

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Taniris Cafiero Braga

Adutos de Biginelli: Síntese e estudo de inibição e de interação com a enzima urease

Belo Horizonte

2019

Taniris Cafiero Braga

Adutos de Biginelli: Síntese e estudo de inibição e de interação com a enzima urease

Tese apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências – Química.

Orientador: Prof. Ângelo de
Fátima

Belo Horizonte

2019

Ficha Catalográfica

B813a Braga, Taniris Cafiero
2019 Adutos de Biginelli [manuscrito] : síntese e estudo
T de inibição e de interação com a enzima urease /
Taniris Cafiero Braga. 2019.
[xix], 174 f. : il.

Orientador: Ângelo de Fátima.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

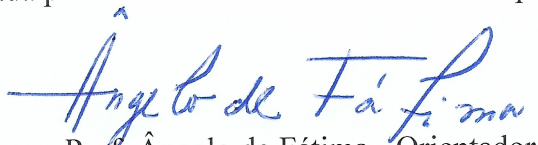
1. Química orgânica - Teses 2. Urease - Inibidores
- Teses 3. Canavalia ensiformis - Teses 4. Catálise -
Teses 5. Catalisadores - Teses 6. Fosfatos - Teses 7.
Van der Waals, Forças de - Teses 8. Colorimetria -
Teses 9. Nióbio - Teses I. Fátima, Ângelo de,
Orientador II. Título.

CDU 043


"Adutos de Biginelli: Síntese e Estudo de Inibição e de Interação com a Enzima Urease"

Taniris Cafiero Braga

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Ângelo de Fátima - Orientador
UFMG


Prof. Carlos Kleber Zago de Andrade
UNB


Prof. Sérgio Antônio Fernandes
UFV


Prof. Maria Helena de Araujo
UFMG


Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão
UFMG

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2019.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos órgãos de fomento FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo financiamento. Ao Programa de Pós-Graduação em química, pela oportunidade do doutorado.

À Deus por todos os milagres no caminho até aqui.

Aos meus pais, que foram meus primeiros professores. Eles que me ensinaram que estudar é importante, que tiveram paciência, que sempre me doaram muito carinho e sempre tiveram mais fé em mim do que eu mesma. À minha mãe, que me acalma, que sempre sabe a palavra certa que eu preciso ouvir. Ao meu pai, meu herói, que faz do impossível realidade, faz a minha vida ser muito mais fácil e agradável.

Sou muito grata ao meu irmão, que mesmo sendo mais novo, sempre tem bons conselhos e sempre apresenta perspectivas novas me ajudando a lidar com os meus medos.

Gostaria de expressar minha grande gratidão ao professor Ângelo que me aceitou em seu grupo, e persistiu na missão “de polir o carvão bruto”, me ajudou a vencer meu medo de falar em público, me ensinou a pesquisar e sempre me motivou, mesmo quando nada parecia dar certo, catalisou boas oportunidades que se tornaram experiências muito enriquecedoras para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Tenho muita gratidão pelos momentos passados no GEQOB e agradeço a todos os integrantes desse grupo, desde 2009, pela convivência diária. Gostaria de oferecer um agradecimento especial ao Carlos, meu parceiro de guerra, que me ajudou nas disciplinas, nos experimentos, sempre muito companheiro e amigo. Ao Breno, Wellington, Juliana, Camila, Marcelo por tirarem minhas dúvidas, por fornecerem consultorias, pela paciência, por me ajudarem a entender meus artigos, reações e pelas sugestões sempre pertinentes. A Grazielle, Joice, Gabrielle, Thalita, Zaqueu, Yuri, Leonardo, Caroline, Angélica, Everton, Daniel, pela amizade diária, companhia e consultorias.

Gostaria de agradecer aos amigos de corredor: Breno, Rafael, Josana, Fernanda, Thaís, Isabel, Ana, Nayara, Luciana, Mozart e Samara pela alegria diária, terapia de grupo, pelas consultorias e por emprestarem reagentes nas horas de sufoco.

Gostaria de agradecer ao Pedro e a Bruna, a convivência com eles é uma das melhores lembranças que eu guardo, são meus irmãos de outra mãe e mesmo pai acadêmico. Eles dividiram comigo o peso do doutorado, o terceiro turno, a coluna que deu certo e a que deu errado, comemoram comigo minhas reações de sucesso e me deram conselhos e suporte quando não funcionaram.

Gostaria de agradecer a todos os professores do Departamento de Química, em especial a Rosemeire e ao Cleiton que além de me ensinarem muito, me doaram uma grande e especial amizade nesse período.

Gostaria de agradecer a professora Luzia e a aluna de Doutorado Thamara do Departamento de Biologia pela colaboração e pelo comprometimento com as minhas urgências sempre se mostraram disponíveis e tiraram muitas de minhas dúvidas.

Gostaria de agradecer ao programa PROCAD que proporcionou a minha ida a Universidade Federal de Alagoas para finalizar os testes do doutorado.

Gostaria de agradecer ao professor Josué e a professora Isis, da UFAL, que me acolheram durante o mês mais intenso da minha vida. A paciência, comprometimento e didática do professor Josué são admiráveis, certamente um exemplo de profissional comprometido com a tarefa de ensinar os alunos de maneira terna.

Agradeço a todos do grupo LINQA: Fátima, Larissa, Karolaine, Marina, Camila pela companhia, a Janaína, Ary, Mayara, Maria Célia, Woodland, Francisco, Jaelson, Emeson e Dayanne pelas conversas divertidas, pelos conselhos, pela amizade, pela ajuda com os equipamentos analíticos, pela troca de experiências e pelas palavras de conforto. À Thamilla que assumiu o compromisso de me ajudar, me ensinou a operar os equipamentos, a compreender os experimentos, me ajudou na escrita do artigo e sugeriu a leitura de materiais que foram importantes para a construção desta tese. A Amanda, minha grande parceira e amiga, que abriu a portas de sua casa, que me ensinou a plotar os gráficos e me apresentou

as maravilhas de Maceió. Ao Moisés, Adriano, Keith, Erivaldo e Neto pela companhia de todo dia durante minha estada em Alagoas.

Gostaria de agradecer ao eterno disco voador: Natália, Vitor, Alexandre pela amizade desde momentos imemoriais e, em especial, à Poliane que me ajudou a caracterizar o fosfato de nióbio e me apresentou artigos que foram essenciais para a construção desse material.

Gostaria de agradecer aos amigos da fenda do biquini: Fabiano, Samira, Esther, Daniela, João, Fernanda, Fábio, Nathália, Cristiano, Ágatha, Graziane pela amizade e por entenderem minhas ausências.

A toda minha família em especial meus primos: Samuel, Amália, Laura, Beatriz e Leandro que sempre torceram por mim e me motivam muito. Meus tios Tânia, Eduardo, Sandrilene, Deslandes, Stella e Delaine que me acompanharam nesta trajetória sempre com palavras de amor e motivação.

Aos membros da Banca, Tiago, Maria Helena, Sérgio e Carlos pela disponibilidade e pela leitura do material.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial ao Sr. Luiz, Santa, Fani e Anderson que sempre foram muito atenciosos e prestativos.

“Caminhante, são tuas pegadas
o caminho e nada mais;
caminhante, não há caminho,
se faz caminho ao andar”

Antonio Machado

(Cantares)

RESUMO

A urease é uma enzima ureolítica presente na microbiota de solos, em plantas e em microorganismos e, em alguns casos, é considerada fator de virulência. Essa enzima participa do ciclo global do nitrogênio, conseqüentemente, contribui para o aumento da emissão de CO₂ e NH₃ no meio ambiente. Nos cultivos agrícolas, a ureia é o principal fertilizante nitrogenado, e a presença da urease diminui o aproveitamento de nitrogênio por volatilização. Portanto, a inibição da enzima urease é uma estratégia de interesse medicinal e tecnológico. Considerando-se a importância da enzima urease e o interesse na inibição dela, este trabalho teve como objetivo sintetizar adutos de Biginelli com o auxílio de catalisadores e avaliar a inibição e a interação molecular entre esses adutos e a enzima urease de *Canavalia ensiformis*. Para a obtenção dos adutos de Biginelli foram avaliados o uso do fosfato de nióbio (NbOPO₄) e do cloridrato de 1-butimidazolio-3-(*n*-butilsulfônico) ([BIMBS][Cl]) como catalisadores. Verificou-se que NbOPO₄ apresentou estabilidade nas temperaturas de calcinações avaliadas (400, 500 e 700 °C), estrutura amorfa, sítios ácidos de Brønsted e a concentração de 0,01 mol de sítios ácidos g⁻¹. Após caracterização do NbOPO₄, a síntese do [BIMBS][Cl] foi descrita em 3 etapas com 68% de rendimento global. As substâncias NbOPO₄ e [BIMBS][Cl] apresentaram atividade catalítica para a reação de Biginelli, contudo a segunda apresentou melhor resultado na condição otimizada (71% de rendimento). Em seguida, usando o [BIMBS][Cl], foram sintetizados 26 adutos de Biginelli, contendo substituintes doadores ou retiradores de densidade eletrônica no anel aromático, com rendimentos entre 4 - 92%. Em seguida foi avaliada a inibição da enzima urease por 16 adutos de Biginelli *via* método colorimétrico (modelo do indofenol). Os adutos de Biginelli inibiram a enzima urease na faixa de 10 - 47% sendo que três substâncias, derivadas da tioureia com os substituintes 4-NO₂, 2,3-OCH₂O, 4-Br no anel aromático (AB7-S, AB9-S, AB11-S, respectivamente), apresentaram inibição de mesma significância estatística que o controle hidroxitioureia. Os quatro compostos mais ativos e o derivado da tioureia com benzaldeído tiveram as constantes de ligação (K_b) determinadas por fluorescência. Os compostos derivados da tioureia com substituintes 4-NO₂ e 3-MeO (AB5-S e AB7-S, respectivamente) foram os que apresentaram maiores K_b e foram avaliados quanto aos mecanismos de interação e de inibição com a enzima urease. Os complexos urease/adutos de Biginelli (AB5-S ou AB7-S) foram considerados termodinamicamente favoráveis, inibidores competitivos e capazes de realizar interações não exclusivas do tipo interações hidrofóbicas ou interações de hidrogênio e van der Waals, respectivamente. Os resultados deste trabalho mostram que a presença de substituintes nos adutos de Biginelli modula a atividade de inibição da urease e interfere no tipo de interação predominante no complexo enzima/inibidor.

Palavras chaves: inibidores de urease, adutos de Biginelli, catálise, fosfato de nióbio, líquido iônico.

ABSTRACT

Urease is an ureolytic enzyme present in the soil microbiota, plants and microorganisms and, in some cases, is considered a virulence factor. This enzyme partakes of the global nitrogen cycle and consequently contributes for the increase of CO₂ and NH₃ emission to environment. In crops, the urea is the main nitrogen fertilizer and the presence of urease decreases the nitrogen exploitation from volatilization. Therefore, urease inhibition is a strategy of medicinal and technological interest and this work aimed to synthesize Biginelli adducts with catalysts assistance and to evaluate the inhibition and molecular interaction between these adducts and urease from *Canavalia ensiformis*. Looking to obtain Biginelli adducts were evaluated the use of niobium phosphate (NbOPO₄) and 1-butyl-3-(4-sulfobutyl)-1*H*-imidazol-3-ium [BIMBS][Cl] as catalysts. NbOPO₄ was stable at the evaluated calcination temperatures (400, 500 and 700 °C), presents amorphous structure, Brønsted acid sites and the concentration of total acids of 0.01 mol of acid sites g⁻¹. After characterization of NbOPO₄, the synthesis and characterization of [BIMBS][Cl] were described in 3 steps with 68% global yield. The compounds NbOPO₄ and [BIMBS][Cl] showed catalytic activity in Biginelli reaction, however [BIMBS][Cl] presented better results in the optimized condition (71% yield). Then, using [BIMBS][Cl], 26 Biginelli's adducts it were synthesized with substituents containing electron donor or withdrawing groups on the aromatic ring with 4-92% yields. Then the urease inhibition was evaluated using 16 adducts of Biginelli via colorimetric method (indophenol model). Biginelli adducts inhibited the enzyme urease in the range of 10-47% and 3 thiourea derivatives with substituents 4-NO₂, 2,3-OCH₂O, 4-Br (AB7-S, AB9-S and AB11-S, respectively) showed inhibition of the same statistical significance as the hydroxyurea control. The 4 most active compounds and the thiourea and benzaldehyde derivative (ABS12-S) had the binding constants (K_b) determined by fluorescence. The thiourea derivatives with substituents 4-NO₂ and 3-MeO (AB5-S and AB7-S, respectively) were the ones with the highest K_b and the interaction and inhibition mechanisms with urease enzyme were evaluated. The urease/Biginelli adducts complexes (AB5-S or AB7-S) were thermodynamically stable, competitive inhibitors and capable of performing non-unique interactions such as hydrophobic interactions or hydrogen and van der Waals interactions, respectively. The result of this work shows that the presence of substituents in the Biginelli adducts modulates urease inhibition and interferes with the predominant interaction type at the enzyme/inhibitor complex.

Keywords: urease inhibitors, Biginelli adducts, catalysis, niobium phosphate, ionic liquid.

Lista de figuras

Figura 1: Núcleos básicos presentes em reconhecidos inibidores de urease.....	5
Figura 2: Esquema de síntese de Benzotiazóis utilizando um derivado de nióbio como catalisador.....	11
Figura 3: Proposta de Domen para o mecanismo de decomposição da água por luz usando $NiK_4Nb_6O_{17}$	12
Figura 4: Sítios de Brønsted e Lewis propostos por Pholjaroen para o fosfato de nióbio....	13
Figura 5: Espectros na região do infravermelho das amostras de NbOPO₄ após o tratamento com piridina e identificação qualitativa dos sítios ácidos calcinadas a: A) 400 °C, B) 500 °C e C) 700°C.....	18
Figura 6: Curvas TG/dTG e DTA do NbOPO₄ (não calcinado), NbOPO₄ (400), NbOPO₄ (500) e NbOPO₄ (700), em atmosfera de N_2 , com uma razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	19
Figura 7: Padrões de difração de raios-X dos NbOPO₄ calcinados: A) 400 °C, B) 500 °C e C) 700 °C.....	21
Figura 8: Exemplos de líquidos iônicos ácidos divididos em categorias segundo a acidez e constituição estrutural.....	24
Figura 9: Uso de líquido iônico ácido como catalisador em uma reação de esterificação...	25
Figura 10: Exemplo de um líquido iônico com função ácida na catálise de uma reação de alquilação.....	26
Figura 11: Exemplo de formação de heterocíclico empregando líquido iônico como catalisador.....	26
Figura 12: Exemplos de reações envolvendo rearranjo pinacol pinacolona catalisado por um líquido iônico de características ácidas.	27
Figura 13: Exemplo de reação de desidratação do etileno glicol em acroleína utilizando um líquido iônico de característica ácida.....	28

Figura 14: Exemplo de reação com biomassa renovável utilizando líquido iônico de características ácidas como catalisador.	28
Figura 15: Exemplo do uso de líquido iônico como catalisador na oxidação do DBT.	29
Figura 16: Estrutura proposta do [BIMBS][Cl]	30
Figura 17: Análise retrossintética para a obtenção do [BIMBS][Cl].....	30
Figura 18: Esquemas de síntese do [BIMBS][Cl] e intermediários.....	31
Figura 19: Proposta de mecanismo para a obtenção do líquido iônico.	32
Figura 20: Possíveis etapas de uma reação multicomponente, definida por UGI, segundo os equilíbrios químicos presentes até a formação do produto final.	36
Figura 21. Reação clássica de Biginelli para a formação de 3,4-di-hidropirimidin-2(1 <i>H</i>)-ona.	37
Figura 22: Exemplos de adutos de Biginelli de interesse biológico.....	38
Figura 23: Possíveis intermediários na reação de Biginelli sugeridos por Folkers e Johnson	41
Figura 24: Relação massa carga dos intermediários da reação de Biginelli identificados por Ramos.	42
Figura 25: Intermediários da reação de Biginelli identificados por Alvim usando ESI-MS	43
Figura 26: Reação cinco componentes de Maskrey baseada na reação de Biginelli.....	43
Figura 27: Reação modelo para a síntese de adutos de biginelli (AB4-O) no estudo de condições otimizadas empregando [BIMBS][Cl] ou NbOPO ₄ como catalisador.	45
Figura 28: Efeito da calcinação do NbOPO ₄ , quantidade de catalisador, tempo, temperatura e solvente na preparação do aduto de Biginelli (AB4-O). Reagentes e condições: 4-hidroxibenzaldeído, acetoacetato de etila e ureia (1:1,5:1,5, respectivamente) sob irradiação de micro-ondas [MO (potência máxima, 250 Watts)] em um reator DISCOVER CEM®. (A) 90 °C, 10 min, sem solvente, 20 mol% do NbOPO ₄ calcinado a 400, 500 ou 700 °C; B) 90 °C, 10 min, sem solvente, diferentes quantidades de NbOPO ₄ (400)- a reação sem catalisador	

foi realizada no período de 30min; C) 10 min, sem solvente, 10 mol% **NbOPO₄ (400)**, em diferentes temperaturas; D) 90 °C, sem solvente, 10 mol% **NbOPO₄ (400)**, diferentes tempos de reação; E) 90 °C, 20 min, 10 mol% do **NbOPO₄ (400)** avaliação do uso de solventes verdes..... 46

Figura 29: Efeito da quantidade de catalisador ([**BIMBS**][**Cl**]), tempo e temperatura na preparação do aduto de Biginelli (**AB4-O**). Reagentes e condições: 4-hidroxibenzaldeído, acetoacetato de etila e ureia (1:1,5:1,5, respectivamente) sob irradiação de micro-ondas [MO (potência máxima, 250 Watts)] em um reator DISCOVER CEM®. (A) 90 °C, 30 min, sem solvente, diferentes quantidade de [**BIMBS**][**Cl**], B) [**BIMBS**][**Cl**] 20 mol%, 30 min em diferentes temperaturas, C) [**BIMBS**][**Cl**] 20 mol%, 90 °C em diferentes períodos. 48

Figura 30: Identificação de amônia pelo método do indofenol. 59

Figura 31: Diagrama de Jablonski dos estados de energia. 60

Figura 32: Efeito dos adutos de Biginelli (**AB**) na atividade da enzima urease de *jack bean*. O teste de triagem foi realizado usando a urease na concentração de 12,5 mU na presença de 0 ou 500 µM de AB em tampão fosfato EDTA, pH 7, com teste estatístico de Scott Knott à significância de 0,05, cada letra representa um grupo diferente de significância 67

Figura 33: Urease (1,0 µM) perfil de emissão espectral em diferentes concentrações de **AB7-S** (2,5 a 50 µM) em pH 7 e 30°C (A). Curva dupla de logaritmo para o cálculo da constante de ligação (K_b) para **AB5-S** e **AB7-S** (B). Comparação das constantes de ligação de todos os **ABs** testados em relação a urease de *jack bean* (C). Curva de Stern-Volmer para os **AB5-S** e **AB7-S** (D). O desvio padrão foi calculado para 3 determinações..... 69

Figura 34: Espectro de fluorescência tridimensional da urease livre (A), complexo urease/**AB5-S** (B) e complexo urease/**AB7-S** (C) em pH 7. Ureases e os ligantes foram utilizados a 1,0 e 40 µM, respectivamente. 73

Figura 35: Hiperbole de Michaelis-Menten para **AB5-S** e **AB6-S** (A e B, respectivamente) e Lineweaver-Burk para **AB5-S** e **AB7-S** (C e D, respectivamente). O sistema foi avaliado em concentrações crescentes de ureia (1-32 mM) foram incubados durante 10 min com urease

de *jack bean* tipo II na ausência das substâncias teste (I-livre) ou na presença das substâncias (0,1-0,3 mM) 77

Lista de equações

Equação 1	55
Equação 2	56
Equação 3	56
Equação 4	56
Equação 5	61
Equação 6	62
Equação 7	62
Equação 8	64
Equação 9	65
Equação 10	65
Equação 11	76
Equação 12	78
Equação 13	78

Lista de tabelas

Tabela 1: Localização de minas e reservas de nióbio.....	8
Tabela 2: Aplicação tecnológica dos compostos de nióbio.....	9
Tabela 3: Relação dos produtos obtidos na benzilação do anisol empregando fosfato de nióbio	14
Tabela 4: Acidez total das amostras de nióbio calcinadas a 400, 500 e a 700 °C.....	20
Tabela 5. Sinais observados no espectro de RMN de ¹ H do 1-butylimidazol (BIM) sintetizado e os descritos para BIM na literatura.....	32
Tabela 6: Sinais observados no espectro de RMN de ¹ H do BIMBS sintetizado e os descritos na literatura.	33
Tabela 7: Dados obtidos do espectro de ¹ H de AB4-O em DMSO- <i>d</i> ₆ versus dados descritos na literatura.....	49
Tabela 8: Reação de Biginelli sob catálise do líquido iônico [BIMBS][Cl]	51
Tabela 9: Evidência da formação dos ABs por RMN e comparação dos dados obtidos com os previamente reportados na literatura.....	53
Tabela 10: Propriedades de fluorescência de aminoácidos em solução aquosa pH neutro ..	61
Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos relacionados com o tipo de interação intermolecular	63
Tabela 12: Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre os adutos de Biginelli AB5-S ou AB7-S com a urease	70
Tabela 13: Parâmetros de FRET para a interação entre os adutos de Biginelli AB5-S e AB7-S S todos a 5 µM.....	72
Tabela 14: Parâmetros de fluorescência sincronizada para as substâncias AB5-S e AB7-S frente a urease.....	75
Tabela 15: Razão das constantes de ligação na ausência (K _b) ou na presença (K _b ') de reconhecidos inibidores de urease	75

Tabela 16: Resultados obtidos da titulação do NbOPO₄ (400)	82
Tabela 17: Resultados obtidos da titulação do NbOPO₄ (500)	82
Tabela 18: Resultados obtidos da titulação do NbOPO₄ (700)	82
Tabela 19: Análise da acidez por peagâmento	86

Siglas, abreviaturas, acrônimos e símbolos

[BIMBS][Cl]	Cloridrato de 1-butilimidazolio-3-(<i>n</i> -butilsulfônico)
CBMM	Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DBT	Dibenzotiofeno
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DPPH	1-Picrilhidrazil de 2,2-difenila
DRX	Difratometria de Raios – X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ESI-MS	Espectrômetro de Massas com Fonte de Ionização electrospray
EXAFS	Estrutura Fina pela Absorção de Raios-X Estendidos
FRET	Transferência de Energia por Ressonância de Föster
GEQOB	Grupo de Estudo de Química Orgânica e Biológica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>

ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
LINQA	Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação em Química Analítica
M	Mega (10^6)
MCM	Composição de Matéria Mobil
NBPT	<i>N</i> -(<i>n</i> -butil)tiofosfóricotriamida
ORD	Dispersão Rotativa Óptica
PAMPA	Permeabilidade de Membrana Paralela
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TG	Termogravimetria
Trp	Triptofano
Try	Tirosina
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
XANES	Estrutura na Proximidade da Borda Absorção dos Raios-X

ΔG Variação da energia livre de Gibbs

ΔH Variação da entalpia

ΔS Variação da entropia

Sumário

Siglas, abreviaturas, acrônimos e símbolos	xiii
Lista de figuras	vii
Lista de equações.....	x
Lista de tabelas	xi
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I - Urease: a necessidade de novos inibidores	1
1.1 – Introdução geral.....	1
1.2 – Objetivo geral	6
CAPÍTULO II – O fosfato de nióbio: Relevância econômica e desempenho como catalisador em síntese orgânica.....	7
2.1 – O nióbio	7
2.2 – O fosfato de nióbio	12
2.2 – Objetivos.....	15
2.3 – Resultados e Discussão.....	16
2.4 – Conclusões.....	22
CAPÍTULO III – Uso de líquido iônicos com função ácida em catálise orgânica	23
3.1 - Líquidos iônicos em catálise	23
3.2 - Objetivos	29
3.3 – Resultados e Discussão.....	29
3.4 – Conclusão	35

CAPÍTULO IV – Obtenção de Adutos de Biginelli.....	36
4.1 – Reações multicomponentes: A busca por metodologias eficientes para a reação de Biginelli	36
4.2 – Objetivos.....	44
4.3 – Resultados e Discussão.....	45
4.4 – Conclusão	54
CAPÍTULO V – Estudo de interação e mecanismo de inibição da urease por adutos de Biginelli	55
5.1 - Métodos para a investigação da interação proteína ligante.....	55
5.1.1 – Método do indofenol para a quantificação de amônio	58
5.1.2 – Fluorescência.....	59
5.2 – Objetivos.....	66
5.3 – Resultados e Discussão.....	66
5.3.1 – Avaliação na conformação da urease	72
5.4 – Conclusão	78
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
CAPÍTULO VII – PARTE EXPERIMENTAL	80
7.1 – Caracterização do NbOPO ₄	80
7.1.1 – Calcinação do NbOPO ₄	80
7.1.2 – Termogravimetria (TG).....	80
7.1.3 – Difratomia de raios-X (DRX).....	80
7.1.4 – Caracterização qualitativa dos sítios de Brønsted e de Lewis pelo método da piridina.....	81
7.1.5 – Titulação dos sítios ácidos totais	81

7.2 – Síntese e caracterizações dos catalisadores e avaliação da atividade catalítica na reação de Biginelli	83
7.2.1 – Materiais e métodos.....	83
7.2.2 – Generalidades metodológicas.....	83
7.2.3 – Temperaturas de fusão.....	83
7.2.4 – Infravermelho	83
7.2.5 – Ressonância magnética.....	84
7.2.6 – Espectrometria de massas de alta resolução.....	84
7.3 – Metodologias de Síntese.....	84
7.3.1 – Preparação do 1-butilimidazol (BIM)	84
7.3.2 – Preparação do 3-(<i>n</i> -butilsulfonato) de 1-butilimidazólio (BIMBS).....	85
7.3.3 – Preparação do cloridrato de 1-butilimidazólio-3-(<i>n</i> -butilsulfônico) ([BIMBS][Cl]).....	86
7.3.4 – Avaliação do fosfato de nióbio como catalisador na reação de Biginelli.....	86
7.3.5 – Avaliação do [BIMBS][Cl] como catalisador na reação de Biginelli	88
7.3.6 – Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli obtidos	89
7.3.7 – Caracterização dos adutos de Biginelli.....	89
7.4 – Avaliação da inibição dos adutos de Biginelli frente à enzima urease.....	102
7.4.1 – Reagentes e preparo de soluções	102
7.4.2 – Ensaio enzimáticos de triagem.....	103
7.4.3 – Estudo de interação por fluorescência molecular	103
7.4.4 – Titulação por fluorescência molecular	103
7.4.5 – Transferência de energia por ressonância de Förster.....	104
7.4.6 – Fluorescência sincronizada: avaliação dos resíduos Tyr e Trp	104

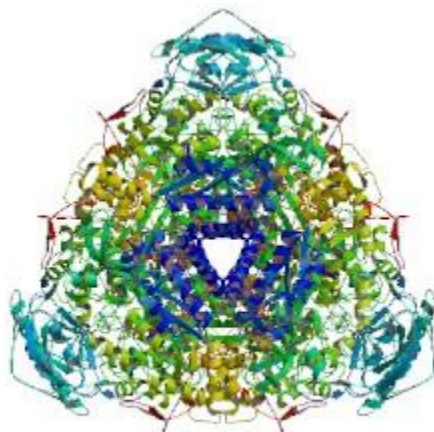
7.4.7 – Avaliação dos sítios de ligação e estudos de competição.....	104
7.4.8 – Fluorescência tridimensional (3D): Alterações conformacionais	105
7.4.9 – Estudo de cinética.....	105
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE	120

CAPÍTULO I - Urease: a necessidade de novos inibidores

1.1 – Introdução geral

A urease é uma enzima capaz de hidrolisar a ureia 10^{14} vezes mais rapidamente do que a reação não catalisada, fornecendo como produtos amônio e carbamato (Figura 1) (CALLAHAN; YUAN; WOLFENDEN, 2005). Essa enzima contribui com o ciclo global do nitrogênio devido a degradação do carbamato gerar espontaneamente CO_2 e NH_3 . Isso acaba fornecendo condições, por exemplo, para a chuva ácida, aumento da temperatura média do planeta, entre outros problemas ambientais. (CALLAHAN; YUAN; WOLFENDEN, 2005; KRAJEWSKA, 2009; MODOLO *et al.*, 2015).

Figura 1: Enzima urease de *Canavalia ensiformis* (jack bean).



Fonte: PDB3LA4.

O primeiro microrganismo ureolítico, denominado *Micrococcus ureae*, foi isolado da urina, em 1864, por van Tieghem (KRAJEWSKA, 2009). Dez anos mais tarde, o pesquisador Musculos isolou a primeira enzima ureolítica que, apenas em 1890, foi denominada urease (KRAJEWSKA, 2009). James B. Sumner, em 1926, obteve o cristal de urease a partir da planta *jack bean*, sendo esse, o primeiro relato de obtenção de cristal enzimático (SUMNER, 1926).

O sítio ativo da urease foi determinado a partir de estudos de espectroscopia de absorção e de raios-X nas regiões de estrutura fina pela absorção de raios-X estendidos (EXAFS) e estrutura na proximidade da borda (XANES) (HASNAIN; PIGGOTT, 1983). Esses estudos sugerem a presença de dois átomos Ni(II) coordenados a três átomos de nitrogênio da histidina e três átomos de oxigênio (MAZZEI, L.; MUSIANI; CIURLI, 2017). Na análise por espectroscopia UV-Vis de absorbância da enzima urease, Dixon e colaboradores (1975) concluíram que os átomos de níquel são essenciais à urease e para a atividade catalítica da mesma (DIXON *et al.*, 1975).

Diferentes subunidades proteicas são observadas em diferentes fontes de urease, mas a estrutura do sítio ativo nas proximidades dos átomos de Ni(II) são similares e capazes de induzir o mesmo mecanismo na atividade catalítica. Portanto, estudos de inibição eficientes para uma fonte de urease também devem ser efetivos para outras (KAFARSKI; TALMA, 2018; KAPPAUN *et al.*, 2018).

As ureases desempenham várias funções importantes: podem atuar na proteção de plantas contra predadores, no metabolismo de plantas, fungos e bactérias que utilizam o nitrogênio da ureia como fonte de nutrientes, na microbiota oral e proteção de dentes contra cáries e diversas patologias humanas, a citar gastrites, úlceras gástricas, cálculos renais e etc (KAPPAUN *et al.*, 2018).

A seguir apresentam-se alguns exemplos pontuais sobre as funções da urease. As evidências de que a urease protege os dentes contra as cáries se fortaleceram, em 2015. Os estudos de Morou-Bermudez e colaboradores mostraram que as bactérias *Haemophilus parainfluenzae* da família *Pasteurellaceae*, capazes de produzir urease, não apresentaram relação com a formação de cáries e, o contrário foi observado para as bactérias como a *Leptotrichia* que não eram capazes de produzir essa enzima (MOROU-BERMUDEZ *et al.*, 2015). Essas descobertas corroboram outros estudos confirmando que urease produzida pela microbiota oral é capaz de aumentar a alcalinidade da boca inibindo a formação de cáries e placas (KAPPAUN *et al.*, 2018; LIU; NASCIMENTO; BURNE, 2012).

Outra urease interessante é a de *Proteus mirabilis*, que foi associada à formação de cálculos renais. Neste caso, a urease promove a alcalinização da urina, propiciando a precipitação de sais na forma de cristais de extradita e carbonato de apatita (KAPPAUN *et al.*, 2018).

A relação entre a urease e o estômago foi um pouco controversa ao longo do tempo. Acreditava-se que as úlceras eram causadas por estresse, má alimentação, tabagismo, álcool ou devido a susceptibilidade genética e que a *H. pylori* era apenas uma contaminação, um comensal inofensivo. Acreditava-se, ainda, que a urease era uma das responsáveis pela proteção do estômago que é capaz de digerir o alimento sem causar danos a si mesmo (GRAHAM; MIFTAHUSSURUR, 2018). Marshall discordava dessa hipótese e devido ao insucesso em criar um modelo animal que comprovasse a relação entre a *H. pylori* e a formação de úlceras ele contaminou a si mesmo, adquiriu úlcera e se curou com o uso de antibióticos. Por essa revolução no tratamento de úlceras e gastrites, Marshall e Warren foram laureados com o Nobel, em 2005. (MARSHALL, 2006).

Desde os estudos de Marshall sabe-se que a urease é essencial para a *H. pylori* adquirir tolerância ao meio ácido do estômago (GRAHAM; MIFTAHUSSURUR, 2018). Portanto, a inibição dessa enzima pode ser uma das formas de erradicar esse micro-organismo (GRAHAM; MIFTAHUSSURUR, 2018; REGO *et al.*, 2018).

Além disso, a urease é uma enzima-chave para o ciclo global do nitrogênio, ela é largamente distribuída na natureza, degrada a ureia e contribui para a formação de gases (NH_3 , CO_2 , N_2O e NO) ou de espécies iônicas (NO_2^- e NO_3^-) que são consideradas poluentes oriundos da hidrólise e de outros processos como nitrificação e desnitrificação (MODOLO *et al.*, 2018). A ureia que é um produto endógeno do catabolismo de proteínas e aminoácidos. Essa substância é bastante utilizada como fonte de nitrogênio (46% em massa) e é o principal fertilizante usado em cultivos agrícolas, uma vez que apresentam baixo custo, fácil aquisição nos mercados, alta solubilidade e baixa corrosão (KAFARSKI; TALMA, 2018; MODOLO *et al.*, 2018; RUTHROF *et al.*, 2018). Nesse sentido, o nitrogênio é o nutriente mais utilizado como fertilizante (CANTARELLA *et al.*, 2018). Estima-se que em 2018/2019 serão produzidos mais de 107 Mt de fertilizantes nitrogenados pela indústria e, dentre eles, cerca de 55% é ureia (CANTARELLA *et al.*, 2018). Estima-se ainda que a perda de NH_3 na agricultura e pecuária mundialmente é de 37 Mt (CANTARELLA *et al.*, 2018).

A importância dos impactos da urease tanto economicamente como ambientalmente motivou vários estudos buscando a inibição dessa enzima. Desses estudos, vários cristais de complexos enzima/inibidores já tiveram suas estruturas determinadas e depositadas no

Protein Data Bank (PDB). Os complexos mais reportados são os da urease de *Sporosarcina pasteurii* com os seguintes ligantes: β -mercaptoetanol (PDB 1UPB) (BENINI, S. *et al.*, 1998), acetohidroxamato (PDB 4UPB) (BENINI, S. *et al.*, 2000), diamidato de fenilfósforo (PDB 3UPB) (BENINI, STEFANO *et al.*, 1999), fosfato (PDB 1 IE7) (BENINI, S. *et al.*, 2001), *N*-(*n*-butil) tiofosfórico triamida (NPBT) (PDB4CU) (MAZZEI, LUCA *et al.*, 2017) entre outros. Extrapolando as informações de cristalização do PDB e utilizando cálculos matemáticos, o estudo sobre a interação entre o inibidor e enzima pode ser avaliado segundo uma proposta mecanística de inibição bem como visando ao desenvolvimento de inibidores ainda mais promissores.

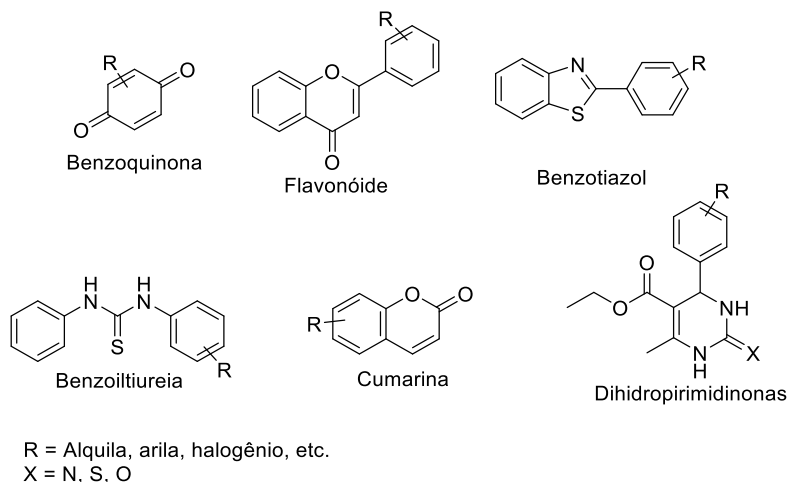
A urease pode ser inibida por metais, os quais geralmente interagem com o grupo sulfidril no sítio ativo e podem formar sulfitos insolúveis. A inibição da urease por metais segue a seguinte tendência: $Ag^+ \sim Hg^+ > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} = Sn^{2+} = Mn^{2+} = Pb^{2+}$ (CANTARELLA *et al.*, 2018). Contudo, a aplicação de metais pesados na inibição da urease não é uma solução prática, pois pode desencadear problemas ambientais como a bioacumulação e toxicidade aos seres vivos (CANTARELLA *et al.*, 2018).

Entre os inibidores orgânicos, o NBPT é o inibidor de urease mais reconhecido e utilizado mundialmente em cultivos, sendo comercializado desde meados de 1990 como *Agrotain* (USA). Hoje existem vários produtos nos quais o NBPT é um dos princípios ativos. Essa substância também pode ser encontrada em muitos países como aditivos e/ou revestida na ureia (CANTARELLA *et al.*, 2018). O NBPT é capaz de bloquear 3 sítios da enzima urease formando uma ligação de natureza tridentada com os dois átomos de níquel centrais e com o oxigênio da ponte de carbamato que une esses dois metais (MANUNZA *et al.*, 1999).

Em geral, os inibidores de urease possuem grupos de átomos em sua estrutura capazes de realizarem ligações de hidrogênio, grupos capazes de complexarem com os átomos de níquel, estrutura flexível, além de sistemas trigonais semelhantes aos da ureia e tioureia (Figura 2, pág. 5) (KAFARSKI; TALMA, 2018; MODOLO *et al.*, 2015, 2016). Várias classes de compostos já foram identificadas como potenciais inibidores de urease a citar: flavonóides, quinolonas, benzimidazóis oxazóis, benzoiltiuréias, derivados da cumarina, tiazolidinas-4-carboxilato, organofosforados e diidropirimidinonas (Figura 2, pág.5) (ARTOLA *et al.*,

2011; KAFARSKI; TALMA, 2018; MODOLO *et al.*, 2015, 2016; RASHID *et al.*, 2013; TAMADDON; GHAZI, 2015).

Figura 2: Núcleos básicos presentes em reconhecidos inibidores de urease.



FONTE: Elaborado pela autora, 2019.

Neste contexto, estratégias baseadas na inibição da urease são consideradas promissoras e poderiam contornar problemas relacionados à saúde, ao meio ambiente, além de contribuir nas culturas de interesse agrícolas dependentes de fertilizantes nitrogenados (RUTHROF *et al.*, 2018). Além disso, conhecer as interações entre os inibidores e a urease é importante para a compreensão dos mecanismos de inibição e para o desenvolvimento de novos e mais potentes inibidores.

Almeja-se que os potenciais novos inibidores de urease sejam obtidos por meio de uma síntese simples, rápida, de baixo custo e que gere poucos resíduos. As dihidropirimidinonas, como mencionado, são inibidoras de urease e são obtidas em apenas uma etapa, geralmente *via* reação de Biginelli catalisada por ácido. Os mecanismos de interação entre a enzima e essa classe de substâncias ainda não estão esclarecidos na literatura.

Este trabalho propõe avaliar o emprego do fosfato de nióbio (**NbOPO₄**) e do cloridrato de 1-butimidazolio-3-(*n*-butilsulfônico) (**[BIMBS][Cl]**) na catálise da reação de Biginelli. Dessa forma, será possível sintetizar e caracterizar diferentes adutos de Biginelli que serão

investigados, por meio de métodos espectroscópicos e colorimétrico, em relação a interação molecular com a enzima urease durante o processo de inibição.

1.2 – Objetivo geral

Avaliar o emprego do fosfato de nióbio e do líquido iônico [BIMBS][Cl] como catalisadores na síntese de adutos de Biginelli (**AB**) e investigar o mecanismo de inibição da enzima urease pelos adutos de Biginelli *in vitro*, utilizando-se métodos de colorimetria e de fluorescência.

CAPÍTULO II – O fosfato de nióbio: Relevância econômica e desempenho como catalisador em síntese orgânica

2.1 – O nióbio

A descoberta do nióbio foi reportada, inicialmente, pelo químico inglês Charles Hatchett (1765-1847) que o denominou colômbio em homenagem ao descobridor das Américas (GRIFFITH; MORRIS, 2003). Houve, entretanto, algumas divergências sobre esse elemento. Em 1802, o químico Anders Gustaf Ekeberg (1767-1813) reportou o novo elemento tântalo e sete anos mais tarde, William Hyde Wollaston (1766-1828) anunciou, erroneamente, que os elementos tântalo e colômbio eram idênticos (ALVES; COUTINHO, 2015; GRIFFITH; MORRIS, 2003). Em 1844, Heinrich Rose (1795-1864) relatou a descoberta de dois elementos: o nióbio e o pelopium. Contudo, Jean-Charles de Marignac (1817-1894) provou que colômbio, nióbio e pelopium eram o mesmo elemento, acrescentou ainda que o tântalo era um elemento diferente, embora encontrado associado ao nióbio na natureza (GRIFFITH; MORRIS, 2003). A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), 149 anos mais tarde, adotou o nome nióbio como o nome oficial para o elemento descoberto por Hatchett (ALVES; COUTINHO, 2015; GRIFFITH; MORRIS, 2003; LOPES *et al.*, 2014).

Como já relatado por Jean-Charles de Marignac, o nióbio não é encontrado no estado livre na natureza, o mineral contendo nióbio é associado com o tântalo $(\text{Fe,Mn})(\text{Nb,Ta})_2\text{O}_6$ e dependendo do metal que predomina, Nb ou Ta, é chamado de columbita ou tantalita, respectivamente (NOWAK; ZIOLEK, 1999).

O Brasil possui as maiores reservas de minas produtoras de nióbio (98% das reservas mundiais) seguido do Canadá (~2%) (Tabela 1, pág. 8) (JÚNIOR, 2016). Os estados brasileiros com maiores capacidades de produção de nióbio são Minas Gerais, que produz cerca de 6 Mt/ano, e Goiás, que produz cerca de 3,9 Mt/ano, com teores de 0,40% e 2,15% de nióbio, respectivamente (JÚNIOR, 2016).

Tabela 1: Localização de minas e reservas de nióbio no mundo

Países	Reservas 2015 (t)
Brasil	10391845
Canadá	200000
Outros países	Nd

^a Estimado. Nd = não disponível.

FONTE: Adaptado de JÚNIOR, 2016.

A reserva de nióbio em Araxá (MG) foi descoberta por Djalma Guimarães após 152 anos da descoberta do elemento. Em 1953, a liga ferro nióbio foi comercializada pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) como o primeiro produto contendo nióbio. A produção de nióbio pela CBMM cresceu consideravelmente de 4800 toneladas em 1979, a 150000 toneladas em 2010 (CBMM, 2019).

O Brasil produziu 80465 toneladas de nióbio em 2015. Nesse mesmo ano, foi constatado um consumo aparente no país de apenas 6615 toneladas de nióbio (JÚNIOR, 2016). Nota-se então que a indústria brasileira não consegue consumir e valorar a maior parte do nióbio produzido e acaba exportando matéria prima e importando produto contendo nióbio com altos valores associados. Uma estratégia potencialmente lucrativa seria agregar valor aos derivados do nióbio com tecnologia brasileira.

O histórico do nióbio na indústria começa em 1933, quando foi aplicado para estabilizar o aço inoxidável da corrosão granular; em 1960, o nióbio foi utilizado para aumentar a resistência mecânica do aço e, em 1970, na produção de super ligas (CBMM, 2019).

Os compostos derivados de nióbio são de grande interesse na produção de materiais tecnológicos: são utilizados na indústria eletrônica como capacitores, magnetos de alta potência, em ferramentas de corte, em sistemas de fuselagem em programas espaciais, em geradores harmônicos, e em implantes ósseos e sutura interna dada a inércia aos fluidos corporais (Tabela 2, pág. 9) (ALVES; COUTINHO, 2015; NOWAK; ZIOLEK, 1999).

Tabela 2: Aplicação tecnológica dos compostos de nióbio

Espécies de nióbio	Propriedades	Aplicações
Óxidos	Alto índice de refração, constante dielétrica, aumento na transmitância de luz.	Lentes de câmeras, revestimento em vidros para tela de computadores.
Carbetos	Alta temperatura de deformação.	Ferramentas de corte.
Nb pó	Alta constante dielétrica, estabilidade de óxidos dielétricos.	Capacitores de circuitos eletrônicos.
Nb metal	Resistência a corrosão.	Equipamentos para processamentos químicos.
FeNb	Aumento na força e dureza devido ao refino de grãos.	O aditivo aumenta a força de ligas de baixa resistência.
Ligas com titânio e estanho	Baixa resistência elétrica, em ligas de arame, em baixas temperaturas.	Bobinas magnéticas supercondutoras.

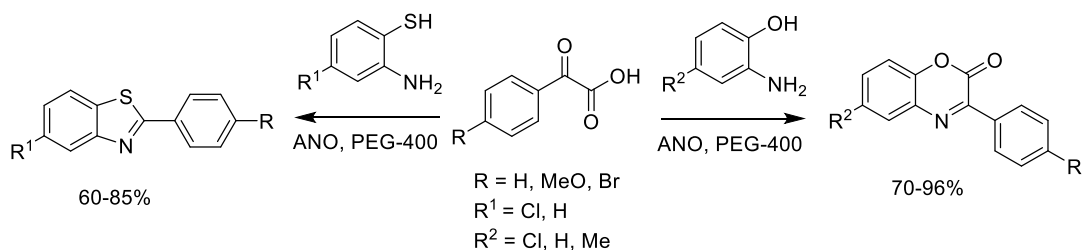
FONTE: adaptado de ALVES; COUTINHO, 2015.

Na década de 1990 foi crescente o interesse no uso de nióbio como catalisador e foram promovidos congressos científicos focados no desenvolvimento e aplicação desse material (NOWAK; ZIOLEK, 1999). A natureza química do nióbio utilizado em catálise é descrita, de maneira geral, como: carbetos de nióbio, sulfetos de nióbio, óxidos de nióbio, cloretos de nióbio, fosfatos de nióbio, nitratos e oxonitritos de nióbio (ANDRADE; AZEVEDO, 2001; REGUERA *et al.*, 2018; TANABE, KOZO, 2003; ANDRADE, 2004; ZIOLEK, 2003).

De um modo geral, Tanabe definiu que o nióbio pode atuar como: i) promotor de uma reação; ii) suporte para catalisadores; iii) um sólido ácido; iv) auxiliador redox com propriedades fotossintéticas (TANABE, K.; OKAZAKI, 1995; TANABE, KOZO, 1990, 2003). Com base nessas definições, segue abaixo uma lista contendo exemplos de cada uma delas:

- i) O efeito promotor do nióbio: a adição de nióbio em reconhecidos catalisadores pode aumentar a estabilidade dos mesmos à temperatura e a efeitos mecânicos, bem como, realçar a atividade catalítica (TANABE, K.; OKAZAKI, 1995; TANABE, KOZO, 1990, 2003; ZIOLEK; SOBCZAK, 2017). Um exemplo desse efeito foi observado por Burch e Swarnakar (1991) na desidrogenação oxidativa de etanos utilizando o catalisador $\text{MoO}_3\text{-V}_2\text{O}_5$ (razão atômica = 6:3) a 390 °C (BURCH; SWARNAKAR, 1991). A seletividade na obtenção de etenos que era de 61% com o $\text{MoO}_3\text{-V}_2\text{O}_5$, após o uso de nióbio $\text{MoO}_3\text{-V}_2\text{O}_5\text{-Nb}_2\text{O}_5$ (razão atômica = 6:3:1) foi observado um aumento de 20% nessa seletividade (BURCH; SWARNAKAR, 1991; TANABE, KOZO, 2003).
- ii) O efeito suporte: o uso de catalisadores em suportes contendo nióbio mostra-se mais eficiente que o uso de suportes convencionais como, por exemplo, o Al_2O_3 (TANABE, K.; OKAZAKI, 1995; TANABE, KOZO, 1990, 2003). Um exemplo desse efeito foi observado por Cherian e colaboradores (2003) que apresentaram a desidrogenação oxidativa do propano usando catalisador de óxido de cromo suportado em óxido de nióbio $\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{Nb}_2\text{O}_5$. A seletividade para a obtenção do propeno foi maior utilizando o suporte de óxido de nióbio (82-85%) quando comparada aos suportes de óxido de alumínio ou de óxido de titânio ($\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ (63-72%) e $\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ (59-73%), respectivamente) (CHERIAN *et al.*, 2002; CHERIAN; RAO; DEO, 2003)
- iii) A característica de sólido ácido: a maioria dos metais perdem a acidez quando absorvem água, o nióbio entretanto, aumenta a acidez com a absorção de água, além de ser bastante resistente a variações da temperatura (TANABE, K.; OKAZAKI, 1995; TANABE, KOZO, 1990, 2003). Em 2012, Penteado verificou que o uso de oxalato de niobato de amônio (ANO) - $\text{NH}_4[\text{NbO}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_x]\cdot n\text{H}_2\text{O}$ - foi eficiente para a catálise entre anilinas *orto* funcionalizadas e ácido 2-oxo-2-fenilacético fornecendo rendimentos entre 60-85% para os derivados de benzotiazóis e 70-96% para os derivados da benzoxazinonas (Figura 3 pág. 11) (PENTEADO *et al.*, 2016).

Figura 3: Esquema de síntese de Benzotiazóis utilizando um derivado de nióbio como catalisador.

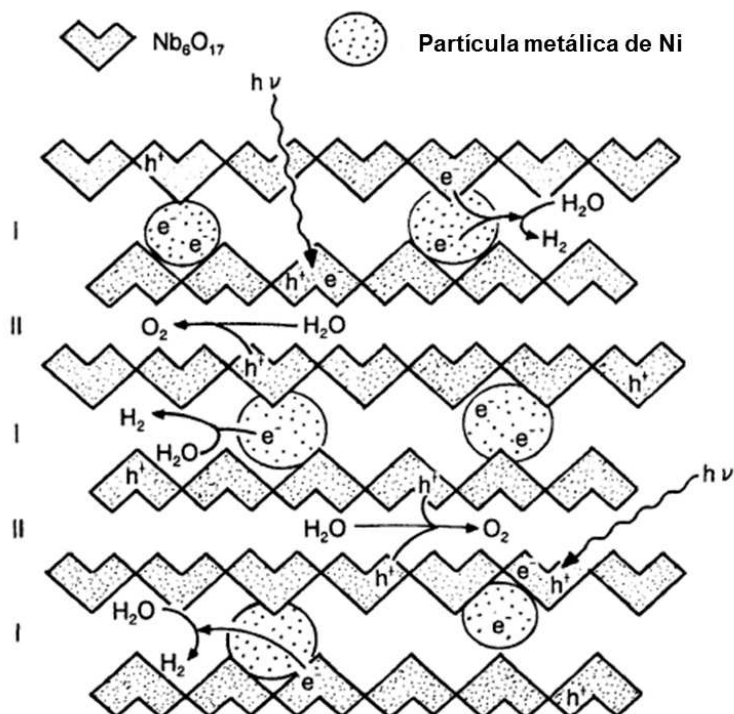


FONTE: Adaptado de PENTEADO *et al.*, 2016.

- iv) As propriedades redox e fotossensíveis: são observadas quando o nióbio é misturado a outros óxidos (TANABE, K.; OKAZAKI, 1995). Em 1990, Domen e colaboradores reportaram um material contendo camadas de niobato de potássio intercaladas com partículas de níquel metálico (NiK₄Nb₆O₁₇), esse material é capaz de decompor a água em H₂ e O₂ quando submetido a irradiação UV (DOMEN *et al.*, 1990). O mecanismo sugerido pelos autores é que o H₂ e o O₂ seriam produzidos em diferentes camadas. Ao ser submetido à luz, a camada de nióbio apresenta um elétron excitado que pode ser deslocado até o metal de níquel e, assim, catalisar a formação de H₂. Já na camada inferior, a vacância do niobato de potássio receberá o elétron da água para a formação do oxigênio, essa proposta de mecanismo está ilustrada na Figura 4 (pág. 12).

Portanto, os derivados de nióbio apresentam várias características desejáveis para o estudo da catálise. Neste trabalho o fosfato de nióbio foi escolhido como objeto de estudo, pois apresenta características vantajosas como: baixo custo, estabilidade térmica, tolerância a meios aquosos e pode ter a acidez modulada por tratamento térmico. Além disso, não há estudos da aplicação de fosfato de nióbio como catalisador em reações multicomponentes.

Figura 4: Proposta de Domen para o mecanismo de decomposição da água por luz usando $\text{NiK}_4\text{Nb}_6\text{O}_{17}$.

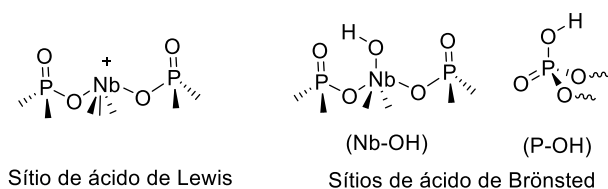


FONTE: adaptado de DOMEN *et al.*, 1990.

2.2 – O fosfato de nióbio

O fosfato de nióbio é sintetizado com a adição de ácido fosfórico a uma solução contendo íons de nióbio pentavalente (OKAZAKI; WADA, 1993). O fosfato de nióbio pode apresentar-se amorfo ou constituído por octaedros distorcidos de NbO_6 conectados por tetraedros de PO_4 (ZIOLEK, 2003). Apresentam tanto sítios ácidos de Lewis caracterizados por Nb^{5+} insaturados, como sítios ácidos de Brønsted caracterizados pelos grupos terminais P-OH e o Nb-OH (Figura 5 – pág. 13) (ARMAROLI *et al.*, 2000). O grupo P-OH é um ácido de Brønsted mais forte que o Nb-OH e, portanto, o NbOPO_4 tem características ligeiramente mais ácidas que o óxido de nióbio (NbO_5).

Figura 5: Sítios de Brønsted e Lewis propostos por Pholjaroen para o fosfato de nióbio.



FONTE: adaptada de PHOLJAROEN *et al.*, 2013.

O fosfato de nióbio e o óxido de nióbio possuem textura, acidez e propriedades catalíticas similares, contudo o fosfato de nióbio tem a vantagem de conservar essas propriedades mesmo em temperaturas elevadas ($> 427\text{ }^{\circ}\text{C} - 700\text{ K}$) (NOWAK; ZIOLEK, 1999).

Os relatos sobre o uso de fosfato de nióbio iniciaram-se na década de 1950, mas o número de publicações começou a crescer na década de 1990 com cerca de 45 artigos publicados por ano sobre esse assunto para 96 artigos sobre essa substância em 2018 (*Sci-finder* – palavra chave “*niobium phosphate*” - 12-01-2019).

Em 1999, da Silva e colaboradores avaliaram o uso de fosfato de nióbio amorfo e calcinado a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ no craqueamento do cumeno, convertidos com seletividade para o benzeno e o α -metilestireno a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DA SILVA; FOLGUERAS-DOMENGUEZ; DOS SANTOS, 1999).

O uso de fosfato de nióbio calcinado a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, como catalisador, foi avaliado nas benzilações aromáticas entre tolueno, etilbenzeno ou propilbenzeno com álcool benzílico, na proporção de (15/1) por De La Cruz e colaboradores. Eles utilizaram um grama de catalisador, temperatura de refluxo da mistura de reação por um período entre 150 a 300 min resultando em substâncias mono-alquiladas como produtos principais (DE LA CRUZ; DA SILVA; LACHTER, 2003). Mais tarde, a reação de Friedel-Crafts, entre anisol e álcoois benzílicos, foi largamente estudada empregando o fosfato de nióbio (Tabela 3, pág. 14) (DE LACRUZ; DA SILVA; LACHTER, 2006; ROCHA *et al.*, 2008). Em 2006, De La Cruz e colaboradores avaliaram o uso de fosfato de nióbio na conversão do anisol empregando álcool benzílico e o 1-feniletanol (DE LACRUZ; DA SILVA; LACHTER, 2006). Dois anos mais tarde, Rocha e colaboradores utilizaram o fosfato de nióbio mesoporoso e álcool benzílico como substrato (ROCHA *et al.*, 2008). Já em 2010, Pereira mostrou que usando o fosfato de nióbio (250 mg) como promotor da alquilação do anisol com o 1-octen-3-ol (razão 10/1) foram obtidos majoritariamente produtos monoalquilados na posição 1 e os produtos formados foram

lineares (PEREIRA; DE LA CRUZ; LACHTER, 2010). Os estudos de alquilação citados apresentaram elevada seletividade para produtos mono-alquilados, dessa maneira o fosfato de nióbio pode ser considerado um catalisador alternativo na reação de Friedel-Crafts, evitando o uso de $AlCl_3$, $FeCl_3$, HF e H_2SO_4 .

Tabela 3: Relação dos produtos obtidos na benzilação do anisol empregando fosfato de nióbio

Compostos	Alquilado			Éter (%)
	<i>orto</i> (%)	<i>para</i> (%)	dialquilado (%)	
Álcool benzílico ^a	34,3	53,1	7,4	5,2
Álcool benzílico ^b	43,0	48,9	5,7	2,4
1-Feniletanol ^c	21,5	74,4	1,0	3.1

Proporção anisol/álcool (15/1) a) fosfato de nióbio 125 mg, calcinado 200 °C, 10 min; b) fosfato de nióbio microporoso (60 mg) calcinado a 400 °C, 45 min, 150 °C; c) fosfato de nióbio 125 mg, calcinado 200 °C, 360 min.

FONTE: adaptado de DE LA CRUZ; DA SILVA; LACHTER, 2006; ROCHA *et al.*, 2008.

Resultados bastante interessantes na catálise da desidratação de sacarídeos e polissacarídeos em derivados do furfural foram obtidos com o uso de fosfato de nióbio (GÓMEZ BERNAL; BERNAZZANI; RASPOLLI GALLETTI, 2014; PHOLJAROEN *et al.*, 2013). Um exemplo foi reportado por Pholjaroen e colaboradores que descreveram a catálise da desidratação da xilose na escala de gramas (2 g) utilizando solvente bifásico água/tolueno (18/30 mL) e catálise por fosfato de nióbio (0,14 g - calcinado a 300 °C). A reação de desidratação se processou durante 1 hora a 160 °C, com uma conversão de 51% sendo o furfural obtido com 43% de rendimento. O catalisador foi reutilizado por 6 ciclos sem mudanças perceptíveis na atividade catalítica (PHOLJAROEN *et al.*, 2013). Bernal e colaboradores, em 2014, também relataram exemplos da desidratação dos sacarídeos catalisada por fosfato de nióbio quando descreveram a obtenção de 23% de furfural em uma reação assistida por micro-ondas em duas etapas partindo da palha de milho (GÓMEZ BERNAL; BERNAZZANI; RASPOLLI GALLETTI, 2014). Na primeira etapa da reação foi realizado um aquecimento hidrotermicamente fracionado e foram obtidos açúcares de hemicelulose solúveis e um resíduo sólido (celulose e lignina). A hemicelulose foi hidrolisada com a catálise por fosfato de nióbio a 170 °C durante 30 min, exemplificando assim, a aplicação do fosfato de nióbio como catalisador seguindo os princípios da química verde (MACHADO, 2012).

O uso do fosfato de nióbio para a esterificação do ácido dodecanóico com butanol também se mostrou bastante promissor como foi reportado por Bassan e colaboradores, em 2013, quando obtiveram à pressão ambiente e temperatura de refluxo uma conversão de 97% do ácido dodecanóico com reuso do catalisador por, pelo menos, 3 ciclos (BASSAN *et al.*, 2013). Outro uso interessante do fosfato de nióbio na química de combustíveis foi descrito por Scaldaferrri e colaboradores na produção de combustível do tipo “*drop-in*” partindo do óleo de soja (SCALDAFERRI; PASA, 2019). Scaldaferrri utilizou fosfato de nióbio calcinado a 200 °C com o óleo de soja e obteve uma solução contendo 62% de combustível do tipo *biojet*, 40% do tipo *diesel* verde e 18% do tipo gasolina. Essa abordagem é bastante interessante, pois aplica o ciclo do carbono sem a necessidade do uso de combustíveis a base de petróleo.

Em 2017, Jin e colaboradores descreveram a síntese catalisada por fosfato de nióbio de quinolinas baseadas na reação de Skraup em tolueno empregando solketal e aminas substituídas (JIN *et al.*, 2017). As condições de reação foram: 250 °C, 10 Mpa em reator de fluxo contínuo. Obteve-se quinolinas com 60% de rendimento, sem o uso de ácido nítrico, com um núcleo heterocíclico de grande interesse farmacológico (JIN *et al.*, 2017).

O fosfato de nióbio apresenta grande potencial na catálise ácida orgânica, visto que é de fácil manipulação, estável à água e, além disso, pode ter as características de ácidos de Brønsted e Lewis modulada pela temperatura de calcinação. Portanto, este capítulo visa à caracterização desse composto para posterior avaliação de suas propriedades catalíticas na reação de Biginelli descrita no capítulo IV.

2.2 – Objetivos

Avaliar o **NbOPO₄**, cedido ao Grupo de Estudos de Química Orgânica e Biológica (GEQOB) pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM).

Objetivos específicos:

- Calcinar o **NbOPO₄** a 400, 500 e 700 °C.
- Identificar qualitativamente os sítios ácidos de Brønsted e de Lewis;
- Verificar o comportamento térmico das amostras por técnica termogravimétrica;
- Quantificar os sítios ácidos totais por titulação;

- Avaliar as características estruturais por difratometria de raios-X.

2.3 – Resultados e Discussão

O material fornecido pela CBMM foi calcinado nas temperaturas de 400, 500 e 700 °C durante 4 horas. O processo de calcinação é considerado uma etapa de purificação de possíveis contaminantes orgânicos da amostra, bem como uma preparação e seleção dos sítios ácidos de Brønsted e de Lewis (DING *et al.*, 2014).

As temperaturas de 400, 500 e 700 °C foram selecionadas após a observação de relatos na literatura que descreviam que o **NbOPO₄** ao ser tratado nessas faixas de temperaturas apresentava tanto sítios ácidos de Brønsted quanto sítios ácidos de Lewis (DA SILVA; FOLGUERAS-DOMENGUEZ; DOS SANTOS, 1999; DING *et al.*, 2014; PEREIRA; DE LA CRUZ; LACHTER, 2010). Essas amostras apresentaram ainda, atividade catalítica em várias reações incluindo o craqueamento de cumeno, alquilação do anisol e fenol, esterificação de ácidos, conversão de sacarídeos em derivados do furfural, na produção de combustíveis e reação de Skraup para obtenção de quinolinas (DA SILVA; FOLGUERAS-DOMENGUEZ; DOS SANTOS, 1999; DING *et al.*, 2014; PEREIRA; DE LA CRUZ; LACHTER, 2010; PHOLJAROEN *et al.*, 2013).

A caracterização dos sítios de Lewis e de Brønsted foi realizada empregando o método de absorção de piridina na região do infravermelho (LEBARBIER; HOUALLA; ONFROY, 2012; SELLI; FORNI, 1999). A piridina tem a capacidade de se coordenar tanto em sítios ácidos de Lewis como em sítios ácidos de Brønsted. Cada uma dessas coordenações podem ser caracterizadas pela técnica de infravermelho, pois os sinais característicos dos estiramentos das ligações dessas substâncias ocorrem em comprimentos de ondas distintos sendo, então, possível as caracterizações dos sítios ácidos. Quando a piridina está coordenada aos sítios ácidos de Brønsted é observada uma banda em 1540 cm⁻¹, enquanto que quando a piridina está coordenada a sítios ácidos de Lewis é observada uma banda em 1445 cm⁻¹ (LEBARBIER; HOUALLA; ONFROY, 2012; SELLI; FORNI, 1999). A banda em 1488 cm⁻¹ é comum para a piridina coordenada em ambos sítios ácidos, não contribuindo com a análise (LEBARBIER; HOUALLA; ONFROY, 2012; SELLI; FORNI, 1999).

