



UnB

Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

Reações Multicomponentes Variantes de Biginelli: Efeito do Solvente, Mecanismos, Aplicações Biológicas e Correções da Literatura

Pedro de Santana Beck

Orientador:

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Coorientadora:

Dra. Carime Vitória da Silva Rodrigues

Brasília, DF.

2024



UnB

Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Pedro de Santana Beck

Reações Multicomponentes Variantes de Biginelli: Efeito do Solvente, Mecanismos, Aplicações Biológicas e Correções da Literatura

Dissertação de Mestrado em química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador:

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Coorientadora:

Dra. Carime Vitória da Silva Rodrigues

Brasília, DF.

2024

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Raquel e Lisandro, por sempre apoiarem em minhas escolhas, mesmo quando não tão convencionais. Agradeço também por me proporcionarem a oportunidade de fazer uma pós-graduação. Sem ele esses 2 anos de mestrado não teriam sido possíveis.

Sou igualmente grato ao apoio dado por a toda minha família. Avôs, avós, tios, tias, primos e ao meu irmão.

Agradeço ao meu orientador Brenno por todos os ensinamentos passados nesses mais de 6 anos de convívio. Agradeço a amizade e principalmente pelas discussões científicas no laboratório que provavam que ele estava sempre certo. Fazer o que!

Agradeço também a minha coorientadora Carime pelo apoio nessa jornada e pela paciência. Por sempre me guiar na profissionalidade e seriedade no trabalho científico.

Agradeço a todos que colaboraram ativamente com essa dissertação e principalmente aos: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa, Prof. Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira, Prof. Dr. Daniel Scalabrini, Dr. Guilherme Matos e Arthur Leitão.

Aos docentes da Universidade de Brasília que foram fundamentais para o meu desenvolvimento como químico.

A todos os amigos que estiveram ao meu lado acompanhando cada descoberta e frustração.

Agradeço ao Instituto de Química por proporcionar toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto. Assim como todos os funcionários do Instituto que o mantem funcionando.

Agradeço as agências de fomento CNPq, CAPES, FAPDF, FINATEC e DPP-UnB que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite, pela leitura do trabalho e as contribuições.

Muito Obrigado!

Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Esquemas	x
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Anexos	xiv
Lista de Abreviações	xvi
Introdução.....	1
Objetivos.....	22
Objetivo geral:	22
Objetivos específicos:.....	22
Parte Experimental	23
Materiais e Métodos	23
Medida de ponto de fusão (PF)	23
Espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	23
Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	23
Análise elementar (CHN)	23
Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).....	24
Condições experimentais nas tentativas de síntese de derivados CPDs.....	24
Metodologia de síntese do Dicumarol (DC).....	25
Metodologia de reciclo do catalisador (MSI) ₃ PW.....	27
Metodologias de síntese da pirano-cromeno-carbonitrila (PCN).....	27
Metodologia de Síntese da 10,10-dimetil-7-fenil-7,9,10,11-tetraidro-6H,8H- cromeno[4,3-b]cromeno-6,8-diona (TCC)	28

Bioensaio de coleóptilo de trigo estiolado.....	29
Bioimageamento celular.....	30
Ensaio de imunofluorescência.....	30
Métodos computacionais:.....	31
Resultados e discussão.....	33
Estudo de otimização e efeito do solvente visando a síntese da CPD.....	33
Avaliação detalhada dos dados espectroscópicos para a CPD.....	44
Investigação relacionadas à literatura que descrevem a síntese da CPD.....	59
Tentativas de reprodução da literatura para a síntese da CPD-01.....	70
Estudo mecanístico, efeito de solvente e acompanhamento da reação da CPD por ESI(+)-MS.....	72
Metodologia alternativas testadas para tentar sintetizar a estrutura CPD-01.....	86
Investigação das reações de síntese da pirano-cromeno-carbonitrila (PCN) e da tiazocromenopirimidinona (TCP).....	97
Síntese de novos adutos DCs e aplicação biológica.....	103
Conclusões e perspectivas.....	112
Referências.....	114
Anexos.....	122

Resumo

Nesta dissertação, investigou-se reações multicomponentes (RMCs) variantes de Biginelli utilizando o modelo de efeito de solvente baseado nos parâmetros de Kamlet-Abboud-Taft (KT). Durante essa análise, foram identificadas inconsistências nas previsões do modelo de efeito de solvente, o que levou a uma análise abrangente dos dados, incluindo espectrometria de massas por ionização por electrospray, RMN de ^1H e ^{13}C , experimentos bidimensionais de RMN, pontos de fusão, análises elementares e análise de raios-X de monocristais, além de uma investigação minuciosa dos dados apresentados pela literatura. Todas essas análises evidenciaram erros grosseiros na caracterização estrutural das RMCs relatadas. Aprofundou-se o estudo dos mecanismos envolvidos na reação de síntese das cromenopirimidinonas (CPDs), permitindo a proposição de um ciclo catalítico completo. Realizou-se a síntese de derivados de DCs, submetendo-os a ensaios biológicos que revelaram características distintivas desses compostos. Um novo mecanismo de ação celular foi revelado para um derivado de DC obtido, sugerindo similaridade com a conhecida diidropirimidinona, o Monastrol, como inibidor da Eg5, interrompendo a mitose pela formação de fusos mitóticos monoastrais. Simulações de *docking* e dinâmica molecular fortaleceram a hipótese da atuação dos DCs na proteína Eg5. Este estudo destaca a importância de uma análise crítica e reprodutibilidade nas RMCs, enfatizando a necessidade de uma abordagem cuidadosa na interpretação dos dados presentes na literatura.

Palavras-chave: Reações multicomponente, Efeito de solvente, Kamlet-Taft, Biginelli, Variante de Biginelli, Estudo mecanístico, Estudos biológicos, Correção da literatura.

Abstract

In this dissertation, we explored variant Biginelli multicomponent reactions (MCRs) using a solvent effect model based on Kamlet-Abboud-Taft (KT) parameters. Throughout this investigation, inconsistencies in the solvent effect model predictions were identified, prompting a comprehensive analysis of the data. The analysis included electrospray ionization mass spectrometry, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, two-dimensional NMR experiments, melting points, elemental analyses, and X-ray crystallography. Additionally, a meticulous examination of literature-reported data was conducted. All these analyses revealed significant errors in the structural characterization of the reported MCRs. The study delved into the mechanisms involved in the synthesis of chromenopyrimidinones (CPDs), leading to the proposal of a complete catalytic cycle. Derivatives of DCs were synthesized and subjected to biological assays, uncovering distinctive characteristics of these compounds. A novel cellular mechanism of action was unveiled for a DC derivative, suggesting similarity to the well-known dihydropyrimidinone, Monastrol, as an inhibitor of Eg5, disrupting mitosis by forming monoastrol mitotic spindles. Docking simulations and molecular dynamics supported the hypothesis of DCs acting on the Eg5 protein. This study underscores the importance of critical analysis and reproducibility in MCRs, emphasizing the need for a careful approach in interpreting data presented in the literature.

Keywords: *Multicomponent reactions, Solvent effect, Kamlet-Taft, Biginelli, Biginelli-like, Mechanistic study, Biological studies, Literature correction.*

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de DHPMs com atividade farmacológica conhecida. ²³	6
Figura 2. Fusão monoastral causado pelo tratamento com o Monastrol em MCF-7 (células de câncer de mama). Imunofluorescência: em verde a α -tubulina e em azul as cromatinas. (A) Tratamento com 68 μ M de Monastrol. (B) Controle negativo, tratamento com DMSO. Retirada da referência 27 com permissão da <i>CC BY 4.0</i>	7
Figura 3. Estruturas moleculares dos primeiros inibidores de cinesinas.	8
Figura 4. Estrutura dos indicadores solvatocrômicos utilizados para determinação dos parâmetros de KT dos solventes.	12
Figura 5. Exemplos de alguns adutos de RMCs variantes de Biginelli com atividades farmacológicas.	16
Figura 6. Resultados referente as buscas realizadas na base de dados <i>Web of Science</i> para a palavra-chave: ““ <i>multicomponent* reaction*</i> ””, como título para os anos entre 2018 e 2022 e como tópico para o ano de 2019. Adaptada da referência 4.	18
Figura 7. Estruturas derivadas de cumarinas com atividades biológicas comprovadas.	19
Figura 8. (A) Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o produto formado na reação. (B) Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o produto formado na reação. Note que a estrutura apresentada é da suposta CPD-01	35
Figura 9. Representações gráficas das otimizações das condições reacionais. A). Otimização da temperatura B) Otimização do tempo de reação. C) Otimização da quantidade de catalisador.	36
Figura 10. Gráficos correlacionado de $\text{Ln}(P)$ com os parâmetros de KT para a RMC da síntese da CPD-01 . (A) Reação equimolar. Coeficiente de determinação: $R^2(\pi^*) = 0,53$; (α) = 0,50; (β) = 0,02. (B) Reação com excesso do reagente 4-hidroxicumarina. Coeficiente de determinação: $R^2(\pi^*) = 0,47$; (α) = 0,44; (β) = 0,02. (C) Reação com excesso do reagente benzaldeído. Coeficiente de determinação: $R^2(\pi^*) = 0,47$; (α) = 0,44; (β) = 0,02. (D) Reação com excesso de ureia. Coeficiente de determinação: $R^2(\pi^*) = 0,62$; (α) = 0,17; (β) = 0,04.	41
Figura 11. Monitoramento por ESI(+)-MS da RMC para a síntese da CPD-01 . (A) 5 min de reação. (B) 45 min de reação. (C) Estruturas detectadas e suas massas exatas calculadas.	50
Figura 12. (A) Espectro de RMN de ^1H para o produto obtido na reação da CPD (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$). (B) Espectro de RMN de ^1H para o produto obtido na reação da	

DPC (300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). Note que todos os deslocamentos químicos dos sinais, as integrações dos sinais e multiplicidades são muito semelhantes, indicando a formação do mesmo produto em ambas as reações.....	52
Figura 13. Estrutura para o produto formado na reação e raios-X de monocristal do DC-01	53
Figura 14. A) Espectro de RMN de ¹ H para o DC-01 (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆). B) Espectro de RMN de ¹³ C para o DC-01 (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	55
Figura 15. RMN de 2D COSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o DC-01	56
Figura 16. RMN de 2D HSQC (600 MHz e 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o DC-01	56
Figura 17. RMN de 2D HMBC (600 MHz e 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o DC-01	57
Figura 18. A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-01 . B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-01	58
Figura 19. Estrutura da CPD-01 que foi pesquisada na base de dados do <i>SciFinder</i> ...	59
Figura 20. Histograma relacionando as faixas de ponto de fusão (°C) relatadas para a CPD-01 com o número de publicações em que aparecem. As faixas de PF próximas entre si são representadas pelas colunas de mesma cor, enquanto as distantes entre as demais são representadas pelas cores diferentes.....	61
Figura 21. Cromatografia de camada delgada feita para os produtos obtidos nas reações de síntese da suposta CPD-01 . Os três primeiros pontos (da esquerda para a direita) representam os produtos da reação da suposta CPD-01 , o último ponto a direita é o DC-01 puro.....	62
Figura 22. Monitoramento dos intermediários reacionais por HRMS. Reagentes: 4-hidroxycumarina, ureia, 4-formil- <i>N,N,N</i> -trimetilbenzenaminium. Solvente: <i>p</i> -cimeno. Temperatura: 80°C. 2CR indica reação bimolecular e 3CR indica reação com os 3 componentes.....	78
Figura 23. Espectro de ESI(+)-MS/MS do intermediário avançado. Note que a perda neutra de ureia é preferencial devido ao sinal mais intenso do fragmento desta perda..	80
Figura 24. Monitoramento dos intermediários da reação por HRMS. Reagentes: 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, ureia, 4-formil- <i>N,N,N</i> -trimetilbenzenaminium. Solvente: água. Temperatura: 80 °C.	83
Figura 25. Espectro de ESI(+)-MS/MS do intermediário avançado da hidroximetilpirona. Note que a perda neutra de ureia é preferencial devido ao sinal mais intenso do fragmento desta perda.	84

Figura 26. (A) Espectro de ESI(+)-MS da estrutura análoga à CPD-01 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS da estrutura análoga à CPD-01	96
Figura 27. (A) Espectro de ESI(+)-MS da PCN . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS da PCN	99
Figura 28. (A) Espectro de RMN de ^1H da PCN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$). (B) Espectro de RMN de ^{13}C para a PCN (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)......	100
Figura 29. Comparação entre os sinais de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) dos hidrogênios benzílicos do DC-01 (espectro de cima) e da PCN (espectro de baixo). Note que os deslocamentos desses sinais são bem afastados entre si.	102
Figura 30. Resultados de inibição de crescimento dos coleóptilos para os tratamentos com as DCs puras.	105
Figura 31. Resultados de inibição de crescimento dos coleóptilos para os tratamentos com as supostas CPDs	106
Figura 32. Divisão celular (mitose) inibição de células MCF-7 pelo DC-03 (Topo) e por Monastrol, o controle positivo (Centro) e o controle negativo (Inferior). (A), (D) e (G) Núcleos corados com o corante DAPI disponível comercialmente (emissor azul). (B), (E) e (H) Anticorpo monoclonal anti- α -Tubulina disponível comercialmente (emissor vermelho). (C), (F) e (I) Imagens mescladas de (A)-(B), (D)-(E) e (G)-(H), respectivamente. Observe que o DC-03 induziu fusos monoastrais em células em mitose, semelhante ao controle positivo.	108
Figura 33. Encaixe do Monastrol (A) e DC-03 (B) na proteína Eg5 (PDB 1Q0B), destacando interações eletrostáticas (linhas pontilhadas magenta) no sítio de ligação. (C) Sobreposição dos sítios de ligação do Monastrol e DC-03 na Eg5. Note-se que o DC-03 penetra mais profundamente na Eg5.	109
Figura 34. Pegada energética de Monastrol (azul) e DC-03 (vermelho) no sítio de ligação da Eg5. Cada linha vertical representa um resíduo, indicando a energia correspondente. O gráfico superior mostra a energia de van der Waals (VDW), enquanto o inferior exhibe as energias eletrostáticas. Ambos compartilham interações cruciais em resíduos adjacentes (GLU116, GLY117, GLU118, ARG119).	110
Figura 35. Análise de DM. (A) e (B), respectivamente, RMSD dos sistemas Monastrol + Eg5 e do derivado dicumarol DC-03 + Eg5. As variações médias na estrutura principal foram 1,709 Å para Eg5 + Monastrol e 1,811 Å para Eg5 + DC-03 . (C) e (D), respectivamente, os RMSDs médios para os ligantes Monastrol e DC-03 no sítio de ligação da Eg5, os valores médios foram 0,351 Å e 0,383 Å.	111

Lista de Esquemas

Esquema 1. Exemplos de RMCs muito estudadas e seus núcleos base.	2
Esquema 2. Comparação entre uma rota sintética linear e uma rota RMC para obtenção de um produto em comum. As siglas GF representam grupos funcionais genéricos, assim como as formas geométricas representam estruturas genéricas.	4
Esquema 3. Reação geral de Biginelli. A reação atualmente considerada modelo consiste na condensação entre o acetoacetato de etila, benzaldeído e ureia.	5
Esquema 4. Comparação entre a proposta original da estrutura da DHPM e a estrutura corrigida posteriormente.	9
Esquema 5. Reação de Biginelli geralmente usada como modelo para os estudos.	10
Esquema 6. Rotas mecanísticas simplificadas, em catálise ácida, para a formação da DHPM comumente aceitas e debatidas na literatura.	11
Esquema 7. Exemplos de RMCs variantes de Biginelli com a variação dos compostos 1,3-dicarbonílicos.	14
Esquema 8. Exemplos de RMCs variantes de Biginelli com variação dos componentes ureia ou aldeído.	15
Esquema 9. Esquemas reacionais para a síntese da CPD , DPC , PCN e TCP	20
Esquema 10. Esquema geral para a síntese da CPD via RMC baseada nas condições descritas na literatura.	33
Esquema 11. Estruturas da síntese dos supostos adutos de CPDs indicados pela literatura científica.	37
Esquema 12. Representação dos mecanismos propostos para a reação de síntese da CPD-01 usando-se uma transformação multicomponente variante de Biginelli. Observa-se que o mecanismo da enamina é o mais improvável tendo a cumarina como um dos reagentes. Nota-se, também, que há um paralelo entre estes 3 mecanismos propostos da literatura e os 3 mecanismos debatidos para a reação de Biginelli.	43
Esquema 13. Condições reacionais utilizadas para tentar formar uma CPD cationicamente marcada. O produto formado não foi o produto esperado indicado no esquema.	49
Esquema 14. Condições experimentais para a RMC para síntese da DPC . Contudo, o produto formado não foi a DPC esperada.	51
Esquema 15. Condições reacionais para a síntese do dicumarol (DC-01).	53
Esquema 16. Em todas as condições testadas o produto formado foi o DC-01	71

Esquema 17. Representação dos mecanismos propostos para a reação de síntese da CPD com os subprodutos possíveis da reação. Os mecanismos da enamina não foi representado por não ser viável nas condições reacionais.	72
Esquema 18. Condições de síntese do DC-01 com a variação dos solventes.	74
Esquema 19. Tentativa de síntese da CPD-01 utilizando o <i>p</i> -cimeno como solvente. Contudo, o produto formado nessas sínteses foi o DC-01	76
Esquema 20. Reação para acompanhamento por HRMS para detecção da CPD	77
Esquema 21. Rota mecanísticas e seus intermediário observados no experimento de acompanhamento reacional por HRMS.	81
Esquema 22. Reação para monitoramento por HRMS para detecção da estrutura análoga à CPD	82
Esquema 23. Possíveis rotas mecanísticas e seus intermediários para a formação do produto análogo à CPD . Nesse esquema os subprodutos bisureída e análogo ao dicumarol foram omitidos, mas são produtos possíveis a partir dos intermediários de cada rota... ..	82
Esquema 24. Proposta de ciclo catalítico para a RMC entre a cumarina, ureia e o benzaldeído em meio ácido. Note que independente do caminho o equilíbrio leva para a formação do DC-01	85
Esquema 25. Tentativa de síntese da CPD-01 por meio de catálise básica.	86
Esquema 26. Metodologia de síntese da cromenoquinilina-6-ona. Referência 119.	87
Esquema 27. Condições reacionais testadas para tentar sintetizar a CPD-01	87
Esquema 28. Síntese da 4-aminocumarina. Note as condições drásticas para substituir a hidroxila por uma amina.	88
Esquema 29. Tentativa de síntese da CPD a partir da aminocumarina.	88
Esquema 30. Rota da enamina para a síntese da CPD-01 . O intermediário enamina está destacado, assim como a reação de ciclização para formar a CPD-01	89
Esquema 31. Condições reacionais para a síntese da tiocumarina com base na referência 120.	90
Esquema 32. Rota sintética para tentar sintetizar a tiocumarina baseada na referência 121.	91
Esquema 33. Rota sintética baseada na referência 122 para sintetizar a tiocumarina... ..	92
Esquema 34. Reação de hidrólise do Intermediário 2	92
Esquema 35. Reação testada baseada nas referências 123,124 para sintetizar a ureia-cumarina.	93

Esquema 36. Produtos detectados por HRMS da reação entre a 4-hidroxycumarina e ureia a 150 °C. (i) 4-aminocumarina. (ii) ureia-cumarina. (iii) guanidina-cumarina. (iv) carbamato-cumarina.	94
Esquema 37. Condições reacionais para a síntese da estrutura análoga à CPD-01	95
Esquema 38. Condições reacionais testadas para a síntese da TCP . Em todas as condições o produto formado foi o DC-01	97
Esquema 39. Reação de síntese da PCN utilizando ureia como catalisador.....	99
Esquema 40. Obtenção de produtos diferentes pela mudança do catalisador. Em catalisadores ácidos a DC-01 é formado e em catalisadores básicos a PCN é formado.	101
Esquema 41. Condições reacionais testadas para a síntese da TCC	103
Esquema 42. Síntese dos derivados de DC	104

Lista de Tabelas

Tabela 1. Solventes utilizados no estudo na RMC da CPD em conjunto com seus respectivos valores dos parâmetros de KT.	38
Tabela 2. Dados de rendimento calculado para a massa da CPD-01 em função do solvente e proporção dos reagentes.....	39
Tabela 3. Estimativas para as multiplicidades, integrais e deslocamentos químicos de um espectro de RMN de ^1H para a CPD-01	46
Tabela 4. Comparação entre os dados experimentais e teóricos das análises elementares CHN para as estruturas CPDs . Os valores destacados em vermelho são para enfatizar a diferença significativa ($\delta > 70\%$) entre os valores experimentais e teóricos.	47
Tabela 5. Artigos encontrados na base de dados do <i>SciFinder</i> sobre a síntese da CPD-01 e os PFs relatados para a estrutura. Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições e/ou os espectros de FTIR.....	60
Tabela 6. Artigos encontrados na base de dados do <i>SciFinder</i> sobre a síntese da CPD-01 . Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições e/ou os espectros de massas.....	64
Tabela 7. Artigos encontrados na base de dados do <i>SciFinder</i> sobre a síntese da CPD-01 . Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições para a análise CHN, a acurácia com relação aos valores esperados para a estrutura CPD-01	67
Tabela 8. Artigos encontrados na base de dados do <i>SciFinder</i> sobre a síntese da CPD-01 . Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições e/ou os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C	69
Tabela 9. Valores de rendimento na síntese da DC-01 em função do solvente utilizado na reação. Os solventes destacados em indicam os piores rendimentos, abaixo de 20%.	75
Tabela 10. Valores dos parâmetros de KT (α , β e π^*) para os solventes que induziram os piores rendimentos para a síntese do DC-01 . Note que o parâmetro α é igual a zero para a maior parte dos solventes.....	75
Tabela 11. Estruturas moleculares possíveis de serem detectadas no monitoramento por HRMS e suas respectivas massas exatas e adutos de sódio. Nos adutos sodiados ocorre a substituição de um átomo de hidrogênio por um átomo de sódio.	79

Lista de Anexos

Anexo 1. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-01 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-01 .	122
Anexo 2. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-02 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-02 .	123
Anexo 3. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-03 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-03 .	124
Anexo 4. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-04 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-04 .	125
Anexo 5. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-05 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-05 .	126
Anexo 6. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o PCN-01 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o PCN-01 .	127
Anexo 7. (A) RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) para o TCC-01 . (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) para o TCC-01 .	128
Anexo 8. Espectro de FTIR (KBr) do DC-01 .	129
Anexo 9. Espectro de FTIR (KBr) do DC-02 .	129
Anexo 10. Espectro de FTIR (KBr) do DC-03 .	130
Anexo 11. Espectro de FTIR (KBr) do DC-04 .	130
Anexo 12. Espectro de FTIR (KBr) do DC-05 .	131
Anexo 13. Espectro de FTIR (KBr) da PCN .	131
Anexo 14. Espectro de FTIR (KBr) do TCC .	132
Anexo 15. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-01 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-01 .	132
Anexo 16. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-02 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-02 .	133
Anexo 17. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-03 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-03 .	133
Anexo 18. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-04 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-04 .	134
Anexo 19. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-05 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-05 .	134

Anexo 20. (A) Espectro de ESI(+)-MS do PCN . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do PCN	135
Anexo 21. (A) Espectro de ESI(+)-MS do TCC . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do TCC	135
Anexo 22. (A) Espectro de ESI(+)-MS do Intermediário 2 . (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do Intermediário 2	136

Lista de Abreviações

APCI	Sigla em inglês para <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> . Ionização química a pressão atmosférica.
CPD	Cromenopirimidinona.
d	Dupleto.
Da	Daltons
DC	Dicumarol
DHPM	3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona.
DPC	Difenilpiranocumarinas.
ee	Excesso enantiomérico
EI	Ionização por impacto de elétrons
ESI	Sigla em inglês para <i>Electrospray Ionization</i> . Ionização por eletrospray.
FTIR	Sigla em inglês para: <i>Fourier Transform Infrared</i> . Espectrometria de absorção no infravermelho por transformada de Fourier.
h	Hora
HPW	Ácido fosfotúngstico
HRMS	Sigla em inglês para: <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> . Espectrometria de massas de alta resolução.
<i>J</i>	Constante de acoplamento.
KT	Kamlet-Tatf
MALDI	Sigla em inglês para <i>Matrix assisted laser desorption Ionization</i> . Dessorção/Ionização a laser assistida por matriz.
mg	Miligramas.
min	Minuto
ns	Nanosegundo
PCN	Pirano-cromeno-carbonitrila.
PF	Ponto de fusão.
RMC	Reação Multicomponente.
RMN	Ressonância magnética nuclear.
s	Simpleto.
SLS	Lauril sulfato de sódio

t	Tripleto.
TMS	Tetrametilsilano
δ	Deslocamento químico.

Introdução

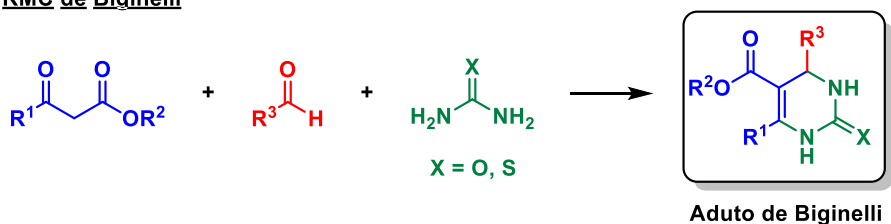
A química orgânica sintética é um ramo da química que tem como objetivo a criação e síntese de moléculas complexas por meio de reações químicas. Ao longo dos séculos, essa disciplina desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento de produtos químicos, fármacos e diversos materiais. Com o passar do tempo, começou a surgir uma crescente conscientização sobre a importância da sustentabilidade na química. O maior exemplo disso é o conceito da Química Verde,¹⁻³ que surge, com seus princípios, e traz uma maior sensibilização para os impactos ambientais gerados pela química, principalmente na área da química sintética, além de guiar o desenvolvimento e aplicação de metodologias de síntese cada vez mais ecologicamente corretos.

Nesse contexto, as Reações Multicomponentes (RMCs) se destacam como uma metodologia promissora para a síntese sustentável de moléculas orgânicas. As RMCs são consideradas ferramentas-chave na química sintética moderna, pois possibilitam a rápida e eficiente construção de bibliotecas complexas de compostos potencialmente bioativos.^{4,5} Além de sua versatilidade e eficiência, as RMCs têm ganhado destaque, pois apresentam diversas vantagens em relação a metodologias lineares,⁶ tais como: (i) redução de etapas de purificação, (ii) redução na produção de rejeitos, (iii) redução no consumo de reagentes e solventes, (iv) economia energética, (v) economia de átomos e (vi) criação de bibliotecas moleculares de compostos potencialmente bioativos.⁷ As RMCs são caracterizadas pela realização da síntese em um único recipiente, com a adição de três ou mais reagentes, sejam simultaneamente ou em sequência, produzindo um único produto. Embora a adição simultânea de todos os componentes da reação (reagentes, solventes e catalisador) em um único recipiente seja geralmente a opção mais vantajosa, essa condição nem sempre é possível de ser alcançada.⁸

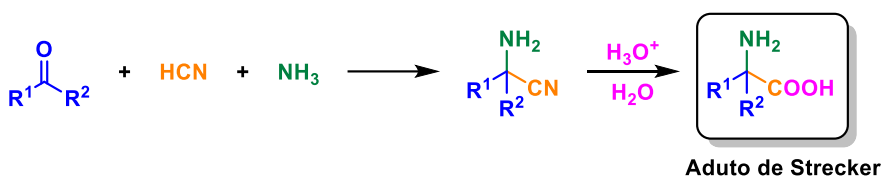
Uma das características mais interessantes das RMCs é a facilidade de criar bibliotecas de compostos, pois mudando apenas um dos reagentes ou suas proporções é possível obter a formação de novos adutos, de maneira rápida e eficiente. Por outro lado, uma das características distintivas das RMCs é a formação de adutos com um núcleo base, muitas vezes chamado de esqueleto molecular. Mesmo com a possibilidade de variação dos reagentes, os produtos resultantes apresentam o mesmo núcleo base, diferenciando-se apenas nas porções externas da estrutura. Essa particularidade pode ser vista, em alguns casos, como uma limitação e tem impulsionado o estudo e surgimento de RMCs

variantes.⁹ Para exemplificar, no Esquema 1 estão representados algumas das RMCs mais comuns e as estruturas base dos seus adutos.

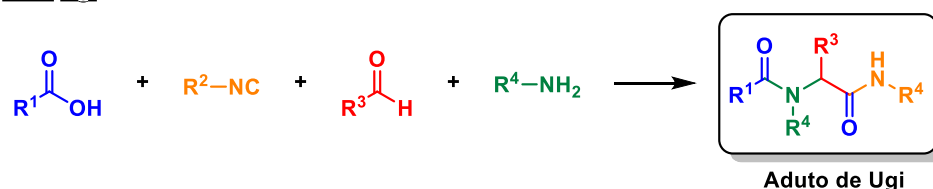
RMC de Biginelli



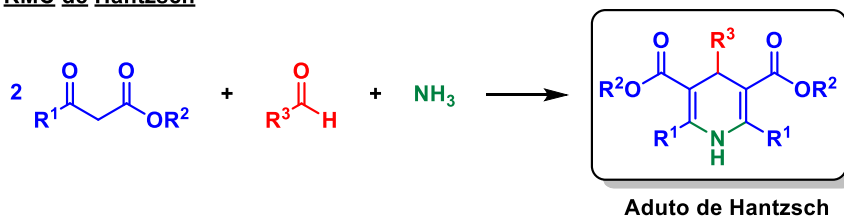
RMC de Strecker



RMC Ugi



RMC de Hantzsch



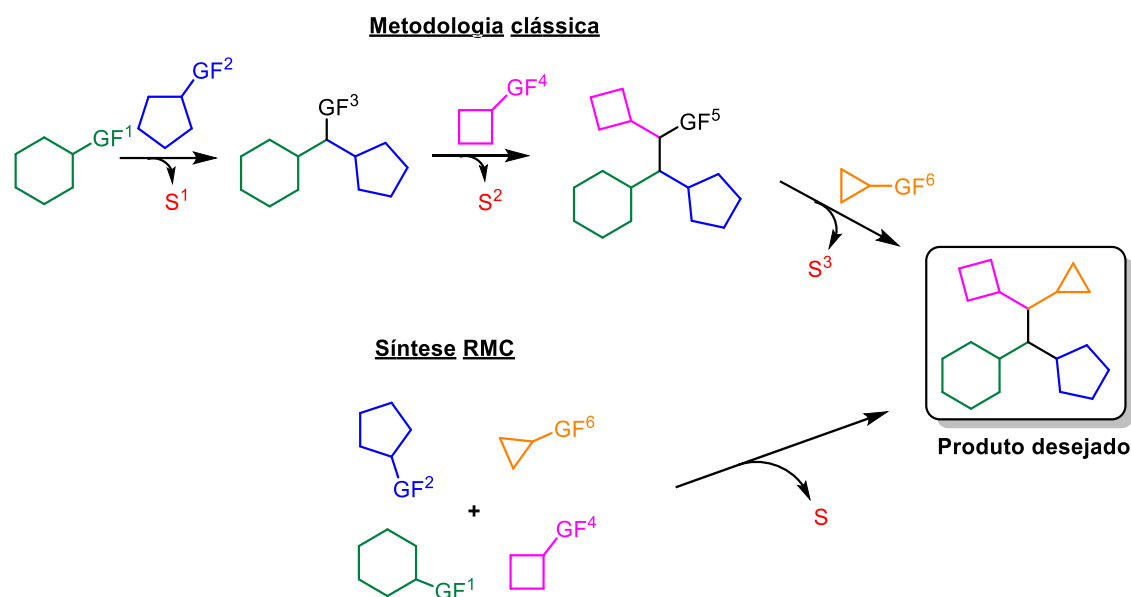
Esquema 1. Exemplos de RMCs muito estudadas e seus núcleos base.

Como mencionado anteriormente, as RMCs têm se mostrado extremamente promissoras na criação de bibliotecas moleculares e a equipe liderada por Alexander Dömling levou essa característica ao extremo.¹⁰ Ao invés de seguirem a metodologia padrão para criação de bibliotecas moleculares, que consiste: (i) na escolha de uma RMC, (ii) depois, otimização das condições reacionais e, por fim, (iii) a variação dos substratos, eles decidiram realizar a síntese, em paralelo, de 16 RMCs. Essas RMCs foram escolhidas pois são conhecidas por gerarem estruturas biologicamente ativas. Portanto, utilizando o equipamento Echo® 555 com 1536 poços, eles realizaram nada menos que 1536 reações simultaneamente. Embora nem todas as reações tenham produzido o produto esperado,

os resultados foram interessantes. Das 16 RMCs testadas, 12 funcionaram em mais de 50% das variações, demonstrando a robustez e eficiência dessas reações, entretanto 4 dessas RMCs não funcionaram conforme o esperado e em menos de 30% das variações houve a formação do produto desejado.

Essa abordagem inovadora permitiu à equipe obter uma quantidade massiva de dados, que foram analisados para obter informações valiosas sobre as limitações e a compatibilidade dos reagentes. Além disso, essa estratégia de síntese paralela economizou tempo e recursos, pois permitiu a realização de um número significativo de reações em um curto período. Os autores estimaram que com essa abordagem, para a tentativa de sintetizar os mesmos 1536 compostos, foram economizados centenas de quilos de reagentes, solventes e materiais para a purificação dos compostos. Todo esse avanço demonstra a facilidade na síntese de estruturas complexas e variadas por RMCs, além da fácil automatização.

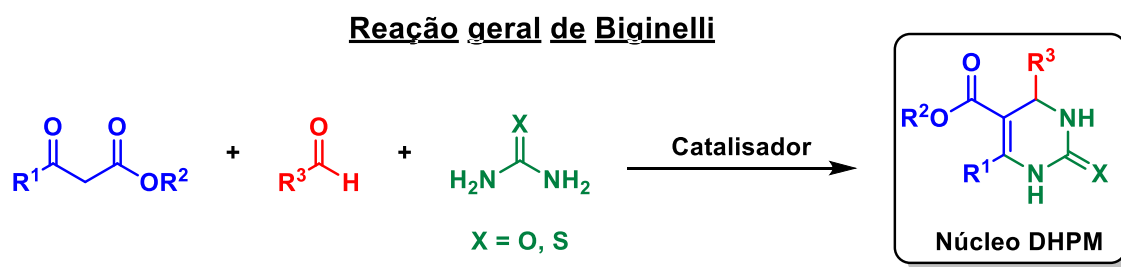
Outro importante aspecto das RMCs é que elas são consideradas reações convergentes. Isso significa que diferentes componentes reagem, sequencialmente ou simultaneamente, convergindo para a formação do produto desejado em uma única operação sintética.^{11,12} No Esquema 2, tem-se a comparação entre uma metodologia de síntese linear e outra multicomponente. A partir do esquema é possível notar que um dos maiores benefícios da metodologia RMC, em comparação à metodologia linear, vem do número de etapas sintéticas reduzido. Essa redução de etapas vai impactar diretamente no consumo de solventes e reagentes, no consumo de energia e tempo. Vale lembrar que, geralmente, em cada etapa de uma rota sintética o produto formado deve ser isolado e purificado para prosseguir com a síntese. Portanto, idealmente, quanto menos etapas maiores serão os benefícios.



Esquema 2. Comparação entre uma rota sintética linear e uma rota RMC para obtenção de um produto em comum. As siglas GF representam grupos funcionais genéricos, assim como as formas geométricas representam estruturas genéricas.

Dentre as RMCs mais populares (Strecker, Ugi, Passerini, Biginelli, Hantzsch, Mannich) a reação de Biginelli é uma das mais importantes e notáveis. Ela foi descrita por Pietro Biginelli, em uma série de quatro artigos preliminares,¹³⁻¹⁶ em 1891. Erroneamente, alguns autores atribuem a data de descoberta da reação ao ano de 1893, entretanto esse foi o ano em que ele publicou dois artigos completos sobre a sua obra.^{17,18}

A RMC modelo Biginelli, comumente empregada nos estudos sobre a reação, consiste na condensação de 3 reagentes principais, o acetoacetato de etila, benzaldeído e ureia sob condições de catálise ácida e refluxo de etanol (veja o Esquema 3), para formar o núcleo 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona (DHPM). Conforme apresentado no início desta introdução sobre a facilidade de se obter novas estruturas, mudando o aldeído aromático e/ou os grupos laterais do composto 1,3-dicarbonílico é possível obter uma vasta gama de novas estruturas com o núcleo DHPM. No Esquema 3, estão representados a reação modelo de Biginelli e os grupos passíveis de alteração para a síntese das DHPMs.



Esquema 3. Reação geral de Biginelli. A reação atualmente considerada modelo consiste na condensação entre o acetoacetato de etila, benzaldeído e ureia.

A reação de Biginelli, desde sua descoberta por Pietro Biginelli (1891), é uma das formas mais elegantes e diretas de se obter estruturas *N*-heterocíclicas,¹⁹ entretanto essa metodologia foi amplamente ignorada por mais de 70 anos. Somente entre 1970 e 1980 que o interesse da comunidade científica gradualmente foi aumentando, pois começaram a aparecer algumas evidências sobre as atividades farmacológicas das DHPMs. Em 1989²⁰ e em 1993,²¹ Kappe e colaboradores publicaram dois artigos de revisão sobre a metodologia. Essas publicações contribuíram para aumentar a visibilidade da reação, resultando em um expressivo aumento no número de publicações científicas e patentes relacionadas ao tema.²² Esse crescimento também foi impulsionado pelas comprovações, até então, recentes das diversas aplicações farmacológicas dos derivados das DHPMs.²²

Desse modo, ao longo do tempo, a reação de Biginelli tem despertado um interesse crescente, impulsionada pelas notáveis atividades biológicas das DHPMs. Essas substâncias têm demonstrado uma variedade de efeitos farmacológicos excepcionais, abrangendo desde propriedades antivirais, antibacterianas e anti-inflamatórias até atividades antifúngicas, modulação de canais de cálcio, antagonismo de receptores adrenérgicos, inibição da cinesina mitótica, entre outras.²³ Como forma de exemplificar, na Figura 1 estão expressas algumas estruturas DHPMs com atividades farmacológicas comprovadas.

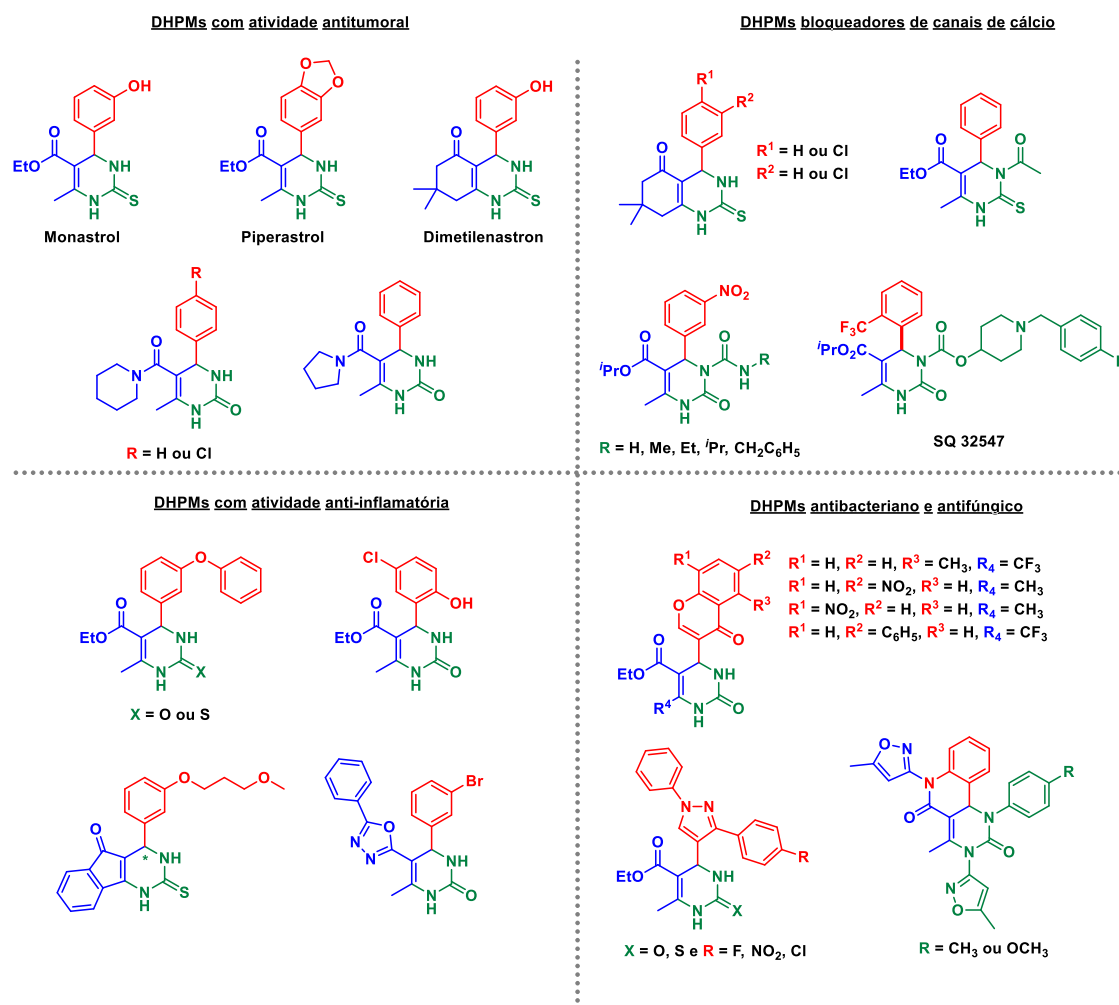


Figura 1. Exemplos de DHPMs com atividade farmacológica conhecida.²³

Dentre as diversas DHPMs com atividades farmacológicas, destaca-se uma em particular, o Monastrol (ver Figura 1). Em um estudo conduzido por Thomas U. Mayer e colaboradores, em 1999,²⁴ com células epiteliais renais (BS-C-1), essa DHPM mostrou-se relevante, sendo a única, dentre 16.320 moléculas testadas, que demonstrou permeabilidade celular, sem interferir na polimerização da tubulina e mesmo assim parava o processo de mitose da célula. A presença do Monastrol resultou na estagnação, de uma grande parcela das células tratadas, durante o processo de mitose, impedindo a conclusão do ciclo de divisão celular. Além disso, observou-se que 90% das células tratadas exibiam o fenótipo monoastral (Figura 2A), o que justifica o nome Monastrol.²⁴ Um fato importante deste estudo pioneiro foi o uso do Monastrol em sua forma racêmica. Estudos posteriores demonstraram que o isômero (*S*) é o enantiômero biologicamente

ativo. No entanto, a presença do isômero (*R*) não prejudicava a ação do Monastrol que pode ser utilizado em sua forma racêmica.²⁵

O fuso monoastral é caracterizado por um conjunto radial de microtúbulos cercados por um círculo de cromossomos.²⁶ Esse fenótipo é característico da mitose celular quando há alguma interferência em alguma parte do processo. Esse arranjo pode ser visto na Figura 2A, em células MCF-7 (células de câncer de mama) tratadas com o Monastrol. Na Figura 2B, que é o controle negativo, é visível a separação dos microtúbulos em 2 polos, característico da fase na anáfase na mitose, portanto comparando as duas células, fica evidente que o processo da mitose está afetado na célula tratada com o Monastrol. A tubulina (em verde) e os cromossomos (em azul) foram marcados pelo protocolo de imunofluorescência.

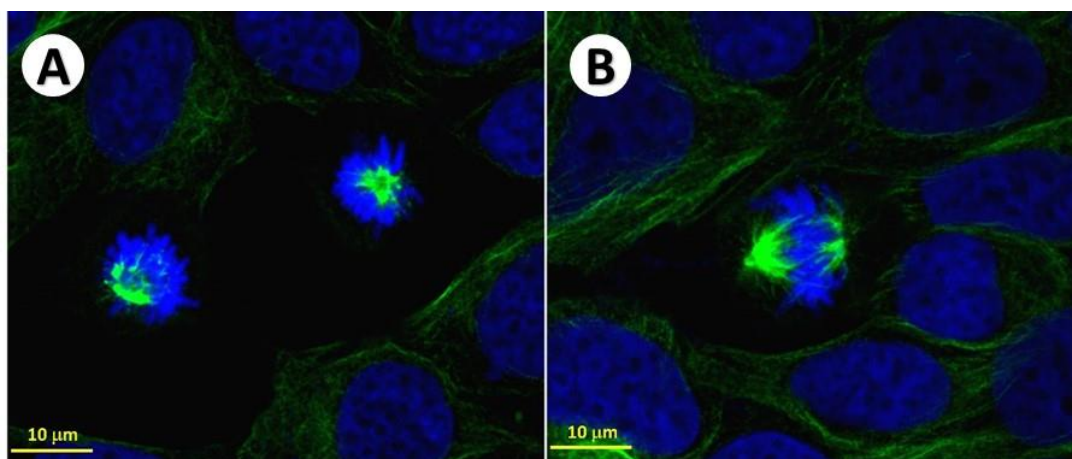


Figura 2. Fuso monoastral causado pelo tratamento com o Monastrol em MCF-7 (células de câncer de mama). Imunofluorescência: em verde a α -tubulina e em azul as cromatinas. (A) Tratamento com 68 μ M de Monastrol. (B) Controle negativo, tratamento com DMSO. Retirada da referência 27 com permissão da CC BY 4.0.

No estudo original,²⁴ a hipótese inicial era de que o Monastrol era um inibidor da proteína cinesina Eg5, uma das várias cinesinas da família das proteínas motoras do fuso mitótico, responsáveis por separar as cromátides irmãs e assim continuar o processo de mitose. Isso foi sugerido pelo fato de que tratamentos com anticorpos específicos para Eg5 induziam a formação de fusos monoastrais, semelhantes às células tratadas com o Monastrol.²⁸ Portanto, os pesquisadores decidiram testar os efeitos do Monastrol em outras proteínas motoras para averiguar a possível especificidade do Monastrol à proteína Eg5. Foi então constatado que essa DHPM não afetava essas proteínas e nem agia como

um inibidor geral dos motores proteicos. Esse resultado estava de acordo com a ação inibidora seletiva do Monastrol sobre a cinesina Eg5.

Essa descoberta foi de grande impacto, uma vez que, até então, apenas dois inibidores de cinesinas eram conhecidos, o 5'-adenil-imido-difosfato²⁹ e um produto natural marinho,³⁰ (para fins comparativos as estruturas estão apresentadas na Figura 3) que não eram permeáveis às células e afetavam múltiplas cinesinas. O Monastrol foi a primeira molécula pequena, com permeabilidade celular, que inibia a mitose sem ter como alvo a tubulina.²⁶ Dessa forma, o Monastrol se tornou um candidato promissor para o desenvolvimento de medicamentos antitumorais e uma ferramenta valiosa para a compreensão do funcionamento da proteína cinesina Eg5 além de outros processos relacionados à mitose.

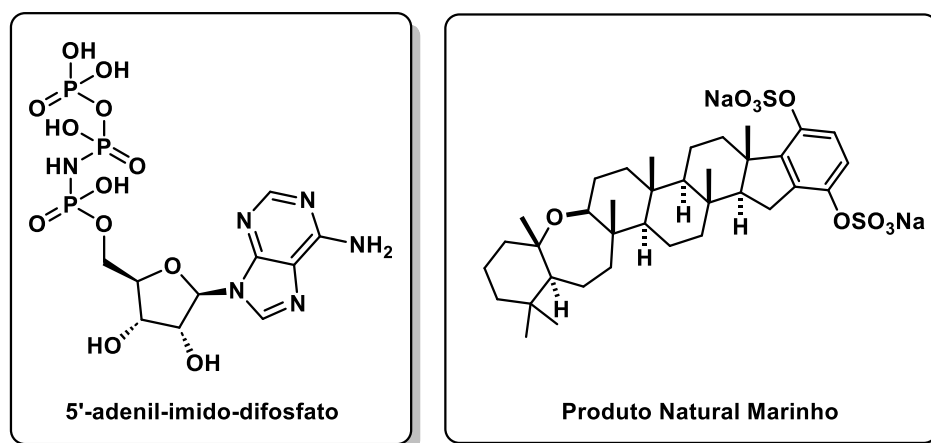
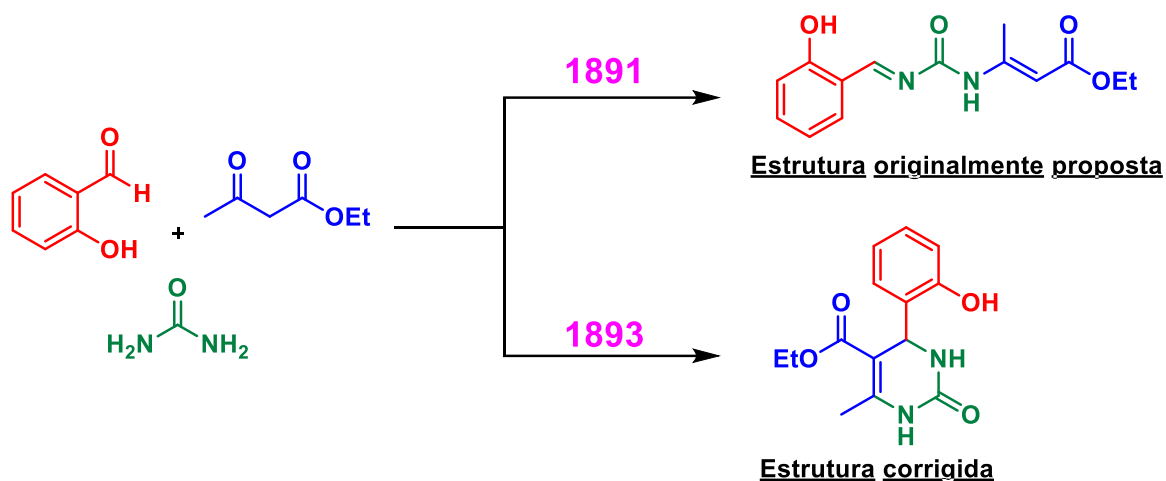


Figura 3. Estruturas moleculares dos primeiros inibidores de cinesinas.

A partir dessa descoberta a RMC de Biginelli ganhou uma alta notoriedade no meio científico, sendo essa uma metodologia barata, simples e direta de se produzir importantes estruturas com atividades biológicas, visando, principalmente, no tratamento de células tumorais.

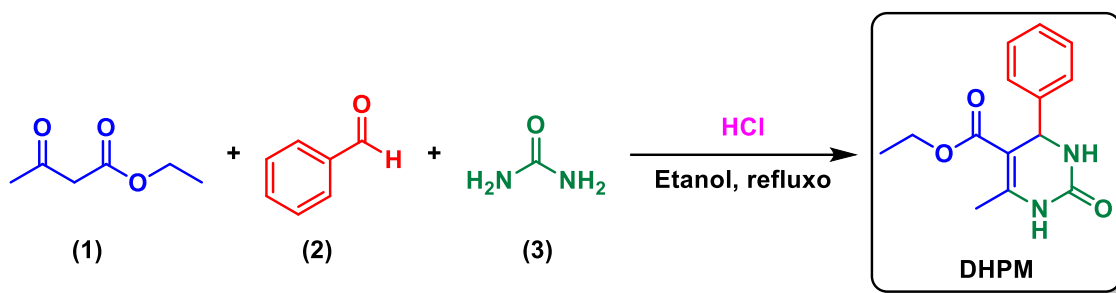
Apesar da inegável importância da reação de Biginelli, ela está cercada de contradições, mitos, controvérsias e discussões.³¹ Essa reação tem sido objeto de polêmicas desde o início de seu descobrimento. Um dos exemplos mais emblemáticos é o fato de Pietro Biginelli, ter proposto inicialmente uma estrutura incorreta para o produto formado.³¹ Quando Biginelli publicou pela primeira vez, nos artigos preliminares de

1891,¹³⁻¹⁶ seus estudos sobre a síntese das DHPMs, ele erroneamente propôs uma estrutura não cíclica para o produto formado, no entanto, nas publicações seguintes, em 1893,¹⁸ ele revisou a estrutura já com o *N*-heterociclo. No Esquema 4, está apresentada a comparação entre a estrutura proposta inicialmente e a estrutura corrigida posteriormente.



Esquema 4. Comparação entre a proposta original da estrutura da DHPM e a estrutura corrigida posteriormente.

Mais um importante aspecto da reação, que é fortemente discutido e ainda não há consenso sobre, são os possíveis mecanismos reacionais para a formação do aduto de Biginelli. As primeiras propostas mecanísticas foram feitas por Folker e Johnson, em 1933,³² no artigo publicado, eles mencionam duas rotas possíveis, a rota do imínio e a da enamina (serão explicadas em detalhes no próximo parágrafo). As propostas tiveram como base os intermediários isolados da reação. Com as evidências, eles concluíram que a reação começa com a condensação bimolecular entre a ureia e o benzaldeído ou acetoacetato de etila. Em seguida, um ou ambos desses intermediários reagem com o componente restante apropriado resultando na formação da DHPM por meio de uma reação de ciclização final. Todavia, na época, as técnicas de caracterização e análise das reações estavam em desenvolvimento e as suas conclusões foram importantes, mas não definitivas.



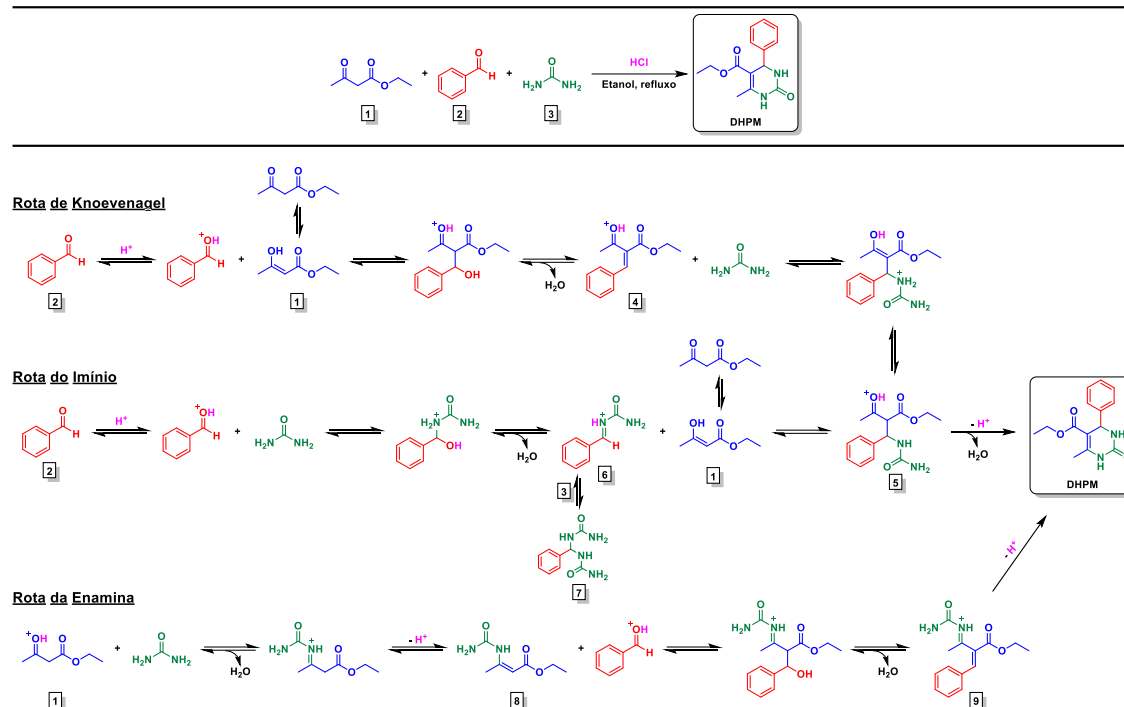
Esquema 5. Reação de Biginelli geralmente usada como modelo para os estudos.

