



Universidade de São Paulo
Instituto de Química



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química Fundamental

Milene Macedo Hornink

**ESTRATÉGIAS PARA SÍNTESE EM FLUXO
CONTÍNUO DE NOVOS HETEROCICLOS
NITROGENADOS E ESPIROIMIDAS**

Versão corrigida da tese

São Paulo 2023

Data de Depósito na SPG:

10/04/2023

Milene Macedo Hornink

**ESTRATÉGIAS PARA SÍNTESE EM FLUXO
CONTÍNUO DE NOVOS HETEROCICLOS
NITROGENADOS E ESPIROIMIDAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

H817e HORNINK, MILENE MACEDO
Estratégias para síntese em fluxo contínuo de novos heterociclos nitrogenados e espiroimidaz / MILENE MACEDO HORNINK. - São Paulo, 2023. 295 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: ANDRADE, LEANDRO HELGUEIRA

1. Fluxo Contínuo. 2. Heterociclos Nitrogenados. 3. Radical Carbamoila. 4. Reações de adição/Ciclização. 5. Vanádio Haloperoxidase. I. T. II. ANDRADE, LEANDRO HELGUEIRA, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Estratégias para síntese em fluxo contínuo de novos heterociclos nitrogenados e espiroimidias"

MILENE MACEDO HORNINK

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - no Programa de Química.

Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Bruno Matos Paz
IQ - USP

Prof. Dr. Paulo Sergio de Carvalho
IFSP - SP

Prof. Dr. Alvaro Takeo Omori
UFABC

SÃO PAULO
18 de maio de 2023

Ao meu pai (Milton), meu maior incentivador e ao meu menino (Martin), a notícia da sua vinda me trouxe imensa alegria, mas a sua perda profunda tristeza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade e por me sustentar.

Agradeço ao Prof. Dr. Leandro Helgueira, primeiro porque me abriu as portas do seu laboratório (mesmo com a minha cara de IC). Estes cinco anos no LQFB foram de muito aprendizado, que foi proporcionado pela sua competência, atenção e paciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Sérgio de Carvalho (IFSP), meu conterrâneo, que me apresentou à química orgânica. Também com sua competência e carinho me introduziu ao laboratório de química orgânica, pela qual me apaixonei como se diz: *'a primeira vista'*.

Agradeço ao meu esposo Vinicius, pelos momentos difíceis que enfrentamos, pelos conselhos e pelos sorrisos que você retirava de mim. Também não poderia deixar de agradecer pelo computador que rodava todos os programas que eu precisei durante a escrita da tese e nunca *'bugou'*.

Agradeço à Regiane pela longa amizade e pela paciência, quando nossos encontros não aconteciam, mas sempre estive presente.

Agradeço à pós-doutoranda Dra. Nathália Florência, minha irmã em Cristo, pelas conversas e cafés, você tem um lugar especial no meu coração.

Agradeço à minha família por todo apoio, principalmente ao meu pai Milton nada disso aconteceria sem os primeiros empurrões que me deu e sem o investimento literalmente *'suado'* que fez na minha formação. Sou grata especialmente à minha irmã Miriane por todas as conversas e conselhos.

Agradeço a todos os que conviveram comigo no LQFB, agradeço às Dra. Marialy Nieves e Dra. Valquíria Correia pela colaboração e também por terem me ajudado no início. Agradeço ao Dr. Kevin Dias, pois com sua alegria sempre nos contagiou, e por todo conhecimento compartilhado. Agradeço à Dra. Leydaiane dos Santos, pelos conselhos. Sou grata ao meu colega de bancada Me. Bruce Lobbo, à Ma. Júlia Couto e ao Vinicius Rodrigues pelas nossas colaborações e por tornarem tudo leve. Agradeço aos atuais alunos, Beatriz Rodrigues, Ma. Bianca Campanile, João Victor Marson e Paulo Nakaya.

Agradeço especialmente às doutorandas Ma. Bianca Campanile e Beatriz Cugnasca pela ajuda com os espectros de absorção no laboratório da Profa. Dra. Iolanda.

Agradeço à Bruna, Jéssica e Valéria, vocês me acolheram e me fortificaram com nossos estudos e orações.

Agradeço à Ma. Edna Kagohara, por me ensinar com dedicação o que eu precisava para manusear as amostras biológicas, nunca mais me esqueço de como preparar e correr um SDS-PAGE.

Agradeço à Profa. Dra. Mutue Fujii pela amostra de alga cedida.

Agradeço à Dra. Érika M. Orozco, que apesar do nosso pouco tempo de trabalho juntas no laboratório gostei muito das nossas conversas sobre costura.

Agradeço especialmente às minhas ICs, Alice Uva, Caroline Souza e Beatriz Rodrigues (atual doutoranda). Obrigada pela oportunidade de co-orientação, companhia, aprendizado e por sua dedicação.

Agradeço a todo o pessoal da Central Analítica. Ma. Cristiane Xavier (RMN), Ma. Janaína Vilcachagua (RMN), Bel. Márcio Wandermuren (CG-EM), Dra. Vânia Bueno (EMAR), estavam sempre dispostos a me ajudar quando precisei. Não poderia deixar de mencionar as corridas no CG-EM que Márcio fez quando o do laboratório não estava funcionando.

Agradeço ao pessoal do STR e SVGAR pelo apoio, em especial ao técnico Artur Mendes pela companhia às 6:00 horas da manhã, no 709U-10 (Santana- Cidade Universitária), e é claro por todo suporte técnico, quando precisei de solventes, reagentes e descartar meus resíduos.

Sou grata a todos os professores do IQ-USP pelo conhecimento compartilhado, agradeço especialmente aos professores que permitiram a utilização dos seus laboratórios e equipamentos durante a pandemia. Prof. Dr. Érik Bastos, por emprestar o equipamento de micro-ondas e as LEDs, aos seus alunos, pelos espectros de absorção e emissão. Ao prof. Dr. Alcindo dos Santos, pelo equipamento de ponto de fusão, à Profa. Dra. Liane Rossi e seus pós-doutorandos, Dra. Lais e Dr. Dagoberto, por auxiliarem na obtenção dos espectros de IV, ao Prof. Dr. Massuo Kato pelos espectros de EMAR. Ao Prof. Dr. Shaker Chuck, e seus pós-doutorandos e técnicos, pelos reagentes para preparação dos tampões e por permitiram a utilização dos equipamentos, NanoDrop e leitor de placas.

Agradeço aos professores Dr. Álvaro Takeo, Dr. Bruno Paz e Dr. Paulo Sérgio de Carvalho, pela gentileza de comporem a banca de defesa e pelas instruções de correção desta tese.

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESP (2018/07152-4) pelo fomento e pelas bolsas concedidas.

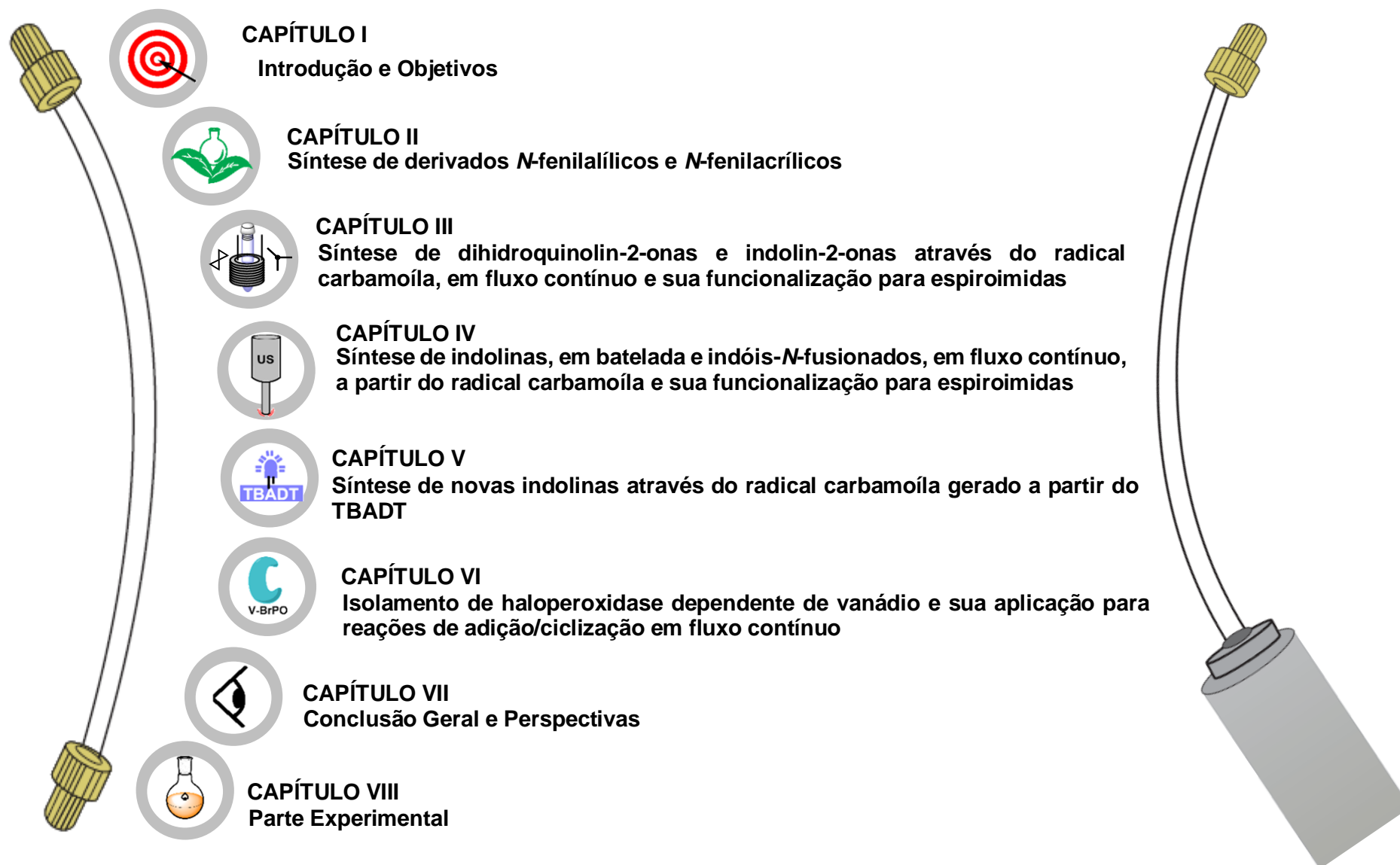
“By faith we understand that the universe was formed at God’s command, so that what is seen was not made out of what was visible”

Hebrews 11: 3

“Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes that over the entrances to the gates of the temple of science are written the words. ‘Ye must have faith’.”

Max Planck

SUMÁRIO GRÁFICO DA TESE



SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
CAPÍTULO I	29
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	29
1. 1. INTRODUÇÃO.....	29
1. 2. OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO II	36
2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS N-FENILALÍLICOS E N-FENILACRÍLICOS	36
2. 1. APRESENTAÇÃO DAS ROTAS DE SÍNTESE DOS SUBSTRATOS C1-C9.....	36
2. 2. DISCUSSÃO ESPECTRAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS OBTIDOS.....	47
2. 3. CONCLUSÃO PARCIAL.....	54
CAPÍTULO III.....	56
3 SÍNTESE DE DIHIDROQUINOLIN-2-ONAS E INDOLIN-2-ONAS ATRAVÉS DO RADICAL CARBAMOÍLA, EM FLUXO CONTÍNUO E SUA FUNCIONALIZAÇÃO PARA ESPIROIMIDAS	56
3. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROPOSTA PARA A PREPARAÇÃO DE DIHIDROQUINOLIN-2-ONAS E INDOLIN-2-ONAS.....	56
3. 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	60
3. 2. 1. Atividades biológicas e Metodologias radiculares para a síntese de dihidroquinolinonas.....	60
3. 2. 2. Atividades biológicas e metodologias radiculares para a síntese de indolin-2-onas	64
3. 2. 3. Atividades biológicas espiromidas e metodologias para síntese de espiromidas	69
3. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3. 4. CONCLUSÃO PARCIAL.....	86
CAPÍTULO IV	88
4 SÍNTESE DE INDOLINAS E INDÓIS-N-FUSIONADOS A PARTIR DO RADICAL CARBAMOÍLA E SUA FUNCIONALIZAÇÃO PARA ESPIROIMIDAS	88
4. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROPOSTA PARA A PREPARAÇÃO DE INDOLINAS E INDÓIS -N- FUSIONADOS SOB IRRADIAÇÃO ULTRASSÔNICA.....	88
4. 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	91

4. 2. 1. Atividades biológicas e metodologias radicalares para a síntese de indolinas.....	91
4. 2. 2. Atividades biológicas de indóis N-fusionados	95
4. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
4. 3. 1. Aplicação do radical carbamoíla para a preparação de indolinas sob irradiação ultrassônica em batelada	96
4. 3. 2. Aplicação do radical carbamoíla para a síntese de indóis n-fusionados e espiroimidaz sob irradiação ultrassônica.....	107
4. 4. CONCLUSÃO PARCIAL.....	115
CAPÍTULO V	118
5 SÍNTESE DE NOVAS INDOLINAS ATRAVÉS DO RADICAL CARBAMOÍLA GERADO A PARTIR DO TBADT.....	118
5. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROPOSTA PARA A PREPARAÇÃO DE INDOLINAS.....	118
5. 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	121
5. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
5. 4. CONCLUSÃO PARCIAL.....	137
CAPITULO VI	139
6 ISOLAMENTO DE HALOPEROXIDASE DEPENDENTE DE VANÁDIO E SUA APLICAÇÃO PARA REAÇÕES DE ADIÇÃO/CICLIZAÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO.....	139
6. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO ABORDAGEM PROPOSTA PARA A APLICAÇÃO DE V-BRPO EM REAÇÕES DE ADIÇÃO/CICLIZAÇÃO.....	139
6. 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	140
6. 2. 1. Haloperoxidase dependente de vanádio	140
6. 2. 2. Considerações mecanísticas e seletividade da V-HPO.....	142
6. 2. 3. A tecnologia de imobilização de biocatalisadores aliada à química em fluxo contínuo, visando superar os desafios da metodologia enzimática via V-brpo.....	143
6. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	148
6. 4. UTILIZAÇÃO DA V-BRPPUR COMO CATALISADOR PARA BROMAÇÃO ENZIMÁTICA	167
6. 5. CONCLUSÃO PARCIAL.....	169
CAPÍTULO VII	171
7 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	171
7. 1. CONCLUSÃO GERAL.....	171
7. 2. PERSPECTIVAS	172
CAPÍTULO VIII	175
8 PARTE EXPERIMENTAL.....	175
8. 1. INFORMAÇÕES GERAIS	175
8. 2. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-ALIL-N-METILANILINA C1	176
8. 3. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-METIL-N-(2-METILALIL) ANILINA C2	177
8. 4. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO (2-METILALIL)OXI)BENZENO C3	178

8. 5.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-ALIL-N-FENILACETAMIDA C4a E C4b	178
8. 6.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DAS N-METILANILINAS S2-S8	180
8. 7.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-BENZILANILINA S9	181
8. 8.	PROCEDIMENTO DE ESTERIFICAÇÃO DO PABA	181
8. 9.	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS 4-(METIL(FENIL)AMINO)-2-METILENO-4-OXOBUTANOICOS)	181
8. 10.	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS (FENIL)AMINO)-2-METILENO-4-OXOBUTANOATOS (C5)	181
8. 11.	PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO DE MONOESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO ITACÔNICO	185
8. 12.	PROCEDIMENTPO PARA PREPARAÇÃO DO METIL 3-(CLOROCARBONIL)BUT-3-ENOATO S10a	186
8. 13.	PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS (FENIL)CARBAMOIL)3-BUTENOATOS (C6)	186
8. 14.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO METIL 2-(HIDROXIMETIL)ACRILATO S11	188
8. 15.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO METIL 2-(BROMOMETIL)ACRILATO S12	189
8. 16.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DOS METIL 2-(FENILAMINO)METILACRILATOS	189
8. 17.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DOS METIL 2-((N-FENILPIVALAMIDO)METIL)ACRILATOS C7A	191
8. 18.	PROCEDIMENTO PARA REDUÇÃO DO ESCATOL	196
8. 19.	PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO DIMETIL 2-METILENOPENTANODIOATO (S30)	196
8. 20.	PROCEDIMENTO PARA HIDRÓLISE DE S30	196
8. 21.	PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO ANIDRIDO METILENO GLUTÁRICO S25	197
8. 22.	PROCEDIMENTO PARA ACILAÇÃO COM ANIDRIDO ITACÔNICO (S24) E METILENO GLUTÁRICO (S25)	197
8. 23.	PROCEDIMENTO PARA ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS 4-(INDOLIN-1-IL)-2-METILENO-4-OXOBUTANOICOS	198
8. 24.	PROCEDIMENTO PARA A OXIDAÇÃO COM DDQ PARA PREPARAÇÃO DE C8A-B E C9A-B	200
8. 25.	PROCEDIMENTO DE GERAÇÃO DO RADICAL CARBAMOÍLA UTILIZANDO A REAÇÃO DE FOTO-FENTON EM FLUXO CONTÍNUO	202
	8. 25. 1. Montagem do reator fotoquímico em fluxo contínuo	202
	8. 25. 2. Preparação das soluções e operação do reator	204
8. 26.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A SÍNTESE DE INDOLINAS SOB IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM	216
8. 27.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A GERAÇÃO DO RADICAL CARBAMOÍLA EM FLUXO CONTÍNUO SOB IRRADIAÇÃO ULTRASSÔNICA	227
	8. 27. 1. Montagem do reator ultrassônico em fluxo contínuo	227
	8. 27. 2. Procedimento geral para a reação de carbamoilação e imidação em fluxo contínuo	229
	8. 27. 3. Procedimento geral para a purificação dos compostos P7, P8, P9 e P10	230
8. 28.	PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO DO TBADT	239

8. 29.	PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO COM TBADT E FORMAMIDA	241
8. 30.	DADOS DA AMOSTRA DE ALGA UTILIZADA	242
8. 31.	TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM FENOL VERMELHO (ABS 590 NM)¹⁸⁴ 242	
8. 31. 1.	Branco.....	242
8. 31. 2.	Sem vanádio.....	242
8. 31. 3.	Com vanádio ¹⁹¹	243
8. 32.	PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E SEMI-PURIFICAÇÃO DA V-BrPO	243
8. 33.	PROCEDIMENTO PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA....	244
8. 33. 1.	Preparo do gel de poliacrilamida 10% não desnaturante.....	246
8. 33. 2.	Preparo da amostra protéica	246
8. 33. 3.	Eletroforese.....	246
8. 33. 4.	Procedimento para corarado com AgNO ₃	247
8. 34.	CONCENTRAÇÃO PROTÉICA PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	249
8. 35.	CINÉTICA ENZIMÁTICA EM MICROPLACA 24 POÇOS.....	249
8. 35. 1.	Branco.....	249
8. 35. 2.	Reação enzimática	249
8. 36.	PROCEDIMENTO DE EQUILIBRAÇÃO LAVAGEM DO SUPORTE.....	249
8. 37.	PROCEDIMENTO PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	250
8. 38.	TESTE QUALITATIVO COM ENZIMA SUPORTADA.....	250
8. 39.	PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO DE BROMAÇÃO DO TIMOL COM V-BrP-Pur 250	
	ESPECTROS SELECIONADOS.....	252

RESUMO

Hornink, M. M. **Estratégias para síntese em fluxo contínuo de novos heterociclos nitrogenados e espiroimidias**. 2023. 295p. Tese de doutorado - Programa de Pós-graduação em Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo- *Campus Capital*, SP.

Os heterociclos nitrogenados são ubíquos na natureza e estão presentes na estrutura de diversos medicamentos. A necessidade do *design* sustentável de compostos orgânicos, marcou as últimas décadas. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo abordar de duas maneiras catalíticas a preparação de novos heterociclos nitrogenados. Os derivados *N*-fenilalílicos e *N*-fenilacrílicos, precursores para os heterociclos, quando possível foram preparados a partir de blocos de construção renováveis, e a sua reatividade explorada em reações de adição/ciclização. Na primeira abordagem foi empregado processo foto-Fenton, este possibilitou a geração de radicais carbamoíla para construir os núcleos alvo (dihidroquinolin-2-onas e indolin-2-onas). A reação ocorreu dentro de 10 minutos, de modo eficiente, em fluxo contínuo, em seguida sua funcionalização à espiroimidias foi realizada, com elevados rendimentos (20-91%). Mais adiante, diversas indolinas foram preparadas a partir dos derivados acrílicos, os metil 2-((*N*-fenilpivalamido)metil)acrilatos e do radical carbamoíla gerado pelo processo sono-Fenton. As indolinas foram obtidas de maneira rápida, dentro de 1 minuto e em excelentes rendimentos (57-99%). Um protocolo *one-pot*, em fluxo contínuo foi planejado para a obtenção de novos indóis-*N*-fusionados sob irradiação ultrassônica, o que levou à preparação rápida de novas espiroimidias em altos rendimentos (22-85%). Expandindo os estudos de reatividade para os compostos *N*-fenilalílicos, verificou-se que os mesmos contendo duplas não ativadas, também eram aceptores do radical carbamoíla em reações de adição/ciclização. Desse modo, a síntese de indolinas a partir do radical carbamoíla gerado pelo fotocatalisador TBADT foi realizada com rendimentos de até 73%, em condições amenas. A segunda abordagem envolveu a utilização da enzima vanádio haloperoxidase em condições de fluxo contínuo para catálise de reações de adição/ciclização, através da geração de espécie eletrofílica de halogênio. Nesta abordagem, a prévia bioprospecção da enzima de interesse em algas encontradas na costa brasileira foi proposta. Um estudo de extração e purificação da enzima VBrPO, da alga *Laurencia dendroidea* foi realizado. A enzima pôde ser obtida de maneira parcialmente purificada e foi imobilizada em Purolite® gerando o catalisador VBrP-Pur, que foi empregado em batelada para a halogenação do fenol vermelho e do timol e mostrou a atividade catalítica desejada.

Palavras Chave: Fluxo Contínuo. Heterociclos Nitrogenados. Radical Carbamoíla. Reações de adição/Ciclização. Vanádio Haloperoxidase

ABSTRACT

Hornink, M. M. **Strategies to the synthesis under continuous flow of new nitrogen heterocycles and spiroimides**. 2023. 295p. PhD Thesis – Fundamental Chemistry Graduate Program, Institute of Chemistry of the University of Sao Paulo- Capital *Campus*, Sao Paulo.

Nitrogen heterocycles are ubiquitous in nature and the pharmaceutically active ingredients in many drugs. The growing need for the sustainable design of organic compounds marked the last decades. In this context, this work aims to approach *via* two catalytic ways the preparation of new nitrogen heterocycles. The *N*-phenylallylic e *N*-phenylacrylic derivatives, when possible, were prepared from renewable building blocks, and its reactivity explored in addition/cyclization reactions. In the first approach the photo Fenton process was applied, which enabled the generation of carbamoyl radicals to the construction of the target nucleus (di-hydroquinolin-2-ones and indolin-2-ones). The reaction happened within 10 minutes, with efficiency, in continuous flow, then its functionalization to spiroimides was carried out with high yields (20-90%). Next, several indolines were prepared from the acrylic derivatives, the methyl 2-((*N*-phenylpivalamido)methyl)acrylates. The indolines were obtained in a fast way, within 1 minute in excellent yields (57-99%). A one-pot protocol under continuous flow to the synthesis of new *N*-fused indoles under ultrasonic irradiation was envisioned. The approach enabled the preparation of new *N*-fused indoles in high yields (22-85%). Expanding, the studies of the reactivity of the *N*-phenylallylic compounds, it was noticed that the latter containing non-activated double bonds were also carbamoyl radical's acceptors in addition/cyclization reactions. Thus, the indoline synthesis from the carbamoyl radical generated by the TBADT photocatalyst was possible with yields up to 73 %. The second approach involved the application of the enzyme Vanadium haloperoxidase under continuous flow conditions to the catalysis of addition/cyclization reactions, promoted through the enzyme generation of an electrophilic halogen species. To the achievement of this approach the previous bioprospecting of the enzyme in marine algae from the Brazilian coast was proposed. A study of the extraction and purification of the VBrPO enzyme was carried out. The enzyme was obtained partially purified and immobilized in Purolite® generating the VBrP-Pur catalyst which was applied to the in batch halogenation of phenol red and tyamol and showed the desired catalytic activity.

Key Words: Addition/cyclization reactions. Carbamoyl Radical. Continuous Flow. Nitrogen Heterocycles. Vanadium Haloperoxidase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- δ - Deslocamento Químico
- (CD₃)₂SO**- Dimetil sulfóxido deuterado
- (nBu)₃P**- Tri-n-butilfosfina
- Abs**-Absorbância
- Ac**- Grupo acetila
- Ac₂O**- Anidrido Acético
- ACC**- Acetil- CoA Carboxilase
- AcCl**- Cloreto de acetila
- ACN**- Acetonitrila (MeCN)
- AcOEt**- Acetato de etila
- AIBN**- Azobisisobutironitrila
- AOP**- Processo avançado de oxidação (*Advanced Oxidative Process*)
- Bn**- Grupo Benzila
- BPR**- Regulador de pressão traseira (*Back Pressure Regulator*)
- BSA**- **Albumina de Soro Bovino** (*Bovine Serum Albumin*)
- calcd**- Calculado
- CCD**- Cromatografia em Camada Delgada
- CD₃CN**- Acetonitrila deuterada
- CD₃O**- Metanol deuterado
- CDCl₃**- Clorofórmio deuterado
- CETP**- Proteína de transferência de éster de colesterol (*Cholesterol Ester Transfer Protein*)
- CG-EM**- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CHCl₃**- Clorofórmio
- CiVCPO**- Cloroperoxidase dependente de vanádio isolada de *Curvularia inaequalis*
- Cy**- Grupo Ciclohexila
- d**- Dupleto
- DABCO**- 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
- DCC**- Dicicloexilcarbodiimida
- DCE**- Dicloroetano
- DCM**- Diclorometano
- DCU**- Dicicloexilureia
- dd**- Duplo Dupleto
- DDQ**- 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
- DEAE**- [Di-Ethyl-Amino-Ethyl]

DHPI- Dihidropirido-indolinonas
DMF- Dimetilformamida
DMSO- Dimetilsulfóxido
dt- Duplo Tripleto
DTBP- di-terc-butilperóxido (Peróxido de di-terc-butila)
EI- Impacto de Elétrons
EM- Espectrometria de Massas
EMAR- Espectrometria de Massas de Alta Resolução
Equiv.- Equivalentes
ESI- Ionização por *electronspray*
Et- Grupo Etila
Et₂O- Éter Dietílico
Et₃B- Trietilborana
eV- Eletron Volt
FDA- *Food and Drug Administration* (do inglês)
FPLC- Cromatografia líquida de proteínas rápida (*Fast Protein Liquid Chromatography*)
h- hora(s), ***h*** (constante de plank)
HAT- Transferência de átomo de hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer*)
HOX- Ácido hipohalogenoso
HPFA- Perfluoroalcóxialcanos de alta pureza (*High Purity Perfluoroalkoxy Alkane*)
Hz- Hertz
IV- Infravermelho
J- Constante de acoplamento
kDa- kiloDalton
LED- Diodo emissor de Luz (*Light emitting diode*)
m- Multipleteo
m/z- Razão massa/carga
mA- miliAmpère
Me- Grupo Metila
MeOH- Metanol
min- Minutos
NaBH₃CN- Ciano Borohidreto de Sódio
NaBH₄- Borohidreto de sódio
n-Bu₃SnH- Hidreto de tri-n-butilestanho
nm- nanômetros
OAc- Ânion Acetato

OMe- Ânion metóxido

PABA- Ácido 4- aminobenzóico

PBr₃- Tribrometo de Fósforo

pe- Ponto de ebulição

PEEK- Poliéter-éter-cetonas (*Polyether ether ketone*)

Ph- Grupo Fenila

Piv- Grupo Trimetilacetila

POM- Polioxometalato

ppm- Partes por milhão

PSA- Perssulfato de amônio

psi- libras por polegada quadrada (*pounds per square inchs*)

R_f- Fator de retenção

RMN ¹³C- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN ¹H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm- Rotação por minuto

S- Estado singleto excitado

s- Segundos

s- Singleto

SDS-PAGE- Gel eletroforético de poliácridamida com dodecil sulfonato de sódio (*Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SET- Transferência de um elétron (*Single Electron Transfer*)

sl- Singleto largo

SOCl₂-Cloro de tionila

t- Tripleto ou tempo

t.a.- tempera ambiente

TBADT- Tetrakis(*N,N,N*-tributyl-1-butanaminium) tungstate ou Tetrakis(tetrabutylammonium) decatungstate

TBHP- terc-butyl-hidroperóxido (Hidroperóxido de terc-butila)

TBPB- tert-Butil peroxibenzoato

^tBuOH- terc-butanol

td- Triplo dubleto

TDV- Tempo de voô

TEA- Trietilamina

TEMED- (*N,N,N',N'*, tetrametilenodiamina)

TFE- Tetrafluoroetileno

THF- Tetrahidrofurano

Torr- Torricelle (unidade de pressão)

t_R - Tempo de residência (ou reação), **t_R** - Tempo de retenção cromatográfica

Tris-H₂SO₄- Tris-(hidroximetil)-aminometano- H₂SO₄ ou Tris-H

u.a.- Unidade adimensional

US- Ultrassom

UV- Luz ultravioleta

V- Volts

V-BrPO- Bromoperoxidase dependente de Vanádio

V-BrP-Pur- Vanádio bromoperoxidase imobilizada em Purolite

V-CIPO- Cloroperoxidase dependente de Vanádio

V-HPO- Haloperoxidase dependente de Vanádio

V-IPO- Iodoperoxidase dependente de Vanádio

Wo- TBADT estado triplete excitado

λ - Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Transformações químicas realizadas com imidas cíclicas, B) Aplicação de imidas para a preparação de alcaloides policíclicos.	30
Figura 2: Estruturas de imidas cíclicas.	31
Figura 3: Característica de uma reação fotoquímica em batelada e em fluxo.	60
Figura 4: Estrutura química da dihidroquinolinona, Trigolutersina A, Cilostazol e Carteolol.	61
Figura 5: Estruturas químicas do oxindól e oxindóis de ocorrência natural.	65
Figura 6: Estruturas químicas do Sunitinib e do Ropinirol.	65
Figura 7: Estrutura geral de algumas azaspirodionas sintetizadas por Wu e colaboradores e estrutura da Buspirona.	70
Figura 8: Estrutura geral das espiroimidazóis sintetizadas que inibiam a enzima aldose redutase.	71
Figura 9: Estrutura da Asperparalina A e da Dictyospiromida.	72
Figura 10: Espectro de massas obtido para o composto P1a.	77
Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P1a.	77
Figura 12: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P2a.	78
Figura 13: Espectro no IV obtido para o composto P4a.	84
Figura 14: Espectro de massas do composto P4a.	84
Figura 15: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P4a.	85
Figura 16: Processo de cavitação de bolhas.	89
Figura 17: Estruturas da indolina (22) e da Jerantinina (23) e Lundurina B (24).	92
Figura 18: Estruturas de indolinas sintéticas com atividades biológicas.	93
Figura 19: Estruturas da isatisina e do análogo da Melotonina.	96
Figura 20: Estrutura da Mersicarpina (32) e do composto sintético 33.	96
Figura 21: Representação da montagem do reator em fluxo sob irradiação ultrassônica.	108
Figura 22: Modos de atuação catalítica do TBADT.	120
Figura 23: Espectro de absorção do TBADT em acetonitrila.	120
Figura 24: Espectro de emissão obtido para a LED (16 W) utilizada.	124
Figura 25: Cromatograma e espectro de massas para o pico correspondente a P12.	125
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P12.	126
Figura 27: Cromatograma e espectro de massas de reação extraída.	128
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P14a e P14a'.	134
Figura 29: A) Resina Purolite [®] , B) processo de imobilização direta de proteína.	144
Figura 30: Proposta para a imobilização da haloperoxidase proveniente de <i>L. dendroidea</i>	145
Figura 31: Incubação da CiVCPO em sistema bifásico, ■ logo depois da mistura, ■ 4 horas depois da mistura, ■ 24 horas depois da mistura.	148
Figura 32: Atividade enzimática com fenol vermelho em tampão Tris- H_2SO_4 pH 6.	151
Figura 33: Atividade enzimática com fenol vermelho em tampão Tris- H_2SO_4 pH 7.	152
Figura 34: Atividade enzimática com fenol vermelho em tampão Tris- H_2SO_4 pH 8.	152
Figura 35: Fluxograma representando as etapas envolvidas no processo de extração e semi-purificação da haloperoxidase dependente de vanádio.	157
Figura 36: Atividade <i>in gel</i> com orto-dianisidina (Fonte: Referência 231)	167
Figura 37: Espectro de massas para o produto majoritário de bromação com VBrPO.	169
Figura 38: Conclusão gráfica da abordagem enzimática proposta.	171
Figura 39: Perspectivas para a pesquisa apresentada nesta tese.	173
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C1.	252

Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C1.	252
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C2.	253
Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C2.	253
Figura 44: Espectro de absorção de C2 em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$	254
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C3.	255
Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C3.	255
Figura 47: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C4a.....	256
Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C4a.	256
Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C4b.....	257
Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C4b.	257
Figura 51: Espectro de absorção de C4b em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$	258
Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de S1.	259
Figura 53: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S6.....	259
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C5a.....	260
Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C5a.	260
Figura 56: Espectro de absorção de C4b em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$	261
Figura 57: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C6a.....	262
Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C6a.	262
Figura 59: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S10.....	263
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de S11.....	263
Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C7a.....	264
Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C7a.	264
Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3CN) de S30.....	265
Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3CN) de S30.....	265
Figura 65: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S25.....	266
Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S25.	266
Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S26.....	267
Figura 68: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S28.....	267
Figura 69: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C8a.....	268
Figura 70: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C8a.....	268
Figura 71: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C9a.....	269
Figura 72: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C9a.....	269
Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P1a.....	270
Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P1a.....	270
Figura 75: Espectro de IV (puro) do composto P1a.....	271
Figura 76: Espectro de absorção de P1a em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$	272
Figura 77: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P2a.....	273
Figura 78: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P2a.....	273
Figura 79: Espectro de absorção de P2a em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$	274
Figura 80: Figura 81: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P3a.	275
Figura 82: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P3a.....	275
Figura 83: Espectro de IV (puro) do composto P3a.	276
Figura 84: Espectro de EMAR- ESI (infusão direta, DCM e diluída em MeOH 0,1% ácido fórmico) do composto P3a.	276
Figura 85: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P4a.....	277
Figura 86: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P4a.....	277
Figura 87: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P5a.....	278

Figura 88: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P5a.....	278
Figura 89: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P6a.....	279
Figura 90: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P6a.....	279
Figura 91: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P7a.....	280
Figura 92: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P7a.....	280
Figura 93: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P8a.....	281
Figura 94: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P8a.....	281
Figura 95: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P9a.....	282
Figura 96: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P9a.	282
Figura 97: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P10a.....	283
Figura 98: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P10a.	283
Figura 99: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P12.....	284
Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P12.....	284
Figura 101: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P14b.....	285
Figura 102: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de P14b.....	285
Figura 103: Espectro de absorção de P14b em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$	286
Figura 104: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P14a e P14a'.	288
Figura 105: Artigo em colaboração com as Dras. Marialy Sanabria e Valquíria Graia. Nesta colaboração a doutoranda realizou a síntese de algumas acrilamidas, purificação dos oxindóis obtidos em fluxo contínuo pela Dra. Marialy e sua caracterização por EMAR, IV, RMN ^1H e ^{13}C . Também foi realizada a otimização das condições de obtenção dos compostos espiros, que foram encontradas pela Dra. Valquíria. Realizou-se a caracterização dos novos compostos espiro por EMAR, IV, RMN ^1H , ^{13}C , HMBC e NOESY. Quanto à escrita do manuscrito, teve participação ativa e ficou responsável pela elaboração do material suplementar.	293
Figura 106: Artigo derivado dos estudos de aplicação do sistema desenvolvido pela Dra. Marialy no artigo anterior, para a produção de novas espiroimidazóis a partir de blocos de construção renováveis.....	293
Figura 107: Artigo derivado dos estudos com os substratos C frente ao ultrassom e processo Fenton.	294
Figura 108: Artigo em colaboração com a Ma. Júlia Couto e o aluno de doutorado Vinicius Rodrigues. Nesta colaboração a doutoranda aplicou as condições encontradas pela Ma. Júlia para os substratos C5 apresentados nesta tese, e produção de diversas dihidroquinolinonas substituídas, além do desenvolvimento das reações de funcionalizações posteriores para espiroimidazóis e novas espiro-lactonas. Ficou responsável pela caracterização de todos os substratos utilizados e produtos obtidos por EMAR, IV, RMN ^1H , ^{13}C . Responsabilizou-se pela organização elaboração do material suplementar.	294
Figura 109: Artigo derivado dos estudos realizados com os substratos C em fluxo contínuo sob irradiação ultrassônica.....	295

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: (A) Aplicação de haloperoxidase dependente de vanádio em sistema de fluxo contínuo visando reações seletivas. (B) Carbamoilação.....	34
Esquema 2: Preparação da <i>N</i> -alil- <i>N</i> -metilanilina.....	36
Esquema 3: Preparação da <i>N</i> -Metil- <i>N</i> -(2-metilalil)anilina.....	37
Esquema 4: Preparação do (2-metilalil)oxi)benzeno.....	37
Esquema 5: Preparação da <i>N</i> -alil- <i>N</i> -phenilacetamida.....	38
Esquema 6: Preparação de <i>N</i> -(2-metilalil)- <i>N</i> -fenilacetamidas substituídas.....	38
Esquema 7: Rota de síntese utilizada para a preparação de fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoatos (C5).....	39
Esquema 8: Reação de aminação redutiva de anilinas para produção de <i>N</i> -metil-anilinas substituídas.....	40
Esquema 9: Reação de benzilação da anilina.....	40
Esquema 10: Rota de síntese utilizada para a preparação dos fenil)carbamoil)3-butenoatos (C6).....	42
Esquema 11: Reação de Morita-Baylis-Hillman para produzir S11.....	42
Esquema 12: Reação de preparação do metil 2-(bromometil)acrilato (S12).....	42
Esquema 13: Reação de alquilação de anilinas com S12.....	43
Esquema 14: Reação de preparação dos metil 2-((<i>N</i> -fenilpivalamido)metil)acrilatos.....	43
Esquema 15: Rota para a preparação de C8a-C9b.....	44
Esquema 16: Reação de redução do escatol com cianoborohidreto de sódio.....	44
Esquema 17: Reação de acilação com anidrido itacônico.....	45
Esquema 18: Reação de oxidação de S26-27 com DDQ.....	45
Esquema 19: Sequencia reacional para a preparação do anidrido α -metileno-glutárico.....	46
Esquema 20: Rota de preparação do metil 5-(metil(fenil)amino)-2-metileno-5-oxopentanoato C9.....	46
Esquema 21: Sequência reacional para a preparação de C9.....	47
Esquema 22: Transformações do ácido itacônico para produção de heterociclos nitrogenados.....	57
Esquema 23: Rota proposta para a síntese de dihidroquinolin-2-onas e indolin-2-onas a partir de derivados do ácido itacônico e sua transformação em espiro-imidas.....	58
Esquema 24: Reação de 2-iodoanilinas com acrilatos na promovida por AIBN e $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$	62
Esquema 25: Mecanismo de reação proposto para a formação das dihidroquinolinonas proposto por Zhou e colaboradores.....	62
Esquema 26: Abordagens sintéticas para dihidroquinolin-2-onas envolvendo a utilização de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ como oxidante.....	63
Esquema 27: Metodologias de síntese de dihidroquinolinonas a partir de <i>N</i> -alquil- <i>N</i> -fenilcinamamidas.....	64
Esquema 28: Metodologias radiculares par a síntese de oxindóis.....	67
Esquema 29: Metodologias radiculares para a preparação de oxindóis propostas por Zhang e Dai.....	68
Esquema 30: Exemplo de síntese da 2-alil-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-diona.....	72
Esquema 31: Exemplo de preparação da 6-clorospiro[cromano-4,3'-pirrolidina]-2',5'-diona.....	73
Esquema 32: Metodologias baseadas em metais de transição para ativação da ligação C-H e síntese de espiroimidas.....	74

Esquema 33: Teste exploratório para verificação da reatividade de C5a frente às condições de Fenton em batelada.....	74
Esquema 34: Produção da dihidroquinolin-2-ona P6a e do oxindol P7a em foto-reator de fluxo contínuo.....	76
Esquema 35: Reações de ciclização de P3a e P4a para produção das respectivas imidas.	80
Esquema 36: Síntese das spiro[dihidroquinolin-2-ona-succinimidas] P3a-o.	81
Esquema 37: Rota sintética para a espirosuccinimida P3p contendo todos os carbonos renováveis.	82
Esquema 38: Síntese das espiro[indolin-2-ona-glutarimidas] P4a-e.....	83
Esquema 39: Mecanismo proposto para a formação de dihidroquinolinonas.....	86
Esquema 40: Trabalhos anteriores utilizando fluxo contínuo e ultrassom.....	91
Esquema 41: A) Metodologia de síntese de indolinas e B) aplicação para preparação de leucomitosanes.	93
Esquema 42: Mecanismo para a síntese de indolinas proposto por Brucelle. ¹⁴⁵	94
Esquema 43: Síntese de indolinas a partir de 2-bromo- <i>N</i> -(3,3-difluoroalil)anilinas.	94
Esquema 44: Metodologia de síntese de indolinas a partir de metil 2-((fenilamino)metil)acrilatos.....	95
Esquema 45: Proposta de aplicação de ultrassom para a síntese de indolinas.	97
Esquema 46: Experimentos exploratórios com substrato C7a em ultrassom (a) C7a (0,15 mmol), HCONH ₂ (3 mL); (b) C7a (0,15 mmol, 1,0 equiv.) H ₂ O ultrapura (100 µL), HCONH ₂ (2,9 mL); (c) C7a (0,15 mmol, 1,0 equiv.) H ₂ O ₂ (2 equiv.), H ₂ SO ₄ (1 equiv.), HCONH ₂ (3 mL); (d) FeSO ₄ (1 mol %) H ₂ SO ₄ (1 equiv.), HCONH ₂ (3 mL); (e) FeSO ₄ (1 mol %) H ₂ O ₂ (2 equiv.), (f) FeSO ₄ (1 mol %) H ₂ O ₂ (2 equiv.), H ₂ SO ₄ (1 equiv.), HCONH ₂ (3 mL).....	98
Esquema 47: Escopo de substratos para a formamida. ^a Rendimento isolado para 2 minutos de irradiação.....	105
Esquema 48: Escopo de substratos em <i>N</i> -metil formamida.....	106
Esquema 49: Mecanismo proposto para a síntese de indolinas sob irradiação de ultrassom.	107
Esquema 50: Proposta de utilização de irradiação ultrassônica para a síntese <i>one-pot</i> de compostos espiros.	108
Esquema 51: Experimentos exploratórios em fluxo contínuo.....	109
Esquema 52: Escopo de substratos para a preparação de espiro[indolina-succinimidas], a partir de formamidas.	113
Esquema 53: Mecanismo proposto para a reação de dealquilação do material de partida C7a.	114
Esquema 54: Escopo de substratos para a síntese de indóis <i>N</i> -fusionados.	115
Esquema 55: Proposta de utilização de alcenos não ativados em reações de adição/ciclização radicalar para preparação de indolinas utilizando TBADT.	121
Esquema 56: Exploração de amidação catalisada por TBADT.	122
Esquema 57: Reação de alquilação de sulfonas.....	122
Esquema 58: Mecanismo de síntese fotocatalisada de sulfonas.....	123
Esquema 59: Hidrofuncionalização de estirenos com formamidas catalisada por TBADT.....	123
Esquema 60: Reação de acil-alilação enantiosseletiva cocatalisada por TBADT e Ni.....	124
Esquema 61: Reação entre C1 e formamida catalisada por TBADT.	124
Esquema 62: Reação entre C2 e formamida catalisada por TBADT.	125
Esquema 63: Reação entre substrato C3 e formamida em TBADT.....	127
Esquema 64: Mecanismo proposto para a formação de P4 e P3.	127
Esquema 65: Mecanismo proposto de dealquilação das aminas aromáticas.....	129

Esquema 66: Reação do substrato C4a com a formamida na presença de TBADT.....	133
Esquema 67: Mecanismo proposto para a formação das indolinas e tetrahydroquinolinas	135
Esquema 68: Exploração das condições para a geração do radical carbamoíla e preparação das dihydroquinolin-2onas	136
Esquema 69: Mecanismo proposto para a reação da amida C5a com o radical carbamoíla ..	137
Esquema 70: Ilustração das transformações químicas com substratos não naturais, catalisadas por bromoperoxidase dependente de vanádio. ^{192,193}	142
Esquema 71:a) Ciclo catalítico da haloperoxidase dependente de vanádio. Possíveis destinos do intermediário reativo HOCl gerado pela enzima: b) Enz-V-OCl; c) HOCl aprisionado ao sítio ativo; c) HOCl difusível no meio reacional. ²⁰⁵	143
Esquema 72: Halogenação da cefaloxina por haloperoxidase imobilizada em Eupergit® C....	146
Esquema 73: Bromação peroxidativa do fenol vermelho.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C1.....	48
Tabela 2: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C2.....	49
Tabela 3: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C3.....	50
Tabela 4: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C5a.....	51
Tabela 5: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C6a.....	52
Tabela 6: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C9a.....	53
Tabela 7: Exploração das condições para a síntese das dihidroquinolin-2onas. ^a	76
Tabela 8: Exploração do tempo de irradiação e modo de ultrassom pulsado. ^a	101
Tabela 9: Exploração da amplitude do ultrassom para a produção de P5a. ^a	102
Tabela 10: Exploração da <i>N</i> -metil formamida para a síntese de <i>N</i> -metil acetamida indolina (P6a) sob irradiação ultrassônica. ^a	103
Tabela 11: Exploração da concentração dos reagentes de Fenton para a produção de P5a em ultrassom pulsado. ^a	104
Tabela 12: Exploração das condições da reação em fluxo contínuo sob irradiação ultrassônica.	111
Tabela 13: Exploração da fonte luminosa e tempo de reação para produção de indolinas ^a	131
Tabela 14: Avaliação das condições de reação para produção de indolinas ^a	133
Tabela 15: Valores de absorbância em 590 nm no teste de atividade para diferentes pHs	153
Tabela 16: Teste de bromação enzimática do timol ^a	154
Tabela 17: Determinação protéica nas frações reunidas da primeira extração.	160
Tabela 18: Teste de bromação enzimática do timol ^a	168



CAPÍTULO I

Introdução e Objetivos



CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

Os compostos nitrogenados são ubíquos na natureza, mesmo no espaço, pequenas moléculas heterocíclicas contendo este elemento já foram detectadas.¹ A maioria do nitrogênio orgânico presente na natureza se encontra covalentemente ligado ao carbono, formando diversos heterociclos.² Os compostos heterocíclicos nitrogenados são os blocos de construção da vida, sendo que apresentam variedade devida aos diversos arranjos possíveis entre nitrogênios e carbonos interligados em um ciclo.³

Do ponto de vista da química medicinal, o nitrogênio é um elemento comumente encontrado na vasta maioria das classes de ingredientes farmacêuticamente ativos. Como apresentado anteriormente, constitui moléculas heterocíclicas e acíclicas.³ Grupos funcionais contendo nitrogênio como: aminas, iminas, nitrilas, amidas, imidas e carbamatos dominam a composição de compostos bioativos. Considerando o grupo das drogas de pequenas moléculas aprovadas pela FDA, 84 % são heterociclos nitrogenados.⁴ Além de estar presente na estrutura de compostos heterocíclicos naturais, o nitrogênio é frequentemente encontrado em drogas sintéticas.⁵ Portanto, devido às atividades biológicas associadas, os compostos heterocíclicos nitrogenados tem atraído a atenção de químicos orgânicos sintéticos ao longo dos anos.⁶

Dentre os heterociclos nitrogenados, as imidas cíclicas podem ser consideradas análogas de anidridos e consistem em dois grupos acila ligados a um nitrogênio dentro de um ciclo. Estes heterociclos são empregados como intermediários na síntese orgânica,⁷ na química medicinal,^{8,9}

¹ Peeters, Z.; Botta, O.; Charnley, S. B.; Kisiel, Z.; Kuan, Y. -J.; Ehrenfreund, P. Formation and photostability of *N*-heterocycles in space I. The effect of nitrogen on the photostability of small aromatic molecules. *A&A*, **2005**, 433, 583–590.

² Vitousek, P. M.; Hättenschwiler, S.; Olander, L.; Allison, S. Nitrogen and Nature, *Ambio*, **2002**, 31, 97–101.

³ Walsh, C. T. Nature loves nitrogen heterocycles, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 3075–3081.

⁴ Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 10257–10274.

⁵ Kerru, N.; Gummidi, L.; Maddila, S.; Gangu, K. K.; Jonnalagadda, S. B. A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications, *Molecules*, **2020**, 25, 2909.

⁶ Heravi, M.; Zadsirjan, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview, *RSC Adv.* **2020**, 10, 44247–44311.

⁷ Chauhan, P.; Kaur, J.; Chimni, S.S. Asymmetric organocatalytic addition reactions of maleimides: A promising approach towards the synthesis of chiral succinimide derivatives. *Chem. Asian J.* **2013**, 8, 328–346.

⁸ Hassanzadeh, F.; Jafari, E. Cyclic imide derivatives: As promising scaffold for the synthesis of antimicrobial agentes, *J. Res. Med. Sci.* **2018**, 23, 1–7.

⁹ Smith, M. E. B.; Schumacher, F. F.; Ryan, C. P.; Tedaldi, L. M.; Papaioannou, D.; Waksman, G.; Caddick, S.; Baker, J.R. Protein modification, bioconjugation, and disulfide bridging using bromomaleimides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1960–1965.



e na química de polímeros.¹⁰ As mesmas também são sintetizadas por organismos vivos, e encontradas na natureza em diversos produtos naturais que apresentam atividades farmacológicas interessantes, que vão de antitumorais a antibióticos e antifúngicos.¹¹ No âmbito da síntese orgânica as imidas cíclicas são consideradas blocos de construção versáteis para aplicação na síntese de produtos naturais.¹² Como é possível observar na **Figura 1 A**), essa versatilidade está relacionada ao número de transformações que podem ser realizadas com essa classe de heterociclos e ao fato de serem intermediários versáteis para a preparação de alcaloides policíclicos (Figura 1 B)).¹³

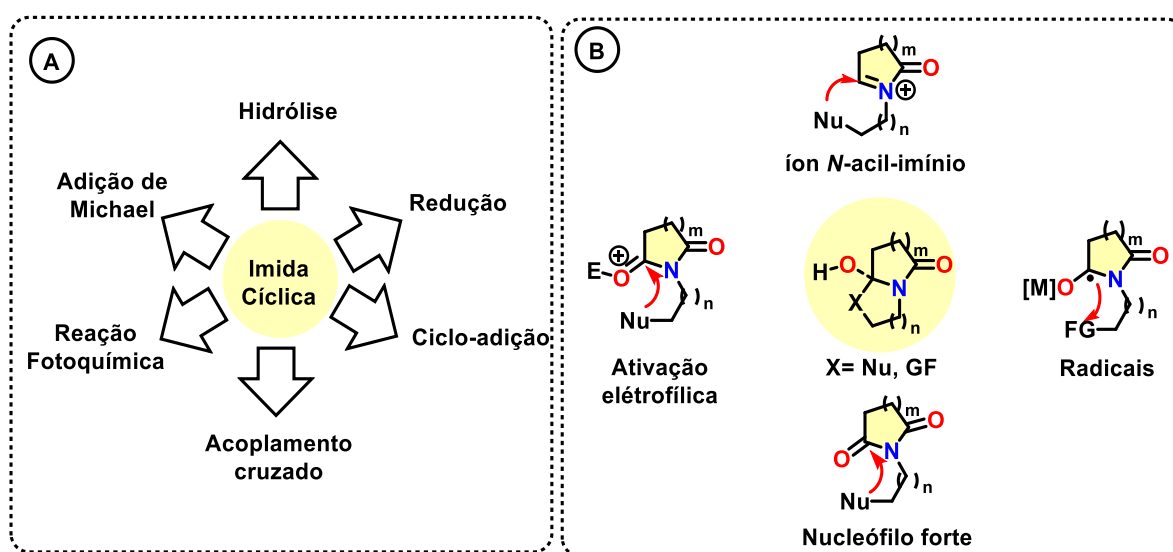


Figura 1: A) Transformações químicas realizadas com imidas cíclicas, **B)** Aplicação de imidas para a preparação de alcaloides policíclicos.

Dentre as imidas cíclicas podem-se segregar duas classes, de acordo com o tamanho do anel que contém a imida. As succinimidas são imidas com anel de cinco membros que apresentam diversas atividades biológicas associadas e estão presentes em medicamentos e agroquímicos.¹² A presença do anel de succinimida está relacionada a atividades biológicas específicas, por exemplo, a fensuximida (1a) e a etoxicimida (1b) são conhecidas pela sua atividade antiepilética.¹⁴ As imidas cíclicas de seis membros são denominadas glutarimidas, assim como as succinimidas elas são amplamente conhecidas pelas atividades biológicas que

¹⁰ Guo, X.; Facchetti, A.; Marks, T. J. Imide- and Amide-Functionalized Polymer Semiconductors, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 18, 8943–9021.

¹¹ Kavitha, K.; Praveena, K. S. S.; Ramarao, E.V.V. S.; Murthy, N. Y.S.; Pala, S. Chemistry of Cyclic Imides: An Overview on the Past, Present and Future, *Cur. Org. Chem.* **2016**, 20, 1955–2001.

¹² Patil, P. C. Oxidation of Lactams to Cyclic Imides, in *Imides Medicinal, Agricultural, Synthetic Applications and Natural Products Chemistry*, edited by Luzzio, F. A. 29-64. Amsterdam: Elsevier, 2019.

¹³ -Acosta, Y. Q.; Jurberg, I. D.; Sánchez D. G. Cyclization Strategies Using Imide Derivatives for the Synthesis of Polycyclic Nitrogen-Containing Compounds, *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202200432.

¹⁴ Crider, A. M.; Kolczynski, T. M.; Yates, K. M. Synthesis and Anticancer Activity of Nitrosoarea Derivatives of Phensuximide. *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 324–326.



apresentam, como anti-hormônio (1c)¹⁴ e antitumorais.¹⁵ As glutarimidas também são encontradas em produtos naturais e sintéticos.

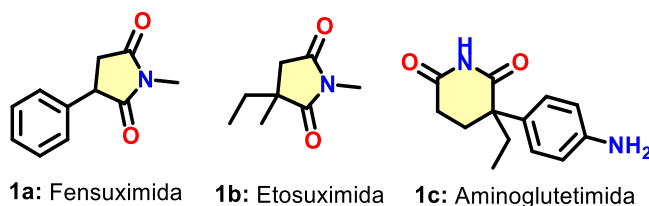


Figura 2: Estruturas de imidas cíclicas.

Devido aos seus diversos usos e atividades biológicas associadas, uma gama de abordagens e metodologias sintéticas gerais estão disponíveis para a preparação de imidas cíclicas, como por exemplo, a reação de clássica de anidridos cíclicos com aminas e a oxidação de lactamas.¹⁶ Além disso, diversas metodologias para a síntese de imidas cíclicas envolvem abordagens que considerem alguns princípios da química verde, como por exemplo, a síntese de imidas com economia atômica,¹⁷ ou a síntese de imidas empregando-se o micro-ondas, como forma alternativa de aquecimento.¹⁸

Dentro da classe das imidas cíclicas, as espiroimidas também são compostos que apresentam atividades biológicas interessantes, apesar de serem em sua maioria compostos de origem sintética, alguns poucos exemplos de espiroimidas naturais podem ser encontrados na literatura. Devido à sua menor distribuição, as metodologias para a síntese de espiroimidas são menos diversificadas. Desse modo abordagens e metodologias que considerem aspectos da química verde para a preparação de espiroimidas são menos recorrentes. No âmbito desta tese foram considerados aspectos relacionados ao desenvolvimento de uma metodologia sintética, que estivesse entrelaçada com abordagens consideradas mais verdes, devido à sua correlação com algum princípio da química verde.

No desenvolvimento de uma nova metodologia sintética é importante lembrar que existem certas condições de ativação de reações que podem ser consideradas sustentáveis. Por exemplo, a utilização de catálise é uma forma de se evitar o uso de reagentes em quantidade estequiométricas e se alcançar seletividade nas reações.¹⁹ A utilização de catalisadores em uma reação química é uma abordagem que se relaciona diretamente com o princípio 9 da química

¹⁵ Popović-Djordjević, J. B.; Klaus, A. S.; Žižak, Ž. S.; Matić, I. Z.; Drakulic, B. J. Antiproliferative and antibacterial activity of some glutarimide derivatives, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, 31, 915–923

¹⁶ Aitken, R. A. Synthesis of Cyclic Imides, in *Imides Medicinal, Agricultural, Synthetic Applications and Natural Products Chemistry*, edited by F. A. Luzzio, 29-64. Amsterdam: Elsevier, **2019**.

¹⁷ Muthaiah, S.; Hong, S. H. Atom-Economical Synthesis of Cyclic Imides, *SYNLETT*, **2011**, 1481–1485

¹⁸ Perillo, I. A.; Shmidt, M. S.; Prieto, S. C.; Blanco, M. M. Microwave-Promoted Synthesis of Cyclic Imides. *Arkivoc* **2018**, 319–345.

¹⁹ Sheldon, R. A. Engineering a more sustainable world through catalysis and green chemistry, *J. R. S. Interface*, **2016**, 13, 20160087.



verde, e apresenta grande impacto em termos de economia atômica. Por outro lado, a biocatálise é uma forma de catálise que segundo *R. A. Sheldon, 2018*, está em conformidade com pelo menos 10 dos 12 princípios da química verde.²⁰ A aplicação de enzimas como catalisadores permite o acesso a produtos com alta enantiosseletividade, além de apresentar benefícios econômicos e ambientais.²¹

A mecanoquímica também é outra forma de ativação de reações químicas que está relacionada ao fornecimento de energia mecânica para uma reação.²² Este tipo de ativação já foi aplicado em diversas reações químicas, e uma de suas vantagens é evitar o uso de solventes.²³ A aplicação de ultrassom em reações químicas também tem consequências que estão relacionadas à mecanoquímica.²² Entretanto, a aplicação de ondas ultrassônicas à líquidos tem aspectos inerentes à dissipação das ondas no meio, que levaram ao surgimento da sonoquímica, hoje considerada, uma outra alternativa sustentável para a ativação de reações.²⁴

A tecnologia de fluxo contínuo também pode ser aplicada à síntese orgânica com vistas a alcançar um processo mais sustentável.²⁵ As condições de fluxo contínuo permitem o uso mais eficiente da energia, através da utilização de micro-reatores,²⁶ os quais devido aos seus pequenos volumes associados à área superficial elevada permitem rápidas trocas de calor e processos de transferência de massa, que refletem em um aumento na velocidade das reações realizadas em tais condições.²⁷ Algumas vantagens associadas ao uso de fluxo contínuo são: segurança, velocidade, eficiência, seletividade, redução de custos e qualidade no acompanhamento dos parâmetros reacionais.²⁸

Devido a essas características a tecnologia de fluxo contínuo tem sido empregada em uma variedade de reações orgânicas e processos de síntese. A construção de diversos ingredientes farmacêuticamente ativos pode ser realizada através da aplicação dessa tecnologia.²⁹ O

²⁰ Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>

²¹ Sheldon, R. A.; Brady, D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis, *ChemSusChem*, **2019**, *12*, 2859–2881.

²² Tan, D.; Friščić, T. Mechanochemistry for Organic Chemists: An Update, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 18–33.

²³ Hernández, J. G.; Bolm, C. Altering Product Selectivity by Mechanochemistry, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4007–4019.

²⁴ Martínez, R. F.; Cravotto, G.; Cintas, P. Organic Sonochemistry: A Chemist's Timely Perspective on Mechanisms and Reactivity *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 13833–13856.

²⁵ Lenstra, D. C.; Rutjes, F. P. J. T. in *Organic Synthesis in Flow: Toward Higher Levels of Sustainability*, ed. L. Vaccaro WILEY-VCH, 2017, p. 103–131.

²⁶ Akwi, F. M.; Watts, P. Continuous flow chemistry: where are we now? Recent applications, challenges and limitations, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13894–13928.

²⁷ Plutschack, M. B.; Pieber, B.; Gilmore, K.; Seeberger, P.H. The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11796–11893.

²⁸ Wiles, C.; Watts, P. Continuous process technology: a tool for sustainable production, *Green Chem.* **2014**, *16*, 55–62.

²⁹ Baumann, M.; Baxendale, I. R. The synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs) using continuous flow chemistry, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1194–1219. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.134>



desenvolvimento de processos de síntese para ingredientes ativos ao ser realizado em condições de fluxo contínuo tem a vantagem de facilitar as etapas de escalonamento e portanto, na intensificação de processos.³⁰ Assim, a tecnologia de micro reatores e fluxo contínuo é vista como uma forma direta de se incorporar diversos aspectos estabelecidos pelos 12 princípios da química verde.³¹

Outro aspecto importante relacionado à síntese orgânica sustentável, diz respeito aos próprios materiais de partida, ou blocos de construção a serem empregados para a síntese de determinado alvo.³² Atualmente, ocorre um aumento da conscientização acerca da origem das moléculas plataforma e uma troca de fontes também é necessária. A aplicação de moléculas plataforma derivadas da biomassa deveria ser preferível em relação às moléculas plataforma derivadas de fontes fósseis e não renováveis. Tal pensamento é essencial no desenvolvimento de rotas de síntese³³ e esta mudança de fontes, aplicada ao se planejar rotas de síntese de moléculas alvo. O desenvolvimento da indústria química se deu em grande parte, baseado em blocos de construção derivados do petróleo, constituído por moléculas simples e de pouca funcionalização. Por outro lado, os blocos de construção obtidos da biorefinaria, mostram um maior grau de funcionalização, de modo que, podem ser aplicados sem a necessidade de novas transformações com vistas à inserção de grupos funcionais, para a síntese de um alvo.³⁴

Desse modo, algumas dessas abordagens foram introduzidas como parte das metodologias desenvolvidas para a preparação de heterociclos nitrogenados e novas espiroimidazóis durante este trabalho.

1. 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo geral estudar a reatividade de compostos aromáticos contendo insaturações (aminas alílicas, amidas e ésteres acrílicos, Compostos C), frente a dois sistemas reacionais diferentes. A halogenação enzimática, **(A)** e a carbamoilação **(B)**, para a geração de heterociclos através de reações de adição/ciclização em condições de fluxo contínuo. Como mostra o **Esquema 1 (A)** o objetivo proposto para esta pesquisa surgiu através de algumas perguntas: **(1)** “Seria possível isolar uma haloperoxidase com atividade brominante de uma alga

³⁰ Gutmann, B.; Cantillo, D.; Kappe, C. O. Continuous-Flow Technology—A Tool for the Safe Manufacturing of Active Pharmaceutical Ingredients, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 6688–6728.

³¹ Fanelli, F.; Parisi, G.; Degennaro, L.; Luisi, R. Contribution of microreactor technology and flow chemistry to the development of green and sustainable synthesis, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 520–542.

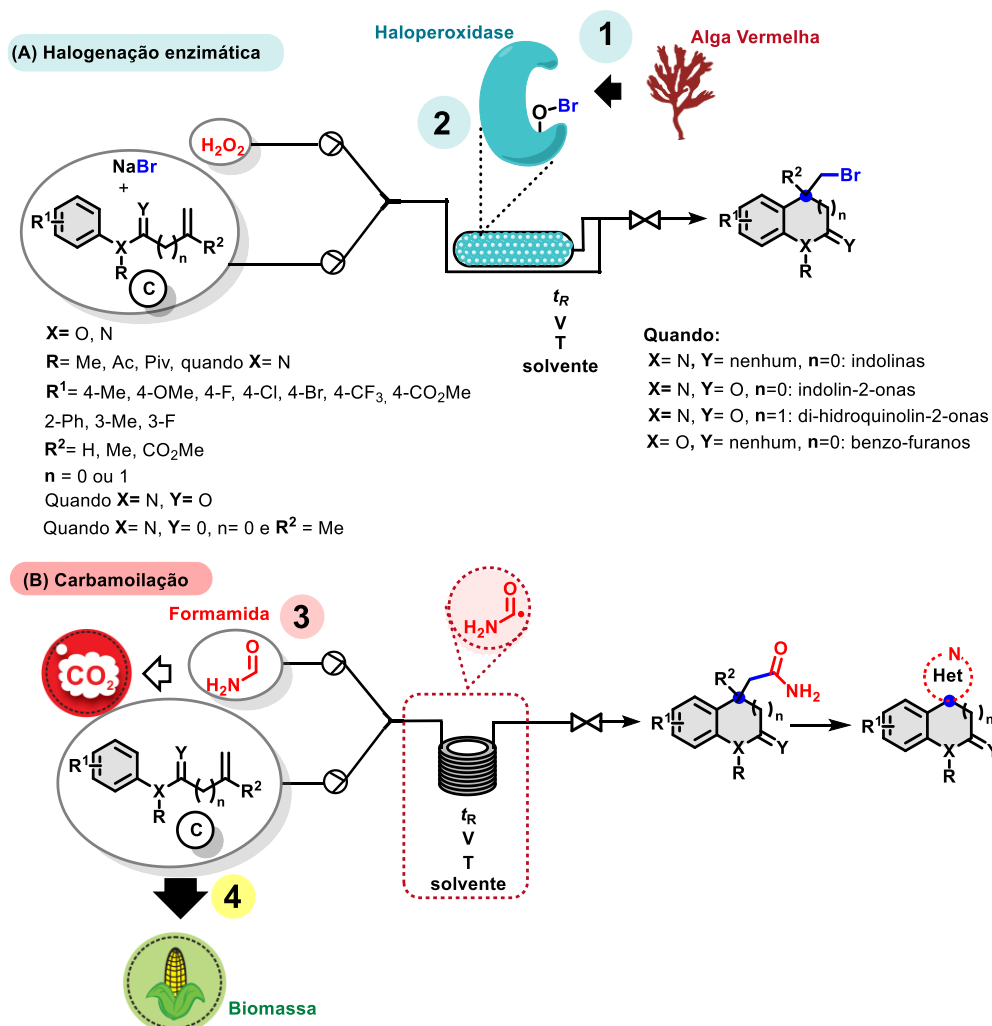
³² Clark, J. H; Green chemistry for the second generation biorefinery – sustainable chemical manufacturing based on biomass, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, 82, 603–609.

³³ Kühlborn, J.; Groß, J.; Opatz, T. Making natural products from renewable feedstocks: back to the roots, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, 37, 380–424.

³⁴ Falarz, L. J.; Singer, S. D.; Chen, G. in *Biomass-Derived Building Block Chemicals*, ed. G. Chen, R. J. Weselake, S.D. Singer, 177–199



vermelha da costa brasileira para realizar reações de bromociclicação?” E junto a esta pergunta: **(2)** “Incorporar o fluxo contínuo, levaria a reações seletivas?”.



Esquema 1: **(A)** Aplicação de haloperoxidase dependente de vanádio em sistema de fluxo contínuo visando reações seletivas. **(B)** Carbamoilação.

Durante o desenvolvimento desse projeto, no laboratório a formamida era estudada para reações de adição/ciclicação em compostos análogos a **C**, sendo assim, também nos perguntamos: **(3)** “Quais dos compostos **C** sintetizados poderiam ser alvo de reações de adição/ciclicação em fluxo contínuo, do radical carbamoíla derivado da formamida?”. Junto a esta pergunta e considerando a formamida como um bloco de construção renovável que pode ser obtido do CO₂, nos perguntamos: **(4)** “Seria possível sintetizar através destas metodologias um composto heterocíclico que contivesse todos os seus átomos provenientes de fontes renováveis?”



CAPÍTULO II

Síntese de derivados *N*-fenilalílicos e *N*-fenilacrílicos



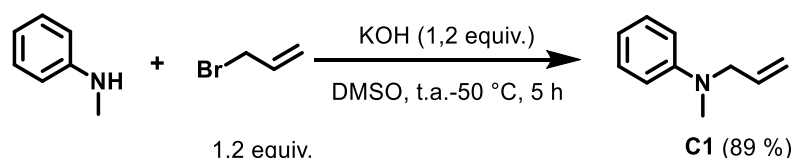
CAPÍTULO II

2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS *N*-FENILALÍLICOS E *N*-FENILACRÍLICOS

Este capítulo será dedicado a apresentação das rotas sintéticas utilizadas para a preparação dos compostos *N*-fenilalílicos e *N*-fenilacrílicos (compostos **C**) que serão explorados posteriormente nas reações de adição/ciclização.

2. 1. APRESENTAÇÃO DAS ROTAS DE SÍNTESE DOS SUBSTRATOS C1-C9

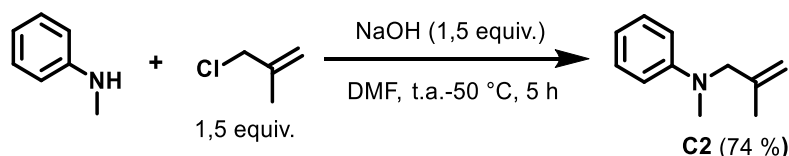
A *N*-alil-*N*-metilanilina (**C1**) foi o primeiro composto a ser sintetizado, para ser alvo das reações de adição do radical carbamoíla e das reações com a haloperoxidase. O composto **C1** foi preparado a partir de uma substituição nucleofílica entre a *N*-metilanilina e o brometo de alila. A reação foi realizada em DMSO como solvente e a base empregada foi hidróxido de potássio. A metodologia escolhida para o procedimento de preparação de **C1**³⁵ indicava a utilização de 2 equivalentes do brometo de alila, entretanto, como um subproduto de bromação do anel da anilina (**C1**) foi verificado, que apresentava difícil separação do produto de interesse, optou-se por diminuir os equivalentes do brometo utilizado. Aplicando as condições reacionais do **Esquema 2** o composto **C1** foi obtido em 89 % de rendimento isolado, após purificação por coluna cromatografia flash em sílica gel.



Esquema 2: Preparação da *N*-alil-*N*-metilanilina.

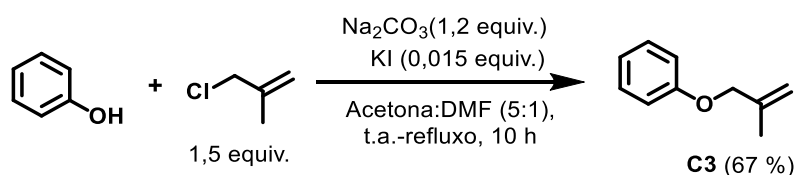
A seguir foi realizada a preparação da *N*-Metil-*N*-(2-metilalil)anilina (**C2**) a fim de se obter um derivado contendo a dupla ligação substituída. Uma metodologia com algumas alterações foi empregada, os equivalentes do agente alquilante, cloreto de 2-metil alila foram aumentados para 1,5 e o solvente utilizado foi DMF. Aplicando a metodologia descrita no **Esquema 3**, foi possível obter o composto **C2** em 74% de rendimento isolado, após purificação por coluna cromatografia flash em sílica gel.

³⁵ Zhang, L.; Peng, C.; Zhao, D.; Wang, Y.; Fu, H.-J.; Shena, Q.; Li, J.-X. Cu (II)-catalyzed C–H (SP³) oxidation and C–N cleavage: base-switched methylenation and formylation using tetramethylethylenediamine as a carbon source, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 5928–5930.



Esquema 3: Preparação da *N*-Metil-*N*-(2-metilalil)anilina.

A seguir foi sintetizado um análogo contendo um átomo de oxigênio, o (2-metilalil)oxi)benzeno (**C3**).³⁶ Neste caso a reação foi realizada em uma mistura de Acetona e DMF (5:1), o mesmo agente alquilante utilizado anteriormente foi empregado (cloreto de 2-metilalila). Devido à menor reatividade do cloreto foi empregado KI como catalisador, como descrito no **Esquema 4**. O composto **C3** foi obtido em 67% de rendimento isolado, após purificação por coluna cromatografia flash em sílica gel.



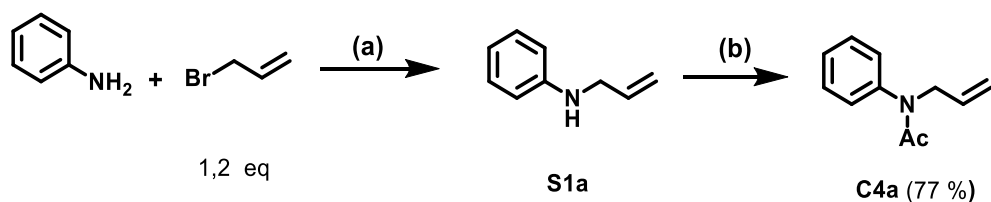
Esquema 4: Preparação do (2-metilalil)oxi)benzeno.

Como os compostos utilizados na literatura, nas halociclicações eram *N*-aril-acrilamidas.³⁷ Nesse caso, contendo um nitrogênio protegido, optou-se pela preparação de um análogo de **C1**, protegido com o grupo acetila, a *N*-alil-*N*-phenilacetamida (**C4a**) foi sintetizada em duas etapas como mostra o **Esquema 5**. A primeira etapa envolveu a alquilação da anilina com o brometo de alila, nesse caso, uma reação com 16 horas a temperatura ambiente forneceu o a *N*-alilililina **S1a** e o produto de dialquilação como minoritário.³⁸ Optou-se por não purificar a mistura e seguiu-se com a etapa de proteção com o bruto reacional. A acetilação foi realizada com cloeto de acetila em diclorometano por 4 horas em atmosfera de N₂, na presença de TEA, essa sequência forneceu o produto **C4a** em 77% de rendimento isolado, após purificação por coluna cromatografia flash em sílica gel.

³⁶ Kim, K. M.; Kim, H.R.; Ryu, E. K. One-Pot Synthesis of 2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran Derivatives, *Heterocycles*, **1993**, 36, 497–505.

³⁷ Ackermann, L.; Lygin, A. V.; Hofmann, N., Ruthenium-Catalyzed Oxidative Synthesis of 2-Pyridones through C–H/N–H Bond Functionalizations, *Org. Let.* **2011**, 13, 3278–3281.

³⁸ Martínez, W.R.; Militão, G.G.; da Silva, T. G.; Silva, R.O.; Menezes, P.H. Synthesis of novel [3,1]-benzothiazepine and [3,1]-benzoxazepine derivatives with antitumoral activity, *RSC Adv.* **2014**, 4, 14715–14718.