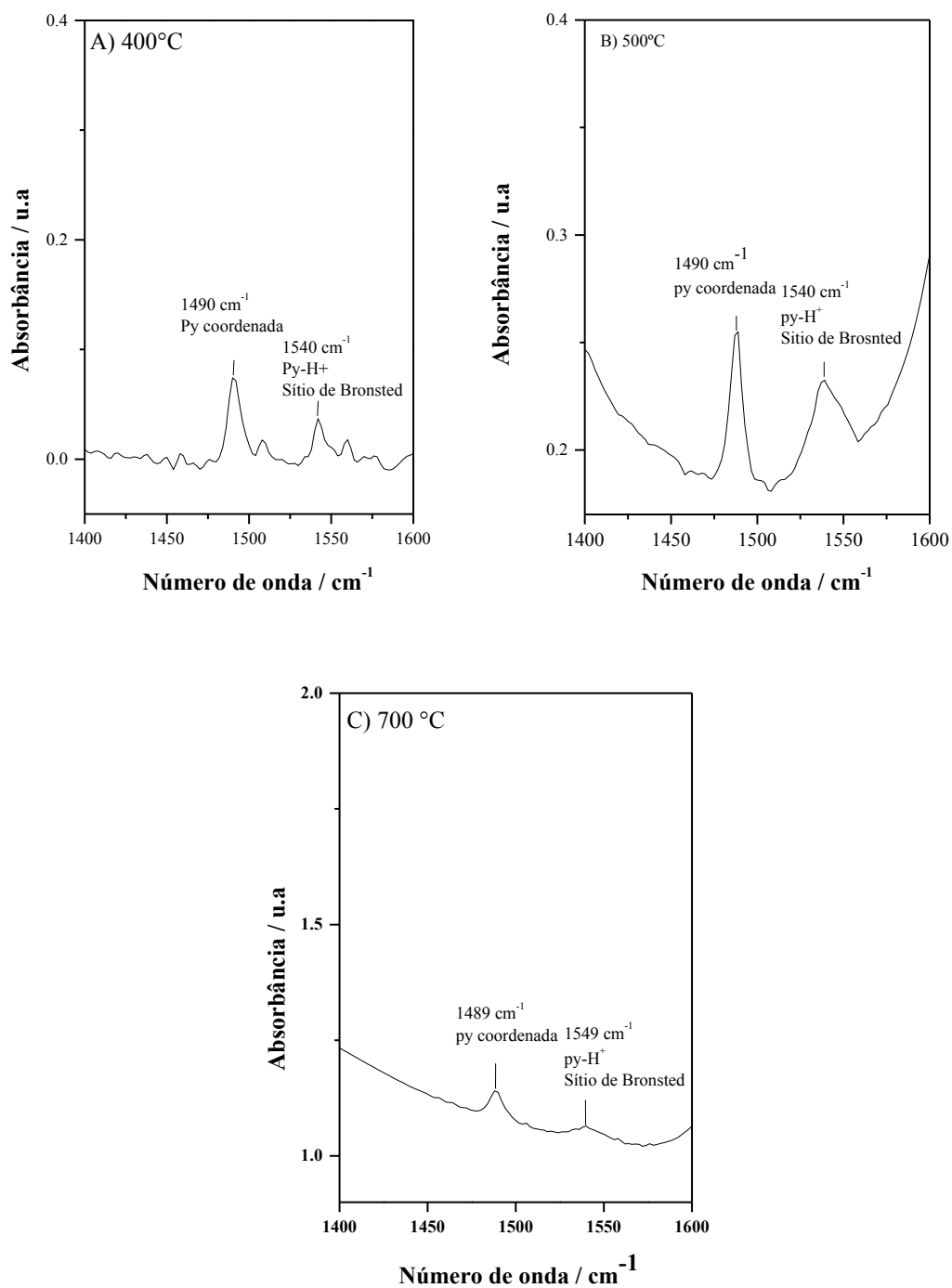
As amostras de NbOPO_4 calcinadas tanto a 400, 500 e 700 °C não apresentaram diferenças qualitativas quanto ao perfil de seus sítios ácidos (Figura 6 – A, B e C respectivamente, pág. 18). Em todas as três amostras foram observadas apenas bandas em 1490 e 1540 cm^{-1} atribuídas à piridina coordenada e à presença de sítios ácidos de Brønsted, respectivamente. Esse resultado foi diferente do esperado pois na literatura a partir de 400 °C já é observada a presença de sítios ácidos de Lewis (DA SILVA; FOLGUERAS-DOMENGUEZ; DOS SANTOS, 1999; DING *et al.*, 2014; PEREIRA; DE LA CRUZ; LACHTER, 2010; PHOLJAROEN *et al.*, 2013). Portanto, esse experimento mostra que a exposição dos sítios de Lewis não ocorrem em temperaturas inferiores a 700 °C.

As amostras de **NbOPO_4 (400)**, **NbOPO_4 (500)**, **NbOPO_4 (700)** e **NbOPO_4 (não calcinado)** foram submetidas a análises termogravimétricas. Na curva termogravimétrica (TG) do **NbOPO_4 (não calcinado)** (Figura 7, A, pág. 19) ocorre um evento endotérmico a 50°C seguido de um evento exotérmico contínuo até o final da análise que sugere a saída da água de hidratação e de possíveis contaminantes orgânicos presentes na amostra sem tratamento que podem ser atribuídos à perda de massa total observada de 22,4%.

Na curva TG do **NbOPO_4 (400)** (Figura 7, B, pág. 19), foi observado um evento endotérmico a 50 °C seguido de um evento exotérmico contínuo até o final da análise com uma perda de massa total de 9,15%. Essa perda de massa equivale a menos da metade da perda de massa observada na amostra não calcinada o que sugere parte dos contaminantes orgânicos foram retirados no processo de calcinação e o valor observado pode ser atribuído a saída de material orgânico e da água de hidratação adsorvida após o processo de calcinação.

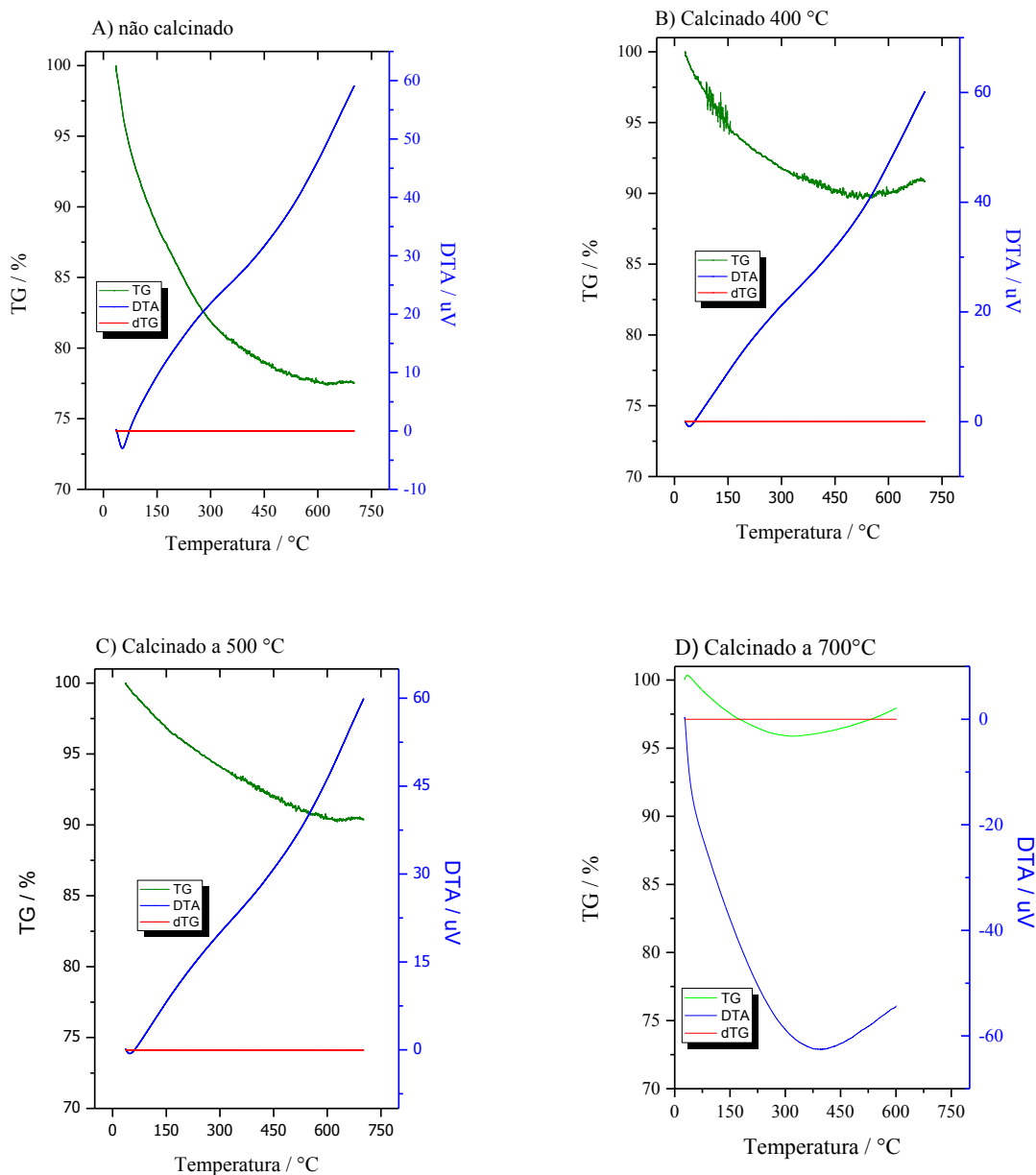
Na curva TG do **NbOPO_4 (500)** (Figura 7, C, pág. 19), houve uma perda de massa de 9,6%, um valor bem próximo ao observado para a amostra de **NbOPO_4 (400)**, que indica que a calcinação também foi eficiente para a retirada de grande parte dos materiais orgânicos e o evento endotérmico observado pela curva DTA pode ser também atribuído à saída da água de hidratação adsorvida após o processo de calcinação. Esses dados estão coerentes com o observado por Martins, em 1989, que obteve uma perda de 4,7% em massa, por um evento endotérmico a 90 °C, de uma amostra de **NbOPO_4** calcinada a 500 °C. O autor atribuiu essa massa à água de hidratação (MARTINS; SCHITINE; CASTRO, 1989)

Figura 6: Espectros na região do infravermelho das amostras de **NbOPO₄**, após o tratamento com piridina e identificação qualitativa dos sítios ácidos, calcinadas a: A) 400 °C, B) 500 °C e C) 700 °C.



FONTE: elaborado pela autora.

Figura 7: Curvas TG/dTG e DTA do NbOPO_4 (não calcinado), NbOPO_4 (400), NbOPO_4 (500) e NbOPO_4 (700), em atmosfera de N_2 , com uma razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.



FONTE: elaborado pela autora.

Pela curva TG do NbOPO_4 (700) (Figura 7, D, pág. 19), verificou-se que a calcinação foi eficiente para a retirada dos contaminantes orgânicos e que houve uma perda de 4,2%, bem inferior as observadas para as outras amostras, pela DTA percebe-se que a perda se iniciou em $90\text{ }^\circ\text{C}$ e foi até $400\text{ }^\circ\text{C}$ caracterizada por um evento endotérmico mostrando a eficiência

na eliminação completa de materiais orgânicos. Antunes e colaboradores relataram que perda de massa acima da temperatura de 332 °C, em um fenômeno endotérmico, caracteriza a saída da água mais fortemente ligada à estrutura do fosfato de nióbio, representando aquelas moléculas de água que interagem por ligação de hidrogênio cujo oxigênio pertence ao poliedro de coordenação do átomo de nióbio (ANTUNES; FOLGUERAS-DOMINGUEZ; MOURA, 1993). O resultado obtido para a amostra calcinada a 700 °C está de acordo com o previamente descrito por Antunes e colaboradores (1993).

A quantificação dos sítios ácidos totais das amostras de **NbOPO₄** foi realizada por uma titulação inversa. As amostras calcinadas a 400, 500 e 700 °C foram tratadas com excesso de NaOH e posteriormente o excesso de base foi titulado com uma solução de biftalato de potássio. Como se sabe a quantidade de base adicionada à amostra (n NaOH_i) e de base remanescente no meio de reação (n NaOH_r) foi determinado o número de sítios ácidos de Brønsted. Os resultados obtidos a partir da titulação inversa de **NbOPO₄ (400)**, **NbOPO₄ (500)** e **NbOPO₄ (700)** são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Acidez total das amostras de nióbio calcinadas a 400, 500 e a 700 °C.

Amostras	Acidez total (n sítio ácido/g de catalisador)
NbOPO ₄ (400)	0,0100 ± 0,0010
NbOPO ₄ (500)	0,0120 ± 0,0020
NbOPO ₄ (700)	0,0104 ± 0,0007

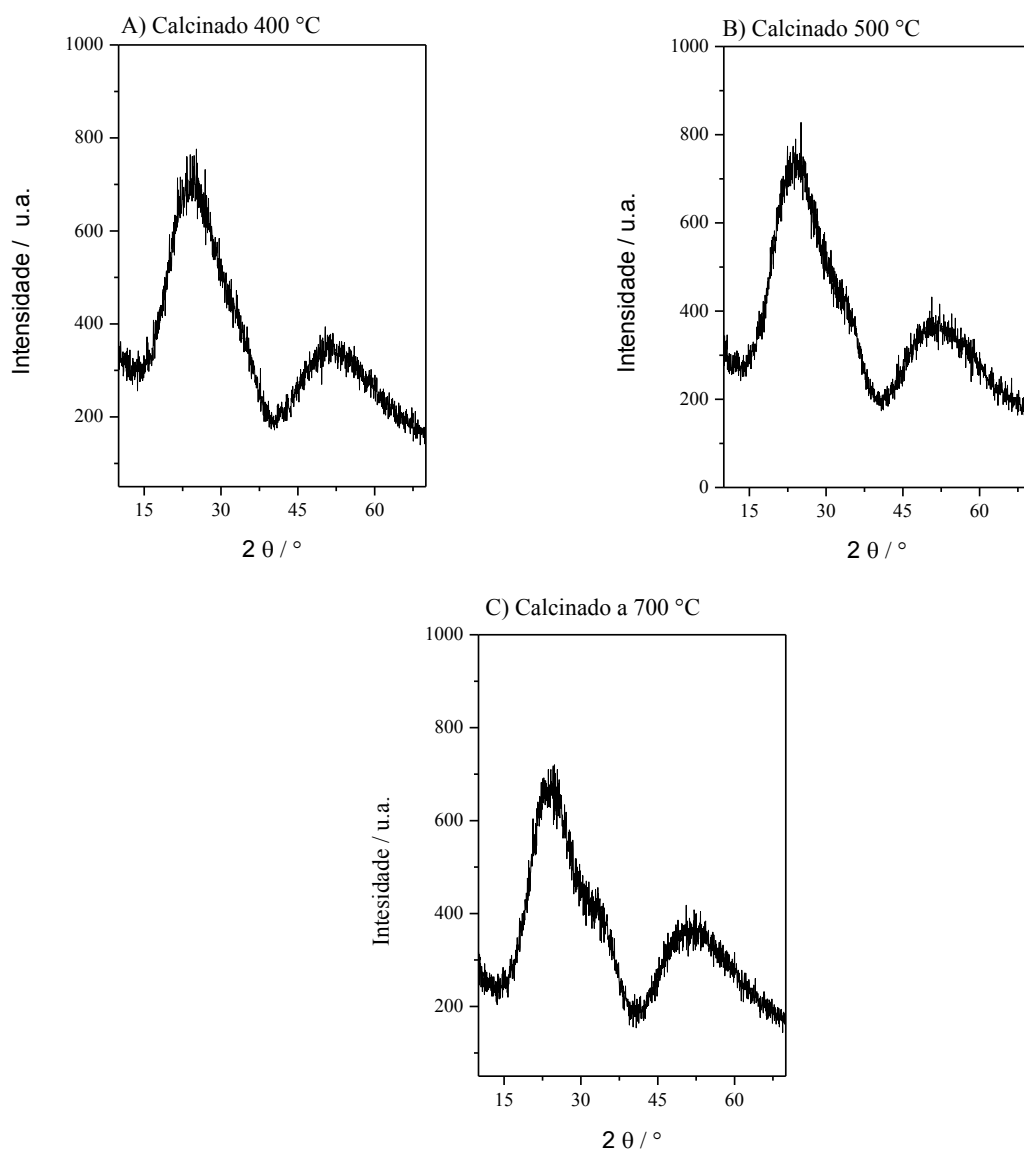
FONTE: elaborado pela autora.

O processo de calcinação não interferiu significativamente na acidez do nióbio. Em todas as amostras avaliadas, o perfil de acidez foi bastante similar. Este resultado é coerente com dados já descritos na literatura por Martins e colaboradores que demonstraram que o **NbOPO₄** é bastante estável termicamente (MARTINS; SCHITINE; CASTRO, 1989).

Após a caracterização das propriedades químicas das amostras de **NbOPO₄** iniciou-se a investigação quanto à morfologia da amostra. Tais informações foram obtidas com a técnica de difração de raios-X, que é capaz de fornecer informações sobre o tipo de estrutura

cristalina de materiais e estimar seu parâmetro de rede. Uma substância de fase cristalina pode ser definida como aquela que possui um arranjo atômico bem definido com estrutura repetitiva que se estende por muitas distâncias atômicas (ANTUNES; FOLGUERAS-DOMINGUEZ; MOURA, 1993). Analisando os padrões de raios-X obtidos para as amostras de **NbOPO₄**, percebe-se que todas exibiram um largo pico apresentando 2θ por volta de 25° e 55° . Esse comportamento sugere que as amostras são de estrutura amorfa, pois não apresentaram regularidade interna de cristalização (Figura 8).

Figura 8: Padrões de difração de raios-X dos **NbOPO₄** calcinados: A) 400°C , B) 500°C e C) 700°C



FONTE: elaborado pela autora.

Resultado coerente com os obtidos por Sun e colaboradores, que calcinaram amostra de **NbOPO₄** a 400 °C e obtiveram resultados de difração de raios-X similares (SUN, QING *et al.*, 2007). Foi relatado por Okazaki, 1993, que acima da temperatura de 800 °C o **NbOPO₄** pode apresentar cristalinidade em sua estrutura (OKAZAKI; WADA, 1993). Portanto, nas temperaturas de calcinação avaliadas, nesse trabalho, é coerente que todas as amostras possuam estruturas amorfas. Descrições de **NbOPO₄** com características cristalinas foram relatadas para amostras calcinadas nas temperaturas de 1000 e 1100 °C apresentando por difração de raios-X padrões de cristalização do tipo α - **NbOPO₄** e β - **NbOPO₄**, respectivamente (DA SILVA; FOLGUERAS-DOMENGUEZ; DOS SANTOS, 1999; MARTINS; SCHITINE; CASTRO, 1989).

2.4 – Conclusões

A calcinação nas temperaturas de 400, 500 e 700 °C não influenciou na acidez, nem nas características estruturais amorfas das substâncias, evidenciando a estabilidade térmica do **NbOPO₄**. Contudo, os tratamentos térmicos foram eficientes para a eliminação de voláteis das amostras. Nenhuma das amostras apresentaram sítios ácido de Lewis, sugerindo que para a exposição deles são necessárias temperaturas mais elevadas. Todas as amostras apresentaram concentração de 0,01 mol de sítios ácidos g⁻¹.

CAPÍTULO III – Uso de líquidos iônicos com função ácida em catálise orgânica

3.1 - Líquidos iônicos em catálise

Os líquidos iônicos são espécies formadas por cátions e ânions que possuem ponto de fusão em temperaturas inferiores a 100 °C (ADAMS; DYSON; TAVENER, 2003). O primeiro líquido iônico reportado foi o citrato de picolina por Ramsay em 1876 (RAMSAY, 1876). O autor não concordava com a estrutura química da picolina e, portanto, descreveu inúmeros derivados da picolina. Dentre eles, o tratado com ácido cítrico formou um xarope impossível de recrystalizar à temperatura ambiente e, portanto, não despertou o interesse de Ramsay (RAMSAY, 1876). Foi apenas em 1914, que Walden descreveu a preparação do nitrato de etilamônio e então despertou o interesse da comunidade científica sobre os líquidos iônicos (HAWKER; HARPER, 2018; WALDEN, 1914).

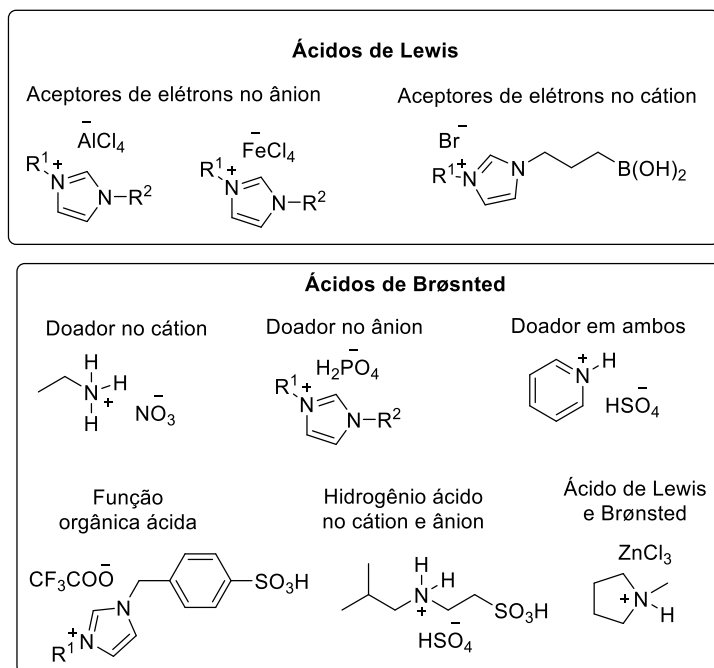
Os primeiros líquidos iônicos eram derivados de ácidos de Lewis tetracloroaluminatos e, portanto, instáveis em água (HAWKER; HARPER, 2018). Até o final dos anos 1990, os relatos sobre a utilização dos líquidos iônicos eram majoritariamente como solvente em reações orgânicas (ADAMS; DYSON; TAVENER, 2003; HAWKER; HARPER, 2018).

Como solvente, os líquidos iônicos são bastante vantajosos, pois apresentam baixa pressão de vapor, não são inflamáveis e podem ser reciclados (VEKARIYA, 2017). O efeito de solventes em reações é bastante estudado, contudo, ainda existem lacunas em como os líquidos iônicos atuam. Já se sabe que os líquidos iônicos são capazes de estabilizar cargas e então podem acelerar reações estabilizando o estado de transição, alguns possuem em sua estrutura funções que são capazes de estabelecer ligações de hidrogênio (carbonilas, iminas, aminas, álcoois, entre outros), a polarizabilidade pode ser um diferencial na eficiência de solvatação, bem como a basicidade de Lewis do ânion (AMARASEKARA, 2016; HAWKER; HARPER, 2018).

Quanto à estrutura, os cátions, em geral, possuem uma maior variação e são, quase exclusivamente, de natureza orgânica com um heteroátomo carregado (os mais comuns são o nitrogênio e o fósforo) (ADAMS; DYSON; TAVENER, 2003; HAWKER; HARPER, 2018).

Nesta tese foi dado destaque aos líquidos iônicos que atuam como ácidos devido à possibilidade do emprego dessas substâncias em catálise. Os líquidos iônicos com características de ácidos de Lewis são capazes de aceitarem elétrons na porção catiônica ou na porção aniônica (Figura 9). Os derivados de ácido de Brønsted são aqueles que são capazes de doar um próton.

Figura 9: Exemplos de líquidos iônicos ácidos divididos em categorias segundo a acidez e constituição estrutural.



FONTE: adaptado de AMARASEKARA, 2016.

Os derivados de Brønsted são os mais comuns, e se dividem em: doador de próton na porção catiônica, doador de próton na porção aniônica, doador de próton em ambas as porções, doador com função ácida na porção catiônica, com função ácida na porção aniônica, com características de ácidos de Lewis e Brønsted (Figura 9) (AMARASEKARA, 2016).

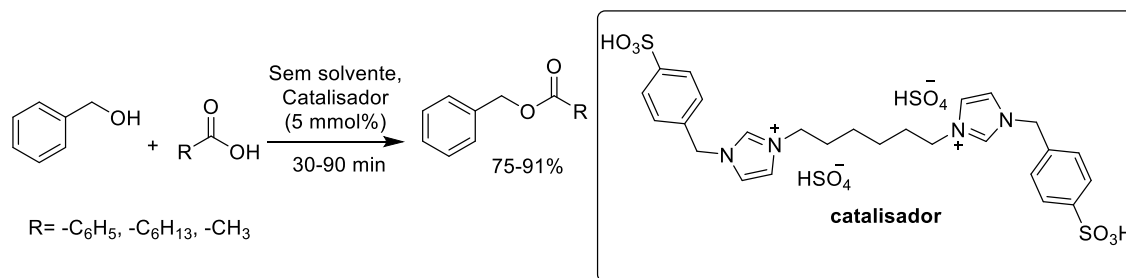
Os líquidos iônicos com função de ácidos de Lewis geralmente são preparados utilizando-se um líquido iônico neutro e tratando-o com um ácido de Lewis derivado de um haleto metálico, geralmente derivado do Fe, Zn ou Al (AMARASEKARA, 2016). Líquidos iônicos aceptores de elétrons no cátion não são muito comuns. Os derivados de ácido de Brønsted podem ser obtidos de uma mistura entre uma base de Brønsted com ácido de Brønsted, da

neutralização parcial de um ácido polibásico e uma base orgânica, a partir de zwitterions tratados com ácido (AMARASEKARA, 2016). O primeiro relato de um líquido iônico com função ácida orgânica foi em 2002 pelos pesquisadores Forbes e Davis, que foram inspirados pela síntese de zwitterion de Yoshizara (2001) (COLE *et al.*, 2002).

Existem diversas reações que podem ser catalisadas por líquidos iônicos, e será dado destaque neste trabalho àquelas que foram catalisadas por líquidos iônicos contendo a função ácida de Brønsted, a citar, reação de esterificação e saponificação, reação de alquilação, síntese de heterocíclicos, geração de carbocátions e rearranjo, reação de desidratação, reação partindo de biomassa renovável e oxidação. (AMARASEKARA; WIREDU, 2014; ELAVARASAN; KONDAMUDI; UPADHYAYULA, 2011; GAO *et al.*, 2010; HENDERSON; BYRNE, 2011; KORE; SRIVASTAVA, 2011; NEMATI; ALIZADEH, 2013; SHEN *et al.*, 2014)

Um exemplo de reação de esterificação utilizando um líquido iônico ácido é o estudo de Kore e Srivastava (2011) no qual o álcool benzílico foi avaliado na presença de ácido orgânico e 5 mmol% do catalisador (Figura 10) (KORE; SRIVASTAVA, 2011). Os autores obtiveram rendimentos muito promissores tanto para ácido aromático quanto para ácidos alifáticos, verificando que o catalisador mantinha, sem grandes perdas, as propriedades catalíticas durante pelo menos 3 ciclos.

Figura 10: Uso de líquido iônico ácido como catalisador em uma reação de esterificação.

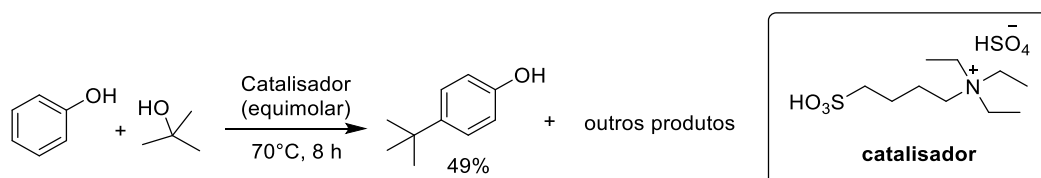


FONTE: adaptado de KORE; SRIVASTAVA, 2011

Elavarasan e colaboradores (2011) descreveram um exemplo de reação de alquilação entre o fenol com o álcool *tert*-butílico, onde um líquido iônico com função ácida (-SO₃H) apresentou uma boa conversão (85%) e seletividade (57,6%) para a formação do 4-*tert*-

butilfenol (Figura 11) (ELAVARASAN; KONDAMUDI; UPADHYAYULA, 2011). A reação foi realizada em batelada, na escala de gramas e o catalisador manteve a eficiência durante 5 ciclos.

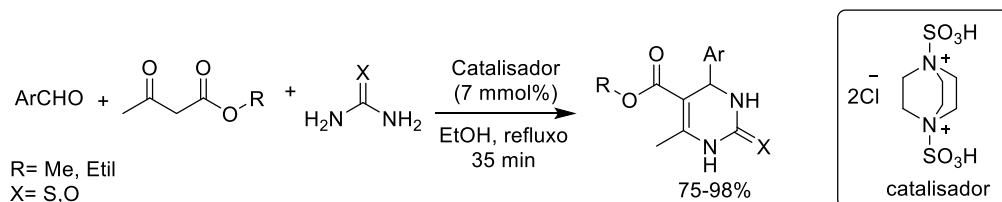
Figura 11: Exemplo de um líquido iônico com função ácida na catálise de uma reação de alquilação.



FONTE: adaptado de ELAVARASAN; KONDAMUDI; UPADHYAYULA, 2011.

Em 2013, Nemati e colaboradores reportaram a síntese para formação de diidropirimidinonas empregando um líquido iônico de função ácida derivado do DABCO como catalisador (Figura 12) (NEMATI; ALIZADEH, 2013). Esses autores obtiveram altos rendimentos (75-98%) na síntese dessa classe de substâncias.

Figura 12: Exemplo de formação de heterocíclico empregando líquido iônico como catalisador.

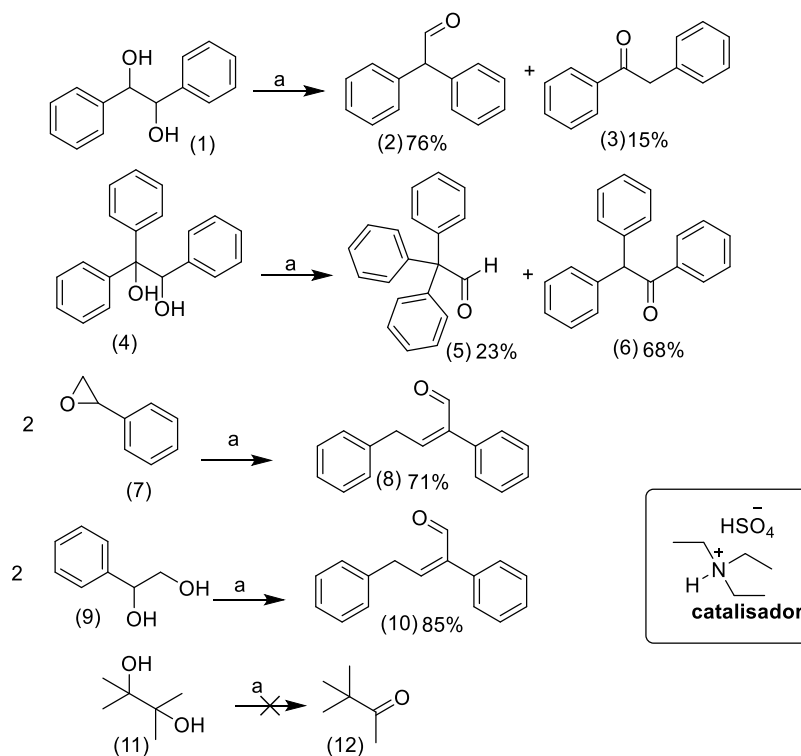


FONTE: adaptado de NEMATI; ALIZADEH, 2013.

Henderson e Byrne (2011) descreveram o uso do líquido iônico derivado de trietilamina tratado com ácido sulfúrico como catalisador de reações de rearranjo pinacol pinacolona realizada em apenas 5 minutos com irradiação de micro-ondas (HENDERSON; BYRNE, 2011). Essa metodologia é bastante vantajosa pois o líquido iônico pode ser retirado da reação com uma filtração simples por coluna de sílica evitando longas etapas de neutralização como são necessárias nas metodologias convencionais que utilizam ácidos muito fortes. A desvantagem desse catalisador é que ele é passível de degradação em altas temperaturas (~120 °C) e potências (~200 W), sendo assim é limitado a reações com aquecimento brando. Na reação com hidrobenzoína (1 - Figura 13, pág. 27), empregando a metodologia citada, foi

possível obter o produto de rearranjo do grupo fenila (2 - Figura 13) com 76% de rendimento, contudo, utilizando o trifeniletileno glicol (4 - Figura 13), como substrato, a reação foi mais seletiva para formar o produto de migração de hidrogênio (6 - Figura 13), razão associada ao impedimento estérico do C α ao aldeído. Nas reações envolvendo feniletileno glicol ou 2-feniloxirano (7 e 9, respectivamente - Figura 13) foram obtidos os produtos de rearranjo pinacol pinacolona seguido da reação de condensação aldólica entre os aldeídos formados (8 e 10, respectivamente - Figura 13) (HENDERSON; BYRNE, 2011). A metodologia para o 2,3-dimetilbutano-2,3-diol não se mostrou eficiente e foi obtida uma mistura complexa.

Figura 13: Exemplos de reações envolvendo rearranjo pinacol pinacolona catalisado por um líquido iônico de características ácidas.

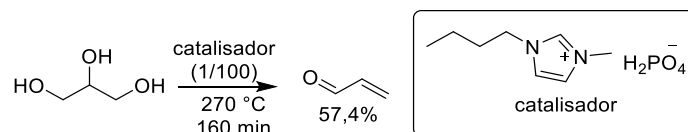


a) Diol: Catalisador (50 mg : 0,25 mL), 80 °C, 5 min, MO (20W)

FONTE: adaptado de HENDERSON; BYRNE, 2011.

Shen e colaboradores (2011) descreveram o uso do líquido iônico derivado do imidazol em reações em semibatelada para a obtenção de acroleína a partir do glicerol e obtiveram resultados satisfatórios (57,4% de seletividade - Figura 14, pág. 28) (SHEN *et al.*, 2014).

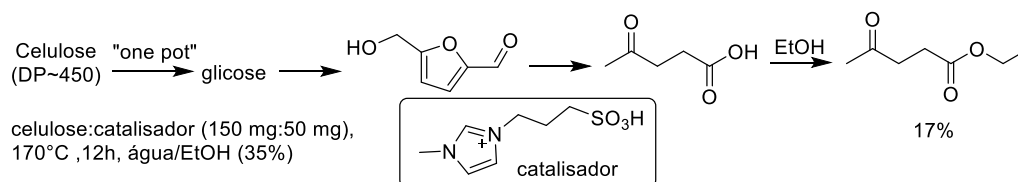
Figura 14: Exemplo de reação de desidratação do etileno glicol em acroleína utilizando um líquido iônico de característica ácida.



FONTE: adaptado de SHEN *et al.*, 2014.

Amarasekara e colaboradores (2014) descreveram a obtenção de levulinato de etila e ácido levulínico a partir de biomassa renovável (celulose- DP 450) utilizando líquido iônico com características ácidas (AMARASEKARA; WIREDU, 2014). A metodologia empregada consistiu em uma mistura etanol/água a 170 °C, que após 12 horas rendeu o levulinato de etila com 17% de rendimento (Figura 15). Essa é uma metodologia bastante simples e conveniente, pois ocorreu em uma única etapa (*one pot*) e o catalisador pôde ser recuperado na fração aquosa após extração com solvente orgânico.

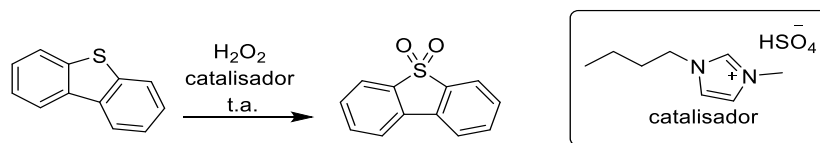
Figura 15: Exemplo de reação com biomassa renovável utilizando líquido iônico de características ácidas como catalisador.



FONTE: adaptado de AMARASEKARA; WIREDU, 2014.

Gao e colaboradores (2010) descreveram a extração e oxidação do dibenzotiofeno (DBT) de óleo diesel utilizando um líquido iônico com características tanto de agente de extração como catalisador (Figura 16, pág. 29) (GAO *et al.*, 2010). O óleo foi submetido à agitação sob temperatura ambiente e após a extração do DBT para a fase do líquido iônico, foi adicionado o peróxido de hidrogênio, dessa maneira foi possível realizar a dessulfurização com 90% de eficiência e o catalisador pode ser reutilizado, sem perder a eficiência catalítica, após 6 ciclos.

Figura 16: Exemplo do uso de líquido iônico como catalisador na oxidação do DBT.



FONTE: adaptado de GAO *et al.*, 2010.

As propriedades catalíticas dos líquidos iônicos somada à atuação como solventes são de grande interesse para o desenvolvimento e aplicação em novas metodologias de reações sem o uso de voláteis. Assim, visando a aplicar essas propriedades dos líquidos iônicos, este capítulo visa a descrever a síntese e caracterização de um líquido iônico derivado do imidazol e do ácido sulfônico, que são bastante comuns na estrutura daqueles que apresentam atividade catalítica em reações orgânicas, com o objetivo de obter um material líquido que dispense o uso de solvente para posterior avaliação de suas propriedades catalíticas na síntese de compostos de interesse biológicos e tecnológicos no capítulo IV.

3.2 - Objetivos

Sintetizar o líquido iônico cloridrato de 1-butylimidazolio-3-(*n*-butilsulfônico) ([BIMBS][Cl]) e caracterizá-lo empregando técnicas de:

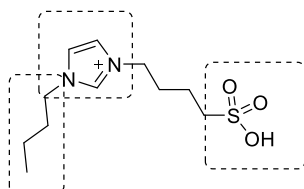
- Infravermelho;
- Espectroscopia de ressonância magnética de ¹H, ¹³C e DEPT.

3.3 – Resultados e Discussão

A estrutura do líquido iônico foi planejada de forma a conter um grupo ácido sulfônico (SO₃H), um núcleo imidazólico e uma cadeia alifática. A presença do grupo ácido sulfônico, em diferentes catalisadores, já se mostrou essencial para a eficiência catalítica em diversas reações multicomponentes catalisada por ácidos de Brønsted (AMARASEKARA, 2016; HAWKER; HARPER, 2018; VEKARIYA, 2017). O núcleo imidazólico, por sua vez, é bastante comum, entre os líquidos iônicos descritos na literatura, participa de ligações de

hidrogênio e, além disso, é passível de modificação dos substituintes nos nitrogênios imidazólicos para modular a dispersão de carga no cátion do líquido iônico (HAWKER; HARPER, 2018). E, finalmente, o grupo *n*-butila que é responsável pelas interações hidrofóbicas e a polarizabilidade do cátion (Figura 17).

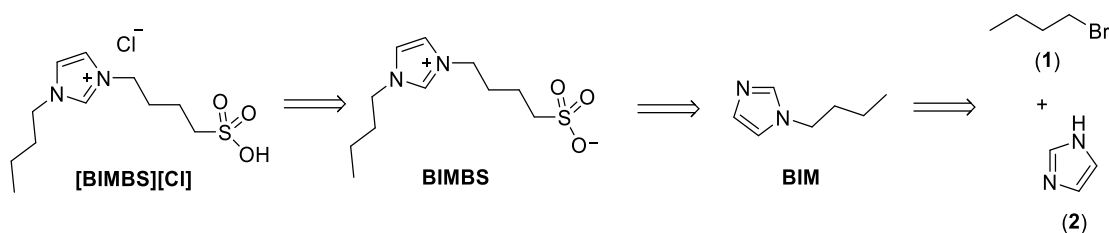
Figura 17: Estrutura proposta do [BIMBS][Cl]



FONTE: elaborado pela autora.

A análise retrossintética para a obtenção do líquido iônico é apresentada na Figura 18. O [BIMS][Cl] foi obtido do tratamento ácido de seu precursor zwitteriônico (BIMBS), que por sua vez foi obtido do tratamento do *N*-butilimidazol (BIM) com a 1,4-butanossultona em uma reação de substituição nucleofílica S_N2. Este por sua vez, foi obtido a partir de uma reação do tipo S_N2 entre o imidazol (2) e o brometo de *n*-butila (1).

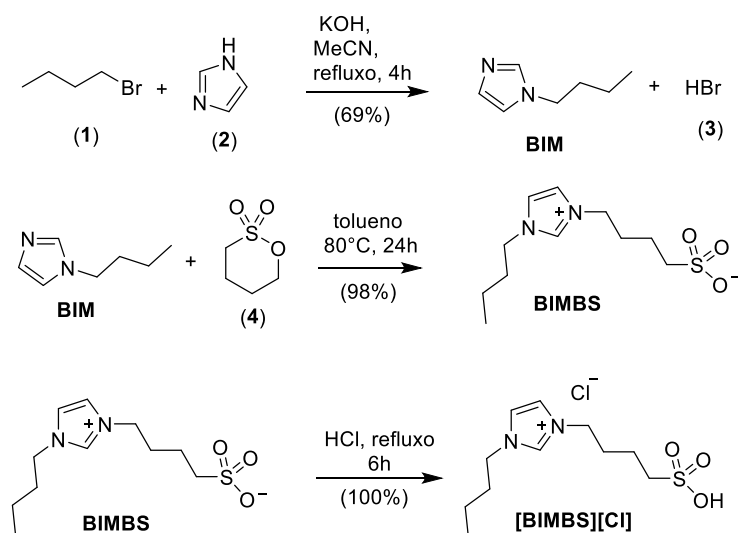
Figura 18: Análise retrossintética para a obtenção do [BIMBS][Cl].



FONTE: elaborado pela autora.

Para a síntese do [BIMBS][Cl], inicialmente, realizou-se uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) entre o imidazol (2) e o brometo de *n*-butila (1) obtendo-se *N*-butilimidazol (BIM) com 69% de rendimento. Em seguida, foi realizada outra reação do tipo S_N2 entre BIM e a 1,4-butanossultona (4) obtendo-se o 3-*n*-butilsulfonato de 1-butilimidazólio (BIMBS) com 98% de rendimento. Este último foi tratado com uma solução de HCl concentrada formando finalmente o cloridrato de 1-butilimidazólio-3-butilsulfônico ([BIMBS][Cl]) (Figura 19, pág. 31). Após realizadas as três etapas de síntese, foi possível obter o líquido iônico com 68% de rendimento global.

Figura 19: Esquemas de síntese do [BIMBS][Cl] e intermediários.



FONTE: elaborado pela autora.

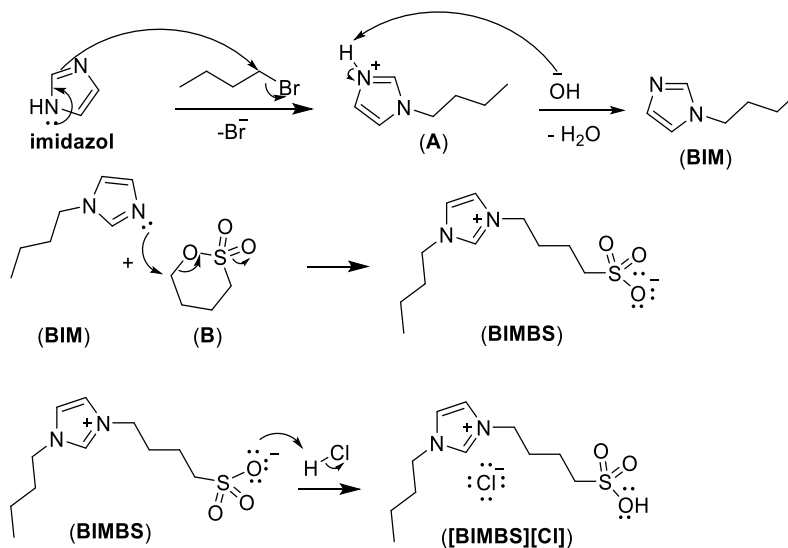
Uma proposta de mecanismo para a obtenção do [BIMBS][Cl], a partir do brometo de *n*-butila e do imidazol, está apresentada na Figura 20 (pág. 32). A primeira etapa consiste na substituição do bromo pelo ataque do nitrogênio sp^2 do imidazol assistido pelos pares de elétrons não ligantes do nitrogênio sp^3 , em um mecanismo do tipo S_N2 formando o imidazol alquilado protonado **A**. A abstração prévia do próton no imidazol pelo KOH não ocorre pois o pK_a do imidazol (18,6) é maior que o pK_a do ácido conjugado do KOH é (15,7) (BORDWELL, 1988; “commonorganicchemistry”, 2019). Então, o íon hidróxido abstrai o próton de **A** formando o **BIM**. O par de elétrons livres do nitrogênio de **BIM** ataca o carbono ligado ao oxigênio da 1,4-butanossultona (**B**) abrindo o anel e formando o zwitterion **BIMBS**. O **BIMBS** abstrai um próton do HCl fornecendo assim o [BIMBS][Cl].

A caracterização estrutural do **BIM** foi realizada mediante a obtenção dos dados de absorção na região do infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C (pág. 84, 131 e 130).

Comparando-se os dados de RMN de ^1H do **BIM** com os dados descritos na literatura, é possível reconhecer uma grande semelhança nos deslocamentos dos sinais obtidos (Tabela 5, pág. 32). No espectro de RMN ^1H de **BIM**, os sinais com deslocamentos em 0,94 a 3,94 ppm foram atribuídos aos hidrogênios da cadeia alquílica e os sinais entre 6,91 a 7,51 ppm são

característicos dos hidrogênios do núcleo imidazólico, confirmando a estrutura proposta para **BIM**.

Figura 20: Proposta de mecanismo para a obtenção do líquido iônico.



FONTE: elaborado pela autora.

Tabela 5. Sinais observados no espectro de RMN de ¹H do 1-butimidazol (**BIM**) sintetizado e os descritos para **BIM** na literatura

RMN de ¹ H, 200 MHz, CDCl ₃					RMN de ¹ H, 400 MHz, CDCl ₃ ^a			
Atribuição	δ (ppm)	m	I	J(Hz)	δ (ppm)	m	I	J(Hz)
H9	0,94	t	3	7,3	0,93	t	3	7,4
H8	1,32	sex	2	7,3	1,32	m	2	-
H7	1,75	qui	2	7,2	1,75	m	2	-
H6	3,94	t	2	7,2	3,92	t	2	7,2
H5	6,91	s	1	-	6,89	s	1	-
H4	7,04	s	1	-	7,04	s	1	-
H2	7,51	s	1	-	7,44	s	1	-

^a Resultados de Cheng e Chu, 2006, utilizados para comparação

*m = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento, t = tripleto, s = simpleto, q = quarteto, sl = sinal largo, quin = quinteto, sex = sexteto, m = multipeto.

FONTE: elaborado pela autora.

Além disso, no espectro obtido na região do IV para a amostra **BIM**, cabe destacar as bandas observadas em 3111 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação Csp²-H, em 2960 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação C-H da metila e em 1667 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação H-C=N-R, que corroboram a estrutura inicialmente proposta.

O **BIMBS** foi caracterizado mediante a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho, RMN de ¹H e ¹³C (pág. 85, 131 e 132).

O RMN de ¹H do **BIMBS** também foi comparado com os dados já descritos na literatura (Tabela 6). No espectro de RMN de ¹H de **BIMBS** os sinais com deslocamento entre 0,86 a 4,22 ppm, integram para 17 hidrogênios correspondendo exatamente aos hidrogênios das duas cadeias alquílicas presentes na estrutura proposta para **BIMBS**.

Tabela 6: Sinais observados no espectro de RMN de ¹H do **BIMBS** sintetizado e os descritos na literatura.

RMN de ¹ H, 200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆					RMN de ¹ H, 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ ^a				
Atribuição	δ (ppm)	m	I	<i>J</i> (Hz)	δ (ppm)	m	I	<i>J</i> (Hz)	
H9	0,86	t	3	7,3	0,90	t	3	7,2	
H8	1,24	sex	2	7,3	1,26	sex	2	7,2-	
H12	1,53	quin	2	7,0	1,56-1,49	m	2	-	
H7, H11	1,69-1,92	m	4	-	1,78	quin	2	7,2	
					1,87	m	2	-	
H13	2,42-2,46	m	2	-	2,44	m	2		
H6, H10	4,13-4,22	m	4	-	4,17	q	4	7,2	
H4, H5	7,82	sl	2	-	7,79	s	1	-	
					7,80	s	1	-	
H2	9,28	s	1	-	9,21	s	1	-	

^a Resultados de Jeong *et al.*, 2011, utilizados para comparação

*m = multiplicidade, I = integração, *J* = acoplamento, t = tripleto, s = simpleto, q = quarteto, sl = sinal largo, quin = quinteto, sex = sexteto, m = multipletto. FONTE: elaborado pela autora.

Além disso, cabe destacar a presença da banda em 1175 cm^{-1} no espectro obtido na região do IV que foi atribuída ao estiramento da ligação S-O corroborando a estrutura proposta para o **BIMBS**.

Após o tratamento de **BIMBS** com HCl, observou-se uma mudança, pois o zwitterion era um sólido branco e o produto final obtido foi um líquido transparente e viscoso. Outra mudança observada foi a variação do pH das soluções 0,01 M de **BIMBS**, da mistura de 0,01 M **BIMBS** + 0,01 M HCl e 0,01 M **[BIMBS][Cl]** que foram respectivamente 7,07; 2,38; 1,21. O resultado foi coerente, pois como esperado, a acidez do líquido iônico está entre a acidez de **BIMBS** e de sua mistura com HCl sendo, portanto, uma evidência da formação de **[BIMBS][Cl]**.

Para verificar se os pares de carbonos C10/C6 e C5/C4 eram realmente coincidentes no espectro de RMN de ^{13}C do **[BIMBS][Cl]** realizou-se o experimento de ressonância magnética binuclear HSQC e HMBC (Fig. Apêndice 13, Fig. Apêndice 14- págs. 134 e 135 respectivamente). No mapa de contornos HSQC, foi possível verificar que apenas o sinal de δ 122,5 ppm possui correlação com o sinal em δ 7,82 ppm que no RMN de ^1H foi atribuído para dois hidrogênios aromáticos, comprovando assim que tanto o C5 quanto o C4 possuem deslocamentos químicos coincidentes. Ainda no mapa de contornos HSQC, foi possível verificar que o sinal em δ 48,6 ppm possui correlação como o sinal multiplete em δ 4,14 - 4,23 ppm que foi integrado para 4 hidrogênios. Essa teoria se confirmou ao analisar o mapa de contornos HMBC e verificar que o sinal 48,6 possui correlações coerentes com os carbonos C6 e C10. A atribuição do quinteto em 1,54 ppm poderia ser atribuída tanto a H12 e H7, com o auxílio do mapa de contornos HMBC foi verificada a correlação desse sinal com os sinais atribuídos a C11, C10 e C13 e, portanto, o sinal em 1,54 foi atribuído ao H12, concluindo assim, a atribuição e confirmando a estrutura proposta para o líquido iônico.

Após a síntese e completa caracterização do líquido iônico, foi realizada a avaliação da sua atividade catalítica, que será abordada no capítulo IV.

3.4 – Conclusão

A metodologia empregada foi eficiente para a síntese do líquido iônico derivado do imidazol com características de ácido de Brønsted. O **[BIMBS][Cl]** foi obtido em três etapas, com rendimento global de 68%.

CAPÍTULO IV – Obtenção de Adutos de Biginelli

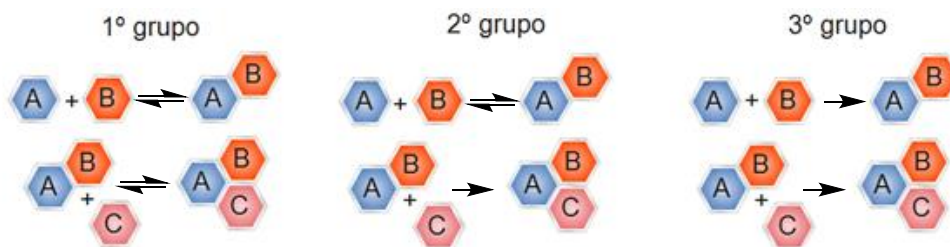
Neste capítulo, as substâncias NbOPO_4 (400), NbOPO_4 (500), NbOPO_4 (700) e $[\text{BIMBS}][\text{Cl}]$, foram avaliadas quanto às propriedades catalíticas na reação de Biginelli sendo que as três primeiras correspondem a catalisadores de caráter heterogêneo e a última de caráter homogêneo e solvente.

4.1 – Reações multicomponentes: A busca por metodologias eficientes para a reação de Biginelli

Reações multicomponentes são aquelas onde os átomos de três ou mais reagentes são incorporados na estrutura de uma única substância caracterizando uma economia atômica e pouca geração de subprodutos (UGI; DÖMLING; HÖRL, 1994; UGI; DÖMLING; WERNER, 2000).

As reações multicomponentes podem ser divididas em três grupos, considerando os equilíbrios químicos presentes até a formação do produto final (Figura 21). O primeiro é representado pelo sistema no qual os intermediários e os produtos fazem parte de um equilíbrio químico; o segundo caracteriza-se pelo sistema no qual os intermediários participam de um equilíbrio químico, e o produto final participa de uma reação irreversível; finalmente, no terceiro grupo, tanto os intermediários quanto o produto fazem parte de um sistema irreversível direcionado para a formação da substância alvo (UGI; DOMLING; WERNER, 2000).

Figura 21: Possíveis etapas de uma reação multicomponente, definida por UGI, segundo os equilíbrios químicos presentes até a formação do produto final.



FONTE: elaborado pela autora.

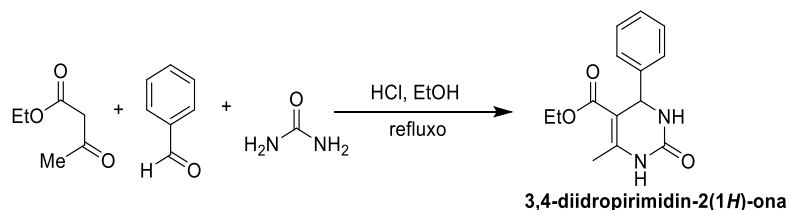
As vantagens da utilização de reações multicomponente incluem: facilidade e agilidade no acesso às substâncias complexas em apenas uma única etapa de reação e, em geral, sem a necessidade de sucessivas purificações (UGI; DÖMLING; EBERT, 1999).

Dentre as diversas classes de substâncias obtidas empregando-se reações multicomponentes destacam-se os compostos heterocíclicos, assim definidos, por apresentarem cadeia cíclica constituída de átomos diferentes de carbono e hidrogênio.

Os *N*-heterocíclicos são substâncias cíclicas, nas quais pelo menos um átomo de carbono foi substituído por um átomo de nitrogênio, como as diidropirimidinonas (AKRITOPOULOU-ZANZE; DJURIC, 2010).

A primeira descrição da síntese de diidropirimidinonas *via* reações multicomponentes foi realizada, em 1891, por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1891b, a). Biginelli descreveu a metodologia de síntese para as diidropirimidinonas por meio da ciclocondensação entre o acetoacetato de etila, o benzaldeído e a ureia, catalisada por ácido clorídrico (Figura 22). E por isso, hoje, essa classe de substâncias também são conhecidas como adutos de Biginelli.

Figura 22. Reação clássica de Biginelli para a formação de 3,4-diidropirimidin-2(1*H*)-ona.



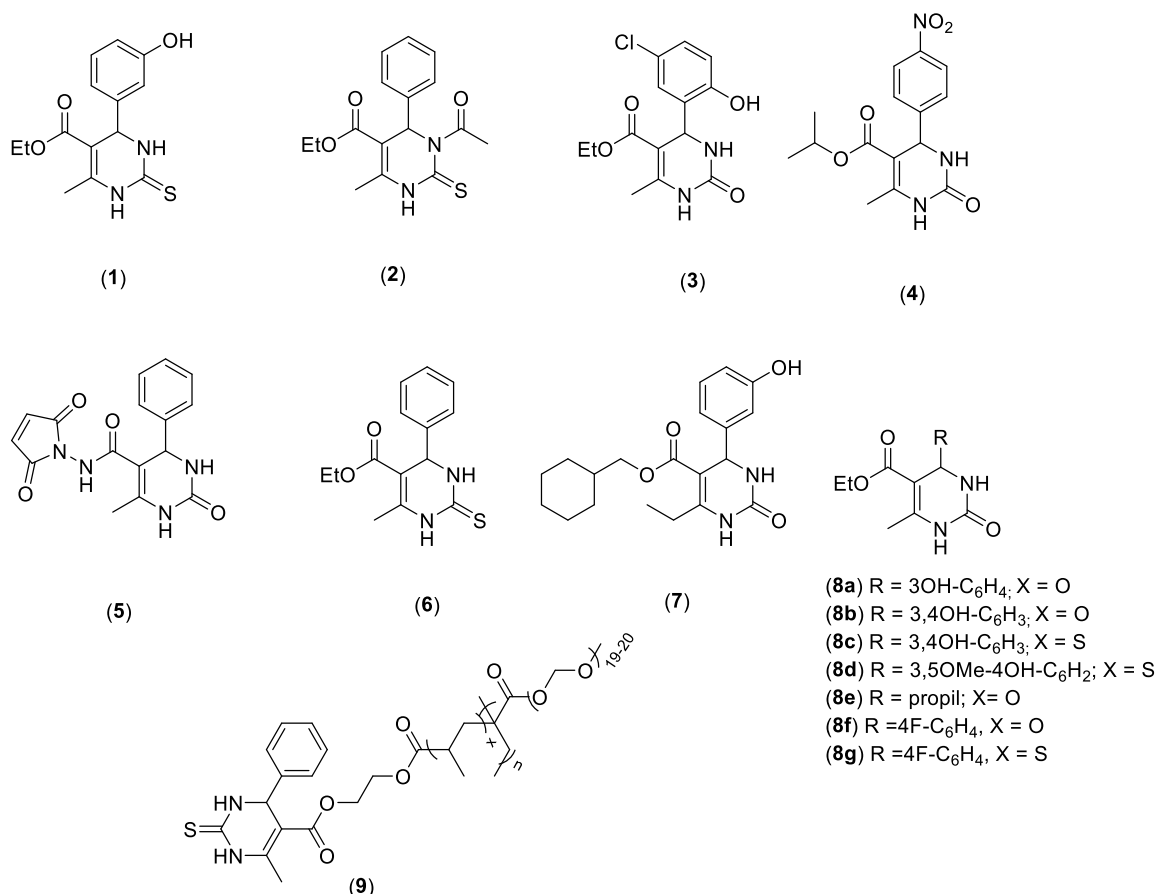
FONTE: adaptado de BIGINELLI, 1891b,a.

Os adutos de Biginelli são reconhecidos por suas atividades biológicas, a citar: atividade antiproliferativa, moduladora de canais de cálcio, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, anti-hiperglicemiantes, inibidora de urease, herbicida, e de proteção celular contra a radiação ultra violeta (UV) (DA SILVA, C. M. *et al.*, 2011; DE FÁTIMA *et al.*, 2015).

O monastrol é o mais conhecido entre os adutos de Biginelli (**1**; Figura 23, pág. 38), uma vez que Mayer e colaboradores (1999) descreveram-no como o primeiro inibidor da enzima Eg5 (MAYER *et al.*, 1999). Essa enzima é responsável pela formação e manutenção dos fusos

mitóticos, sendo imprescindível para a continuidade do processo de divisão celular. A Eg5 é um reconhecido alvo para o tratamento de neoplasias, e o monastrol, como reconhecido inibidor, tem motivado a investigação para o desenvolvimento de inibidores ainda mais potentes (EL-NASSAN, 2013).

Figura 23: Exemplos de adutos de Biginelli de interesse biológico



FONTE: elaborado pela autora.

O uso de adutos de Biginelli para modular canais de cálcio pode ser exemplificado pelo estudo de Sati e colaboradores em 2012 (SATI *et al.*, 2012). Esses autores estudaram a substância **2** (Figura 23) frente ao íleo paralítico de porco-da-índia (SATI *et al.*, 2012). O íleo é um segmento do intestino delgado e seu funcionamento é dependente da concentração de cálcio e potássio. No estudo de Sati, a substância **2** apresentou um efeito antagonista de 50% se comparado com a referência Verapamil (SATI *et al.*, 2012).

Donthabhakthuni e colaboradores em 2012 descreveram o aduto de Biginelli **3** (Figura 23, pág. 38), substância com potencial anti-inflamatório, que atua como inibidor da produção de NO da micróglia ativada por lipossacarídeos (DONTAHABHAKTHUNI *et al.*, 2012).

Chitra mostrou em seus estudos que o aduto de Biginelli **4** (Figura 23, pág. 38) pode atuar como antibacteriano. Os valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) encontrados para o aduto de Biginelli foram quatro vezes menores que o controle Ciprofloxacina no combate à cultura bacteriana de *Salmonella typhi*, CIM duas vezes menores nas culturas bacterianas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, e *Staphylococcus aureus*, além de apresentar CIM similar ao controle frente à cultura de *Pseudomonas aeruginosa* (CHITRA; DEVANATHAN; PANDIARAJAN, 2010).

Quanto à atividade antifúngica, o emprego do aduto de Biginelli **5** (Figura 23, pág. 38) frente às culturas de *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus* ocasionou em uma zona de inibição de crescimento comparável àquelas observadas para o Clotrimazol (BEENA; AKELESH, 2012).

O potencial antioxidante também é atribuído aos adutos de Biginelli, e pode ser exemplificado pelo aduto de Biginelli **6** (Figura 23, pág. 38) que se mostrou eficiente no sequestro dos radicais 1-picrilhidrazil de 2,2-difenila (DPPH) na faixa de 15-45 μM (DE VASCONCELOS *et al.*, 2012).

O potencial antiviral pode ser ilustrado pela substância **7** (Figura 23, pág. 38), que inibiu *in vitro* o crescimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em concentração 1,7 vezes menor que o nevirapina, um fármaco com reconhecida atividade anti-HIV (KIM *et al.*, 2012).

Um exemplo da potencial atividade anti-hiperglicemiante de adutos de Biginelli já foi descrito por Dhumasckar e colaboradores que mostraram que o aduto de Biginelli **6** (Figura 23, pág. 38) inibiu a enzima α -amilase em 97,2% na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ (DHUMASKAR *et al.*, 2014).

Os adutos de Biginelli (**8a-d** e **8f** - Figura 23, pág. 38) foram descritos por Modolo e colaboradores, em patente depositada em 2016. Eles apresentam atividade inibidora de urease na concentração entre 200-300 μM (MODOLO *et al.*, 2016). Além disso foi mostrado pelo mesmo grupo de pesquisa que os adutos de Biginelli também apresentam atividade

herbicida (MUNIZ *et al.*, 2019). A substância **8g** ($> 200 \mu\text{M}$) é letal a *B. pilosa* e **8h** ($\geq 600 \mu\text{M}$) reduziu a porcentagem de germinação de sementes de *U. decumbens* e atrasou a germinação da mesma e além disso, esses dois compostos aumentaram e estimularam a expansão de folhas de alface da espécie de *Lactuca sativa* (Figura 23 – pág. 38).

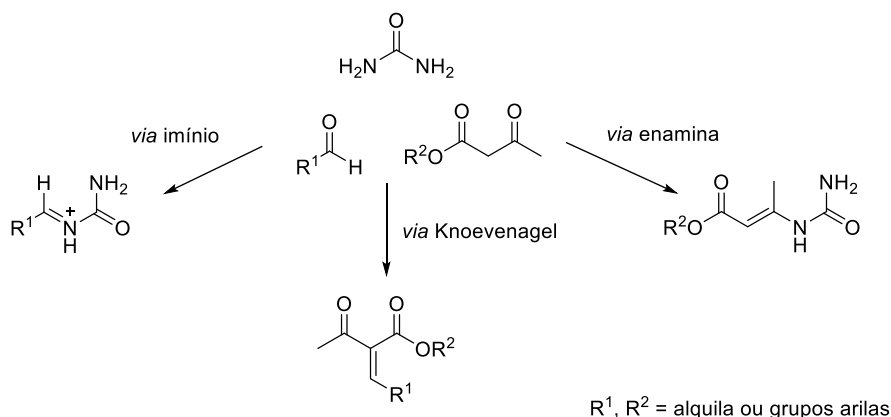
Os adutos de Biginelli ainda apresentam potencial de proteção UV como foi descrito por Mao e colaboradores em 2018 (MAO *et al.*, 2018). Esses autores verificaram que uma linhagem de células de fibroblasto murino (L929) tratada com radiação UV apresenta 85,1% de danos no DNA. Contudo, quando essa linhagem de células foram previamente tratadas com o polímero **9** (Figura 23, pág. 38) na concentração de 10 mg mL^{-1} , o dano observado no DNA foi de apenas 3,7%.

