontrada permitiu diferenciá-la de seu possível isômero que teria um átomo de hidrogênio no N2 e ausência do H1. Seus parâmetros de célula unitária são $a = 14,67860 (10) \text{ \AA}$, $b = 7,2757 (2) \text{ \AA}$, $c = 15,2822 (2)$ e $\beta = 117,105 (4)^\circ$. As principais informações sobre o cristal, coleta de dados e detalhes de refinamento são fornecidos na Tabela 3.1.

Figura 3.1 – Representação ORTEP da unidade assimétrica da MP-TDPy



Os elipsoides foram calculados com 50% de probabilidade. Entre os átomos desordenados, apenas aqueles com maior contribuição para o pico de densidade eletrônica foram exibidos. FONTE: Adaptado de NAVES

et al., 2021

Tabela 3.1 – Informações experimentais da MP-TDPy

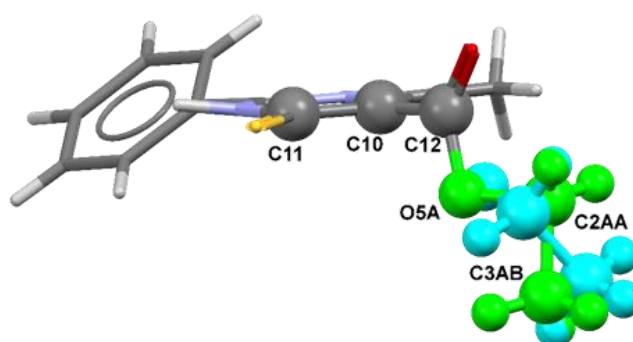
Fórmula Química	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂ S, H ₂ O
M_r	292.35
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $P2_1/c$
Temperatura (K)	293(2)
a, b, c (Å)	14,67860(10), 7,2757(2), 15,2822(2)
β (°)	117,105(4)
V (Å ³)	1452,85(6)
Z	4
Tipo de radiação	Cu $K\alpha$
μ (mm ⁻¹)	1,54184
Tamanho do cristal (mm)	0,231 × 0,165 × 0,124
Reflexões medidas, independentes e observadas [$I > 2\sigma(I)$]	2852, 2734, 2454
R_{int}	0,0119
$(\text{sen } \theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,6354
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, S	0,0470, 0,1323, 1,092
Número de reflexões	2734
Número de parâmetros	219
Tratamento dos átomos de H	Os átomos de hidrogênio foram tratados por uma mistura de refinamentos independentes e constrições.
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0,38, -0,38

Existem átomos desordenados na porção etanoato do grupo éster, cuja cadeia carbônica com a contribuição de densidade de elétrons mais significativa está rotulada na Figura 3.2. A Tabela 3.2 mostra os ângulos diedrais mais relevantes para descrever a conformação do MP-TDPy, sendo ângulos em asterisco correspondentes à cadeia desordenada. Por razões de clareza, a conformação desordenada que menos contribuiu para o pico de densidade eletrônica (azul claro) foi omitida, uma vez que não participa de interações intermoleculares significativas.

Analisando a molécula MP-TDPy sem água, há apenas um local com hidrogênio ácido capaz de fazer ligações de hidrogênio, N1-H1, e outros átomos que podem atuar como aceitadores, como oxigênio, nitrogênio e enxofre. Um cristal sem água provavelmente teria apenas uma ligação de hidrogênio por molécula por causa dessa limitação estereoquímica. Nesse cristal, a molécula de água tem papel essencial na coordenação de diferentes átomos aceitadores e doadores da molécula MP-TDPy,

participando das três ligações de hidrogênio presentes que estabilizam a maior parte do empacotamento.

Figura 3.2 – Representação do MP-TDPy destacando os átomos desordenados



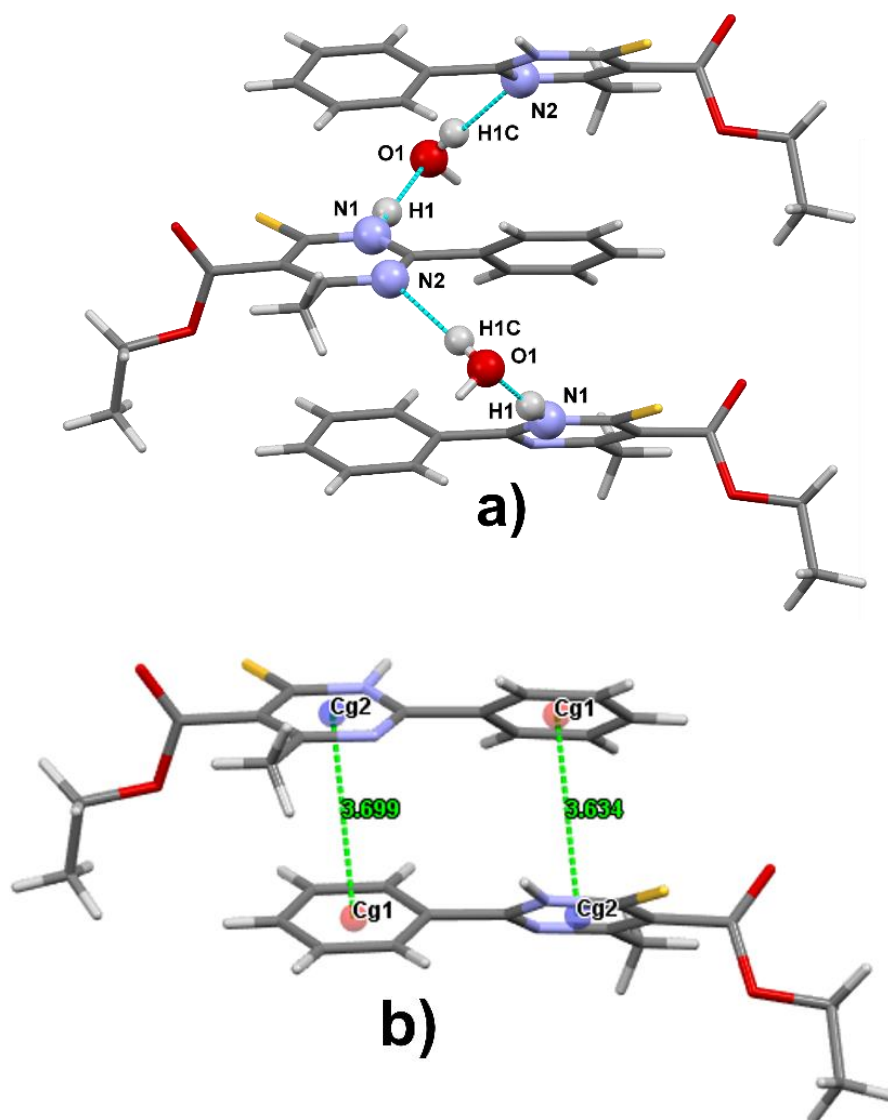
A principal cadeia, O5A — C2AA — C3AB, é verde e está rotulada, enquanto a cadeia desordenada O5 — C2AB — C3AA é azul claro. FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