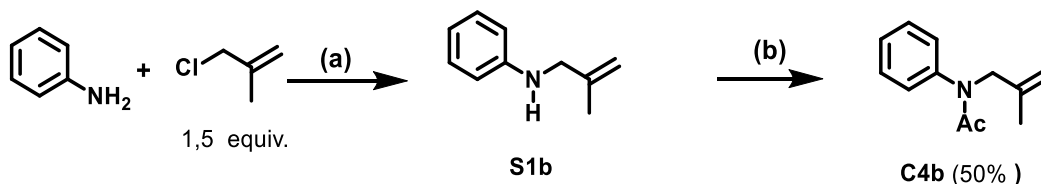


(a) Na_2CO_3 (1,2 equiv.), DMF, 0 °C-t.a., 16 h

(b) AcCl (1,2 equiv.), TEA (1,2 eq), CH_2Cl_2 , 0 °C-t.a., N_2 , 4 h

Esquema 5: Preparação da *N*-alilil-*N*-fenilacetamida.

Na sequência foi sintetizado o análogo do composto **C2** contendo o nitrogênio protegido (C4b). Novamente a preparação foi realizada em duas etapas, como mostra o **Esquema 6**. A primeira etapa envolveu a alquilação da anilina e de anilinas substituídas no anel aromático, nesse caso, utilizou-se 1,5 equivalentes do coreto, a seguir, o bruto reacional foi submetido a acilação, fornecendo a *N*-(2-metilalil)-*N*-fenilacetamida substituídas



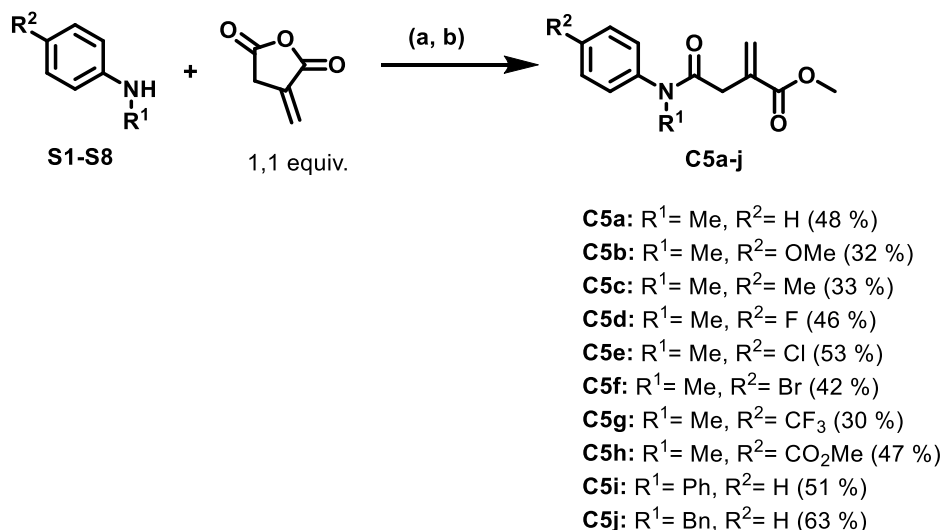
(a) Na_2CO_3 (1,2 equiv.), KI (0,015 equiv.) Acetona:DMF (5:1), t.a.-50 °C, 16 h

(b) AcCl (1,2 equiv.), TEA (1,2 equiv.), CH_2Cl_2 , 0 °C-t.a., N_2 , 4 h

Esquema 6: Preparação de *N*-(2-metilalil)-*N*-fenilacetamidas substituídas.

Outra série de amidas contendo dupla ligação foi preparada a partir do ácido itacônico.

Os (fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoatos (C5a-j) foram preparados a partir de uma acilação utilizando-se o anidrido itacônico e anilinas *N*-alquiladas (S1-S8), seguida de uma esterificação. A sequência de reações utilizadas na preparação é mostrada no **Esquema 7**.



(a) tolueno, 70°C, 1 h, 80 °C, 0,5 h

(b) SOCl₂ (1,75 equiv.), MeOH, 0 °C-refluxo, 2,5 h

Esquema 7: Rota de síntese utilizada para a preparação de fenil(amino)-2-metileno-4-oxobutanoatos (C5).

A primeira etapa foi o estudo da acilação da *N*-metil-anilina com o anidrido itacônico, o anidrido apresenta três sítios eletrofílicos, que podem ser alvo do ataque de um nucleófilo, entretanto como uma das carbonilas apresenta uma dupla ligação conjugada, esta carbonila teria uma reatividade menor em detrimento da outra, e empregando-se condições controladas, a adição à carbonila conjugada seria evitada. Para isso foi utilizada uma metodologia já disponível na literatura, a qual foi desenvolvida para anilinas não substituídas no anel aromático.³⁹ O anidrido itacônico era aquecido em banho de óleo de silicone até a temperatura de 70°C, a seguir a anilina era adicionada em um período de uma hora gota-a-gota, após o término da adição da anilina, a reação era aquecida até 80°C por mais 30 minutos. Essa etapa foi realizada com excesso de 0,1 equivalentes do anidrido, e a adição durante uma hora da anilina a no máximo 70°C foi necessária, para se evitar a adição do tipo Michael da anilina à dupla. Quint em 2003 estudou a reação entre o anidrido itacônico e anilinas e mostrou que o produto de adição à carbonila não conjugada era preferencialmente formado.⁴⁰

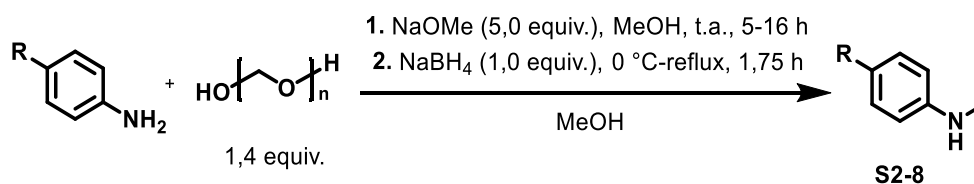
Como o interesse era avaliar o escopo de substratos, diversas anilinas substituídas foram metiladas. Como mostra o

³⁹Wiffen, J.; Wilson, I. (Almac Sciences Limited) WO Patent 2008035086A2, 2008.

⁴⁰ Quint, M. L. Síntese e estudo de correlação estrutura-atividade de *N*-fenilcitraconimidas, e monoanilidas dos ácidos succínico, malêico, citracônico, itacônico e ftálico segundo o método manual de topliss. **2003**, [Dissertação de mestrado, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.



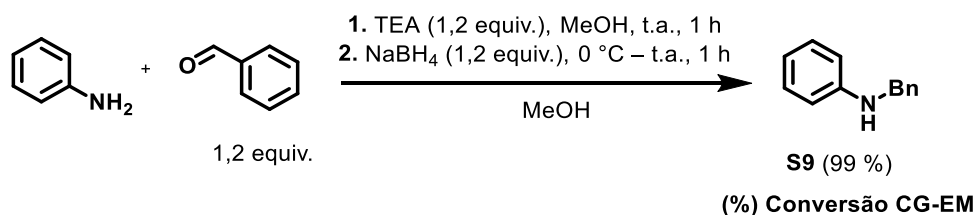
Esquema 8. A metodologia utilizada para a metilação das anilinas foi a aminação reductiva.⁴¹ A primeira etapa consiste na formação de uma imina utilizando-se paraformaldeído e como base metóxido de sódio. As *N*-metil-anilinas substituídas **S2-S8** foram obtidas após a redução com NaBH₄ em refluxo. As conversões foram determinadas por CG-EM, como as conversões foram altas, optou-se por evitar uma coluna cromatográfica e utilizar o bruto obtido após extração para a próxima etapa. No caso das anilinas contendo os grupos *p*-Br, *p*-CF₃ e *p*-CO₂Me o tempo de reação para a primeira etapa de formação da imina foi de 16 horas.



S2: R= OMe (97 %)
S3: R= Me (89 %)
S4: R= F (96 %)
S5: R= Cl (95 %)
S6: R= Br (91 %)
S7: R= CF₃ (95 %)
S8: R= CO₂Me (95 %)
 (%) **Conversões CG-EM**

Esquema 8: Reação de aminação reductiva de anilinas para produção de *N*-metil-anilinas substituídas.

A *N*-benzil-anilina foi preparada para a obtenção do composto **C5j**, **Esquema 7**, para obtê-la foi aplicada uma metodologia de benzilação, na qual o benzaldeído foi utilizado na presença de TEA como base, a seguir a imina era reduzida com NaBH₄,⁴² como mostra o **Esquema 9**. A amina **S9** foi utilizada na próxima etapa após a realização de uma destilação à vácuo.



Esquema 9: Reação de benzilação da anilina.

Após a preparação das *N*-alquil-anilinas realizou-se a acilação das mesmas com o anidrido itacônico, como a adição da anilina era realizada no período de 1 hora, optou-se por utilizar uma bomba de fluxo contínuo. Desse modo, era preparada uma solução da respectiva *N*-alquil-anilina bruta em tolueno, transferia-se para a seringa e a bomba de fluxo contínuo era programada para

⁴¹ Teichert, A.; Jantos, K.; Harms, K. Studer, A. One-pot homolytic aromatic substitutions/HWE olefinations under microwave conditions for the formation of a small oxindole library. *Org Lett.* **2004**, 6, 3477–3480.

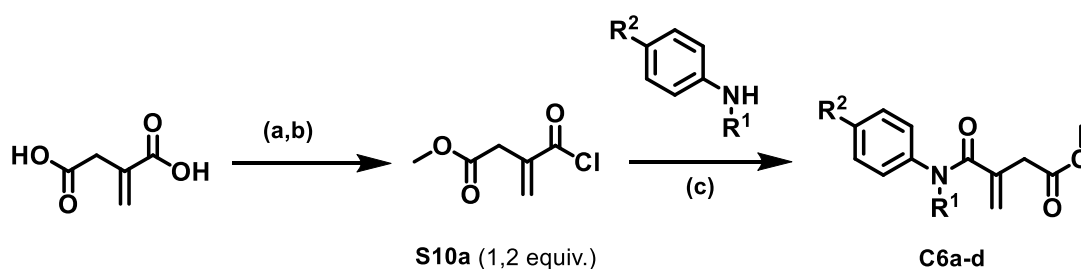
⁴² Al-Qawasmeh, R. A.; Lee, Y.; Cao, M-Y; Gu, X.; Viau, S.; Lightfoot, J.; Wright, J. A.; Young, A. H.; 11-Phenyl-[b,e]-dibenzazepine compounds: Novel antitumor agentes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 104–107.



adicionar o volume durante uma hora. A seguir, aquecia-se o balão até 80°C por mais 30 minutos, como descrito no **Esquema 7**. No caso da reação de acilação da difenilamina e da *N*-benzilanilina, após a adição das mesmas, foi necessário refluxo de duas horas para a obtenção do rendimento relatado no **Esquema 7**.

Os ácidos 2-metileno-4-oxo-4-(fenilamino)butanoicos obtidos após a abertura do anidrido também não foram isolados, o tolueno era removido do bruto da reação à pressão reduzida e a seguir, a etapa de esterificação era realizada. Na etapa de esterificação foi utilizado o cloreto de tionila e metanol, segundo uma metodologia que foi anteriormente utilizada para a geração de ésteres acrílicos substituídos.⁴³ Após a utilização desta sequência de reações e uma purificação por coluna cromatográfica flash de sílica gel, foi possível obter os respectivos (fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoatos (C5a-j) em bons rendimentos (63-30%). Os materiais de partida **C5a-j** foram caracterizados por EM, EMAR, RMN de ¹H e RMN de ¹³C.

A preparação dos (fenil)carbamoil)3-butenosatos (C6a-d) foi realizada de acordo com metodologias já publicadas, o **Esquema 10** mostra a rota utilizada para obtenção destes derivados do ácido itacônico. Em um primeiro momento preparou-se o monoéster metílico do ácido itacônico, na presença de cloreto de acila catalítico e metanol.⁴⁴ A seguir, preparou-se o cloreto de ácido **S10**, o qual foi utilizado para acilar as respectivas *N*-metilanilinas substituídas. No caso dessa rota foi necessária a purificação das anilinas, a reação foi realizada em acetato de etila na presença de TEA, durante 16 horas, os (fenil)carbamoil)3-butenosatos **C6a-d** foram obtidos em rendimentos bons a elevados.



C6a: R¹= Me, R²= H (89 %)

C6b: R¹= Me, R²= OMe (52 %)

C6c: R¹= Me, R²= CF₃ (43 %)

C6d: R¹= Bn, R²= H (60 %)

(a) AcCl (0,03 equiv.), MeOH, t.a.-refluxo, 2,5 h, 83 %

(b) SOCl₂ (1,2 equiv.), t.a.-refluxo, 0,5 h

(c) TEA (1,2 equiv.), AcOEt, N₂, 0 °C-t.a., 16 h

⁴³ Farley, A. J. M.; Sandford, C.; Dixon, D. J. J. Bifunctional Iminophosphorane Catalyzed Enantioselective Sulfa-Michael Addition to Unactivated α -Substituted Acrylate Esters, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 15992–15995.

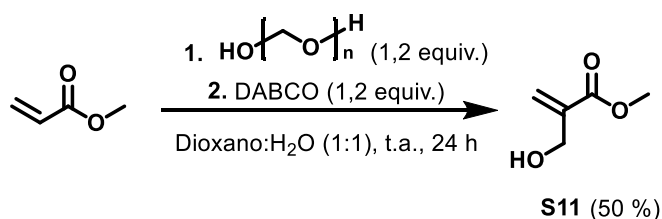
⁴⁴ Gowda, R. C. F. R; Chen, E. Y. Synthesis of β -methyl- α -methylene- γ -butyrolactone from biorenewable itaconic acid. *Organic Chem Front.* **2014**, 1, 230–234.



Esquema 10: Rota de síntese utilizada para a preparação dos fenil(carbamoil)3-butenosatos (C6).

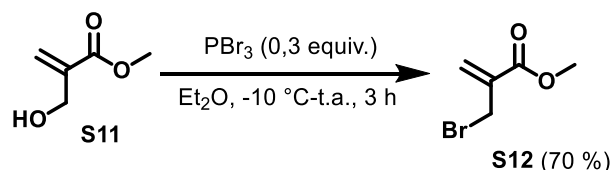
Os materiais de partida **C6a-d** foram caracterizados por EM. EMAR, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

Outras variações de substratos também foram preparadas, por exemplo, um substrato análogo de **C2** foi sintetizado, ele continha o nitrogênio da anilina protegido pelo grupo pivaloila e também apresentava um substituinte éster metílico na dupla ligação. O composto **C7a** foi preparado em algumas etapas. Na primeira etapa para produzir o metil 2-(hidroximetil)acrilato (**S11**) o acrilato de metila é alvo de uma reação de Morita-Baylis-Hillman, que ocorre na presença de paraformaldeído e DABCO.⁴⁵ Nessa etapa o composto **S11** foi obtido em rendimento isolado de 50 %, como um óleo incolor, após purificação por coluna cromatográfica flash de sílica gel.



Esquema 11: Reação de Morita-Baylis-Hillman para produzir S11.

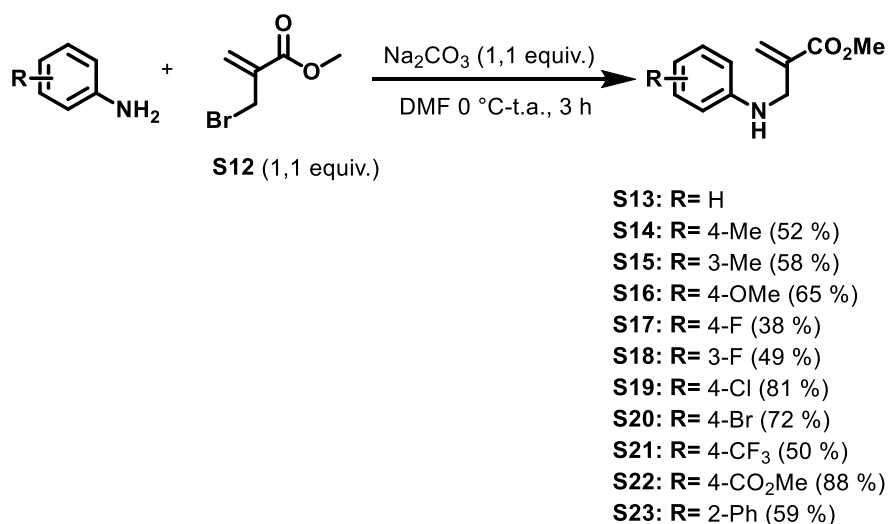
Após a obtenção do produto de α -hidroxi-metilenação. A etapa seguinte foi a preparação do brometo a partir de **S11**, nesse caso o PBr_3 foi empregado para a bromação.⁴⁵ A reação foi realizada em éter dietílico anidro a -10°C em banho de gelo e NaCl . O metil 2-(bromometil)acrilato (**S12**) foi obtido em 70% de rendimento isolado, como um óleo incolor, após purificação por coluna cromatográfica.



Esquema 12: Reação de preparação do metil 2-(bromometil)acrilato (S12).

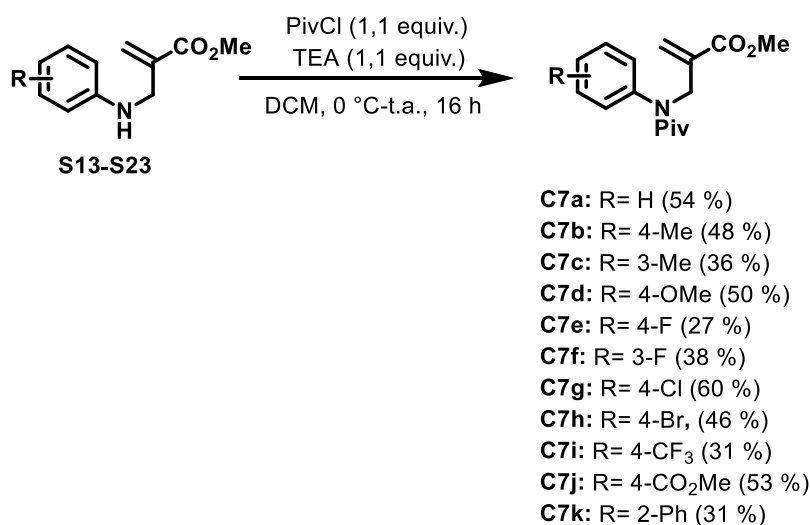
De posse do brometo, foi então realizada a alquilação de diversas anilinas substituídas, para a produção dos metil 2- (fenilamino)metilacrilatos (S13-S19). A reação era realizada em DMSO utilizando-se como base Na_2CO_3 . O composto **S13** não foi purificado por coluna cromatográfica, o bruto foi utilizado diretamente na próxima etapa. Já os compostos **S14-19** foram purificados por cromatografia em coluna e os respectivos rendimentos isolados estão dispostos no **Esquema 13**.

⁴⁵ Liu, H.; Ge, L.; Wang, D.-X.; Chen, N.; Feng, C. Photoredox-Coupled F-Nucleophilic Addition: Allylation of gem-Difluoroalkenes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *13*, 3918–3922.



Esquema 13: Reação de alquilação de anilinas com S12.

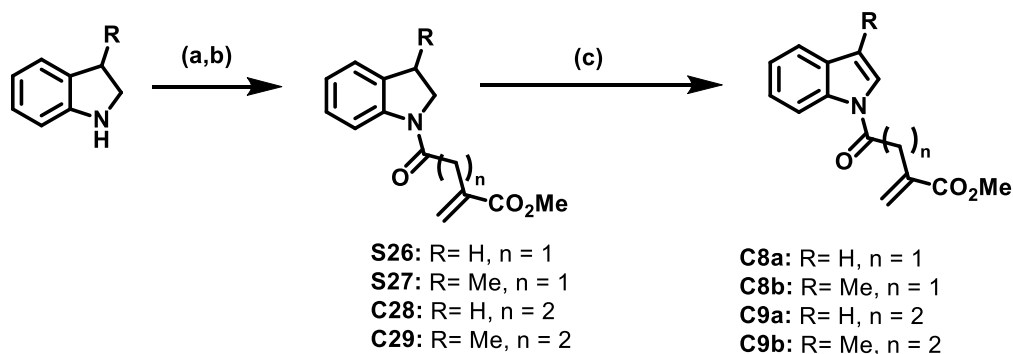
A seguir, de posse das anilinas acrílicas **S14-S23** foi realizada uma reação de proteção com o cloreto de pivaloíla. A reação foi realizada em diclorometano. Após purificação em coluna cromatográfica os metil 2-((*N*-fenilpivalamido)metil)acrilatos foram obtidos em rendimentos moderados, como mostra o **Esquema 14**.



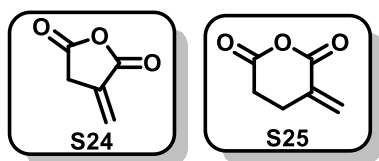
Esquema 14: Reação de preparação dos metil 2-((*N*-fenilpivalamido)metil)acrilatos.

Outra classe de substratos (C8 e C9) também foi preparada, vislumbrando a sua utilização para a síntese de indóis-*N*-fusionados. A preparação dessa classe de substratos envolveu a sequência de reações apresentadas no

Esquema 15 a seguir.

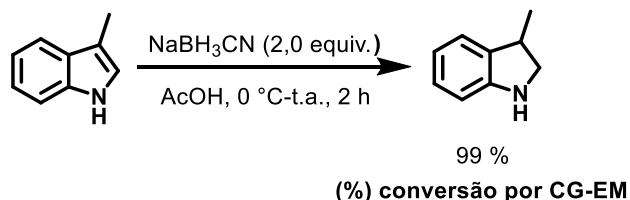


- (a)** S24 ou S25, Tolueno, t.a.-80 °C, 3 h,
(b) SOCl₂ (1,75 equiv.), MeOH, 0 °C-refluxo, 2,5 h
(c) DDQ (1,1 equiv.), Tolueno, t.a.-refluxo, 15 h



Esquema 15: Rota para a preparação de C8a-C9b.

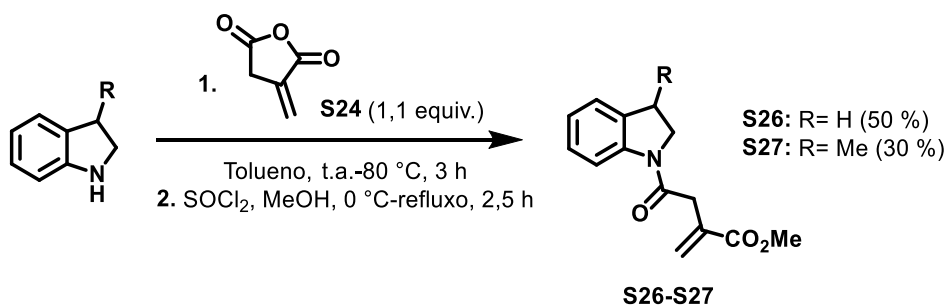
A primeira etapa da síntese foi a redução do escatol com ciano borohidreto de sódio (NaBH₃CN) (Esquema 16). A reação foi realizada em ácido acético como solvente.⁴⁶ A adição do cianoborohidreto de sódio é realizada em banho de gelo, após 2 horas, o meio é neutralizado, após a extração o escatol foi utilizado sem posteriores purificações. A indolina derivada do indol estava disponível no laboratório.



Esquema 16: Reação de redução do escatol com cianoborohidreto de sódio.

A seguir a reação de acilação entre a indolina e o anidrido foi realizada, em um primeiro momento foi utilizado o anidrido itacônico (S24) que é disponível comercialmente. Como mostra o **Esquema 17**.

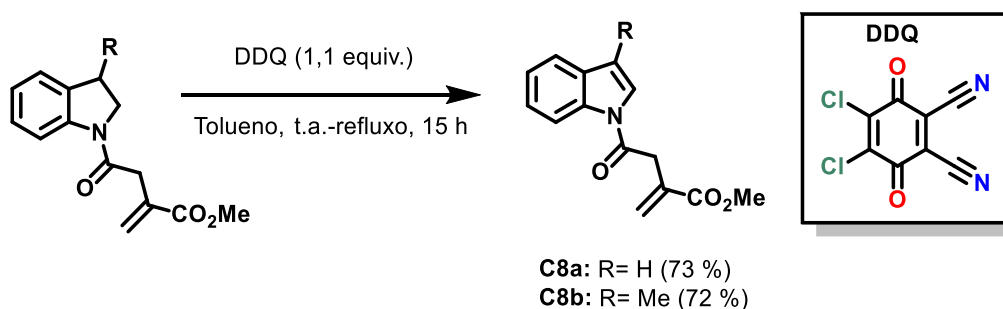
⁴⁶ Torigoe, T.; Ohmura, T.; Suginome, M. Asymmetric Cycloisomerization of o-Alkenyl-N-Methylanilines to Indolines by Iridium-Catalyzed C(sp³)-H Addition to Carbon-Carbon Double Bonds *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 14272–14276.



Esquema 17: Reação de acilação com anidrido itacônico.

A reação foi realizada em tolueno, e foi aplicada a mesma metodologia utilizada anteriormente para a preparação dos compostos **C5**, porém, a reação foi mantida durante 3 horas a 80°C, sem a necessidade de adição contínua da amina, como relatado anteriormente. A seguir o tolueno é removido e então realizada a esterificação do material bruto remanescente com cloreto de tionila em metanol. Os compostos **S26-27** foram purificados por cromatografia em coluna flash e obtidos em rendimento moderado, no caso de **S26** e baixo no caso de **S27**. A indolina de partida ainda estava presente no cromatograma do bruto reacional extraído e também na análise por CCD. Apesar disso, quando optou-se por realizar a reação com um maior tempo e temperatura (4h a 100°C) e não se observou aumento no rendimento obtido.

A próxima etapa envolveu a oxidação dos intermediários **S26-27** ao correspondente indol. A reação como mostra o **Esquema 18** é realizada com a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ).⁴⁷ A reação foi realizada em tolueno durante 15 horas. Após a extração os produtos **C8a** e **C8b** foram purificados por cromatografia em coluna flash.



Esquema 18: Reação de oxidação de S26-27 com DDQ.

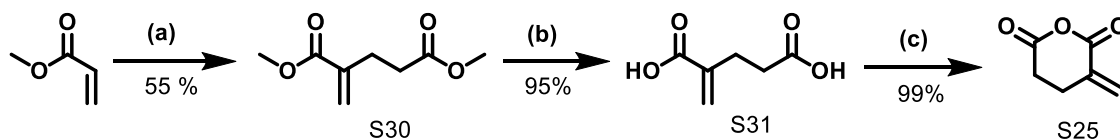
A síntese dos compostos **C9** dependia da etapa prévia de preparação do anidrido **S25** (

Esquema 15). O anidrido foi preparado de acordo com a sequência reacional disposta no **Esquema 19**. A primeira etapa foi a dimerização do acrilato de metila catalisada por tri-(n-butil)

⁴⁷ Huang, H.; Yu, M.; Su, X.; Guo, P.; Zhao, J.; Zhou, J.; Li, Y. Sustainable Radical Cascades to Synthesize Difluoroalkylated Pyrrolo[1,2-a]indoles, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 2425–2437.



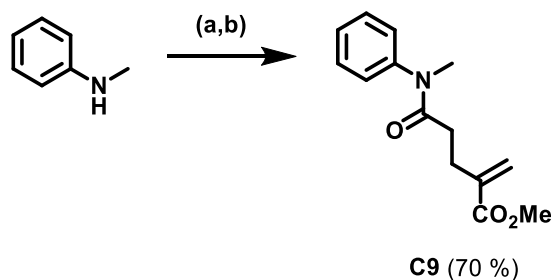
para preparação do diéster metílico (S30),⁴⁸ a seguir foi realizada a hidrólise do mesmo, para o respectivo diácido (S31).⁴⁹ O composto **31** foi então empregado para a preparação do anidrido cíclico **S25**, em uma reação na qual o anidrido acético é utilizado como solvente na presença do diácido, o meio é aquecido a 60°C durante 2 horas, a seguir o anidrido é recuperado após remoção do excesso de ácido acético e anidrido acético por destilação à pressão reduzida.⁵⁰



- (a) $(n\text{Bu})_3\text{P}$ (10 %), puro, -10 °C-t.a., 4 h
 (b) KOH (3,0 equiv.), H_2O , t.a.-refluxo, 2 h
 (c) Ac_2O , t.a.-60 °C, 2 h

Esquema 19: Sequencia reacional para a preparação do anidrido α -metileno-glutárico.

Após a preparação do anidrido **S25** o mesmo foi utilizado para acilar a *N*-metil-anilina, assim como realizado para a síntese dos compostos **C5** obtidos através do anidrido itacônico. Como mostra o **Esquema 20**, o objetivo da reação era comparar a reatividade do anidrido obtido com o anidrido itacônico já explorado anteriormente.



- (a) tolueno, 70°C, 1 h, 80 °C, 0,5 h
 (b) SOCl_2 (1,75 equiv.), MeOH, 0 °C-refluxo, 2,5 h

Esquema 20: Rota de preparação do metil 5-(metil(fenil)amino)-2-metileno-5-oxopentanoato **C9**

As etapas posteriores para a preparação dos compostos **C9** foram as mesmas aplicadas aos compostos **C8**. Durante a realização da reação de acilação do anidrido **S25** com as respectivas indolinas notou-se uma menor reatividade entre os compostos, o que culminou em um rendimento isolado baixo das indolinas aciladas **C28** e **C29**, como mostra o **Esquema 21**.

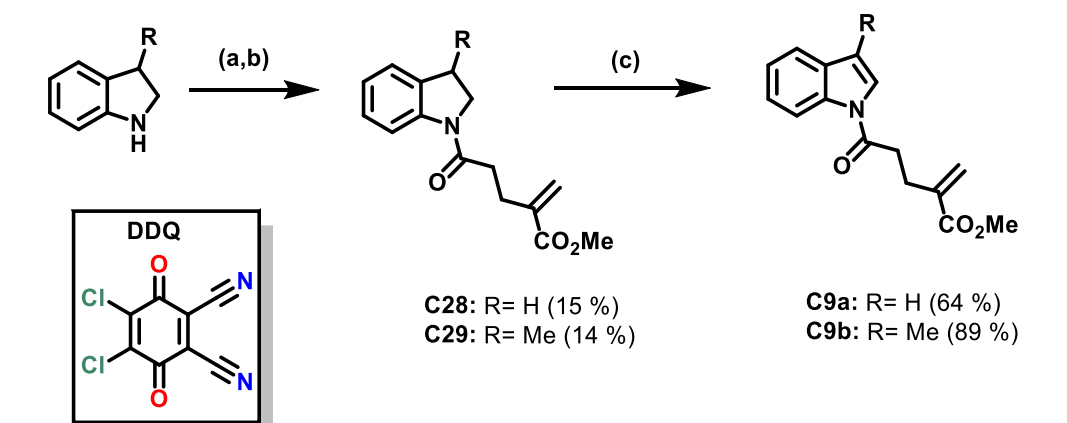
⁴⁸ Feng, Y.; Coward, J. K. Prodrug Forms of *N*-[(4-Deoxy-4-amino-10-methyl)pteroyl]glutamate- γ -[$\psi\text{P}(\text{O})(\text{OH})$]-glutarate, a Potent Inhibitor of Folylpoly- γ -glutamate Synthetase: Synthesis and Hydrolytic Stability, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 770–788. p

⁴⁹ Kagan, J.; Luisito, T. The Solution of a Classical Problem. Tautomerism and Isomerism in the α -Methylglutaconic Acid Series, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 3085–3093..

⁵⁰ Wang, Y.; Xu, S.; Hoye, T. R. Poly(α -Methyleneglutarimide)s from Radical Polymerization of α Methylene-glutarimides, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2018**, 56, 1020–1026.



Após a oxidação dos intermediários, os produtos finais **C9a** e **C9b** foram obtidos com rendimentos elevados na etapa de oxidação com DDQ.



- (a) **S25** (4,0 equiv.), Tolueno, t.a.-60 °C, 3 h,
 (b) SOCl_2 (1,75 equiv.), MeOH, 0 °C-refluxo, 2,5 h
 (c) **DDQ** (1,1 equiv.), Tolueno, t.a.-refluxo, 15 h

Esquema 21: Sequência reacional para a preparação de C9.

De posse dos diversos materiais de partida preparados deu-se início à investigação da sua reatividade frente às condições propostas nos objetivos, para a preparação dos diversos heterociclos.

2.2. DISCUSSÃO ESPECTRAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS OBTIDOS

Este tópico será dedicado à discussão acerca dos dados obtidos a partir da caracterização dos substratos sintetizados.

A **Tabela 1** apresenta os sinais observados no espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para os hidrogênios e carbonos do composto **C1**. Os respectivos espectros estão anexos na **Figura 40** (p. 252) e **Figura 41** (p. 252). O espectro de hidrogênio apresentou na região característica de aromáticos um multiplete entre $\delta = 7,25 - 7,20$ ppm com integração para 2 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C6. Um multiplete entre $\delta = 6,73 - 6,68$ ppm com integração para 3 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos C1, C3 e C5. Um sinal entre $\delta = 5,88 - 5,81$ ppm com integração para 1 hidrogênio, e com desdobramento característico de hidrogênio em sistema alílico, neste caso, o hidrogênio ligado ao C9. O sinal entre $\delta = 5,819 - 5,13$ ppm tem integração para 2 hidrogênios e um desdobramento complexo, neste caso são os hidrogênios geminais ligados ao C10 da dupla ligação. Entre $\delta = 3,92 - 3,91$ ppm um multiplete de integração para 2 hidrogênios, correspondente aos hidrogênios metilênicos. Em $\delta = 2,93$ ppm o singlete de integração para 3 hidrogênios correspondente à metila (C7) ligada ao nitrogênio. O espectro de RMN de ^{13}C



apresenta os seguintes sinais $\delta = 149,5$ (C4); 133,8 (C9); 129,1 (C2,C6); 116,4 (C10); 116,2 (C1); 112,5 ppm (C3,C5) que são correspondentes aos carbonos aromáticos e de dupla ligação. O sinal em $\delta = 55,3$ correspondente ao carbono do grupo metilênico alfa ao nitrogênio (C8) e em $\delta = 38,0$ o sinal correspondente ao carbono da metila (C7).

Tabela 1: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C1.

Composto C1

C1

n°	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	6,71 (m)	116,2
2	7,22 (m)	129,1
3	6,71 (m)	112,5
4	-	149,5
5	6,71 (m)	112,5
6	7,22 (m)	129,1
7	2,93 (s)-	38,0
8	3,92 (m)	55,3
9	5,84 (m)	133,8
10	5,15 (m)	116,4

A **Tabela 2** apresenta os sinais observados no espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para os hidrogênios e carbonos do composto **C2**. Os respectivos espectros estão anexos nas **Figura 42** (p.253) e **Figura 43** (p.253). O espectro de hidrogênio apresentou na região característica de aromáticos um multiplete entre $\delta = 7,25 - 7,19$ ppm com integração para 2 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C6. Um multiplete entre $\delta = 6,69 - 6,67$ ppm com integração para 3 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos C1, C3 e C5. Um sinal entre $\delta = 4,84 - 4,83$ ppm com integração para 1 hidrogênio, neste caso um dos hidrogênios geminais ligado a C10. O sinal em $\delta = 5,80$ correspondente ao outro hidrogênio geminal da dupla ligação. Em $\delta = 3,79$ um singlete de integração para 2 hidrogênios, correspondente aos prótons metilênicos. Em $\delta = 2,95$ ppm o singlete de integração para 3 hidrogênios correspondente à metila (C7) ligada ao nitrogênio e em $\delta = 1,70$ ppm o singlete



referente à metila da dupla ligação. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta os seguintes sinais δ = 149,7 (C4); 141,5 (C9); 129,1 (C2,C6), 116,1 (C1); 112,5 ppm (C3,C5), 110,7 (C10) que são correspondentes aos carbonos aromáticos e de dupla ligação. O sinal em δ = 58,8 correspondente ao carbono do grupo metilênico (C8) alfa ao nitrogênio e em δ = 38,2 o sinal correspondente ao carbono da metila (C7) ligada ao nitrogênio. Em δ = 20,1 ppm o sinal correspondente à metila (C11) da dupla ligação.

Tabela 2: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C2.

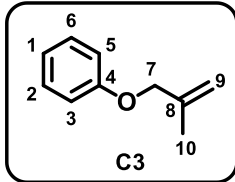
Composto C2		
n°	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	6,67(m)	116,1
2	7,21 (m)	129,0
3	6,67 (m)	112,0
4	-	149,7
5	6,67(m)	112,0
6	7,21 (m)	129,0
7	2,95 (s)	38,2
8	3,79 (m)	58,8
9	-	141,5
10	4,84 (m), 4,80 (s)	110,7
11	1,72 (s)	20,1

A **Tabela 3** apresenta os sinais observados no espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para os hidrogênios e carbonos do composto **C3**. Os respectivos espectros estão anexos nas **Figura 45** (p.255) e **Figura 46** (p.255). O espectro de hidrogênio apresentou na região característica de aromáticos um multiplete entre δ = 7,27 – 7,23 ppm com integração para 2 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C6. Um multiplete entre δ = 6,93 – 6,89 ppm com integração para 3 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos C1, C3 e C5. Um sinal em δ = 5,08 ppm com integração para 1 hidrogênio, neste caso um dos hidrogênios geminais ligado a C9. O sinal em δ = 4,97 ppm correspondente ao outro hidrogênio



geminal da dupla ligação. Em $\delta = 4,40$ um singlete de integração para 2 hidrogênios, correspondente aos prótons metilênicos. Em $\delta = 1,81$ ppm o singlete referente à metila da dupla ligação. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta os seguintes sinais $\delta = 158,9$ (C4); 141,1 (C9); 129,5 (C2,C6), 120,8 (C1); 114,9 ppm (C3,C5), 112,7 (C8) que são correspondentes aos carbonos aromáticos e de dupla ligação. O sinal em $\delta = 71,7$ correspondente ao carbono do grupo metilênico (C7) alfa ao oxigênio e em $\delta = 19,4$ o sinal correspondente ao carbono da metila (C10) da dupla ligação.

Tabela 3: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C3.

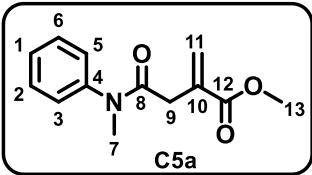
Composto C3		
		
n°	δ_{H}	δ_{C} (ppm)
1	6,91(m)	120,8
2	7,25 (m)	129,4
3	6,91 (m)	114,9
4	-	158,9
5	6,91(m)	114,9
6	7,25 (m)	129,5
7	4,40 (s)	71,7
8	-	112,7
9	5,08(s), 4,97 (s)	141,1
10	1,81	19,4

A **Tabela 4** apresenta os sinais observados no espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para os hidrogênios e carbonos do composto **C5a**. Os respectivos espectros estão anexos na **Figura 54** (p.260) e **Figura 55** (p.260). O espectro de hidrogênio apresentou na região característica de aromáticos um multiplete entre $\delta = 7,45 - 7,42$ ppm com integração para 2 hidrogênios correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos C3 e C5. Um multiplete entre $\delta = 7,37 - 7,34$ ppm com integração para 1 hidrogênio correspondente ao hidrogênio ligado ao C1. O multiplete entre $\delta = 7,28 - 7,23$ ppm correspondente aos hidrogênios ligados a C3 e C5. Um singlete em $\delta = 6,25$ ppm com integração para 1 hidrogênio, neste caso um dos hidrogênios geminais ligado a C11. O singlete em $\delta = 5,60$ ppm correspondente ao outro hidrogênio geminal



da dupla ligação. Em $\delta = 3,74$ um singlete de integração para 3 hidrogênios, correspondente à porção ester (C13). Em $\delta = 3,28$ ppm o singlete referente à metila (C7) ligada ao nitrogênio, em $\delta = 3,10$ ppm o singlete com integração para 2 referente aos hidrogênios metilênicos (C9). O espectro de RMN de ^{13}C apresenta os seguintes sinais $\delta = 170,0$ (C12); 166,9 (C8), 143,9 (C4); 135,9 (C10), 129,8 (C2, C6); 128,0 ppm (C1), 127,4 (C3, C5) que são correspondentes aos carbonos aromáticos e de dupla ligação. O sinal em $\delta = 51,9$ correspondente ao carbono do grupo metila e (C13) em $\delta = 37,7$ o sinal correspondente ao carbono da metila (C7) ligada ao nitrogênio e em $\delta = 37,4$ o sinal referente ao carbono alfa à amida (C9).

Tabela 4: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C5a.

Composto C5a		
		
n°	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	7,35 (m)	128,0
2	7,27 (m)	129,8
3	7,43(m)	127,4
4	-	143,9
5	7,43(m)	127,4
6	7,27 (m)	129,8
7	3,28 (s)	37,7
8	-	166,9
9	3,10 (s)	37,4
10	-	135,1
11	6,25 (s), 5,60 (s)	127,7
12	-	170,0
13	3,74 (s)	51,9

A **Tabela 5** apresenta os sinais observados no espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para os hidrogênios e carbonos do composto **C6a**. Os respectivos espectros estão anexos na **Figura 57** (p.262) e **Figura 58** (p.262). O espectro de hidrogênio apresentou na região característica de aromáticos um multipeto entre $\delta = 7,37 - 7,30$ ppm com integração para 4 hidrogênios



correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos C3, C5, C2 e C6. Um multipletto entre $\delta = 7,26 - 7,23$ ppm com integração para 1 hidrogênio correspondente ao hidrogênio ligado ao C1. Um singletto em $\delta = 5,27$ ppm com integração para 1 hidrogênio, neste caso um dos hidrogênios geminais ligado a C10. O singletto em $\delta = 5,04$ ppm correspondente ao outro hidrogênio geminal da dupla ligação. Em $\delta = 3,71$ um singletto de integração para 3 hidrogênios, correspondente à porção ester (C13). Em $\delta = 3,39$ ppm o singletto referente à metila (C7) ligada ao nitrogênio, em $\delta = 3,30$ ppm o singletto com integração para 2 referente aos hidrogênios metilênicos (C11). O espectro de RMN de ^{13}C apresenta os seguintes sinais $\delta = 171,1$ (C12); 169,3 (C8), 144,9 (C4); 136,1 (C10), 129,2 (C2, C6); 126,9 ppm (C1), 126,8 (C3, C5) que são correspondentes aos carbonos aromáticos e de dupla ligação. O sinal em $\delta = 51,9$ correspondente ao carbono do grupo metila e (C13) em $\delta = 39,3$ o sinal correspondente ao carbono da metila (C7) ligada ao nitrogênio e em $\delta = 38,4$ o sinal referente ao carbono alfa ao éster (C11).

Tabela 5: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C6a.

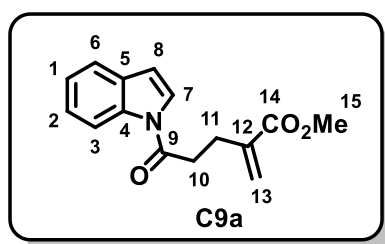
Composto C6a		
n°	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	7,25 (m)	126,9
2	7,33 (m)	129,2
3	7,33 (m)	126,8
4	-	144,9
5	7,33(m)	126,8
6	7,33 (m)	129,2
7	3,39 (s)	39,3
8	-	169,3
9		126,8
10	5,27 (s), 5,04 (s)	136,7
11	3,30	38,4
12		171,1
13	3,71 (s)	51,9



A **Tabela 6** apresenta os sinais observados no espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para os hidrogênios e carbonos do composto **C9a**. Os respectivos espectros estão anexos nas **Figura 71** (p.269) e **Figura 72** (p.269). O espectro de hidrogênio apresentou na região característica de aromáticos um dubleto em $\delta = 8,46$ ppm com integração para 1, correspondente ao hidrogênio ligado ao C3, um dubleto em $\delta = 7,56$ ppm, outro em $\delta = 7,56$ ppm ambos com integração para 1 hidrogênio. Observa-se o multiplete entre $\delta = 7,37 - 7,34$ ppm com integração para 1 hidrogênio correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono C2. Um multiplete entre $\delta = 7,29 - 7,26$ ppm com integração para 1 hidrogênio correspondente ao hidrogênio ligado ao C1. O dubleto em $\delta = 6,65$ ppm correspondente ao hidrogênio ligados a C8. Um singlete em $\delta = 6,26$ ppm com integração para 1 hidrogênio, neste caso um dos hidrogênios geminais ligado a C13. O singlete em $\delta = 5,76$ ppm correspondente ao outro hidrogênio geminal da dupla ligação. Em $\delta = 3,79$ um singlete de integração para 3 hidrogênios, correspondente à metila ligada do grupo éster. Entre $\delta = 3,16 - 3,13$ ppm o multiplete referente aos hidrogênios do grupo metileno alfa à carbonila, e o multiplete entre $2,87 - 2,84$ ppm referente ao metileno alfa à dupla ligação C=C conjugada ao éster. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta os seguintes sinais $\delta = 170,5$ (C9); $167,2$ (C14), $138,5$ (C4), $135,6$ (C12), $130,4$ ppm (C5), $127,1$ (C7), $125,2$ (C2) $123,7$ ppm (C13) que são correspondentes respectivamente aos carbonos das carbonilas, aromáticos e da dupla ligação. O sinal em $\delta = 52,0$ ppm correspondente ao carbono do grupo metila (C15), em $\delta = 36,1$ ppm o sinal correspondente ao carbono metilênico alfa à carbonila (C11), enquanto em $\delta = 27,7$ ppm o sinal correspondente ao carbono metilênico alfa à dupla conjugada.

Tabela 6: Sinais RMN ^1H e ^{13}C do composto C9a.

Composto C9a



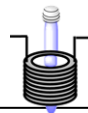
n°	δ_{H}	δ_{C} (ppm)
1	7,29 – 7,26 (m)	120,8
2	7,37 – 7,34 (m)	125,2
3	8,46 (d)	116,6
4	-	138,5
5	-	130,4
6	7,56 (d)	120,8



7	7,52 (d)	127,1
8	6,65 (d)-	109,3
9	-	170,5
10	3,16 – 3,13 (m)	36,1
11	2,87 – 2,84 (m)	27,7
12	-	135,6
13	6,26 (s), 5,76 (s)	123,7
14	-	167,2
15	3,79	52,0

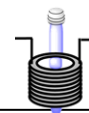
2. 3. CONCLUSÃO PARCIAL

Este segundo capítulo foi dedicado à apresentação das rotas de síntese utilizadas para a preparação dos compostos **C**, derivados *N*-fenilalílicos e *N*-fenil acrílicos. Com esse propósito foram utilizadas tanto metodologias disponíveis na literatura quanto metodologias que foram desenvolvidas para a preparação dos compostos inéditos derivados do ácido itacônico.



CAPÍTULO III

**Síntese de dihidroquinolin-2-onas e indolin-2-onas
através do radical carbamoíla, em fluxo contínuo e
sua funcionalização para espiroimididas**



CAPÍTULO III

3 SÍNTESE DE DIHIDROQUINOLIN-2-ONAS E INDOLIN-2-ONAS ATRAVÉS DO RADICAL CARBAMOÍLA, EM FLUXO CONTÍNUO E SUA FUNCIONALIZAÇÃO PARA ESPIROIMIDAS

3. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROPOSTA PARA A PREPARAÇÃO DE DIHIDROQUINOLIN-2-ONAS E INDOLIN-2-ONAS

A incorporação de materiais de partida disponíveis a partir de fontes renováveis para a produção de compostos orgânicos mais complexos é uma tendência.³³ Com esse propósito, o ácido itacônico foi escolhido como material de partida para a preparação dos substratos acrílicos apresentados no tópico 2. O ácido itacônico é um ácido dicarboxílico contendo uma dupla ligação α - β insaturada, que é produzido industrialmente através do fungo *Aspergillus terreus*. O ácido itacônico é empregado na indústria de detergentes e xampus, e os seus poliésteres na fabricação de plásticos e adesivos.⁵¹ Devido às suas funcionalidades ele ainda é amplamente estudado para ser aplicado como monômero na síntese de polímeros, e copolímeros para a produção de poliésteres.⁵² Além disso, também existem aplicações do ácido itacônico como bloco de construção renovável para diversos heterociclos, que envolvem as tradicionais reações de adição à derivados carbonílicos e condensações, como mostra o **Esquema 22**.^{53,54,55,56,57}

⁵¹ Okabe, M.; Lies, D.; Kanamasa, S.; Park, E. Y. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 84, 597–606. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2132-3>

⁵² Robert, T.; Friebel, S. Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality, *Green Chem.* **2016**, 18, 2922.

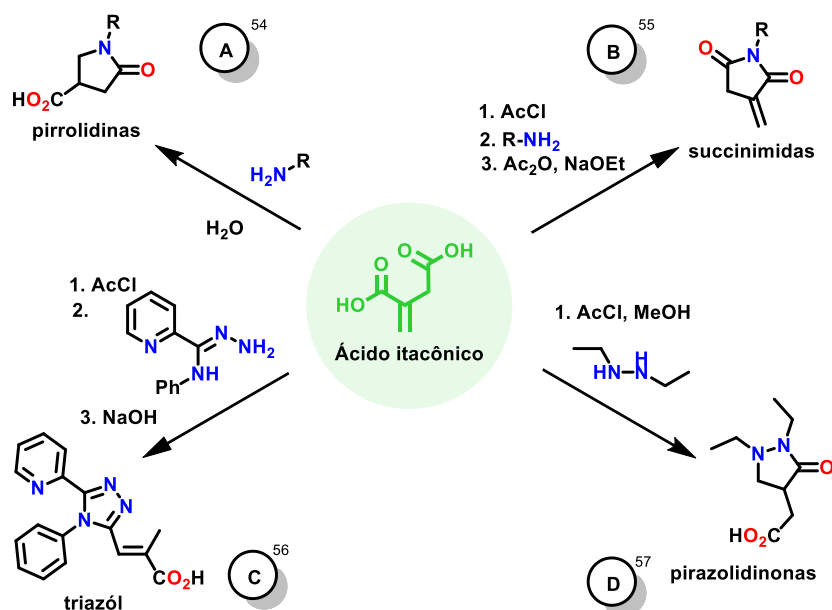
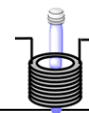
⁵³ Medway, A. M.; Sperry, J. Heterocycle construction using the biomass-derived building block itaconic acid, *Green Chem.* **2014**, 16, 2084–2101.

⁵⁴ Paytash, P. L.; Sparrow, E.; Gathe, J. C. The Reaction of Itaconic Acid with Primary Amines, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 3, 1415–1416.

⁵⁵ Abdel-Naby, A. S. Copolymerization of acrylonitrile with *N*-(substituted phenyl)itaconimide, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2011**, 121, 169–175.

⁵⁶ Banachiewicz, B. M.; Paprocka, R. Mazur, L.; Saczewski, J.; Kutkowska, J.; Stępień, D. K.; Cyrasński, M. Experimental and theoretical study on the reaction of *N*³-phenyl-(pyridin-2-yl)carbohydrazonamide with itaconic anhydride. *Journal of Molecular Structure*, **2012**, 1022, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.04.087>.

⁵⁷ Kornet, M. J. Synthesis of 1,2-Diethyl-4-(2-hydroxyethyl)pyrazolidine, *J. Pharm. Sci.* **1966**, 55, 355–357.



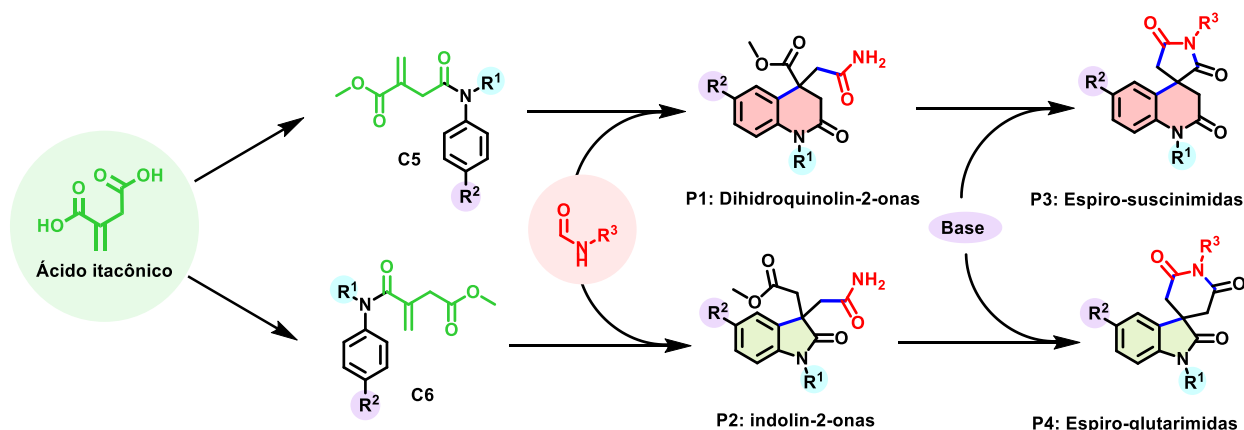
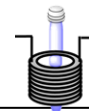
Esquema 22: Transformações do ácido itacônico para produção de heterociclos nitrogenados.

A formamida é considerada um precursor pré-biótico chave para a formação de diversos compostos orgânicos.⁵⁸ Além disso, já foi constatado que a formamida é amplamente distribuída por todo o universo, ela já foi detectada em nuvens moleculares, cometas, meio interestelar e núcleos de protoestrelas.⁵⁹ A formamida também é um bloco de construção que pode ser utilizado para a síntese de diversos heterociclos.

Uma rota foi proposta para empregar o ácido itacônico e seu derivado anídrido, para a preparação de duas classes de substratos. Esses materiais de partida, compostos (C) seriam alvo das reações de adição/ciclização proposta neste trabalho. Nas condições de foto-Fenton em formamida, tais compostos levariam a formação de dois núcleos de importância, as diidroquinolin-2-onas e indolin-2-onas. Os heterociclos preparados, contendo a carboxamida e o grupo éster oriundo do ácido itacônico, levariam a formação do núcleo da espiro-imida, como disposto no **Esquema 23**.

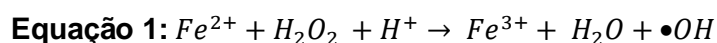
⁵⁸ Saladino, R.; Crestini, C.; Pino, S.; Costanzo, G.; Di Mauro, E. *Phys. Life Rev.* **2012**, 9, 84–104.

⁵⁹ López-Sepulcre, A.; Balucani, N.; Ceccarelli, C.; Codella, C.; Dulieu, F.; Theulé, P. *ACS Earth Space Chem.* **2019**, 3, 2122.

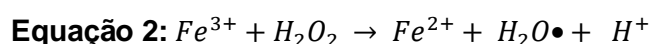


Esquema 23: Rota proposta para a síntese de dihidroquinolin-2-onas e indolin-2-onas a partir de derivados do ácido itacônico e sua transformação em espiro-imidas.

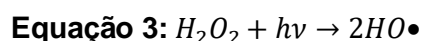
Em nossa estratégia, a formamida é precursora do radical carbamoíla, que é gerado a partir da reação com radicais hidroxilas. O radical hidroxila é gerado no processo Fenton, que é reconhecido como um processo oxidativo avançado (AOP, sigla em inglês), utilizado para o tratamento de resíduos orgânicos.⁶⁰ O processo Fenton envolve a reação de peróxido de hidrogênio com Fe^{2+} em meio ácido. Nessa reação o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} pela ação do peróxido de hidrogênio em meio ácido gerando o radical hidroxila e água, como descrito na **Equação 1**.⁶¹



É conhecido que para a regeneração da espécie de Fe^{2+} no meio, ocorre a reação entre o Fe^{3+} e o peróxido de hidrogênio, regenerando o Fe^{2+} e formando um radical hidroperóxido, como mostra a **Equação 2**.



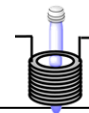
A velocidade da reação de oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} é 6000 vezes mais rápida do que a reação de redução do Fe^{3+} . Isso gera a acumulação de Fe^{3+} e conseqüentemente de óxidos de Fe^{3+} hidratados no meio. Uma forma de se evitar essa formação indesejada é através da utilização de luz durante o processo Fenton. No processo foto-Fenton, a reação de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} é acelerada pela energia proveniente da luz, além disso, a fotólise direta do H_2O_2 , pode ocorrer durante a irradiação por UV, de acordo com a **Equação 3**.⁶²



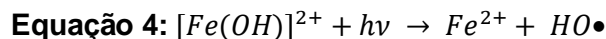
⁶⁰ SharmaJaved, A.; Flora, A. J. S. Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products, *Environ. Res.* **2018**, 223–233.

⁶¹ Zhang, M.-h; Dong, H.; Zhao, L.; Wang, D.-x.; Meng, D. A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective, *Sci. Total Environ.* **2019**, 670, 110–121.

⁶² Babuponnusami, A.; Muthukumar, K. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment, *J. Environ. Chem. Eng.* **2014**, 2, 557–572.



A espécie de Fe^{3+} em pH 2,8-3,5 existe na forma de $[Fe(OH)]^{2+}$, através da irradiação por luz essa espécie sofre redução e regenera o Fe^{2+} do meio, de acordo com a **Equação 4**.



A nossa abordagem utiliza a reação da **Equação 1** para gerar radicais hidroxila diretamente em formamida, e também se utiliza do efeito positivo que a aplicação de luz UV tem no processo Fenton, para promover uma rápida regeneração dos íons Fe (III), de acordo com a equação 4. A formamida na presença dos radicais hidroxila forma o radical carbamoíla, o qual se adiciona aos substratos (fenil)amino-2-metileno-4-oxobutanoatos (C5) e (fenil)carbamoil)3-butenoatos (C6).

O fluxo contínuo foi considerado para o desenvolvimento desta metodologia, pois agrega diversas características interessantes ao processo. A primeira delas é a segurança associada às reações realizadas em microcanais, visto que a troca de calor é bastante eficiente, além disso, como a reação é constantemente fluída ao longo dos canais do reator, o acúmulo de intermediários reativos é evitado.⁶³ Outra vantagem que pode ser atribuída à utilização de reatores em fluxo é a eficiência. Reações realizadas em fluxo são frequentemente mais rápidas do que as realizadas em batelada, o que proporciona um melhor uso da energia e do tempo.⁶³

As reações fotoquímicas são muito beneficiadas pela utilização de sistemas em fluxo contínuo, visto que a estrutura dos microcanais aumenta a eficiência da irradiação da mistura reacional. Quando uma reação que envolve luz é desenvolvida em batelada o seu escalonamento é difícil, visto que a penetração da luz na solução é limitada pela absorção das espécies, e assim a penetração da luz decai com a distância da lâmpada. Desse modo, em um sistema composto por uma solução em um frasco irradiada por uma lâmpada, as espécies no seio da solução estarão “blindadas” pelas espécies próximas à parede do frasco, e este efeito será amplificado de acordo com o aumento da concentração da solução (Figura 3, A).⁶⁴

As reações fotoquímicas quando realizadas em fluxo contínuo permitem que pequenas quantidades da solução da reação fiquem em contato com a fonte de luz ao longo do tempo, isso leva a uma irradiação uniforme de toda a mistura, a medida que ela é fluída. O tempo de exposição à luz é precisamente controlado pela velocidade do fluxo e volume do reator, isso pode evitar tanto a irradiação ineficiente da mistura quanto, a irradiação exagerada. Como os tubos utilizados para fluir as soluções podem ser microcanais, por exemplo, tubos com diâmetros internos de 0,1 mm, soluções de alta concentração podem ser empregadas (Figura 3, B). Além disso, um sistema em fluxo contínuo é independente da escala, pois um reator pode ser utilizado

⁶³ Sambiagio, C.; Noël, T. Flow Photochemistry: Shine Some Light on Those Tubes! *Trends Chem.* **2020**, *2*, 92–106

⁶⁴ Newman, S. G.; Jensen, K. F. The role of flow in green chemistry and engineering, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1456–1472.



para sintetizar desde alguns miligramas a quilogramas em um único dia., variando-se apenas o tempo de operação ⁶⁵

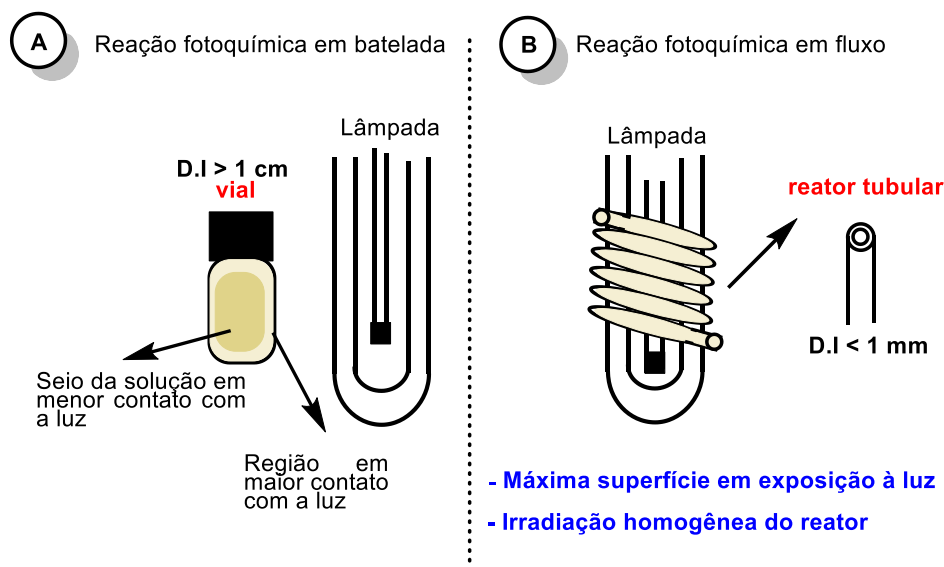


Figura 3: Característica de uma reação fotoquímica em batelada e em fluxo.

3. 2. REVISÃO DA LITERATURA

3. 2. 1. Atividades biológicas e Metodologias radiculares para a síntese de dihidroquinolinonas

O núcleo de 3,4-dihidroquinolin-2(1*H*)-ona é um sistema bicíclico de uma δ -lactama fundida a um anel benzênico (2, Figura 4). Tal núcleo apresenta algumas atividades biológicas associadas, e também alguns fármacos aprovados para uso, contém o núcleo **2** em sua estrutura. ⁶⁶ Existem certos produtos naturais que possuem a 3,4-dihidroquinolin-2(1*H*)-ona em sua estrutura. Dentre eles pode-se destacar a trigolutesina A (3, Figura 4) que é um alcaloide bis-indólico isolado de *Trigonostemon lutescens*, uma espécie de arbustos nativa de regiões da Ásia subtropical. ⁶⁷ O cilostazol (4, Figura 4) é um medicamento aprovado pela FDA (do inglês, food and drug administration) e utilizado para combater dores nas pernas em pessoas com doença cardiovascular periférica. Já o carteolol (4, Figura 4) é outro medicamento aprovado para o tratamento do glaucoma. ⁶⁶

⁶⁵ Knowles, J. P.; Elliott, L. D.; Booker-Milburn, K. I. Flow photochemistry: Old light through new windows, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 2025–2052.

⁶⁶ Meiring, L.; Petzer, J. P.; Petzer, A. A Review of the Pharmacological Properties of 3,4-Dihydro-2(1*H*)-quinolinones, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2018**, 18, 828–836

⁶⁷ Ma, S.-S.; Mei, W.-L.; Guo, Z.-K.; Liu, S.-B.; Zhao, Y.-X.; Yang, D.-L.; Zeng, Y.-B.; Jiang, B.; Dai, H.-F. Two New Types of Bisindole Alkaloid from *Trigonostemon lutescens*, *Org. Lett.* **2013**, 15, 1492–1495.

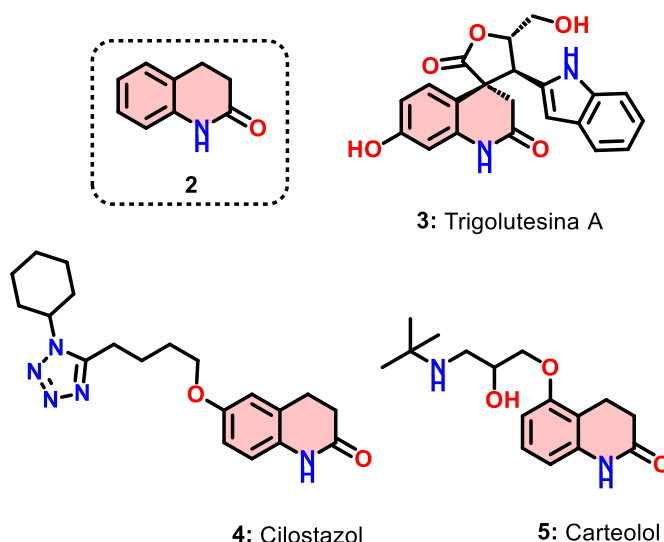


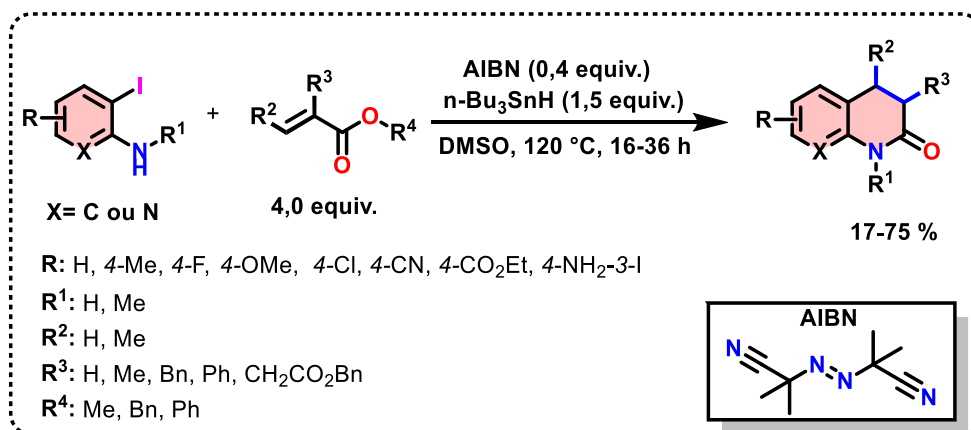
Figura 4: Estrutura química da dihidroquinolinona, Trigolutesina A, Cilostazol e Carteolol.

Devido a sua distribuição como produto natural, e também as atividades biológicas associadas às dihidroquinolin-2-onas, diversas metodologias sintéticas tem sido dedicadas para a síntese desse núcleo.⁶⁸ O repertório de estratégias sintéticas para a síntese de dihidroquinolin-2-onas abordadas nesta tese será restrito às metodologias radiculares.

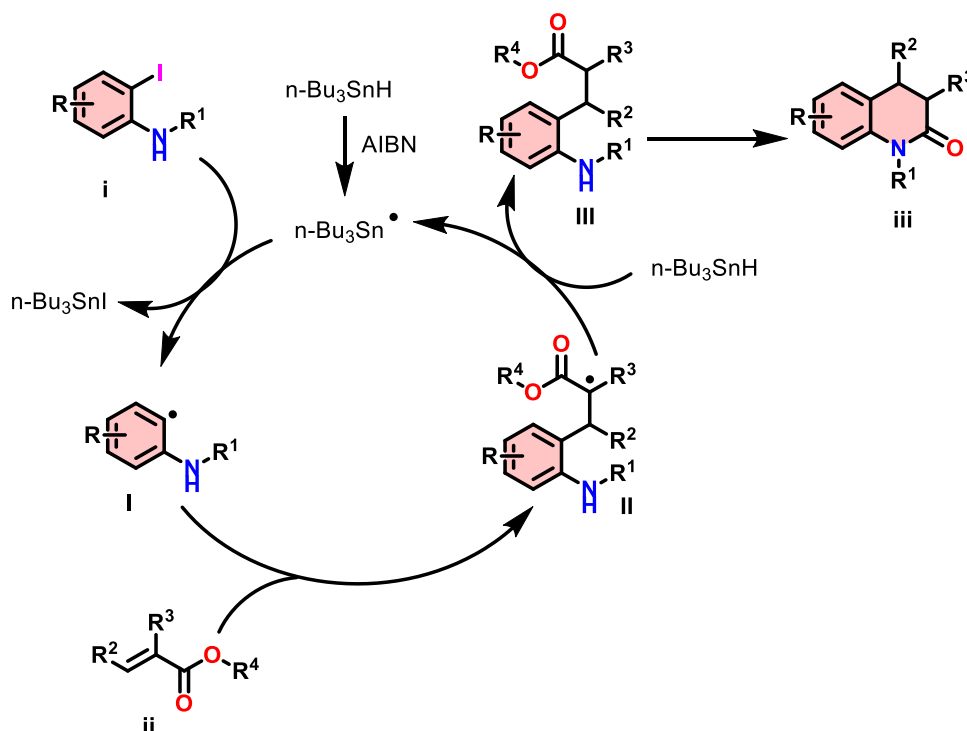
Zhou e colaboradores em 2009 publicou uma metodologia que utilizava 2-iodoanilinas e acrilatos para a construção da dihidroquinolinona.⁶⁹ As 2-iodoanilinas substituídas, reagem com os respectivos acrilatos na presença de AIBN e $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$, a reação era realizada em DMSO a 120°C em tempos de reação que variavam de 16 a 36 horas (Esquema 24). A metodologia é compatível com diversos grupos substituídos no anel aromático da 2-iodoanilina, e também diferentes grupos ligados ao acrilato. A reação fornecia as 3,4-dihidroquinolin-2-onas em rendimentos de moderados a altos.

⁶⁸ Muthukrishnan, I.; Sridharan, V.; Menendez, J. C. Progress in the Chemistry of Tetrahydroquinolines, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 5057–5191.

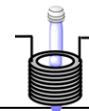
⁶⁹ Zhou, W.; Zhang, L.; Jiao, N. The tandem reaction combining radical and ionic processes: an efficient approach to substituted 3,4-dihydroquinolin-2-ones, *Tetrahedron*, **2009**, *19*, 8265–1987.



Segundo os autores o mecanismo da reação envolve um processo radicalar de alquilação da 2-iodoanilina (i) seguido da reação intramolecular da amina aromática com a porção éster derivada do acrilato. Como é possível observar no **Esquema 25** a primeira etapa é o ataque do radical n-Bu₃Sn• à 2-iodoanilina (i), a abstração do iodo leva a geração do intermediário radical I, em seguida I se adiciona à dupla ligação do acrilato (ii) levando à formação do intermediário radicalar II, por fim, a terminação ocorre através da reação com o hidreto de tributilestanho pela redução do radical II. O próximo intermediário proposto é o III, que por sua vez reage em uma ciclização intramolecular entre a amina aromática e a porção éster para levar a formação da dihidroquinolinona **iii**.

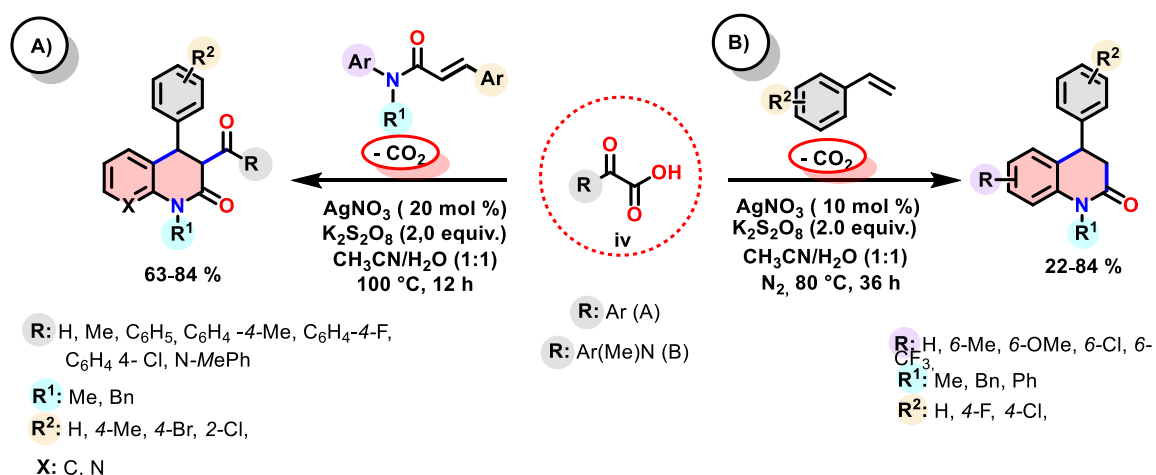


Esquema 25: Mecanismo de reação proposto para a formação das dihidroquinolinonas proposto por Zhou e colaboradores.



A preparação da dihidroquinolin-2-ona pode ser realizada através da utilização de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) como oxidante. Em uma das abordagens envolvendo esse oxidante foram utilizados *N*-metil-*N*-fenilcinamidas e ácidos 2-oxo-2-fenilacéticos (iv) em uma mistura de ACN e água (1:1) a 100°C por 12 horas (Esquema 26, A). O $AgNO_3$ era empregado como catalisador e $K_2S_2O_8$ como oxidante, para produção de 3-Acil-4-arildihidroquinolin-2(1*H*)-onas em rendimentos elevados.⁷⁰

Em outra abordagem, mais recente, ácidos *N*-metil-*N*-feniloxamicos e estirenos na presença de $K_2S_2O_8$ e $AgNO_3$ catalítico, foram empregados para a síntese de dihidroquinolinonas em uma reação de 36 horas, a uma temperatura de 80°C . Como é possível notar no **Esquema 26, B** a metodologia forneceu diversos exemplos de dihidroquinolin-2-onas substituídas em rendimentos baixos a elevados.⁷¹ Ambas metodologias do **Esquema 26** se baseiam em uma primeira etapa de oxidação da Ag(I) para Ag(II) o qual abstrai um elétron do precursor radicalar (iv), para formar um radical carboxila, que sofrerá descarboxilação levando a radicais carbamoíla (A) ou acila (B), os quais vão se adicionar aos respectivos alcenos.

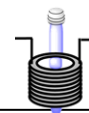


Esquema 26: Abordagens sintéticas para dihidroquinolin-2-onas envolvendo a utilização de $K_2S_2O_8$ como oxidante.