A grande importância biológica desse núcleo motivou vários estudos que visam a desvendar a melhor maneira de obtenção, avaliando o uso de diversos catalisadores e analisando os mecanismos de formação dos adutos de Biginelli.

A reação multicomponente de Biginelli é classificada no segundo grupo de Ugi (Figura 21, pág. 36), visto que é regida por vários equilíbrios químicos que são direcionados a um estágio que fornece o produto, diidropirimidinonas, de maneira irreversível.

Em 1933, ocorreram os primeiros relatos sobre uma possível proposta de mecanismo para a formação dos adutos de Biginelli. Folkers e Johnson (1933) sugeriram 3 intermediários: i) o intermediário imínio, oriundo do equilíbrio químico entre o aldeído e a ureia, ii) o intermediário de Knoevenagel proveniente do equilíbrio químico entre o aldeído e o composto 1,3-dicarbonílico e iii) o intermediário enamina, resultante do equilíbrio químico entre a ureia e o composto 1,3-dicarbonílico (Figura 24, pág. 41) (FOLKERS; JOHNSON, 1933). Esses autores avaliaram a reação de Biginelli na presença de HCl como catalisador e verificaram que o produto da enamina rapidamente era hidrolisado nessas condições. Sendo assim, eles propuseram que o mecanismo ocorre ou *via* imínio ou *via* Knoevenagel (FOLKERS; JOHNSON, 1933).

Figura 24: Possíveis intermediários na reação de Biginelli sugeridos por Folkers e Johnson



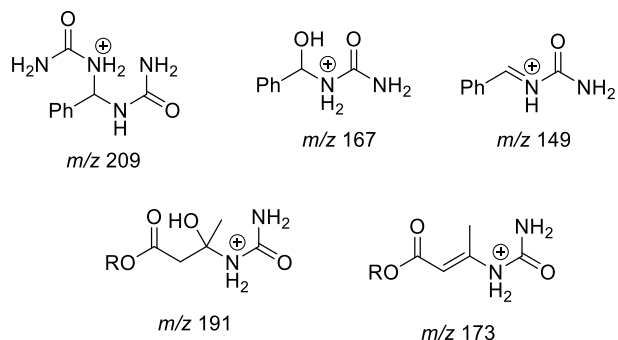
FONTE: adaptado de FOLKERS; JOHNSON, 1933.

O pesquisador Kappe (1997), 64 anos mais tarde, investigou o mecanismo da reação de Biginelli usando ressonância magnética nuclear (RMN) como ferramenta para a identificação dos intermediários (KAPPE, 1997). Ao avaliar a reação de Biginelli durante 15 a 20 minutos Kappe identificou o intermediário imínio. Além disso foi observada a acetalização do aldeído pelo solvente metanol-deuterado, formando o $\text{PhCH}(\text{OCD}_3)_2$. Este subproduto que compete com a formação do intermediário de Knoevenagel e enamina. O primeiro não foi identificado e o segundo intermediário hidrolisou rapidamente. Portanto, segundo os estudos de Kappe o mecanismo da reação de Biginelli é preferencialmente *via* formação do intermediário imínio (KAPPE, 1997).

Ramos e colaboradores (2012) estudaram o mecanismo da reação de Biginelli utilizando espectrometria de massas por *electrospray* com infusão direta (ESI-MS) e ácido fórmico como catalisador em metanol (RAMOS *et al.*, 2012). Avaliando a reação entre a ureia e o benzaldeído, os autores identificaram os intermediários com relação massa/carga (m/z) 209, 107 e 149 (Figura 25, pág. 42). Avaliando a reação entre o benzaldeído e o dicarbonílico só foi identificado algum intermediário após 24 h de reação, contudo, as reações de Biginelli geralmente se processam em no máximo 12 horas, portanto os autores concluíram que o intermediário de Knoevenagel não seria o mais favorecido. Avaliando a reação entre a ureia e o dicarbonílico, apenas um intermediário de m/z 191 foi identificado sugerindo que a enamina, se formada, ocorre em baixíssima concentração nas condições avaliadas. Sendo

assim, os autores sugeriram que o mecanismo *via* imínio é o mais coerente nessas condições para a reação de Biginelli. Em 2013, Ramos também identificou a *via* imínio favorecida quando usou, como catalisador, o heptacloro de ferro(III) 1-(carboximetil-3-metil-1*H*-3-imidazólio) e estudou a cinética de reação utilizando como ferramenta a espectrometria de massas por quadrupolo de tempo de voo (ESI-QTF) (RAMOS *et al.*, 2013).

Figura 25: Relação massa carga dos intermediários da reação de Biginelli identificados por Ramos.



FONTE: adaptado de RAMOS *et al.*, 2013.

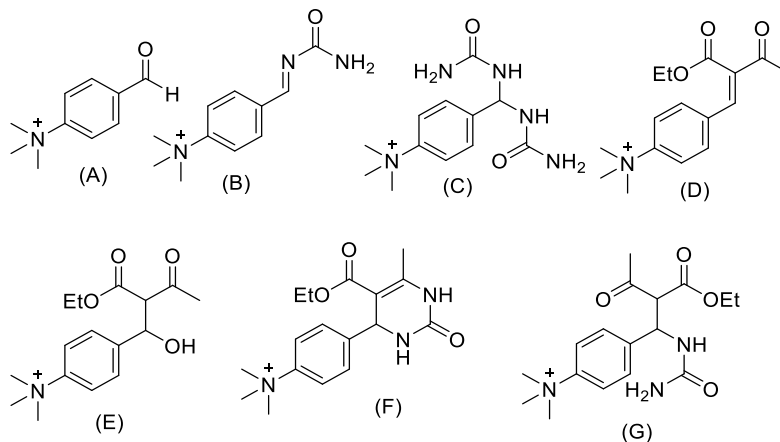
Resultado diferente foi observado por Cepanec e colaboradores (2007) que avaliaram a reação de Biginelli catalisada por SbCl_3 (CEPANEC *et al.*, 2007). Após otimizadas as condições, avaliaram a reação de cada combinação possível entre os reagentes e, apenas foi possível isolar um intermediário da reação entre a ureia e o dicarbonílico sugerindo então que o mecanismo mais favorecido seria *via* enamina (CEPANEC *et al.*, 2007). Litvic, em 2010, realizou estudo similar ao do Cepanec *et al.*, mas usando como catalisador o $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{BF}_4)_3]$ e também obteve evidências que sugerem o mecanismo *via* enamina como o mais favorecido (LITVIĆ *et al.*, 2010).

Vitório e colaboradores (2015) descreveram um aduto de Biginelli derivado da cumarina catalisado por HCl (VITÓRIO *et al.*, 2015). Durante os estudos para avaliar a melhor condição para a reação de Biginelli, foi identificado por RMN o intermediário de Knoevenagel, que sugere que nessas condições o mecanismo se daria preferencialmente por esse equilíbrio.

Alvim e colaboradores (2014) realizaram um estudo mecanístico da reação de Biginelli na ausência de catalisador (ALVIM *et al.*, 2014). Para identificação dos intermediários, os

autores empregaram um aldeído marcado com carga e a técnica espectrometria de massas. Todos os possíveis intermediários sugeridos por Folkers e Jonhson foram identificados (intermediários A-G, Figura 26) e, então, os autores concluíram que o uso do catalisador vai além de apenas melhorar em curtos períodos o rendimento das reações. O catalisador também é importante para determinar a seletividade do equilíbrio que a reação vai se processar.

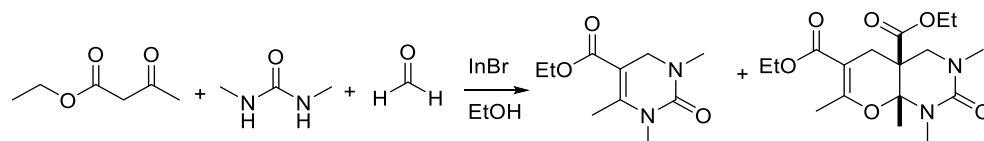
Figura 26: Intermediários da reação de Biginelli identificados por Alvim usando ESI-MS



FONTE: adaptado de ALVIM *et al.*, 2014.

Maskrey e colaboradores (2018) relataram que a reação de Biginelli na presença de brometo de índio, aldeído, composto dicarbonílico e ureia na proporção de 0,1:5:2,5:1, respectivamente, ocorre *via* imínio e *via* Knoevenagel. A presença desses dois intermediários favoreceu a formação do produto de Diels-Alder configurando uma reação cinco componentes em detrimento da tradicional reação de Biginelli (Figura 27) (MASKREY *et al.*, 2018).

Figura 27: Reação cinco componentes de Maskrey baseada na reação de Biginelli.



FONTE: adaptado de MASKREY *et al.*, 2018.

Com essas evidências experimentais percebe-se que o mecanismo da reação de Biginelli pode ser modulado segundo as características do catalisador e as condições empregadas no meio de reação.

Vários estudos, ainda hoje, são realizados buscando melhorias na metodologia de Biginelli. Dentre as modificações descritas, cabem citar: o uso de catalisadores ácidos, solventes próticos e apróticos, uso de irradiação de micro-ondas e ultrassom. (KAPPE, 1997; PASUNOOTI *et al.*, 2011; WANG, Q.; PEI, 2010; YU; SHI; GONG, 2011)

Exemplos de catalisadores para a reação de Biginelli incluem os ácidos de Brønsted: cloridratos de piperidinas, H₂SO₄, HCl, ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA), calix[*n*]arenos, entre outros (TERADA; MACHIOKA; SORIMACHI, 2007). Se tratando de ácidos de Lewis cabe citar: InCl₃, SnCl₂, FeCl₃, AlCl₃ (RAMOS *et al.*, 2012). Líquidos iônicos também foram descritos como catalisadores, destacando-se aqueles que são derivados do núcleo imidazólico (RAMOS *et al.*, 2012). Por fim, entre os solventes mais empregados na reação de Biginelli, estão o etanol, o acetato de etila e a dimetilformamida, de forma que o primeiro é um exemplo de solvente prótico e os demais apróticos (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

A importância do núcleo de Biginelli ainda motiva pesquisadores a encontrar novos catalisadores e novas metodologias que visam à obtenção dessa classe de substâncias de maneira eficiente.

4.2 – Objetivos

Avaliar o uso de **NbOPO₄** calcinado a 400, 500, 700 °C e o líquido iônico cloridrato de 1-butylimidazolio-3-(*n*-butilsulfônico) [**BIMBS**][**Cl**] na catálise da reação de Biginelli.

- Determinar as melhores condições de reação para a obtenção dos adutos de Biginelli.
- Preparar uma série de análogos de Biginelli.
- Caracterizar os produtos obtidos por ponto de fusão, IV e RMN de ¹H, ¹³C e DEPT.

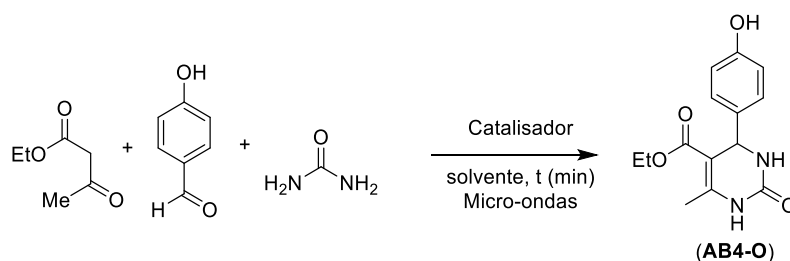
4.3 – Resultados e Discussão

Os catalisadores podem ser divididos em dois grupos: homogêneos e heterogêneos. Os catalisadores homogêneos são aqueles que formam um sistema de apenas uma fase com a mistura de reação e reagem formando estados de transição e intermediários menos energéticos (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012). Os catalisadores heterogêneos, por sua vez, são aqueles que não são miscíveis com a mistura de reação e a catálise ocorre na superfície do catalisador ou através de um auxiliador de transferência de fase. Uma vantagem dos catalisadores heterogêneos é que eles podem ser facilmente separados do sistema de reação e, muitas vezes, precisam de pouco ou nenhum tratamento para serem reutilizados (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012).

Nestes estudos foram avaliados o **[BIMBS][Cl]** e o **NbOPO₄** como catalisadores heterogêneo e homogêneo, respectivamente, na reação de Biginelli.

A reação modelo escolhida envolveu a ciclocondensação entre o 4-hidroxibenzaldeído (1 mmol), acetoacetato de etila (1,5 mmol) e ureia (1,5 mmol) sob irradiação de micro-ondas em diferentes temperaturas e na ausência de solvente para a formação do aduto de Biginelli, os rendimentos descritos foram referentes ao produto isolado (**AB4-O**) (Figura 28).

Figura 28: Reação modelo para a síntese de adutos de Biginelli (**AB4-O**) no estudo de condições otimizadas empregando **[BIMBS][Cl]** ou **NbOPO₄** como catalisador.

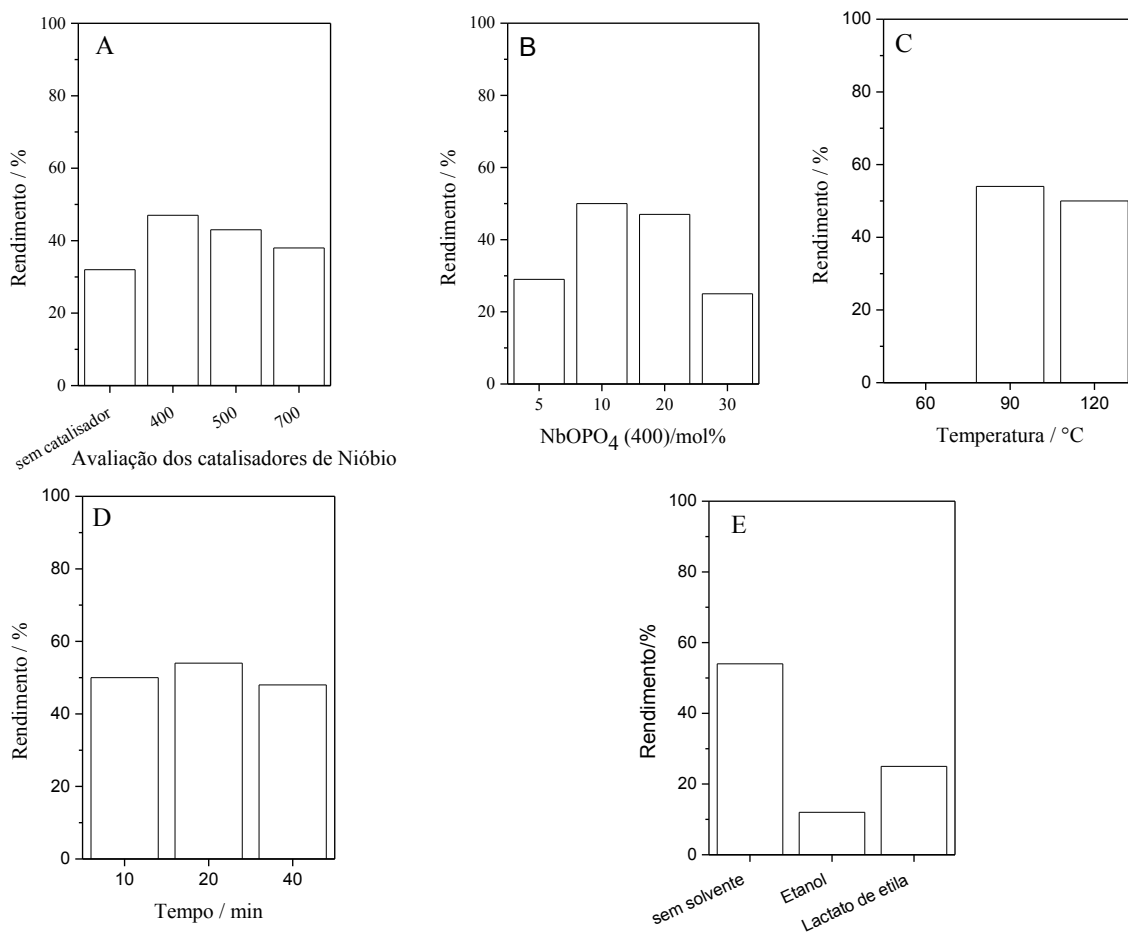


FONTE: Elaborado pela autora.

Iniciaram-se as investigações com o catalisador **NbOPO₄** na concentração de 20 mol% a 90 °C durante 10 minutos e foi avaliado qual das calcinações 400, 500 ou 700 °C forneceria o catalisador mais eficiente para a reação de Biginelli. Avaliando-se o gráfico A (Figura 29 – A, pág. 46) percebe-se que o **NbOPO₄** calcinado a 400 °C foi o que forneceu melhor

rendimento nas condições avaliadas, sendo assim as avaliações seguintes foram usando apenas esse catalisador.

Figura 29: Efeitos da calcinação do NbOPO_4 , quantidade de catalisador, tempo, temperatura e solvente na preparação do aduto de Biginelli (**AB4-O**). Reagentes e condições: 4-hidroxibenzaldeído, acetoacetato de etila e ureia (1:1,5:1,5, respectivamente) sob irradiação de micro-ondas [MO (potência máxima, 250 Watts)] em um reator DISCOVER CEM®, rendimentos reportados são referentes aos produtos isolados. (A) 90 °C, 10 min, sem solvente, 20 mol% do NbOPO_4 calcinado a 400, 500 ou 700 °C - a reação sem catalisador foi realizada no período de 30 min; B) 90 °C, 10 min, sem solvente, diferentes quantidades de NbOPO_4 (400) C) 10 min, sem solvente, 10 mol% NbOPO_4 (400), em diferentes temperaturas; D) 90 °C, sem solvente, 10 mol% NbOPO_4 (400), diferentes tempos de reação; E) 90 °C, 20 min, 10 mol% do NbOPO_4 (400) avaliação do uso de solventes.



FONTE: Elaborado pela autora.

Em seguida, foi avaliada a influência da concentração na catálise. Utilizaram-se as concentrações de 5, 10, 20 e 30 mol% de NbOPO_4 (400) a 90 °C durante 10 minutos e os

resultados encontram-se no gráfico B (Figura 29 – B, pág. 46). Foi possível constatar que a concentração de 10 mol% foi a mais eficiente para a catálise e que concentrações mais elevadas do catalisador comprometem a formação do produto.

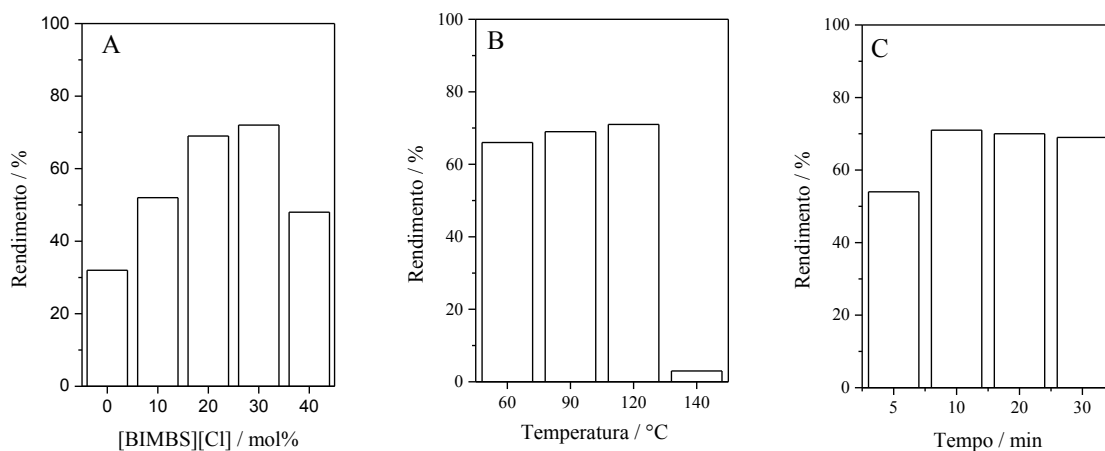
A temperatura de reação também foi avaliada nas temperaturas de 60, 90 ou 120 °C e os resultados encontram-se no gráfico C (Figura 29 – C, pág. 46). Na avaliação dos resultados, verificou-se que a temperatura de 90 °C foi capaz de fornecer o produto com 54% de rendimento. Em temperaturas mais elevadas o resultado não teve grandes variações, portanto a temperatura de 90 °C foi escolhida para as demais otimizações.

O tempo de reação foi avaliado nos períodos de 10 min, 20 min ou 40 min e os resultados encontram-se no gráfico D (Figura 29 – D, pág. 46). Percebe-se que o tempo de 20 min foi o que forneceu o melhor resultado e, portanto, os demais estudos de otimização utilizaram esse tempo. Também foram avaliados os solventes etanol e lactato de etila, contudo, os rendimentos caíram bastante com o uso do solvente. Na catálise heterogênea, a reação ocorre na superfície do catalisador (TANABE, KOZO, 1990) e acredita-se que o solvente diminuiu a eficiência da reação pois ao solvatar o catalisador provavelmente impede os substratos de formarem de maneira eficiente o estado de transição na direção do produto de interesse. E, assim, foi determinado que a melhor condição para o uso de **NbOPO₄ (400)** como catalisador na reação de Biginelli foi a concentração de 10 mol%, irradiação de micro-ondas à temperatura de 90 °C durante 20 min, em um sistema sem solvente. Após elaboração obteve-se um rendimento de 54% do aduto de Biginelli.

A avaliação do uso de cloridrato de 1-butimidazólio-3-butilsulfônico [**BIMBS**][**Cl**] na reação de Biginelli, o primeiro parâmetro avaliado foi a quantidade do [**BIMBS**][**Cl**] utilizou-se as proporções de 10, 20, 30 ou 40 mol% em relação ao aldeído em reações realizadas a 90 °C, por aquecimento de micro-ondas, durante 30 minutos (gráfico A, Figura 30, pág. 48). A quantidade de 20 mol% do catalisador foi a que apresentou melhor atividade catalítica. Ao utilizar um excesso de catalisador [**BIMBS**][**Cl**] 40 mol% (gráfico A, Figura 30, pág. 48), percebe-se que, assim como o observado com o excesso de **NbOPO₄** (gráfico B, Figura 29, pág. 46), o rendimento da reação diminuiu. Esta tendência também foi relatada por Vijayakumar e colaboradores (2012) quando avaliaram o catalisador ZrOCl₂.8H₂O suportado em montmorillonita K10 em uma reação sem solvente que também perceberam que o excesso

de catalisador era melhor na solvatação dos intermediários, diminuindo a difusão requerida a formação do produto (VIJAYAKUMAR; RANGA RAO, 2012).

Figura 30: Efeito da quantidade de catalisador ([BIMBS][Cl]), tempo e temperatura na preparação do aduto de Biginelli (AB4-O). Reagentes e condições: 4-hidroxibenzaldeído, acetoacetato de etila e ureia (1:1,5:1,5, respectivamente) sob irradiação de micro-ondas [MO (potência máxima, 250 Watts)] em um reator DISCOVER CEM®, os rendimentos reportados são referentes ao produto isolado. (A) 90 °C, 30 min, sem solvente, diferentes quantidade de [BIMBS][Cl], B) [BIMBS][Cl] 20 mol%, 30 min em diferentes temperaturas, C) [BIMBS][Cl] 20 mol%, 90 °C em diferentes períodos.



FONTE: Elaborado pela autora.

Em seguida, manteve-se a quantidade de 20 mol% de [BIMBS][Cl] e variou-se a temperatura de reação (gráfico B, Figura 30). As temperaturas de 90, 120 ou 140 °C foram avaliadas e os resultados encontram-se no gráfico B (Figura 30). Dentre as temperaturas avaliadas, as de 90 °C e 120 °C não apresentaram diferenças significativas na obtenção do produto desejado. Sendo assim, a temperatura de 90 °C foi estabelecida por ser uma condição mais branda. Na temperatura de 140 °C, a mistura de reação adquiriu uma coloração mais escura, o que sugere que houve degradação dos reagentes durante o período de reação e conseqüentemente a baixa formação de AB4-O.

O último parâmetro avaliado foi o tempo de reação de 5, 10, 20 ou 30 minutos. Os resultados encontram-se no gráfico C (Figura 30), que sugerem 10 min como o melhor período para a formação do produto, pois em períodos maiores não houve melhoras significativas nos rendimentos observados.

Em resumo, verificou-se que o [BIMBS][Cl] (20 mol%), *per si*, catalisou a reação de Biginelli conduzindo à formação de **AB4-O** em 71% após 10 min de reação sob aquecimento por irradiação de micro-ondas a 90 °C. O aduto de Biginelli **AB4-O** foi caracterizado mediante a obtenção dos espectros na região do infravermelho, RMN de ^1H e de ^{13}C (pág. 144 e 145). Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H de **AB4-O** estão em concordância com aqueles descritos na literatura (da Silva, D.L. *et al.*, 2011) como descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Dados obtidos do espectro de ^1H de **AB4-O** em DMSO- d_6 versus dados descritos na literatura

RMN de ^1H , 200 MHz, DMSO- d_6					RMN de ^1H , 200 MHz, DMSO- d_6^a			
Atribuição	δ	M	I	J	δ	m	I	J
Ha	1,09	t	3	6,9	1,09	t	3	7,07
Hd	2,23	s	3	-	2,22	s	3	-
Hb	3,97	q	2	6,9	3,97	q	2	7,07
H4	5,04	sl	1	-	5,03	sl	1	-
H9, H11	6,68	d	2	8,0	6,68	d	2	8,33
H8, H12	7,03	d	2	8,0	7,00	d	2	8,33
OH	7,62	s	1	-	7,61	s	1	-
H3	9,12	s	1	-	9,10	s	1	-
H1	9,34	s	1	-	9,33	s	1	-

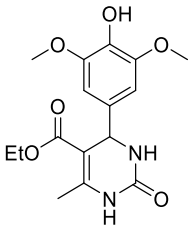
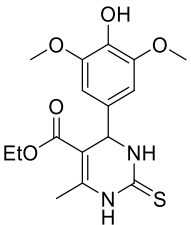
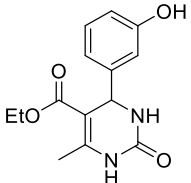
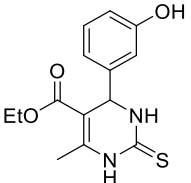
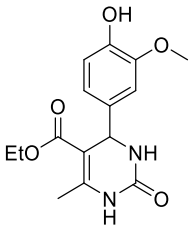
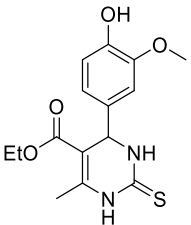
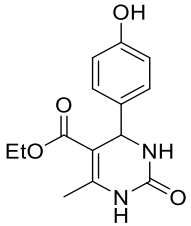
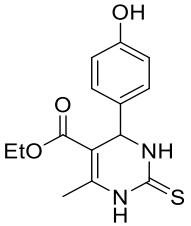
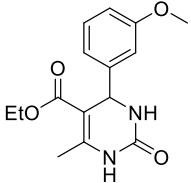
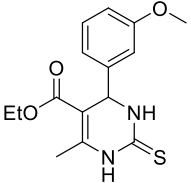
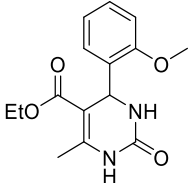
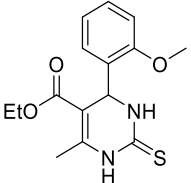
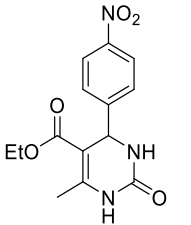
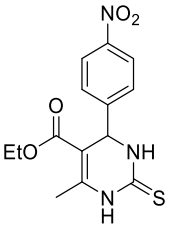
^a Resultados de DA SILVA *et al.*, 2011, utilizados para comparação *m = multiplicidade, I = integração, J = acoplamento, t = tripleto, s = simpleto, q = quarteto, sl = sinal largo, m = multipeto. FONTE: Elaborado pela autora.

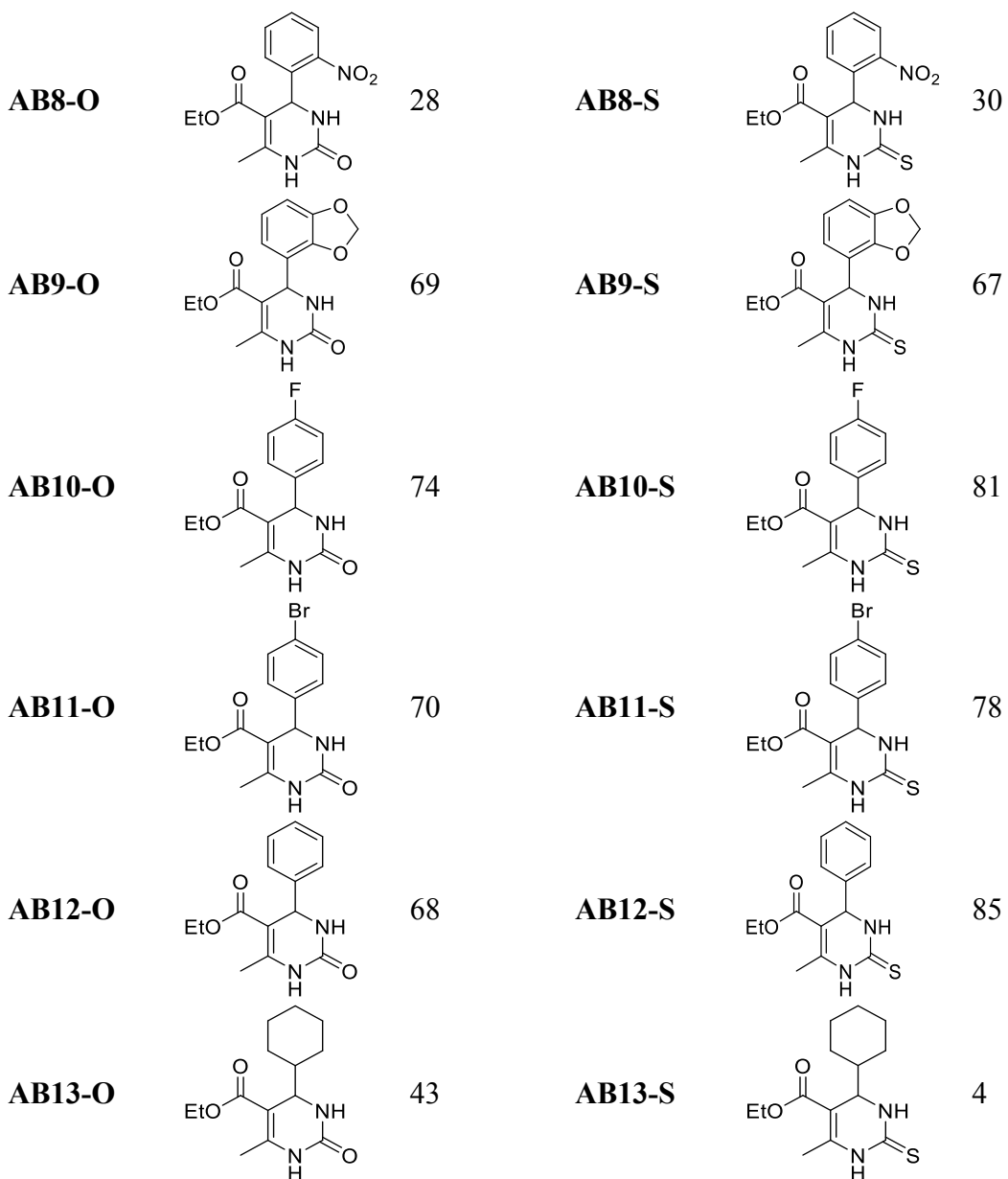
O tripleto com deslocamento em 1,09 ppm integrado para 3 hidrogênios foi atribuído ao hidrogênios do CH_3 derivado do acetoacetato de etila inserido à estrutura de **AB4-O**. Os simpletos com deslocamento em 7,62 e 9,34 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados à nitrogênio derivado da ureia inserida à estrutura de **AB4-O**, o sinal largo em 5,04 ppm é característico do hidrogênio CH do anel pirimidínico, e finalmente os sinais entre 6,68-7,03 ppm foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos derivados da inserção do derivado do aldeído inserido à estrutura de **AB4-O**. Esses sinais confirmam a estrutura proposta para **AB4-O**.

Além disso, no espectro obtido na região do IV para a amostra **AB4-O**, cabe citar bandas observadas em 3504 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação O-H, em 3355 cm^{-1} e 3270 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos das ligações N-H, e em 1668 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C=O, que corroboram a estrutura inicialmente proposta.

Dentre os catalisadores avaliados, o **NbOPO₄(400)** apresentou baixa atividade catalítica e pouca robustez pois para a síntese dos compostos **AB2-O**, **AB2-S** e **AB6-S** foram obtidos rendimentos entre 23-36%, em contrapartida o catalisador **[BIMBS][Cl]** apresentou uma melhor atividade catalítica e maior robustez sendo assim, ele foi utilizado para a síntese de uma série de adutos de Biginelli (Tabela 8, pág. 51).

Tabela 8: Rendimentos de adutos de Biginelli isolados obtidos *via* catálise utilizando o líquido iônico [BIMBS][Cl]

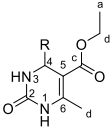
Substância	Estrutura	Rendimento (%)	Substância	Estrutura	Rendimento (%)
AB1-O		26	AB1-S		47
AB2-O		52	AB2-S		46
AB3-O		39	AB3-S		25
AB4-O		71	AB4-S		52
AB5-O		73	AB5-S		81
AB6-O		55	AB6-S		92
AB7-O		61	AB7-S		60



^aReagentes e condições: Aldeído, acetoacetato de etila, ureia ou tiourea (1:1,5:1,5, respectivamente) e [BIMBS][Cl] (20 mol%) sob irradiação de micro-ondas [MO (potência máxima 250 Watts, 90 °C, tempo de rampa: 2min, tempo de reação: 10 min)] no DISCOVER CEM®. Rendimentos isolados.
FONTE: Elaborado pela autora.

Foi possível obter 26 adutos de Biginelli que foram identificados e caracterizados de acordo com a literatura. O carbono e hidrogênio na posição 4 (Tabela 9, pág. 53) na estrutura dos ABs é bastante característico, pois eles configuram a união dos fragmentos oriundos do aldeído, da ureia/tiourea e do dicarbonílico. Sendo assim, na Tabela 9 (pág. 53) estão descritos os deslocamentos atribuídos para o C4 e H4, experimental e na literatura.

Tabela 9: Evidência da formação dos ABs por RMN e comparação dos dados obtidos com os previamente reportados na literatura

Substâncias	Experimental		Literatura		Referências
	H4 ^a	C4 ^b	H4 ^a	C4 ^b	
					
AB1-O	5,08 ^e	53,8 ^f	5,07 ^e	53,8 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2012
AB1-S	5,11 ^e	53,8 ^f	5,11 ^e	53,9 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2012
AB2-O	5,06 ^g	53,9 ^h	5,07 ⁱ	54,3 ^j	PASUNOOTI <i>et al.</i> , 2011
AB2-S	5,01 ^e	54,0 ^f	5,12 ^k	53,7 ^l	KOLB <i>et al.</i> , 2009
AB3-O	5,06 ^e	53,6 ^f	5,07 ^e	53,3 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2011
AB3-S	5,09 ^e	53,7 ^f	5,08 ^e	55,5 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2011
AB4-O	5,04 ^e	53,8 ^f	5,12 ^g	53,54 ^h	SUJATHA <i>et al.</i> , 2006
AB4-S	5,06 ^e	53,6 ^f	5,07 ^k	55,7 ^l	KOLB <i>et al.</i> , 2009
AB5-O	5,12 ^e	53,8 ^f	5,12 ^e	53,8 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2011
AB5-S	5,15 ^e	53,8 ^f	5,16 ^e	54,2 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2011
AB6-O	5,49 ^e	48,9 ^f	5,49 ^m	49,3 ^m	DEBACHE <i>et al.</i> , 2008
AB6-S	5,50 ^g	49,5 ^h	5,49 ^e	49,4 ^f	RUSSOWSKY <i>et al.</i> , 2006
AB7-O	5,28 ^e	53,7 ^f	5,27 ^e	53,6 ^f	KAPOOR <i>et al.</i> , 2006
AB7-S	5,39 ^e	53,7 ^f	5,45 ^k	51,6 ^l	MOBINIKHALEDI, A.; <i>et al.</i> , 2006
AB8-O	5,14 ^g	49,4 ^h	5,83 ^g	58,97 ^h	SUJATHA <i>et al.</i> , 2006
AB8-S	5,95 ^g	49,2 ^h	5,90 ^k	49,3 ^l	MOBINIKHALEDI, A.; <i>et al.</i> , 2006
AB9-O	5,07 ^e	53,7 ^f	ⁿ	ⁿ	-
AB9-S	5,09 ^e	53,7 ^f	ⁿ	ⁿ	-
AB10-O	5,14 ^e	53,4 ^f	5,16 ^e	53,4 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2011
AB10-S	5,18 ^g	53,4 ^h	5,18 ^e	53,4 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2012
AB11-O	5,13 ^e	59,6 ^f	5,12 ⁱ	54,1 ^j	PASUNOOTI <i>et al.</i> , 2011
AB11-S	5,15 ^e	59,7 ^f	5,15 ^g	53,5 ^h	JEONG, YEON TAE, 2010
AB12-O	5,14 ^g	54,0 ^h	5,14 ^e	55,7 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2011
AB12-S	5,18 ^g	66,9 ^h	5,17 ^e	54,1 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2012
AB13-O	3,92 ^e	55,0 ^f	3,91 ⁱ	55,4 ^j	PASUNOOTI <i>et al.</i> , 2011
AB13-S	3,94-3,98 ^e	55,3 ^f	3,90-4,26 ^e	55,3 ^f	DA SILVA, <i>et al.</i> , 2012

^aRMN de ¹H. ^b RMN de ¹³C. ^d DMSO-*d*₆. ^e 200 MHz. ^e 50 MHz. ^g400 MHz, ^h100 MHz, ⁱ300 MHz, ^j125 MHz, ^k500 MHz, ^l250 MHz, ^mnão mencionou o campo, ⁿ RMN não está descrito na literatura. FONTE: elaborado pela autora

Em resumo, não foi encontrada uma evidência coerente sobre o efeito do substituinte no aldeído na reação, contudo pode-se afirmar que em adutos de Biginelli com grupos retiradores de densidade eletrônica foi observado um rendimento médio de 58% para os derivados da ureia e 62% nos derivados da tiourea. E para os adutos derivados de aldeídos com grupos doadores de densidade eletrônica foi observado um rendimento médio de 55% para os derivados da ureia e 58% para os derivados da tiourea (Tabela 8, pág. 51).

Nas reações de baixo rendimento, não foram identificados por cromatografia em camada delgada (CCD) a formação de outros produtos, apenas a presença dos reagentes que não foram consumidos. A única exceção foi a reação para a obtenção do **AB13-S** que forneceu uma mistura complexa não sendo possível a identificação dos subprodutos formados.

4.4 – Conclusão

Ambos os catalisadores avaliados foram capazes de catalisar a reação modelo, contudo o **[BIMBS][Cl]** foi 1,3 vezes mais eficiente e mais robusto que o **NbOPO₄** e, além disso, foi 2,2 vezes melhor que a reação não catalisada. As condições de reação determinadas para o **[BIMBS][Cl]** foram a concentração de 20 mol% de catalisador, na ausência de solvente, durante 10 min, a 90 °C usando o aquecimento por irradiação de micro-ondas e obteve-se 26 adutos de Biginelli com rendimentos entre 4 - 92%.

CAPÍTULO V – Estudo de interação e mecanismo de inibição da urease por adutos de Biginelli

Neste capítulo, foram avaliados quanto à inibição da urease, uma seleção de adutos de Biginelli contendo grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica. Em seguida, foram determinados e discutidos os parâmetros de interação molecular dos dois inibidores de maior constante de ligação. A síntese e caracterização dessas substâncias foram descritas no capítulo IV.

5.1 - Métodos para a investigação da interação entre proteína e ligante

Ao misturar uma proteína (P) e um ligante (L), em solução, após um certo tempo, é estabelecido um sistema em equilíbrio contendo o complexo proteína/ligante (PL) bem como os reagentes na forma livre. Os ligantes são definidos, nesse contexto, como qualquer substância capaz de ligar a uma proteína com alta especificidade e afinidade (DU *et al.*, 2016). A taxa que essa associação ocorre é conhecida como constante de ligação k_b que é a razão da constante de equilíbrio de formação do complexo enzima/ligante (k_f) pela constante de dissociação desse complexo (k_d), também podendo ser escrita em razão da concentração como pode ser visto na Equação 1 (DU *et al.*, 2016).

$$k_b = \frac{k_f}{k_d} = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} \quad \text{Equação 1}$$

onde, k_b é a constante de ligação, [P] é a concentração da proteína, [L] concentração do ligante e [PL] concentração do complexo proteína/ligante.

Se a interação entre uma enzima e um ligante é espontânea, a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) é negativa e pode ser escrita em termos de k_b nas condições padrões (ligante e proteína a 1 M, temperatura de 298 K e 1 atm de pressão) como na Equação 2 (pág. 56).

$$\Delta G^{\circ} = - R T \ln k_b \quad \text{Equação 2}$$

onde R é a constante de gases ideais, T a temperatura e o k_b é a constante de ligação padrão.

Para uma variação de ΔG , em qualquer momento durante a reação, tem-se a Equação 3.

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + R T \ln Q \quad \text{Equação 3}$$

onde Q é a razão entre a concentração do complexo proteína/ligante e o produto das concentrações do ligante e da proteína, portanto no equilíbrio o $\Delta G = 0$ e $Q = k_b$.

O ΔG ainda pode ser escrito em termos da entalpia e entropia (Equação 4)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Equação 4}$$

Onde ΔH é a variação da entalpia, T é a temperatura e ΔS a variação da entropia.

A entalpia de ligação é definida, nesse contexto, como a mudança de energia do sistema quando ligantes se ligam à proteína. Essa energia se refere à formação de interações não covalentes (interações de Van de Waals, ligações de hidrogênio, par iônico, interações polares e apolares) na interface do ligante (DU *et al.*, 2016). Quando a variação de entalpia é negativa, o fenômeno é exotérmico e a formação do complexo é energeticamente favorável por um incremento das interações não covalentes. Quando a variação de entalpia é positiva, o fenômeno é endotérmico e a quebra de interações não-covalentes prevalece (DU *et al.*, 2016). De fato, as interações entálpicas são resultados de interações individuais que se formam e se quebram entre proteína/solvente, ligante/solvente e proteína/ligante/solvente. A mudança na entalpia é resultado da combinação de todas essas pequenas contribuições.

A entropia é definida como sendo a medida de como esse calor será distribuído sobre todo o sistema, podendo também ser analisada como a medida da desordem dos átomos do sistema estudado (DU *et al.*, 2016). A entropia positiva é interpretada como uma maior desordem do sistema (maior grau de liberdade) e a entropia negativa é interpretada como um sistema mais organizado (menor grau de liberdade). De fato, as interações entrópicas são resultados da combinação das variações de entropia do solvente, da conformação da proteína e da perda de

graus de rotação e translação dos átomos na proteína e no ligante com a formação do complexo.

A discriminação entre as contribuições entálpicas e entrópicas são importantes no campo de desenvolvimento de novas substâncias e, visando à obtenção de um ΔG bem negativo, pode-se modular as possíveis interações intermoleculares entre a proteína e o ligante no complexo, bem como as possíveis mudanças de conformação da proteína ocasionadas por essas interações (BARREIRO; FRAGA, 2015; DU *et al.*, 2016)

Existem várias técnicas utilizadas para investigar a interação proteína/ligante. Essas técnicas são divididas em dois grandes grupos: os que estudam ligantes e proteína de maneira separada avaliando a concentração do ligante ou da proteína, e aquelas que investigam as variações das propriedades do complexo proteína/ligante (VUIGNIER *et al.*, 2010).

Dentre as estratégias técnicas que visam ao estudo por separação entre a proteína e o ligante cabe citar: o equilíbrio de diálise, que visa à utilização de uma membrana permeável ao ligante e impermeável à proteína e ao complexo proteína/ligante, permitindo que, soluções contendo a proteína e o ligante sejam separadas após um determinado tempo de incubação; a ultrafiltração é bem parecida com o equilíbrio de diálise e ocorre com aplicação de pressão ao sistema; a ultracentrifugação é utilizada baseando na condição de que a proteína e o complexo proteína/ligante serão sedimentados após a centrifugação e o ligante quantificado na água-mãe; o ensaio de permeabilidade de membrana paralela (PAMPA) é utilizado quando uma solução contendo o ligante e uma solução contendo apenas tampão são separados por uma membrana sintética permeável ao ligante. Após um tempo de incubação a concentração do ligante que foi permeável é medida na presença e na ausência da proteína; a cromatografia líquida é utilizada em duas versões: por exclusão de tamanho ou por afinidade - na exclusão por tamanho, o tempo de retenção do ligante e da proteína são diferentes, sendo determinados comparando a injeção da solução pura de cada substância e depois a injeção da mistura contendo complexo proteína/ligante. Este, por ser muito grande, não é capaz de passar pelos poros da coluna, sendo assim é eluído primeiro. Na cromatografia por afinidade, a proteína está presente na fase estacionária da coluna. Os ligantes são injetados e aquele que tiver maior tempo de eluição é o que tem maior afinidade pela proteína; a Eletroforese capilar é utilizada com uma solução da proteína com diferentes concentrações

do ligante que são injetadas e os tempos de mobilidade eletroforética do ligante e do complexo formado são avaliados. (VUIGNIER *et al.*, 2010).

Dentre os métodos que avaliam o complexo proteína/ligante temos: os métodos espectroscópicos: UV-visível, infravermelho, RMN, dispersão rotativa óptica (ORD) e dicroísmo, todos baseados na perturbação eletrônica e nos níveis espectroscópicos de energia do ligante e da proteína. Esses métodos são mais completos, pois fornecem a constante de afinidade, informação da estrutura tridimensional e da conformação do complexo em solução (VUIGNIER *et al.*, 2010). A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é utilizada quando pequenas quantidades do ligante são adicionadas à proteína e o calor liberado é monitorado; calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para avaliar a estabilidade da proteína e a conformação partindo da premissa de que a proteína ligada tem temperatura de desnaturação mais elevada que a proteína livre; a ressonância plasmônica de superfície é baseada na mudança de refração do complexo enzima/ligante e é utilizada quando se tem a proteína ancorada e se avaliam as mudanças no índice de refração com a adição de um fluxo de uma solução contendo o ligante (VUIGNIER *et al.*, 2010)

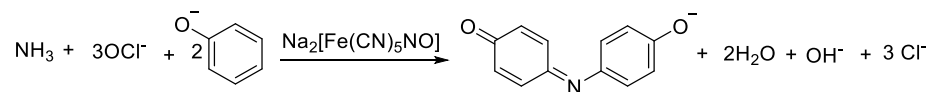
Neste contexto, será dado destaque para as técnicas espectrométricas de colorimetria (triagem de inibição e cinética - método do indofenol) e de fluorescência (mecanismo de interação e parâmetros termodinâmicos, ressonância de transferência de energia, avaliação da conformação da urease, competição – estudos de *quenching*) que foram as técnicas utilizadas neste estudo.

5.1.1 – Método do indofenol para a quantificação de amônio

O método colorimétrico do indofenol é bastante utilizado para estudos de interação da enzima urease e potenciais inibidores (WEATHERBURN, 1967). Esta técnica se baseia na identificação e quantificação da amônia gerada na hidrólise da ureia pela enzima urease na presença e na ausência do potencial inibidor. A amônia formada é oxidada pelo hipoclorito fornecendo o cloreto de amônia que sofre o ataque de dois equivalentes do fenolato, formando assim o indofenol (Figura 31, pág. 59), substância que possui coloração azul e absorção máxima em 630 nm. A quantidade de indofenol formada é proporcional a

concentração de amônio e inversamente proporcional à inibição enzimática (WEATHERBURN, 1967).

Figura 31: Identificação de amônia pelo método do indofenol.



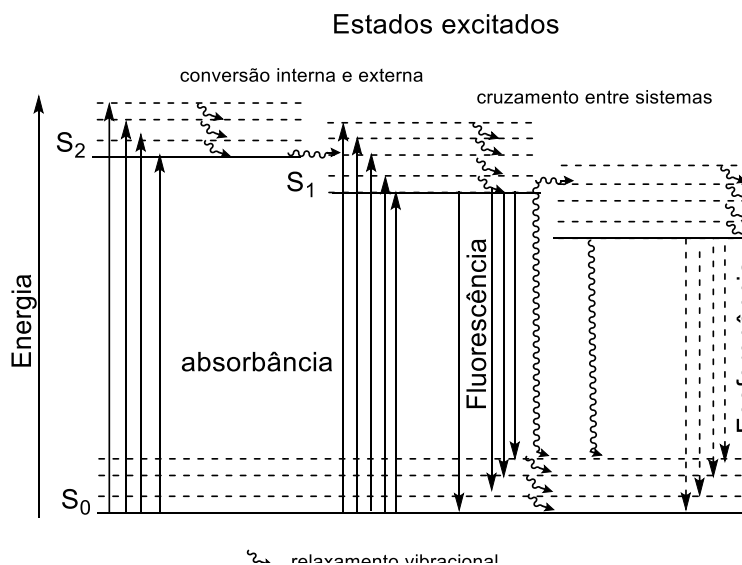
FONTE: adaptado de WEATHERBURN, 1967.

5.1.2 – Fluorescência

A técnica de fluorescência apresenta alta sensibilidade, fácil operação e seletividade visto que nem todas substâncias são capazes de emitir fluorescência (SKOOG; WEST, 1982). Essa técnica é muito utilizada para estudos de interação entre proteínas e fármacos (em geral, substâncias pequenas) (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

A absorção de um fóton de luz por uma substância no estado fundamental S_0 promove elétrons para níveis superiores de energia. Quando o elétron retorna para o estado fundamental, uma parte da energia absorvida é reemitida, e esse fenômeno é conhecido como luminescência (SIERRA *et al.*, 1996). O fenômeno recebe o nome de fluorescência quando a energia é reemitida a partir do primeiro estado *singlete* excitado (S_1) do diagrama de Jablonski (Figura 32, pág. 60). O fenômeno de fluorescência dura cerca de 10^{-5} - 10^{-10} s, e geralmente é observado em processos de transição $\pi^* \rightarrow \pi$ e $\pi^* \rightarrow n$ (SKOOG; WEST, 1982). Nesse sentido, o arranjo eletrônico da substância contribui para a manifestação do fenômeno de fluorescência. As substâncias, ou parte de uma estrutura, que são capazes de emitir fluorescência são chamadas de fluoróforos e a fluorescência delas depende também de fenômenos externos como temperatura, solvente e adição de substituintes (SIERRA *et al.*, 1996; SKOOG; WEST, 1982).

Figura 32: Diagrama de Jablonski dos estados de energia.



FONTE: adaptado de SOTOMAYOR *et al.*, 2008.

Os estudos de interação por fluorescência baseiam-se no monitoramento da intensidade de sinal de fluorescência na presença e na ausência do ligante. Pode-se monitorar o sinal intrínseco da proteína ou, em casos mais raros, utilizar um corante como, por exemplo, a tioflavina T, que é ativa para fibrilas amiloides e pode diferenciá-las de oligômeros (MUNISHKINA; FINK, 2007).

Estudar o sinal intrínseco da proteína é mais vantajoso, pois fornece informações sobre as alterações na estrutura da macromolécula na presença do ligante (MUNISHKINA; FINK, 2007). Além disso, é possível determinar importantes parâmetros como a constante de ligação (k_b), os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS , ΔG), identificar forças intermoleculares envolvidas no processo de ligação, determinar as distâncias intermoleculares, proporção de interação com o ligante, sugerir o sítio de ligação, entre outros parâmetros (KANDAGAL *et al.*, 2006; LAGE *et al.*, 2018; MUNISHKINA; FINK, 2007).

O sinal intrínseco nas proteínas é relacionado com os resíduos de aminoácidos de triptofano (Trp) e tirosina (Tyr). O resíduo de fenilalanina (Phe) também possui fluorescência, contudo o rendimento quântico desse resíduo é tão baixo que sua contribuição não é tão relevante nos

estudos de interação (Tabela 10) (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; MUNISHKINA; FINK, 2007).

Tabela 10: Propriedades de fluorescência de aminoácidos em solução aquosa a pH neutro

Aminoácido	Absorção		Fluorescência	
	λ (nm)	Absortividade (ϵ)	λ (nm)	Rendimento quântico (Φ_F)
Triptofano	280	5600	348	0,20
Tirosina	274	1400	393	0,14
Fenilalanina	257	200	282	0,04

FONTE: adaptado de GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014.

Ao interagir uma proteína com um ligante, a fluorescência intrínseca da proteína será atenuada devido às interações entre eles. Esse fenômeno é conhecido como *quenching* (LAKOWICZ, 1999). O *quenching* pode ser definido como a supressão da intensidade do sinal de fluorescência devido a: rearranjos moleculares, transferências de energia ou elétrons, formação de complexos no estado fundamental e extinção por colisões. Uma substância que interage com um fluoróforo e o desativa inibindo a fluorescência é denominada de *quencher* (Q) (LAKOWICZ, 1999). O mecanismo de *quenching* é denominado estático quando se tem a formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental (a distância entre o fluoróforo e o *quencher* é fixa) e é denominado mecanismo de *quenching* dinâmico quando o *quencher* colide com o fluoróforo no estado excitado durante a difusão e ocorre a supressão da intensidade de fluorescência. Esse fenômeno pode ser descrito matematicamente pela equação de Stern-Volmer (Equação 5) (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; LAKOWICZ, 1999; MUNISHKINA; FINK, 2007).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Equação 5}$$

Onde F_0 é a fluorescência da proteína livre, F a fluorescência da proteína com o *quencher*, k_q é a constante de *quenching* de velocidade difusional bimolecular, τ_0 é a média do tempo de vida (10^{-8} s), $[Q]$ é a concentração do ligante (*quencher*), e o K_{SV} é a constante de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 1999).

O estudo do K_{SV} em diferentes temperaturas classifica o tipo de *quenching*. A difusão é favorecida com o aumento da temperatura, então quando o K_{SV} aumenta com o aumento da temperatura o processo é de *quenching* dinâmico (SHU *et al.*, 2015). Quando o K_{SV} diminui com o aumento da temperatura é indicativo de *quenching* estático, pois a estabilidade do complexo proteína/ligante no estado fundamental diminui com o aumento da temperatura (SHU *et al.*, 2015).

Uma outra maneira de classificar o tipo de *quenching* em um sistema é usando o k_q , que possui um valor referencial de $2,0 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Valores de k_q que são maiores que a referência são classificados como *quenching* estático e valores de k_q menores são classificados como *quenching* dinâmico (LI, XIANGRONG *et al.*, 2013; SHU *et al.*, 2015).

Pelos estudos de *quenching* também é possível determinar a constante de ligação k_b usando a curva de duplo logaritmo dada pela Equação 6 (LAGE *et al.*, 2018)

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação 6}$$

Onde, F_0 e F são as respectivas intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, k_b é a constante de ligação, n é o número de sítios na enzima e $[Q]$ a concentração do ligante (LAGE *et al.*, 2018).

Ao obter o k_b em diferentes temperaturas e trabalhando matematicamente a Equação 2 (pág. 56) e a Equação 4 (pág. 56), tem-se a relação da equação de Van't Hoff para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos (LAGE *et al.*, 2018)

$$\log K_b = - \frac{\Delta H}{R} \times \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação 7}$$

Onde, T é a temperatura em Kelvin (K) e R é a constante de gás ideal. A análise dos parâmetros termodinâmicos permite inferir sobre a característica das forças intermoleculares

presentes na interação proteína/ligante como mostrado na Tabela 11 para cada relação de ΔH e ΔS em sistemas espontâneos (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981)

Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos relacionados com o tipo de interação intermolecular

Interação intermolecular	ΔH	ΔS
Forças hidrofóbicas	Positivo	Positivo
Forças eletrostáticas	Negativo	Positivo
Ligação de hidrogênio e interação de van der Waals	Negativo	Negativo

FONTE: adaptado de ROSS; SUBRAMANIAN, 1981.

Além do tipo de interação, com o estudo de fluorescência é possível avaliar mudanças na estrutura nativa de uma proteína no complexo proteína/ligante usando a técnica de fluorescência tridimensional. Quando se considera o gráfico 3D de uma proteína, avalia-se 3 picos: o primeiro mais intenso é referente ao espalhamento Rayleigh ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), o segundo pico mais intenso é atribuído aos resíduos de triptofano e tirosina, enquanto que o terceiro é atribuído às transições $\pi^* \rightarrow \pi$ da carbonila presente nas ligações peptídicas (GUO *et al.*, 2014; LAGE *et al.*, 2018; SAMANTA; PAUL; GUCHHAIT, 2011). Quando se compara o gráfico de fluorescência 3D da proteína na presença e na ausência do ligante, pode-se inferir sobre mudanças na estrutura nativa ao monitorar a mudança de intensidade dos picos 2 e 3.

Para analisar a estrutura da proteína de maneira mais seletiva, tem-se a técnica de fluorescência sincronizada. Essa técnica é utilizada para analisar seletivamente um fluoróforo em uma mistura (LLOYD, 1971). Na fluorescência convencional, o espectro de emissão é obtido pela varredura em uma determinada faixa de comprimento de onda λ_{em} e irradiação de excitação fixa λ_{ex} (SOTOMAYOR *et al.*, 2008). Na fluorescência sincronizada, os monocromadores de excitação e emissão movimentam-se de maneira simultânea mantendo a diferença entre eles constante ou variável (KABIRI *et al.*, 2012). Se a varredura for constante, tem-se um $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) que pode ser ajustado para a identificação seletiva de um fluoróforo (KABIRI *et al.*, 2012; SOTOMAYOR *et al.*, 2008). Em proteínas, é possível obter informações seletivamente dos microambientes dos resíduos de Trp ou Tyr usando $\Delta\lambda = 60$ nm ou $\Delta\lambda = 15$ nm, respectivamente (WANG, YAN-QING *et al.*, 2007). A

mudança na polaridade na vizinhança desses resíduos resulta em um deslocamento no máximo do espectro de emissão. Quando o deslocamento no máximo de emissão é na direção de maiores comprimentos de onda, atribui-se a um aumento da polaridade na região investigada do complexo proteína/ligante, quando ocorre um deslocamento no máximo de emissão para comprimento de ondas menores, é atribuído a um aumento na hidrofobicidade na região investigada (WANG, Q.; PEI, 2010). E, para reconhecer qual dos sistemas foi mais afetado, realiza-se o cálculo da constante de Stern-Volmer (K_{SV} -Equação 5) e é atribuída maior interação para aquele sistema que tiver maior K_{SV} (SUN, YANG *et al.*, 2012).

Para investigar as interações entre a proteína e um ligante, é comum fazer o uso de marcadores que têm interação com um sítio reconhecido da proteína e, assim, avaliar o sítio preferencial de ligação do ligante testado. Avalia-se a intensidade de fluorescência do complexo proteína/marcador adicionando incrementos do ligante a ser avaliado. Em seguida, calcula-se a constante de ligação aparente (k_b') com o marcador, além do k_b na ausência do marcador. Aquele marcador que tiver menor valor na razão k_b'/k_b é o que influencia mais efetivamente no sítio de ligação no qual a substância teste atua (LAGE *et al.*, 2018; NI; SU; KOKOT, 2006).

A distância entre o fluoróforo e o ligante pode ser calculada pela técnica de transferência de energia por ressonância de Föster (FRET). Essa transferência de energia ocorre quando um fluoróforo que está no estado excitado (doador) pode transferir a energia para um ligante (acceptor) e um fóton de fluorescência é transmitido pelo acceptor (LAKOWICZ, 1999). A condição necessária para essa transmissão de energia é que o espectro de transmissão do doador sobreponha o espectro de absorção do acceptor (CHIRIO-LEBRUN; PRATS, 1998). Além disso, o FRET é baseado na orientação relativa entre os dipolos de transição entre o acceptor e o doador, bem como na distância entre eles (1-8 nm) (CHIRIO-LEBRUN; PRATS, 1998). A energia transferida neste experimento é dada pela Equação 8

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação 8}$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência do doador na respectiva presença ou ausência de ligante, (E) é a fração de energia transferida do doador para o receptor e o R_0 é a distância crítica (quando 50% da emissão de energia do doador é transferida para o receptor) matematicamente descrita pela Equação 9

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad \text{Equação 9}$$

Onde K^2 é a orientação do dipolo do doador e do receptor, N é referente ao índice de refração, Φ é o rendimento quântico de fluorescência da proteína e J representa a área de sobreposição do doador com o espectro normalizado de emissão em relação ao espectro de absorção do receptor. A área de sobreposição (J) pode ser calculada pela Equação 10

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} \quad \text{Equação 10}$$

Onde $F(\lambda)$ é o doador de fluorescência e $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção do receptor que pode ser obtido pela lei de Beer (CHIRIO-LEBRUN; PRATS, 1998).

A enzima urease é bastante relevante e estudos pela busca de inibidores eficientes são recorrentes (CAPÍTULO I - pág.1). O uso das técnicas de fluorescência e colorimetria podem auxiliar na elucidação do mecanismo de inibição da urease pelos adutos de Biginelli, e assim, servir de ponte para o desenvolvimento e desenho substâncias que possam interagir de maneira ainda mais potente contra a urease.

5.2 – Objetivos

Realizar uma triagem quanto a inibição de urease utilizando uma amostragem representativa, com grupos substituintes doadores e retiradores de elétrons, dos adutos de Biginelli, além de determinar *in vitro* os parâmetros de interação entre essas substâncias, por meio da seguinte estratégia:

- Triagem de uma amostra representativa dos adutos de Biginelli pelo método colorimétrico do indofenol;
- Selecionar substâncias para o estudo do mecanismo por fluorimetria;
- Determinar a estequiometria dos complexos urease/AB, bem como, os parâmetros de ligação (K_{SV} , k_q e k_b);
- Determinar os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS);
- Determinar o sítio de ligação dos ABs (teste de competição), variação da conformação da proteína (fluorescência sincronizada e tridimensional);
- Calcular a distância de “FRET”.

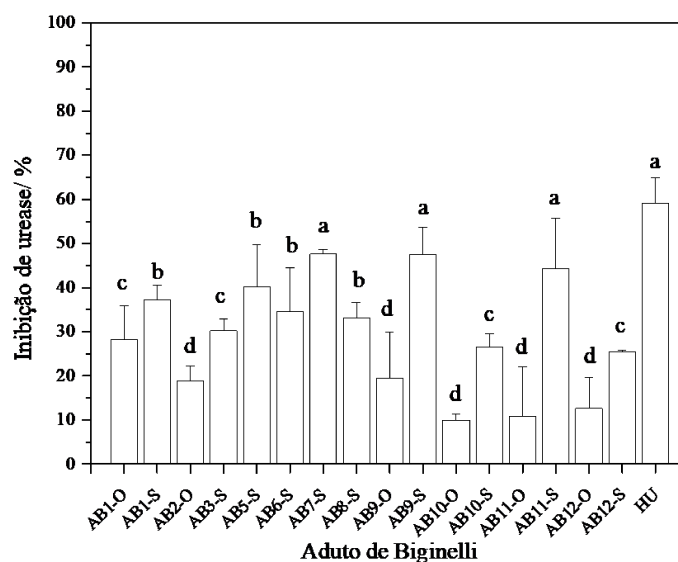
5.3 – Resultados e Discussão

Foi realizado um estudo de triagem de uma seleção representativa de adutos de Biginelli que apresentam grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica e que foram solúveis em etanol (**AB1-O**, **AB1-S**, **AB2-O**, **AB3-S**, **AB5-S**, **AB6-S**, **AB7-S**, **AB8-S**, **AB9-O**, **AB9-S**, **AB10-O**, **AB10-S**, **AB11-O**, **AB11-S**, **AB12-O**, **AB12-S**). Os compostos selecionados foram avaliados quanto à atividade de inibição frente à enzima urease e como controle foi utilizado a hidroxiiureia (Figura 33, pág. 67).