Tabela 3.2 – Seleção de ângulos diedrais da MP-TDPy. Os ângulos com um asterisco são os correspondentes desordenados

Ângulo diedral	Átomos	Valor (°)	Conformação
ω_1	C1—C6—C7—N1	145.6(2)	+ Anti-Clinal
ω_2	C11—C10—C12—O5A	83.3(4)	+ Sin-Clinal
ω_2^*	C11—C10—C12—O5	104.6(4)	+ Anti-Clinal
ω_3	C10—C12—O5A—C2AA	161.0(5)	+ Anti-Periplanar
ω_3^*	C10—C12—O5—C2AB	-153.7(6)	- Anti-Periplanar
ω_4	C12—O5A—C2AA—C3AB	176.7(7)	+ Anti-Periplanar
ω_4^*	C12—O5—C2AB—C3AA	-159.9(7)	- Anti-Periplanar

As ligações de hidrogênio N1—H1...O1 e O1—H1C...N2 formam uma sequência de interações na direção [010], como visto na Figura 3.3a. A distância e os ângulos entre os anéis das moléculas MP-TDPy envolvidas nesse conjunto de interações descritas são compatíveis com interações π - π . A Figura 3.3b mostra um par de moléculas desse conjunto como exemplo. Ela mostra que a distância entre um anel pirimidina (Cg2) de cima e um anel aromático de baixo (Cg1) é 3,699 Å, com deslizamento de 0,813 Å. Em contraste, a distância entre um anel de pirimidina (Cg2) de baixo e um anel aromático de cima (Cg1) é 3,634 Å, com deslizamento de 1,545 Å. Essa diferença é justificada pela falta de centro de inversão entre esses pares, perceptível pela orientação do grupo éster. Em ambos os casos, o ângulo formado entre os anéis é de apenas 5,07°, quase paralelo. Este sistema π - π pode ter uma pequena contribuição para a estabilização dessa sequência de interações.

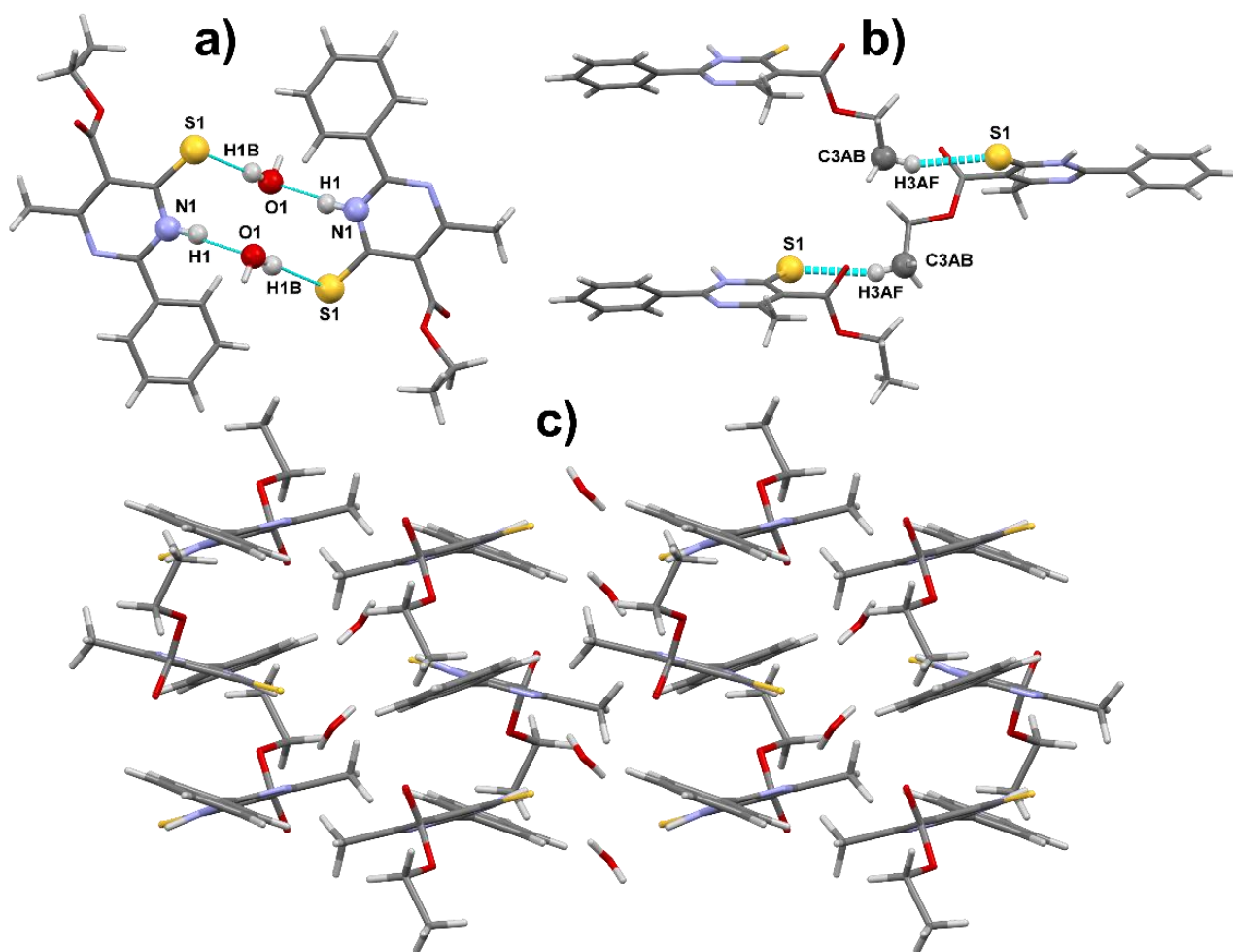
Figura 3.3 – Sequência de interações formada pelas ligações de hidrogênio N1—H1...O1 e O1—H1C...N2 (a), também estabilizadas por interações π - π (b)



FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

Outra grande cadeia de interações emerge das ligações de hidrogênio O1—H1B...S1 na direção [001], complementando as interações descritas anteriormente para produzir camadas orientadas no plano (100). Além disso, as interações N1—H1...O1 e O1—H1B...S1 formam um dímero com grande contribuição para a estabilização das camadas, como visto na Figura 3.4a. Finalmente, essas camadas são empilhadas pelo meio das interações C3AB—H3AF...S1 na direção [100], completando o preenchimento do espaço do cristal, como mostra a Figura 3.4b. Uma imagem de empacotamento do cristal de uma vista normal a [100] pode ser vista na Figura 3.4c, destacando o formato de uma camada do cristal. Os parâmetros geométricos das interações descritas são apresentados na Tabela 3.3.

Figura 3.4 – Empacotamento cristalino destacando as interações N—H...O, O—H...S e C—H...S



O empacotamento também é estabilizado por um dímero formado pelas interações N1—H1...O1 e O1—H1B...S1 (a) e por outro caminho formado por interações C3AB—H3AF...S1 (b). Uma vista da rede cristalina do MP-TDPy normal à direção [100] é mostrada em (c). FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

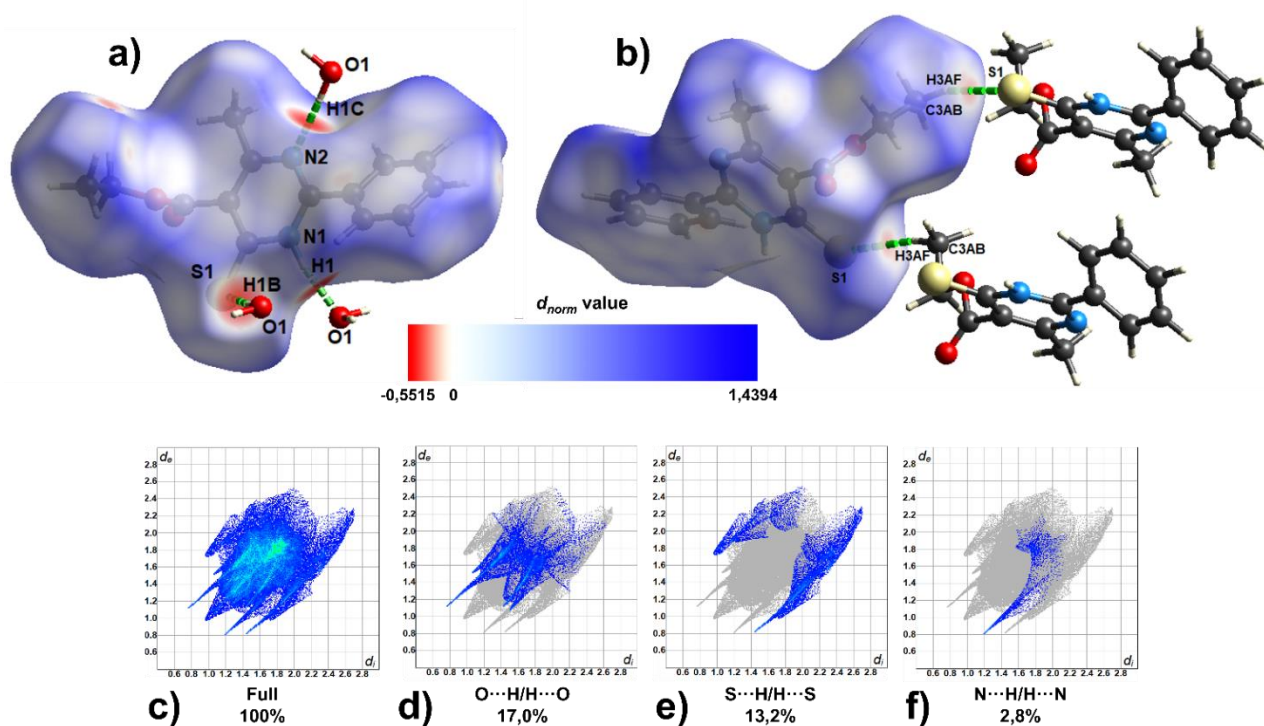
Tabela 3.3 – Geometria das principais interações intermoleculares no cristal de MP-TDPy. Os hidrogênios das moléculas de água estão com uma distância D—H idealizada