Atualmente, com base em experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) e experimentos mecanísticos com espectrometria de massas, são considerados 3 rotas principais (apresentadas em detalhes no Esquema 6). (i) A rota de Knoevenagel, proposta inicialmente pelos pesquisadores Frederick. Sweet e John Fissekis em 1973.³³ (ii) A rota do imínio, proposta por Kappe em 1997³⁴ e (iii) a rota da enamina, confirmada só em 2007 por Capanec e colaboradores.³⁵ Para elucidar as rotas mencionadas, tem-se como base a reação modelo de Biginelli (vide Esquema 5), no qual os reagentes são o acetoacetato de etila (**1**), o benzaldeído (**2**) e a ureia (**3**) sob catálise ácida (HCl).

Inicialmente, temos a rota de Knoevenagel, nessa rota o primeiro passo é a condensação entre **1** e ao benzaldeído (**2**), formando o intermediário **4** (intermediário chave da rota de Knoevenagel), seguido pela adição nucleofílica do tipo Michael da ureia ao intermediário **4**, formando o intermediário avançado **5**, que por sua vez, passa por uma adição intramolecular com eliminação de água, ciclizando a estrutura e formando a DHPM.

Já para a rota do imínio, a primeira etapa consiste na adição nucleofílica da ureia (**3**) no benzaldeído protonado (**2**), eliminando água e formando o intermediário imínio (**6**). A partir desse intermediário, podem ocorrer dois eventos, a adição de **1**, que levará ao intermediário avançado **5** e posteriormente à DHPM ou uma segunda adição de outra molécula de **3**, a qual levará à formação do subproduto **7**.

Por fim, o mecanismo da enamina consiste, primeiramente, na adição de **3** em **1**, eliminando água e formando o intermediário enamina **8**, que, por sua vez, se adiciona com **2** para formar o intermediário avançado **9**, no qual, posteriormente, ocorre uma adição de Michael intramolecular, ciclizando a estrutura e formando a DHPM.



Esquema 6. Rotas mecânicas simplificadas, em catálise ácida, para a formação da DHPM comumente aceitas e debatidas na literatura.

Atualmente, sabe-se que essas vias mecânicas são inteiramente dependentes das condições reacionais. Elas podem ser favorecidas ou desfavorecidas, dependendo do catalisador utilizado, da temperatura, do solvente ou da estequiometria dos reagentes.^{19,31}

Como exemplo, o trabalho publicado por Capanec e seu grupo demonstrou que a RMC de Biginelli passa exclusivamente pelo mecanismo da enamina quando catalisada por SbCl_3 (um ácido forte de Lewis) em acetonitrila anidra.³⁵ O mesmo resultado foi obtido por Litvic e colaboradores, quando eles usaram 10 mol% do catalisador $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{BF}_4)_3$.³⁶

Por outro lado, no artigo publicado pelo grupo de pesquisa liderado por Neto,³⁷ foram utilizados líquidos iônicos como solventes, e foi observado que o mecanismo do imínio é fortemente favorecido. O estudo mecânico foi realizado por meio de espectrometria de massa de alta resolução, e apenas o intermediário imínio e seus derivados foram detectados. A explicação para esse favorecimento reside na interação de pares iônicos entre a parte aniônica do líquido iônico e o intermediário imínio. Portanto, fica evidente que as condições reacionais têm uma influência direta no mecanismo envolvido na transformação.

Outro aspecto interessante a ser discutido é o impacto do solvente RMCs. Embora muitos estudos tenham observado que a variação do solvente influencia nos rendimentos das reações, poucos quantificam esse efeito. Até o momento, apenas quatro trabalhos forneceram uma quantificação explícita do efeito do solvente nas RMCs.^{31,38-40}

A avaliação desse efeito pode ser conduzida por meio dos parâmetros propostos pelos pesquisadores Mortimer J. Kamlet, José Luis Abboud e Robert W. Taft, conhecidos como parâmetros de Kamlet-Abboud-Taft ou parâmetros de Kamlet-Taft (KT). Os descritores apresentados por eles são: α , β e π^* . Cada solvente possui valores específicos associados a esses parâmetros, os quais foram detalhadamente discutidos em uma série de quatro artigos⁴¹⁻⁴⁴ e serão brevemente apresentados neste trabalho.

Os parâmetros KT têm as seguintes interpretações: (i) o parâmetro α reflete a capacidade do solvente em doar ligações de hidrogênio para o soluto, sendo correlacionado à acidez do solvente. Quanto maior o valor de α , maior a capacidade do solvente em estabelecer (doando) uma ou múltiplas ligações de hidrogênio para o soluto. (ii) O parâmetro β está associado a basicidade do solvente, indicando sua capacidade de doar pares de elétrons ou aceitar ligações de hidrogênio. Por fim, (iii) o descritor π^* refere-se à polaridade/polarizabilidade do solvente, representando sua capacidade de estabilizar cargas ou dipolos de reagentes ou intermediários.

Para a construção da escala e determinação dos parâmetros de KT para cada solvente são utilizados indicadores solvatocrômicos. Alguns exemplos são: o 4-nitroanisol para determinação do parâmetro π^* , o iodeto de 4-carbometoxi-1-etilpiridínio para determinação do parâmetro α , e os indicadores 4-nitrofenol e 4-nitroanilina para determinação do parâmetro β . As estruturas desses indicadores estão ilustradas na Figura 4.

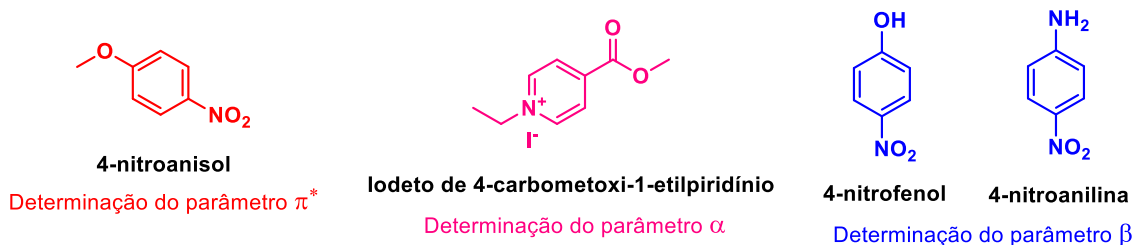


Figura 4. Estrutura dos indicadores solvatocrômicos utilizados para determinação dos parâmetros de KT dos solventes.

De acordo com a abordagem proposta de Jessop e sua equipe,⁴⁵ o parâmetro π^* pode ser determinado por meio do comprimento de onda máximo de absorção (λ) no UV-Vis do corante 4-nitroanisol. Esse descritor pode ser calculado aplicando a Equação 1.

$$\pi^* = 14,75 - \frac{4270}{\lambda_{m\acute{a}x}} \quad (1)$$

Para calcular o parâmetro α , estabeleceu-se que, para hidrocarbonetos, éteres, ésteres, aminas terciárias e *N,N*-amidas dissustituídas, o valor padrão é 0,00. No entanto, uma alternativa é usar o corante iodeto de 4-carbometoxi-1-etilpiridínio, conforme indicado na Equação 2. Note que para a determinação do parâmetro α é necessário determinar o π^* previamente.

$$\alpha = \left(\frac{1386,66}{\lambda_{m\acute{a}x}} \right) - 2,75 - 0,46\pi^* \quad (2)$$

Por fim, o parâmetro β pode ser calculando a partir da média dos resultados das Equações 3 e 4. Cada equação utiliza indicadores diferentes, sendo a 4-nitroanilina e o 4-nitrofenol exemplos comuns de sondas empregadas nesse processo. Na Equação 4, inclui-se o termo δ que é uma correção numérica para a polarizabilidade dos solventes. Os valores possíveis para δ são os seguintes: (i) 1,0 para solventes aromáticos; (ii) 0,5 para solventes (poli)clorados alifáticos; e (iii) 0,0 para solventes alifáticos.

$$\beta = 11,134 - \frac{3580}{\lambda_{m\acute{a}x}} - 1,125\pi^* \quad (3)$$

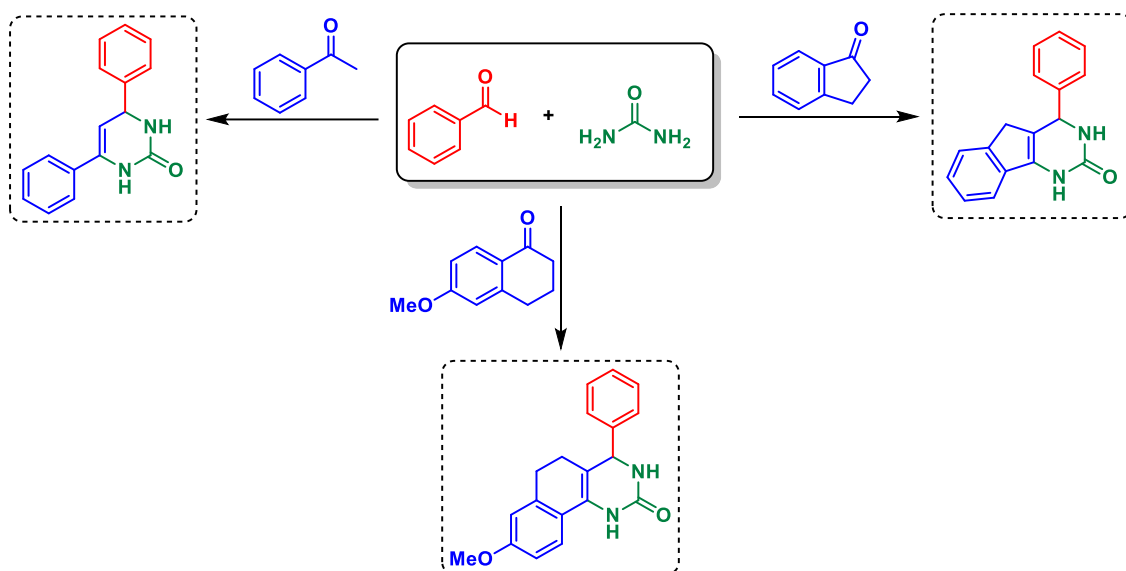
$$\beta = 12,126 - \frac{3460}{\lambda_{m\acute{a}x}} - 0,57\pi^* - 0,12\delta \quad (4)$$

A análise desses parâmetros possibilita uma racionalização acerca dos solventes que, em princípio, são propensos a favorecer uma reação química específica, além de permitir inferências mecanísticas sobre a transformação em questão. Essa abordagem torna plausível a inferência de rotas mecanísticas ao medir quantitativamente o efeito do solvente sobre os reagentes, intermediários e produtos envolvidos em uma dada reação.

Diante da expressividade e versatilidade da reação de Biginelli, assim como as propriedades biológicas do núcleo DHPM, começaram a surgir reações variantes de Biginelli, sendo que, a maioria dessas variantes visam diversificar estruturalmente o núcleo base das DHPMs, o que possibilita desenvolver novos adutos biologicamente ativos.

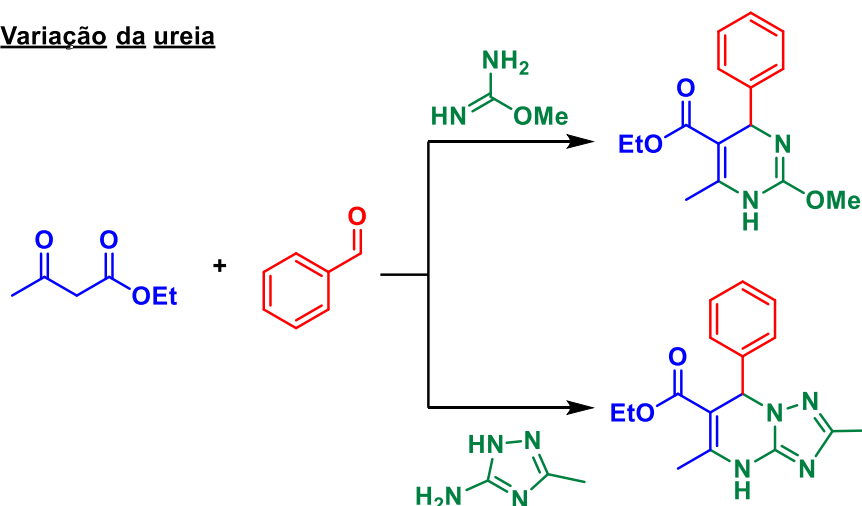
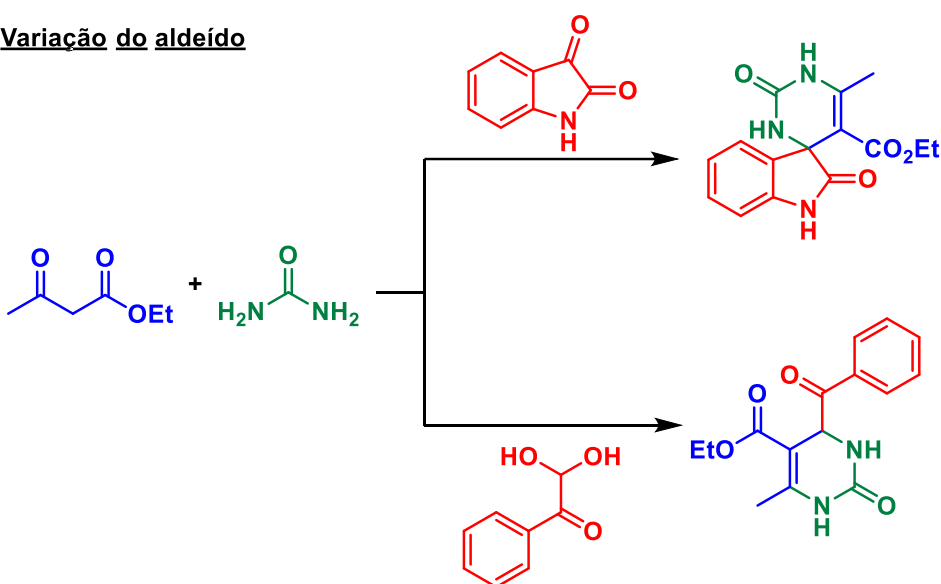
Uma reação variante de Biginelli pode ser caracterizada pela mudança de um ou mais componentes base da reação modelo (apresentada no Esquema 5). Por exemplo, alterando o componente acetoacetato de etila por algum outro componente diferente dos compostos 1,3-dicarbonílicos, conforme ilustrado no Esquema 7 abaixo. Essas modificações permitem a obtenção de moléculas com diferentes estruturas e propriedades físico-químicas e biológicas.⁹

Varição do componente 1,3-dicarbonílico



Esquema 7. Exemplos de RMCs variantes de Biginelli com a variação dos compostos 1,3-dicarbonílicos.

Além da modificação do acetoacetato de etila, as RMCs variantes de Biginelli também permitem a alteração da ureia e do aldeído utilizados na reação. Por exemplo, em vez de ureia, pode-se utilizar outros compostos nitrogenados, como a guanidina. Da mesma forma, o aldeído pode ser. Até mesmo isatinas podem ser substituintes do aldeído, formando uma estrutura DHPM espiro, conforme demonstrado no Esquema 8 abaixo.⁴⁶

Variação da ureia**Variação do aldeído**

Esquema 8. Exemplos de RMCs variantes de Biginelli com variação dos componentes ureia ou aldeído.

Essa versatilidade nas RMCs variantes de Biginelli oferece uma abordagem altamente modular e customizável para a síntese de moléculas orgânicas. Ao modificar a ureia e o aldeído utilizados na reação, é possível explorar diferentes grupos funcionais, o núcleo base e as características estruturais, visando a obtenção de compostos com propriedades específicas desejadas para diversas aplicações. Na Figura 5 estão ilustradas alguns adutos de reações variantes de Biginelli com aplicações farmacológicas.

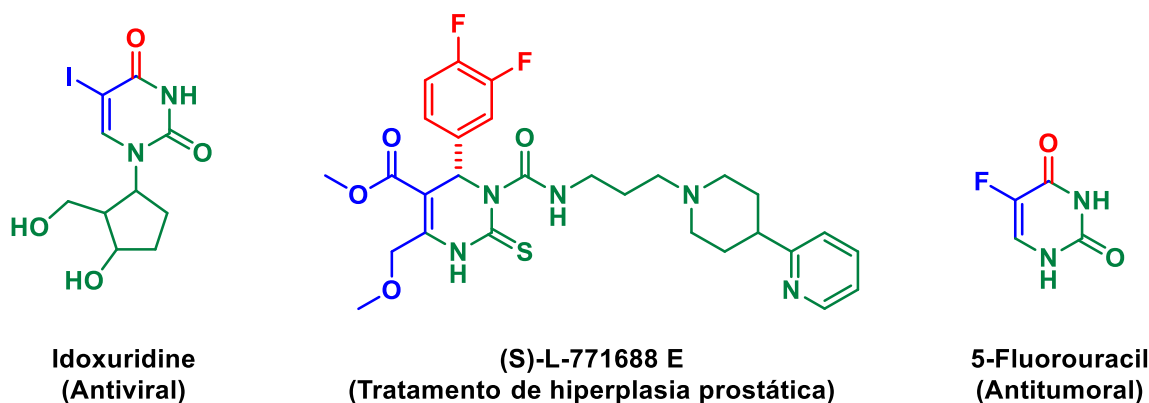


Figura 5. Exemplos de alguns adutos de RMCs variantes de Biginelli com atividades farmacológicas.

Como mencionado anteriormente, a RMC de Biginelli, as variantes de Biginelli e demais RMCs (Ugi, Strecker, Mannich etc.) desempenham um papel relevante e de extrema importância na comunidade científica, o que tem impulsionado o crescimento acelerado dessa área ao longo dos anos. Contudo, esse rápido desenvolvimento também tem sido acompanhado por alguns desafios significativos.

Entretanto, à medida que as RMCs ganham destaque, também surgem alguns problemas cruciais. Por exemplo, tem havido um aumento significativo no número de artigos de RMCs retratados, especialmente devido a atribuições estruturais incorretas e questões de reprodutibilidade, como rendimentos e seletividades.⁴ Essas questões representam desafios significativos para a validade e confiabilidade dos resultados alcançados nessa área tão promissora.

A maior fonte dos problemas citados está relacionada com a caracterização simplória dos produtos sintetizados. Em muitas publicações na área os produtos são caracterizados apenas pela comparação entre pontos de fusão (PF) descritos na literatura.⁴ Faltam espectros de RMN e/ou espectros de massa de alta resolução, técnicas fundamentais para a atribuição correta das estruturas moleculares dos compostos sintetizados. Sem estas técnicas, a chance de publicarem artigos com estruturas equivocadas aumentam.

A respeito das medidas de PF, de fato, são muito importantes e úteis para indicar a pureza de um composto e, em certa medida, para caracterizar sua estrutura quando se dispõe de PFs confiáveis descritos na literatura. No entanto, é essencial salientar que essa caracterização físico-química não é totalmente conclusiva, uma vez que é possível que

muitos compostos com estruturas consideravelmente distintas apresentem PFs semelhantes ou que diferentes PFs sejam observados para a mesma estrutura. Por exemplo, no caso de um aduto de Biginelli, foram observados vários PFs para as DHPMs, com variação de até 20 °C. Essa disparidade não é exclusiva da reação multicomponente de Biginelli, pois em diversas outras RMCs, os produtos principais podem exibir valores de PF discrepantes. Essa questão foi abordada e discutida em um artigo de revisão recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa.⁴

O artigo⁴ relata uma pesquisa realizada na base de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics) usando a palavra-chave “*multicomponent* reaction**” no título, no período de 2018 a 2022, resultando em 592 artigos. Dentre esses, aproximadamente 7% (39 artigos) apresentaram falta de caracterizações adequadas, limitando-se a fornecer apenas medidas de ponto de fusão (PF) e/ou descrições de espectros sem apresentá-los de forma adequada. Em uma pesquisa mais aprofundada, focada no ano de 2019, utilizando a mesma palavra-chave, mas desta vez como tópico, foram encontrados 913 artigos, dos quais aproximadamente 10% (91 artigos) apresentaram o mesmo problema. Também foi realizada uma análise em relação à “qualidade” das revistas. As revistas são classificadas em quartis (Q), sendo o Q1 representando as 25% mais influentes e o Q2 incluindo as revistas entre os 25% e 50% mais influentes, assim por diante. Essa classificação é baseada no fator de impacto das revistas, o que significa que as revistas mais renomadas são classificadas em quartis mais baixos. Essa análise foi conduzida para determinar se o problema estava restrito a revistas menos impactantes ou renomadas, porém esse não é o caso, conforme ilustrado na Figura 6. Por exemplo, na pesquisa realizada entre os anos de 2018 e 2022, aproximadamente 31% das publicações problemáticas foram encontradas em revistas conceituadas.

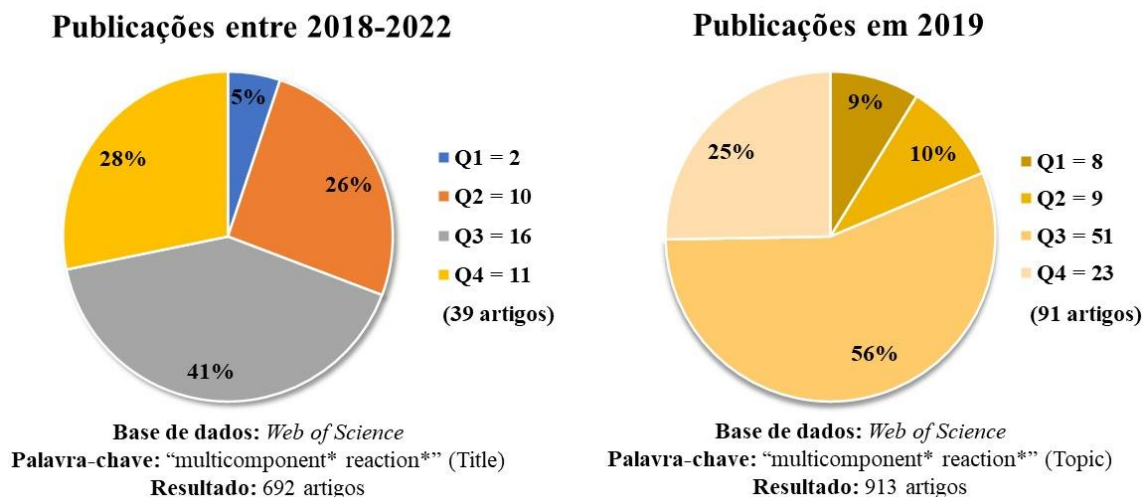


Figura 6. Resultados referente as buscas realizadas na base de dados *Web of Science* para a palavra-chave: ““*multicomponent* reaction**””, como título para os anos entre 2018 e 2022 e como tópico para o ano de 2019. Adaptada da referência 4.

Esses resultados destacam a preocupante falta de caracterizações apropriadas, em porcentagens significativas, de estudos envolvendo RMCs. A falta de uma caracterização completa dos compostos sintetizados pode comprometer a compreensão, a validação e a veracidade dos resultados obtidos. É essencial que os pesquisadores adotem uma abordagem mais abrangente e rigorosa ao relatar seus estudos. Isso garantirá a transparência, a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados, promovendo avanços sólidos na área.

Nesse contexto, embora as RMCs sejam consideradas uma metodologia extremamente promissora dentro do campo da Química Verde e sustentável, e sejam uma abordagem simples para a obtenção de estruturas complexas, diversificadas, com potencial atividade farmacológica e alto valor agregado, é importante ressaltar que algumas das RMCs descritas podem não ser totalmente confiáveis ou verdadeiras.

Considerando esses aspectos, foram selecionadas algumas RMCS variantes de Biginelli que apresentaram produtos com relatos de atividades biológicas atraentes. Uma dessas reações é a síntese das cromenopirimidinonas (**CPDs**). Estruturas derivadas de cumarinas são conhecidas por apresentarem uma ampla variedade de efeitos biológicos,⁴⁷ como atividades anticoagulantes,⁴⁸ anti-inflamatórias,⁴⁸ antioxidantes,^{49,50} antitumorais,⁵¹ entre outros. Na Figura 7 estão representados alguns dos exemplos de drogas comerciais baseadas em cumarinas. Sendo a **CPD** uma estrutura derivada da cumarina, é esperado

encontrar alguma atividade biológica relevante. De fato, existem artigos publicados sobre as **CPDs** que demonstram atividades antitumorais⁵² e bactericidas.⁵³

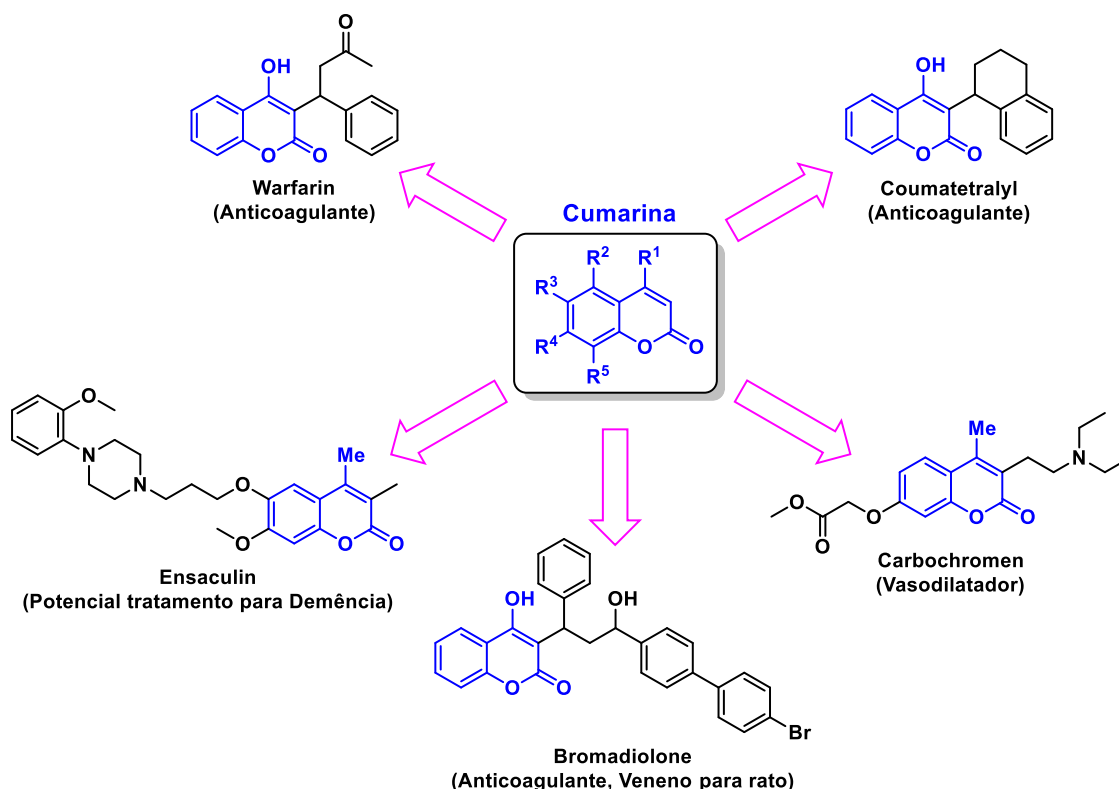
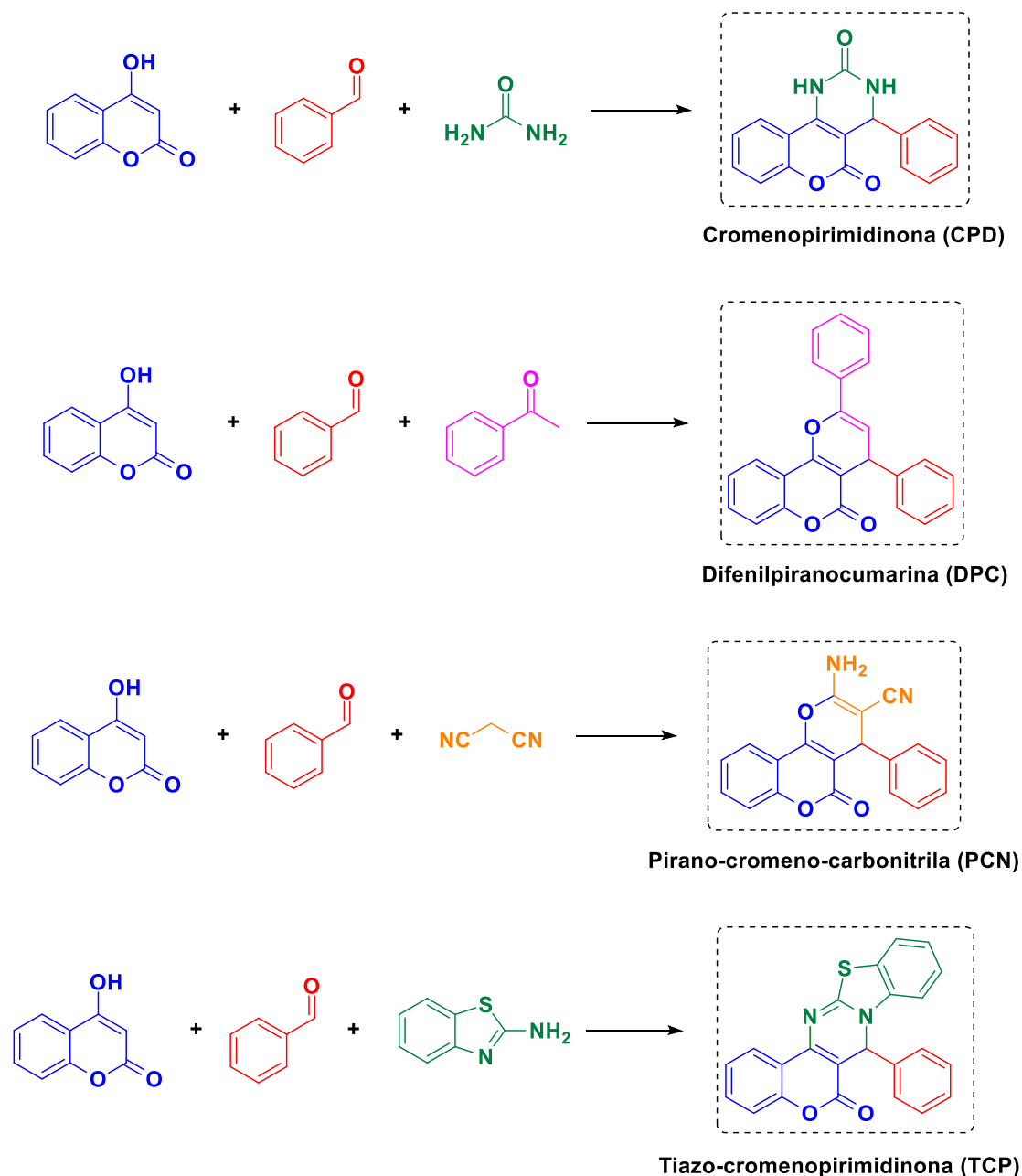


Figura 7. Estruturas derivadas de cumarinas com atividades biológicas comprovadas.

No entanto, é importante destacar que a maioria dos artigos publicados sobre a síntese das **CPDs** (vide Esquema 9) apresenta limitações no que diz respeito à caracterização adequada dos compostos. Os dados disponíveis apresentam discrepâncias entre os artigos, além da ausência de espectros de RMN e/ou espectros de massas. Por exemplo, para a mesma estrutura molecular (4-fenil-3,4-dihidro-2H-cromeno[4,3-d]pirimidina-2,5(1H)-diona), foram encontradas faixas de PFs que variam de 160-162 °C,^{54,55} 211-213 °C⁵⁶ até 265-267 °C.⁵⁷ Essas diferenças significativas nos PFs (variação de até 107 °C) não são explicadas em nenhuma publicação, levantando dúvidas sobre a confiabilidade dos dados apresentados por esses estudos.

Da mesma forma, essas características são observadas nas RMCs variantes de Biginelli para a síntese de difenilpiranocumarinas (**DPC**), pirano-cromeno-carbonitrilas (**PCN**) e tiazol-cromeno-pirimidinona (**TCP**) nas quais são relatadas diversas, porém os

dados referentes à caracterização desses compostos são conflitantes. Em vista disso, essas RMCs representam alvos ideais para um estudo minucioso.



Esquema 9. Esquemas reacionais para a síntese da CPD, DPC, PCN e TCP.

Embora as RMCs tenham demonstrado produtos com relatos de atividades biológicas interessantes, é crucial adotar cautela devido às limitações encontradas na caracterização adequada desses compostos. As discrepâncias nos pontos de fusão e a falta de espectros de RMN e espectros de massas suscitam questionamentos sobre a validade dos resultados obtidos. Portanto, é essencial realizar estudos aprofundados nessas RMCs,

aprimorar os métodos de caracterização e investigar mais detalhadamente os produtos obtidos, a fim de garantir a confiabilidade dos artigos científicos e, o mais importante, a relevância biológica desses compostos.

Objetivos

Objetivo geral:

O objetivo desta dissertação foi analisar o efeito de solvente em RMCs variantes de Biginelli que apresentam divergências nos dados relatados na literatura, com o propósito de investigar as causas dessas discrepâncias e, se necessário, corrigir os possíveis erros publicados. O estudo buscou compreender as razões por trás das diferenças observadas e fornecer uma análise crítica dos resultados obtidos, contribuindo para o avanço do conhecimento e aprimoramento da confiabilidade das informações na área das RMCs.

Objetivos específicos:

- Estudar o efeito de solvente em RMCs variantes de Biginelli
- Otimizar as condições reacionais dessas RMCs
- Confirmar as atribuições estruturais dos adutos reportados na literatura utilizando as técnicas apropriadas como FTIR, ^1H e ^{13}C RMN e HRMS;
- Verificar rotas mecanísticas operantes na RMC variante de Biginelli;
- Sintetizar adutos das RMCs estudadas;
- Avaliar a atividade biológica dos compostos.

Parte Experimental

Materiais e Métodos

Medida de ponto de fusão (PF)

Os pontos de fusão foram medidos em um equipamento Thomas Hoover da marca Unimelt. A taxa de aquecimento para as análises foi de 1 °C min⁻¹.

Espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho foram adquiridos no equipamento Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier da marca Varian, modelo 640. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e a faixa de número de onda analisada foi de 4000 até 400 cm⁻¹.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (¹H) e carbono (¹³C) foram registrados em espectrômetro Bruker com sonda de diâmetro interno de 5 mm. A frequência de operação para ¹H é de 600 MHz ou 300MHz e para ¹³C é de 150 MHz ou 75 MHz. Os deslocamentos químicos são expressos em δ (ppm). As amostras foram preparadas com aproximadamente 20 mg em DMSO-*d*₆ ou CDCl₃ como o padrão TMS ($\delta = 0,00$ ppm). A constante de acoplamento é definida por *J* e os padrões de acoplamento são definidos por: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), m (multiplete), dd (duplo duplete), dt (duplo triplete).

Análise elementar (CHN)

A análise elementar (CHN) foi conduzida utilizando cerca de 2 mg de cada amostra, as quais foram processadas em um analisador modelo 2400 Series II CHNS/O. A combustão completa dos analitos ocorreu a uma temperatura de 925 °C, em uma atmosfera oxidante composta por oxigênio (O₂).

Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

As análises de espectrometria de massas ESI(+)-MS(/MS) foram realizadas no equipamento AB Sciex TripleTOF 5600+, fonte de ionização electrospray (ESI), analisador quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF). Para injeção no equipamento, as amostras puras foram diluídas até a concentração de 10^{-4} mol L⁻¹ em água ou metanol com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. Para o acompanhamento das reações, com ou sem os reagentes cationicamente marcados, 1 µL da reação foi diluída em 1 mL de água ou metanol. A janela de massa analisada foi de m/z 50 até m/z 1000. Temperatura da fonte de ionização de 450 °C e voltagem do campo de 5500 V.

Condições experimentais nas tentativas de síntese de derivados CPDs

Para a investigação da síntese da **CPD** foram reproduzidas algumas condições experimentais reportadas em alguns artigos. Já as metodologias novas testadas estão indicadas com “este trabalho”.

Vale ressaltar que em nenhuma reação foi detectada a formação da **CPD**, apenas foi formado o dicumarol (**DC**).

Condição 1:⁵⁸ Em um tubo de ensaio, foram adicionadas proporções equimolares de 4-hidroxicumarina (1 mmol), benzaldeído (1 mmol) e ureia (1 mmol). Adicionou-se 10 mol% de L-prolina (11 mg) como catalisador e 1 mL de água como solvente. A mistura foi irradiada com micro-ondas (150 W) e mantida a 70 °C por 10 minutos. Após a conclusão da reação, o sólido formado foi filtrado, lavado com EtOH/H₂O (1:1, v/v), seco e recristalizado em etanol. Rendimento isolado de 59% (**DC-01**).

Condição 2:⁵⁹ Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 4-hidroxicumarina (1 mmol), benzaldeído (1 mmol), ureia (1 mmol), 10 mol% de laurilsulfato de sódio (SLS) (30 mg) e 5 mL de água. A mistura foi agitada por 5 h a 25 °C. O precipitado foi filtrado, lavado com EtOH/H₂O (1:1, v/v), seco e recristalizado em etanol. Rendimento isolado de 34% (**DC-01**).

Condição 3:⁶⁰ 4-hidroxicumarina (1 mmol), benzaldeído (1 mmol), ureia (1 mmol), 20 mol% de laurilsulfato de sódio (SLS) (60 mg), 2 gotas de ácido acético concentrado e 10 mL de água foram adicionados em um frasco Schlenk. A mistura de reação foi mantida a 100 °C por 6 h. Ao final do tempo, a reação foi resfriada à temperatura ambiente e o

sólido precipitado foi filtrado, lavado com água quente (30 mL, 80°C) e 5 mL de etanol. Em seguida, o sólido foi seco e lavado com etanol quente. Rendimento isolado: 51% (**DC-01**).

Condição 4 (este trabalho): Em um tubo Schlenk, foram adicionados 1 mmol dos seguintes reagentes: 4-hidroxycumarina, benzaldeído, ureia e 5 mol% de catalisador superácido (MSI)₃PW (0,17 g). Para fins de estudo do efeito do solvente, foram utilizados diferentes solventes em diferentes reações, sendo adicionados 1 mL de cada um dos seguintes solventes: água, etanol, metanol, acetato de etila, *tert*-butanol, acetonitrila, hexano, THF, dioxano, trietilamina, ciclo-hexano, octanol, 2,2,2-trifluoroetan-1-ol, acetona, clorofórmio, BMI.PF₆, BMI.BF₄, BMI.NTf₂, diclorometano, tolueno, *p*-cimeno, limoneno e sem solvente. A reação foi mantida por 1 h a 80 °C. Após a conclusão da reação, o precipitado foi filtrado, lavado com água quente e depois etanol, seco e recristalizado em etanol.

Metodologia de síntese do Dicumarol (DC)

Em um tubo de Schlenk selado, foram adicionados 2 mmol de 4-hidroxycumarina, 1 mmol de aldeído, 5 mol% de catalisador (MSI)₃PW e 1 mL de água como solvente, a 80 °C por 1 h. Após a conclusão da reação, o precipitado foi filtrado e lavado com uma solução quente de EtOH/H₂O (1:1, v/v). Em seguida, após a secagem, o produto desejado foi recristalizado em etanol para obter o produto puro. Rendimento do produto isolado de 89%.

3,3'-(Fenilmetileno)bis(4-hidroxi-2H-cromen-2-ona) - (DC-01): Rendimento 403 mg (88%) e 2,5 g (93%, para síntese multigrama); Sólido branco; PF 230-231 °C; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,92 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,60 (t, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,33 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,24 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,17 – 7,14 (m, 3H), 6,39 (s, 1H); ¹³C{¹H} RMN (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 165,1, 164,9, 152,2, 139,7, 132,0, 128,1, 126,7, 125,7, 123,9, 123,8, 118,0, 116,0, 104,2, 36,0; FTIR (cm⁻¹) 3446, 3068, 2736, 2615, 1660, 1616, 1604, 1567, 1495, 1450, 1346, 1299, 1182, 1093, 759; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calculado para [C₂₅H₁₆O₆ + H]⁺, 413,1020, encontrado, 413,1019.

3,3'-((4-Metoxifenil)metileno)bis(4-hidroxi-2H-cromen-2-ona) - (DC-02):

Rendimento 267 mg (89%); Sólido brando; PF 247-248 °C, RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,92 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,60 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,39 (dd, $J = 7,9, 2,1$ Hz, 2H), 7,34 (td, $J = 7,9, 2,1$ Hz, 2H), 7,07 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,80 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,31 (s, 1H), 3,70 (s, 3H), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 164,9, 157,4, 152,2, 132,0, 131,2, 127,8, 123,9, 117,7, 116,0, 113,6, 104,5, 55,0, 35,2, FTIR (cm^{-1}) 3448, 3068, 3002, 2937, 2836, 2732, 2616, 1668, 1617, 1604, 1560, 1510, 1454, 1353, 1309, 1257, 1178, 1093, 767 HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_7 + \text{H}]^+$ 443,1125 encontrado, 443,1122.

3,3'-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethylene)bis(4-hydroxy-2H-chromen-2-one) (DC-03):

Rendimento 232 mg (90%); Sólido amarelo claro; PF 258-260 °C; RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,92 (dd, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 2H), 7,59 (td, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 2H), 7,36 (d, $J = 7,9, 2\text{H}$), 7,32 (t, 7,9, 2H), 6,76 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,71 (s, 1H), 6,62 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,26 (s, 1H), 5,94 (s, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 165,2, 164,8, 152,3, 147,4, 145,3, 133,7, 132,0, 123,9, 123,8, 119,5, 117,9, 116,0, 107,8, 107,6, 104,4, 100,7, 35,8; FTIR (cm^{-1}) 3448, 3081, 2898, 2736, 2615, 1662, 1616, 1602, 1567, 1488, 1436, 1344, 1309, 1236, 1097, 1039, 763; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{26}\text{H}_{16}\text{O}_8 + \text{H}]^+$, 457,0918, encontrado, 457,0916.

3,3'-((4-bromophenyl)methylene)bis(4-hydroxy-2H-chromen-2-one) (DC-04):

Rendimento 346 mg (89%); Sólido branco; PF 267-268 °C; RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,89 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,58 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,35 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,31 (t, $J = 7,9, 2\text{H}$), 7,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,29 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 165,8, 164,7, 152,3, 140,1, 131,9, 130,8, 129,2, 124,0, 123,7, 118,5, 118,4, 116,0, 103,8, 35,8; FTIR (cm^{-1}) 3428, 3070, 2728, 2609, 1668, 1617, 1604, 1560, 1488, 1351, 1307, 1093, 765, HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{BrO}_6 + \text{H}]^+$, 491,0125, encontrado, 491,0120.

3,3'-((4-(Dimethylamino)phenyl)methylene)bis(4-hydroxy-2H-chromen-2-one)

(DC-05): Rendimento 235 mg (85%); Pink solid; mp 200-201 °C; RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,83 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,52 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,44 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,31-7,23 (m, 7H), 6,30 (s, 1H), 3,15 (s, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 167,5, 164,4, 152,5, 131,2, 128,2, 124,1, 123,0, 119,6, 115,6, 103,0, 45,6, 36,0; FTIR (cm^{-1}) 3434, 3045, 2917, 2792, 1673, 1606, 1540, 1400, 1351, 1043, 755; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{NO}_6 + \text{H}]^+$, 456,1442, encontrado, 456,1439.

Metodologia de reciclo do catalisador (MSI)₃PW

Em uma síntese multigramada do **DC-01**, empregando 10 mmol de 4-hidroxycumarina, 10 mmol de benzaldeído e 5 mol% do catalisador (MSI)₃PW, os reagentes foram combinados em um balão contendo 10 mL de água e a reação foi conduzida a 80 °C por 1 h. Após o período estipulado, o produto precipitado foi filtrado e lavado com 10 mL de uma solução quente de EtOH/H₂O (1:1, v/v). A água-mãe, aproximadamente 20 mL, foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e submetida à secagem em evaporador rotativo. O sólido remanescente no balão foi lavado com etanol e seco sob pressão reduzida. O catalisador recuperado foi utilizado em mais duas reações idênticas, resultando em rendimentos de síntese para o **DC-01** de 93%, 93%, e 90%, respectivamente.

Metodologias de síntese da pirano-cromeno-carbonitrila (PCN)

Método 1: Foram adicionados 5 mmol de benzaldeído, 5 mmol de malononitrila e 5 mol% de ureia em um balão de fundo redondo com 5 mL de solução EtOH/H₂O (1:1, v/v). A mistura foi agitada por 20 min a 30 °C e, em seguida, 5 mmol de 4-hidroxycumarina foram adicionados. A reação foi mantida a 30 °C por 6 h. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com a mesma solução de EtOH/H₂O. O sólido foi recristalizado em etanol. Rendimento isolado: 78%.

Método 2: Em um balão de fundo redondo, uma mistura reacional foi preparada, composta por 1 mmol de malononitrila, 1 mmol de benzaldeído e 1 mmol de 4-hidroxycumarina. Adicionalmente, 10 mol% de um catalisador foram incorporados, sendo as opções disponíveis Na₂CO₃, *t*-BuOK, HCl, HPW ou 5 mol% do (MSI)₃PW. A reação

foi iniciada pela adição de 1 mL de uma solução EtOH/H₂O (1:1, v/v) à mistura reacional. O sistema foi então aquecido a 80 °C e mantido a essa temperatura por um período de 30 min. Essa metodologia busca facilitar a síntese desejada, destacando os reagentes, catalisadores e solventes utilizados, além de fornecer informações específicas sobre a temperatura e o tempo de reação.

2-amino-5-oxo-4-fenil-4H,5H-pirano[3,2-c]cromeno-3-carbonitrila – (PCN):

Rendimento 1,24 g (78%, Método 1) e 0,24 g (49%, Método 2); Sólido branco; PF 257-259 °C; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,91 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,70 (ddd, *J* = 8,4, 7,5 Hz, 1,5, 1H), 7,48 (ddd, *J* = 8,0, 7,5, 1,0 Hz, 1H), 7,45 (dd, *J* = 8,4, 1,0 Hz, 1H), 7,40 (s, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,24 (m, 3H), 4,44 (s, 1H); ¹³C{¹H}in RMN (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 159,6, 158,3, 153,5, 152,2, 143,4, 133,0, 128,6, 127,7, 127,2, 124,7, 122,5, 119,3, 116,6, 113,0, 104,4, 58,0, 37,0; FTIR (cm⁻¹) 3378, 3284, 3180, 2198, 1708, 1673, 1608, 1380, 1058; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calculado para [C₁₉H₁₂N₂O₃ + H]⁺, 317,0921, encontrado, 317,0923.

Metodologia de Síntese da 10,10-dimetil-7-fenil-7,9,10,11-tetraidro-6H,8H-cromeno[4,3-b]cromeno-6,8-diona (TCC)

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados: 4-hidroxycumarina (5 mmol), 5,5-dimetilciclo-1,3-dimedona (5 mmol), benzaldeído (5 mmol) (MSI)₃PW (5 mol%), e água (10 mL). A mistura resultante foi aquecida a 80 °C e agitada a essa temperatura por 2 h antes de ser resfriada à temperatura ambiente, filtrada e lavada com água quente para separar o catalisador. O produto bruto resultante foi purificado por recristalização com EtOH/CH₂Cl₂ (1:4, v/v). Rendimento isolado: 68%.

10,10-dimetil-7-fenil-7,9,10,11-tetraidro-6H,8H-cromeno[4,3-b]cromene-6,8-dione – (TCC):

Rendimento 1,23 g (63%), Sólido branco; PF 222-224 °C; RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,81 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,50 (ddd, *J* = 8,7, 7,5, 1,5 Hz, 1H), 7,33-7,24 (m, 4H), 7,19 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,09 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 4,90 (s, 1H), 2,63 (q, *J* = 17,0 Hz,

2H), 2,23 (q, $J = 17,0$ Hz, 2H), 1,11 (s, 3H), 1,03 (s, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN δ ppm 196,1, 162,1, 160,7, 154,0, 152,7, 142,6, 132,3, 128,7, 128,4, 127,2, 124,4, 122,6, 117,0, 115,3, 113,8, 106,9, 50,8, 40,9, 33,5, 32,5, 29,3, 27,7; FTIR (cm^{-1}) 3425, 3064, 2956, 2869, 1714, 1658, 1365, 1192, 1170, 1055, 761, HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_4 + \text{H}]^+$, 373,1434; encontrado, 373,1438.

Bioensaio de coleóptilo de trigo estiolado

Para conduzir o experimento, sementes de trigo da variedade *Triticum aestivum* cv. *Duro* foram inicialmente umedecidas com água (15 mL para 100 sementes) e, em seguida, colocadas em placas de Petri. Essas placas foram dispostas em uma câmara de germinação mantida a uma temperatura constante de aproximadamente 25 °C, em completa ausência de luz.

Após decorridas 72 h, foram cuidadosamente coletados fragmentos de coleóptilos com 4 mm de comprimento. O corte precisou ser realizado imediatamente abaixo dos primeiros 2 mm da extremidade do coleóptilo, sendo que todo esse processo ocorreu sob uma iluminação verde.

Quanto aos procedimentos de teste, os produtos obtidos da RMC da **CPDs** e os dicumaróis (**DCs**) foram previamente dissolvidos em DMSO. Posteriormente, essas soluções foram diluídas em um tampão de citrato/fosfato com pH ajustado para 5,6 e enriquecido com 2% de sacarose. As diluições foram preparadas para atingir as 5 concentrações finais de: (i) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$; (ii) $3,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$; (iii) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$; (iv) $3,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ e (v) $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$.

Dois controles foram estabelecidos: um utilizando uma solução pura de tampão com a adição de DMSO (atuando como controle negativo) e outro contendo o herbicida de referência, Logran® (*triassulfuron* 0,6%), servindo como controle positivo.

Cinco fragmentos de coleóptilos foram então colocados em tubos de ensaio, onde cada tubo continha 2 mL da solução de teste, com três repetições para cada nível de diluição. Os tubos foram adequadamente identificados, selados e colocados em incubação, com agitação constante a 6 rpm, em um agitador de cultura *Stuart Scientific SC2*, em condições de escuridão, a uma temperatura controlada de 25 ± 1 °C, durante um período de 24 h. Após essa fase de incubação, a avaliação do aumento no comprimento

dos coleóptilos foi realizada. Esses coleóptilos foram dispostos em uma superfície preta, sendo divididos em células retangulares de tamanho padrão (40 × 20 mm) e categorizados de acordo com sua diluição e repetição. Os comprimentos dos fragmentos foram medidos através do *software ImageJ*.

Bioimageamento celular

A linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) foi mantida seguindo as recomendações da *American Type Culture Collection (ATCC)*. O **DC-03** e o Monastrol foram diluídos para 100 µM em *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* suplementado com 0,1% de DMSO e 10% de soro fetal bovino. Setenta mil células foram semeadas em lâminas de vidro de 13 mm dentro de uma placa de 24 poços por 48 h, alcançando 75% de confluência. As amostras foram divididas em três grupos e incubadas nas seguintes condições por 48 h: (A) controle negativo incubado apenas com meio de cultura mais 0,1% de DMSO; (B) controle positivo incubado com Monastrol a 100 µM; e (C) incubado com **DC-03** a 100 µM. Após 48 h, as amostras foram lavadas três vezes com PBS morno (37 °C), pH 7,4, e submetidas a procedimentos de fixação em formaldeído a 3,7% por 30 min à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para o **DC-03** contaminado com ureia.

Ensaio de imunofluorescência

As amostras fixadas foram permeabilizadas em Triton X-100 a 0,1% por 20 min e, em seguida, incubadas em uma solução de bloqueio (PBS, pH 7,4, 1% de leite desnatado, 2,5% de albumina de soro bovino, 8% de soro fetal bovino) por mais 20 min. Posteriormente, as amostras foram incubadas com um anticorpo primário (anti- α -tubulina) produzido em camundongo por 16 h a 4 °C. Após três lavagens com PBS, pH 7,4, à temperatura ambiente, as amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C com um anticorpo secundário, Alexa Fluor 594 anti-camundongo (5 µg mL⁻¹), no escuro. Após três lavagens adicionais em PBS, pH 7,4, as amostras foram incubadas por 5 min com DAPI (300 nM) para corar o núcleo celular. Após mais três lavagens em PBS, pH 7,4, as amostras foram montadas em lâminas de vidro usando o agente ProLong Gold Antifade e analisadas usando um microscópio confocal de varredura a laser.

Métodos computacionais:

Detalhes da Simulação de *Docking* e Dinâmica Molecular (DM):

Etapa de preparação: A estrutura 1Q0B foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB), por meio do *UCSF Chimera*. A unidade assimétrica inicialmente compreendia um dímero da Eg5 com duas moléculas de Monastrol e duas moléculas de ADP. Realizou-se a remoção de um monômero e do excesso de moléculas de água cristalizadas, resultando em um monômero, ADP complexado com Mg^{2+} e moléculas de água adjacentes, além do Monastrol. Para garantir a minimização dos impedimentos estéricos entre os ligantes e a proteína, a estrutura cristalina foi relaxada inicialmente por meio de uma minimização de energia e uma breve simulação de dinâmica molecular restrita a átomos pesados (NVT) a 298 K no GROMACS 2020. A parametrização da proteína foi realizada com o campo de força ff14SB, enquanto a dos ligantes foi feita com GAFF2, incluindo cargas AM1-BCC.

Etapa da simulação de docking: Após assegurar que qualquer impedimento estérico fosse minimizado, o Monastrol foi removido do sítio de ligação, e a superfície da proteína foi gerada utilizando o programa DMS⁶¹ com um átomo sonda de raio de 1,4 Å. Esferas de ancoragem foram geradas dentro do sítio de ligação com o DOCK's *sphgen*.⁶² As grades de energia do 1Q0B foram geradas utilizando o programa *grid*.⁶³ Cada ponto da grade possuía um termo de energia coulombiana usando uma dielétrica dependente da distância de $4r$ e um termo Lennard Jones de 6-9. O Dicoumarol foi ancorado usando o *score* de grade do DOCK6, e a melhor pose de ligação foi minimizada e reavaliada usando o *score* de Energia Contínua (CE) do DOCK6. O ligante original, Monastrol, foi minimizado e pontuado com CE. *Footprints* energéticos foram geradas para as estruturas minimizadas no sítio de ligação.