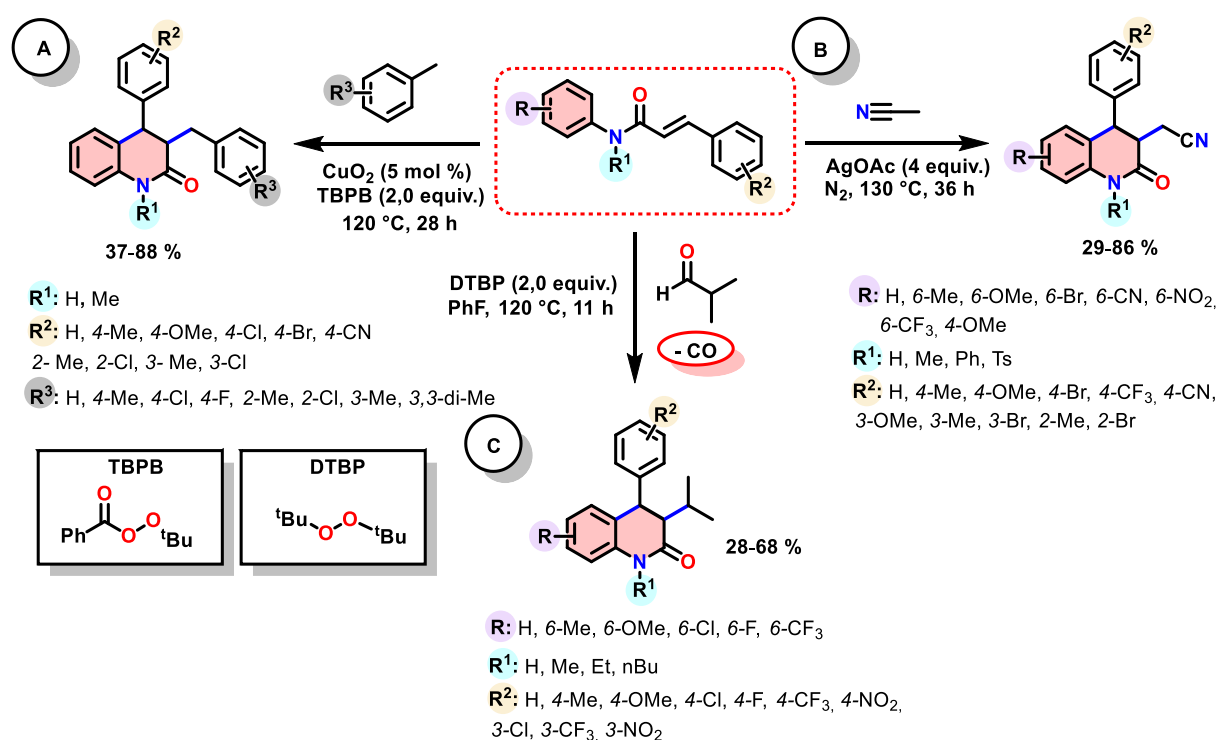
Em outra abordagem para a preparação de dihidroquinolinonas (Esquema 27, A), foram utilizadas *N*-arilcinamidas e radicais benzila. O TBPB foi utilizado como oxidante e Cu_2O foi empregado em quantidades catalíticas. Diversos hidrocarbonetos benzílicos foram avaliados como fonte de radicais e as dihidroquinolinonas foram isoladas em rendimentos de baixos a elevados, os autores relataram que a reação foi seletiva com formação de apenas um dos

⁷⁰ Mai, W.-P.; Sun, G.-C.; Wang, J.-T.; Song, G.; Mao, P.; Yang, L.-R.; Yuan, J.-W.; Xiao, Y.-M.; Qu, L.-B. Silver-Catalyzed Radical Tandem Cyclization: An Approach to Direct Synthesis of 3-Acyl-4-arylquinolin-2(1H)-ones, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8094–8102. <https://doi.org/10.1021/jo501301t>

⁷¹ Jin, C.; He, J.-Y.; Bai, Q.-F.; Feng, G. Silver-Catalyzed Decarboxylative Radical Addition/Cyclization of Oxamic Acids with Alkenes towards Quinolin-2-ones, *Synlett*, **2020**, 31, A-F. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1707891>.



estereoisômeros.⁷² A acetonitrila também foi empregada para gerar radicais que se adicionavam a *N*-arilcinamidas, nesta metodologia o oxidante AgOAc foi empregado em excesso, foram necessárias 36 horas a uma temperatura de 120°C em atmosfera de nitrogênio para fornecer as dihidroquinolinonas em rendimentos de moderados a elevados, como mostrado no **Esquema 27, B**, nessa abordagem foram recuperadas misturas dos respectivos isômeros.⁷³ Também foi desenvolvida uma metodologia livre de metais na qual o precursor radicalar foi o isobutiraldeído, diversos oxidantes foram avaliados e o DTBP foi utilizado. A reação era conduzida por 11 horas a 120°C, e forneceu as dihidroquinolinonas em rendimentos moderados, com formação apenas do isômero *trans* (Esquema 27, **C**).⁷⁴



Esquema 27: Metodologias de síntese de dihidroquinolinonas a partir de *N*-alquil-*N*-fenilcinamidas.

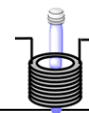
3. 2. 2. Atividades biológicas e metodologias radiculares para a síntese de indolin-2-onas

O núcleo de oxindol (6, Figura 5) pode ser considerado o indól oxidado na posição 2. Ele é amplamente encontrado na natureza, pode ser encontrado em tecidos e fluídos de mamíferos e também é produzido por plantas, bactérias e invertebrados. Diversas atividades biológicas foram

⁷² Zhou, S.-L.; Guo, L.-N.; Wang, S.; Duan, X.-H. Copper-catalyzed tandem oxidative cyclization of cinnamamides with benzyl hydrocarbons through cross-dehydrogenative coupling, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 3589–3591. <https://doi.org/10.1039/C4CC00637B>

⁷³ Wang, K.; Chen, X.; Yuan, M.; Yao, M.; Zhu, H.; Xue, Y.; Luo, Z.; Zhang, Y. Silver-Mediated Cyanomethylation of Cinnamamides by Direct C(sp³)-H Functionalization of Acetonitrile, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 1525–1531. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02585>

⁷⁴ Xu, X.; Luo, Z.; Liu, C.-F.; Wang, X.; Deng, L.; Gao, J. Metal-Free Synthesis of 3,4-Dihydroquinolin-2(1H)-Ones via Cascade Oxidative Decarbonylative Radical Alkylation/Cyclization of Cinnamamides with Aliphatic Aldehydes, *Asian J. Org. Chem.* **2019**, 8, 1903–1906. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201900424>.



descritas para compostos contendo o núcleo oxindólico, como: antitumorais, antioxidantes, antibacterianas, analgésicas, etc.⁷⁵ Um estudo publicado em 2000 mostrou que o mais simples oxindól existente em fluídos de mamíferos, como o 5-hidroxi oxindol (7) apresenta atividade inibidora da proliferação de células de HL60 (Leucemia humana) *in vitro* além de causar a apoptose das mesmas.⁷⁶ Dentre os produtos naturais contendo o núcleo **6**, pode-se destacar a horsifilina (8) um composto espiro isolado da espécie *Horsfieldia superba*, em 1991.⁷⁷

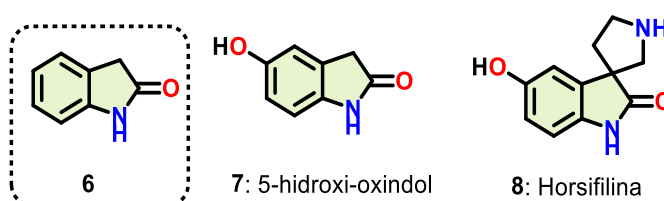


Figura 5: Estruturas químicas do oxindól e oxindóis de ocorrência natural.

Dentre os oxindóis que apresentam atividades biológicas pode-se destacar a classe dos 3-alquenil oxindóis. Entre os 3- alquenil oxindóis, um exemplo de significativa importância é o composto **9**, **Figura 6** conhecido como sunitinib o mesmo é vendido como Sutent®, um medicamento, utilizado para o tratamento de carcinoma avançado de células renais e tumores gastrointestinais.⁷⁸ Dentre os oxindóis substituídos no anel aromático o ropinirol (10, **Figura 6**) é um medicamento, que foi desenvolvido em 1996 e é utilizado para o tratamento da doença de Parkinson e a síndrome das pernas inquietas. Ele se comporta como um agonista do receptor da dopamina.⁷⁹

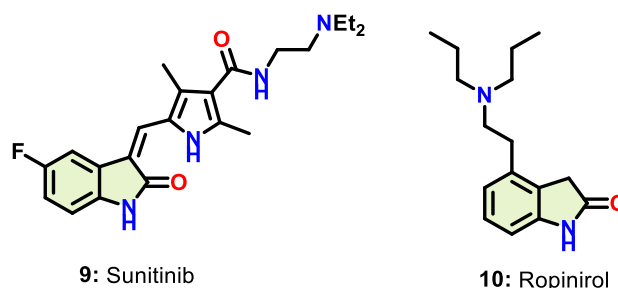


Figura 6: Estruturas químicas do Sunitinib e do Ropinirol.

Devido ao grande número de metodologias para a preparação de oxindóis, as metodologias incluídas nessa revisão sobre obtenção de oxindóis, se baseiam na utilização de *N*-metil-*N*-

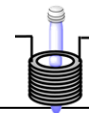
⁷⁵ Kaur, M.; Singh, M.; Chadha, N.; Silakari, O. Oxindole: A chemical prism carrying plethora of therapeutic benefits. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 123, 858–894. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.011>.

⁷⁶ Cane, A.; Tournaire, M.-C.; Barritault, D.; -Arias, M. C. The Endogenous Oxindoles 5-Hydroxyoxindole and Isatin Are Antiproliferative and Proapoptotic, *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **2000**, 276, 379–384. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3477>

⁷⁷ Jossang, A.; Jossang, P.; Hadi, H.A.; Sévenet, T.; Bodo, B. Horsifiline, an Oxindole Alkaloid from *Horsfieldia superba*, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6527–6530. <https://doi.org/10.1021/jo00023a016>

⁷⁸ <http://www.in-pharmatechnologist.com/Industry-Drivers/Pfizer-abandons-Ph-III-Sutent-colon-cancer-study>

⁷⁹ De Mey, C.; Haran, N. S. **1992**, Ropinirole and domperidone for use in the manufacture of a medicament for the treatment of parkinson's disease, WO9200735A1. <https://patents.google.com/patent/WO1992000735A1/en>



fenilmetacrilamidas e no emprego de agentes oxidantes para a geração de radicais centrados no carbono.

Em 2013, Zhou e colaboradores utilizaram *N*-metil-*N*-fenilmetacrilamidas na presença de tolueno como fonte de radicais benzila, a partir de Cu₂O catalítico e TBPB.⁸⁰ A reação ocorria a 120°C durante 28 horas, **Esquema 28, A**. Diversos grupos substituídos no anel da acrilamida foram verificados e o maior rendimento foi obtido para o grupo metila substituído na posição 2 da acrilamida. Quando os substituintes foram variados no anel do tolueno ficou evidente que grupos doadores de elétrons como a metila forneceram os maiores rendimentos, enquanto que grupos retiradores de elétrons como a nitrila, forneceram baixos rendimentos.

No mesmo ano Wang e colaboradores mostraram a acilarilação de acrilamidas utilizando-se de ácidos α-oxocarboxílicos, catalisada por prata em água.⁸¹ Como é possível observar no **Esquema 28, B**. A reação era realizada a 50°C durante 24 horas em atmosfera de nitrogênio. O oxidante utilizado foi persulfato de potássio e o sal de prata empregado foi AgNO₃. Foram variados diversos substituintes no anel do ácido fenilglioixílico, sendo que nenhuma variação significativa nos rendimentos foi observada. Porém quando utilizados os respectivos ácidos α-oxocarboxílicos derivados do naftaleno, o ácido furil-formico e o ácido 2-tiofenil-glioixílico menores rendimentos foram observados. Quanto à substituição no anel aromático da acrilamida tanto grupos retiradores ou doadores de elétrons forneceram rendimentos comparáveis. Wang e colaboradores também utilizaram compostos 1,3 dicarbonílicos como fonte de radicais para ciclização com as acrilamidas, a 2,4-pentanediona foi empregada como composto modelo para a exploração da reação, AgNO₃ catalítico e K₂S₂O₈ foi utilizado como oxidante. A reação era realizada em água a 50°C durante 24 horas. A variação dos substituintes no anel da acrilamida na posição 4, não resultou em variações significativas no rendimento, quando grupos mais volumosos foram substituídos na dupla ligação o rendimento isolado diminuiu.⁸²

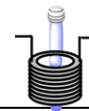
Em 2015, Zhou e colaboradores realizaram a síntese de ciano oxindóis a partir da arilação de acrilamidas catalisada por cobre na presença de AIBN.⁸³ Como mostra o **Esquema 28, C** o AIBN foi utilizado como fonte de radicais para adição na respectiva acrilamida, o iodeto de cobre (I) (CuI) foi utilizado de forma catalítica, e DTBP como oxidante, a reação era realizada em

⁸⁰ Zhou, S.-L.; Guo, L.-N.; Wang, H.; Duan, X.-H. Copper-Catalyzed Oxidative Benzylarylation of Acrylamides by Benzylic CH Bond Functionalization for the Synthesis of Oxindoles, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12970–12973. <https://doi.org/10.1002/chem.201302139>

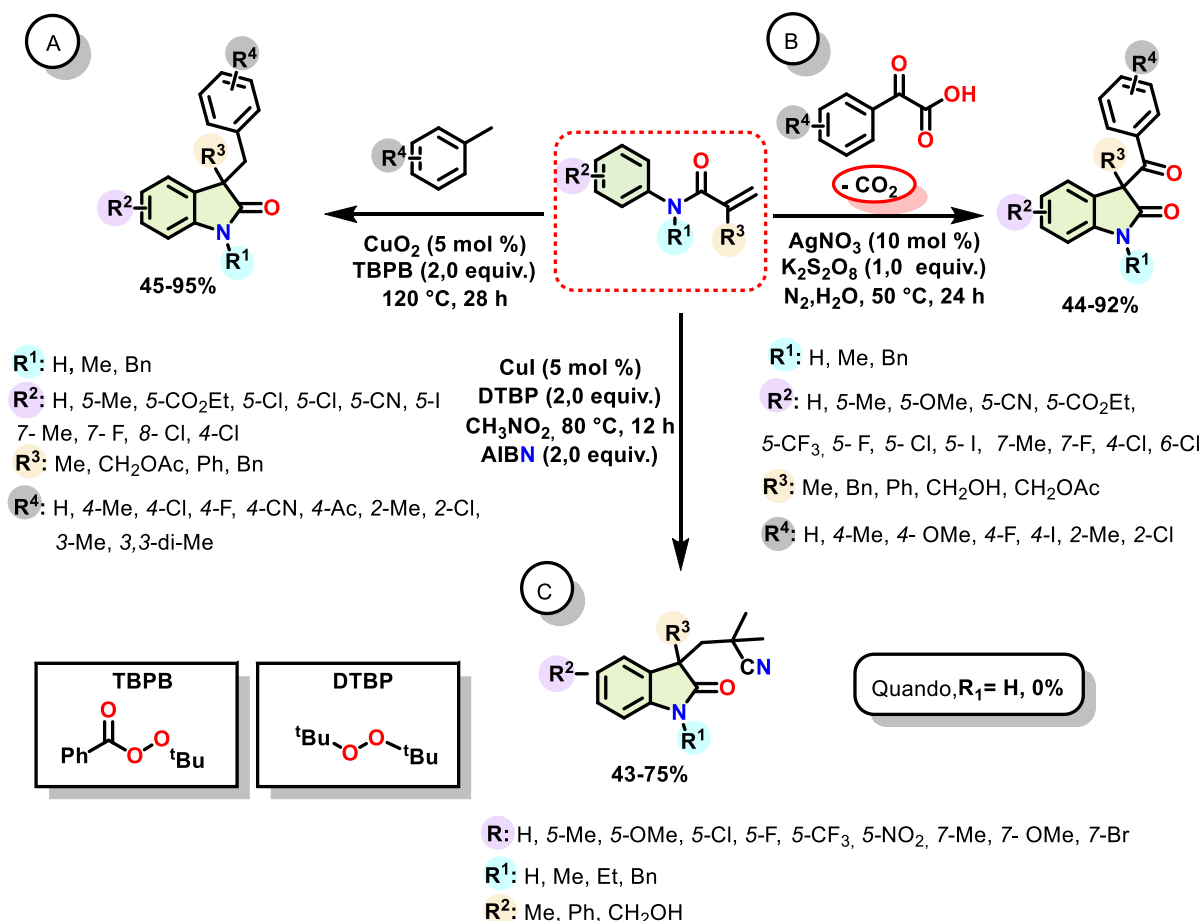
⁸¹ Wang, H.; Guo, L.-N.; Duan, X.-H. Silver-Catalyzed Decarboxylative Acylarylation of Acrylamides with α-Oxocarboxylic Acids in Aqueous Media, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 2222–2226. <https://doi.org/10.1002/adsc.201300468>

⁸² Wang, H.; Guo, L.-N.; Duan, X.-H. Silver-catalyzed oxidative coupling/cyclization of acrylamides with 1,3-dicarbonyl compounds, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10370–10372. <https://doi.org/10.1039/C3CC46114A>

⁸³ Zhou, D.; Li, Z.-H.; Li, J.; Li, S.-H.; Wang, M.-W.; Luo, X.-L.; Ding, G.-L.; Sheng, R.-L.; Fu, M.-J.; Tang, S. Copper-Catalysed Alkylarylation of Activated Alkenes Using AIBN and Beyond: An Access to Cyano-Containing Oxindoles, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 1606–1612



nitrometano a 80°C por 12 horas. Ao avaliar a substituição no anel aromático da acrilamida, a presença de um grupo doador de elétrons como a metoxila forneceu um rendimento maior do que o composto sem substituição, enquanto que, a presença de um grupo fortemente retirador de elétrons como CF₃ levou a uma diminuição significativa no rendimento isolado do respectivo oxindol. De maneira geral os oxindóis foram obtidos em rendimentos de moderados a elevados.



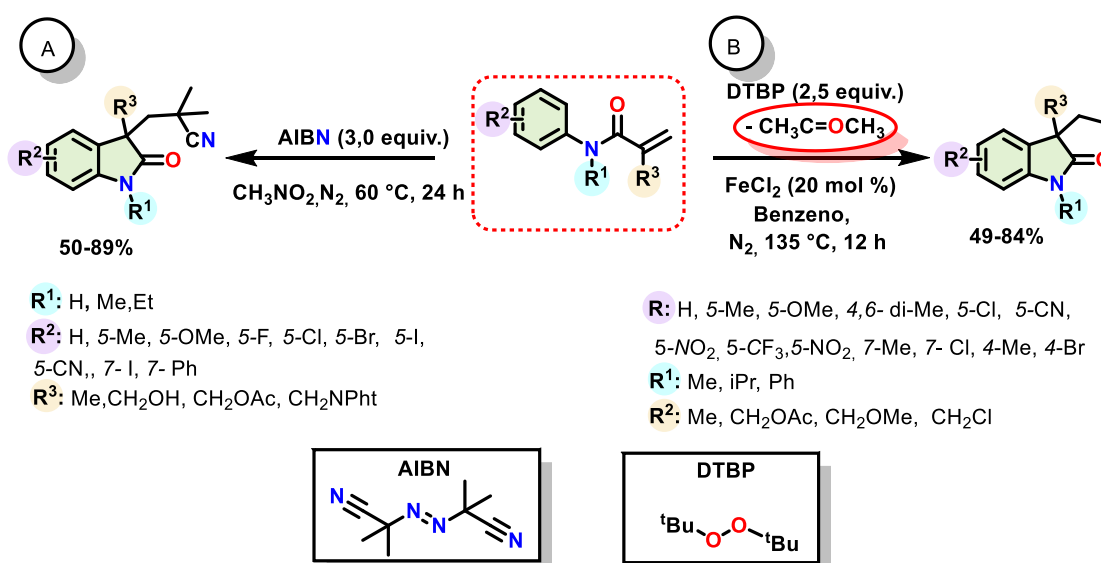
Esquema 28: Metodologias radiculares par a síntese de oxindóis.

Ainda em 2015, Zhang e colaboradores propuseram a cianoisopropilação de acrilamidas livre de metais, **Esquema 29, A**.⁸⁴ Nesse caso, ciano-oxindóis foram sintetizados a partir de AIBN como fonte de radicais, o solvente utilizado foi nitrometano, a reação era conduzida a 60°C em atmosfera de nitrogênio durante 24 horas. Com essa abordagem os oxindóis foram obtidos em rendimentos de moderados a elevados. Quando a acrilamida foi substituída no anel aromático com substituintes doadores de elétrons, como 4-Me e 4-OMe o rendimento se manteve comparável ao rendimento do composto sem substituintes, por outro lado, a utilização de halogênios substituídos na posição 4 do anel gerou uma diminuição no rendimento isolado, assim como a utilização de grupos retiradores de elétrons como o grupo 4-CN.

⁸⁴ Zhang, M.; Sheng, W.; Ji, P.; Liu, Y.; Guo, C. Metal-free direct cianoisopropylation/arylation of N-arylacrylamides or N-alkyl-N-(arylsulfonyl)acrylamides with AIBN: a simple and mild approach to cyano-containing oxindoles, *RSC Adv.* **2015**, 56438–56443. <https://doi.org/10.1039/C5RA10084D>.

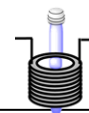


Outra estratégia foi proposta por Dai e colaboradores para a preparação de oxindóis, nela as aril-acrilamidas sofriram uma carbometilação, catalisada por Fe (II) na presença de DTBP, o peróxido era utilizado como a fonte de radicais metilas, como descrito no **Esquema 29, B**.⁸⁵ O sal de ferro utilizado foi cloreto de ferro (II), a reação era realizada em benzeno, em atmosfera de nitrogênio a 130°C durante 12 horas. Os rendimentos obtidos foram na faixa de moderados a elevados, quando a acrilamida era substituída com grupo retirador de elétrons como o 4-CN o maior rendimento foi obtido (84%), já o menor rendimento obtido foi para o derivado contendo a substituição 4,6- di-Me. O mecanismo proposto da reação envolve a formação do radical terc-butoxi a partir da oxidação de Fe(II) a Fe(III) pelo DTBP, seguida da perda de uma molécula de propanona, formando assim o radical metila, que é inserido na dupla ligação da acrilamida.



Esquema 29: Metodologias radicalares para a preparação de oxindóis propostas por Zhang e Dai.

⁸⁵ Dai, Q.; Yu, J.; Jiang, Y.; Guo, S. S.; Yanga, H.; Cheng, J. The carbomethylation of arylacrylamides leading to 3-ethyl-3-substituted indolin-2-one by cascade radical addition/cyclization. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 3865–3867. <https://doi.org/10.1039/C4CC01053A>



3. 2. 3. *Atividades biológicas espiromidas e metodologias para síntese de espiromidas*

Os primeiros relatos da utilização de espiromidas na literatura datam da década de 70 e envolviam a sua utilização como intermediários sintéticos para a preparação de azaspiranos,⁸⁶ visto que na época os azaspiranos eram estudados por apresentarem atividades anti-inflamatória e anticancerígena.⁸⁷ Durante o desenvolvimento de rotas para a preparação desses compostos, as atividades das imidas intermediárias também foram testadas e foi verificada a atuação das espiromidas no sistema nervoso central. Efeitos convulsivantes foram encontrados para algumas doses das imidas.⁸⁸ Mais tarde, em outros estudos com espiromidas foram descobertos efeitos anticonvulsivantes^{89,90,91,92} e antipsicóticos.⁹³

Durante esse tempo, também foram relatadas diversas outras atividades biológicas por uma série de publicações e patentes envolvendo novas classes de espiromidas (11, Figura 7). Como por exemplo, potente efeito tranquilizante⁹⁴ e até mesmo o depósito de uma patente do medicamento atualmente conhecido como Buspirona, que em 1979 foi considerado eficaz para a atuação como ansiolítico, em estudos clínicos comparativos com o diazepam.⁹⁵ Até que no ano de 1980, foi patenteado o seu uso como ansiolítico.⁹⁶ Já em 1986, a Buspirona (12) era vendida

⁸⁶ Grogan, C. H.; Geschickter, C.F.; Freed, M. E.; Rice, L. M. Spirans. VII. Neuroleptics derived from azaspirans, *J. Med. Chem.* **1965**, 8, 62–73 <https://doi.org/10.1021/jm00325a015>.

⁸⁷ Rice, L. M.; Geschickter, C. K.; Grogan, C. H. Spiranes. III. Azaspiranes and Intermediates. *J. Med. Chem.* **1963**, 6, 388–402. <https://doi.org/10.1021/jm00340a012>.

⁸⁸ Grogan, C. H.; Geschickter, C. F. **1966**, *Spiromides*, US3236862, 3,236,862. <https://patents.google.com/patent/US4812567A/en>

⁸⁹ Tarver, M.L.; Nicholson, J. M.; Scott, K. R. Spirosuccinimides as Potential Anticonvulsants, *J. Pharm. Sci.* **1985**, 74, 785–787. <https://doi.org/10.1002/jps.2600740721>

⁹⁰ Edafiogho, I.; Scott, K. R.; Moore, J. A.; Farrar, V. A.; Nicholson, J. M. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Imidoxy Derivatives, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 387–392. <https://doi.org/10.1021/jm00105a059>

⁹¹ Alexander, M. S.; Stables, J. P.; Ciechanowicz-Rutkowska, M.; Hursthouse, M. B.; Hibbs, D. E.; Edafiogho, I. O.; Farrar, V. A.; Moore, J. A.; Scott, K. R. Spiranes 6. Ring A homologues of *N*-benzyloxy-2-azaspiro[4.4]nonane-1,3-dione. Synthesis, X-ray analysis and anticonvulsant evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, 31, 787–795. [https://doi.org/10.1016/0223-5234\(96\)83972-9](https://doi.org/10.1016/0223-5234(96)83972-9)

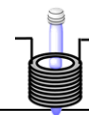
⁹² Obniska, J.; Byrtus, H.; Kaminski, K.; Pawłowski, M.; Szczesio, M.; Karolak-Wojciechowska, J. Design, synthesis, and anticonvulsant activity of new *N*-Mannich bases derived from spirosuccinimides and spirohydantoin. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6134–6142. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.064>

⁹³ Abou-Gharbia, M. A. **1989**, Polycyclic spiroimides with psychotropic activity, US4812567A, 4,812,567, <https://patents.google.com/patent/US4812567A/en>.

⁹⁴ Wu, Y. H.; Rayburn, J. W. **1975**, *N*-(4-pyridyl-piperazino)-alkyl azaspiroalkanedones, US3907801A, 3,907,801. <https://patents.google.com/patent/US3907801A/en>

⁹⁵ Harold, L.; Golberg, M.D.; Finerty, R. J. The Comparative Efficacy of Buspirone and Diazepam in the Treatment of Anxiety, *Am. J. Psychiatry*, **1979**, 136, 1184–1186. <https://doi.org/10.1176/ajp.136.9.1184>.

⁹⁶ Casten, G. P.; McKinney, G. R.; Newton, R. E.; Tompkins, E. C.; Weikel, J. H. Buspirone anti-anxiety method, **1980**, US4182763A, 4,182,763. <https://patents.google.com/patent/US4182763A/en>



como BuSpar, um medicamento aprovado pela FDA para o tratamento da desordem de ansiedade generalizada.⁹⁷

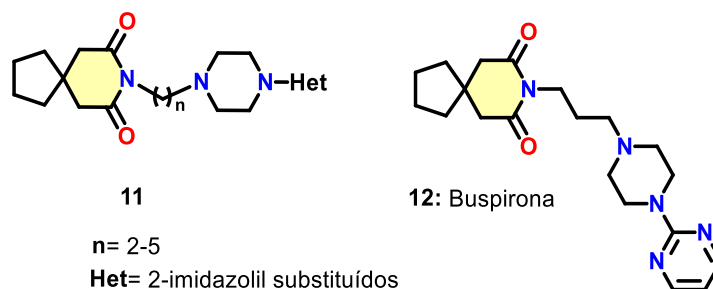


Figura 7: Estrutura geral de algumas azaspiroindolonas sintetizadas por Wu e colaboradores e estrutura da Bupirone.

Durante a década de 80 uma série de estudos *in vivo* com espiroimidazóis levou a descoberta de atividade antialérgica e antiarrítmica,^{98,99} porém a grande maioria dos compostos apresentava citotoxicidade elevada. Mais tarde, começaram a surgir estudos e patentes relacionando o efeito de certas espiroimidazóis (13, Figura 8) na diminuição dos níveis de sorbitol no corpo e sua possível aplicação para o tratamento de complicações da diabetes, através da inibição da enzima aldose redutase.¹⁰⁰ Investindo na atividade inibitória da enzima aldose redutase promovida pelas espiroimidazóis, estudos de SAR (do inglês Structure-Activity Relationship) foram realizados com uma série de espirosuccinimidazóis e elas foram responsáveis pela diminuição dos níveis de glicose no plasma, a mais potente delas foi o composto (+) **14**, **Figura 8**, que foi obtido após a resolução por recristalização diastereomérica.¹⁰¹

A busca de novos candidatos para o tratamento de complicações tardias da diabetes, através de espiroimidazóis continuou. Nessa época, o Imirestat já não era mais empregado em testes clínicos devido à toxicidade. Desse modo, novas espiroimidazóis baseadas no esqueleto de isoquinolinadionas substituídas foram preparadas a fim de verificar a eficácia dessa nova série.¹⁰²

⁹⁷ Howland, R. H. Bupirone: Back to the Future, *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.*, **2015**, 53, 21–24. <https://doi.org/10.3928/02793695-20151022-01>

⁹⁸ Abou-Gharbia, M. A.; Su, T. T.; Joulli, M. M. Synthesis of Spirofluorenes of Biological Interest, *J. Pharm. Sci.* **1978**, 67, 953–956. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670721>.

⁹⁹ Tentorey, P. A.; Ronfeld, R. A.; Feldman, H. S. New Antiarrhythmic Agents. 4. 1'-(Aminoalkyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-1-spiro-3'-pyrrolidine 2', 5'-dione Derivatives. *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 47–53. <https://doi.org/10.1021/jm00133a011>.

¹⁰⁰ Belletire, J. L.; Sarges, R. **1981**, Method for lowering sorbitol levels using spiro-mides, US4307108, 4,307,108, <https://patents.google.com/patent/US4307108>

¹⁰¹ Wrobel, J.; Dietrich, A.; Woolson, S. A.; Millen, J.; McCaleb, M.; Harrison, M.C.; Hohman, T. C.; Sredy, J.; Sullivan, D. Novel Spirosuccinimides with Incorporated Isoindolone and Benzisothiazole 1,1-Dioxide Moieties as Aldose Reductase Inhibitors and Antihyperglycemic Agents, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4613–4627. <https://doi.org/10.1021/jm00102a016>.

¹⁰² Malamas, M.S.; Hohman, J. T. C.; Millen, J. Novel spirosuccinimide aldose reductase inhibitors derived from isoquinoline-1,3-diones: 2-[(4-bromo-2-fluorophenyl)methyl]-6-fluorospiro[isoquinoline-4(1H),3'-pyrrolidine]-1,2',3,5'(2H)-tetrone and congeners. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2043–2058. <https://doi.org/10.1021/jm00039a017>



A estrutura **15**, **Figura 8** é do candidato clínico proposto, após estudos de inibição da aldose redutase e de lipofilicidade.

Mais recentemente, pesquisadores com o objetivo era melhorar a estabilidade metabólica de alguns inibidores da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC), sintetizaram uma nova classe de spiro-piperidinas como inibidores da AAC. Nesse caso eles identificaram que a espiroimida (**16**, **Figura 8**) contendo uma porção tieno[2,3-b]piridina mostrou potente atividade inibidora de ACC e estabilidade metabólica favorável em humanos.¹⁰³

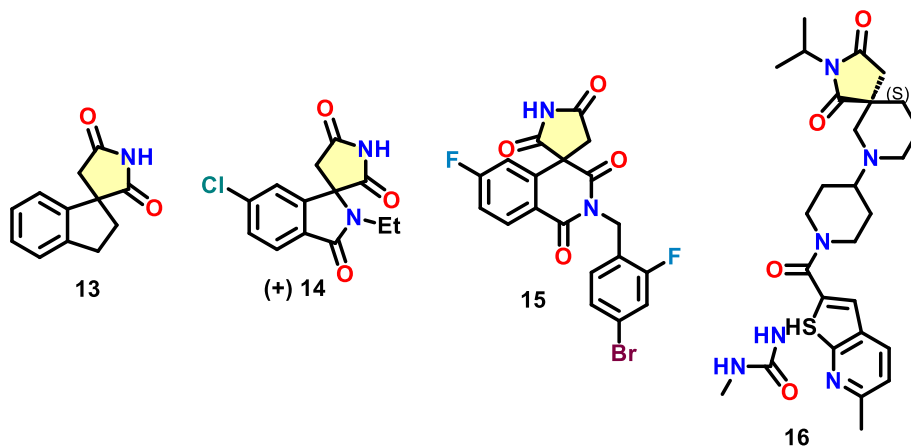


Figura 8: Estrutura geral das espiroimidias sintetizadas que inibiam a enzima aldose redutase.

Quanto aos produtos naturais contendo o núcleo de espiroimida, pouquíssimos exemplares são encontrados na literatura. No ano de 1997, pesquisadores publicaram um novo produto natural que contém em sua estrutura uma *N*-metil-espirosuccinimida, denomina Asperparalina A (**16**). O composto **16**, **Figura 9** foi isolado do fungo *Aspergillus japonicus*, na época foram realizados testes de atividade biológica em larvas do bicho da seda e a Asperparalina apresentou atividade paralisante.¹⁰⁴ O alcaloide dictyospiromida (**17**, **Figura 9**) foi isolado em 2019.¹⁰⁵ Esse produto natural foi obtido da alga marinha *Dictyota coriácea*. Além do isolamento desse novo composto foi realizado o estudo de ação antioxidante do mesmo para proteção de células contra ação de H₂O₂ e o composto **17** mostrou-se eficiente como um citoprotetor e antioxidante.

¹⁰³ Kamata, M.; Yamashita, T.; Kina, A.; Funata, M.; Mizukami, A. I.; Sasaki, M.; Tani, A.; Funami, M.; Amano, N.; Fukatsu, K. Design, synthesis, and structure–activity relationships of novel spiro-piperidines as acetyl-CoA carboxylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3643–3647. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.047>.

¹⁰⁴ Hayashi, H.; Nishimoto, Y.; Nozaki, H. Asperparaline A, a New Paralytic Alkaloid from *Aspergillus japonicus* JV-23, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 5655–5658. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01231-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01231-8)

¹⁰⁵ Yan, P.; Li, G.; Wang, C.; Wu, J.; Sun, Z.; Martin, G. E.; Wang, X.; Reibarkh, M.; Sauri, J.; Gustafson, K. R. Characterization by Empirical and Computational Methods of Dictyospiromide, an Intriguing Antioxidant Alkaloid from the Marine Alga *Dictyota coriacea*, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7577–7581. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b02856>

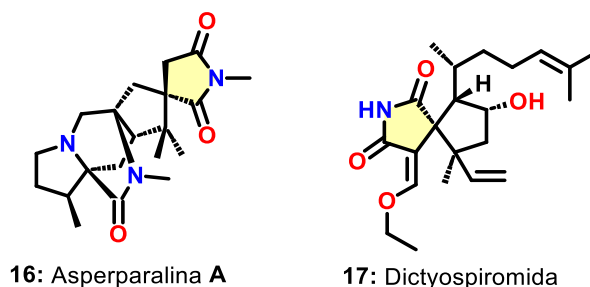
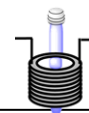
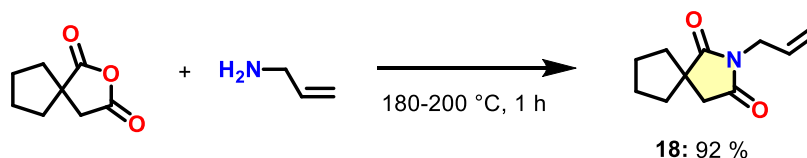


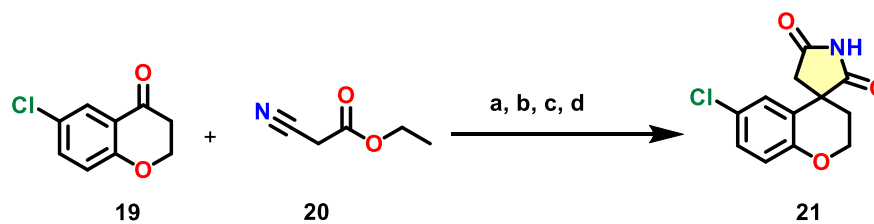
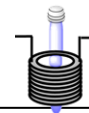
Figura 9: Estrutura da Asperparalina A e da Dictyospiromida.

As primeiras metodologias que foram aplicadas para a síntese de diversas espiroimididas foram baseadas na condensação de diácidos gem, ou de anidridos cíclicos com amônia em solução aquosa, ou com as respectivas alquil aminas. Um exemplo reportado para a síntese da espiroimidida **18** patenteada por Grogan⁸⁸ emprega a metodologia tradicional que era aplicada na época para a síntese das espiroimididas e envolve a reação do anidrido do ácido ciclopentano 1-carboxi acético com a alilamina para a síntese da espiroimidida. Como mostra a reação do **Esquema 30**, o procedimento geral consiste em reagir o respectivo anidrido com a alquil amina em aquecimento, até se observar a completa ciclização do ácido âmico para a respectiva imida.



Esquema 30: Exemplo de síntese da 2-álil-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-diona.

Outra metodologia que foi empregada para a síntese das imidas contendo anéis saturados fusionados ao benzeno, é bastante recorrente. A metodologia foi utilizada para a síntese da imida **13** (Figura 8).^{99,100} No **Esquema 31**, é mostrada o exemplo da sequência de reações que eram empregadas, tomando como exemplo, uma das espiroimididas sintetizadas por Belletire em 1981.¹⁰⁰ Partia-se da respectiva cetona cíclica (19) e a condensava com o etilcianoacetato (20) em meio ácido com acetato de amônia como catalisador e utilizando-se o aparelho de Dean-Stark, desse modo o ilideno correspondente é recuperado e utilizado na próxima etapa. A seguir, uma adição -1,4 de cianeto é realizada, seguida de hidrólise e descarboxilação, mais uma etapa de hidrólise é utilizada e por fim a reação com hidróxido de sódio concentrado leva a formação da espiroimidida desejada (21).



- a) NH_4OAc , AcOH, toluene, refluxo, 24 h
 b) KCN, EtOH/ H_2O (1:1), refluxo, 20 min
 c) HCl (conc), refluxo, 48 h
 d) NH_4OH (conc), 280°C , 2 h

Esquema 31: Exemplo de preparação da 6-clorospiro[cromano-4,3'-pirrolidina]-2',5'-diona.

As metodologias mais recentes de preparação de espiroisindolinonas com atividade antihiperlipidêmica fazem uso da ativação de ligações C-H através da catálise por metais de transição, como sais de Rh, Co e Cu.¹⁰¹ Tais metodologias partem da respectiva *N*-alquil maleimida como bloco de construção para a porção espiroimida e benzamidas substituídas com um grupo dirigente são necessárias.^{106,107,108,109,110,111} Algumas delas empregam quantidades equimolares dos respectivos metais de transição e outras fazem uso de um sistema catalítico, mas que também aplica outros metais de transição, em excesso, como sais de prata e manganês como oxidantes. Os tempos de reação para a síntese das espiroisindolinonas variam de 12 a 24 horas, em temperaturas entre 80°C a 110°C com rendimentos isolados de elevados a baixos. Como mostra o **Esquema 32**, benzamidas funcionalizadas com diferentes grupos dirigentes precisam ser utilizadas para a inserção da maleimida no anel aromático.

¹⁰⁶ Miura, W.; Hirano, K.; Miura, M. Copper-Mediated Oxidative Coupling of Benzamides with Maleimides via Directed C–H Cleavage, *Org. Lett.* **2015**, 17, 16, 4034–4037. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01940>

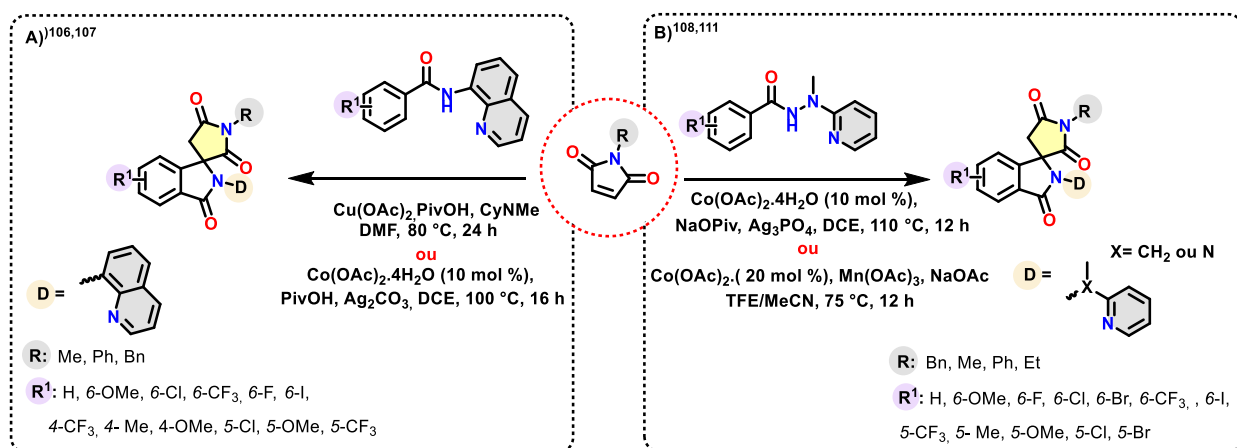
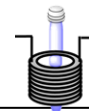
¹⁰⁷ Manoharan, R.; Jeganmohan, M. Cobalt-Catalyzed Oxidative Cyclization of Benzamides with Maleimides: Synthesis of Isoindolone Spirosuccinimides, *Org. Lett.* **2017**, 19, 5884–5887. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02873>.

¹⁰⁸ Zhao, H.; Shao, X.; Wang, T.; Zhai, S.; Qiu, S.; Tao, C.; Wang, H.; Zhai, H. A 2-(1-methylhydrazinyl)pyridine-directed C–H functionalization/spirocyclization cascade: facile access to spirosuccinimide derivatives, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 4927–4930. <https://doi.org/10.1039/C8CC01774C>.

¹⁰⁹ Ramesh, B.; Tamizmani, M.; Jeganmohan, M. Rhodium (III)-Catalyzed Redox-Neutral 1,1-Cyclization of *N*-Methoxy Benzamides with Maleimides via C–H/N–H/N–O Activation: Detailed Mechanistic Investigation, *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 4058–4071. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00051>

¹¹⁰ Sen, C.; Sarvaiya, B.; Sarkar, S.; Ghosh, S.H.C. Room-Temperature Synthesis of Isoindolone Spirosuccinimides: Merger of Visible-Light Photocatalysis and Cobalt-Catalyzed C–H Activation, *J. Org. Chem.* **2020**, 85, 15287–15304. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02120>

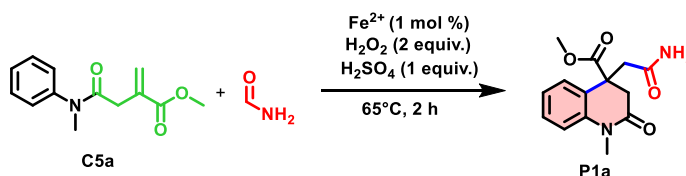
¹¹¹ Xu, M.; Yuan, Y.; Wang, Y.; Mu, Y.; Xie, H.; Li, Y. Cobalt-catalyzed CAH activation of *N*-carbamoyl indoles or benzamides with maleimides: Synthesis of imidazo[1,5-*a*]indole- or isoindolone-incorporated spirosuccinimides, *Tetrahedron Lett.* **2021**, 70, 152872–152875.



Esquema 32: Metodologias baseadas em metais de transição para ativação da ligação C-H e síntese de espiroimidias.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

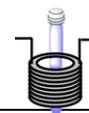
De posse dos materiais de partida iniciou-se as investigações da reatividade do composto **C5a** frente à reação de Fenton em formamida, como solvente, em um sistema utilizando-se o aquecimento convencional em batelada. A reação foi mantida durante duas horas a 65°C, como mostra o **Esquema 33**, a seguir. Ao final de duas horas notou-se consumo completo do material de partida, mostrando que o composto **C5a** era um ótimo aceptor dos radicais carbamoíla, pois o produto **P1a** que apresenta o íon molecular com *m/z* 276 foi detectado na análise por CG-EM realizada com a reação extraída.



Esquema 33: Teste exploratório para verificação da reatividade de **C5a** frente às condições de Fenton em batelada.

A fim de avaliar se outro solvente poderia ser utilizado para a realização da carbamoilação realizaram-se testes para verificar a carbamoilação em terc-butanol na presença de equivalentes de formamida. Quando foi empregado o terc-butanol como solvente majoritário e 10 % *v/v* de formamida, apenas o material de partida foi detectado na análise por CG-EM da reação extraída, o mesmo fato ocorreu quando foram utilizadas 20 % *v/v* de formamida.

A seguir decidiu-se então realizar a reação de carbamoilação através da foto-Fenton em fluxo contínuo. Com esse propósito foi utilizado o reator proposto na **Imagem 14** (Tópico 8. 25. 1. p.202). O reator é constituído de um tubo de HPFA, com volume total de 1 mL, enrolado no poço de imersão de Quartzo. As soluções contendo os reagentes foram injetadas através de duas seringas, das quais o fluxo confluía em um misturador em forma de Y, a seguir um único

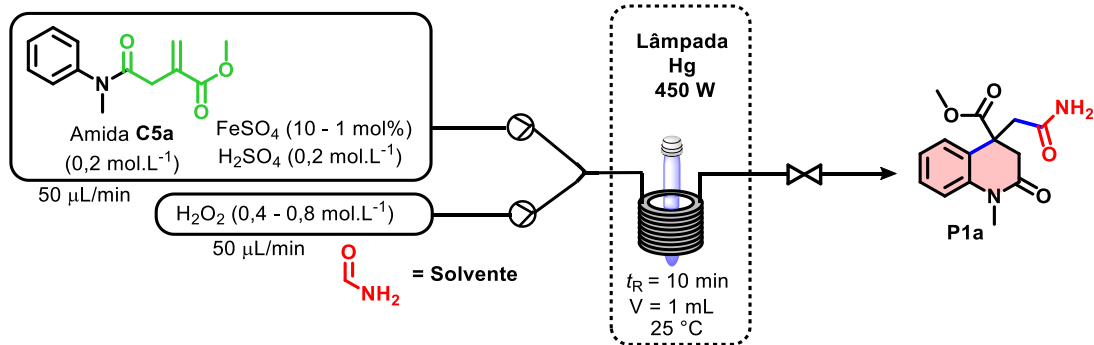


segmento de fluxo levava o efluente reacional para o reator, ao deixar o reator, um regulador de pressão traseira de 75 psi estava conectado ao sistema e por fim o efluente reacional era coletado em um frasco de vidro. A concentração inicial da amida **C5a** era de $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$, dentro da seringa de injeção e a velocidade do fluxo utilizada foi $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, garantindo que a confluência dos dois segmentos das seringas geraria um fluxo final de $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. De posse desse reator foram então exploradas as condições de reação para a produção das dihidroquinolinonas e dos oxindóis em fluxo contínuo. O tempo de residência (t_R) escolhido para a reação foi de 10 minutos, com base em trabalhos publicados anteriormente.

Como mostra a **Tabela 7**, investigou-se a quantidade de catalisador necessária para a geração das dihidroquinolin-2-onas a partir de **C5a**. Uma primeira reação foi realizada a temperatura ambiente, utilizando-se 10 mol% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, quatro equivalentes de peróxido de hidrogênio e um equivalente de ácido sulfúrico, **Entrada 1, Tabela 7**, nesse caso observou-se conversão total da amida **C5a**. A concentração de catalisador foi então diminuída para 5 e 1 mol% respectivamente, **Entradas 2-3, Tabela 7**, e notou-se que a conversão total da amida **C5a** se mantinha. Desse modo, optou-se por diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio pela metade, e como mostra a **Entrada 4, Tabela 7**, obteve-se a mesma conversão total da amida **C5a**. Como a conversão cromatográfica se manteve elevada, optou-se por diminuir a quantidade de equivalentes de oxidante utilizado, como descrito na **Entrada 4, Tabela 7**, porém nesse caso, a conversão cromatográfica diminuiu. Como controle negativo, um experimento foi realizado com a lâmpada de mercúrio desligada, **Entrada 5**, neste caso não houve consumo da amida **C5a**, mostrando o papel da irradiação pela lâmpada UV na reação. Os experimentos nos quais a conversão cromatográfica foi acima de 99 % o produto majoritário foi a dihidroquinolinona **P1a**, mas como produto minoritário se notava o respectivo composto ciclizado, as análises por CCD também mostravam a presença deste segundo produto.



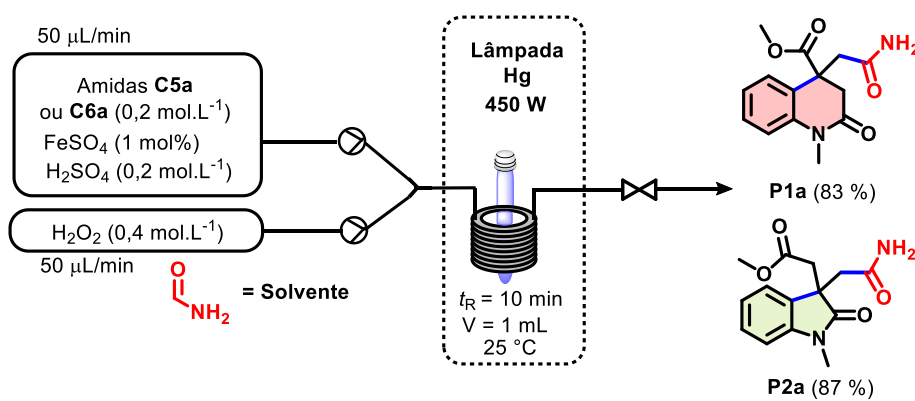
Tabela 7: Exploração das condições para a síntese das dihidroquinolin-2-onas.^a



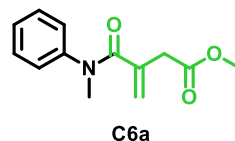
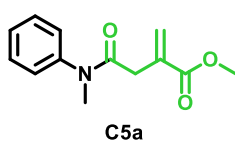
Entrada	FeSO ₄ (mol%)	H ₂ O ₂ (mol/L)	P1a (%) ^b
1	10	0,4	>99
2	5	0,4	>99
3	1	0,4	>99
5	1	0,2	81
6 ^c	1	0,4	0

^a Condições de reação: **C5a** (0,2 mol. L⁻¹), H₂SO₄ (0,2 mol. L⁻¹), FeSO₄ (1-10 mol %), H₂O₂ (30% *m/m* solução aquosa) e formamida como solvente; Tempo de residência (*t_R*) = 10 min; 25°C; Regulador de pressão traseira (BPR) de 75 psi. ^b A conversão foi determinada por CG-EM, pela análise da reação extraída. ^c Lâmpada de Hg desligada.

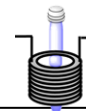
De posse das condições ideais para a síntese das dihidroquinolinonas foi realizado um experimento para verificar o rendimento isolado do composto **P1a**, o qual nas condições da **Entrada 4, Tabela 7**, foi obtido em elevado rendimento (83 %) (Esquema 34). As mesmas condições foram então empregadas para a amida análoga **C6a**, desse modo o oxindol **P2a** foi obtido em elevado rendimento isolado (87%) dentro de 10 minutos. (Esquema 34).



Amidas **C5a** e **C6a**:



Esquema 34: Produção da dihidroquinolin-2-ona **P6a** e do oxindol **P7a** em foto-reator de fluxo contínuo.



O composto **P1a** foi caracterizado por EM, EMAR, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e IV. A **Figura 10** mostra o espectro de massas para o composto **P1a** e as estruturas propostas do íon molecular, do pico base e outros picos de maior intensidade.

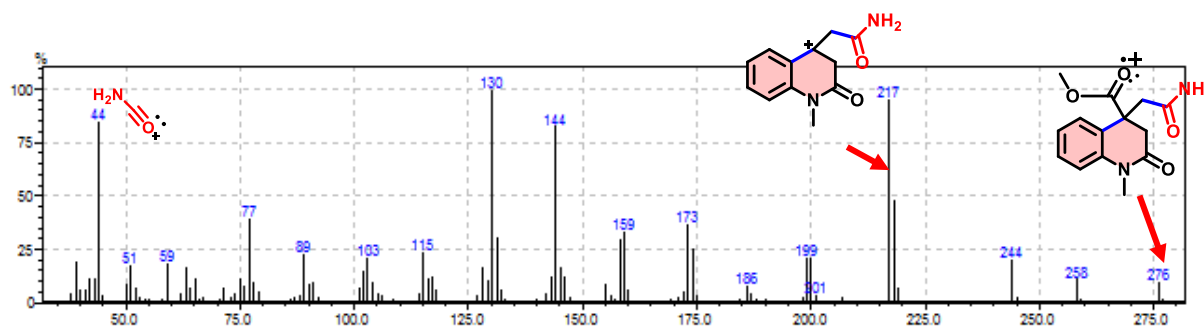


Figura 10: Espectro de massas obtido para o composto **P1a**.

A **Figura 11** a seguir mostra o espectro de RMN de ^1H do composto **P1a**.

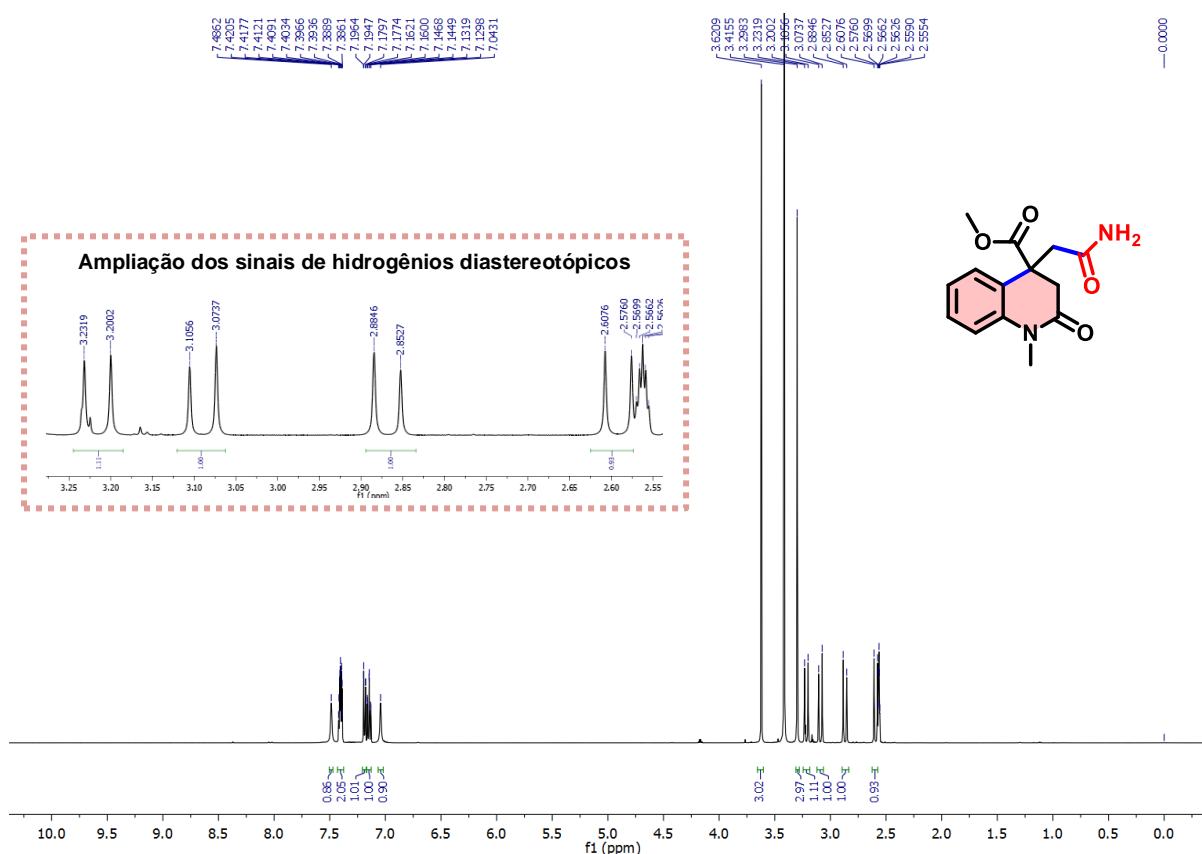
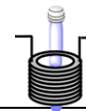


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **P1a**.

O espectro de RMN de ^1H do composto **P1a** (Figura 11) apresentou em $\delta = 7,49$ ppm um singleto largo de integração para um hidrogênio que é referente a um dos hidrogênios da amida, a seguir entre $\delta = 7,42 - 7,39$ ppm um multipletto de integração para dois hidrogênios, referente à hidrogênios aromáticos, entre $\delta = 7,20 - 7,18$ ppm outro multipletto de integração para um hidrogênio, referente a hidrogênio aromático e entre $\delta = 7,16 - 7,13$ ppm outro multipletto de integração para um hidrogênio referente a hidrogênio aromático, em $\delta = 7,04$ ppm um singleto largo com integração para 1 hidrogênio referente ao outro hidrogênio da amida primária. Em $\delta =$



3,62 ppm um sinal singleto de integração para três hidrogênios referentes à metila da porção éster, $\delta = 3,30$ ppm outro singleto de integração para três hidrogênios referentes à metila ligada ao nitrogênio. A seguir uma série de sinais referentes aos hidrogênios diástereotópicos presentes, em $\delta = 3,15$ ppm um dubleto de integração para um hidrogênio, com constante de acoplamento $J = 15,8$ Hz, em $\delta = 3,02$ ppm outro dubleto com integração para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J = 16,0$ Hz, em $\delta = 2,80$ ppm, um dubleto com integração para um hidrogênio e constante de acoplamento $J = 16,0$ Hz, e em $\delta = 2,53$ ppm outro dubleto com integração para um e constante de acoplamento $J = 15,8$ Hz. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar os sinais em $\delta = 173,0, 171,2$ e $167,9$ ppm referentes aos carbonos das carbonilas, a seguir os sinais em $\delta = 140,2, 129,3, 126,3, 126,2, 123,3$ e $116,0$ ppm referentes aos carbonos aromáticos. Os sinais em $\delta = 52,7, 45,9, 41,0, 38,3$ e $29,4$ ppm referentes aos carbonos alifáticos da molécula.

O composto **P2a** foi caracterizado por EM, EMAR, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e IV. A **Figura 12**, a seguir mostra o espectro de RMN de ^1H do composto **P2a**.

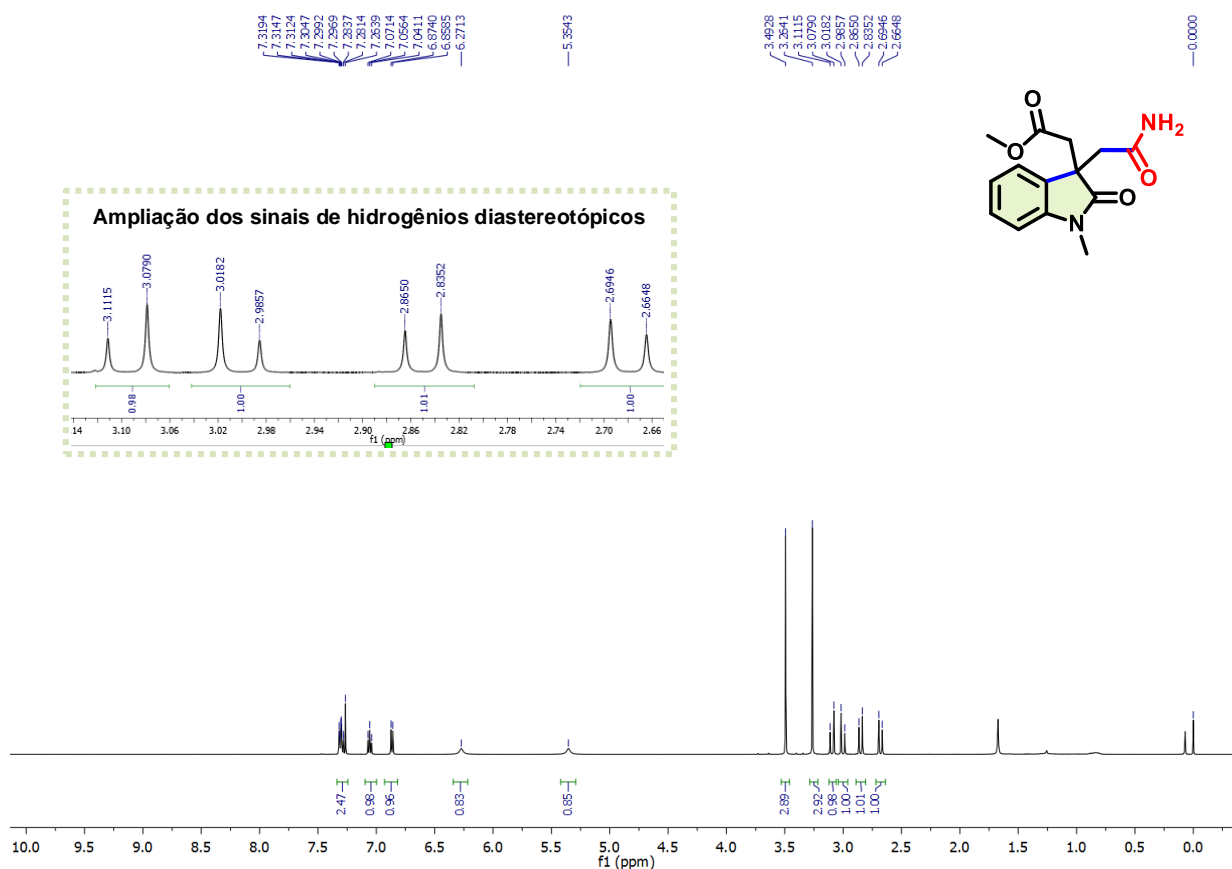
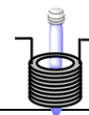


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **P2a**.

O espectro de RMN de ^1H do composto **P2a** (Figura 12) apresenta entre $\delta = 7,32$ - $7,28$ um multipletto de integração para dois hidrogênios, entre $\delta = 7,07 - 7,04$ ppm outro multipletto de



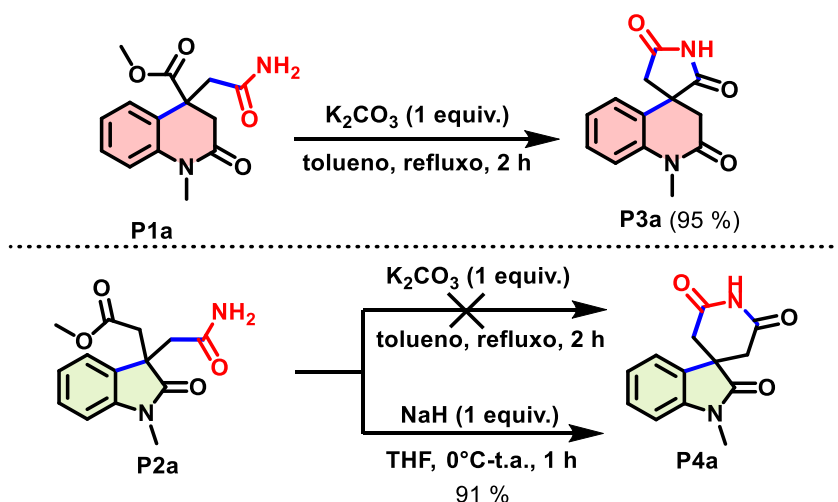
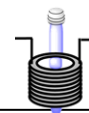
integração para um hidrogênio, entre $\delta = 6,87 - 6,89$ ppm outro multipletto de integração para um hidrogênio perfazendo os quatro hidrogênios aromáticos. Em $\delta = 6,27$ e $5,25$ ppm dois singletos largos de integração cada um para um hidrogênio, correspondentes aos hidrogênios ligados à amida primária. Em $\delta = 3,49$ ppm um sinal singleto de integração para três hidrogênios referentes à metila da porçar éster, $\delta = 3,26$ ppm outro singleto de integração para três hidrogênios referentes à metila ligada ao nitrogênio. A seguir uma série de sinais referentes aos hidrogênios diástereotópicos presentes, em $\delta = 3,10$ ppm um dubleto de integração para um hidrogênio, com constante de acoplamento $J = 16,2$ Hz, em $\delta = 3,00$ ppm outro dubleto com integração para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J = 16,2$ Hz, em $\delta = 2,85$ ppm, um dubleto com integração para um hidrogênio e constante de acoplamento $J = 14,9$ Hz, e em $\delta = 2,68$ outro dubleto com integração para um e constante de acoplamento $J = 14,9$ Hz. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar os sinais em $\delta = 178,9, 170,7$ e $170,2$ ppm referentes aos carbonos das carbonilas, a seguir os sinais em $\delta = 143,8, 130,3, 128,8, 123,4, 122,8$ e $108,4$ ppm referentes aos carbonos aromáticos. Os sinais em $\delta = 51,7, 47,2, 42,4, 39,9$ e $26,6$ ppm referentes aos carbonos alifáticos da molécula.

A seguir com o objetivo de se verificar a formação das correspondentes espiro-imidas foram realizados testes de ciclização na presença de base, já que foram encontradas na literatura diversas metodologias que realizavam a ciclização de ésteres metílicos com amidas primárias na presença de uma base.^{112,113,114} Nessa etapa, o nitrogênio na amida atacaria a carboxila do grupo éster para formação da correspondente imida. A reação foi realizada com o composto **P1a** e o composto **P2a** purificados. A ciclização da dihidroquinolin-2-ona **P1a** ocorreu na presença de um equivalente de carbonato de potássio em tolueno e refluxo durante duas horas como mostra o **Esquema 35**, a espirosuccinimida **P3a** foi obtida em 95% de rendimento isolado. Já no caso da etapa de ciclização de **P2a** para a respectiva espiroglutarimida **P4a** a utilização das mesmas condições não forneceu a imida de interesse, portanto foi utilizada uma base mais forte, nesse caso um equivalente de hidreto de sódio em THF, a temperatura ambiente por uma hora, nessa abordagem a espiroglutarimida **P3a** foi obtida em 91 % de rendimento isolado (Esquema 35).

¹¹²Narula, A. P. S.; Epstein, J. W. The preparation of 2-(3-pyridyl)maleimide, *Tetrahedron*, **1983**, 39, 3055–3057. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)91545-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)91545-5)

¹¹³Singh, V.; Yadav, G.P.; Maulik, P.R.; Batra, S. Studies toward the construction of substituted piperidine-2-ones and pyridine-2-ones from Baylis–Hillman adducts: discovery of a facile synthesis of 5-methyl-4-oxo-6-aryl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-1-carboxylates, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 8731–8739. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.06.099>

¹¹⁴Yamashita, Y.; Kurihara, T.; Horiguchi, T.; Miki, A.; Shoji, M.; Sugai, T.; Hanaya, K. Ex Situ Enantioconvergent Approaches for the Effective Use of Undesired Isomers: Stereochemical Convergence of a Substrate with Multiple Chiral Centers and Recycling of a Decarboxylated Byproduct, *Synthesis*, **2016**, 48, 2191–2200. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1561620>

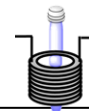


Esquema 35: Reações de ciclização de **P3a** e **P4a** para produção das respectivas imidas.

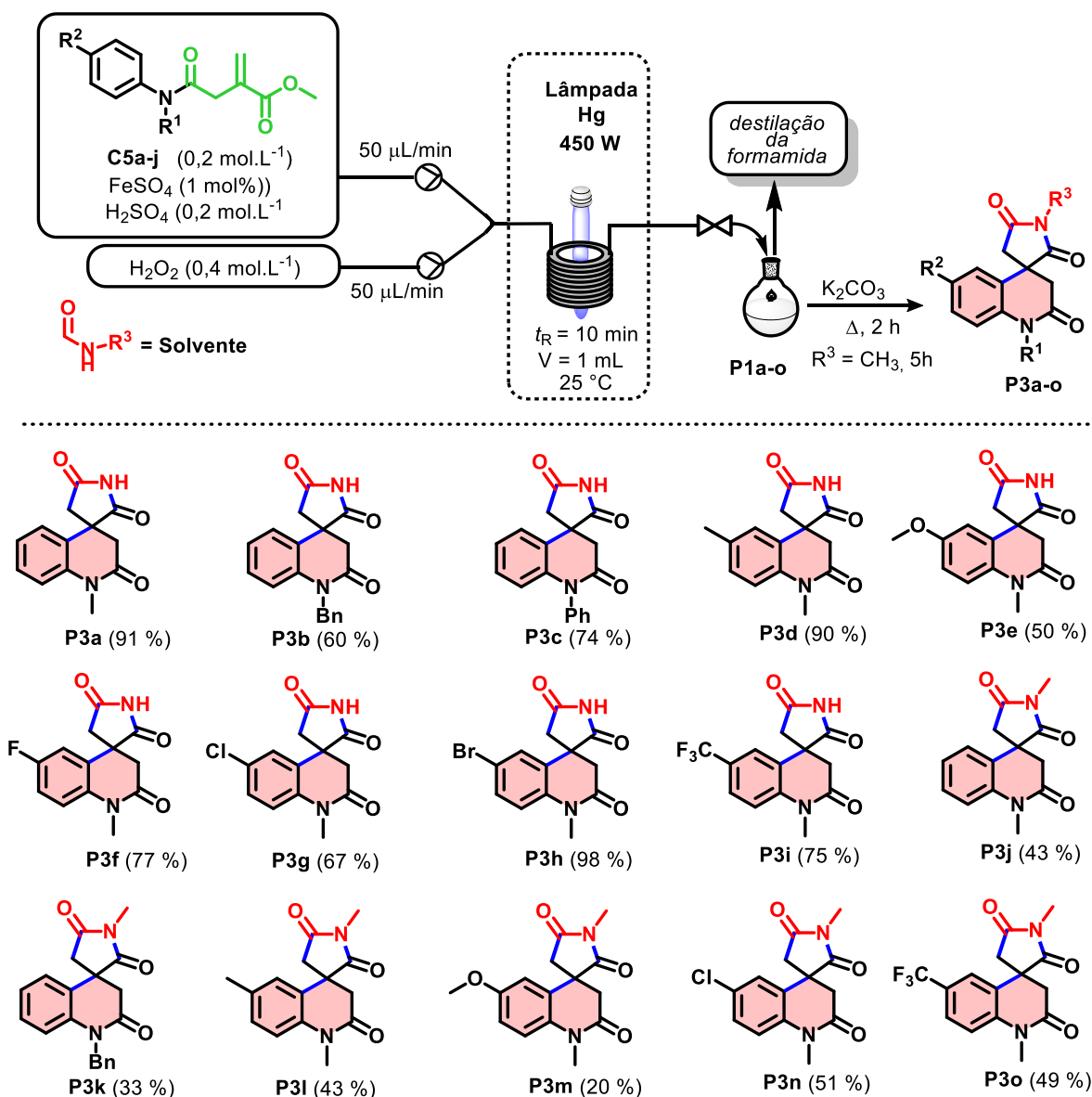
Com o propósito de se evitar etapas e facilitar o processo de obtenção da espirosuccinimida **P3a**, optou-se por não realizar a purificação cromatográfica dos intermediários **P1a**. Desse modo, após a reação em fluxo contínuo a mistura bruta que deixava o reator era neutralizada com bicarbonato de sódio e bisulfito de sódio, e após agitação por 15 minutos para eliminação de gases, o volume de 4 mL da mistura bruta era então transferido para um balão de fundo redondo e destilado à vácuo até completa remoção da formamida. A seguir, a etapa de imidação promovida por K_2CO_3 era realizada com o bruto remanescente no balão, após a etapa de imidação, seguia-se uma extração e por fim a purificação cromatográfica. A síntese das espirosuccinimidas **P3a** foi realizada dessa forma.

Em um primeiro momento avaliou-se a síntese das espiro[dihidroquinolin-2-ona-succinimidas] contendo a porção da imida contendo o NH livre, essas foram derivadas da reação em formamida como solvente. Como é possível observar no **Esquema 36**, o composto **C5a** sem substituintes no anel aromático forneceu a espirosuccinimida **P3a** em rendimento elevado (91%), as amidas contendo grupos protetores mais volumosos como benzila (**P3b**) e fenila (**P3c**), forneceram as respectivas espirosuccinimidas em rendimentos menores, respectivamente 60 e 74 % se comparados às amidas contendo o grupo metila. Quando o grupo metila estava presente na posição 4 do anel da amida, o mesmo rendimento elevado foi obtido para a imida **P3d**. A substituição no anel aromático da amida na posição 4 com F, Cl, Br e também a utilização do grupo fortemente retirador de elétrons CF_3 ainda possibilitou a recuperação das succinimidas em rendimentos elevados, respectivamente, 77, 67, 98 e 75 %. (**P3f** – **P3i**) No caso da substituição com um grupo fortemente doador de elétrons como a metoxila na posição 4 do anel, um rendimento mais baixo de 50 % foi obtido (**P3e**). provavelmente devido à sua maior susceptibilidade de degradação pelo sistema de foto-Fenton.¹¹⁵

¹¹⁵ Nam, S.; Renganathan, V.; Tratnyek, P. G. Substituent effects on azo dye oxidation by the Fe^{III} -EDTA- H_2O_2 system, *Chemosphere*, **2001**, 45, 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00599-3).

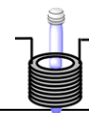


Já no caso da utilização da *N*-metil-formamida para obtenção das respectivas espiro[dihidroquinolin-2-ona-succinimidas] *N* metiladas uma tendência geral de rendimentos menores foi observada, além de um maior tempo de reação ter sido empregado na ciclização (5 horas) sendo que a espirosuccinimida **P3k** contendo o grupo benzila foi obtida em rendimento baixo de 33% e também a espirosuccinimida **P3m** contendo o grupo metoxila foi obtida em apenas 20 % de rendimento. Como observado anteriormente, este baixo rendimento pode estar atrelado à maior susceptibilidade de degradação pelo sistema de foto-Fenton.¹¹⁵

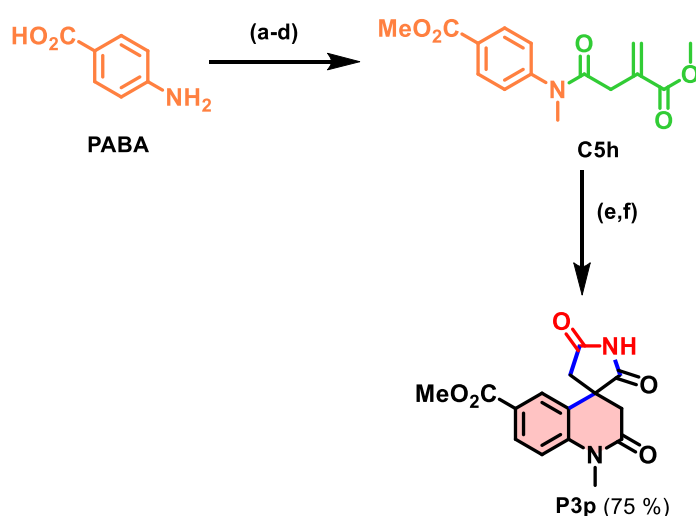


Esquema 36: Síntese das spiro[dihidroquinolin-2-ona-succinimidas] **P3a-o**.