Os **ABs** derivados da tioureia apresentaram uma maior inibição frente à atividade da enzima urease (27 - 47%) se comparados com os derivados da ureia (10 - 29%) e essa tendência está de acordo com a já verificada por outros autores (MODOLO *et al.*, 2016; RASHID *et al.*, 2013). Ao avaliar os resultados de inibição estatisticamente com o teste de Scott Knott (significância de 0,05) verificam-se que as substâncias **AB7-S**, **AB9-S** e **AB11-S** possuem

atividade inibitória com a mesma significância que o controle hidroxureia. Esse resultado é intrigante, pois nesse grupo de **ABs** tem representantes doadores de densidade eletrônica (**AB9-S**, **AB11-S**) e retiradores de densidade eletrônica (**AB7-S**). Com a finalidade de compreender melhor os mecanismos que influenciam nas atividades inibitórias dos **ABs** frente à enzima urease, foram escolhidos os 4 compostos mais promissores **AB5-S**, **AB7-S**, **AB9-S**, **AB11-S**, além do **AB12-S** que não possui substituinte no anel para comparar o efeito da estrutura base dos **ABs** na interação com a urease.

Figura 33: Efeito dos adutos de Biginelli (**AB**) na atividade da enzima urease de *jack bean*. O teste de triagem foi realizado usando a urease na concentração de 12,5 mU na presença de 0 ou 500 μ M de **AB** em tampão fosfato EDTA, pH 7, com teste estatístico de Scott Knott à significância de 0,05, cada letra representa um grupo diferente de significância



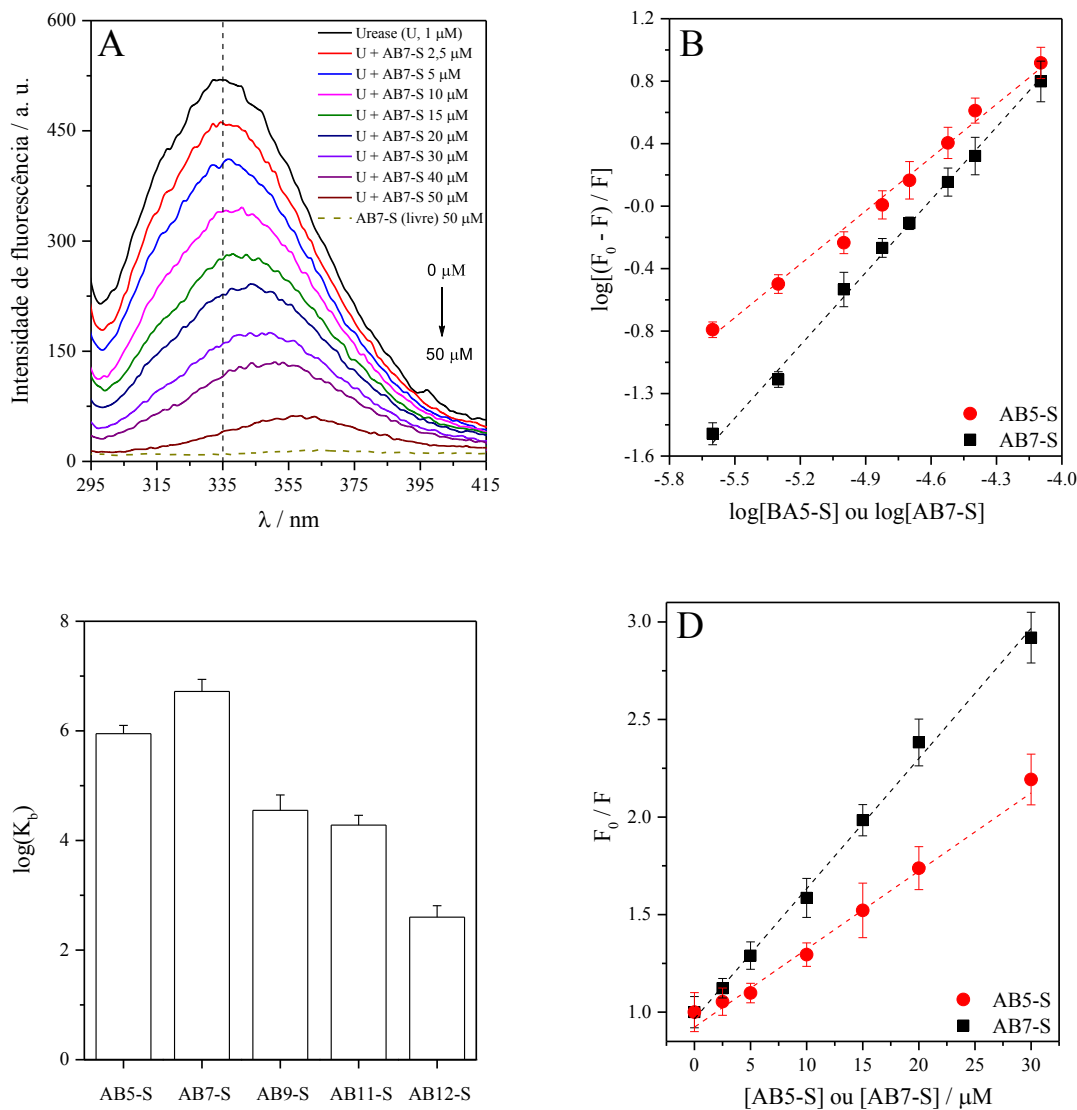
FONTE: disponibilizado pela Prof.^a Luzia Modolo (UFMG).

Sabe-se que a urease de *Canavalia ensiformis* (*jack bean*) contém 4 resíduos de Trp nas posições 495, 648, 708 e 728 e que em pH fisiológico esses resíduos são os principais contribuintes na fluorescência da enzima ($\Phi = 0,20$) quando comparados com os resíduos de Tyr ($\Phi = 0,14$) ou Phe ($\Phi = 0,04$) (Tabela 10, pág 61) (LAGE *et al.*, 2018; YAN-QING; HONG-MEI, 2012). Além disso, na proteína nativa, a emissão da Tyr geralmente é atenuada, possivelmente por sua interação com a cadeia de peptídeos ou por transferência de energia para o Trp (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014). Portanto, as investigações sobre as variações

nas intensidades de fluorescências dos resíduos de Trp sugerem mudanças conformacionais na estrutura da proteína nativa e fornecendo informações sobre as interações entre proteína/ligante (ZHANG; ZHANG; WANG, 2011).

Sendo assim, titulações espectrofluorimétricas da urease foram realizadas na ausência ou na presença de crescentes quantidades de **AB5-S**, **AB7-S**, **AB9-S**, **AB11-S** ou **AB12-S**. Os perfis espectrais obtidos foram semelhantes para todas as substâncias avaliadas e o gráfico obtido para o composto **AB7-S** está apresentado na Figura 34 – A (pág. 69). Verificou-se, analisando o perfil espectral obtido com a substância **AB7-S**, que a urease livre quando excitada a 280 nm apresentou uma banda larga e intensa em 335 nm (Figura 34 (A) - pág. 69), bem como uma diminuição na intensidade de fluorescência após a adição de incrementos de **AB7-S** no sistema, seguido de uma variação no comprimento de onda máximo de emissão na faixa de 335 - 345 nm. Essa redução na intensidade de sinal de fluorescência e o deslocamento do máximo de comprimento de onda na direção do vermelho podem ser atribuídas às mudanças conformacionais na estrutura da enzima (LI, TIAN *et al.*, 2016). Com os resultados obtidos, foram construídos gráficos de linearização da Equação 6 (pág. 62) para cada composto e foram apresentados os resultados obtidos para os compostos **AB5-S** e **AB7-S**, na Figura 34 - B (pág. 69), para fins ilustrativos. O exponencial na base 10 das inclinações obtidas nesses gráficos fornecem os k_b s que foram utilizados para a construção do gráfico C (Figura 34 - pág. 69). Percebe-se, então, que entre as substâncias avaliadas as que apresentaram interação mais forte com a urease foram a **AB5-S** e a **AB7-S**, que na triagem apresentaram inibição de 40,2 e 47,6%, respectivamente. Pode-se inferir, ainda, com base no k_b da substância **AB12-S**, que o núcleo base dos **ABs** é capaz de interagir com a enzima urease e que a presença de substituintes pode aumentar ainda mais essa interação. O gráfico D (Figura 34, pág. 69) foi construído utilizando a equação de Stern- Volmer (Equação 5 - pág. 61) e nele é possível verificar que as substâncias **AB5-S** e **AB7-S** apresentaram linearidade nas concentrações de 2,5 a 30 μ M.

Figura 34: Urease (1,0 μM) perfil de emissão espectral em diferentes concentrações de **AB7-S** (2,5 a 50 μM) em pH 7 e 30 $^{\circ}\text{C}$ (A). Curva duplo de logaritmo para o cálculo da constante de ligação (k_b) para **AB5-S** e **AB7-S** (B). Comparação das constantes de ligação de todos os **ABs** testados em relação a urease de *jack bean* (C). Curva de Stern-Volmer para os **AB5-S** e **AB7-S** (D). O desvio padrão foi calculado para 3 determinações.



FONTE: elaborado pela autora.

As substâncias de maiores k_b (**AB5-S** e **AB7-S**) foram utilizadas como modelo para o estudo de mecanismo de inibição enzimática. Os resultados desses estudos estão apresentados na Tabela 12 (pág.70) para as temperaturas 22, 30 e 38 $^{\circ}\text{C}$.

Tabela 12: Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre os adutos de Biginelli **AB5-S** ou **AB7-S** com a urease

Substância	T (°C)	Constante de Stern-Volmer			Parâmetros da constante de ligação			Parâmetros termodinâmicos		
		K _{SV} (10 ⁴ M ⁻¹)	r	k _q (10 ¹² M ⁻¹ s ⁻¹)	k _b (10 ⁶ M ⁻¹)	n	r	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
AB5-S	22	4,96 ± 0,14	0,9872	4,96	0,66 ± 0,03	1,36 ± 0,04	0,9862	-32,88		
	30	4,70 ± 0,10	0,9853	4,70	0,91 ± 0,10	1,22 ± 0,05	0,9944	-34,54	+28,37	+207,6
	38	4,46 ± 0,06	0,9887	4,46	1,20 ± 0,15	1,07 ± 0,03	0,9873	-36,20		
AB7-S	22	9,11 ± 0,26	0,9861	9,11	8,49 ± 0,46	1,29 ± 0,02	0,9971	-39,4		
	30	8,99 ± 0,15	0,9779	8,99	5,27 ± 0,52	1,23 ± 0,06	0,9873	-38,98	-45,19	-20,50
	38	8,30 ± 0,09	0,9891	8,30	3,29 ± 0,37	1,38 ± 0,02	0,9962	-38,91		

FONTE: elaborado pela autora.

A constante de ligação (k_b) expressa a força de interação entre o ligante e a proteína. Entre os adutos de *Biginellis* avaliados, o **AB7-S** apresentou interações mais fortes com a urease que **AB5-S** (Tabela 12, pág.70). Os valores de k_b de **AB5-S** e **AB7-S** foram na mesma ordem de grandeza que aqueles já reportados para o (*R*)-(+)-ácido úsnico ($3550 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$) (LAGE *et al.*, 2018) e Cu(II) ($389 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para $[\text{Cu(II)}] < 16 \text{ } \mu\text{M}$) (WANG, YAN-QING; ZHANG; ZHANG, 2011), e mais alto que o pentaclorofenol ($3,85 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a $32 \text{ }^\circ\text{C}$) (YAN-QING; HONG-MEI, 2012) e Cr(VI) ($19,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a $29 \text{ }^\circ\text{C}$) com a urease de *jack bean*. Entretanto, o objetivo desses autores foi utilizar urease como um marcador biológico para identificação da presença de contaminação, e não avaliar o potencial do pentaclorofenol, Cr(VI) ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) Cu(II) como inibidor de urease.

Ainda utilizando a Equação 6 (pág. 62) foi possível calcular o n que corresponde ao número de sítios ocupados pelo ligante na estrutura da urease. O valor de n variou de 1,07 e 1,38, indicando que as interações entre a estrutura da urease e esses ligantes acontecem na razão de 1:1.

De acordo com os resultados da Tabela 12 (pág. 70), os valores da constante de *quenching* (K_{SV}) diminuíram com o aumento da temperatura para ambos os ligantes avaliados. Então o processo de interação entre o **AB5-S** ou **AB7-S** e a urease ocorrem preferencialmente através de um mecanismo de *quenching* estático com formação de um complexo supramolecular enzima/ligante no estado fundamental (SANTANA *et al.*, 2019). Adicionalmente, os valores de k_q foram calculados (equação 5, pág 61) e foram observados que todos k_q são maiores que o valor referencial de $2,0 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ confirmando o mecanismo de *quenching* estático (SILVA *et al.*, 2018).

Usando-se a linearização da equação de Van't Hoff (Equação 7, pág. 62, Fig. Apêndice 1, pág. 127) nas amostras avaliadas em diferentes temperaturas foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos ΔG , ΔH e ΔS (Tabela 12, pág. 70). O ΔG negativo comprova que a interação entre os **AB** e a enzima é termodinamicamente espontânea e os valores de ΔH e ΔS permitem deduzir o tipo de forças de ligação envolvidas na interação inibidor/enzima (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Logo, as predominâncias de forças de ligação (não exclusivas) para o **AB5-S** foram interações hidrofóbicas ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$) e para o **AB7-S** foram ligações de hidrogênio e forças de van der Waals ($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$).

Também foram realizados os estudos de FRET com a finalidade de determinar a distância entre os resíduos de triptofano da urease (doador) e o aduto de Biginelli (receptor) no processo de transferência de energia devido à interação. Inicialmente, a área de sobreposição entre o espectro de fluorescência de urease livre e o espectro de absorção molecular das substâncias **AB5-S** ou **AB7-S** foram avaliados Fig. Apêndice 2 (pág. 127), e os parâmetros calculados do processo de FRET são mostrados na Tabela 13. A distância (r_0) entre o doador e o receptor foi calculada usando a Equação 8 (pág. 64) e a Equação 9 (pág. 65) para determinar a distância crítica (R_0) e o J foi calculado pela Equação 10 (pág. 65). Nesse caso foi utilizado $K^2 = 2/3$, $N = 1,336$ e $F = 1,50$ para urease (WANG, YAN-QING; ZHANG; ZHANG, 2011).

Tabela 13: Parâmetros de FRET para a interação entre os adutos de Biginelli **AB5-S** e **AB7-S**, todos a 5 μM

Substâncias	$J (10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1})$	E (%)	R_0 (nm)	r_0 (nm)
AB5-S	4,0	34	2,16	2,42
AB7-S	7,5	44	2,40	2,50

FONTE: elaborado pela autora.

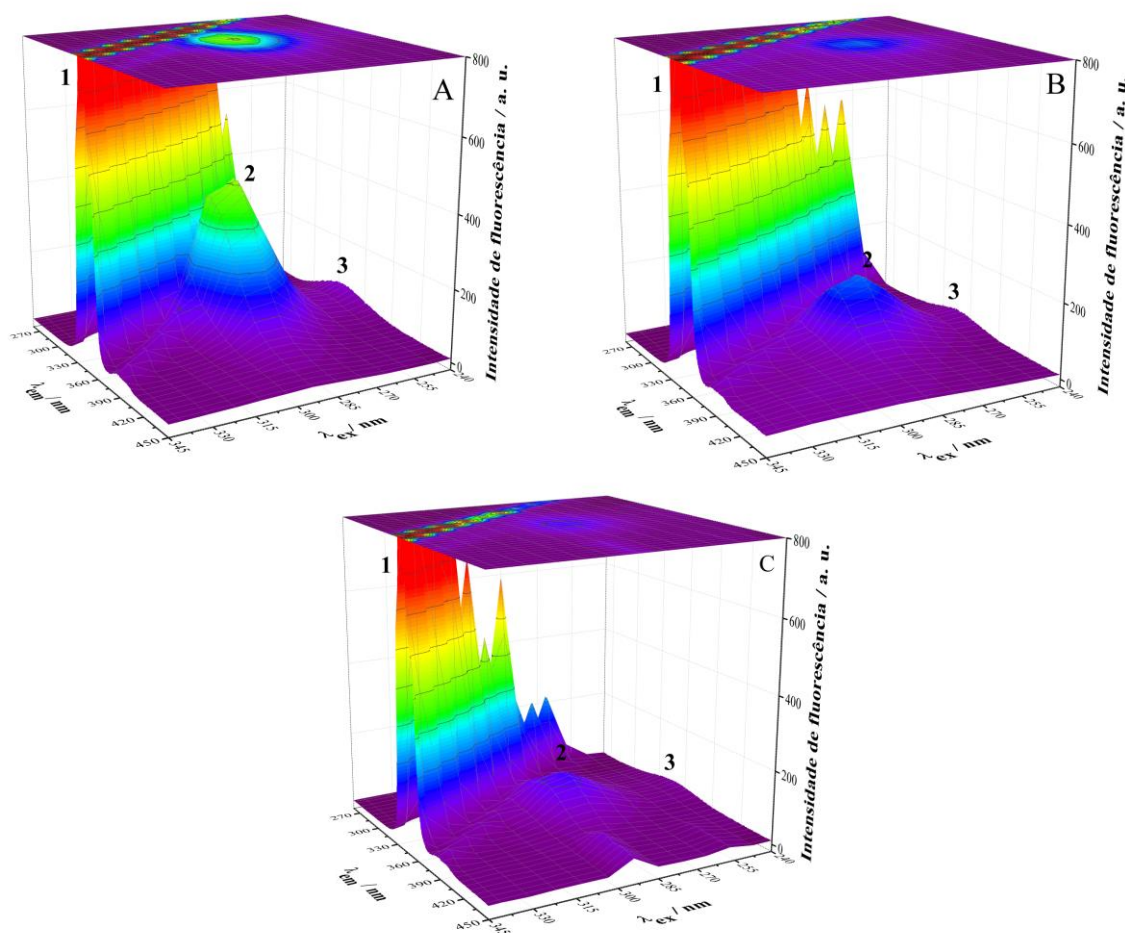
De acordo com os resultados da Tabela 13, a energia transferida (E) foi menor que 50% implicando que $R_0 < r_0$, e os valores das distâncias de r_0 para **AB5-S** e **AB7-S** são similares. A distância crítica entre r_0 para os adutos de Biginelli e os resíduos de triptofano (urease) foi menor que 8 nm, indicando que a energia transferida ocorre depois do processo de interação (SHU *et al.*, 2015). Uma vez avaliada a interação efetivamente com a urease, foi analisado se o processo levou a mudanças na conformação da enzima pelos estudos de fluorescência sincronizada e tridimensional.

5.3.1 – Avaliação na conformação da urease

O espectro de fluorescência tridimensional da urease na ausência ou presença dos compostos **AB5-S** ou **AB7-S** foram apresentados na Figura 35 (pág. 73). O gráfico de fluorescência tridimensional da urease livre apresenta um complexo pico chamado de 1 (Figura 35, pág. 73) que corresponde ao espalhamento Rayleigh, atribuído à radiação de re-emissão ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$) da água (solvente). O Pico 2 corresponde à emissão do resíduo de triptofano e o resíduo

de tirosina, enquanto que a emissão da cadeia polipeptídica é atribuída ao pico 3 (DANTAS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 35: Espectro de fluorescência tridimensional da urease livre (A), complexo urease/**AB5-S** (B) e complexo urease/**AB7-S** (C) em pH 7. Ureases e os ligantes foram utilizados a 1,0 e 40 μ M, respectivamente.



FONTE: elaborado pela autora.

As intensidades de fluorescência dos picos 2 e 3 apresentaram redução de intensidade de 53% e 60% respectivamente para o **AB5-S** (Tab. Apêndice 1, pág. 129) e um perfil similar foi registrado para os sistemas contendo o **AB7-S** com redução de intensidade de fluorescência de 72 e 79%, observados para os picos 2 e 3, respectivamente. Os principais parâmetros de fluorescência tridimensional foram listados na Tab. Apêndice 1 (pág. 129). A redução na intensidade de fluorescência no pico 2 foi atribuída as emissões dos resíduos de triptofano e

tirosina enquanto que alterações relacionadas com o pico 3 foram atribuídas a modificações na estrutura nativa da proteína. A intensidade de variação de fluorescência mais significativa foi observada para o pico 3, indicando que houve alterações na cadeia polipeptídica e dobramento da enzima (WANG, QIAN *et al.*, 2015). Além disso, esses resultados são suportados pela variação no deslocamento da banda de Stokes determinado para a urease nativa e o respectivo complexo inibidor/urease, Tab. Apêndice 1 (pág. 129).

Os estudos de fluorescência sincronizada foram realizados visando à observação preferencial das mudanças de conformação no micro-ambiente dos cromóforos da urease (triptofano e tirosina). Diferenças entre os comprimentos de onda de excitação e emissão foram usadas como parâmetros para avaliar a mudança na polaridade dos resíduos de aminoácidos, desde que o $\Delta\lambda = 15$ nm (Fig. Apêndice 3, pág. 128) fornece informações sobre o resíduo de tirosina, enquanto o $\Delta\lambda = 60$ nm (Fig. Apêndice 3, pág. 128) fornece evidências de mudanças no resíduo de triptofano (SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017). Os parâmetros obtidos de fluorescência sincronizada para as substâncias **AB5-S** e **AB7-S** foram apresentados na Tabela 14 (pág. 75). O máximo de deslocamento de emissão para **AB5-S** e **AB7-S** frente a urease foi maior para o triptofano que para a tirosina (Tabela 14 – pág. 75) esse comportamento é coerente com o fato de que os resíduos de tirosina são menos sensíveis a mudanças de polaridade de cargas se comparado com os resíduos de triptofano. A variação positiva de λ_{\max} é atribuída a um aumento na polaridade do microambiente e a variação negativa de λ_{\max} é atribuída a uma redução da polaridade permitindo, então, descrever as mudanças na estrutura nativa da proteína.

Nos resíduos de tirosina, para ambos **AB5-S** e **AB7-S**, os valores de K_{SV} foram sistematicamente mais afetados quando comparados aos resíduos de triptofano (Tabela 14 – pág. 75) isso se deve possivelmente à localização dos resíduos de tirosina nas posições 410 e 544, próximo aos resíduos de histidina (posições 409 e 545), responsáveis pela coordenação com os átomos de níquel no sítio ativo da urease de *jack bean* (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010). Considerando que os resíduos de triptofano (495 e 648) são mais distantes do sítio catalítico da urease (LAGE *et al.*, 2018), pode-se inferir que os adutos de Biginelli **AB5-S** e **AB7-S** interagem no sítio catalítico.

Tabela 14: Parâmetros de fluorescência sincronizada para as substâncias **AB5-S** e **AB7-S** frente a urease

Substância	$\Delta\lambda$ (nm)	Parâmetros de Stern-Volmer		λ_{\max} Deslocamento de emissão (nm) ¹
		K_{SV} (10^4 M ⁻¹)	r	
AB5-S	15	4,24 ± 0,08	0,9691	-1
	60	2,91 ± 0,04	0,9880	+6
AB7-S	15	10,21 ± 0,12	0,9656	+1
	60	6,49 ± 0,09	0,9705	+4

¹ $\lambda_{\max}(\text{urease/AB}) - \lambda_{\max}(\text{urease livre})$. O erro foi apresentado como o desvio padrão de 3 determinações.
FONTE: elaborado pela autora.

Uma maneira de verificar a interação dos compostos **AB5-S** e **AB7-S** no sítio catalítico é avaliar a influência dele na presença de um inibidor já conhecido. Sendo assim, foram avaliados os reconhecidos inibidores de urease: NBPT, tiureia, hidroxiiureia e omeprazol, no teste de competição. A razão da constante k_b'/k_b foi usada com a finalidade de comparação (Tabela 15), onde k_b' e k_b correspondem às constantes de ligação na presença ou ausência de competidor, respectivamente. A formação do complexo ligante/urease é favorecida quando $k_b'/k_b > 1$ enquanto que razões menores que 1 indicam que a formação do complexo é desfavorecida (LAGE *et al.*, 2018).

Tabela 15: Razão das constantes de ligação na ausência (k_b) ou na presença (k_b') de reconhecidos inibidores de urease

Substância	Competidores (k_b'/k_b) ^a			
	NBPT	Omeprazol	Tiureia	Hidroxiiurea
AB5-S	0,32 ± 0,08	0,40 ± 0,10	0,66 ± 0,07	0,31 ± 0,03
AB7-S	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,33 ± 0,02 ^b

^a k_b' = constante de ligação na presença de inibidor (25 μM), urease (1 μM) variando os adutos de Biginelli (2,5 - 50 μM). ^bHidroxiiurea foi usada a 38 μM . O erro de desvio padrão foi calculado para 3 determinações.
FONTE: elaborado pela autora.

Em geral, a constante de ligação diminuiu na presença dos inibidores ($k_b'/k_b < 1$), indicando que os adutos de Biginelli **AB5-S** e **AB7-S** interagem com o sítio ativo da urease. Esse

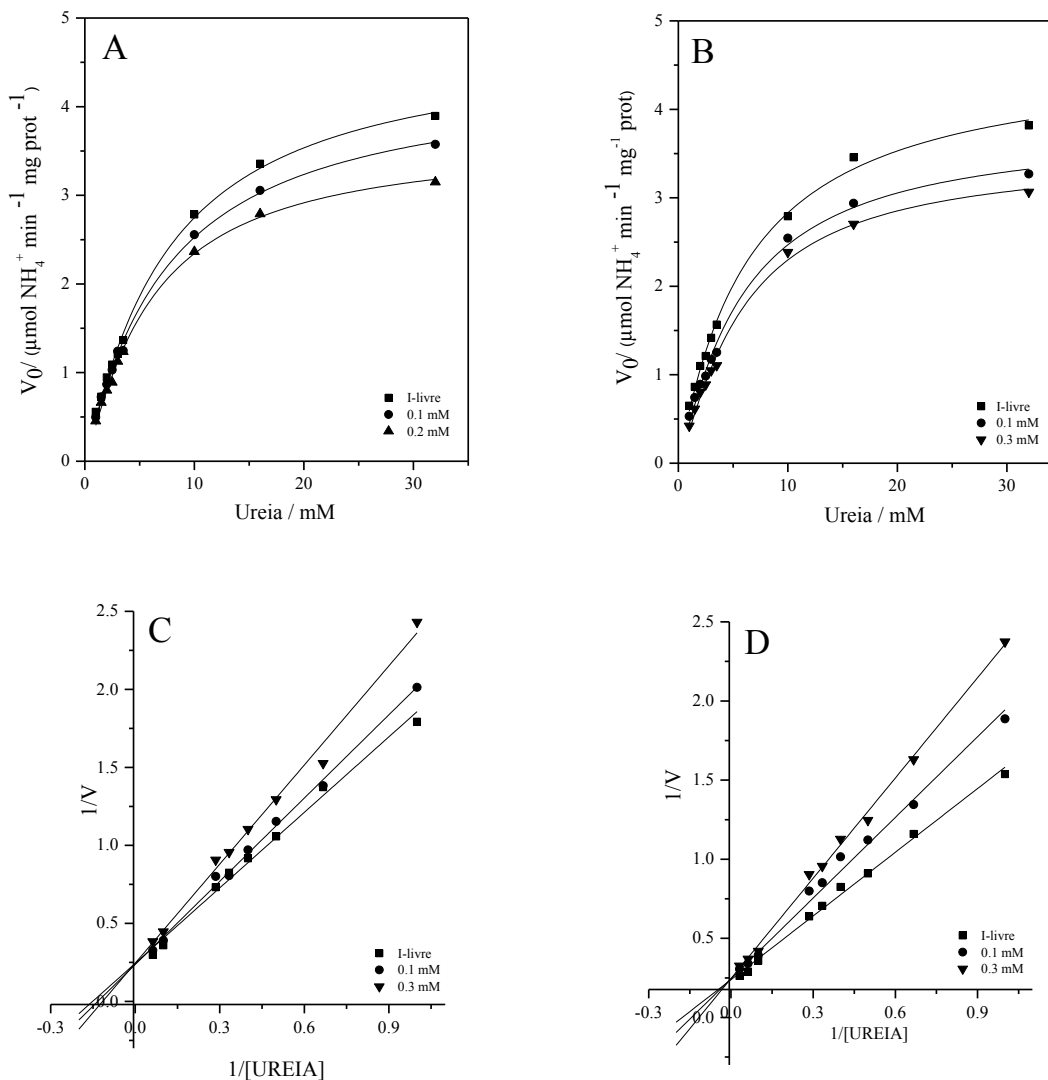
resultado está de acordo com a fluorescência sincronizada (Tabela 14 - pág. 75). Sabe-se que tioureia, hidroxiiurea e NBPT são inibidores competitivos enquanto que o omeprazol é classificado como um inibidor não competitivo (AMTUL *et al.*, 2002). O omeprazol reage com o resíduo livre de cisteína (posição 596) da urease de *jack bean*, que causa um bloqueio ao acesso do sítio catalítico da enzima (AMTUL *et al.*, 2002). Os resultados observados para os **AB5-S** e **AB7-S** indicam que eles interagem no sítio ativo da enzima, entretanto o estudo de competição é limitado e não é capaz de diferenciar inibidores competidores de inibidores mistos. Portanto, para afirmar assertivamente foram realizados estudos clássicos de cinética enzimática.

Foi realizado, então, o teste colorimétrico baseado no método do indofenol e foi verificada a velocidade da enzima urease na catálise da ureia na presença e na ausência de **AB5-S** e **AB7-S**. Com os resultados obtidos, foi possível plotar a hipérbole de Michaelis-Menten, nos gráficos A e B (Figura 36, pág. 77). Verificou-se que ambas substâncias testadas são inibidores competitivos, pois não houve alteração na velocidade máxima da atividade da urease e o K_m aparente da urease aumentou com a adição de incrementos das substâncias avaliadas. Os valores de K_m foram calculados utilizando a equação de Lineweaver-Burk (Equação 11)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Equação 11}$$

Onde V_0 é a velocidade de formação do complexo urease/ureia, K_m é a constante de Michaelis-Menten, V_{max} é a velocidade quando praticamente toda a enzima está em sua forma combinada (urease/ureia) e a adição de substrato (ureia) não altera a velocidade, $[S]$ é a concentração de ureia (NELSON *et al.*, 2014). Portanto a inclinação da reta fornece o inverso da velocidade máxima e de posse dela é possível calcular o K_m e o V_{max} da urease. O K_m aparente, que é aquele obtido na presença dos compostos **AB5-S** e **AB7-S**.

Figura 36: Hiperbole de Michaelis-Menten para **AB5-S** e **AB7-S** (A e B, respectivamente) e Lineweaver-Burk para **AB5-S** e **AB7-S** (C e D, respectivamente). O sistema foi avaliado em concentrações crescentes de ureia (1-32 mM), foram incubados durante 10 min com urease de *jack bean* tipo II na ausência das substâncias teste (I-livre) ou na presença das substâncias (0,1-0,3 mM)



FONTE: disponibilizado pela Prof.^a Luzia Modolo (UFMG).

De posse do K_m aparente é possível calcular o α e o K_i no sistema competidor usando as fórmulas (Equação 12 e 13, respectivamente) (NELSON *et al.*, 2014).

$$\alpha = \frac{K_{m\text{aparente}}}{K_{m\text{urease}}} \quad \text{Equação 12}$$

$$K_i = \frac{[AB]}{\alpha - 1} \quad \text{Equação 13}$$

O valor encontrado de K_i para o complexo **AB5-S**/urease foi de $0,96 \pm 0,01$ mM enquanto que o encontrado para o complexo **AB7-S**/urease foi de $0,57 \pm 0,16$ mM. Esses resultados indicam que o **AB7-S** é um inibidor de urease mais potente que o **AB5-S** e de fato nos estudos enzimáticos a afinidade do **AB7-S** foi mais elevada (maior k_b - Tabela 11, pág 63)

5.4 – Conclusão

Os adutos de Biginelli apresentam em sua estrutura grupos farmacofóricos que permitem interação com a enzima urease. As substâncias **AB5-S** e **AB7-S** foram as que apresentaram maior interação com a enzima urease, com inibição de 40,2% e 47,6%, respectivamente. Pelas análises empregando o método de fluorescência, pode-se identificar que as interações com a urease dos **AB5-S** e **AB7-S** estão presentes nas proximidades do sítio ativo, o que concorda com o mecanismo de inibição competitivo determinado, no método do indofenol, para ambas substâncias. As interações entre a urease e **AB5-S** ou **AB7-S** são termodinamicamente favoráveis e predominantemente hidrofóbicas para a substância **AB5-S** e por ligações de hidrogênio e interação van der Waals para a substância **AB7-S**.

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os catalisadores foram devidamente caracterizados, o **NbOPO₄** foi purificado quanto aos possíveis contaminantes voláteis usando-se três temperaturas de calcinação 400, 500 e 700 °C. A essas temperaturas as amostras são amorfas e possuem acidez na ordem de 0,01 mol de sítios ácidos g⁻¹, além de apresentarem apenas características de ácidos de Brønsted. O **[BIMBS][Cl]** foi sintetizado, com 68% de rendimento global em três etapas a partir do imidazol e caracterizado por RMN e IV.

As substâncias **NbOPO₄** e **[BIMBS][Cl]** foram testadas em relação ao seu potencial catalisador na reação de Biginelli sendo que a primeira mostrou-se 1,6 vezes mais eficiente que a reação não catalisada e a segunda 2,2 vezes mais eficiente.

Utilizando-se o **[BIMBS][Cl]** foi possível a síntese de 26 derivados da reação de Biginelli com rendimentos entre 4-92%. Os adutos de Biginelli mostraram-se bons inibidores de urease (9 – 47%) pelo método do indofenol e a presença de substituinte no anel aromático modula a atividade de inibição. Após a realização dos testes de fluorescência, determinou-se que os complexos urease/adutos de Biginelli (**AB5-S** e **AB7-S**) são termodinamicamente favoráveis, a interação é principalmente nas proximidade do sítio ativo e, portanto, são considerados inibidores competitivos.

Este estudo mostra que tanto um substituinte doador de densidade eletrônica quanto um substituinte retirador de densidade eletrônica podem ser capazes de interagir no sítio ativo da enzima urease. Mostrou ainda que esses substituintes contribuem de maneira diferente na estrutura da proteína nativa. E assim, sugere-se que a presença de substituintes nos adutos de Biginelli modulam a atividade de inibição da urease e interferem no tipo de interação predominante no complexo enzima/inibidor.

Não foram encontradas interações na função ester dos adutos de Biginelli nos estudos de interação com a enzima urease portanto, modificações nessa parte da substância podem fornecer interações aditivas e assim melhorar a atividade de inibição frente a enzima urease. Sugerimos, como perspectivas futuras, a adição de grupos benzilas substituídos, outros análogo da toureia como possíveis modificações na busca por melhorias na atividade de inibição.

CAPÍTULO VII – PARTE EXPERIMENTAL

7.1 – Caracterização do NbOPO₄

O fosfato de nióbio (NbOPO₄) foi fornecido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), Araxá, Minas Gerais, Brasil. O material doado foi calcinado a temperatura de 400, 500 ou 700 °C. Os sítios ácidos dos NbOPO₄ calcinados foram caracterizados quantitativamente e qualitativamente empregando-se as técnicas de titulação inversa e sonda de piridina, respectivamente.

7.1.1 – Calcinação do NbOPO₄

As temperaturas de calcinação foram escolhidas seguindo-se a metodologia descrita previamente na literatura (DA SILVA; FOLGUERAS-DOMENGUEZ; DOS SANTOS, 1999; PEREIRA; DE LA CRUZ; LACHTER, 2010)

O NbOPO₄ foi calcinado utilizando-se um forno industrial tubular horizontal da SANCHIS empregando-se uma rampa de 10 °C por minuto até a temperatura de 400, 500 ou 700 °C e permaneceu na temperatura desejada durante 4 horas.

7.1.2 – Termogravimetria (TG)

As análises de termogravimetria foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio (N₂) com razão de aquecimento igual a 10 °C min⁻¹ no Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG, em um equipamento DTG60 – SHIMADZU.

7.1.3 – Difractometria de raios-X (DRX)

Os dados de DRX foram obtidos no Departamento de Química da UFMG, utilizando-se o equipamento Rigaku, modelo Geigerflex, utilizando-se radiação Cu-K α (30 kV, 30 mA, $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$), com um ângulo 2θ que foi variado de 4 a 60 graus em uma taxa de 2° min⁻¹.

7.1.4 – Caracterização qualitativa dos sítios de Brønsted e de Lewis pelo método da piridina

A caracterização qualitativa dos sítios de Brønsted e de Lewis pelo método da piridina foi realizada seguindo-se a metodologia previamente descrita na literatura (LEBARBIER; HOUALLA; ONFROY, 2012; SELLI; FORNI, 1999)

Cerca de 10 mg das amostras de **NbOPO₄ (400)**, **NbOPO₄ (500)** ou **NbOPO₄ (700)** foram aquecidas em um forno a 200 °C, por 2 h, sob um fluxo de N₂ de 100 mL min⁻¹. Em seguida, o sistema foi resfriado até a temperatura de 50 °C e o fluxo de nitrogênio foi direcionado para um recipiente contendo piridina, de tal forma que a amostra fosse saturada durante uma hora. Finalmente, a temperatura do forno foi elevada para 100 °C, sob o fluxo de N₂, sem piridina, por mais uma hora para a remoção da piridina fisiossorvida.

As amostras obtidas foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho e os espectros foram registrados na região de 1600 a 1400 cm⁻¹ usando pastilha de KBr e o espectrofotômetro Spectro One Perkin Elmer (Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química – UFMG).

7.1.5 – Titulação dos sítios ácidos totais

Em um frasco de 20 mL com tampa foram adicionados cerca de 10 mg do **NbOPO₄ (400, 500 ou 700)** seguido da adição de 10 mL de uma solução de NaOH (0,0231 ± 0,0001) mol L⁻¹. Essa mistura foi mantida sob agitação durante 12 horas. Ao final, 5 mL de cada solução foram titulados com uma solução de biftalato de potássio (0,035 mol L⁻¹) a fim de conhecer o excesso de NaOH. Com a informação do excesso, foi possível calcular a quantidade de NaOH consumida que equivale à metade de sítio ácidos, visto que apenas metade da solução foi titulada, com base nessa informação foi possível quantificar os sítios ácidos. Todas as titulações foram realizadas em triplicata.

Para o **NbOPO₄** calcinado a 400, 500 ou 700 °C foram encontrados 0,010 ± 0,001 mol de sítios ácido/g, 0,012 ± 0,002 mol de sítios ácidos g⁻¹ e 0,0104 ± 0,0007 mol de sítios ácidos g⁻¹, respectivamente (Tabela 16, 17 e 18 respectivamente; pág. 81).

Tabela 16: Resultados obtidos da titulação do **NbOPO₄ (400)**

NbOPO ₄ (400) (g)	V _{Bif} (mL)	n _{NAOHR} (10 ⁻⁵ mol)	n _{NaOHc} (10 ⁻⁵ mol)	n _{SA} (10 ⁻⁴ mol)	[SA] (mol/g)	Desvio
0,0118	1,55	5,425	6,04	1,208	0,010237288	0,001277
0,0108	1,75	6,125	5,34	1,068	0,009888889	
0,011	1,35	4,725	6,74	1,348	0,012254545	

V_{Bif} = volume de biftalato (0,035 mol L⁻¹), n_{NAOHR} = quantidade de NaOH que não reagiu; n_{NaOHc} = quantidade de NaOH consumido pelos sítios ácidos; n_{SA} = quantidade de sítios ácidos em ~0,01 g de NbOPO₄, [SA] = concentração de sítios ácidos. [NAOH] = 0,0231 mol L⁻¹

FONTE: elaborado pela autora.

Tabela 17: Resultados obtidos da titulação do **NbOPO₄ (500)**

NbOPO ₄ (500) (g)	V _{Bif} (mL)	n _{NAOHR} (10 ⁻⁵ mol)	n _{NaOHc} (10 ⁻⁵ mol)	n _{SA} (10 ⁻⁴ mol)	[SA] (mol/g)	Desvio
0,0125	1,15	4,025	7,44	1,488	0,01190400	0,001867
0,0134	1,65	5,775	5,69	1,138	0,00849257	
0,0136	1,55	5,425	6,04	1,208	0,00888233	

V_{Bif} = volume de biftalato (0,035 mol L⁻¹), n_{NAOHR} = quantidade de NaOH que não reagiu; n_{NaOHc} = quantidade de NaOH consumido pelos sítios ácidos; n_{SA} = quantidade de sítios ácidos em ~0,01 g de NbOPO₄, [SA] = concentração de sítios ácidos. [NAOH] = 0,0231 mol L⁻¹

FONTE: elaborado pela autora.

Tabela 18: Resultados obtidos da titulação do **NbOPO₄ (700)**

NbOPO ₄ (700) (g)	V _{Bif} (mL)	n _{NAOHR} (10 ⁻⁵ mol)	n _{NaOHc} (10 ⁻⁵ mol)	n _{SA} (10 ⁻⁴ mol)	[SA] (mol/g)	Desvio
0,0105	1,90	4,3111	7,0339	1,40678	0,0140600	0,000756
0,0101	1,95	4,37825	6,9772	1,39544	0,0139544	
0,0102	1,60	3,6871	7,6579	1,53158	0,0153158	

V_{Bif} = volume de biftalato (0,035 mol L⁻¹), n_{NAOHR} = quantidade de NaOH que não reagiu; n_{NaOHc} = quantidade de NaOH consumido pelos sítios ácidos; n_{SA} = quantidade de sítios ácidos em ~0,01 g de NbOPO₄, [SA] = concentração de sítios ácidos. [NAOH] = 0,0231 mol L⁻¹

FONTE: elaborado pela autora.

7.2 – Síntese e caracterizações dos catalisadores e avaliação da atividade catalítica na reação de Biginelli

7.2.1 – Materiais e métodos

Na síntese dos compostos descritos neste trabalho, foram utilizados reagentes de grau analítico. Quando necessário, foram realizadas purificações seguindo metodologia descrita por Perrin e Amarengo (1988) (PERRIN; AMARENGO, 1988).

7.2.2 – Generalidades metodológicas

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas POLYGRAM- UV 2540, 20 mm MACHEREY-NAGEL (20 X 20 cm). As placas de CCD foram observadas sob lâmpada de ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) e posteriormente reveladas com o auxílio de vapores de iodo (I_2), solução alcoólica de vanilina [(4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (6 g) + etanol (100 mL) + H_2SO_4 (conc.) (1 mL)], solução de $KMnO_4$ [$KMnO_4$ (6 g) + K_2CO_3 (20 g) + 5% NaOH (aq) (5 mL) + H_2O (300 mL)].

As cromatografias em coluna foram realizadas empregando-se sílica gel como suporte e como eluentes, solventes previamente destilados. Em cada caso, a mistura do eluente usada foi especificada.

7.2.3 – Temperaturas de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas utilizando-se o equipamento GEHAKA-PF1500. Os valores observados no equipamento não foram corrigidos.

7.2.4 – Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos pela técnica de ATR em espectrofotômetro *Spectro One Perkin Elmer* (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG), e pelo espectrofotômetro *Spectro One Perkin Elmer* (Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química – UFMG) utilizando pastilha de KBr na região de $400-4000\text{ cm}^{-1}$.

7.2.5 – Ressonância magnética

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 200 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 50 MHz) foram obtidos por um espectrômetro Bruker AVANCE DPX 200 com sonda BBO multinuclear (Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química – UFMG) e os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 400 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 100 MHz) foram obtidos no espectrômetro Bruker AVANCE-III 400 (Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química – UFMG). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos sinais dos respectivos solventes ou padrão interno tetrametilsilano (TMS).

7.2.6 – Espectrometria de massas de alta resolução

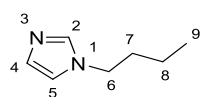
Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos empregando-se um Espectrômetro de Massas com Fonte de Ionização Electrospray (ESI-MS), modelo SHIMADZU LC – ITTOF (Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química – UFMG).

7.3 – Metodologias de Síntese

7.3.1 – Preparação do 1-butilimidazol (BIM)

Para a síntese do 1-butilimidazol, foi utilizada metodologia adaptada de Cheng (CHENG; CHU, 2006). Em um balão de 10 mL, foram adicionados o *n*-bromobutano (2,4 mmol – 328,8 mg), o imidazol (3 mmol – 204,2 mg) e o KOH (6 mmol – 336,6 mg) em 5 mL de acetonitrila. A mistura reagente foi mantida sob refluxo e agitação durante 4 horas. Ao final, resfriou-se a mistura reagente e foram adicionados 20 mL de diclorometano. Foi realizada uma extração líquido-líquido com 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída (2 vezes, 10 mL de diclorometano) e as fases orgânicas reunidas e posteriormente foi adicionado sulfato de magnésio para remoção da água residual e filtrado. O solvente foi removido por evaporação em evaporador rotatório e o bruto de reação foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como eluente a mistura de acetato de etila:hexano:diclorometano (6:1:1). O produto foi obtido como um óleo amarelo com 69% (205,7 mg) de rendimento.

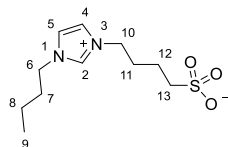
Fórmula molecular: C₇H₁₂N₂. **Aspecto:** líquido amarelado. **IV** (ATR, ν cm⁻¹): 3111 (ν Csp²-H), 2960 (ν CH₃), 1667 (ν CH=N-R). **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ : 0,94 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H9), 1,32 (2H, sex, $J = 7,3$ Hz, H8), 1,75 (2H, quin, $J = 7,2$ Hz, H7), 3,94 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, H6), 6,91 (1H, s, H5), 7,04 (1H, s, H4), 7,51 (1H, s, H2). **RMN de ¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ : 13,4 (C9), 19,7 (C8), 33,0 (C7), 46,8 (C6), 188,8 (C5), 128,9 (C4), 136,9 (C2). **HRMS (ESI):** calculado m/z [M+1]: 125,1079; encontrado m/z [M+1]: 125,1026 erro: 4,16 ppm; calculado m/z [M+Na]: 147,0898; encontrado m/z [M+Na]: 147,0789 erro: 7,4 ppm. Os dados de caracterização estão de acordo com aqueles reportados na literatura. (CHENG e CHU 2006).



7.3.2 – Preparação do 3-(*n*-butilsulfonato) de 1-butylimidazólio (BIMBS)

Para a síntese do 3-(*n*-butilsulfonato) de 1-butylimidazólio, foi utilizada metodologia adaptada de Geilen (GEILEN *et al.*, 2010). Em um balão de 10 mL, foram adicionados o **BIM** (1,12 mmol – 139,1 mg) e a 1,4-butano sulfona (1,21 mmol – 164,8 mg) em 0,5 mL de tolueno. A mistura reagente foi mantida a 80 °C durante 24 h. Após este período, resfriou-se a mistura reagente até a temperatura ambiente e seguiu-se a adição de éter etílico sob agitação até ocorrer a formação de um sólido branco. O material obtido foi filtrado e seco sob pressão reduzida fornecendo 78% (227,4 mg) de rendimento.

Fórmula molecular: C₁₁H₂₀N₂O₃S. **Aspecto:** Sólido branco. **Faixa de fusão:** 76,8-79,3 °C [136 °C – lit. (JEGATHA, *et al.*, 2008)]. **IV** (ATR, ν cm⁻¹): 3135 (ν Csp²-H), 2962 (ν CH₃),



1648 (ν CH=N-R), 1175 (ν SO). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0,86 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H9), 1,24 (2H, sex, $J = 7,3$ Hz, H8), 1,53 (2H, quin, $J = 7,0$ Hz, H12), 1,69-1,92 (4H, m, H7, H11), 2,42-2,46 (m, 2H, H13), 4,13-4,22 (4H, m, H6, H10), 7,82 (2H, sl, H4, H5), 9,28 (1H, sl, H2). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13,3 (C9), 18,8 (C8), 21,8 (C12), 28,6 (C11), 31,2 (C7), 48,5 (C6, C10), 50,4 (C13), 122,4 (C4, C5), 136,1 (C2). Os dados de caracterização estão de acordo com aqueles reportados na literatura (GEILEN *et al.* 2010).

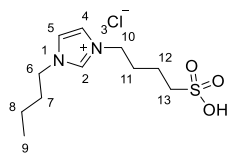
7.3.3 – Preparação do cloridrato de 1-butylimidazolio-3-(*n*-butilsulfônico) ([BIMBS][Cl])

Em um balão de 10 mL, foram adicionados o **BIMBS** (3,8 mmol – 989,3 mg) e o HCl_(aq) (37%; 3,8 mmol). A mistura foi mantida sob agitação e refluxo durante 6 horas. Ao final, a água foi evaporada no evaporador rotatório e foi obtido um líquido viscoso e incolor. De forma a evidenciar a formação do [BIMBS][Cl], foram preparadas soluções 0,01 molar do **BIMBS**, do [BIMBS][Cl] puro e da mistura de **BIMBS** e HCl em seguida, o pH das soluções foram aferidos (Tabela 19).

Tabela 19: Análise da acidez por peagâmetro

Solução 0,01 M	pH
BIMBS	7,07
[BIMBS][Cl]	2,38
BIMBS + HCl	1,21

FONTE: elaborado pela autora.



Fórmula molecular: C₁₁H₂₁ClN₂O₃S. **Aspecto:** Líquido transparente.

Rendimento: 100% (1127,9 mg). **IV** (ATR, ν cm⁻¹): 3144 (ν Csp²-H), 2963 (ν CH₃), 1647 (ν CH=N-R), 1162 (ν SO).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0,88 (3H, t, J = 7,4 Hz, H9), 1,24 (2H, sex, J = 7,4 Hz, H8), 1,54 (quin, 2H, J = 7,5 Hz, H12), 1,69-1,96 (4H, m, H7, H11), 2,54 – 2,57 (2H, m, H13), 4,14-4,23 (4H, m, H6, H10), 7,83 (2H, s, H4, H5), 9,34 (1H, s, H2). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13,3 (C9), 18,7 (C8), 21,6 (C12), 28,6 (C11) 31,2 (C7), 48,6 (C6, C10), 50,5 (C13), 122,5 (C4, C5), 136,1 (C2).

7.3.4 – Avaliação do fosfato de nióbio como catalisador na reação de Biginelli

Inicialmente foram realizados os testes de otimização do catalisador **NbOPO₄** quanto à calcinação, quantidade de matéria de catalisador, temperatura, tempo de reação e solventes.

- A) Calcinação: Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e 20 mol% **NbOPO₄** calcinados a 400, 500 ou 700 °C. A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, 90 °C durante 10 min. Ao final, o bruto de reação foi solubilizado em etanol quente (~50 °C), foi filtrado para a retirada do catalisador e à água mãe foi adicionada água destilada gota-a-gota até que se observasse a turvação da mistura reagente. Essa mistura reagente foi mantida sob agitação durante 10 min até a formação de um sólido que foi filtrado, seco e caracterizado. Os resultados obtidos foram plotados no gráfico A da Figura 29 (pág. 46).
- B) Quantidade de matéria de NbOPO₄(400): Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e **NbOPO₄** calcinado a 400 °C foi avaliado em diferentes concentrações: 5, 10, 20 ou 30 mol%. A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, a 90 °C durante 10 min. A elaboração foi similar à mencionada no item A. Os resultados obtidos foram plotados no gráfico B da Figura 29 (pág. 46).
- C) Avaliação da temperatura: Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97, 7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e **NbOPO₄ (400)** (10 mol%). A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa e 60, 90 ou 120 °C durante 10 min. A elaboração foi similar à mencionada no item A. Os resultados obtidos foram plotados no gráfico C da Figura 29 (pág. 46).
- D) Avaliação do tempo: Em um balão de 25 mL foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e **NbOPO₄ (400)** (10 mol%). A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, a 90 °C durante 10, 20 ou 40 min. A elaboração foi similar à mencionada no item A. Os resultados obtidos foram plotados no gráfico D da Figura 29 (pág. 46).

- E) Avaliação do uso de solventes: Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e **NbOPO₄ (400)** (10 mol%) sem solvente, na presença de etanol ou lactato de etila (1 mL). A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, a 90 °C durante 20 min. A elaboração foi similar à mencionada no item A. Os resultados obtidos foram plotados no gráfico D da Figura 29 (pág. 46).

7.3.5 – Avaliação do [BIMBS][Cl] como catalisador na reação de Biginelli

Inicialmente foram realizados os testes de otimização do emprego de [BIMBS][Cl] como catalisador quanto à quantidade de matéria de catalisador, temperatura e tempo de reação.

- A) Quantidade de matéria de [BIMBS][Cl]: Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e [BIMBS][Cl] nas quantidades de 10, 20, 30 ou 40 mol%. A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, a 90 °C durante 30 min. Ao final o bruto de reação foi solubilizado em etanol quente (~50 °C) e à água mãe foi adicionado água gota-a-gota até que se observasse a turvação da mistura reagente. Essa mistura reagente foi mantida sob agitação durante 10 min até a formação de um sólido que foi filtrado, seco e caracterizado. Os resultados obtidos foram plotados no gráfico A da Figura 30 (pág. 48).
- B) Avaliação da temperatura: Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e [BIMBS][Cl] (20 mol%). A mistura reagente foi irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, a 60, 90, 120 ou 140 °C durante 30 min. A elaboração foi similar ao item A e os resultados obtidos foram plotados no gráfico B da Figura 30 (pág. 48).
- C) Avaliação do tempo: Em um balão de 25 mL, foram adicionados o *p*-hidroxibenzaldeído (0,8 mmol – 97,7 mg), o acetoacetato de etila (1,2 mmol – 156,2 mg), a ureia (1,2 mmol – 72,1 mg) e [BIMBS][Cl] (20 mol%). A mistura reagente foi

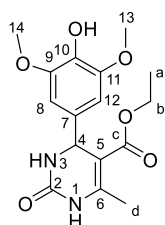
irradiada por micro-ondas em um reator DISCOVER CEM® nas seguintes condições: 2 min de rampa, a 90 °C durante 5, 10, 20 ou 30 min. A elaboração foi similar ao item A e os resultados obtidos foram plotados no gráfico C da Figura 30 (pág. 48).

7.3.6 – Síntese e caracterização dos adutos de Biginelli obtidos

Os demais adutos de Biginelli foram sintetizados de acordo com a metodologia padronizada utilizando o [BIMBS][Cl] como catalisador (20 mol%, a 90 °C durante 10 min) e os dados de caracterização encontram-se a seguir. Toda a caracterização está de acordo com a previamente relatada na literatura e as atribuições dos sinais de RMN foram realizadas com o auxílio do programa *PerkinElmer ChemDraw* professional 15.1.0.144.

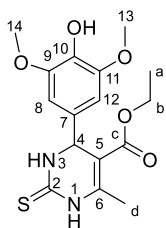
7.3.7 – Caracterização dos adutos de Biginelli

4-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB1-O): 26% de rendimento (purificado por precipitação).



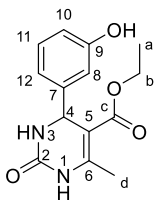
Fórmula molecular: C₁₆H₂₀N₂O₆. **Faixa de fusão:** 182,3-183,4 °C. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3614 (ν OH), 3232 (ν NH), 3102 (ν NH), 2952 (ν sp²H), 1726 (ν C=O), 1708 (ν C=O), 1654 (ν C=C), 1120 (C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,12 (t, 3H, *J* = 6,5 Hz, Ha), 2,24 (s, 3H, Hd), 3,70 (s, 6H, H13 e H14), 4,01 (q, 2H, *J* = 6,5 Hz, Hb), 5,08 (s, 1H, H4), 6,48 (s, 2H, H7 e H8), 7,65 (s, 1H, H3), 8,32 (s, 1H, OH), 9,13 (s, 1H H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,2 (Ca), 17,7 (Cd), 53,8 (C4), 56,0 (C13 e C14), 59,1 (Cb), 99,4 (C5), 103,9 (C8 e C12), 135,0 (C7 e C10), 147,8 (C11 e C9), 152,2 (C2), 165,5 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB1-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, *et al.*, 2012).

4-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB1-S): 47% de rendimento (purificado por precipitação).



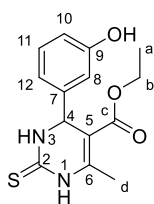
Fórmula molecular: C₁₆H₂₀N₂O₅S **Faixa de fusão:** 213,0-214,3 °C. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3476 (v OH), 3330 (v NH), 3198 (v NH), 2946 (v sp²-H), 1668 (v C=O), 1648 (v C=C), 1186 (v C=S), 1112 (v C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,13 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,28 (s, 3H, Hd), 3,71 (s, 6H, H13 e H14), 4,04 (2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,11 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, H4), 6,46 (s, 2H, H12 e H8), 8,42 (s, 1H, OH), 9,60 (sl, 1H, H3), 10,29 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,1 (Cd), 53,8 (C4), 56,0 (C13 e C14), 59,6 (Cb), 101,0 (C5), 104,0 (C8 e C12), 133,7 (C10), 135,4 (C7), 144,7 (C9), 147,9 (C11) 165,3 (Cc), 174,3 (C2). Os dados de caracterização para o **AB1-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2012).

4-(3-Hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB2-O): 52% de rendimento (purificado por precipitação).



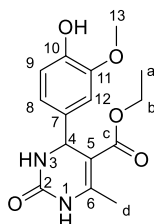
Fórmula molecular: C₁₄H₁₆N₂O₄. **Faixa de fusão:** 183,7-185,0 °C [190-192 °C Lit. (PASUNOOTI *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3514 (v OH), 3354 (v NH), 3246, 3124 (v NH), 2980 (v sp²H), 1726 (v C=O), 1700 (v C=O), 1602 (v C=C), 1092 (v C-O). **RMN de ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,11 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,23 (s, 3H, Hd), 3,99 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,06 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, H4), 6,62 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, H8), 6,66-6,67 (sl, 2H, H10 e H12), 7,08 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, H11), 7,69 (sl, 1H, H3), 9,16 (s, 1H, H1), 9,36 (s, 1H, OH). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,8 (Cd), 53,9 (C4), 59,2 (Cb), 99,4 (C5), 113,1 (C8), 114,2 (C10), 116,9 (C12), 129,3 (C11), 146,3 (C7), 148,1 (C6), 152,3 (C2), 157,4 (C9), 165,4 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB2-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (PASUNOOTI *et al.*, 2011).

4-(3-Hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilata de etila (AB2-S): 46% de rendimento (purificado por precipitação).



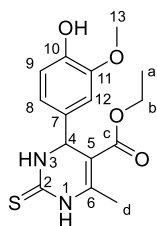
Fórmula molecular: C₁₄H₁₆N₂O₃S. **Faixa de fusão:** 183,4-185,1 °C [185-187 °C Lit. (ZEYNIZADEH; DILMAGHANI; YARI, 2009)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3308 (ν OH), 3184 (ν NH), 3116 (ν NH), 2984 (ν sp²-H), 1684 (ν C=O), 1662 (ν C=C), 1196 (ν C=S). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,11 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,28 (s, 3H, Hd), 4,05 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, Hb), 5,01 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz, H4), 6,63-6,67 (m, 3H, H8, H10 e H12), 7,12 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, H11), 9,45 (s, 1H, OH), 9,60 (sl, 1H, H3), 10,30 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,2 (Cd), 54,0 (C4), 59,6 (Cb), 100,8 (C5), 113,3 (C8), 114,7 (C10), 117,0 (C12), 129,5 (C11), 144,9 (C6 e C7), 157,5 (C9), 165,2 (Cc), 174,2 (C2). Os dados de caracterização para o **AB2-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (ZEYNIZADEH; DILMAGHANI; YARI, 2009).

4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB3-O) 39% de rendimento (purificado por precipitação).



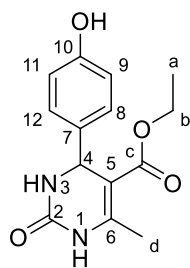
Fórmula molecular: C₁₅H₁₈N₂O₅. **Faixa de fusão:** 233,9-236,0 °C [226-228 °C - Lit. (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3538 (ν OH), 3244 (ν NH), 3116 (ν NH), 2974 (ν sp²H), 1704 (ν C=O), 1698 (ν C=O), 1644 (ν C=C), 1170 (ν C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,11 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,24 (s, 3H, Hd), 3,72 (s, 3H, H13), 3,99 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, Hb), 5,06 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, H4), 6,58-6,73 (m, 2H, H11 e H8), 6,78-6,80 (m, 1H, H12), 7,65 (sl, 1H, H3), 8,92 (s, 1H, OH), 9,13 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,2 (Ca), 17,8 (Cd), 53,6 (C4), 55,6 (C13), 59,2 (Cb), 99,6 (C5), 110,9 (C12), 115,3 (C11), 118,3 (C8), 136,0 (C10), 145,8 (C7), 147,3 (C9), 148,0 (C6), 152,3 (C2), 165,5 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB3-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilata de etila (AB3-S): 25% de rendimento (purificado por precipitação).



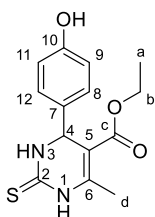
Fórmula molecular: C₁₅H₁₈N₂O₄S. **Faixa de fusão:** 224,9-225,5 °C [206-208 °C - Lit. (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3418 (ν OH), 3160 (ν NH), 3000 (ν NH), 2952 (ν sp²H), 1682 (ν C=O), 1652 (ν C=C), 1196 (ν C=S), 1112 (ν C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,11 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,28 (s, 3H, Hd), 3,72 (s, 3H, H13), 4,02 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,09 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, H4), 6,57-6,60 (m, 1H, H11), 6,71-6,78 (m, 2H, H8 e H12), 9,02 (s, 1H, OH), 9,57 (sl, 1H, H3), 10,27 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,2 (Cd), 53,7 (C4), 55,6 (C13), 59,6 (Cb), 101,0 (C5), 111,0 (C12), 115,4 (C11), 118,6 (C8), 134,6 (C10), 144,7 (C7), 146,2 (C9), 147,4 (C6), 165,3 (Cc), 174,1 (C2). Os dados de caracterização para o **AB3-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

4-(4-Hidroxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB4-O): 71% de rendimento (purificado por precipitação).



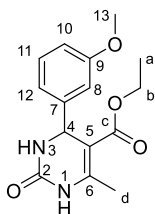
Fórmula molecular: C₁₄H₁₆N₂O₄. **Faixa de fusão:** 231,9-234,8 °C [237-239 °C - Lit. (NANDURKAR *et al.*, 2007)]. **IV** (ATR, ν cm⁻¹): 3504 (ν OH), 3270 (ν NH), 3113 (ν NH), 2982 (ν sp²-H), 1678 (ν C=O), 1640 (ν C=O), 1600 (ν C=C), 1088 (ν C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, Ha), 2,23 (s, 3H, Hd), 3,97 (q, 2H, *J* = 6,9 Hz, Hb), 5,04 (sl, 1H, H4), 6,68 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H9 e H10), 7,03 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H8 e H12), 7,62 (sl, 1H, H3), 9,12 (s, 1H, H1), 9,34 (s, 1H, OH). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,5 (Ca), 18,1 (Cd), 53,8 (C4), 59,5 (Cb), 100,1 (C5), 115,4 (C9, C11), 127,8 (C8, C12), 135,8 (C7), 148,1 (C6), 152,6 (C2), 156,9 (C10), 165,8 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB4-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (NANDURKAR *et al.*, 2007).

4-(4-Hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB4-S): 52% de rendimento (purificado por precipitação).



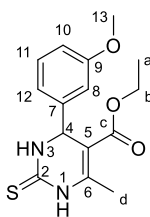
Fórmula molecular: $C_{14}H_{16}N_2O_3S$. **Faixa de fusão:** 202,7-205,7 °C [212-215 °C - Lit. (ZHU *et al.*, 2009)]. **IV:** (KBr, ν cm^{-1}): 3422 (ν OH), 3286 (ν NH), 3198 (ν NH), 3022 (ν sp^2 -H), 1716 (ν C=O), 1662 (ν C=C), 1198 (ν C=S), 1084 (ν C-O). **RMN de 1H** (200 MHz, DMSO- d_6) δ 1,09 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, Ha), 2,27 (s, 3H, Hd), 3,99 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, Hb), 5,06 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, H4), 6,70 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H9 e H11), 7,00 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H8 e H12), 9,42 (s, 1H, OH), 9,55 (sl, 1H, H3), 10,24 (s, 1H, H1). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, DMSO- d_6) δ 14,1 (Ca), 17,1 (Cd), 53,6 (C4), 59,5 (Cb), 101,1 (C5), 115,1 (C9 e C11), 127,7 (C12 e C8), 134,1 (C7), 144,1 (C6), 156,9 (C10), 165,2 (Cc), 173,9 (C2). Os dados de caracterização para o **AB4-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (ZHU *et al.*, 2009).