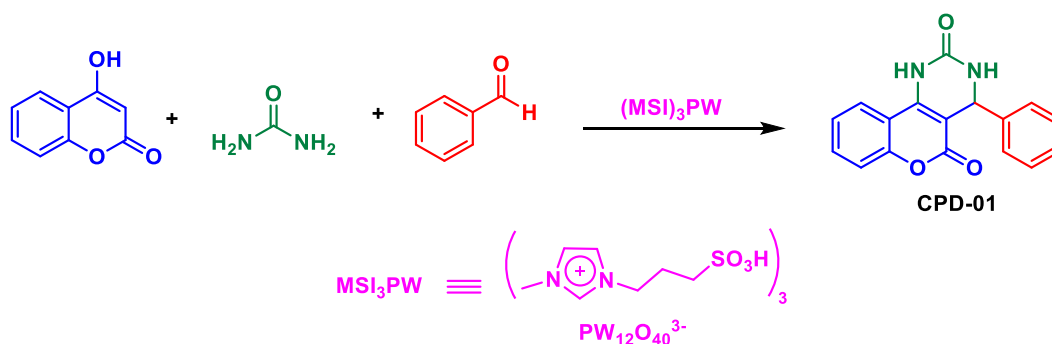
Etapa de Dinâmica Molecular (DM): As poses originais do Monastrol e a melhor pose pontuada do DC-03 foram preparadas para DM de maneira semelhante à etapa de preparação pré-ancoragem. O receptor foi atribuído com parâmetros ff14SB, enquanto os ligantes receberam parâmetros GAFF2 e cargas AM1-BCC. Utilizou-se o programa Tleap para solvatar e neutralizar cada complexo receptor-ligante. A etapa de produção de 10 ns foi precedida por uma minimização e quatro etapas de equilíbrio. A minimização de energia foi realizada com um algoritmo *steepest descent*, com uma

tolerância de energia de 10 kJ/mol e passos de 0,01 kJ mol⁻¹. A primeira etapa de equilíbrio (NVT) consistiu em uma simulação de 100 ps com um integrador de Langevin configurado para gerar configurações a 298 K, com um passo de 2 fs. Todos os átomos pesados que não são de moléculas de solvente foram mantidos em seus lugares por uma restrição de posição de 1000 kJ mol⁻¹. A segunda etapa de equilíbrio (NPT_1) foi configurada da mesma forma que a etapa de equilíbrio NVT, com a adição de um barostato de Berendsen para levar a densidade e a pressão da caixa de simulação a condições quase equilibradas a 1 bar. A terceira etapa de equilíbrio (NPT_2) utilizou o barostato de Parrinello-Rahman para garantir que a amostragem fosse adequada no *ensemble* isotérmico-isobárico. A quarta etapa de equilíbrio (NPT_3) diferiu da NPT_2 pelas restrições no receptor. Em NPT_3, o esqueleto foi restrito, e as cadeias laterais foram permitidas a se mover livremente. A etapa de produção (PROD) foi executada com um sistema completamente sem restrições a 298 K e 1 bar, usando o mesmo integrador e barostato da etapa anterior. Exceto pela etapa de minimização, as ligações com hidrogênio foram constringidas usando a implementação de LINCS do GROMACS. Interações de van der Waals foram desconsideradas além de um *cutoff* de 12 Å, com uma transição em 10 Å, e interações eletrostáticas foram calculadas usando o método *Particle Mesh Ewald* (PME) de ordem 4 com um *cutoff* no espaço real de 12 Å e espaçamento de grade de 1,6 Å. Condições de contorno periódicas foram aplicadas.

Resultados e discussão

Estudo de otimização e efeito do solvente visando a síntese da CPD

A primeira reação estudada nesta pesquisa foi a reação para a formação da **CPD**, esta está ilustrada no Esquema 10. Como etapa inicial da investigação da RMC, foram determinadas as condições reacionais ideais, conduzindo experimentos variando o tempo de reação, a temperatura e a quantidade de catalisador. Quanto ao catalisador, optou-se pelo $(\text{MSI})_3\text{PW}$ (estrutura apresentada no Esquema 10), um derivado de heteropoliácido amplamente utilizado em diversas RMCs, incluindo RMCs de Biginelli e variantes de Biginelli. Este catalisador demonstrou consistentemente altos rendimentos, por ter características de um superácido, o que resulta em eficiência catalítica aprimorada nas reações de Biginelli e suas variantes.⁶⁴



Esquema 10. Esquema geral para a síntese da **CPD** via RMC baseada nas condições descritas na literatura.

Inicialmente, conduziu-se uma reação teste utilizando 1 mmol dos reagentes, 5 mol% do catalisador e mantendo a temperatura a 70 °C por 30 min, com o emprego de água como solvente. Durante a progressão da reação, foi observada a formação de um precipitado branco. Ao término do tempo estipulado, procedeu-se à filtração do precipitado, seguida de uma lavagem com água e etanol. Para caracterizar o produto, realizaram-se análises de pontos de fusão, assim como RMN de ^1H e ^{13}C . Os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura, apresentando concordância.

O ponto de fusão registrado situou-se na faixa de 160-162 °C,⁶⁵⁻⁶⁷ no entanto, na literatura é encontrada uma grande variedade de valores para o PF, como será discutido neste trabalho. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram disponibilizados na Figura 8. Apesar de algumas pequenas discrepâncias terem sido observadas nos sinais e integrações

do espectro de ^1H e o número de sinais no espectro de ^{13}C , levantando dúvidas sobre a estrutura do composto, optou-se por considerá-la correta, dado que a molécula já havia sido amplamente estudada e todos os sinais eram condizentes com os sinais relatados na literatura.⁶⁵⁻⁶⁷

As atribuições dos sinais dos RMNs de ^1H e ^{13}C apresentadas na Figura 7 são: RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,91 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,59 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,38-7,30 (m, 4H), 7,26-7,24 (m, 2H), 7,17-7,14 (m, 3H), 6,37 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 165,4, 164,9, 152,3, 139,9, 132,0, 128,1, 126,6, 125,6, 124,0, 123,8, 118,0, 116,0, 104,2, 36,0.

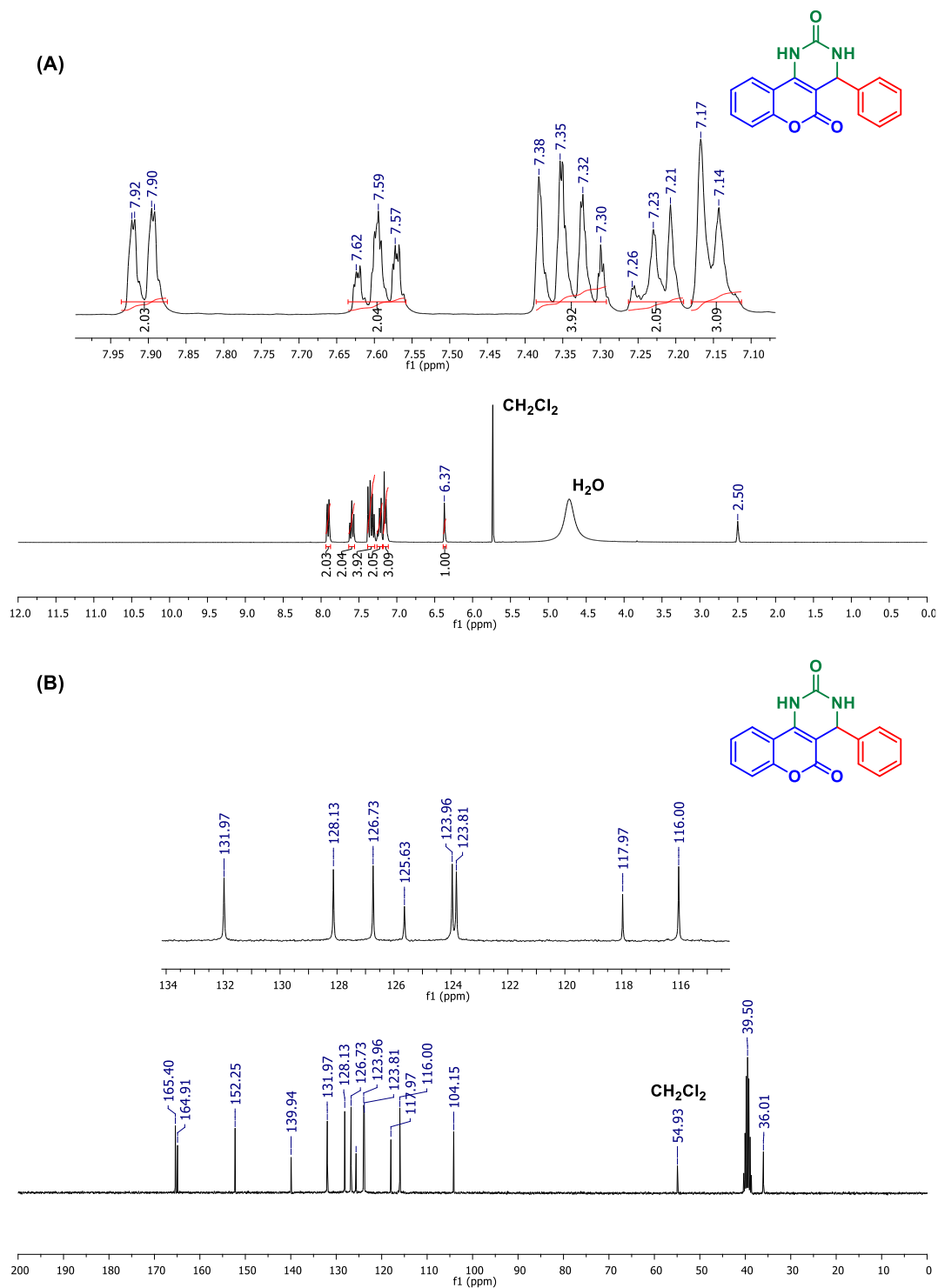


Figura 8. (A) Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o produto formado na reação. (B) Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o produto formado na reação. Note que a estrutura apresentada é da suposta **CPD-01**.

Sendo assim, logo em seguida começou-se a etapa de otimização das condições reacionais. No início do estudo, procedeu-se à variação da temperatura de reação. Para isso, foram selecionadas as condições iniciais com base em condições descritas na literatura.⁶⁸ As condições iniciais foram: escala da reação 1 mmol, água como solvente (0,5 mL), o tempo de 30 min e 5 mol% do catalisador (MSI)₃PW. Em seguida, explorou-se uma faixa de temperaturas entre 30 °C e 100 °C, identificando 80 °C como a temperatura ótima para o rendimento máximo.

Por conseguinte, promoveu-se a variação do tempo, mantendo constantes as demais condições, incluindo temperatura, solvente e quantidade de catalisador. Diversos intervalos de tempo reacional foram investigados, sendo que uma hora de reação se destacou como o período mais eficiente.

Por fim, realizou-se a variação da concentração do catalisador, começando com 0 mol% e aumentando até 10 mol%, sem modificar as condições otimizadas anteriormente. A concentração mais adequada foi determinada como sendo 5 mol% de catalisador.

Assim, estabeleceram-se as condições ideais para o estudo do solvente, compreendendo: (i) uma temperatura de 80 °C, (ii) um tempo de reação de 1 h e (iii) 5 mol% de catalisador. Na Figura 9 estão representados graficamente os resultados obtidos na otimização das condições reacionais

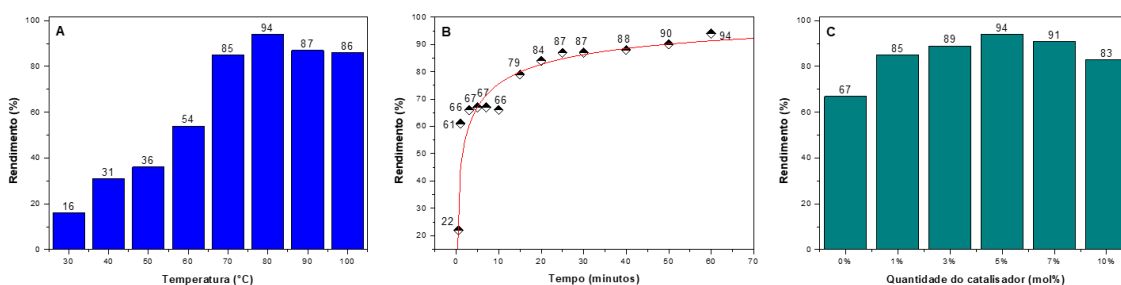
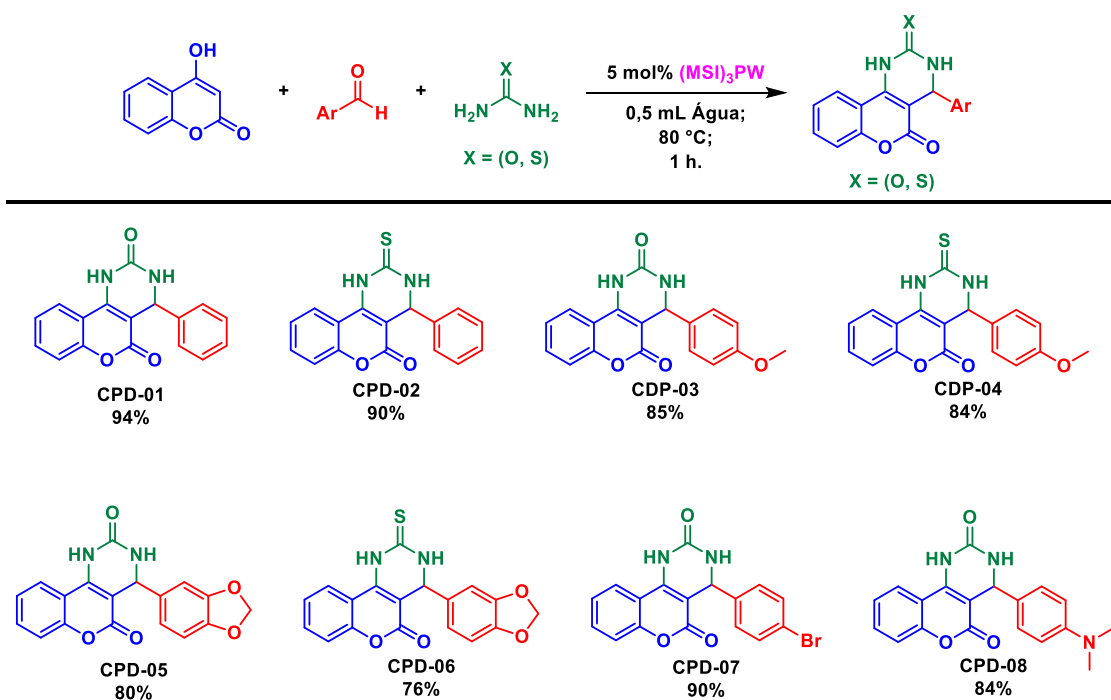


Figura 9. Representações gráficas das otimizações das condições reacionais. A) Otimização da temperatura B) Otimização do tempo de reação. C) Otimização da quantidade de catalisador.

Após otimizar a RMC, propusemos a síntese de novos adutos CPDs em água. Esses adutos foram gerados por meio da substituição do aldeído aromático e/ou da tioureia. Os produtos resultantes passaram por caracterização, incluindo determinação do ponto de fusão e análise de RMN de ¹H e ¹³C. A comparação dos dados de caracterização obtidos com os dados da literatura revelou concordância entre eles, mostrando que as

substâncias sintetizadas tratam-se das mesmas estruturas relacionadas na literatura. As estruturas propostas estão apresentadas no Esquema 11, em conjunto com os seus respectivos rendimentos.



Esquema 11. Estruturas da síntese dos supostos adutos de CPDs indicados pela literatura científica.

Com as condições reacionais otimizadas, avançou-se para a etapa de variação dos solventes. Foram selecionados 11 solventes distintos, incluindo alguns considerados tóxicos, para explorar uma ampla gama de parâmetros de Kamlet-Taft (KT),⁶⁹⁻⁷² visando obter informações mecanísticas. Importante ressaltar que essa análise não teve a intenção de incorporar esses solventes na RMC após atingir um estado mais sustentável. Adicionalmente, foram incluídos 3 líquidos iônicos como solventes para investigar seus efeitos na RMC para a síntese da **CPD-01**. A escolha desses líquidos iônicos decorre de sua viabilidade como alternativa aos solventes orgânicos moleculares, devido às suas propriedades físico-químicas atrativas, como estabilidade térmica, pressão de vapor insignificante, baixa volatilidade e a capacidade de reciclagem, entre outras características.⁷³ Testes adicionais foram conduzidos em reações que demandavam excesso de reagentes, focando na compreensão dos efeitos dos solventes sobre o mecanismo reacional. Destaca-se que o principal objetivo foi estabelecer condições ideais para a reação, evitando excessos e visando a minimização do fator E.

Destaca-se que o fato E é um parâmetro muito utilizado no conceito da Química Verde atualmente, por ser uma métrica que relaciona a quantidade de rejeito produzida em um processo. O fator E é definido como a razão entre a massa de rejeitos pela massa do produto desejado.³ Pode ser calculado através da Equação 5.

$$\text{Fator } E = \frac{\text{Massa dos rejeitos totais}}{\text{Massa do produto}} \quad (5)$$

Os solventes empregados estão listados na Tabela 1 abaixo, em conjunto com os seus respectivos parâmetros solvatocrômicos de KT. Esses parâmetros serão discutidos mais a fundo ao decorrer deste trabalho.⁷⁴⁻⁷⁶ Na Tabela 2 estão disponibilizados os rendimentos obtidos para as reações variando o solvente e/ou variando as proporções dos reagentes.

Tabela 1. Solventes utilizados no estudo na RMC da CPD em conjunto com seus respectivos valores dos parâmetros de KT.

Solvente	α	β	π^*	Referência
Acetato de etila	0,00	0,45	0,55	45
Acetonitrila	0,19	0,31	0,75	44
Água	1,17	0,47	1,09	45
BMI.BF ₄	0,63	0,38	1,04	45
BMI.NTf ₂	0,62	0,23	0,90	45
BMI.PF ₆	0,63	0,19	1,02	45
Diclorometano	0,04	-0,01	0,79	45
Etanol	0,83	0,75	0,51	45
Hexano	-0,08	0,00	0,00	44
Metanol	0,93	0,66	0,58	45
Tolueno	0,00	0,11	0,54	44

Tabela 2. Dados de rendimento calculado para a massa da **CPD-01** em função do solvente e proporção dos reagentes.

Cumarina + Benzaldeído + Ureia $\xrightarrow[0,5 \text{ mL Solvente; } 80^\circ\text{C; } 1 \text{ Hora.}]{5 \text{ mol\% (MSI)}_3\text{PW}}$ CPD-01

Rendimentos (%)					
Proporção (mmol) Cumarina : Aldeído : Ureia					
Solvente	1 : 1 : 1	2 : 1 : 1	1 : 2 : 1	1 : 1 : 2	Fator-E
Acetato de etila	74%	67%	72%	62%	47
Acetonitrila	63%	85%	65%	53%	41
Água	94%	94%	90%	71%	36
BMI.BF ₄	69%	93%	83%	77%	38
BMI.NTf ₂	80%	90%	88%	59%	39
BMI.PF ₆	71%	94%	75%	64%	37
Diclorometano	74%	79%	80%	75%	44
Etanol	77%	90%	75%	58%	39
Hexano	53%	63%	59%	44%	55
Metanol	65%	92%	82%	52%	38
Tolueno	55%	72%	75%	50%	47

As entradas destacadas indicam rendimentos $\geq 90\%$.

Foi observado que o maior rendimento foi alcançado ao utilizar a água como solvente, um resultado notável, considerando que, entre os solventes testados, a água é a uma opção ecologicamente amigável, economicamente viável e não depende de fontes fósseis. Além disso, quando analisado os rendimentos utilizando algum reagente em excesso, foi notado que, de forma geral, o excesso do reagente 4-hidroxicumarina favoreceu a reação, enquanto o excesso de ureia prejudicou a formação do composto desejado.

Para analisar o impacto que o solvente tem na reação, pode-se utilizar os parâmetros solvatocrômicos de KT. Esses parâmetros são, respectivamente: (i) a capacidade de doação de ligação de hidrogênio, representada por α ; (ii) a capacidade acceptora de ligação de hidrogênio ou doadora de pares de elétrons, representada por β ; e (iii) a polaridade/polarizabilidade, representada por π^* . A análise desses parâmetros de KT se dá com a correlação entre o logaritmo natural da produtividade da reação (**P**), definida como razão molar do produto formado (n_{produto}) pelo reagente limitante não incorporado ($n_{\text{reagenteLimitante}}$) (Equação 6), com os parâmetros α , β e π^* . Quando há uma

correlação linear entre essas duas variáveis ($\ln(\mathbf{P})$ e α ou β ou π^*) é possível inferir que o parâmetro de KT em questão está influenciando na reação.

$$\mathbf{P} = \frac{n_{\text{produto}}}{(1 - \%Rendimento) * n_{\text{reagenteLimitante}}} \quad (6)$$

Com base nisso, os gráficos de $\ln(\mathbf{P})$ em relação aos parâmetros de KT foram gerados, representados na Figura 10. Em todas as condições avaliadas, a ureia foi selecionada como reagente limitante para o cálculo de \mathbf{P} .

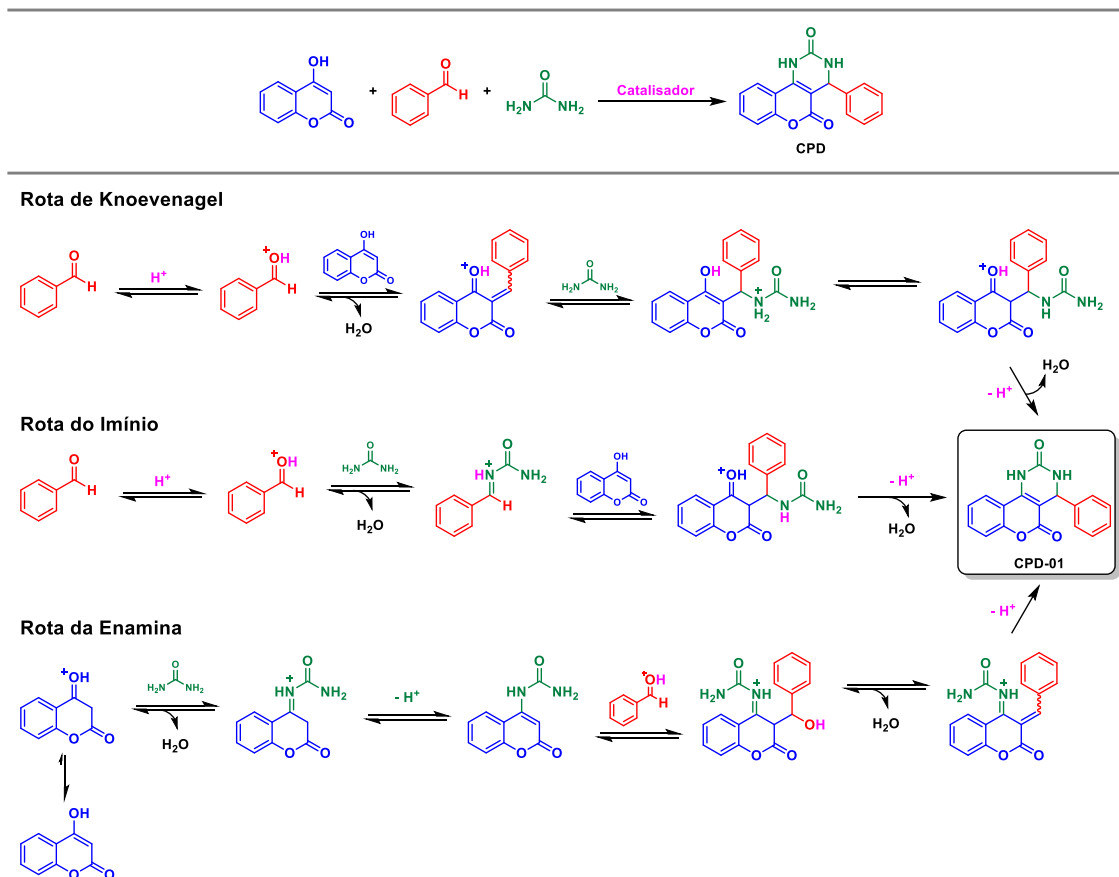
aproximadamente linear com $\text{Ln}(\mathbf{P})$, sugerindo que um aumento no valor de α do solvente está associado a uma maior produtividade na reação. Em contrapartida, o valor de R^2 para o parâmetro β sugere que não há uma relação direta entre esse parâmetro e a produtividade, indicando que as variações em β não explicam as variações na produtividade, tornando β estatisticamente não significativo.

Para analisar e compreender os resultados desses ensaios, é imperativo examinar o conhecimento já consolidado e debatido na literatura. Nesse cenário, iremos discutir os estudos que abordam o impacto do solvente na RMC de Biginelli. Na RMC de Biginelli, é comum utilizar compostos 1,3-dicarbonílicos como um dos componentes da reação, sendo o acetoacetato de etila um exemplo clássico (conforme ilustrado no Esquema 5).⁷⁷⁻⁸⁸ É reconhecido que, para a reação de Biginelli, esse reagente é reativo em sua forma enólica e não em sua forma diceto.⁸⁴ Essa constatação foi consolidada por alguns poucos grupos que investigaram o mecanismo associado com o efeito de solvente nesta reação.^{31,38,39} Nesses estudos, verificou-se que a variação do parâmetro $\text{KT } \pi^*$ mantinha uma relação inversamente proporcional à produtividade. Solventes com baixos valores de π^* favoreciam a manutenção do composto acetoacetato de etila em sua forma enólica, favorecendo assim, a cinética e a produtividade da transformação.⁸⁴ Esses estudos permitiram testes com utilização de solventes ecologicamente sustentáveis, como óleos vegetais e outros solventes alternativos na RMC de Biginelli, mantendo-se nestas condições, rendimentos que foram significativos.

Na reação variante de Biginelli estudada neste trabalho, a síntese da **CPD**, houve a substituição do reagente 1,3-dicarbonílico pela 4-hidroxycumarina, que por sua vez é predominantemente encontrada em sua forma enólica devido à manutenção da estrutura aromática nesse estado, notavelmente mais estável.⁸⁹ Independentemente do solvente utilizado e dos parâmetros de KT , a cumarina é encontrada quase exclusivamente em sua forma enol e com reatividade nucleofílica considerável.⁹⁰⁻⁹² Essa característica sugere que a reatividade da cumarina permanece independente dos parâmetros de KT dos solventes empregados, ampliando assim a gama de oportunidades para explorar diversos outros solventes, como fora realizado nos experimentos anteriores.

Para compreender as possíveis os efeitos gerados pelos solventes na reação, é preciso entender as três rotas mecanísticas possíveis para esta reação variante de Biginelli. As três propostas estão ilustradas no Esquema 12, e elas tiveram como base os

mecanismos encontradas na literatura.^{56,60,65,93-95} Embora, até o momento, nenhuma evidência experimental tenha sido fornecida para a elucidação dos mecanismos propostos. Esses mecanismos serão discutidos mais profundamente ao decorrer deste trabalho.



Esquema 12. Representação dos mecanismos propostos para a reação de síntese da **CPD-01** usando-se uma transformação multicomponente variante de Biginelli. Observa-se que o mecanismo da enamina é o mais improvável tendo a cumarina como um dos reagentes. Nota-se, também, que há um paralelo entre estes 3 mecanismos propostos da literatura e os 3 mecanismos debatidos para a reação de Biginelli.

Nas considerações sobre as rotas viáveis para a transformação, focalizam-se exclusivamente as rotas do imínio e de Knoevenagel. Conforme discutido previamente, a 4-hidroxycumarina predomina em sua forma enólica, sem evidências do tautômero ceto.⁹⁶ Dessa forma, é plausível descartar o mecanismo da enamina.

Quanto à influência dos solventes nas rotas mecanísticas, registros indicam que o parâmetro β assume papel central como descritor primário na assistência à rota de Knoevenagel. Maiores valores de β , conforme documentado, favorecem a formação do produto, presumindo que a rota principal seja a de Knoevenagel.⁹⁷ Em contraste, outro

estudo⁹⁸ aponta que, dependendo das condições catalíticas, o descritor crítico seria o π^* , promovendo a rota do imínio. Solventes de menor polaridade, nesse contexto, favoreceriam a reação, embora o mesmo estudo tenha observado que o descritor α não apresentou correlação estatisticamente significativa.⁹⁸

Ao analisar os dados ilustrados na Figura 10, é evidente que elevados valores do parâmetro $KT \alpha$ promoveram a formação do produto, indicando que a rota favorecida foi a do imínio. À primeira vista, os resultados de nossos experimentos podem parecer lógicos e promissores na elucidação da transformação. No entanto, como demonstrado em outro trabalho,⁸⁴ o parâmetro α geralmente não está correlacionado com a produtividade para reações de Biginelli. Portanto, os resultados da reação da **CPD** contradizem o comportamento esperado derivado de um modelo robusto de efeito de solvente, tornando os nossos resultados questionáveis.

Neste estágio, tornou-se crucial conduzir uma análise mais abrangente dos resultados obtidos e empregar técnicas espectroscópicas para compreender e esclarecer as contradições observadas.

Avaliação detalhada dos dados espectroscópicos para a CPD.

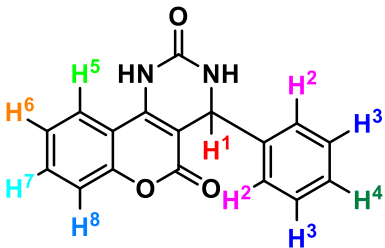
Em qualquer estudo de síntese molecular, a análise dos dados espectroscópicos desempenha um papel fundamental na identificação e validação da estrutura do composto sintetizado. É crucial que os resultados espectroscópicos de todas as técnicas empregadas estejam em conformidade com a estrutura molecular proposta. É importante destacar que cada técnica ou experimento utilizado para determinar a estrutura de um composto químico possui suas próprias vantagens e limitações. Portanto, a utilização de várias técnicas de análise é uma abordagem prudente para evitar possíveis erros na elucidação da estrutura molecular. Isso garante uma maior confiabilidade nos resultados e uma compreensão mais completa das características do composto em estudo.

Conforme avançávamos no desenvolvimento deste estudo, começaram a surgir discrepâncias significativas nos dados físico-químicos e espectroscópicos em relação à estrutura da **CPD-01**. Essas disparidades se manifestaram não apenas no efeito de solvente, mas também em quase todas as análises feitas para a **CPD**, isso em relação aos

valores encontrados na literatura, mas também em relação à estrutura proposta. A primeira indicação clara disso surgiu durante a análise do ponto de fusão.

Com relação ao ponto de fusão, a maior parte das medidas realizadas para a **CPD-01** estava em concordância com os valores encontrados na literatura, situando-se na faixa de 160-162 °C. No entanto, quando esses valores divergiam dessa faixa, presumia-se a presença de impurezas no produto, o que levava à decisão de recrystalizá-lo utilizando etanol. Após o processo de recrystalização, ao medir novamente o ponto de fusão, observou-se uma significativa elevação para a faixa de 229-230 °C, bem acima do valor de referência na literatura. Esse fenômeno, até então inédito em qualquer dos artigos que relatavam a síntese da **CPD-01**, chamou atenção, porém, naquele momento, ainda não havia explicações plausíveis para essa notável alteração no ponto de fusão.

Essa discrepância também se manifestou nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Inicialmente, no espectro de RMN de ^1H , dois pontos críticos divergiram entre os dados experimentais e as expectativas teóricas, bem como em relação aos espectros encontrados na literatura. O primeiro ponto de destaque referia-se ao deslocamento químico (δ) do sinal do hidrogênio benzílico na estrutura da **CPD-01**, o qual poderia ser previsto como um simpleto com δ de $\approx 4,50$ ppm. O segundo ponto destacado estava relacionado às integrações dos hidrogênios na estrutura da **CPD-01**, as quais revelaram uma contagem de hidrogênios superior ao esperado. Para esclarecer essas discrepâncias, os dados teóricos referentes ao deslocamento químico dos hidrogênios e à proporção de integração estão detalhadamente apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativas para as multiplicidades, integrais e deslocamentos químicos de um espectro de RMN de ^1H para a **CPD-01**.


Hidrogênio	Multiplicidade de sinal do Hidrogênio	Proporção da Integral	Deslocamento químico teórico (δ) (ppm) ^a
1	s	1	5,13
2	d	2	7,28
3	t	2	7,28
4	t	1	7,29
5	d	1	8,32
6	t	1	7,41
7	t	1	7,70
8	d	1	7,36

^a Deslocamentos previstos no Software ChemDraw Professional 22.

De imediato, são notadas algumas diferenças entre os dados obtidos experimentalmente (Figura 8A) e os dados teóricos (Tabela 3), das quais são:

- O sinal do hidrogênio benzílico (**H1**) que era esperado como um simpleto em δ 5,13 ppm foi observado em δ 6,37 ppm, um valor muito mais elevado do que o previsto teoricamente e, em princípio, sem nenhuma explicação adequada.
- Os sinais que a parecem no espectro (Figura 8) em δ 7,91 ppm e δ 7,59 ppm, que são do núcleo da cumarina, deveriam ter integrais para um hidrogênio, foram observados com integrais para dois hidrogênios, podendo indicar a presença de 2 cumarinas na estrutura.
- A estrutura da **CPD-01** previa a detecção de 10 hidrogênios, no entanto, foram detectados 14 hidrogênios no espectro experimental.

Essas diferenças levantam dúvidas sobre a correspondência entre a estrutura proposta para a **CPD-01** e os resultados experimentais.

Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C (Figura 8B), na estrutura da **CPD-01**, existem 15 carbonos quimicamente distintos, esperando-se que apresentem δ distintos. No entanto, nos dados experimentais, foram identificados apenas 14 carbonos quimicamente distintos. Essa discrepância pode ser atribuída à natureza aromática da

estrutura, o que pode resultar na sobreposição de alguns sinais de carbonos e, conseqüentemente, na contagem reduzida. Todavia, essa diferença no número de sinais de carbonos também suscita questionamentos sobre a estrutura proposta. Considerando-se que o RMN de ^{13}C foi adquirido em uma frequência de 75 MHz e 150 MHz, a possibilidade de sobreposição dos sinais de dois carbonos desta estrutura simples é ainda mais reduzida.

Neste contexto, foram propostos experimentos adicionais com o objetivo de realizar uma caracterização estrutural mais abrangente das **CPDs**. Até o momento, a caracterização havia sido realizada principalmente por meio de comparações com dados da literatura, incluindo medidas de ponto de fusão e análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que por sua vez eram em grande parte concordantes. Os experimentos adicionais propostos foram: (i) análise elementar CHN e (ii) espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).

Até o momento, os dados espectroscópicos não forneceram evidências inquestionáveis para confirmar ou refutar a estrutura proposta da **CPD-01**. Portanto, os experimentos adicionais propostos servem para esclarecer essa questão. O primeiro experimento adicional consistiu na análise elementar de CHN, que foi conduzida para as oito estruturas **CPDs** (estruturas ilustradas no Esquema 11). Já nesse experimento, os resultados obtidos não se mostraram consistentes com nenhuma das estruturas propostas. A comparação entre os dados experimentais e teóricos estão apresentados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Comparação entre os dados experimentais e teóricos das análises elementares CHN para as estruturas **CPDs**. Os valores destacados em vermelho são para enfatizar a diferença significativa ($\delta > 70\%$) entre os valores experimentais e teóricos.

Estrutura	Dados Experimentais			Dados Teóricos		
	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
CPD-01	64,62	3,92	2,90	69,86	4,14	9,58
CPD-02	63,59	3,47	0,48	66,22	3,92	9,08
CPD-03	68,65	3,95	0,13	67,08	4,38	8,69
CPD-04	53,33	2,85	0,06	63,89	4,17	8,28
CPD-05	67,29	3,36	0,07	64,29	3,6	8,33
CPD-06	64,04	3,25	0,01	61,36	3,43	7,95
CPD-07	56,01	2,82	1,32	55,01	2,99	7,55
CPD-08	70,53	4,49	2,98	68,05	5,11	12,53

A proporção de átomos de CHN em nenhum dos casos estava em concordância com as estruturas das **CPDs**. A maior discrepância foi observada na proporção de nitrogênio, que em todos os testes se encontrava significativamente abaixo do valor esperado. Em três casos específicos (**CPD-04**, **CPD-05** e **CPD-06**), o valor chegou a se aproximar de zero, considerando a margem mínima de erro do equipamento. Esses resultados indicam que a estrutura formada pode não corresponder à estrutura esperada para as **CPDs**. Portanto, é imperativo explorar outras técnicas para confirmar a verdadeira estrutura dos compostos obtidos.

Diante disso, buscou-se realizar o experimento de HRMS para determinar com exatidão a massa dos compostos formados. Essa técnica demonstra uma notável precisão e sensibilidade, capaz de detectar moléculas mesmo em concentrações extremamente baixas. Devido à sua capacidade de alta resolução, a técnica permite a caracterização precisa da composição elementar do composto e, por meio das fragmentações, uma caracterização estrutural da molecular.⁹⁹

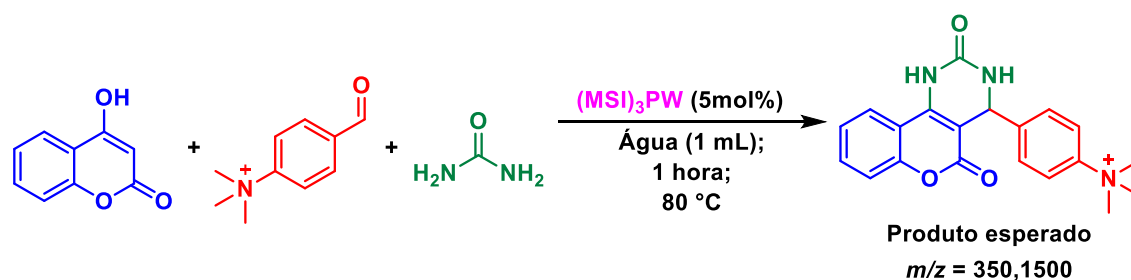
Para o experimento de HRMS, a primeira técnica empregada foi a ionização por electrospray (ESI), acoplada a um analisador Q-ToF. Nessa técnica, as moléculas são protonadas e detectadas como adutos de hidrogênio, sendo representadas como $[M+H]^+$, o que resulta em uma massa detectada com 1 Da a mais. Em algumas situações, elas podem ser detectadas como adutos de sódio ($[M+Na]^+$) ou até mesmo como dímeros protonados ou sodiados. Todavia, apesar das variações nas concentrações e solventes utilizados, nenhum dos íons esperados para as oito estruturas das supostas **CPDs** foi detectada por meio dessa técnica.

Uma outra tentativa foi feita para detecção das estruturas, a fonte de ionização foi alterada, utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica (APCI). No entanto, mais uma vez, nenhum dos íons esperados pôde ser detectado.

Após os resultados negativos obtidos anteriormente, decidiu-se realizar uma outra mudança na fonte de ionização e na técnica empregada. Foi optado por utilizar um espectrômetro de massas com fonte de ionização por elétrons, com injeção direta das amostras. No entanto, mesmo com essa alteração, não houve resultados positivos, e nenhuma das oito estruturas das **CPDs** foram confirmadas.

Diante desse desafio, partiu-se para uma última tentativa, utilizando a técnica de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI). Contudo, também não foi possível detectar nenhuma das estruturas esperadas.

Explorando uma abordagem alternativa, tentou-se realizar a detecção de uma estrutura ionicamente marcada (com carga permanente),¹⁰⁰ considerando que a estrutura já apresentava uma carga positiva, espera-se aumentar a sensibilidade da técnica, por aumentar a razão sinal ruído do analito, para que a sua detecção seja facilitada. A metodologia de síntese das CPDs foi empregada, e a reação correspondente foi conduzida conforme o Esquema 13. Vale ressaltar que essa ideia de utilizar um aldeído ionicamente marcado já fora utilizado anteriormente pelo nosso grupo e foi um crucial para a elucidação dos mecanismos operante para a RMC de Biginelli.³¹ Entretanto, ao injetar o produto da reação no espectrômetro de massas (ESI-QToF), mais uma vez, não foi possível detectar a massa do produto esperado e sim outros sinais de intermediários da reação.



Esquema 13. Condições reacionais utilizadas para tentar formar uma CPD cationicamente marcada. O produto formado não foi o produto esperado indicado no esquema.

Para investigar os eventos que se desenrolam durante a reação, optou-se por monitorá-la por meio de ESI(+)-MS(/MS) durante 45 min, uma técnica reconhecida por sua eficácia no acompanhamento de RMCs.¹⁰¹ Inicialmente, conduziu-se a reação conforme delineado no Esquema 10 com as condições otimizadas, com a ressalva de que alíquotas foram coletadas em diferentes momentos para análise por essa técnica. Durante o curso da reação, foram coletadas amostras nos períodos de 5, 15, 30 e 45 min. Os espectros de ESI(+)-MS correspondentes às amostras dos tempos 5 e 45 min são apresentados na Figura 11.

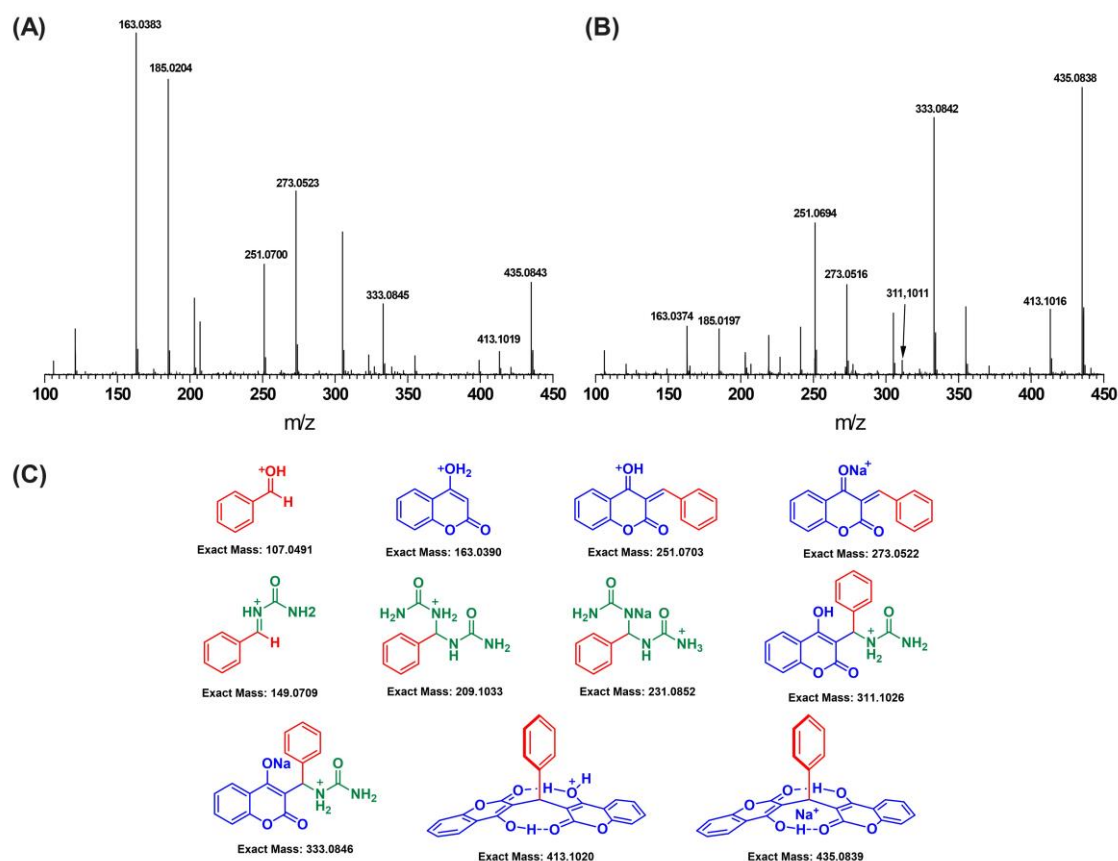


Figura 11. Monitoramento por ESI(+)-MS da RMC para a síntese da **CPD-01**. (A) 5 min de reação. (B) 45 min de reação. (C) Estruturas detectadas e suas massas exatas calculadas.

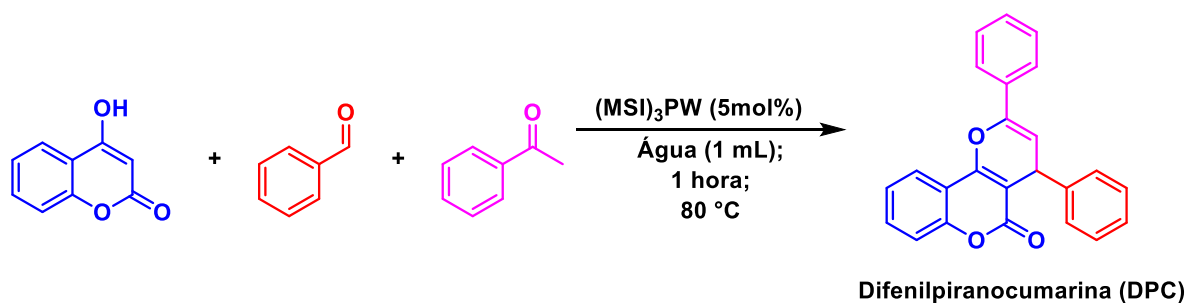
Durante o acompanhamento da reação, foram detectados sinais significativos e de interesse, como: (i) o benzaldeído protonado de m/z 107; (ii) a cumarina protonada de m/z 163; (iii) o intermediário de Knoevenagel de m/z 251; (iv) o bisureída de m/z 209 que é originado do íon imínio de m/z 149; (v) o ion sodiado de m/z 333 no qual é referente ao intermediário avançado da RMC e (vi) a presença de um derivado de dicumarol m/z 413 e 435 para o derivado sodiado. Vale salientar que todos esses sinais foram detectados já no tempo inicial. No espectro correspondente à amostra coletada aos 45 min, os sinais identificados previamente foram observados novamente, com a distinção de um aumento na intensidade do sinal de m/z 311, relacionado ao intermediário avançado. Esse aumento sugere que a concentração desse intermediário no meio reacional também havia aumentado.

Os íons com m/z 311 e m/z 333 correspondem ao último intermediário (intermediário avançado) a partir do qual a ciclização deve ocorrer para gerar o aduto final da RMC, ou seja, a **CPD-01**. No entanto, em nenhum momento do acompanhamento

foi identificado o íon da **CPD-01**. Essa análise cinética foi conduzida para os 11 solventes listados na Tabela 2. No entanto, em todas as tentativas de observação do derivado **CPD-01**, os resultados foram infrutíferos. O acompanhamento da reação também foi realizado com o uso do aldeído marcado (grupo amônio), mas esses dados serão apresentados e discutidos posteriormente nesta dissertação.

Com esses resultados, tornou-se evidente que a reação não formava o produto esperado, a **CPD-01**, e que em todas as condições testadas anteriormente o produto formado foi o dicumarol. A literatura apresenta um relato documentando a falha na síntese da **CPD-01**, resultando no produto **DC-01**. Contudo, os autores não exploraram essa observação, mantendo o problema inexplorado.¹⁰²

A confirmação mais robusta da estrutura do produto, identificado como **DC-01**, ocorreu quando estávamos conduzindo, simultaneamente, estudos sobre outra RMC específica. Essa reação refere-se à síntese de difenilpiranocumarinas (**DPCs**) (Esquema 14).



Esquema 14. Condições experimentais para a RMC para síntese da **DPC**. Contudo, o produto formado não foi a **DPC** esperada.

O produto resultante da reação com a **DPC** apresentava-se como um precipitado branco, semelhante ao precipitado da **CPD-01**. Contudo, ao medir o ponto de fusão desse sólido, verificou-se uma discrepância significativa em relação aos valores encontrados na literatura. A realização de uma recristalização foi acompanhada de uma mudança notável, elevando o ponto de fusão para aproximadamente 230 °C, o mesmo valor obtido após a recristalização da **CPD-01**.

Outra semelhança notável entre esses dois sólidos estava relacionada aos espectros de RMN de ¹H. O espectro do produto formado a partir da reação com a **DPC** mostrou-se idêntico ao espectro da **CPD-01**, incluindo os deslocamentos químicos dos sinais e

suas integrações. Isso confirmou de forma inequívoca que o produto formado em ambas as reações era o mesmo.

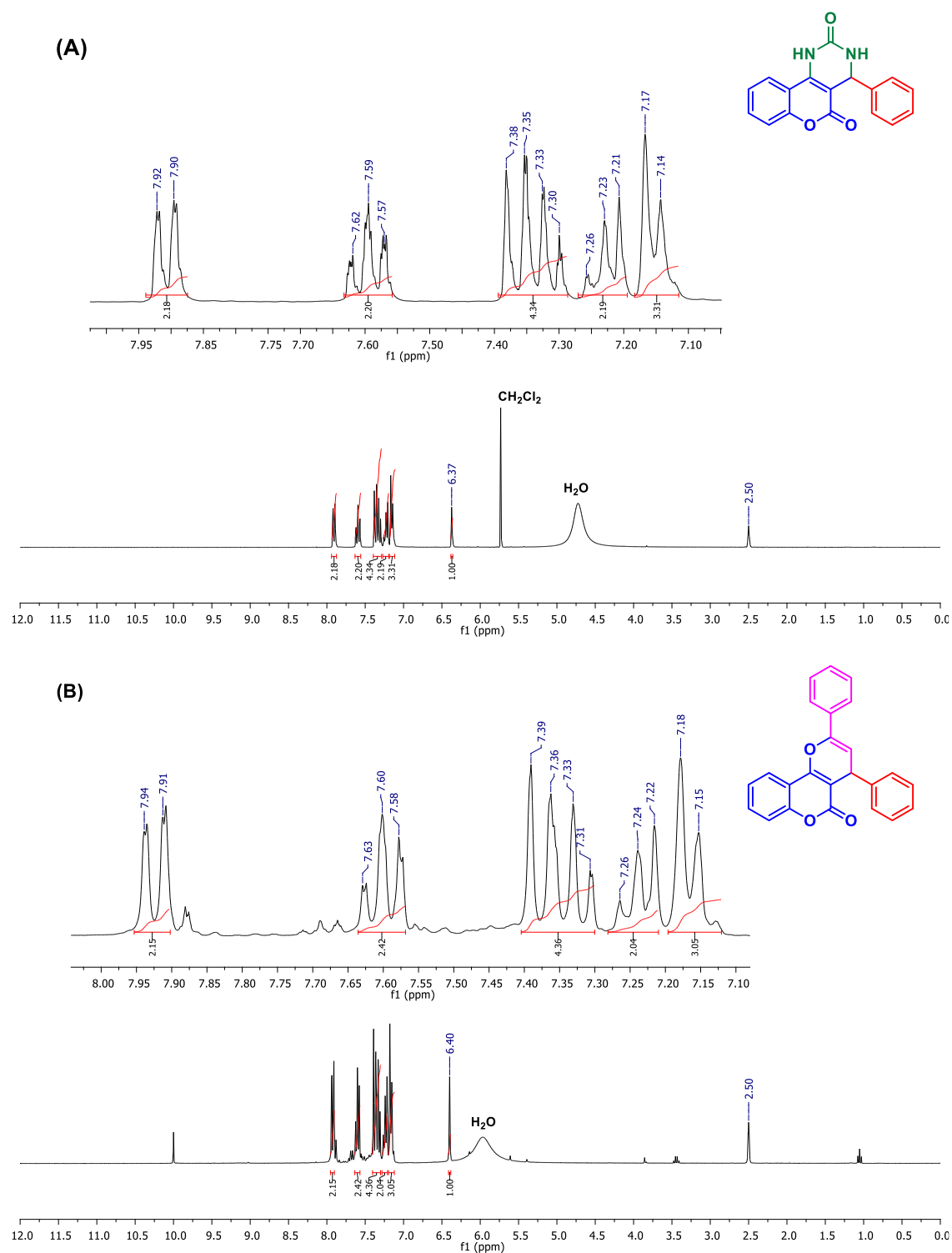


Figura 12. (A) Espectro de RMN de ^1H para o produto obtido na reação da **CPD** (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$). (B) Espectro de RMN de ^1H para o produto obtido na reação da **DPC** (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$). Note que todos os deslocamentos químicos dos sinais, as integrações dos sinais e multiplicidades são muito semelhantes, indicando a formação do mesmo produto em ambas as reações.

Durante o processo de recristalização do produto resultante da reação com a **DPC**, foi obtido um cristal que foi submetido à análise por difração de raios-X. Essa análise eliminou quaisquer dúvidas remanescentes e revelou que as reações tanto da **CPD-01** quanto da **DPC** não geravam os produtos esperados, mas sim uma outra estrutura, denominada derivado dicumarol (**DC-01**). Os resultados da difração de raios-X e a estrutura do **DC-01** estão apresentados na Figura 13 abaixo.

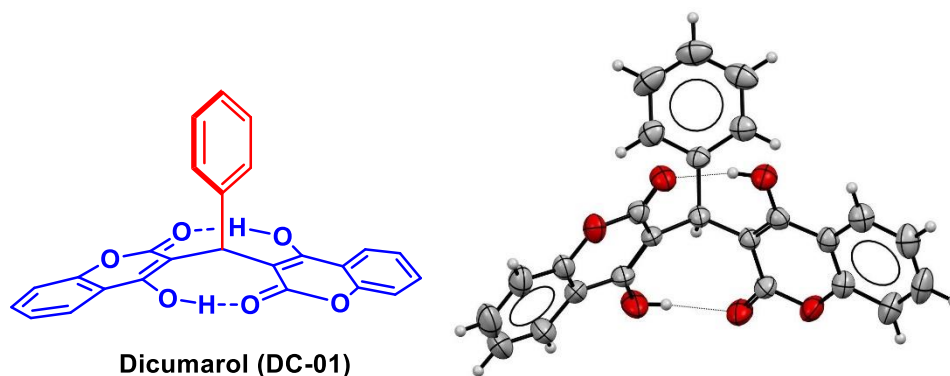
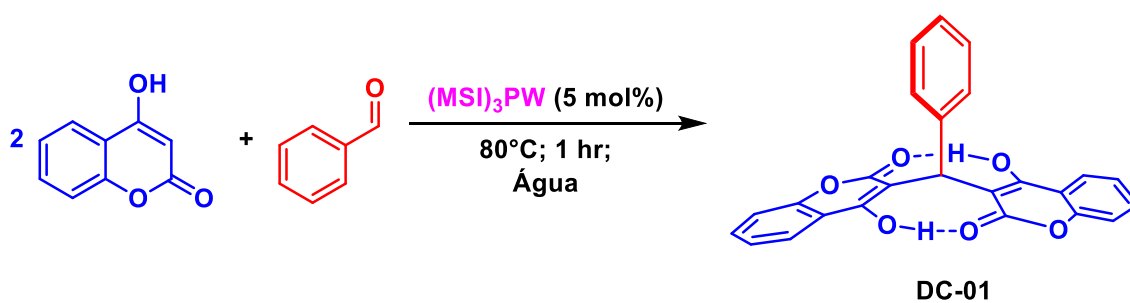


Figura 13. Estrutura para o produto formado na reação e raios-X de monocristal do **DC-01**.

Com esse resultado decidiu-se realizar a síntese do **DC-01** por meio de uma reação bimolecular (Esquema 15). As condições reacionais utilizadas foram as mesmas determinadas para a até então RMC da “**CPD**”. Após o término da reação, o precipitado branco foi filtrado e lavado com água e etanol. O **DC-01** foi obtido com um rendimento de 89%.



Esquema 15. Condições reacionais para a síntese do dicumarol (**DC-01**).

Para se certificar se a estrutura formada na reação foi de fato o **DC-01**, foram realizados diversos experimentos de caracterização. Portanto, para o **DC-01** foram feitos:

(i) ponto de fusão; (ii) RMN de ^1H e ^{13}C ; (iii) HRMS; (iv) RMN bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC).

Iniciando pelo ponto de fusão, o valor encontrado para a estrutura do **DC-01** foi de 230-231 °C, esse valor é condizente com os valores encontrados na literatura.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados na Figura 14. Notavelmente, no espectro de RMN de ^1H , todos os deslocamentos químicos dos sinais coincidiram com os valores teóricos, e suas integrações permitiram uma contagem precisa dos átomos de hidrogênio. O mesmo nível de consistência foi observado no espectro de RMN de ^{13}C , no qual foram identificados os 14 sinais de carbonos quimicamente distintos conforme o esperado.

Os experimentos de RMN bidimensionais (2D) apresentaram resultados semelhantes, esses estão ilustrados na Figura 15 até a Figura 17. No experimento de sequência de pulsos COSY (^1H -RMN de ^1H), foi possível identificar os sinais referentes ao núcleo da cumarina, uma vez que os hidrogênios estavam acoplado entre si e não com o hidrogênio benzílico da estrutura. Além disso, foi possível diferenciar os sinais dos hidrogênios do grupo fenila. Os experimentos 2D de HSQC e HMBC (^1H -RMN de ^{13}C) também confirmaram a consistência com a estrutura proposta para o **DC-01**.