Após a preparação das espirosuccinimidas apresentadas no **Esquema 36** optou-se por realizar a preparação de uma espirosuccinimida que possuísse os seus átomos derivados de blocos de construção renováveis. Para isso, encontrou-se que o PABA (ácido 4- amino benzoico) que é uma das poucas anilinas disponíveis na natureza, o mesmo pode ser produzido pela



Saccharomyces cerevisiae, de maneira renovável¹¹⁶. Dessa maneira, para a preparação desse derivado partiu-se do PABA e realizou-se uma esterificação do mesmo para obtenção do éster metílico em conversão quantitativa (a), **Esquema 37**.¹¹⁷ O bruto da etapa anterior foi então empregado na etapa de metilação redutiva e a seguir realizou-se a acilação com anidrido itacônico, após a esterificação obteve-se o material de partida **C5h** em rendimento isolado de 47% (**Esquema 37**). O composto **C5h** foi então submetido às condições de reação otimizadas para a preparação direta da espiroimida, desse modo obteve-se o composto **P3p** em 75% de rendimento isolado. Nota-se nesta abordagem, a complexidade estrutural obtida em poucas etapas, para a produção de um heterociclo nitrogenado, até o momento não relatado como produto natural, porém sintetizado através de carbonos naturais.



(a) SOCl_2 (1,0 equiv.), MeOH, t.a.- refluxo, 2 h;

(b) NaOMe (5 equiv.), HCOH (1,4 equiv.), 16 h, NaBH_4 (1,0 equiv.), MeOH, t.a.- refluxo, 1,75 h;

(c) Anidrido itacônico (1,1 equiv.), tolueno, 70 - 80 °C, 1,5 h;

(d) SOCl_2 (1,75 equiv.), MeOH, 0°C-refluxo, 2,5 h;

(e) Reator fotoquímico em fluxo: **C5h** (0,2 mol.L⁻¹), H_2SO_4 (0,2 mol.L⁻¹), FeSO_4 (1 mol%), H_2O_2 (30% solução aquosa; 0,4 mol. L⁻¹), formamida como solvente, $t_R = 10$ min, 25 °C;

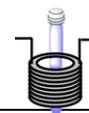
(f) K_2CO_3 (1,0 equiv.), tolueno refluxo, 2 h.

Esquema 37: Rota sintética para a espirosuccinimida **P3p** contendo todos os carbonos renováveis.

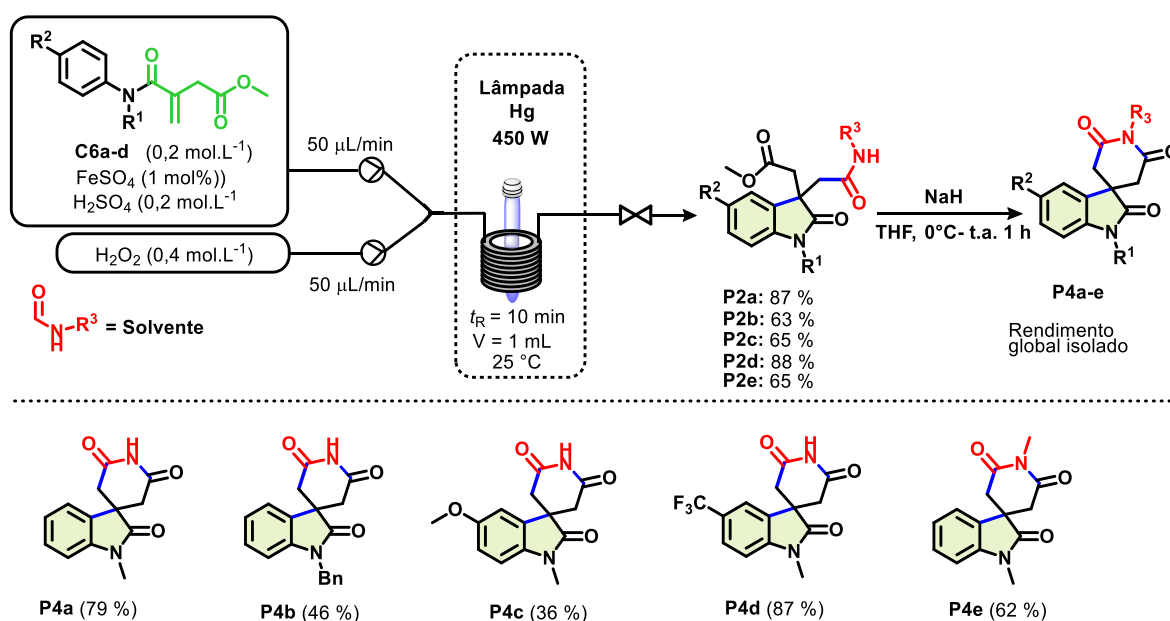
A produção das espiro[indolin-2-ona-glutarimidas] foi realizada aplicando-se as condições otimizadas anteriormente, a seguir os intermediários indolin-2-onas **P2a-e** foram purificados e então foi realizada a etapa de ciclização em meio básico para as correspondentes glutarimidas utilizando-se NaH como base (**Esquema 35**). Como é possível observar no **Esquema 38** as indolin-2-onas 3,3 dissubstituídas foram obtidos na etapa de carbamoilação em fluxo contínuo

¹¹⁶ Aversch, N. J.; H.; Winter, G.; Krömer, J. O. Production of para-aminobenzoic acid from different carbon-sources in engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell Fact.* **2016**, 15, 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0485-8>

¹¹⁷ Nicolaou, K. C.; Boddy, C.N. C.; Li, H.; Koumbis, A. E.; Hughes, R.; Natarajan, S.; Jain, N. F.; Ramanjulu, J.M.; Bräse, S.; Solomon, M. E. Total Synthesis of Vancomycin—Part 2: Retrosynthetic Analysis, Synthesis of Amino Acid Building Blocks and Strategy Evaluations, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2602–2621. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19990903\)5:9<2602::AID-CHEM2602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19990903)5:9<2602::AID-CHEM2602>3.0.CO;2-X)



em rendimentos elevados. A seguir foi utilizada a reação de ciclização com NaH, o que forneceu as respectivas espiroglutarimidas. A amida sem substituintes no anel aromático forneceu o produto **P4a** em elevado rendimento isolado global (79%), no caso do seu correspondente benzilado **P4b**, o rendimento obtido foi menor (46%). A substituição na posição para do anel com o grupo metoxila levou ao isolamento do produto **P4c** em baixo rendimento (36 %). Quando o grupo fortemente retirador de elétrons CF₃ estava presente na posição 4 do anel da amida de partida, o produto **P4d** pôde ser obtido em elevado rendimento (87%). A glutarimida *N*-metilada (**P4e**) foi produzida a partir da *N*-metil formamida e obtida em bom rendimento (62%).



A **Figura 13** mostra o espectro de absorção no IV obtido para a amostra do composto **P4a**. É possível notar na região de 3200 cm⁻¹ a banda referente ao estiramento da ligação N-H. A seguir na região de 3080 é possível identificar bandas fracas referentes ao estiramento de ligações C-H (sp²). Em torno de 2900 cm⁻¹ nota-se as bandas referentes ao estiramento de ligações C-H (sp³). A seguir em 1708 e 1685 cm⁻¹ é possível verificar as bandas correspondes ao estiramento das carbonilas da imida. À título de comparação o **Figura 83** (p.276) mostra o espectro de IV obtido para o composto **P3a**, no qual é possível observar claramente os dois conjuntos de bandas duplas referentes aos estiramentos das carbonilas.

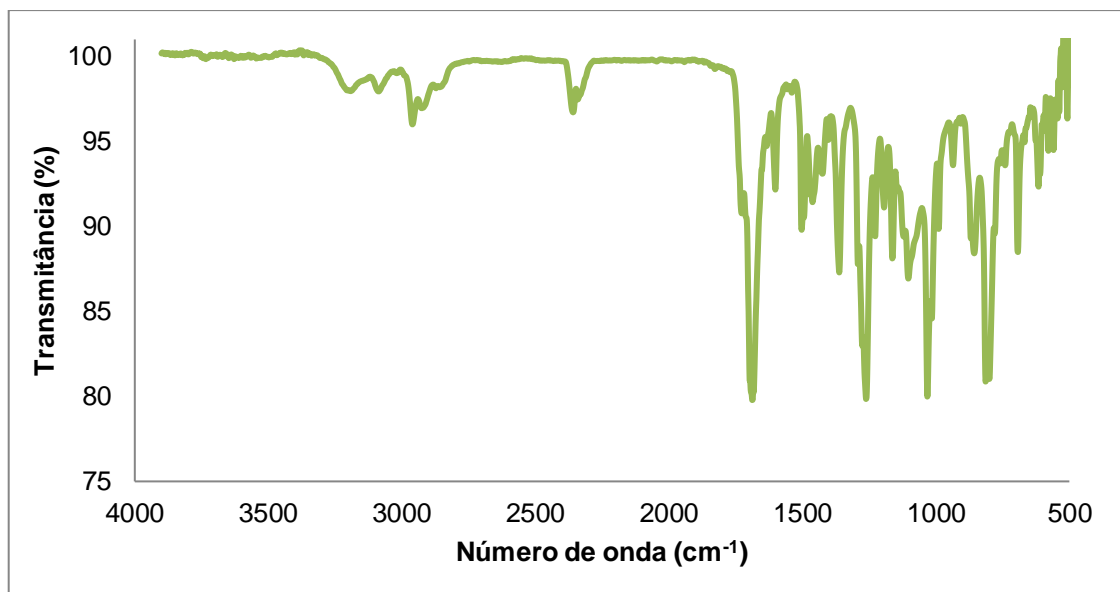
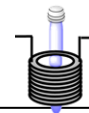


Figura 13: Espectro no IV obtido para o composto **P4a**.

A Figura 14 mostra o espectro de massas do composto **P4a** com a estrutura do íon molecular e pico base.

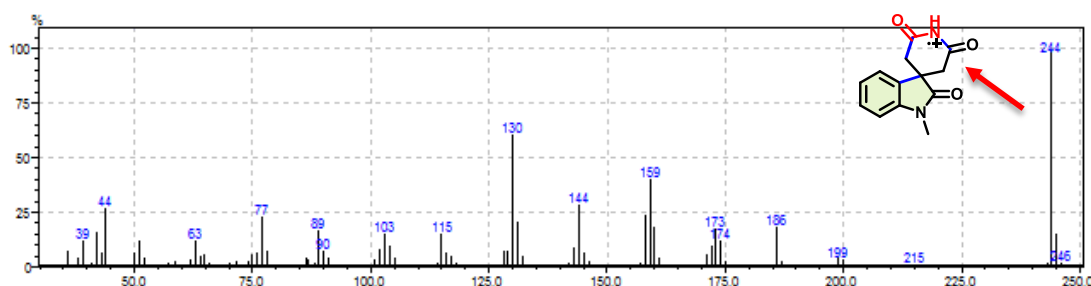


Figura 14: Espectro de massas do composto **P4a**.

A Figura 15 mostra o espectro de RMN de ^1H da espiroglutarimida **P4a**. Nota-se em $\delta = 8,47$ ppm um singleto largo de integração para um, que é referente ao hidrogênio da imida, a seguir entre $\delta = 7,37$ ppm um tripo dubleto de integração para um hidrogênio, referente a hidrogênio aromático em $\delta = 7,23$ ppm um dubleto com integração para 1 hidrogênio. Em $\delta = 7,10$ ppm um tripo dubleto de integração para um hidrogênio referente a hidrogênio aromático e em $\delta = 6,93$ ppm um dubleto com integração para um hidrogênio. Em $\delta = 3,26$ ppm um singleto com integração para 3 hidrogênios referente à metila. Em $\delta = 2,99$ ppm um dubleto com integração para 2 hidrogênios com constante de acoplamento $J = 17,2$ Hz, em $\delta = 2,66$ ppm outro dubleto de integração para 2 hidrogênios e constante de acoplamento $J = 17,3$ Hz, referentes aos hidrogênios diastereotópicos do anel da glutarimida. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar os sinais em $\delta = 176,2$, e $169,9$ ppm referentes aos carbonos das carbonilas, a seguir os sinais em $\delta = 142,6$, $129,3$, $129,8$, $129,7$, $123,61$, $122,5$ e $109,1$ ppm referentes aos carbonos aromáticos. Os sinais em $\delta = 45,0$, $38,7$ e $26,7$ ppm referentes aos carbonos alifáticos da molécula.

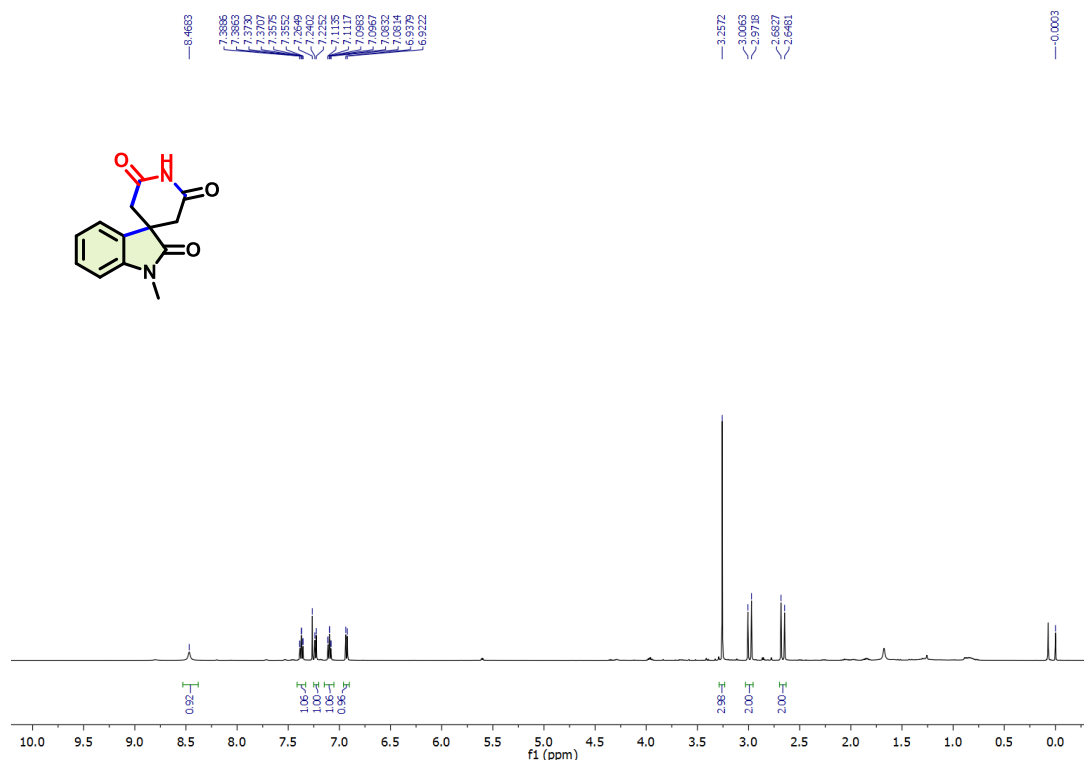
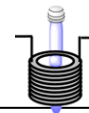
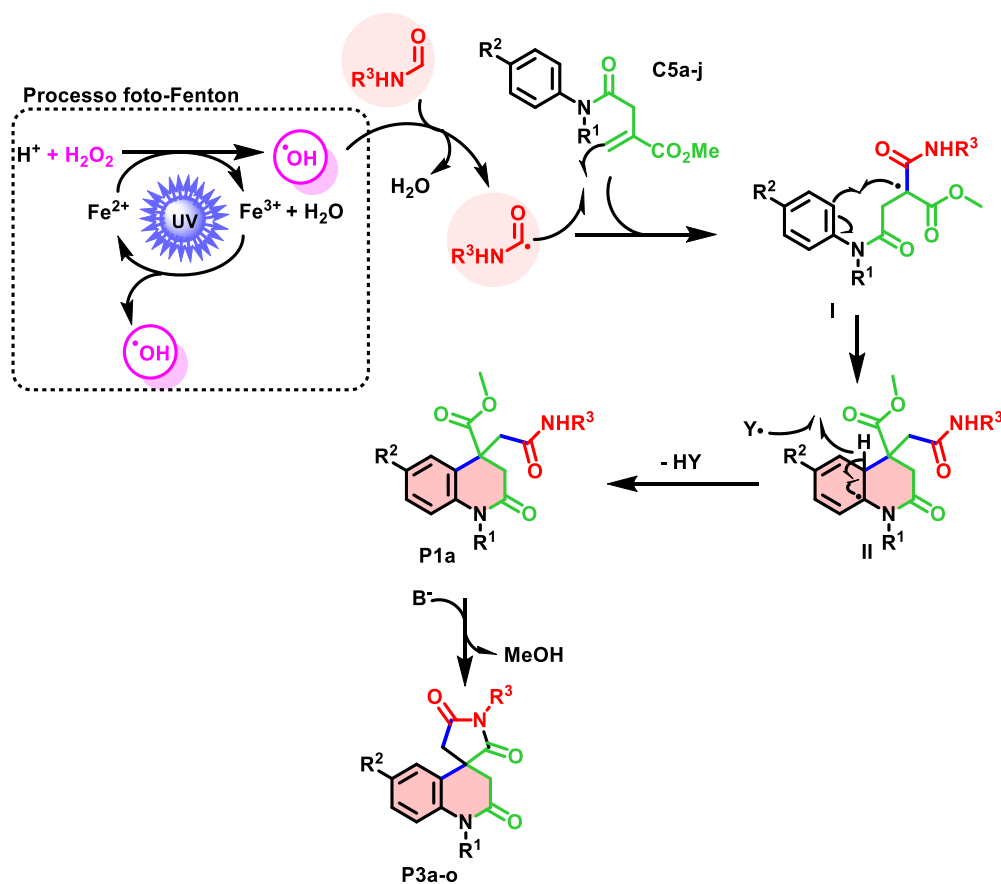
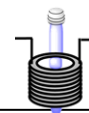


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **P4a**.

Um mecanismo foi proposto no **Esquema 39** para a formação das espiroimidaz **P3a**. A primeira etapa envolve a reação dos íons Fe^{2+} com o H_2O_2 nesta etapa, um equivalente de radical hidroxila é liberado e uma molécula de água, e o íon Fe^{3+} que na presença de luz será reduzido liberando outro equivalente de radical hidroxila. O radical hidroxila abstrai o hidrogênio ligado à carbonila da formamida liberando nessa etapa uma molécula de água e o radical carbamoíla. A seguir o radical carbamoíla se adiciona à dupla $\text{C}=\text{C}$ da porção éster α - β insaturado da amida **C5a**, gerando o radical terciário **I**. Por sua vez o radical **I** reage de maneira intramolecular com o anel aromático gerando o radical **II**. A seguir o intermediário **II** é rearomatizado através da remoção de um hidrogênio, pela atuação de uma espécie radicalar **Y**, fornecendo a dihidroquinolinona **P1a**. A seguir, uma imidação promovida pela base ocorre com a eliminação de MeOH .



Esquema 39: Mecanismo proposto para a formação de dihidroquinolinonas.

3. 4. CONCLUSÃO PARCIAL

Em suma, neste capítulo foi desenvolvida uma metodologia na qual a formamida junto ao ácido itacônico foram empregados para a preparação de novas espiro[dihidroquinolin-2-ona-succinimidas e espiro[indolin-2-ona-glutarimidas]. Os materiais de partida para a síntese dessas novas espiroimididas foram preparados através da utilização da versatilidade do ácido itacônico como bloco de construção. A reação de carbamoilação com formamidas permitiu a preparação de alvos moleculares contendo o núcleo da dihidroquinolin-2-ona e também contendo o núcleo da indolin-2-ona. Através da utilização de um reator fotoquímico foi possível sintetizar os heterociclos em um curto tempo. Além disso, a exploração da carboxamida incorporada na primeira reação, levou a preparação de novas espirosuccinimidas e glutarimidas dentro de poucas horas em elevados rendimentos. Através da aplicação de uma amina aromática natural, o PABA, foi possível preparar uma espiroimidida totalmente derivada de blocos de construção renováveis. A próxima etapa envolve a realização de ensaios biológicos para a avaliação de possíveis atividades biológicas das imidas sintetizada.

CAPÍTULO IV

Síntese de indolinas e indóis-*N*-fusionados do radical carbamoíla e sua funcionalização para espiroimididas

CAPÍTULO IV

4 SÍNTESE DE INDOLINAS E INDÓIS-N-FUSIONADOS A PARTIR DO RADICAL CARBAMOÍLA E SUA FUNCIONALIZAÇÃO PARA ESPIROIMIDAS

Este capítulo trata da síntese de indolinas e indóis *N*-fusionados acoplados a espirosuccinimidas, em condições de sono-Fenton a partir do radical carbamoíla. Em um primeiro momento, as indolinas foram preparadas em batelada, sob irradiação ultrassônica dentro de 1 minuto em rendimentos excelentes, item **4. 3. 1.** A seguir, no item **4. 3. 2.**, aproveitando-se o rápido aquecimento mecânico causado pelas ondas ultrassônicas um reator em fluxo contínuo foi proposto para a síntese direta de indolina-espirosuccinimidas e indóis *N*-fusionados, que foram obtidos em ótimos rendimentos.

4. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROPOSTA PARA A PREPARAÇÃO DE INDOLINAS E INDÓIS -N- FUSIONADOS SOB IRRADIAÇÃO ULTRASSÔNICA

Os efeitos químicos da irradiação de líquidos com ondas ultrassônicas são conhecidos a quase um século.¹¹⁸ Apesar disso, o crescimento das aplicações de ondas ultrassônicas na química orgânica,^{119,120} inorgânica e de materiais é recente.¹²¹ Entre as vantagens do uso do ultrassom em síntese está a possibilidade de alcançar seletividades que não são possíveis com aquecimento convencional, a possibilidade de se aumentar a seletividade,^{122,123} as velocidades de reações e os rendimentos das reações.^{124,125} Devido a essas vantagens houve um grande

¹¹⁸ Richards, W. T.; Loomis, A. L. The Chemical Effects of High Frequency Sound Waves: I. A Preliminary Survey, *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, 49, 3086–3100. <https://doi.org/10.1021/ja01411a015>

¹¹⁹ Banerjee, B. Recent developments on ultrasound assisted catalyst-free organic synthesis, *Ultrason. Sonochem.* **2017**, 35, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.023>

¹²⁰ G. Chatel, R. S. Varma, Ultrasound and microwave irradiation: contributions of alternative physicochemical activation methods to green chemistry, *Green Chem.* **2019**, 21, 643–650. <https://doi.org/10.1039/C9GC02534K>.

¹²¹ Li, Z.; Zhuang, T.; Dong, J.; Wang, L.; Xia, J.; Wang, H.; Cui, X.; Wang, Z. Sonochemical fabrication of inorganic nanoparticles for applications in catalysis, *Ultrason. Sonochem.* **2021**, 71, 105384. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105384>

¹²² Gadilohar, B. L.; Pinjari, D. V.; Shankarling, G. S. An Energy Efficient Sonochemical Selective Oxidation of Benzyl Alcohols to Benzaldehydes by Using Bio-TSIL Choline Peroxydisulfate, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, 55, 4797–4802. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b00731>.

¹²³ Nazeri, M. T.; Shaabani, A.; Notash, B. Chemoselective synthesis of fully substituted pyrroles via a one-pot four-component isocyanide-based reaction, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 19, 127112. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127112>

¹²⁴ Venkateshwarlu, R.; Singh, S. N.; Siddaiah, V.; Ramamohan, H.; Dandela, R.; Hossain, K. A.; Babu, P. V.; Pal, M. Ultrasound assisted rapid synthesis of mefenamic acid based indole derivatives under ligand free Cu-catalysis: Their pharmacological evaluation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30, 5333–5338. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)82382-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82382-6).

¹²⁵ Cravotto, G.; Cintas, P. Harnessing mechanochemical effects with ultrasound-induced reactions, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 295–307. <https://doi.org/10.1039/C1SC00740H>.

desenvolvimento nas reações orgânicas mediadas por ultrassom e conseqüentemente isso possibilitou novas aplicações dessa ferramenta na indústria.¹²⁶

Os efeitos do ultrassom anteriormente citados são gerados através da cavitação que ocorre em um meio irradiado por frequências ultrassônicas entre 20 kHz e 10 MHz. Uma onda ultrassônica, é mecânica, e, portanto, ao contrário de uma radiação eletromagnética, não pode alterar estados eletrônicos, vibracionais ou rotacionais de uma molécula. Dessa forma a onda de ultrassom é uma onda de pressão, que alterna ciclos de compressão e expansão (rarefação) ao se propagar por um meio. Neste processo forças de coesão do meio são quebradas, e assim microbolhas contendo gás são geradas (A, Figura 16), e começam a crescer durante os ciclos de compressão/rarefação (B, Figura 16) até que essas bolhas irão colapsar (C, Figura 16).¹²⁷

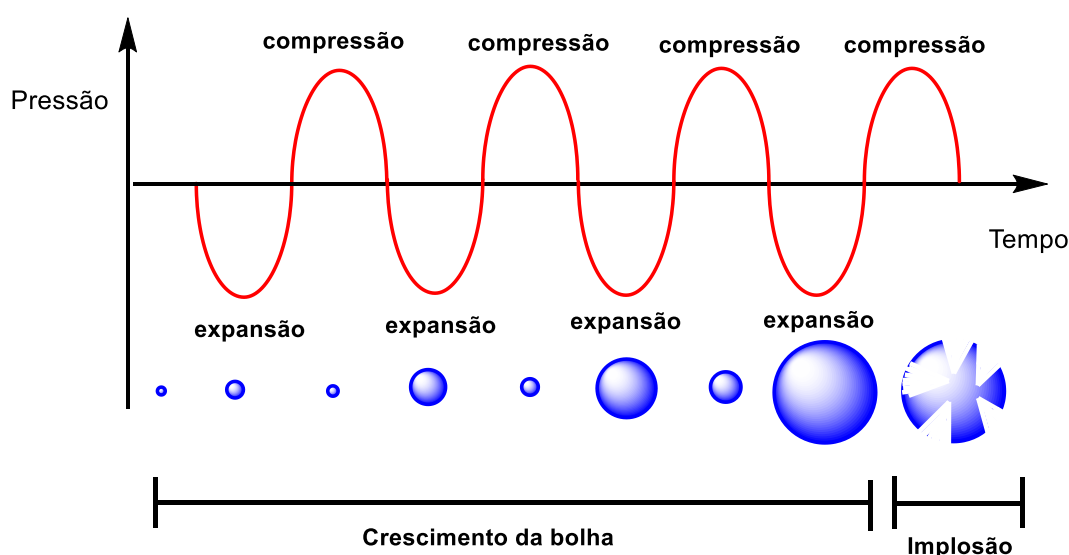


Figura 16: Processo de cavitação de bolhas.

A implosão das bolhas é acompanhada da emissão de luz, que é conhecido como sonoluminescência.¹²⁸ Além disso, são geradas pressões de até 1000 atm e temperaturas de até 5000 K. Caso moléculas voláteis entrem na bolha, as condições extremas geradas durante o colapso são suficientes para a geração de radicais através da homólise das ligações químicas, esse é considerado o efeito químico do ultrassom, estudado pela sonoquímica.¹²⁹ Além disso, pode-se destacar os efeitos mecânicos da propagação de ondas ultrassônicas, que são gerados através das forças de cisalhamento, micro jatos e ondas de choque que ocorrem fora da bolha,

¹²⁶ Cravotto, G.; Cintas, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 180–196. <https://doi.org/10.1039/B503848K>.

¹²⁷ Cintas, P.; Luque, J.-L. Green Chemistry. The sonochemical approach, *Green Chem.* **1999**, 1, 115–125. <https://doi.org/10.1039/A900593E>

¹²⁸ Suslick, K. S.; Flint, E. D. Sonoluminescence from non-aqueous liquids, *Nature*, **1987**, 330, 553–557. <https://doi.org/10.1038/330553a0>.

¹²⁹ Chatel, G.; Varma, R. S. Ultrasound and microwave irradiation: contributions of alternative physicochemical activation methods to green chemistry, *Green Chem.* **2019**, 21, 643–650. <https://doi.org/10.1039/C9GC02534K>.

levando a mudanças no meio, sendo uma delas o aquecimento, devido às ondas de choque ¹²⁵ e outra a melhora dos processos de transferência de massa. ¹³⁰

Devido à capacidade do ultrassom de alterar ou intensificar quimicamente uma reação, principalmente através da diminuição do tempo reacional, essa irradiação tem sido aplicada para a síntese de heterociclos. O ultrassom já foi empregado na preparação de diversos heterociclos nitrogenados de 3 membros, como as aziridinas e heterociclos nitrogenados de cinco membros, com atividades biológicas relevantes. ¹³¹ Além disso, várias sínteses multicomponentes de heterociclos foram realizadas sob irradiação de ultrassom, em protocolos que envolvem tempos reacionais de alguns minutos. ¹³² A aplicação de ultrassom para a síntese de heterociclos, também pode estar associada a condições reacionais que envolvem a utilização de solventes considerados mais verdes, como água e líquidos iônicos, ou até mesmo casos em que solventes não são necessários. ¹³³

A habilidade da onda de ultrassom gerar radicais é um processo que é majoritariamente utilizado no campo da química orgânica, para a geração de polímeros. ^{134,135} Outro processo que também pode gerar radicais é o sono-Fenton. ¹³⁶ Ele foi escolhido por ser capaz de gerar radicais hidroxilas e conseqüentemente radicais carbamoíla, no âmbito do deste trabalho. Esse processo é amplamente utilizado no tratamento de resíduos aquosos para a remoção de compostos orgânicos ¹³⁶, pois a união do processo Fenton e a irradiação de ultrassom pode aumentar a geração de radicais e melhorar o processo de degradação. ¹³⁷

A combinação da irradiação de ultrassom com a tecnologia de fluxo contínuo para propósitos sintéticos é denominada síntese em fluxo acústico, nessa combinação as vantagens associadas à miniaturização dos canais de reação são combinadas aos benefícios associados ao ultrassom. ²⁴ A utilização de reatores em fluxo sob irradiação de ultrassom, para a síntese orgânica não é muito recorrente. Aljbour e colaboradores propuseram um micro-reator capilar

¹³⁰ Cravotto, G.; Gaudino, E. C.; Cintas, P. On the mechanochemical activation by ultrasound, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7521–75324. <https://doi.org/10.1039/C2CS35456J>.

¹³¹ Hussein, E. M.; Khairou, K. S. Sonochemistry: Synthesis of Bioactive Heterocycles, *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2155–2191. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.893360>.

¹³² Banerjee, B. Recent developments on ultrasound-assisted one-pot multicomponent synthesis of biologically relevant heterocycles, *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *35*, 15–35. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.010>

¹³³ Draye, M.; Chatel, G.; Duwald, R. Ultrasound for Drug Synthesis: A Green Approach, *Pharmaceuticals*, **2020**, *13*, 23. <https://doi.org/10.3390/ph13020023>.

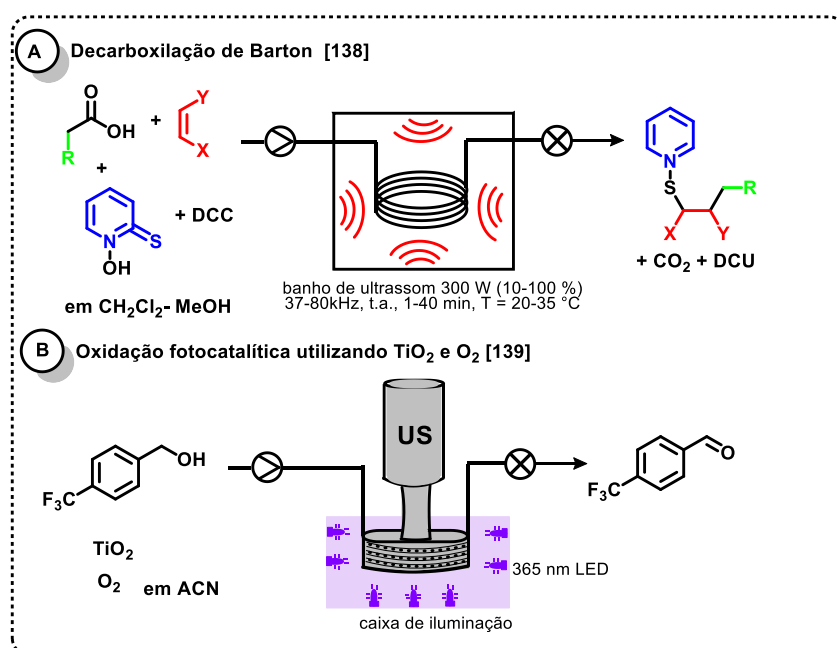
¹³⁴ Székely, A.; Klusmann, M. Molecular Radical Chain Initiators for Ambient- to Low-Temperature Applications, *Chem. Asian, J.* **2019**, *15*, 105–115. <https://doi.org/10.1002/asia.201801636>.

¹³⁵ McKenzie, T.G.; Karimi, F.; Ashokkumar, M.; Qiao, G.G. Ultrasound and Sonochemistry for Radical Polymerization: Sound Synthesis, *Chem. Eu. J.* **2019**, *25*, 5372-5388 <https://doi.org/10.1002/chem.201803771>.

¹³⁶ Mahamuni, N. N.; Adewuyi, Y. G. Advanced oxidation processes (AOPs) involving ultrasound for waste water treatment: A review with emphasis on cost estimation, *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *17*, 990–1003. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.09.005>.

¹³⁷ Jih-Gao, L.; Ying-Shih, M. Oxidation of 2-Chlorophenol in Water by Ultrasound/Fenton Method, *J. Environ. Eng.* **2000**, *126*, 130–137. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2000\)126:2\(130\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:2(130)).

sob irradiação de ultrassom para uma reação multifásica, na qual eles testaram a utilização de um catalisador de transferência de fase, para a preparação do sulfeto de dibenzila. Léonard e colaboradores realizaram uma descarboxilação de Barton em um reator ultrassônico.¹³⁸ Nessa abordagem o ultrassom era responsável pela geração dos radicais e pela degaseificação da mistura reacional. Recentemente, Dong e colaboradores realizaram o design de um reator ultrassônico que possibilita uma reação gás-líquido-sólido envolvendo a conversão fotocatalítica do álcool 4-(trifluorometil)benzílico ao aldeído utilizando-se TiO_2 como fotocatalisador.¹³⁹ Nos exemplos supracitados a principal função da irradiação ultrassônica foi permitir a utilização de um reagente insolúvel sem o entupimento dos canais do reator.



Esquema 40: Trabalhos anteriores utilizando fluxo contínuo e ultrassom.

4. 2. REVISÃO DA LITERATURA

4. 2. 1. Atividades biológicas e metodologias radiculares para a síntese de indolinas

A indolina (22), também denominada benzopirrolidina é um composto heterocíclico aromático, que se apresenta como um biciclo formado por um anel benzênico fusionado a um anel de cinco membros, contendo o átomo de nitrogênio.¹⁴⁰ Dentre os produtos naturais que apresentam a indolina em sua estrutura pode-se destacar a Jerantinina A (23) um alcaloide isolado de *Tabernaemontana corymbosa* que apresentou citotoxicidade contra células de

¹³⁸ –Léonard E. B.; Manginb, F.; Len, C. Barton decarboxylation under ultrasonic continuous flow, *New J. Chem.* **2016**, 40, 7414–7420. <https://doi.org/10.1039/C6NJ01368F>.

¹³⁹ Dong, Z.; Zondag, S. D. A; Schmid, M.; Wen, Z.; Noël, T. *Chem. Eng. J.* **2022**, 428, 130968. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130968>

¹⁴⁰ Silva, T. S.; Rodrigues Jr., M. T. ; Santos, H.; Zeoly , L. A.; Almeida, W. P.; Barcelos, R. C.; Gomes, R. C.; Fernandes, F. S.; Coelho, F. Recent advances in indoline synthesis, *Tetrahedron*, **2019**, 75, 2063-2097. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.02.006>

carcinoma epiteliano.¹⁴¹ O alcaloide Lundurina B (24, Figura 17) é isolado de plantas do gênero *Kopsia*, junto a outras indolinas de estrutura relacionada, e apresenta em sua estrutura a indolina fusionada a uma porção ciclopropano. Alguns testes de citotoxicidade realizados *in vitro* com a Lundurina D, em células B16 de melanoma, mostraram que o composto 24 apresenta atividade citotóxica apreciável contra essas células.¹⁴²

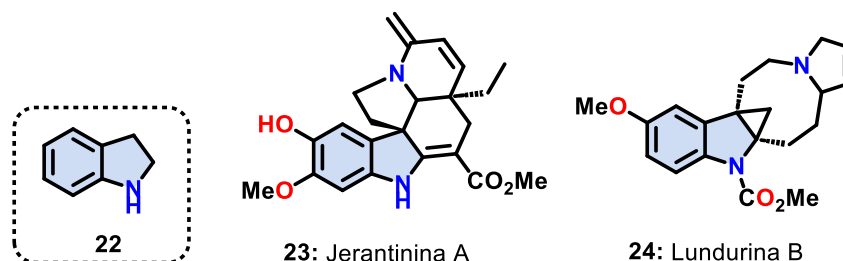
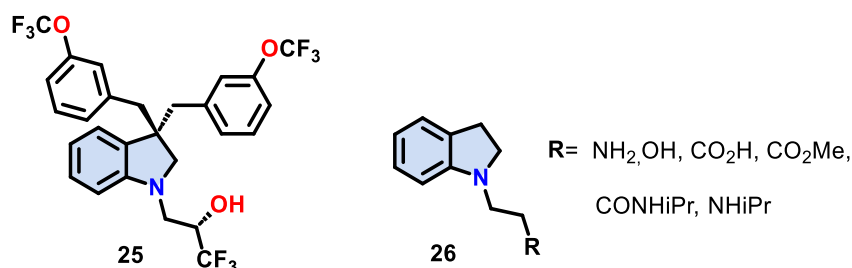


Figura 17: Estruturas da indolina (22) e da Jerantinina (23) e Lundurina B (24).

Compostos sintéticos que possuem o heterociclo **22** também apresentaram atividades biológicas relevantes. Em 2016, químicos da Merck descobriram que a indolina 3,3 dissubstituída **25**, da qual realizaram o design e a síntese, apresentava uma potente atividade inibitória da proteína de transferência de éster de colesterol, do inglês CETP. A inibição dessa proteína pode ajudar com a excreção do colesterol.¹⁴³ As indolinas *N* substituídas **26** foram sintetizadas por Zeeli e colaboradores em 2018¹⁴⁴ e as suas atividades anti-inflamatória e antioxidante foram testadas *in vitro* e *in vivo*. Os autores constataram que as indolinas que apresentam em sua estrutura o grupo R igual ao éster metílico, a isopropilamina ou à isopropilamida podem apresentar efeito terapêutico benéfico em condições patológicas que ocasionem aumento de espécies reativas de oxigênio nos sistemas nervoso central e/ou periférico.



¹⁴¹Lim, K.-H.; Hiraku, O.; Komiyama, K.; Kam, T.-S. Jerantines A-G, Cytotoxic Aspidosperma Alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*, *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1591–1594. <https://doi.org/10.1021/np800435c>.

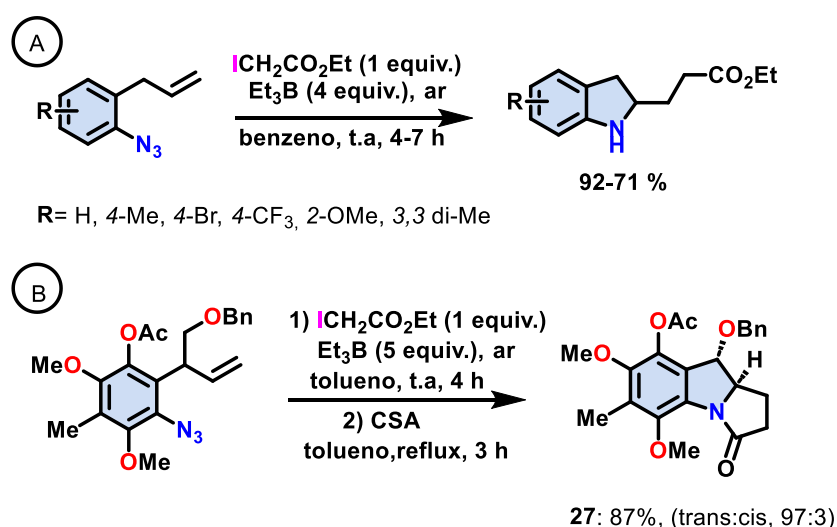
¹⁴² Kam, T.-S.; Lim, K.-H.; Yoganathan, K.; Hayashib, M.; Komiyama, K. Lundurines A–D, cytotoxic indole alkaloids incorporating a cyclopropyl moiety from *Kopsia tenuis* and revision of the structures of tenuisines A–C, *Tetrahedron*, 2004, 60, 10739–10745. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.08.091>.

¹⁴³ Wilson, J. E.; Kurukulasuriya, R.; M. Reibarkh, M. Reiter, A. Zwicker, K. Zhao, F. Zhang, R. Anand, V. J. Colandrea, A.-M. Cumiskey, A. Crespo, R. A. Duffy, B. A. Murphy, K. Mitra, D. G. Johns, J. L. Duffy, P. Vachal, Discovery of Novel Indoline Cholesterol Ester Transfer Protein Inhibitors (CETP) through a Structure-Guided Approach, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 261–265. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00404>.

¹⁴⁴ Zeeli, S.; Weill, T.; Finkin-Groner, E.; Bejar, C.; Melamed, M.; Furman, S.; Zhenin, M.; Nudelman, A.; Weinstock, M. Synthesis and Biological Evaluation of Derivatives of Indoline as Highly Potent Antioxidant and Anti-inflammatory Agents *J. Med. Chem.* 61 (2018) 4004–4019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00001>.

Figura 18: Estruturas de indolinas sintéticas com atividades biológicas.

Existem diversas estratégias de síntese para a preparação de indolinas,¹⁴⁰ entretanto a reação de adição radicalar a substratos com duplas ligações e posterior ciclização é bastante utilizada. Em 2012, Brucelle e Renald propuseram a síntese de indolinas a partir de arilazidas.¹⁴⁵ Os substratos empregados foram *o*-azido-alilbenzenos na presença de iodoacetato de etila e trietilborana (Et₃B) como mostrado no **Esquema 41, A**. A Et₃B foi utilizada como iniciador radicalar na presença de oxigênio, nessas condições foram produzidas indolinas substituídas em rendimentos elevados.

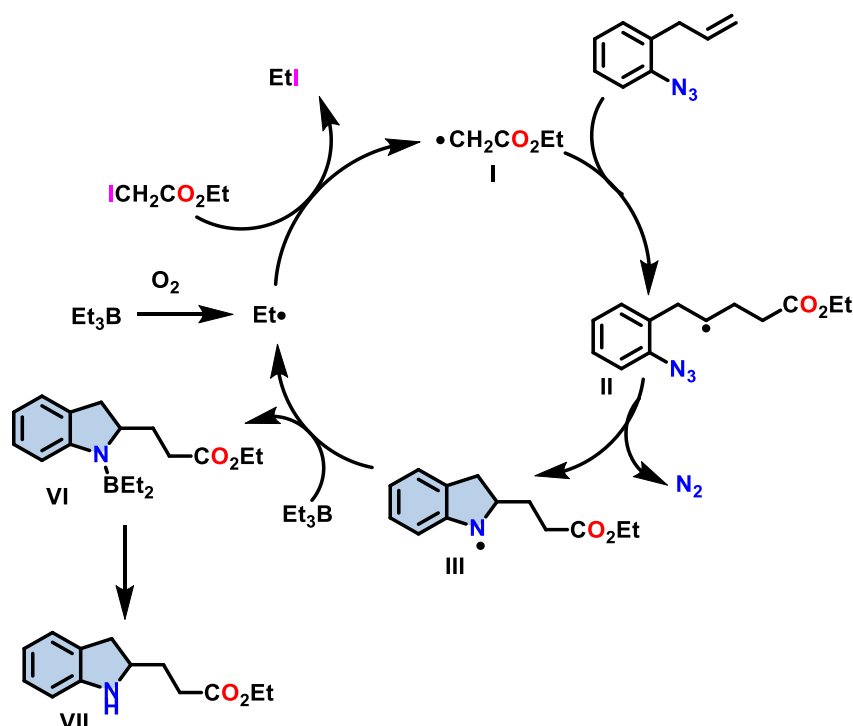
**Esquema 41:** **A)** Metodologia de síntese de indolinas e **B)** aplicação para preparação de leucomitosanes.

No ano seguinte, Brucelle e Renald aplicaram a cascata radicalar desenvolvida para a síntese de um intermediário para a preparação de mitomicinas **Esquema 41, B**. O composto **27** pertence a uma classe de leucomitosanes que foi preparado de maneira *one-pot* e de forma diastereosseletiva.¹⁴⁶

Segundo os autores o processo se inicia com a formação de radicais etila através da oxidação da (Et₃B) pelo oxigênio, **Esquema 42**. Os radicais etila reagem com o iodoacetato de etila para formar iodoetano e o intermediário radicalar **I** que por sua vez se adiciona aos 2-alilazidobenzenos, levando à formação do radical **II** que sofre uma ciclização intramolecular para gerar o radical aminil **III**, o qual interage com o organoboro que está em excesso, levando ao aminoborano **VI**, o qual é hidrolisado para fornecer **VII**.

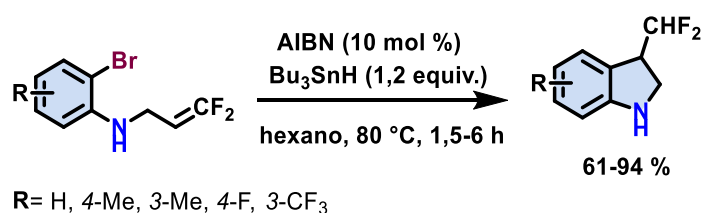
¹⁴⁵ Brucelle, F.; Renaud, P. Synthesis of Indolines, Indoles, and Benzopyrrolizidinones from Simple Aryl Azides, *Org. Lett.* 2012, 14, 3048-3051. <https://doi.org/10.1021/ol301120w>

¹⁴⁶ Brucelle, F.; Renaud, P. Synthesis of a Leucomitosane via a Diastereoselective Radical Cascade, *J. Org. Chem.* 2013, 78, 12, 6245–6252. <https://doi.org/10.1021/jo4009904>.



Esquema 42: Mecanismo para a síntese de indolinas proposto por Brucelle.¹⁴⁵

Em 2014 Fujita e colaboradores¹⁴⁷ empregaram uma estratégia radicalar diferente para a síntese de indolinas, como é possível observar no **Esquema 43**. Nessa abordagem partia-se da 2-bromo-*N*-(3,3-difluoroalil)anilina, o iniciador radicalar empregado foi AIBN e *n*-Bu₃SnH. As indolinas foram produzidas após algumas horas de agitação a 80°C, em rendimentos de bons a elevados. O substrato contendo o grupo retirador CF₃ na posição 3 do anel forneceu o menor rendimento (61%), enquanto que o substrato sem substituinte no anel forneceu o rendimento de 94%.



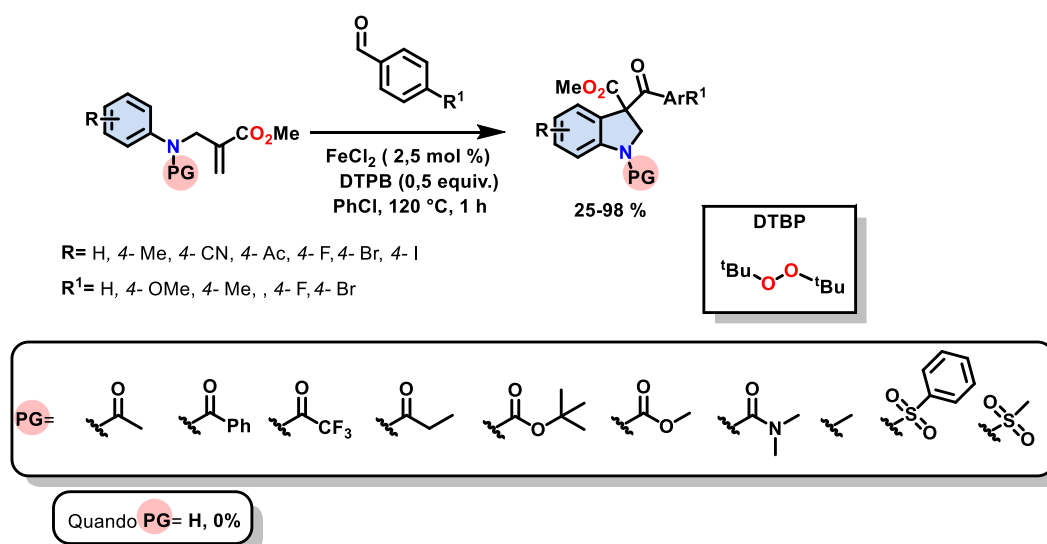
Esquema 43: Síntese de indolinas a partir de 2-bromo-*N*-(3,3-difluoroalil)anilinas.

A síntese de indolinas também foi realizada através da utilização de metil 2-((fenilamino)metil)acrilatos protegidos e benzaldeídos, a reação é catalisada por Fe²⁺ e o oxidante foi DTBP como é descrito no **Esquema 44**.¹⁴⁸ Nessa metodologia o tempo de reação, diferente das outras citadas até o momento, é de apenas uma hora, a reação ocorre em

¹⁴⁷ Fujita, T.; Sanada, S.; Chiba, Y.; Sugiyama, K.; Ichikawa, J. Two-Step Synthesis of Difluoromethyl-Substituted 2,3-Dihydrobenzoheteroles, *Org. Lett.* 2014, 16, 5, 1398–1401. <https://doi.org/10.1021/ol5001582>

¹⁴⁸ Lv, L.; Qi, L.; Guo, Q.; Shen, B.; Li, Z. Iron-Catalyzed Divergent Tandem Radical Annulation of Aldehydes with Olefins toward Indolines and Dihydropyrans, *J. Org. Chem.* 2015, 80, 12562–12571. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02457>

clorobenzeno a 120°C. Os autores avaliaram diferentes grupos protetores no átomo de nitrogênio, e verificaram que grupos de proteção como acetoxi e acetil forneciam os melhores rendimentos das indolinas, enquanto que grupos retiradores de elétrons como trifluoroacetil fornecerem rendimentos isolados menores. Quanto ao benzaldeído precursor do radical acila não foi verificada influência significativa dos grupos substituídos na posição 4 do anel.



Esquema 44: Metodologia de síntese de indolinas a partir de metil 2-((fenilamino)metil)acrilatos.

4. 2. 2. Atividades biológicas de indóis N-fusionados

O núcleo indólico é um *N*-heterocíclo amplamente encontrado na natureza, sua estrutura é composta por um anel benzênico fusionado a um pirrol, sendo uma molécula heteroaromática planar, ele constitui um importante grupo farmacóforo de diversos compostos bioativos.¹⁴⁹ Neste contexto os indóis *N*-fusionados são uma classe de produtos naturais que apresentam atividades biológicas interessantes. Considerando-se os indóis fusionados que apresentam o terceiro ciclo com cinco membros, denominados pirrolo-indóis (28), pode-se destacar como produto natural a Isatisina A (29, Figura 19) que é isolada das raízes de *Isatis indigotica*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças virais.¹⁵⁰ O composto **30** é um análogo sintético da melatonina que mostrou uma maior atividade anti-inflamatória quando comparada à própria.¹⁵¹

¹⁴⁹ Kumaria, A.; Singh, R. K. Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic Prospectives, *Bioorg. Chem.* **2019**, 89, 103021. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103021>

¹⁵⁰ Liu, J.-F.; Jiang, Z.-Y.; Wang, R.-R.; Zheng, Y.-T.; Chen, J.-J.; Zhang, X.-M.; Ma, Y.-B. Isatisine A, a Novel Alkaloid with an Unprecedented Skeleton from Leaves of *Isatis indigotica*, *Org. Lett.* **2007**, 9, 4127–4129. <https://doi.org/10.1021/ol701540y>

¹⁵¹ Elmegeed, G. A.; Baiuomy, A. R.; Abdel-Salam, O. M. E. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of novel synthesized melatonin analogues, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 1285–1292. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.01.027>

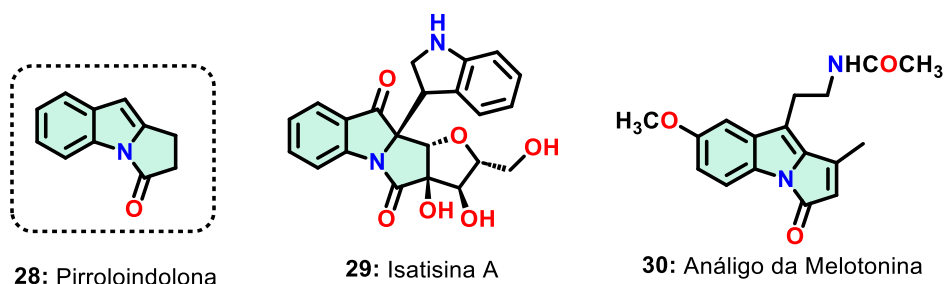


Figura 19: Estruturas da isatisina e do análogo da Melotonina.

Os indóis *N*-fusionados contendo um terceiro ciclo de 6 membros da classe das dihidropirido-indolonas (DHPI, 31) também são encontrados na natureza, por exemplo, a Mersicarpina (32, Figura 20) foi primeiramente isolada do gênero *Kopsia*¹⁵² que é encontrada na Ásia tropical, recentemente mostrou atividade como inibidor da etapa de translação em células de HL-60 (células de leucemia humana).¹⁵³ O composto sintético **33** mostrou-se um inibidor de proteínas HPS90 de fungos, e portanto foi patenteado como um agente antifúngico.¹⁵⁴

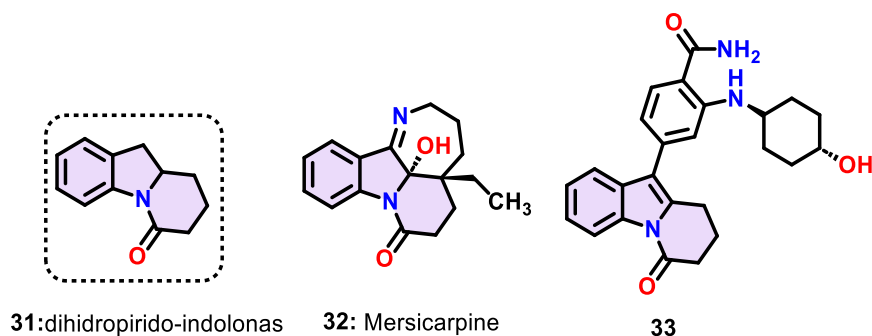


Figura 20: Estrutura da Mersicarpina (32) e do composto sintético **33**.

4. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 3. 1. Aplicação do radical carbamoila para a preparação de indolinas sob irradiação ultrassônica em batelada

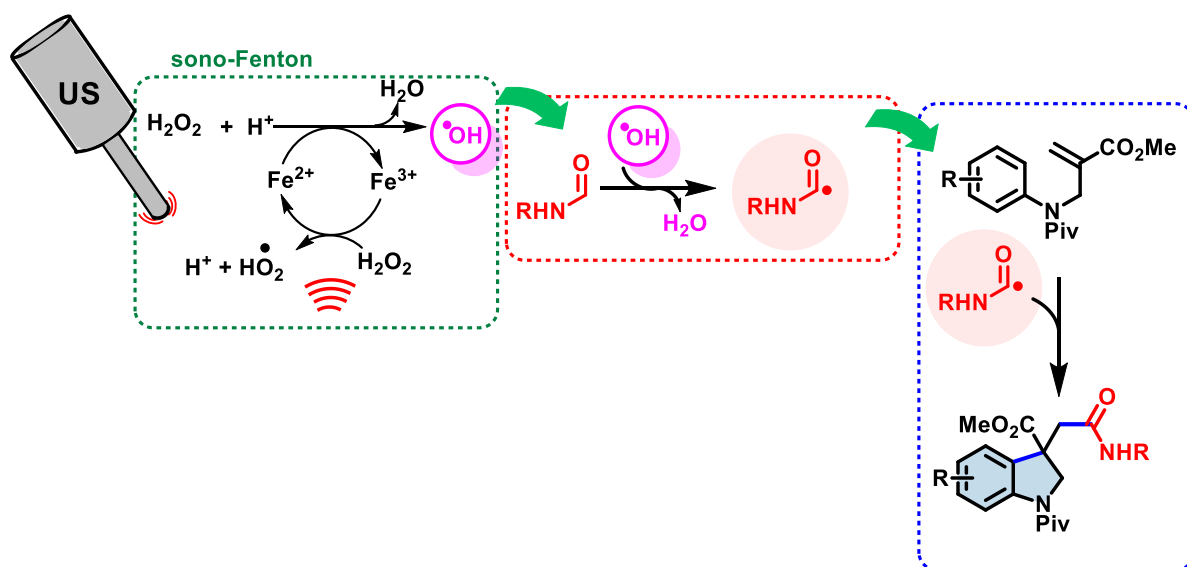
Em busca de formas rápidas de se promover a carbamoilação, e com o objetivo de se preparar indolinas através da utilização do processo sono-Fenton em formamida, o fenil-aminoacrilato (C7a) preparado anteriormente foi utilizado para a exploração da reação sob

¹⁵² Seok, T.; Subramaniam, K. G.; Lim, K.-H.; Choo, Y.-M. Mersicarpine, an unusual tetracyclic dihydroindole alkaloid incorporating a seven-membered imine ring, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45: 5995–5998. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.06.039>

¹⁵³ Shiobara, T.; Nagumo, Y.; Nakajima, R.; Fukuyama, T.; Yokoshima, S.; Usui, T. A novel translation inhibitor, mersicarpine, inhibits S-phase progression and induces apoptosis in HL60 cells, *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **2021**, 85: 92–96. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa070>.

¹⁵⁴ Bureau, P.; Fournier, J.-H.; Jaquith, J. B.; Laurent, A.; Rose, Y.; Proulx, M.; Morris, S. Preparation of aminotetrahydropyridoindolylbenzamide derivatives and analogs as HSP-90 modulators for use in the treatment and prevention of fungal infections, **2012**, WO2012126084,.

irradiação ultrassônica, em batelada. Nessa segunda abordagem, o processo sono-Fenton seria responsável pela geração dos radicais hidroxilas, que por sua vez na presença de formamida gerariam os radicais carbamoíla que através de uma reação de adição/ciclização levariam a formação das indolinas (Esquema 45). A ideia inicial era desenvolver um procedimento simples para a síntese das indolinas, para isso um equipamento de ultrassom comum em laboratório foi utilizado (Branson Digital Sonifier, 20 kHz, 400 W).



Esquema 45: Proposta de aplicação de ultrassom para a síntese de indolinas.

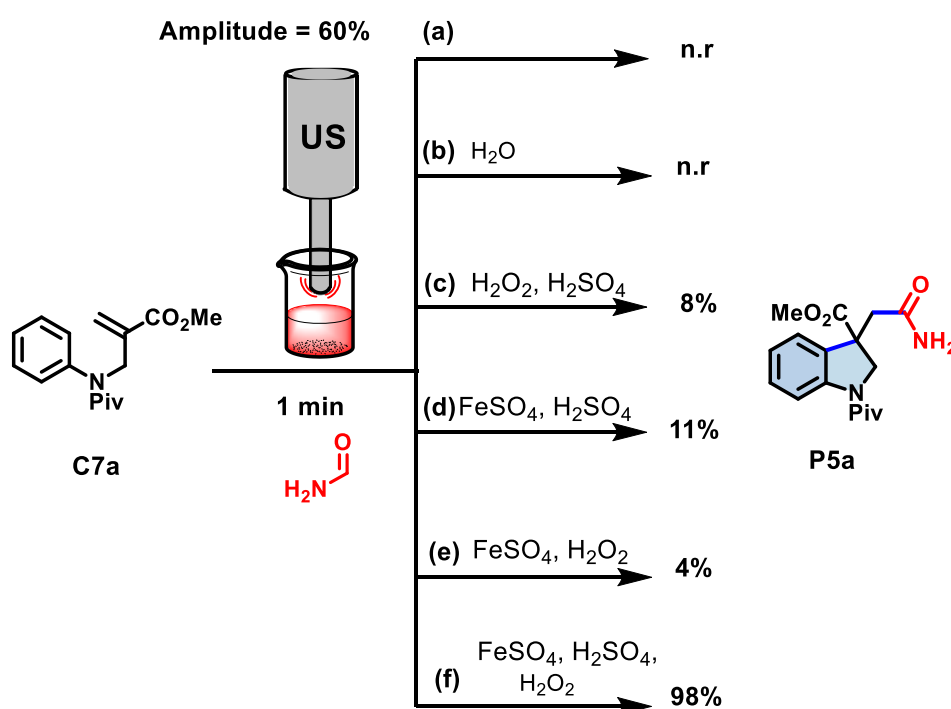
Os experimentos em ultrassom, nessa primeira abordagem (tópico 4. 3. 1.) foram realizados utilizando-se a amplitude em 60%, com o modo contínuo de irradiação e um tempo fixo de 1 minuto foi fixado, todos em batelada.

O primeiro experimento exploratório realizado envolveu a sonicação do composto **C7a** na presença de formamida, nesse caso os componentes da reação de Fenton não foram adicionados. Este experimento visava verificar a possível formação de radicais carbamoíla, a partir da sonicação da formamida. Como é possível notar no **Esquema 46, a)**, após a extração da reação e análise por CG-EM e CCD foi possível observar apenas o material de partida **C7a**. O segundo experimento realizado visava verificar a formação de radicais hidroxilas a partir da sonicação de uma mistura de formamida e água, já que a formação de radicais hidroxilas a partir da água é conhecida.¹⁵⁵ Entetando como é possível verificar no **Esquema 46, b)** a indolina de interesse não foi observada e somente o material de partida foi detectado nas análises por CG-EM e CCD. A formação de radicais através da homólise, a partir da aplicação de ultrassom é efetiva quando são utilizados equipamentos com altas frequências. Os equipamentos de menores frequências, como o de 20 kHz utilizado nos experimentos, geram um tipo de cavitação

¹⁵⁵ Makino, K.; Mossoba, M.M.; Riesz, P. Chemical Effects of Ultrasound on Aqueous Solutions. Evidence for and by Spin Trapping, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 3537 – 3539. <https://doi.org/10.1021/ja00376a064>

conhecido como cavitação estável, neste caso as bolhas criadas nos ciclos de rarefação oscilam durante a compressão e rarefação, e por consequência aumentam seu tamanho aos poucos, nesse caso, se algum radical é formado no interior da bolha ela acaba preso, não entrando em contato com as espécies no seio da solução. Por outro lado, se um equipamento de maior frequência for utilizado, como por exemplo, 1 MHz, as bolhas formadas crescem e implodem rapidamente, em uma cavitação denominada transiente, nesse caso, as espécies radicalares são liberadas durante o colapso, podendo interagir com as espécies em solução.¹⁵⁶

O próximo experimento realizado envolveu a utilização de alguns dos reagentes envolvidos no processo Fenton, com exceção do catalisador Fe^{2+} , nesse caso como é possível observar no **Esquema 46, c)** o cromatograma da reação extraída mostrou a formação de 8% da indolina **P5a** após 1 minuto de irradiação. Nesse experimento é possível verificar que houve a formação de radicais hidroxila, porém não se pode afirmar que a origem deles seja a homólise da ligação O–O devido ao processo de cavitação. Como a temperatura dessas reações não era controlada durante a sonicação, a fim de se aproveitar toda a energia liberada pelo equipamento, a temperatura nesses experimentos variava entre a temperatura ambiente e 120°C durante o tempo de 1 minuto, o que também pode causar a homólise da ligação O–O do peróxido de hidrogênio.

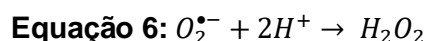
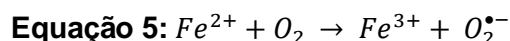


Esquema 46: Experimentos exploratórios com substrato **C7a** em ultrassom **(a)** **C7a** (0,15 mmol), HCONH₂ (3 mL); **(b)** **C7a** (0,15 mmol, 1,0 equiv.) H₂O ultrapura (100 μL), HCONH₂ (2,9 mL); **(c)** **C7a** (0,15 mmol, 1,0 equiv.) H₂O₂ (2 equiv.), H₂SO₄ (1 equiv.), HCONH₂ (3 mL); **(d)** FeSO₄ (1 mol %) H₂SO₄ (1

¹⁵⁶ Somaglino, L.; Bouchoux, G.; Mestas, J.-L.; Lafon, C. Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode: Application to in vitro drug release from liposomes, *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 577–588. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.009>

equiv.), HCONH₂ (3 mL); **e**) FeSO₄ (1 mol %) H₂O₂ (2 equiv.), **f**) FeSO₄ (1 mol %) H₂O₂ (2 equiv.), H₂SO₄ (1 equiv.), HCONH₂ (3 mL).

A seguir, como é possível observar no **Esquema 46, d**) nesse experimento também foi observada a formação em 11% de conversão do produto de interesse, como não houve a adição de peróxido de hidrogênio, algum outro mecanismo levou a formação de radicais hidroxila. Durante os experimentos, não foi realizado nenhum procedimento de remoção de O₂ do meio reacional, desse modo, as reações das **Equações 5 e 6** podem ocorrer, em pequena proporção:¹⁵⁷



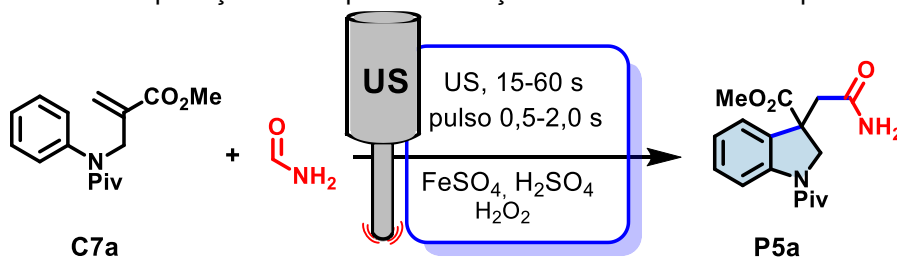
Como a oxidação do Fe²⁺ pelo oxigênio pode ocorrer em pequenas quantidades em água, para a formação do ânion radical superóxido, acredita-se que essa possa ser a via de formação de radicais que leve à observação do produto **P5a**. A seguir, a remoção do ácido no experimento do **Esquema 46, e**) também levou a detecção em conversão irrisória do material de partida para a indolina de interesse, nesse caso, a reação de Fenton acontece, entretanto como o meio reacional não está ácido, não se observou a formação do produto em quantidade apreciável. Por fim, quando todos os componentes da reação de Fenton são sonicados na presença de formamida, dentro de 1 minuto é possível observar 98% de conversão no produto desejado.

A seguir, foi realizado o estudo do tempo de exposição ao ultrassom para alcançar uma alta conversão na indolina **P5a**. Como é possível observar na **Entrada 1, Tabela 8**, aplicando-se um tempo de 15 segundos, apenas 4 % de conversão na respectiva indolina foi observada, ao se aplicar 30 segundos de irradiação contínua foi observada uma alta conversão no produto desejado, 84 % (Entrada 2, Tabela 8), por fim ao se aplicar 60 segundos de irradiação contínua foi verificada 98 % de conversão no produto de interesse, e nesse caso, o rendimento isolado foi de 90 % (Entrada 3, Tabela 8).

A seguir o efeito da utilização do ultrassom pulsado foi verificado. A opção de ultrassom pulsado disponível no equipamento permite que seja definido um tempo no qual a sonda está ligada e emitindo ondas, alternado um tempo desligada, desse modo, sem a irradiação. Como é possível notar na **Entrada 4, Tabela 8**, a utilização do ultrassom pulsado por 15 segundos com a sonda ligada por 1,0 segundo e desligada por 1,0 segundo levou a uma conversão de 38% na respectiva indolina. Ao se aumentar o tempo para 30 segundos, mantendo o mesmo pulso, foi verificada uma conversão de 87 % na indolina (Entrada 5, Tabela 8), já com o tempo de 60 segundos, foi possível observar 99% de conversão no produto **P5a** com recuperação de 97% de

¹⁵⁷ Santana-Cassiano, J. M.; Gonzáles-Dávila, M.; Millero, F. J. Oxidation of Nanomolar Levels of Fe(II) with Oxygen in Natural Waters, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 2073-2079.

rendimento isolado, como verificado na **Entrada 6, Tabela 8**. A seguir optou-se por verificar o efeito da variação do tempo do pulso emitido pelo equipamento. Desse modo, ao se diminuir o pulso para 0,5 s ligado e 0,5 s desligado, praticamente a mesma conversão no produto **P5a** foi alcançada, 94% (Entrada 7, Tabela 8), ao se aumentar o pulso ligado para 2,0 segundos e desligado 2,0 segundos uma alta conversão também foi observada (Entrada 8, Tabela 8). Por outro lado, quando o pulso utilizado foi de 1,0 segundos ligado e 2,0 segundos desligado, observou-se uma diminuição efetiva da conversão para a respectiva indolina, apenas 26 % de conversão foi verificada na **Entrada 9, Tabela 8**. Esse fato pode ser explicado pela rápida diminuição da temperatura do meio durante os 2 segundos em que a sonda estava desligada. A utilização de um pulso de 2,0 segundos com a sonda ligada e 1,0 desligada, levou a uma conversão alta, porém ainda menor do que no caso da Entrada 10, Tabela 8. Desse modo, ficou constatado que a utilização do pulso 1,0:1,0 durante 1 minuto seria mais adequada para o alcance de um ótimo rendimento isolado.

Tabela 8: Exploração do tempo de irradiação e modo de ultrassom pulsado.^a

Entrada	Tempo(s)	Pulso ON:OFF (s) ^d	P5a (%) ^b
1	15	-	4
2	30	-	84
3	60	-	98 (90) ^c
4	15	1,0:1,0	38
5	30	1,0:1,0	87
6	60	1,0:1,0	99 (97) ^c
7	60	0,5:0,5	94
8	60	2,0:2,0	98
9	60	1,0:2,0	26
10	60	2,0:1,0	70

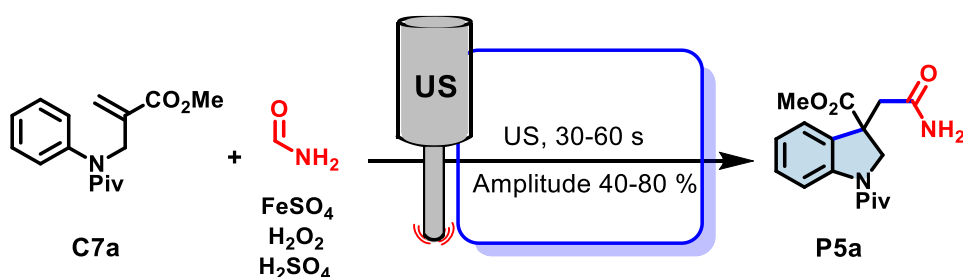
^a C7a (0,15 mmol), FeSO₄·7H₂O (1 mol%), H₂SO₄ (0,15 mmol), H₂O₂ (0,30 mmol) e formamida (3 mL).

^b Conversão determinada por CG-EM.

^c Rendimentos isolados de P5a entre parênteses.

^d Amplitude do US = 60%

Após o estudo do efeito do pulso na reação, outro parâmetro que foi estudado foi a amplitude da onda ultrassônica, que está relacionada à força da onda ultrassônica irradiada, este parâmetro é diretamente proporcional à potência emitida pelo equipamento ao quadrado. Desse modo, quanto maior a amplitude da onda de ultrassom, maior a energia fornecida ao meio. Em um primeiro momento foi verificado o efeito da amplitude na reação realizada em formamida, como é possível verificar na **Entrada 1, Tabela 9**, a utilização de um tempo de irradiação de 30 segundos com a amplitude de 40 % levou a uma conversão de 7 % na indolina, quando um tempo de 60 segundos foi empregado na mesma amplitude, uma conversão de 82 % foi obtida, na **Entrada 2, Tabela 9**. Quando a amplitude de 50 % foi utilizada durante 60 segundos foi verificado 98 % de conversão e 85 % de rendimento isolado, como observado na **Entrada 3, Tabela 9**. Ao se utilizar uma amplitude de 60 % durante 30 segundos, uma conversão de 84 % foi verificada, porém com 60 segundos de irradiação 98 % de conversão foi alcançada com 91 % de rendimento isolado, como mostrado nas **Entradas 4 e 5, Tabela 9**. Ao se utilizar a amplitude de 80 %, **Entradas 6 e 7, Tabela 9**, observou-se intensa formação de bolhas no meio, e a mistura reacional não aparentava-se homogênea ao longo do tempo, com muitas bolhas sendo formadas, esse fato culminou em nenhuma conversão observada, na **Entrada 6**, e uma baixa conversão com 60 segundos. Desse modo, verificou-se que a utilização de uma amplitude de 60 % durante 60 segundos fornecia o melhor rendimento isolado da indolina P5a.

Tabela 9: Exploração da amplitude do ultrassom para a produção de P5a.^a

Entrada	Tempo(s)	Amplitude (%)	P5a (%) ^b
1	30	40	7
2	60	40	82
3	60	50	98 (85) ^c
4	30	60	84
5	60	60	98 (91) ^c
6	30	80	-
7	60	80	36

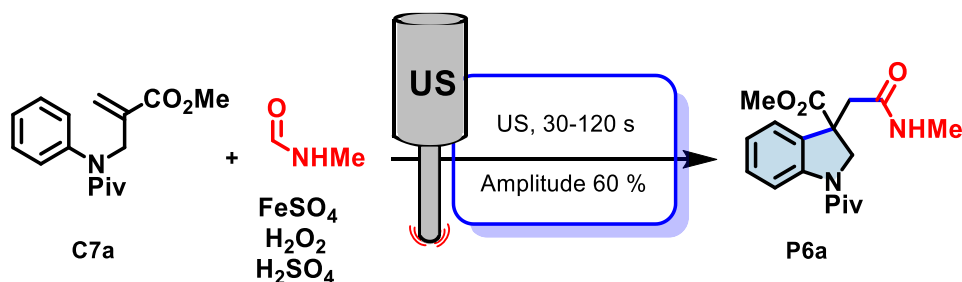
^a C7a (0,15 mmol), FeSO₄·7H₂O (1 mol%), H₂SO₄ (0,15 mmol), H₂O₂ (0,30 mmol) e formamida (3 mL).

^b Conversão determinada por CG-EM.

^c Rendimentos isolados de P5a entre parêntesis.