4-(3-Metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB5-O): 73% de rendimento (purificado por precipitação).



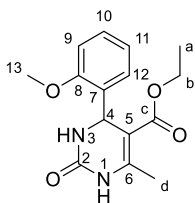
Fórmula molecular: $C_{15}H_{18}N_2O_4$. **Faixa de fusão:** 221,3-223,9 °C [219–220 °C Lit. (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, ν cm^{-1}): 3242 (ν NH), 3104 (ν NH), 2934 (ν sp^2 H), 1702 (ν C=O), 1648 (ν C=O), 1600 (ν C=C), 1164 (ν C-O). **RMN de 1H** (200 MHz, DMSO- d_6) δ 1,11 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, Ha), 2,24 (s, 3H, Hd), 3,72 (s, 3H, H13), 3,99 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, Hb), 5,12 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, H4), 6,78-6,83 (m, 3H, H12, H8 e H10), 7,24 (t, $J = 3,8$ Hz, H11), 7,74 (sl, 1H, H3), 9,20 (s, 1H, H1). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, DMSO- d_6) δ 14,1 (Ca), 17,8 (Cd), 53,8 (C4), 55,0 (C13), 59,3 (Cb), 99,2 (C5), 112,2 (C10), 112,4 (C8), 118,3 (C12), 129,6 (C11), 146,4 (C7), 148,5 (C6), 152,3 (C2), 159,2 (C9), 165,4 (C2). Os dados de caracterização para o **AB5-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

4-(3-Metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB5-S): 81% de rendimento (purificado por precipitação).



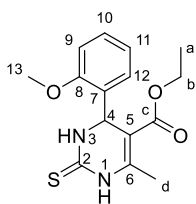
Fórmula molecular: C₁₅H₁₈N₂O₃S. **Faixa de fusão:** 160,9-162,8 °C [141-143 °C - Lit. (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011)]. **IR** (KBr, v cm⁻¹): 3320 (v NH), 3176 (v NH), 2992 (v sp²H), 1668 (v C=O), 1652 (v C=O), 1192 (v C=S), 1098 (v C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,11 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,28 (s, 3H, Hd), 3,72 (s, 3H, H13), 4,02 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,15 (d, 1H, *J* = 3,0 Hz, H4), 6,72 (d, 1H, *J*₄ = 2 Hz, H8), 6,79 (d, 1H, *J*₃ = 7,8 Hz, H10), 6,84 (dd, 1H, *J*₃ = 7,8 Hz, *J*₄ = 2,0 Hz, H12), 7,26 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, H11), 9,65 (sl, 1H, H3), 10,35 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,0 (Ca), 17,2 (Cd), 53,8 (C4), 55,0 (C13), 59,7 (Cb), 100,6 (C5), 112,5 (C10 e C8), 118,4 (C12), 129,8 (C11), 145,0 (C6), 145,1 (C7), 159,3 (C9), 165,2 (Cc), 174,4 (C2). Os dados de caracterização para o **AB5-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

4-(2-Metoxifenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxylato de etila (AB6-O): 55% de rendimento (purificado por precipitação).



Fórmula molecular: C₁₅H₁₈N₂O₄. **Faixa de fusão:** 261,0-262,6 °C [260-262 °C - Lit. (SHIRINI; RAD-MOGHADAM; AKBARI-DADAMAHALEH, 2012)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3256 (v NH), 3108 (v NH), 2958 (v sp²H), 1726 (v C=O), 1702 (v C=O), 1636 (v C=C), 1080 (v C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,02 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,27 (s, 3H, Hd), 3,79 (s, 3H, H13), 3,91 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,49 (sl, 1H, H4), 6,83-7,03 (m, 3H, H12, H11 e H9), 7,19-7,27 (m, 2H, H3 e H10), 9,12 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,0 (Ca), 17,7 (Cd), 48,9 (C4), 55,4 (C13), 59,0 (Cb), 97,6 (C5), 111,1 (C9), 120,2 (C11), 127,1 (C12), 128,7 (C10), 131,6 (C7), 148,9 (C6), 152,2 (C2), 156,5 (C8), 165,4 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB6-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (SHIRINI; RAD-MOGHADAM; AKBARI-DADAMAHALEH, 2012).

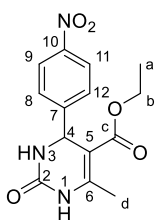
4-(2-Metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB6-S): 92% de rendimento (purificado por precipitação).



Fórmula molecular: C₁₅H₁₈N₂O₃S. **Faixa de fusão:** 185,5-187,9 °C (230-231 °C – Lit. (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3260 (ν NH), 3170 (ν NH), 2998 (ν sp²H), 1710 (ν C=O), 1652 (ν C=C), 1178 (ν C=S), 1102 (ν C-O). **RMN de ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,37 (t,

3H, $J = 7,1$ Hz, Ha), 2,29 (s, 3H, Hd), 3,37 (s, 3H, H13), 3,94 (qd, 2H, $J_3 = 7,1$ Hz, $J_4 = 1,5$ Hz, Hb), 5,50 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, H4), 6,89 (td, 1H, $J_3 = 7,6$ Hz, $J_4 = 0,7$ Hz, H11), 7,00 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H9), 7,04 (dd, 1H, $J_3 = 7,6$, $J_4 = 1,6$ Hz, H12), 7,25 (td, 1H, $J_3 = 7,6$ Hz, $J_4 = 1,6$ Hz, H10), 9,24 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H3), 10,23 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,9 (Ca), 17,1 (Cd), 49,5 (C4), 55,5 (C13), 59,4 (Cb), 99,4 (C5), 111,3 (C9), 120,2 (C11), 127,8 (C7), 129,2 (C12), 130,6 (C10), 145,2 (C6), 156,6 (C8), 165,2 (Cc), 174,2 (C2). Os dados de caracterização para o **AB6-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009).

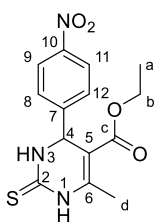
6-Metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB7-O): 61% de rendimento (purificado por precipitação).



Fórmula molecular: C₁₄H₁₅N₃O₅. **Faixa de fusão:** 201,9-206,7 °C [211-212 °C – Lit.(PASUNOOTI *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3238 (ν NH), 3122(ν NH), 2988 (ν sp²H), 1728 (ν C=O), 1700 (ν C=O), 1646 (ν C=C), 1522 (ν_{as} NO₂), 1096 (ν C-O), 856 (ν CN). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-

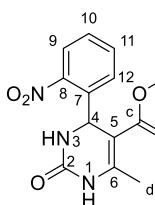
*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, Ha), 2,27 (s, 3H, Hd), 3,98 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, Hb), 5,28 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, H4), 7,51 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H8 e H12), 7,90 (sl, 1H, H3), 8,22 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H9 e H11), 9,37 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,9 (Cd), 53,7 (C4), 59,4 (Cb), 98,2 (C5), 123,8 (C8 e C12), 127,7 (C9 e C11), 146,7 (C10), 149,4 (C6), 151,8 (C7), 152,0 (C2), 165,1 Cc). Os dados de caracterização para o **AB7-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (PASUNOOTI *et al.*, 2011).

6-Metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB7-S):
60% de rendimento (purificado por precipitação).



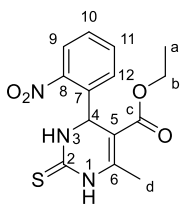
Fórmula molecular: C₁₄H₁₈N₃O₄S. **Faixa de fusão:** 193,0-195,6 °C [193-194 °C - Lit. (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3298 (ν NH), 3170 (ν NH), 2988 (ν sp²H), 1682 (ν C=O), 1652 (ν C=C), 1520 (ν_{as} NO₂), 1352 (ν_s NO₂), 1174 (ν C=S), 853 (ν CN). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,31 (s, 3H, Hd), 4,00 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,39 (d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H4), 7,48 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, H8 e H12), 8,23 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, H9 e H11), 9,77 (sl, 1H, H3), 10,50 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,0 (Ca), 17,3 (Cd), 53,7 (C4), 59,8 (Cb), 99,7 (C5), 124,0 (C8 e C12), 127,8 (C11 e C9), 146,0 (C10), 146,9 (C6), 150,4 (C7), 164,9 (Cc), 174,5 (C2). Os dados de caracterização para o **AB7-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009).

6-Metil-4-(2-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB8-O)
28% de rendimento [purificado por coluna cromatográfica de sílica gel usando com mistura eluente acetato de etila/hexano (3:1)].



Fórmula molecular: C₁₄H₁₅N₃O₅. **Faixa de fusão:** 220,5-222,5 °C [205-206 °C - Lit. (SHIRINI; RAD-MOGHADAM; AKBARI-DADAMAHALEH, 2012)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3366 (ν NH), 3222 (ν NH), 2986 (ν sp²H), 1698 (ν C=O), 1646 (ν C=O), 1608 (ν C=C), 1524 (ν_{as} NO₂), 1370 (ν_s NO₂), 1094 (C-O), 860 (ν C-O). **RMN de ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0,92 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,28 (s, 3H, Hd), 3,82-3,85 (m, 2H, Hb), 5,14 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H4), 7,51-7,57 (m, 2H, H10 e H12), 7,71-7,73 (m, 2H, H11 e H3), 7,88-7,90 (m, 1H, H9), 9,36 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,7 (Ca), 17,7 (Cd), 49,4 (C4), 59,1 (Cb), 96,0 (C5), 123,9 (C9), 128,7 (C10), 129,0 (C12), 134,1 (C11), 139,3 (C7), 147,5 (C6), 149,6 (C8), 151,2 (C2), 164,7 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB8-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (SHIRINI; RAD-MOGHADAM; AKBARI-DADAMAHALEH, 2012).

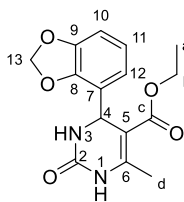
6-Metil-4-(2-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB8-S): 30% de rendimento [purificado por cromatografia em coluna em sílica gel utilizando como eluente a mistura acetato de etila/hexano (3:1)].



Fórmula molecular: C₁₄H₁₅N₃O₄S. **Faixa de fusão:** 204,5-205,1 °C [195-197 °C Lit. (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3292 (v NH), 3190 (v NH), 2982 (v sp²H), 1722 (v C=O), 1656 (v C=C), 1524 (v_{as} NO₂), 1354 (v_s NO₂), 1196 (v C=S), 1094 (v C-O), 860 (v N-O).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0,94 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,31 (s, 3H, Hd), 3,81-3,93 (m, 2H, Hb), 5,95 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, H4), 7,50-7,57 (m, 2H, H10 e H12), 7,93 (td, 1H, *J*₃ = 8,2 Hz, *J*₄ = 1,1 Hz, H11), 7,76 (dd, 1H, *J*₃ = 7,6 Hz, *J*₄ = 1,1 Hz, H9), 9,56 (sl, 1H, H3), 10,44 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,7 (Ca), 17,1 (Cd), 49,2 (C4), 59,5 (Cb), 99,8 (C5), 124,2 (C11), 129,1 (C12), 129,4 (C10), 134,2 (C9), 136,0 (C7), 145,6 (C6), 147,3 (C8), 164,5 (Cc), 174,1 (C2). Os dados de caracterização para o **AB8-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009).

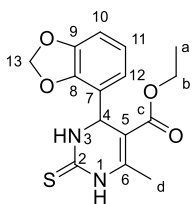
4-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-4-il)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB9-O): 69% de rendimento (purificado por precipitação).



Fórmula molecular: C₁₅H₁₆N₂O₅. **Faixa de fusão:** 186,9-189,4 °C. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3222 (v NH), 3106 (v NH), 2966 (v sp²H), 1702 (v C=O), 1690 (v C=O), 1640 (v C=C), 1094 (v C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,10 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,24 (s, 3H, Hd), 3,99 (q, 2H, *J*

= 7,0 Hz, Hb), 5,07 (sl, 1H, H4), 5,97 (s, 2H, H13), 6,67- 6,68 (m, 3H, H11, H12 e H10), 7,68 (sl, 1H, H3), 9,18 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,8 (Cd), 53,7 (C4), 59,2 (Cb) 99,3 (C5), 101,0 (C13), 106,7 (C10), 108,0 (C12), 119,3 (C11), 138,9 (C7), 146,3 (C6), 147,2 (C9), 148,2 (C8), 152,1 (C2), 165,3 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB9-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2012).

4-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-4-il)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB9-S): 67% de rendimento (purificado por precipitação).



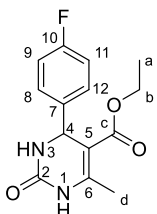
Fórmula molecular: C₁₅H₁₆N₂O₄S. **Faixa de fusão:** 172,6-174,3 °C. **IV**

(KBr, v cm⁻¹): 3316 (v NH), 3180 (v NH), 2980 (v sp²H), 1654 (v C=O), 1576 (v C=C), 1192 (v C=S), 1112 (v C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz,

DMSO-*d*₆) δ 1,10 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,29 (s, 3H, Hd), 4,01 (q, 2H, *J*

= 7,1 Hz, Hb), 5,09 (d, 1H, *J* = 3,5 Hz, H4), 5,99 (s, 2H, H13), 6,66-6,71 (m, 2H, H10 e H11), 6,87 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz, H12), 9,59 (sl, 1H, H3), 10,31 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,2 (Cd), 53,7 (C4), 59,6 (Cb), 100,8 (C5), 101,1 (C10), 106,7 (C13), 108,2 (C12), 119,7 (C11), 137,5 (C7), 145,0 (C6), 146,7 (C9), 147,4 (C9), 165,1 (Cc), 174,1 (C2). Os dados de caracterização para o **AB9-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2012).

4-(4-Fluorofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB10-O): 74% rendimento (purificado por precipitação).



Fórmula molecular: C₁₄H₁₅FN₂O₃. **Faixa de fusão:** 179,5-180,7 °C [172-173

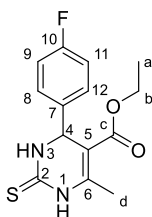
°C Lit. (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3246 (v NH),

3124 (v NH), 2980 (v sp²H), 1728 (v C=O), 1714 (v C=O), 1648 (v C=C), 1220

(v CF), 1100 (v C-O). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,08 (t, 3H, *J* =

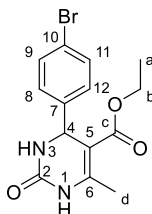
7,1 Hz, Ha), 2,25 (s, 3H, Hd), 3,98 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, Hb), 5,14 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H4), 7,14 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, H11 e H9), 7,24-7,28 (m, 2H, H12 e H8), 7,73 (s, 1H, H3), 9,21 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,8 (Cd), 53,4 (C4), 59,2 (Cb), 99,1 (C5), 115,1 (C8 e C12), 126,2 (C9 e C11), 141,1 (C7), 148,5 (C6), 151,9 (C2), 161,4 (C10), 165,3 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB10-O** estão de acordo com aqueles reportados na (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

4-(4-Fluorofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB10-S): 81% de rendimento (purificado por precipitação).



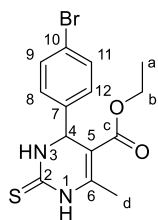
Fórmula molecular: C₁₄H₁₅FN₂O₂S. **Faixa de fusão:** 190,3-192,0 °C [194-195 °C Lit. (KUMAR *et al.*, 2008)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3328 (v NH), 3274 (v NH), 2986 (v NH), 1682 (v C=O), 1656 (v C=C), 1284 (v CF), 1196 (v C=S), 1118 (v C-O). **RMN de ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,30 (s, 3H, Hd), 4,00 (qd, 2H, *J*₃ = 7,1 Hz, *J*₄ = 3,4 Hz, Hb), 5,18 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz, H4), 7,15-7,20 (m, 2H, H11 e H9), 7,23-7,26 (m, 2H, H12 e H8), 9,64 (sl, 1H, H3), 10,35 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,0 (Ca), 17,2 (Cd), 53,4 (C4), 59,6 (Cb), 100,6 (C5), 115,3 (C8 e C12), 128,4 (C9 e C11), 139,7 (C7), 145,1 (C6), 161,3 (C10), 165,0 (Cc), 174,2 (C2). Os dados de caracterização para o **AB10-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (KUMAR *et al.*, 2008).

4-(4-Bromofenil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB11-O): 70% de rendimento (purificado por precipitação).



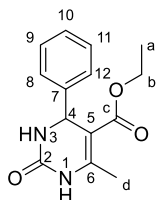
Fórmula molecular: C₁₄H₁₅BrN₂O₃. **Faixa de fusão:** 212,3-215,3 °C [225-226 °C Lit. (PASUNOOTI *et al.*, 2011)] **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3244 (v NH), 3116 (v NH), 2980 (v sp²H), 1722 (v C=O), 1704 (v C=O), 1650 (v C=C), 1088 (v C-O), 678 (v C-Br). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, Ha), 2,25 (s, 3H, Hd), 3,98 (q, 2H, *J* = 6,9 Hz, Hb), 5,13 (sl, 1H, H4), 7,52 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H11 e H9), 7,19 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, H12 e H8), 7,77 (sl, 1H, H3), 9,25 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,4 (Ca), 18,2 (Cd), 53,9 (Cb), 59,6 (C4), 99,2 (C5), 120,7 (C7), 128,9 (C9 e C11), 131,7 (C8 e C12), 144,6 (C6), 149,1 (C2), 152,3 (C10), 165,6 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB11-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (PASUNOOTI *et al.*, 2011).

4-(4-Bromofenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB11-S): 78% de rendimento (purificado por precipitação).



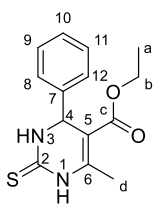
Fórmula molecular: C₁₄H₁₅BrN₂O₂S. **Faixa de fusão:** 192,0-194,4 °C [191-192 °C Lit. (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3328 (v NH), 3174 (v NH), 2982 (v sp²H), 1670 (v C=O), 1578 (v C=C), 1198 (v C=S), 1122 (v C-O), 596 (v CBr). **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,29 (s, 3H, Hd), 4,00 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,15 (sl, 1H, H4), 7,17 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H9 e H11), 7,55 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, H12 e H8), 9,67 (sl, 1H, H3), 10,38 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,0 (Ca), 17,2 (Cd), 53,6 (Cb), 59,7 (C4), 100,2 (C5), 120,8 (C10), 126,6 (C9 e C11), 131,5 (C8 e C12), 142,8 (C7), 145,4 (C6), 165,0 (Cc), 174,3 (C2). Os dados de caracterização para o **AB11-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (MOBINIKHALEDI, AKBAR *et al.*, 2009).

6-Metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB12-O): 68% de rendimento (purificado por precipitação). **Fórmula molecular:** C₁₄H₁₆N₂O₃.



Faixa de fusão: 205,3 - 207,3 °C [202-203 °C - Lit. (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3246 (v NH), 3116 (v NH), 2980 (v sp²H), 1726 (v C=O), 1700 (C=O), 1648 (v C=C), 1092 (C-O). **RMN de ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,09 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, Ha), 2,25 (s, 3H, Hd), 3,98 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, Hb), 5,14 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H4), 7,23-7,25 (m, 3H, H10, H12 e H8), 7,30-7,34 (m, 2H, H11, H9), 7,73 (sl, 1H, H3), 9,19 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,0 (Ca), 17,8 (Cd), 54,0 (C4), 59,2 (Cb), 99,3 (C5), 126,2 (C9 e C11), 127,3 (C10), 128,4 (C8 e C12), 144,0 (C7), 148,3 (C6), 152,2 (C2), 165,4 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB12-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DA SILVA, DANIEL L. *et al.*, 2011).

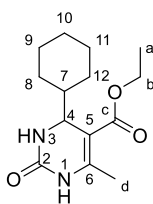
6-Metil-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB12-S): 85% de rendimento (purificado por precipitação).



Fórmula molecular: C₁₄H₁₆N₂O₂S. **Faixa de fusão:** 205,5 - 207,3 °C [208-209 °C – Lit. (SHIRINI; RAD-MOGHADAM; AKBARI-DADAMAHALEH, 2012)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3330 (ν NH), 3174 (ν NH), 3104 (ν sp²H), 1670 (ν C=O), 1648 (ν C=C), 1196 (ν C=S), 1118 (ν C-O).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,08 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, Ha), 2,29 (s, 3H, Hd), 4,01 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, Hb), 5,18 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz, H4), 7,21-7,36 (m, 5H, H8, H9, H10, H11 e H12), 9,64-9,64 (m, 1H, H3), 10,32 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26,9 (Ca), 30,0 (Cd), 66,9 (C4), 72,4 (Cb), 113,6 (C5), 139,3 (C9 e C11), 140,6 (C7), 141,4 (C8 e C12), 156,4 (C6), 157,9 (C10), 178,0 (Cc), 187,1 (C2). Os dados de caracterização para o **AB12-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (SHIRINI; RAD-MOGHADAM; AKBARI-DADAMAHALEH, 2012).

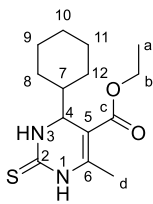
4-(4-Hidroxibutil)-6-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB13-O): 43% de rendimento [purificado por cromatográfica em coluna em sílica gel utilizando como eluente a mistura hexano/clorofórmio/acetato de etila (3:3:4)].



Fórmula molecular: C₁₄H₂₂N₂O₃. **Faixa de fusão:** 234,7-238,6 °C [237-238 °C Lit. (GHOLAP *et al.*, 2004)]. **IV** (KBr, ν cm⁻¹): 3238 (ν NH), 3120 (ν NH), 2922 (ν CH₂), 1728 (ν C=O), 1704 (ν C=O), 1646 (ν C=C), 1096 (ν CO).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0,82-1,37 (m, 10H, H7, Ha, H8, H12 e H10), 1,57-1,67 (m, 4H, H9 e H11), 2,16 (s, 3H, Hd), 3,92 (sl, 1H, H4), 3,97- 4,17 (m, 2H, Hb), 7,30 (sl, 1H, H3), 8,89 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,2 (Ca), 17,7 (Cb), 25,7 (C8), 25,9 (C12), 26,0 (C9), 26,3 (C11), 28,5 (C10), 44,9 (C7), 55,0 (C4), 59,0 (Cb), 98,0 (C5), 148,4 (C6), 153,2 (C2), 165,8 (Cc). Os dados de caracterização para o **AB13-O** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (GHOLAP *et al.*, 2004).

4-Ciclohexil-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etila (AB13-S):
4% de rendimento [purificado por cromatografia em coluna em sílica gel utilizando como eluente a mistura hexano/ acetato de etila (3:1)].



Fórmula molecular: C₁₄O₂₂N₂O₂S. **Faixa de fusão:** 210,5-212,8 °C [207-208 °C Lit.(ATWAL *et al.*, 1987)]. **IV** (KBr, v cm⁻¹): 3188 (v NH), 2980 (v NH), 2926 (v CH₂), 1708 (v C=O), 1648 (v C=C), 1182 (v C=S), 1092 (v C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0,78-0,90 (m, 1H, H7), 1,07-1,22 (m, 7H, Ha, H8 e H12), 1,37 (sl, 2H, H9), 1,58-1,65 (m, 4H, H10 e H11), 2,21 (s, 3H, Hd), 3,94-3,98 (m, 1H, H4), 4,02-4,16 (m, 2H, Hb), 9,22-9,32 (m, 1H, H3), 10,07 (s, 1H, H1). **RMN de ¹³C** (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,1 (Ca), 17,1 (Cd), 25,5 (C12), 25,7 (C9), 24,9 (C8), 26,6 (C11), 28,3 (C12), 44,7 (C7), 55,3 (C4), 59,7 (Cb), 99,5 (C5), 145,3 (C6), 165,6 (Cc), 175,2 (C2). Os dados de caracterização para o **AB13-S** estão de acordo com aqueles reportados na literatura (ATWAL *et al.*, 1987).

7.4 – Avaliação da inibição dos adutos de Biginelli frente à enzima urease

7.4.1 – Reagentes e preparo de soluções

A urease *Canavalia ensiformis* (*jack bean*) tipo III (Sigma-Aldrich) foi utilizada nos experimentos e para o preparo das soluções foram utilizados reagentes de grau analítico. Nas soluções foram utilizadas água ultra pura (condutividade < 0,1 μS) obtida pelo sistema Master System-200 (Brasil, Gehaka). Os adutos de Biginelli foram sintetizados e caracterizados como previamente apresentado no capítulo IV (pág. 36). Nos experimentos de interação, foi utilizada solução tampão fosfato 20 mM (pH 7) com 1 mM de ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA).

Foram preparadas soluções estoques 1,0 mM em etanol 98% dos compostos **AB1-O**, **AB1-S**, **AB2-O**, **AB3-S**, **AB5-S**, **AB6-S**, **AB7-S**, **AB8-S**, **AB9-O**, **AB9-S**, **AB10-O**, **AB10-S**, **AB11-O**, **AB11-S**, **AB12-O**, **AB12-S** e dessas soluções foram realizadas as diluições sucessivas em tampão conforme descrito para cada experimento.

7.4.2 – Ensaio enzimático de triagem

Os ensaios enzimáticos de triagem e cinética foram realizados por colaboração com aluna de doutorado Thamara Ferreira Silva do grupo de Estudos em Bioquímica de Plantas GEBIOPLAN da professora Luzia Valentina Modolo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A triagem da atividade ureolítica e a cinética da enzima urease foi realizada na presença e na ausência das substâncias teste utilizando o método colorimétrico do indofenol (WEATHERBURN, 1967). Para a triagem foram utilizados tampão fosfato 20 mM (pH 7) com 1 mM de EDTA e uma concentração fixa de ureia (10 mM) e de urease (12,5 mM) na presença das substâncias **AB1-O**, **AB1-S**, **AB2-O**, **AB3-S**, **AB5-S**, **AB6-S**, **AB7-S**, **AB8-S**, **AB9-O**, **AB9-S**, **AB10-O**, **AB10-S**, **AB11-O**, **AB11-S**, **AB12-O**, **AB12-S** na concentração de 0 ou 500 μM em um volume total de 100 μL . Os sistemas foram incubados durante 10 min a 25 °C e 600 rpm. As reações foram então interrompidas pela adição de 45 μL de uma solução de fenol (1% m/v) em solução aquosa de nitroprussiato de sódio (0,0005% m/v), seguida da adição de 70 μL de uma solução de NaOH (0,5% m/v) e em solução aquosa de NaOCl (0,1% m/V). Em seguida, os sistemas foram incubados a 50 °C durante 5 min e foram avaliadas a absorbância de cada reação a 630 nm, para então se determinar a quantidade de íon amônio (NH_4^+) formado no meio. Foram realizados experimentos independentes em triplicata. O tratamento estatístico foi realizado com teste de Scott Knott à significância de 0,05 e cada letra representa um grupo diferente de significância.

7.4.3 – Estudo de interação por fluorescência molecular

Os estudos de interação molecular foram realizados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), no Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação em Química Analítica (LINQA) do professor Josué Carinhanha Caldas Santos com o auxílio da aluna Thamilla Maria Silva Maciel, utilizando como recurso para o deslocamento o Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

7.4.4 – Titulação por fluorescência molecular

As titulações foram realizadas utilizando cubetas de 10 mm de caminho óptico no espectrofluorímetro (modelo 5301PC, Japão) equipado com lâmpada de xenônio (150 W). Os espectros de fluorescência da urease (1,0 μM), na presença ou ausência dos compostos

testes (**AB5-S**, **AB7-S**, **AB9-S**, **AB11-S** ou **AB12-S** - 2.5 a 50 μM), foram registrados de 260-450 nm empregando λ_{ex} de 280 nm com *slit* de excitação e emissão de 5 e 10, respectivamente (LAGE *et al.*, 2018). Para avaliação dos parâmetros termodinâmicos foram realizadas titulações espectrofluorimétricas em três temperaturas (22, 30, 38 °C) e os valores de k_b foram calculados para o sistema utilizando os valores de ΔH e ΔS , estabelecidos pela equação de Van'T Hoff, e posteriormente o valor de ΔG (LAGE *et al.*, 2018)

7.4.5 – Transferência de energia por ressonância de Förster

Para determinar a distância entre os resíduos de triptofano (doadores) e os compostos **AB5-S** ou **AB7-S** (aceptores), foi estudada a transferência de energia por ressonância de Förster. Foram então realizadas medidas de fluorescência da urease e do sistema urease/ligante registrados de 220-450 nm, empregando λ_{ex} de 280 nm, com *slit* de excitação e emissão de 3 e 5, respectivamente. Bem como, o perfil de absorção molecular dos ligantes registrado de 200-400 nm e λ_{ex} de 280 nm, mantendo-se a proporção 1:1 e 1:2, sendo a concentração empregada de urease de 5 μM e a de ligante 5 ou 10 μM , respectivamente (ZHANG; ZHANG; WANG, 2011).

7.4.6 – Fluorescência sincronizada: avaliação dos resíduos Tyr e Trp

O espectro de fluorescência sincronizado de urease na ausência e na presença dos adutos de Biginelli foram obtidos simultaneamente variando a excitação e a emissão do monocromador. A diferença no comprimento de onda de excitação ($\Delta\lambda$) foi fixada individualmente em $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina - λ_{ex} 265 nm), $\Delta\lambda = 60$ nm (triptofano - λ_{ex} 220 nm) para mostrar seletivamente o comportamento dos resíduos de triptofano e da tirosina, respectivamente. Para ambos os resíduos foram avaliados o processo de interação na faixa de 280-450 nm e as medidas foram realizadas na presença e na ausência dos ligantes **AB5-S** ou **AB7-S** (0-80 μM) (LAGE *et al.*, 2018)

7.4.7 – Avaliação dos sítios de ligação e estudos de competição

Soluções de urease 1 μM com reconhecidos inibidores: *N*-(*n*-butil) tiofosfórico triamida (NBPT), ureia, omeprazol foram utilizados com concentração fixa de 25 μM e a tioureia foi utilizada na concentração de 38 μM . Em seguida, foram realizadas titulações

espectrofluorimétricas da enzima e das substâncias **AB5-S** ou **AB7-S** na faixa de concentração de 0-80 μM . Os espectros foram registrados de 260 - 450 nm, empregando λ_{ex} de 280 nm, com *slit* de excitação e emissão de 5 e 10, respectivamente (LAGE *et al.*, 2018).

7.4.8 – Fluorescência tridimensional (3D): Alterações conformacionais

Solução de urease (1 μM) foi avaliada na presença e na ausência das substâncias **AB5-S** ou **AB7-S** na concentração (40 μM) os resultados foram registrados de 260-450 nm, empregando λ_{ex} na faixa de 220-350 nm, e λ_{em} 260 - 450 nm, com *slit* de excitação e emissão de 5 e 10, respectivamente (LAGE *et al.*, 2018).

7.4.9 – Estudo de cinética

Os adutos de Biginelli nas concentrações de 0,1 - 0,3 mM (concentrações capazes de inibir a atividade na urease entre 30 e 40%, respectivamente), foram incubadas no meio contendo 20 mM de tampão fosfato (pH 7), 1 mM de EDTA, ureia (na faixa de 1-32 mM) e concentração fixa de urease (12,5 mU). As reações foram interrompidas, o NH_4^+ foi quantificado e a inibição da urease foi calculada como descrita para o processo de triagem (pág. 103). Os parâmetros da urease: velocidade inicial, K_m e V_m foram obtidos usando o Hyper 32 software (easterby 2003). A hipérbole de Michaelis Menten e Lineweaver-Burk foram obtidas utilizando o OriginPro8 (Origin Lab, Northampton MA). Finalmente, foram determinadas as constantes de equilíbrio de dissociação para ureia e complexo com os inibidores (k_i) (VOET; VOET, 2011).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J.; DYSON, P. J.; TAVENER, S. J. Ionic Liquids. *Chemistry in Alternative Reaction Media*. John Wiley & Sons, Ltd, 2003. v. 41. p. 75–93.
- AKRITOPOULOU-ZANZE, I.; DJURIC, S. W. Applications of MCR-Derived heterocycles in drug discovery. In: ORRU, ROMANO V. A.; RUIJTER, EELCO (Org.). *Synthesis of Heterocycles via Multicomponent Reactions II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 231–287.
- ALVES, A. R.; COUTINHO, A. R. The evolution of the niobium production in Brazil. *Materials Research*, v. 18, n. 1, p. 106–112, 2015.
- ALVIM, H. G. O. *et al.* Facts, Presumptions, and myths on the solvent-free and catalyst-free Biginelli reaction. What is catalysis for? *The Journal of Organic Chemistry*, v. 79, n. 8, p. 3383–3397, 2014.
- ATWAL, K. S. *et al.* Synthesis of substituted 1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-2-thioxo-5-pyrimidinecarboxylic acid esters. *Heterocycles*, v. 26, n. 5, p. 1189, 1987.
- AMARASEKARA, A. S. Acidic ionic liquids. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 10, p. 6133–6183, 2016.
- AMARASEKARA, A. S.; WIREDU, B. Acidic ionic liquid catalyzed one-pot conversion of cellulose to ethyl levulinate and levulinic acid in ethanol-water solvent system. *BioEnergy Research*, v. 7, n. 4, p. 1237–1243, 2014.
- AMTUL, Z. *et al.* Chemistry and mechanism of urease inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 14, p. 1323–1348, 2002.
- ANDRADE, C. K. Z.; AZEVEDO, N. R. Niobium (V) chloride-mediated allylation of aldehydes. Scope and stereoselectivity. *Tetrahedron Letters*, v. 42, n. 37, p. 6473–6476, 2001.
- ANDRADE, C. K. Z. Niobium pentachloride in organic synthesis: applications and perspectives. *Current Organic Synthesis*, v. 1, n. 4, p. 333–353, 2004.
- ANTUNES, A. C.; FOLGUERAS-DOMINGUEZ, S.; MOURA, L. F. Síntese do oxifosfato de níbio (V) hidratado $\text{NbOPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ a partir do hexaniobato de potássio. *Química Nova*, v. 6, n. 16, p. 521–523, 1993.
- ARMAROLI, T. *et al.* Acid sites characterization of niobium phosphate catalysts and their activity in fructose dehydration to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 151, n. 1–2, p. 233–243, 2000.

- ARTOLA, E. *et al.* Effect of *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide on urea metabolism and the assimilation of ammonium by *Triticum aestivum* L. *Plant Growth Regulation*, v. 63, n. 1, p. 73–79, 2011.
- BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Journal of Molecular Biology*, v. 400, n. 3, p. 274–283, 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, A. M. Aspectos gerais da ação dos fármacos. *Química medicinal : as bases moleculares da ação dos fármacos*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. p. 5–13.
- BASSAN, I. A. L. *et al.* Esterification of fatty acids with alcohols over niobium phosphate. *Fuel Processing Technology*, v. 106, p. 619–624, 2013.
- BEENA, K. P.; AKELESH, T. Synthesis and screening of some dihydropyrimidine derivatives as antimicrobial agents. *Int Res J Pharm*, v. 3, n. 9, p. 2, 2012.
- BENINI, S. *et al.* Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 6, n. 8, p. 778–790, 2001.
- BENINI, S. *et al.* The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55 Å resolution. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 110–118, 2000.
- BENINI, S. *et al.* The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data at 1.65-Å resolution. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 3, n. 3, p. 268–273, 1998.
- BENINI, S. *et al.* A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, v. 7, n. 2, p. 205–216, 1999.
- BIGINELLI, P. Intorno ad uramidi aldeidiche dell'etere acetilacetico. II. *Gazzetta chimica Italiana*, v. 21, p. 497–500, 1891a.
- BIGINELLI, P. Ueber Aldehyduramide des Acetessigäthers. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 24, n. 1, p. 1317–1319, 1891b.
- BORDWELL, F. G. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. *Accounts of Chemical Research*, v. 21, n. 12, p. 456–463, 1988.
- BURCH, R.; SWARNAKAR, R. Oxidative dehydrogenation of ethane on vanadium-molybdenum oxide and vanadium-niobium-molybdenum oxide catalysts. *Applied Catalysis*, v. 70, n. 1, p. 129–148, 1991.

CALLAHAN, B. P.; YUAN, Y.; WOLFENDEN, R. The burden borne by urease. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 31, p. 10828–10829, 2005.

CANTARELLA, H. *et al.* Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 19–27, 2018.

CBMM. *Conheça a história da CBMM e sua relação com o desenvolvimento do Nióbio*. Disponível em: <<https://www.cbmm.com/pt/Partner-with-CBMM/Our-history>>. Acesso em: 6 maio 2019.

CEPANEC, I. *et al.* Antimony(III) chloride-catalysed Biginelli reaction: a versatile method for the synthesis of dihydropyrimidinones through a different reaction mechanism. *Tetrahedron*, v. 63, n. 48, p. 11822–11827, 2007.

CHENG, J.; CHU, Y-H. 1-Butyl-2,3-trimethyleneimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([b-3C-im][NTf₂]): a new, stable ionic liquid. *Tetrahedron Letters*, v. 47, n. 10, p. 1575–1579, 2006.

CHERIAN, M. *et al.* Oxidative dehydrogenation of propane over supported chromia catalysts: Influence of oxide supports and chromia loading. *Journal of Catalysis*, v. 211, n. 2, p. 482–495, 2002.

CHERIAN, M.; RAO, M. S.; DEO, G.. Niobium oxide as support material for the oxidative dehydrogenation of propane. *Catalysis Today*, v. 78, n. 1–4, p. 397–409, 2003.

CHIRIO-LEBRUN, M-C; PRATS, M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET): theory and experiments. *Biochemical Education*, v. 26, n. 4, p. 320–323, 1998.

CHITRA, S.; DEVANATHAN, D.; PANDIARAJAN, K. Synthesis and in vitro microbiological evaluation of novel 4-aryl-5-isopropoxycarbonyl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 1, p. 367–371, 2010.

COLE, A. C. *et al.* Novel Brønsted acidic ionic liquids and their use as dual solvent–catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 21, p. 5962–5963, 2002.

commonorganicchemistry. Disponível em: <http://commonorganicchemistry.com/Common_Reagents/Potassium_Hydroxide/Potassium%20Hydroxide.htm>, acessado 28 maio 2019

DA SILVA, C. M. *et al.* Synthesis of aryl aldimines and their activity against fungi of clinical interest. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 78, n. 5, p. 810–5, 2011.

DA SILVA, D. L. *et al.* Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 8, p. 2645–2650, 2012.

DA SILVA, D. L. *et al.* *p*-Sulfonic acid calixarenes as efficient and reusable organocatalysts for the synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones/-thiones. *Tetrahedron Letters*, v. 52, n. 48, p. 6328–6330, 2011.

DA SILVA, J. C. G.; FOLGUERAS-DOMENGUEZ, S.; DOSSANTOS, A. C. B. Amorphous niobium phosphate: characterization and acid aspects. *Journal of Materials Science Letters*, v. 18, n. 3, p. 197–200, 1999.

DANTAS, M. D. A. *et al.* Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 505–514, 2017.

DE FÁTIMA, Â. *et al.* A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *Journal of Advanced Research*, v. 6, n. 3, p. 363–373, 2015.

DE LA CRUZ, M. H. C.; DA SILVA, J. F. C.; LACHTER, E. R. Catalytic activity of niobium phosphate in the Friedel–Crafts reaction of anisole with alcohols. *Catalysis Today*, v. 118, n. 3–4, p. 379–384, 2006.

DE LA CRUZ, M. H. C.; DA SILVA, J. F. C.; LACHTER, E. R. Liquid phase benzylation of aromatic compounds with benzyl alcohol catalyzed by niobium phosphate. *Applied Catalysis A: General*, v. 245, n. 2, p. 377–382, 2003.

DE VASCONCELOS, A. *et al.* Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2*H*)-ones promoted by naturally occurring organic acids. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 26, n. 4, p. 155–161, 2012.

DEBACHE, Abdelmadjid *et al.* A one-pot Biginelli synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1*H*)-ones/thiones catalyzed by triphenylphosphine as Lewis base. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 42, p. 6119–6121, 2008.

DHUMASKAR, K. L. *et al.* Graphite catalyzed solvent free synthesis of dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones/thiones and their antidiabetic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 13, p. 2897–2899, 2014.

DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. An overview of the different types of catalysts in organic synthesis. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 6, 2012.

DING, D. *et al.* High-yield production of levulinic acid from cellulose and its upgrading to [gamma]-valerolactone. *Green Chemistry*, v. 16, n. 8, p. 3846–3853, 2014.

DIXON, N. E. *et al.* Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

DOMEN, K. *et al.* Overall photodecomposition of water on a layered niobiate catalyst. *Catalysis Today*, v. 8, n. 1, p. 77–84, 1990.

DONTHABHAKTHUNI, S. *et al.* Synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones (DHPMs) using highly efficient recyclable silica supported rhodium chloride as heterogeneous catalyst and their anti-neuroinflammatory activity. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 9, n. 10, p. 962–966, 2012.

DU, X. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

ELAVARASAN, P.; KONDAMUDI, K.; UPADHYAYULA, S. Kinetics of phenol alkylation with *tert*-butyl alcohol using sulfonic acid functional ionic liquid catalysts. *Chemical Engineering Journal*, v. 166, n. 1, p. 340–347, 2011.

EL-NASSAN, H. B. Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 614–631, 2013.

FOLKERS, K.; JOHNSON, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The mechanism of formation of tetrahydropyrimidines by the Biginelli reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 55, n. 9, p. 3784–3791, 1933.

FOLLMER, C. *et al.* Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, v. 360, n. 1, p. 217–224, 2001.

GAO, H. *et al.* Extraction and oxidative desulfurization of diesel fuel catalyzed by a Brønsted acidic ionic liquid at room temperature. *Green Chemistry*, v. 12, n. 7, p. 1220, 2010.

GEILEN, F. M. A. *et al.* Selective and flexible transformation of biomass-derived platform chemicals by a multifunctional catalytic system. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 49, n. 32, p. 5510–5514, 2010.

GHISAIDOOBE, A.; CHUNG, S. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 2014.

GHOLAP, A. R. *et al.* Ionic liquid promoted novel and efficient one pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1*H*)-ones at ambient temperature under ultrasound irradiation. *Green Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 147–150, 2004.

GÓMEZ BERNAL, H.; BERNAZZANI, L.; RASPOLLI GALLETTI, A. M. Furfural from corn stover hemicelluloses. A mineral acid-free approach. *Green Chem.*, v. 16, n. 8, p. 3734–3740, 2014.

GRAHAM, D. Y.; MIFTAHUSSURUR, M. *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 51–57, 2018.

GRIFFITH, W. P.; MORRIS, P. J. T. Charles Hatchett FRS (1765-1847), chemist and discoverer of niobium. *Notes and Records of the Royal Society of London*, v. 57, n. 3, p. 299–316, 2003.

GUO, X. *et al.* A spectroscopic study on the interaction between *p*-nitrophenol and bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, v. 149, p. 353–360, 2014.

HASNAIN, S. S.; PIGGOTT, B. An EXAFS study of jack bean urease, a nickel metalloenzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 112, n. 1, p. 279–283, 1983.

HAWKER, R. R.; HARPER, J. B. Organic reaction outcomes in ionic liquids. *Advances in Physical Organic Chemistry*. Elsevier, 2018. v. 52. p. 49–85. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065316018300029>>. Acesso em: 14 maio 2019.

HENDERSON, L. C.; BYRNE, N. Rapid and efficient protic ionic liquid-mediated pinacol rearrangements under microwave irradiation. *Green Chemistry*, v. 13, n. 4, p. 813, 2011.

JEGATHA, N. K.; HYUNG-SUN, L.; JAE-KYUN, C.; BYUNG-WON, R.; EUN-JOO, L.; SANG-GI, K., Organic solvents containing zwitterion as electrolyte for Li ion cells. *Korean Chemical Society*, v. 29, n.9, p. 1705–1710, 2008.

JEONG, Y. *et al.* Intramolecular hydroalkoxylation in Bronsted acidic ionic liquids and its application to the synthesis of (+/-)-centrolobine. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 9, n. 2, p. 374–378, 2011.

JIN, J. *et al.* Continuous niobium phosphate catalysed Skraup reaction for quinoline synthesis from solketal. *Green Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 2439–2447, 2017.

JÚNIOR, R. F. P. Sumário mineral. *Nióbio*, v. 36, n. 36, p. 80–81, 2016.

KABIRI, M. *et al.* Use of spectroscopic, zeta potential and molecular dynamic techniques to study the interaction between human holo-transferrin and two antagonist drugs: comparison of binary and ternary systems. *Molecules*, v. 17, n. 3, p. 3114–3147, 2012.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 101–112, 2018.

KANDAGAL, P. B. *et al.* Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 2, p. 393–399, 2006.

KAPOOR, K. K. *et al.* Antimony(III) chloride impregnated on alumina — An efficient and economical Lewis acid catalyst for one-pot synthesis of dihydropyrimidinones under solvent-free conditions. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 84, n. 3, p. 433–437, 2006.

KAPPAUN, K. *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 3–17, 2018.

KAPPE, C. O. A Reexamination of the mechanism of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. Support for an N-Acyliminium ion intermediate¹. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 62, n. 21, p. 7201–7204, 1997.

KIM, J. *et al.* Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 5, p. 2119–2124, 2012.

KOLB, S. *et al.* Development of novel thiazolopyrimidines as CDC25B phosphatase inhibitors. *ChemMedChem*, v. 4, n. 4, p. 633–648, 2009.

KORE, R.; SRIVASTAVA, R. Synthesis and applications of highly efficient, reusable, sulfonic acid group functionalized Brønsted acidic ionic liquid catalysts. *Catalysis Communications*, v. 12, n. 15, p. 1420–1424, 2011.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, n. 1–3, p. 9–21, 2009.

KRISHNAN, J.; Kim, H-S.; Lee, J-K.; Cho, B-W.; Roh, E-J.; Lee, S-G. Organic solvents containing zwitterion as electrolyte for Li ion cells. *Korean Chemical Society*, v. 29, n. 9, p. 1705–1710, 2008.

KUMAR, P. *et al.* *Leishmania donovani* pteridine reductase 1: Biochemical properties and structure-modeling studies. *Experimental Parasitology*, v. 120, n. 1, p. 73–79, 2008.

LAGE, T. C. A. *et al.* *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. *New Journal of Chemistry*, v. 42, n. 7, p. 5356–5366, 2018.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum, 1999.

LEBARBIER, V.; HOUALLA, M.; ONFROY, T. New insights into the development of Brønsted acidity of niobic acid. *Catalysis Today*, v. 192, n. 1, p. 123–129, 2012.

LI, T. *et al.* Comparison of interactions between three food colorants and BSA. *Food Chemistry*, v. 194, p. 740–748, 2016.

LI, X. *et al.* Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: Ascorbic acid, α -tocopherol, and proanthocyanidins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 70, p. 22–36, 2013.

LITVIĆ, M. *et al.* First application of hexafluoroaluminum(III) tetrafluoroborate as a mild, recyclable, non-hygroscopic acid catalyst in organic synthesis: a simple and efficient protocol

for the multigram scale synthesis of 3,4-dihydropyrimidinones by Biginelli reaction. *Tetrahedron*, v. 66, n. 19, p. 3463–3471, 2010.

LIU, Y-L.; NASCIMENTO, M.; BURNE, R. A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *International Journal of Oral Science*, v. 4, n. 3, p. 135–140, 2012.

LLOYD, J. B. F. Synchronized Excitation of Fluorescence Emission Spectra. *Nature Physical Science*, v. 231, n. 20, p. 64–65, 1971.

LOPES, O. F. *et al.* Niobium oxides: an overview of the synthesis of Nb₂O₅ and its application in heterogeneous photocatalysis. *Química Nova*, v. 38, n. 1, p. 106–117, 2015.

MACHADO, A. A. S. C. Dos primeiros aos segundos doze princípios da química verde. *Química nova*, v. 35, n. 6, p. 1250–1259, 2012.

MANUNZA, B. *et al.* The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, n. 5, p. 789–796, 1999.

MAO, T. *et al.* High throughput preparation of UV-Protective polymers from essential oil extracts via the Biginelli reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 22, p. 6865–6872, 2018.

MARSHALL, B. Helicobacter connections. *ChemMedChem*, v. 1, n. 8, p. 783–802, 2006.

MARTINS, R. L.; SCHITINE, W. J.; CASTRO, F. R. Texture, surface acidic and catalytic properties of niobium phosphate. *Catalysis Today*, v. 5, n. 4, p. 483–491, 1989.

MASKREY, T. S. *et al.* A Five-Component Biginelli-Diels-Alder Cascade Reaction. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, n. 376, p. 1–8, 2018.

MAYER, T. U. *et al.* Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, v. 286, n. 5441, p. 971–4, 1999.

MAZZEI, L.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. CHAPTER 5. Urease. In: ZAMBLE, D.; ROWINSKA-ZYREK, M.; KOZLOWSKI, H. (Org.). *Metallobiology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017. p. 60–97.

MAZZEI, L. *et al.* Urease inhibition in the presence of N-(n-Butyl)thiophosphoric triamide, a suicide substrate: structure and kinetics. *Biochemistry*, v. 56, n. 40, p. 5391–5404, 2017.

MOBINIKHALEDI, A. *et al.* An efficient synthesis of some novel bicyclic thiazolopyrimidine derivatives. *Heterocyclic Communications*, v. 15, n. 6, p.451-158, 2009.

MOBINIKHALEDI, Akbar *et al.* An efficient synthesis of some novel bicyclic thiazolopyrimidine derivatives. *Heterocyclic Communications*, v. 15, n. 6, 2009.

MODOLO, L. V. *et al.* A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 29–37, 2018.

MODOLO, L. V. *et al.* An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, v. 6, n. 1, p. 35–44, 2015.

MODOLO, L. V. *et al.* *Uso de adutos de Biginelli como inibidores de urease.*, patente BR 10 2013 017356-8 A2 3.1, 27 set. 2016

MOROU-BERMUDEZ, E. *et al.* Urease and dental plaque microbial profiles in children. *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, p. e0139315, 2015.

MUNISHKINA, L. A.; FINK, A. L. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1768, n. 8, p. 1862–1885, 2007.

MUNIZ, D. R. *et al.* Pre-emergence application of (thio)urea analogues compromises the development of the weed species *Bidens pilosa*, *Urochloa brizantha*, and *Urochloa decumbens*. *Journal of Advanced Research*, v. 17, p. 95-102, 2019.

NANDURKAR, N. S. *et al.* $Y(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$: A novel and reusable catalyst for one pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones under solvent-free conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 271, n. 1–2, p. 14–17, 2007.

NELSON, D. L. *et al.* *Princípios de bioquímica de Lehninger.*, 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

NEMATI, F.; ALIZADEH, S. G. Bi-SO₃H functionalized ionic liquid based on DABCO: New and efficient catalyst for facile synthesis of dihydropyrimidinones. *Journal of Chemistry*, v. 2013, p. 5, 2013.

NI, Y.; SU, S.; KOKOT, S. Spectrofluorimetric studies on the binding of salicylic acid to bovine serum albumin using warfarin and ibuprofen as site markers with the aid of parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 580, n. 2, p. 206–215, 2006.

NOWAK, I.; ZIOLEK, M. Niobium compounds: preparation, characterization, and application in heterogeneous catalysis. *Chemical Reviews*, v. 99, n. 12, p. 3603–3624, 1999.

OKAZAKI, S.; WADA, N. Surface properties and catalytic activities of amorphous niobium phosphate and a comparison with those of H₃PO₄-treated niobium oxide. *Catalysis Today*, v. 16, n. 3–4, p. 349–359, 1993.

PASUNOOTI, K. K. *et al.* A microwave-assisted, copper-catalyzed three-component synthesis of dihydropyrimidinones under mild conditions. *Tetrahedron Letters*, v. 52, n. 1, p. 80–84, 2011.

- PENTEADO, F. *et al.* Niobium-promoted reaction of α -phenylglyoxylic acid with ortho-functionalized anilines: synthesis of 2-arylbenzothiazoles and 3-aryl-2H-benzo[*b*][1,4]benzoxazin-2-ones. *Green Chemistry*, v. 18, n. 24, p. 6675–6680, 2016.
- PEREIRA, C. C. M.; DE LA CRUZ, M. H. C.; LACHTER, E. R. Liquid phase alkylation of anisole and phenol catalyzed by niobium phosphate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 367–370, 2010.
- PERRIN, D. D.; AMARENGO, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. 3. ed. Oxford: Kieboom, A. P. G, 1988. v. 107.
- PHOLJAROEN, B. *et al.* Dehydration of xylose to furfural over niobium phosphate catalyst in biphasic solvent system. *Journal of Energy Chemistry*, v. 22, n. 6, p. 826–832, 2013.
- RAMOS, L. M. *et al.* Mechanistic studies on Lewis acid catalyzed Biginelli reactions in ionic liquids: evidence for the reactive intermediates and the role of the reagents. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 22, p. 10184–10193, 2012.
- RAMOS, L. M. *et al.* The Biginelli reaction with an imidazolium-tagged recyclable iron catalyst: kinetics, mechanism, and antitumoral activity. *Chemistry – A European Journal*, v. 19, n. 13, p. 4156–4168, 2013.
- RAMSAY, W. XXXIV. *On picoline and its derivatives*. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, v. 2, n. 11, p. 269–281, 1876.
- RASHID, U. *et al.* Structure based virtual screening-driven identification of monastrol as a potent urease inhibitor. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 43, p. 47–57, 2013.
- REGO, Y. F. *et al.* A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 69–100, 2018.
- REGUERA, L. *et al.* Multicomponent reactions in ligation and bioconjugation chemistry. *Accounts of Chemical Research*, v. 51, n. 6, p. 1475–1486, 2018.
- ROCHA, A. S. *et al.* Comparative performance of niobium phosphates in liquid phase anisole benzylation with benzyl alcohol. *Catalysis Communications*, v. 9, n. 10, p. 1959–1965, 2008.
- ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.
- RUSSOWSKY, De. *et al.* Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorganic Chemistry*, v. 34, n. 4, p. 173–182, 2006.
- RUTHROF, K. X. *et al.* Transitioning from phosphate mining to agriculture: Responses to urea and slow release fertilizers for Sorghum bicolor. *Science of The Total Environment*, v. 625, p. 1–7, 2018.

SAMANTA, A.; PAUL, B. K.; GUCHHAIT, N. Spectroscopic probe analysis for exploring probe–protein interaction: A mapping of native, unfolding and refolding of protein bovine serum albumin by extrinsic fluorescence probe. *Biophysical Chemistry*, v. 156, n. 2–3, p. 128–139, 2011.

SANTANA, C. C. *et al.* Evaluation of guanylylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. *Bioorganic Chemistry*, v. 87, p. 169–180, 2019.

SANTOS, J. C. N. *et al.* Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 113, p. 1032–1040, 2018.

SATI, B. *et al.* Synthesis of Acetylated Dihydropyrimidine Analogues Under Solvent Free Conditions and their Evaluation as Calcium Channel Blockers. *Oriental Journal of Chemistry*, v. 28, n. 2, p. 5, 2012.

SCALDAFERRI, C. A.; PASA, V. M. D. Production of jet fuel and green diesel range biohydrocarbons by hydroprocessing of soybean oil over niobium phosphate catalyst. *Fuel*, v. 245, p. 458–466, 2019.

SELLI, E.; FORNI, L. Comparison between the surface acidity of solid catalysts determined by TPD and FTIR analysis of pre-adsorbed pyridine. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 31, n. 1–2, p. 129–140, 1999.

SHEN, L. *et al.* Liquid phase catalytic dehydration of glycerol to acrolein over Brønsted acidic ionic liquid catalysts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 20, n. 3, p. 759–766, 2014.

SHIRINI, F.; RAD-MOGHADAM, K.; AKBARI-DADAMAHALEH, S. Application of ionic liquids in multicomponent reactions. In: MOHAMMAD, A.; INAMUDDIN, D. R. (Org.). *Green solvents II: Properties and applications of ionic liquids*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 289–334.

SHU, Y. *et al.* Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. *Food Chemistry*, v. 173, p. 31–37, 2015.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 10, p. S1409–S1421, 2017.

SIERRA, M. M. S. *et al.* Química nova. *A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas*, v. 19, n. 3, p. 294–301, 1996.

- SILVA, M. DE M. *et al.* Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 189, p. 165–175, 2018.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M. *Fundamentals of analytical chemistry*. 4th ed. Philadelphia: Saunders College Pub, 1982. (Saunders golden sunburst series).
- SOTOMAYOR, M. D. P. T. *et al.* Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1755–1774, 2008.
- SUJATHA, K. *et al.* Synthesis and cardiac effects of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one-5 carboxylates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 18, p. 4893–4897, 2006.
- SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 69, p. 435- 441, 1926.
- SUN, Q. *et al.* Dehydration of methanol to dimethyl ether over Nb₂O₅ and NbOPO₄ catalysts: Microcalorimetric and FT-IR studies. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 275, n. 1–2, p. 183–193, 2007.
- SUN, Y. *et al.* Interactions between 4-(2-dimethylaminoethoxy)-*N*-octadecyl-1,8-naphthalimide and serum albumins: Investigation by spectroscopic approach. *Journal of Luminescence*, v. 132, n. 4, p. 879–886, 2012.
- TAMADDON, F.; GHAZI, S. Urease: A highly biocompatible catalyst for switchable Biginelli reaction and synthesis of 1,4-dihydropyridines from the in situ formed ammonia. *Catalysis Communications*, v. 72, p. 63–67, 2015.
- TANABE, K.; OKAZAKI, S. Various reactions catalyzed by niobium compounds and materials. *Applied Catalysis A: General*, v. 133, n. 2, p. 191–218, 1995.
- TANABE, K. Application of niobium oxides as catalysts. *Catalysis Today*, v. 8, n. 1, p. 1–11, 1990.
- TANABE, K. Catalytic application of niobium compounds. *Catalysis Today*, v. 78, n. 1, p. 65–77, 2003.
- TERADA, M.; MACHIOKA, K.; SORIMACHI, K. Chiral Brønsted acid-catalyzed tandem aza-ene type reaction/cyclization cascade for a one-pot entry to enantioenriched piperidines. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 34, p. 10336–10337, 2007.
- UGI, I.; DÖMLING, A.; EBERT, B. Combinatorial chemistry of multicomponent reactions. *Combinatorial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 1999. p. 125–165.
- UGI, I.; DÖMLING, A.; HÖRL, W. Multicomponent reactions in organic chemistry. *Endeavour*, v. 18, n. 3, p. 115–122, 1994.

UGI, I.; DOMLING, A.; WERNER, B. Since 1995 the new chemistry of multicomponent reactions and their libraries, including their heterocyclic chemistry. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 37, n. 3, p. 647–658, 2000.

VEKARIYA, R. L. A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*, v. 227, p. 44–60, 2017.

VIJAYAKUMAR, B.; RANGA RAO, G. Synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones using ZrOCl₂/mont K10 under microwave assisted solvent-free conditions. *Journal of Porous Materials*, v. 19, n. 4, p. 491–497, 2012.

VITÓRIO, F. *et al.* Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction. *New Journal of Chemistry*, v. 39, n. 3, p. 2323–2332, 2015.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011.

VUIGNIER, K. *et al.* Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, n. 1, p. 53–66, 2010.

WALDEN, P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bulletin of the Russian Academy of Science*, v. 8, p. 405–422, 1914.

WANG, Q.; PEI, W. Synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones catalyzed by nafion-H under ultrasound irradiation and solvent-free conditions. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 7, n. 2, p. 318–321, 2010.

WANG, Q. *et al.* Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 136, p. 321–326, 2015.

WANG, Y-Q. *et al.* Studies of the interaction between paraquat and bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, n. 3, p. 243–250, 2007.

WANG, Y-Q.; ZHANG, G-C.; ZHANG, H-M. Study on the Interaction of Pentachlorophenol with Urease in Aqueous Solution by Multiple Spectroscopic Techniques. *Journal of Solution Chemistry*, v. 40, n. 3, p. 458–469, 2011.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967.

YAN-QING, W.; HONG-MEI, Z. Spectral studies on the interaction between Cu²⁺ and urease. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 96, p. 352–357, 2012.

YU, J.; SHI, F.; GONG, L. Z. Bronsted-acid-catalyzed asymmetric multicomponent reactions for the facile synthesis of highly enantioenriched structurally diverse nitrogenous heterocycles. *Accounts of Chemical Research*, v. 44, n. 11, p. 1156–71, 2011.

ZEYNIZADEH, B.; DILMAGHANI, K. A.; YARI, M. NaHSO₄·H₂O as a heterogeneous acidic reagent for mild and convenient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones and their sulfur derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, v. 184, n. 9, p. 2465–2471, 2009.

ZHANG, H-M.; ZHANG, G-C.; WANG, Y-Q. The interaction of chromium(VI) with urease in solution. *Biological Trace Element Research*, v. 141, n. 1–3, p. 53–64, 2011.

ZHU, J. *et al.* New ytterbium complex-catalyzed multicomponent reactions for synthesis of dihydropyrimidines: [4+2] cycloaddition vs. Biginelli type reaction. *Chemistry Letters*, v. 38, n. 1, p. 56–57, 2009.

ZIOLEK, M. Niobium-containing catalysts—the state of the art. *Catalysis Today*, v. 78, n. 1, p. 47–64, 2003.

ZIOLEK, M.; SOBCZAK, I. The role of niobium component in heterogeneous catalysts. *Catalysis Today*, v. 285, p. 211–225, 2017.