D—H...A	D—H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (°)
C3AB—H3AF...S1 ⁱ	0.961	2.8269	3.75(1)	161.6
N1—H1...O1 ⁱⁱ	0.96(3)	1.94(2)	2.893(2)	170(3)
O1—H1C...N2 ⁱⁱⁱ	0.850	2.155	3.000(3)	173.1
O1—H1B...S1 ^{iv}	0.850	2.4161	3.264(1)	175.7

Códigos de simetria: (i) $-x, -1/2+y, 1.5-z$; (ii) x, y, z ; (iii) $1-x, 1/2+y, 1.5-z$; (iv) $1-x, 1-y, 2-z$

Os contatos descritos foram reconhecidos pelos parâmetros geométricos do Mercury, além de serem confirmadas pela superfície de Hirshfeld através das propriedades d_{norm} e *shape index*. Os pontos vermelhos mais intensos no d_{norm} , bem como o formato característico do diagrama *fingerprint* indicando uma alta frequência de interações de hidrogênio, indicam a presença e contribuição das ligações de hidrogênio descritas e das interações C—H...S, como mostrado na Figura 3.5. Por outro lado, na Figura 3.6, a existência da mancha vermelha e azul com formato "gravata borboleta" na superfície *shape index* reforça a possibilidade de interações π - π que auxiliam na formação da cadeia de interações descrita anteriormente na Figura 3.3.

Figura 3.5 – Propriedade d_{norm} da superfície de Hirshfeld da MP-TDPy e diagramas *fingerprint*

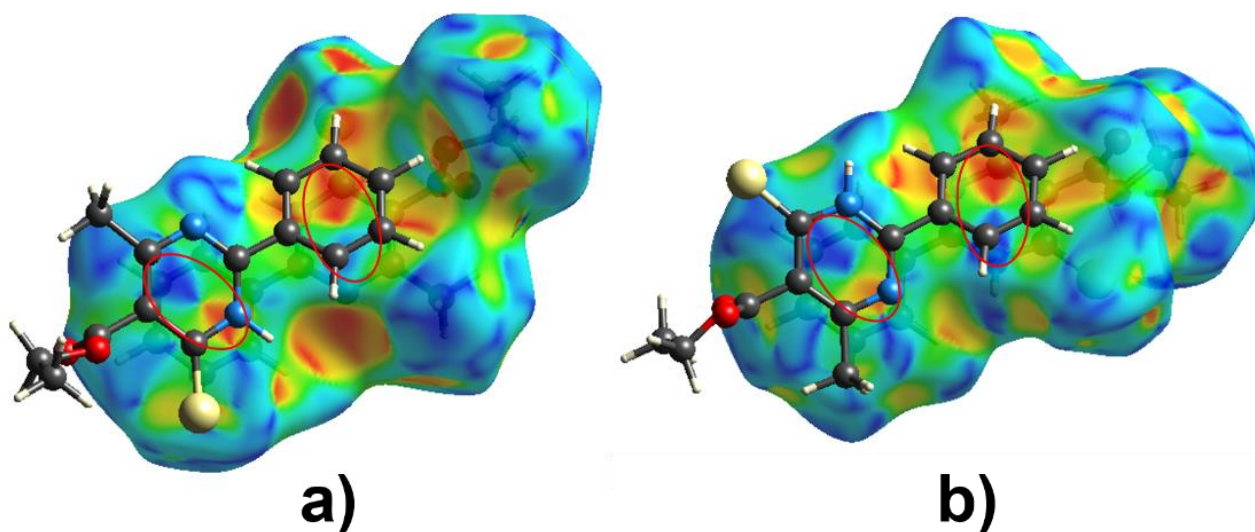


Manchas vermelhas na propriedade d_{norm} da superfície de Hirshfeld confirmando ligações de hidrogênio no cristal de MP-TDPy (a). A mancha vermelha mais fraca, mas ainda significativa, mostra a interação C—H...S (b). O diagrama *fingerprint* da estrutura é um mapa de frequências de contato, filtrado por todos os contatos (c), pelos contatos O...H/H...O (d), S...H/H...S (e) e N...H/H...N (f). Outros percentuais relevantes de contatos: C...H/H...C 7,10%; H...H 49,30%; C...C 6,90%; outros 3,70%. FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

Essas informações indicam que a molécula de água desempenha um papel fundamental na organização do empacotamento cristalino, coordenando todas as ligações de hidrogênio entre os átomos do anel de pirimidina. Devido a essa preferência por coordenar interações no centro da molécula MP-TDPy, mesmo o substituinte éster tendo dois oxigênios capazes de atuar como átomos aceitadores em uma possível ligação de

hidrogênio, ele não faz interações intermoleculares fortes. Conseqüentemente, os grupos éster situam-se entre as camadas formadas pelas ligações de hidrogênio descritas anteriormente e apresentam desordem.