Determinadas as melhores condições para a síntese de indolinas a partir da formamida, foram então estudados os parâmetros para a utilização da *N*-metil-formamida como solvente e fonte de radicais carbamóila para a produção de indolinas. Como é possível observar na **Entrada 1, Tabela 10**, a utilização do ultrassom contínuo durante 30 segundos, não levou a nenhuma conversão significativa para a indolina P6a. Aumentando-se o tempo de irradiação com ultrassom contínuo para 60 segundos, uma baixa conversão foi verificada, na **Entrada 2, Tabela 10**, quando um tempo de 120 segundos foi utilizado com ultrassom contínuo, verificou-se 99 % de conversão do material de partida C7a na indolina de interesse, como verificado na **Entrada 3, Tabela 10**. Decidiu-se então verificar o efeito do ultrassom pulsado na conversão, em um primeiro momento utilizou-se 30 segundos de irradiação pulsada, em pulso de 1,0 segundo com a sonda ligada e 1,0 segundo com a sonda desligada, **Entrada 4, Tabela 10**, nesse caso uma baixa conversão foi verificada. Utilizando-se 45 segundos de irradiação, um aumento na conversão foi verificado, porém ao se utilizar 60 segundos de irradiação ultrassônica pulsada, 98 % de conversão foi alcançada, com 68 % de rendimento isolado, como descrito nas **Entradas 5 e 6, Tabela 10**. Ao se aumentar o tempo de reação para 120 segundos, como é possível observar na **Entrada 7, Tabela 10**, a conversão se manteve elevada e um aumento do rendimento isolado foi verificado (75 %). Desse modo, apesar da **Entrada 7** fornecer um rendimento isolado um pouco maior, por questões de produtividade a **Entrada 6** foi escolhida como a melhor condição.

Tabela 10: Exploração da *N*-metil formamida para a síntese de *N*-metil acetamida indolina (**P6a**) sob irradiação ultrassônica.^a



Entrada	Tempo (s)	Pulso ON:OFF (s)	P6a (%) ^b
1	30	-	-
2	60	-	5
3	120	-	99
4	30	1,0:1,0	24
5	45	1,0:1,0	85
6	60	1,0:1,0	98 (68) ^c
7	120	1,0:1,0	99 (75) ^c

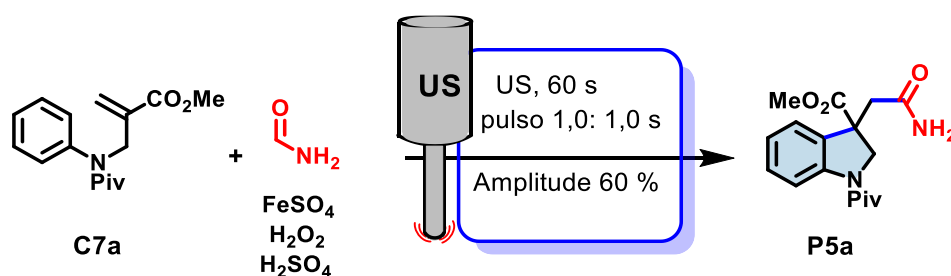
^a **1a** (0,15 mmol), FeSO₄ (1 mol%), H₂SO₄ (0,15 mmol), H₂O₂ (0,30 mmol) e *N*-metilformamida (3 mL).

^b Conversão determinada por CG-EM.

^c Rendimentos isolados de **P6a** entre parêntesis.

Uma vez estudado o efeito do pulso na reação, decidiu-se verificar o papel da estequiometria de cada um dos componentes da reação na conversão e rendimento isolado das indolinas. Como é possível observar, na **Entrada 1, Tabela 11**, a diminuição de 0,5 equivalentes de ácido sulfúrico forneceu uma conversão elevada de 98 %, entretanto, o rendimento isolado recuperado foi de 79%, indicando a importância da utilização de 1,0 equivalentes de H₂SO₄, apesar de que o ácido seja catalítico, segundo o mecanismo, acredita-se que algum processo de protonação do acrilato (C7) possa ocorrer, por isso a demanda por 1 equivalente. A seguir na **Entrada 2, Tabela 11**, foi removido 1,0 equivalente do oxidante H₂O₂, nesse caso, apesar de ser observada uma conversão elevada de 96 %, um rendimento isolado baixo de 34% foi recuperado, isso pode estar relacionado à necessidade de pelo menos 1 equivalente de radical hidroxila na etapa de rearomatização do intermediário radicalar **I** (Esquema 49). Apenas quando 1,0 equivalente de ácido sulfúrico e 2,0 equivalentes de peróxido de hidrogênio foram utilizados, **Entrada 3, Tabela 11**, foi possível verificar uma alta conversão associada ao alto rendimento isolado (97%).

Tabela 11: Exploração da concentração dos reagentes de Fenton para a produção de **P5a** em ultrassom pulsado.^a



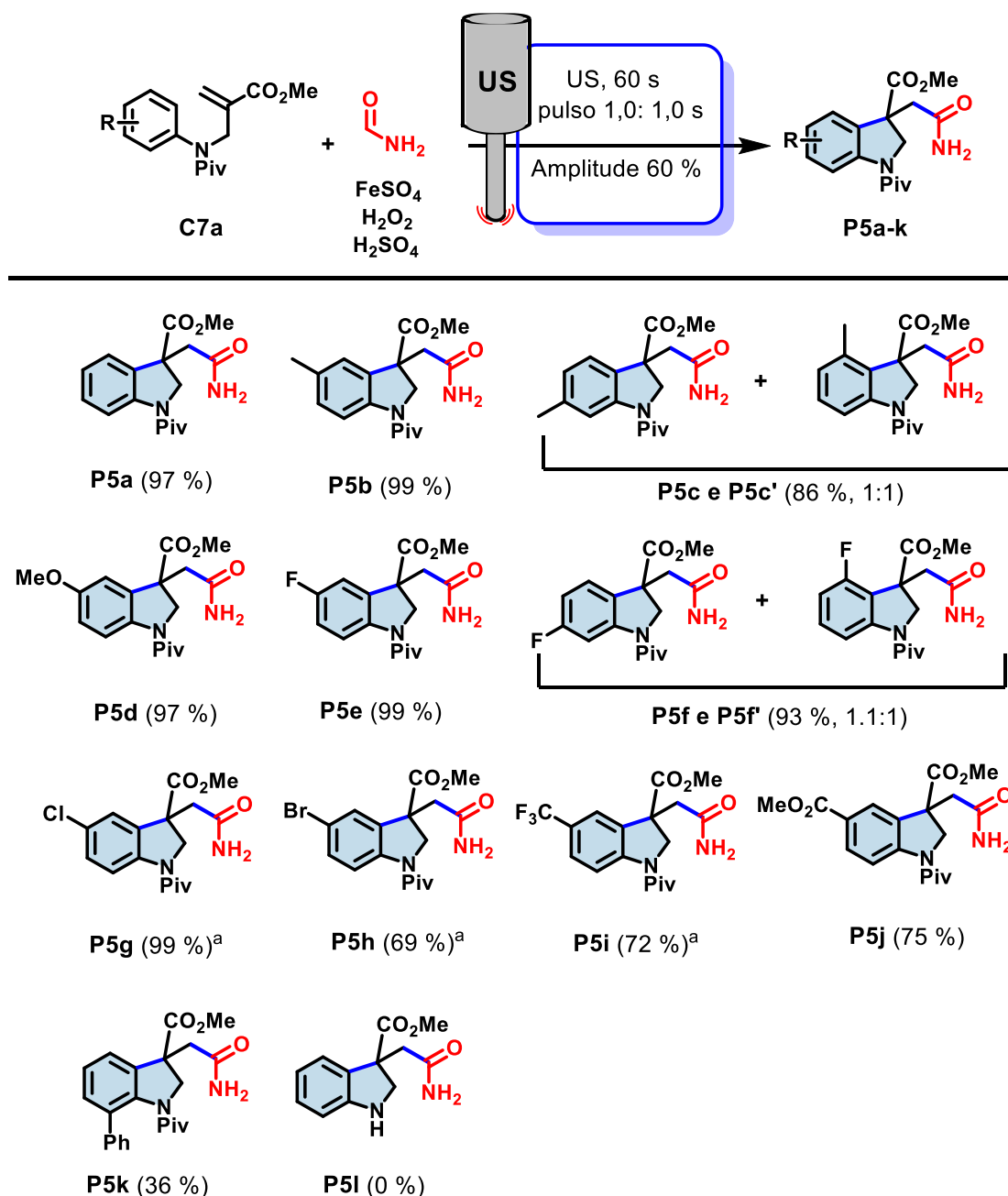
Entrada	FeSO ₄ (mol%)	H ₂ SO ₄ (equiv.)	H ₂ O ₂ (equiv.)	P5a (%) ^b
1	1,0	0,5	2	98(79) ^c
2	1,0	1,0	1	96(34) ^c
3	1,0	1,0	2	96(97) ^c

^a **C7a** (0,15 mmol) e formamida (3 mL).

^b Conversão determinada por CG-EM.

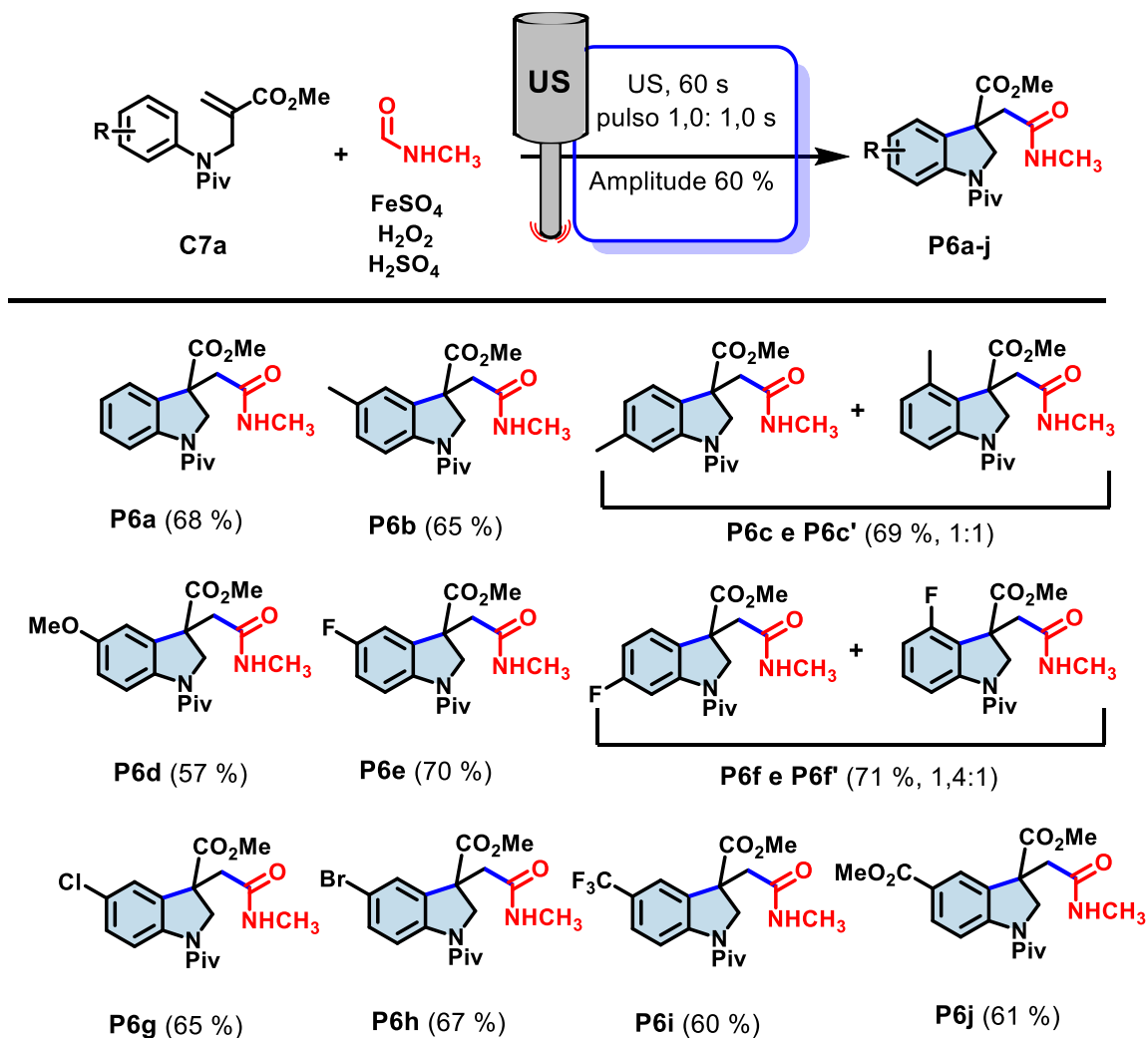
^c Rendimento isolado de **P5a** entre parênteses.

Estabelecidas as melhores condições os 2-(((*N*-aril)amino)metil)acrilatos substituídos foram utilizados para a realização do escopo de substratos. As reações utilizando formamida como solvente foram realizadas com ultrassom pulsado (1,0 s : 1,0 s), o que levou a 30 segundos de irradiação ultrassônica efetiva. Nas condições da **Tabela 8, Entrada 6**, o substrato modelo, sem substituintes no anel, levou a formação da indolina **P5a** em alto rendimento isolado de 97 % (Esquema 47). O substrato contendo o grupo metila na posição 4 do anel forneceu a indolina **P5b** com rendimento isolado de 99 %. Já no caso do grupo metila na posição 3 do anel do amino acrilato, o rendimento isolado foi de 86 %, sendo que, não houve seletividade na posição de ciclização, já que a proporção de regioisômeros obtidos foi de 1:1, **P5c** e **P5c'** (segundo RMN ¹H); **Esquema 47**. Quando um grupo fortemente doador de elétrons como a metoxila estava presente na posição 4 do anel aromático, o rendimento isolado da indolina **P5d** também foi excelente, como mostra o **Esquema 47**. Quando o flúor estava presente na posição 4 do anel do amino acrilato ou na posição 3, altos rendimentos isolados de 99 % e 93 % respectivamente foram obtidos, como descrito no **Esquema 47** (**P5e** e **P5f** e **P5f'**). Para a preparação das indolinas **P5g**, **P5h** e **P5i**, devido à baixa solubilidade dos substratos, foi necessária a utilização de 30 % de ^tBuOH como cossolvente. Como mostra o **Esquema 47**, quando o substrato com cloro substituído na posição 4 do anel foi utilizado, a indolina **P5g** foi obtida em elevado rendimento isolado, quando um tempo de irradiação de 2 minutos foi utilizado. O mesmo tempo foi necessário para a obtenção dos rendimentos isolados de 69 % (**P5h**) e 72 % (**P5i**), respectivamente, no caso dos substratos contendo, os substituintes 4-Br e 4-CF₃. Já no caso da utilização do grupo éster carboxílico substituído na posição 4 do anel, um alto rendimento isolado também pôde ser obtido, **P5j**, **Esquema 47**. Quando o grupo fenila estava presente na posição 2 do anel do amino acrilato, um baixo rendimento isolado de 36 % foi obtido.



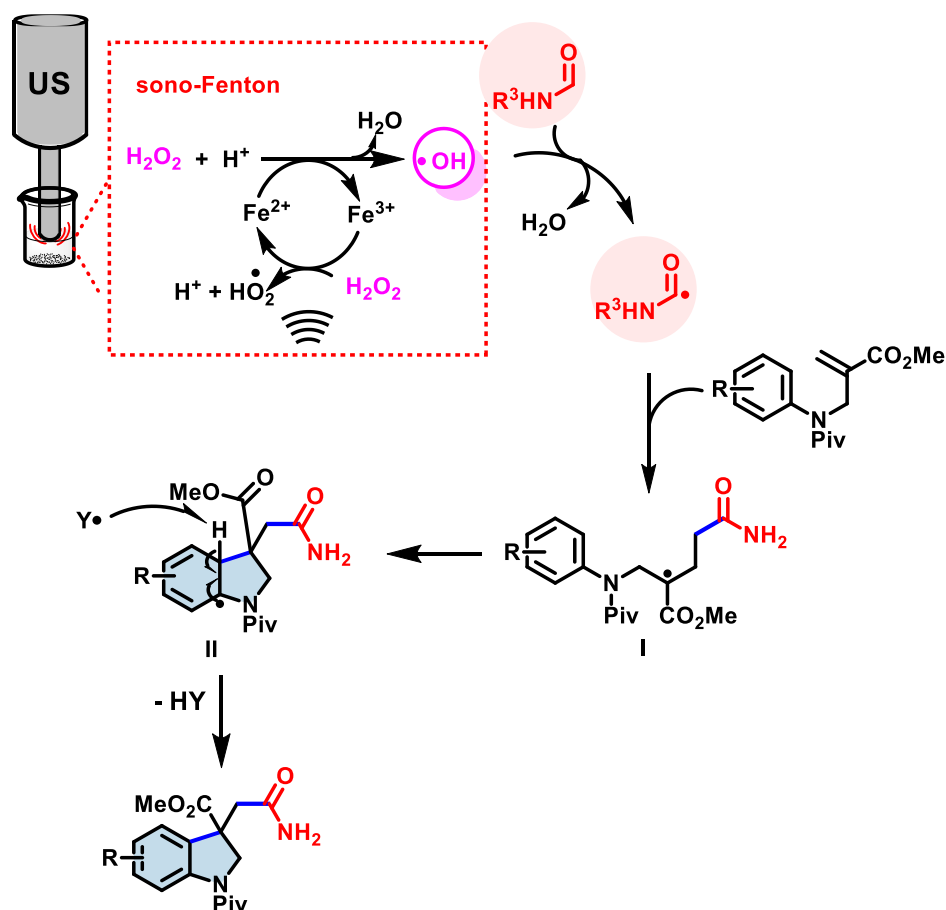
Esquema 47: Escopo de substratos para a formamida. ^a Rendimento isolado para 2 minutos de irradiação.

A seguir o escopo de substratos foi realizado com a *N*-metil formamida como solvente da reação. O amino acrilato sem substituição no anel, forneceu o rendimento isolado foi de 68% da indolina **P6a** (Esquema 48). No caso dos amino acrilatos contendo grupos doadores de elétrons, nas posições 4 e 3 do anel, as indolinas foram obtidas em rendimentos de moderados a altos **P6b**, (65%) **P6c** (69%), **P6d** (57%). Quando halogênios como F, Cl e Br estavam presentes na posição 4 do anel, os rendimentos se mantiveram de altos a moderados, **P6e**, (70%), **P6f e P6f'** (71%), **P6g** (65%), **P6h** (67%). Já no caso dos substratos substituídos com um grupo fortemente retirador como 4-CF₃ e 4-CO₂Me os rendimentos isolados das indolinas **P6i** (60%) e **P6j** (61%) foram ligeiramente menores.



Esquema 48: Escopo de substratos em *N*-metil formamida.

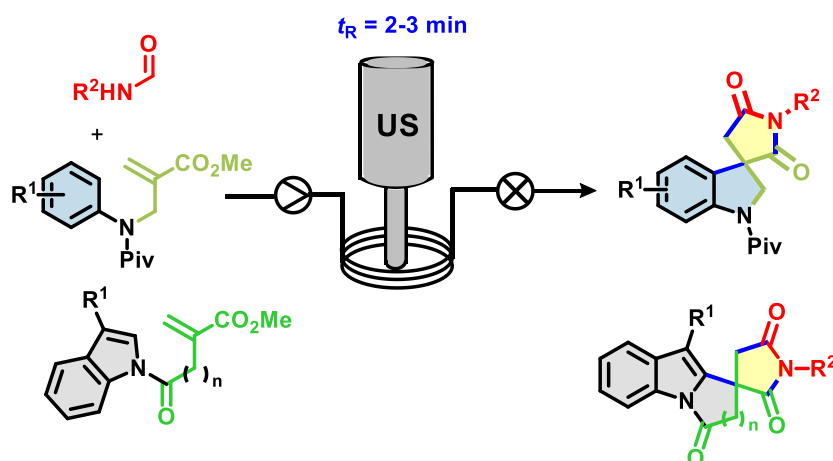
O mecanismo proposto começa com a reação entre o H_2O_2 e o Fe^{2+} para a geração dos radicais hidroxila em meio ácido. A seguir os radicais hidroxila reagem com a formamida abstraindo um átomo de hidrogênio para gerar radicais carbamoila. Este por sua vez ataca a ligação dupla ($\text{C}=\text{C}$) do éster acrílico do substrato 2-(((*N* aril)amino)metil)acrilato para gerar o intermediário radicalar **I** que sofre uma ciclização intramolecular com o anel aromático, formando o intermediário **II**, o mesmo é então oxidado para gerar as indolinas. A regeneração das espécies de Fe^{2+} pode ocorrer na etapa de rearomatização ou na reação entre o Fe^{3+} e H_2O_2 para formar o complex $\text{Fe}-\text{O}_2\text{H}^+$, o qual gera íons Fe^{2+} e radicais HO_2^\bullet , essa reação é intensificada quando é submetida à irradiação de ultrassom.¹³⁷



Esquema 49: Mecanismo proposto para a síntese de indolinas sob irradiação de ultrassom.

4. 3. 2. Aplicação do radical carbamoíla para a síntese de indóis *n*-fusionados e espiroimidaz sob irradiação ultrassônica

Considerando a eficiência encontrada para a síntese de indolinas através da irradiação de ultrassom. Planejou-se a utilização de uma reação de carbamoílação seguida da imidação em um sistema de fluxo contínuo. A aplicação da irradiação ultrassônica foi realizada para permitir a formação de novos compostos espiros em um arranjo *one-pot* através do processo sono-Fenton em condições de fluxo contínuo, visando uma rápida produção, que evitasse etapas de purificação. Desse modo, a partir da utilização de derivados do ácido acrílico, os metil 2-((*N*-fenilpivalamido)metil)acrilatos (C7a-k) e metil 5-(1H-indol-1-il)-2-metileno-5-oxopentanoatos (C9a e b) e de derivados do ácido itacônico, os metil 4-(1H-indol-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoatos (C8a e b), seria possível preparar respectivamente espiro[indolina-succinimidas], espiro[pirrolo-indol-succinimidas] e espiro[pirido-indol-succinimidas].



Esquema 50: Proposta de utilização de irradiação ultrassônica para a síntese *one-pot* de compostos espiros.

Desse modo foi envisioneda a montagem do reator, como mostra a **Figura 21**, uma bomba de seringa foi utilizada para infundir os reagentes (A), um tubo de HPFA (Perfluoroalcoxialcanos de alta pureza) enrolado em forma de bobina foi utilizado como um reator (B). Nessa montagem a sonda ultrassônica (C) foi inserida no centro do reator em forma de bobina, e ambos foram inseridos em um banho de glicerol (D). O reator foi conectado a um regulador de pressão traseira (75 psi) (E) e o efluente que deixava o reator era coletado em frascos (F).

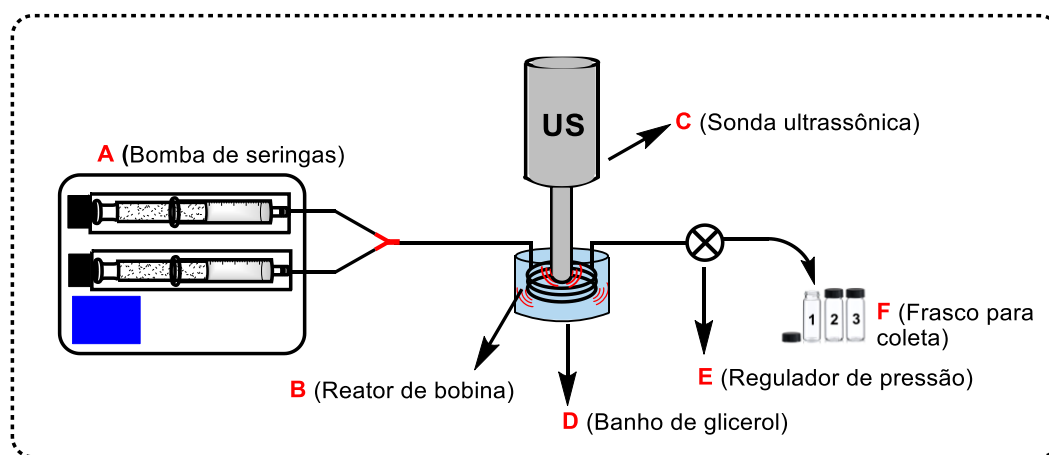
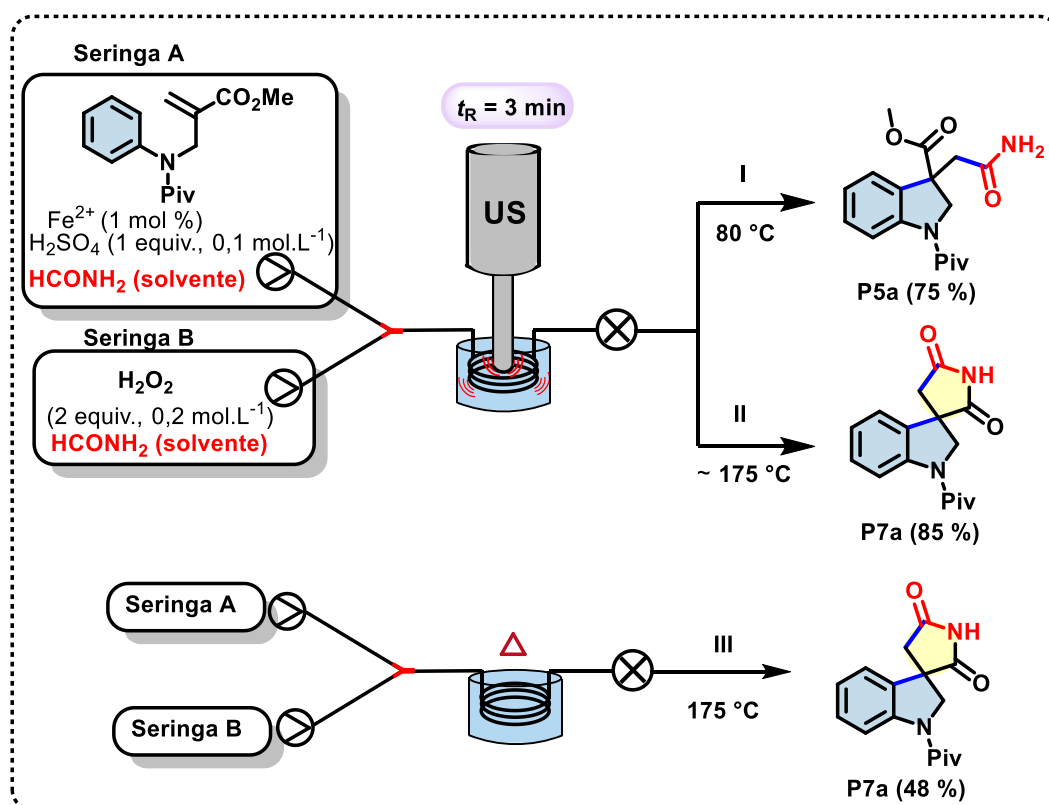


Figura 21: Representação da montagem do reator em fluxo sob irradiação ultrassônica.

De posse do reator, experimentos exploratórios foram realizados em fluxo com o objetivo de se alcançar a síntese de espiroimidaz de maneira *one-pot*. O glicerol foi escolhido como líquido para o banho do reator, pois ele apresenta: baixa pressão de vapor, alta viscosidade e alto ponto de ebulição, além de ser considerado um solvente verde.¹⁵⁸ Dois experimentos foram realizados, no primeiro deles, como mostra o **Esquema 51** utilizou-se o controle da temperatura durante a reação em fluxo, o banho de glicerol foi mantido a 80°C, através de um sistema de

¹⁵⁸ Cintas, P.; Tagliapietra, S.; Gaudino, E.C.; Palmisano, G.; Cravotto, G. *Green Chem.* **2014**, *16*, 1056–1065. <https://doi.org/10.1039/C3GC41955J>

refrigeração com circulação de água. Já no segundo experimento a temperatura do banho não foi controlada, desse modo, variou durante o tempo de injeção, sendo que durante o tempo de coleta para produção, a temperatura média foi 175 °C, notou-se que, após a etapa de estabilização do reator e coleta das amostras para análise, a temperatura alcançava cerca de 160 °C e até o final da coleta do efluente para a produção, a temperatura chegava a 190 °C, em um tempo total de 76 minutos de operação. Como foi possível observar a formação eficiente da espiroimida **P7a**, no segundo experimento optou-se por não realizar o controle da temperatura, aproveitando-se o aumento da mesma, que foi promovido pela irradiação ultrassônica.



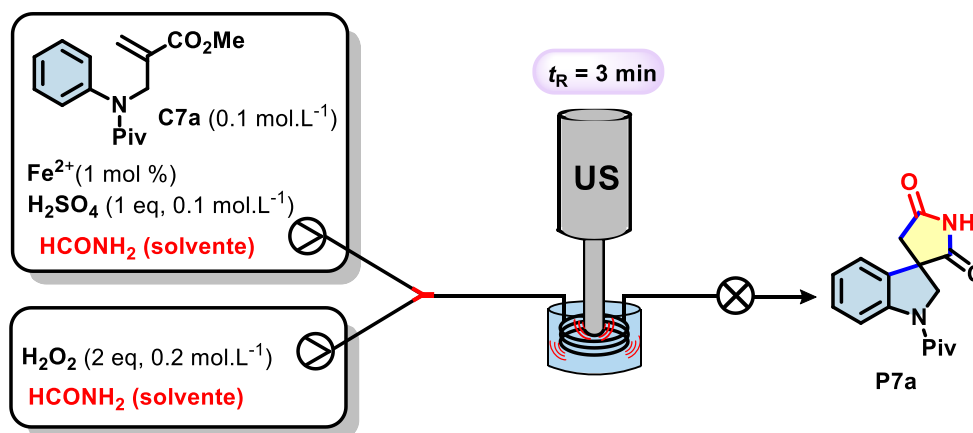
Esquema 51: Experimentos exploratórios em fluxo contínuo.

Como mostrado no **Esquema 51**, nesse experimento exploratório as soluções contendo os reagentes foram carregadas em duas seringas. A seringa A continha o metil 2-((N-fenilpivalamido)metil)acrilato **C7a** (0,1 mol. L⁻¹), preparado anteriormente, o catalisador FeSO₄ (1 mol%), o H₂SO₄ (0,1 mol. L⁻¹) em formamida, a seringa B continha solução aquosa de H₂O₂ (0,2 mol. L⁻¹) em formamida. Como disposto no **Esquema 51** (I). A reação sob irradiação de ultrassom que foi mantida a 80° C foi realizada com tempo de residência (t_R) de 3 minutos e o produto final foi a indolina **P5a** em 75 % de rendimento isolado. Entretanto quando a temperatura não foi controlada e aplicado o t_R de 3 minutos, **Esquema 51** (II) a espiroimida desejada **P7a** foi então isolada em rendimento isolado de 85 %. Com esses experimentos ficou evidente a necessidade da realização da reação em alta temperatura, para que, a etapa de imidação ocorresse após a etapa de carbamoilação. Desse modo, considerando o objetivo de se realizar a carbamoilação e em seguida a reação de imidação em um processo *one-pot*, foi escolhida a condição que não



envolvia o controle da temperatura. A título de comparação uma reação “em silêncio” foi realizada, nesse caso, utilizou-se o sistema em fluxo descrito no **Esquema 51**, porém empregou-se o aquecimento convencional, com uma chapa e a temperatura foi mantida durante toda a operação do reator em 190 °C. O mesmo tempo de residência foi utilizado ($t_R = 3$ min). Nesse experimento o produto **P7a** foi isolado em 48 % de rendimento, indicando a maior eficiência do aquecimento ultrassônico e possivelmente a existência de efeitos relacionados a melhoria de processos de transferência de massa, quando a reação é realizada sob irradiação.

O composto **C7a** foi escolhido como modelo para otimização das condições da reação. Para a investigação das condições da reação, a amplitude da irradiação ultrassônica foi mantida, em um primeiro momento em 50 %. Como mostra a **Entrada 1, Tabela 12**, a utilização de um t_R de 4 minutos forneceu 81% de conversão para o produto **P12a**. Quando foi aplicado um t_R menor de 3 minutos, **Entrada 2, Tabela 12** foi verificada maior conversão por CG-EM e um rendimento isolado de 85 %. A diminuição no t_R da **Entrada 1** para a **Entrada 2** e o aumento na conversão, pode estar relacionado à uma degradação do material de partida, promovida pelas condições de Fenton, já que a CCD do bruto reacional da **Entrada 1** mostrou uma mancha mais intensa na linha de aplicação. A seguir, mantendo-se a amplitude ultrassônica a 50 %, um t_R de 2 minutos foi utilizado na **Entrada 3, Tabela 12**, ao se empregar esse menor t_R notou-se que o produto majoritário obtido era a indolina **P5a**, e o composto ciclizado **P7a** correspondia a cerca de 10 % de conversão por CG-EM. Posteriormente, se diminuiu a amplitude ultrassônica para 40 %, como mostra a **Entrada 4, Tabela 6**, nesse experimento o t_R aplicado foi de 4 minutos, a conversão por CG-EM obtida foi de 82 %, porém o rendimento isolado foi de 70 %, indicando novamente que o t_R de 4 minutos levava a uma degradação do material de partida, ou até mesmo do produto formado, devido ao maior tempo de exposição às condições de Fenton. A fim de evitar essa degradação, a amplitude do ultrassom foi ajustada para 30 % e o t_R foi mantido em 4 minutos, na **Entrada 5, Tabela 12**, porém nesse caso, apenas 50 % do produto **P7a** foi verificado por CG-EM, sendo que a indolina não ciclizada foi detectada. A **Entrada 6, Tabela 12** mostra o experimento no qual, a amplitude foi mantida a 50 %, o t_R de 3 minutos foi utilizado e o ultrassom pulsado, com a razão de 1,0 s: 1,0 s, nesse caso a indolina **P5a** foi o produto majoritário e apenas traços do composto ciclizado foram detectados.

Tabela 12: Exploração das condições da reação em fluxo contínuo sob irradiação ultrassônica.

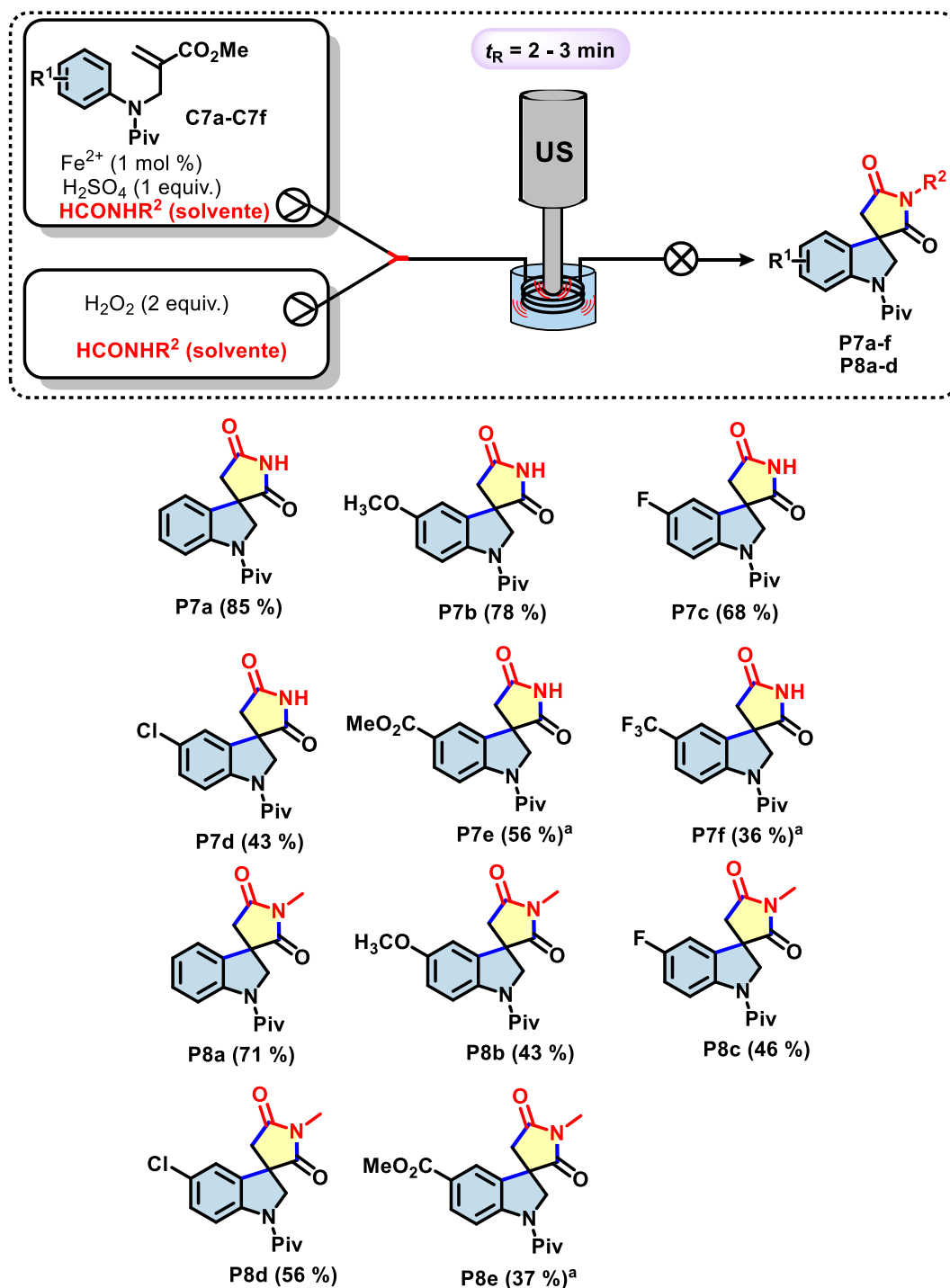
Entrada	Amplitude US (%)	t_R (min)	P7a (%) ^b
1	50	4	81
2	50	3	86 (85) ^c
3	50	2	10 ^d
4	40	4	82 (70) ^c
5	30	4	50
6	50	3	traços ^{d,e}

^aCondições de reação dentro do reator: metil 2-((*N*-fenilpivalamido)metil)acrilato **C7a** (0,05 mol. L⁻¹), H₂SO₄ (0,05 mol. L⁻¹), FeSO₄ (1 mol%), H₂O₂ (30% *m/m* solução aquosa, 0,1 mol. L⁻¹) e formamida (solvente); volume do reator = 400 μL; sonda ultrassônica 20 kHz; regulador de pressão traseira = 75 psi; tempo de operação total = 76 min; 175 °C (Temperatura média). ^b Conversões foram determinadas por análise no CG-EM. ^c Rendimento isolado. ^d O intermediário foi detectado como produto majoritário. ^e Pulso ON:OFF (s) (1,0: 1,0).

Obtidas as condições otimizadas para a preparação das espiro[indolina-succinimidas], de maneira *one-pot*, as mesmas foram aplicadas para a exploração do escopo de substratos, com a reação de Fenton em formamida como solvente. O substrato modelo **C7a** forneceu um rendimento isolado de 85 % da imida **P7a**, **Esquema 52**, quando foram utilizados 3 minutos de t_R e a amplitude do ultrassom em 50 %. A seguir foi utilizado o composto com substituição de um grupo doador de elétrons (4-OMe), nesse caso, o rendimento isolado foi de 78 % para a imida **P7b**, **Esquema 52**. A seguir, foram utilizados substratos contendo halogênios substituídos no anel aromático, o produto contendo o grupo 4-F foi obtido em rendimento isolado de 68 % (P7c, **Esquema 52**), quando o grupo 4-Cl estava presente no material de partida o rendimento isolado caiu para 43 % da imida **P7d**, **Esquema 52**. A seguir foi empregado o substrato contendo o grupo éster, 4-CO₂Me que é retirador de elétrons, nesse caso aplicando-se o tempo de residência de 3 minutos, obteve-se um rendimento isolado de 33 % da imida **P7e** desse modo, optou-se por diminuir o tempo de residência. Um t_R de 2 minutos foi utilizado e dessa forma o produto **C7e** foi obtido com 56 % de rendimento isolado da imida **P7e**, **Esquema 52**. Quando o substrato contendo o grupo 4-CF₃ também fortemente retirador de elétrons por indução foi utilizado

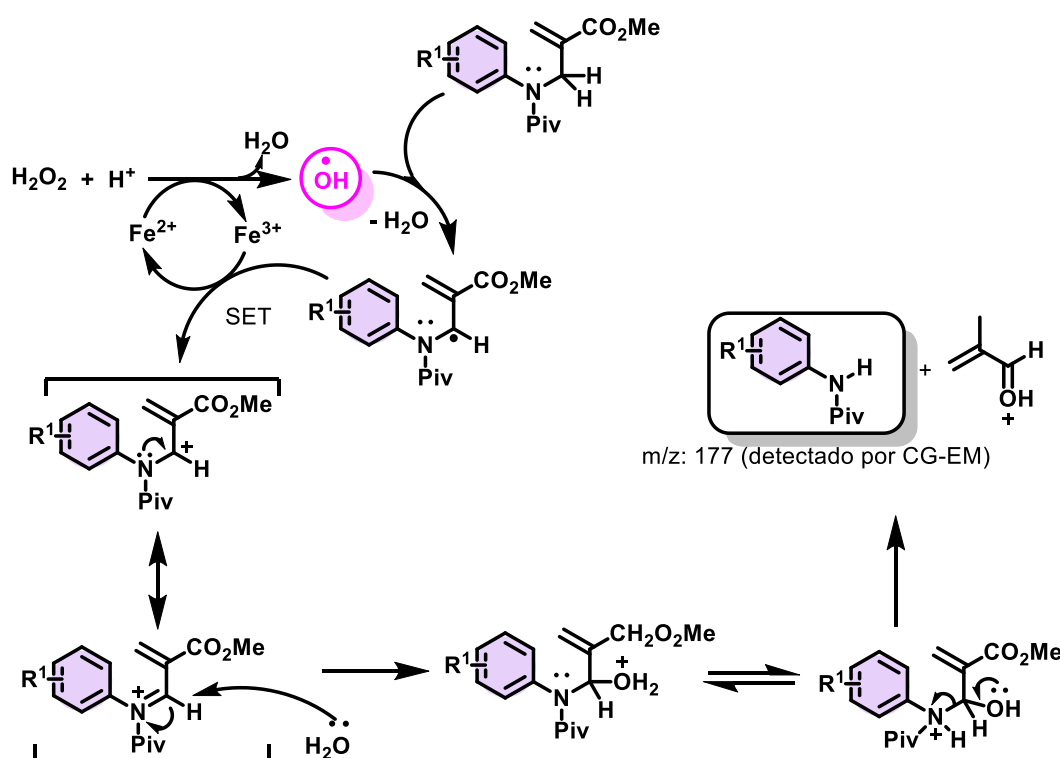
aplicando-se um t_R de 3 minutos, um rendimento isolado de 25 % foi obtido. Desse modo foi aplicado um t_R de 2 minutos, nessas condições a imida **P7f**, **Esquema 52** foi obtida em rendimento isolado de 36 %.

Em seguida o escopo reacional de substratos foi realizado para a preparação das espiro[indolina-succinimidas] em *N*-metil formamida como solvente, aplicando-se o t_R de 3 minutos. Parap substrato modelo **C7a**, nessas condições o rendimento isolado de 71 % foi obtido para a imida **P8a**, **Esquema 52**. A seguir foi utilizado o substrato contendo o grupo 4-OMe nesse caso, a imida **P8b** foi isolada em rendimento de 43 %, como é possível observar no **Esquema 52**. A seguir, foram explorados os substratos contendo halogênios, o exemplo com o grupo 4-F forneceu um rendimento isolado de 46 % da respectiva imida **P8c**, enquanto que o substrato contendo o grupo 4-Cl forneceu um rendimento isolado de 56 % para a imida **P8d**. Quando o substrato contendo o grupo éster metílico (*p*-CO₂Me) foi utilizado o rendimento isolado da espiro imida **P8e** foi de 37 %, **Esquema 52**, porém nesse caso o t_R de 2 minutos foi utilizado.



Esquema 52: Escopo de substratos para a preparação de espiro[indolina-succinimidas], a partir de formamidas.

Durante os experimentos em fluxo contínuo foi verificada a formação de um subproduto, que surgiu devido à natureza do material de partida. O subproduto formado foi observado na CCD, no cromatograma da reação extraída e apresentava a m/z correspondente ao material de partida sem o grupo alquila ligado ao nitrogênio. Ao se verificar a presença desse subproduto em todas as reações extraídas considerou-se que o ambiente altamente oxidante associado à elevada temperatura favoreceu uma dealquilação. O **Esquema 53** mostra o mecanismo proposto para sua formação.

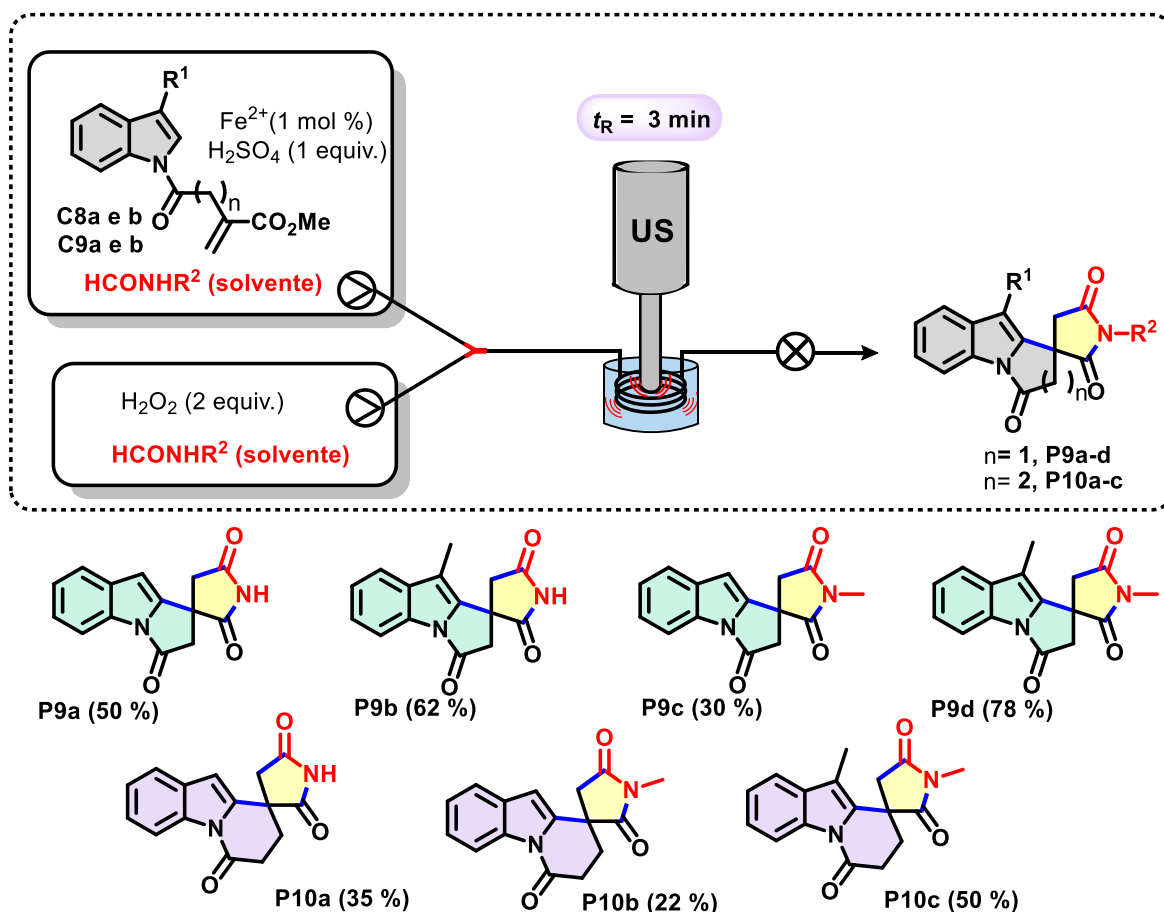


Esquema 53: Mecanismo proposto para a reação de dealquilação do material de partida **C7a**.

Após a utilização do reator ultrassônico para a produção das espiro[indolina-succinimidas] ser realizada com a obtenção de rendimentos elevados e bons dos produtos finais. A seguir foi avaliado o escopo dos metil 4-(1H-indol-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoatos (**C8a** e **b**) para a construção de indóis fusionados ligados a uma succinimida através do carbono espiro. Em um primeiro experimento o composto indólico **C8a** contendo a função amida derivada do ácido itacônico foi utilizado para avaliar a eficiência das condições reacionais anteriores, para essa nova classe de substratos, desse modo o t_R foi mantido a 3 min e a formamida foi investigada como fonte de C-N.

Como é possível observar no **Esquema 54**, a espiro[pirrolo-indol-succinimida] **P9a** foi obtida em rendimento isolado de 50 %, considerado bom. A seguir foi utilizado o composto **C8b**, contendo um grupo metila substituído na posição 3 do anel do indol, a espiro imida **P9b** foi obtida em ótimo rendimento isolado de 62 %, **Esquema 54**. A seguir a *N*-metil formamida foi utilizada como fonte de C-N, o composto padrão contendo o anel indólico sem substituintes forneceu a imida **P9c** em 30 % de rendimento isolado, enquanto que a amida **C8b** forneceu a imida **P9d** em excelente rendimento isolado de 78 % como descrito no **Esquema 54**. Para a avaliação do escopo dos metil 5-(1H-indol-1-il)-2-metileno-5-oxopentanoatos (**C9a** e **b**), o mesmo t_R de 3 minutos foi utilizado para explorar a obtenção das espiro[pirrido-indol-succinimidas]. O composto **C9a** na presença de formamida forneceu a imida **P10a** em modesto rendimento isolado de 35 % como mostra o no **Esquema 54**, quando a *N*-metilformamida foi utilizada como fonte de C-N, o rendimento obtido foi de 22 % para a respectiva imida **P10b**, **Esquema 54**. O material de partida

contendo o anel do indol substituído com o grupo metila na posição 3 forneceu a imida **P10c** em bom rendimento isolado de 50 %, como é possível observar no **Esquema 54**. Uma característica notável desta sequência reacional é a complexidade dos produtos obtidos, através de uma série de reações realizadas em um único fluxo em bons rendimentos, o que é algo desejável do ponto de vista da química verde.^{25,28}



Esquema 54: Escopo de substratos para a síntese de indóis *N*-fusionados.

4. 4. CONCLUSÃO PARCIAL

Em suma, foi desenvolvida uma metodologia direta e de fácil aplicação para a síntese de indolinas sob irradiação ultrassônica. A irradiação de ultrassom foi essencial para promover a rápida regeneração de Fe²⁺ no meio, aumentando assim a geração de radicais carbamoíla. O equipamento utilizado é facilmente encontrado em laboratórios de química. O uso do processo sono-Fenton em formamida combinado aos 2-(((*N*-aril)amino)metil)acrilatos forneceram uma ampla gama de indolinas substituídas em elevados rendimentos, e um tempo curto. A seguir com o intuito de se expandir ainda mais a aplicação do ultrassom, envisionou-se um sistema em fluxo contínuo no qual diversas espiroimidias foram preparadas de maneira rápida e *one-pot*. O *set-up* utilizado pode ser considerado mais eficiente do que a primeira abordagem realizada no **tópico 3**, p.56, pois evitou a necessidade de troca de solvente, adição de bases e realização de

purificação por cromatografia, além de ser uma metodologia com maior eficiência temporal e eficiência na criação de funcionalizadas complexas de maneira direta. Os próximos passos também envolvem a realização de ensaios biológicos com os novos compostos obtidos.

CAPÍTULO V

**Síntese de novas indolinas através do
radical carbamoíla gerado a partir do
TBADT**

CAPÍTULO V

5 SÍNTESE DE NOVAS INDOLINAS ATRAVÉS DO RADICAL CARBAMOÍLA GERADO A PARTIR DO TBADT

5. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROPOSTA PARA A PREPARAÇÃO DE INDOLINAS

A família dos polioxometalatos (POMs) inclui os ânions de óxidos moleculares metálicos contendo três ou mais centros com metais em seu mais alto estado de oxidação. Há algumas décadas esta classe de óxidos têm se destacado devido às propriedades interessantes que apresentam ao atuarem como fotocatalisadores.¹⁵⁹ O Decatungstato de tetrakis(tetrabutilamônio) (do inglês TBADT) pertence à vasta família dos polioxometalatos (POMs) e é frequentemente utilizado como a fonte do ânion decatungstato. O ânion decatungstato devido à sua robustez como fotocatalisador já foi empregado com propósitos sintéticos, na funcionalização de

¹⁵⁹ Tanielian, C. Decatungstate photocatalysis, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 178–180, 1165–1181.

alcanos,^{160,161,162,163} em processos de aminação,^{164,165} oxidações,^{166,167}, na funcionalização de heteroaromáticos,^{168,169} e na funcionalização de alcenos ativados¹⁷⁰ e não ativados.¹⁷¹

Como destacado anteriormente, o TBADT ou $(n\text{-Bu}_4\text{N})_4[\text{W}_{10}\text{O}_{32}]$ é um fotocatalisador amplamente utilizado em metodologias de funcionalização de ligações C-H, ele catalisa tanto reações de transferência de hidrogênio (HAT), como reações de transferência de elétrons (SET), a natureza do processo dependerá das propriedades redox do substrato.¹⁷² Independente de qual o mecanismo observado, ambos levarão ao TBADT monoreduzido, como mostra a **Figura 22**.

Ao ser irradiado com uma das fontes de energia citadas no paragrafo anterior, o TBADT apresenta uma transição eletrônica com caráter de transição de transferência de carga ligante-metal.¹⁷² O resultado é a formação de um estado singleto excitado (S1) que rapidamente decai para o estado triplete, **wO** (T) que é a espécie química que vai interagir com os substratos orgânicos. O TBADT fotoexcitado abstrai um átomo de hidrogênio do substrato orgânico (HAT) formando a sua espécie reduzida $(\text{H}^+)[\text{W}_{10}\text{O}_{32}]^{5-}$, dependendo do potencial de oxidação da

¹⁶⁰ Molinari, A.; Amadelli, R.; Andreotti, L.; Maldotti, A. Heterogeneous photocatalysis for synthetic purposes: oxygenation of cyclohexane with H₃PW₁₂O₄₀ and (nBu₄N)₄W₁₀O₃₂ supported on sílica, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 1203–1204.

¹⁶¹ Laudadio, G.; Govaerts, S.; Wang, Y.; Ravelli, D.; Koolman, H.F.; Fagnoni, M.; Djuric, S. W.; Noël, T. Selective C(sp³)–H Aerobic Oxidation Enabled by Decatungstate Photocatalysis in Flow, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 4078–4082.

¹⁶² Laudadio, G.; Deng, Y.; Van der wal, K.; Raavelli, D.; Nuño, M.; Fagnoni, M.; Guthrie, D.; Sun, Y.; Noël, T. C(sp³)–H functionalizations of light hydrocarbons using decatungstate photocatalysis in flow. *Science*, **2020**, 369, 92–96.

¹⁶³ Wen, Z.; Meheshwari, A.; Sambiagio, C.; Deng, Y.; Laudadio, G.; Van Aken, K.; Sun, Y.; Gemoets, H. P. L.; Noël, T., Optimization of a Decatungstate-Catalyzed C(sp³)–H Alkylation Using a Continuous Oscillatory Millistructured Photoreactor, *Org. Process Res. Dev.* **2020**, 24, 2356–2361.

¹⁶⁴ Ryu, I.; Tani, A.; Fukuyama, T.; Ravelli, D.; Montanaro, S.; Fagnoni, M. Efficient C-H/C-N and C-H/C-CO-N Conversion via Decatungstate Photoinduced Alkylation of Diisopropyl Azodicarboxylate. *Org. Lett.* **2013**, 15, 2554–2557.

¹⁶⁵ Supranovich, V.I.; Levin, V. V.; Dilman, A.D.; Radical Addition to N-Tosylimines via C–H Activation Induced by Decatungstate Photocatalyst, *Org. Lett.* **2019**, 21, 4271–4274.

¹⁶⁶ Hyodo, M.; Iwano, H.; Tasakado, T.; Fukuyama, T.; Ryu, Ilhyong, Using High-Power UV-LED to Accelerate Decatungstate-Anion-Catalyzed Reaction: A Model Study for the Quick Oxidation of Benzyl Alcohol to Benzoic Acid Using Molecular Oxygen, *Micromachines*, **2021**, 12, 1307.

¹⁶⁷ Wang, H.; Giordino, G. J.; Chen, R.; Yang, C.; Niu, J.; Wang, D.; Photocatalytic Depolymerization of Native Lignin toward Chemically Recyclable Polymer Networks. *ACS Cent. Sci.* **2023**, 9, 48–55.

¹⁶⁸ Quattrinii, M. C.; Fujii, S.; Yamada, K.; Fukuyama, T.; Ravelli, D.; Fagnoni, M.; Ryu, I. Versatile Cross-Dehydrogenative Coupling of Heteroaromatics and Hydrogen Donors via Decatungstate Photocatalysis, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 2335–2338.

¹⁶⁹ Varletg, T.; Bouchet, D.; Van Elslande, E.; Mansson, G.; Decatungstate-Photocatalyzed Dearomative Hydroacylation of Indoles: Direct Synthesis of 2-Acylindolines, *Chem. Eur. J.* **2022**, 28, e202201707.

¹⁷⁰ Cruise, A.; Baumnn, M.; TBADT- Mediated C-C Bond Formation Exploiting Aryl Aldehydes in a Photochemical Flow Reactor, *ChemCatChem* **2023**, 15, e202201328

¹⁷¹ Prieto, A.; Taillefer, M.; Visible-Light Decatungstate/Disulfide Dual Catalysis for the Hydro-Functionalization of Styrenes, *Org. Lett.* **2021**, 23, 1484–1488.

¹⁷² Ravelli, D.; Fagnoni, M.; Fukuyama, T.; Nishikawa, T.; Ryu, I. Site-Selective C–H Functionalization by Decatungstate Anion Photocatalysis: Synergistic Control by Polar and Steric Effects Expands the Reaction Scope. *ACS Catal.* **2018**, 8, 701–713. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03354>.

espécie presente o TBADT fotoexcitado pode promover uma SET (do inglês, single electron transfer).

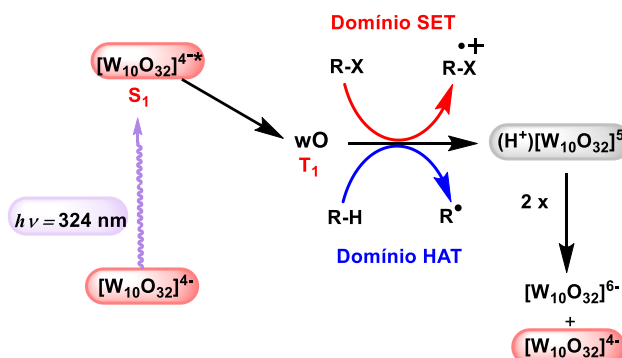


Figura 22: Modos de atuação catalítica do TBADT.

O TBADT apresenta uma larga banda de absorção em $\lambda = 324$ nm (Figura 23). Devido ao seu espectro de absorção, durante o desenvolvimento das reações fotocatalisadas era comum a utilização de lâmpadas de Xenônio de alta potência (450-1500 W) ou até mesmo a luz solar^{164,168}. Atualmente as publicações envolvendo o TBADT demonstram a utilização de LEDs para a realização da fotoexcitação, sendo comum a utilização de LEDs com emissão em $\lambda = 365$ nm^{161,162,163}, e relatada recentemente a utilização de LEDs com emissão em $\lambda = 405$ nm.^{169,171}. Além disso, muitas dessas reações foram estudadas em fluxo contínuo, devido aos benefícios inerentes à técnica.

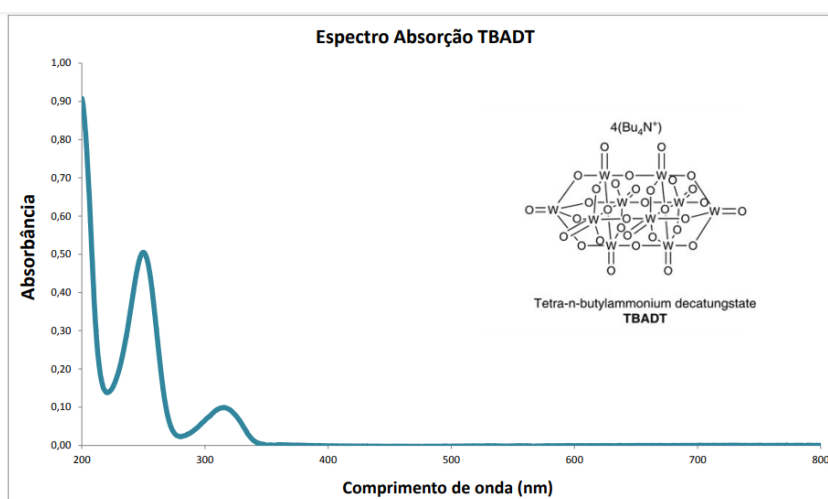
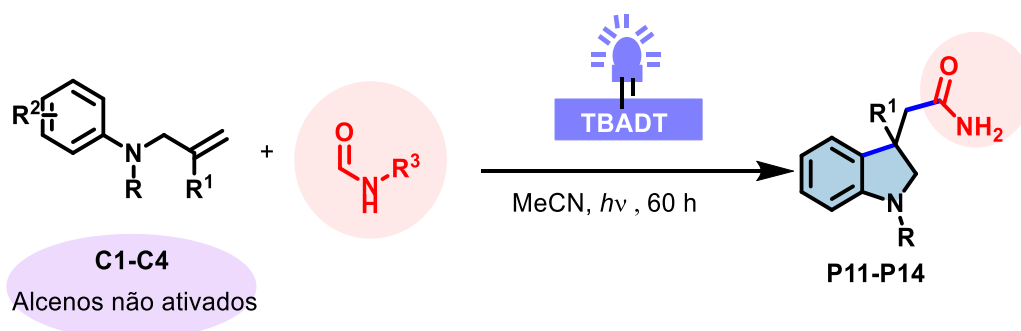


Figura 23: Espectro de absorção do TBADT em acetonitrila.

A nossa abordagem propõe a exploração da reatividade dos compostos *N*-fenilalílicos sintetizadas e apresentadas no tópico 2. 1. frente ao TBADT como fotocatalisador. Como observado na contextualização anterior, até o momento, alcenos não ativados ainda não foram empregados em reações com esse fotocatalisador com vistas a processos de adição/ciclização em sequência (*tandem*) para produção de heterociclos. O **Esquema 55**, mostra proposta de utilização do fotocatalisador em questão para a preparação de indolinas.



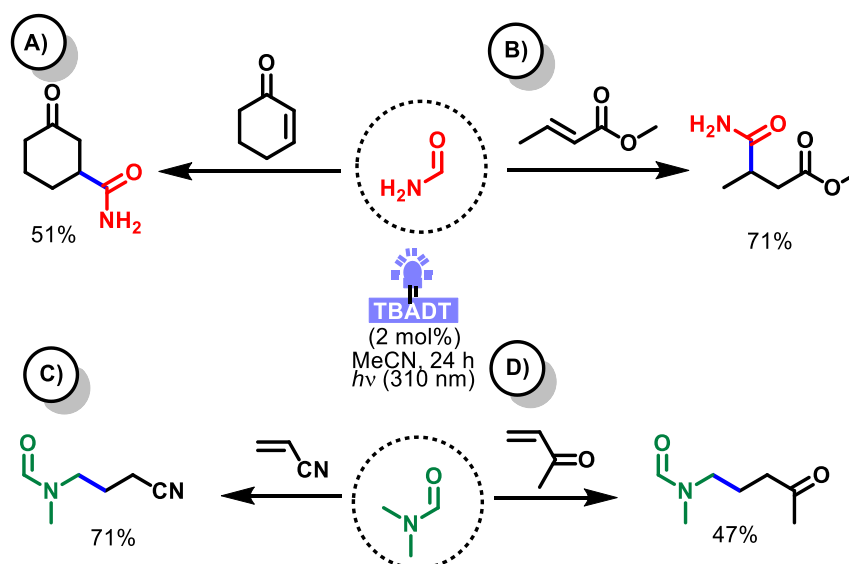
Esquema 55: Proposta de utilização de alcenos não ativados em reações de adição/ciclização radicalar para preparação de indolinas utilizando TBADT.

5. 2. REVISÃO DA LITERATURA

Consultando a literatura, foram encontrados alguns poucos exemplos da utilização do TBADT para a catálise da geração do radical carbamoila. Angioni e colaboradores em 2009 investigaram a amidação de olefinas pobres em elétrons.¹⁷³ A formamida e a *N*-metilformamida foram utilizadas, entre outras amidas. Quando a formamida foi empregada na presença das olefinas contendo grupos retiradores de elétrons foi verificada a formação dos respectivos produtos de adição do radical oriundo da abstração do hidrogênio ligado à carbonila. A ciclohexenona forneceu a 3-oxociclohexanocarboxamida em rendimento moderado (**A**) (Esquema 56) e o éster acrílico forneceu a carboxamida em rendimento bom (**B**) Esquema 56).

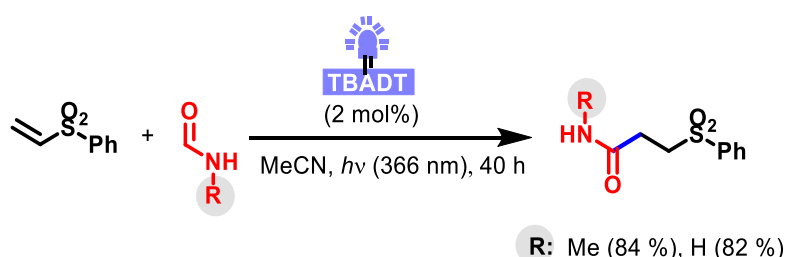
Uma mudança na seletividade foi observada quando a amida terciária foi empregada. Quando a DMF foi utilizada como fonte de radical na presença da acrilonitrila, forneceu o produto oriundo da formação de um radical na metila em bom rendimento (**C**) Esquema 56), sem competição com a formação do radical no grupo acila. Enquanto que a utilização da metilvinilcetona levou à formação da respectiva carboxamida em rendimento moderado (**D**) Esquema 56).

¹⁷³ Angioni, S.; Ravelli, D.; Emma, D.; Dondi, D.; Fagnoni, M.; Albinia, A. Tetrabutylammonium Decatungstate (Chemo)selective Photocatalyzed, Radical CH Functionalization in Amides, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 2209 – 2214, <https://doi.org/10.1002/adsc.200800378>.



Esquema 56: Exploração de amidação catalisada por TBADT.

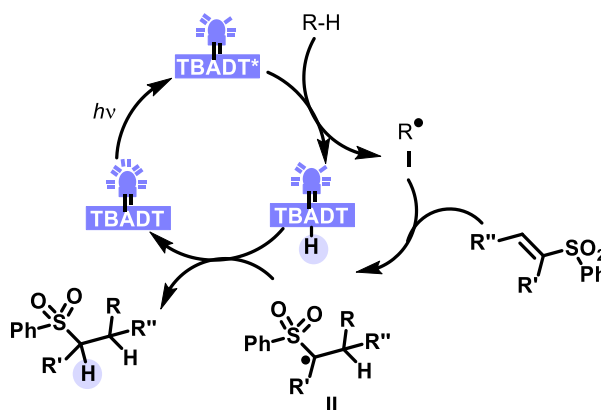
Em outra abordagem Ravelli e colaboradores em 2011 realizaram a alquilação de sulfonas α - β insaturadas catalisada por TBADT.¹⁷⁴ Eles avaliaram diversos substratos, entre eles foram avaliadas a formamida e a *N*-metil formamida como mostra o **Esquema 57**. Como é possível notar os respectivos produtos de adição das formamidas foram obtidos em rendimentos elevados, após 40 horas de irradiação.



Esquema 57: Reação de alquilação de sulfonas.

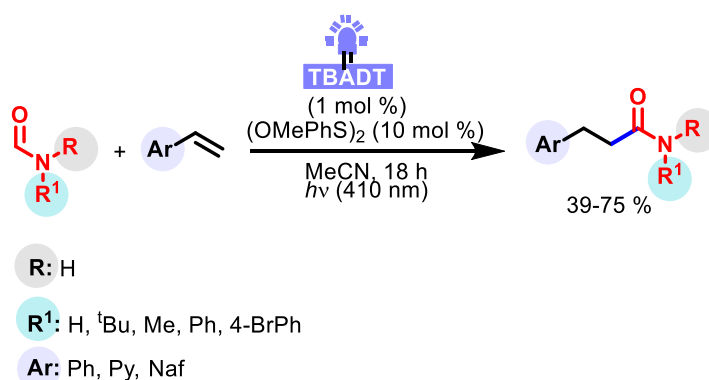
O mecanismo proposto pelos autores envolve a abstração quimiosseletiva de hidrogênio pelo TBADT. Como mostra o **Esquema 58**, em um primeiro momento o TBADT é foto excitado, sendo capaz de abstrair um hidrogênio do substrato R-H, doador de hidrogênio. O radical formado (I) se adiciona à vinil sulfona gerando um radical terciário (II). O radical terciário formado recebe por retrodoação o hidrogênio ligado ao TBADT, regenerando o fotocatalisador e fornecendo a sulfona.

¹⁷⁴ Ravelli, D.; Montanaro, S.; Zema, M.; Fagnoni, M.; Albini, A. A Tin-Free, Radical Photocatalyzed Addition to VinylSulfones, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 3295–3300. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100591>.



Esquema 58: Mecanismo de síntese fotocatalisada de sulfonas.

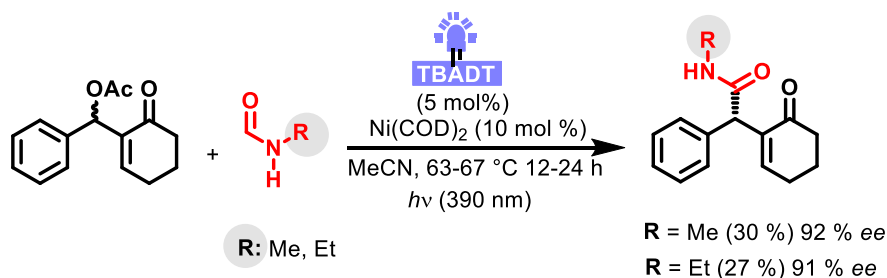
É importante notar que os alcenos utilizados como trapeadores do radical carbamoíla gerado através do TBADT, são alcenos contendo grupos retiradores de elétrons, aqui considerados ativados. Porém recentemente, algumas amidas, incluindo a formamida foram utilizadas na presença de TBADT e estirenos que não continham grupos retiradores de elétrons, ou seja, alcenos não ativados. Como é possível observar no **Esquema 59**, Pietro e Taillefer, em 2021, realizaram a hidrofuncionalização de estirenos, empregando TBADT e formamidas, na presença de um dissulfeto como co-catalisador. A partir da metodologia desenvolvida foi possível funcionalizar estirenos em rendimentos de moderados a bons.¹⁷¹



Esquema 59: Hidrofuncionalização de estirenos com formamidas catalisada por TBADT.

Recentemente em 2023, Wang e colaboradores demonstraram a acil-alição enantiosseletiva de adutos de Morita-Baylis-Hillman através da utilização de TBADT, e um catalisador de níquel, contendo ligante quiral. Diversos aldeídos foram empregados como fonte de radicais acila, e algumas formamidas como fonte de radicais carbamoíla. Como é possível observar no **Esquema 60**, a fonte de irradiação foi um LED com emissão em $\lambda = 390$ nm, o tempo de reação variou entre 12-24 horas, sendo a reação realizada entre 63 e 67 °C em acetonitrila.¹⁷⁵

¹⁷⁵ Wang, R.; Fan, P.; Wang, C.; Nickel/Photo-Cocatalyzed Asymmetric Acyl C-H Allylation of Aldehyde and Formamides. *ACS Catal.* **2023**, *13*, 141–146.



Esquema 60: Reação de acil-alição enantiosseletiva cocatalisada por TBADT e Ni.

5. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a possibilidade de geração do radical carbamoíla através do TBADT e vislumbrando a realização da síntese de indolinas a partir de aminas aromáticas alílicas. O substrato alílico **C1** foi utilizado para um teste frente à reação com o radical carbamoíla gerado na presença do fotocatalisador TBADT, e LEDs UV (365 nm) como fonte luminosa. O espectro de emissão dos LEDs utilizados foi obtido, como é possível observar na **Figura 24** o comprimento de onda obtido no máximo de emissão foi de 367 nm.

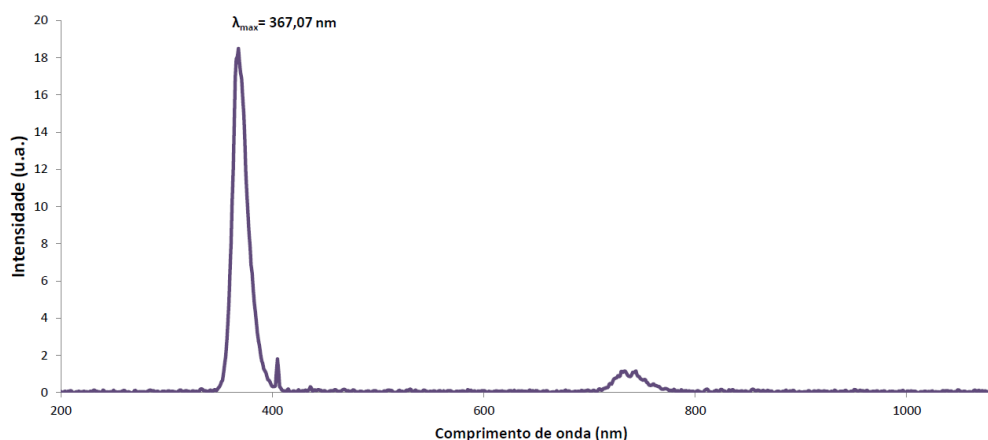
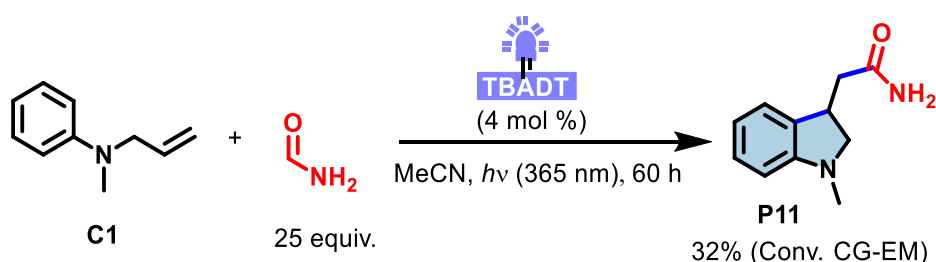


Figura 24: Espectro de emissão obtido para a LED (16 W) utilizada.

Como é possível observar no **Esquema 61** a reação foi realizada na presença de 4 mol % de TBADT, com 20 equivalentes de formamida em acetonitrila. A fonte de luz utilizada foi a LED UV de 365 nm, a mistura foi deixada em agitação durante 60 horas.



Esquema 61: Reação entre C1 e formamida catalisada por TBADT.