APÊNDICE

Fig. Apêndice 1: Gráfico de Van't Hoff para os adutos de Biginelli AB5-S and AB7-S com urease	127
Fig. Apêndice 2: Sobreposição da emissão de fluorescência da urease (azul, 5 μ M) com o espectro de absorção de (A) AB5-S (black, 5 μ M) and (B) AB7-S (preto, 5 μ M).	127
Fig. Apêndice 3: Urease (1,0 μ M, pH 7,4) espectro de fluorescência sincronizada com a adição de incrementos de AB5-S , monitorando (A) $\Delta\lambda = 15$ nm (Tyr resíduos) and (B) $\Delta\lambda = 60$ nm (Trp resíduos), e AB7-S monitorando (C) $\Delta\lambda = 15$ nm (Tyr resíduos) e (D) $\Delta\lambda = 60$ nm (Trp resíduos).	128
Fig. Apêndice 4: Espectro de RMN de ^1H da substância BIM (200 MHz, CDCl_3).....	130
Fig. Apêndice 5: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) BIM (50 MHz, CDCl_3)	130
Fig. Apêndice 6: Espectro na região do infravermelho (ATR) BIM	131
Fig. Apêndice 7: Espectro de RMN de ^1H da substância BIMBS (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).131	
Fig. Apêndice 8: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) BIMBS (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).....	132
Fig. Apêndice 9: Espectro na região do infravermelho (ATR) BIMBS	132
Fig. Apêndice 10: Espectro de RMN de ^1H da substância [BIMBS][CI] (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).	133
Fig. Apêndice 11: : Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) [BIMBS][CI] (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	133
Fig. Apêndice 12: Espectro na região do infravermelho (ATR) [BIMBS][CI]	134
Fig. Apêndice 13: Mapa de contorno HMQC [BIMBS][CI] ($\text{DMSO-}d_6$)	134
Fig. Apêndice 14: Mapa de contorno HMBC [BIMBS][CI] ($\text{DMSO-}d_6$)	135
Fig. Apêndice 15: Espectro de RMN de ^1H da substância AB1-O (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).	135

Fig. Apêndice 16: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB1-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	136
Fig. Apêndice 17: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB1-O	136
Fig. Apêndice 18: Espectro de RMN de ^1H da substância AB1-S (200 MHz, DMSO- d_6).	137
Fig. Apêndice 19: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB1-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	137
Fig. Apêndice 20: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB1-S	138
Fig. Apêndice 21: Espectro de RMN de ^1H da substância AB2-O (400 MHz, DMSO- d_6).	138
Fig. Apêndice 22: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB2-O (100 MHz, DMSO- d_6).....	139
Fig. Apêndice 23: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB2-O	139
Fig. Apêndice 24: Espectro de RMN de ^1H da substância AB2-S (200 MHz, DMSO- d_6).	140
Fig. Apêndice 25: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB2-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	140
Fig. Apêndice 26: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB2-S	141
Fig. Apêndice 27: Espectro de RMN de ^1H da substância AB3-O (200 MHz, DMSO- d_6).	141
Fig. Apêndice 28: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB3-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	142
Fig. Apêndice 29: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB3-O	142
Fig. Apêndice 30: Espectro de RMN de ^1H da substância AB3-S (200 MHz, DMSO- d_6).	143

Fig. Apêndice 31: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB3-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	143
Fig. Apêndice 32: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB3-S	144
Fig. Apêndice 33: Espectro de RMN de ^1H da substância AB4-O (200 MHz, DMSO- d_6).	144
Fig. Apêndice 34: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB4-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	145
Fig. Apêndice 35: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB4-O	145
Fig. Apêndice 36: Espectro de RMN de ^1H da substância AB4-S (200 MHz, DMSO- d_6).	146
Fig. Apêndice 37: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB4-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	146
Fig. Apêndice 38: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB4-S	147
Fig. Apêndice 39: Espectro de RMN de ^1H da substância AB5-O (200 MHz, DMSO- d_6).	147
Fig. Apêndice 40: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB5-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	148
Fig. Apêndice 41: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB5-O	148
Fig. Apêndice 42: Espectro de RMN de ^1H da substância AB5-S (200 MHz, DMSO- d_6).	149
Fig. Apêndice 43: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB5-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	149
Fig. Apêndice 44: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB5-S	150
Fig. Apêndice 45: Espectro de RMN de ^1H da substância AB6-O (200 MHz, DMSO- d_6).	150

Fig. Apêndice 46: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB6-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	151
Fig. Apêndice 47: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB6-O	151
Fig. Apêndice 48: Espectro de RMN de ^1H da substância AB6-S (400 MHz, DMSO- d_6).	152
Fig. Apêndice 49: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB6-S (100 MHz, DMSO- d_6).....	152
Fig. Apêndice 50: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB6-S	153
Fig. Apêndice 51: Espectro de RMN de ^1H da substância AB7-O (200 MHz, DMSO- d_6).	153
Fig. Apêndice 52: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB7-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	154
Fig. Apêndice 53: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB7-O	154
Fig. Apêndice 54: Espectro de RMN de ^1H da substância AB7-S (200 MHz, DMSO- d_6).	155
Fig. Apêndice 55: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB7-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	155
Fig. Apêndice 56: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB7-S	156
Fig. Apêndice 57: Espectro de RMN de ^1H da substância AB8-O (400 MHz, DMSO- d_6).	156
Fig. Apêndice 58: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB8-O (100 MHz, DMSO- d_6).....	157
Fig. Apêndice 59: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB8-O	157
Fig. Apêndice 60: Espectro de RMN de ^1H da substância AB8-S (400 MHz, DMSO- d_6).	158

Fig. Apêndice 61: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB8-S (100 MHz, DMSO- d_6).....	158
Fig. Apêndice 62: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB8-S	159
Fig. Apêndice 63: Espectro de RMN de ^1H da substância AB9-O (200 MHz, DMSO- d_6).	159
Fig. Apêndice 64: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB9-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	160
Fig. Apêndice 65: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB9-O	160
Fig. Apêndice 66: Espectro de RMN de ^1H da substância AB9-S (200 MHz, DMSO- d_6).	161
Fig. Apêndice 67: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB9-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	161
Fig. Apêndice 68: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB9-S	162
Fig. Apêndice 69: Espectro de RMN de ^1H da substância AB10-O (200 MHz, DMSO- d_6).	162
Fig. Apêndice 70: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB10-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	163
Fig. Apêndice 71: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB10-O	163
Fig. Apêndice 72: Espectro de RMN de ^1H da substância AB10-S (400 MHz, DMSO- d_6).	164
Fig. Apêndice 73: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB10-S (100 MHz, DMSO- d_6).....	164
Fig. Apêndice 74: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB10-S	165
Fig. Apêndice 75: Espectro de RMN de ^1H da substância AB11-O (200 MHz, DMSO- d_6).	165

Fig. Apêndice 76: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB11-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	166
Fig. Apêndice 77: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB11-O	166
Fig. Apêndice 78: Espectro de RMN de ^1H da substância AB11-S (200 MHz, DMSO- d_6).	167
Fig. Apêndice 79: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB11-S (50 MHz, DMSO- d_6).....	167
Fig. Apêndice 80: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB11-S	168
Fig. Apêndice 81: Espectro de RMN de ^1H da substância AB12-O (400 MHz, DMSO- d_6).	168
Fig. Apêndice 82: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB12-O (100 MHz, DMSO- d_6)	169
Fig. Apêndice 83: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB12-O	169
Fig. Apêndice 84: Espectro de RMN de ^1H da substância AB12-S (400 MHz, DMSO- d_6).	170
Fig. Apêndice 85: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB12-S (100 MHz, DMSO- d_6).....	170
Fig. Apêndice 86: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB12-S	171
Fig. Apêndice 87: Espectro de RMN de ^1H da substância AB13-O (200 MHz, DMSO- d_6).	171
Fig. Apêndice 88: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB13-O (50 MHz, DMSO- d_6).....	172
Fig. Apêndice 89: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB13-O	172
Fig. Apêndice 90: Espectro de RMN de ^1H da substância AB13-S (200 MHz, DMSO- d_6).	173

Fig. Apêndice 91: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) AB13-S (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).....	173
Fig. Apêndice 92: Espectro na região do infravermelho (KBr) de AB13-S	174
Tab. Apêndice 2: Fluorescência tridimensional e parâmetros para a urease livre (pH 7,4) ou na presença de adutos de Biginelli AB5-S e AB7-S . Enzima e ligantes foram utilizados a: 1,0 e 40 μM , respectivamente.....	129

Fig. Apêndice 1: Gráfico de Van't Hoff para os adutos de Biginelli **AB5-S** e **AB7-S** com urease

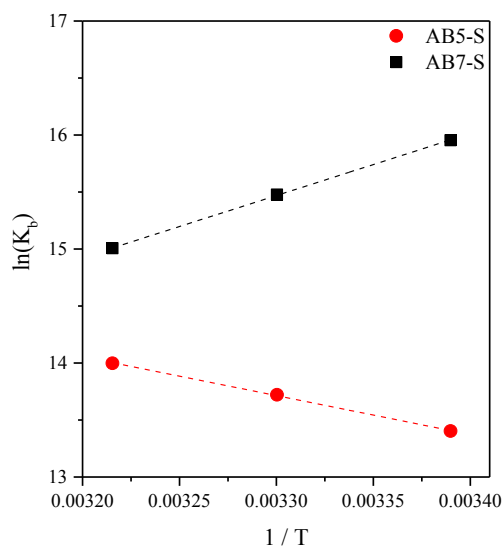


Fig. Apêndice 2: Sobreposição da emissão de fluorescência da urease (azul, 5 μM) com o espectro de absorção de (A) **AB5-S** (preto, 5 μM) e (B) **AB7-S** (preto, 5 μM).

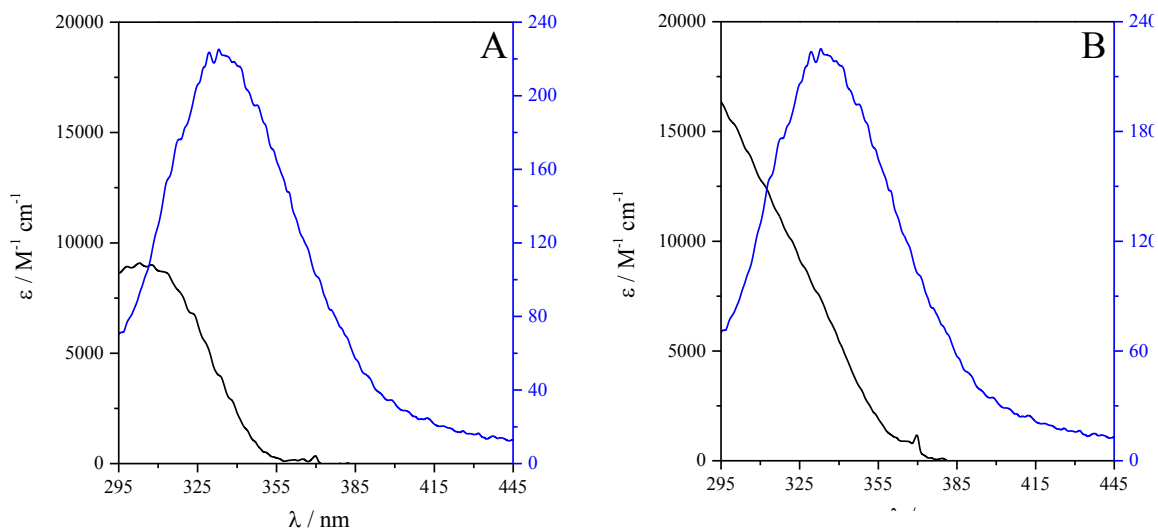
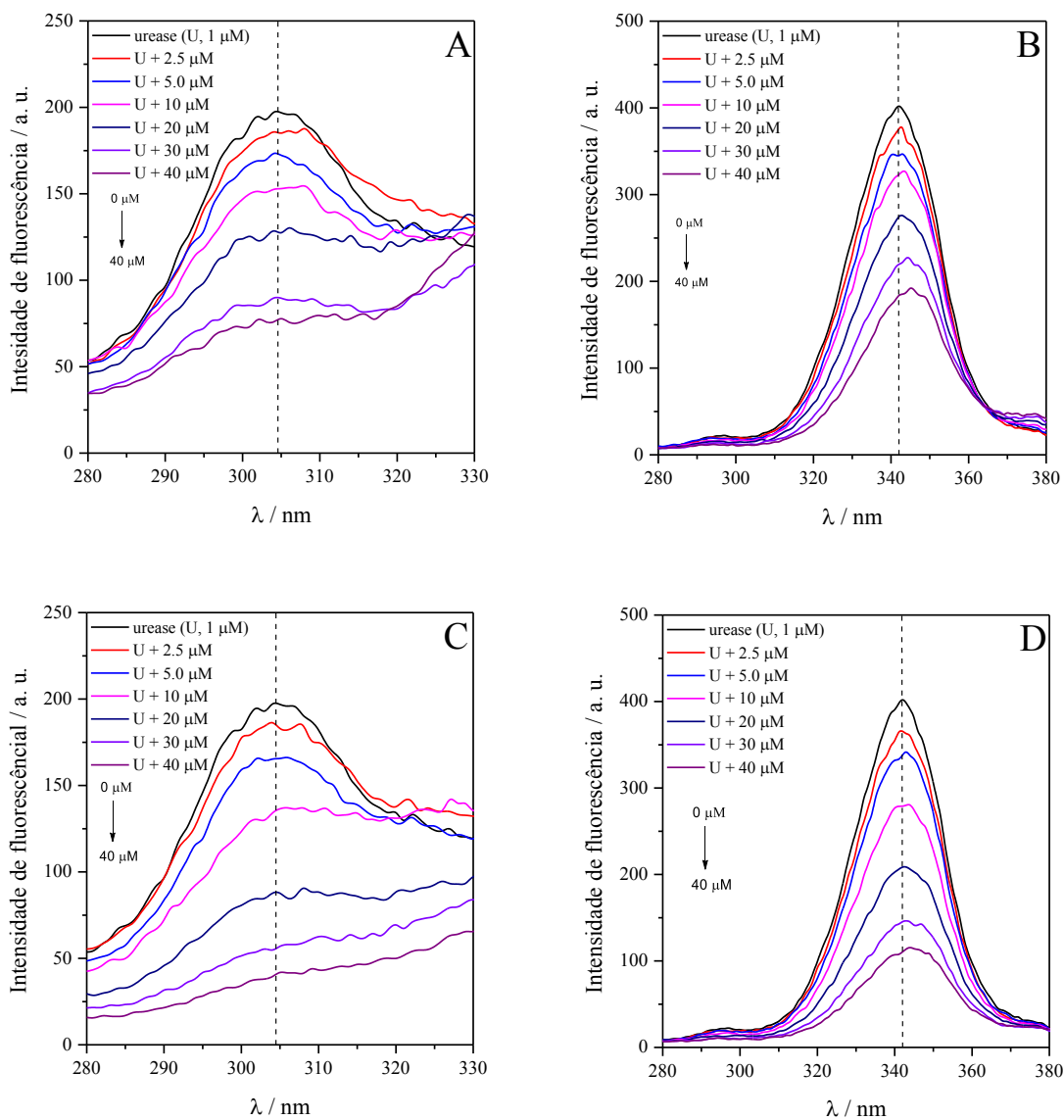


Fig. Apêndice 3: Urease (1,0 μM , pH 7,4) espectro de fluorescência sincronizada com a adição de incrementos de **AB5-S**, monitorando (A) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (Tyr resíduos) e (B) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (Trp resíduos), e **AB7-S** monitorando (C) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (Tyr resíduos) e (D) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (Trp resíduos).



Tab. Apêndice 1: Fluorescência tridimensional e parâmetros para a urease livre (pH 7,4) ou na presença de adutos de Biginelli **AB5-S** e **AB7-S**. Enzima e ligantes foram utilizados a: 1,0 e 40 μ M, respectivamente.

Pico	Urease livre			urease + AB5-S			urease + AB7-S		
	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes ¹ $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000
2	285 / 339	54	408 (100%) ²	285 / 350	65	194 (47%)	285 / 353	68	115 (28%)
3	238 / 348	110	53 (100%)	238 / 353	115	21 (40%)	238 / 355	117	11 (21%)

¹ Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$)

² Números em parênteses representam a porcentagem de sinal de fluorescência. Valores baixos indicam grande variação na relação do controle (urease livre).

Fig. Apêndice 4: Espectro de RMN de ^1H da substância **BIM** (200 MHz, CDCl_3).

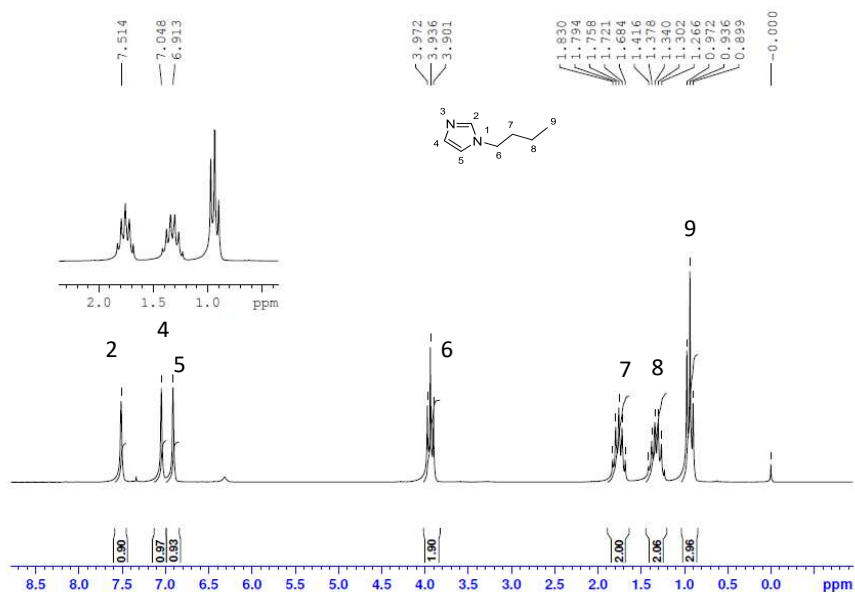


Fig. Apêndice 5: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **BIM** (50 MHz, CDCl_3).

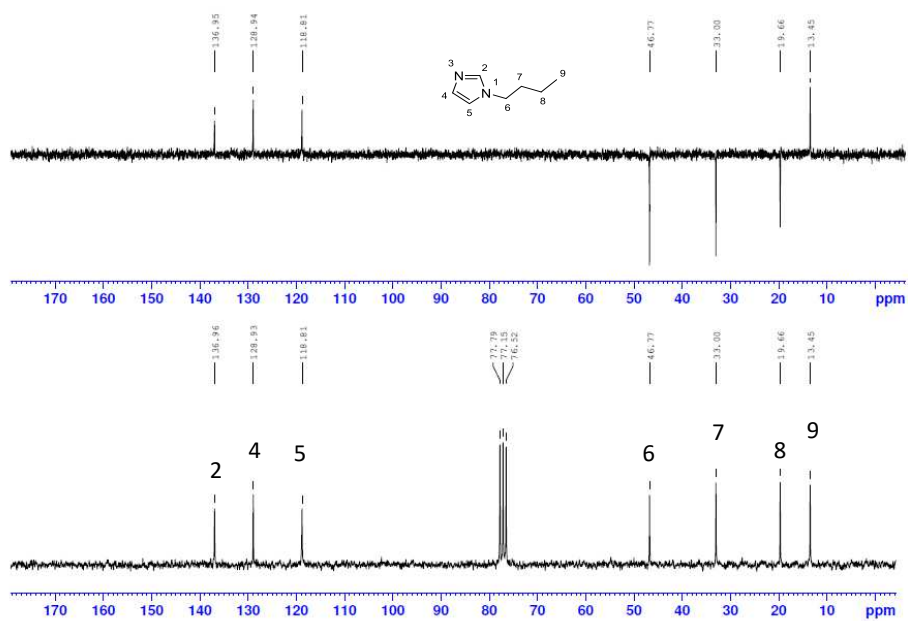


Fig. Apêndice 6: Espectro na região do infravermelho (ATR) **BIM**.

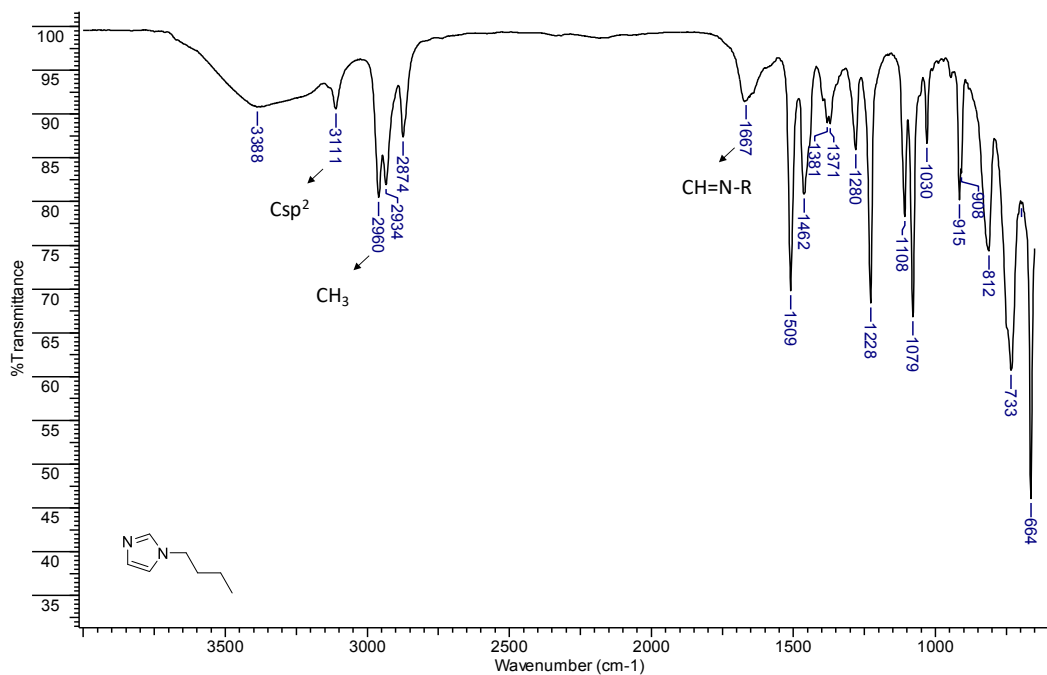


Fig. Apêndice 7: Espectro de RMN de ^1H da substância **BIMBS** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

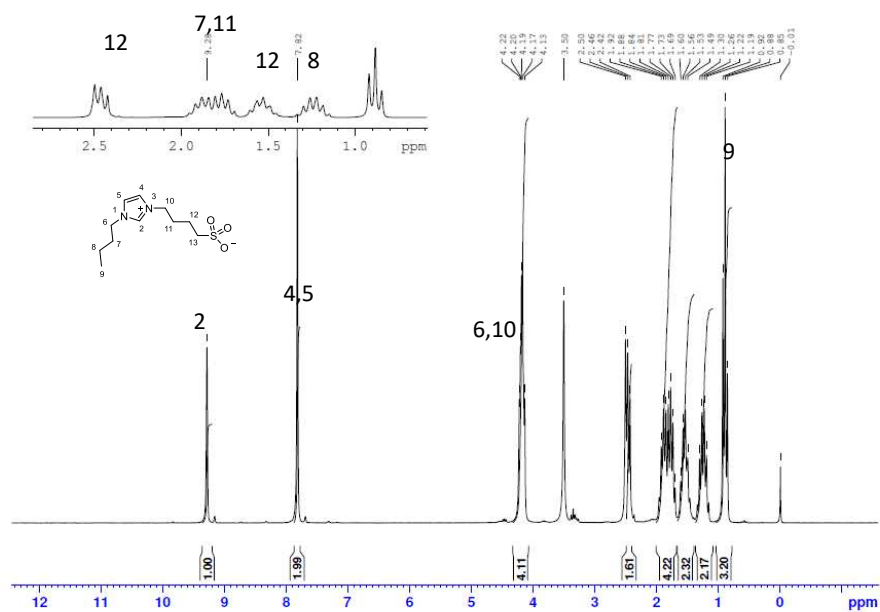


Fig. Apêndice 8: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **BIMBS** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

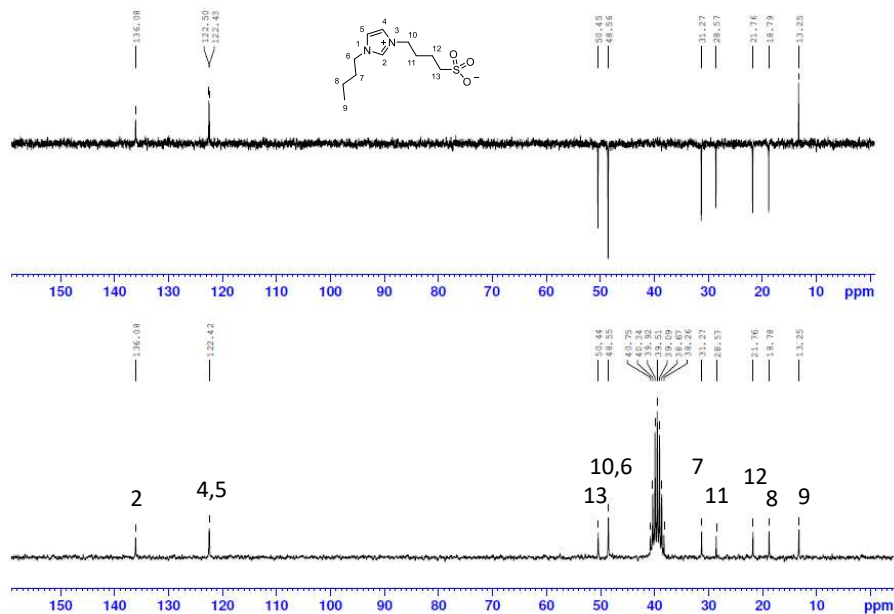


Fig. Apêndice 9: Espectro na região do infravermelho (ATR) **BIMBS**.

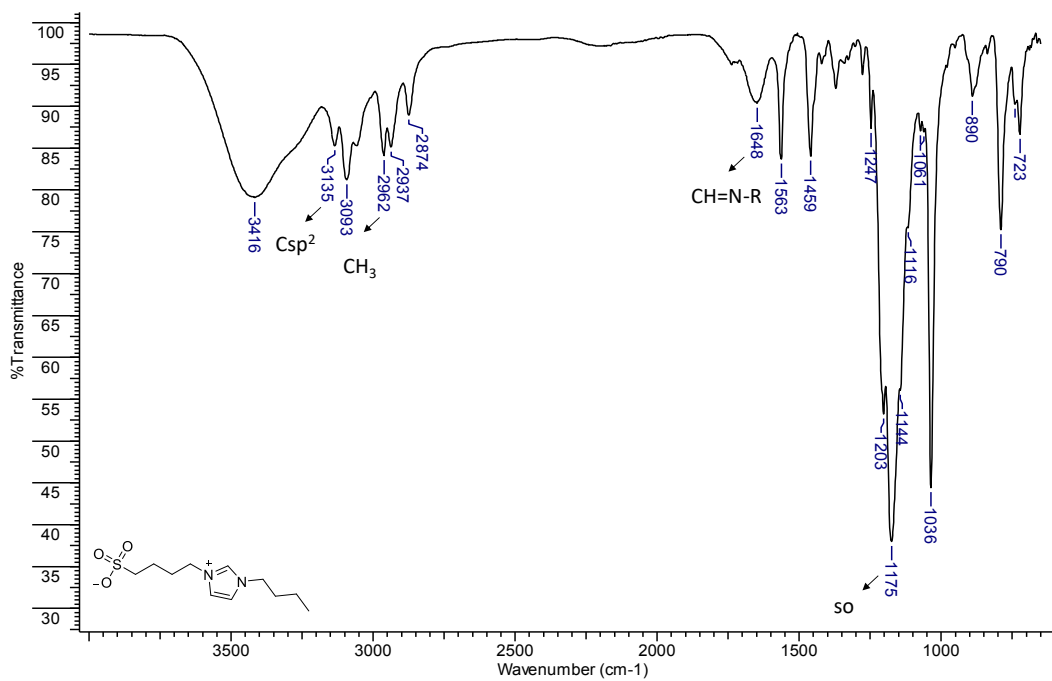


Fig. Apêndice 10: Espectro de RMN de ^1H da substância **[BIMBS][Cl]** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

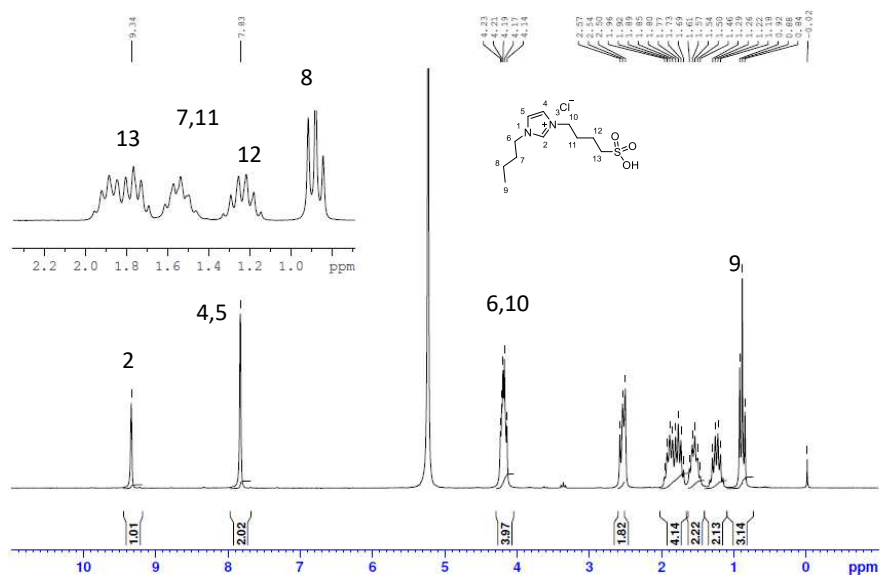


Fig. Apêndice 11: : Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **[BIMBS][Cl]** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

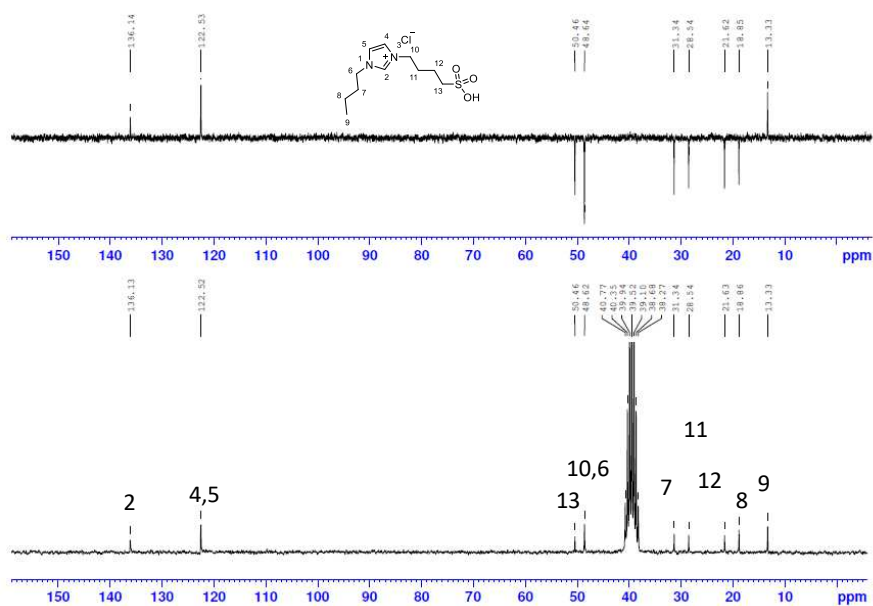


Fig. Apêndice 12: Espectro na região do infravermelho (ATR) [BIMBS][Cl]

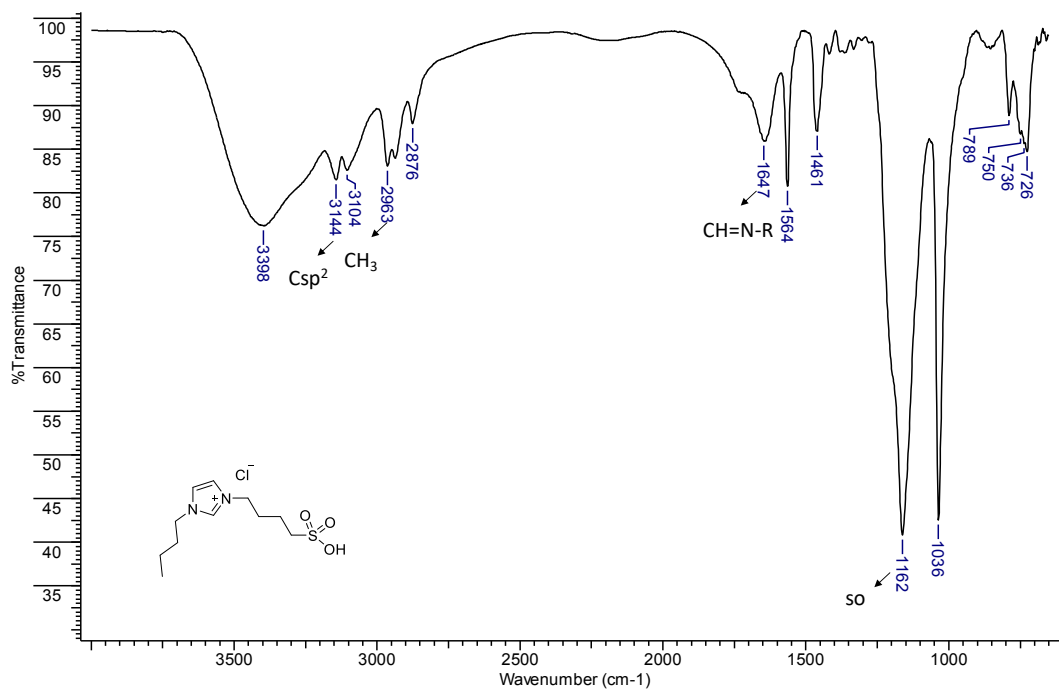


Fig. Apêndice 13: Mapa de contorno HSQC [BIMBS][Cl] (DMSO-*d*₆)

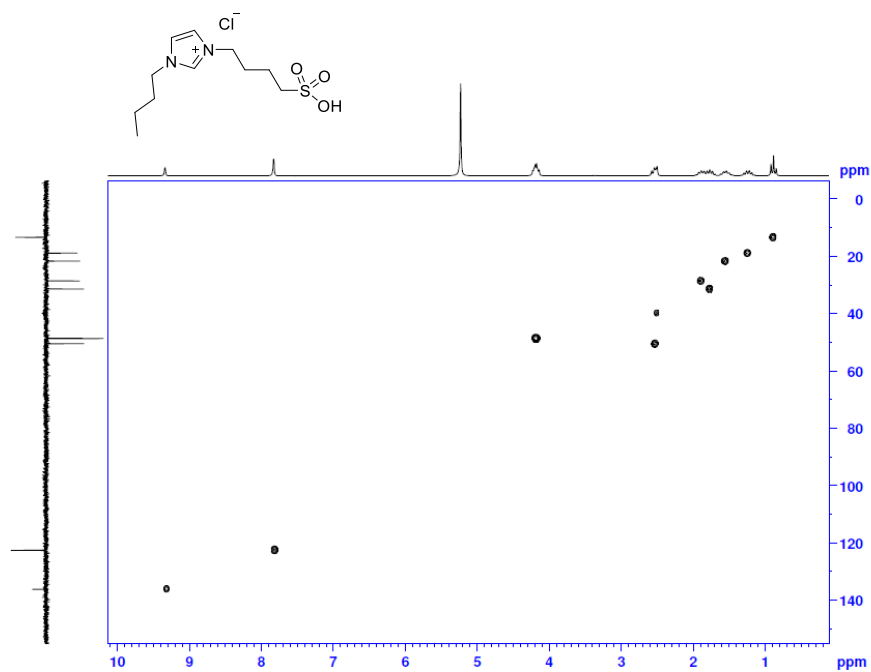
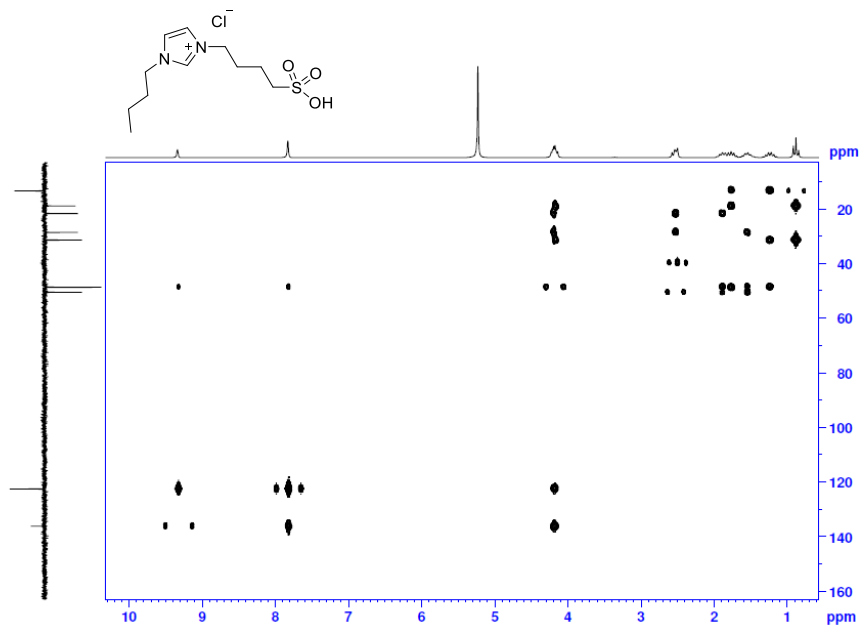


Fig. Apêndice 14: Mapa de contorno HMBC [BIMBS][Cl] (DMSO- d_6)



t

Fig. Apêndice 15: Espectro de RMN de ^1H da substância AB1-O (200 MHz, DMSO- d_6).

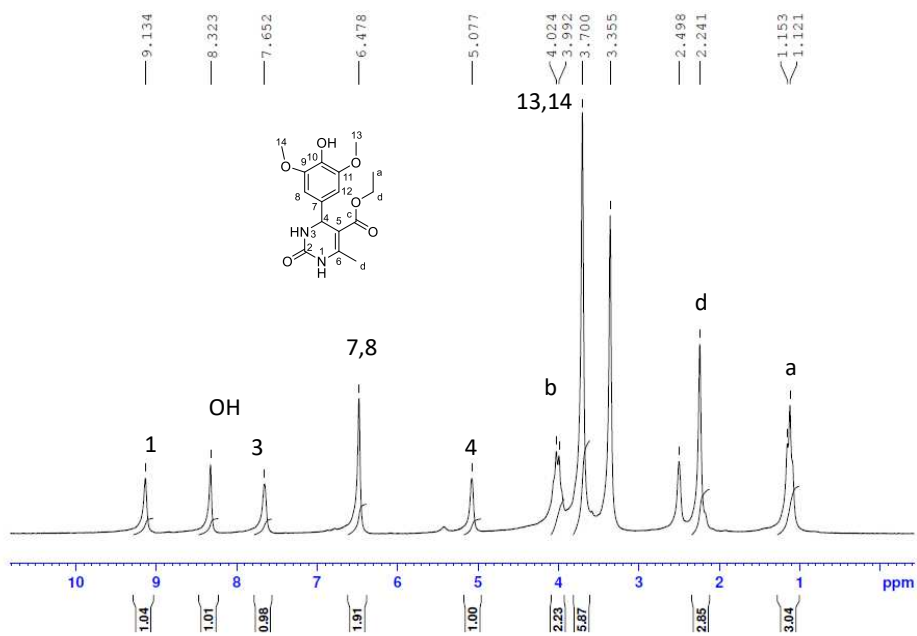


Fig. Apêndice 16: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB1-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

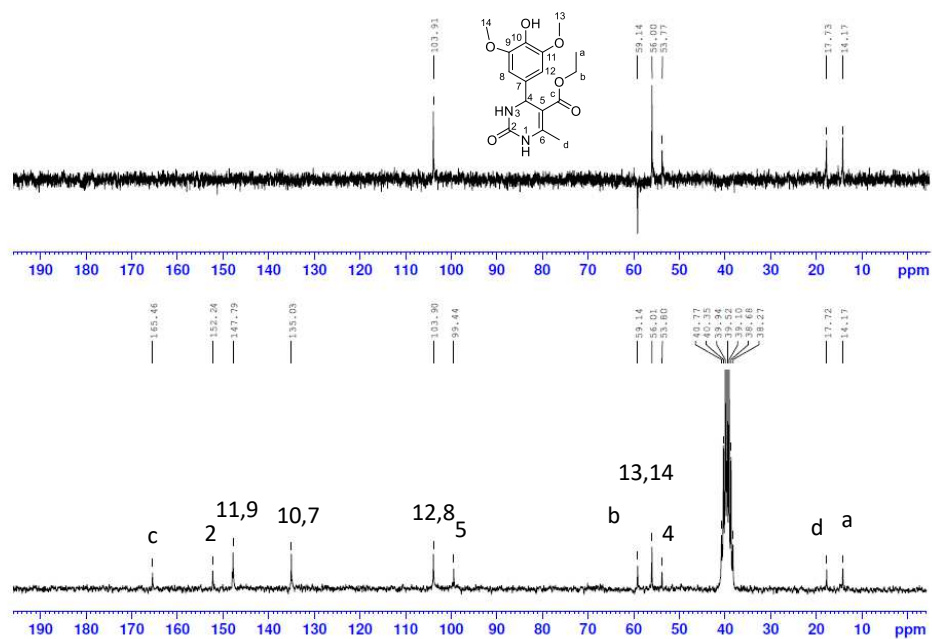


Fig. Apêndice 17: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB1-O**.

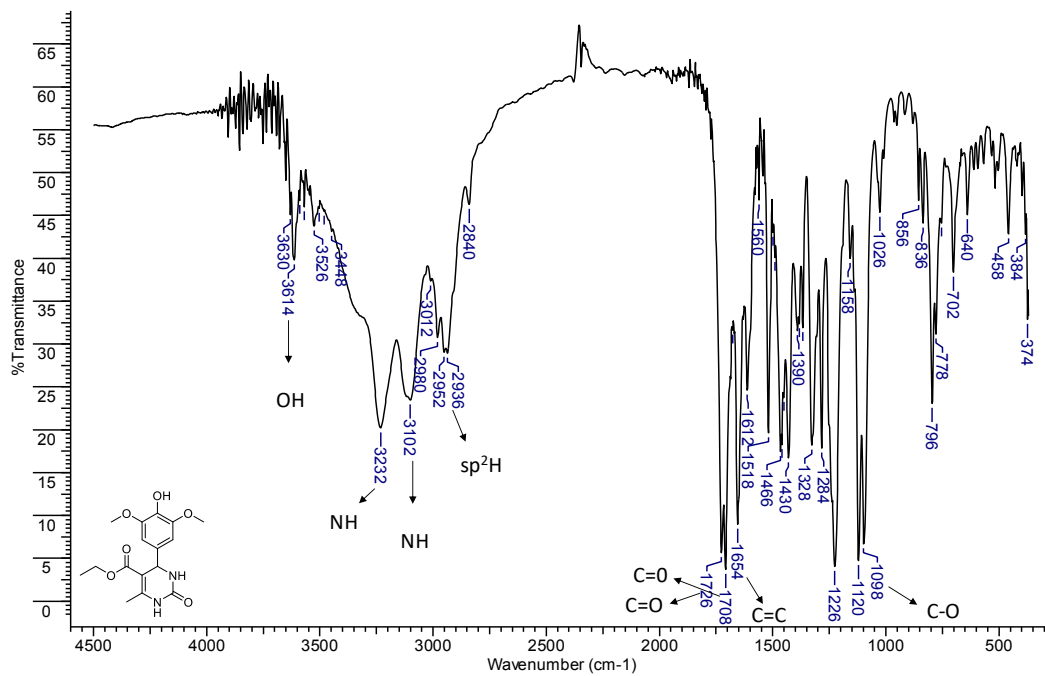


Fig. Apêndice 18: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB1-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

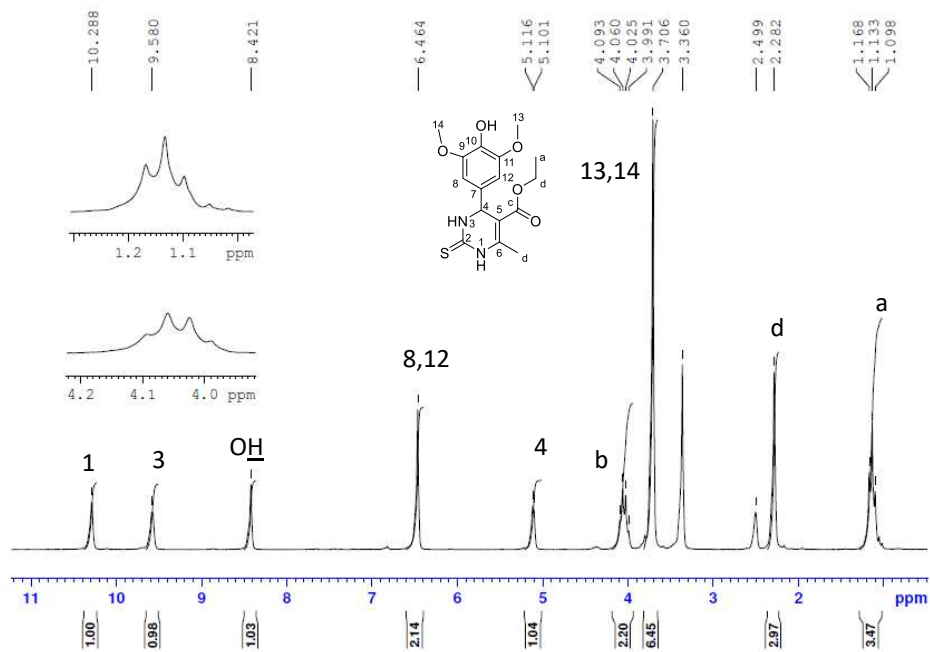


Fig. Apêndice 19: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB1-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

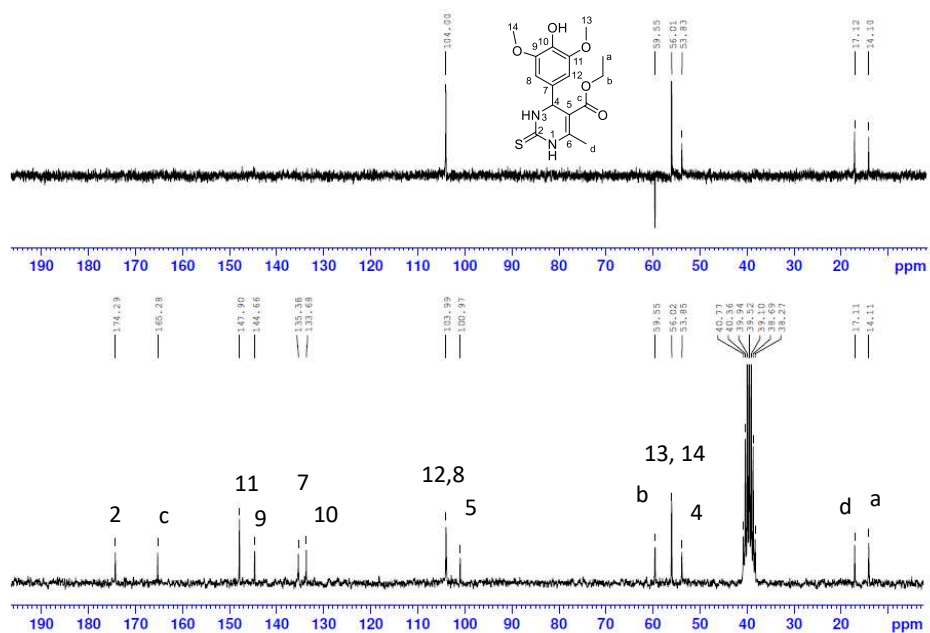


Fig. Apêndice 20: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB1-S**.

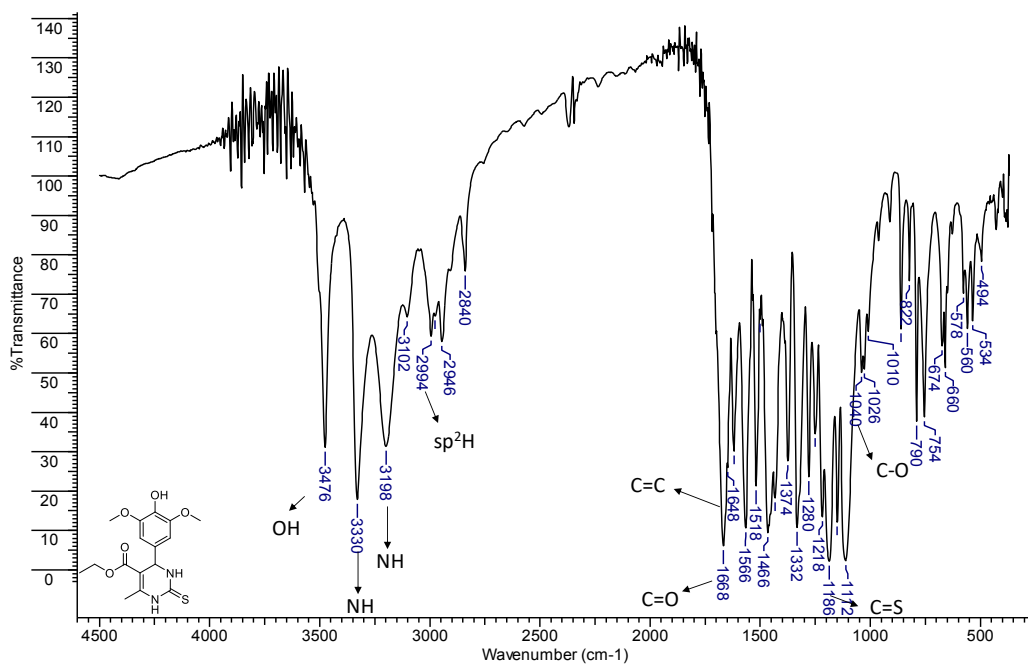


Fig. Apêndice 21: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB2-O** (400 MHz, DMSO-d₆).

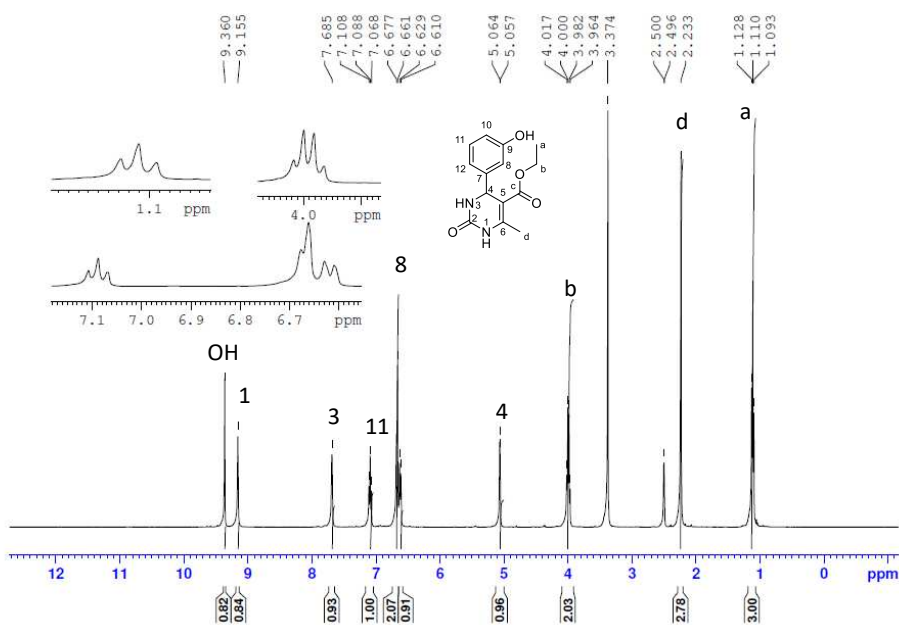


Fig. Apêndice 22: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB2-O** (100 MHz, DMSO- d_6)

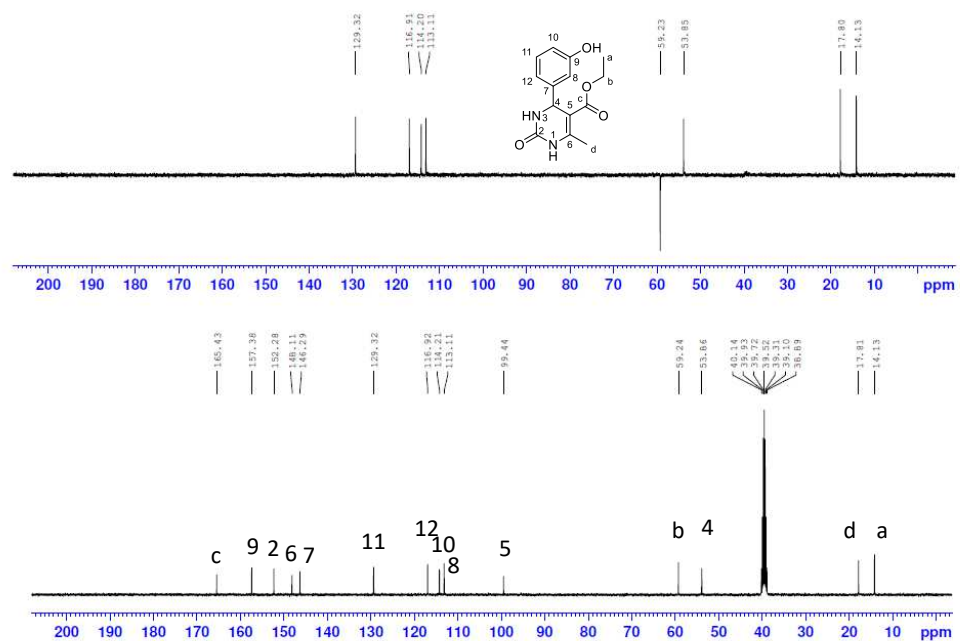


Fig. Apêndice 23: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB2-O**.

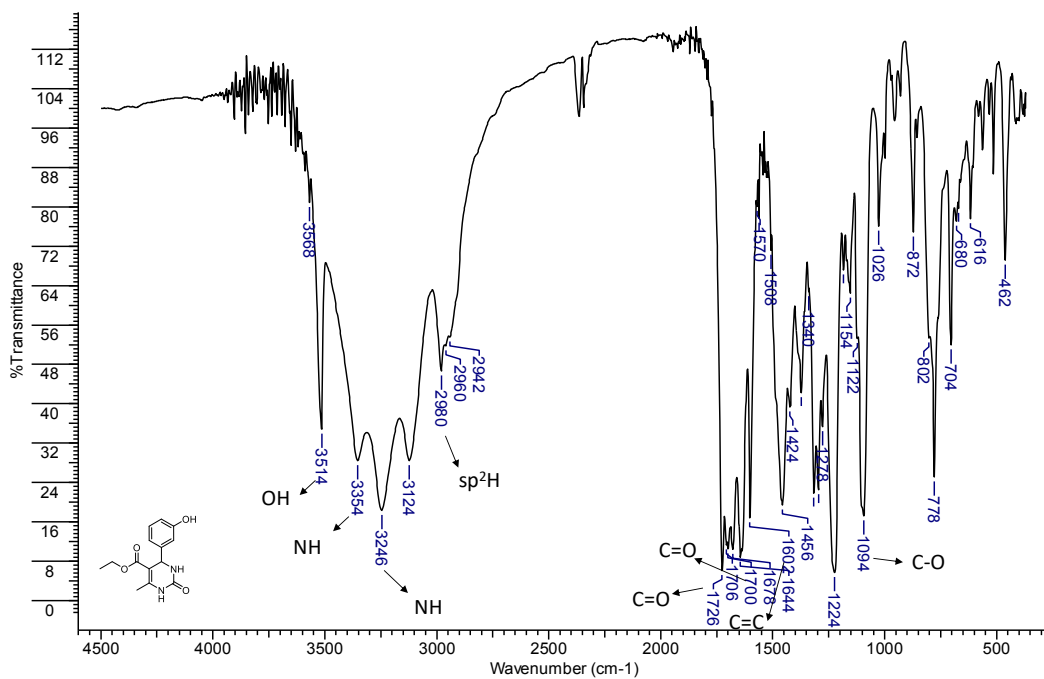


Fig. Apêndice 24: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB2-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

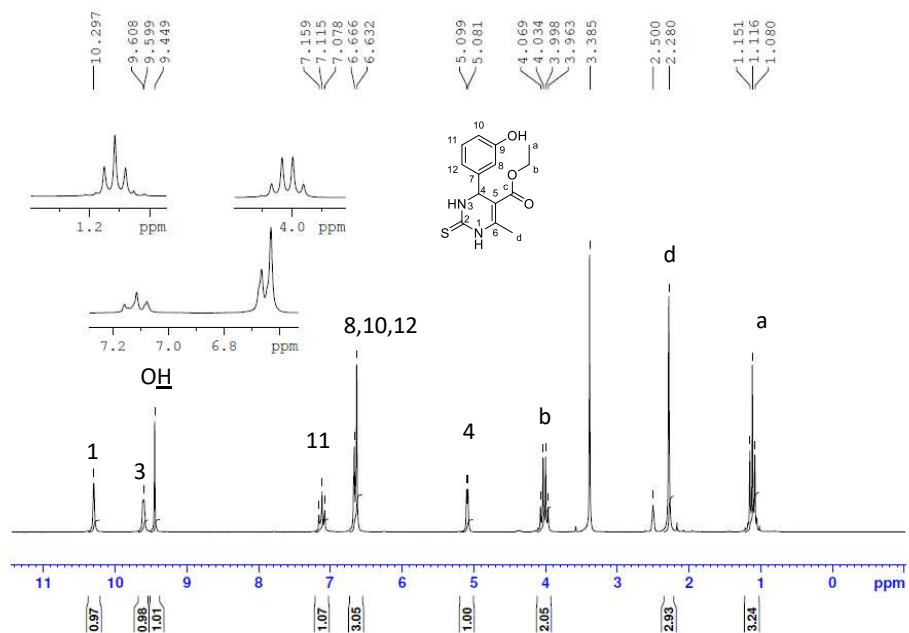


Fig. Apêndice 25: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB2-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

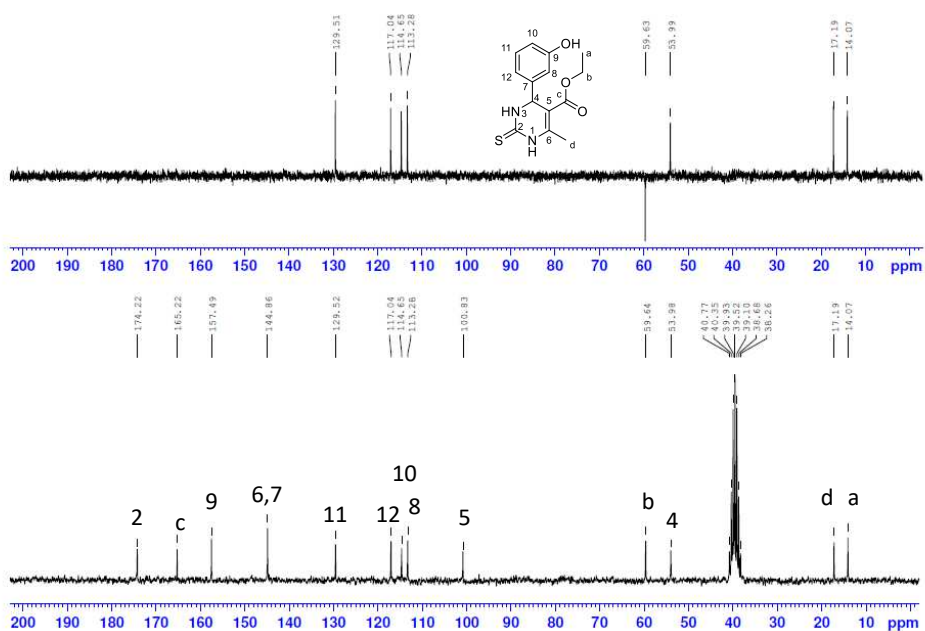


Fig. Apêndice 26: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB2-S**

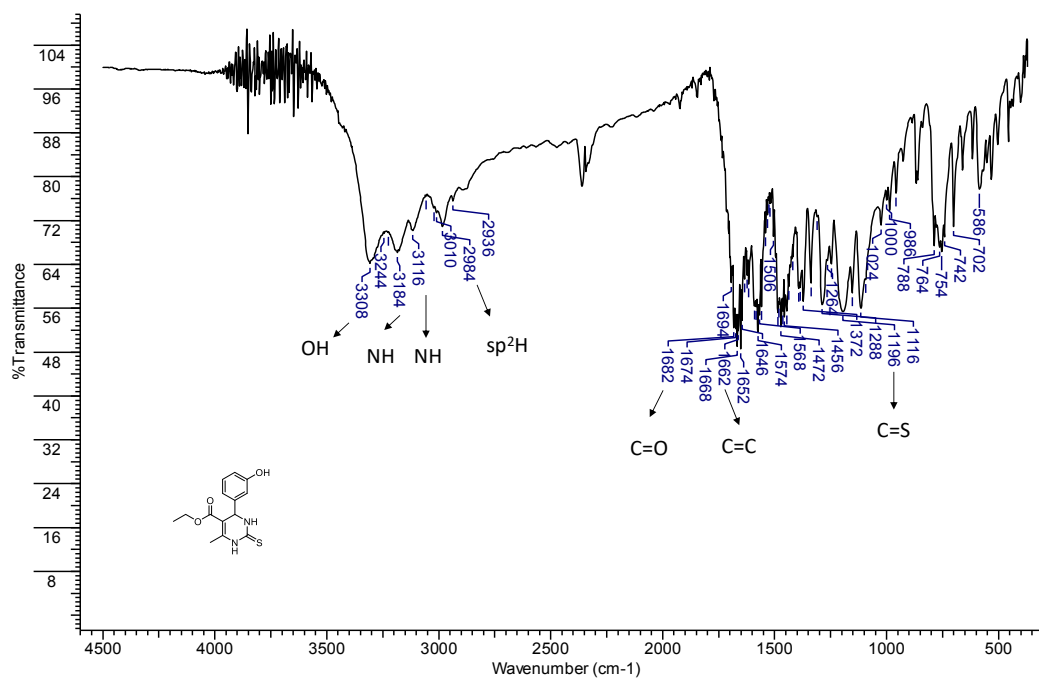


Fig. Apêndice 27: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB3-O** (200 MHz, DMSO-d₆).

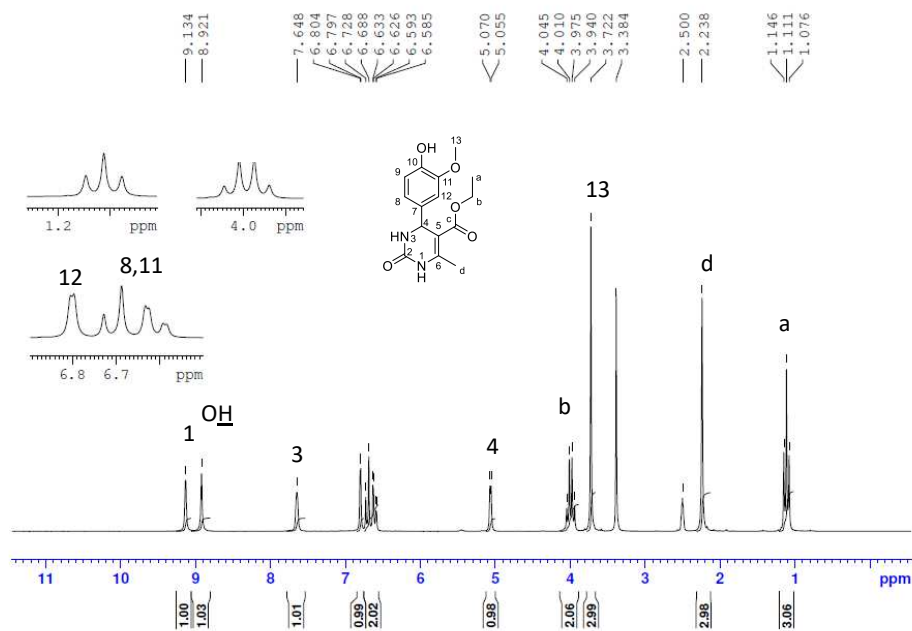


Fig. Apêndice 28: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB3-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

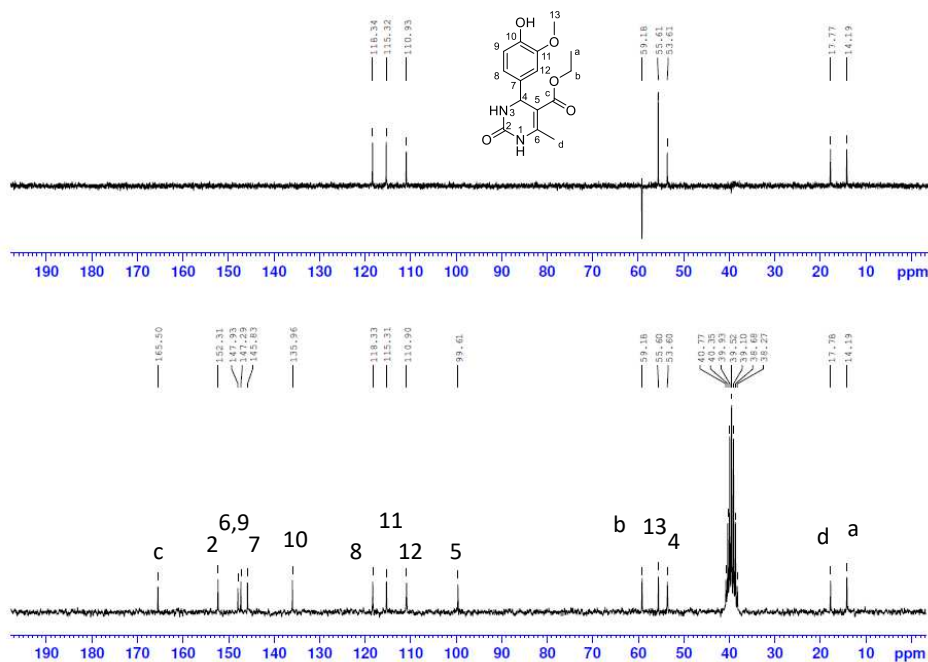


Fig. Apêndice 29: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB3-O**.