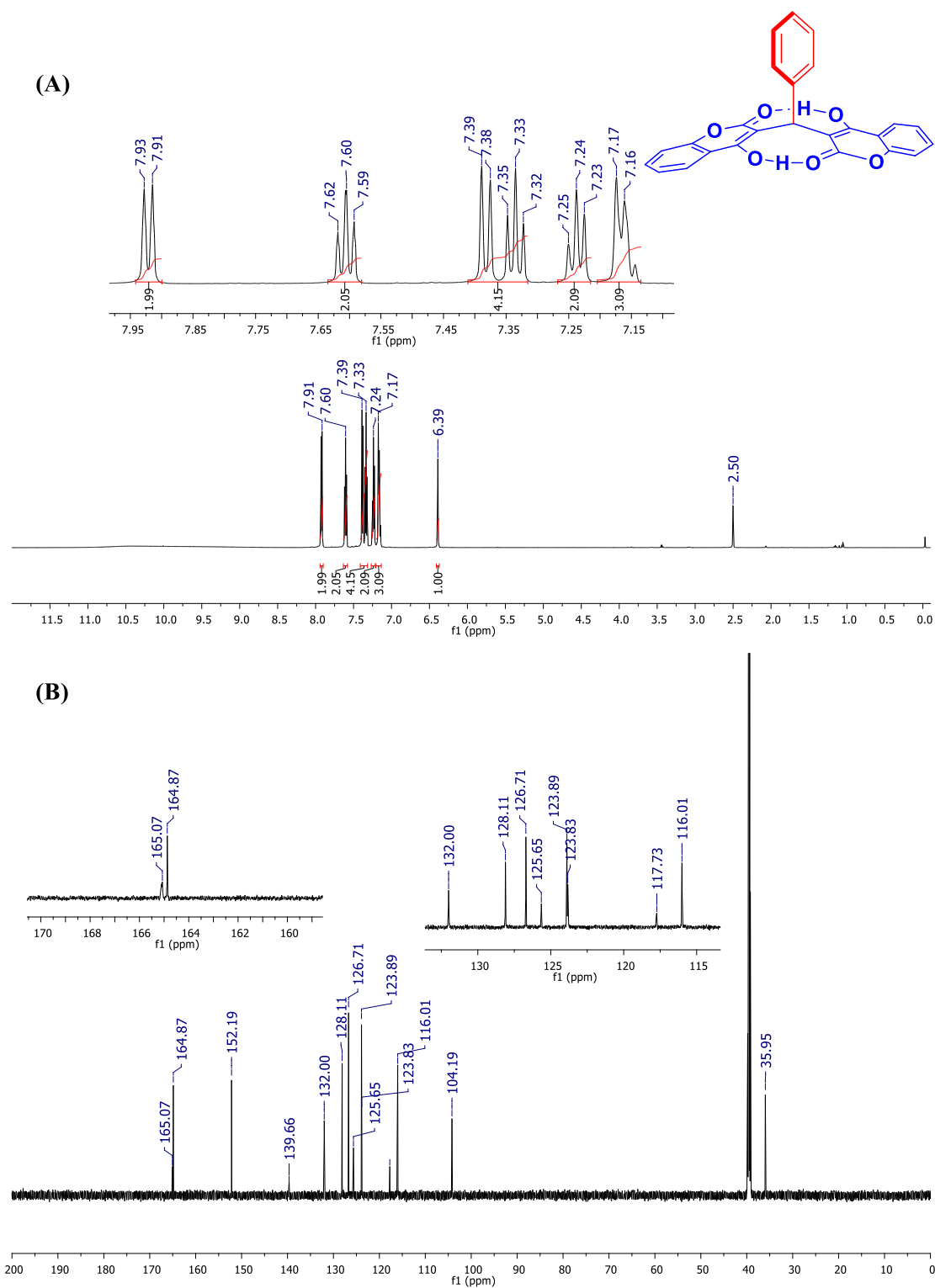


Figura 14. A) Espectro de RMN de ^1H para o DC-01 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$). B) Espectro de RMN de ^{13}C para o DC-01 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

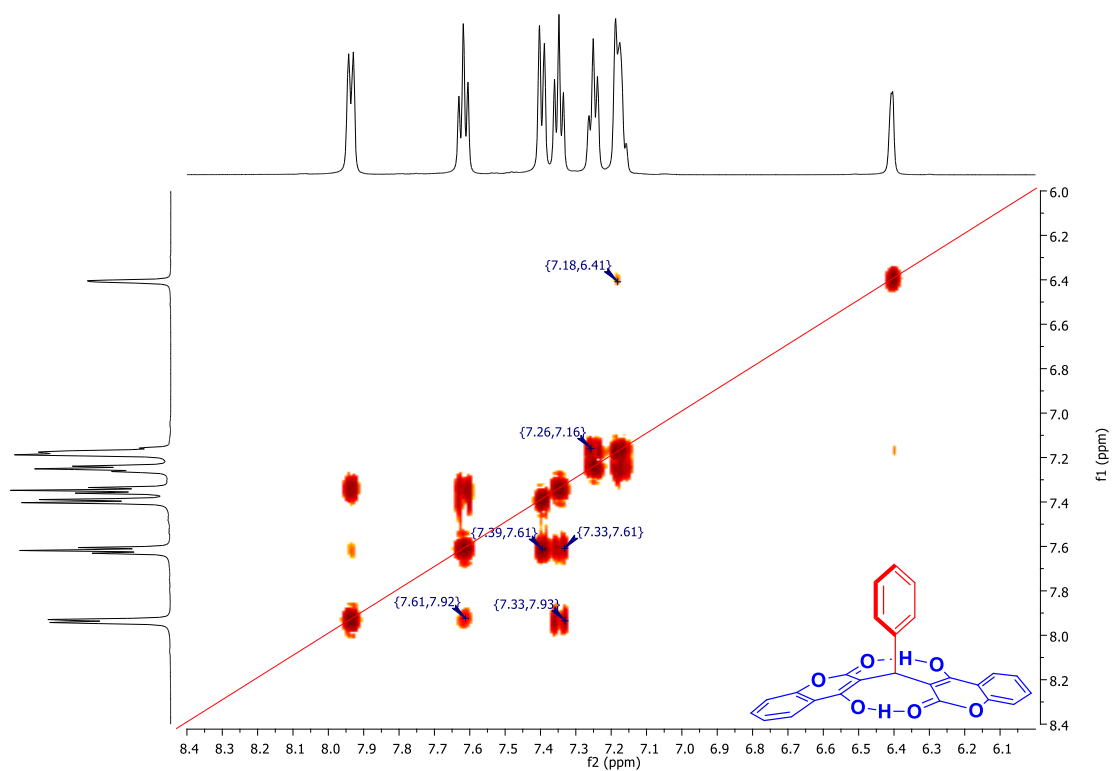


Figura 15. RMN de 2D COSY (600 MHz, DMSO- d_6) para o DC-01.

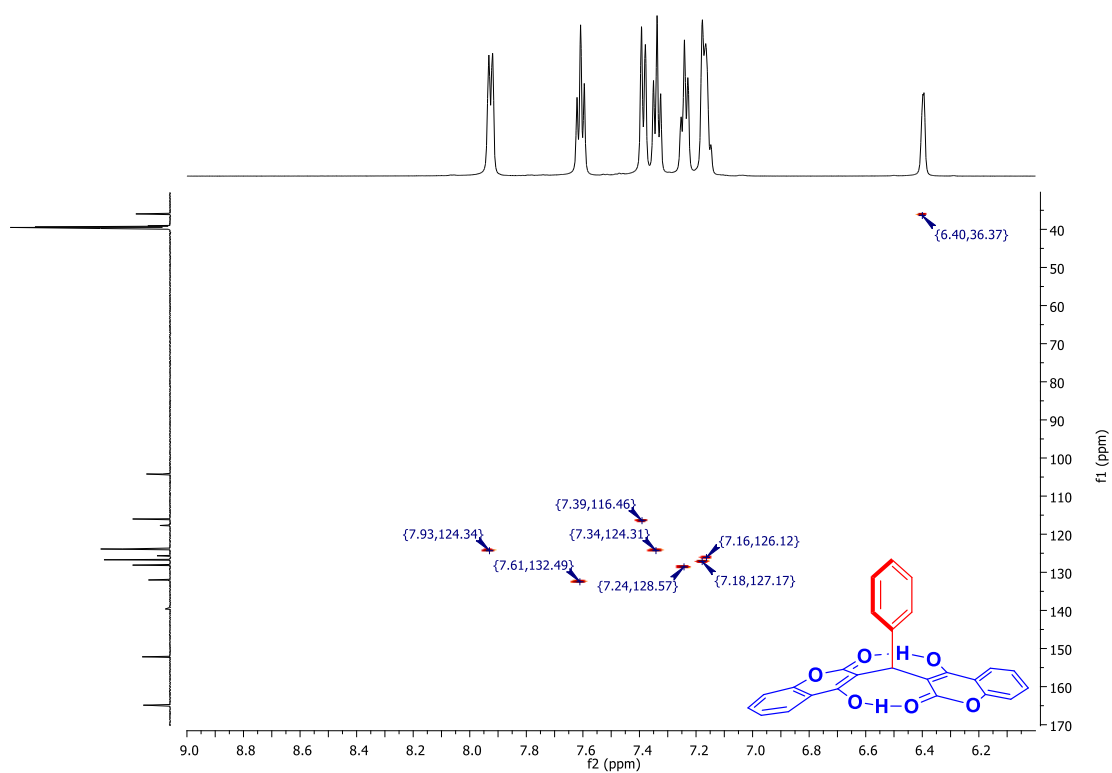


Figura 16. RMN de 2D HSQC (600 MHz e 150 MHz, DMSO- d_6) para o DC-01.

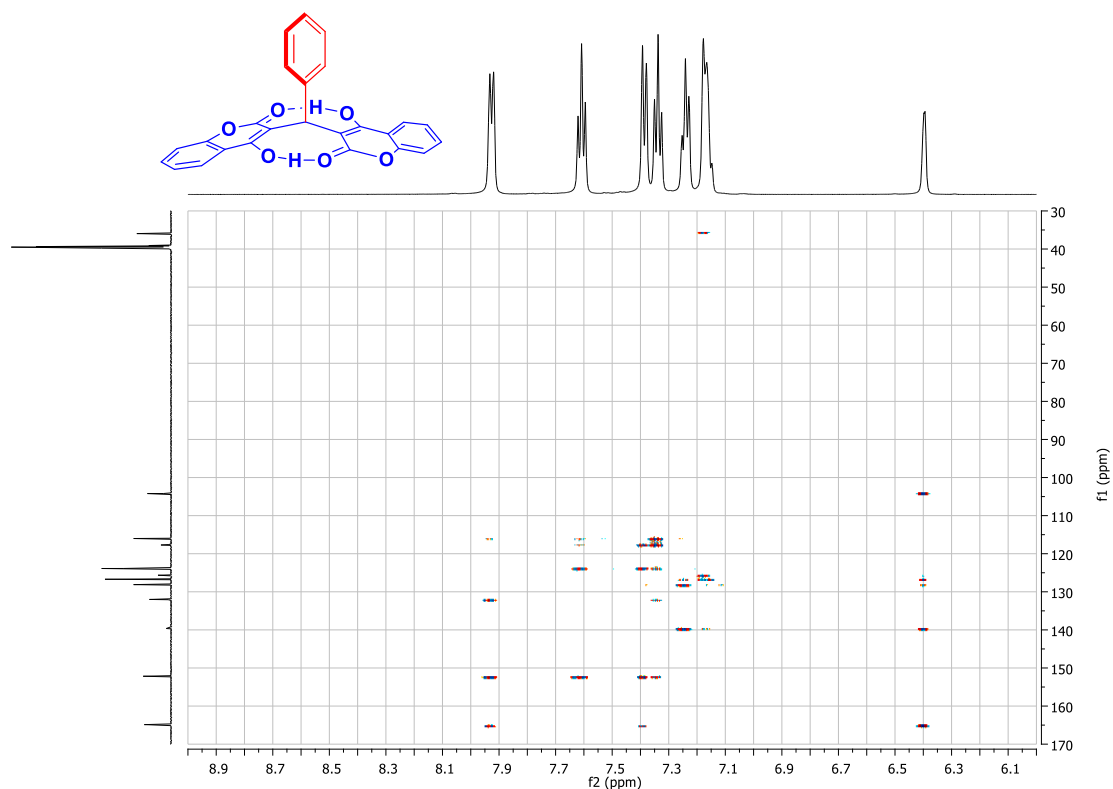


Figura 17. RMN de 2D HMBC (600 MHz e 150 MHz, DMSO- d_6) para o **DC-01**.

No experimento de HRMS também foi possível detectar a estrutura do **DC-01**. Realizou-se a espectrometria de massas para o **DC-01** utilizando a técnica ESI(+)-MS(/MS). No experimento, a estrutura foi detectada protonada $[M+H]^+$ com massa de 413,1019 Da, apresentando um erro de -0,2 ppm em relação à massa exata teórica de 413,1020 Da (o erro é calculado a partir da Equação 7). Além disso, também foi detectado o aduto do **DC-01** com sódio $[M+Na]^+$, com massa de 435,0841 Da. Os espectros de HRMS (MS e MS/MS) do **DC-01** estão exibidos na Figura 18.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{Massa}_{\text{detectada}} - \text{Massa}_{\text{teórica}}}{\text{Massa}_{\text{teórica}}} * 10^6 \quad (7)$$

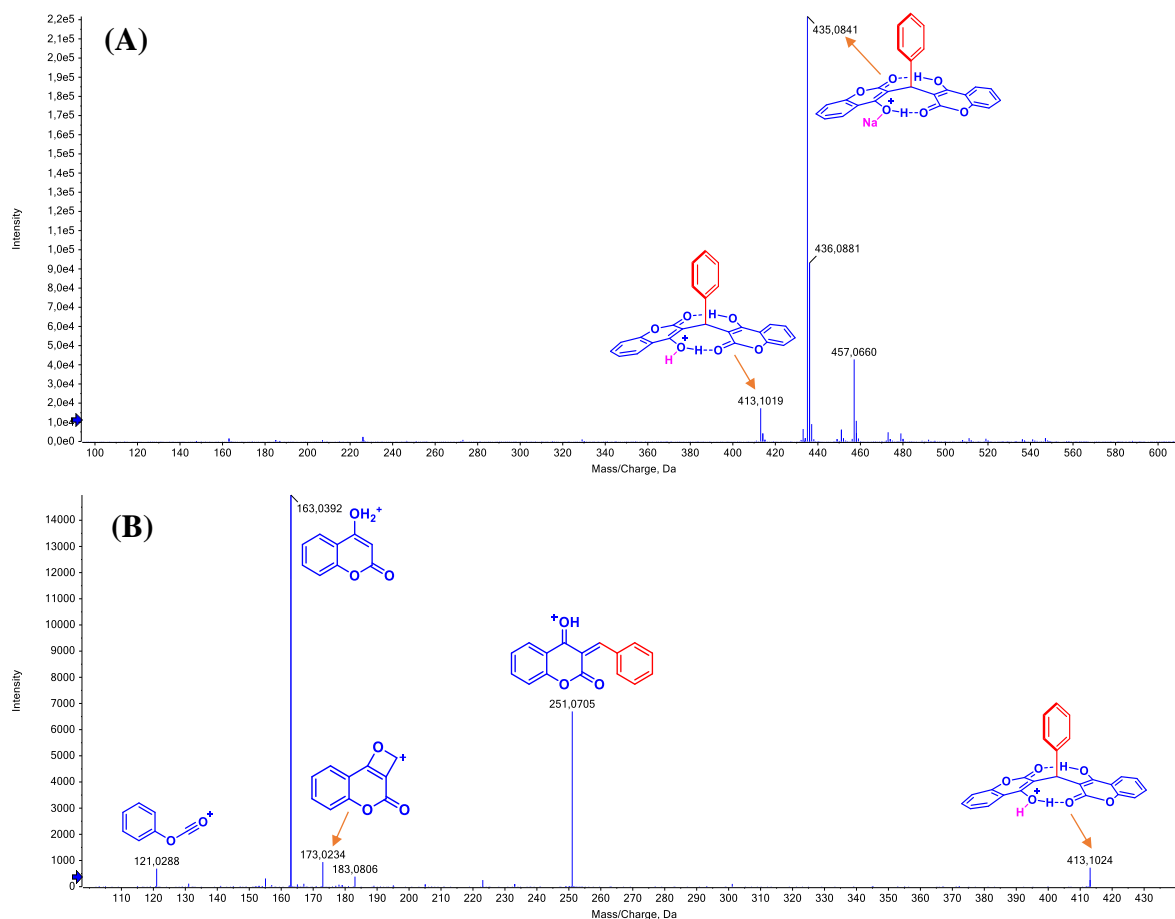


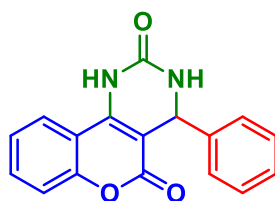
Figura 18. A) Espectro de ESI(+)-MS do **DC-01**. B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do **DC-01**.

Portanto, todos esses dados espectroscópicos confirmam que tanto na reação da "CPD-01" quanto na reação da **DPC**, o produto formado foi o **DC-01**. Isso se deve ao fato de que todas as técnicas utilizadas forneceram resultados consistentes apenas com essa estrutura.

Com esses resultados de que a formação da **CPD-01** não ocorreu, surgem algumas dúvidas acerca dos resultados encontrados na literatura. Existem diversos artigos que estudaram esta reação e afirmam ter chegado no produto esperado (**CPD-01**). Desse modo pareceu razoável investigar a fundo esses artigos e verificar se eles de fato chegaram na estrutura da **CPD-01**. O tópico a seguir é uma investigação detalhada dos artigos sobre esta RMC.

Investigação relacionadas à literatura que descrevem a síntese da CPD

Foram investigados os artigos cujo foco é a síntese da **CPD-01** (Figura 19). Para isso, foi realizado um levantamento das publicações que abordam o processo de síntese dessa substância. A pesquisa foi conduzida em 12/06/2023, utilizando a base de dados do *SciFinder*, com a estrutura alvo sendo a *3,4-Dihydro-4-phenyl-2H-[1]benzopyrano[4,3-d]pyrimidine-2,5(1H)-dione*. Na busca, foram identificados 23 artigos na base de dados, dos quais 21 estão disponíveis para consulta.



3,4-Dihydro-4-phenyl-2H-[1]benzopyrano[4,3-d]pyrimidine-2,5(1H)-dione (CPD-01)

Figura 19. Estrutura da **CPD-01** que foi pesquisada na base de dados do *SciFinder*.

Em seguida, foi feita uma análise detalhada dos dados de caracterização da **CPD-01** apresentados em cada trabalho, incluindo as técnicas utilizadas para caracterizar a estrutura, parâmetros físico-químicos, descrições e/ou apresentação dos espectros. Para análise dos dados, foram assumidas como essenciais as técnicas de PF, FTIR, ^1H e ^{13}C RMN, espectrometria de massa e análise elementar (CHN).

Inicialmente, cabe destacar a análise dos PFs. Observou-se que, em quase a totalidade das publicações, foram efetuadas medições dos PFs da **CPD-01**, com exceção do primeiro artigo datado de 2003, o qual não apresentou quaisquer outros dados de caracterização. É notável que a faixa de temperatura mais frequentemente reportada se situa entre 160-162 °C (conforme documentado em 9 artigos). Contudo, é importante salientar que existem registros com variações substanciais, alcançando valores tão elevados quanto 265-267 °C. Tais informações estão devidamente catalogadas na Tabela 5, a qual também assinala a presença de descrições e/ou espectros de FTIR nos artigos. A análise relativa aos espectros de FTIR será posteriormente abordada, após a minuciosa avaliação dos PFs.

Tabela 5. Artigos encontrados na base de dados do *SciFinder* sobre a síntese da **CPD-01** e os PFs relatados para a estrutura. Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições e/ou os espectros de FTIR.

Ano	PF (°C)	FTIR		Referência
		Descrição	Espectro	
2003	-	-	-	106
2006	162	Sim	Não	107
2008	162-163	Sim	Não	108
2014	210-212	Sim	Não	109
2015	265-267	Sim	Não	57
2016	162-163	Sim	Não	93
2016	160-162	Sim	Não	110
2017	160-162	Sim	Não	111
2018	160-162	Sim	Não	112
2018	160-162	Não	Não	68
2018	206	Sim	Não	113
2018	160-162	Não	Não	55
2018	238-240	Sim	Sim	52
2019	165-167	Não	Não	114
2019	160-162	Sim	Não	58
2020	163-165	Sim	Não	115
2020	211-213	Não	Sim	56
2020	160-162	Sim	Não	65
2022	162-163	Sim	Não	66
2022	160-162	Sim	Sim	67
2023	214-216	Sim	Sim	116

Sobre a variação PFs para a **CPD-01**, existem diversas razões que podem levar moléculas idênticas a apresentarem PFs diferentes. É importante listar essas causas a fim de compreender as variações observadas. As principais influências incluem: (i) diferenças nas condições experimentais, como taxa de aquecimento, variação do equipamento e possíveis erros humanos; (ii) presença de impurezas na amostra; (iii) a possibilidade de diastereoisômeros; e (iv) polimorfismo. Esses fatores podem contribuir para as discrepâncias nos pontos de fusão reportados, ainda assim, alguns desses podem gerar variações maiores ou menores, desse modo vale analisar quais fatores podem explicar essas variações. Para facilitar a discussão, na Figura 20 está expresso um histograma das faixas de PFs reportadas e suas respectivas frequências. As colunas de mesma cor representam que as faixas de PF estão próximas entre si e de cores diferentes significam que estão distantes entre as demais.

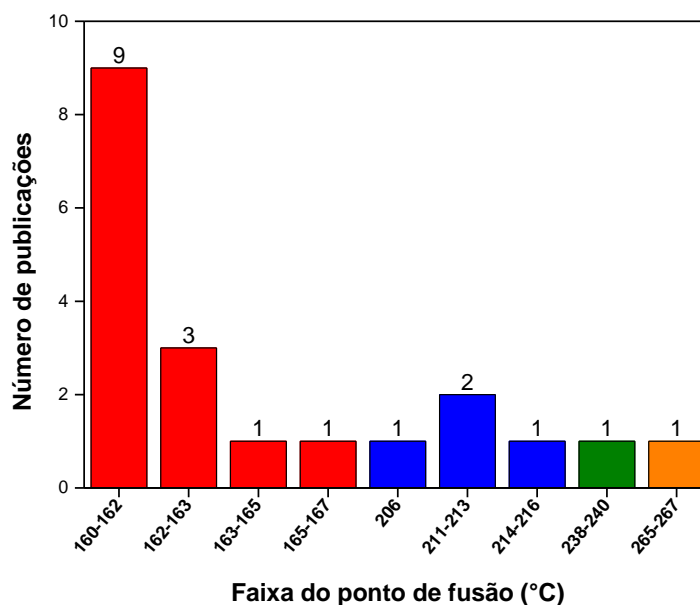


Figura 20. Histograma relacionando as faixas de ponto de fusão (°C) relatadas para a **CPD-01** com o número de publicações em que aparecem. As faixas de PF próximas entre si são representadas pelas colunas de mesma cor, enquanto as distantes entre as demais são representadas pelas cores diferentes.

Para elucidar as pequenas variações nas faixas de PF, pode-se considerar que elas possam ter origem nas diferenças experimentais, como a taxa de aquecimento e possíveis erros humanos. Apesar disso, esses fatores não conseguem explicar as grandes diferenças observadas nos PFs. Nesse sentido, os outros fatores podem desempenhar um papel importante e explicar as consideráveis variações observadas.

Uma possível explicação para as grandes diferenças nos PFs seriam os diastereoisômeros, dos quais podem apresentar PFs bastante distintos. Não obstante, no caso da **CPD** em questão, a estrutura proposta possui apenas um centro quiral, o que significa que só são possíveis a existência de enantiômeros, que possuem as mesmas propriedades térmicas. Portanto, embora os diastereoisômeros possam ser responsáveis por diferenças significativas nos PFs de algumas moléculas, no caso da **CPD**, a presença desses isômeros não é uma explicação plausível para as variações observadas nos PFs. Outros fatores, como polimorfismo ou impurezas, podem desempenhar um papel mais significativo nessas diferenças de PFs para a **CPD** em questão.

Polimorfismo é um fenômeno em que um composto pode existir em diferentes formas cristalinas, ou seja, pode adotar diferentes arranjos moleculares na estrutura cristalina.¹¹⁷ Essas diferentes formas podem apresentar propriedades físico-químicas

distintas, incluindo PFs diferentes. Considerando as variações nos PFs relatados para a **CPD**, inicialmente poderíamos pensar que o polimorfismo poderia ser uma explicação para essas diferenças. No entanto, ao analisar os artigos em que a **CPD** foi mencionada, observa-se que na maioria deles a **CPD** foi purificada de forma semelhante, em grande maioria por recristalização em etanol, logo é improvável que as diferenças significativas nos PFs sejam resultado do polimorfismo.

A presença de impurezas é o fator mais provável para explicar as discrepâncias nos pontos de fusão relatados. A técnica de medição de pontos de fusão é altamente sensível a impurezas, tornando-a excelente para verificar a pureza de um composto. De fato, as impurezas têm o potencial de reduzir ou ampliar significativamente a faixa de pontos de fusão de um composto, devido à formação de fases eutéticas.¹¹⁸ É importante ressaltar que as impurezas podem exercer um efeito significativo nas medidas de pontos de fusão, mesmo em concentrações muito baixas. Por consequência, a presença de impurezas deve ser considerada como um fator importante na explicação das variações nos PFs relatados.

Para testar se esse abaixamento da temperatura era causado por impureza foi realizada uma cromatografia em camada delgada (CCD) nos produtos obtidos, a fim de identificar as possíveis impurezas. Essa técnica é conhecida por sua sensibilidade na detecção de impurezas. Para fins de comparação, uma amostra conhecida de **DC-01** também foi adicionada na mesma CCD. O eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila com diclorometano na proporção 1:1 (v/v). A revelação da plaquinha foi feita em uma câmara escura com lâmpada com emissão em 365 nm. A CCD obtida pode ser visualizada na Figura 21.

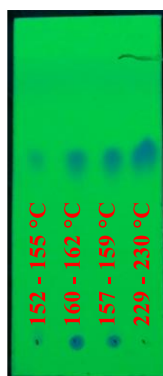


Figura 21. Cromatografia de camada delgada feita para os produtos obtidos nas reações de síntese da suposta **CPD-01**. Os três primeiros pontos (da esquerda para a direita) representam os produtos da reação da suposta **CPD-01**, o último ponto a direita é o **DC-01** puro.

Através da análise por CCD, foi possível constatar que os produtos que fundiam em temperaturas muito menores do que o PF do **DC-01**, estavam contaminados com impurezas que foram retidas no início da placa. A partir da análise de CHN (Tabela 4) foi possível estimar que a suposta **CPD-01** é uma mistura composta por 2 equivalentes do **DC-01** com um equivalente de ureia.

Com relação às técnicas espectroscópicas, o FTIR foi amplamente utilizado nos artigos para caracterizar a **CPD**, sendo em alguns casos a única técnica empregada. O FTIR fornece informações valiosas sobre a presença de grupos funcionais em uma molécula, tornando fácil a identificação de grupos como carbonilas, nitrilas, hidroxilas e aminas. Todavia, em muitos casos, essas informações não são suficientes para determinar com precisão a estrutura completa da molécula. Embora a maioria dos artigos descreva espectros de FTIR semelhantes, indicando a presença dos mesmos grupos funcionais nas estruturas sintetizadas, é digno de nota que os autores não disponibilizam os espectros para os leitores. Essa omissão prejudica a transparência e a replicabilidade dos estudos. A divulgação dos espectros de FTIR seria fundamental para uma melhor compreensão e validação dos resultados, além de possibilitar comparações e análises mais detalhadas.

Das quatro publicações que disponibilizaram o espectro de FTIR, é evidente a presença de uma carbonila de éster conjugada a uma ligação dupla devido ao sinal em torno de 1655 cm^{-1} , assim como a presença de uma ligação C=C pelo sinal em 1600 cm^{-1} . No entanto, ao analisar os números de onda mais energéticos, os dados começam a ser contraditórios. Em todas as publicações, são observados sinais de banda larga em torno de 3000 cm^{-1} , que podem indicar a presença de hidroxila (-OH), a qual não é esperada na estrutura proposta para a **CPD**. Além disso, em alguns espectros, não é observado o sinal referente ao N-H da amida, esperado em torno de 3300 cm^{-1} , enquanto em uma publicação é observado um sinal duplete em 3300 e 3200 cm^{-1} , característico dos estiramentos N-H de amidas primárias (R-CONH₂), o que poderia ser explicado pela presença de ureia. Essas observações fortalecem a hipótese de impurezas nas amostras.

Partindo agora para a técnica de espectrometria de massas e ao analisar os dados fornecidos pelos artigos (indicados na Tabela 6), é inegável que existem inconsistências de considerável gravidade, o que nos leva a questionar a integridade das publicações. Para uma compreensão mais profunda, é crucial esclarecer a distinção entre massa molecular e massa exata de um composto, bem como adentrar nas complexidades das técnicas

empregadas na espectrometria de massas e no processo de detecção das moléculas por essas técnicas.

Tabela 6. Artigos encontrados na base de dados do *SciFinder* sobre a síntese da **CPD-01**. Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições e/ou os espectros de massas.

Ano	Espectro de massas		Referência
	Descrição	Espectro	
2003	-	-	106
2006	Não	Não	107
2008	Sim	Não	108
2014	Não	Não	109
2015	Não	Não	57
2016	Não	Não	93
2016	Sim*	Não	110
2017	Não	Não	111
2018	Não	Não	112
2018	Sim*	Sim*	68
2018	Não	Não	113
2018	Sim*	Sim*	55
2018	Sim*	Não	52
2019	Não	Não	114
2019	Sim*	Sim*	58
2020	Sim*	Não	115
2020	Não	Não	56
2020	Não	Não	65
2022	Sim*	Não	66
2022	Não	Não	67
2023	Não	Não	116

* = Indicam a massa molecular da estrutura detectada (massa errada).

A massa molecular de um composto é calculada como a média ponderada das massas dos átomos que o compõem, levando em consideração as abundâncias relativas dos isótopos presentes na estrutura. Por outro lado, a massa exata de um composto considera apenas as massas específicas dos isótopos, sem levar em conta suas proporções. Vamos utilizar a **CPD-01** como exemplo para ilustrar esse conceito. A fórmula molecular da **CPD-01** é $C_7H_{12}N_2O_3$. Calculando a massa monoisotópica (massa exata considerando os isótopos mais abundantes) com alta exatidão, obtemos 292,0848 Da. No entanto, devido à presença natural de isótopos mais pesados dos átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, é possível que a molécula contenha pelo menos um desses átomos mais pesados, o que resulta em um aumento de 1 Da na massa total da molécula ou até

mesmo 2 Da, comumente visto em moléculas com muitos átomos de oxigênios, devido ao isótopo ^{18}O . Levando em conta a abundância desses isótopos, também é possível estimar a porcentagem de moléculas de **CPD-01** que possuem pelo menos um desses isótopos mais pesados em sua estrutura. Para a **CPD-01**, essa estimativa seria a seguinte: 82,6% das moléculas teriam massa exata igual a 292,0848 Da, 15,4% teriam massa igual a 293,0881 Da e 2,0% teriam massa igual a 294,0915 Da. Esse padrão de distribuição de massa é conhecido como padrão isotópico e é extremamente importante e útil para caracterizações moleculares. Por outro lado, para determinar a massa molecular da **CPD-01**, é feita a média ponderada das massas, considerando as abundâncias relativas dos isótopos. Portanto, a massa molecular da **CPD-01** seria aproximadamente 292,28 g mol⁻¹.

Nesse contexto, é importante ressaltar que as técnicas de espectrometria de massas não detectam a massa molecular de um composto, pois esse valor é uma média ponderada. Nos espectros de massas, são detectadas as massas exatas dos íons dos compostos. Nesse contexto, por exemplo, em uma análise de massas para a **CPD-01** por meio da ionização por impacto de elétrons (IE), em um equipamento com resolução de até duas casas decimais, seria esperado detectar uma massa próxima de 292,08 Da. Caso o experimento seja conduzido em um equipamento com ionização por electrospray (ESI), a massa detectada seria de 293,09 Da, pois nessa técnica a molécula é ionizada quimicamente e sua estrutura é protonada. Nesse caso, a notação para as estruturas detectadas seria $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Após essa breve explicação sobre esses conceitos, vamos agora analisar os dados de massa apresentados nos artigos. Dos oito artigos que relatam terem realizado espectrometria de massas, sete indicam a detecção de uma massa de 292,30 Da, um valor que se aproxima consideravelmente da massa molecular da **CPD-01**. No entanto, é importante ressaltar que tal valor não pode ser obtido por meio de uma análise de massas quando se utiliza um equipamento calibrado. Além disso, nos artigos é mencionado que a técnica utilizada foi a ESI-MS, o que indica que a massa que deveria ser encontrada seria $[\text{M}+\text{H}]^+$, totalizando 293,09 Da e não 292,30 Da. Por fim, chama a atenção o fato de que três dos artigos apresentam espectros idênticos.^{55,58,68}

Com essa análise minuciosa dos dados de massa mencionados nos artigos, conclui-se que os valores de massa informados não correspondem à **CPD-01**, levantando dúvidas em relação à veracidade dos dados apresentados.

Ao analisar os dados de CHN apresentados nas publicações (conforme indicado na Tabela 7), é notável que, em sua maioria, esses dados refletem com acurácia as proporções esperadas para a fórmula molecular da **CPD**. Contudo, é relevante observar que em dois dos artigos revisados, os valores obtidos não correspondem ao esperado. Além disso, chama a atenção o fato de que em três dessas publicações, os valores de CHN são idênticos, esses valores estão marcados em vermelho na Tabela 7. Essa repetição notável de dados suscita dúvidas quanto à confiabilidade dos resultados apresentados, uma vez que é pouco comum que análises de caracterização química resultem em valores absolutamente idênticos. Adicionalmente, é notável que em uma das publicações, o valor experimental coincide exatamente com os valores teóricos esperados, o que implicaria em uma acurácia de 100% - algo raro e difícil de se alcançar nesse tipo de análise.

Esses resultados corroboram para o indicativo de que os resultados apresentados não são fidedignos para a estrutura da **CPD-01**.

Tabela 7. Artigos encontrados na base de dados do *SciFinder* sobre a síntese da **CPD-01**. Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições para a análise CHN, a acurácia com relação aos valores esperados para a estrutura **CPD-01**.

Ano	Análise elementar (CHN)				Referência
	Descrição	Acurácia	Calculado (%)	Encontrado (%)	
2003	-	-	-	-	106
2006	Sim	Sim	C 69,88; H 4,10; N 9,58	C 69,80; H 4,01; N 9,49	107
2008	Sim	Sim	C 69,86; H 4,10; N 9,58	C 69,85; H 4,14; N 9,56	108
2014	Não	-	-	-	109
2015	Sim	Sim	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 69,67; H 4,11; N 9,61	57
2016	Sim	Não*(a)	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 69,64; H 3,96; N 9,69	93
2016	Não	-	-	-	110
2017	Não	-	-	-	111
2017	Não	-	-	-	112
2018	Sim	Sim	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 70,02; H 4,18; N 9,69	68
2018	Não	-	-	-	113
2018	Sim	Sim	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 70,02; H 4,18; N 9,69	55
2018	Sim	Sim	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 70,00; H 4,27; N 9,60	52
2019	Não	-	-	-	114
2019	Sim	Sim	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 70,02; H 4,18; N 9,69	58
2020	Sim	Sim	Não informado	C 69,86; H 4,14; N 9,58;	115
2020	Não	-	-	-	56
2020	Sim	Sim	C 69,86; H 4,14; N 9,58	C 69,92; H 4,22; N 9,70	65
2022	Sim	Não*(b)	C 69,86; H 4,10; N 9,58	C 69,85; H 4,14; N 5,30	66
2022	Não	-	-	-	67
2023	Não	-	-	-	116

* = Fórmula química calculada baseada no CHN experimental: (a) $C_{17}H_{11}N_2O_3$; (b) $C_{31}H_{22}N_2O_7$. Os resultados das análises elementares em vermelho destacam que os valores estão duplicados. O valor destacado em azul indica que o valor obtido é exatamente igual ao valor teórico.

Prosseguindo com a discussão sobre os artigos e as técnicas espectroscópicas utilizadas, na Tabela 8 estão indicados se os artigos apresentam as descrições dos dados ^1H e/ou RMN de ^{13}C e se disponibilizam os espectros. De início, é possível observar a vasta ausência dos espectros nas análises de tanto de ^1H quanto para RMN de ^{13}C . Além disso, cerca de 50% das publicações descrevem apenas os espectros de RMN de ^1H , o que restringe severamente a avaliação e compreensão por parte dos leitores. Ainda mais preocupante é o fato de que os poucos espectros apresentados estão em baixa resolução, dificultando uma análise criteriosa. É alarmante perceber que, das poucas publicações que mostraram os espectros (apenas 7), 4 delas apresentam espectros duplicados, no qual os deslocamentos químicos, as integrações e até mesmo os ruídos são idênticos.^{55,58,68,110} Essa observação levanta questionamentos sobre a confiabilidade dos dados apresentados. A prática de copiar e colar os espectros em publicações científicas é altamente condenável. Com relação aos dados espectroscópicos apresentados nos artigos, é importante ressaltar que há um sinal comum em todos os trabalhos de RMN de ^1H , um sinal simpleto em torno de 6,1 ppm quando o experimento é realizado em CDCl_3 e cerca de 6,3 ppm quando realizado em $\text{DMSO}-d_6$. O deslocamento deste sinal, como visto anteriormente é característico do hidrogênio benzílico do **DC-01** (veja o espectro de RMN na Figura 14) e o valor esperado para o hidrogênio benzílico da **CPD-01** deveria aparecer em torno de 5,13 ppm.

Tabela 8. Artigos encontrados na base de dados do *SciFinder* sobre a síntese da **CPD-01**. Na tabela está indicado se estes artigos mostram as descrições e/ou os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Ano	RMN de ^1H		RMN de ^{13}C		Referência
	Descrição	Espectro	Descrição	Espectro	
2003	-	-	-	-	106
2006	Sim	Não	Não	Não	107
2008	Sim	Não	Não	Não	108
2014	Sim	Não	Sim	Não	109
2015	Sim	Não	Sim	Não	57
2016	Sim	Não	Não	Não	93
2016	Sim	Sim*	Sim	Sim	110
2017	Sim	Não	Não	Não	111
2018	Sim	Não	Sim	Não	112
2018	Sim	Sim*	Sim	Sim*	68
2018	Sim	Não	Sim	Não	113
2018	Sim	Sim*	Sim	Sim*	55
2018	Sim	Sim	Sim	Não	52
2019	Sim	Sim	Não	Não	114
2019	Sim	Sim*	Sim	Sim*	58
2020	Sim	Não	Sim	Não	115
2020	Não	Não	Não	Não	56
2020	Sim	Não	Sim	Não	65
2022	Sim	Não	Não	Não	66
2022	Não	Não	Não	Não	67
2023	Sim	Sim	Não	Não	116

* = indicam os artigos que têm os espectros duplicados entre si.

Em resumo, nas técnicas analisadas, constatou-se consistentes discrepâncias entre as publicações no que diz respeito à estrutura da **CPD-01**, o que levanta questões significativas sobre a validade da estrutura proposta. Além disso, identificou-se ausência de dados e erros substanciais que minam a confiabilidade das informações. Além disso, vale ressaltar a presença de sinais diagnósticos do **DC-01** nos espectros de RMN de ^1H (sinal simpleto em $\delta \approx 6,3$ para $\text{DSMO}-d_6$ e $\delta \approx 6,1$ para CDCl_3). A partir desses indícios, torna-se evidente que, nos artigos examinados, a síntese da **CPD-01** não foi efetivamente alcançada, resultando na formação do **DC-01** como o principal produto.

Tentativas de reprodução da literatura para a síntese da CPD-01

As evidências espectroscópicas disponibilizadas nos artigos investigados indicaram fortemente a formação do **DC-01** ao invés da **CPD-01** por parte dos pesquisadores. Por conseguinte, optou-se por replicar algumas das condições experimentais descritas em diferentes publicações, a fim de verificar e validar a estrutura proposta para a **CPD-01**.

Nesse sentido, a primeira abordagem seguiu os parâmetros apresentados por Pramod K. Sahu e colaboradores,⁵⁸ que empregou 5 mmol dos reagentes (4-hidroxicumarina, benzaldeído e ureia), 10 mol% de L-prolina como catalisador, 10 mL de água como solvente e utilizou radiação de micro-ondas (300 W) por 10 min a 70 °C. Ressalta-se que Sahu descreveu, em seu trabalho, uma metodologia de síntese assimétrica para a **CPD-01** e reportou valores de excesso enantiomérico (ee) substanciais, superiores a 95%. Essas condições foram adaptadas no laboratório, com uma pequena variação na escala de reação, empregando 1 mmol dos reagentes e 2 mL de água para reproduzir a reação. Foi constatada a formação de um precipitado branco após o tempo de reação, o qual foi purificado conforme a metodologia indicada no artigo original.

No entanto, após a análise de P.F. e dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, verificou-se que o produto obtido correspondia ao **DC-01**. O P.F. atingido situou-se na faixa de 230-321 °C, e os espectros de RMN exibiram o sinal simpleto característico do **DC-01** em $\delta \approx 6,3$ ppm, confirmado a formação do **DC-01** em detrimento da **CPD-01**. Este desdobramento experimental levanta indagações em relação à capacidade de Sahu de obter um alto ee com a metodologia mencionada, visto que o produto formado (**DC-01**) não apresenta centros quirais, suscitando dúvidas sobre a validade dos valores de excesso enantiomérico previamente relatados.

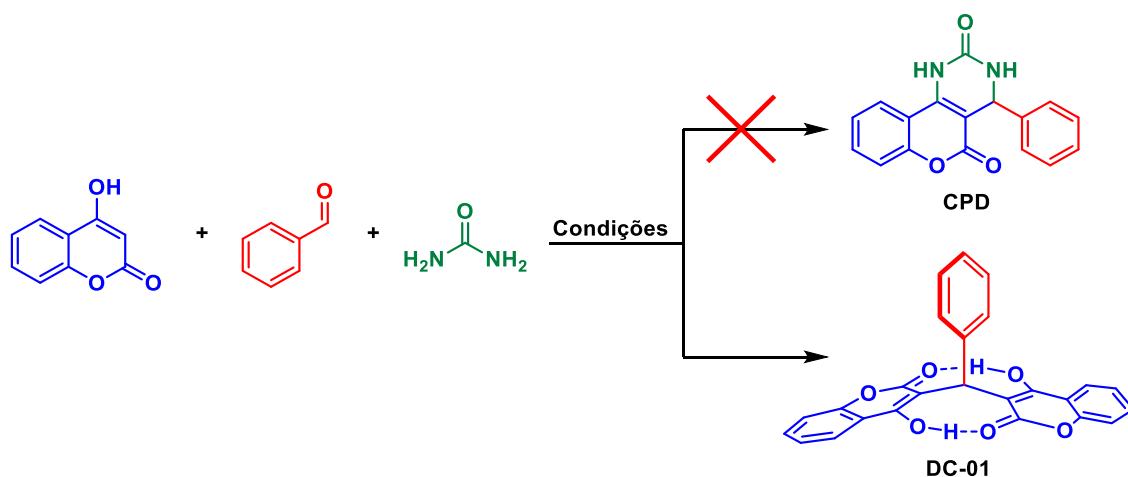
Outras tentativas de reprodução das condições mencionadas na literatura foram realizadas, com foco em dois artigos específicos. Os referidos artigos, publicados por Hossein Mehrabi e colaboradores,⁶⁰ bem como por Pramod K. Sahu e colaboradores,⁵⁹ detalhavam a utilização do surfactante SLS como facilitador da reação, em combinação ou não com catalisadores ácidos.

No protocolo proposto por Mehrabi, 1 mmol dos reagentes 4-hidroxicumarina e benzaldeído, juntamente com 1,5 mmol de ureia, foram misturados em 10 mL de água como solvente, mantendo uma temperatura de 100 °C por 6 h. Duas gotas de ácido acético

foram adicionadas como catalisador, juntamente com 20 mol% de SLS. Essas condições foram reproduzidas no laboratório, resultando na formação do composto **DC-01**. A confirmação da estrutura formada foi obtida por meio de análises de P.F. e espectroscopia RMN de ^1H .

Em seguida, o protocolo descrito por Sahu envolveu o uso de 2 mmol dos reagentes, 10 mL de água como solvente, manutenção da temperatura ambiente por 4,5 h e a presença de 10 mol% de SLS. Apesar da reprodução rigorosa dessas condições, o produto formado, mais uma vez, consistiu no **DC-01**, sem qualquer indício da formação da **CPD-01**.

Em resumo, embora nem todas as condições descritas nos 21 artigos que abordam a formação da **CPD-01** tenham sido reproduzidas, a conclusão geral permanece a mesma: a síntese da **CPD-01** não foi alcançada e o produto formado nos artigos analisados é o **DC-01**. Isso é evidenciado pelos dados espectroscópicos fornecidos nas publicações, que indicam claramente que o produto formado foi o **DC-01**, além das reproduções das condições descritas não levarem ao produto desejado, colocando a reprodutibilidade das condições em questão. Até o momento da pesquisa, todas as condições testadas levaram a formação da **DC-01**, conforme expresso no Esquema 16. Diante dessa constatação, é válido realizar um estudo mais aprofundado desta reação, a fim de explorar a possibilidade de sintetizar a **CPD-01**.

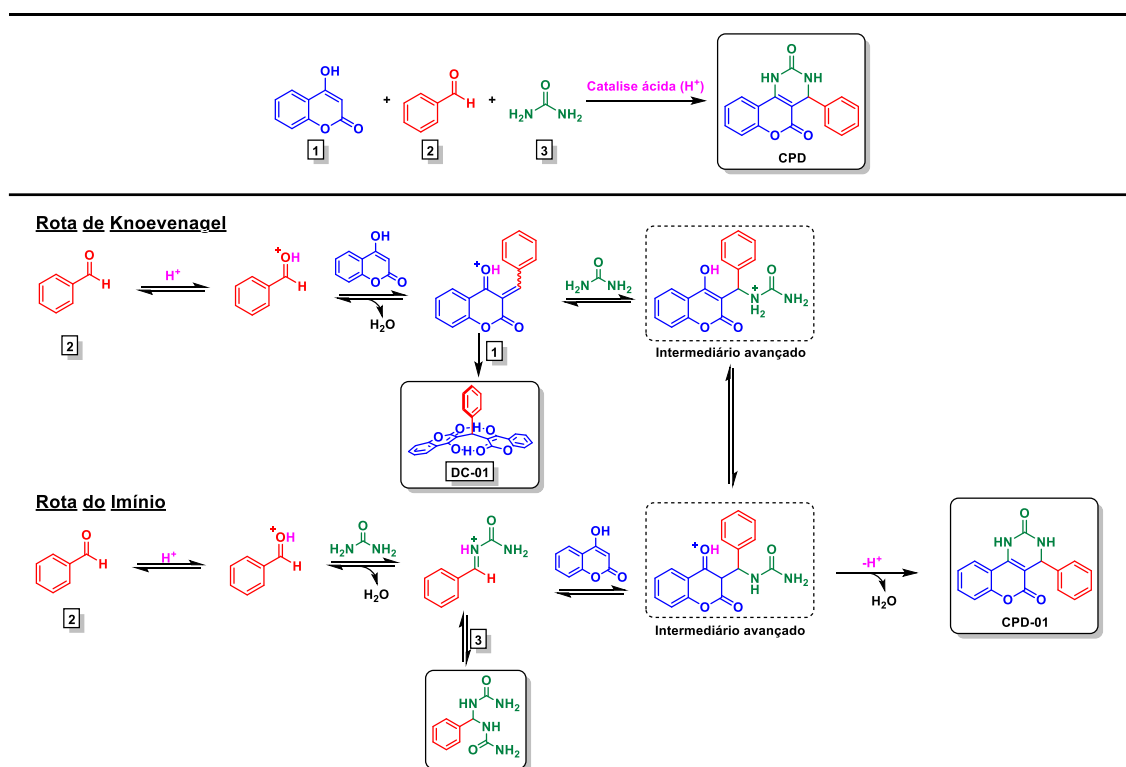


Esquema 16. Em todas as condições testadas o produto formado foi o **DC-01**.

Estudo mecanístico, efeito de solvente e acompanhamento da reação da CPD por ESI(+)-MS

Com o intuito de aprofundar a investigação desta reação, é uma estratégia válida explorar os mecanismos e intermediários que surgem durante esta RMC. É relevante discutir os possíveis mecanismos envolvidos na formação da **CPD-01** e conduzir experimentos para detectar seus intermediários-chave. Essas informações se mostrarão essenciais para determinar a viabilidade de obter a estrutura **CPD-01** sob as condições da RMC.

Inicialmente, é imperativo analisar os possíveis mecanismos que podem conduzir à formação da **CPD-01**. Com base nos três mecanismos típicos de uma reação de Biginelli (Knoevenagel, imínio e enamina), como apresentado anteriormente, essas propostas mecanísticas podem ser adaptadas para algumas variações da reação de Biginelli, uma vez que os reagentes apresentam semelhanças funcionais. Portanto, examinamos as três propostas mecanísticas para a síntese do **DC-01**. As possíveis rotas mecanísticas estão apresentadas no Esquema 17.



Esquema 17. Representação dos mecanismos propostos para a reação de síntese da **CPD** com os subprodutos possíveis da reação. Os mecanismos da enamina não foi representado por não ser viável nas condições reacionais.

Com relação aos mecanismos apresentados apenas a rota de Knoevenagel e do imínio estão sendo considerados. Haja visto que a 4-hidroxycumarina está predominantemente em sua forma enólica e não há evidências da presença do tautômero ceto,⁹⁶ logo, é possível descartar o mecanismo da enamina, uma vez que esse caminho requer que a cumarina esteja na forma ceto.

Analisando as rotas, é possível identificar intermediários-chave. Na rota de Knoevenagel, o intermediário-chave é a estrutura o aduto de Knoevenagel, a partir da qual a reação pode seguir por dois caminhos. (i) A adição da ureia, levando à formação da **CPD** e (ii) uma segunda adição de cumarina que leva à formação do **DC-01**. A princípio, a segunda adição da cumarina parece ser favorecida, visto que o produto real das reações é o **DC-01**. Caso ocorra a adição da ureia neste intermediário, isso levaria à formação de outro intermediário-chave (intermediário avançado), a partir do qual ocorreria uma ciclização intramolecular para formar a **CPD**.

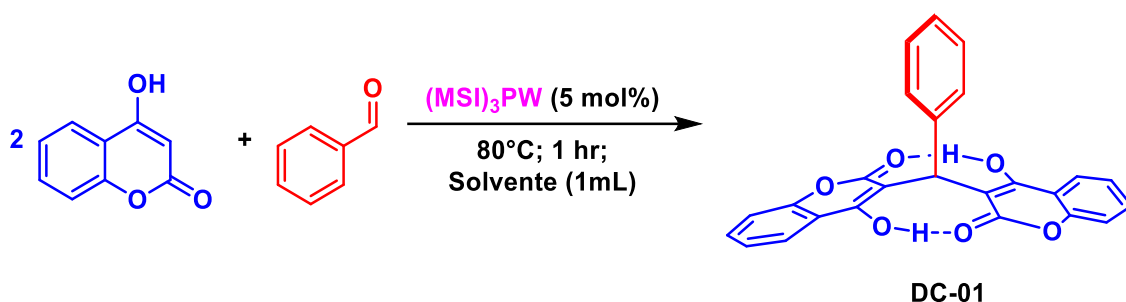
Na rota do imínio, o intermediário-chave é a estrutura do imínio, deste intermediário a rota se divide. (i) Pode ocorrer a formação do subproduto bisureída, a partir de uma segunda adição de ureia ou (ii) a adição da cumarina para gerar o intermediário avançado, que, por sua vez, levaria à formação da **CPD**.

Nesse contexto, é notável que podem ocorrer a formação de dois subprodutos, o **DC-01** e o bisureída, antes da formação da **CPD**. Também é importante ressaltar que o intermediário avançado (ver Esquema 17) é comum às duas rotas, sugerindo que, mesmo que a reação ocorra exclusivamente pelo caminho do imínio, ainda é possível a formação do **DC-01**, uma vez que todas as adições são reações de equilíbrio. No entanto, espera-se que se a reação ocorrer exclusivamente pelo caminho do imínio, o intermediário avançado seria formado preferencialmente e haveria uma maior probabilidade de ocorrer a ciclização intramolecular e formar a **CPD**.

Após compreender todas as possíveis rotas e seus intermediários-chave para a formação da **CPD**, sabe-se também que o solvente utilizado em uma reação pode exercer influência nas rotas mecanísticas, especialmente em reações de múltiplos caminhos possíveis, como as RMCs. Portanto, no contexto da RMC da **CPD**, a estratégia de variar o solvente para favorecer a rota do imínio e/ou dificultar a rota de Knoevenagel, bem como a segunda adição da cumarina ao intermediário de Knoevenagel no qual acabaria

por formar o **DC-01**, apresenta-se como uma abordagem interessante na busca pela formação da **CPD-01**.

Seguindo essa lógica, como o intuito é desfavorecer a rota de Knoevenagel ou a segunda adição da cumarina no intermediário imínio (ver Esquema 17) qualquer das condições deveria refletir no rendimento da síntese do **DC-01**. Portanto, a reação bimolecular da **DC-01** foi conduzida em diversos solventes (ver Esquema 18), com o objetivo paradoxal de identificar os solventes que resultariam nos rendimentos mais baixos.



Esquema 18. Condições de síntese do **DC-01** com a variação dos solventes.

Foram avaliadas um total de 24 condições distintas, das quais 22 envolviam solventes diferentes. Os resultados de rendimento obtidos para cada variação de solvente estão detalhados na Tabela 9. Nos testes realizados, alguns solventes causaram uma redução significativa no rendimento da reação. Destaca-se, por exemplo, o *p*-Cimeno, o qual, nas condições de reação, levou à formação do **DC-01** com um rendimento de apenas 1%. Os solventes que resultaram nos menores rendimentos estão identificados em amarelo na Tabela 9. Esses resultados evidenciam o papel ativo dos solventes na reação, uma vez que foi observado uma grande variação dos rendimentos em função da mudança do solvente.

Tabela 9. Valores de rendimento na síntese da **DC-01** em função do solvente utilizado na reação. Os solventes destacados em indicam os piores rendimentos, abaixo de 20%.

Solvente (1mL)	Rendimento	Solvente (1mL)	Rendimento
BMI.BF ₄	95%	Acetonitrila	36%
Água	88%	Dioxano	27%
Sem Solvente	87%	Diclorometano	27%
Etanol	86%	Tetraidrofurano	26%
BMI.PF ₆	85%	Trietilamina	26%
BMI.NTf ₂ (0,2mL)	85%	Tolueno	19%
Metanol	72%	Acetato de etila	18%
<i>t</i> -Butanol	67%	Hexano	14%
Água (sem catalisador.)	61%	Limoneno	13%
n-Octanol	59%	Ciclohexano	11%
Acetona	59%	CHCl ₃	11%
2,2,2-Trifluoroetanol	52%	<i>p</i> -Cimeno	1%

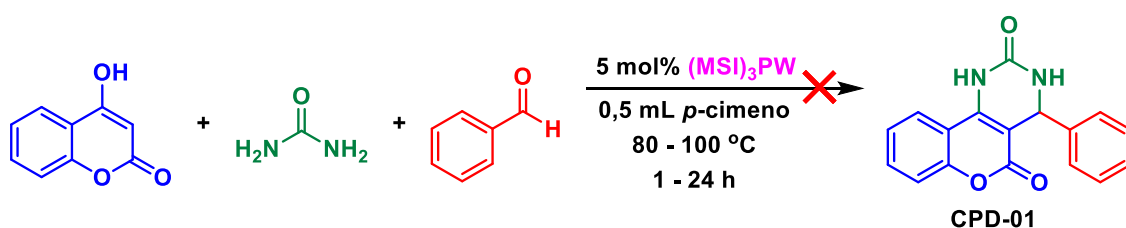
Ao examinar os solventes que resultaram nos rendimentos mais baixos na síntese do **DC-01**, foi observado que eles exibiam valores mais baixos do parâmetro $KT \alpha$ em comparação com os demais solventes. Os valores dos parâmetros de KT para os solventes destacados estão expressos na Tabela 10. Esses dados estão em consonância com os resultados do primeiro estudo de efeito de solvente realizado para a síntese da "**CPD-01**" (consulte a Figura 10B), que indicou que valores elevados do parâmetro $KT \alpha$ estavam associados aos maiores rendimentos. Portanto, a redução desse parâmetro está correlacionada com rendimentos mais baixos.