O cromatograma da reação extraída apresentou o produto **P11** como majoritário e traços do produto de adição à dupla ligação sem a ocorrência da ciclização intramolecular tandem. Devido à baixa conversão cromatográfica observada, o produto **P11** não foi isolado, e foi considerado que o produto desejado havia sido formado, apenas pela m/z obtida pelo CG-EM, e pela análise por CCD da reação. Como a adição do radical carbamoila à duplas ligações de alcenos ricos, com subsequente ciclização intramolecular era desconhecida, optou-se por realizar a mesma reação com o substrato **C2**, visto que o mesmo apresentava uma metila ligada à dupla ligação, o que levaria à formação de um radical terciário, portanto mais estável do que o radical formado a partir de **C1**.

Desse modo, a reação com **C2** foi realizada nas mesmas condições que a anterior, como mostra o **Esquema 62**. Nesse caso, observou-se o produto **P12** em conversão cromatográfica de 80%. O material de partida não reagido foi detectado na análise por CG-EM como mostra a **Figura 25**, e o espectro de massas obtido para o pico em $t_R = 13,16$ minutos apresentava a razão massa carga (m/z) esperada para o respectivo produto ciclizado **P12**.

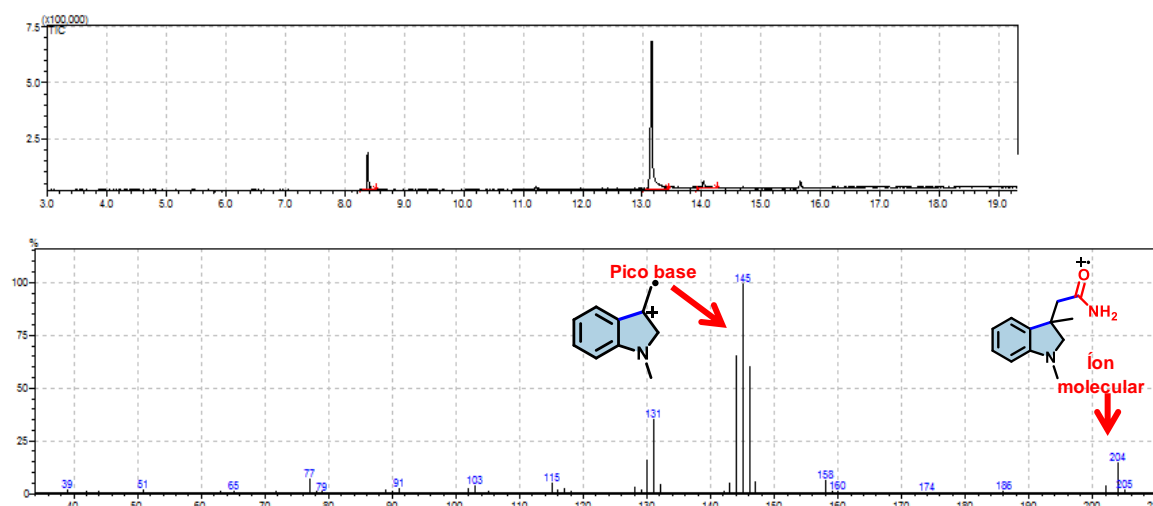
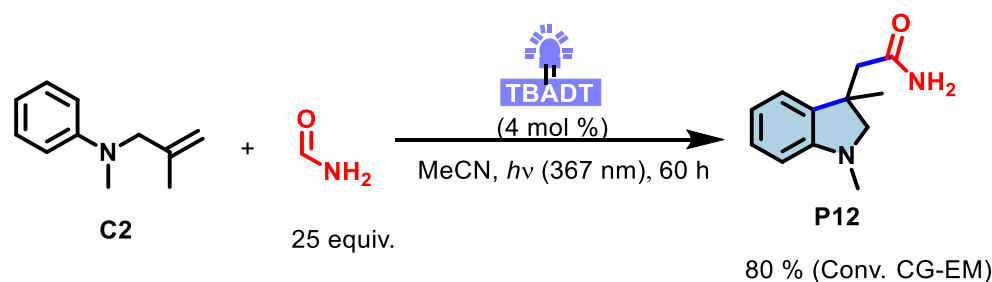


Figura 25: Cromatograma e espectro de massas para o pico correspondente a **P12**.

O espectro de massas da **Figura 25**, mostra a estrutura do íon molecular e também o fragmento correspondente ao pico base de m/z 145.

Como foi observada uma reação limpa na qual o produto de interesse havia sido obtido, o mesmo foi então isolado para caracterização por RMN ^1H e de RMN ^{13}C , para a confirmação da estrutura obtida. Como é possível observar na **Figura 26** o espectro de RMN de hidrogênio de **P12** apresentou na região característica de aromáticos 4 sinais desdobrados em multipletos. Em $\delta = 5,43$ e $5,35$ ppm foi verificado os sinais de hidrogênios ligados à amida primária. Em $\delta = 3,50$ ppm um dubleto de integração para 1 hidrogênio, com constante de acoplamento $9,1$ Hz, em $\delta = 3,10$ ppm outro dubleto de integração para 1 hidrogênio com constante de acoplamento $9,1$ Hz ambos correspondentes aos hidrogênios diastereotópicos do grupo metileno do anel saturado da indolina. A seguir em $\delta = 2,76$ ppm um singleto correspondente à metila ligada ao nitrogênio, em $\delta = 2,52$ ppm um dubleto com integração para 1 hidrogênio e constante de acoplamento $14,0$ Hz e em $\delta = 2,48$ ppm outro dubleto com integração para 1 hidrogênio e constante de acoplamento $14,0$ Hz ambos referentes aos hidrogênios diastereotópicos alfa à carboxamida. Em $\delta = 1,45$ ppm um singleto com integração para 3 hidrogênios correspondente à metila do carbono quaternário. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 100, anexos) apresentou o sinal em $\delta = 173,3$ ppm correspondente ao carbono da carbonila da amida. A seguir, em $\delta = 152,2$, $136,5$, $128,3$, $122,0$, $117,9$, $107,6$ ppm os sinais correspondentes aos carbonos aromáticos. Em $\delta = 67,8$ ppm o sinal correspondente ao carbono metilênico do ciclo da indolina, a seguir em $\delta = 45,9$ ppm o sinal do carbono alfa à carboxamida. Em $\delta = 42,6$ ppm o sinal do carbono quaternário, em $\delta = 35,7$ ppm o sinal correspondente à metila ligada ao nitrogênio e em $\delta = 25,0$ ppm o sinal da metila ligada ao carbono quaternário.

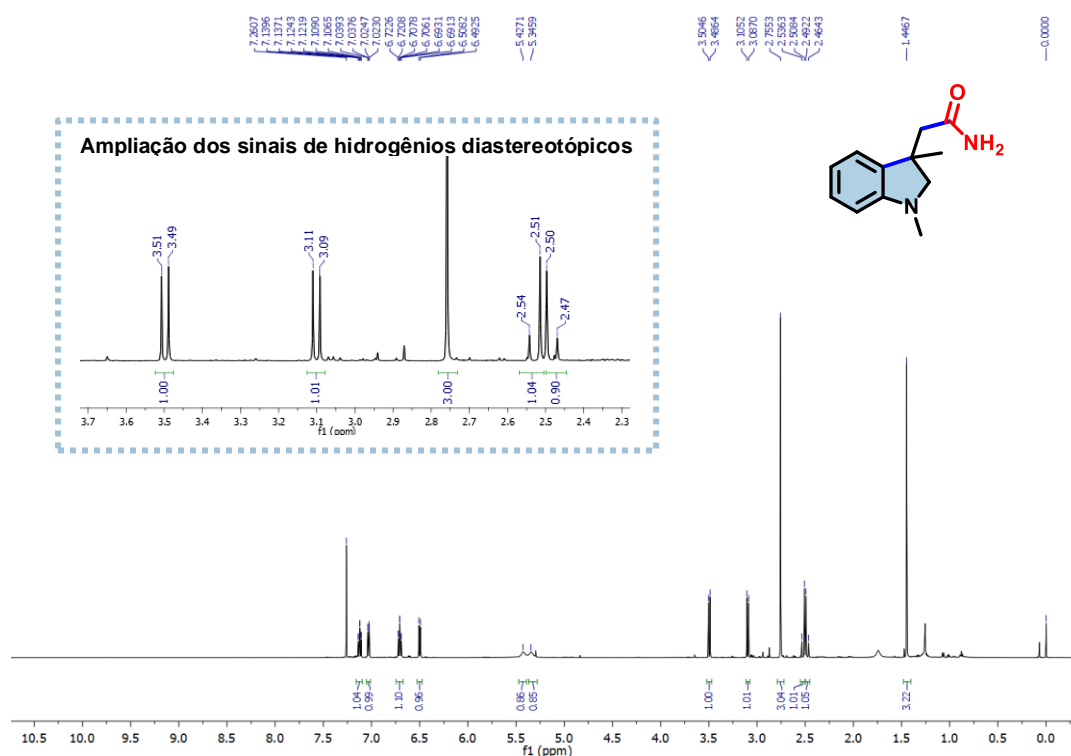
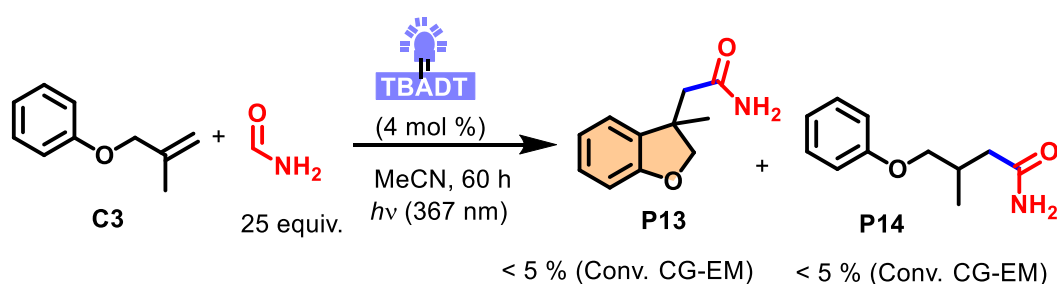


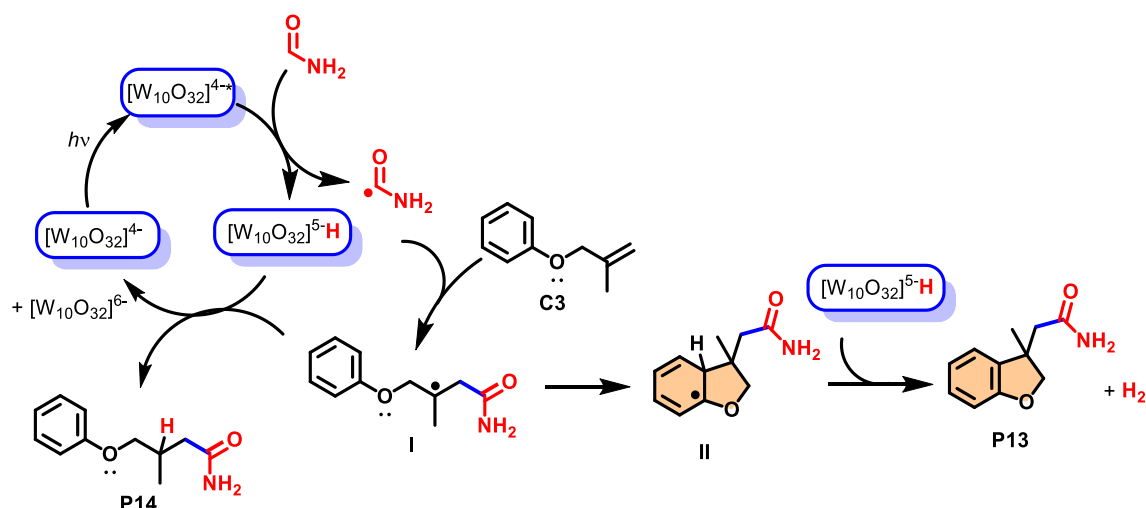
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **P12**.

O substrato análogo de **C2** contendo o oxigênio como heteroátomo (**C3**) também foi testado frente às condições de carbamoilação utilizando-se TBADT. Como é possível observar no **Esquema 63** a reação de adição/ciclização levaria à formação de benzofuranos. O cromatograma da reação extraída mostrou a formação de dois produtos, o produto **P13** decorrente da reação de adição/ciclização e o produto **P14** formado pela adição do radical carbamoíla e retrodoação do hidrogênio ligado ao fotocatalisador, com formação do produto aberto. Entretanto, ambos produtos **P13** e **P14** foram observados em uma conversão muito baixa. Tal diferença na reatividade pode estar relacionada à maior propensão do anel contendo o nitrogênio, em atacar o intermediário radical formado, como no caso das anilinas, quando comparadas ao anel contendo o átomo de oxigênio.



Esquema 63: Reação entre substrato **C3** e formamida em TBADT.

O mecanismo proposto para a formação do produto ciclizado **P13** começa com a fotoexcitação do TBADT que no estado excitado abstrai o hidrogênio ligado à carbonila da formamida, como mostra o **Esquema 64**. O radical carbamoíla formado se adiciona à dupla ligação da porção metil-álílica do substrato **C3**, dando origem ao intermediário radical **I**. Se observou a formação de dois produtos, o produto **P13** é formado após a reação intramolecular do anel aromático no intermediário **I**, formando o intermediário radicalar **II** o qual é oxidado, por exemplo, pela espécie intermediária do catalisador (TBADT-H). Porém o intermediário **I** pode receber o hidrogênio ligado ao TBADT por retrodoação e levar à formação de **P14**.



Esquema 64: Mecanismo proposto para a formação de **P4** e **P3**.

Diante da obtenção do produto esperado no caso da utilização das aminas aromáticas, foram então realizados outros testes para a otimização das condições de reação, entretanto as análises por CG-EM do produto extraído da reação com **C2** começaram a não apresentar reprodutibilidade. Nos cromatogramas diversos picos referentes a possíveis decomposições do material de partida foram observados junto à diminuição da área do pico do produto **P12**. Os principais picos de subprodutos observados tinham a razão m/z de 106 e 147, como é possível observar nos espectros de massa da **Figura 27**.

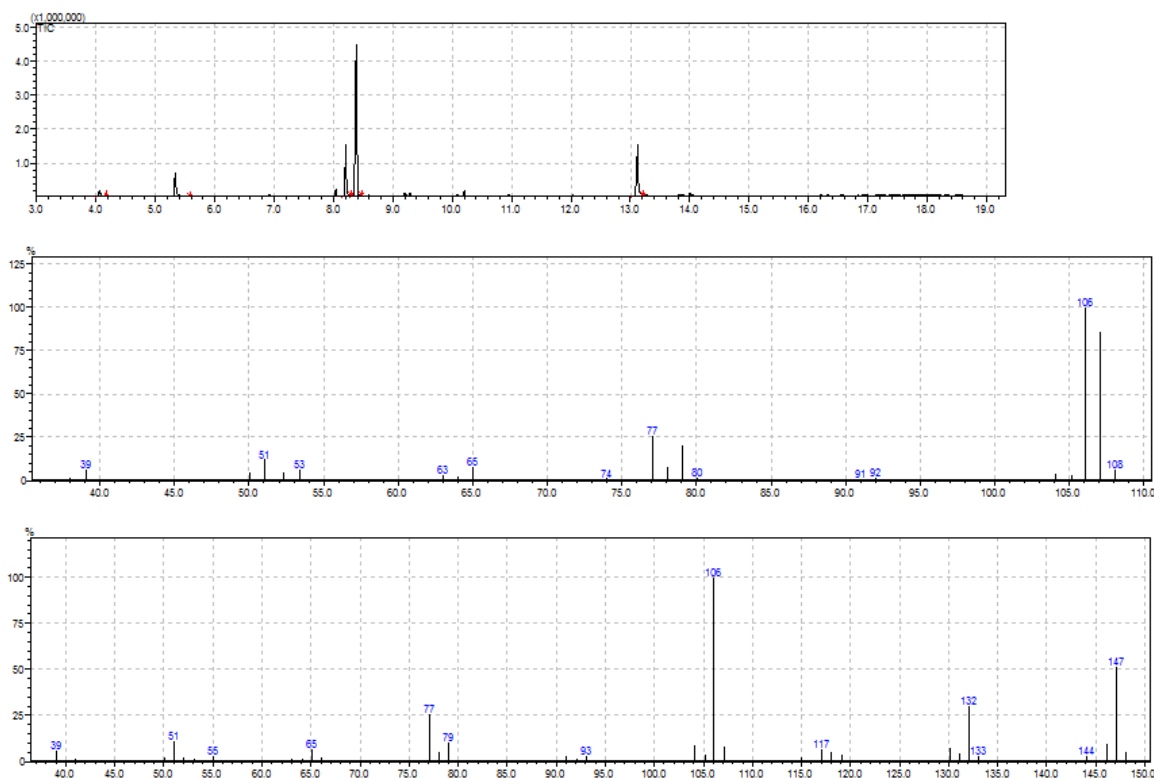


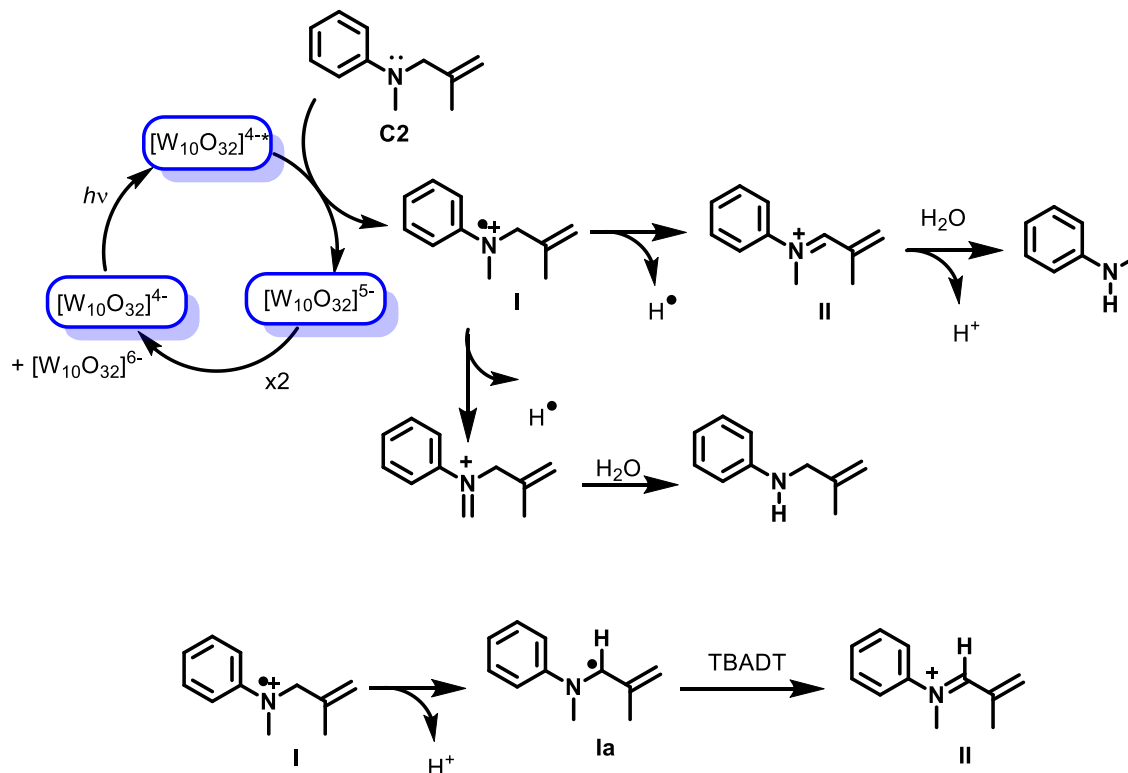
Figura 27: Cromatograma e espectro de massas de reação extraída.

Como estavam sendo formados subprodutos derivados de possível dealquilação oxidativa da amina aromática, a literatura foi consultada. Verificou-se que devido ao seu baixo potencial de oxidação as aminas aromáticas são facilmente oxidadas pelo TBADT através de um mecanismo de SET ($E_{\text{red}} = +2,44 \text{ V}$).^{176,177} O mecanismo proposto para a formação dos subprodutos observados tanto no cromatograma da **Figura 27**, como nas análises por CCD é mostrado no **Esquema 65**. A amina aromática **C2** é oxidada pelo TBADT fotoexcitado, através da transferência de um elétron, gerando o TBADT monoreduzido (H^+)[$\text{W}_{10}\text{O}_{32}$]⁵⁻ e o cátion-radical **I**. O TBADT monoreduzido sofre desproporcionamento espontâneo gerando as espécies

¹⁷⁶Jakubiaka, V.; Allonab, X.; Fouassierb, J. P.; Sionkowskac, V.; Andrzejewskad, E.; Lindene, L.A. Rabekf, J.F. Camphorquinone–amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization, *Polymer*, **2003**, 44, 5219–5226. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00568-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00568-8)

¹⁷⁷Ravelli, D.; Protti, S.; Fagnoni, M. Decatungstate Anion for Photocatalyzed “Window Ledge” Reactions, *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 2232–2242. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00339>.

$[W_{10}O_{32}]^{6-}$ e $[W_{10}O_{32}]^{4-}$.¹⁷² O cátion radical **I** perde um hidrogênio α ao nitrogênio, gerando o cátion intermediário **II** o qual sofre um ataque da água, gerando os produtos de hidrólise. O cátion radical **I** também pode perder um próton, gerando o radical **Ia** centrado no carbono α ao nitrogênio, ¹⁷⁸ que pode ser oxidado para formar o cátion intermediário **II**.



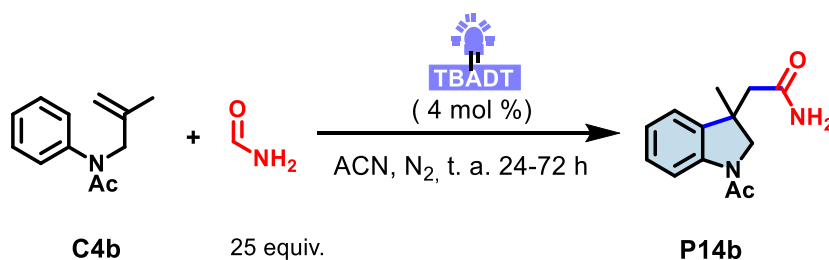
Esquema 65: Mecanismo proposto de dealquilação das aminas aromáticas.

Devido à baixa reprodutibilidade encontrada nos experimentos com o TBADT e as aminas aromáticas **C1** e **C2**, e a baixa conversão e seletividade verificada nos experimentos utilizando **C3** optou-se por explorar a reatividade do substrato **C4** na presença de TBADT e formamida. Nesse caso o substrato **C4** por apresentar um grupo de proteção ligado ao nitrogênio, dificultaria a reação de SET e consequente oxidação do composto, tornando possível a reprodução de experimentos sem a ocorrência de reações secundárias, que pudessem consumir o substrato. A **Tabela 13** apresenta os experimentos realizados nos quais foram exploradas duas fontes luminosas diferentes, a LED 365 nm, utilizada nos experimentos citados anteriormente, a qual apresenta potência de 16 W, e uma LED luz negra (emissão) com 50 W de potência. Além disso, o tempo de reação foi avaliado e também a utilização de oxidante. Para a exploração destas condições reacionais, a formamida foi empregada em excesso (25 eq), a acetonitrila foi utilizada

¹⁷⁸Thavaneswaran, S.; P. J. Scammells, Further investigation of the N-demethylation of tertiary amine alkaloids using the non-classical Polonovski reaction, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 16, 2868–2871. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.03.017>

como solvente, o TBADT foi utilizado em 4 mol %, ¹⁶⁸ e após a adição de todos reagentes borbulhava-se N₂ por 5 minutos.

Tabela 13: Exploração da fonte luminosa e tempo de reação para produção de indolinas^a



Entrada	Lâmpada	Tempo (h) ^d	P14b (%) ^b
1	LED 400 (50 W)	24	42
2	LED 400 (50 W)	48	55 (59) ^c
3	LED 400 (50 W)	72	68 (73) ^c
4	LED 400 (50 W)	48	54 ^d
5	LED 365 (16 W)	48	50
6	LED 365 (16 W)	72	65(71) ^c

^a **C4b** (0,10 mmol, 1,0 eq), TBADT (4 mol %), HCONH₂ (2,5 mmol, 25 eq), ACN (2 mL).

^b Rendimentos isolados.

^c Rendimentos isolados utilizando K₂S₂O₈ (0,12 mmol, 1,2 eq) como oxidante.

^d **C4b** (0,20 mmol, 1,0 eq), TBADT (4 mol %), HCONH₂ (2,5 mmol, 25 eq), ACN (4 mL).

A utilização do persulfato de potássio como oxidante foi considerada, já que, em duas etapas do mecanismo proposto no **Esquema 64** a presença de uma espécie oxidante é necessária. A primeira etapa que envolve a abstração de um hidrogênio da formamida gera o TBADT monoreduzido, o qual pode ser facilmente reoxidado através da reação com K₂S₂O₈¹⁶⁸. A etapa anterior libera um equivalente de ácido, junto a um potente oxidante, o ânion radical SO₄^{•-}. Após a adição do radical carbamoíla ao alceno, ocorre a ciclização intramolecular gerando um intermediário radicalar (II) que ao ser oxidado leva a formação do aromático, portanto esta etapa de rearomatização também envolve a presença de um oxidante.

Como mostra a **Entrada 1, Tabela 13**, ao se utilizar a LED Luz negra durante 24 horas, sem utilização de um oxidante, o rendimento isolado obtido de **P10a** foi de 42 %. Quando a reação foi realizada na mesma irradiação durante 48 horas, o rendimento isolado obtido foi de 55 %, como mostra a **Entrada 2, Tabela 13**, o mesmo experimento foi realizado utilizando-se K₂S₂O₈ como oxidante, e o rendimento obtido foi de 59% ligeiramente, maior. A seguir a reação foi mantida sob irradiação durante 72 horas, como é possível verificar na **Entrada 3, Tabela 13**, o rendimento isolado foi de 68%, sem a utilização de oxidante, e quando o oxidante estava presente obteve-se um rendimento de 73 % da indolina desejada. A seguir, na **Entrada 4, Tabela 13**, foi realizado um experimento em maior escala, na qual a mesma concentração foi mantida, neste caso verificou-se um decréscimo no rendimento isolado, para 54 % após 72 horas de irradiação. A fonte luminosa, LED 365 nm também foi empregada e forneceu rendimentos isolados similares, como mostram as **Entradas 5 e 6, Tabela 13**. Porém, como a LED luz negra utilizada apresentava uma disposição das LEDs que concentrava a irradiação de maneira a irradiar de forma mais eficiente a mistura, ela foi escolhida.

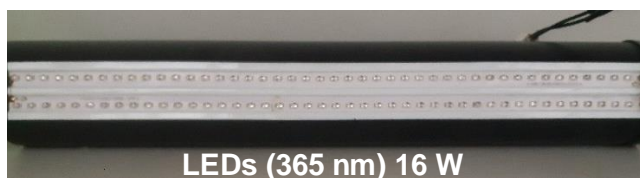
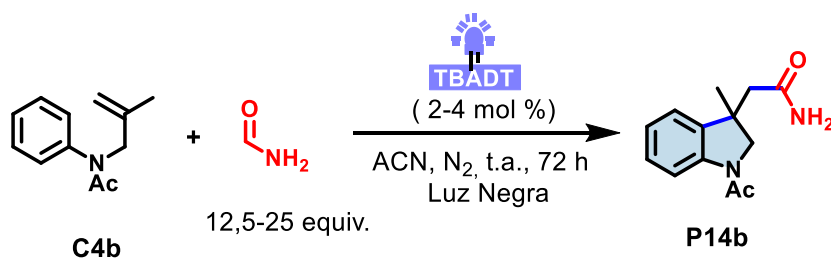


Imagem 1: Foto comparativa das LEDs utilizadas como fonte luminosa. Fonte: Dispositivo próprio)

Estes experimentos mostraram que, como observado anteriormente, o produto pode ser obtido sem a necessidade de adição de um oxidante e que alguma espécie no meio reacional era capaz de oxidar o radical intermediário **II**.

A seguir foram realizados experimentos controles, com o intuito de se determinar a influência de cada componente no rendimento da reação. Como é possível observar na **Entrada 2, Tabela 14**, ao se dobrar a concentração da reação notou-se drástica diminuição do rendimento isolado da indolina **P14a**. Já quando foi realizado o escalonamento para o dobro mantendo-se a mesma concentração da melhor condição, **Entrada 3, Tabela 14**, uma pequena diminuição no rendimento isolado foi verificada. Também avaliou-se na **Entrada 4, Tabela 14**, a utilização de dioxano como solvente, entanto, não foi observada formação de produto. Ao se diminuir a quantidade de TBADT empregada, uma drástica diminuição de rendimento isolado foi verificada na **Entrada 5, Tabela 14**. O experimento controle no qual TBADT não foi empregado rendeu 12 % da indolina, o que foi considerado intrigante, e ao se realizar o experimento em duplicato, o mesmo rendimento foi obtido, como observado na **Entrada 6, Tabela 14**. Quando 12,5 equivalentes de formamida foram utilizados, também foi observada diminuição no rendimento isolado, de acordo com a **Entrada 7, Tabela 14**. Realizou-se uma reação na qual O₂ foi borbulhado ao invés de N₂, **Entrada 8, Tabela 14**, nesse caso além de não se observar produto formado, notou-se a formação de uma suspensão esbranquiçada, e a coloração transparente e azul profundo características de um catalisador ativo, não foi observada. A reação na qual foi utilizado TBADT e a solução foi agitada no escuro, não forneceu nenhum produto (**Entrada 9, Tabela 14**).

Tabela 14: Avaliação das condições de reação para produção de indolinas^a

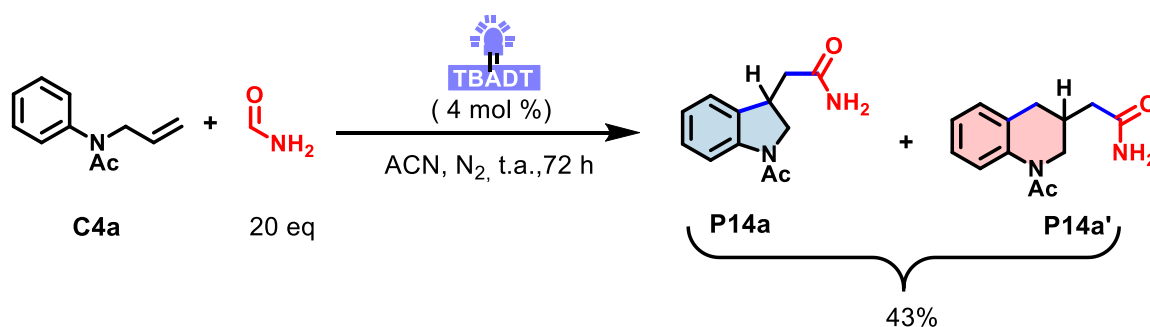
Entrada	Desvio da melhor condição	P14b (%) ^b
1	Nenhum	68
2	Dobrar concentração	25
3	Dobro reação	61 ^c
4	Dioxano como solvente	N.O
5	TBADT (2 mol %)	26
6	S/ TBADT	12
7	12,5 equiv. de formamida	45
8	Borbulhando O ₂	N.O
9	S/Luz	N.O

^a **C4b** (0,10 mmol, 1,0 eq), TBADT (4 mol %), HCONH₂ (2,5 mmol, 25 eq), ACN (2 mL).

^b Rendimentos isolados.

^c **C4b** (0,20 mmol, 1,0 eq), TBADT (4 mol %), HCONH₂ (2,5 mmol, 25 eq), ACN (4 mL).

A seguir optou-se por avaliar o substrato **C4a** frente às condições reacionais otimizadas. Como mostra o **Esquema 66**, ao se empregar o substrato alílico para a síntese de indolinas, obteve-se uma mistura de produtos que apresentavam o mesmo R_f na análise por CCD, com rendimento isolado de 43 %. Inicialmente acreditou-se que apenas o produto **P14a** teria sido obtido, porém a análise de RMN de ¹H do produto mostrou uma mistura, com a presença de um segundo composto, que poderia ser o produto de adição do radical à dupla, sem ocorrência de posterior ciclização. Porém também se considerou a possibilidade de ser o produto de ciclização 6-endo-trig.

Esquema 66: Reação do substrato **C4a** com a formamida na presença de TBADT.

A **Figura 28** (Figura 104, anexos) mostra o espectro de RMN de ¹H obtido para a mistura de produtos. Segundo a integração é possível notar que o produto **P14a** (indolina) aparenta ser o minoritário, obtido pela ciclização 5-exo-trig, já o produto **P14a'** é o majoritário, obtido da ciclização 6-endo-trig, porém não é observada uma seletividade. Dois sinais observados no

espectro foram importantes para a determinação das estruturas. O duplete que se destaca em campo baixo, $\delta = 8,20$ ppm é característico de um hidrogênio aromático de anel de indolina acetilada no nitrogênio. O hepteto em $\delta = 3,89$ ppm é característico do hidrogênio metínico ligado ao carbono 3 do núcleo da dihidroquinolinona de **P14a'**. Como uma mistura de produtos com mesmo R_f foi obtida, decidiu-se utilizar apenas derivados do substrato **C4** contendo o grupo (metil)alila para avaliar o escopo.

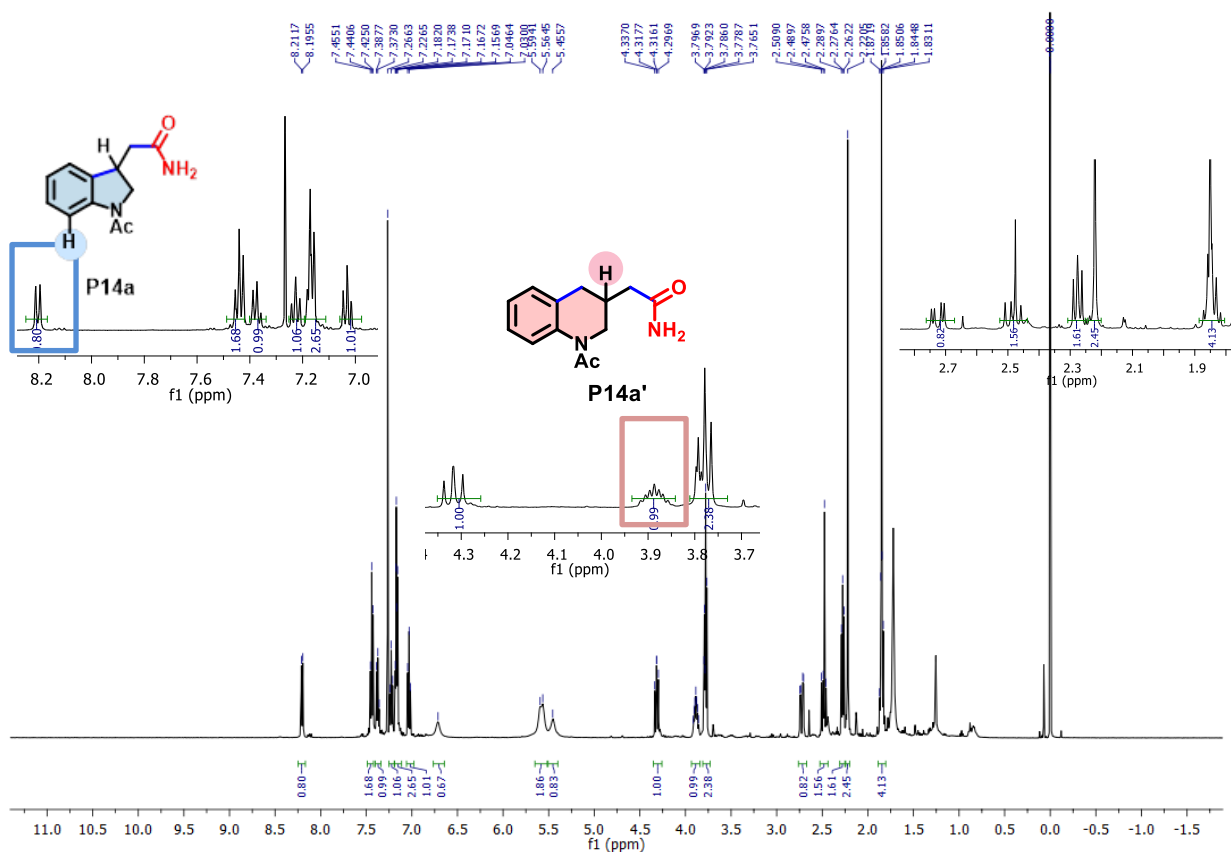
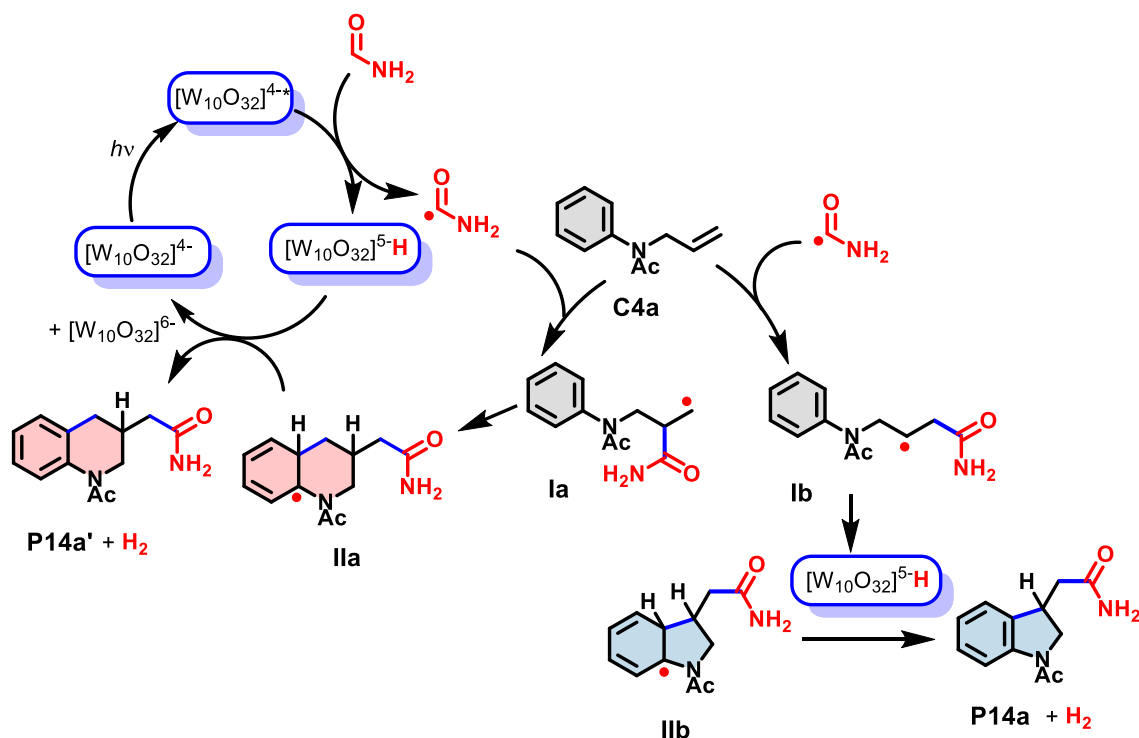


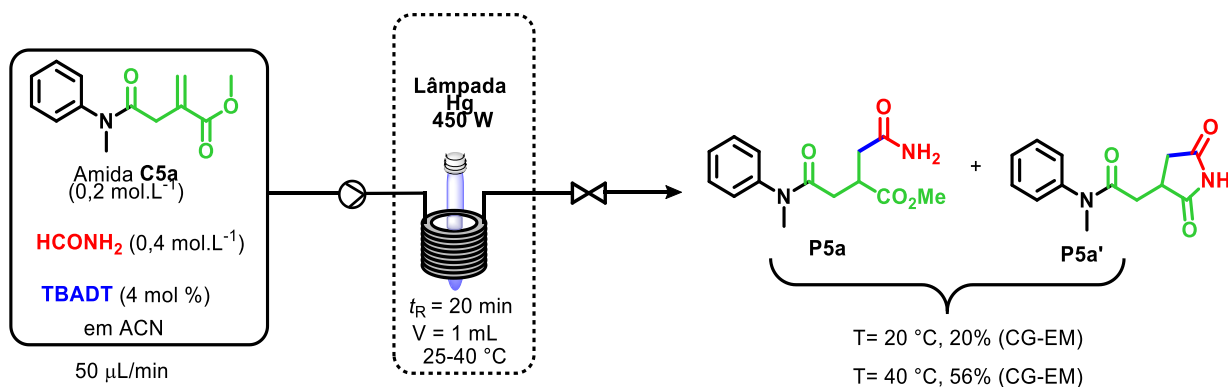
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **P14a** e **P14a'**.

O mecanismo proposto para a formação dos dois núcleos observados na análise por RMN, envolve a adição do radical carbamoíla, à dupla ligação inativada, que no caso de uma dupla ligação alílica, sem substituintes, ocorreu de maneira não seletiva, como é possível observar no **Esquema 67**. A primeira etapa do mecanismo proposto, leva à geração de dois radicais **1a** e **1b**, ambos atacam de maneira intramolecular o anel aromático. Os intermediários radicalares, dos possíveis ataques, **11a** e **11b**, devem sofrer a abstração de um hidrogênio através da atuação de uma espécie oxidante. As **entradas 2,3 e 6, Tabela 13** mostraram um ligeiro aumento do rendimento, quando um oxidante é utilizado, indicando, que a utilização de um oxidante externo não se faz necessária. Além do mais, ao analisar a **entrada 8, Tabela 14**, nota-se que o oxigênio também não foi benéfico para a reação. Desse modo, propôs-se que o próprio hidrogênio ligado à rede cristalina do TBADT, aquele abstraído da formamida, possa agir como oxidante, na etapa de rearomatização.



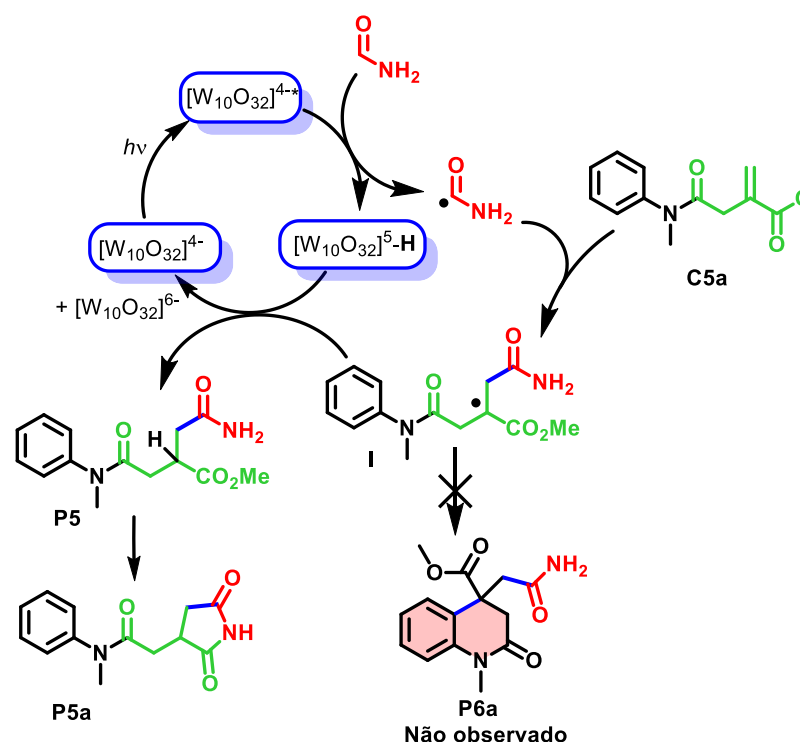
Esquema 67: Mecanismo proposto para a formação das indolinas e tetrahydroquinolinas

Como a abordagem com TBADT havia sido empregada com sucesso, para a adição do radical carbamoíla à ésteres α - β insaturados em condições de fluxo contínuo, o substrato **C5a** foi estudado no sistema fotoquímico proposto no capítulo 3 p.56, para se verificar a possibilidade de utilização do TBADT para a geração do radical carbamoíla em fluxo contínuo e sua posterior adição ao substrato **C5a**. O **Esquema 68** mostra dois experimentos realizados. O primeiro deles envolveu a utilização do TBADT como fotocatalisador para gerar o radical carbamoíla. Essa investigação foi realizada a temperatura ambiente e no reator em fluxo contínuo o t_R escolhido foi de 20 minutos. Ao final da reação observou-se pela análise por CG-EM e por CCD da mistura extraída a formação de dois produtos, sendo que o material de partida não foi totalmente consumido. Um dos produtos formados, segundo a m/z fornecida pelo espectro de massas do pico com maior tempo de retenção foi o **P5a**, o outro produto observado foi a succinimida (**P5a'**), resultado da ciclização termina (no injetor do CG) entre os grupos éster e carboxamida presentes em **P5a**.



Esquema 68: Exploração das condições para a geração do radical carbamoíla e preparação das dihidroquinolin-2-onas

A seguir, outra reação foi realizada, nas mesmas condições de fluxo da primeira, entretanto optou-se por realizar a reação em uma temperatura mais elevada, neste caso 40°C. Observou-se nesse experimento que o produto **P5a** era o majoritário, e o produto de ciclização **P5a'** também estava presente, como é possível notar o aumento da temperatura levou ao aumento da conversão, porém, novamente nem todo o material de partida foi consumido. De acordo com o resultado observado, o substrato contendo uma porção éster acrílico como aceptora do radical carbamoíla não levou à formação do produto de adição/ciclização, como observado anteriormente para os substratos **C2** e **C4**. O mecanismo proposto para a formação destes produtos é apresentado no **Esquema 69**. Como é possível notar no mecanismo proposto. Após a adição do radical carbamoíla à dupla ligação de **C5a**, radical intermediário **I** formado é reduzido pela retrodoação de hidrogênio da rede cristalina do fotocatalisador, não sendo observada a formação do produto de adição/ciclização.



Esquema 69: Mecanismo proposto para a reação da amida **C5a** com o radical carbamoíla

5. 4. CONCLUSÃO PARCIAL

Em suma esse primeiro estudo exploratório visava à utilização do TBADT como fotocalisador para a geração de radicais carbamoíla, e sua posterior adição e ciclização nos compostos **C** que apresentam a dupla ligação não ativada. As *N*-metil-*N*-alil anilinas foram exploradas como aceptoras do radical carbamoíla. Em um primeiro momento mostraram-se efetivas para a preparação de indolinas, os tempos de reação entre as alil-anilinas na presença de TBADT e formamida estavam de acordo tempos reacionais reportados para essa metodologia. O baixo potencial de redução dessas aminas aromáticas levou à reações laterais e dificuldades de reprodução dos resultados. Ao se empregar a amida **C4b** como aceptora do radical foi possível obter reprodutibilidade nos experimentos com vistas à obtenção de indolinas. Essa aplicação sintética do radical carbamoíla para a síntese de indolinas a partir de alcenos não ativados também não é conhecida na literatura e está sendo explorada no laboratório.

CAPÍTULO VI

**Isolamento da haloperoxidase dependente de vanádio e
sua aplicação para reações de adição/ciclização em
fluxo contínuo**

CAPITULO VI

6 ISOLAMENTO DE HALOPEROXIDASE DEPENDENTE DE VANÁDIO E SUA APLICAÇÃO PARA REAÇÕES DE ADIÇÃO/CICLIZAÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO

A professora Dra. Mutue Toyota Fujii do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) gentilmente cedeu a amostra de alga utilizada nesta tese. A amostra de alga *Laurencia dendroidea* possui exsicata depositada no Herbário do IPA sob o número SP 514108. A ficha de depósito pode ser obtida no item **8. 30.** p. 242 desta tese.

6. 1. CONTEXTUALIZAÇÃO ABORDAGEM PROPOSTA PARA A APLICAÇÃO DE V-BRPO EM REAÇÕES DE ADIÇÃO/CICLIZAÇÃO

Moléculas que apresentam um halogênio em sua estrutura costumam exibir atividades biológicas.¹⁷⁹ Entretanto, a incorporação desses halogênios em moléculas orgânicas costuma envolver a utilização de oxidantes instáveis, reativos e perigosos.¹⁸⁰ A natureza tem desenvolvido um extenso repertório de estratégias enzimáticas para incorporar halogênios em moléculas orgânicas. Há um grande interesse em descobrir e explorar essas enzimas¹⁷⁹, vislumbrando sua aplicação como catalisadores em síntese orgânica.¹⁸¹

Dentre os grupos de enzimas que catalisam a halogenação dos compostos naturais destaca-se a haloperoxidase,¹⁸² um grupo capaz de introduzir átomo de halogênio em moléculas orgânicas nucleofílicas. A classificação das haloperoxidasas ocorre segundo o co-fator metálico presente no sítio ativo da enzima: haloperoxidase dependente de vanádio, dependente de heme ou livre de metal.¹⁸³

A haloperoxidase dependente de vanádio (V-HPO) é um catalisador atrativo frente aos outros,^{181,184,185} visto que é resistente à inativação oxidativa,¹⁸⁶ demonstra tolerância à solventes

¹⁷⁹ Fejzagić, A.V.; Gebauer, J.; Huwa, N.; Classen, T. Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow, *Molecules*, **2019**, 24, 4008. <https://doi.org/10.3390/molecules24214008>

¹⁸⁰ Kolvari, E.; Koukabi, N.; Khoramabadi-zad, A.; Shiri, A.; Ali Zolfigol, M. Alternative Methodologies for Halogenation of Organic Compounds, *Current Organic Synthesis*, **2013**, 10, 837–863. 10.2174/157017941006140206102541

¹⁸¹ Höfler, G. T.; Buttler, A.; Hollmann, F. Haloperoxidasas as catalysts in organic synthesis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 9267–9274.

¹⁸² Murphy, C.D.; Clark, B. R. Enzymatic halogenation in stereoselective synthesis. In: Andrushko, V.; Andrushko, N. (Ed). *Stereoselective Synthesis of Drugs and Natural Products*. Wiley, **2013**, 2, 1377-1397.

¹⁸³ Blasiak, L. C.; Drennan, C. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 147–155.

¹⁸⁴ Martinez, J.S.; Carroll, G.L.; Tschirret-Guth, R.A.; Altenhoff, G.; Little, R.D.; Butler, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3289–3294.

¹⁸⁵ Picard, M.; Gross, J.; Liibbert, E.; Tolzer, S.; Krauss, S.; van Pee, K.; Berkessel, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1196–1199.

¹⁸⁶ Brink, H.B.T.; Tuynman, A.; Dekker, H.L.; Hemrika, W.; Izumi, Y.; Oshiro, T.; Schoemaker, H.E.; Wever, R. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 6780–6784.

orgânicos e altas temperaturas.¹⁸¹ Além disso, a enzima exibe promiscuidade catalítica pois já foi utilizada como catalisador em diferentes reações químicas, em alguns casos de forma seletiva.¹⁸⁶ Em relação a abundância natural as V-HPO são produzidas por diferentes organismos, especialmente algas marinhas.¹⁸⁷

6. 2. REVISÃO DA LITERATURA

6. 2. 1. Haloperoxidase dependente de vanádio

As haloperoxidasas dependentes de vanádio (V-HPO) são encontradas em fungos,¹⁸⁸ bactérias e alga marinhas.¹⁸³ As principais fontes de vanádio bromoperoxidasas (V-BrPO) na natureza são as algas vermelhas.^{189,190,191,192} Já as vanádio cloroperoxidasas (V-CIPO) estão presentes em alguns fungos terrestres.^{190,193} Com relação às vanádio iodoperoxidasas (V-IPO) poucas foram isoladas de algas marinhas.¹⁹⁴

As haloperoxidasas dependentes de vanádio são classificadas segundo o halogênio mais eletronegativo oxidado, sendo assim, a vanádio-cloroperoxidase (V-CIPO) pode oxidar cloro, bromo e iodo, a vanádio-bromoperoxidase (V-BrPO) é capaz de oxidar bromo e iodo, enquanto que a vanádio-iodoperoxidase (V-IPO) oxida apenas o iodo. Considerando a eletronegatividade do flúor e o mecanismo reacional de peroxidação por estas enzimas, infere-se que o peróxido de hidrogênio não é capaz de oxidar o flúor.¹⁸³

A partir da distribuição enzimática acima abordada, é possível verificar que: enquanto os metabólitos bromados são predominantes em ambientes marinhos, principalmente algas marinhas, os metabólitos clorados são preferencialmente produzidos em organismos

¹⁸⁷ Butler, A.; Carter-Franklin, J. N. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 180–188.

¹⁸⁸ P. Barnett, W. Hemrika, H.L. Dekker, A. O. Muijsers, R. Renirie, R. Wever, Isolation, Characterization, and Primary Structure of the Vanadium Chloroperoxidase from the Fungus *Embellisia didymospora*. *J. Bio. Chem.* **1998**, *273*, 23381–23387. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23381>.

¹⁸⁹ Butler, A.; Walker, J.V. Marine Haloperoxidasas, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1937–1944. <https://doi.org/10.1021/cr00021a014>

¹⁹⁰ Yamada, H.; Itoh, N.; Murakami, S.; Izumi, Y. New bromoperoxidase from coralline algae that brominates phenol compounds, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2961–2967. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867194>.

¹⁹¹ Suthiphongchai, T.; Boonsiri, P.; Panijpan, B. Vanadium-dependent bromoperoxidasas from Gracilaria algae, *J. Appl. Phycol.* **2008**, *20*, 271–278. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9243-y>

¹⁹² Winter, J.M.; Moore, B.S. Exploring the Chemistry and Biology of Vanadium-dependent Haloperoxidasas, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18577–18581. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.001602>.

¹⁹³ J.W.P.M. van Schijndel, E. G.M. Vollenbroek, R. Wever, The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1161*, 249–256. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90221-C](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90221-C)

¹⁹⁴ J.-B. Fournier, E. Rebuffet, L. Delage, R. Grijoil, L. Meslet-Cladière, J. Rzonca, P. Potin, G. Michel, M. Czjzek, C. Leblanc, The Vanadium Iodoperoxidase from the Marine Flavobacteriaceae Species *Zobellia galactanivorans* Reveals Novel Molecular and Evolutionary Features of Halide Specificity in the Vanadium Haloperoxidase Enzyme Family, *App. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 7561-7573. <https://doi.org/10.1128/AEM.02430-14>.

terrestres.¹⁹⁵ Ademais, existe baixa compreensão no âmbito da biossíntese de produtos naturais pela enzima V-CIPO.¹⁹⁴ Com isso, torna-se um desafio estabelecer substratos autênticos para reações com V-CIPO.¹⁹⁶ Esses dados podem ser uma das justificativas ao fato de existirem poucos exemplos na literatura de aplicação da V-CIPO em síntese orgânica. Por outro lado, encontram-se diferentes estudos de reatividade de V-BrPO.

Como já abordado, as bromoperoxidases dependentes de vanádio são isoladas principalmente de algas marinhas e são imprescindíveis na biossíntese de compostos bromados, como indóis, terpenos, acetogeninas, fenóis e hidrocarbonetos.^{195,196} A maioria dos organohalogenados de ocorrência natural são de origem marinha e aproximadamente todos os produtos naturais bromados são produzidos por organismos marinhos.^{192,197,198}

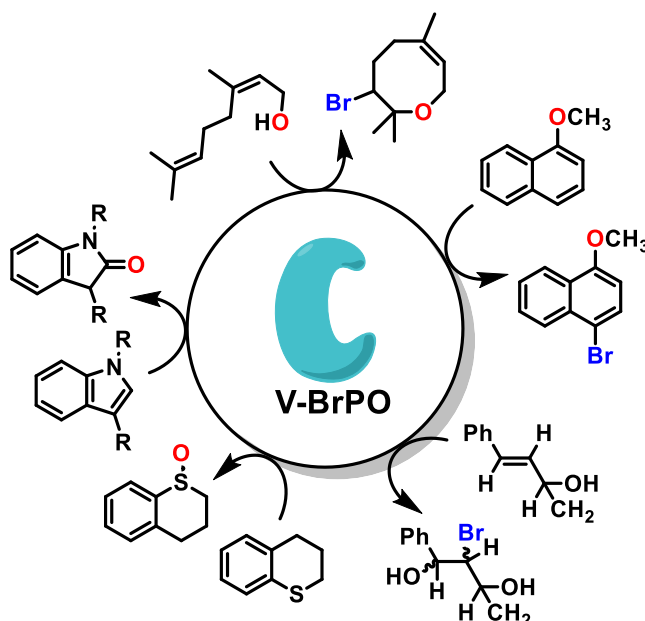
Além da importância biológica, existem alguns exemplos da aplicação de bromoperoxidase dependente de vanádio em diferentes reações químicas com substratos não naturais (Esquema 70).

¹⁹⁵ B.-G. Wang, J. B. Gloer, N.-Y. Ji, J.-C. Zhao, Halogenated Organic Molecules of Rhodospirillaceae Origin: Chemistry and Biology, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 3632–3685. <https://doi.org/10.1021/cr9002215>.

¹⁹⁶ Butler, A.; Carter, J.N.; Simpson, M.T. Vanadium in proteins and enzymes. In: Bertini, I.; Sigel, A.; Sigel, H. (Ed.). *Handbook of Metalloproteins*. United States of America: CRC press, **2004**, 154–175.

¹⁹⁷ F.H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. G.-Tsodikova, C. T. Walsh, Nature's Inventory of Halogenation Catalysts: Oxidative Strategies Predominate, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3364–3378. <https://doi.org/10.1021/cr050313i>.

¹⁹⁸ G. W. Gribble, Amazing Organohalogens: Although best known as synthetic toxicants, thousands of halogen compounds are, in fact, part of our natural environment, *Am. Sci.* 2004, 92, 342–349.



Esquema 70: Ilustração das transformações químicas com substratos não naturais, catalisadas por bromoperoxidase dependente de vanádio.^{192,199,200,201,202,203}

6. 2. 2. Considerações mecanísticas e seletividade da V-HPO

A V-HPO utiliza peróxido de hidrogênio e um cofator vanadato para oxidar o haleto (X^-) a um intermediário de halogenação ativado, frequentemente representado pelo ácido hipohalogenoso (HOX).¹⁸¹ O metal de transição vanádio pode existir em muitos estados de oxidação,¹⁹³ entretanto como grupo prostético da enzima em questão apresenta-se sempre no seu estado de oxidação máximo, V (+5), impossibilitando a inativação oxidativa que pode ocorrer com as haloperoxidasas dependentes de heme.¹⁸⁶

O mecanismo da halogenação peroxidativa promovido pela V-HPO é classificado como *bi-bi ping-pong* e inicia-se pela associação do peróxido de hidrogênio ao vanadato (HVO_4^{2-}), no sítio ativo da enzima (Esquema 71, a) intermediário I).¹⁹² Como o átomo de vanádio se apresenta em seu estado de oxidação mais alto (+5) em ambos estados de repouso e no ciclo catalítico da enzima, infere-se que o peróxido de hidrogênio não irá oxidar o íon vanádio, mas sim coordenar-se de maneira bidentada culminando na geração de um intermediário peroxo-enzima (Esquema 71, a) intermediário II) e a liberação de uma molécula de água. Subsequentemente o haleto (por exemplo, Cl⁻) promove um ataque ao átomo de oxigênio parcialmente nucleofílico, levando à criação de um grupo Enz-V-OCl (Esquema 71, a) intermediário III). A abstração de um átomo de

¹⁹⁹ Littlechild, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 28–34.

²⁰⁰ Butler, A.; Carter-Franklin, J. N. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 180–188.

²⁰¹ Itoh, N.; Hasan, A.K.M.Q.; Izumi, Y.; Yamada, H. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 172, 477–484.

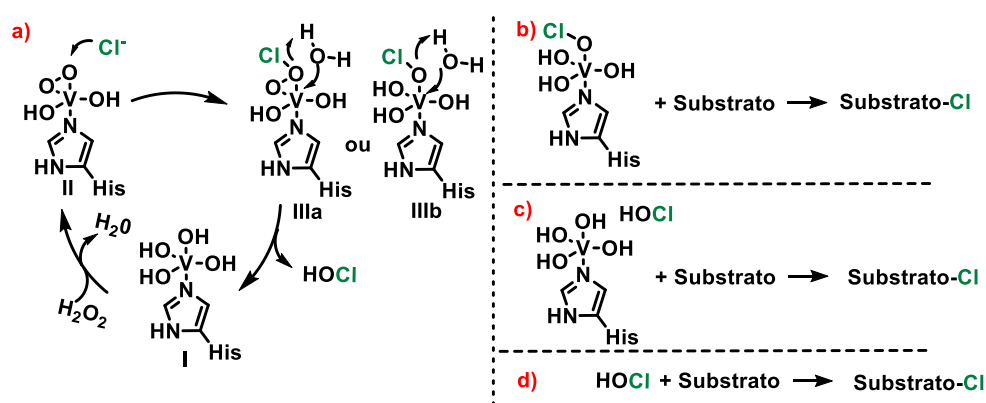
²⁰² Biaoming, Z.; Xupeng, C.; Song, X.; Tonghu, X.; Wei, Z. *Chin. J. Catal.*, **2010**, 31, 1293–1299.

²⁰³ Carter-Franklin, J.N.; Parrish, J.D.; Tschirret-Guth, R.A.; Little, R.D.; Butler, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3688–3689.

hidrogênio de uma molécula de água e a geração do intermediário reativo HOCl é seguida pela regeneração do ciclo catalítico.

Existem diferentes hipóteses quanto à etapa em que ocorre a interação da enzima/espécie halogenante com o substrato. As propostas mecanísticas são:

- O grupo Enz-V-OCl reage com o substrato (Esquema 71, b);¹⁸⁷
- Após abstração do próton de uma molécula de água pelo intermédio III, o HOCl permanece preso dentro do sítio ativo e reage com o substrato (Esquema 71, c);^{184,204}
- Ou o HOCl é difusível no meio reacional e reage com o substrato (Esquema 71, d);²⁰⁵



Esquema 71: a) Ciclo catalítico da haloperoxidase dependente de vanádio. Possíveis destinos do intermediário reativo HOCl gerado pela enzima: b) Enz-V-OCl; c) HOCl aprisionado ao sítio ativo; c) HOCl difusível no meio reacional.²⁰⁵

6. 2. 3. A tecnologia de imobilização de biocatalisadores aliada à química em fluxo contínuo, visando superar os desafios da metodologia enzimática via V-brpo

Nota-se nos exemplos acima que algumas reações enzimáticas apresentaram seletividade baixa ou ausente na reação de bromação peroxidativa, o que pode estar relacionado à baixa eficiência enzimática na conversão de um determinado tipo de substrato, bem como a decomposição da espécie enzimática reativa Enz-OX e liberação de HOX no meio reacional. Como já mencionado, a alta reatividade do intermediário associada com a reação em batelada e ao prolongado contato entre substrato e reagente, podem ter contribuído negativamente e assim ter proporcionado a obtenção de mistura de produtos, com baixa seletividade.

Acredita-se que a utilização de um reator em fluxo possa promover a geração controlada e contínua do intermediário reativo “Enz-OX”. Ademais, o controle do tempo de residência das espécies dentro do sistema em fluxo contínuo poderá contribuir para as reações mais favorecidas

²⁰⁴ Tschirret -Guth, R.A.; Butler, A. Evidence for Organic Substrate Binding to Vanadium Bromoperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 411-412. <https://doi.org/10.1021/ja00080a063>.

²⁰⁵ Smith, D.R.M.; Gruschow, S.; Goss, R. J. M. Scope and potential of halogenases in biosynthetic applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.01.018>.

cineticamente, corroborando com uma potencial transformação enzimática estereo e regioseletiva.

Como o propósito inicial do projeto era a utilização da enzima em fluxo, para aplicação sintética. Considerando algumas limitações encontradas ao manusear a enzima e os suportes propostos no início do trabalho, em contrapartida considerando as oportunidades que surgiram ao longo do doutorado. O último ano envolveu uma reavaliação da abordagem do projeto da enzima V-BrPO, portanto uma revisão da literatura foi realizada para restringir as abordagens que seriam posteriormente empregadas com a amostra de alga. A revisão será apresentada a seguir, neste mesmo tópico.

A proposta de imobilização da haloperoxidase dependente de vanádio extraída da alga vermelha *Laurencia dendroidea* foi reavaliada nos últimos meses do doutorado. Foram recebidas algumas amostras de suportes utilizados para imobilização de enzimas da empresa LifeTech Scientific, que gentilmente doou 5 g da resina epóxi-metacrilato de alta porosidade Purolite® (ECR82215F) (**Figura 29 A**). A mesma resina foi alvo de estudos de imobilização da enzima lipase de *B. cepacia*, concomitante a um estudo de imobilização da mesma em esferas de vidro. A Dra. Érika M. Orozco, ao efetuar testes de reciclabilidade da enzima imobilizada concluiu que a resina epóxi fornecida pela LifeTech demonstrou maior estabilidade operacional, quando comparada às esferas de vidro.

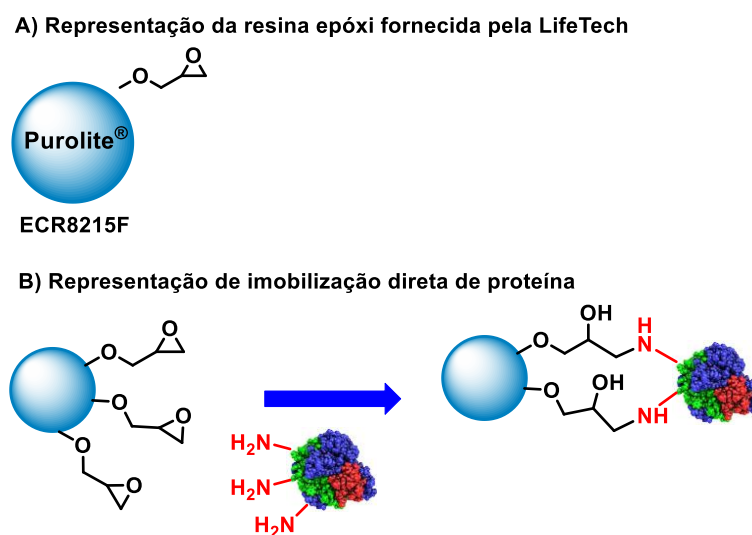


Figura 29: A) Resina Purolite®, B) processo de imobilização direta de proteína

No projeto inicial proposto as esferas de vidro eram a primeira opção para se realizar a imobilização da enzima parcialmente purificada, como destacado na **Figura 30**. A utilização das esferas de vidro como suporte requer uma série de etapas de preparação da mesma para receber a enzima, dentre elas a adição de espaçadores como APTS e grupos funcionais para a

ligação dos resíduos NH_2 da proteína.²⁰⁶ Como as esferas de vidro contendo a enzima imobilizada pela Dra. Érika mostraram pouca estabilidade operacional, a resina epóxi foi então considerada como primeira opção para se investigar a imobilização da V-BrPO. Tal decisão foi tomada, levando-se em conta, tanto a possibilidade de maior estabilidade operacional, como também a facilidade de execução do próprio procedimento de imobilização, que no caso de uma resina epóxi pode ser realizado sem a necessidade de adição de grupos funcionais ou espaçadores ao suporte (Figura 29 B)).

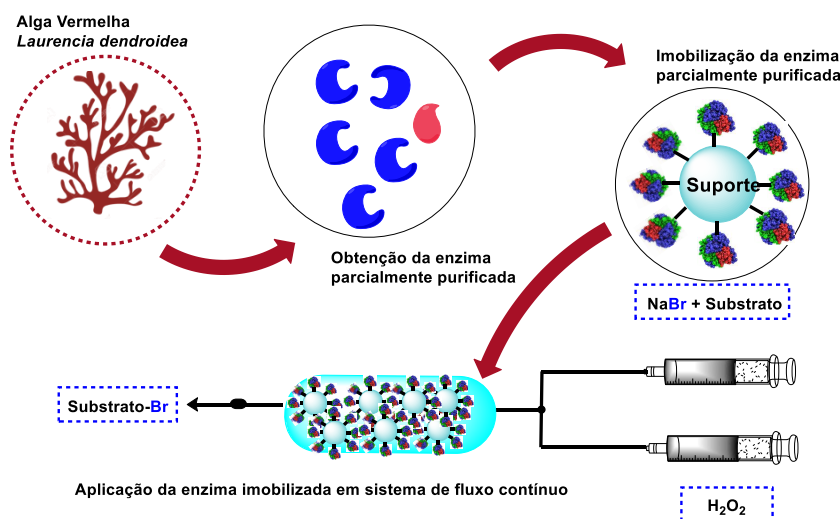
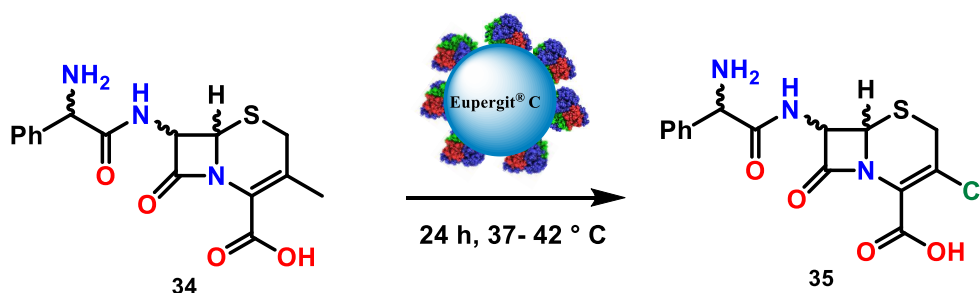


Figura 30: Proposta para a imobilização da haloperoxidase proveniente de *L. dendroidea*

Assim acreditou-se que, considerando o propósito de aplicar a enzima como agente halogenante em fluxo contínuo, a resina Purolite® (ECR82215F) possibilitaria melhores resultados. Para tanto foi realizada uma investigação da literatura, acerca dos tópicos envolvidos nessa proposta. O primeiro passo foi verificar se a enzima haloperoxidase já foi imobilizada em algum suporte contendo grupos epóxi como *linkers*. Verificou-se a existência de uma patente, na qual uma cloroperoxidase de *Rathayibacter biopuresis* foi imobilizada em resina epóxi, no caso a publicação tinha como alvo halogenar a cefaloxina²⁰⁷ para a obtenção do antibiótico Cefaclor (35), como mostra o **Esquema 72**. A enzima foi imobilizada diretamente em Eupergit® C e utilizada com êxito para preparação de forma direta do antibiótico da classe das cefalosporinas. Um fator importante desse estudo foi a razão entre massas de enzima e suporte utilizada, 1:50, bem diferente da ideal relatada na literatura, 1:4, o que indica um haloperoxidase bem ativa, mesmo após a imobilização.

²⁰⁶ E. Yilmaz K.Can, M. Sezgin, M. Yilmaz, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester, *Bioresource Technology*, **2011**, 102, 499–506

²⁰⁷ Wong, B. L.; Shen, Y-Q.; Chen, Y-P. HALOGENATION OF CEPHALEXIN WITH HALOPEROXIDASE FROM *RATHAYIBACTER BIOPURESIS*, Biopure Corporation, US, 5,589,354, 12,20,1994.



Esquema 72: Halogenação da cefaloxina por haloperoxidase imobilizada em Eupergit® C.

Em seguida, foi verificado na literatura se havia alguma menção à utilização de enzima imobilizada em Eupergit® C e utilizada em fluxo contínuo. Encontrou-se um micro-reator de leito fixo contendo a enzima treonina aldolase imobilizada em Eupergite[®].²⁰⁸ Alguns parâmetros importantes de imobilização e da reação em fluxo foram estudados, como o tempo de incubação suporte-enzima, o tempo de residência e a temperatura da reação. A enzima imobilizada de forma direta ao suporte mostrou um melhor desempenho no quesito retenção de atividade. A **Imagem 2** foi retirada do artigo em questão, o reator é composto por um simples tubo de vidro que apresenta volume de 500 µL quando vazio, o mesmo era preenchido com aproximadamente 250 mg do suporte e continha o volume de 250 µL ao ser preenchido.

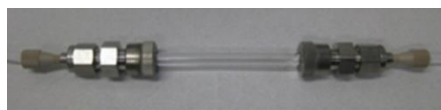


Imagem 2: Micro-reator de fluxo contínuo²⁰⁸

É conhecido que a V-BrPO é obtida em pequenas quantidades a partir da alga, assim optou-se por verificar qual seria o melhor tamanho de reator, a fim de comportar uma quantidade de suporte epóxi que permitisse a reprodução de pelo menos mais 3 reatores igualmente preenchidos. A sequência de fotos a seguir apresenta estruturas que poderiam ser utilizados como reatores de leito fixo, e que estavam disponíveis no laboratório. Acima a massa de suporte necessária para preenche-los, a qual foi o fator mais relevante para se considerar qual deles seria utilizado, lembrando-se sempre da pequena quantidade de proteína que é isolada da alga, fato que já foi constatado em relatórios anteriores.

²⁰⁸ Tibhe, D. J.; Fu, H.; Noël, T.; Wang, Q.; Meuldijk, J.; Hessel, V. Flow synthesis of phenylserine using threonine aldolase immobilized on Eupergit support, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2168–2179.

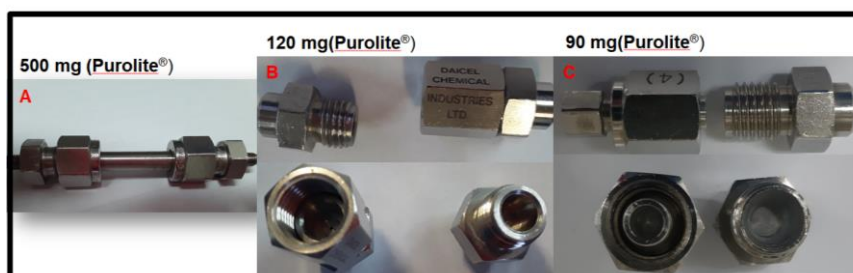


Imagem 3: Opções de micro-reatores: (A) reator de tubo de aço inox (B) suporte para cartucho pré-coluna de HPLC (C) filtro de pré-coluna de HPLC

Observando-se na Imagem 3 que a opção **C** seria a mais adequada para ser utilizada nessa etapa inicial para os testes em fluxo, a opção **A**, não foi descartada, também pode ser utilizada, porém, quando todas as etapas estiverem otimizadas e uma nova amostra de alga foi coletada. O reator proposto teria uma quantidade de suporte muito reduzida. De tal modo, também foi verificada na literatura a existência de alguma publicação na qual uma resina epóxi foi utilizada para preencher um micro-reator de leito fixo com uma quantidade de suporte próxima a proposta. Foi encontrada uma publicação na qual 133 mg de Eupergit® contendo apenas 1,15 mg de enzima treonina aldolase imobilizada foram utilizadas em um micro-reator de leito fixo.²⁰⁹ Com as considerações acerca de suporte e tipo de reator resolvidas, voltou-se para uma planejamento de aplicação do reator com a enzima halogenante com o propósito sintético.