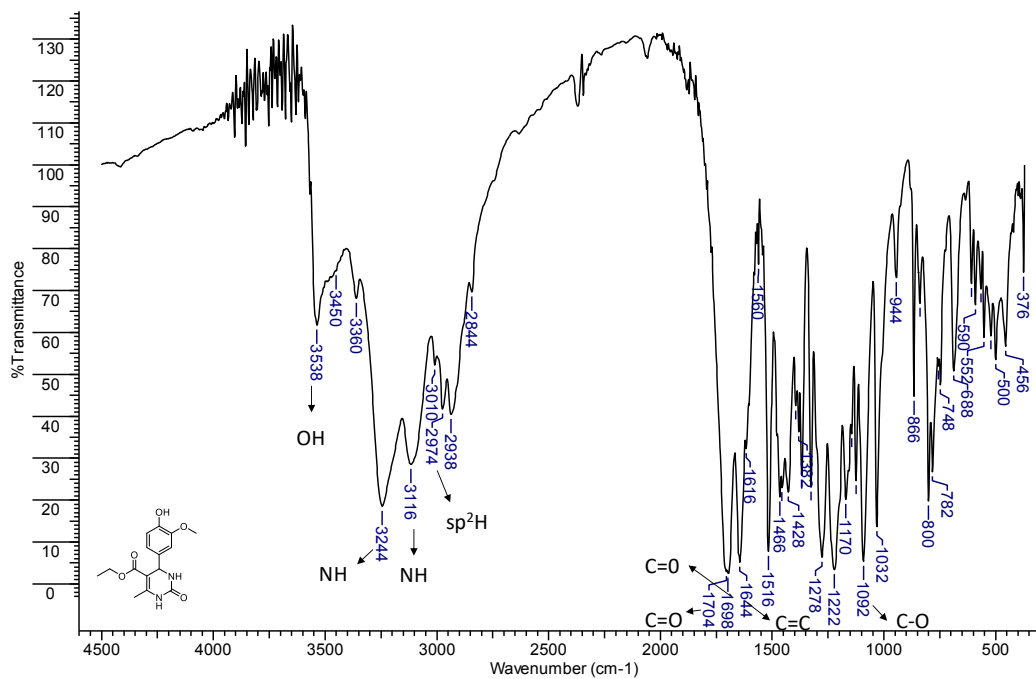


Fig. Apêndice 30: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB3-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

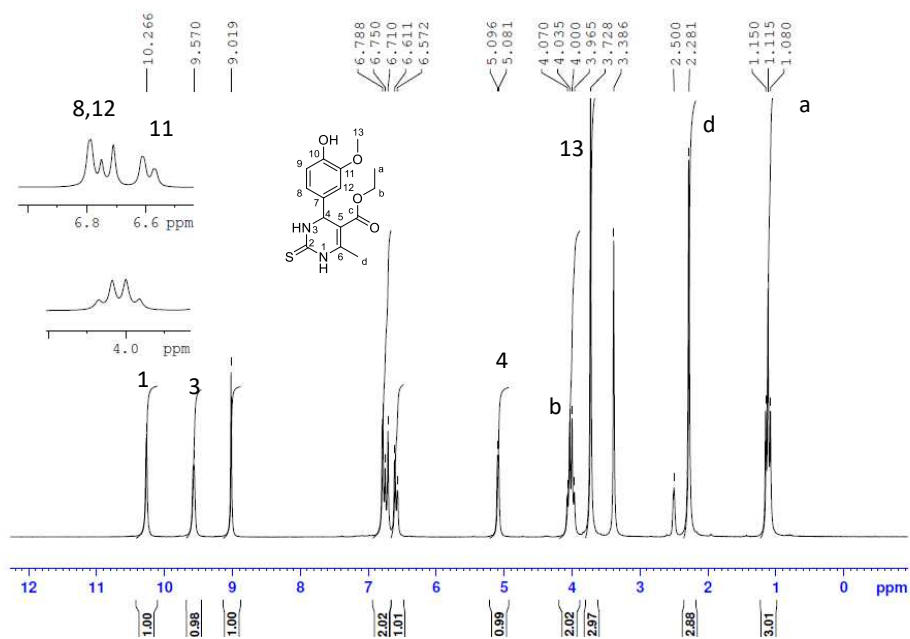


Fig. Apêndice 31: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB3-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

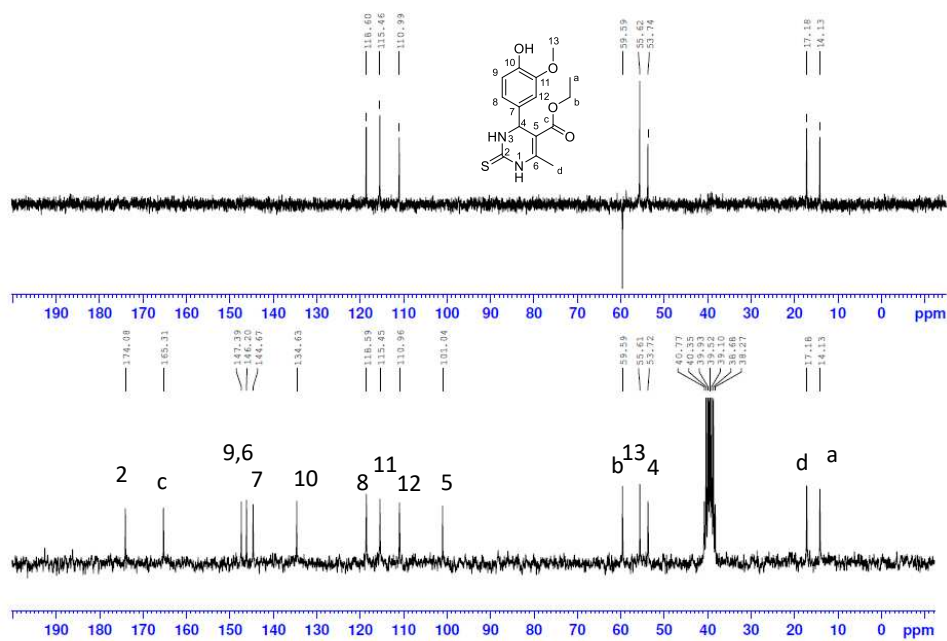


Fig. Apêndice 32: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB3-S**.

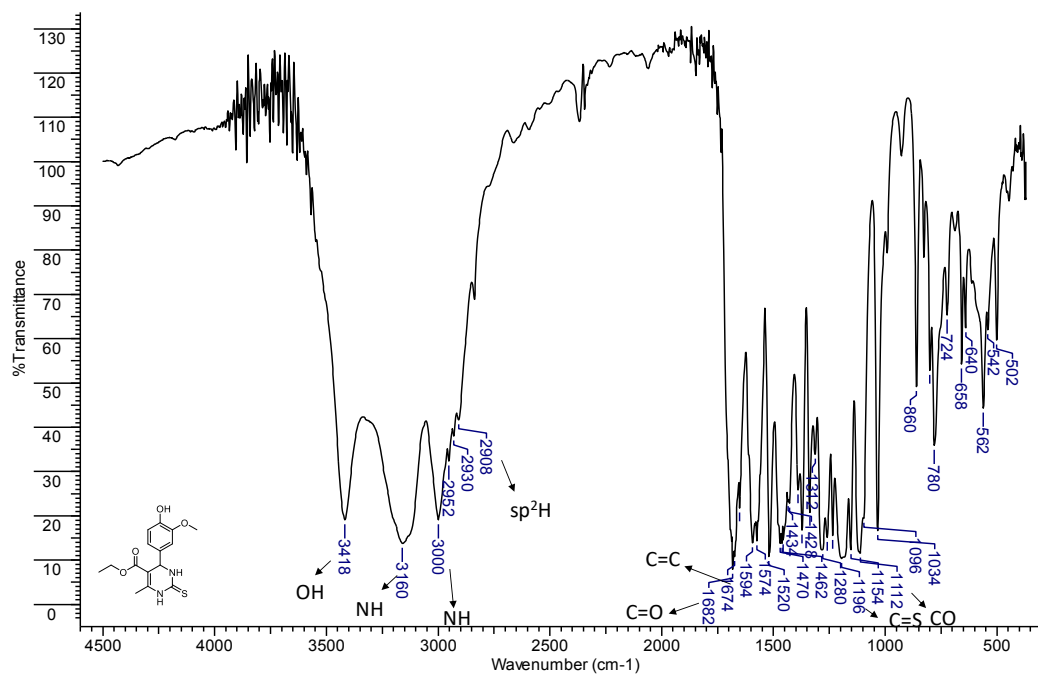


Fig. Apêndice 33: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB4-O** (200 MHz, DMSO-d₆).

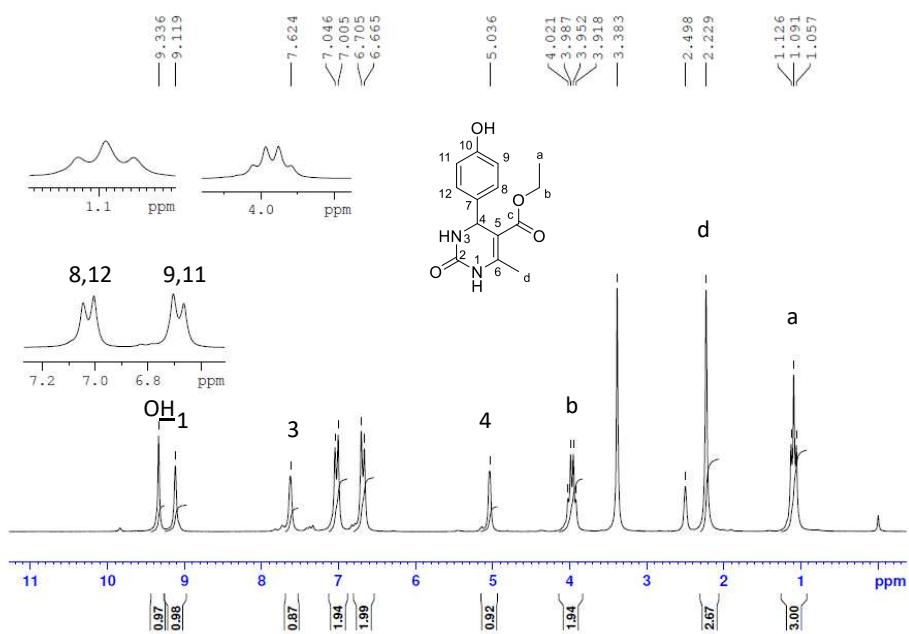


Fig. Apêndice 34: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB4-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

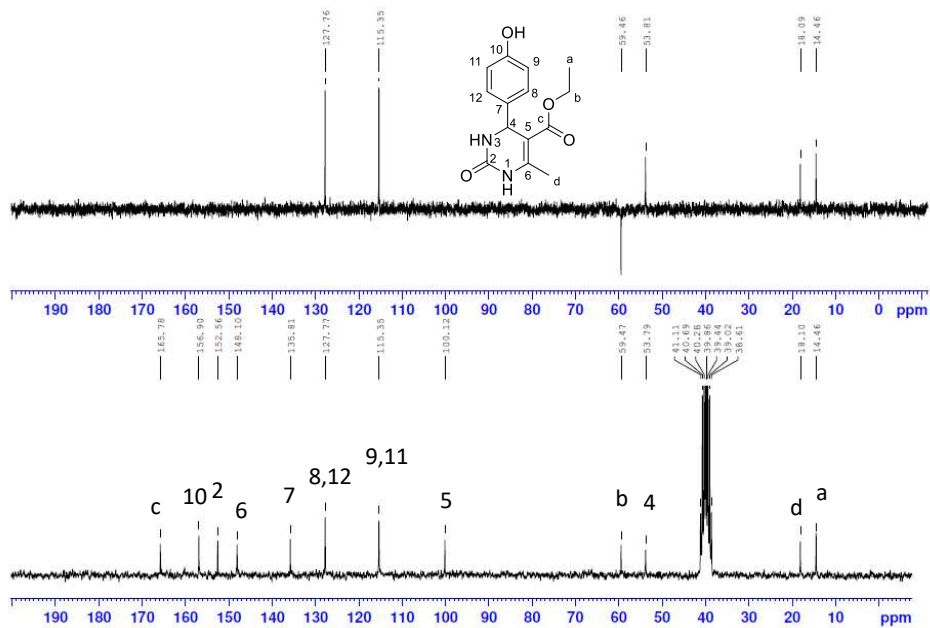


Fig. Apêndice 35: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB4-O**.

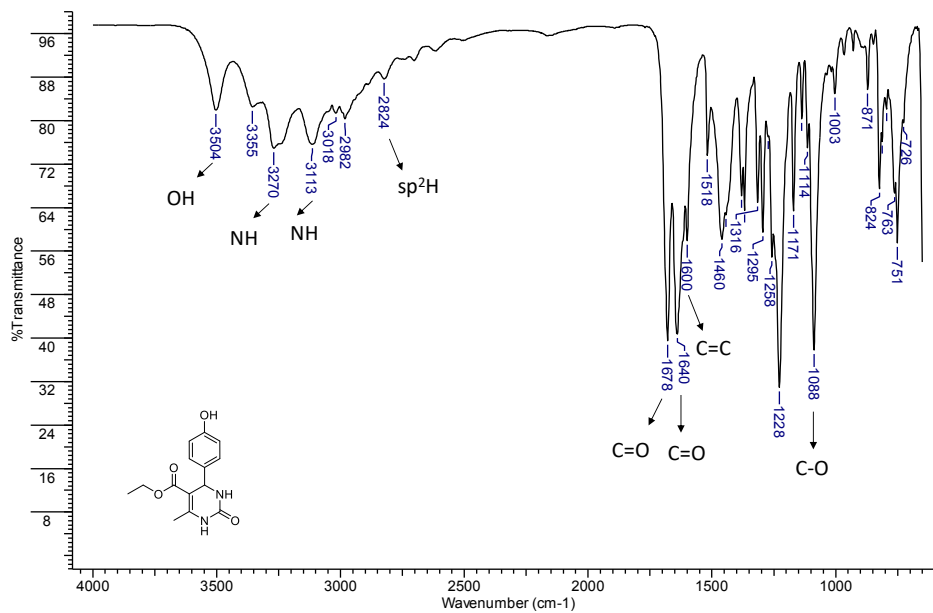


Fig. Apêndice 36: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB4-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

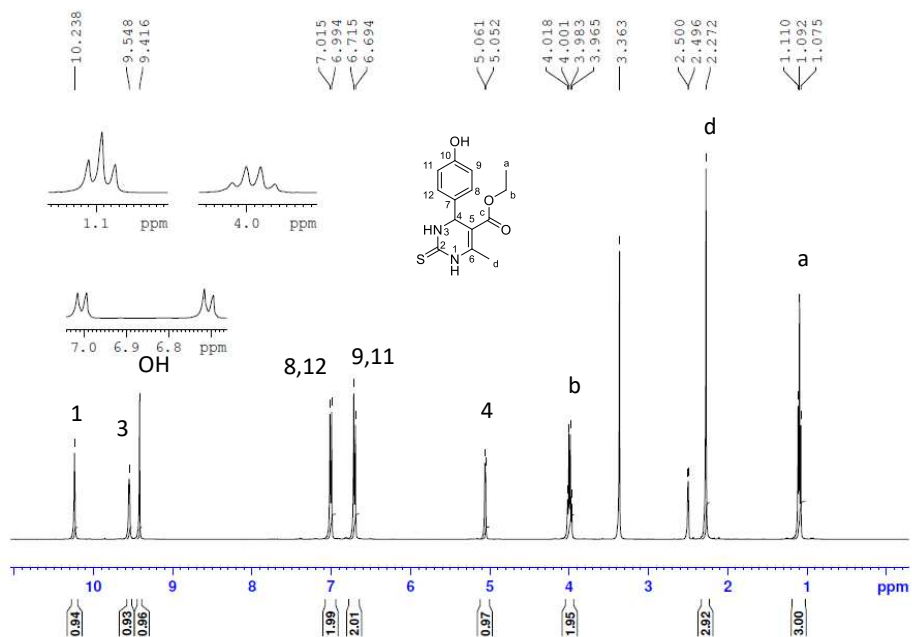


Fig. Apêndice 37: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB4-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

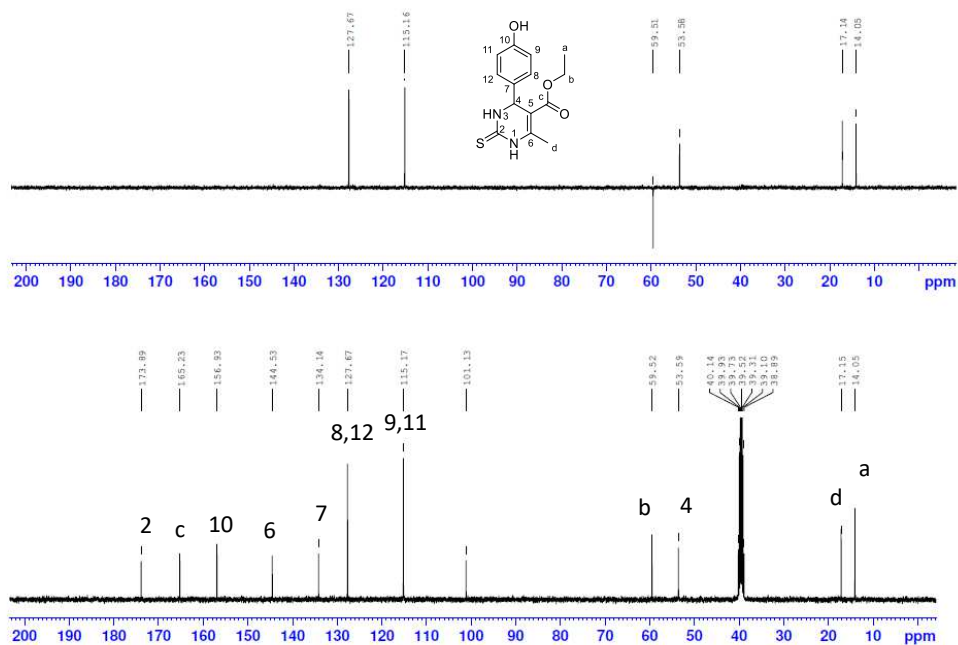


Fig. Apêndice 38: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB4-S**.

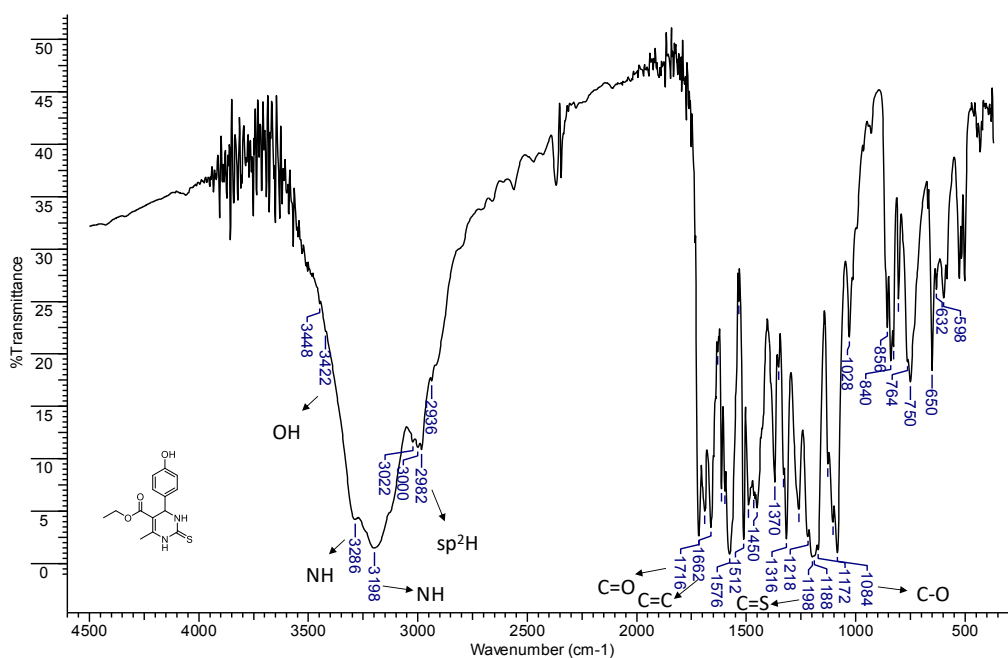


Fig. Apêndice 39: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB5-O** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

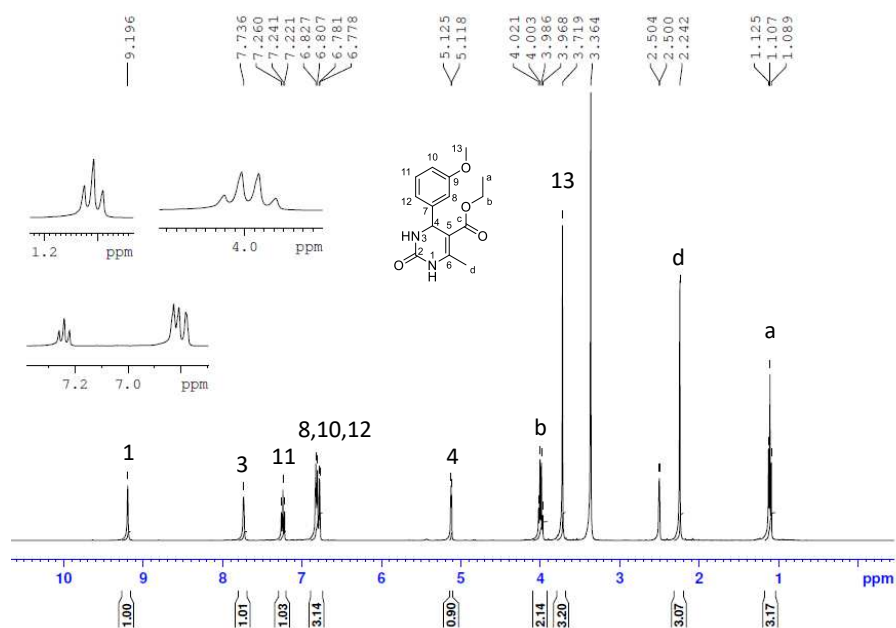


Fig. Apêndice 40: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB5-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

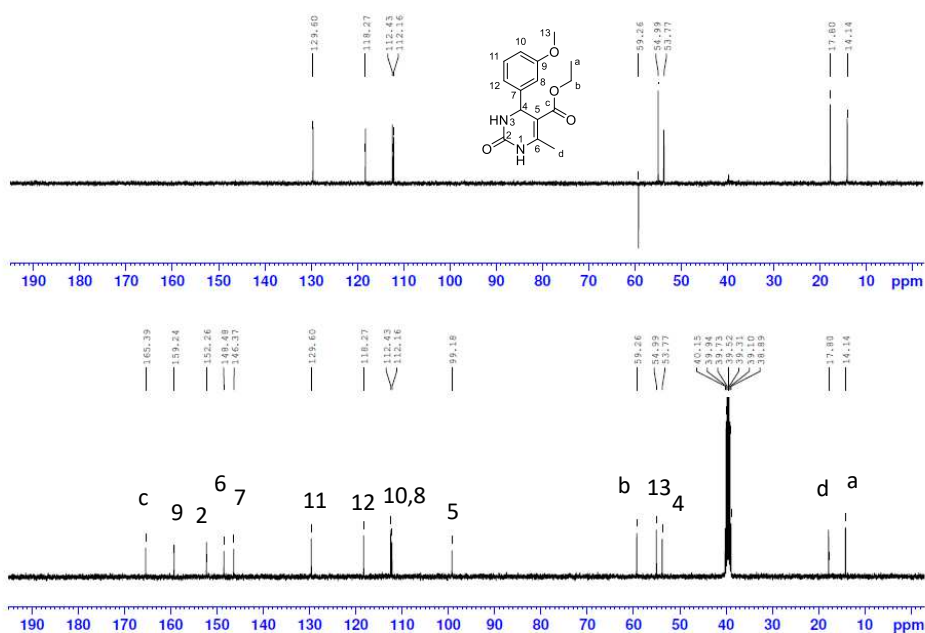


Fig. Apêndice 41: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB5-O**.

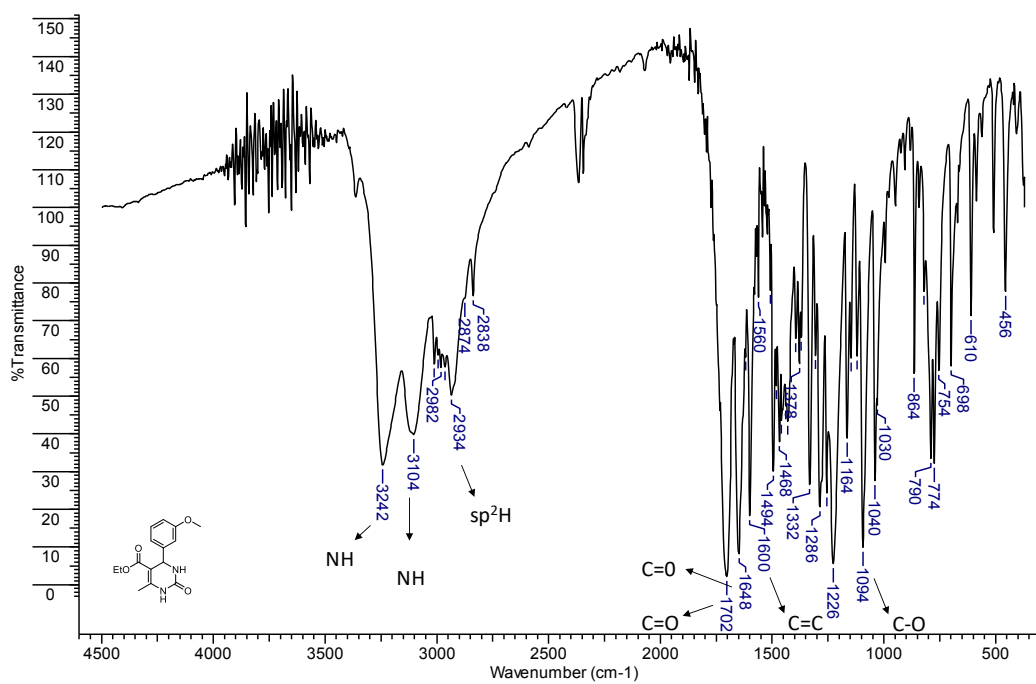


Fig. Apêndice 42: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB5-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

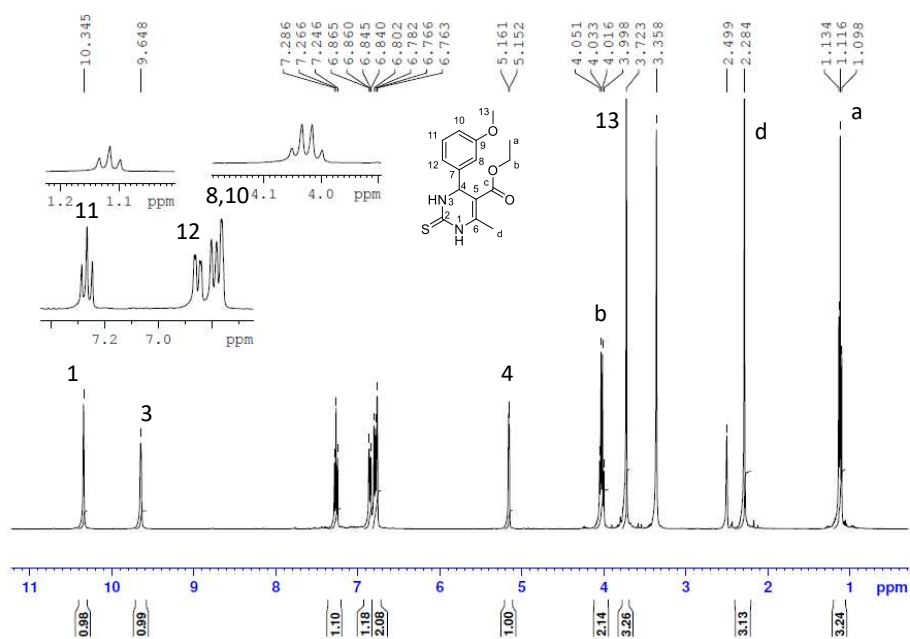


Fig. Apêndice 43: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB5-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

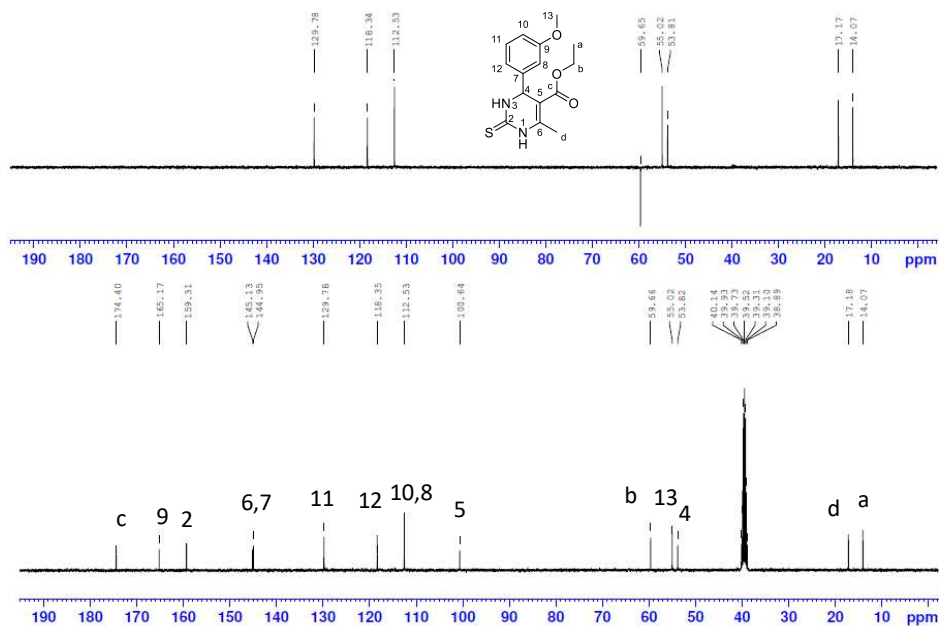


Fig. Apêndice 44: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB5-S**.

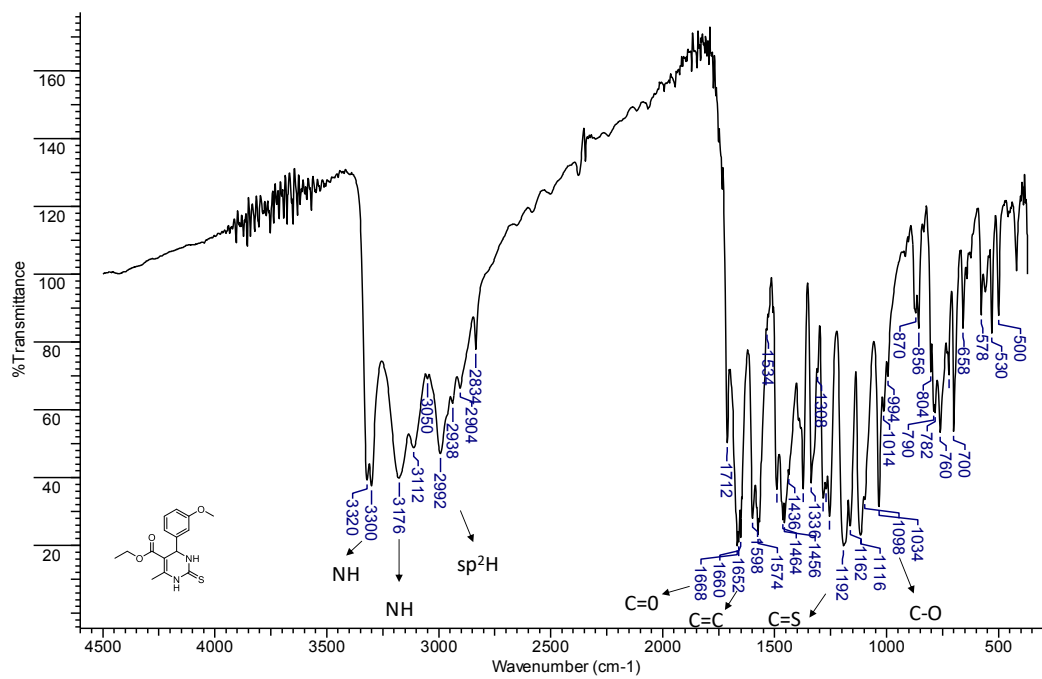


Fig. Apêndice 45: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB6-O** (200 MHz, DMSO-d₆).

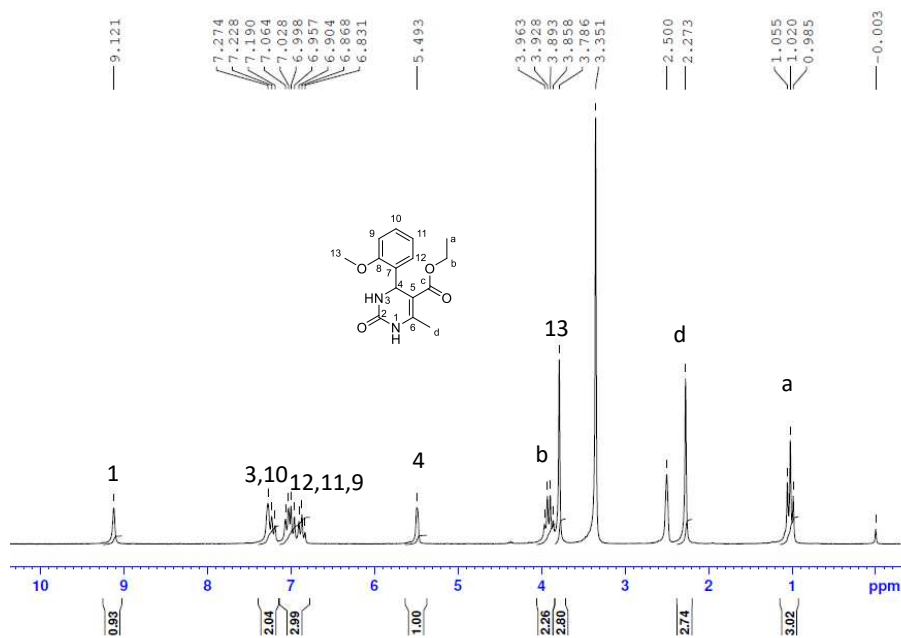


Fig. Apêndice 46: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB6-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

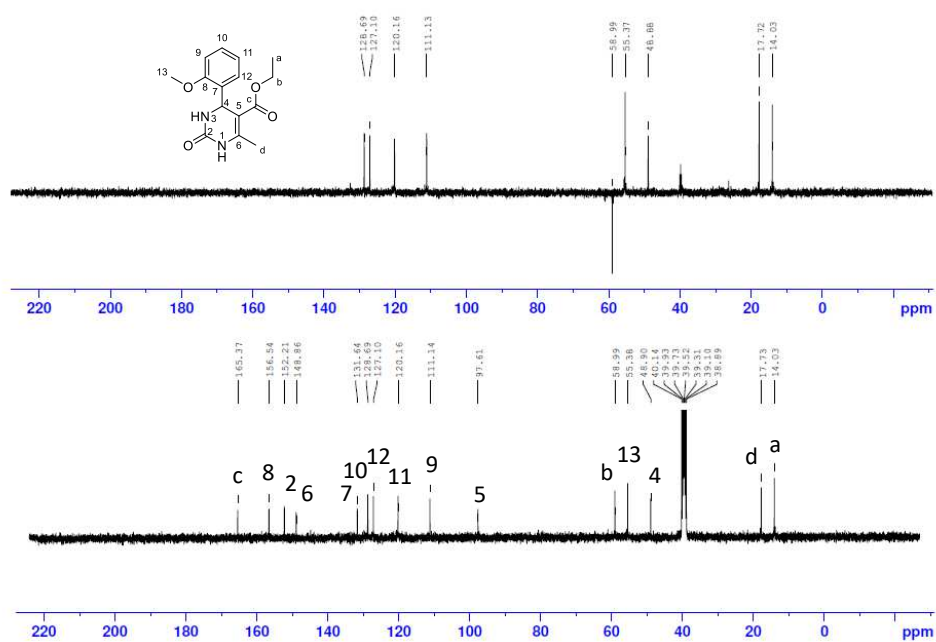


Fig. Apêndice 47: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB6-O**.

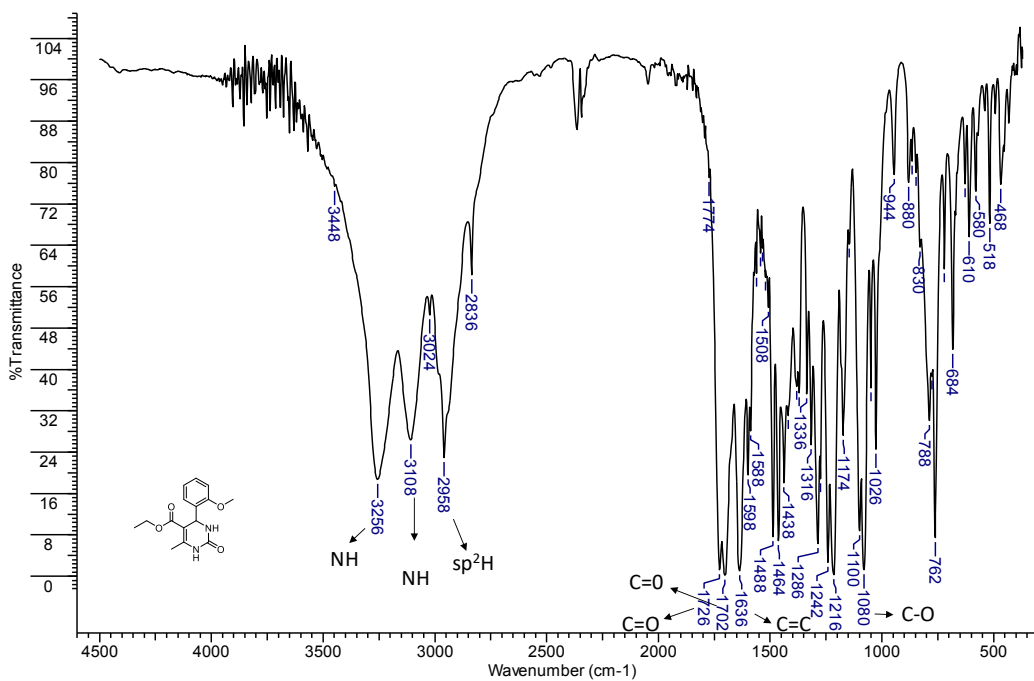


Fig. Apêndice 48: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB6-S** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

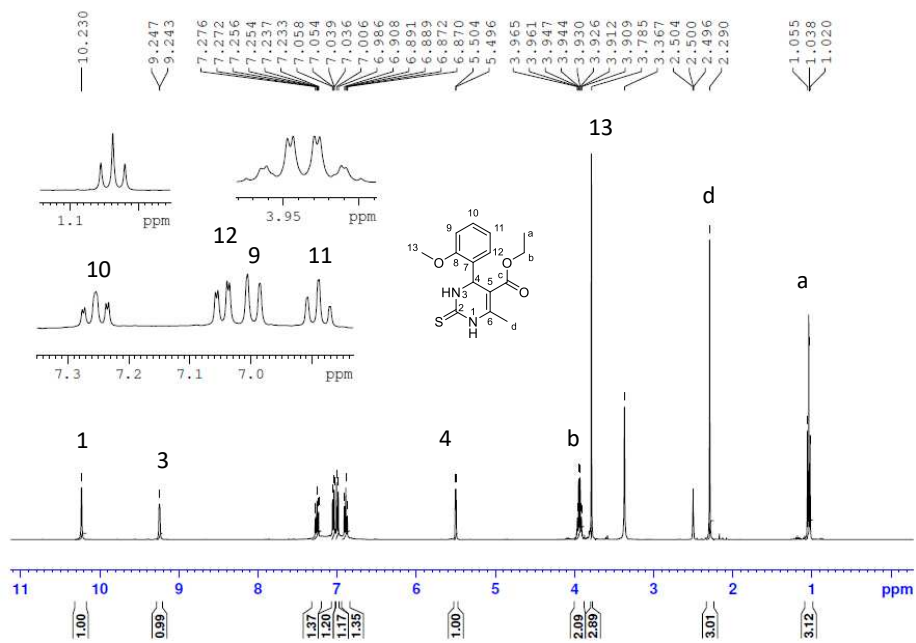


Fig. Apêndice 49: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB6-S** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

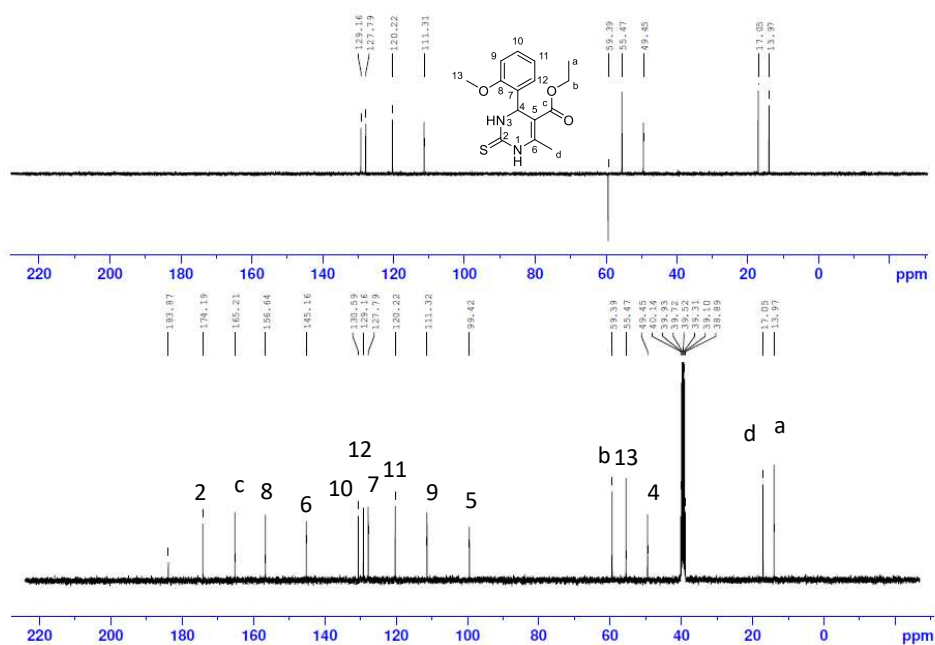


Fig. Apêndice 50: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB6-S**.

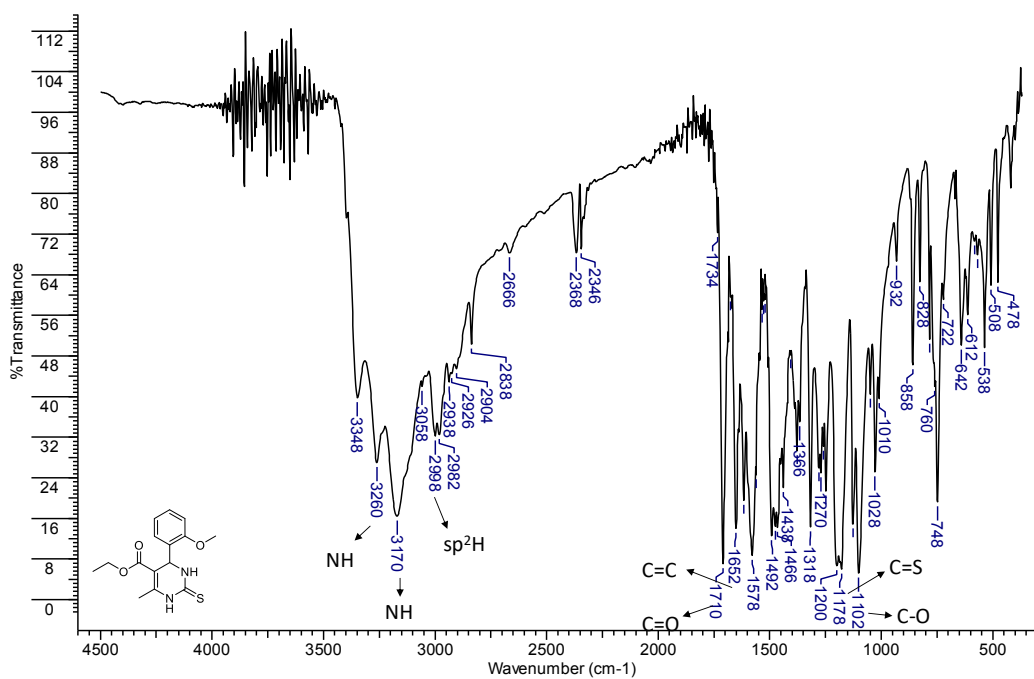


Fig. Apêndice 51: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB7-O** (200 MHz, DMSO-*d*₆).

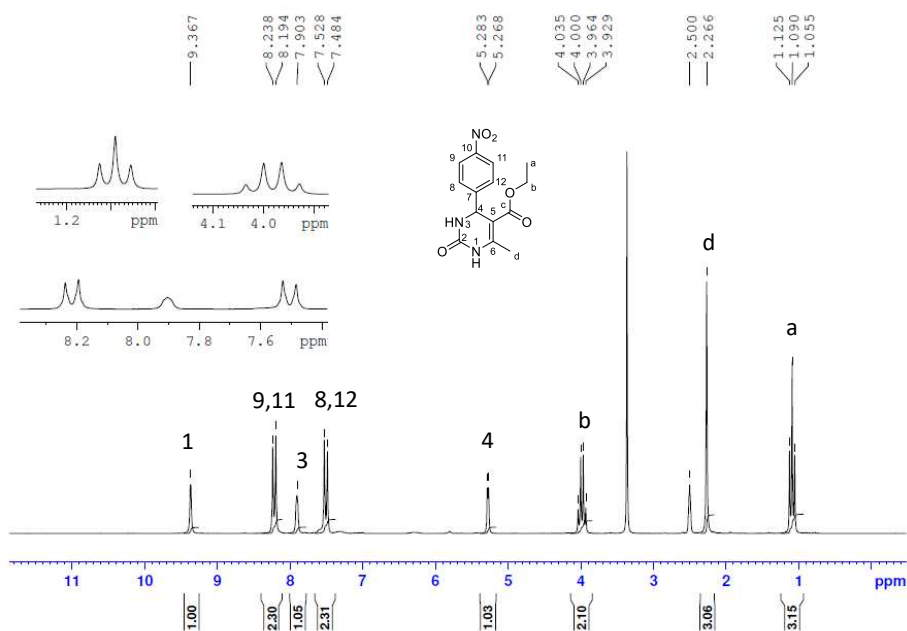


Fig. Apêndice 52: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB7-O** (50 MHz, DMSO-d_6)

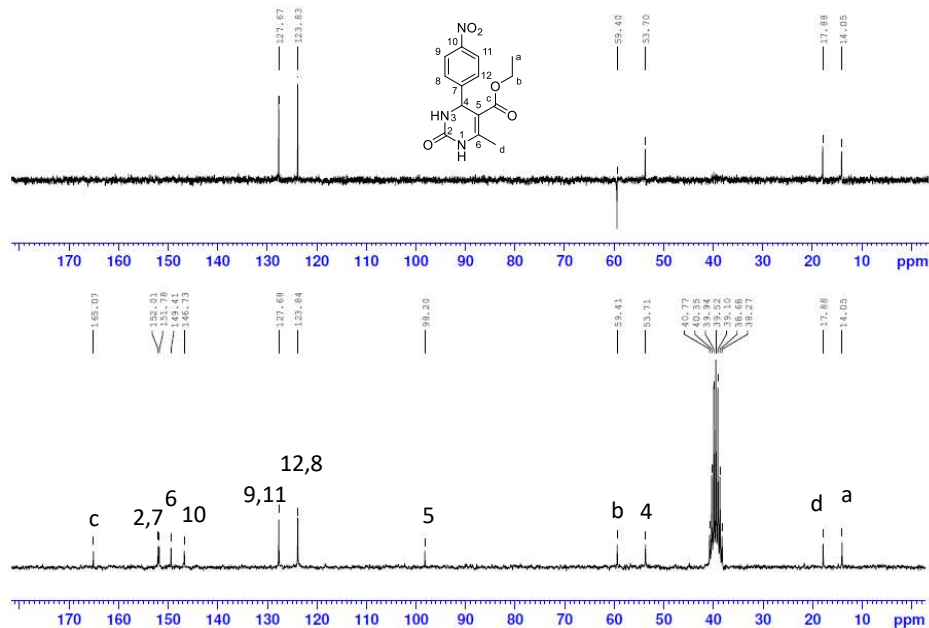


Fig. Apêndice 53: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB7-O**.

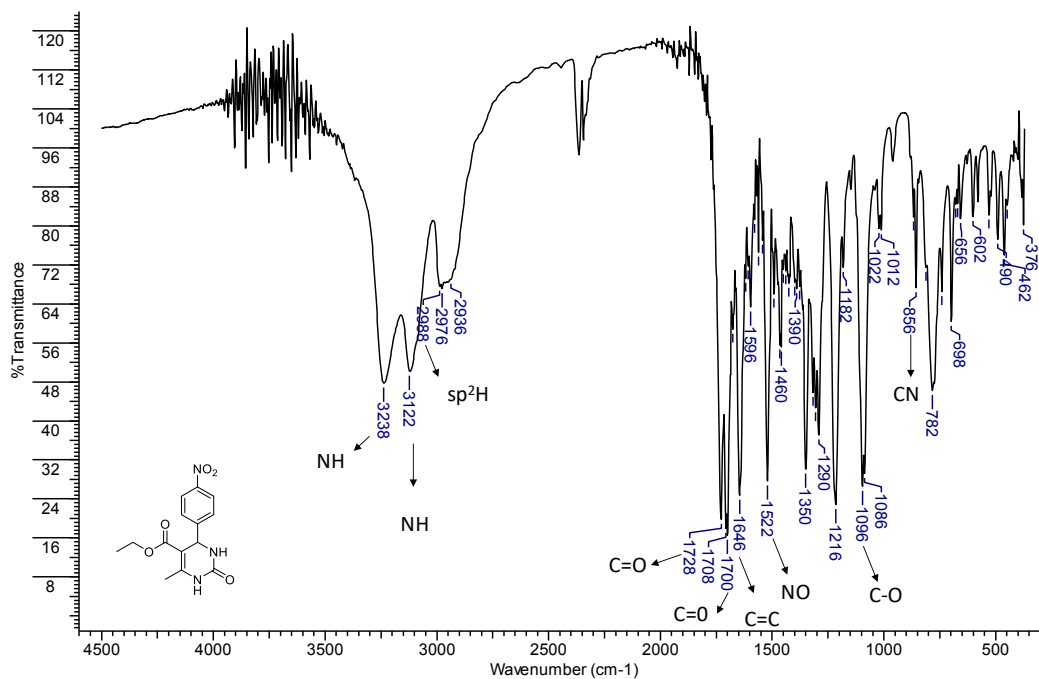


Fig. Apêndice 54: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB7-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

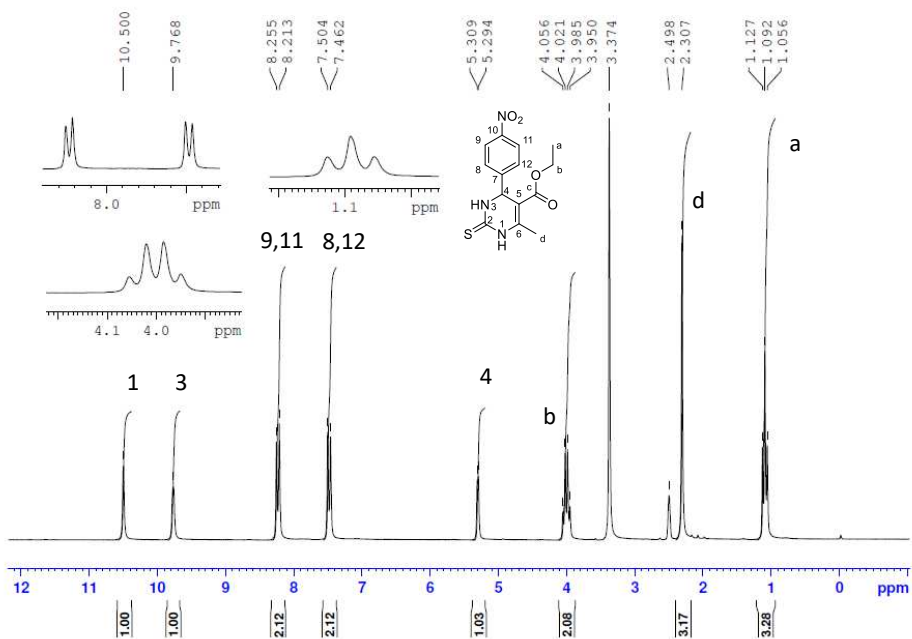


Fig. Apêndice 55: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB7-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

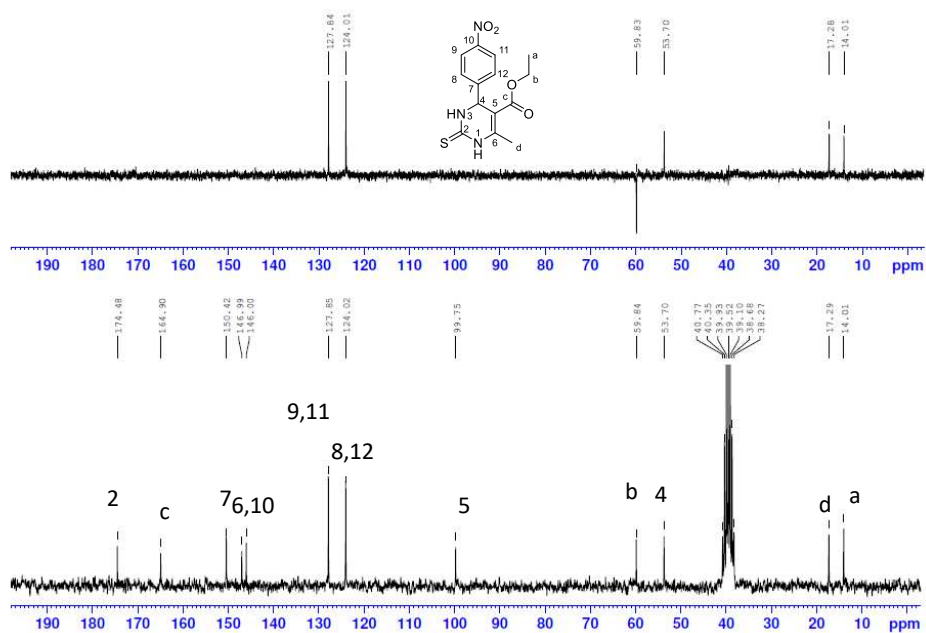


Fig. Apêndice 56: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB7-S**.

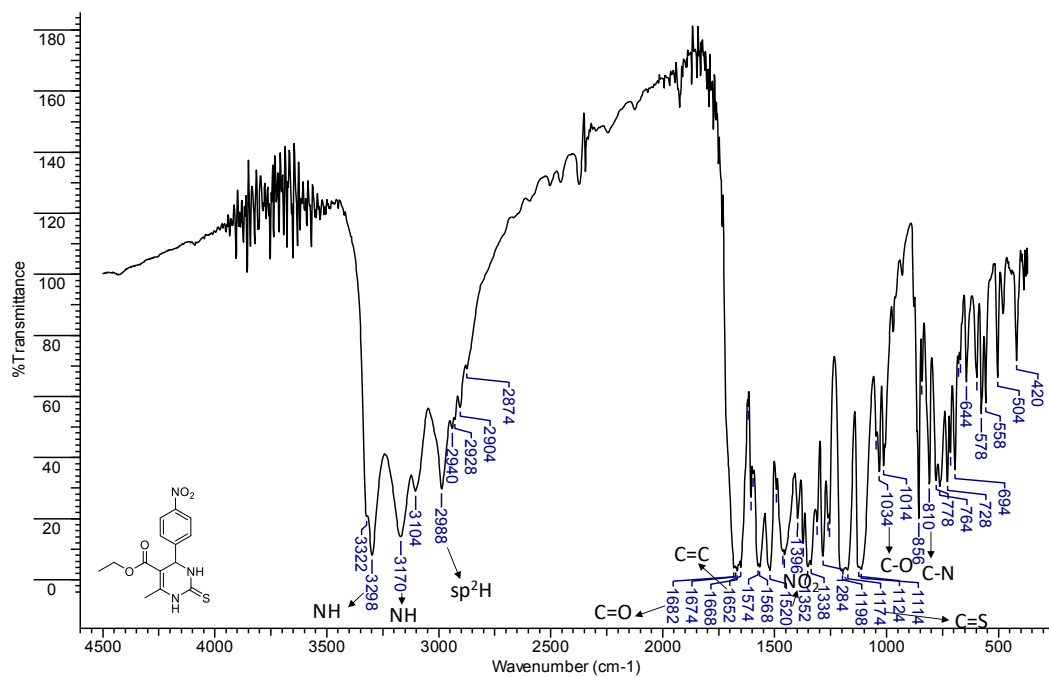


Fig. Apêndice 57: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB8-O** (400 MHz, DMSO-d₆).

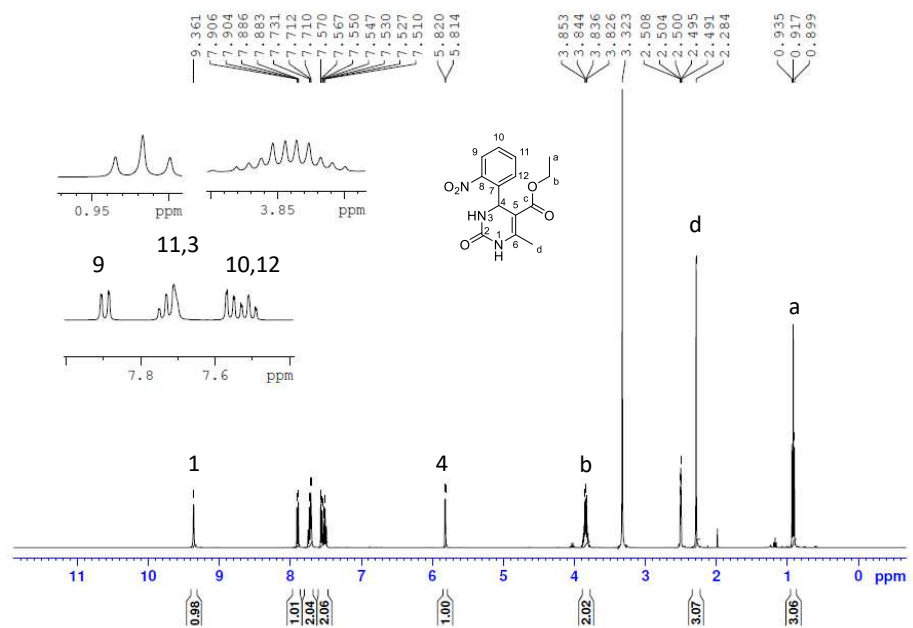


Fig. Apêndice 58: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB8-O** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

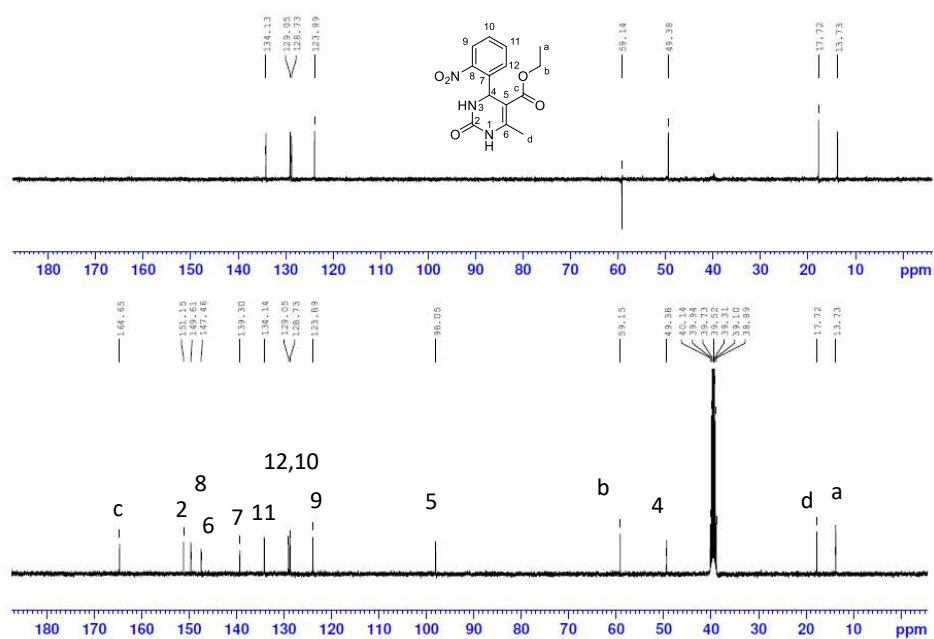


Fig. Apêndice 59: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB8-O**.

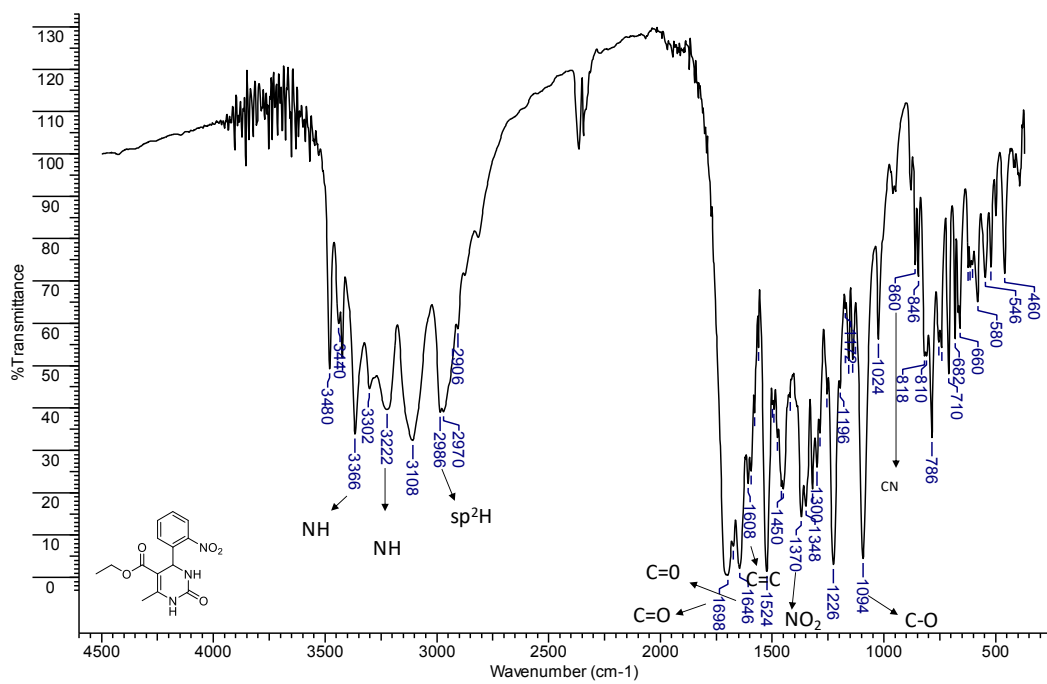


Fig. Apêndice 60: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB8-S** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

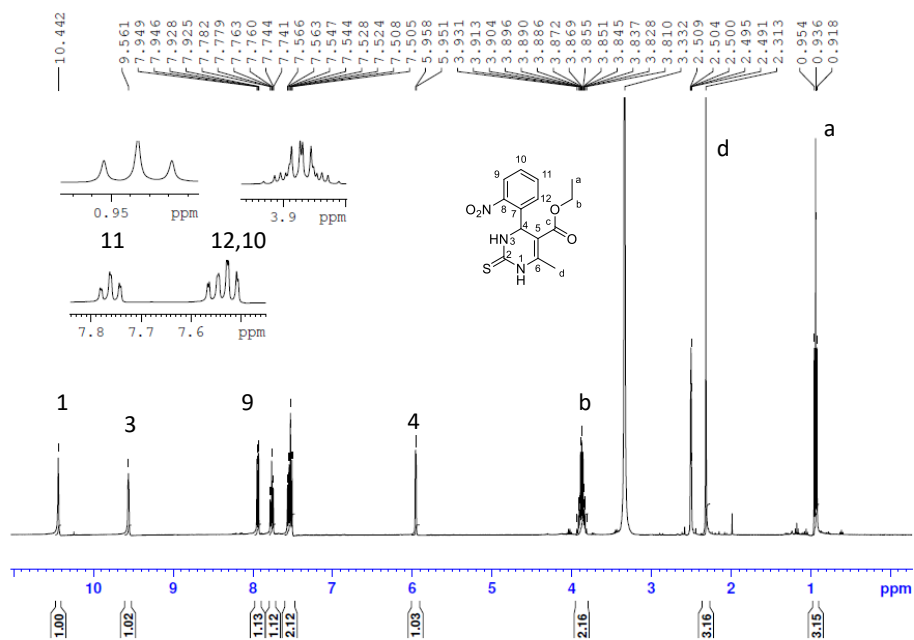


Fig. Apêndice 61: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB8-S** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

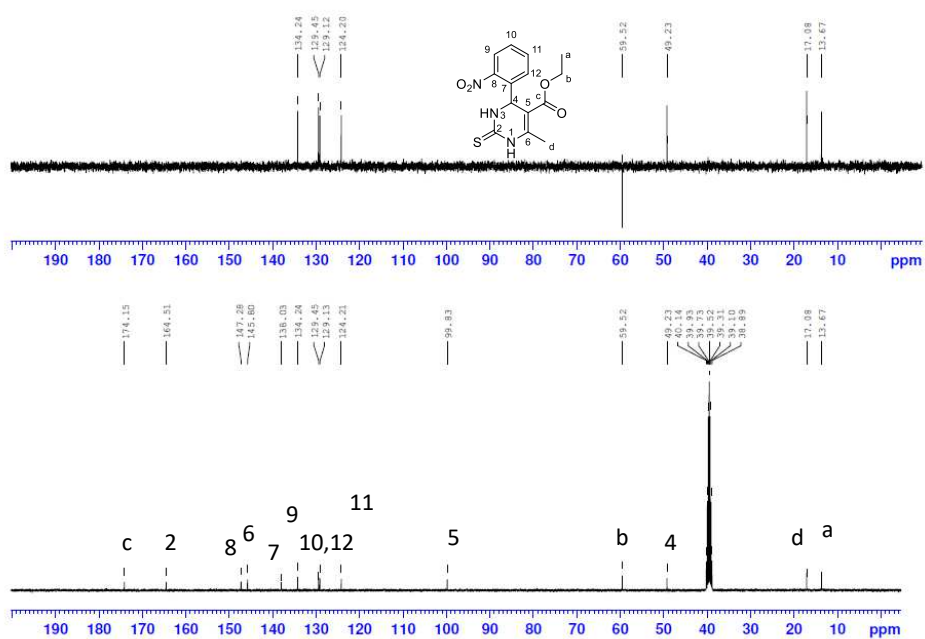


Fig. Apêndice 62: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB8-S**.