Figura 3.6 – Propriedade *shape index* da superfície de Hirshfeld da MP-TDPy

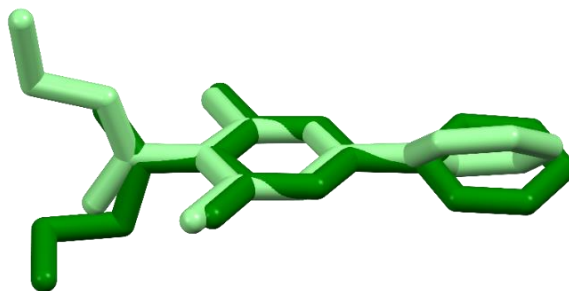


Círculos vermelhos destacam formas de "gravata borboleta" vermelhas e azuis na superfície de Hirshfeld com a propriedade *shape index*, presentes entre os anéis aromáticos das moléculas MP-TDPy de baixo (a) e de cima (b). Essas formas são um sinal característico de interações π - π . FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

3.3.2 Modelagem molecular

A sobreposição das estruturas cristalográfica e do *docking*, usando o anel de pirimidina como ponto de ancoragem, mostra que as principais diferenças estão relacionadas ao ângulo diédrico envolvendo o grupo éster (C12—O5A—C2AA—C3AB) e o ângulo entre os planos do anel benzênico e do anel pirimidina (Figura 3.7). Quando esse ângulo diedral é comparado, nota-se que o grupo alquila da porção éster está disposto de forma oposta nas diferentes conformações. Além disso, há um desvio de planaridade igual a 24° entre a orientação do anel de benzeno nas diferentes estruturas. Eletronicamente, os cálculos revelam que a transição da conformação cristalina para a conformação do *docking* requer uma variação de energia de 498,83 kJ/mol.

Figura 3.7 – Sobreposição das conformações no estado cristalino e no *docking*

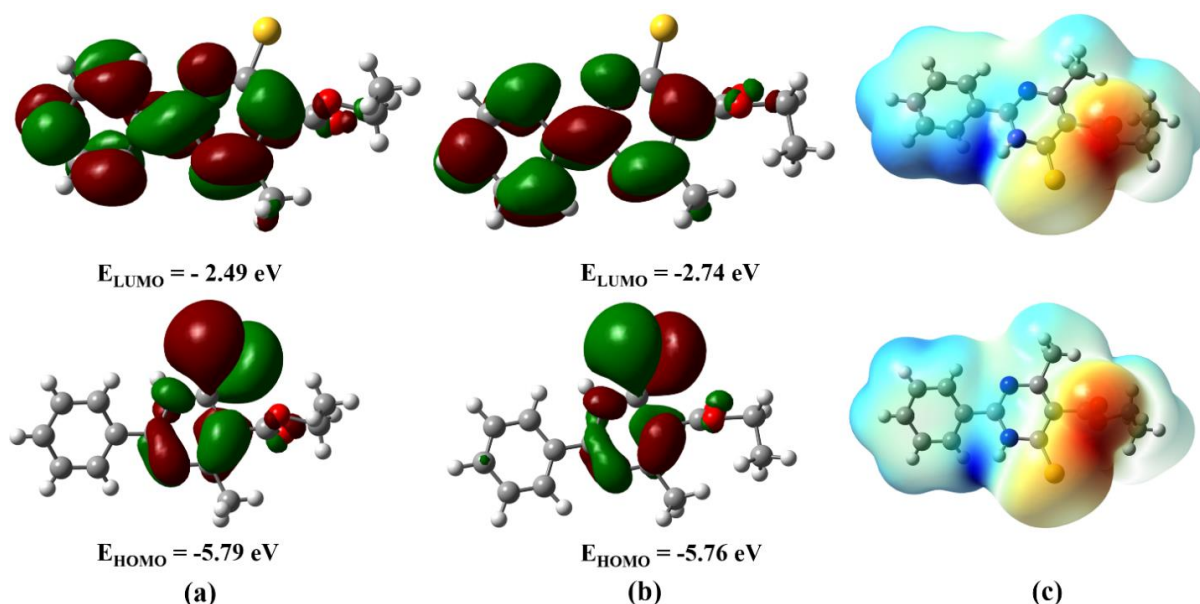


A sobreposição das conformações cristalográfica (verde claro) e do *docking* (verde) evidenciando as diferenças estruturais. O anel de pirimidina foi escolhido como ponto comum entre as estruturas. FONTE:

Adaptado de NAVES et al., 2021

As energias calculadas dos orbitais moleculares de fronteira e a análise do potencial eletrostático molecular (Figura 3.8) mostram que a diferença de energia entre HOMO e LUMO, E_{gap} , é maior na conformação cristalográfica (3,30 eV) do que na conformação adotada no *docking* (3,02 eV), o que significa que a primeira é menos reativa. Além disso, é possível notar que o HOMO está distribuído, em ambas as conformações, sobre o anel da pirimidina, e está concentrado sobre o átomo de enxofre. Além disso, o LUMO é distribuído sobre os anéis aromáticos. Outra característica é a inversão do sinal de cargas entre os FMO. Em termos de sítios reativos, há uma região nucleofílica no átomo H do grupo N-H, enquanto a região eletrofílica está concentrada sobre a região éster.

Figura 3.8 – Os FMO calculados para conformações cristalográfica (a) e do *docking* (b). O MEP para cada conformações é apresentado em (c)