Um fator importante a ser considerado quando se trata de uma reação enzimática, em um sistema como o proposto, para halogenar os substratos orgânicos previamente sintetizados é a estabilidade da enzima em solventes orgânicos. Com relação à estabilidade de bromoperoxidases foi encontrado que álcoois de cadeia curta podem ser utilizados em até 30% v/v sem causar inativação da enzima de interesse, desse modo, metanol, etanol e isopropanol poderiam ser empregados como co-solventes nas reações.²¹⁰⁻²¹¹

Outra publicação que se propôs a realizar esse tipo de transformação em escala preparativa também foi encontrada, nesse caso a mesma enzima, proveniente do mesmo microorganismo foi utilizada. Porém nessa publicação foram explorados alguns solventes, diferentes de álcoois para serem empregados nas reações, como mostra a Figura 31.

²⁰⁹ H. Fu *et al.* Threonine aldolase immobilization on different supports for engineering of productive, cost-efficient enzymatic microreactors, *J. Chem. Eng.* **2012**, 207-208, 564–576.

²¹⁰ Wever, R.; Plat, H.; de Boer, V. Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed *Ascophyllum nodosum*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1985**, 830, 181–186.

²¹¹ Sheffield, D. J.; Harry, T. R.; Smith, A. J.; Rogers, L. J. *Corallina officinalis* bromoperoxidase immobilized on agarose, *Phytochemistry*, **38**, 1103–1107.

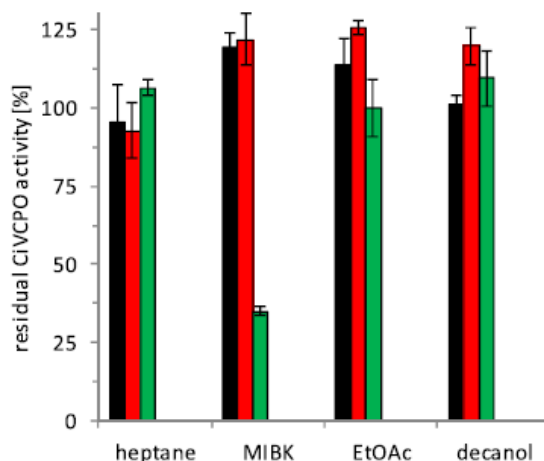


Figura 31: Incubação da CIVCPO em sistema bifásico, ■ logo depois da mistura, ■ 4 horas depois da mistura, ■ 24 horas depois da mistura.²¹²

Os autores do estudo verificaram que a utilização de acetato de etila nas reações seria mais conveniente, principalmente se considerados os aspectos da química verde, além de ter uma polaridade adequada para a solubilização do produto da reação. Todo o processo foi otimizado e reproduzido numa escala de 10 L em um reator do tipo tanque.

6. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente aos resultados relatados neste trabalho, foram realizados no laboratório estudos de triagem de algumas espécies de algas provenientes da costa brasileira para a verificação da existência de atividade brominante nas amostras. A professora e pesquisadora Dra. Mutue Toyota Fujii do instituto de pesquisas ambientais gentilmente disponibilizou as amostras de algas provenientes da costa brasileira, coletadas no estado do Espírito Santo. Dentre as espécies de algas estavam a *Ochtodes sp.*, *Padina sp.* e a *Laurencia dendroidea*. Após a primeira avaliação inicial, realizada pela técnica Ma. Edna Kagohara ficou decidido que a alga *L.dendroidea* seria a espécie utilizada para prosseguir os estudos de isolamento da enzima.

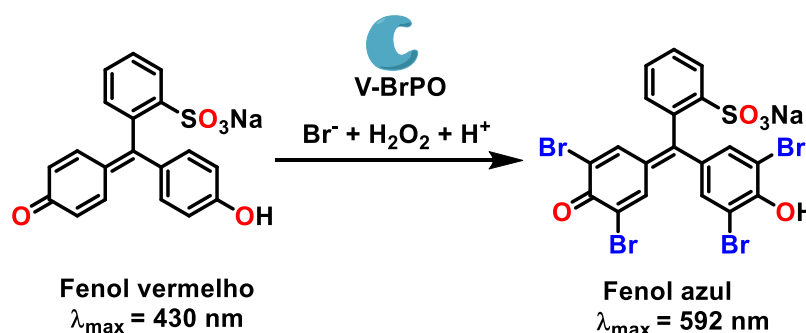
A *Laurencia dendroidea* é uma espécie de alga vermelha (Rhodophyta) que é comum na costa brasileira e a espécie é amplamente estudada, por pesquisadores locais, com vistas ao isolamento de produtos naturais.²¹³ Dentre os compostos que podem ser isolados desta alga está

²¹² Höfler, G. T.; Buttler, A.; Younes, S. H. H.; Wever, R.; Paul, C. E.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. Chemoenzymatic Halocyclization of 4-Pentenoic Acid at Preparative Scale, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2020**, 8, 2602–2607.

²¹³ Pereira, R. C.; Da Gama, B. A. P.; Teixeira, V. L.; Yoneshigue-Valentin, Y, Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtuse*. *Braz. J. Biol.* **2003**, 63, 665–672. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842003000400013>

o elatol que é o metabólito secundário bromado mais abundante na *Laurencia dendroidea*.²¹⁴ Considerando a distribuição de enzimas halogenantes nas algas vermelhas, relatadas na introdução deste capítulo e a presença de metabólitos bromados na alga vermelha de interesse, iniciaram-se alguns testes para a verificação da presença da enzima vanádio bromoperoxidase na amostra de alga.

Com o objetivo de se verificar a presença da atividade brominante de compostos orgânicos na amostra de alga, o fenol vermelho foi escolhido como substrato modelo para esta avaliação. O fenol vermelho ao entrar em contato com HOBr reage para formar o bromo fenol azul que apresenta uma banda de absorção típica em 592 nm (Esquema 73), desse modo, a bromação do fenol vermelho pode ser verificada espectrofotometricamente.²¹⁵ A bromação também pode ser verificada visualmente, pois a coloração alaranjada da solução contendo o fenol vermelho se torna azul após alguns minutos de reação na presença da enzima.



Esquema 73: Bromação peroxidativa do fenol vermelho.

A amostra de *L. dendroidea* utilizada neste trabalho era diferente da primeira amostra utilizada pela pesquisadora Ma. Edna para avaliação da presença da enzima haloperoxidase, pois foram coletadas em épocas diferentes do ano na praia dos Castelhanos, Anchieta-ES. Como a presença da enzima na alga é sazonal,²¹⁶ a nova amostra foi avaliada para a verificação da presença de atividade brominante. O tampão de extração da enzima é um aspecto importante da etapa de obtenção da haloperoxidase, o tampão Tris- H_2SO_4 foi escolhido para a realização da etapa de ruptura celular, visto que foram encontrados procedimentos relatando a sua utilização.^{217,218} Apesar do tampão fosfato ser recorrente em processos de purificação da

²¹⁴ Santos, A. O.; Veiga-Santos, P.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D., Sudatti, D. B., Bianco; E. M., Pereira; R. C. Nakamura; C. V. Effect of Elatol, Isolated from Red Seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonenses*. *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 2733–2743. <https://doi.org/10.3390/md8112733>.

²¹⁵ Wever, R.; Tromp, M. G. M.; Krenn, B. E.; Marjani, A.; Van To, M. Brominating Activity of the Seaweed *Ascophyllum nodosum*: Impact on the Biosphere. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, 25, 446–449. <https://doi.org/10.1021/es00015a010>

²¹⁶ Itoh, N.; Shinya, M., Seasonal evolution of bromomethanes from coralline algae (Corallinaceae) and its effect on atmospheric ozone, *Mar. Chem.* **1994**, 45, 95-103.

²¹⁷ Wever, R.; Plat, H.; Boer, E., Characterization of nonheme iron and reaction mechanism of bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*., *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, 830,181-186. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45306-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45306-9)

²¹⁸ Sabuzi, F.; Churakova, E.; Galloni, P., Wever, R., Hollmann, F., Floris, B., Conte, V., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 21, 3519-3525. <https://doi.org/10.1002/ejic.201500086>.

bromoperoxidase a partir de algas vermelhas, alguns experimentos realizados anteriormente pela Ma. Edna mostraram a perda de atividade de bromação do fenol vermelho, pois o íon fosfato é capaz de causar inibição da enzima,²¹⁹ desse modo ele não foi utilizado.

O procedimento para exposição da enzima consistia em triturar a amostra de alga e tampão em liquidificador. A proporção utilizada para os testes de avaliação do tampão a ser utilizado foi 1:10 (5 g de alga para 50 mL de tampão). A proporção avaliada em estudos anteriores pela Ma. Edna era de 1:1 (alga: tampão) porém, como seriam utilizados apenas 5 g da alga nesses testes, e o rompimento da amostra foi realizado no liquidificador, foi necessário aumentar a proporção do tampão utilizado, a fim de permitir uma homogeneização da amostra dentro do copo do liquidificador. A Ma. Edna estudou previamente, com a amostra de alga anterior, qual seria a melhor sequência de etapas de exposição celular, extração, filtração e coluna cromatográfica. Considerando o estudo previamente realizado e com a nova amostra de alga em mãos, optou-se por verificar o pH do tampão que forneceria a melhor visualização da atividade enzimática de modo qualitativo, ou seja, apenas verificando visualmente a formação do produto de bromação, através do desenvolvimento da coloração azul no meio reacional.

O primeiro tampão utilizado foi o Tris-H₂SO₄ pH 6 (0,2 mol. L⁻¹), desse modo uma amostra de 5 g de alga, junto a 50 mL de tampão Tris- H₂SO₄ pH 6 era triturada durante 3 ciclos de 5 minutos em liquidificador. A suspensão resultante era centrifugada por 5 minutos a 9500 rpm, e a seguir, uma alíquota da solução resultante era utilizada para a realização da atividade enzimática. A atividade enzimática era realizada em microtubo, com a utilização de solução aquosa H₂O₂ (30 % m/m), solução aquosa de fenol vermelho (1 mg. mL⁻¹), solução aquosa de KBr (100 mmol. L⁻¹), podendo conter ou não a solução aquosa de orto-vanadato de sódio (10 µmol. L⁻¹) para reconstituição da apoenzima.²²⁰ Com o propósito de se comparar e evitar falsos positivos utilizaram-se alguns controles.

Como é possível observar na **Figura 32** o microtubo 1 em t = 0 min, continha todos os componentes do teste de atividade com exceção da solução de extrato bruto de alga e da solução de ortovanadato de sódio. O microtubo 2 continha os componentes do teste de atividade incluindo a solução de extrato bruto de alga, porém não foi adicionado o ortovanadato de sódio. O microtubo 3 continha todos os componentes do teste de atividade enzimática, incluindo o vanadato, por fim o microtubo 4 continha os componentes de teste sem a solução do extrato bruto mas com vanadato, simplesmente para verificar se ele poderia gerar um falso resultado positivo.

²¹⁹ Weinberger, F.; Coquempot, B.; Forner, S.; Morin, P.; Kloareg, B.; Potin, P. *Journal of Experimental Botany*. **2007**, *58*, 4365. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm303>

²²⁰ Suthiphongchai, T.; Boonsiri, P.; Panijpan, Vanadium-dependent bromoperoxidases from Gracilaria algae, B. *J Appl Phycol*. **2008**, *20*, 271-278. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9243-y>

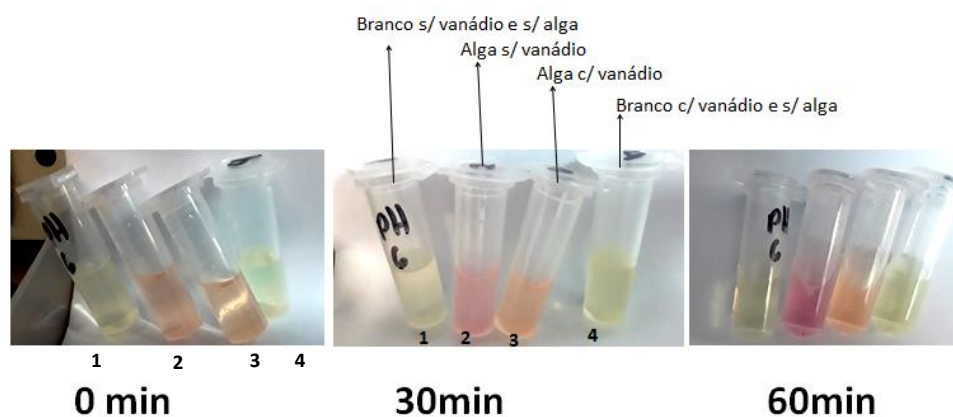


Figura 32: Atividade enzimática com fenol vermelho em tampão Tris-H₂SO₄ pH 6.

Como é possível verificar na sequência de imagens da **Figura 32**, após 30 minutos de reação, o qual é o tempo padrão para a avaliação da atividade brominante com fenol vermelho, verificou-se que o microtubo 2 contendo o extrato bruto da alga, se tornou levemente rosa, e com 60 minutos de atividade uma coloração levemente roxa surgiu, indicando a possível formação do produto azulado, porém em uma concentração muito baixa, numa avaliação qualitativa. Também verificou-se que o microtubo 4 não apresentou mudança na coloração, indicando que nessas condições o íon vanadato adicionado não catalisaria a reação de bromação do fenol vermelho.

A seguir, o tampão Tris-H₂SO₄ pH 7 (0,2 mol. L⁻¹) foi avaliado, como é possível verificar na **Figura 33**, o microtubo 1 continha os componentes do teste de atividade enzimática com exceção do extrato bruto da alga e do vanádio, formando uma solução levemente rosada. O microtubo 2 continha o extrato bruto da alga porém ortovanadato de sódio não foi adicionado. A coloração rosada presente nos microtubos contendo o extrato de alga ocorreu devido à extração de ficoeritrinas presente nas algas vermelhas, essas proteínas são pigmentos presentes em elevada concentração nas algas vermelhas.²²¹ Após 30 minutos de reação em pH 7 é possível notar a mudança de coloração dos microtubos 2 e 3, que como mostra a **Figura 33**, contém o extrato bruto da alga, essa mudança de coloração para o azulado fica mais evidente na terceira imagem, correspondente a 60 minutos de reação. Novamente nota-se que não houve mudança de coloração no microtubo 4 correspondente, ao teste de atividade enzimática, realizado sem extrato bruto e com adição de ortovanadato de sódio.

²²¹ Zhang, B. Cao, X., Cheng, Xiaofei, Wu, P., Xiao, T., Zhang, W. Efficient purification with high recovery of vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*, *Biotechnol. Lett.* **2011**, 33, 545–548. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0454-y>

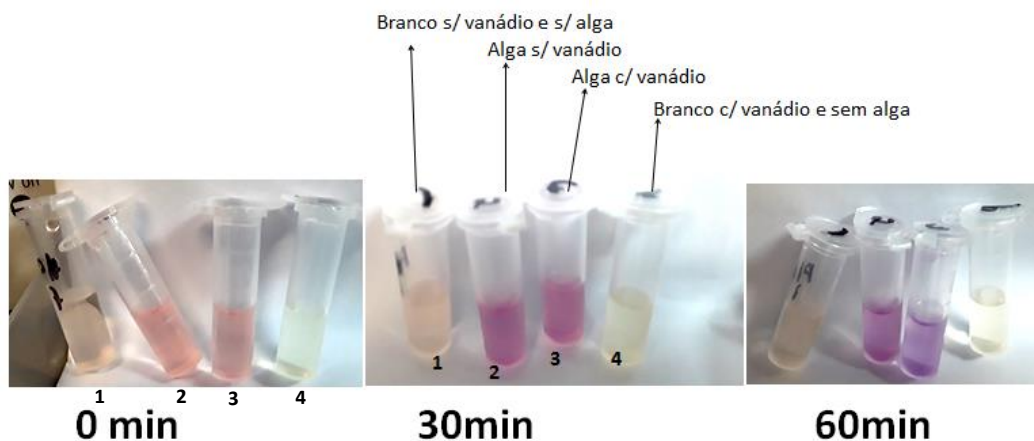


Figura 33: Atividade enzimática com fenol vermelho em tampão Tris-H₂SO₄ pH 7.

A seguir foi realizado o teste com o tampão Tris-H₂SO₄ pH 8 (0,2 mol. L⁻¹), como é possível observar na **Figura 34**, o microtubo 1 apresenta o controle negativo, no qual não foi adicionada amostra do extrato bruto da alga, nesse caso fica evidente a coloração roxa que o fenol vermelho apresenta em pH 8. O microtubo 2 apresenta o teste de atividade contendo o extrato bruto da alga, no microtubo 3 foi adicionada a solução de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) e o extrato bruto. Como foi possível verificar na sequência de imagens, após 30 minutos de reação o microtubo 3, o qual continha o extrato bruto da alga e vanádio, apresentou mudança de coloração para o azulado, sendo que a coloração se intensificou com 60 minutos de reação.

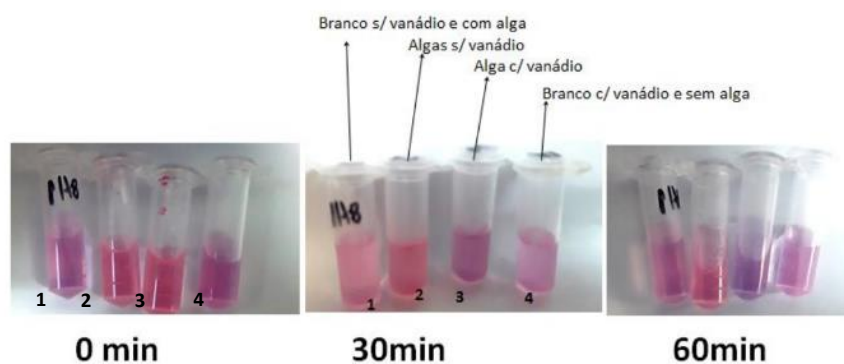


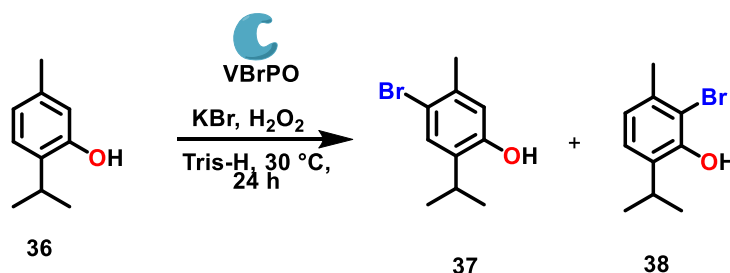
Figura 34: Atividade enzimática com fenol vermelho em tampão Tris-H₂SO₄ pH 8

Com o propósito de se certificar espectrofotometricamente a atividade observada com 30 minutos de reação, foram realizadas leituras, a **Tabela 15** a seguir mostra os valores obtidos. Como é possível observar, a maior absorbância em 590 nm, foi observada quando o teste de atividade foi realizado em pH 7 com a adição de vanadato. Ao se utilizar o extrato de alga em pH 7 notou-se uma pequena diferença de absorção, que foi maior em pH 8. Desse modo, o pH 7 foi então considerado ideal para a realização das etapas de purificação junto a avaliação da atividade enzimática de maneira visualmente prática.

Tabela 15: Valores de absorvância em 590 nm no teste de atividade para diferentes pHs

pH	Abs (590 nm) u.a.	Abs (590 nm) u.a. com vanadato
6	0,03	0,11
7	0,22	0,43
8	0,20	0,49

Considerando que o objetivo inicial desse estudo era a imobilização da enzima haloperoxidase obtida da alga, e sua utilização em um sistema de fluxo contínuo, optou-se por verificar a possibilidade de utilização de um substrato orgânico que pudesse ser analisado por CG-EM, para a realização dos ensaios de atividade. Ao se realizar a revisão da literatura foi encontrado que o timol poderia ser utilizado.¹⁷⁴ Já que é um composto disponível comercialmente, e também um substrato ativado para bromação eletrofílica. Como mostra a **Tabela 16**, a reação de bromação do timol foi realizada com o extrato de alga proveniente do mesmo processo de extração relatado anteriormente, em uma temperatura de 30 °C durante 24 horas.

Tabela 16: Teste de bromação enzimática do timol^a

Entrada	Na ₃ VO ₄ (10 μmol. L ⁻¹) ²²¹	37 + 38 (%) ^b
1 ^c	-	8,4
2 ^d	-	-
3 ^d	2,5	-
4	2,5	7,8
5	-	2,7

^a Condições de reação: Timol (10 mmol. L⁻¹), KBr (10 mmol. L⁻¹), H₂O₂ (10 mmol. L⁻¹, 30% *m/m* solução aquosa) e 2 mL de extrato de alga em tampão Tris-H, pH 7. ^b Conversões determinadas por CG-EM. ^c Adicionou-se 2,5 μL de H₂O a cada 15 minutos ^d Adicionou-se 2 mL de tampão Tris-H, pH 7 em substituição ao extrato de alga.

No artigo de referência no qual a reação de bromação do timol por uma haloperoxidase foi realizada, os autores relataram a utilização de adição contínua do peróxido de hidrogênio, para evitar a inativação da enzima, visto que, alguns estudos comprovaram a inativação da enzima pelo peróxido de hidrogênio.²²² Por isso o volume total da solução de peróxido de hidrogênio a ser adicionado foi dividido em 10 adições, sendo uma a cada 10 minutos. Como mostra a **Entrada 1, Tabela 16**, a utilização do extrato de alga, sem a adição de ortovanadato e adicionando-se o H₂O₂ continuamente, forçou uma conversão de 8,4 % para os dois isômeros. Nas **Entradas 2 e 3 da Tabela 16** foram realizados controles negativos utilizando-se o tampão Tris-H em substituição ao extrato de alga, sendo que na estrada 3 foi adicionado o ortovanadato, e como é possível verificar, nenhuma conversão foi obtida, eliminando-se a possibilidade do vanadato inorgânico catalisar a reação de bromação.

Como mostra a **Entrada 4, Tabela 16**, ao adicionar-se ortovanadato ao meio reacional e o H₂O₂ em uma única vez, uma conversão de 7,8 % foi obtida. Entretanto quando o H₂O₂ foi adicionado em uma única vez e não foi utilizado o ortovanadato, uma conversão de 2,7 % foi obtida na **Entrada 5, Tabela 16**. Apesar das baixas conversões obtidas, pode-se afirmar que uma possível inibição da enzima pelo H₂O₂ pode ter ocorrido e a adição de ortovanadato levou a mesma conversão observada na **Entrada 1**, quando o H₂O₂ foi adicionada aos poucos. As

²²² Soedjak, H. S.; Walker, J. V.; Butler, A., *Biochemistry*, **1995**, 34, 126889–12696. <https://doi.org/10.1021/bi00039a027>

baixas conversões eram esperadas neste estudo, visto que uma solução de extrato bruto de alga foi empregada, sem nenhuma etapa de purificação, sendo assim, a concentração da enzima de interesse era muito baixa.

Após a realização desses estudos, infelizmente, devido a pandemia causada pelo coronavírus, os estudos de isolamento da V-BrPO não foram aprofundados, pois a realização deles pela doutoranda dependia da colaboração da Ma. Edna. Desse modo, quando o trabalho presencial retornou ao normal, optou-se por realizar a obtenção da enzima de forma parcialmente purificada, já que foram encontrados artigos relatando a dificuldade de remoção do pigmento característico das algas vermelhas, a ficoeritrina.²²³ Também se notava durante a manipulação das amostras extraídas da alga a formação de uma fase viscosa em certas etapas de purificação, que é verificada devido à presença de polissacarídeos, que são extraídos juntamente à enzima e também apresentam difícil remoção.²²⁴ Alguns experimentos foram realizados com o intuito de se remover esses componentes indesejados, porém nenhum deles levou a remoção completa, sem que houvesse inativação enzimática, portanto optou-se por utilizar a enzima parcialmente purificada, assim como relatado nos artigos citados.

Diante das dificuldades encontradas durante os estudos de purificação considerou-se algumas publicações que relataram a utilização da enzima haloperoxidase de alga vermelha de forma parcialmente purificada para estudos de imobilização.^{220,225} Nesse contexto levou-se em consideração o objetivo inicial do estudo que envolvia utilizar a enzima haloperoxidase imobilizada em fluxo contínuo, como uma ferramenta halogenante. Desse modo, decidiu-se realizar um processo de purificação partindo-se de maior quantidade de alga com o propósito de se obter uma quantidade apreciável da enzima.

Partiu-se de 750 g de alga que estava congelada armazenada em um freezer a - 20 °C. A forma de ruptura celular utilizada foi o liquidificador. Todo o conteúdo da alga foi liquidificado junto ao tampão Tris-H₂SO₄ pH 7 (750 mL), na proporção de 1:1 por 5 minutos, como estudado no protocolo anterior. Durante essa etapa notou-se uma dificuldade relacionada à homogeneização e trituração da amostra, devido à potência do liquidificador, como uma maior massa foi empregada, houve dificuldade no funcionamento do equipamento. Desta forma, nas próximas aquisições de amostras de alga e novas realizações de extrações, acredita-se que um liquidificador industrial, ou de alta rotação, possa ser empregado.

²²³ Fukuzawa, A., Aye, M., Takasugi, Y., Nakamura, M., Tamura, M., Murai, A., Enzymatic Bromo-ether Cyclization of Laurediols with Bromoperoxidase. *Chem. Lett.* 1994, 2307- 2310.

²²⁴ Itoh, N.; Hiraoka, M.; Ohsawa, N.; Taniguchi, T.; Kamenarska, Z. *Phytochemistry*, 68, 2007, 1358-1366.

²²⁵ Itoh, N., Cheng, L. Y., Izumi, Y., Yamada, H. Immobilized bromoperoxidase of *Corallina pilulifera* as a multifunctional halogenating biocatalyst. *J. Biotechnol.* 5, 1987, 29-38.

Após a primeira etapa de trituração, a amostra de alga triturada foi mantida em contato com o tampão de extração sob agitação magnética durante 1 hora. A seguir, a amostra de extrato protéico foi transferida para frascos de centrifugação e centrifugada a 4°C, por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante, nomeado extrato 1, foi então recolhido e armazenado, o pellet foi ressuspenso em tampão de extração e novamente liquidificado por 5 minutos, e deixado em agitação para extração por mais 1 hora, posteriormente, após centrifugação, o mesmo processo foi realizado mais uma vez, dessa forma obteve-se 3 extratos brutos, que apresentavam volumes de 1,2 L até 0,9 L. Nessa primeira etapa, a principal dificuldade foi relacionada à viscosidade dos extratos obtidos após a ruptura em liquidificador, a presença de compostos como os polissacarídeos, já citados, podem ser responsáveis por essa propriedade, que dificultou a etapa de extração por agitação magnética.²²⁶ Verificando-se a literatura acerca do tema, encontrou-se que essas substâncias podem ser extraídas da alga em contato com tampão por agitação magnética durante cerca de 3 horas, uma etapa que pode vir a ser adicionada nos próximos experimentos.

Geralmente após essa primeira etapa de ruptura celular e remoção de materiais insolúveis por centrifugação, a próxima etapa relatada na literatura seria a precipitação com sulfato de amônio.²²⁷ Porém, alguns grupos não utilizam a etapa de prévia de precipitação.¹⁸⁰ Como essa etapa foi estudada com amostras anteriores e não foi eficiente, ela não foi executada nessa preparação em maior escala. Apesar de que a primeira centrifugação gerou pellets bastante estáveis, o sobrenadante removido, tanto do extrato 1, como do 2 e 3, estavam bastante turvos, e para evitar a danificação da coluna DEAE Hiprep 16/10, foi necessário centrifugar todos os volumes de extratos 1-3 em microtubos de 2 mL, durante 10 minutos a 4°C em 12000 rpm. Apesar de demandar algum tempo essa etapa foi muito necessária, visto que em todas as rodadas notava-se a formação de um pellet nos microtubos. Desse modo, a etapa adicional de centrifugação de todos os extratos brutos evitaria algum dano à coluna.

Como o volume final dos três extratos brutos obtidos foi em torno de 1L optou-se por concentrar os mesmos separadamente, para aplicação na coluna. Desta forma foi empregada membrana de ultrafiltração Amicon 10 kDa, na qual em cada etapa reduzia-se o volume da solução inicial de 12 mL, para uma média aproximada de 1 mL, para o extrato 1 após a centrifugação em 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, volumes um pouco menores eram alcançados para os extratos 2 e 3. A amostra concEntrada foi aplicada com amostrador de 50 mL na coluna DEAE utilizando o FPLC. Um método previamente definido para essa etapa foi

²²⁶ Ferreira, L. G.; da Silva, A. C. R.; Noseda, M. D.; Fuly, A. L.; de Carvalho, M. M.; Fujii, M.T.; Sanchez, E.F.; Carneiro; Duarte, J.M.E.R. Chemical structure and snake antivenom properties of sulfated agarans obtained from *Laurencia dendroidea* (Cerámiales, Rhodophyta), *Carbohydr. Polym.* **2019**, 218, 136–144.

²²⁷ Itoh, N.; Izumi, Y.; Yamada, H. Purification of bromoperoxidase from *corallina piluifera*, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, **131**, 1985, 428 –435.

empregado, e para cada 50 mL de extrato bruto injetado, coletaram-se 56 frações de 4 mL, num gradiente de salinidade de 0% a 100% de NaCl em tampão Tris H₂SO₄ pH 7, 50 mmol. L⁻¹, em um fluxo de 5 mL.min⁻¹. O extrato 1 rendeu cerca de 5,5 injeções de 50 mL.

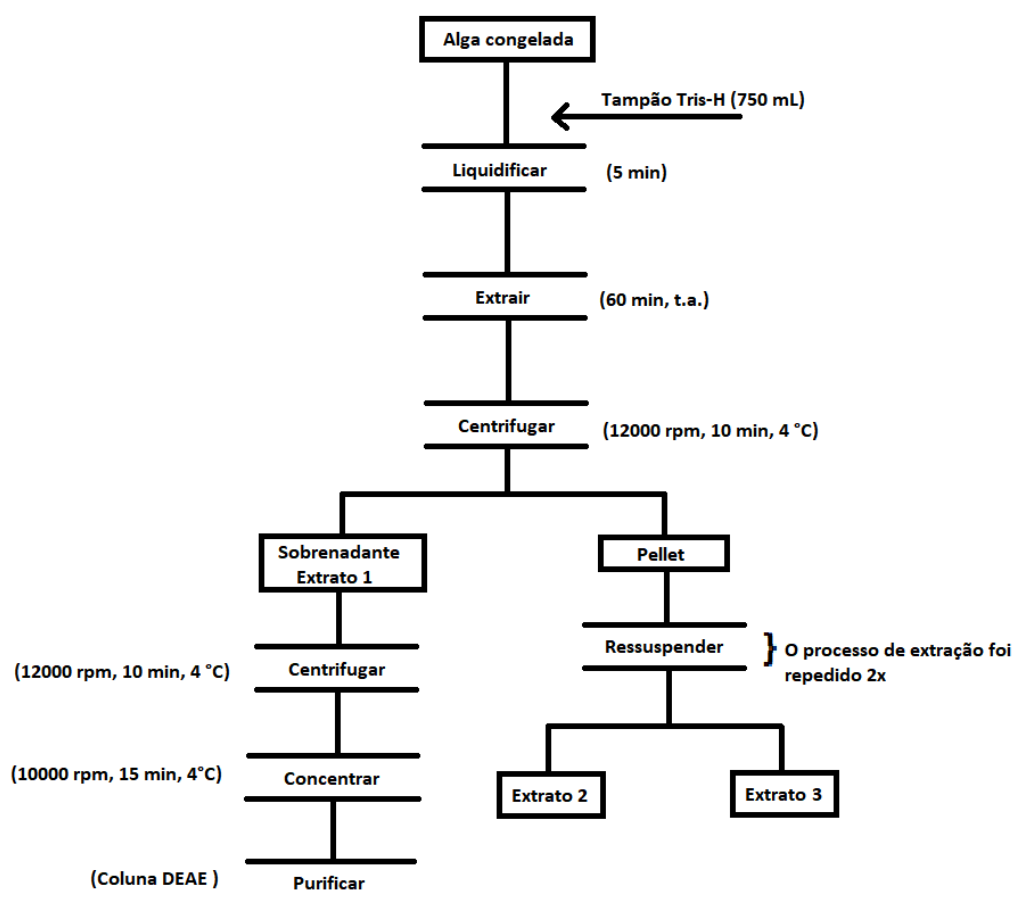


Figura 35: Fluxograma representando as etapas envolvidas no processo de extração e semi-purificação da haloperoxidase dependente de vanádio.

A seguir foi testada a atividade das frações com fenol vermelho, podendo-se verificar visualmente qual delas exibiam atividade, notou-se que apesar do gradiente de salinidade, as frações que exibiam atividade continham a coloração rosada, relativa à proteína que dá coloração à alga vermelha, indicando que essa proteína não é eficientemente separada da enzima de interesse na coluna de afinidade. As frações coletadas foram separadamente concentradas na membrana de ultrafiltração Amicon 10 kDa. Nessa etapa, além de se verificar que muitas frações que exibiam atividade, continham coloração rosa, verificou-se que algumas delas aparentavam um sistema bifásico, provavelmente devido à presença dos polissacarídeos que foram extraídos diretamente junto à enzima. A seguir uma eletroforese em gel de poliácridamida foi feita com as respectivas frações concentradas para a verificação do perfil protéico das frações eluídas da DEAE (Imagem 4).

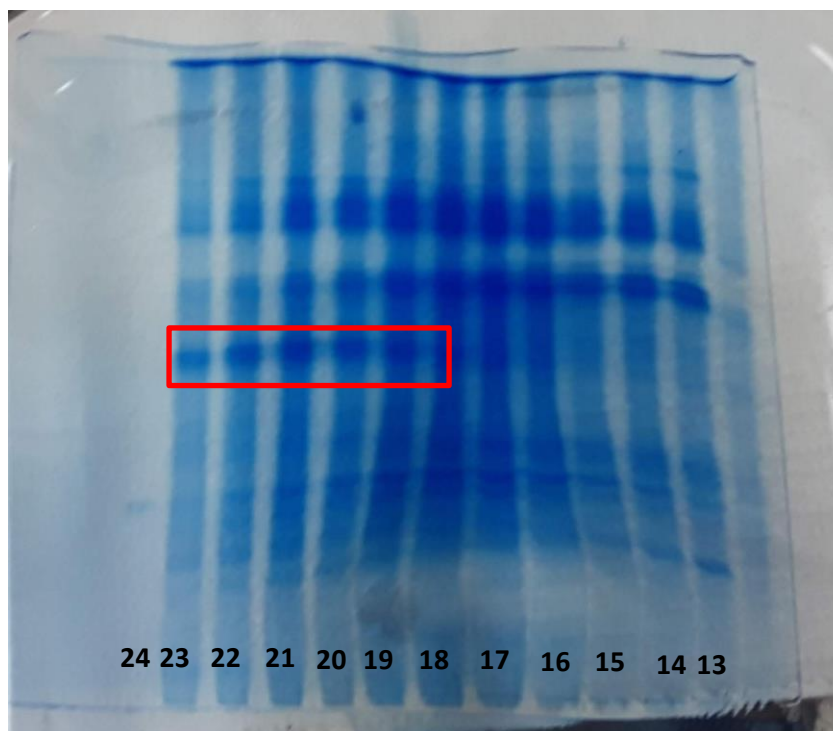


Imagem 4 : Gel de poliacrilamida corado com azul de comassie com as frações 13 a 23 coletadas da purificação pela coluna DEAE .

Combinando a observação de atividade catalítica, qualitativamente com fenol vermelho e também o perfil protéico obtido no gel, acredita-se que a enzima tenha sido eluída principalmente entre as frações 18-23 eluídas da coluna, como destacado em vermelho na **Imagem 4**. A partir do perfil observado no gel, e também a partir das atividades das frações, optou-se por reunir as frações da coluna em 3 grupos, frações 13-18, que não apresentam alta concentração das bandas destacadas em vermelho na **Imagem 4**, mas que apresentavam atividade após 15 minutos de reação com fenol vermelho. As frações de 19- 23 que estão destacadas em vermelho aparentavam ter uma banda intensa e que durante os testes de atividade mostraram um resultado positivo em menos de 5 minutos de reação, o que pode indicar que tais bandas correspondam à enzima de interesse. As frações de 24-36 também exibiram atividade, porém como se pode notar no gel, a concentração protéica era baixa. Como as frações 37-53 poderiam conter alguma quantidade residual da enzima, elas também foram reunidas e armazenadas.

Depois de reunidas como foi descrito anteriormente, fez-se necessário trocar o tampão das amostras, visto que o tampão TRIS empregado na extração e purificação apresenta resíduos de NH_2 , que não é indicado para ser utilizado como tampão em um procedimento de imobilização em resina epóxi, devido à possível reação entre os grupos. Na literatura, as imobilizações em resina epóxi, geralmente são realizadas em tampão fosfato, um tampão que optamos por eliminar dos procedimentos que envolvessem a enzima, devido à sua inativação por substituição do cofator VO_4^{3-} , pelo ânion fosfato. Como o tampão citrato em pH 5,5 e 6,3 já havia sido utilizado em

reações com a haloperoxidase, optou-se por verificar a estabilidade da enzima frente a esse tampão.

Assim um pequeno teste foi realizado, coletando-se uma amostra de fração concEntrada contendo atividade em tampão Tris-SO₄ pH 7 e diluindo-se para o tampão citrato pH 6,3 100 mM, essa amostra foi incubada durante 16 horas em geladeira, e a seguir adicionados os reagentes. A partir desse teste foi verificado que a enzima continuou ativa (Imagem 5), porém todo o procedimento de imobilização seria realizado em um pH não correspondente ao ideal para a atividade enzimática, como encontrado nos resultados da Tabela 15.

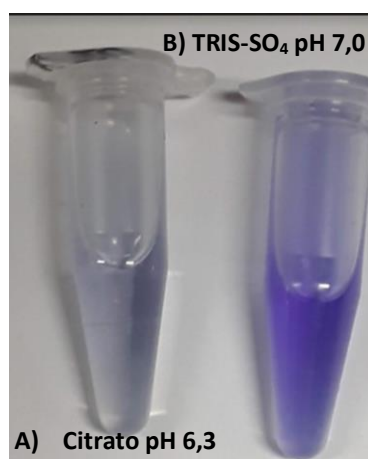


Imagem 5: Comparação dos testes de atividade (A) em tampão citrato pH 6,3 (B) em TRIS-SO₄ pH 7,0.

Constatado que a enzima se mantinha ativa em contato com o tampão citrato, os três grupos de amostras concentradas foram então transferidos para um tubo falcon e o volume completado para 12 mL, com tampão citrato pH 6,3 100 mM contendo 10 µM de ortovanadato de sódio, o vanadato foi adicionado para assegurar a manutenção do cofator no sítio enzimático durante o armazenamento.²²⁸ Essa amostra foi armazenada a 4 °C durante 24 horas. A seguir, transferida para uma membrana de ultrafiltração 10 KDa e centrifugada para remoção do tampão Tris, o concentrado remanescente na membrana foi então lavado com tampão citrato pH 6,3 50 mM.

As amostras concentradas foram então alvo de quantificação protéica e estudo de cinética enzimática. A **Tabela 17** a seguir mostra as concentrações protéicas obtidas para as frações combinadas provenientes do primeiro extrato protéico. A obtenção de uma amostra pura da enzima não era o objetivo desse processo, por isso apenas a coluna de afinidade DEAE foi realizada. Os relatos da literatura que se propõe isolar a enzima em alta pureza descrevem exaustivas colunas cromatográficas, cerca de 6 as que não seria interessantes para o nosso propósito no momento.¹⁹⁷ Apesar disso, não está descartada a possibilidade de se encontrar a enzima responsável pela atividade brominante, sequenciá-la e cloná-la.

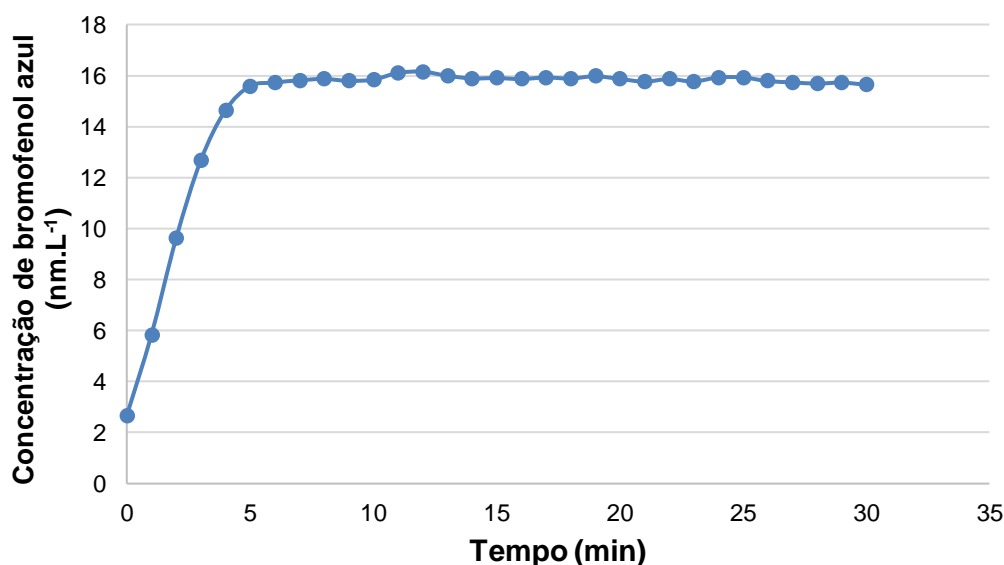
²²⁸ Asthana, A.; Kwang, K. H.; Shin, S.-J. Perumal, J.; Butler, L.; Lee, S.-H.; Kim, D.-P, Bromo-oxidation reaction in enzyme-entrapped alginate hollow microfibers, *Biomicrofluidics*, **2011**, 5, 024117

Tabela 17: Determinação protéica nas frações reunidas da primeira extração.

Amostra	Abs (u.a.) (y)	Conc. Final (mg.mL ⁻¹)
F 13-18	0,5816	14,50
F 19-24	0,8489	21,16
F 25-36	0,1381	3,44
F 37-53	0,0288	0,72

Equação da reta: $y = 0,8023x$ $R^2 = 0,9739$, testes realizados com diluição da enzima em um fator de 1:20.

De acordo com o observado através da determinação protéica pelo método de Bradford, a amostra 13-18 continha grande quantidade de proteínas, notava-se durante a purificação em coluna que eram as frações mais ricas no pigmento rosa, por isso optou-se por realizar testes de atividade enzimática com essa amostra. O Gráfico 1 mostra a cinética enzimática para o fenol vermelho como substrato, nota-se que após 5 minutos a atividade se mantém constante, alcançando um platô, indicando uma amostra muito ativa, possivelmente com alta concentração da enzima desejada.

**Gráfico 1:** Avaliação da cinética enzimática para a amostra 13-18.

A amostra protéica de 19-24 continha frações nas quais, durante os testes de atividade enzimática com fenol vermelho notava-se mudança de coloração instantânea para o azul. Além disso, como é possível notar na **Tabela 17**, linha 2, foi a amostra com maior concentração protéica determinada. Desse modo, a atividade enzimática também foi avaliada ao longo do tempo para essa amostra. Como é possível, verificar no **Gráfico 2**, após 15 minutos de reação uma velocidade constante de transformação já foi estabelecida.

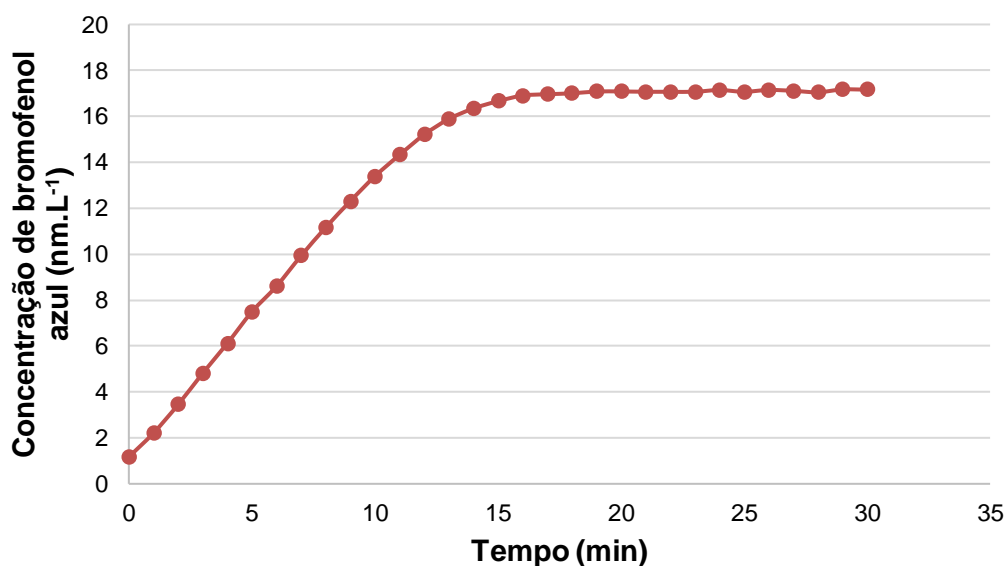


Gráfico 2: Avaliação da cinética enzimática para a amostra 19-24.

As frações de 25-36 continham a menor concentração protéica, porém apresentaram atividade após 15 minutos durante os testes qualitativos realizados nas frações diretamente após a purificação. Apesar de notar-se no **Gráfico 3** uma menor velocidade de conversão do fenol vermelho para essas amostras, foi possível notar no gel de poliacrilamida (Imagem 4) que as bandas circuladas em vermelho se repetiam em baixa concentração.

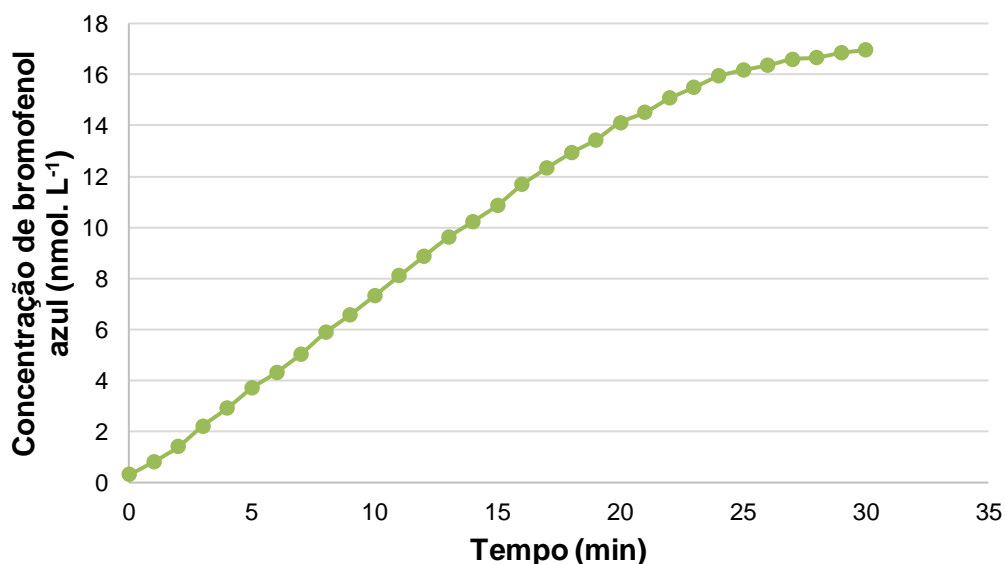


Gráfico 3: Avaliação da cinética enzimática para a amostra 25-36

Os testes de atividade enzimática realizados logo após a coluna cromatográfica nas frações foram feitos em tampão TRIS-SO₄ pH 7,0 (50 mM), assim como definido na **Tabela 15**, este pH foi aquele no qual maior atividade enzimática foi verificada. A cinética enzimática foi realizada em tampão Citrato pH 6,3 (50 mM), e como já relatado, notou-se nos testes qualitativos que a atividade foi menor. Porém os dados de cinética enzimática para a fração 13-18 surpreenderam,

visto que, pelo **Gráfico 1** aparenta ser a amostra mais ativa. É conhecido na literatura que algumas espécies de alga podem ter várias isozimas da haloperoxidase, que inclusive, tem pHs ótimos de atuação diferentes, além de pesos moleculares diferentes.²²⁹ Assim, como nenhum estudo acerca desse tópico foi publicado para a alga *Laurencia dendroidea*, se faz necessária uma investigação mais aprofundada e mais algumas etapas de purificação protéica para se determinar a existência ou não de uma ou mais bromoperoxidases, atuantes em diferentes pHs ótimos.

Desse modo, considerou-se a amostra 19-24 para se iniciar os testes de imobilização. Tal amostra foi escolhida, pois, continha a maior concentração protéica, apresentava tonalidade rosada menos intensa do que a amostra 13-18, a qual se acredita ter maior concentração do pigmento rosa, e também se apresentou bastante ativa nos testes com fenol vermelho. O tampão utilizado foi o citrato pH 6,3 (50 mM). A resina utilizada foi a epóxi-metacrilato de alta porosidade Purolite® (ECR82215F) doada gentilmente pela empresa LifeTech Scientific. A resina foi previamente preparada para receber a solução enzimática, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a imobilização uma razão de 1 mg de proteína para 32 mg de suporte foi empregada nesse primeiro teste. A razão entre suporte e tampão escolhida foi baseada no manual de utilização fornecido pela empresa, uma razão de 1:4. O tempo de agitação da solução protéica em contato com suporte foi de 18 horas, a 25 °C, 600 rpm sendo que temperaturas acima de 30°C não são indicadas, após esse tempo em agitação, o protocolo é manter o suporte em contato com a solução parados por mais 20 horas, portanto essa recomendação foi aplicada nesse primeiro teste.

Após o tempo de imobilização, as amostras contidas nos microtubos foram filtradas em coluna e a solução aquosa recolhida em microtubos. A seguir a amostra de suporte foi lavada com 2 mL de tampão citrato pH 6,3 por 2 vezes e na terceira a amostra foi filtrada a vácuo. A **Imagem 6** mostra o microtubo **A** com a amostra de suporte com enzima imobilizada, que nomeou-se VBrP-Pur, e o microtubo **B**, com suporte que não encontrou em contato com a enzima. Notou-se a coloração rosa mesmo após as lavagens, indicando que o pigmento rosa também foi imobilizado, já que se trata de uma proteína. A imobilização do pigmento não foi preocupante, pois a solução remanescente do procedimento se apresentava com muita coloração rosa, mesmo após a imobilização. Também se considera que, como o suporte foi empregado em largo excesso com relação à massa de proteína, esse pigmento não bloquearia possíveis sítios de ligação para a haloperoxidase.

²²⁹ J. Kongkiattikajorn , P. Ruenwongsab, Isolation and Characterisation of Vanadium Bromoperoxidases from The Red Alga *Gracilaria tenuistipitata*, *ScienceAsia*, **32**, 2006, 31-35

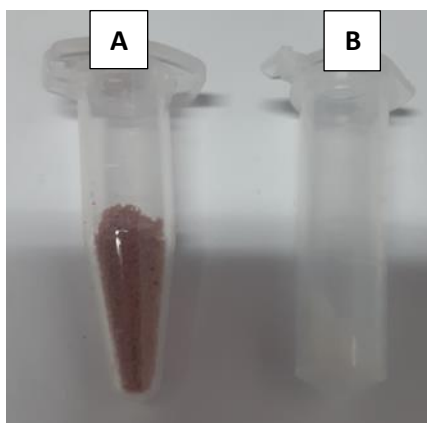


Imagem 6: Suporte com catalisador imobilizado (VBrP-Pur) e suporte equilibrado e lavado com tampão de imobilização.

De posse da resina VBrP-Pur, o primeiro teste qualitativo realizado foi utilizar 1,2 mg do mesmo para verificar a presença ou não da atividade de bromação do fenol vermelho, para isso uma amostra do suporte lavado com tampão sem proteína imobilizada também foi avaliado. A **Imagem 7** a seguir, mostra o teste de atividade com o respectivo controle, no qual o suporte lavado foi deixado em contato com os reagentes (A) e o tubo azulado (B) no qual a amostra de resina **VBrP-Pur** foi colocada. Essa coloração azulada foi alcançada após 2h de contato, sendo que nos primeiros 15 minutos apenas a coloração do suporte mudou, de um rosa, observado na **Imagem 6** para azul intenso característico do fenol azul.

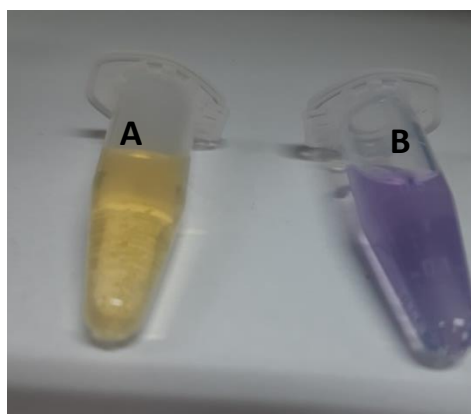


Imagem 7: Teste qualitativo com suporte (A) Controle e (B) atividade enzimática com **VBrP-Pur**.

A seguir, a solução protéica que estava em contato com o suporte, denominada **F19-23-D** foi alvo de determinação de proteína pelo método de Bradford, comparando-a com a amostra de proteína antes do processo de imobilização e a atividade antes e após imobilização também foi realizada. A amostra utilizada para imobilização (**F19-24-A**) continha 7,9 mg/mL de proteína. Após a realização do procedimento de imobilização descrito, a solução remanescente continha 1,9 mg/mL de proteína, indicando que houve ligação de proteína ao suporte. Entretanto, como não se utilizou de frações puras, acredita-se que a eficiência da imobilização deva ser comparada em termos de atividade enzimática. Por isso, foi comparada a atividade da amostra (F19-23) antes da imobilização (**F19-24-A**) e depois (**F19-24-D**)(Gráfico 4).

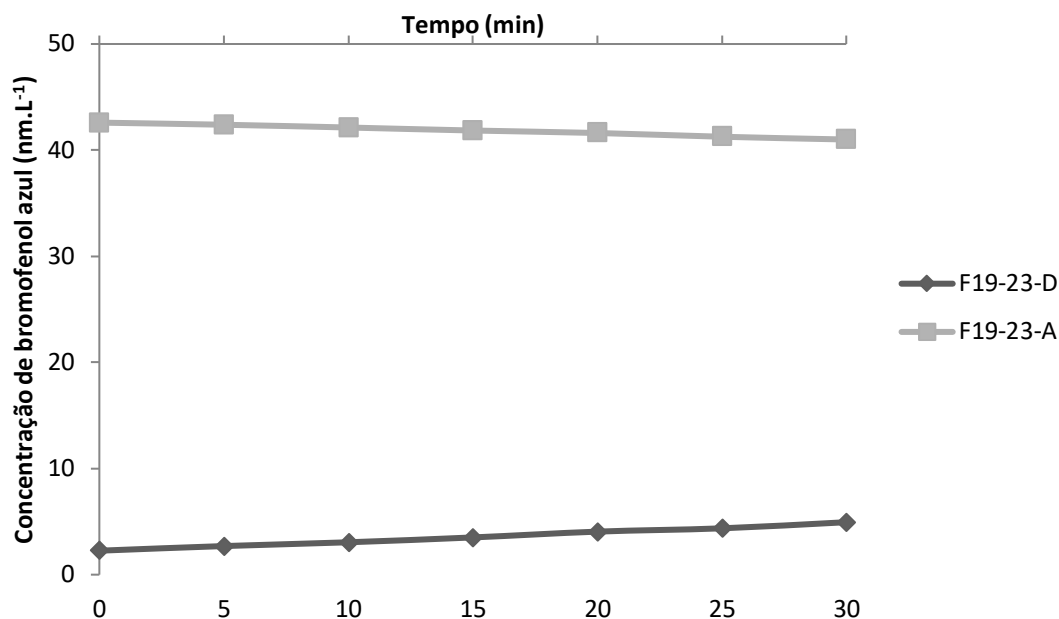


Gráfico 4: Comparação da cinética enzimática antes e depois do procedimento de imobilização

Como é possível verificar no **Gráfico 4**, a variação da concentração de fenol azul ao longo de 30 minutos foi determinada, a linha azul correspondente à solução remanescente (F19-24-D) que foi testada para atividade e mostrou pouca variação, ao contrário da solução protéica inicial (F19-24-A), mais um indício de que foi possível imobilizar a enzima de interesse.

Os estudos com SDS PAGE foram novamente realizados com as amostras provenientes do processo de purificação realizados com 750 g de alga. O objetivo seria identificar a banda relacionada à enzima, para que fosse possível realizar o experimento de digestão *in gel* e obter uma amostra que pudesse ser analisada e sequenciada, mas também desejava-se inferir a massa molecular da proteína, através da comparação com amostras de proteínas de pesos moleculares conhecidos. O primeiro passo foi utilizar as frações mais ativas que foram oriundas da coluna DEAE, para se realizar um zimograma. Desse modo foi corrido um gel SDS PAGE e a atividade enzimática realizada no mesmo, de acordo com o protocolo de Wever *et al.*²³⁰ A atividade foi realizada com a orto-dianisidina como substrato, a qual ao ser oxidada torna-se alaranjada, podendo então a banda relacionada à enzima ser visualizada.

A **Imagem 8 A** mostra o zimograma das frações que foram reunidas da coluna DEAE para serem alvo de imobilização. Como é possível notar, a amostra F35-37 apresentou apenas uma leve coloração alaranjada que foi verificada no topo do gel, o que era esperado, pois ao se avaliar a atividade durante a purificação por coluna, as frações se mostraram muito pouco ativas. A amostra F13-18 mostrou uma banda muito ativa no topo do gel e também uma única banda em

²³⁰ Wever, R.; Krenn, B. E., Renirie, R., **Marine Vanadium-Dependent Haloperoxidases, Their Isolation, Characterization, and Application.** In: Moore BS, ed. *Methods in Enzymology*. London: Elsevier Inc.; 2018,142-191.

peso molecular em torno de 66 kDa. Já a amostra F19-24 mostrou a mesma banda ativa no topo do gel e diversas bandas em torno de 66-80 kDa de peso molecular que também apresentaram atividade. À direita do gel estão as frações concentradas, que não foram reunidas. O gel equivalente e que foi corado com *comassie blue* não forneceu muitas informações sobre as bandas da alga, como é possível notar na **Imagem 8 B** muito pouca concentração da enzima pode ser inferida no topo do gel (destacado em vermelho) e a proteína mais concentrada foi o pigmento rosa.

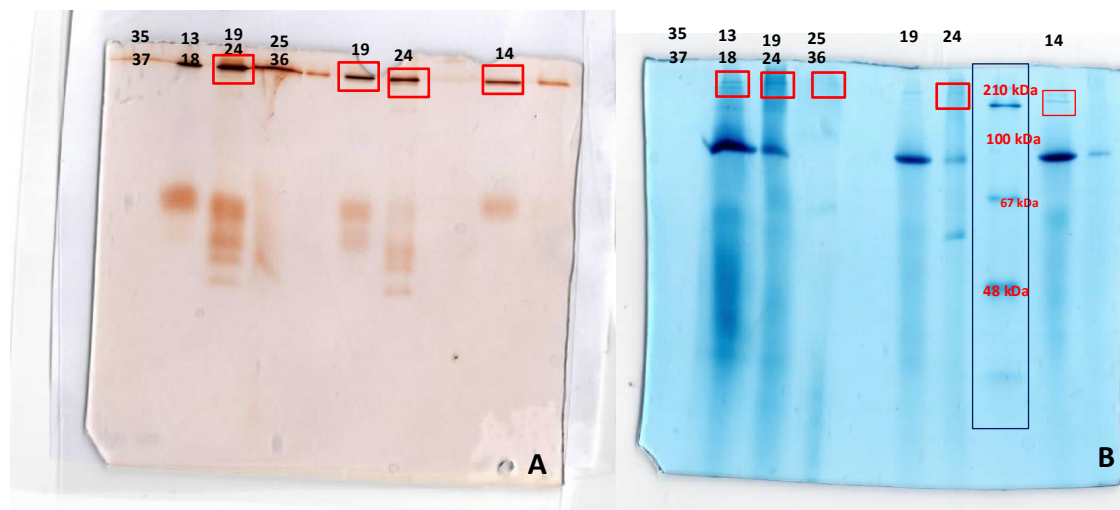


Imagem 8: (A) SDS PAGE da atividade com o-dianisidina (B) SDS PAGE corado com comassie blue.

Devido à dificuldade de visualização das bandas referentes à enzima a partir do corado com *comassie blue* (que é indicado para visualização de proteínas em concentração de mg.mL^{-1}) optou-se por corar com nitrato de prata, uma metodologia mais sensível, que pode indicar concentrações nanomolares de enzima. A **Imagem 9** apresenta o gel corado com nitrato de prata. Nesse caso, foi possível notar nitidamente as bandas relativas à enzima de interesse destacadas em vermelho. Além disso, foi possível verificar que as bandas em torno de 66 kDa, que apresentaram atividade no zimograma A (Imagem 8) apresentavam peso molecular muito próximo ao BSA fato já constatado para outras bromoperoxidases.²²¹

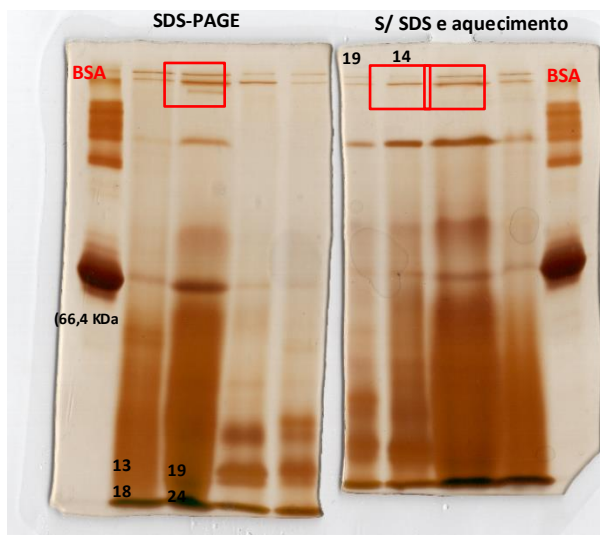


Imagem 9: Géis de poliacrilamida (A) corrido com marcador de peso molecular e (B) corados com nitrato de prata.

A **Imagem 10 A**, a seguir mostra uma foto tirada do gel A (Imagem 8) após 30 minutos de reação, nele é possível notar a coloração alaranjada das bandas ativas no topo do gel. O pigmento rosa extraído conjuntamente com a enzima de interesse e a seguir na região de massa molecular em torno de 66 kDa outras bandas coradas no zimograma. As bandas à esquerda do gel A foram obtidas utilizando-se o procedimento de denaturação, enquanto que as bandas à direita, foram obtidas sem denaturação da amostra. Apesar disso, nota-se retenção da atividade enzimática, mesmo após denaturação. Enquanto que a **Imagem 10 B** mostra o mesmo gel sob irradiação de luz UV 365 nm, nesse caso é possível notar o fenômeno da fluorescência da ficoeritrina encontrada na *Laurencia dendroidea*, o fenômeno de fluorescência da ficoeritrina de algas vermelhas é conhecido na literatura desde 1950, e o comprimento de onda da máxima fluorescência da proteína é em torno de 600 nm, região correspondente à coloração amarela.

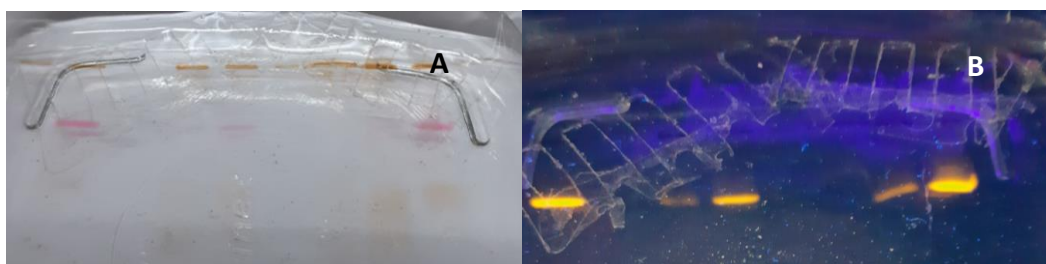


Imagem 10: (A) Zimograma após 30 min de reação (B) o mesmo sob irradiação de UV (365 nm)

Apesar de o gel ter sido normalmente corrido nas condições tradicionais, utilizando-se o detergente para denaturação da proteína e melhor percolação no gel de acrilamida, é possível notar que as bandas mais ativas se encontraram sempre no topo do gel, o que foi observado em todos os experimentos. Na literatura foi encontrado um artigo que realizou a atividade in gel e mostrou os resultados que estão de acordo com o observado durante a realização dos géis

(Figura 12).²³¹ Este fenômeno pode ser causado pela agregação da enzima, levando a uma dificuldade de penetração no gel de acrilamida. Na literatura encontra-se que, principalmente em soluções concentradas, a bromoperoxidase proveniente de outra alga vermelha (*Corallina officinalis*), pode formar corpos de inclusão com 748 kDa.²³² Entretanto, como é possível observar nas **Imagem 7 e 6**, alguma atividade pode ser observada em bandas mais abaixo em torno de 66 kDa, que é próximo a um dos pesos moleculares relatados para uma subunidade dessa enzima. É interessante destacar que, como observado na **Figura 36** as frações recuperadas pelos autores também apresentavam a proteína responsável pela coloração rosa.

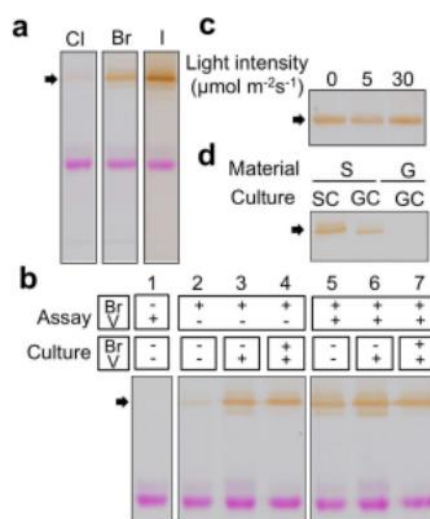


Figura 36: Atividade *in gel* com orto-dianisidina (Fonte: Referência 231)

6. 4. UTILIZAÇÃO DA V-BRPPUR COMO CATALISADOR PARA BROMAÇÃO ENZIMÁTICA

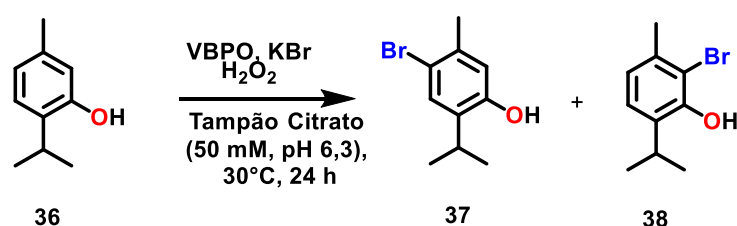
Com a amostra da enzima imobilizada em mãos decidiu-se realizar experimentos em batelada, para verificação da eficiência de bromação do catalisador suportado obtido, comparando o mesmo com a enzima livre. A amostra de enzima imobilizada em Purolite® a partir da solução das frações 19-23 foi denominada **VBrP-Pur(A)**, enquanto que a amostra obtida a partir da imobilização das frações 13-18 foi denominada **VBrP-Pur(B)**. A **Tabela 18** mostra as conversões obtidas por CG-EM após extração das reações. Como é possível notar nas **Entradas 1-3** a conversão obtida para bromofenol (37 e 38) utilizando-se o catalisador **VBrP-Pur(A)**, foi menor do que a obtida utilizando-se o catalisador **VBrP-Pur(B)**, **Entradas 4-6**. Além disso, a adição do cofator ao meio reacional, **Entradas 2 e 5** não levou ao aumento da atividade catalítica.

²³¹R.Matsuda, R. Ozgur, Y. H. K. Takechi, H. Takano, S. Takio, Preferential Expression of a Bromoperoxidase in Sporophytes of a Red Alga, *Pyropia yezoensis*, *Mar. Biotechnol.* 2015, **17**, 199-210.

²³² E.E. Coupe a, M.G. Smyth b, A.P. Fosberry b, R.M. Hall b, J.A. Littlechild, The dodecameric vanadium-dependent haloperoxidase from the marine algae *Corallina oYcinalis*: Cloning, expression, and refolding of the recombinant enzyme, *Protein Expr. Purif.*, 2007, **52**, 265-272.

Quando o peróxido de hidrogênio foi adicionado ao longo de 10 minutos, para evitar possível inibição, também não foi verificado aumento na conversão, **Entradas 3 e 6**. Como é possível notar nas **Entradas 7-9** a utilização da enzima livre levou à maior conversão cromatográfica. Apesar de essa observação poder estar relacionada à possível diminuição da atividade catalítica, quando a enzima foi imobilizada, acredita-se que esse não seja o caso, já que a quantidade de enzima livre em solução utilizada pode ter sido maior, já que uma amostra concentrada foi empregada. Além do mais, a quantidade de enzima livre em solução empregada não é reflexo da concentração da enzima de interesse na amostra, já que a enzima em maior concentração é a ficoeritrina, o que foi constatado pelos experimentos de SDS-PAGE.

Tabela 18: Teste de bromação enzimática do timol^a



Entrada	Catalisador	Conversão ^e
1	VBrP-Pur(A)	8%
2 ^c	VBrP-Pur(A)	7%
3 ^d	VBrP-Pur(A)	6%
4	VBrP-Pur(B)	14%
5 ^c	VBrP-Pur(B)	12%
6 ^d	VBrP-Pur(B)	14%
7	VBrPO ^b	30%
8 ^c	VBrPO ^b	27%
9 ^d	VBrOP ^b	28%

^a VBrP-Pur, (5 mg), Timol (0.1 mmol), KBr (0.1 mmol), H₂O₂ 30% *m/m*, solução aquosa (0,1 mmol), Tampão citrato pH 6,3 50 mmol, 30°C, 600 rpm, 24 h;

^b VBrP (enzima em solução) (100 uL, 7,9 mg/mL);

^c Tampão citrato pH 6,3 50 mmol, 10 uM de (Na₃VO₄);

^d Foi adicionado 1 µL de H₂O₂ a cada 10 minutos;

^e Conversão por CG-EM.

Os produtos 4- bromotimol (37) e 2-bromotimol (38) foram detectados na análise por CG-EM. O espectro de massas apresentado abaixo é referente ao pico do produto bromado majoritário. Nota-se claramente na região de *m/z* 228 e 230 os picos referentes aos isótopos do bromo na região do íon molecular.

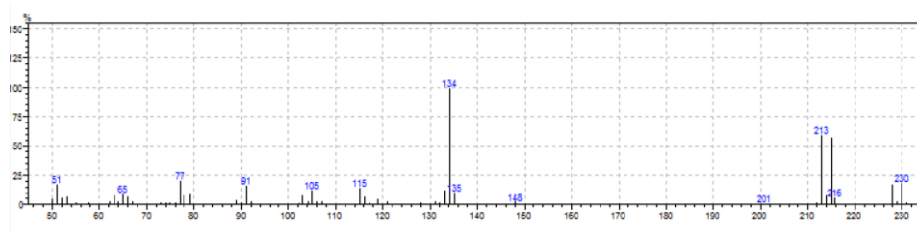


Figura 37: Espectro de massas para o produto majoritário de bromação com VBrPO.

6. 5. CONCLUSÃO PARCIAL

Em suma a abordagem para purificação e imobilização da haloperoxidase foi realizada. O processo de purificação se mostrou bastante trabalhoso, como verificado na literatura, e nos experimentos de extração e purificação. Os estudos em SDS-PAGE, mostraram que a enzima pode ser obtida de forma parcialmente purificada, sendo observado o pigmento majoritário das algas vermelhas junto à enzima de interesse. A concentração inferida da enzima na alga durante os estudos com SDS-PAGE também foi muito baixa, porém a enzima estava ativa nos zimogramas realizados. Apesar das dificuldades, optou-se por realizar a imobilização da enzima parcialmente purificada, após revisão minuciosa da literatura. Os testes com a **V-BrP-Pur** mostraram que a enzima suportada em Purolite® pode ser usada na halogenação do Timol. Os próximos passos para essa abordagem envolvem os testes com os substratos **C** e a aplicação da **V-BrP-Pur** como catalisador heterogêneo em reações em fluxo contínuo para reações de adição/ciclização.



CAPÍTULO VII

Conclusão geral e perspectivas



CAPÍTULO VII

7 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSÃO GERAL

Ao longo do desenvolvimento desta pesquisa foi possível realizar a síntese e a exploração da reatividade de compostos aromáticos simples, contendo uma dupla ligação funcionalizada ou não, com um grupo retirador de elétrons. No princípio, idealizou-se a utilização de duas abordagens catalíticas, que envolvessem a tecnologia de fluxo contínuo, para a preparação de novos heterociclos nitrogenados a partir de reações de adição/ciclização.

A primeira abordagem proposta nos objetivos envolvia a utilização de uma vanádio haloperoxidase isolada de uma alga vermelha em reações de bromação eletrofílica dos derivados *N*-fenilalílicos e *N*-fenilacrílicos, **Figura 38**. Para a concretização de tal abordagem, a bioprospecção de uma haloperoxidase dependente de vanádio seria necessária. Durante o percurso, os substratos a serem alvo das halogenações foram obtidos, inclusive com uma diversidade estrutural elevada e em rendimentos razoáveis. Entretanto, o processo de obtenção da bromoperoxidase dependente de vanádio, a partir da alga *Laurencia dendroidea*, se mostrou mais complicado e difícil. Mesmo assim, foi possível imobilizar a enzima em um suporte epoxi e testá-la na reação de bromação do timol, o que permitiu verificar atividade brominante desses aromáticos.