Tabela 10. Valores dos parâmetros de KT (α , β e π^*) para os solventes que induziram os piores rendimentos para a síntese do **DC-01**. Note que o parâmetro α é igual a zero para a maior parte dos solventes.

Solvente	α	β	π^*
Acetato de etila	0,00	0,45	0,55
CHCl ₃	0,20	0,10	0,58
Ciclohexano	0,00	0,00	0,00
Hexano	0,00	0,00	-0,04
Limoneno	0,00	0,00	0,16
<i>p</i> -Cimeno	0,00	0,13	0,39
Tolueno	0,00	0,11	0,54

Desse modo, como o *p*-cimeno foi o solvente que levou ao pior rendimento da **DC-01**, indicando que ele prejudica de forma substancial a rota de Knoevenagel e/ou a segunda adição da cumarina no intermediário de Knoevenagel gerando a **DC-01**, com isso pensou-se que com esse solvente seria possível chegar na estrutura da **CPD-01**. Portanto, ele foi usado para a tentar chegar na síntese da **CPD-01**.

Foram realizados diversos experimentos com a intenção de sintetizar a **CPD-01**, utilizando o *p*-cimeno como solvente nas condições descritas no Esquema 19. Os testes incluíram variações nos tempos de reação, na temperatura e na ordem de adição dos reagentes.



Esquema 19. Tentativa de síntese da **CPD-01** utilizando o *p*-cimeno como solvente. Contudo, o produto formado nessas sínteses foi o **DC-01**.

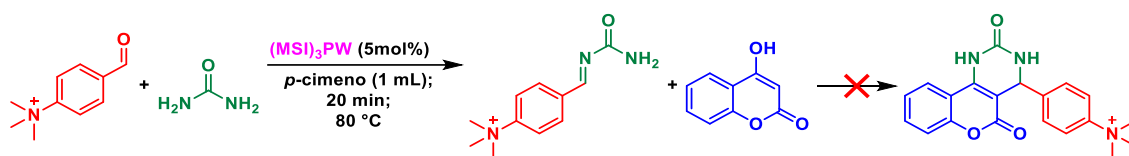
Inicialmente, as reações foram conduzidas com a adição simultânea dos três reagentes em um balão e mantidas a 80 °C por diferentes períodos: 1, 2 e 4 h. No entanto, em nenhum desses testes, a formação da **CPD-01** foi detectada por análise de HRMS. Em todas as condições, o produto detectado foi o **DC-01**.

Em seguida, outra reação foi realizada com a adição simultânea dos reagentes, mas a temperatura foi mantida a 100 °C por 2 h. Novamente, a análise por HRMS não detectou a presença da **CPD-01**.

Em seguida, conduziu-se mais uma reação, porém, com uma alteração na sequência de adição dos reagentes. Inicialmente, apenas a ureia e o benzaldeído foram introduzidos na mistura reacional, e essa combinação foi mantida a 80 °C por 1 h, com o objetivo de favorecer a formação preferencial do intermediário imínio e direcionar completamente a rota do imínio. Após o término do primeiro período reacional, a cumarina foi adicionada, e a reação prosseguiu por mais 1 h. Posteriormente, a mistura reacional passou por análise por HRMS, e mais uma vez, não foi detectada a formação da **CPD-01**, mas sim a formação do **DC-01**.

Diante da falta de sucesso dos experimentos anteriores na formação da **CPD-01**, adotou-se uma abordagem alternativa para detectar a molécula em nível traço, caso ela fosse formada, usando HRMS. Essa técnica é reconhecida por sua robustez e eficácia para o acompanhamento de RMCs.¹⁰¹ Nessa estratégia, a reação foi realizada empregando um aldeído cationicamente marcado, a fim de amplificar os sinais no equipamento e facilitar a detecção dos intermediários e do produto, que naturalmente estariam na forma catiônica.

Nessa nova abordagem, buscou-se também favorecer a rota do imínio, evitando a formação imediata do **DC-01**. Inicialmente, a reação foi iniciada com a ureia e o aldeído marcado cationicamente, visando à formação preferencial do intermediário imínio (ver Esquema 17). Em seguida, a cumarina foi adicionada para gerar o intermediário avançado e, por fim, produzir a **CPD-01** desejada. O processo da reação e suas condições experimentais estão detalhados no Esquema 20.



Esquema 20. Reação para acompanhamento por HRMS para detecção da **CPD**.

Para monitorar o progresso da reação, amostras foram coletadas em intervalos de tempo predeterminados. Durante a primeira etapa da reação bimolecular (2CR), as amostras foram retiradas nos tempos de 5, 10 e 20 min. Posteriormente, com a adição da cumarina, a reação tornou-se tricomponente (3CR), e amostras foram coletadas nos tempos de 40, 50, 60, 90, 120 e 240 min. As amostras foram submetidas à HRMS, e os espectros resultantes estão apresentados na Figura 22. Com base nos intermediários discutidos nos possíveis mecanismos, a Tabela 11 exibe as estruturas moleculares que poderiam ser detectadas, juntamente com suas respectivas massas exatas.

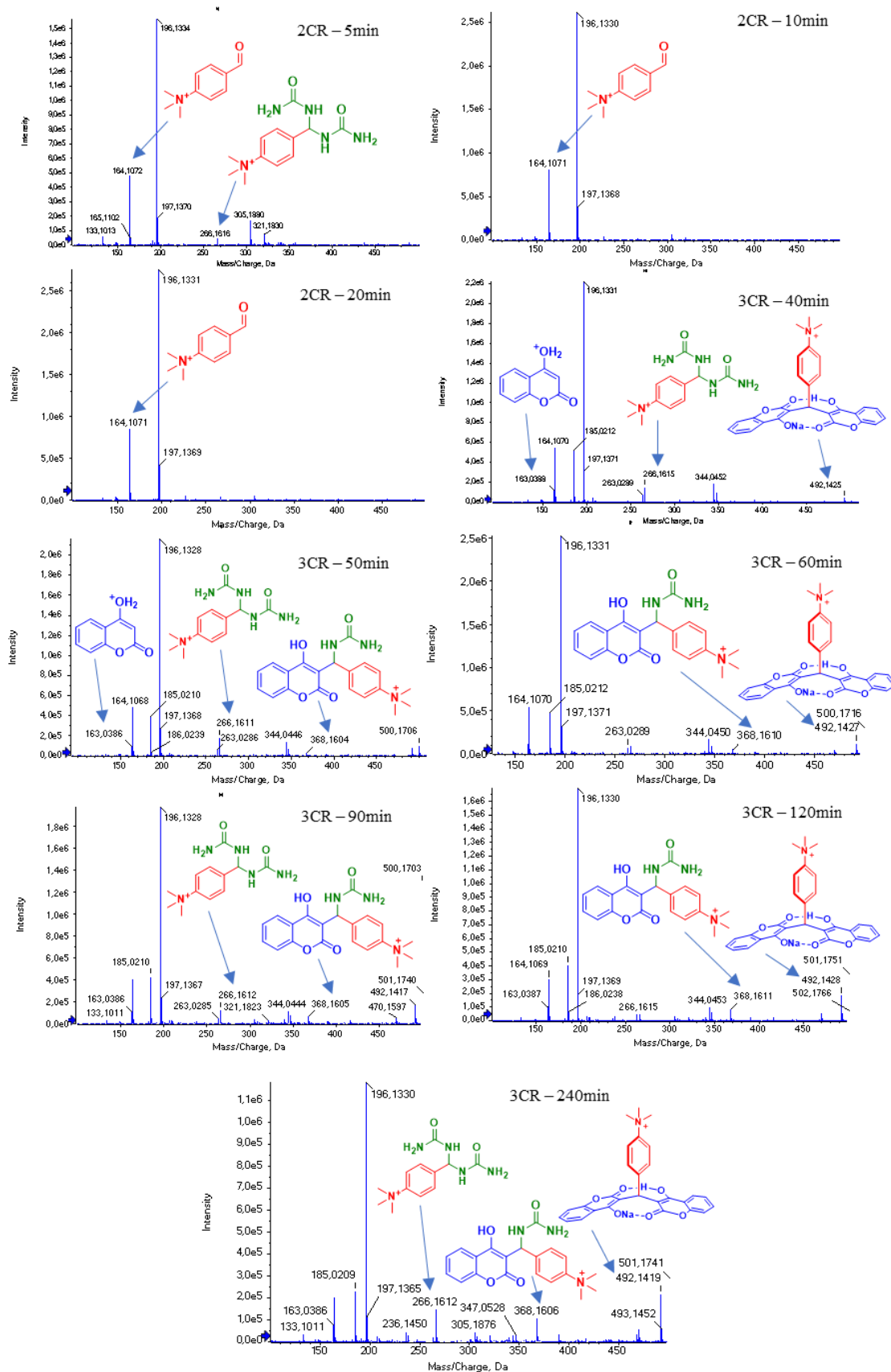
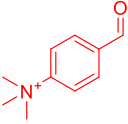
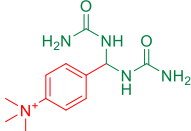
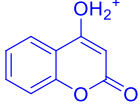
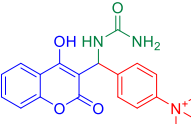
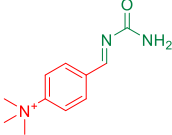
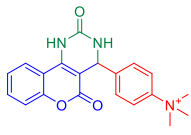
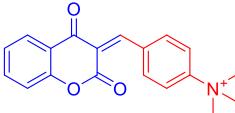
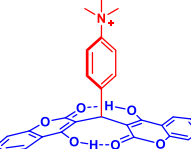


Figura 22. Monitoramento dos intermediários reacionais por HRMS. Reagentes: 4-hidroxycumarina, ureia, 4-formil-*N,N,N*-trimetilbenzenaminium. Solvente: *p*-cimeno. Temperatura: 80°C. 2CR indica reação bimolecular e 3CR indica reação com os 3 componentes.

Tabela 11. Estruturas moleculares possíveis de serem detectadas no monitoramento por HRMS e suas respectivas massas exatas e adutos de sódio. Nos adutos sodiados ocorre a substituição de um átomo de hidrogênio por um átomo de sódio.

Estrutura molecular	[M] ⁺ (Da)	[M + Na] ⁺ (Da)	Estrutura molecular	[M] ⁺ (Da)	[M + Na] ⁺ (Da)
	164,1070	-		266,1612	288,1431
	163,0390	185,0209		368,1605	390,1424
	206,1288	228,1107		350,1499	372,1319
	308,1281	-		470,1598	492,1418

Com esse experimento foram obtidos dados importantes, por isso vamos analisá-los em parte. Nos espectros da primeira etapa da reação, no qual os reagentes eram apenas a ureia e o aldeído marcado, foram detectados majoritariamente o aldeído marcado (164,1070 Da) e o aldeído com uma adição de metanol (195,1330 Da), esse metanol advém do equipamento de HRMS. Esses sinais estavam muito intensos e suprimiram os demais, mas foi possível detectar, já nos minutos iniciais da reação, os sinais para o intermediário imínio (206,1288 Da) e para o subproduto bisureída (266,1612 Da), porém com intensidades baixas. A detecção desses sinais indica que a reação estava progredindo conforme o planejado.

Na etapa subsequente, após a adição da cumarina, foi observada a formação do **DC** marcado ionicamente nos primeiros 10 min, como evidenciado pelo sinal a 492,1418 Da. Essa descoberta revela que, mesmo com a formação do intermediário avançado (ver Esquema 17), o equilíbrio favorece a formação do **DC** marcado. Surpreendentemente, o sinal do intermediário avançado foi detectado com intensidade mais significativa somente após 20 min da adição da cumarina. Essa observação indica que, uma vez formado o intermediário, ele rapidamente elimina a ureia e forma o intermediário de Knoevenagel. A ausência de detecção inicial do intermediário avançado, mas a formação do **DC**

marcado nos minutos iniciais, sugere um equilíbrio fortemente inclinado em direção à formação do intermediário de Knoevenagel e, posteriormente, a do **DC**.

A caracterização por fragmentação (MS/MS) do intermediário avançado foi realizada, conforme apresentado na Figura 23. O espectro de MS/MS mostra uma perda preferencial da ureia neutra, gerando o intermediário de Knoevenagel. Essa preferência é indicada pela intensidade do sinal produzido pelo fragmento.

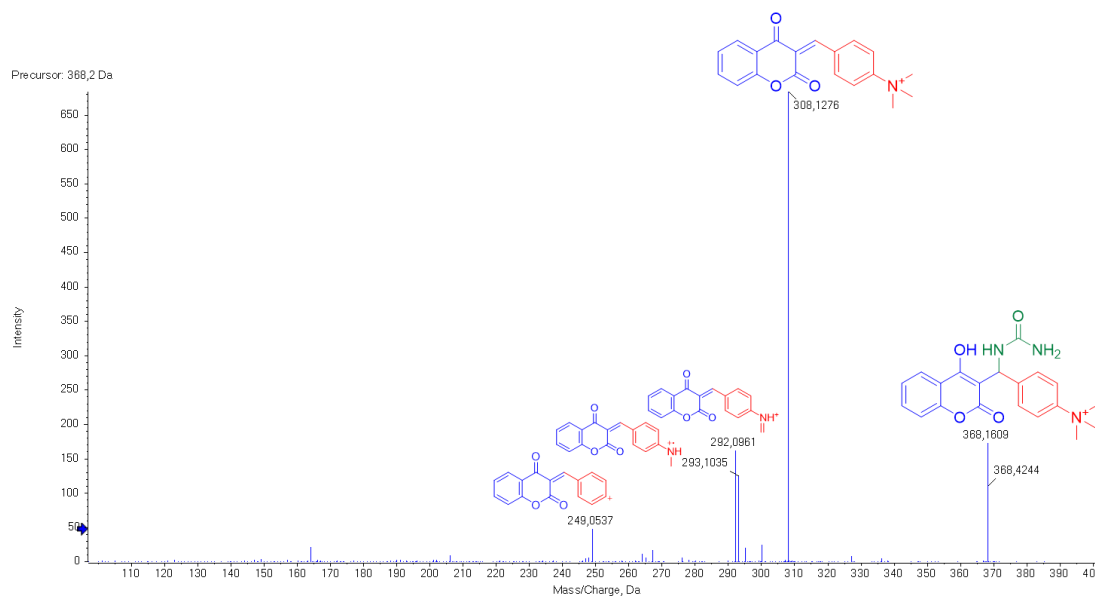


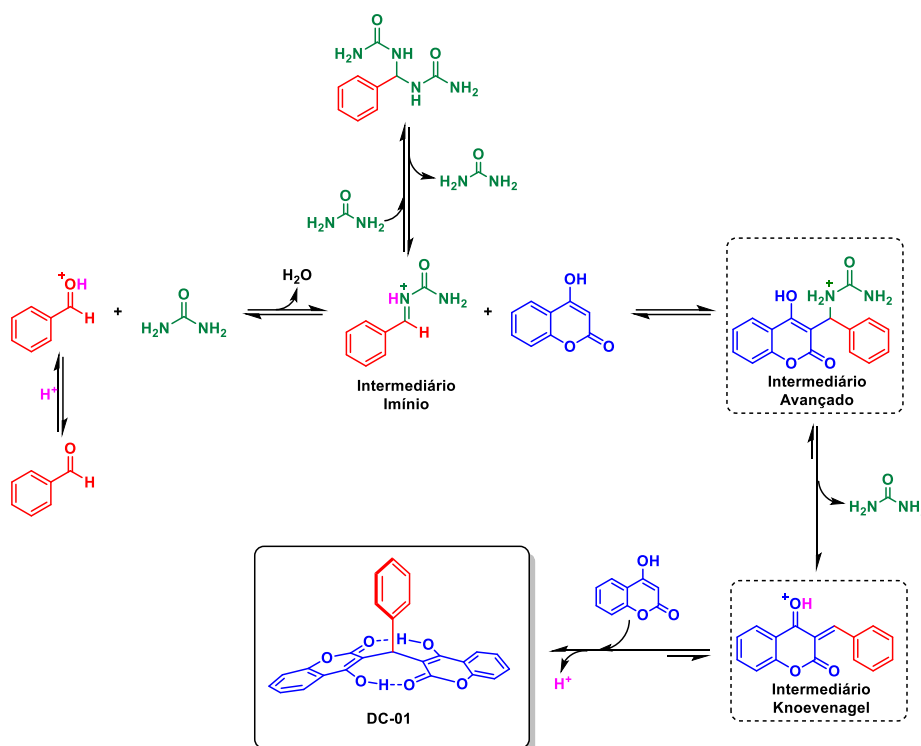
Figura 23. Espectro de ESI(+)-MS/MS do intermediário avançado. Note que a perda neutra de ureia é preferencial devido ao sinal mais intenso do fragmento desta perda.

Em relação à estrutura da **CPD**, não foi detectada em nenhum ponto do experimento, o que sugere que a etapa limitante para a sua formação é a ciclização intramolecular. Isso é indicado pelo fato de que o intermediário avançado é formado, mas, a partir desse ponto, a reação não prossegue para a formação da **CPD**. Vale ressaltar que este acompanhamento também foi conduzido em durante 24 h, entretanto os resultados foram os mesmos e a **CPD** não foi detectada em qualquer intervalo.

O acompanhamento da reação foi repetido usando o aldeído marcado cationicamente, mas desta vez com limoneno como solvente. Os resultados foram idênticos: o intermediário avançado foi detectado desde o início da reação, no entanto, a estrutura da **CPD** não foi observada em nenhum dos intervalos analisados.

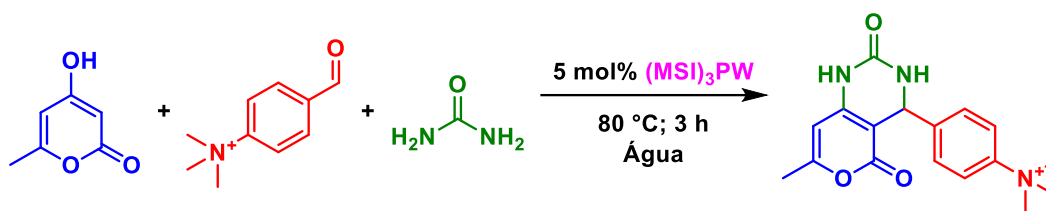
Assim, ficou demonstrado que, mesmo quando se favorece completamente a rota do imínio e/ou se dificulta a formação do **DC**, uma vez que o intermediário avançado é

formado, é cineticamente mais favorável que ele elimine uma ureia, gerando o intermediário de Knoevenagel, e que com a segunda adição da cumarina, o **DC** seja formado. Essa observação pode ser extrapolada para a reação com os reagentes da reação modelo e está ilustrada no Esquema 21.



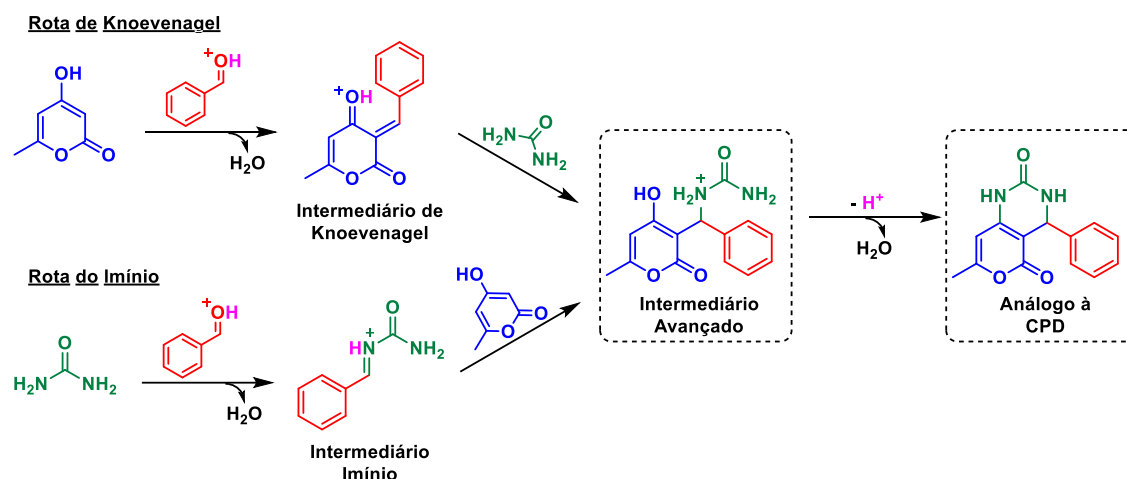
Esquema 21. Rota mecanísticas e seus intermediário observados no experimento de acompanhamento reacional por HRMS.

Após o insucesso de ao se tentar detectar a formação da **CPD**, optou-se por uma abordagem alternativa para explorar uma reação semelhante, substituindo a 4-hidroxicumarina pela 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, a fim de verificar se o comportamento seria análogo ao observado na síntese da **CPD**. O Esquema 22 ilustra essa reação. Nesse experimento, os três componentes foram adicionados simultaneamente, utilizando água como solvente, e a reação foi monitorada ao longo de 3 h. Amostras foram coletadas nos seguintes intervalos de tempo: 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 min, e todas foram submetidas à análise por HRMS.



Esquema 22. Reação para monitoramento por HRMS para detecção da estrutura análoga à **CPD**.

Como se trata de uma reação análoga à **CPD**, pode-se assumir que os caminhos reacionais seriam os mesmos (Knoevenagel e imínio) para chegar ao produto. As rotas mecanísticas possíveis foram ilustradas no Esquema 23, portanto, buscou-se nos espectros de MS os possíveis intermediários dessas rotas. Diferentemente do Esquema 23, no experimento conduzido, empregou-se o aldeído cationicamente marcado para aumentar a sensibilidade do experimento e assim como a probabilidade de detectar o produto análogo à **CPD**.



Esquema 23. Possíveis rotas mecanísticas e seus intermediários para a formação do produto análogo à **CPD**. Nesse esquema os subprodutos bisureída e análogo ao dicumarol foram omitidos, mas são produtos possíveis a partir dos intermediários de cada rota.

Os resultados desse experimento foram intrigantes e compartilharam algumas semelhanças com os resultados do experimento envolvendo a **CPD**. No início da reação, foi possível detectar os três intermediários possíveis dessa reação, mas o íon predominante correspondeu ao intermediário avançado. No entanto, apesar da formação eficaz do intermediário avançado, não foi possível detectar o produto análogo à **CPD**, o que indica que, nesse caso, a etapa de ciclização intramolecular também atua como etapa

limitante na formação do produto. No entanto, o produto análogo ao **DC** foi detectado nos primeiros min da reação. Os espectros de MS desse experimento podem ser observados na Figura 24.

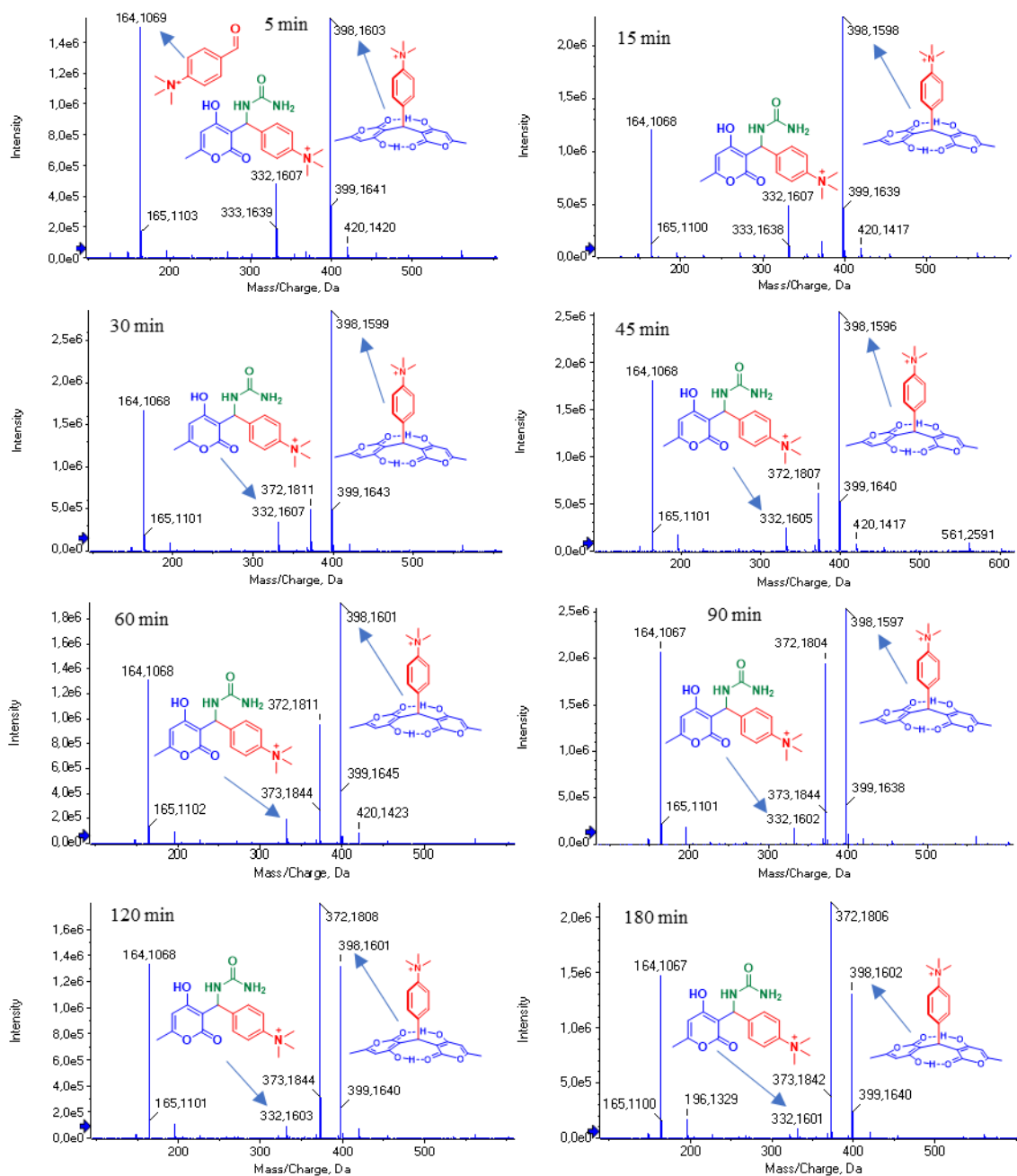


Figura 24. Monitoramento dos intermediários da reação por HRMS. Reagentes: 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, ureia, 4-formil-*N,N,N*-trimetilbenzenaminium. Solvente: água. Temperatura: 80 °C.

Essa reação parece apresentar um comportamento semelhante ao observado na síntese da **CPD** em relação ao intermediário avançado. Portanto, foi realizado uma análise do espectro de MS/MS do intermediário avançado, que revelou uma clara tendência à perda neutra de ureia como a perda preferencial. Isso leva à formação do intermediário de Knoevenagel, possibilitando, assim, a formação do análogo ao **DC**. O espectro de MS/MS do intermediário avançado encontra-se representado na Figura 25.

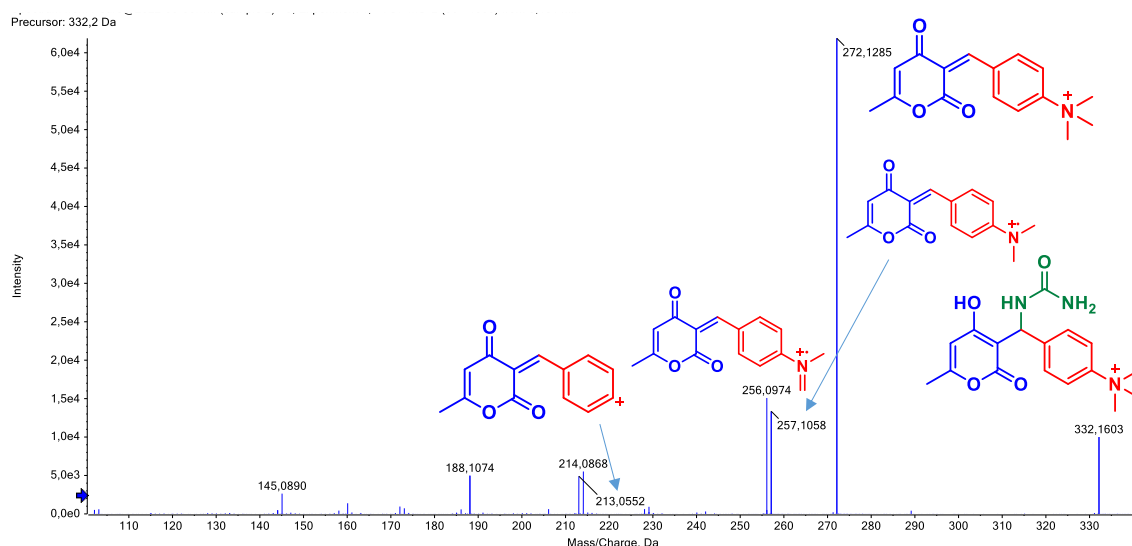
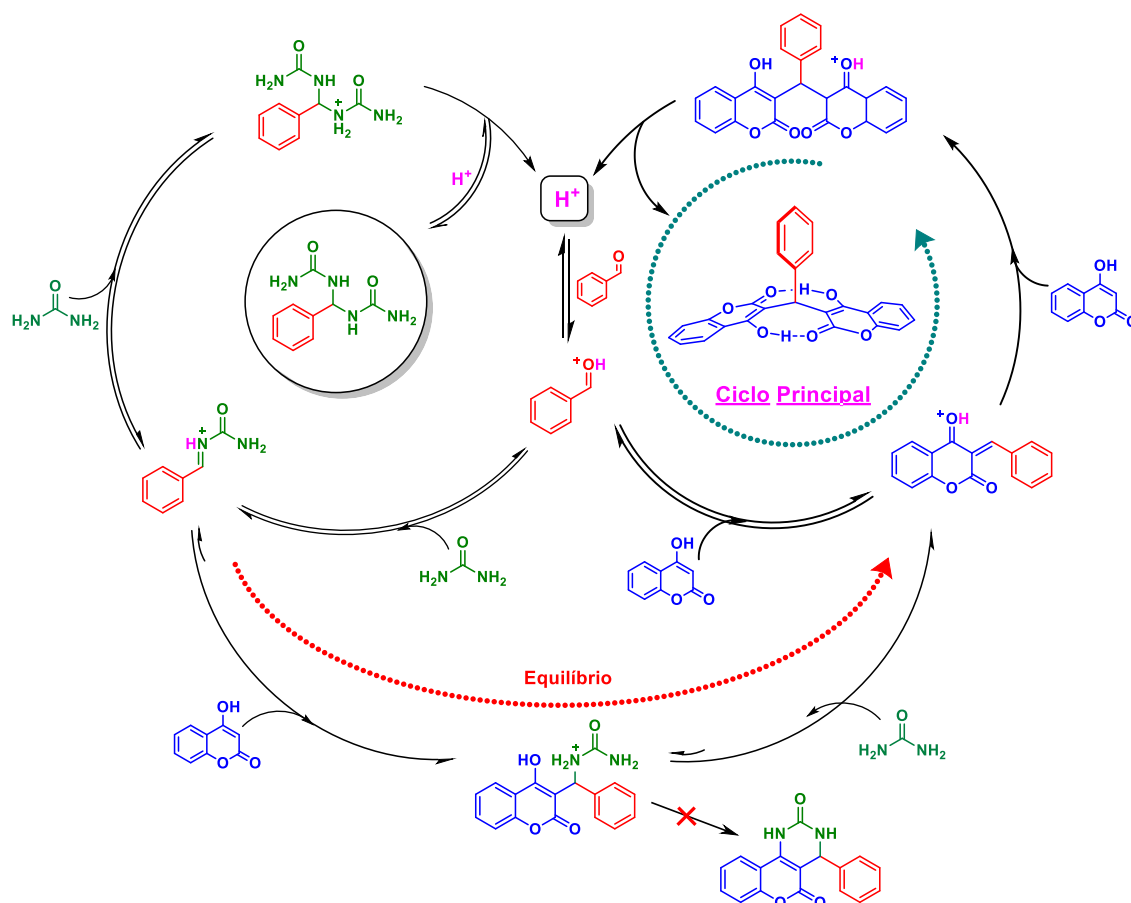


Figura 25. Espectro de ESI(+)-MS/MS do intermediário avançado da hidroximetilpirona. Note que a perda neutra de ureia é preferencial devido ao sinal mais intenso do fragmento desta perda.

Assim, em ambos os experimentos, observou-se que os mecanismos das RMCs nas duas reações conduzem à formação do intermediário avançado. Entretanto, a partir desse ponto, a ciclização intramolecular necessária para a formação do produto desejado não ocorre. Em vez disso, ocorre preferencialmente a eliminação da ureia.

Com base nos dados e nas estruturas detectadas nos experimentos de HRMS, foi possível propor um ciclo catalítico para a RMC em questão, ilustrado Esquema 24. É importante notar as setas de equilíbrio, indicando que a formação preferencial do **DC-01** ocorre, independentemente de o mecanismo ser o do imínio ou de Knoevenagel.



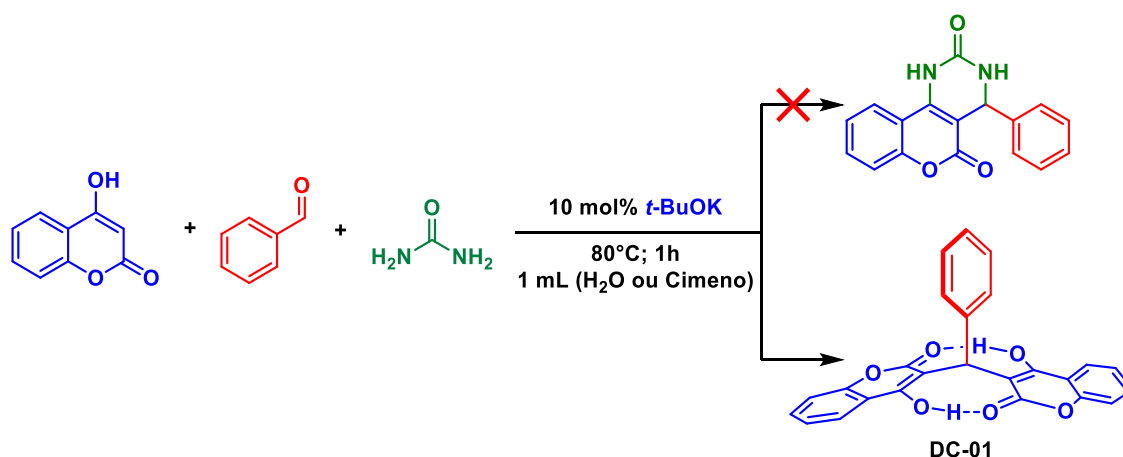
Esquema 24. Proposta de ciclo catalítico para a RMC entre a cumarina, ureia e o benzaldeído em meio ácido. Note que independente do caminho o equilíbrio leva para a formação do **DC-01**.

Nesse sentido, é inegável que as tentativas de sintetizar a **CPD** através da metodologia de RMC, tanto com as condições reacionais testadas quanto aquelas previamente descritas nos artigos, se mostraram infrutíferas. Diante desse desafio, para atingir a estrutura da **CPD**, torna-se imperativo uma mudança drástica de estratégia, requerendo uma abordagem sintética consideravelmente mais complexa ou inovadora.

Metodologia alternativas testadas para tentar sintetizar a estrutura CPD-01

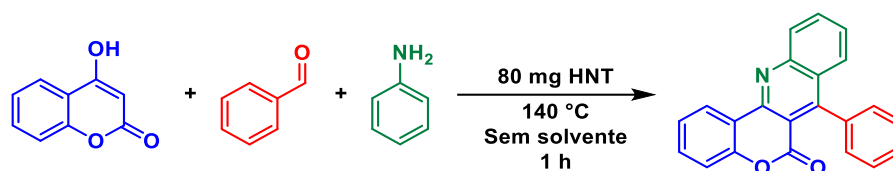
Conforme evidenciado nos experimentos anteriores, não foi possível sintetizar a **CPD** por meio da metodologia de RMC, utilizando a 4-hidroxicumarina, ureia e benzaldeído como reagentes. Com base nisso, foram realizadas diversas tentativas de síntese da **CPD** sob diferentes condições para alcançar a estrutura desejada.

Uma das abordagens consistiu na substituição da catálise ácida por uma catálise básica. Utilizou-se *t*-BuOK (10 mol%) como catalisador básico e as condições reacionais permaneceram as mesmas, mantendo a reação a 80 °C por 1 h. O solvente utilizado foi água em uma replicata e *p*-cimeno em outra. Após o término da reação, a mistura resultante foi analisada por HRMS. Novamente, a **CPD-01** não foi detectada, e o único produto formado foi o **DC-01**. Conforme demonstrado no Esquema 25.



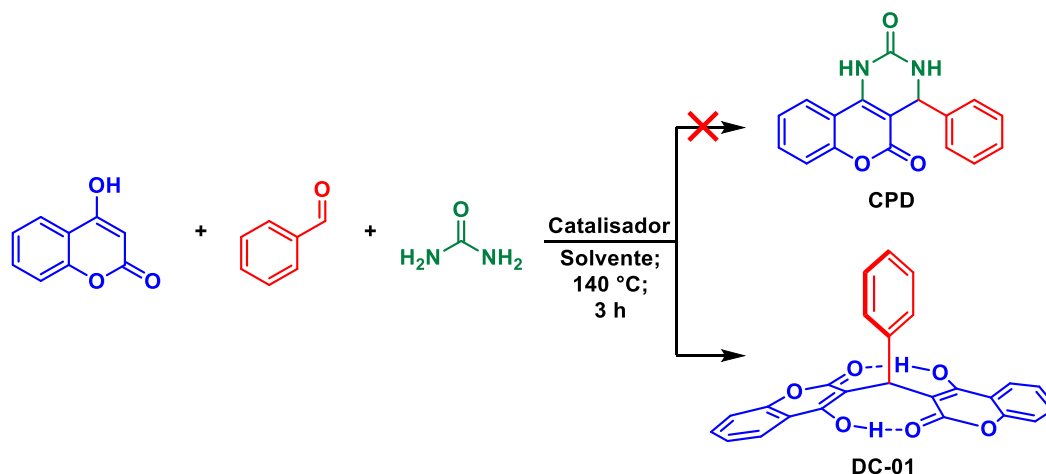
Esquema 25. Tentativa de síntese da **CPD-01** por meio de catálise básica.

Uma alternativa adotada foi elevar a temperatura da reação para 140 °C. Essa estratégia foi inspirada em uma metodologia de síntese de cromoquinolina-6-onas por meio de RMC, que empregava reagentes semelhantes, incluindo 4-hidroxicumarina, benzaldeído e anilina (conforme ilustrado no Esquema 26).¹¹⁹ No artigo de referência, um catalisador ácido de Lewis, especificamente uma zeólita em nanotubos (HNT), foi utilizado. No entanto, a síntese nesse caso demonstrou ser sensível à temperatura, com a formação do produto não sendo alcançada a temperaturas abaixo de 100 °C. A temperatura otimizada para essa síntese foi de 140 °C. Dessa forma, essa mesma temperatura foi aplicada em alguns experimentos na tentativa de obter a **CPD-01**.



Esquema 26. Metodologia de síntese da cromenoquinilina-6-ona. Referência 119.

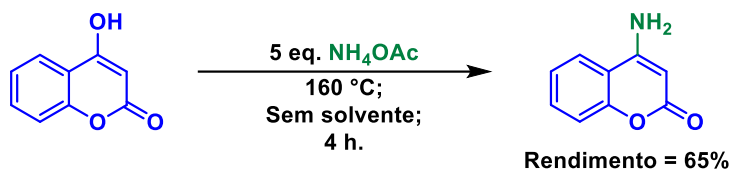
As reações a 140 °C foram conduzidas com dois catalisadores distintos, o ácido $(\text{MSI})_3\text{PW}$ e o básico $t\text{-BuOK}$, fazendo uso de água, $p\text{-cimeno}$ como solvente, e uma reação sem solvente também foi incluída na avaliação. As reações permaneceram por 3 h a essa temperatura elevada, e posteriormente, as misturas reacionais foram analisadas por HRMS. Contudo, em nenhuma das condições testadas, foi possível detectar a formação da **CPD-01**.



Esquema 27. Condições reacionais testadas para tentar sintetizar a **CPD-01**.

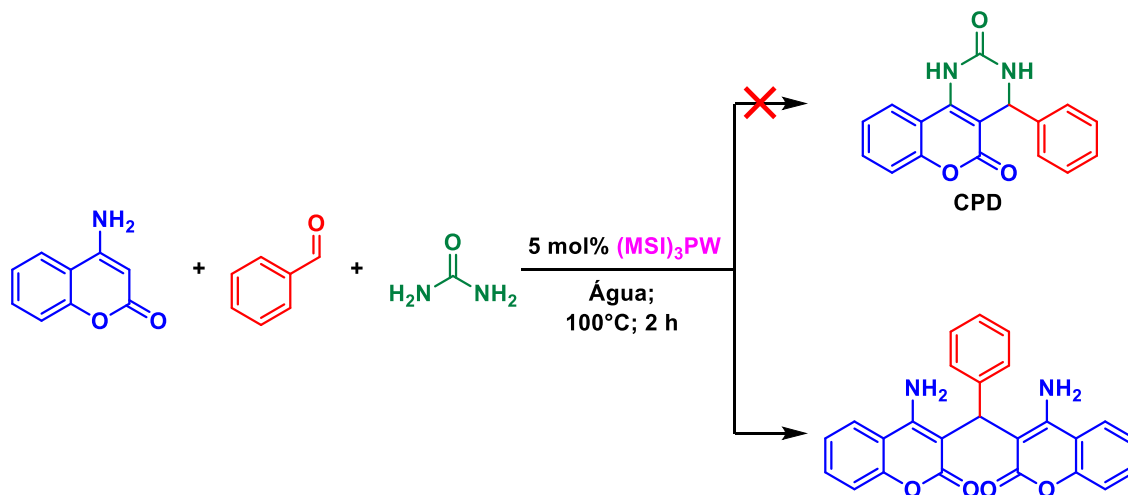
Em uma última tentativa alternativa de síntese por meio de uma RMC, optou-se por utilizar 4-aminocumarina em vez de 4-hidroxycumarina. A preparação da 4-aminocumarina envolveu uma reação que exigiu alta temperatura e pressão, permitindo que a amônia realizasse uma substituição nucleofílica na cumarina, como mostrado no Esquema 28. A necessidade de condições tão vigorosas para efetuar essa substituição indica que a barreira energética para a substituição na posição 4 da cumarina é considerável. Isso reforça a compreensão do motivo pelo qual a **CPD** não foi formada nas condições experimentais testadas até o momento. A ureia é significativamente maior que

a amônia, o que a sujeita a efeitos estéricos na adição nucleofílica, além de que ela é um nucleófilo menos eficaz em comparação à amônia.



Esquema 28. Síntese da 4-aminocumarina. Note as condições drásticas para substituir a hidroxila por uma amina.

Após a síntese da 4-aminocumarina, a reação de multicomponentes (RMC) foi conduzida usando 1 mmol dos reagentes (4-aminocumarina, benzaldeído e ureia), juntamente com 5 mol% do catalisador $(\text{MSI})_3\text{PW}$, 1 mL de água como solvente, e a reação foi mantida a 100 °C por 2 h. Durante a reação, um precipitado amarelado se formou, o qual, após lavagem com etanol e água, passou por caracterização. As análises revelaram que o produto resultante da reação era um análogo do **DC-01**, conforme ilustrado no Esquema 29. Detalhes adicionais, incluindo os espectros dessa estrutura, podem ser encontrados nos Anexos.



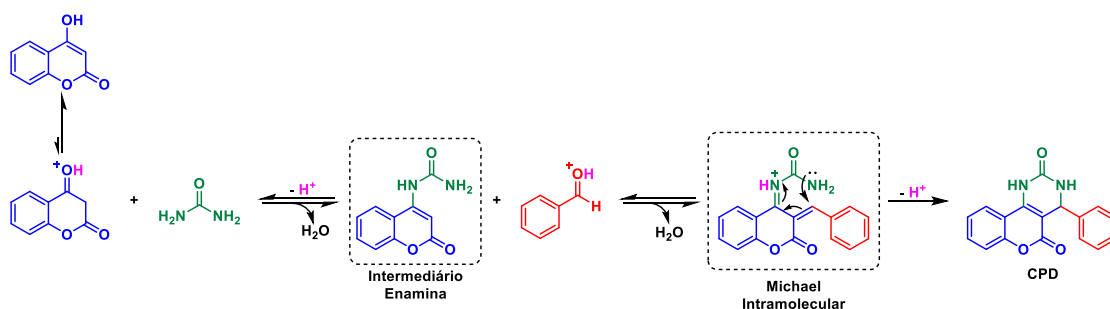
Esquema 29. Tentativa de síntese da **CPD** a partir da aminocumarina.

Seguindo as diversas tentativas frustradas de sintetizar a estrutura **CPD**, decidiu-se abandonar a metodologia RMC para esse fim. Como evidenciaram os experimentos anteriores, a etapa crítica é a adição da ureia à posição 4 da 4-hidroxycumarina e,

subsequentemente, a ciclização do intermediário avançado (consulte o Esquema 24). Essa etapa revelou-se energeticamente desfavorável, favorecendo a eliminação da ureia.

No que diz respeito às rotas mecanísticas possíveis para a síntese da **CPD-01**, tanto as rotas de Knoevenagel quanto a do imínio foram exaustivamente testadas, resultando em todos os casos na formação do **DC-01**. A rota da enamina, que já havia sido previamente descartada, mostrou-se promissora ao analisar mais profundamente sua viabilidade. A razão para a reticência em relação a essa rota era a predominância da cumarina na forma enólica, pois esse tautômero evidencia ainda mais a aromaticidade da estrutura e, assim, tornando-a mais estável. No entanto, ao considerar a rota da enamina, ela se revela como um caminho ideal para a síntese da **CPD-01**, como ilustrado no Esquema 30. A partir da formação do intermediário enamina, espera-se que a reação com o benzaldeído ocorra de maneira favorável, dada a nucleofilicidade mantida do núcleo cumarina. Em seguida, a etapa subsequente seria uma adição de Michael intramolecular, no qual sabe-se ser termodinamicamente favorecida.

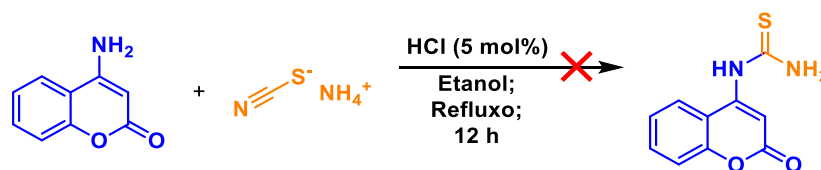
Rota da Enamina



Esquema 30. Rota da enamina para a síntese da **CPD-01**. O intermediário enamina está destacado, assim como a reação de ciclização para formar a **CPD-01**.

Teoricamente, a rota da enamina mostra-se promissora para a síntese da **CPD-01**. Contudo, decidiu-se realizar as reações com o intuito de isolar os intermediários e caracterizá-los antes de progredir na rota sintética. Nesse contexto, procurou-se, primeiramente, métodos para formar o intermediário enamina, conforme ilustrado no Esquema 30. Para isso, realizou-se uma extensa pesquisa na literatura em busca de procedimentos experimentais que permitissem a adição de uma ureia ou tioureia à posição 4 da cumarina. No entanto, apenas um procedimento experimental foi encontrado, destinado à síntese de tiocumarina.¹²⁰ Nesse artigo, a reação partia da 4-aminocumarina,

que reagia com o tiocianato de amônio sob catálise ácida com HCl. Dado a simplicidade do procedimento, optou-se por replicá-lo, como ilustrado no Esquema 31.



Esquema 31. Condições reacionais para a síntese da tiocumarina com base na referência 120.

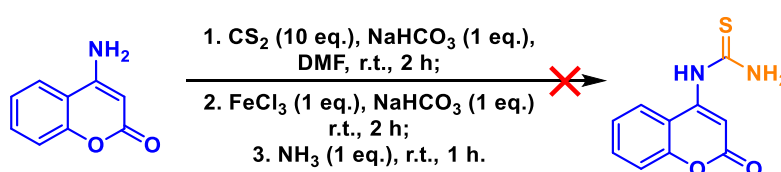
A fim de economizar tempo e recursos, antes de proceder com o isolamento do produto, a mistura reacional foi submetida à caracterização por HRMS, considerando que somente se o produto fosse detectado, valeria a pena o esforço de isolá-lo. Todavia, apesar de relatado na literatura, a reação para obter tiocumarina não produziu o resultado esperado. Após 12 h, o que se encontrava no balão reacional eram apenas os reagentes de partida.

Como as condições do artigo de referência não obtiveram êxito, outras três abordagens experimentais foram consideradas. Estas foram: (i) utilizando 5 mmol de 4-aminocumarina e 7 mmol de tiocianato de amônio, com acetato de etila como solvente, a reação foi mantida a temperatura ambiente por 48 h. (ii) com as mesmas quantidades de reagentes e solvente da condição (i), porém, a reação ocorreu sob refluxo por 6 h. (iii) empregando 1 mmol de 4-aminocumarina, 5 mmol de tiocianato, sem a adição de solvente, e a reação foi mantida a 130 °C por 6 h. No entanto, nenhuma dessas novas condições permitiu a detecção de tiocumarina. Portanto, essa estratégia foi abandonada.

Dado que não havia referências disponíveis para a síntese da tiocumarina a partir de uma cumarina, foi realizada uma pesquisa em busca de estruturas semelhantes, e a naftilamina e anilina surgiram como uma alternativa viável. Durante essa busca, foram identificadas algumas metodologias para a formação de fenil-ureias ou tioureias, assim como naftil-ureias ou tioureias, que poderiam ser adaptadas para alcançar o objetivo de sintetizar a tiocumarina.

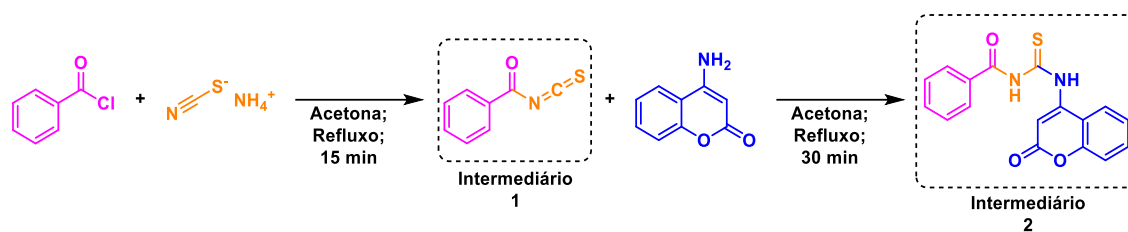
Uma das metodologias que parecia promissora foi adaptada de um estudo conduzido por Madhavi N. e sua equipe.¹²¹ Em um balão de 25 mL, foram adicionados 2 mmol de 4-aminocumarina, seguidos da adição de 5 mL de dimetilformamida (DMF). Lentamente, 10 equivalentes de dissulfeto de carbono (CS₂) foram introduzidos, seguidos

da adição de 1 equivalente de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). A mistura foi agitada por 2 h à temperatura ambiente. Após esse período, 2 mmol de cloreto de ferro (III) (FeCl_3) foram adicionados, resultando na formação de um precipitado preto, seguido da adição de mais 2 mmol de NaHCO_3 . A mistura foi agitada à temperatura ambiente por mais 2 h. Finalmente, após o tempo de reação, 2 mmol de hidróxido de amônio (NH_4OH) foram adicionados, e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por mais 1 h. Toda essa rota sintética está ilustrada no Esquema 32. Ao término de toda a sequência sintética, uma alíquota da reação foi analisada por HRMS, no entanto, nenhum sinal da tiocumarina foi detectado. Logo, essa estratégia foi descartada.



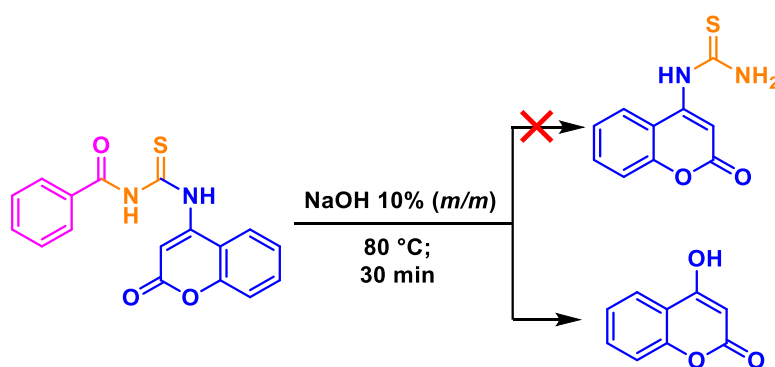
Esquema 32. Rota sintética para tentar sintetizar a tiocumarina baseada na referência 121.

Uma outra metodologia viável, baseada no trabalho de Rahul V. P. e sua equipe, buscava produzir um intermediário que, após hidrólise, levasse à formação da *N*-naftil-tioureia.¹²² O Esquema 33 ilustra a rota sintética. Inicialmente, em um balão, foram adicionados 3 mmol de NH_4SCN juntamente com 5 mL de acetona. Em seguida, 2 mmol de cloreto de benzoíla foram adicionados lentamente. A mistura foi refluxada por 15 min para formar o intermediário 1, conforme indicado no Esquema 33. Após esse tempo, no mesmo balão, foram acrescentados 2 mmol de aminocumarina, e a mistura foi refluxada por mais 30 min. Ao final da reação, a mistura reacional foi lentamente vertida, sob agitação vigorosa, em água gelada. Isso resultou na formação de um precipitado de cor bege, que foi filtrado e lavado com água. Esse precipitado foi caracterizado por HRMS, confirmando ser o **Intermediário 2** (ver espectro de ESI-MS(/MS) em Anexos), conforme ilustrado no Esquema 33.



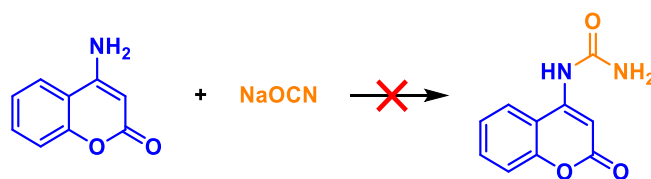
Esquema 33. Rota sintética baseada na referência 122 para sintetizar a tiocumarina.