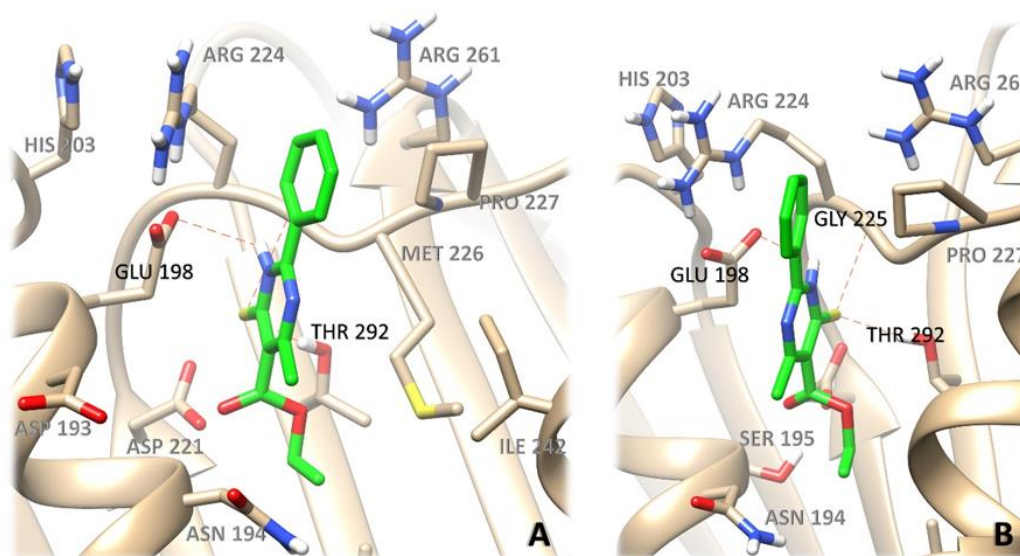


FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

3.3.3 Arranjo supramolecular

A estrutura cristalina da topoisomerase IV (código PDB¹: 1S14 de *Escherichia coli* (BELLON et al., 2004)) em complexo com Novobiocina (07N) foi usada como receptor para simulação de *docking* molecular. Essa estrutura foi escolhida por duas razões: seu ligante Novobiocina mostrou atividade inibitória *contra M. luteus* e *E. coli* (FU et al., 1986) por um mecanismo semelhante; possui a melhor resolução entre as estruturas disponíveis em complexo com 07N. Para validar o processo de *docking*, foi utilizada a metodologia descrita anteriormente para *docking* com ligante co-cristalizado (07N). A conformação prevista foi então comparada com a conformação de ligação observada experimentalmente, apresentando um valor de desvio médio quadrático (RMSD) de 0,63 Å, considerado excelente para validação em estudos de *docking* molecular, além de apresentar uma pontuação no AutoDock Vina significativa, de -8,2 kcal mol⁻¹. Para entender o motivo da atividade antimicrobiana do composto MP-TDPy, foi realizado então o *docking* desse derivado de tioxopirimidina no sítio de ligação da estrutura ParE de *E. coli* a 24kDa. O composto foi facilmente acomodado no sítio de ligação da topoisomerase IV, ocupando a região de ligação de forma parecida como o composto de referência em sua estrutura cristalográfica de raios-X (Figura 3.9).

Figura 3.9 – Resultados do *docking* para o composto MP-TDPy na estrutura cristalográfica da topoisomerase IV 1S14.

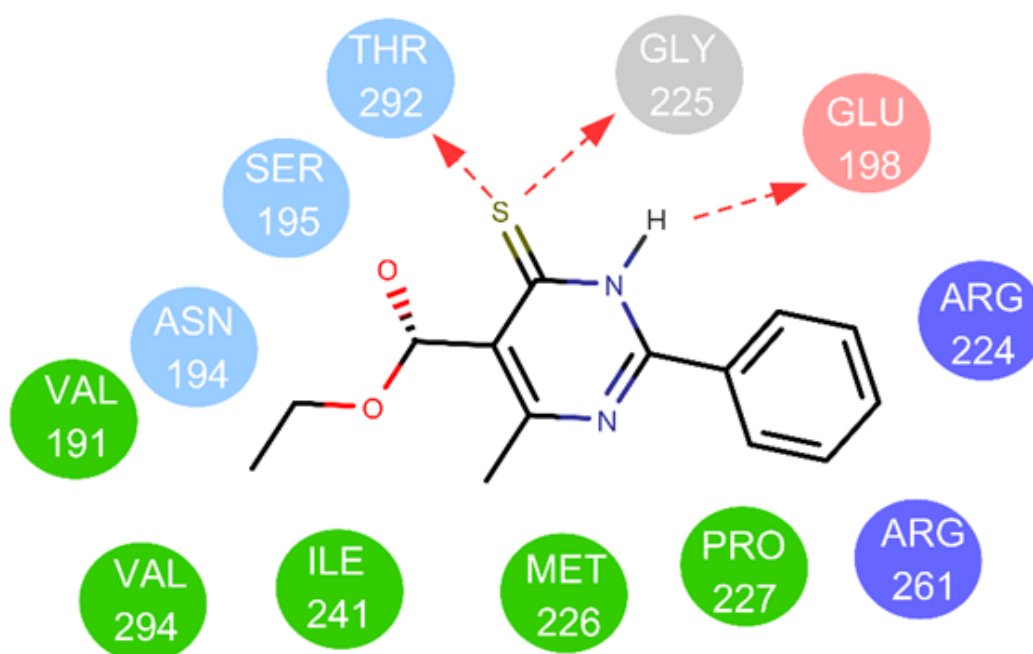


FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

¹ Protein Data Bank, maior banco de dados de estruturas de proteínas do mundo.

A melhor conformação exibiu boa afinidade de ligação com uma pontuação de $-5,4$ kcal mol⁻¹. Embora esse valor seja relativamente grande em comparação com outros cálculos de *docking* realizados pelo AutoDock Vina (CUSTODIO et al., 2020), ele está de acordo com a pequena afinidade de ligação calculada para o ligante cocrystalizado 07N. Importante dizer que mesmo com uma afinidade tão pequena, 07N inibe a topoisomerase IV, o que sugere que MP-TDPy também pode ter modo de ligação semelhante. Este composto interage principalmente formando ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de Glu198 (2,76 Å) e Thr292 (2,19 Å) (Figura 3.9a), e a cadeia lateral de Gly225 (2,34 Å) (Figura 3.9b), bem como interações hidrofóbicas significativas com Pro227, Met226, Ile242, Val191 e Val294 (Figura 3.10). Esses resultados de *docking* revelaram uma boa correlação entre estudos anteriores e podem ser uma razão para sua significativa atividade antibacteriana *in vitro* contra *M. luteus* (CUNHA et al., 2007).