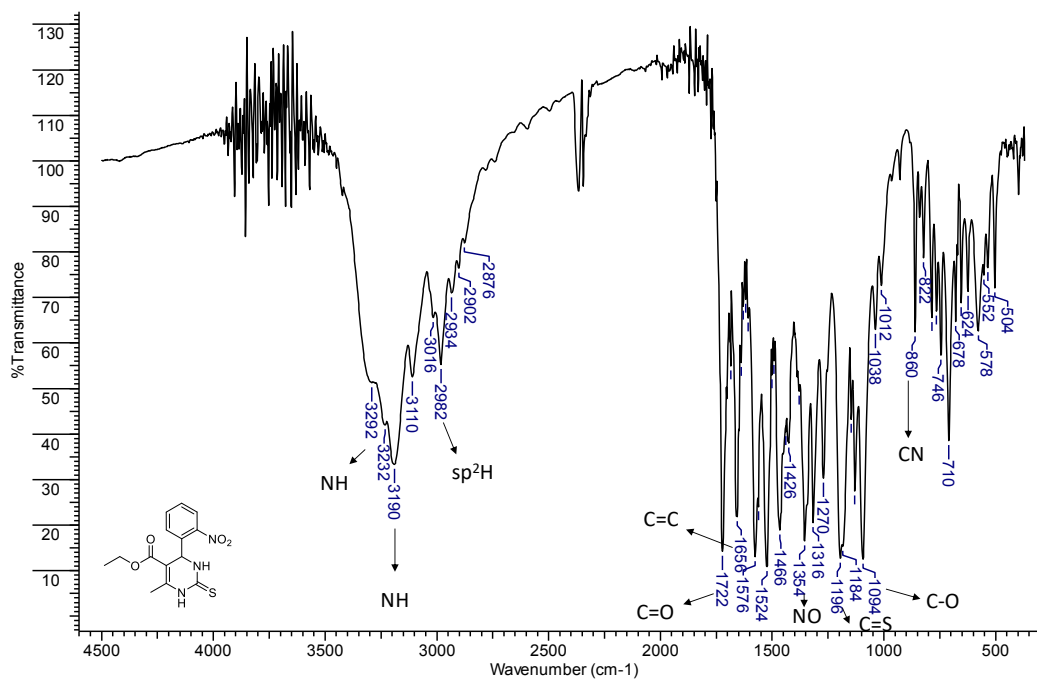


Fig. Apêndice 63: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB9-O** (200 MHz, DMSO-d₆).

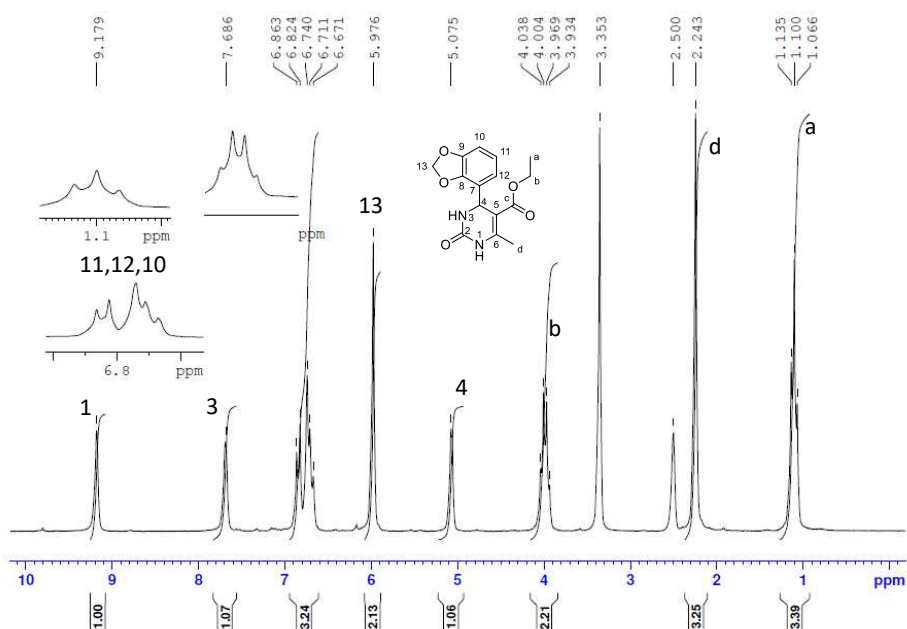


Fig. Apêndice 64: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB9-O** (50 MHz, DMSO- d_6)

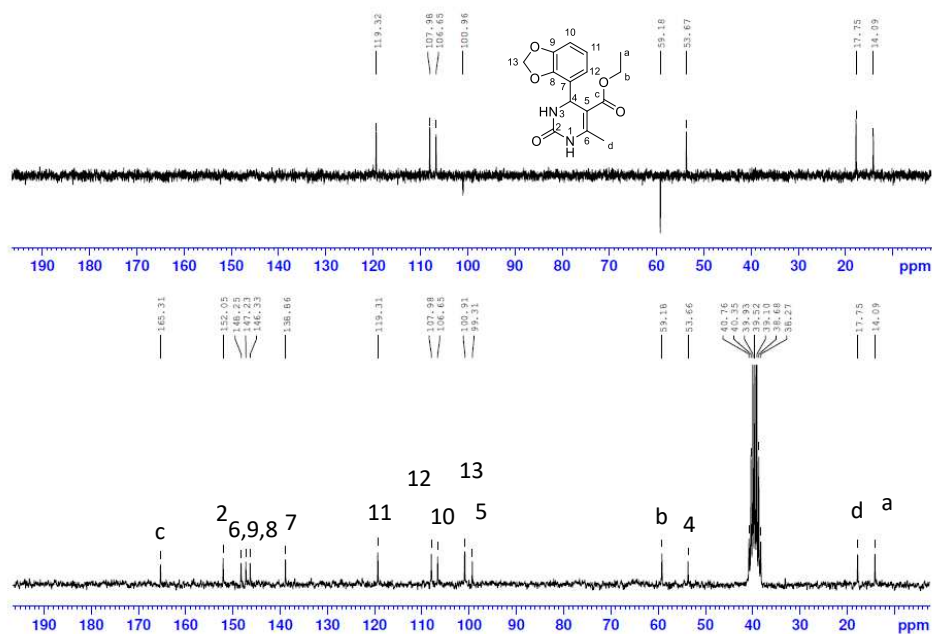


Fig. Apêndice 65: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB9-O**.

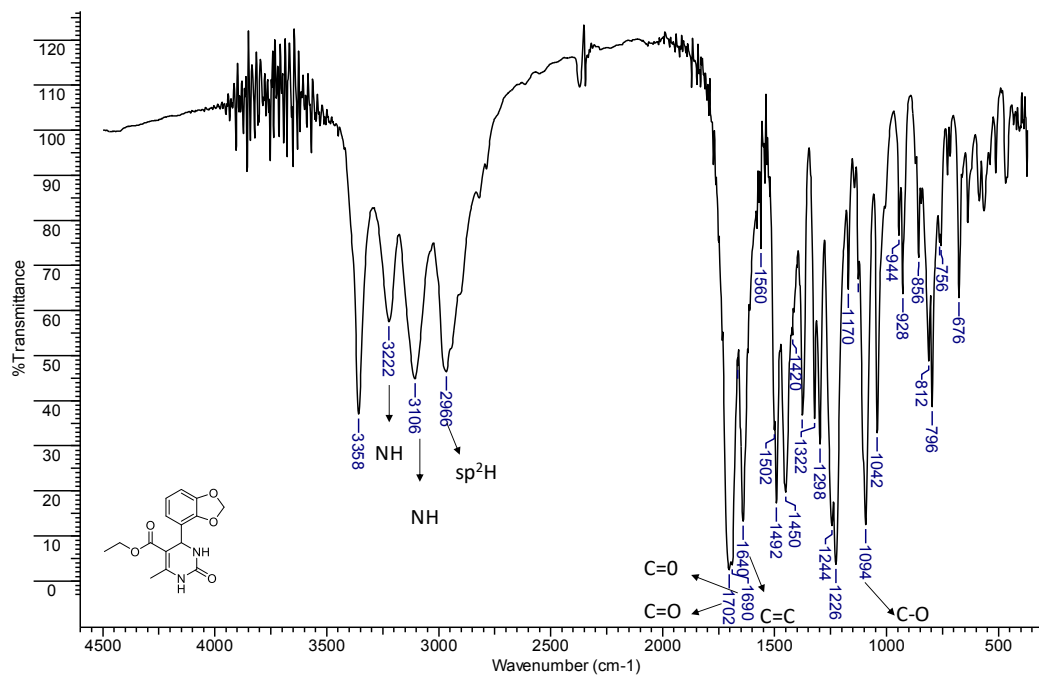


Fig. Apêndice 66: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB9-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

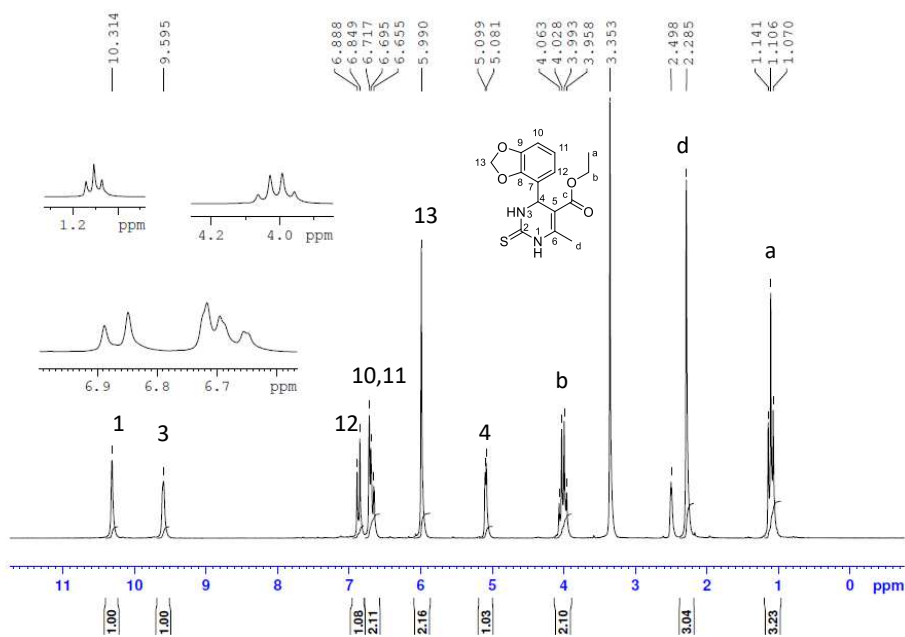


Fig. Apêndice 67: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB9-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

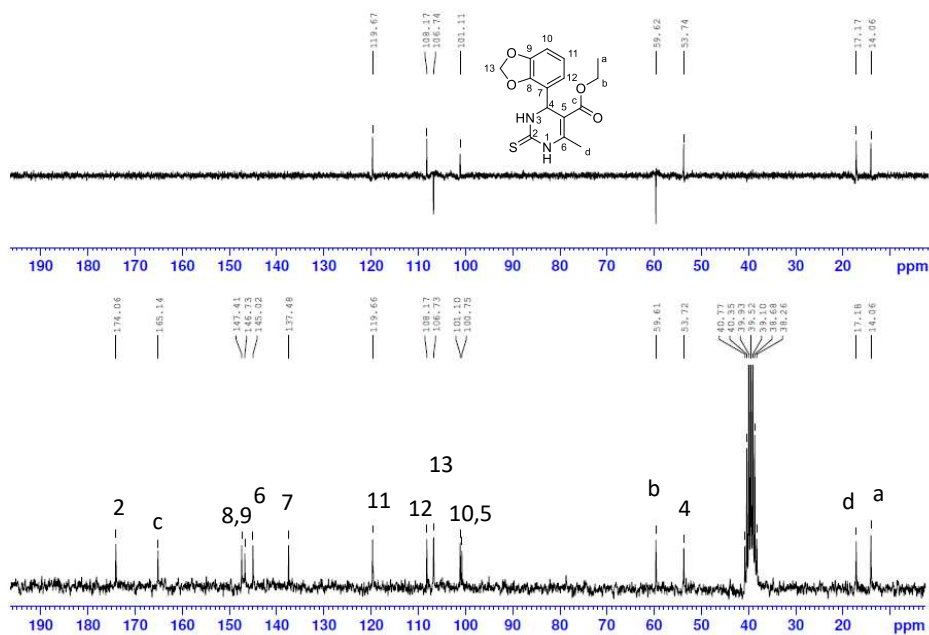


Fig. Apêndice 68: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB9-S**.

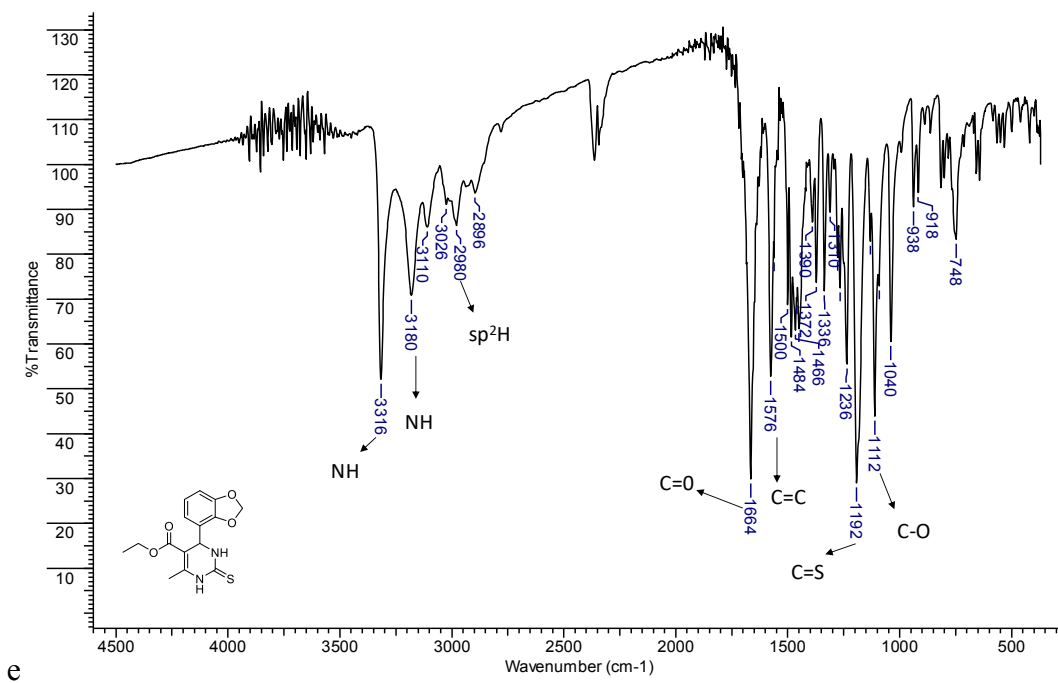


Fig. Apêndice 69: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB10-O** (200 MHz, DMSO-*d*₆).

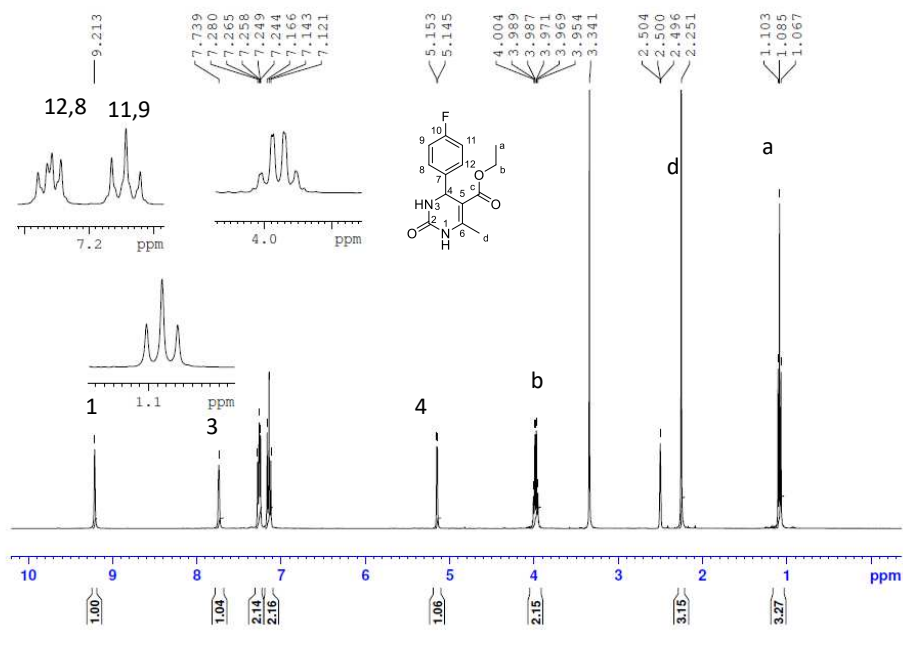


Fig. Apêndice 70: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB10-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

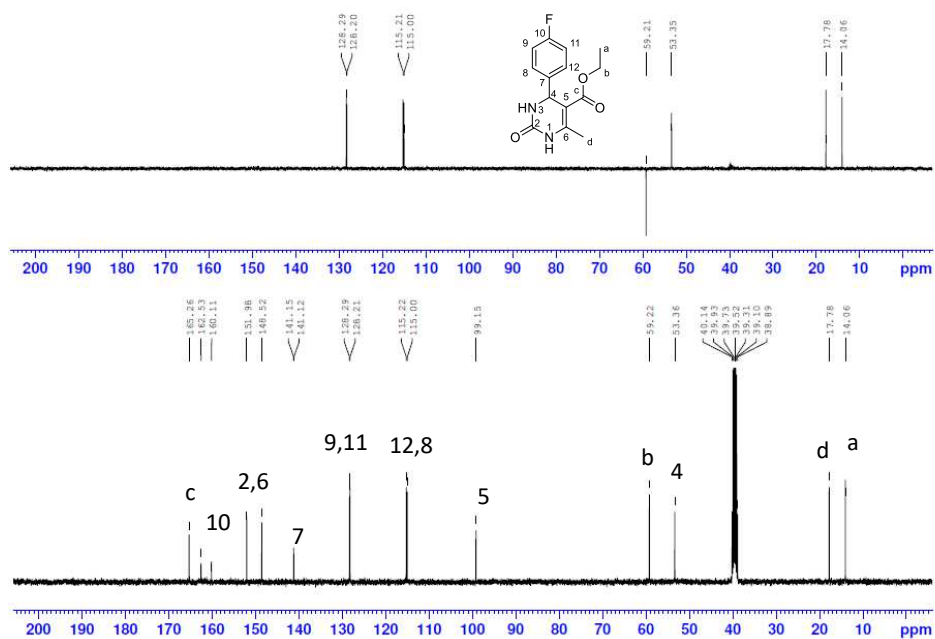


Fig. Apêndice 71: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB10-O**.

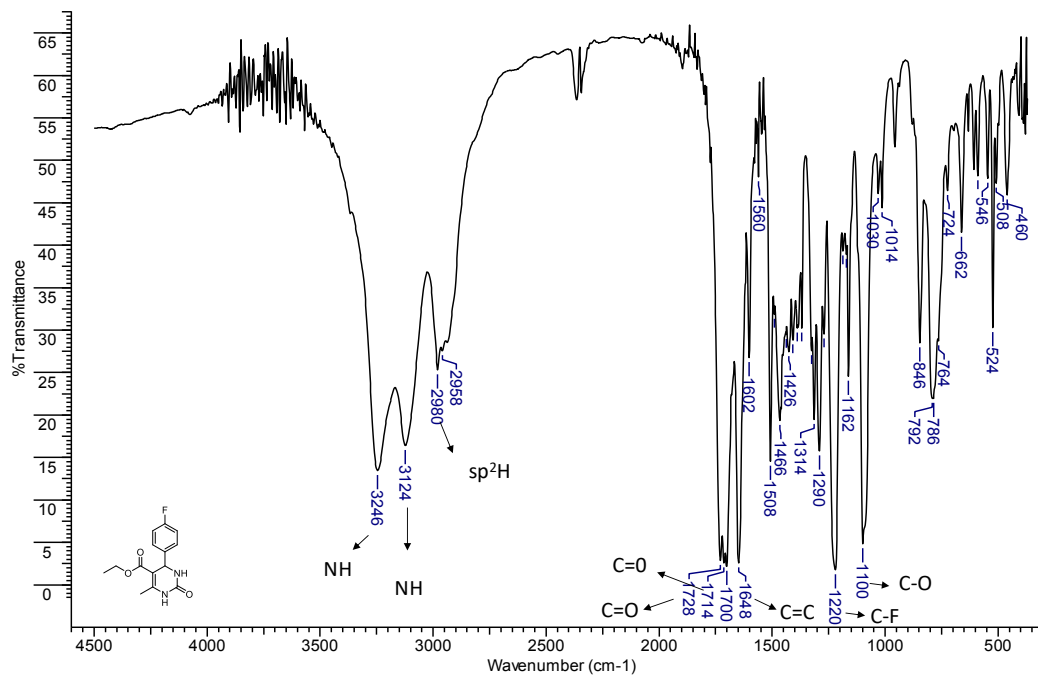


Fig. Apêndice 72: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB10-S** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

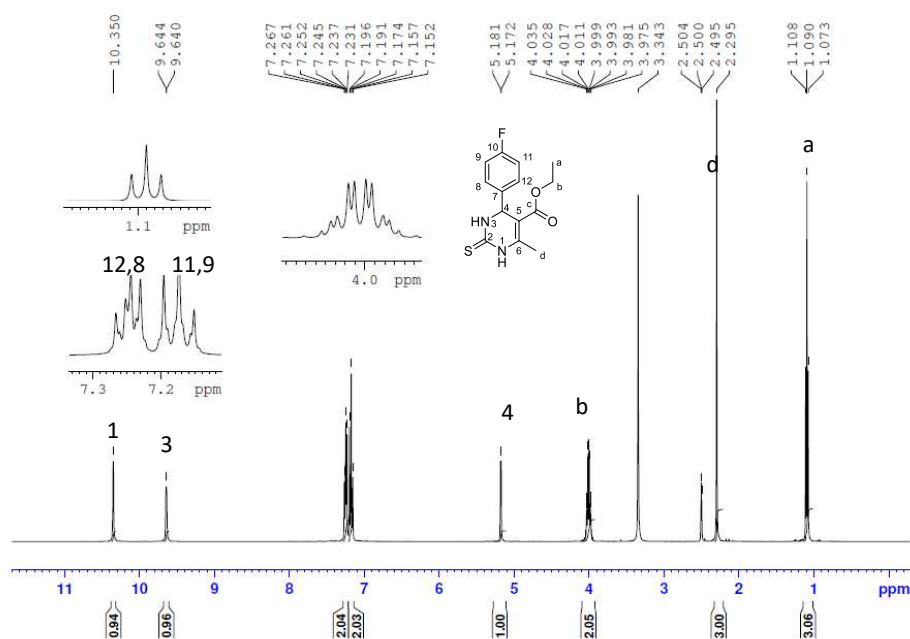


Fig. Apêndice 73: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB10-S** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

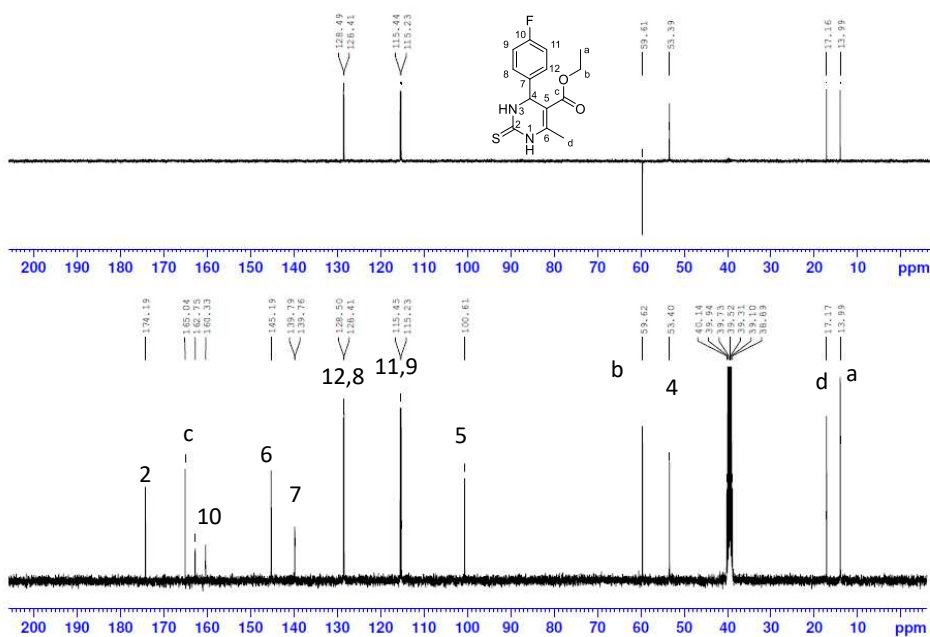


Fig. Apêndice 74: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB10-S**.

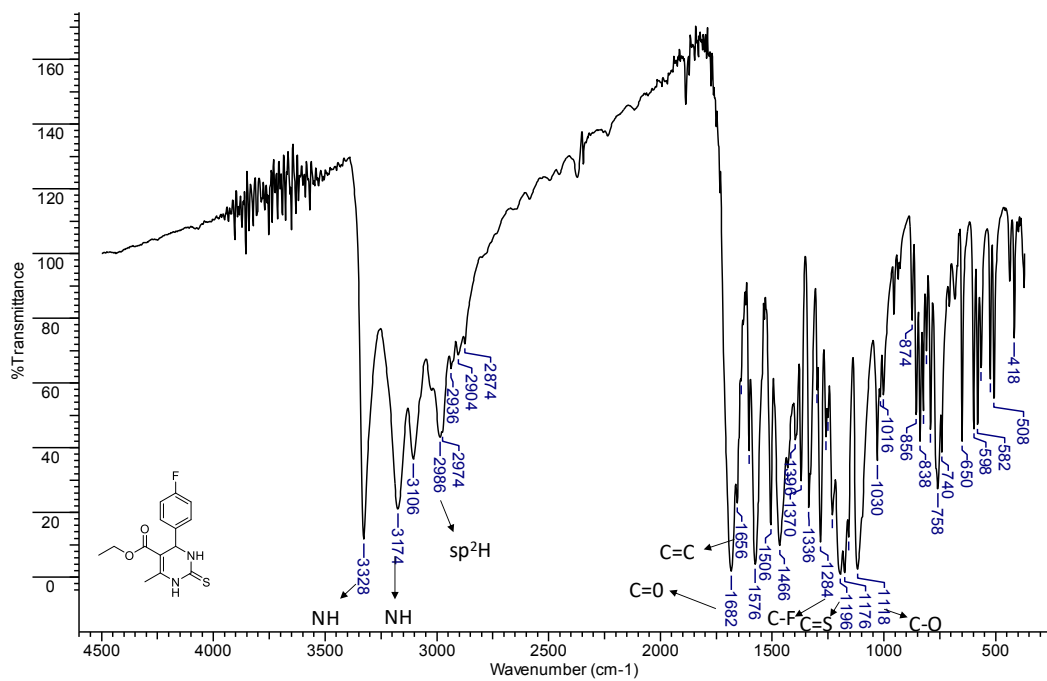


Fig. Apêndice 75: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB11-O** (200 MHz, DMSO-d₆).

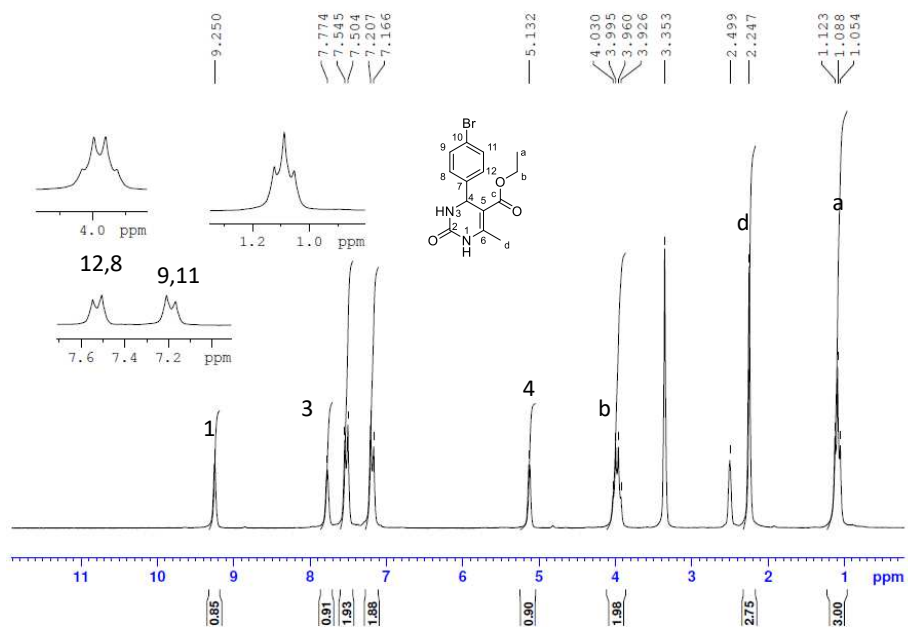


Fig. Apêndice 76: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB11-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

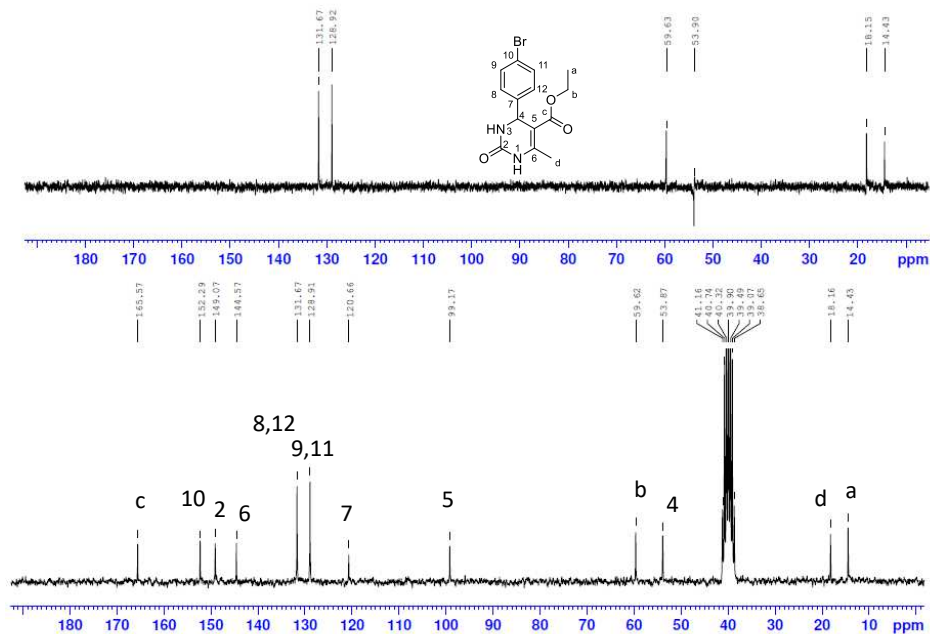


Fig. Apêndice 77: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB11-O**.

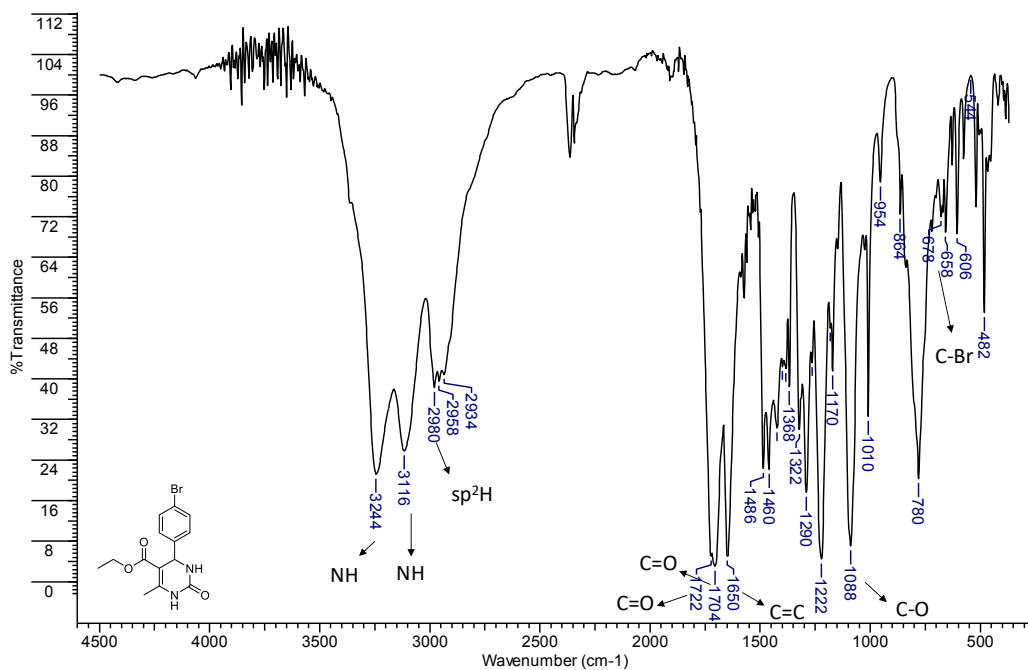


Fig. Apêndice 78: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB11-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

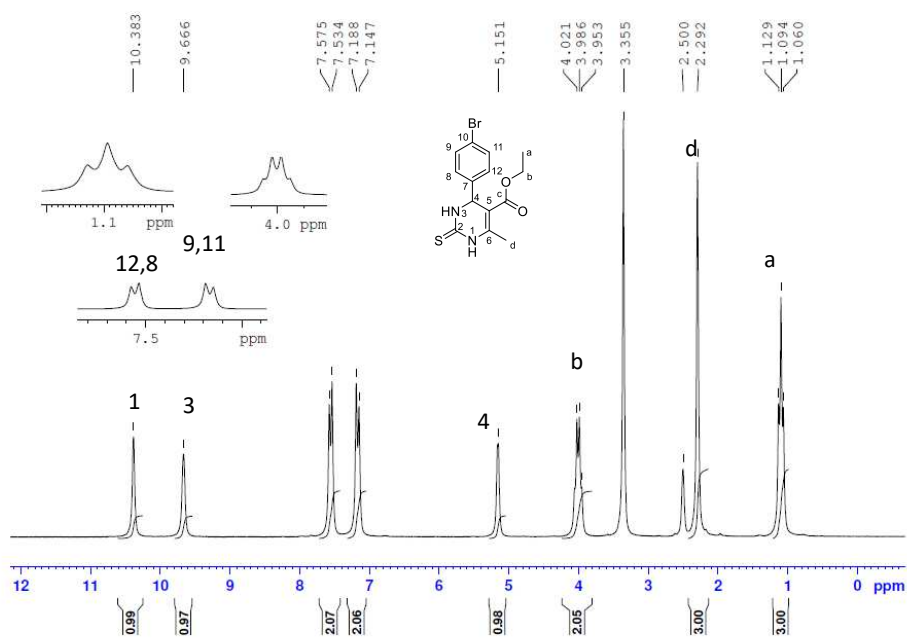


Fig. Apêndice 79: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB11-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

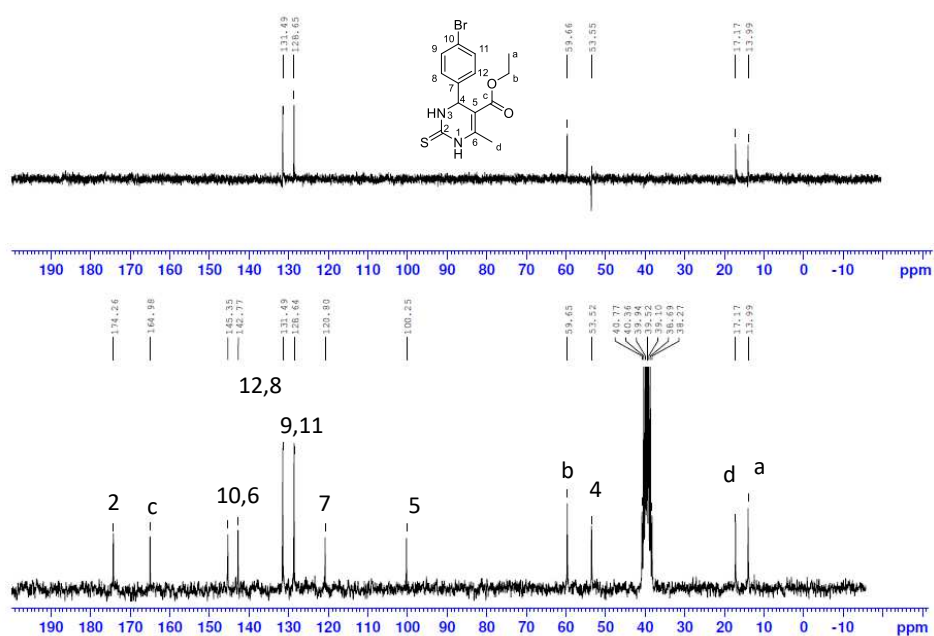


Fig. Apêndice 80: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB11-S**.

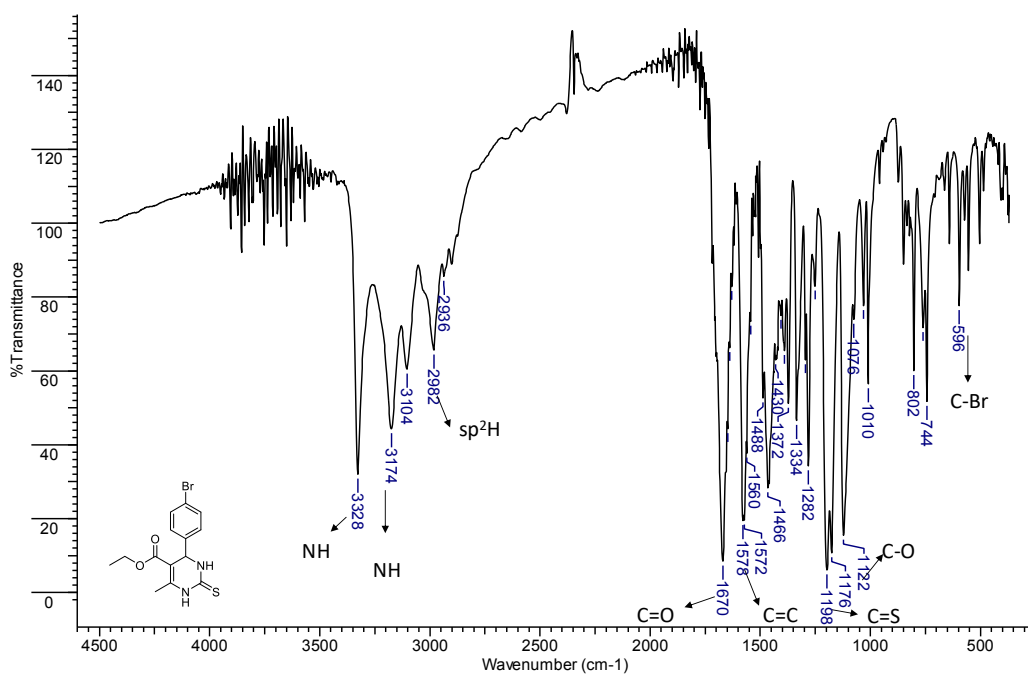


Fig. Apêndice 81: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB12-O** (400 MHz, DMSO-*d*₆).

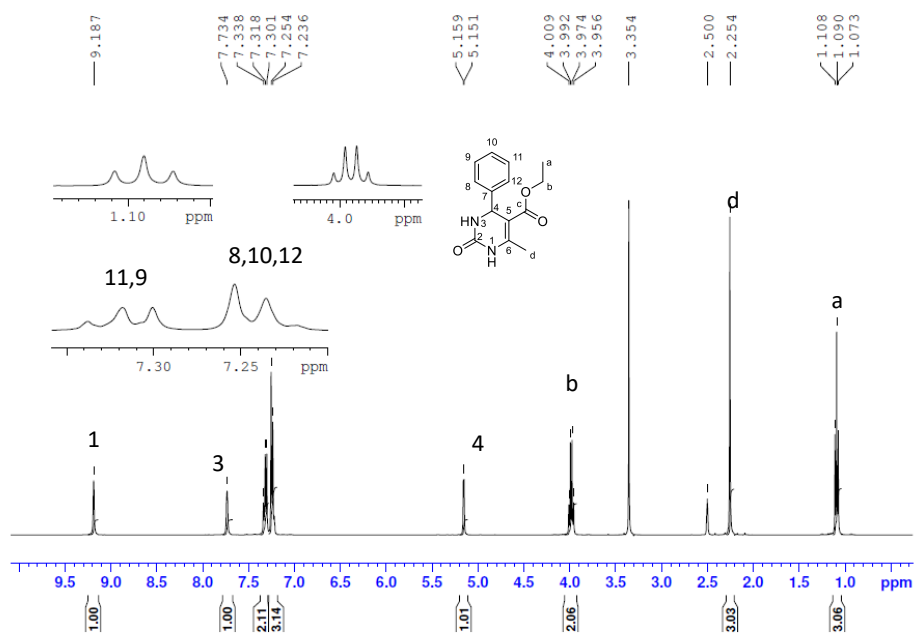


Fig. Apêndice 82: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB12-O** (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

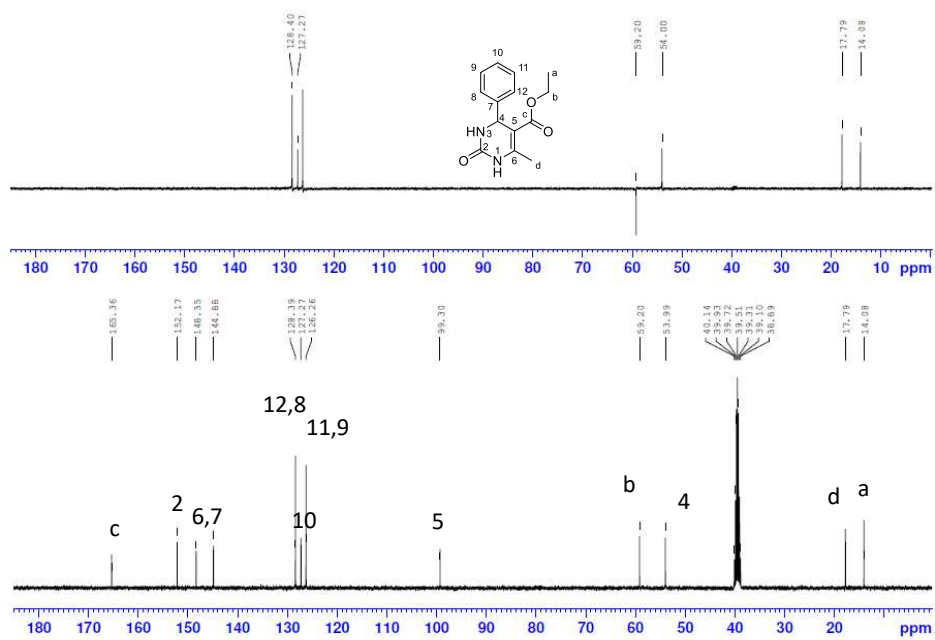


Fig. Apêndice 83: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB12-O**.

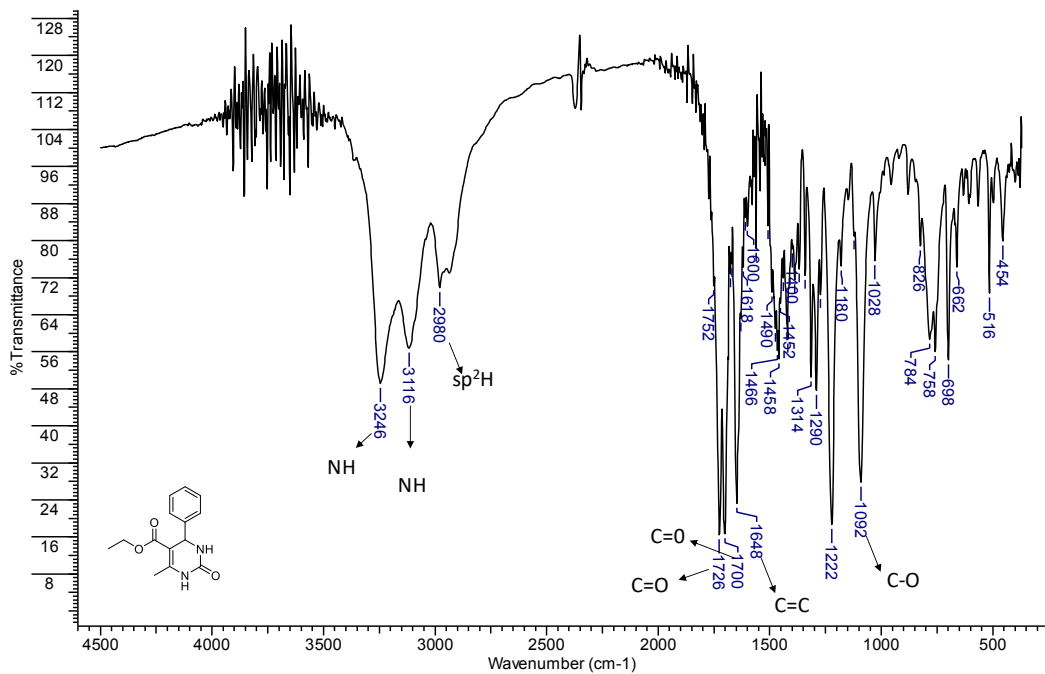


Fig. Apêndice 84: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB12-S** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

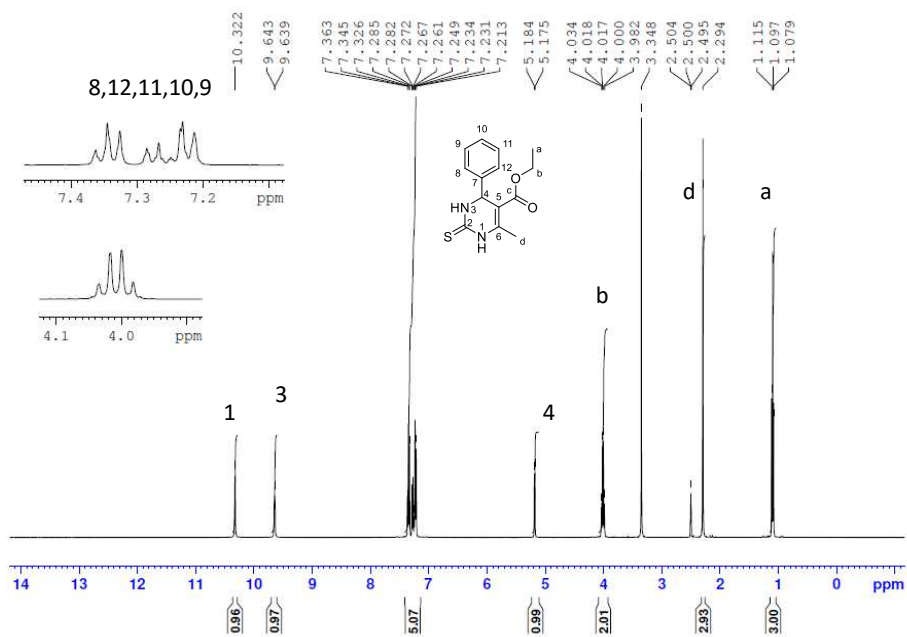


Fig. Apêndice 85: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB12-S** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

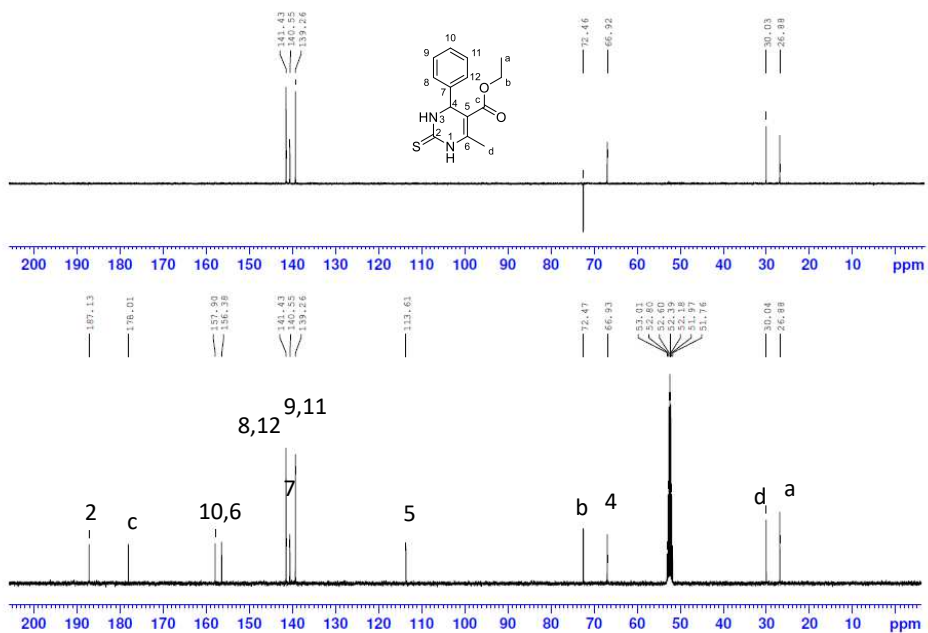


Fig. Apêndice 86: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB12-S**.

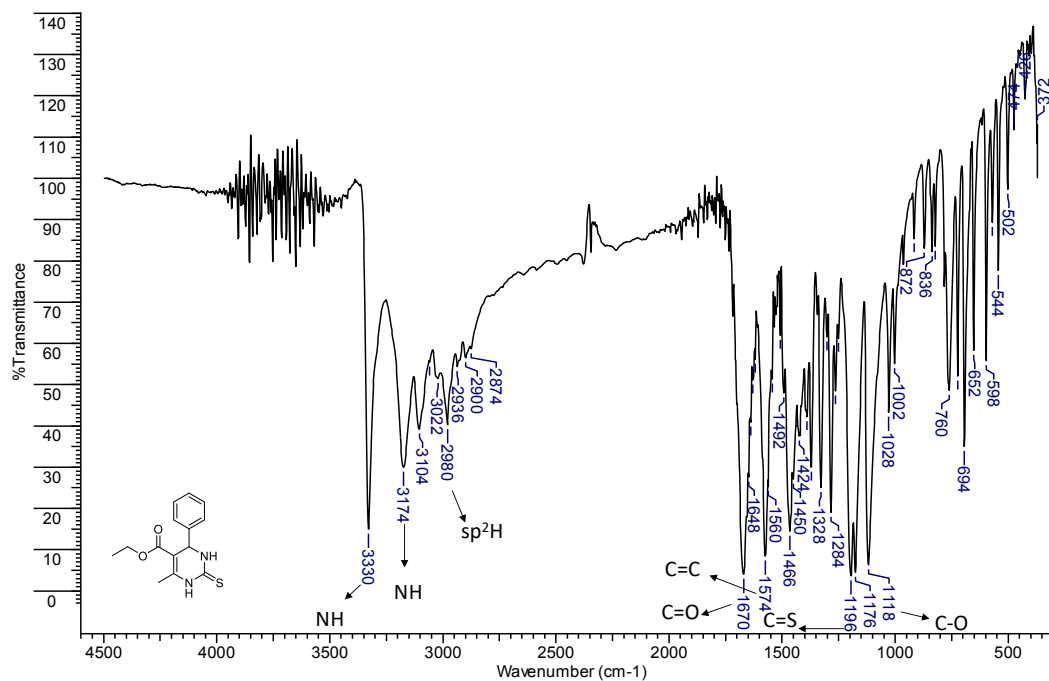


Fig. Apêndice 87: Espectro de RMN de ¹H da substância **AB13-O** (200 MHz, DMSO-d₆).

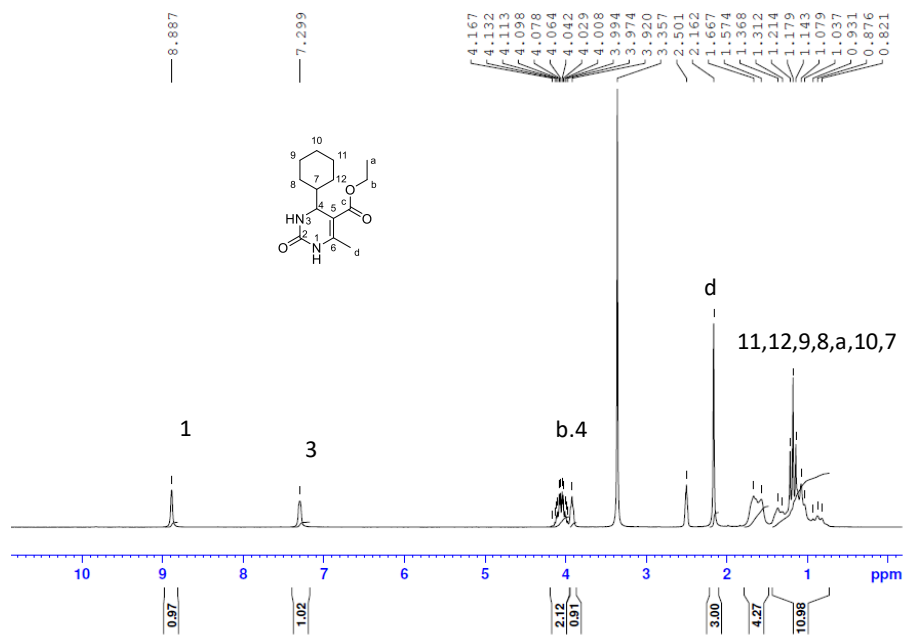


Fig. Apêndice 88: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB13-O** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

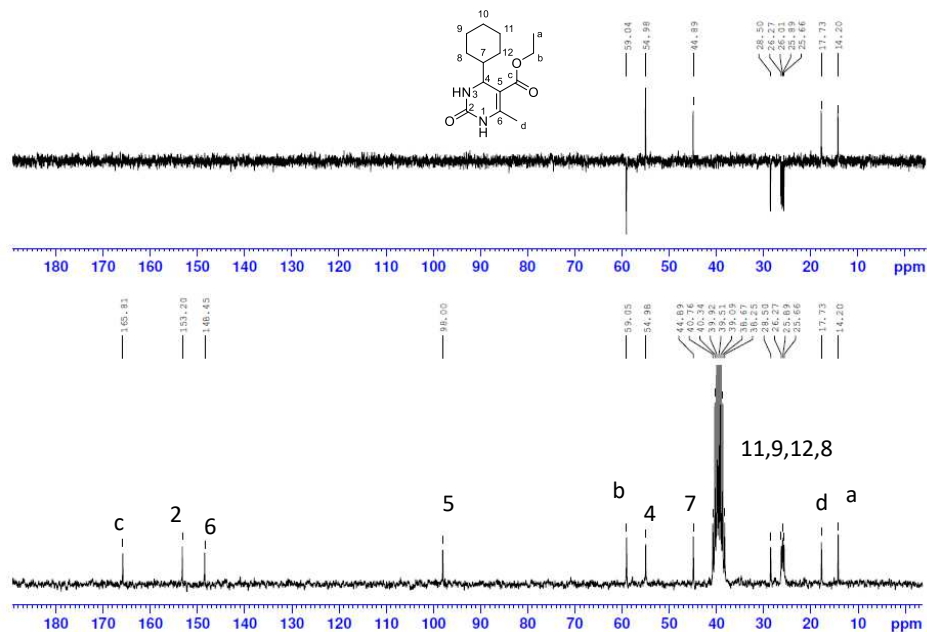


Fig. Apêndice 89: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB13-O**.

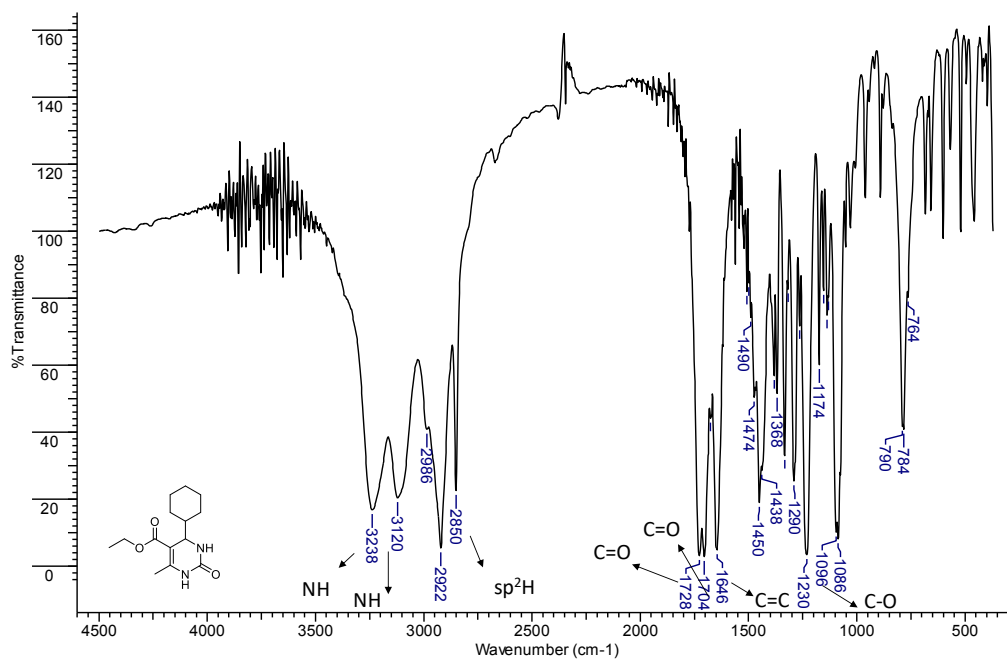


Fig. Apêndice 90: Espectro de RMN de ^1H da substância **AB13-S** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

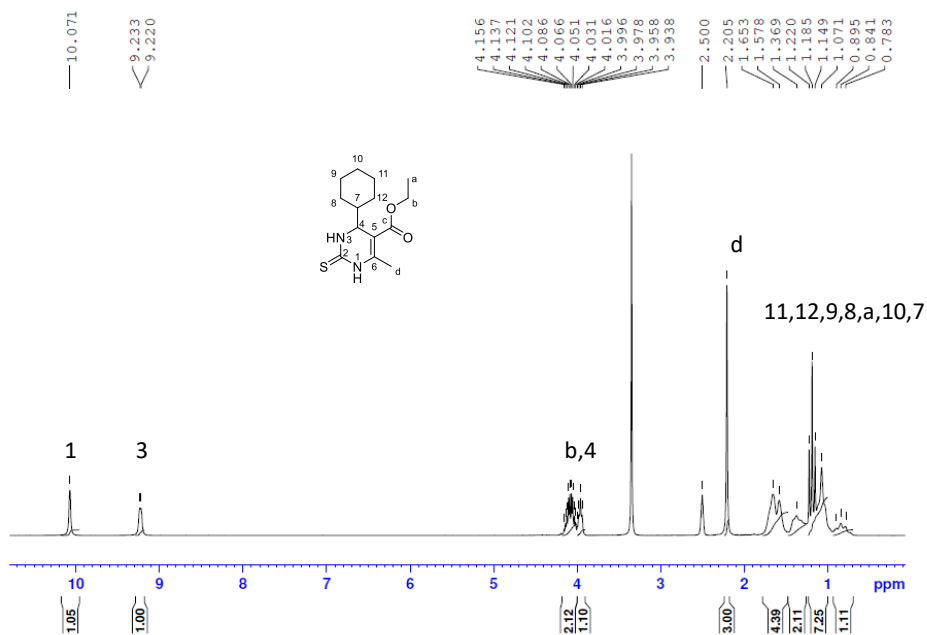


Fig. Apêndice 91: Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) **AB13-S** (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

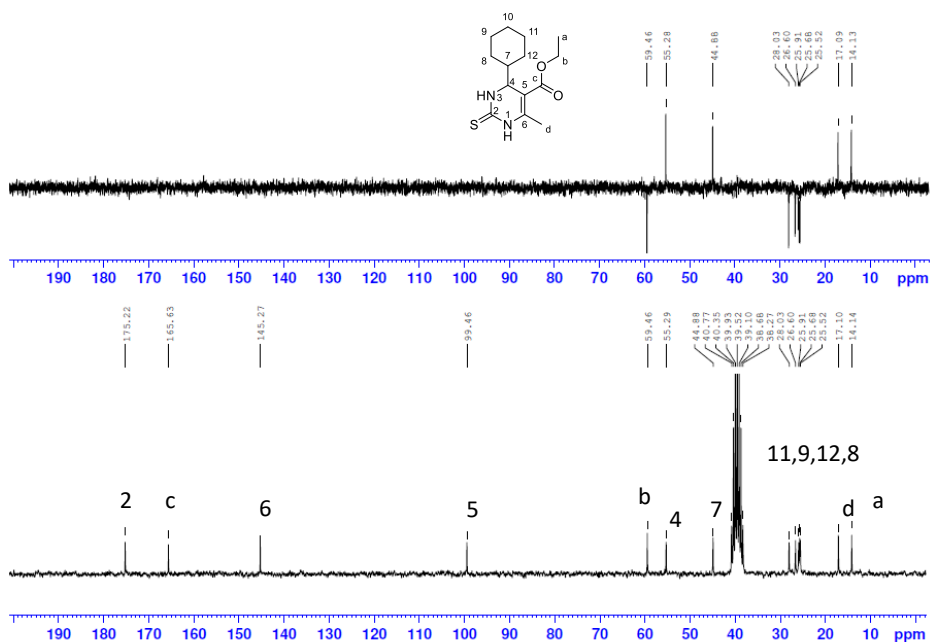


Fig. Apêndice 92: Espectro na região do infravermelho (KBr) de **AB13-S**