Após a confirmação da síntese do **Intermediário 2**, a etapa de hidrólise foi iniciada (Esquema 34). Um mmol do intermediário 2 foi adicionado a 10 mL de uma solução de NaOH a 10% (*m/m*). Essa mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos. Ao término do tempo de reação, a solução quente foi filtrada para remover pequenos sólidos insolúveis e deixada esfriar até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi acidificada com HCl até atingir um pH de 2, levando à formação de um precipitado amarelo. Posteriormente, o pH foi ajustado para 8 por meio da adição de NH₄OH, visando solubilizar o ácido benzoico formado durante a hidrólise. Mesmo a pH 8, persistiu a presença de um precipitado, que foi filtrado e lavado com água. Tanto o precipitado quanto a fase aquosa foram submetidos à análise por HRMS, e em nenhuma das frações foi detectada a presença de tiocumarina. No entanto, foi observado que o precipitado formado, o produto da hidrólise, era a 4-hidroxycumarina. Portanto, essa metodologia também não serviu para formar a tiocumarina.



Esquema 34. Reação de hidrólise do **Intermediário 2**.

As tentativas de sintetizar a tiocumarina não foram bem-sucedidas. Diante disso, a estratégia foi redirecionada para a síntese da ureia-cumarina. As metodologias encontradas empregavam o uso de cianato de sódio (NaOCN) em catálise ácida para formar naftilureias forneceram a base para a investigação.^{123,124} Foram testadas as seguintes condições experimentais: (i) 1 mmol de aminocumarina e 1,5 mmol de NaOCN foram adicionados a 10 mL de uma solução de H₂O : Ácido acético (1:1, v/v). A mistura foi agitada por 12 h a temperatura ambiente. (ii) As proporções dos reagentes foram mantidas, mas a mistura foi aquecida a 80 °C por 12 h. (iii) 1 mmol de aminocumarina e 1,5 mmol de NaOCN foram colocados em um tubo de Schlenk selado com 1 mL de CHCl₃, e a mistura foi aquecida a 70 °C por 12 h. A progressão das reações foi monitorada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando uma mistura de AcOEt : CH₂Cl₂ (1:1, v/v) como eluente. Em todos os casos, não foi observada a conversão da aminocumarina, e nenhuma nova mancha surgiu na CCD, sugerindo que as reações não tiveram êxito, demonstrado no Esquema 35.

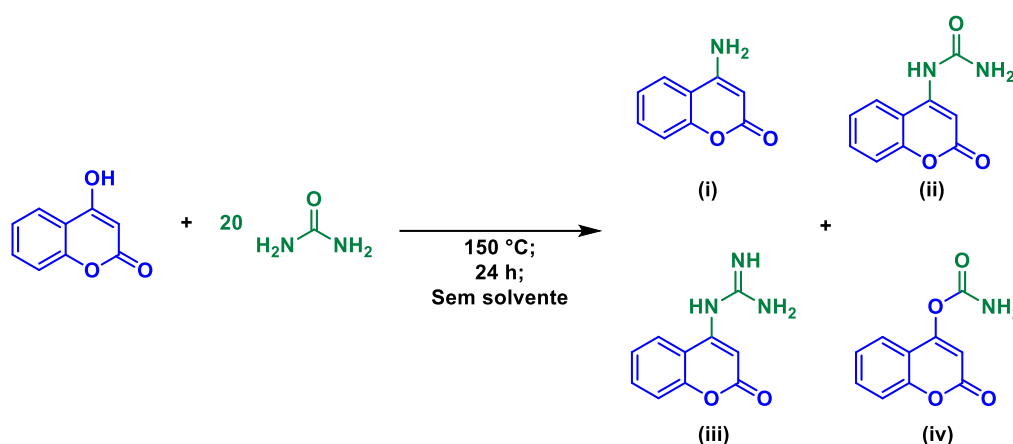


Esquema 35. Reação testada baseada nas referências 123,124 para sintetizar a ureia-cumarina.

As metodologias racionais descritas em artigos se esgotaram, sem serem capazes de produzir a ureia-cumarina ou a tiocumarina. Diante disso, optou-se por desenvolver metodologias próprias para alcançar a estrutura proposta. Com base na reação de síntese da aminocumarina (Esquema 28), a escolha foi reagir a ureia diretamente com a 4-hidroxicumarina em alta temperatura e pressão. Devido à ureia ser menos nucleofílica que a amônia, a reação foi realizada com uma proporção de 20 equivalentes de ureia para cada equivalente de cumarina.

A primeira reação testada ocorreu em um reator *Fischer Porter*, selado, sem adição de solventes, a uma temperatura de 150 °C, mantida por 24 h. Durante a reação, a mistura sólida fundiu a uma temperatura próxima de 130 °C, transformando-se de um líquido incolor para uma mistura líquida amarela escura, indicando uma transformação química. Após o tempo de reação, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente,

solidificando-se. Posteriormente, o sólido foi solubilizado em etanol. Inicialmente, uma CCD da reação mostrou principalmente a formação de 4-aminocumarina, mas algumas manchas fluorescentes indicaram a presença de outros produtos. Assim, a mistura foi analisada por HRMS. Após várias reações infrutíferas, foi a primeira vez que a ureia-cumarina foi detectada. No entanto, não foi a única estrutura formada; a análise de HRMS revelou quatro produtos de interesse: (i) 4-aminocumarina, (ii) 4-ureia-cumarina, (iii) 4-guanidina-cumarina e (iv) 4-carbamato-cumarina. O Esquema 36 ilustra a reação realizada juntamente com os produtos detectados por HRMS.



Esquema 36. Produtos detectados por HRMS da reação entre a 4-hidroxycumarina e ureia a 150 °C. (i) 4-aminocumarina. (ii) ureia-cumarina. (iii) guanidina-cumarina. (iv) carbamato-cumarina.

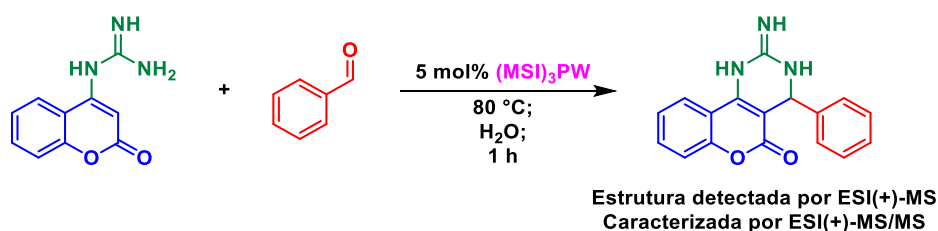
A partir da detecção bem-sucedida da ureia-cumarina, buscou-se isolá-la. A primeira tentativa foi realizada com apenas 1 mmol de 4-hidroxycumarina e 20 mmol de ureia. Ao separar a mistura reacional por uma coluna de sílica flash, utilizando AcOEt como eluente, observou-se que a estrutura predominante formada foi a 4-aminocumarina, com um rendimento de 80%. Nas frações contendo as outras estruturas (ii), (iii) e (iv), indicadas no Esquema 36, não havia massa suficiente para análises além do HRMS, pois a massa isolada era menor que 0,1 mg e não estavam completamente puras.

Diante disso, optou-se por realizar uma reação com maior quantidade de material e algumas modificações na metodologia, como na temperatura e proporção de ureia. A temperatura de 150 °C foi considerada alta, levando à degradação da ureia, que ocorre a partir de 135 °C. Essa degradação gera amônia, explicando por que a 4-aminocumarina foi o produto principal. A proporção entre ureia e coumarina foi ajustada para 10 equivalentes para um. Assim, uma reação foi conduzida com 1 g de 4-hidroxycumarina (6

mmol), 3,6 g de ureia (60 mmol), mantendo a mistura a 135 °C por 24 h. Essa temperatura foi escolhida para que a mistura fundisse e houvesse energia suficiente para ocorrer a adição nucleofílica da ureia na cumarina.

Após a nova reação, a separação por uma coluna cromatográfica revelou que, apesar das alterações nas condições reacionais, a 4-aminocumarina permaneceu como o produto majoritário. Entretanto, desta vez, foi possível isolar um pouco menos de 5 mg da guanidina-cumarina. As outras estruturas permaneceram nas mesmas frações da coluna e não foi possível separá-las de forma eficaz.

Apesar da quantidade limitada da guanidina-cumarina isolada, optou-se por conduzir uma reação dela com o benzaldeído. Assim, em um balão de 5 mL, foram adicionados 4 mg da guanidina-cumarina ($\approx 0,03$ mmol), juntamente com 6 mg de benzaldeído ($\approx 0,06$ mmol) e 5 mol% do catalisador $(MSI)_3PW$ em 100 μ L de H_2O . A mistura reacional foi aquecida a 80 °C e mantida nessa temperatura por 1 h. Ao final da reação, o precipitado foi filtrado e lavado com 2 mL de água para remover o catalisador. Em seguida, uma CCD foi realizada para identificar se o precipitado consistia nos reagentes iniciais. Inicialmente, as manchas indicaram que a reação não formou novos produtos, pois apresentavam a mesma altura que as dos reagentes. No entanto, o precipitado foi analisado por HRMS, revelando indícios substanciais de que o caminho da enamina é a rota adequada para obter a **CPD**, pois foi detectado o sinal da estrutura análoga à **CPD-01**. As condições da reação estão ilustradas no Esquema 37, e o espectro de ESI-MS(/MS) do sinal referente à estrutura análoga à **CPD-01** está apresentado na Figura 26.



Esquema 37. Condições reacionais para a síntese da estrutura análoga à **CPD-01**.

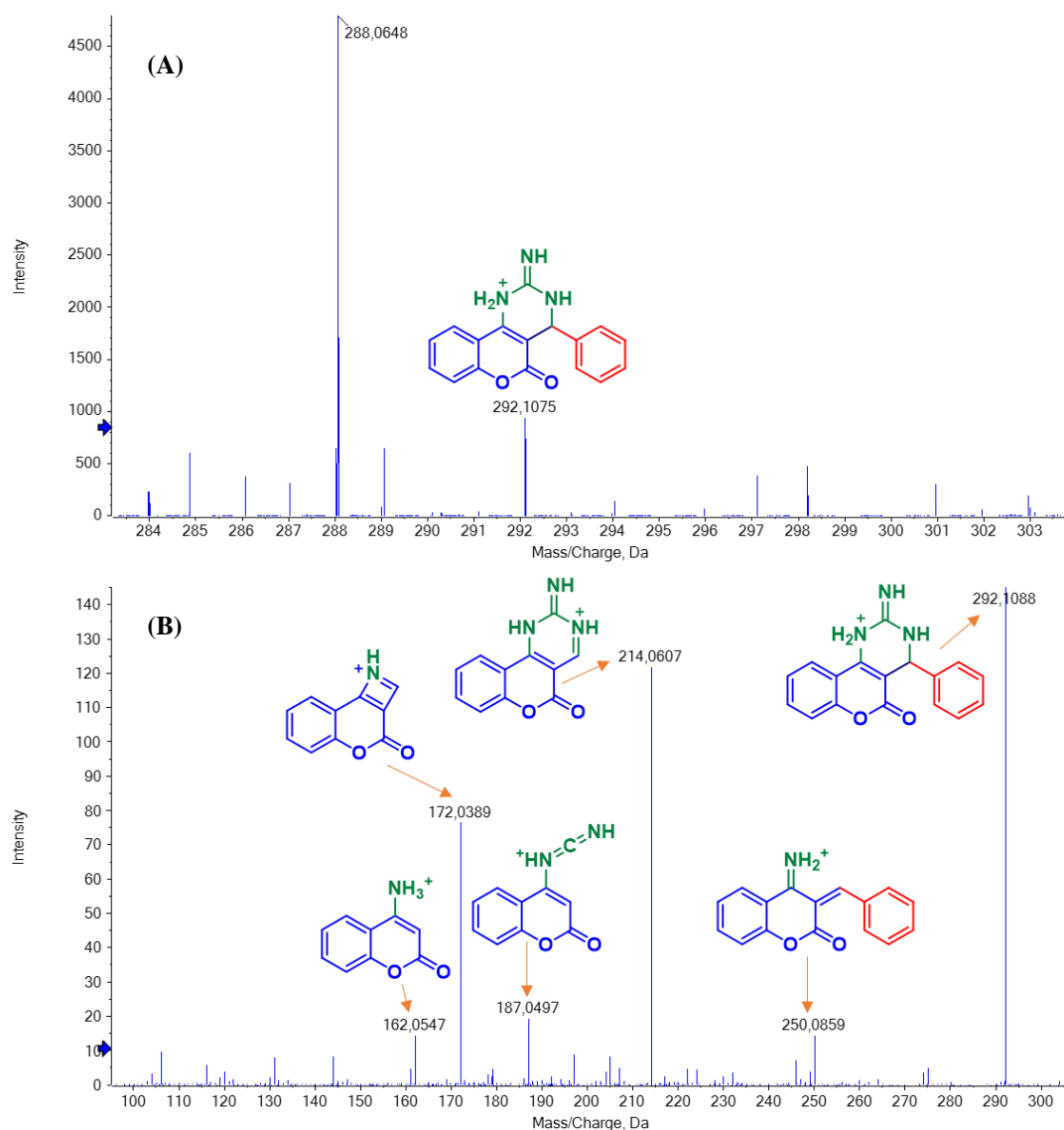


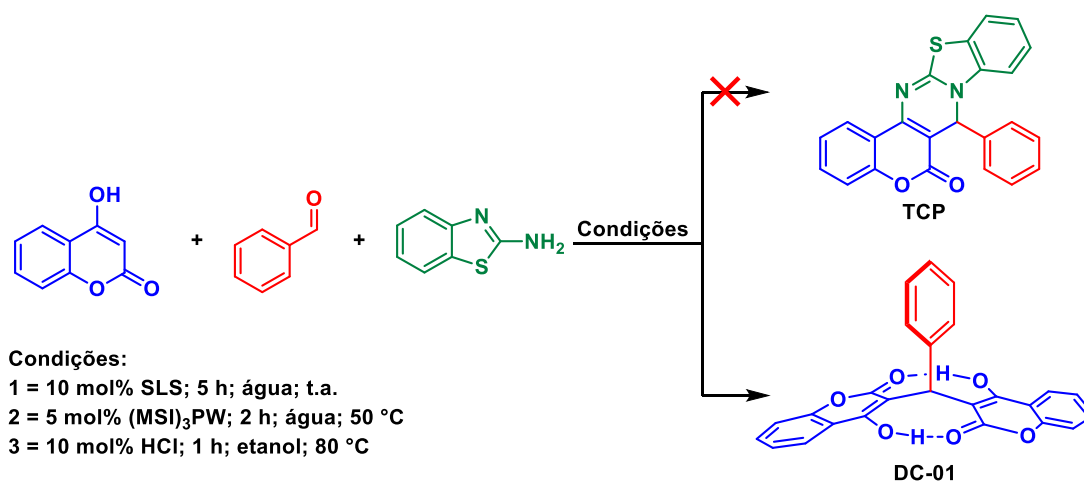
Figura 26. (A) Espectro de ESI(+)-MS da estrutura análoga à **CPD-01**. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS da estrutura análoga à **CPD-01**.

Até onde se verificou, este é o primeiro relato da síntese de uma estrutura análoga à **CPD**. A massa exata do composto, aliada ao padrão de fragmentação molecular, está de acordo com a estrutura proposta, proporcionando evidências robustas da efetiva formação desse aduto. Este avanço representa um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes na obtenção de estruturas **CPDs**. Na tentativa de se obter derivados de **CPDs**, a rota mecanística considerada improvável no início deste estudo (rota da Enamina, conforme Esquema 12) foi a que tentou-se favorecer nas diversas tentativas apresentadas e conduziu a formação da estrutura desejada.

Investigação das reações de síntese da pirano-cromeno-carbonitrila (PCN) e da tiazio-cromenopirimidinona (TCP)

Adicionalmente à investigação da reação da **CPD**, em paralelo, foram realizados estudos de outras duas reações que apresentaram desafios semelhantes. Estas reações visavam a síntese da pirano-cromeno-carbonitrila (**PCN**) e da tiazio-cromenopirimidinona (**TCP**), as reações citadas estão representadas no Esquema 9.

No que tange à síntese da **TCP**, uma variedade de condições foi testada com base na literatura disponível. Diversos catalisadores, incluindo catalisadores ácidos, como HCl e $(\text{MSI})_3\text{PW}$, um catalisador básico (*t*-BuOK) e a adição de surfactante (SLS), foram investigados. As reações foram conduzidas em temperaturas variando de 25 °C a 80 °C e em diferentes solventes, como água ou etanol. Cada uma dessas reações foi submetida à análise de HRMS na tentativa de detectar a **TCP**, no entanto, em todas as condições testadas, o produto formado foi consistentemente o **DC-01**, sem qualquer sinal identificável da **TCP**. As condições reacionais testadas estão expressas no Esquema 38.



Esquema 38. Condições reacionais testadas para a síntese da **TCP**. Em todas as condições o produto formado foi o **DC-01**.

Sobre a literatura disponível com relação a reação da **TCP**, é importante observar que essa é uma reação pouco explorada. Na base de dados do *SciFinder*, até a data de 15/10/2023 (chave de busca “7-Phenyl-6H,7H-[1]benzopyrano[4',3':4,5]pyrimido[2,1-b]benzothiazol-6-one”), continha apenas 7 artigos relacionados a essa reação.^{68,110,125-129}

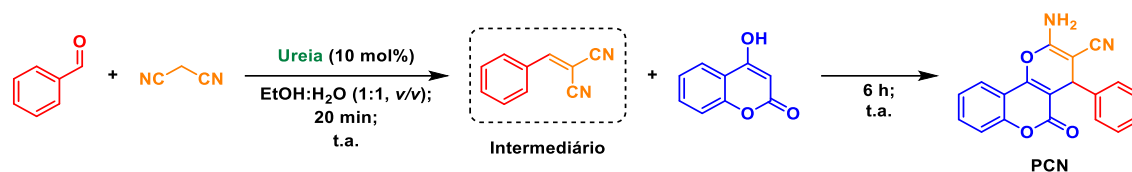
Nos artigos analisados, torna-se evidente que os espectros de RMN de ^1H atribuídos à **TCP**, na verdade, correspondem ao **DC-01**. Isso se baseia na presença do sinal simpleto diagnóstico em $\delta \approx 6,3$ ppm, que é característico do **DC-01** e não da **TCP**, em que o sinal simpleto deveria estar situado em $\delta \approx 4,6$ ppm. É notável que, em todos os artigos em questão, o espectro de RMN de ^1H claramente corresponde ao **DC-01**, sugerindo, mais uma vez, uma confusão na identificação do produto das reações. Portanto, esse é mais um caso de equívoco na caracterização da estrutura sintetizada.

No que diz respeito à síntese da **PCN**, uma dinâmica diferente se manifestou. Esta reação se provou viável; no entanto, a obtenção do produto desejado dependeu da aplicação das condições catalíticas adequadas.

Inicialmente, quando se investigou a síntese da **PCN**, as condições de reação utilizadas foram aquelas otimizadas para a **CPD** (utilização de 5 mol% de $(\text{MSI})_3\text{PW}$, temperatura de 80 °C, tempo de reação de 1 h e água como solvente). No entanto, nessas circunstâncias, o produto resultante foi o **DC-01**. Foram feitos testes com outros catalisadores ácidos, como HCl e HPW, no entanto, o resultado manteve-se inalterado, e o produto obtido permaneceu sendo o **DC-01**.

Posteriormente, quando se recorreu a catalisadores básicos ocorreu à formação da **PCN**. A primeira tentativa com um catalisador básico baseou-se nas condições descritas na literatura,¹³⁰ utilizando ureia como catalisador (10 mol%). No entanto, a reação não foi conduzida no formato ideal de uma RMC, já que começou com a reação entre a malononitrila e o aldeído, para formar o intermediário reacional da condensação desses dois reagentes. Somente após 20 min de reação que o terceiro componente (4-hidroxycumarina) foi adicionado, essa reação está representada no Esquema 39. Sob essa metodologia, um rendimento de 78% foi alcançado para o produto isolado. É importante salientar que esta não é a condição ótima para uma RMC, visto que o conceito envolve a adição simultânea de três ou mais reagentes. Outro aspecto intrigante para análise é o uso da ureia como catalisador na síntese da **PCN**, que resulta na formação do produto desejado. Isso contrasta com a reação da **CPD**, na qual a ureia é empregada como um dos reagentes. Este contraste serve como uma evidência adicional de que a reação da **CPD** não gera o produto desejado, uma vez que, se o processo fosse eficaz, a ureia não poderia ser utilizada como catalisador na síntese da **PCN**, já que seria consumida na formação da

CPD. Inicialmente o produto foi detectado por HRMS (Figura 27), mas em seguida o derivado **PCN** foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 28).



Esquema 39. Reação de síntese da **PCN** utilizando ureia como catalisador.

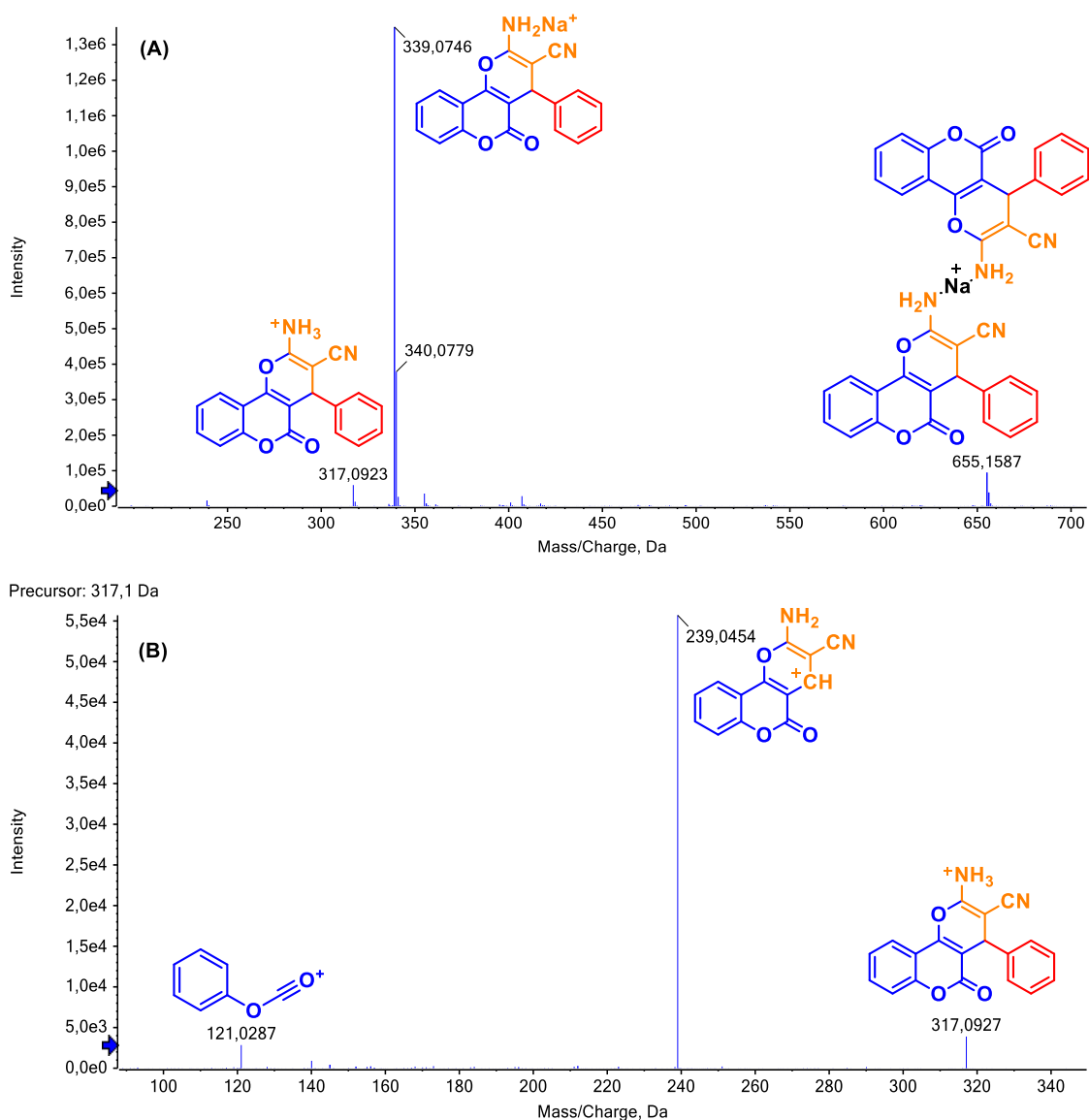


Figura 27. (A) Espectro de ESI(+)-MS da **PCN**. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS da **PCN**.

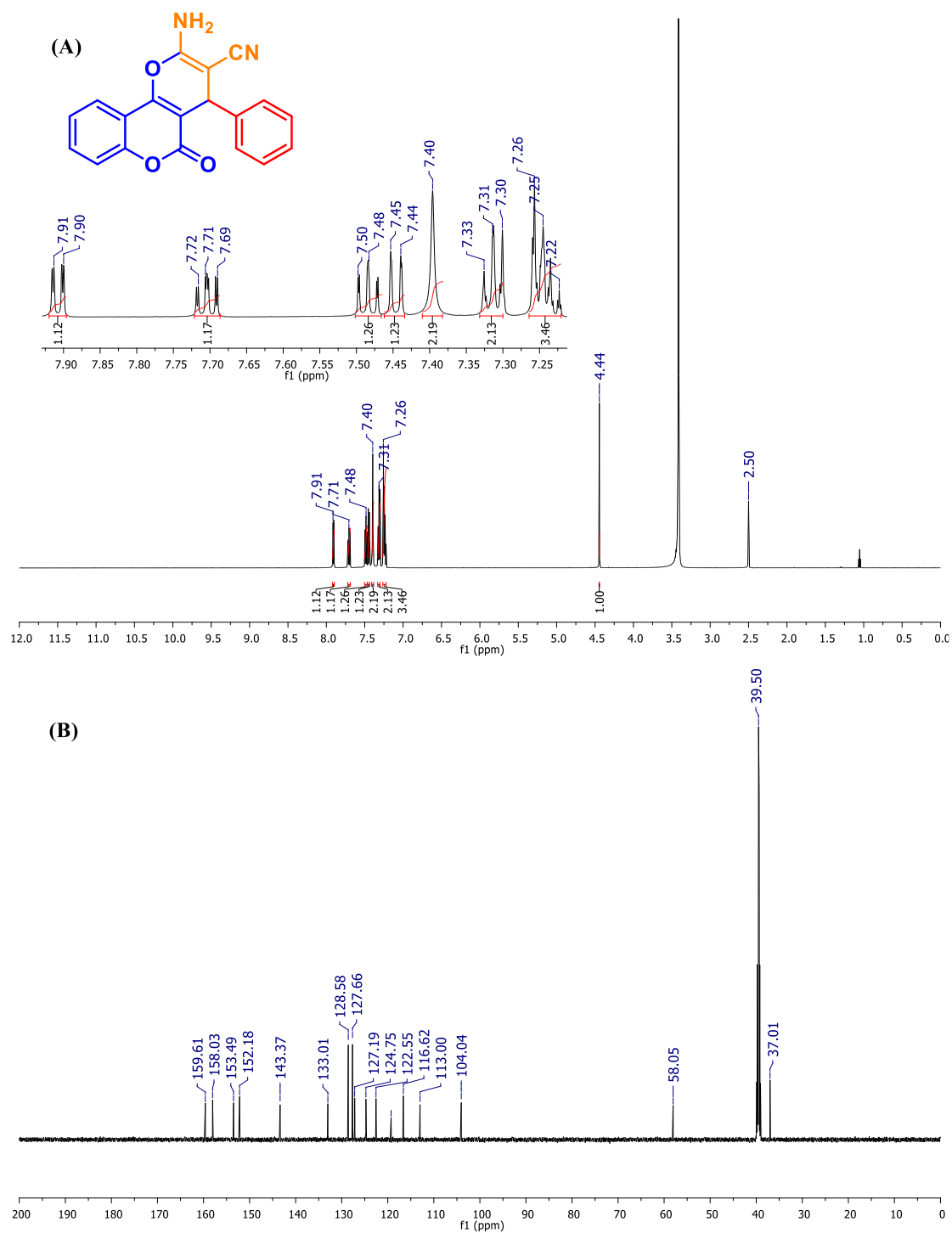
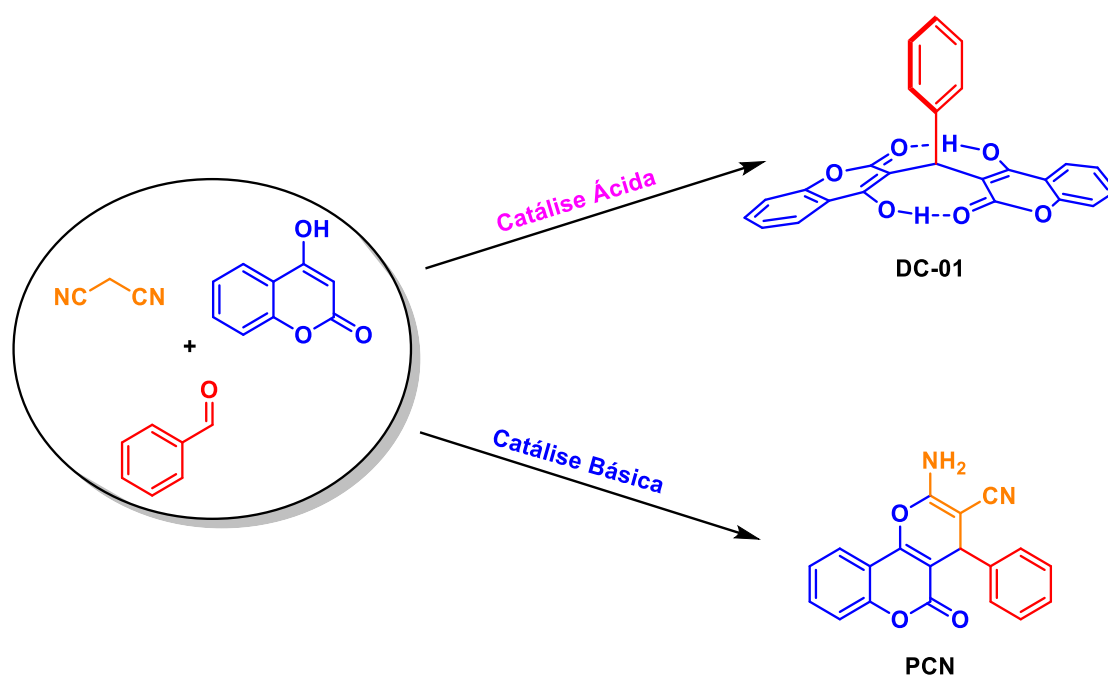


Figura 28. (A) Espectro de RMN de ^1H da PCN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$). (B) Espectro de RMN de ^{13}C para a PCN (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Em seguida, com o intuito de realizar a síntese em uma RMC clássica, também foi testada a adição dos três reagentes simultaneamente, juntamente com 10 mol% de ureia como catalisador. Essa nova abordagem resultou em uma mistura de produtos, 65% do produto formado sendo o **DC-01** e apenas 35% sendo a **PCN**. Foram testados outros catalisadores básicos, sendo eles o *t*-BuOK e o Na₂CO₃. O uso desses catalisadores resultou apenas na formação da **PCN**, sem a produção de subprodutos. Assim, para essa reação, torna-se evidente que a utilização de catalisadores ácidos leva a formação do **DC-01** como produto principal, enquanto o uso de catalisadores básicos conduz à formação da **PCN**. Essa constatação está apresentada no Esquema 40.



Esquema 40. Obtenção de produtos diferentes pela mudança do catalisador. Em catalisadores ácidos a **DC-01** é formado e em catalisadores básicos a **PCN** é formado.

No que diz respeito ao espectro de RMN de ¹H da **PCN**, ele é prontamente distinguível do espectro da **DC-01**. Essa diferenciação é viável porque o sinal do hidrogênio benzílico da **PCN** surge em torno de δ 4,4 ppm, enquanto o da **DC-01** é encontrado aproximadamente em δ 6,4 ppm. Essa discrepância nos deslocamentos químicos dos sinais é ilustrada na Figura 29.

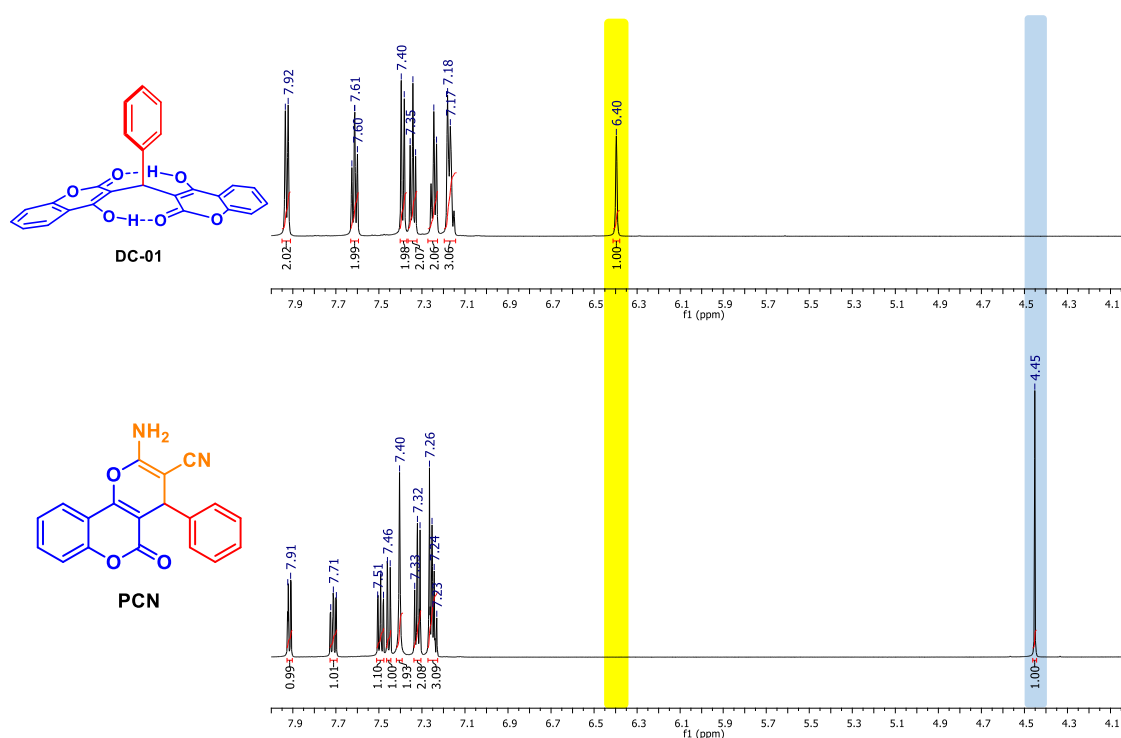
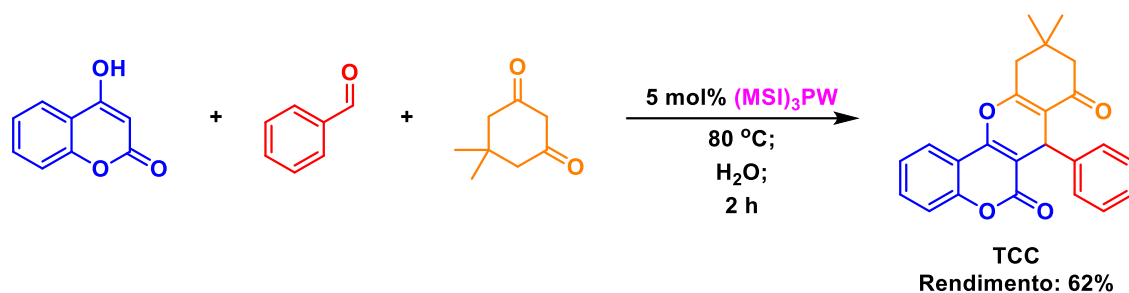


Figura 29. Comparação entre os sinais de RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) dos hidrogênios benzílicos do **DC-01** (espectro de cima) e da **PCN** (espectro de baixo). Note que os deslocamentos desses sinais são bem afastados entre si.

Portanto, a RMC para a síntese da **PCN** provou ser eficaz, ao contrário das outras RMCs testadas. É importante notar que a obtenção da estrutura proposta é viável, contanto que a catálise básica seja empregada na síntese.

Decidiu-se, por fim, investigar uma última RMC, mais especificamente a síntese de um derivado de tetraidro-cromeno-cromenodiona (**TCC**), conforme ilustrado no Esquema 41. Esta reação foi realizada sob condições de catálise ácida, empregando 5 mmol de cada reagente e 10 mL de água como solvente. A mistura foi aquecida a 80 °C e mantida nessa temperatura por 2 h. A análise por meio de RMN de ¹H permitiu a identificação da formação tanto do **TCC** quanto do **DC-01**, com uma proporção de 7:3 de **TCC** para **DC-01**. O **TCC** foi facilmente purificado por recristalização usando uma mistura de EtOH/CH₂Cl₂ (1:4, v/v), resultando em um rendimento de 63% do produto isolado. Assim, esta RMC demonstrou eficácia mesmo sob condições ácidas. Os dados espectroscópicos correspondentes podem ser encontrados na seção de Anexos.

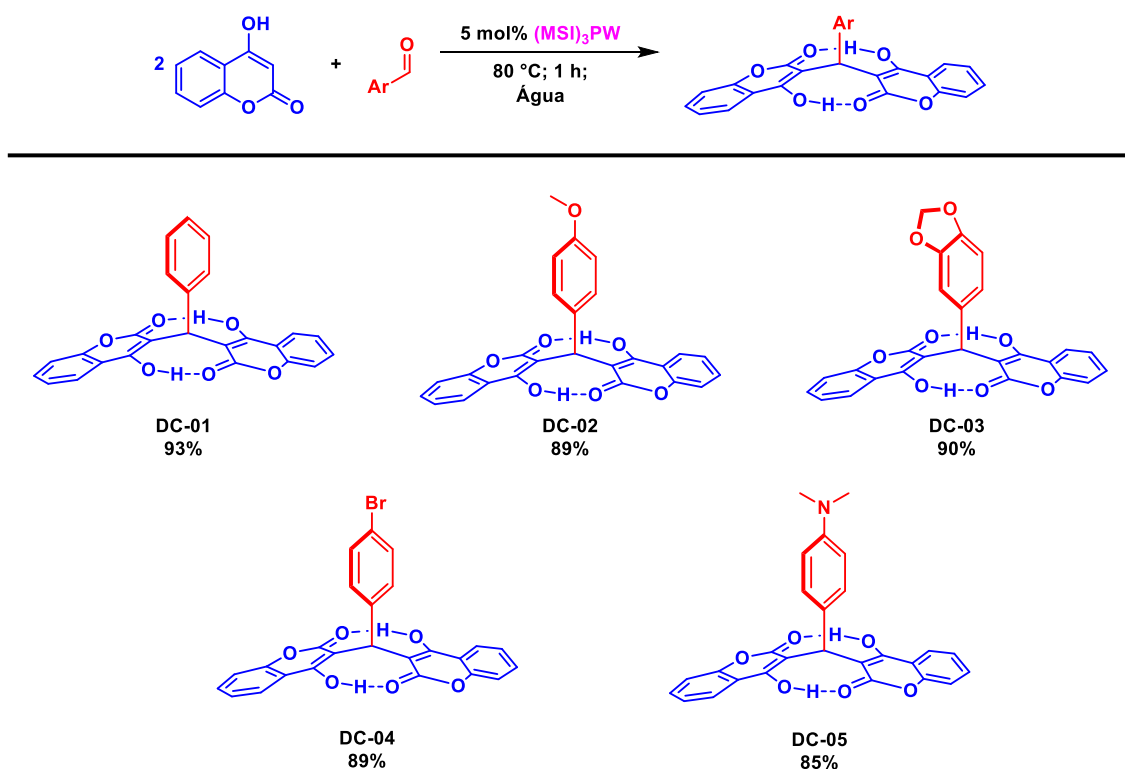


Esquema 41. Condições reacionais testadas para a síntese da TCC.

Síntese de novos adutos DCs e aplicação biológica

Com base na tentativa de síntese dos supostos adutos CPDs (Esquema 11), optou-se por sintetizar derivados do DC-01 para avaliar suas propriedades biológicas. Os DCs são reconhecidos por apresentarem propriedades biológicas notáveis, conforme destacado em uma revisão recente.¹³¹ Essas propriedades incluem (i) ação antibacteriana,¹³² (ii) inibição de enzimas lipoxigenases,¹³³ (iii) efeitos anticoagulantes,¹³⁴ (iv) benefícios antidiabéticos,¹³⁵ dentre outros.

Quanto às condições reacionais para a síntese dos novos adutos DCs, foram empregadas as condições otimizadas para a síntese da suposta CPD-01 (Figura 9). Optou-se por utilizar água como solvente, apesar de se obterem rendimentos ligeiramente superiores ao empregar líquidos iônicos. Essa escolha foi motivada pela facilidade de remoção do produto do meio reacional, uma vez que os DCs são insolúveis em água. Tal abordagem permitiu a recuperação eficiente do catalisador, viabilizando sua reutilização por até três vezes, com rendimentos superiores a 90%, pois o catalisador utilizado permanecia solúvel em fase aquosa. Detalhes sobre a metodologia de recuperação do catalisador podem ser encontrados na sessão Materiais e Métodos. As condições reacionais e os DCs sintetizados, juntamente com seus respectivos rendimentos, estão ilustrados no Esquema 42.



Esquema 42. Síntese dos derivados de **DC**.

É relevante observar que na literatura existem alguns artigos que investigaram as atividades biológicas dos alegados derivados de **CPD**, destacando atividades interessantes, como antiviral¹³⁶ e antituberculosa.¹³⁷ Não questionamos a eficácia das atividades biológicas reportadas; no entanto, é necessário reavaliar a estrutura genuinamente ativa. Como evidenciado, as **CPDs** eram **DCs** que apresentavam algum grau de contaminação por ureia/tioureia. Portanto, optamos por avaliar a atividade biológica tanto dos compostos puros quanto dos contaminados, a fim de determinar se apresentam alguma influência significativa.

O bioensaio selecionado inicialmente para este estudo foi o de coleóptilos de trigo estiolados, que é conhecido por sua rapidez (resultado em apenas 24 h) e sensibilidade. Macias e colaboradores propuseram essa técnica como o primeiro passo na busca por potenciais novos herbicidas,¹³⁸ devido à sua alta sensibilidade.¹³⁹

Foram avaliados oito adutos das supostas **CPDs** (**DCs** contaminados com ureia ou tioureia) e quatro estruturas de **DCs** sem contaminações. Os resultados estão expressos como porcentagem de inibição de crescimento em comparação com o controle negativo. As informações provenientes dos tratamentos com as **DCs** puras estão ilustradas na

Figura 30, enquanto os resultados relacionados ao tratamento com as **DCs** contaminadas (representadas na ilustração como **CPDs**) estão apresentados na Figura 31

Durante os ensaios, observou-se que a maioria das **CPDs** inibiu significativamente o crescimento dos coleóptilos, com destaque para as **CPDs 3 e 4**, que exibiram um IC_{50} inferior ao do Logran®, utilizado como controle positivo. Uma exceção foi observada na **CPD-08**, que não apresentou atividade significativa. Em relação às amostras puras, não foram observadas diferenças significativas em comparação com as contaminadas, e ambas inibiram de forma expressiva o crescimento dos coleóptilos de trigo.

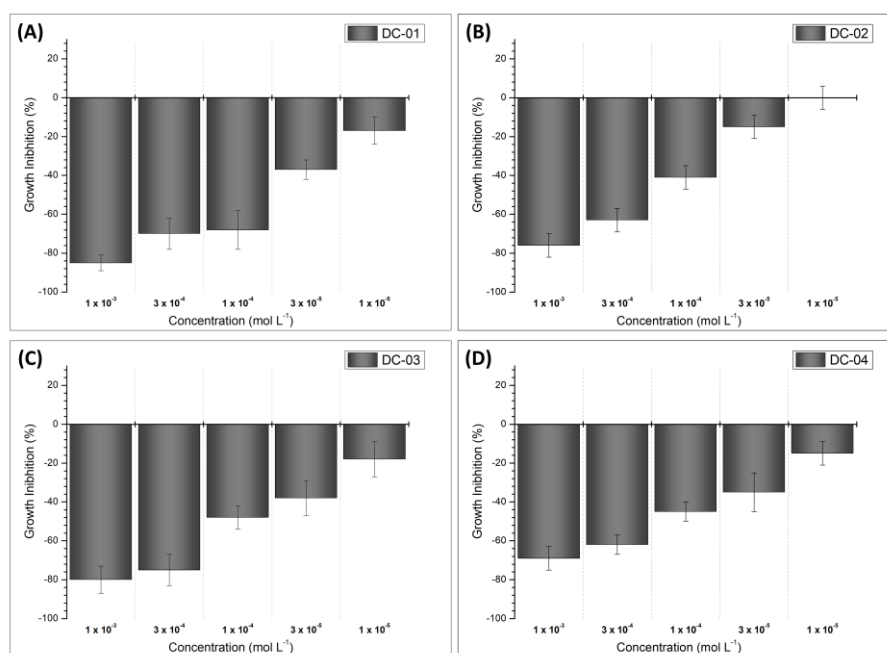


Figura 30. Resultados de inibição de crescimento dos coleóptilos para os tratamentos com as **DCs** puras.

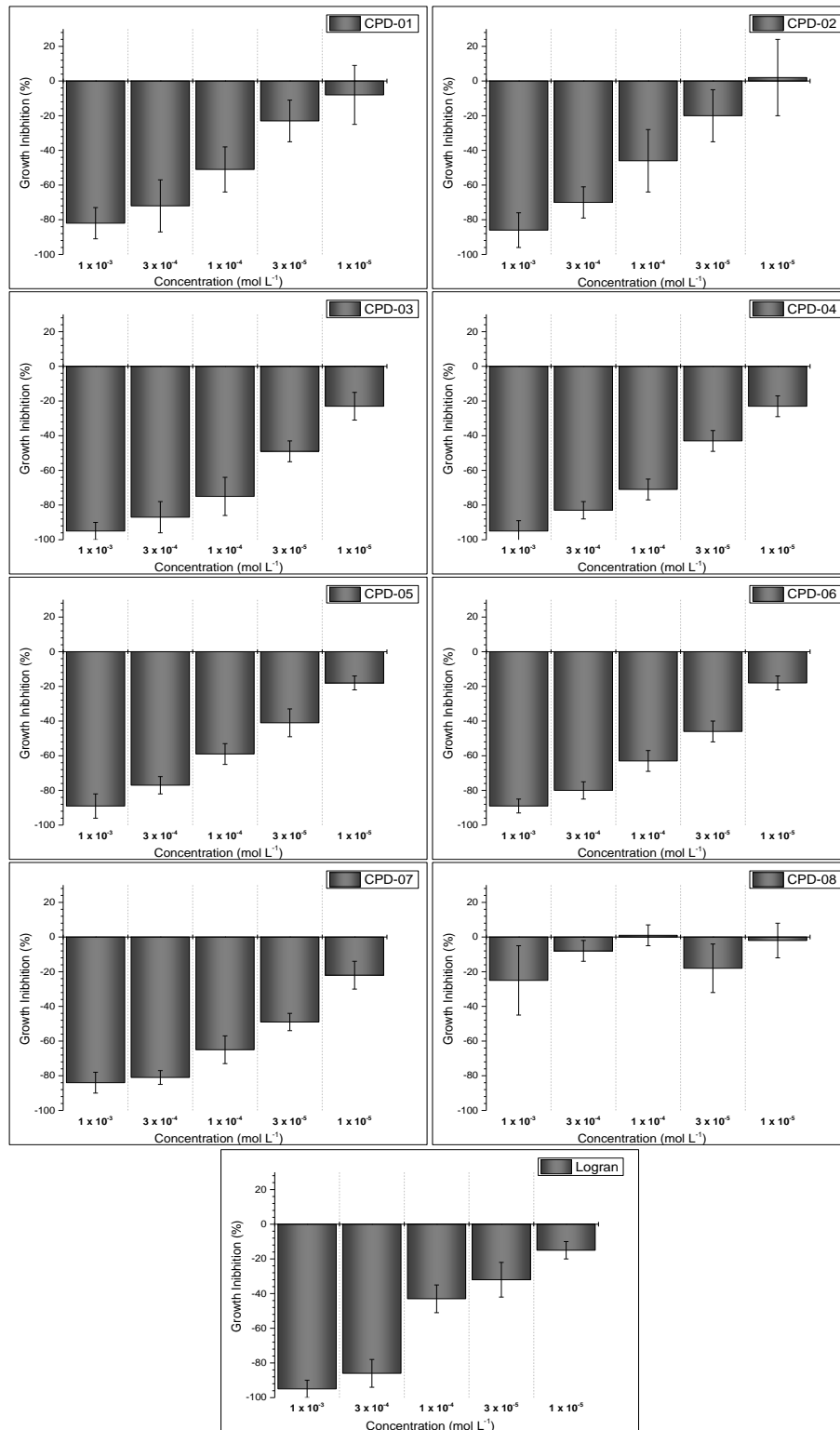


Figura 31. Resultados de inibição de crescimento dos coleótipos para os tratamentos com as supostas CPDs.

Esses resultados sugerem um notável potencial para a atividade biológica desses adutos **DCs**, uma vez que a maioria dos compostos demonstrou inibir o crescimento dos coleóptilos. No entanto, é importante ressaltar que este ensaio representa apenas um estágio preliminar, tornando essencial a condução de estudos adicionais para avaliar, de forma mais abrangente, a atividade herbicida desses produtos.

A literatura científica apresenta vários relatos sobre as atividades antitumorais de derivados de **DCs**, sendo destacados 16 artigos em uma revisão recente¹³¹ que evidenciam algum efeito antitumoral desses compostos. Entre eles, destaca-se um estudo¹⁴⁰ que investigou o impacto de um **DC** em células de câncer de mama (MCF7). Os resultados indicaram que o **DC** inibiu a proliferação, reduziu a viabilidade das células cancerosas e induziu apoptose. No entanto, o mecanismo de ação desse derivado não foi esclarecido, sugerindo a necessidade de estudos adicionais para determiná-lo.

Nesse contexto, outro bioensaio impactante escolhido visou avaliar o **DC-03**, tanto em sua forma pura quanto quando contaminado, como agente antitumoral. Essa estrutura foi selecionada devido ao fato de que o aldeído utilizado em sua síntese, o piperonal, possui substituintes em posições específicas que são comprovadamente essenciais para a atividade biológica de um aduto reconhecido na reação de Biginelli, o Piperastrol (apresentado na Figura 1).^{141,142} Os resultados do bioensaio para ambas as formas do **DC-03**, contaminado e puro, demonstraram atividade antitumoral semelhante, comparável ao controle positivo, Monastrol. O resultado comparando o controle positivo, o controle negativo e o tratamento com o **DC-03** puro estão ilustrados na Figura 32.

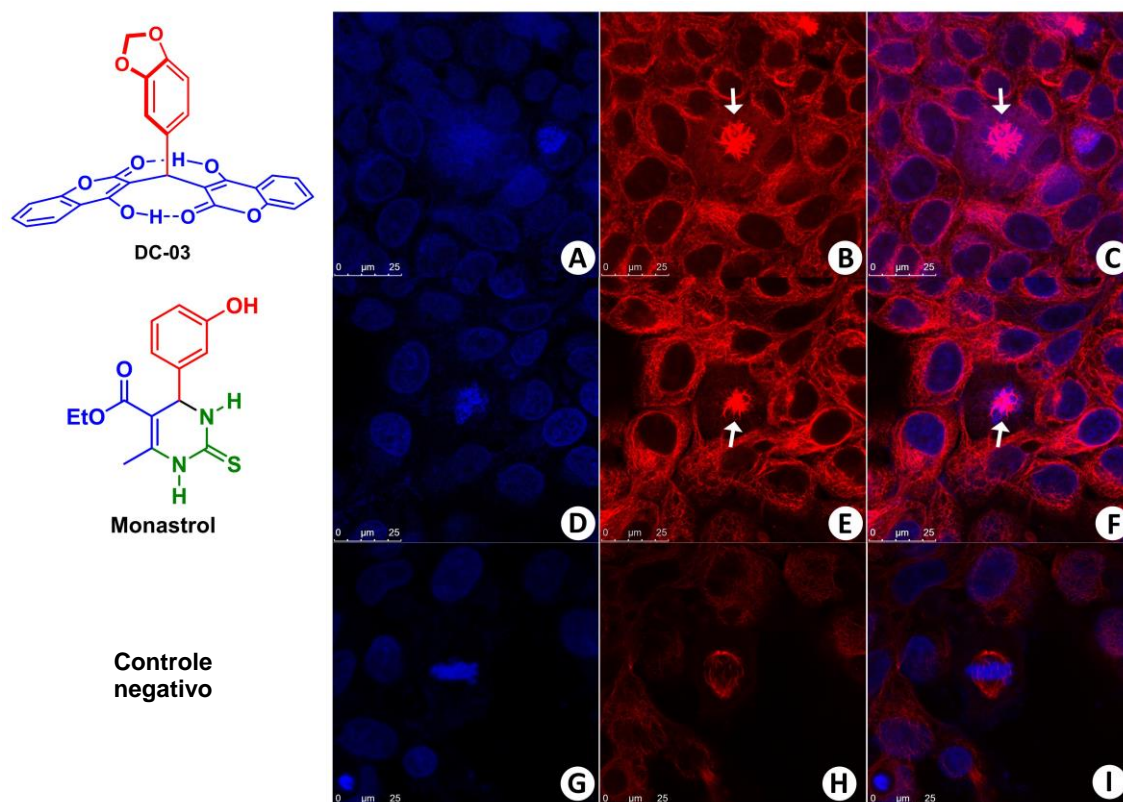


Figura 32. Divisão celular (mitose) inibição de células MCF-7 pelo **DC-03** (Topo) e por Monastrol, o controle positivo (Centro) e o controle negativo (Inferior). (A), (D) e (G) Núcleos corados com o corante DAPI disponível comercialmente (emissor azul). (B), (E) e (H) Anticorpo monoclonal anti- α -Tubulina disponível comercialmente (emissor vermelho). (C), (F) e (I) Imagens mescladas de (A)-(B), (D)-(E) e (G)-(H), respectivamente. Observe que o **DC-03** induziu fusos monoastrais em células em mitose, semelhante ao controle positivo.

No experimento, foi possível observar que, para o controle negativo (Figura 32G-D), as células cancerosas MCF-7 exibem a metáfase normal durante a divisão celular. Nesse processo, ocorre uma posição bipolar dos centrômeros, com microtúbulos emanando de polos celulares opostos, alinhando cromossomos no equador celular e preparando-os para a segregação às células filhas. Por outro lado, as células tratadas tanto com o Monastrol (controle positivo) (Figura 32D-F) quanto com o **DC-03** (Figura 32A-C) interromperam a mitose celular, ficando estagnadas na fase G2/M (fuso monoastral). Esse efeito resulta em morte celular, representando um resultado promissor na pesquisa de moléculas antitumorais. Uma observação significativa foi a maior densidade de microtúbulos no fuso mitótico monoastral de células tratadas exclusivamente com a molécula **DC-03**. A influência do **DC-03** nas células MCF-7 sugere fortemente a inibição da proteína cinesina KSP/Eg5, uma vez que, de acordo com a literatura,²⁴ a inibição dessas proteínas leva à formação de fusos monoastrais.

Para corroborar essas descobertas e fortalecer a hipótese, foram conduzidos estudos de *docking* utilizando o DOCK6^{143,144} usando o *Monastrol-bound Eg5* (PDB 1Q0B)¹⁴⁵ como referência para verificar as interações das estruturas do Monastrol e do **DC-03** na proteína Eg5. Os resultados do *docking* indicaram que tanto o Monastrol quanto o **DC-03** se ligam de maneira semelhante à proteína Eg5, com *score* de ligação de -45,55 e -39,27 kcal mol⁻¹, respectivamente. A interação entre essas estruturas e a proteína está ilustrada na Figura 33. Destaca-se a Figura 33C onde é possível observar que ambos os inibidores ocupam sítios de ligação idênticos, no entanto, é possível observar que o **DC-03** exibe interações hidrofóbicas adicionais em comparação com o controle positivo Monastrol ao adentrar uma região mais interna da proteína Eg5.