Figura 3.10 – Representação bidimensional dos resultados do *docking*, mostrando o composto MP-TDPy fazendo ligações de hidrogênio (linha tracejada vermelha) e interações hidrofóbicas (círculos verdes)



FONTE: Adaptado de NAVES et al., 2021

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO

A estrutura cristalina do MP-TDPy apresentada destaca como as moléculas de água e o anel de tioxopirimidina são importantes para o empacotamento, pois coordenam as ligações de hidrogênio. Em contraste, os substituintes fenil e éster participam de interações mais fracas. Além disso, a conformação do *docking* tem energia inferior à conformação do cristal e apresenta a porção éster em uma posição sin-periplanar que se acomoda melhor no sítio ativo. Em relação ao arranjo dos orbitais moleculares, o HOMO é encontrado na região do anel da pirimidina, enquanto o LUMO está disperso na região dos anéis aromáticos. Além disso, a superfície de potencial eletroestático mostrou que a região com maior densidade de carga está próxima ao oxigênio no grupo éster, enquanto a região com menor densidade de carga está localizada no nitrogênio que está ligado a um átomo de hidrogênio. Por último, os resultados do *docking* mostram uma acomodação razoável da molécula no sítio de ligação da topoisomerase IV e que interagem principalmente por ligações de hidrogênio entre a porção de tioxopirimidina e as cadeias laterais Glu198, Thr292 e Gly225, auxiliada por interações hidrofóbicas envolvendo o resto da molécula. Esses resultados indicam uma relação entre a atividade antibacteriana observada experimentalmente com, principalmente, a porção 4-tioxopirimidina, sugerindo a investigação de novos compostos que utilizem este fragmento base.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, A. A. H. et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of some chalcones and their derived pyrazoles, pyrazolines, isoxazolines, and 5,6-dihydropyrimidine-2-(1H)-thiones. **Monatshefte fur Chemie**, v. 138, n. 9, p. 889–897, 2007.
- AL-ABDULLAH, E. S. Synthesis and anticancer activity of some novel tetralin-6-yl-pyrazoline, 2-thioxopyrimidine, 2-oxopyridine, 2-thioxo-pyridine and 2-iminopyridine derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 3410–3419, 2011.
- AUBERT, E.; LECOMTE, C. Illustrated Fourier transforms for crystallography. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 6, p. 1153–1165, 2007.
- BELLON, S. et al. Crystal Structures of Escherichia coli Topoisomerase IV ParE Subunit (24 and 43 Kilodaltons): A Single Residue Dictates Differences in Novobiocin Potency against Topoisomerase IV and DNA Gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1856–1864, 2004.
- BERG, T. Inhibition of transcription factors with small organic molecules. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 464–471, 2008.
- BRAGG, W. L. The diffraction of X-rays by crystals. **Nobel lecture**, v. 6, 1922.
- BUTLER, M. S.; PATERSON, D. L. Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019. **Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 6, p. 329–364, 2020.
- COSSAR, P. J. et al. Crystal Structure of Ethyl 2,4-Dimethyl-1-phenyl-6-thioxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylate: The Product from the Reaction of Ethyl 3-Aminocrotonate, Phenylisothiocyanate and Acetic Anhydride. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 48, n. 3, p. 91–95, 2018.
- CUNHA, S. et al. Synthesis and structural studies of 4-thioxopyrimidines with antimicrobial activities. **Monatshefte fur Chemie**, v. 138, n. 2, p. 111–119, 2007.
- CUSTODIO, J. M. F. et al. On the in silico and in vitro anticancer activity of sulfonamide chalcones: Potential JNKK3 inhibitors. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3294–3309, 2020.
- DESIRAJU, G. R. Chemistry beyond the molecule. **Nature**, v. 412, n. 6845, p. 397–400, 2001.
- DONNAY, J. D. H.; HARKER, D. A new law of crystal morphology extending the Law of Bravais. **American Mineralogist**, v. 22, n. 5, p. 446–467, 1 maio 1937.
- DURCIK, M. et al. ATP-competitive DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitors as antibacterial agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 3, p. 171–180, 2019.
- EL-AGRODY, A. M. et al. Synthesis and antimicrobial activity of thioxopyrimidines and related derivatives. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, v. 181, n. 4, p. 839–864, 2006.
- ELTON, L. R. B.; JACKSON, D. F. X-Ray Diffraction and the Bragg Law. **American Journal of Physics**, 1966.
- FIEF, C. A. et al. Examining the Impact of Antimicrobial Fluoroquinolones on Human DNA Topoisomerase II α and II β . **ACS Omega**, v. 4, n. 2, p. 4049–4055, 2019.
- FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09, Revision D.01**, Wallingford CT, Gaussian, Inc., 2009.