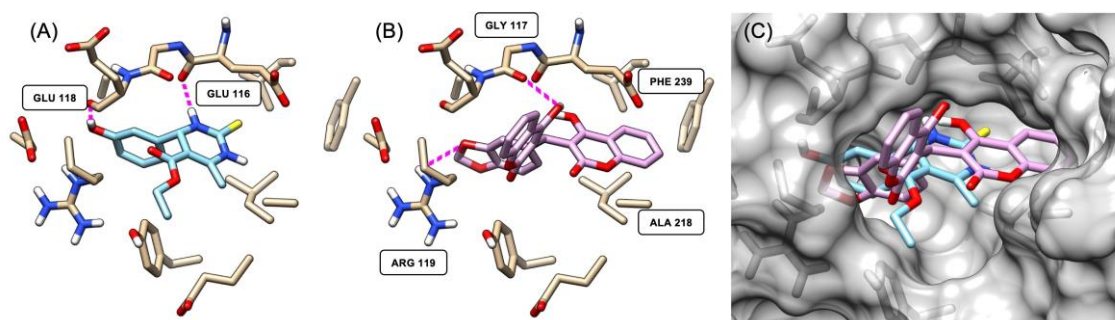


Figura 33. Encaixe do Monastrol (A) e **DC-03** (B) na proteína Eg5 (PDB 1Q0B), destacando interações eletrostáticas (linhas pontilhadas magenta) no sítio de ligação. (C) Sobreposição dos sítios de ligação do Monastrol e **DC-03** na Eg5. Note-se que o **DC-03** penetra mais profundamente na Eg5.

É crucial destacar que a *footprint* energético calculada pelo DOCK6, apresentada na Figura 34, confirma a capacidade do **DC-03**, devido ao seu tamanho maior, de penetrar em regiões mais profundas no sítio de ligação da proteína Eg5. Enquanto o Monastrol forma interações eletrostáticas mais robustas com os resíduos de aminoácidos GLU118 e GLU116 por meio de ligações de hidrogênio a 1,897 Å e 1,930 Å, respectivamente, o **DC-03** estabelece interações eletrostáticas mais sutis com os resíduos ARG119 e GLY117 a uma distância de 3,266 Å e 2,549 Å, respectivamente. No entanto, o **DC-03** mantém estabilidade no sítio de ligação por meio de interações hidrofóbicas com resíduos adicionais, como PHE239 e ALA218.

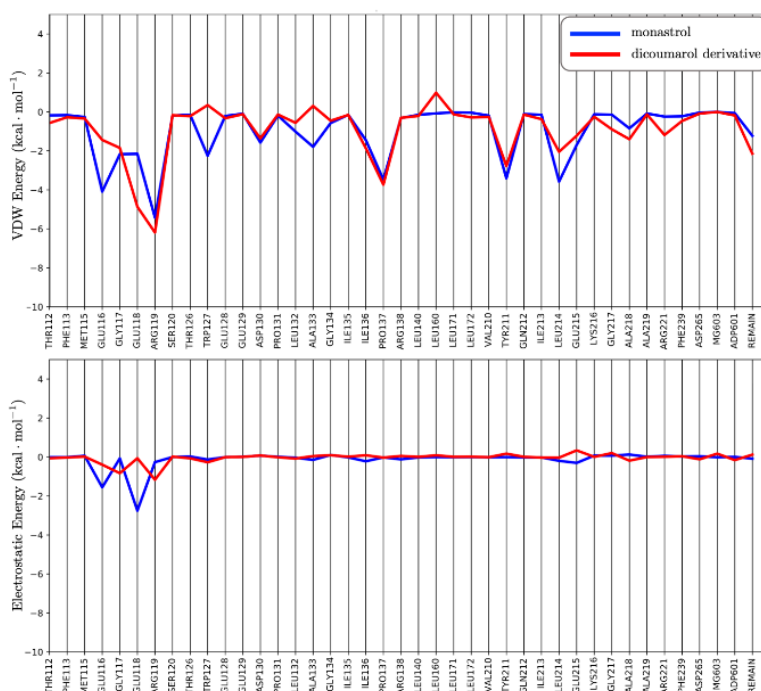


Figura 34. Pegada energética de Monastrol (azul) e **DC-03** (vermelho) no sítio de ligação da Eg5. Cada linha vertical representa um resíduo, indicando a energia correspondente. O gráfico superior mostra a energia de van der Waals (VDW), enquanto o inferior exibe as energias eletrostáticas. Ambos compartilham interações cruciais em resíduos adjacentes (GLU116, GLY117, GLU118, ARG119).

Apesar de ser uma ferramenta poderosa, o *docking* proporciona apenas imagens estáticas do sistema, negligenciando os efeitos dinâmicos relacionados à entropia, solvatação e dessolvatação das moléculas e proteínas. Para uma avaliação mais precisa da estabilidade do ligante, recorre-se à simulação de dinâmica molecular (DM). Assim, foram conduzidas duas simulações de DM, com uma duração de 10 ns cada. Uma das simulações monitorou as mudanças conformacionais da Eg5 com o ligante Monastrol, enquanto a outra investigou o ligante **DC-03**. Os resultados da DM foram expressos em termos de *root mean square deviation* (RMSD) das posições dos átomos em relação à posição inicial, indicando a estabilidade do sistema. O RMSD estabilizando em torno de um valor específico sugere um estado equilibrado, enquanto um aumento significativo pode indicar uma mudança conformacional ou a dissociação do sistema simulado.

Os valores de RMSD para as simulações de DM são apresentados na Figura 35, representando a variação do sistema para Eg5 + Monastrol (Figura 35A e 34C) e Eg5 + **DC-03** (Figura 35B e 34D). Observa-se que o RMSD nessas simulações se estabilizou em torno de 2 Å, indicando a estabilidade da proteína e do ligante ao longo do tempo de

simulação. Notavelmente, a variação dos ligantes dentro da Eg5 foi mínima e os sistemas mantiveram-se estáveis. Esses resultados sustentam a hipótese de que o **DC-03** e o Monastrol podem exercer efeitos semelhantes por serem ligantes estáveis dentro do sítio da Eg5.

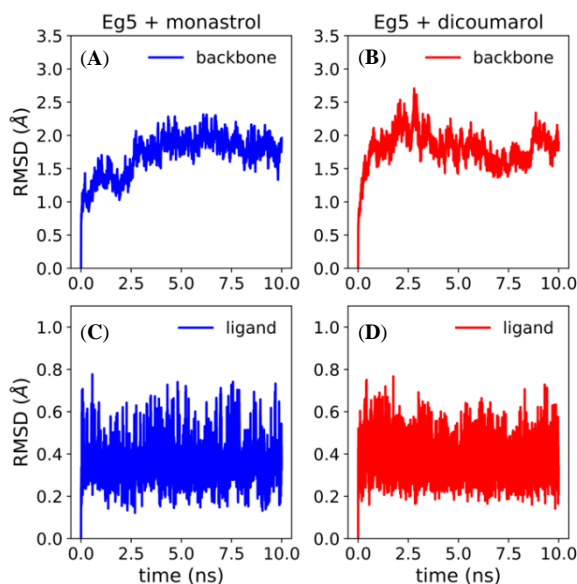


Figura 35. Análise de DM. (A) e (B), respectivamente, RMSD dos sistemas Monastrol + Eg5 e do derivado dicoumarol **DC-03** + Eg5. As variações médias na estrutura principal foram 1,709 Å para Eg5 + Monastrol e 1,811 Å para Eg5 + **DC-03**. (C) e (D), respectivamente, os RMSDs médios para os ligantes Monastrol e **DC-03** no sítio de ligação da Eg5, os valores médios foram 0,351 Å e 0,383 Å.

Conclusões e perspectivas

Esta dissertação aplicou um modelo de efeito de solvente baseado nas descrições de Kamlet-Abboud-Taft para avaliar os impactos do solvente na reação de síntese das **CPDs**, uma reação variante de Biginelli. Entretanto, os resultados iniciais apontaram discrepâncias com o modelo, direcionando a pesquisa para uma análise mais abrangente dos dados espectroscópicos e espectrométricos da estrutura sintetizada, bem como para uma revisão minuciosa dos relatos na literatura. Essa abordagem revelou que a RMC para a síntese das **CPDs** e de algumas variantes da Biginelli não conduz ao produto esperado. Nessas instâncias, os produtos formados consistem em derivados de dicumarol, com a presença de contaminantes, como ureia ou tioureia, durante a RMC da **CPD**. Essa constatação foi reforçada pela falha nas tentativas de reproduzir as condições da literatura.

Para a RMC na síntese da **CPD-01**, realizou-se uma investigação aprofundada dos mecanismos reacionais envolvidos na transformação recorrente. A espectrometria de massas foi empregada para monitorar os intermediários reacionais e investigar hipóteses, com reações monitoradas tanto com quanto sem reagentes ionicamente marcados. Os dados adquiridos corroboraram a hipótese sobre a ineficiência da reação, apontando ainda para a atribuição incorreta de vários adutos de MCR e possibilitando a proposição de um ciclo catalítico envolvendo a pseudo RMC.

Neste trabalho foi possível detectar e caracterizar uma estrutura análoga à **CPD** (com uma guanidina). Apesar dos rendimentos muito baixos, a caracterização estrutural foi conduzida exclusivamente por ESI(+)-MS/MS. Conclui-se que a síntese da **CPD** permanece como um desafio a ser enfrentado, abrindo perspectivas para futuros estudos em busca de metodologias e sequências sintéticas distintas, uma vez que nenhuma condição de RMC descrita até o momento permitiu a produção bem-sucedida dessa estrutura.

Os ensaios biológicos conduzidos com os derivados de dicumarol reiteraram suas notáveis atividades biológicas, evidenciadas pelos resultados positivos nos ensaios de coleóptilos de trigo e na avaliação da atividade antitumoral. Notou-se, de maneira significativa, que os contaminantes não exerceram impacto na atividade biológica dos **DCs**. No estudo da atividade antitumoral do **DC-03**, emergiu um novo potencial inibidor de Eg5, respaldado pela convergência de dados biológicos e computacionais (*docking* e

dinâmica molecular). Contudo, investigações adicionais serão cruciais para validar e consolidar essa hipótese.

Por fim, as perspectivas que se abriram com esta dissertação são: (i) necessidade de desenvolvimento de uma metodologia de síntese alternativa e eficiente para a síntese de derivados **CPD**, (ii) aplicação dos outros adutos de **DC** como possíveis agentes antitumorais, (iii) expandir o estudo dos **DCs** como inibidores da proteína Eg5, (iv) expandir os estudos dos **DCs** como possíveis herbicidas e (v) desenvolver e aplicar **DCs** fluorescentes sem atividade antitumoral como possíveis marcadores celulares.

Referências

- (1) Zimmerman, J. B.; Anastas, P. T.; Erythropel, H. C.; Leitner, W. Designing for a green chemistry future. *Science* **2020**, *367*, 397-400.
- (2) Sheldon, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437-1451.
- (3) Sheldon, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem.* **2017**, *19*, 18-43.
- (4) Neto, B. A. D.; Beck, P. S.; Sorto, J. E. P.; Eberlin, M. N. In Melting Points We Trust: A Review on the Misguiding Characterization of Multicomponent Reactions Adducts and Intermediates. *Molecules* **2022**, *27*, 7552.
- (5) Hulme, C.; Gore, V. "Multi-component reactions : Emerging chemistry in drug discovery" 'From xylocain to crixivan'. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 51-80.
- (6) Biggs-Houck, J. E.; Younai, A.; Shaw, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 371-382.
- (7) Rogerio, K.; Vitorio, F.; Kümmerle, A.; Graebin, C. Reações multicomponentes: Um breve histórico ea versatilidade destas reações na síntese de moléculas bioativas. *Rev. Virtual Quim* **2016**, *8*, 1934-1962.
- (8) Climent, M. J.; Corma, A.; Iborra, S. Homogeneous and heterogeneous catalysts for multicomponent reactions. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 16-58.
- (9) Sánchez-Sancho, F.; Escolano, M.; Gaviña, D.; Csáky, A. G.; Sánchez-Roselló, M.; Díaz-Oltra, S.; del Pozo, C. Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin(thio)one Containing Scaffold: Biginelli-like Reactions. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 948.
- (10) Gao, L.; Shaabani, S.; Reyes Romero, A.; Xu, R.; Ahmadianmoghaddam, M.; Dömling, A. 'Chemistry at the speed of sound': automated 1536-well nanoscale synthesis of 16 scaffolds in parallel. *Green Chem.* **2023**, *25*, 1380-1394.
- (11) Gu, Y. Multicomponent reactions in unconventional solvents: state of the art. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2091-2128.
- (12) Cioc, R. C.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. Multicomponent reactions: advanced tools for sustainable organic synthesis. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2958-2975.
- (13) Biginelli, P. Intorno ad uramidi aldeidiche dell'etere acetilacetico. *Gazz. Chim. Ital* **1891**, *21*, 497-500.
- (14) Biginelli, P. Intorno ad uramidi aldeidiche dell'etere acetilacetico. II. *Gazz. Chim. Ital.* **1891**, *21*, 455-461.
- (15) Biginelli, P. Ueber aldehyduramide des acetessigäthers. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1891**, *24*, 1317-1319.
- (16) Biginelli, P. Ueber aldehyduramide des acetessigäthers. II. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1891**, *24*, 2962-2967.
- (17) Biginelli, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, *23*, 360-416.
- (18) Biginelli, P. Aldehydureidderivate des Acet-und Oxalessigäthers. *Ber Deutsch Chem Ges* **1893**, *26*, 447-450.
- (19) Alvim, H. G.; da Silva Júnior, E. N.; Neto, B. A. What do we know about multicomponent reactions? Mechanisms and trends for the Biginelli, Hantzsch, Mannich, Passerini and Ugi MCRs. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 54282-54299.
- (20) Kappe, C. O.; Roschger, P. Synthesis and reactions of "biginelli-compounds". Part I. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 55-64.
- (21) Oliver Kappe, C. 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6937-6963.
- (22) Kappe, C. O. Recent Advances in the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. New Tricks from an Old Dog. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 879-888.
- (23) de Fátima, Â.; Braga, T. C.; Neto, L. d. S.; Terra, B. S.; Oliveira, B. G. F.; da Silva, D. L.; Modolo, L. V. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 363-373.

- (24) Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* **1999**, *286*, 971-974.
- (25) Maliga, Z.; Kapoor, T. M.; Mitchison, T. J. Evidence that Monastrol Is an Allosteric Inhibitor of the Mitotic Kinesin Eg5. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 989-996.
- (26) Kapoor, T. M.; Mayer, T. U.; Coughlin, M. L.; Mitchison, T. J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 975-988.
- (27) Alvim, H. G. O.; Correa, J. R.; Machado, T. R.; Silva, W. A.; D. Neto, B. A. Catalyzed and non-catalyzed synthesis of bioactive monastrol. *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1713-1715.
- (28) Blangy, A.; Lane, H. A.; d'Hérin, P.; Harper, M.; Kress, M.; Nigg, E. A. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **1995**, *83*, 1159-1169.
- (29) Saxton, W. M.: Chapter 16 Isolation and Analysis of Microtubule Motor Proteins. In *Methods in Cell Biology*; Goldstein, L. S. B., Fyrberg, E. A., Eds.; Academic Press, 1994; Vol. 44; pp 279-288.
- (30) Sakowicz, R.; Berdelis, M. S.; Ray, K.; Blackburn, C. L.; Hopmann, C.; Faulkner, D. J.; Goldstein, L. S. B. A Marine Natural Product Inhibitor of Kinesin Motors. *Science* **1998**, *280*, 292-295.
- (31) Alvim, H. G. O.; Lima, T. B.; de Oliveira, A. L.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, F. M.; Gozzo, F. C.; Souza, R. Y.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. Facts, Presumptions, and Myths on the Solvent-Free and Catalyst-Free Biginelli Reaction. What is Catalysis for? *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3383-3397.
- (32) Folkers, K.; Johnson, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The Mechanism of Formation of Tetrahydropyrimidines by the Biginelli Reaction1. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3784-3791.
- (33) Sweet, F.; Fissekis, J. D. Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8741-8749.
- (34) Kappe, C. O. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Support for an N-Acyliminium Ion Intermediate1. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7201-7204.
- (35) Cepanec, I.; Litvić, M.; Filipan-Litvić, M.; Grüngold, I. Antimony(III) chloride-catalysed Biginelli reaction: a versatile method for the synthesis of dihydropyrimidinones through a different reaction mechanism. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11822-11827.
- (36) Litvić, M.; Večenaj, I.; Ladišić, Z. M.; Lovrić, M.; Vinković, V.; Filipan-Litvić, M. 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* **2010**, *66*, 3463-3471.
- (37) Alvim, H. G. O.; Pinheiro, D. L. J.; Carvalho-Silva, V. H.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C.; da Silva, W. A.; Amarante, G. W.; Neto, B. A. D. Combined Role of the Asymmetric Counteranion-Directed Catalysis (ACDC) and Ionic Liquid Effect for the Enantioselective Biginelli Multicomponent Reaction. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12143-12153.
- (38) Clark, J. H.; Macquarrie, D. J.; Sherwood, J. The Combined Role of Catalysis and Solvent Effects on the Biginelli Reaction: Improving Efficiency and Sustainability. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5174-5182.
- (39) Noppawan, P.; Sangon, S.; Supanchaiyamat, N.; Hunt, A. J. Vegetable oil as a highly effective 100% bio-based alternative solvent for the one-pot multicomponent Biginelli reaction. *Green Chem.* **2021**, *23*, 5766-5774.
- (40) Oliveira, G. H. C.; Ramos, L. M.; de Paiva, R. K. C.; Passos, S. T. A.; Simões, M. M.; Machado, F.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. Synthetic enzyme-catalyzed multicomponent reaction for Isoxazol-5(4H)-one Syntheses, their properties and biological application; why should one study mechanisms? *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 1514-1531.
- (41) Kamlet, M. J.; Abboud, J. L.; Taft, R. W. The solvatochromic comparison method. 6. The .pi.* scale of solvent polarities. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6027-6038.

- (42) Kamlet, M. J.; Taft, R. The solvatochromic comparison method. I. The. beta.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377-383.
- (43) Taft, R.; Kamlet, M. J. The solvatochromic comparison method. 2. The. alpha.-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886-2894.
- (44) Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877-2887.
- (45) Jessop, P. G.; Jessop, D. A.; Fu, D.; Phan, L. Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chem.* **2012**, *14*, 1245-1259.
- (46) Stucchi, M.; Lesma, G.; Meneghetti, F.; Rainoldi, G.; Sacchetti, A.; Silvani, A. Organocatalytic Asymmetric Biginelli-like Reaction Involving Isatin. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1877-1884.
- (47) Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hrabínova, M.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kristian, P.; Kuca, K.; Imrich, J. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tacrine Derivatives and Tacrine–Coumarin Hybrids as Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7073-7084.
- (48) Sandhya, B.; Giles, D.; Mathew, V.; Basavarajaswamy, G.; Abraham, R. Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of coumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4696-4701.
- (49) Manojkumar, P.; Ravi, T. K.; GOPALAKRISHNAN, G. Synthesis of coumarin heterocyclic derivatives with antioxidant activity and in vitro cytotoxic activity against tumour cells. *Acta. Pharm.* **2009**, *59*, 159-168.
- (50) Khoobi, M.; Emami, S.; Dehghan, G.; Foroumadi, A.; Ramazani, A.; Shafiee, A. Synthesis and Free Radical Scavenging Activity of Coumarin Derivatives Containing a 2-Methylbenzothiazoline Motif. *Arch. Pharm.* **2011**, *344*, 588-594.
- (51) Nofal, Z. M.; El-Zahar, M. I.; Abd El-Karim, S. S. Novel Coumarin Derivatives with Expected Biological Activity. *Molecules* **2000**, *5*, 99-113.
- (52) Bhosle, M. R.; Wahul, D. B.; Bondle, G. M.; Sarkate, A.; Tiwari, S. V. An efficient multicomponent synthesis and in vitro anticancer activity of dihydropyranochromene and chromenopyrimidine-2,5-diones. *Synth. Commun.* **2018**, *48*, 2046-2060.
- (53) Bhut, D.; Gami, R.; Parikh, A.; Sharma, C.; Patel, P. SYNTHESIS OF SOME NEW BENZOPYRANO [4, 3-d] PYRIMIDINES AS POTENTIAL ANTIMICROBIAL AGENTS. *Pharm. Sci. Monit.* **2015**, *6*, 149-156.
- (54) Kidwai, M.; Saxena, S.; Mohan, R. Environmentally benign synthesis of benzopyranopyrimidines. *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, *42*.
- (55) Sahu, P. K.; Sahu, P. K.; Kaurav, M. S.; Messali, M.; Almutairi, S. M.; Sahu, P. L.; Agarwal, D. D. One-pot facile and mild construction of densely functionalized pyrimidines in water via consecutive C–C and C–S bonds formation. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 33952-33959.
- (56) Heravi, M. M.; Hosseinejad, T.; Tamimi, M.; Zadsirjan, V.; Mirzaei, M. 12-Tungstoboric acid (H5BW12O40) as an efficient Lewis acid catalyst for the synthesis of chromenopyrimidine-2,5-diones and thioxochromenopyrimidin-5-ones: Joint experimental and computational study. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1205*, 127598.
- (57) Mehrabi, H.; Baniasad-Dashtabi, M. One-Pot Synthesis of Novel Heterocyclic Chromenopyrimidine-2,5-Dione and Thioxochromenopyrimidin-5-one Derivatives. *J. Chem. Res.* **2015**, *39*, 294-295.
- (58) Kaurav, M. S.; Sahu, P. K.; Sahu, P. K.; Messali, M.; Almutairi, S. M.; Sahu, P. L.; Agarwal, D. D. An efficient, mild and metal free L-proline catalyzed construction of fused pyrimidines under microwave conditions in water. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 3755-3763.
- (59) Sahu, P. K.; Sahu, P. K.; Kaurav, M. S.; Messali, M.; Almutairi, S. M.; Sahu, P. L.; Agarwal, D. D. One-pot facile and mild construction of densely functionalized pyrimidines in water via consecutive C-C and C-S bonds formation. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 33952-33959.
- (60) Mehrabi, H.; Baniasad-Dashtabi, M. One-pot synthesis of novel heterocyclic chromenopyrimidine-2,5-dione and thioxochromenopyrimidin-5-one derivatives. *J. Chem. Res.* **2015**, 294-295.

- (61) DMS. UCSF Computer Graphics Laboratory: San Francisco, CA, 2003.
- (62) DesJarlais, R. L.; Sheridan, R. P.; Seibel, G. L.; Dixon, J. S.; Kuntz, I. D.; Venkataraghavan, R. Using shape complementarity as an initial screen in designing ligands for a receptor binding site of known three-dimensional structure. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 722-729.
- (63) Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 505-524.
- (64) Alvim, H. G. O.; de Lima, T. B.; de Oliveira, H. C. B.; Gozzo, F. C.; de Macedo, J. L.; Abdelnur, P. V.; Silva, W. A.; Neto, B. A. D. Ionic Liquid Effect over the Biginelli Reaction under Homogeneous and Heterogeneous Catalysis. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1420-1430.
- (65) Shaikh, Y. I.; Shaikh, S. S.; Ahmed, K.; Nazeruddin, G. M.; Shaikh, V. S. A Facile and Efficient Tamarind Juice Catalyzed One-Pot Synthesis of Benzopyranopyrimidines in Aqueous Medium Just by Grinding: A Green Chemistry Approach. *Orient. J. Chem.* **2020**, *36*, 415-418.
- (66) Bhagi, A. K.; Singh, K. P.; Kumar, A.; Priya; Manav, N. One Pot Synthesis of Benzopyranones and Benzoxazinones Catalyzed by MMO. *Indian J. Chem.* **2022**, *61*, 1173-1179.
- (67) Besharati, Z.; Malmir, M.; Heravi, M. M. Cu₂O NPs immobilized on Montmorillonite-K10 decorated by acidic-ionic liquid: An environmentally friendly, heterogeneous and recyclable catalyst for the synthesis of benzopyranopyrimidines. *Inorg. Chem. Commun.* **2022**, *143*, 109813.
- (68) Sahu, P. K.; Sahu, P. K.; Kaurav, M. S.; Messali, M.; Almutairi, S. M.; Sahu, P. L.; Agarwal, D. D. Metal-Free Construction of Fused Pyrimidines via Consecutive C–C and C–N Bond Formation in Water. *ACS Omega* **2018**, *3*, 15035-15042.
- (69) Taft, R. W.; Abboud, J. L. M.; Kamlet, M. J.; Abraham, M. H. Linear Solvation Energy Relations. *J. Solution Chem.* **1985**, *14*, 153-186.
- (70) Kamlet, M. J.; Abboud, J. L.; Taft, R. W. Solvatochromic Comparison Method .6. π^* Scale of Solvent Polarities. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6027-6038.
- (71) Taft, R. W.; Kamlet, M. J. Solvatochromic Comparison Method .2. α -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886-2894.
- (72) Kamlet, M. J.; Taft, R. W. Solvatochromic Comparison Method .1. β -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377-383.
- (73) Greer, A. J.; Jacquemin, J.; Hardacre, C. Industrial Applications of Ionic Liquids. *Molecules* **2020**, *25*, 5207.
- (74) Sheldon, R. A. E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem. Commun.* **2008**, 3352-3365.
- (75) Sheldon, R. A. The E factor: fifteen years on. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1273-1283.
- (76) Sheldon, R. A. Atom utilisation, E factors and the catalytic solution. *C. R. Acad. Sci. II C* **2000**, *3*, 541-551.
- (77) do Nascimento, L. G.; Dias, I. M.; de Souza, G. B. M.; Dancini-Pontes, I.; Fernandes, N. R. C.; de Souza, P. S.; de Oliveira, G. R.; Alonso, C. G. Niobium Oxides as Heterogeneous Catalysts for Biginelli Multicomponent Reaction. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 11170-11180.
- (78) Goncalves, I. L.; Davi, L.; Rockenbach, L.; das Neves, G. M.; Kagami, L. P.; Santos Canto, R. F.; Figueiro, F.; Oliveira Battastini, A. M.; Eifler-Lima, V. L. Versatility of the Biginelli reaction: Synthesis of new biphenyl dihydropyrimidin-2-thiones using different ketones as building blocks. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 2759-2762.
- (79) Fan, W. G.; Queneau, Y.; Popowycz, F. HMF in multicomponent reactions: utilization of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in the Biginelli reaction. *Green Chem.* **2018**, *20*, 485-492.
- (80) Lillo, V. J.; Saa, J. M. Towards Enzyme-like, Sustainable Catalysis: Switchable, Highly Efficient Asymmetric Synthesis of Enantiopure Biginelli Dihydropyrimidinones or Hexahydropyrimidinones. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17182-17186.
- (81) Wang, J.-H.; Tang, G.-M.; Wang, Y.-T.; Cui, Y.-Z.; Wang, J.-J.; Ng, S. W. A series of phenyl sulfonate metal coordination polymers as catalysts for one-pot Biginelli reactions under solvent-free conditions. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 17829-17840.

- (82) Zhang, Q.; Wang, X.; Li, Z.; Wu, W.; Liu, J.; Wu, H.; Cui, S.; Guo, K. Phytic acid: a biogenic organocatalyst for one-pot Biginelli reactions to 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 19710-19715.
- (83) Karimi, B.; Mobaraki, A.; Mirzaei, H. M.; Zareyee, D.; Vali, H. Improving the Selectivity toward Three-Component Biginelli versus Hantzsch Reactions by Controlling the Catalyst Hydrophobic/Hydrophilic Surface Balance. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 212-219.
- (84) Zafar, A. M.; Qureshi, S.; Khan, M. N.; Azad, M.; Munawar, M. A.; Khan, M. A. Amino Acids Catalyzed Biginelli Protocols. *Asian J. Chem.* **2013**, *25*, 3244-3246.
- (85) Dewan, M.; Kumar, A.; Saxena, A.; De, A.; Mozumdar, S. Biginelli Reaction Catalyzed by Copper Nanoparticles. *Plos One* **2012**, *7*, e43078.
- (86) Godoi, M. N.; Costenaro, H. S.; Kramer, E.; Machado, P. S.; Montes D'Oca, M. G.; Russowsky, D. Synthesis of monastrol and of new Biginelli compounds promoted by $\text{In}(\text{OTf})_3$. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 1010-1013.
- (87) Russowsky, D.; Lopes, F. A.; da Silva, V. S. S.; Canto, K. F. S.; D'Oca, M. G. M.; Godoi, M. N. Multicomponent Biginelli's synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones promoted by $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 165-169.
- (88) Tejero, T. N.; Kummerle, A. E.; Bauerfeldt, G. F. Theory Behind Biginelli Reaction Revisited. *Rev. Virtual Quim.* **2019**, *11*, 1203-1224.
- (89) Traven, V. F.; Negrebetsky, V. V.; Vorobjeva, L. I.; Carberry, E. A. Keto-enol tautomerism, RMN spectra, and H-D exchange of 4-hydroxycoumarins. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 377-383.
- (90) Reddy, C. R.; Kiranmai, N.; Johny, K.; Pendke, M.; Naresh, P. Nucleophilic Addition of 4-Hydroxycoumarin to Baylis-Hillman Acetate Adducts. *Synthesis* **2009**, 399-402.
- (91) Wolf, F. F.; Klare, H.; Goldfuss, B. Asymmetric Michael Additions of 4-Hydroxycoumarin to beta-Nitrostyrenes with Chiral, Bifunctional Hydrogen-Bonding Catalysts. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1762-1768.
- (92) Abdou, M. M.; El-Saeed, R. A.; Bondock, S. Recent advances in 4-hydroxycoumarin chemistry. Part 2: Scaffolds for heterocycle molecular diversity. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 974-1003.
- (93) Abdolmohammadi, S.; Karimpour, S. Rapid and mild synthesis of quinazolinones and chromeno[d]pyrimidinones using nanocrystalline copper(I) iodide under solvent-free conditions. *Chin. Chem. Lett.* **2016**, *27*, 114-118.
- (94) Sadjadi, S.; Heravi, M. M.; Zadsirjan, V.; Beheshtiha, S. Y. S.; Kelishadi, R. R. HPA@Methenamine-HNTs: A Novel Catalyst for Promoting One-Pot and Three-Component Synthesis of Chromenopyrimidine-2,5-Diones and Thioxochromenopyrimidin-5-ones in Aqueous Media. *Chemistryselect* **2018**, *3*, 12031-12038.
- (95) Ziarani, G. M.; Moradi, R.; Ahmadi, T.; Gholamzadeh, P. The molecular diversity scope of 4-hydroxycoumarin in the synthesis of heterocyclic compounds via multicomponent reactions. *Mol. Divers.* **2019**, *23*, 1029-1064.
- (96) Traven, V. F.; Negrebetsky, V. V.; Vorobjeva, L. I.; Carberry, E. A. Keto-enol tautomerism, RMN spectra, and H-D exchange of 4-hydroxycoumarins. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 377-383.
- (97) Priede, E.; Brica, S.; Bakis, E.; Udris, N.; Zicmanis, A. Ionic liquids as solvents for the Knoevenagel condensation: understanding the role of solvent-solute interactions. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 9132-9142.
- (98) Macquarrie, D. J.; Clark, J. H.; Lambert, A.; Mdoe, J. E. G.; Priest, A. Catalysis of the Knoevenagel reaction by gamma-aminopropylsilica. *React. Funct. Polym.* **1997**, *35*, 153-158.
- (99) Xian, F.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G. High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 708-719.
- (100) Limberger, J.; Leal, B. C.; Monteiro, A. L.; Dupont, J. Charge-tagged ligands: useful tools for immobilising complexes and detecting reaction species during catalysis. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 77-94.
- (101) Rodrigues, M. O.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. D. How and Why to Investigate Multicomponent Reactions Mechanisms? A Critical Review. *Chem. Rec.* **2021**, *21*, 2762-2781.

- (102) Matache, M.; Dobrota, C.; Bogdan, N. D.; Dumitru, I.; Ruta, L. L.; Paraschivescu, C. C.; Farcasanu, I. C.; Baci, I.; Funeriu, D. P. Synthesis of fused dihydro-pyrimido[4,3-d]coumarins using Biginelli multicomponent reaction as key step. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5949-5957.
- (103) Srivastava, S. Knoevenagel Condensation and Michael Addition in Bio-Renewable Deep Eutectic Solvent: Facile Synthesis of a Library of Bis-enol Derivatives. *ChemistrySelect* **2020**, *5*, 799-803.
- (104) Kandasamy, K.; Pachamuthu, M. P.; Muthusamy, M.; Ganesabaskaran, S.; Ramanathan, A. Synthesis of novel pyrazolylbiscoumarin derivatives using FeTUD-1 as a mesoporous solid acid catalyst. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 25367-25373.
- (105) Montagut-Romans, A.; Boulven, M.; Lemaire, M.; Popowycz, F. Efficient C-3 reductive alkylation of 4-hydroxycoumarin by dehydrogenative oxidation of benzylic alcohols through ruthenium catalysis. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 1794-1801.
- (106) Sabitha, G.; Reddy, G. K. K.; Reddy, K. B.; Yadav, J. Vanadium (III) chloride catalyzed Biginelli condensation: solution phase library generation of dihydropyrimidin-(2H)-ones. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6497-6499.
- (107) Kidwai, M.; Saxena, S.; Mohan, R. Environmentally benign synthesis of benzopyranopyrimidines. *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, *42*, 52-55.
- (108) Kidwai, M.; Priya; Rastogi, S. Reaction of Coumarin Derivatives with Nucleophiles in Aqueous Medium. *Z. Naturforsch. B* **2008**, *63*, 71-76.
- (109) Ambre, P. K.; Pissurlenkar, R. R. S.; Wavhale, R. D.; Shaikh, M. S.; Khedkar, V. M.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Coutinho, E. C. Design, synthesis, and evaluation of 4-(substituted)phenyl-2-thioxo-3,4-dihydro-1H-chromino[4,3-d]pyrimidin-5-one and 4-(substituted)phenyl-3,4-dihydro-1H-chromino[4,3-d]pyrimidine-2,5-dione analogs as antitubercular agents. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 2564-2575.
- (110) Sahu, P. K. Role of surfactant and micelle promoted mild, green, highly efficient and sustainable approach for construction of novel fused pyrimidines at room temperature in water. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 67651-67661.
- (111) Sadjadi, S.; Heravi, M. M.; Malmir, M. Heteropolyacid@creatin-halloysite clay: an environmentally friendly, reusable and heterogeneous catalyst for the synthesis of benzopyranopyrimidines. *Res. Chem. Interm.* **2017**, *43*, 6701-6717.
- (112) Sadjadi, S.; Heravi, M. M.; Malmir, M. Bio-assisted synthesized Ag(0) nanoparticles immobilized on SBA-15/cyclodextrin nanosponge adduct: Efficient heterogeneous catalyst for the ultrasonic-assisted synthesis of benzopyranopyrimidines. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e4286.
- (113) Sadjadi, S.; M. Heravi, M.; Zadsirjan, V.; Beheshtiha, S. Y. S.; Kelishadi, R. R. HPA@Methenamine-HNTs: A Novel Catalyst for Promoting One-Pot and Three-Component Synthesis of Chromenopyrimidine-2,5-Diones and Thioxochromenopyrimidin-5-ones in Aqueous Media. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 12031-12038.
- (114) Rout, L.; Kumar, A.; Chand, P. K.; Achary, L. S. K.; Dash, P. Microwave-Assisted Efficient One-Pot Multi-Component Synthesis of Octahydroquinazolinone Derivatives Catalyzed by Cu@Ag Core-Shell Nanoparticle. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 5696-5706.
- (115) Puvithra, J.; Parthiban, D. Tannic Acid Catalyzed Green Synthesis of Functionalized Chromeno-Pyrimidine-2,5-dione/thione Derivatives. *Asian J. Chem.* **2020**, *32*, 2067-2074.
- (116) Ghobakhloo, F.; Azarifar, D.; Mohammadi, M. Macrocyclic pseudo crown-ether-manganese (II) complex coated on nanomagnetic LDH- catalyzed Biginelli annulation reactions. *J. Phys. Chem. Solids* **2023**, *175*, 111222.
- (117) Giron, D. Investigations of Polymorphism and Pseudo-polymorphism in Pharmaceuticals by Combined Thermoanalytical Techniques. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2001**, *64*, 37-60.
- (118) Cammenga, H. K.; Epple, M. Basic Principles of Thermoanalytical Techniques and Their Applications in Preparative Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1171-1187.
- (119) Ataee-Kachouei, T.; Nasr-Esfahani, M.; Baltork, I. M.-.; Mirkhani, V.; Moghadam, M.; Tangestaninejad, S.; Kia, R. Facile and Green One-Pot Synthesis of Fluorophore

Chromeno[4,3-b]quinolin-6-one Derivatives Catalyzed by Halloysite Nanoclay under Solvent-free Conditions. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 2301-2306.

(120) Ahmed, E. Y.; Abdel Latif, N. A.; Nasr, T.; Awad, H. M.; Abdelhafez, O. M. Design, synthesis, and molecular modeling of coumarin derivatives as MDM2 inhibitors targeting breast cancer. *Chem. Biol. Drug Des.* **2022**, *99*, 609-619.

(121) Pendem, V. B.; Nannapaneni, M. Iron Mediated Desulfurization and C-N Bond Formation: Strategy for the Synthesis of Thioureas. *Lett. Org. Chem.* **2018**, *15*, 1025-1029.

(122) Patel, R. V.; Park, S. W. Access to a new class of biologically active quinoline based 1,2,4-triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *71*, 24-30.

(123) Azam, F.; El-gnidi, B. A.; Alkskas, I. A. Combating oxidative stress in epilepsy: Design, synthesis, quantum chemical studies and anticonvulsant evaluation of 1-(substituted benzyldiene/ethylidene)-4-(naphthalen-1-yl)semicarbazides. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2817-2826.

(124) Ran, X.; Long, Y.; Yang, S.; Peng, C.; Zhang, Y.; Qian, S.; Jiang, Z.; Zhang, X.; Yang, L.; Wang, Z.; Yu, X. A novel route to unsymmetrical disubstituted ureas and thioureas by HMPA catalyzed reductive alkylation with trichlorosilane. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7*, 472-481.

(125) Basirat, N. Preparation and application of a novel supported 3-(3-sulfamic acid imidazolium trifluoroacetate)propyl triethoxysilane on magnetic nanoparticles as a new magnetic ionic liquid for the synthesis of triazole quinazolinones and fused pyrimidines. *Res. Chem. Interm.* **2020**, *46*, 5441-5458.

(126) Hosseinzadegan, S.; Hazeri, N.; Maghsoodlou, M. T. Synthesis of novel thiazolo[3,2-a]chromeno[4,3-d]pyrimidine-6(7H)-ones by bioactive Fe₃O₄@gly@thiophen@Cu(NO₃)₂ as reusable magnetic nanocatalyst. *Appl. Organomet. Chem.* **2020**, *34*, e5797.

(127) Khalaj, M. Preparation of benzo[4,5]thiazolo[3,2-a]chromeno[4,3-d]pyrimidin-6-one derivatives using MgO-MgAl₂O₄ composite nano-powder. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 6403-6411.

(128) Basirat, N.; Sajadikhah, S. S.; Zare, A. Ionic liquid-catalyzed synthesis of triazoloquinazolinones, chromeno[4,3-d]benzothiazolopyrimidines and benzoimidazopyrimidine derivatives. *Res. Chem. Interm.* **2020**, *46*, 3263-3275.

(129) Sahu, P. K. Eco-friendly grinding synthesis of a double-layered nanomaterial and the correlation between its basicity, calcination and catalytic activity in the green synthesis of novel fused pyrimidines. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 78409-78423.

(130) Brahmachari, G.; Banerjee, B. Facile and One-Pot Access to Diverse and Densely Functionalized 2-Amino-3-cyano-4H-pyrans and Pyran-Annulated Heterocyclic Scaffolds via an Eco-Friendly Multicomponent Reaction at Room Temperature Using Urea as a Novel Organo-Catalyst. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2*, 411-422.

(131) Sun, C.; Zhao, W.; Wang, X.; Sun, Y.; Chen, X. A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent. *Pharmacol. Res.* **2020**, *160*, 105193.

(132) Pansuriya, P. B.; Patel, M. N. Dicoumarol complexes of Cu(II), Fe(II) and Fe(III): preparation, characterization, in-vitro antibacterial and DNA binding activity. *Appl. Organomet. Chem.* **2007**, *21*, 719-727.

(133) Simijonovic, D.; Vlachou, E. E.; Petrovic, Z. D.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Litinas, K. E.; Stankovic, N.; Mihovic, N.; Mladenovic, M. P. Dicoumarol derivatives: Green synthesis and molecular modelling studies of their anti-LOX activity. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 741-752.

(134) Bavandi, H.; Habibi, Z.; Yousefi, M. Porcine pancreas lipase as a green catalyst for synthesis of bis-4-hydroxy coumarins. *Bioorg. Chem.* **2020**, *103*, 104139.

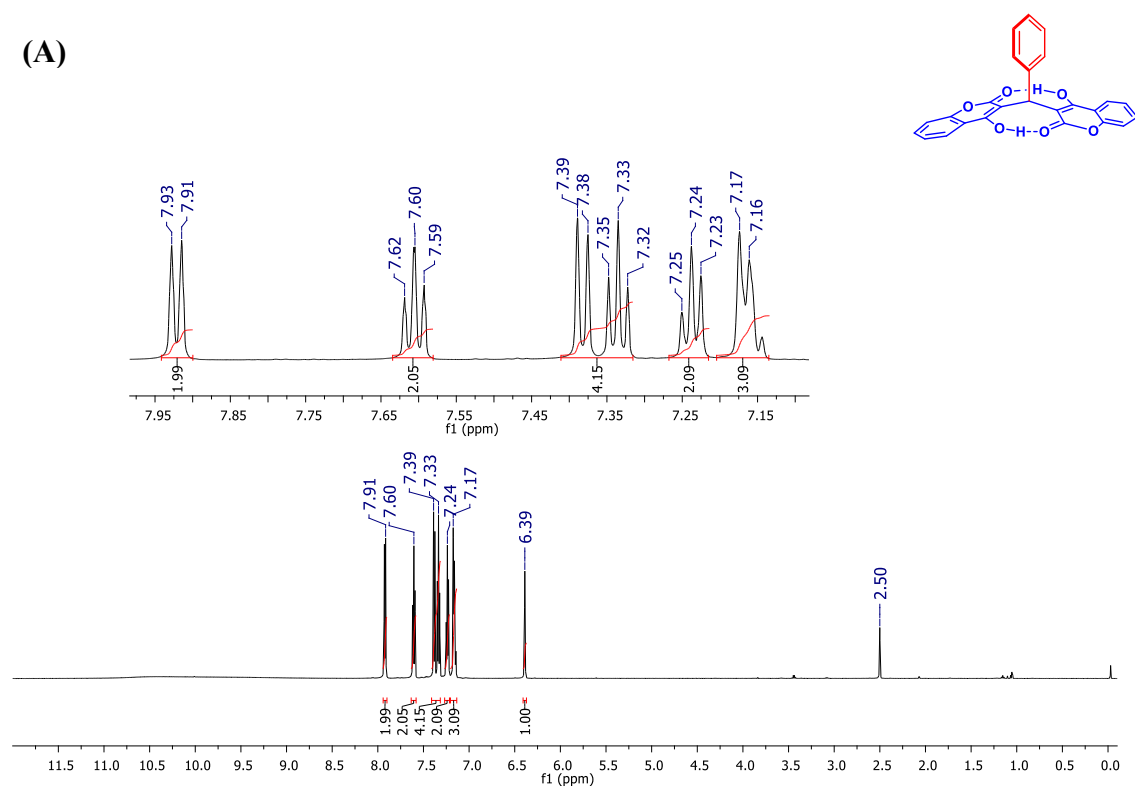
(135) Han, J.; Sun, L. D.; Chu, Y. Y.; Li, Z.; Huang, D. D.; Zhu, X. Y.; Qian, H.; Huang, W. L. Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Dicoumarol Glucagon-like Peptide 1 Conjugates. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9955-9968.

(136) Song, D. W.; Liu, G. L.; Xue, M. Y.; Qiu, T. X.; Wang, H.; Shan, L. P.; Liu, L.; Chen, J. In vitro and in vivo evaluation of antiviral activity of a phenylpropanoid derivative against spring viraemia of carp virus. *Virus Res.* **2021**, *291*, 198221.

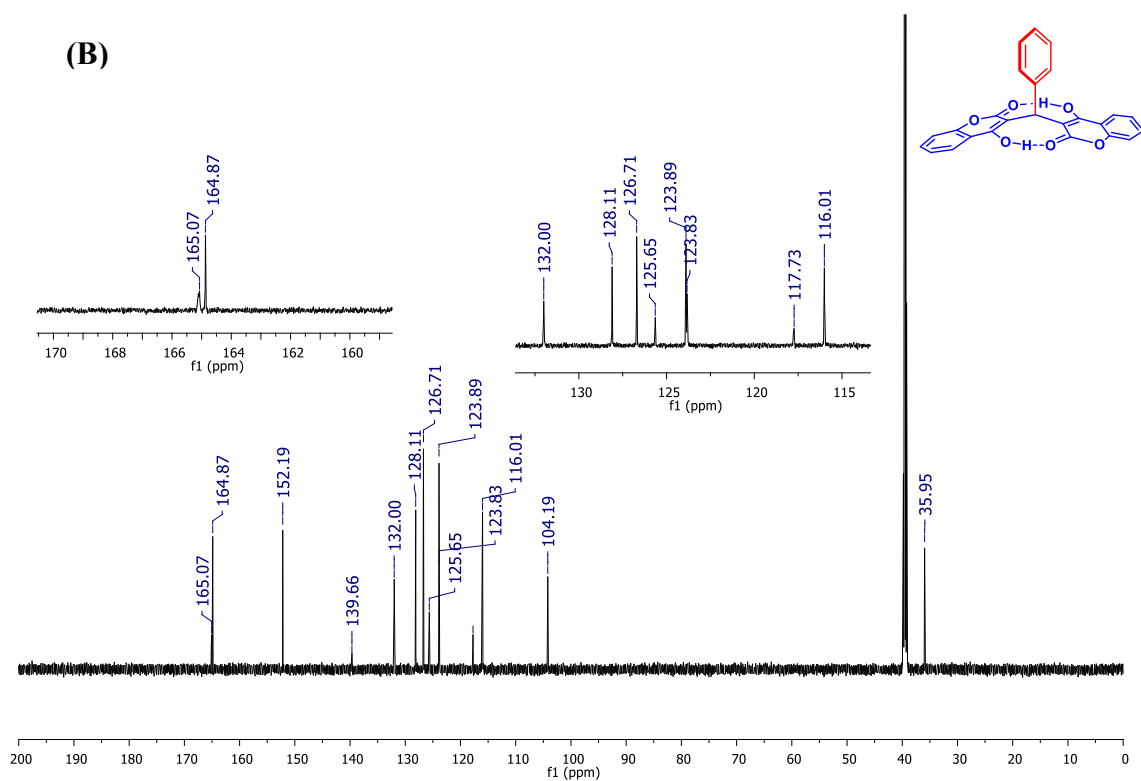
- (137) Ambre, P. K.; Pissurlenkar, R. R. S.; Wavhale, R. D.; Shaikh, M. S.; Khedkar, V. M.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Coutinho, E. C. Design, synthesis, and evaluation of 4-(substituted)phenyl-2-thioxo-3,4-dihydro-1H-chromino[4,3-d]pyrimidin-5-one and 4-(substituted)phenyl-3,4-dihydro-1H-chromino[4,3-d]pyrimidine-2,5-dione analogs as antitubercular agents. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 2564-2575.
- (138) Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M. G. Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2512-2521.
- (139) Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals.: Selection of standard target species. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2512-2521.
- (140) Aras, D.; Cinar, O.; Cakar, Z.; Ozkavukcu, S.; Can, A. Can dicoumarol be used as a gonad-safe anticancer agent: an in vitro and in vivo experimental study. *Molecular Human Reproduction* **2015**, *22*, 57-67.
- (141) Potdar, S. M.; Deshmukh, A. R.; Waghmode, K. T. New Strategy for Synthesis of Anticancer Active Piperastrol, Enastron Using Ammonium Sulfo cyanate. *Lett. Org. Chem.* **2021**, *18*, 924-927.
- (142) Russowsky, D.; Canto, R. F. S.; Sanches, S. A. A.; D'Oca, M. G. M.; de Fatima, A.; Pilli, R. A.; Kohn, L. K.; Antonio, M. A.; de Carvalho, J. E. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxomonastrol and oxygenated analogues. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 173-182.
- (143) Balius, T. E.; Mukherjee, S.; Rizzo, R. C. Implementation and evaluation of a docking-rescoring method using molecular footprint comparisons. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2273-2289.
- (144) Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Balius, T. E.; Roe, D. R.; Case, D. A.; Rizzo, R. C. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. *J. Comput-Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 749-773.
- (145) Yan, Y.; Sardana, V.; Xu, B.; Homnick, C.; Halczenko, W.; Buser, C. A.; Schaber, M.; Hartman, G. D.; Huber, H. E.; Kuo, L. C. Inhibition of a Mitotic Motor Protein: Where, How, and Conformational Consequences. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 547-554.

Anexos

(A)

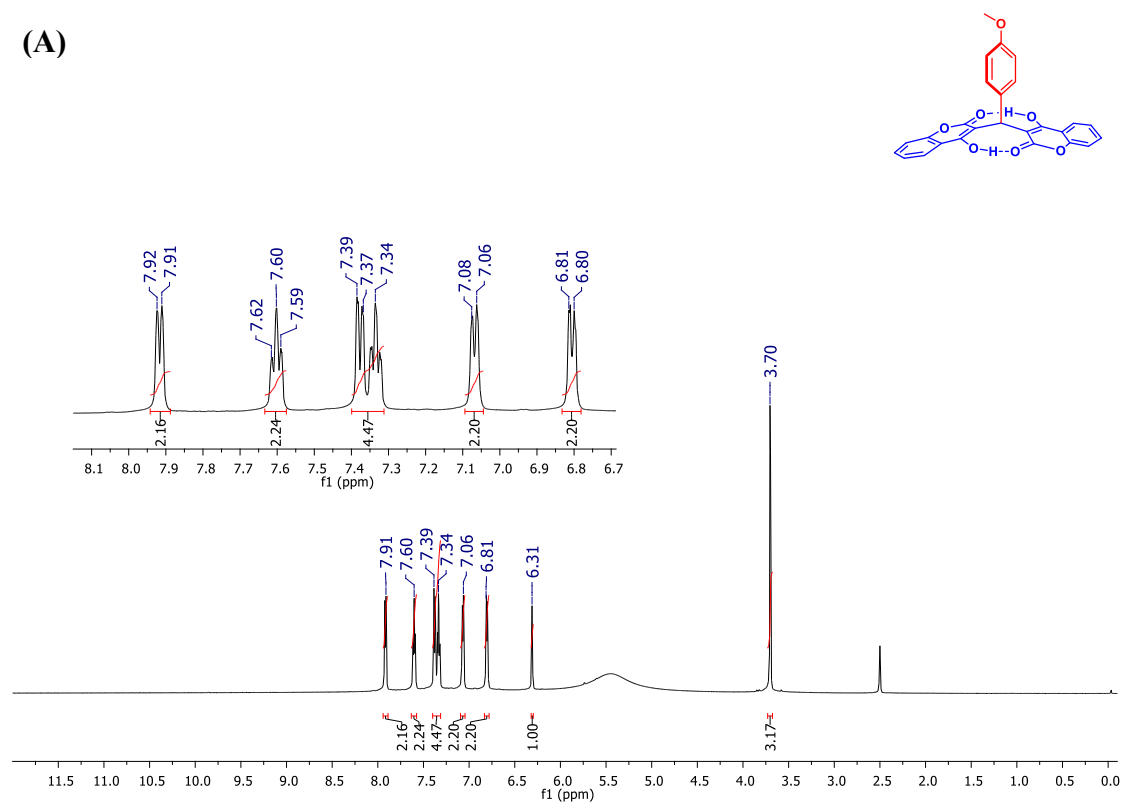


(B)

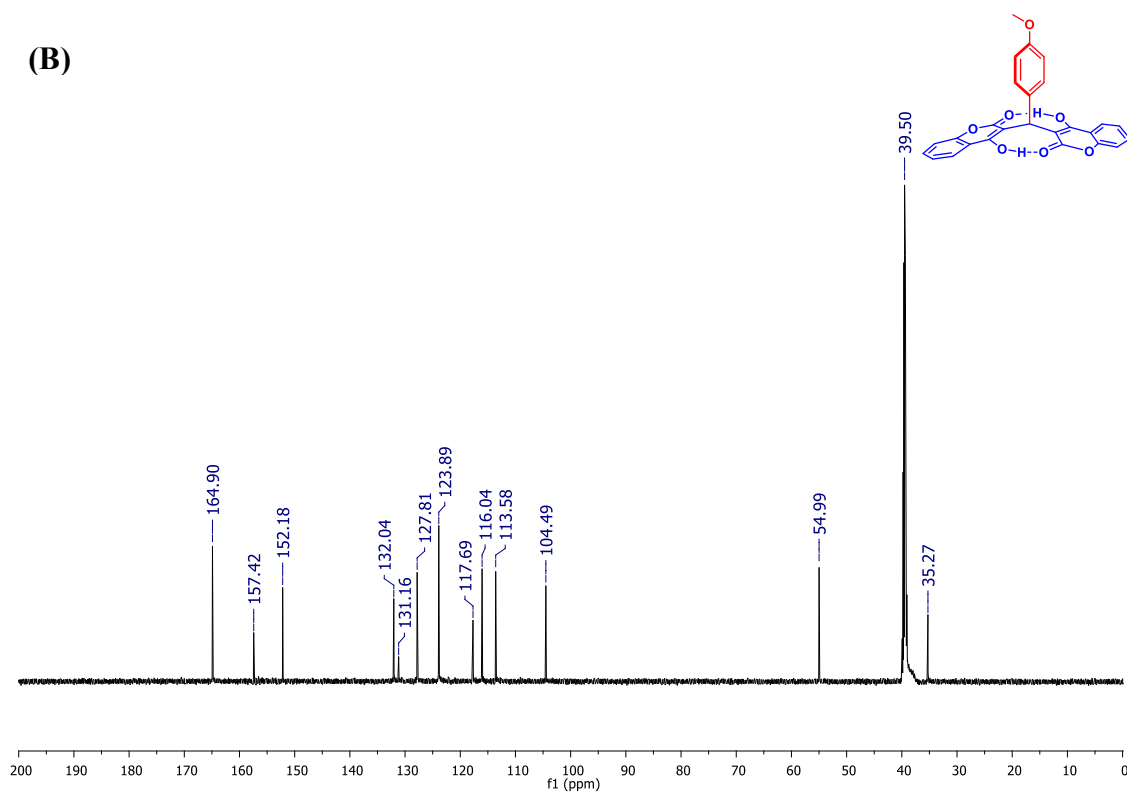


Anexo 1. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o **DC-01**. (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o **DC-01**.