- FU, K. P. et al. Discrepancy between the antibacterial activities and the inhibitory effects on *Micrococcus luteus* DNA gyrase of 13 quinolones. **Chemotherapy**, v. 32, n. 6, p. 494–498, 1986.
- GIACOVAZZO, C. et al. **Fundamentals of Crystallography**. 3. ed. Bari, Italy: Oxford Science Publications, 2013.
- GLAZER, A. M. Structure Determination by X-Ray Crystallography. **Physics Bulletin**, v. 29, n. 1, p. 24–25, 1978.
- GLUSKER, J. P.; LEWIS, M.; ROSSI, M. Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists. **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 3, p. A73, 1995.
- GROOM, C. R. et al. The Cambridge Structural Database. **Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials**, v. 72, n. 2, p. 171–179, abr. 2016.
- HAHN, T. The 230 space groups. In: **International Tables for Crystallography Volume A: Space-Group Symmetry**. [s.l.] Springer, 2006. p. 112–717.
- HAUPTMAN, H. Direct Methods of X-ray Crystallography. v. 233, n. 6, p. 2–7, 1950.
- HAUPTMAN, H. Direct methods and anomalous dispersion. **Chem. Scr**, v. 26, p. 277–286, 1986.
- ISMAIL, M. M. F. et al. Synthesis of novel 2-aminobenzothiazole derivatives as potential antimicrobial agents with dual DNA gyrase/topoisomerase IV inhibition. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103437, 2020.
- JOHNSON, W. R.; NILSEN, J.; CHENG, K. T. Thomson scattering in the average-atom approximation. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 86, n. 3, 2012.
- KARLE, J. Recovering phase information from intensity data (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 7, p. 614–629, 1986.
- LEE, L. et al. 1,2,3,4-Tetrahydro-2-thioxopyrimidine analogs of combretastatin-A4. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2011–2015, 2008.
- MACRAE, C. F. et al. Mercury 4.0: From visualization to analysis, design and prediction. **Journal of Applied Crystallography**, v. 53, p. 226–235, 2020.
- MASSE, R.; ZYSS, J. A new approach in the design of polar crystals for quadratic nonlinear optics exemplified by the synthesis and crystal structure of 2-amino-5-nitropyridinium dihydrogen monophosphate (2A5NPDP). **Molecular Engineering**, v. 1, n. 2, p. 141–152, 1991.
- MAVRAČIĆ, J. et al. Similarity between Amorphous and Crystalline Phases: The Case of TiO₂. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 9, n. 11, p. 2985–2990, 2018.
- MCKINNON, J. J.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M. A. Towards quantitative analysis of intermolecular interactions with Hirshfeld surfaces. **Chemical Communications**, n. 37, p. 3814–3816, 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.
- MEIRA, C. S. et al. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1971–1985, 2018.

- MICHELINI, L. J. et al. A novel potential anticancer chalcone: Synthesis, crystal structure and cytotoxic assay. **Journal of Molecular Structure**, v. 1168, p. 309–315, 2018.
- MICHELINI, L. J. et al. Synthesis, characterization and conformational analysis of two novel 4(1H)-quinolinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 66–78, 2020.
- MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017.
- NAPOLITANO, H.; CAMARGO, A.; MASCARENHAS, Y. Análise da difração dos Raios X. **Revista Processos Químicos**, v. 1, n. 1, p. 35–45, 2007.
- NAVES, L. F. N. et al. Structural insights into the biological activity of a thioxopyrimidine derivative. **Journal of Molecular Modeling**, v. 27, n. 3, 2021.
- NESPOLO, M. The ash heap of crystallography: Restoring forgotten basic knowledge. **Journal of Applied Crystallography**, v. 48, p. 1290–1298, 2015.
- PADMAJA, A. et al. Synthesis, antimicrobial and antioxidant activities of substituted pyrazoles, isoxazoles, pyrimidine and thioxopyrimidine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4557–4566, 2009.
- PEKPARLAK, A. et al. Synthesis, crystal structure, spectroscopic (FT-IR, ¹H and ¹³C NMR) and nonlinear optical properties of a novel potential HIV-1 protease inhibitor. **Chemical Physics Letters**, v. 742, p. 137171, 2020.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- PHAM, T. D. M.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. T. Quinolone antibiotics. **MedChemComm**, v. 10, n. 10, p. 1719–1739, 2019.
- SALLUM, L. O. et al. Synthesis, conformational analysis and molecular docking studies on three novel dihydropyrimidine derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1192, p. 274–287, 2019.
- SAŞIADEK, W. et al. Crystal structure, conformation and vibrational characteristics of diethyl 4,4'-disulfanediybis(6-methyl-2-phenylpyrimidine-5-carboxylate) – A new pharmaceutical cure. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 881–896, 2019.
- SCHREIBER, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1964–1969, 2000.
- SHAPOVALOV, M. V.; DUNBRACK, R. L. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. **Structure**, v. 19, n. 6, p. 844–858, 2011.
- SHMUELI, U. **International Tables for Crystallography, Volume B: Reciprocal Space**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008.
- SPACKMAN, M. A.; JAYATILAKA, D. Hirshfeld surface analysis. **CrystEngComm**, 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. Structure validation in chemical crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. 2, p. 148–155, 2009.

- STOLARCZYK, M. et al. Synthesis, crystal structure and cytotoxic activity of novel 5-methyl-4-thiopyrimidine derivatives. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 74, n. 10, p. 1138–1145, 2018.
- TAYLOR, G. The phase problem. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. 59, n. 11, p. 1881–1890, 2003.
- TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002.
- TEICHMANN, S. A. et al. Small-molecule metabolism: An enzyme mosaic. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 482–486, 2001.
- TERNAVISK, R. R. et al. Synthesis, characterization, and computational study of a new dimethoxy-chalcone. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, n. 12, 2014.
- THOMAS, K. E. et al. The structural chemistry of metallocorroles: Combined X-ray crystallography and quantum chemistry studies afford unique insights. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 8, p. 1203–1214, 2012.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, p. 455–461, 2010.
- TURNER, M. J. et al. **CrystalExplorer17** University of Western Australia, , 2017. Disponível em: <<https://hirshfeldsurface.net>>
- VAZ, W. F. et al. Synthesis, characterization, and third-order nonlinear optical properties of a new neolignane analogue. **RSC Adv.**, v. 6, n. 82, p. 79215–79227, 2016.
- WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 2, p. 247–260, 2006.
- WILKINS, S. W. Celebrating 100 years of X-ray crystallography. **Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography**, v. 69, n. 1, p. 1–4, 2013.
- WILLIAM, F. B. et al. Aplicações Tecnológicas da Metodologia Cristalográfica. **Revista Processos Químicos**, v. 4, n. 7, p. 19–32, 2010.