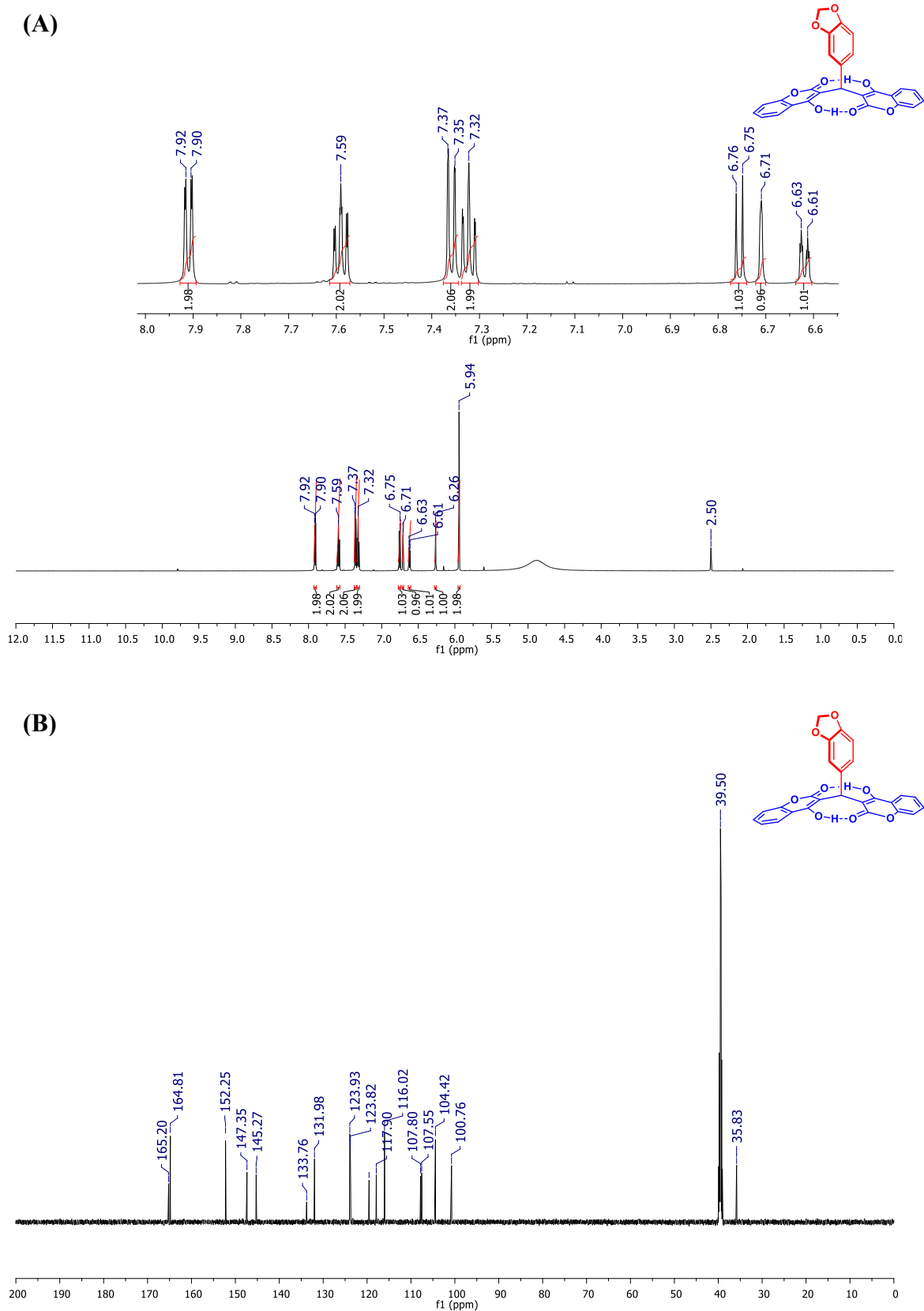
(A)



(B)



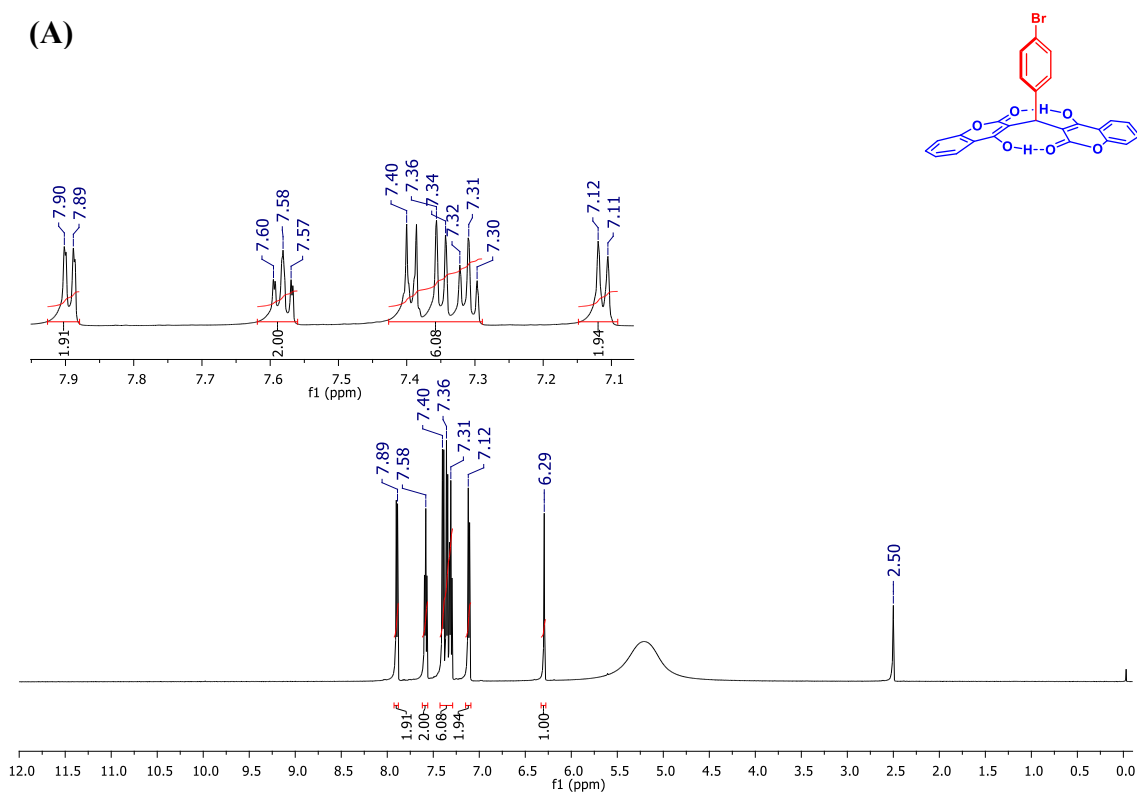
Anexo 2. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-02. (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-02.



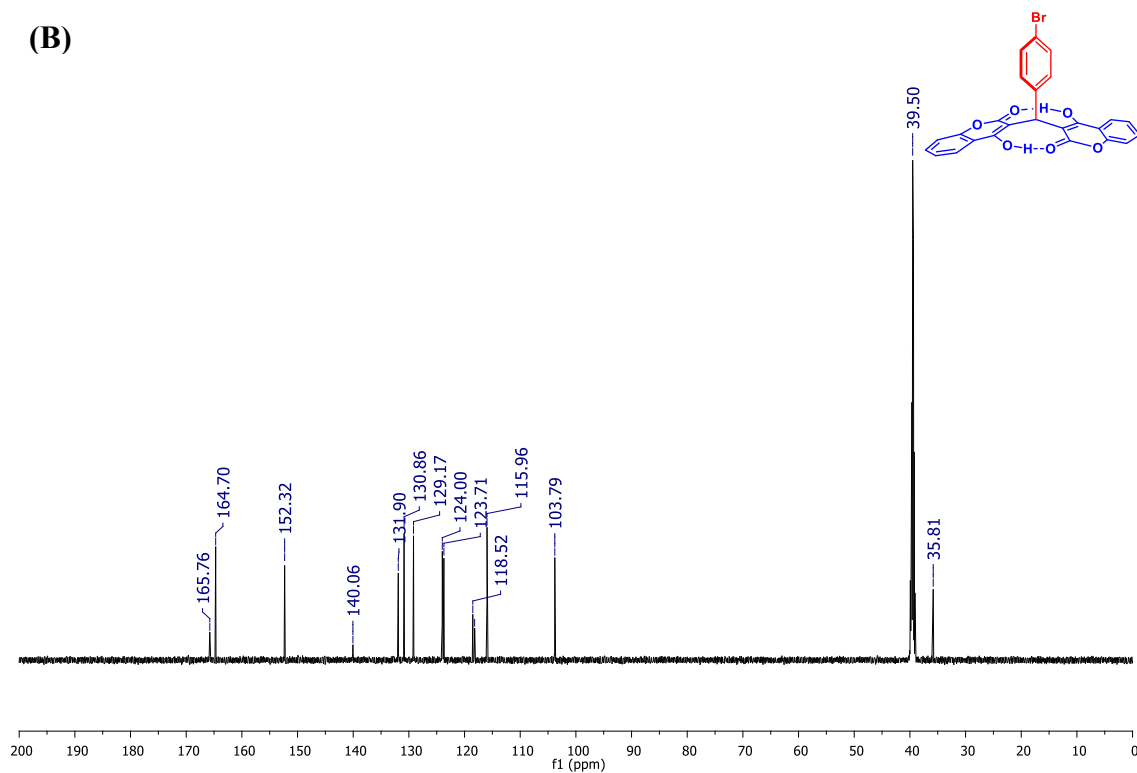
Anexo 3. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-03. (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o DC-03.

Anexos

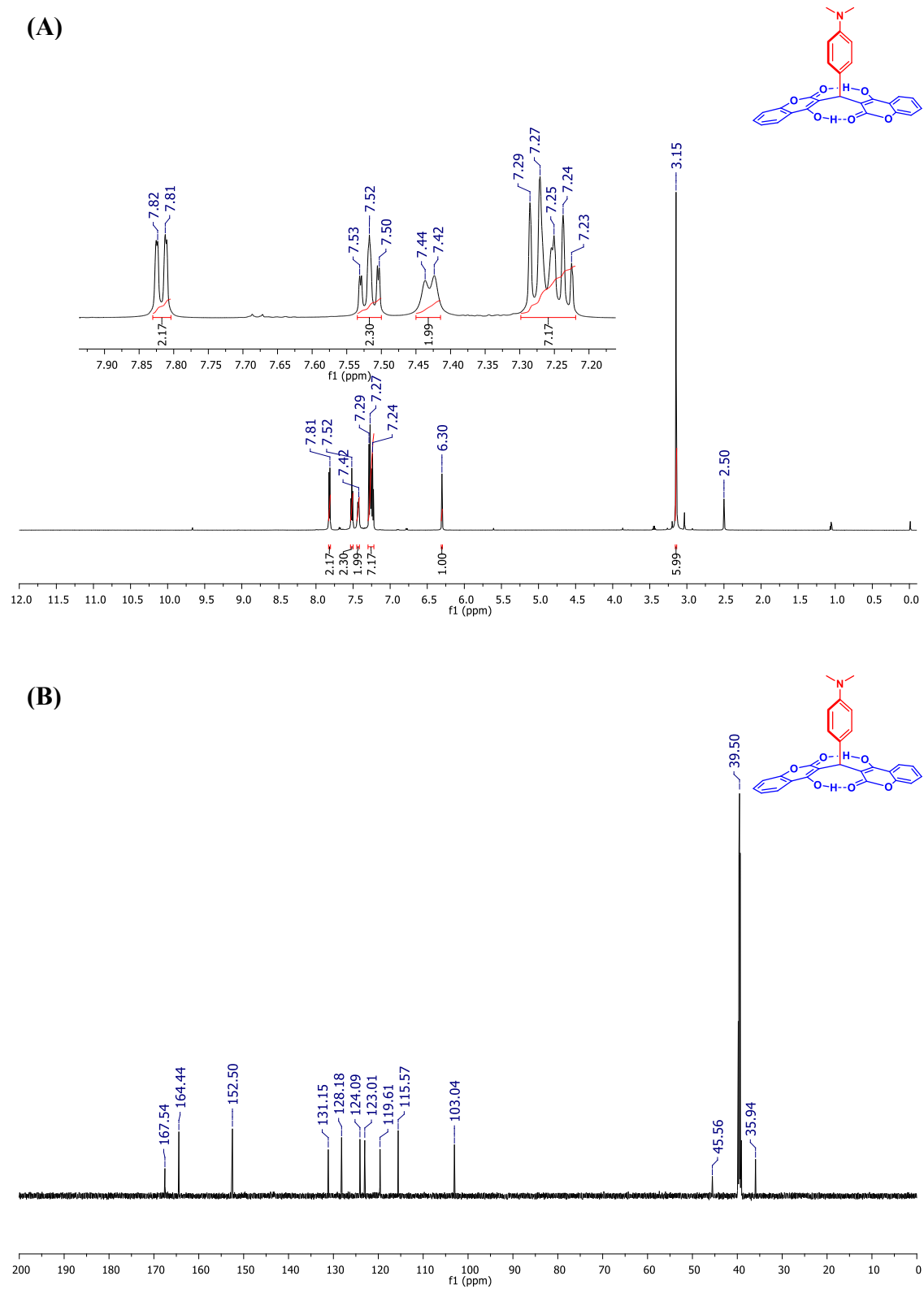
(A)



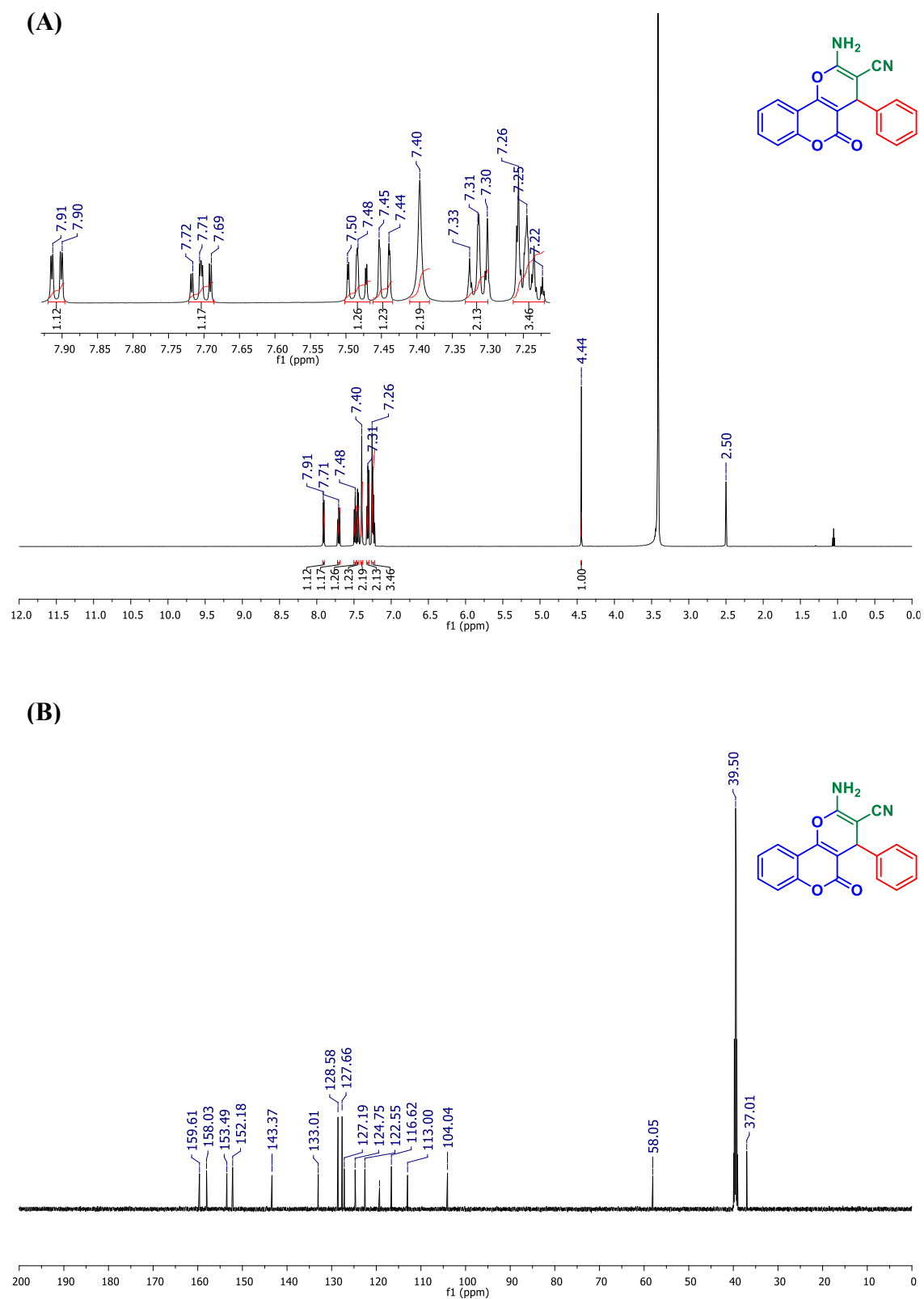
(B)



Anexo 4. (A) RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o **DC-04**. (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o **DC-04**.

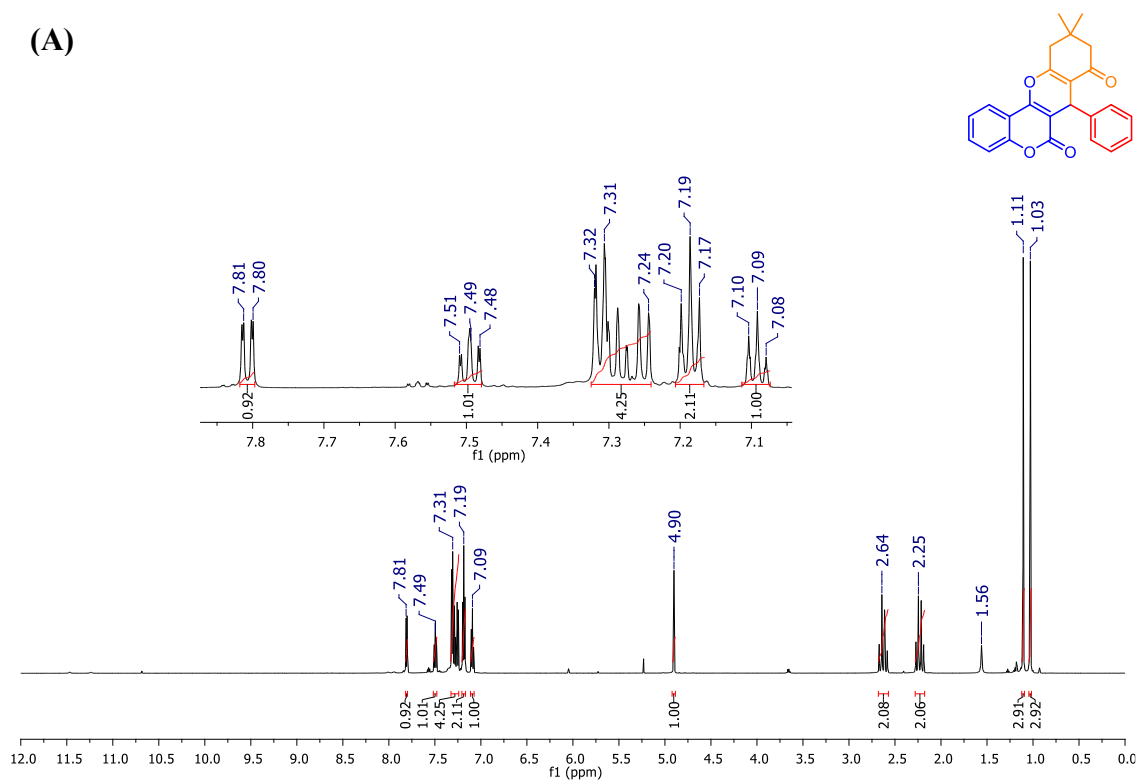


Anexo 5. (A) RMN de ^1H (600 MHz, DMSO-*d*₆) para o DC-05. (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-*d*₆) para o DC-05.

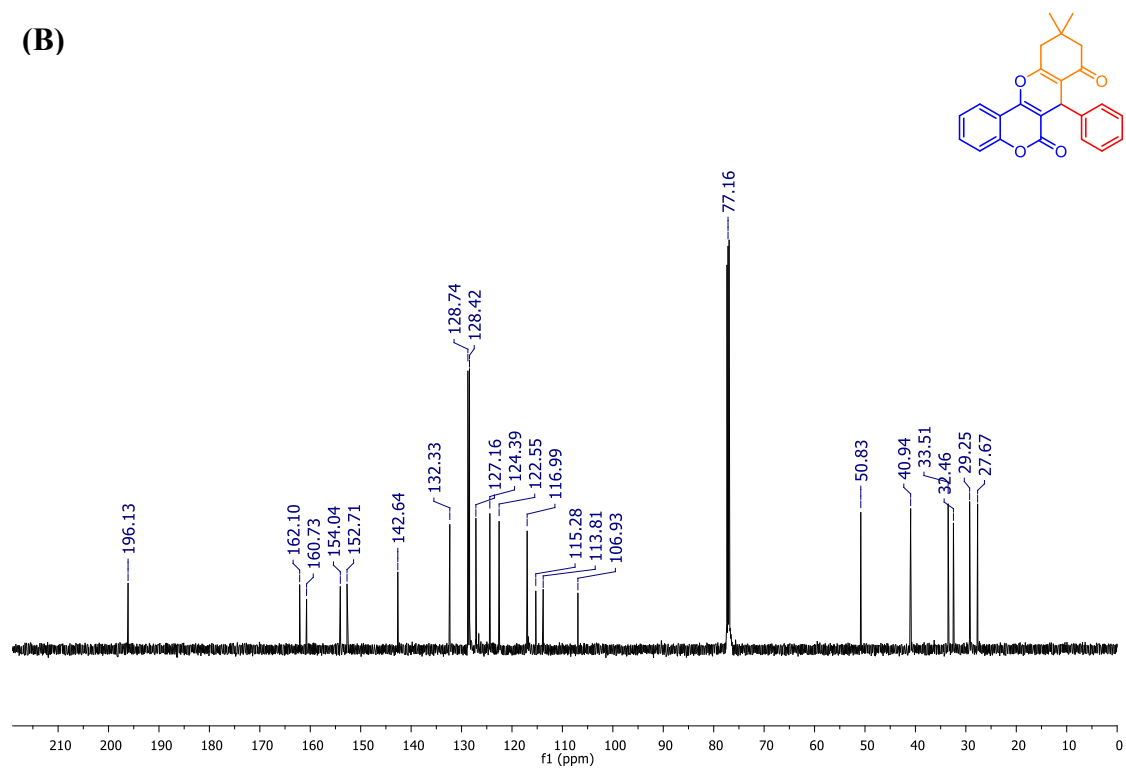


Anexo 6. (A) RMN de ^1H (600 MHz, DMSO-*d*₆) para o PCN-01. (B) RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-*d*₆) para o PCN-01.

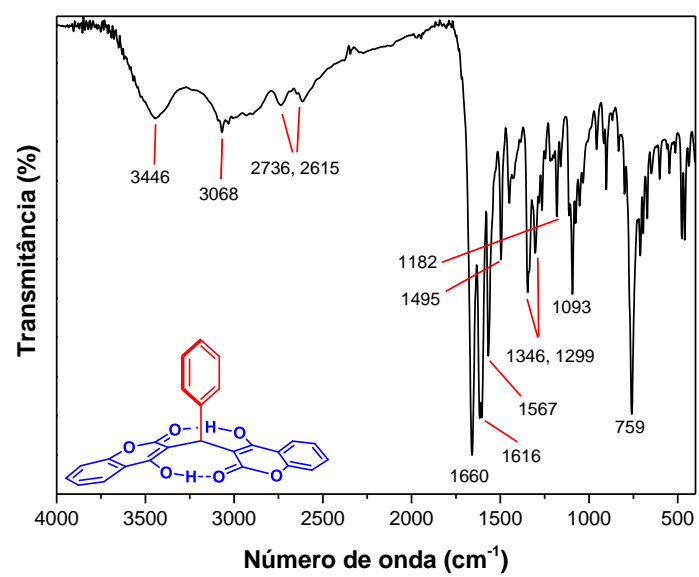
(A)



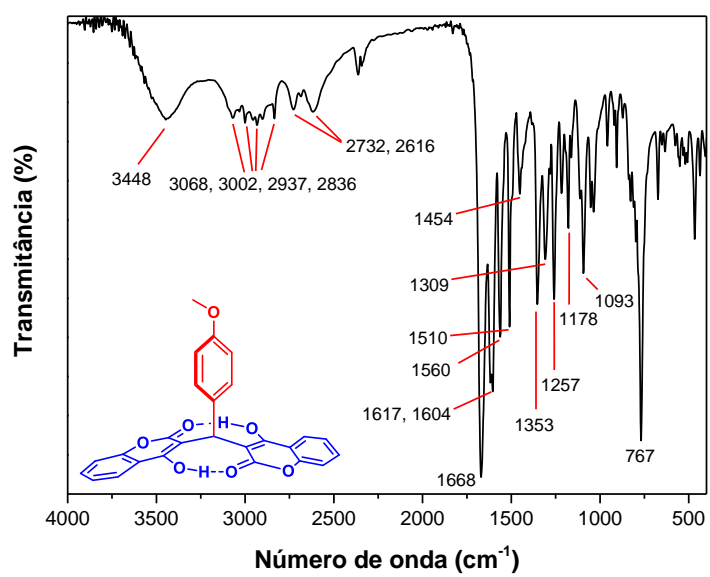
(B)



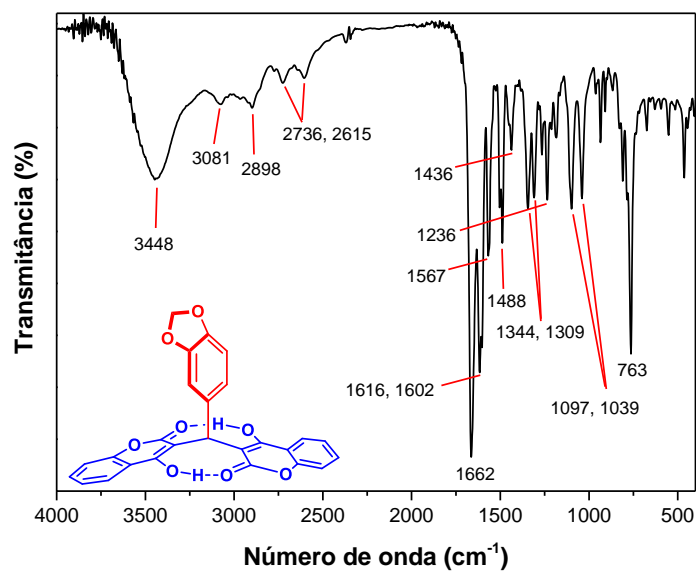
Anexo 7. (A) RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) para o TCC-01. (B) RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃) para o TCC-01.



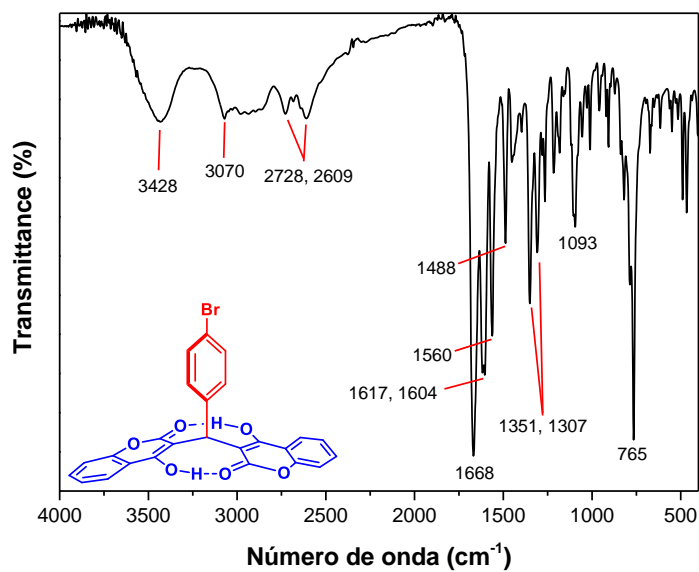
Anexo 8. Espectro de FTIR (KBr) do DC-01.



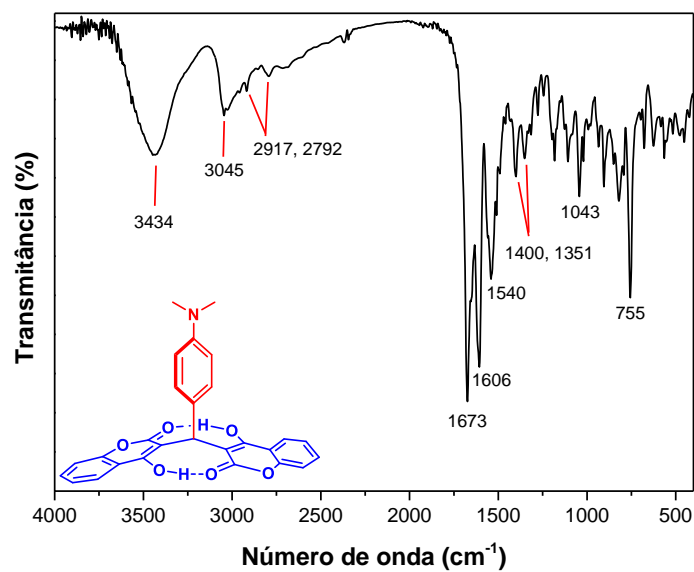
Anexo 9. Espectro de FTIR (KBr) do DC-02.



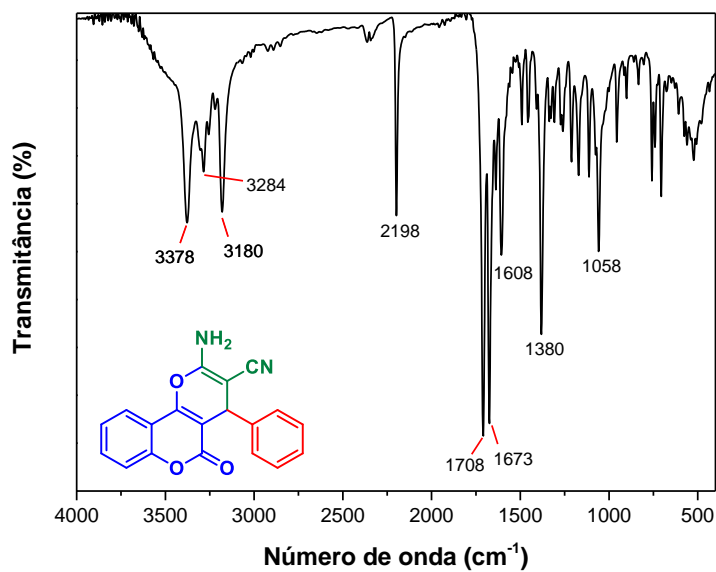
Anexo 10. Espectro de FTIR (KBr) do DC-03.



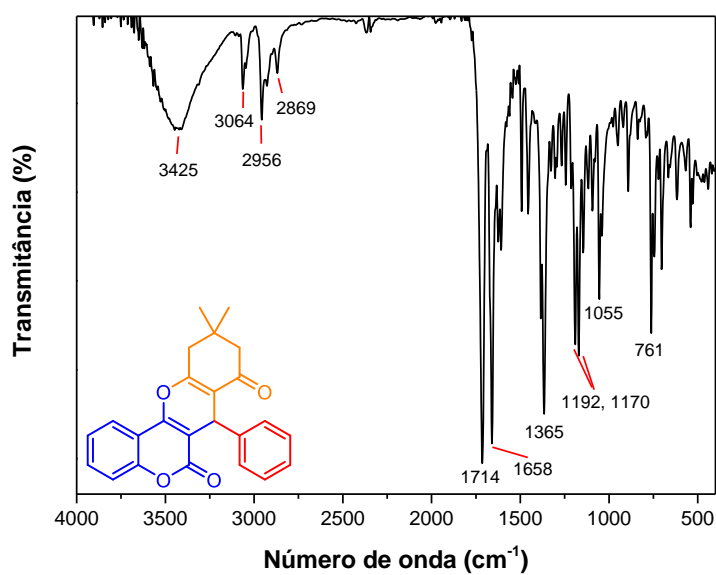
Anexo 11. Espectro de FTIR (KBr) do DC-04.



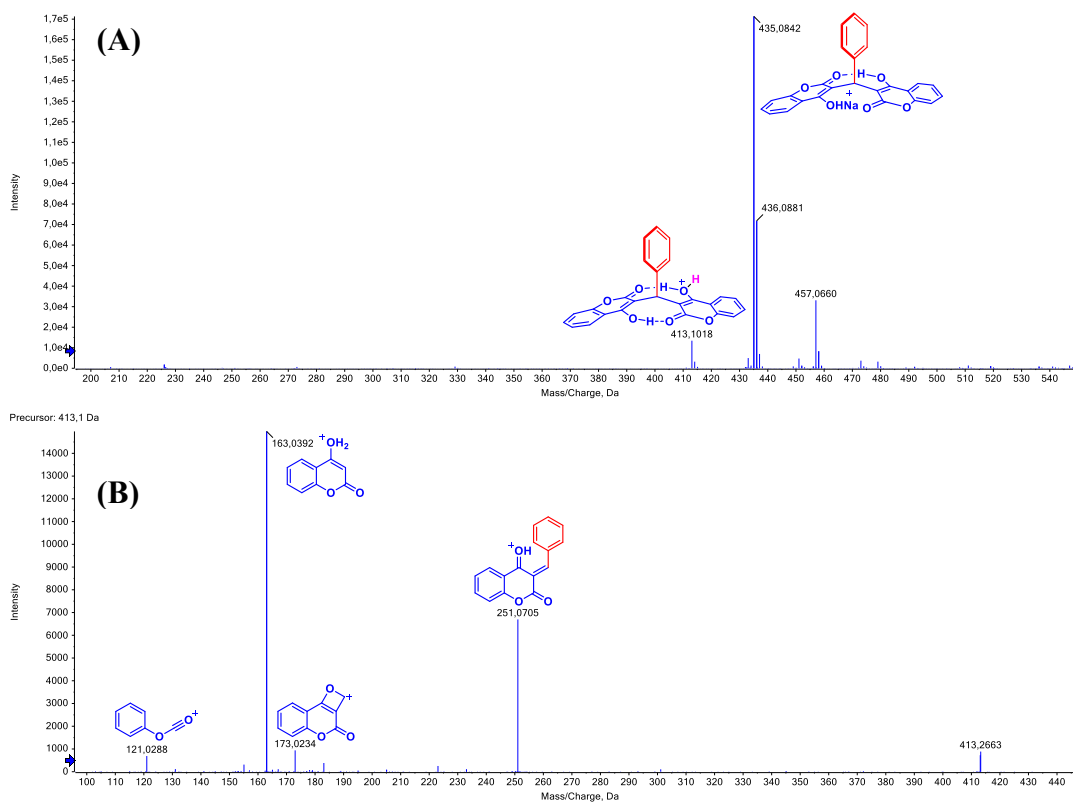
Anexo 12. Espectro de FTIR (KBr) do DC-05.



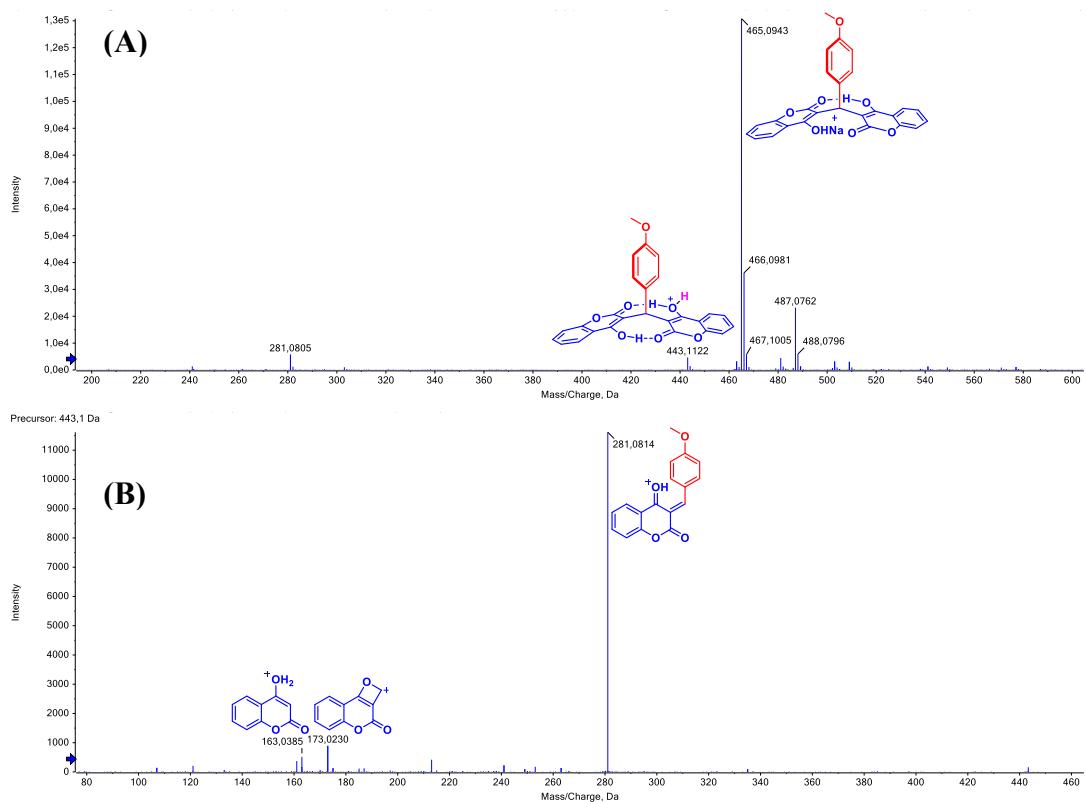
Anexo 13. Espectro de FTIR (KBr) da PCN.



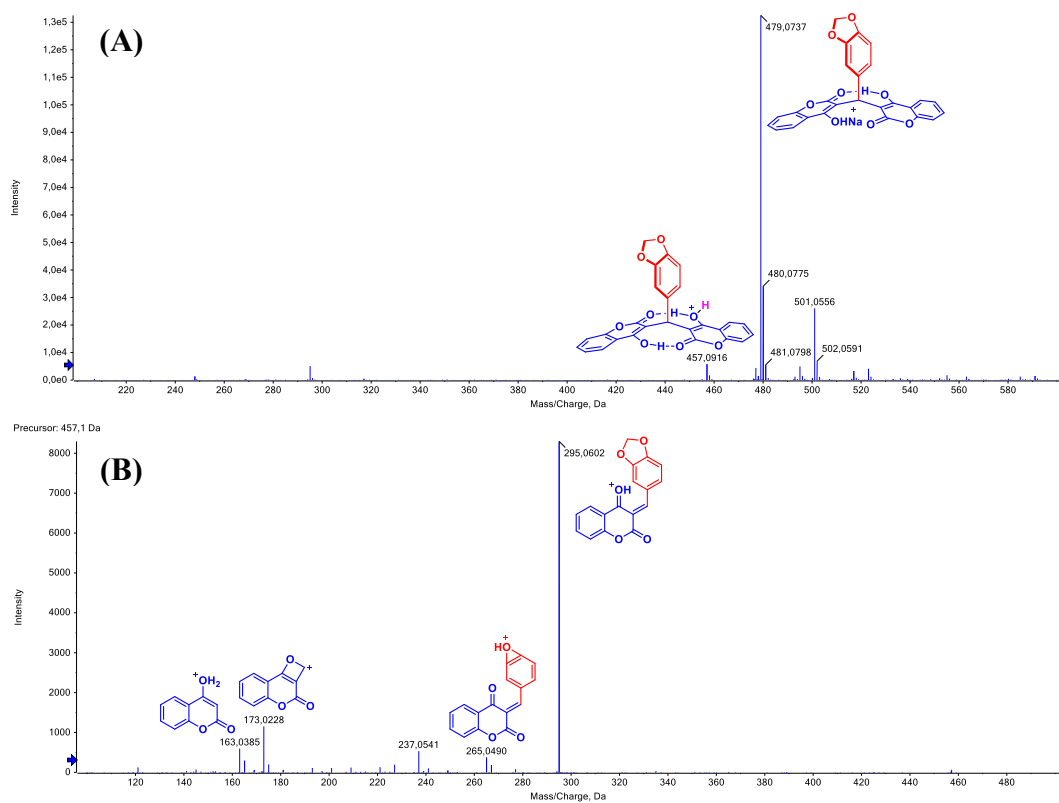
Anexo 14. Espectro de FTIR (KBr) do TCC.



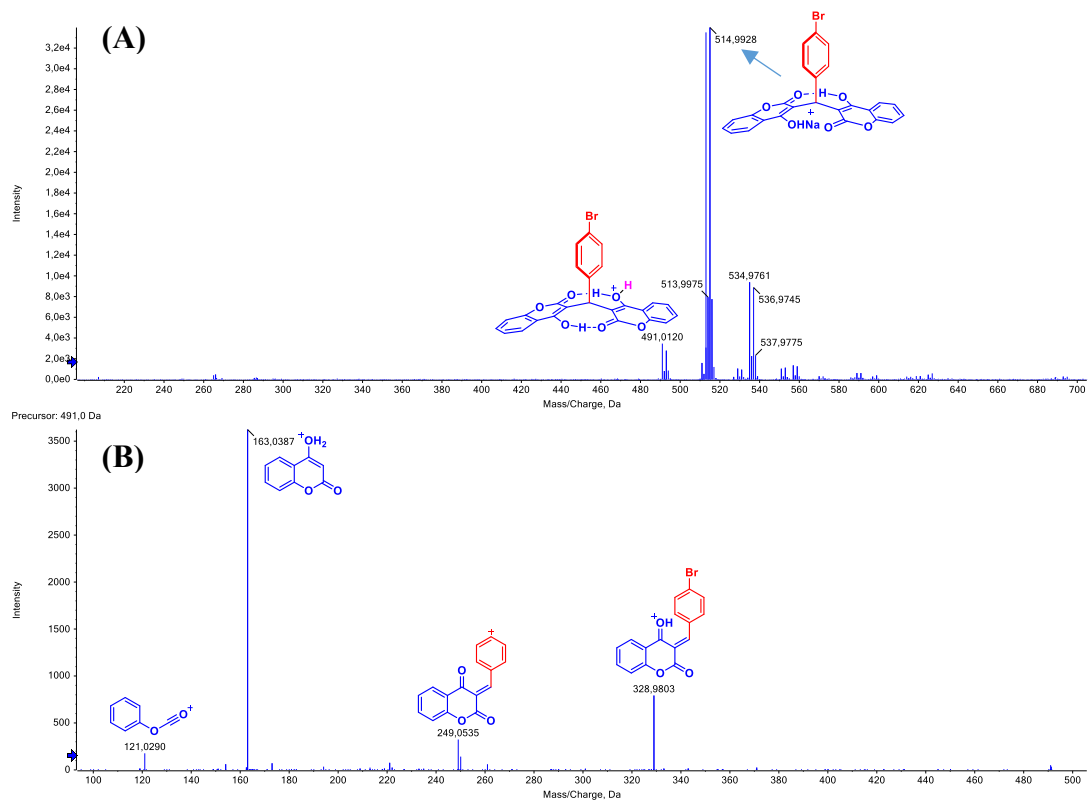
Anexo 15. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-01. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-01.



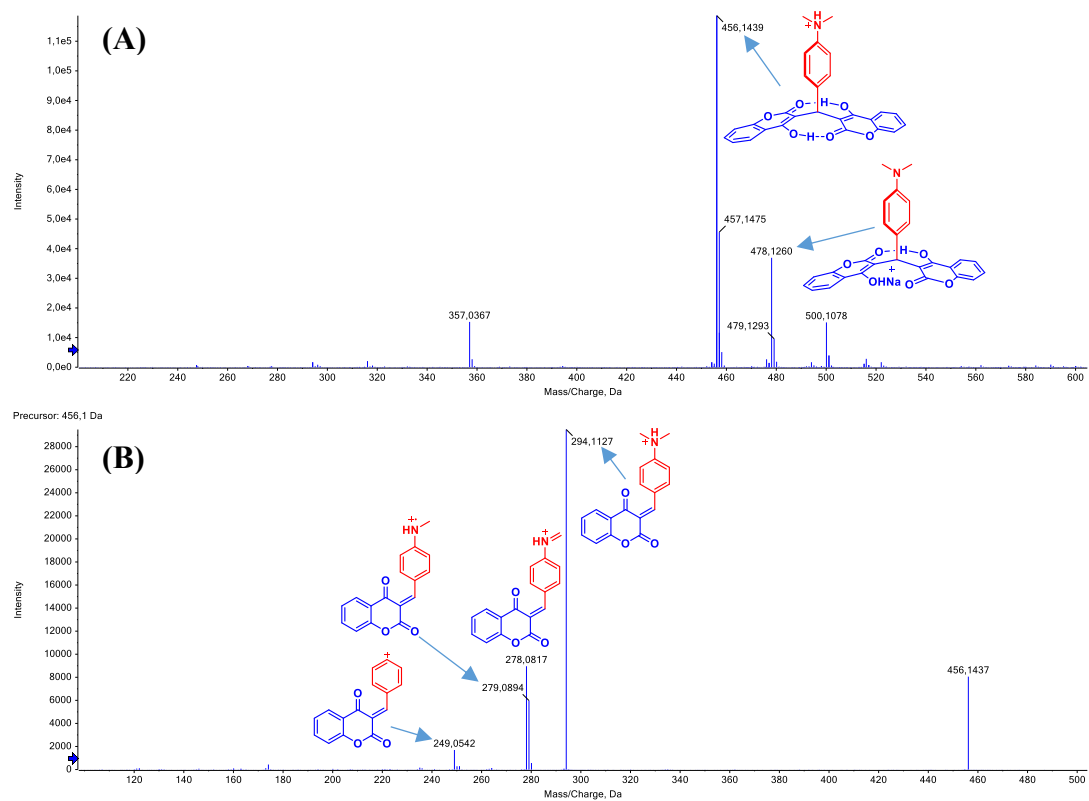
Anexo 16. (A) Espectro de ESI(+)-MS do **DC-02**. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do **DC-02**.



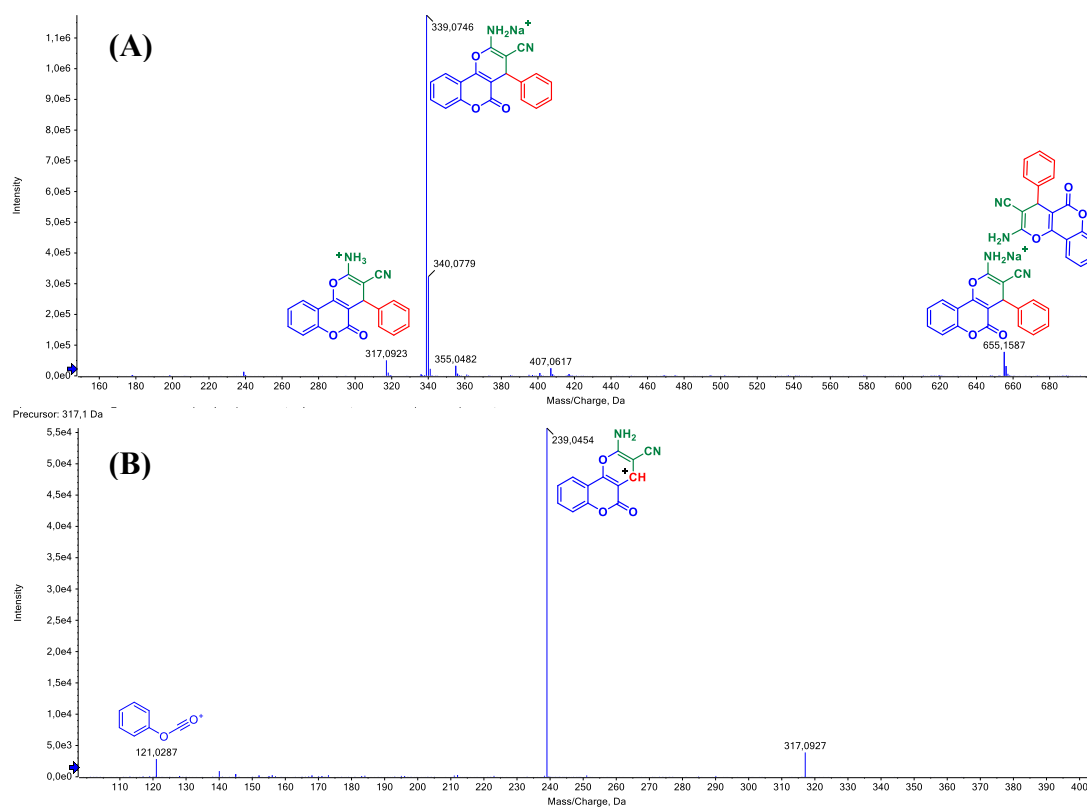
Anexo 17. (A) Espectro de ESI(+)-MS do **DC-03**. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do **DC-03**.



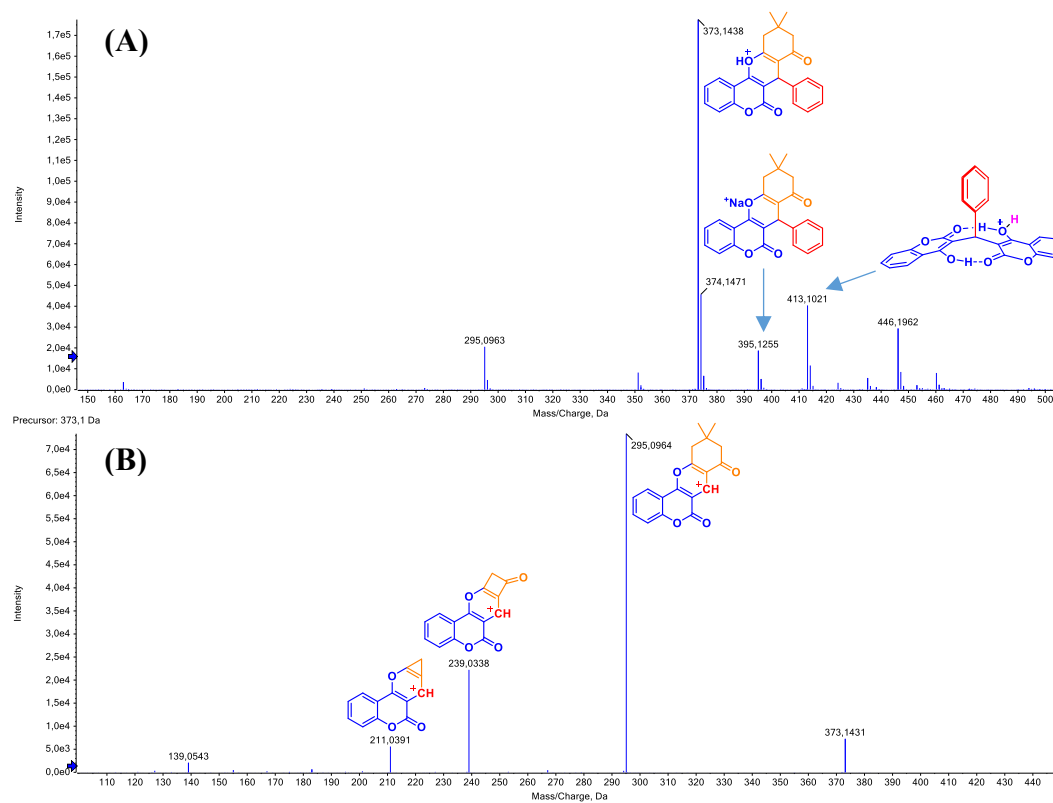
Anexo 18. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-04. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-04.



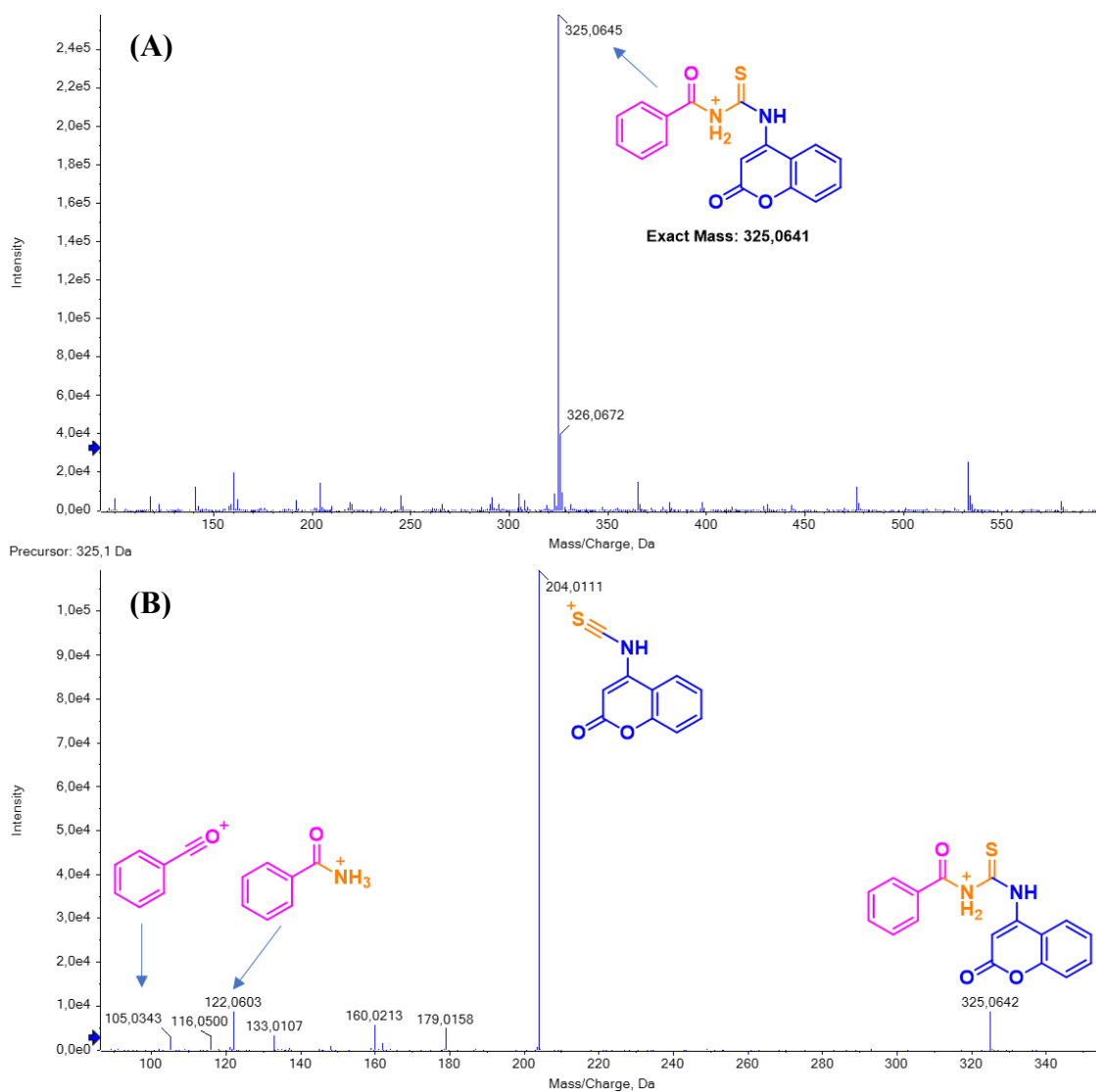
Anexo 19. (A) Espectro de ESI(+)-MS do DC-05. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do DC-05.



Anexo 20. (A) Espectro de ESI(+)-MS do PCN. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do PCN.



Anexo 21. (A) Espectro de ESI(+)-MS do TCC. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do TCC.



Anexo 22. (A) Espectro de ESI(+)-MS do **Intermediário 2**. (B) Espectro de ESI(+)-MS/MS do **Intermediário 2**.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: Pedro de Santana Bast

Programa: PPGQ

Nome completo: Pedro de Santana Bast

Título do Trabalho: Resposta Multicomponente Variante de Biogélica:
Efeito da Silvestre, Mecanismo, Aplicação Biológica e Correlação de Literatura.

Nível: Mestrado () Doutorado

Orientador/a: Bruno Amor da Silveira Neto

Brasília, 15 de fevereiro de 2024