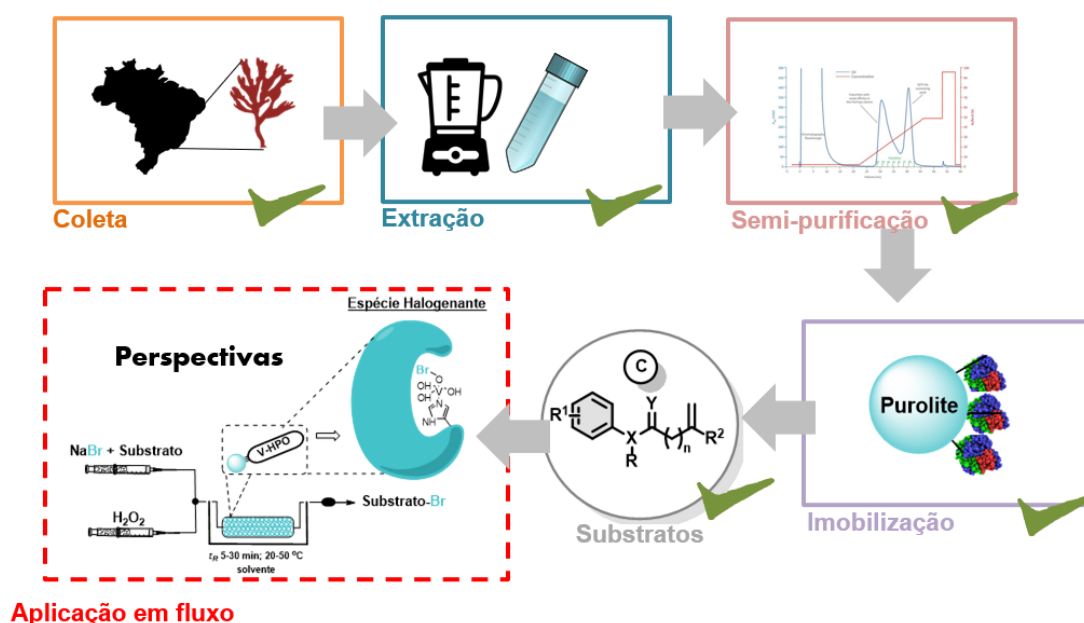


Figura 38: Conclusão gráfica da abordagem enzimática proposta



A segunda abordagem presente nos objetivos propunha a exploração da reatividade dos derivados *N*-fenilalílicos e *N*-fenilacrílicos frente ao radical carbamoíla. Tal abordagem, foi surpreendentemente frutuosa. Em um primeiro momento, o radical carbamoíla foi gerado a partir do sistema foto-Fenton, em fluxo contínuo, e quando adicionado aos (fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoatos e aos (fenil)carbamoil)3-butenosatos gerou respectivamente as dihidroquinolin-2-onas e indolin-2-onas. A seguir, uma etapa promovida por base levou a preparação de espirosuccinimidas e espiroglutarimidas. Esta abordagem em fluxo permitiu também a síntese de uma molécula, na qual o conceito de *bio-based carbons* foi aplicado, o composto **P3p**, com seus carbonos derivados, tanto do ácido itacônico, como do ácido 4-aminobenzoico, produzido pelas plantas. O sistema sono-Fenton foi empregado, em batelada, para produzir indolinas, de maneira rápida, dentro de 1 minuto, em elevados rendimentos. A seguir, aproveitando-se do eficiente aquecimento mecanoquímico promovido pela irradiação ultrassônica, foram preparados indóis-*N*-fusionados acoplados à espirosuccinimidas de maneira *one-pot*, em fluxo contínuo com ótimos rendimentos.

Em um segundo momento explorou-se a geração do radical carbamoíla, com a utilização do TBADT como fotocatalisador. A abordagem proposta permitiu a exploração de alcenos não ativados, as aminas alílicas aromáticas, na reação de adição do radical carbamoíla, tal abordagem ainda não é relatada na literatura, sem a utilização de um co-catalisador. Além do mais, auspiciamos realizar a reação de adição/ciclização em sequência (tandem) para produzir indolinas funcionalizadas. Até o momento as indolinas puderam ser obtidas em elevados rendimentos em batelada, de forma amena, sob irradiação de LEDs comerciais.

7. 2. PERSPECTIVAS

As perspectivas para as pesquisas realizadas nesta tese estão voltadas para a última abordagem de geração do radical carbamoíla através do fotocatalisador TBADT. Acredita-se que a síntese das indolinas e outros núcleos heterocíclicos, possa ser realizada de maneira enantiosseletiva, mas também que a química de fluxo contínuo possa ser incorporada como uma ferramenta a fim de diminuir os tempos reacionais através da irradiação eficiente da mistura reacional (Figura 39).

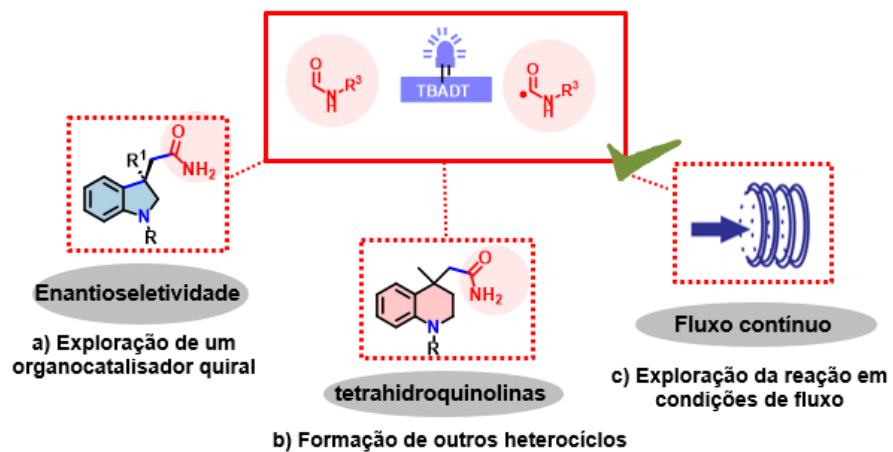


Figura 39: Perspectivas para a pesquisa apresentada nesta tese



CAPÍTULO VIII

Parte experimental



CAPÍTULO VIII

8 PARTE EXPERIMENTAL

8.1. INFORMAÇÕES GERAIS

As reações foram monitoradas usando o GCM-QP2010SE (Shimadzu) de impacto de elétrons com baixa resolução (EI, 70 eV) equipado com uma coluna capilar RTX-5MS (Restek) ou SBL®- 5 ms (Supelco). Condições do CG-EM: Injetor 260°C, detector: 110 °C, pressão: 100 kPa; temperatura da coluna: método 1 (19 min) = 3 min a 80 °C, 15°C/min até 28 mantido por 3 minutos a 280 °C, método 2 (24 min) = 3 min a 80 °C, 15°C/min até 280 °C, mantido por 8 minutos a 280 °C. Cromatografia em camada delgada foi realizada com placas revestidas de sílica gel 60 F254 disponíveis na Merck e visualizadas na luz UV (254 nm). Cromatografia em coluna flash foi realizada em sílica gel (200- 300 mesh).

Os espectros de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C foram adquiridos em um equipamento Varian Inova- 300 (300 MHz), em um Bruker All 500 (500 MHz) ou Bruker All 300 (300 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm utilizando TMS como padrão interno, os sinais residuais de solvente nos espectros de hidrogênio apresentam os deslocamentos químicos a seguir: CDCl₃ em δ = 7,26 ppm, (CD₃)₂SO δ = 2,50 ppm, CD₃OD δ = 3,31 ppm. Os deslocamentos químicos foram reportados em ppm relativos aos sinais residuais do solvente, que nos espectros de carbono se apresentam nos seguintes deslocamentos químicos: CDCl₃ δ = 77,0 ppm, (CD₃)₂SO δ = 40,0 ppm, CD₃OD δ = em 49,0.

Os espectros de massas de alta resolução (EMAR) foram obtidos usando o equipamento MicroTDV Bruker Dantomics utilizando a ionização por electrospray e análise por tempo de voo (ESI-TDV) com nebulizador 0,4 bar, fluxo 4L/min a 180°C. Os pontos de fusão foram obtidos no aparelho B-545 da BUCHI®. Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em um espectrômetro Nexus 670 (Nicolet).

As reações assistidas por ultrassom foram realizadas em um equipamento Branson Digital Sonifier- 450 (EDP N°100-132-890R; 20 kHz, 400 W, diâmetro da sonda de 12,7 mm). Para comparação as “reações silenciosas” foram realizadas em agitador magnético (IKA® C-MAG- HS 4; 1500 rpm).

Os espectros de absorção dos compostos sintetizados foram obtidos em um equipamento Agilent Cary 60 UV-Vis em cubeta de quartzo.

Ensaio espectrofotométrico em cubetas foram realizados no espectrofotômetro (Biospectro SP220) (590 nm) ou espectrofotômetro (BECKMAN DU 7400) (590 nm). As



microplacas foram analisadas na plataforma de detecção multimodal (Molecular Devices Spectra Max[®] Paradigm[®]) (590 nm).

Reações enzimáticas em microtubo e procedimentos de imobilização foram realizados em Thermomixer, Eppendorf. As corridas eletroforéticas foram realizadas no Mini VE vertical electrophoresis system e a fonte utilizada foi a Eletrophoresis Power Supply, EPS 301.

A purificação de proteína por cromatografia líquida rápida foi realizada no equipamento FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare, com monitor UPC-900 e detector de UV em 280 nm), com a coluna DEAE (HiPrep 16/10, GE Healthcare).

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de todos os substratos sintetizados e produtos obtidos, podem ser obtidos nos seguintes links para acesso aos materiais suplementares.

Compostos **C5, C6, P1, P2, P3, P4:**

https://www.thieme-connect.de/media/synthesis/202102/supmat/sup_ss-2020-z0330-fa_10-1055_s-0040-1707318.pdf

Compostos **S11, S12, C7, P5 e P6:**

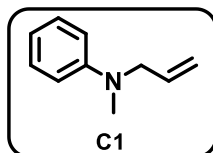
<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1350417721003205-mmc1.pdf>

Compostos **S25, S30, C8, C9, P7, P8, P9 e P10**

https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs41981-023-002615/MediaObjects/41981_2023_261_MOESM1_ESM.pdf

8.2. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-ALIL-N-METILANILINA C1

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionada a *N*-metil-anilina (2,16 mL, 20 mmol, 1,0 eq) a seguir o DMSO (50 mL), após solubilização da amina, adicionou-se o KOH (1,35 g, 24 mmol, 1,2 eq), e em seguida o brometo de alila (2,10 mL, 24 mmol, 1,2 eq) foi adicionado gota-a-gota. A reação foi mantida sob agitação a 50°C durante 5 horas. A seguir o balão foi arrefecido na temperatura ambiente e adicionada água ultrapura (500 mL) e a mistura foi extraída com AcOEt (5 x 100mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. *N*-alil-*N*-metilanilina (C1) foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (2:98) como eluente.



***N*-alil-*N*-metilanilina (C1)⁹²**

Óleo amarelo; rendimento: 2,62 g (89%); $R_f = 0,68$ (AcOEt/hexanos, 2:98).

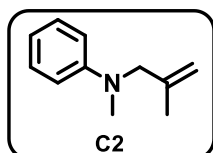
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,25 - 7,20$ (m, 2 H); 6,73 – 6,68 (m, 3 H); 5,88 – 5,81 (m, 1 H); 5,19 – 5,13 (m, 2 H); 3,92 – 3,91 (m, 2 H); 2,93 (s, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 149,5; 133,8, 129,1, 116,4, 116,2, 112,5, 55,3, 38,0$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 147 (M⁺, 62), 120 (100).

8. 3. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA *N*-METIL-*N*-(2-METILALIL) ANILINA C2

A um balão de fundo redondo equipado com uma barra de agitação magnética foi adicionada a *N*-metil-anilina (2,16 mL, 20 mmol), o hidróxido de sódio (1,20 g, 30 mmol) e a DMF (50 mL). A seguir foi adicionado gota-a-gota o 3-cloro-2-metilpropeno (2,90 mL, 30 mmol). A reação foi mantida sob agitação durante 16 horas. Posteriormente a mistura foi diluída em 500 mL de água destilada e extraída com AcOEt (5 x 100 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. *N*-alil-*N*-metilanilina (C1) foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (2:98) como eluente.



***N*-Metil-*N*-(2-metilalil) anilina (C2)²³³**

Óleo amarelo; rendimento: 2,39 g (74%); $R_f = 0,68$ (AcOEt/hexanos, 2:98).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,25 - 7,19$ (m, 2 H); 6,69 – 6,66 (m, 3 H); 4,85 – 4,80 (m, 1 H); 3,79 (s, 2 H); 2,95 (s, 3 H); 1,72 (s, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 149,7, 141,5, 129,0, 116,1, 112,0, 110,7, 58,8, 38,2, 20,1$ ppm.

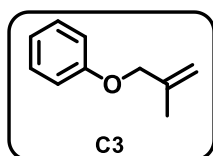
EM (IE⁺): m/z (%) = 161 (M⁺, 25), 120 (100).

²³³ M.Wang, F. Xiao, Y.Bai, X. Hu, Reactions of tertiary allylic amines and dichlorocarbenes, *Synth. Comm.* **2015**, 45, 2259–2265. <https://doi.org/10.1080/00397911.2015.1075218>.



8. 4. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO (2-METILALIL)OXI)BENZENO C3

A um balão equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o fenol (2,3 g, 25 mmol, 1,25 equiv.), o carbonato de sódio (2,2 g, 20 mmol, 1,0 equiv.), iodeto de potássio (0,05 g, 0,05 g, 0,3 mmol, 0,015 eq), uma mistura de acetona (10 mL) e DMF (2 mL) (5:1), o 3-cloro-2-metil-alila (2,9 mL, 30 mmol) foi adicionado gota-a-gota. A seguir a reação foi agitada em refluxo, até observado o consumo do fenol por CCD. O solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura lavada com água destilada (100 mL) e extraída com éter etílico (5 x 15 mL). A seguir a fase orgânica lavada com solução aquosa de NaOH 10 % (50 mL) A fase orgânica foi seca sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. O (2-metilalil)oxi)benzeno (C3) foi purificado por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (5:95) como eluente.



(2-metilalil)oxi)benzeno (C3)²³⁴

Óleo incolor; rendimento: 1,99 g (67%); $R_f = 0,57$ (AcOEt/hexanos, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,27 - 7,23$ (m, 2 H); 6,93 – 6,89 (m, 3 H); 5,08 (s, 1H); 4,97 (s, 1H); 4,40 (s, 2 H); 1,81 ppm (s, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 158,9, 141,1, 129,5, 120,9, 114,9, 112,7, 71,7, 19,4$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 148 (M⁺, 23), 133 (57), 94 (30), 55 (100).

8. 5. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-ALIL-N-FENILACETAMIDA C4a E C4b

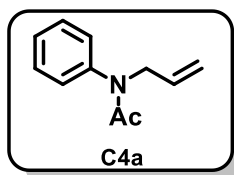
A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionada a anilina (1,8 mL, 20 mmol, 1,0 eq) o Na₂CO₃ (2,76 g, 20 mmol, 1,0 eq), a DMF (50 mL), o balão foi resfriado a 0°C em banho de gelo e em seguida o brometo de alila (2,10 mL, 24 mmol, 1,2 eq) foi adicionado gota-a-gota. A reação foi mantida sob agitação durante 16 horas. Posteriormente a mistura foi diluída em 500 mL de água destilada e extraída com AcOEt (5 x 100 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄. O bruto da reação foi utilizado na próxima etapa.

Acetilação:

²³⁴ Dahlén, A.; Sundgren, A.; Lahmann, M.; Oscarson, S.; Hilmersson, G., Sml₂/Water/Amine Mediates Cleavage of Allyl Ether Protected Alcohols: Application in Carbohydrate Synthesis and Mechanistic Considerations, *Organic Letters*, **2003**, 5, 4085–4088. <https://doi.org/10.1021/ol0354831>.



A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética, em atmosfera de nitrogênio foi adicionado o bruto da etapa anterior e DCM anidro (20 mL), a trietilamina (3,3 mL, 24 mmol, 1,2 equiv.), o balão foi resfriado a 0°C em banho de gelo e a seguir foi adicionada gota-gota o cloreto de acetila (1,6 mL, 24 mmol, 1,2 equiv.). A mistura foi agitada durante 4 horas na temperatura ambiente. A seguir foi adicionada uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ (20 mL) e a mistura extraída, e depois novamente extraída com DCM (2 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. A *N*-alil-*N*-fenilacetamida (C4a) foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (3:7) como eluente.



***N*-alil-*N*-fenilacetamida (C4a)**

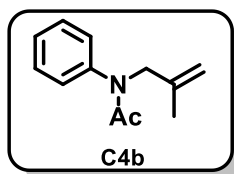
Sólido branco; rendimento: 3,33 g (77%); $R_f = 0,21$ (AcOEt/hexanos, 3:7).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,40$ (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,34 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H); 5,91 – 5,83 (m, 1H); 5,12 – 5,05 (m, 2H); 4,30 (d, $J = 6,8$ Hz, 2 H); 1,86 (s, 3H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 170,1, 143,0, 133,2, 129,6, 128,1, 127,9, 117,8, 52,0, 27,7$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 175 (M⁺, 11), 133 (100).

Para a preparação de **C4b** o mesmo procedimento de alquilação para preparação de **C3** foi utilizado, empregando-se 16 horas de reação e eliminando-se a lavagem com solução aquosa de NaOH 10 %. A seguir a etapa de acetilação realizada para **C4a** foi utilizada.



***N*-(2-metilalil)-*N*-fenilacetamida (C4b)**

Sólido branco; rendimento: 1,90 g (50%); $R_f = 0,21$ (AcOEt/hexanos, 3:7).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,40$ (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,32 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 4,81 (s, 1H); 4,70 (s, 1H); 2,28 (s, 2 H); 1,90 (s, 3H); 1,76 (s, 3H) ppm .

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 170,4, 143,2, 140,8, 129,5, 127,8, 127,7, 113,1, 55,0, 22,8, 20,3$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 189 (M⁺, 7), 106 (100).

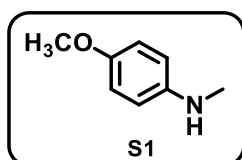


8. 6. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DAS N-METILANILINAS S2-S8

1) A um balão de 3 vias, equipado com barra de agitação magnética, em atmosfera inerte, resfriado em banho de gelo, foi adicionado sódio metálico (1,15 g, 50 mmol), em seguida foi adicionado gota-a-gota com auxílio de funil de adição metanol (15 mL) até a formação de uma suspensão viscosa.

2) A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação foi adicionada a respectiva anilina substituída (10 mmol, 1,0 eq), o paraformaldeído (0,42 g, 14 mmol, 1,4 eq), o metanol (10 mL) e a suspensão de metóxido de sódio (15 mL). A suspensão resultante foi agitada durante 5 - 16 horas. No caso das anilinas contendo os substituintes 4-OMe, 4-Me e 4-F, o tempo de agitação nesta etapa foi de 5 horas, no caso das anilinas contendo os grupos 4-Cl, 4-Br, 4-CF₃ e 4-CO₂Me o tempo de agitação foi de 16 horas.

3) A suspensão da etapa anterior foi resfriada a temperatura ambiente, aos poucos foi adicionado NaBH₄ (0,38 g, 10 mmol, 1,0 eq), em seguida aquecida em refluxo permanecendo sob agitação durante uma 1,75 horas. A seguir o balão foi arrefecido, e o metanol removido sob pressão reduzida. Posteriormente foi adicionado solução aquosa de KOH (1 mol. L⁻¹, 20 mL), a suspensão foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL), as fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. As N-metil anilinas foram utilizadas sem purificação para a preparação dos compostos **C5a-j** e no caso da preparação dos compostos **C6b** e **C6c** elas foram purificadas por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (1:9) como eluente.

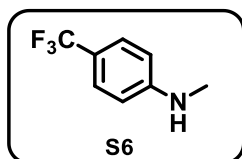


N-metil-4-(metoxi)anilina (S1)

Óleo amarelo pálido; rendimento: 1,12 g (82%); $R_f = 0,41$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 6,73 - 6,70$ (m, 2 H); 6,49 – 6,46 (m, 2 H); 5,14 (sl, 1 H); 3,62 (s, 3 H); 2,61 (s, 3 H) ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 137 (M⁺, 37), 120 (100).



N-metil-4-(trifluorometil)anilina (S6)

Óleo amarelo; rendimento: 1,71 g (98%); $R_f = 0,40$ (AcOEt/hexanos, 5:95).



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,42 – 7,39 (m, 2 H); 6,60 – 6,57 (m, 2 H); 2,86 (s, 3 H) ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 175 (M⁺, 100).

8. 7. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DA N-BENZILANILINA S9

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionada a anilina (1,8 mL, 20,0 mmol, 1,0 eq) e MeOH (20 mL), em seguida a trietilamina (3,3 mL, 24 mmol, 1,2 eq) e o benzaldeído (2,4 mL, 24 mmol, 1,2 eq). A mistura ficou em agitação na temperatura ambiente durante 1 hora. A seguir foi adicionado NaBH₄ (0,91 g, 24 mmol, 1,2 eq) aos poucos. A mistura foi agitada por mais 1 hora na temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida e adicionada uma solução aquosa de KOH (1 mol. L⁻¹, 20 mL), a mistura foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL). As frações orgânicas combinadas foram secas em MgSO₄, filtradas e o solvente foi removido sob pressão reduzida.

8. 8. PROCEDIMENTO DE ESTERIFICAÇÃO DO PABA

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o ácido 4-amino benzoico (1,37 g, 10 mmol, 1,0 eq) em seguida o MeOH (15 mL) a seguir o SOCl₂ (0,73 mL, 10 mmol, 1,0 eq) foi adicionado gota-a-gota e a reação reação foi mantida em refluxo durante 2 horas. A reação foi arrefecida na temperatura ambiente e adicionada solução aquosa saturada de NaHCO₃ e extraiu-se com AcOEt (3 x 20 mL). Como o éster metílico foi formado quantitativamente foi utilizada a mistura bruta na etapa de metilação reductiva.

8. 9. PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS 4-(METIL(FENIL)AMINO)-2-METILENO-4-OXOBUTANOICOS)

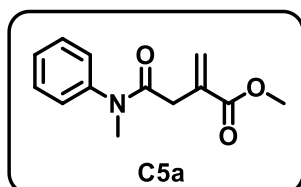
A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o anidrido itacônico (0,67 g, 6,0 mmol, 1,2 eq) e tolueno (5 mL). O balão foi então aquecido a 70°C. A seguir a N- alquilanilina (5,0 mmol, em tolueno (2 mL) foi adicionada com bomba de fluxo contínuo durante 1 hora, após a adição a mistura foi aquecida por 30 minutos a 80°C, depois a reação foi arrefecida na temperatura ambiente. A seguir o tolueno foi removido sob pressão reduzida. O bruto da reação foi utilizado na próxima etapa.

8. 10. PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS (FENIL)AMINO)-2-METILENO-4-OXOBUTANOATOS (C5)

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética e resfriado em banho de gelo foi adicionado o MeOH (5 mL), o cloreto de tionila (0,7 mL, 8,75 mmol, 1,75 eq) gota-a-gota. A seguir foi adicionada uma solução do bruto dos ácidos 4-(metil(fenil)amino)-2-



metileno-4-oxobutanoicos) em MeOH (5 mL). A reação foi deixada na temperatura ambiente e então aquecida em refluxo durante 2,5 horas. A seguir o balão foi arrefecido, e o metanol removido sob pressão reduzida. Posteriormente foi adicionada solução aquosa saturada de K_2CO_3 até pH 7, a suspensão foi extraída com $CHCl_3$ (3 x 20 mL), as fases orgânicas foram reunidas, secas sob $MgSO_4$ e filtradas, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos como eluente.



Metil 4-(Metil(fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5a)

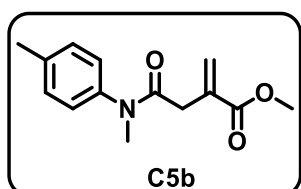
Xarope amarelo; rendimento: 0,560 g (48%); $R_f = 0,41$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,43$ (t, $J = 7,5$ Hz, 2 H); 7,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 7,28 – 7,26 (m, 2 H); 6,23 (s, 1 H); 5,60 (s, 1 H); 3,74 (s, 3 H); 3,28 (s, 3 H); 3,10 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170,0, 166,9, 143,9, 135,1, 129,8, 127,9, 127,7, 127,4, 51,9, 37,7, 37,4$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 233 (M^+ , 3), 107 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$M + H$] $^+$ calcd para $C_{13}H_{15}NO_3$: 234,1130; obtido: 234,1125.



Metil 4-(Metil(p-tolil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5b)

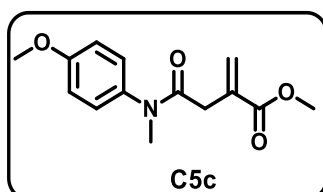
Sólido amarelo pálido; rendimento: 0,396 g (32%); $R_f = 0,42$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,22$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H); 7,14 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H); 6,24 (s, 1 H); 5,59 (s, 1 H); 3,73 (s, 3 H); 3,25 (s, 3 H); 3,09 (s, 2 H); 2,38 (s, 3 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170,1, 167,0, 141,4, 137,9, 135,2, 130,4, 127,6, 127,1, 51,9, 37,7, 37,4, 21,1$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 247 (M^+ , 5), 121 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$M + H$] $^+$ calcd para $C_{14}H_{17}NO_3$: 248,1287; obtido: 248,1283.




Metil 4-((4-Metoxifenil)(metil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5c)

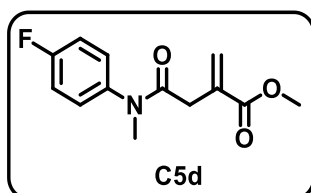
Sólido branco; rendimento: 0,434 g (33%); $R_f = 0,34$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,17$ (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H); 6,93 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H); 6,24 (s, 1 H); 5,59 (s, 1 H); 3,83 (s, 3 H); 3,73 (s, 3 H); 3,24 (s, 3 H); 3,08 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,3, 167,0, 159,0, 136,7, 135,2, 128,4, 127,6, 114,9, 55,5, 51,9, 37,7, 35,5$ ppm.

EM (IE $^+$): m/z (%) = 263 (M^{+} , 10), 137 (100), 122 (69).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 264,1236; obtido: 264,1238.


Metil 4-((4-Fluorofenil)(metil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5d)

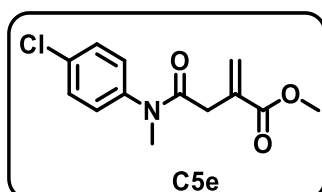
Sólido branco; rendimento: 0,578 g (46%); $R_f = 0,35$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,27 - 7,24$ (m, 2 H); 7,12 (t, $J_{\text{H,F}} = 8,4$ Hz, 2 H); 6,26 (s, 1 H); 5,62 (s, 1 H); 3,74 (s, 3 H); 3,26 (s, 3 H); 3,07 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,0, 166,9, 161,8$ (d, $J_{\text{C,F}} = 246$ Hz), 140,0 (d, $J_{\text{C,F}} = 1,3$ Hz), 135,0, 129,2 (d, $J_{\text{C,F}} = 8,5$ Hz), 127,8, 116,7 (d, $J_{\text{C,F}} = 23$ Hz), 52,0, 37,7, 37,5 ppm.

EM (IE $^+$): m/z (%) = 251 (M^{+} , 3), 125 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{FNO}_3$: 252,1036; obtido: 252,1025.


Metil 4-((4-Clorofenil)(metil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5e)

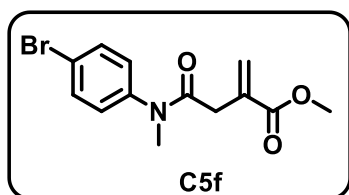
Sólido branco; rendimento: 0,709 g (53%); $R_f = 0,36$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,40$ (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H); 7,23 – 7,20 (m, 2 H); 6,26 (s, 1 H); 5,62 (s, 1 H); 3,74 (s, 3 H); 3,26 (s, 3 H); 3,08 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,9, 166,9, 142,5, 134,9, 133,8, 130,0, 128,8, 127,9, 52,0, 37,7, 37,4$ ppm.

EM (IE $^+$): m/z (%) = 267 (M^{+} , 3), 141 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$: 268,0740; obtido: 268,0734.



Metil 4-((4-Bromofenil)(metil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5f)

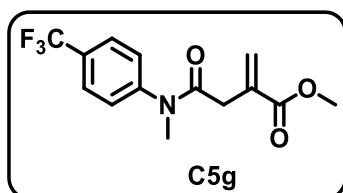
Sólido branco; rendimento: 0,656 g (42%); $R_f = 0,42$ (AcOEt/hexanes, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,56$ (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H); 7,16 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H); 6,26 (s, 1 H); 5,62 (s, 1 H); 3,74 (s, 3 H); 3,26 (s, 3 H); 3,08 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,8, 166,9, 143,0, 134,9, 133,1, 129,9, 129,2, 128,0, 52,0, 37,7, 37,4$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 313 (M^+ , 5), 185 (80), 127 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrNO}_3$: 312,0235; obtido: 312,0235.



Metil 4-(Metil(4-(trifluorometil)fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5g)

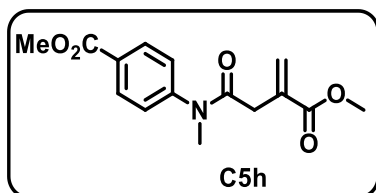
Sólido amarelado; rendimento: 0,452 g (30%); $R_f = 0,39$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,70$ (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H); 7,42 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H); 6,28 (s, 1 H); 5,64 (s, 1 H); 3,74 (s, 3 H); 3,31 (s, 3 H); 3,12 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,7, 166,8, 147,1, 134,7, 128,1, 127,8, 127,0, 123,7$ (q, $J = 270$ Hz), 116,7, 52,0, 37,8, 37,4 ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 301 (M^+ , 2), 127 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_3$: 302,1004; obtido: 302,0999.



Metil 4-(3-(Metoxicarbonil)-N-metilbut-3-enamido)benzoato (C5h)

Sólido amarelo pálido; rendimento: 0,690 g (47%); $R_f = 0,45$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

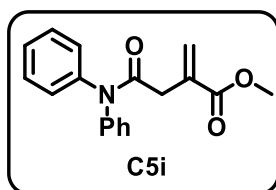
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,11$ (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H); 7,36 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H); 6,27 (s, 1 H); 5,63 (s, 1 H); 3,94 (s, 3 H); 3,74 (s, 3 H); 3,31 (s, 3 H); 3,14 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,7, 166,8, 166,2, 147,9, 134,8, 131,2, 129,5, 128,0, 127,2, 52,3, 52,0, 37,8, 37,4$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 291 (M^+ , 4), 165 (100).



EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + H]^+$ calcd para $C_{15}H_{17}NO_5$: 292,1185; obtido: 292,1172.



Metil 4-(Difenilamino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5i)

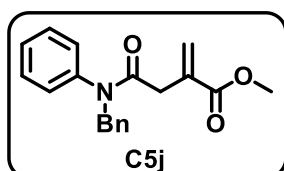
Sólido transparente; rendimento: 0,753 g (51%); $R_f = 0,24$ (AcOEt/hexanes, 3:7).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,32$ (sl, 10 H); 6,28 (s, 1 H); 5,66 (s, 1 H); 3,76 (s, 3 H); 3,27 (s, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170,1, 166,9, 142,7, 140,6, 135,1, 128,9, 127,9, 126,4, 52,0, 39,1$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 295 (M^{+} , 3), 169 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + H]^+$ calcd para $C_{18}H_{17}NO_3$: 296,1287; obtido: 296,1285.



Metil 4-(Benzil(fenil)amino)-2-metileno-4-oxobutanoato (C5j)

Óleo incolor; rendimento: 0,974 g (63%); $R_f = 0,64$ (AcOEt/hexanes, 2:3).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,37 - 7,20$ (m, 8 H); 7,05 (d, $J = 6,9$ Hz, 2 H); 6,27 (s, 1 H); 5,61 (s, 1 H); 4,89 (s, 2 H); 3,74 (s, 3 H); 3,09 (s, 2 H) ppm.

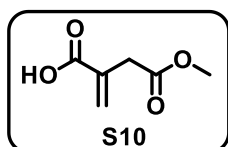
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170,0, 166,9, 142,2, 137,4, 135,1, 129,6, 128,9, 128,5, 128,3, 128,1, 127,8, 127,4, 53,2, 51,2, 38,1$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 309 (M^{+} , 3), 91 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + H]^+$ calcd para $C_{19}H_{19}NO_3$: 310,1443; obtido: 310,1435.

8. 11. PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO DE MONOESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO ITACÔNICO

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o ácido itacônico (2,6 g, 20 mmol) e MeOH (10 mL), a seguir gota-a-gota o cloreto de acetila (42,7 μ L, 0,6 mmol). A mistura foi refluxada durante 2,5 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido remanescente foi dissolvido em tolueno (5 mL, 80°C). A mistura foi arrefecida na temperatura ambiente, e adicionado hexano (7,5 mL, 0°C). Duas camadas foram observadas e o frasco foi mantido no freezer durante 20 horas. Os cristais foram filtrados a vácuo e lavados com hexano resfriado.



ácido 4-metoxi-2-metileno-4-oxobutanóico (S10)⁸³

Sólido branco; rendimento: 2,40 g (83 %); $R_f = 0,35$ (AcOEt/hexanes, 3:7).

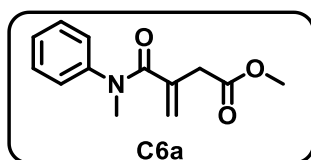
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 6,47$ (s, 1 H); 5,84 (s, 1 H); 3,71 (s, 3 H); 3,35 (s, 2 H) ppm.

8. 12. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO METIL 3-(CLOROCARBONIL)BUT-3-ENOATO S10a²³⁵

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o ácido 4-metoxi-2-metileno-4-oxobutanóico (0,86 g, 6,0 mmol) e o SOCl₂ gota-a-gota (0,55 mL, 7,2 mmol, 1,2 eq). A mistura resultante foi refluxada durante 30 minutos. A seguir a reação foi arrefecida na temperatura ambiente, o SOCl₂ remanescente foi removido à pressão reduzida e o material bruto foi utilizado na próxima etapa.

8. 13. PROCEDIMENTO GERAL PARA PREPARAÇÃO DOS (FENIL)CARBAMOIL)3-BUTENOATOS (C6)

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética, em atmosfera de nitrogênio foi adicionada uma solução da *N*-alquilanilina (5 mmol) em AcOEt anidro (10 mL), a trietilamina (0,84 mL, 6 mmol, 1,2 eq), o balão foi resfriado a 0°C em banho de gelo e a seguir foi adicionada gota-a-gota uma solução do cloreto de ácido em AcOEt (6 mmol em 5 mL de AcOEt anidro). A mistura foi agitada durante 16 horas na temperatura ambiente. A seguir foi adicionada uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ (20 mL) e a mistura extraída, e depois novamente extraída com AcOEt (2 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos como eluente.



²³⁵ D. E. Lizos, J. A. Murphy, Concise synthesis of (±)-horsfiline and (±)-coerulescine by tandem cyclisation of iodoaryl alkenyl azides, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, 117–122. <https://doi.org/10.1039/B208114H>


metil 3-(Metil(fenil)carbamoil)but-3-enoato (C6a)²³⁶

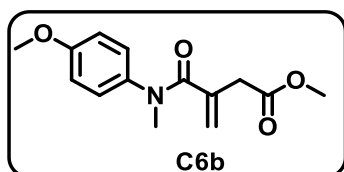
Óleo amarelo; rendimento: 1,038 g (89%); $R_f = 0,51$ (AcOEt/hexanos, 1:1).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,36 - 7,23$ (m, 5 H); 5,27 (s, 1 H); 5,04 (s, 1 H); 3,71 (s, 3 H); 3,38 (s, 3 H); 3,30 (s, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,4, 169,6, 158,3, 137,7, 136,8, 127,9, 123,6, 114,4, 55,4, 51,9, 39,4$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 233 (M⁺, 3), 107 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₃H₁₅NO₃: 234,1130; obtido: 234,1128.


Metil 3-((4-Metoxifenil)(metil)carbamoil)but-3-enoato (C6b)²³⁷

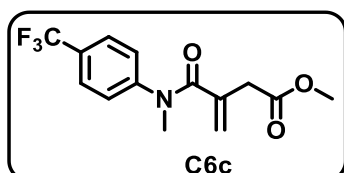
Óleo amarelo; rendimento: 0,684 g (52%); $R_f = 0,28$ (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,21$ (d, $J = 9,0$ Hz, 2 H); 6,86 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H); 5,26 (s, 1 H); 5,06 (s, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 3,70 (s, 3 H); 3,34 (s, 3 H); 3,29 (s, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,4, 169,3, 158,3, 137,7, 136,8, 127,9, 123,8, 114,4, 55,4, 51,9, 39,5, 38,6$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 263 (M⁺, 19), 137 (100)

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₇NO₄: 264,1236; obtido: 264,1225.


Metil 3-(Metil(4-(trifluorometil)fenil)carbamoil)but-3-enoato (C6c)

Óleo amarelo; rendimento: 0,648 g (43%); $R_f = 0,46$ (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,62$ (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H); 7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H); 5,32 (s, 1 H); 5,00 (s, 1 H); 3,72 (s, 3 H); 3,42 (s, 3 H); 3,39 (s, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,4, 169,3, 148,2, 136,3, 128,6$ (q, $J = 33$ Hz), 126,9, 126,3 (q, $J = 3,7$ Hz), 124,2, 123,8 (q, $J = 270,3$ Hz), 51,9, 39,1, 38,3 ppm.

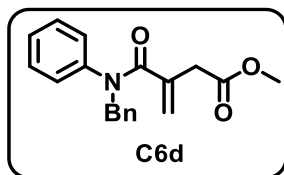
²³⁶ D.C.Fabry, M. Stodulski, S. Hoerner, T. Gulder, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10834-10838. Metal-Free Synthesis of 3,3-Disubstituted Oxindoles by Iodine(III)-Catalyzed Bromocarbocyclizations, <https://doi.org/10.1002/chem.201201232>

²³⁷ P.Biswas, S. Paul, J. Guin, Aerobic Radical-Cascade Alkylation/Cyclization of α,β -Unsaturated Amides: an Efficient Approach to Quaternary Oxindoles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7756-7760. <https://doi.org/10.1002/anie.201603809>



EM (IE⁺): m/z (%) = 301 (M⁺, 2), 127 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₄F₃NO₃: 302,1004; obtido: 302,1004.



Metil 3-(Benzil(fenil)carbamoil)but-3-enoato (C6d)

Óleo amarelo; rendimento: 0,925 g (60%); R_f = 0,44 (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,28 – 7,17 (m, 10 H); 5,25 (s, 1 H); 5,06 (s, 1 H); 5,02 (s, 2 H); 3,69 (s, 3 H); 3,33 (s, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 171,2, 169,2, 143,5, 137,4, 136,8, 129,1, 128,4, 128,3, 127,7, 127,2, 127,1, 124,0, 53,8, 51,8, 39,6 ppm.

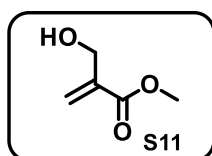
EM (IE⁺): m/z (%) = 309 (M⁺, 7), 91 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₉H₁₉NO₃: 310,1443; obtido: 310,1473.

8. 14. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO METIL 2-(HIDROXIMETIL)ACRILATO

S11

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o acrilato de metila (4,53 mL, 50 mmol, 1,0 equiv.), a seguir o paraformaldeído (1,80 g, 60 mmol, 1,2 equiv.), a mistura dioxano : água ultrapura (1:1,40 mL) e a DABCO (6,73 g, 60 mmol, 1,2 eq). A mistura foi mantida em agitação na temperatura ambiente durante 24 horas. A seguir a reação foi diluída em AcOEt (200 mL) e lavada com água ultrapura (100 mL) e com solução aquosa saturada de NaCl (100 mL). A fase orgânica foi seca sob MgSO₄, filtrada e o solvente foi então removido sob pressão reduzida. O metil 2-(hidroximetil)acrilato (S11) foi purificado por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (1:4) como eluente.



metil 2-(hidroximetil)acrilato (S11)²³⁸

Óleo incolor; rendimento: 2,90 g (50%); R_f = 0,31 (AcOEt/hexanos, 1:4).

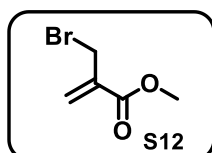
²³⁸ T. Kippo, T. Fukuyama, I. Ryu, Regioselective Radical Bromoallylation of Allenes Leading to 2-Bromo-Substituted 1,5-Dienes, *Org. Lett.* **2011**, 15, 3864–3867. <https://doi.org/10.1021/ol201395p>.



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 6,27 – 6,26 (m, 1 H); 5,86 – 5,85 (m, 1 H); 4,35 – 4,34 (m, 2 H); 3,80 (s, 3 H); 2,40 – 2,36 (m, 1 H) ppm.

8. 15. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO METIL 2-(BROMOMETIL)ACRILATO S12

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o metil 2-(hidroximetil)acrilato (S11) (1,16 g, 10 mmol, 1,0 equiv) o éter etílico anidro (10 mL) a seguir o balão foi resfriado a a -10°C e adicionado gota-a-gota o PBr₃ (0,31 mL, 3,3 mmol, 0,33 equiv). A mistura foi mantida em agitação na temperatura ambiente durante 3 horas. A seguir foi adicionada água ultrapura (50 mL) e a mistura foi extraída com éter de petróleo (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, filtradas e o solvente foi então removido sob pressão reduzida. O metil 2-(bromometil)acrilato (S12) foi purificado por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos (5:95) como eluente.



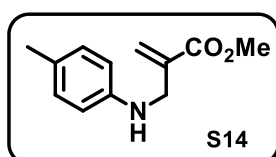
metil 2-(bromometil)acrilato (S12)²³⁸

Óleo incolor; rendimento: 1,25 g (70%); R_f = 0,40 (AcOEt/hexanos, 5:95).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 6,34 (s, 1 H); 5,97 (s, 1 H); 4,19 (s, 2 H); 3,82 (s, 3 H) ppm.

8. 16. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DOS METIL 2-(FENILAMINO)METILACRILATOS

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionada a respectiva anilina (10 mmol, 1,0 eq), Na₂CO₃ (1,15 g, 11 mmol, 1,1 eq), a DMF (20 mL), o balão foi resfriado a 0°C em banho de gelo, e adicionado gota-a-gota o metil 2-(bromometil)acrilato (2,0 g, 11 mmol, 1,1 eq). A mistura foi mantida em agitação na temperatura ambiente durante 3 horas. A seguir foi adicionada água ultrapura (100 mL) e a mistura extraída com AcOEt (4x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. Os metil 2-(fenilamino)metilacrilatos foram purificados por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos como eluente.

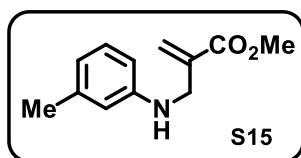


metil 2-(p-tollamino)metilacrilato (S14)

Óleo incolor; rendimento para escala 5 mmol: 0,53 g (52%); R_f = 0,29 (AcOEt/hexanos, 1:9).



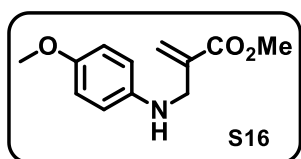
EM (IE⁺): m/z (%) = 205 (M⁺, 29), 144 (100).



metil 2-((*m*-tolilamino)metil)acrilato (S15)

Óleo incolor; rendimento: 1,56 g (58%); $R_f = 0,28$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

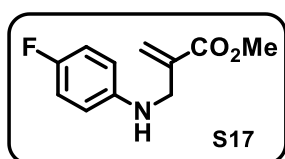
EM (IE⁺): m/z (%) = 205 (M⁺, 22), 144 (100).



metil 2-(((4-metoxifenil)amino)metil)acrilato (S16)

Sólido branco; rendimento: 1,44 g (65%); $R_f = 0,36$ (AcOEt/hexanos, 15:85).

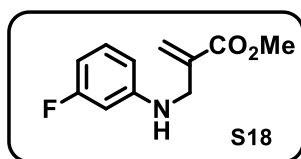
EM (IE⁺): m/z (%) = 221 (M⁺, 70), 120 (100).



metil 2-(((4-fluorofenil)amino)metil)acrilato (S17)

Óleo incolor; rendimento para escala de 5 mmol: 0,40 g (38%); $R_f = 0,26$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

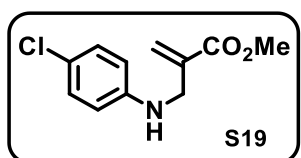
EM (IE⁺): m/z (%) = 209 (M⁺, 19), 148 (100).



metil 2-(((3-fluorofenil)amino)metil)acrilato (S18)

Óleo incolor; rendimento: 1,43 g (45%); $R_f = 0,28$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

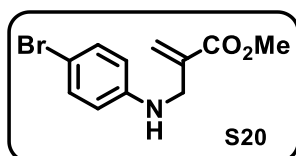
EM (IE⁺): m/z (%) = 209 (M⁺, 27), 148 (100).



metil 2-(((4-clorofenil)amino)metil)acrilato (S19)

Sólido branco; rendimento: 1,83 g (81 %); $R_f = 0,37$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

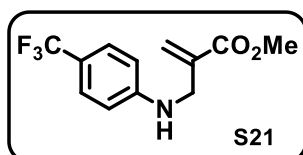
EM (IE⁺): m/z (%) = 225 (M⁺, 38), 140 (100).



metil 2-(((4-bromofenil)amino)metil)acrilato (S20)

Sólido branco; rendimento: 1,94 g (72 %); $R_f = 0,43$ (AcOEt/hexanos, 15:85).

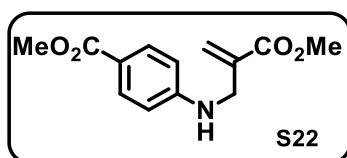
EM (IE⁺): m/z (%) = 269 (M⁺, 35), 130 (100).



metil 2-(((4-(trifluorometil)fenil)amino)metil)acrilato (S21)

Sólido branco; rendimento: 1,30 g (50 %); $R_f = 0,34$ (AcOEt/hexanos, 15:85).

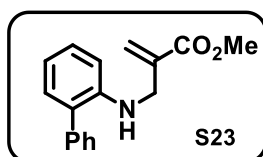
EM (IE⁺): m/z (%) = 259 (M⁺, 31), 55 (100).



metil 4-((2-(metoxicarboni)alil)amino)benzoato (S22)

Sólido branco; rendimento: 2,18 g (88%); $R_f = 0,11$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

EM (IE⁺): m/z (%) = 149 (M⁺, 34), 130 (100).



metil 2-(((1,1'-bifenil)-2-ilamino)metil)acrilato (S23)

Sólido branco; rendimento: 1,14 g (59%); $R_f = 0,40$ (AcOEt/hexanos, 1:9).

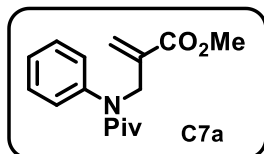
EM (IE⁺): m/z (%) = 267 (M⁺, 33), 180 (100).

8. 17. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DOS METIL 2-((N-FENILPIVALAMIDO)METIL)ACRILATOS C7A

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética, em atmosfera de nitrogênio foi adicionado respectivo metil 2- (fenilamino)metilacrilato (5 mmol, 1,0 eq) a TEA (0,68 mL, 5,5 mmol, 1,1 eq) a seguir o DCM (20 mL), o balão foi resfriado a 0°C em banho de gelo e adicionado gota-a-gota o cloreto de pivaloíla (0,67 mL, 5,5 mmol, 1,1 eq). A mistura foi mantida em agitação na temperatura ambiente durante 16 horas. A seguir o solvente foi removido sob pressão reduzida e adicionado AcOEt (30 mL) a mistura foi lavada com solução aquosa saturada



de NaHCO₃ (30 mL) e a seguir com solução aquosa saturada de NaCl (30 mL). A fase orgânica foi seca sob MgSO₄, o solvente foi então removido sob pressão reduzida. Os metil 2-(fenilamino)metilacrilatos foram purificados por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos como eluente.



metil 2-((*N*-fenilpivalamido)metil)acrilato (C7a)

Sólido branco; rendimento:* 1,27 g (46%); **pf**: 54 – 56 °C; **R_f** = 0,25 (AcOEt/hexanos, 15:85).

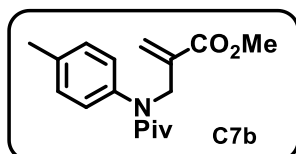
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,38 – 7,11 (m, 3 H); 7,21 – 7,18 (m, 2 H); 6,32 (s, 1 H); 5,75 (s, 1H); 4,50 (s, 2 H); 3,68 (s, 3 H); 1,04 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,9, 166,7, 143,9, 135,8, 129,5, 129,1, 128,1, 126,3, 53,3, 51,8, 41,1, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 275 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + Na]⁺ calcd para C₁₆H₂₁NO₃Na: 298,1419; obtido: 298,1124.

*Rendimento obtido para uma escala de 10 mmol utilizando-se o bruto da etapa anterior.



metil 2-((*N*-(*p*-tolil)pivalamido)metil)acrilato (C7b)

Sólido branco; rendimento:* 0,35 g (48%); **pf**: 94 – 96 °C; **R_f** = 0,17 (AcOEt/hexanos, 10:90).

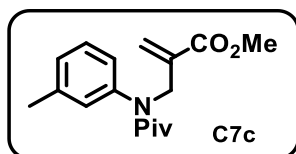
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,15 – 7,13 (m, 2 H); 7,08 – 7,05 (m, 2 H); 6,31 – 6,30 (m, 1 H); 5,73 – 5,72 (m, 1 H); 4,48 – 4,47 (m, 2 H); 3,68 (s, 3 H); 2,36 (s, 3 H); 1,04 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,9, 166,7, 141,2, 138,0, 135,8, 129,6, 129,2, 126,1, 53,3, 51,8, 41,0, 29,5, 21,1 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 289 (M⁺, 5), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₂₁NO₃: 290,1756; obtido: 290,1754.

*Rendimento obtido para reação em escala de 2,5 mmol.



metil 2-((*N*-(*m*-tolil)pivalamido)metil)acrilato (C7c)



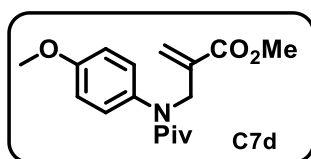
Sólido branco; rendimento: 0,734 g (36%); **pf**: 54 – 56 °C; **R_f** = 0,31 (AcOEt/hexanos, 15:85).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,25 – 7,21 (m, 1 H); 7,14 – 7,12 (m, 1 H); 7,00 – 6,99 (m, 1 H); 6,32 – 6,31 (m, 1 H); 5,75 – 5,74 (m, 1 H); 4,49 – 4,48 (m, 2 H); 3,67 (s, 3 H); 2,35 (s, 3 H); 1,05 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,7, 143,9, 139,0, 135,8, 129,9, 128,8 (2C), 126,4, 125,9, 53,3, 51,8, 41,1, 29,5, 21,3 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 289 (M⁺, 4), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₂₁NO₃: 290,1756; obtido: 290,1746.



metil 2-((N-(4-metoxifenil)pivalamido)metil)acrilato (C7d)

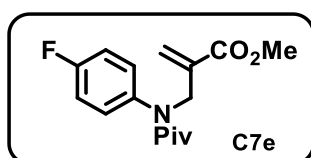
Sólido branco; rendimento: 0,76 g (50%); **pf**: 79 – 81 °C; **R_f** = 0,14 (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,11 – 7,08 (m, 2 H); 6,87 – 6,84 (m, 2 H); 6,31 – 6,30 (m, 1 H); 5,72 – 5,71 (m, 1 H); 4,48 – 4,47 (m, 2 H); 3,82 (s, 3 H); 3,69 (s, 3 H); 1,05 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,0, 166,7, 159,0, 136,5, 135,8, 130,6, 126,2, 114,0, 55,4, 53,4, 51,8, 40,9, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 305 (M⁺, 6), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₇H₂₃NO₄: 306,1705; obtido: 306,1695.



metil 2-((N-(4-fluorofenil)pivalamido)metil)acrilato (C7e)

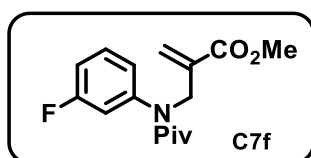
Sólido branco; rendimento: 1,50 g (27%); **pf**: 89 – 91 °C; **R_f** = 0,23 (AcOEt/hexanos, 15:85).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,19 – 7,15 (m, 2 H); 7,07 – 7,02 (m, 2 H); 6,32 – 6,31 (m, 1 H); 5,74 – 5,73 (m, 1 H); 4,48 – 4,47 (m, 2 H); 3,69 (s, 3 H); 1,05 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,9, 166,6, 161,9 (d, *J_{C,F}* = 248,6 Hz), 139,8 (d, *J_{C,F}* = 3,2 Hz), 135,7, 131,2 (d, *J_{C,F}* = 8,5 Hz), 126,7, 115,9 (d, *J_{C,F}* = 22,6 Hz), 53,2, 51,9, 41,0, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 293 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₂₀FNO₃: 294,1506; obtido: 294,1507.




metil 2-((N-(3-fluorofenil)pivalamido)metil)acrilato (C7f)

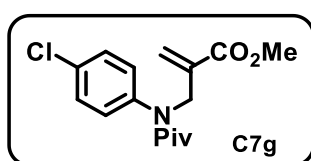
Sólido branco; rendimento: 0,76 g (38%); **pf**: 61 – 63 °C; **R_f** = 0,54 (AcOEt/hexanos, 15:85).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,36 – 7,31 (m, 1 H); 7,06 (tq, *J* = 8,2 Hz, 0,8 Hz, *J_{H,F}* = 2,4 Hz, 1 H); 7,01 (dq, *J* = 7,9 Hz, *J_{H,F}* = 1 Hz, 1 H) 6,94 (dt, *J* = 9,5 Hz, *J_{H,F}* = 2,2 Hz, 1 H); 6,33 – 6,32 (m, 1 H); 5,74 – 5,73 (m, 1 H); 4,49 – 4,48 (m, 2 H); 3,70 (s, 3 H); 1,07 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,5, 162,6 (d, *J_{C,F}* = 248,9 Hz), 145,4 (d, *J_{C,F}* = 9,1 Hz), 135,6, 130,1 (d, *J_{C,F}* = 9,1 Hz), 126,6, 125,3 (d, *J_{C,F}* = 3,7 Hz), 116,8 (d, *J_{C,F}* = 21,4 Hz), 115,3 (d, *J_{C,F}* = 21,0 Hz), 53,1, 51,9, 41,2, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 293 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₂₀FNO₃: 294,1506; obtido: 294,1501.


metil 2-((N-(4-clorofenil)pivalamido)metil)acrilato (C7g)

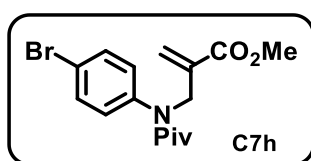
Sólido branco; rendimento: 0,93 g (60%); **pf**: 121 – 124 °C; **R_f** = 0,14 (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,35 – 7,32 (m, 2 H); 7,15 – 7,12 (m, 2 H); 6,32 – 6,31 (m, 1 H); 5,73 – 5,72 (m, 1 H); 4,48 – 4,47 (m, 2 H); 3,69 (s, 3 H); 1,05 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,5, 142,3, 135,6, 133,9, 130,8, 129,3, 126,8, 53,2, 51,9, 41,1, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 309 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₂₀ClNO₃: 310,1210; obtido: 310,1205.


metil 2-((N-(4-bromofenil)pivalamido)metil)acrilato (C7h)

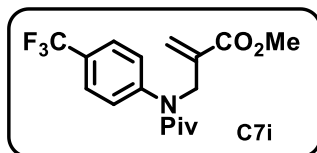
Sólido branco; rendimento: 0,81 g (46%); **pf**: 128 – 130 °C; **R_f** = 0,17 (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,51 – 7,48 (m, 2 H); 7,09 – 7,06 (m, 2 H); 6,32 – 6,31 (m, 1 H); 5,73 – 5,72 (m, 1 H); 4,48 – 4,47 (m, 2 H); 3,69 (s, 3 H); 1,05 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,5, 142,9, 135,6, 132,3, 131,2, 126,8, 121,9, 53,1, 51,9, 41,1, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 353 (M⁺, 3), 355 (3), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₂₀BrNO₃: 354,0705; obtido: 354,0687.



metil 2-((N-(4-(trifluorometil)fenil)pivalamido)metil)acrilato (C7i)

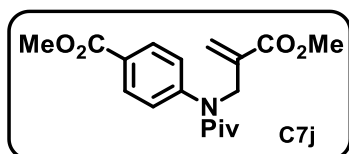
Sólido branco; rendimento: 0,53 g (31%); **pf**: 90 – 92 °C; **R_f** = 0,17 (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,65 – 7,63 (m, 2 H); 7,35 – 7,33 (m, 2 H); 6,35 – 6,34 (m, 1 H); 5,77 – 5,76 (m, 1 H); 4,51 – 4,50 (m, 2 H); 3,69 (s, 3 H); 1,06 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,5, 147,2, 135,5, 130,2 (q, *J_{C,F}* = 32,9 Hz), 129,8, 127,0, 126,3 (q, *J_{C,F}* = 3,6 Hz), 123,7 (q, *J_{C,F}* = 247,4 Hz), 53,1, 51,9, 41,3, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 343 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₇H₂₀F₃NO₃: 344,1474; obtido: 344,1476.



metil 4-(N-(2-(metoxicarbonil)alil)pivalamido)benzoato (C7j)

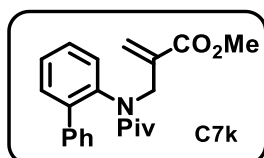
Sólido branco; rendimento: 0,89 g (53%); **pf**: 95 – 97 °C; **R_f** = 0,21 (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,06 – 8,03 (m, 2 H); 7,29 – 7,27 (m, 2 H); 6,33 – 6,32 (m, 1 H); 5,76 – 5,75 (m, 1 H); 4,52 – 4,51 (m, 2 H); 3,93 (s, 3 H); 3,69 (s, 3 H); 1,05 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,5, 166,2, 148,1, 135,6, 130,5, 129,7, 129,3, 126,9, 53,0, 52,4, 51,9, 41,3, 29,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 333 (M⁺, 3), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₈H₂₃NO₅: 334,1655; obtido: 334,1633.



metil 2-((N-([1,1'-bifenil]-2-yl)pivalamido)metil)acrilato (C7k)

Sólido branco; rendimento: 0,48 g (31%); **pf**: 93 – 95 °C; **R_f** = 0,26 (AcOEt/hexanos, 15:85).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,45 – 7,35 (m, 7H); 7,31 – 7,28 (m, 1 H); 7,19 – 7,18 (m, 1 H); 6,21 (s, 1 H); 5,63 (s, 1 H); 4,79 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H); 3,63 (s, 3 H); 3,53 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H); 1,08 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,8, 166,4, 147,1, 135,5, 130,3, 130,1, 129,8, 127,0, 126,3, 126,3, 126,3, 126,2, 124,7, 122,6, 53,1, 51,9, 41,2, 29,5 ppm.



EM (IE⁺): m/z (%) = 351 (M⁺, 1), 57 (100).

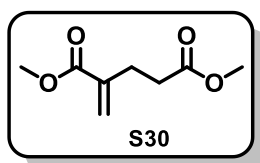
EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₂₂H₂₅NO₃: 352,1913; obtido: 334,1901.

8. 18. PROCEDIMENTO PARA REDUÇÃO DO ESCATOL

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o escatol (1,31 g, 10 mmol, 1,0 eq) a seguir o AcOH (8 mL), o balão foi resfriado a 0°C em banho de gelo e adicionado aos poucos cianoborohidreto de sódio (1,26 g, 20 mmol, 2,0 eq). A mistura foi mantida em agitação na temperatura ambiente durante 2 horas. A seguir o balão foi novamente resfriado a 0°C e adicionada água ultrapura (15 mL) a mistura foi basificada com solução aquosa NaOH (5 mol. L⁻¹) até pH = 12. A seguir a reação foi extraída com AcOEt (3 x 40 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄, filtradas e o solvente foi então removido sob pressão reduzida. A 3- metilindolina foi utilizada sem purificação na próxima etapa.

8. 19. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO DIMETIL 2-METILENOPENTANODIOATO (S30)

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o acrilato de metila (4,5 mL, 50 mmol, 1,0 eq), a seguir o balão foi resfriado a -10°C e aos poucos foi adicionada a tri-n-butilfosfina (1,2 mL, 5 mmol, 0,1 eq). A mistura foi mantida em agitação na temperatura ambiente durante 4 horas. A seguir o acrilato de metila não reagido foi removido sob pressão reduzida e o bruto remanescente no balão foi destilado a vácuo (pe 95-98°C/10-11 Torr).



dimetil 2-metilenepentanodioato (S30)

Óleo incolor; rendimento: 4,74 g (55%); R_f = 0,43 (AcOEt/hexanos, 1:9).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN): δ = 6,12 (s, 1 H); 5,62 (s, 1 H); 3,71 (s, 3 H); 3,62 (s, 3 H); 2,60 – 2,55 (m, 2 H); 2,51 – 2,46 (m, 2 H) ppm.

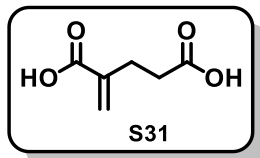
RMN ¹³C (75 MHz, CD₃CN): δ = 172,8, 166,9, 139,3, 125,0, 117,3, 51,4, 51,0, 32,4, 27,0 ppm.

8. 20. PROCEDIMENTO PARA HIDRÓLISE DE S30

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o dimetil 2-metilenepentanodioato (S30) (3,44 g, 20 mmol, 1,0 eq) a seguir água ultrapura (10 mL) e hidróxido de potássio (3,36g, 60 mmol, 3,0 eq). A mistura foi aquecida em refluxo durante 2 horas, depois a reação foi arrefecida na temperatura ambiente, resfriada a 0°C e então



adicionado $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ (37% m/m) até se atingir pH igual a 1 (verificado com fita de papel indicador de pH). O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água, o sólido foi deixado na linha de vácuo por pelo menos 10 horas, o composto obtido foi utilizado sem purificação prévia na próxima etapa.

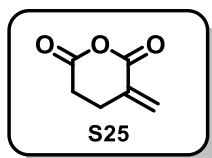


Ácido 2-metilenopentanedióico (S31)

Sólido branco; rendimento: 2,74 g, (95 %); $R_f = 0,27$ (AcOEt/hexanos, 3:2).

8. 21. PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO ANDRIDO METILENO GLUTÁRICO S25

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o ácido 2-metilenopentanedióico (S31) (2,88 g, 20 mmol), o anidrido acético (Ac_2O) e a mistura foi mantida em agitação a 60°C durante 2 horas. A seguir a reação foi arrefecida a temperatura ambiente e o excesso de anidrido acético e ácido acético foram removidos por destilação à vácuo (60°C , 10-11 Torr). O anidrido foi recuperado como o sólido branco remanescente no balão e foi utilizado sem posteriores purificações.



3-metienedihidro-2H-piran-2,6(3H)-diona (S25)

Sólido branco; rendimento: 2,50 g (99 %); $R_f = 0,24$ (AcOEt/hexanos, 7:3).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 6,58$ (s, 1 H); 5,90 (s, 1 H); 2,83 – 2,75 (m, 4 H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 166,2$, 161,1, 131,2, 130,9, 30,4, 24,7 ppm.

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_6\text{H}_6\text{NaO}_3$: 149,0215; obtido: 149,0210.

8. 22. PROCEDIMENTO PARA ACILAÇÃO COM ANDRIDO ITACÔNICO (S24) E METILENO GLUTÁRICO (S25)

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o anidrido **S24** ou **S25** (1,30 g, 11,0 mmol, 1,1 eq) e tolueno (10 mL), seguir a indolina (10 mmol, 1,0 eq) foi adicionada, a mistura foi aquecida por 3 horas a 80°C (60°C , no caso do anidrido S25), depois a reação foi arrefecida na temperatura ambiente. A seguir o tolueno foi removido



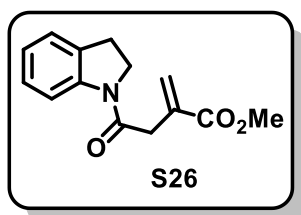
sob pressão reduzida. Os ácidos 4-(indolin-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoicos foram utilizados na próxima etapa sem purificação prévia.

No caso da reação com o anidrido α -metileno glutárico as proporções foram: Anidrido (2,52 g, 20 mmol, 4,0 eq), indolina (5 mmol, 1 eq). A temperatura da reação deve ser mantida a 60°C.

8. 23. PROCEDIMENTO PARA ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS 4-(INDOLIN-1-IL)-2-METILENO-4-OXOBUTANOICOS

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética e resfriado em banho de gelo foi adicionado o MeOH (10 mL), o cloreto de tionila (1,3 mL, 17,5 mmol, 1,75 eq) gota-a-gota. A seguir foi adicionada uma solução do bruto dos ácidos 4-(indolin-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoicos em MeOH (10 mL). Em seguida a mesma foi deixada na temperatura ambiente e então aquecida em refluxo durante 2,5 horas. O balão foi arrefecido, e o metanol removido sob pressão reduzida. AcOEt foi adicionado à mistura (20 mL) e solução aquosa saturada de K_2CO_3 até pH 7, a suspensão foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL), as fases orgânicas foram reunidas e secas sob $MgSO_4$, filtradas e o solvente foi então removido sob pressão reduzida. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos como eluente.

No caso da reação de esterificação dos ácidos 5-(indolin-1-il)-2-metileno-5-oxopentanóicos foram utilizadas as mesmas proporções descritas no item 8. 22. , pois foram utilizados 5 mmol da indolina.



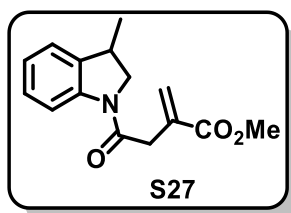
metil 4-(indolin-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoato (S26)

Sólido branco; rendimento: 1,22 g (50%); **pf**: 93 – 95 °C; **R_f** = 0,31 (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,21 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,19 – 7,18 (m, 2 H); 7,01 (t, J = 7,2 Hz, 1 H); 6,38 (s, 1 H); 5,77 (s, 1 H); 4,14 (t, J = 8,4 Hz, 2 H); 3,78 (s, 3 H); 3,47 (s, 3 H); 3,22 (t, J = 8,4 Hz, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 168,1, 167,0, 142,9, 134,2, 131,1, 128,3, 127,6, 124,5, 123,8, 117,2, 52,2, 48,1, 39,3, 28,1 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 245 (M⁺, 10), 119 (100).



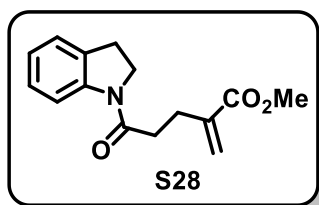
metil 2-metileno-4-(3-metilindolin-1-il)-4-oxobutanoato (S27)

Sólido bege; rendimento: 0,62 g (30%); **pf**: 93 – 95 °C; **R_f** = 0,46 (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,19 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H); 7,22 – 7,15 (m, 2 H); 7,07 – 7,02 (m, 1 H); 6,38 (s, 1 H); 5,76 (s, 1 H); 4,33 – 4,27 (m, 1 H); 3,78 (s, 3 H); 3,68 – 3,62 (m, 1 H); 3,56 – 3,51 (m, 1 H); 3,47 (s, 2 H); 1,38 – 1,36 (m, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 168,1, 167,0, 142,3, 136,4, 134,2, 128,2, 127,7, 123,9, 123,3, 117,1, 56,3, 52,2, 39,3, 34,9, 20,3 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 259 (M⁺, 16), 133 (100).



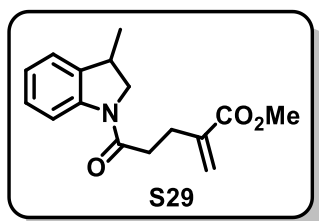
metil 5-(indolin-1-il)-2-metileno-5-oxopentanoato (S28)

Sólido bege; rendimento: 0,19 g (15%); **pf**: 93 – 95 °C; **R_f** = 0,41 (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,23 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H); 7,21 – 7,16 (m, 2 H); 7,01 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H); 6,22 (s, 1 H); 5,71 (s, 1 H); 4,05 (t, *J* = 8,1 Hz, 2 H); 3,77 (s, 3 H); 3,19 (t, *J* = 8,1 Hz, 2 H); 2,78 – 2,73 (m, 2 H); 2,65 – 2,60 (m, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 170,2, 167,4, 143,0, 139,2, 131,1, 127,6, 126,5, 124,5, 123,6, 117,0, 51,9, 48,0, 35,1, 28,0, 27,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 259 (M⁺, 10), 119 (100).



metil 2-metileno-5-(3-metilindolin-1-il)-5-oxopentanoato (S29)

Sólido bege; rendimento: 0,19 g (14%); **pf**: 93 – 95 °C; **R_f** = 0,50 (AcOEt/hexanos, 2:3).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,21 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H); 7,20 (t, *J* = 7,9 Hz, 1 H); 7,16 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H); 7,04 (t, *J* = 7,4 Hz, 1 H); 6,22 (s, 1 H); 5,70 (s, 1 H); 4,23 – 4,20 (m, 1 H); 3,77 (s, 3 H);



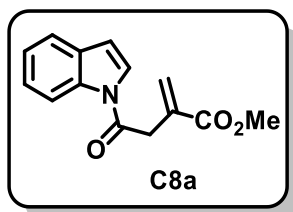
3,71 – 3,65 (m, 1 H); 3,59 – 3,56 (m, 1 H); 2,77 – 2,74 (m, 2 H); 2,65 – 2,61 (m, 2 H); 1,36 – 1,34 (m, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 170,1, 167,4, 142,5, 139,2, 136,3, 127,7, 126,5, 123,7, 123,4, 116,9, 56,1, 51,9, 35,1, 34,8, 27,5, 20,3 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 273 (M⁺, 12), 133 (100).

8. 24. PROCEDIMENTO PARA A OXIDAÇÃO COM DDQ PARA PREPARAÇÃO DE C8A-B E C9A-B

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o tolueno (0,2 M) a seguir as indolinas (S26-29, 1,0 eq). A seguir foi adicionada a DDQ (1,1 eq). A mistura foi mantida em agitação em refluxo durante 15 horas. A reação foi então arrefecida e o tolueno foi removido sob pressão reduzida. Ao bruto remanescente foi adicionado AcOEt e água ultrapura, a fase orgânica foi removida e a reação extraída novamente com AcOEt. As fases orgânicas foram reunidas e secas sob MgSO₄. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se AcOEt em hexanos como eluente.



metil 4-(1H-indol-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoato (C8a)

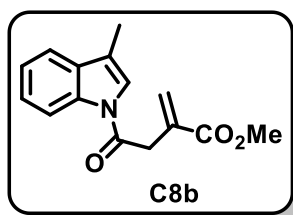
Sólido branco; rendimento: 0,38 g (73 %); R_f = 0,22 (AcOEt/hexanos, 1:4).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,43(d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,56 (d, J = 7,8 Hz, 1 H); 7,49 (d, J = 3,8 Hz, 1 H); 7,34 (t, J = 7,4 Hz, 1 H); 7,27 (t, J = 7,4 Hz, 1 H); 6,66 (d, J = 3,8 Hz, 1 H); 6,46 (s, 1 H); 5,81 (s, 1 H); 3,96 (s, 2 H); 3,79 (s, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 168,5, 166,6, 135,7, 133,3, 130,4, 129,2, 125,2, 124,6, 123,8, 120,9, 116,7, 109,6, 52,4, 39,0 ppm;

EM (IE⁺): m/z (%) = 243 (M⁺, 17), 117 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + Na]⁺ calcd para C₁₄H₁₃NNaO₃: 266,0793; obtido: 266,0790.



metil 4-(3-metil-1H-indol-1-il)-2-metileno-4-oxobutanoato (C8b)



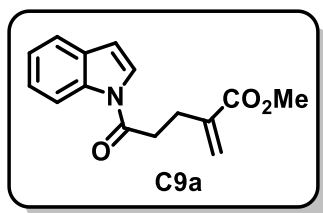
Sólido bege; rendimento: 0,44 g (72 %); $R_f = 0,28$ (AcOEt/hexanos, 1:4).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,41$ (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,51 – 7,49 (m, 1 H); 7,38 – 7,25 (m, 3 H); 6,45 (s, 1 H); 5,80 (s, 1 H); 3,92 (s, 2 H); 3,79 (s, 3 H); 2,29 – 2,29 (m, 3 H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 168,1, 166,7, 136,6, 136,0, 133,5, 131,4, 129,0, 125,3, 123,6, 121,5, 118,9, 118,8, 116,7, 52,4, 39,1, 9,8$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 257 (M^+ , 15), 131 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NNaO}_3$: 280,0950; obtido: 280,0944.



metil 5-(1H-indol-1-il)-2-metilene-5-oxopentanoato (C9a)

Sólido branco; rendimento: 0,096 g (64 %); $R_f = 0,31$ (AcOEt/hexanos, 1:4).

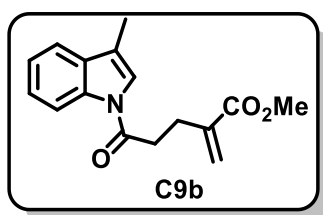
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,46$ (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H); 7,56 (d, $J = 7,7$ Hz, 1 H); 7,52 (d, $J = 3,7$ Hz, 1 H); 7,37 – 7,34 (m, 1 H); 7,29 – 7,26 (m, 1 H); 6,65 (d, $J = 3,7$ Hz, 1 H); 6,26 (s, 1 H); 5,76 (s, 1 H); 3,79 (s, 3 H); 3,16 – 3,13 (m, 2 H); 2,87 – 2,84 (m, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,5, 167,2, 138,5, 135,6, 130,4, 127,1, 125,2, 123,7, 120,8, 116,6, 109,3, 52,0, 36,1, 27,7$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 257 (M^+ , 15), 117 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NNaO}_3$: 280,0950; obtido: 280,0943.

Para a reação de oxidação foram empregados 0,58 mmol de S28.



metil 5-(3-metil-1H-indol-1-il)-2-metilene-5-oxopentanoato (C9b)

Sólido branco; rendimento: 0,174 g (89 %); $R_f = 0,34$ (AcOEt/hexanos, 1:4).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,43$ (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 7,49 (d, $J = 7,7$ Hz, 1 H); 7,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 7,30 – 7,26 (m, 2 H); 6,26 (s, 1 H); 5,74 (s, 1 H); 3,79 (s, 3 H); 3,09 (t, $J = 7,8$ Hz, 2 H); 2,84 (t, $J = 7,8$ Hz, 2 H); 2,28 (s, 3 H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,1, 167,2, 138,6, 135,9, 131,4, 126,9, 125,2, 123,4, 121,6, 118,8, 118,5, 116,6, 52,0, 36,0, 27,6, 9,7$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 271 (M^+ , 12), 131 (100).



EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + Na]^+$ calcd para $C_{16}H_{17}NNaO_3$: 294,1106; obtido: 294,1112.

Para a reação de oxidação foram empregados 0,71 mmol de S29.

Todos os compostos C abordados anteriormente revelam em solução reveladora de permanganato de potássio.

Os compostos **C8a-b** e **C9a-b** revelam em solução reveladora de vanilina, apresentando mancha vermelha.

8. 25. PROCEDIMENTO DE GERAÇÃO DO RADICAL CARBAMOÍLA UTILIZANDO A REAÇÃO DE FOTO-FENTON EM FLUXO CONTÍNUO

8. 25. 1. Montagem do reator fotoquímico em fluxo contínuo

Uma Lâmpada UV (Lâmpada de vapor de mercúrio, de média-pressão, 450 W, Ace Glass Inc., 7825-35) foi inserida em um filtro (Pyrex). Os dois foram então inseridos em um poço de imersão de quartzo que foi colocado em um banho de água (Imagem 11 e Imagem 12). Um reator tubular (1 mL, tubulação de perfluoro alcóxi-alcanos de alta pureza de 1,6 mm x 0,8 mm x 2,21 m) foi envolvido entorno do poço de imersão. O reator em forma de bobina foi conectado as seringas através de um adaptador em Y de PEEK. Uma cabine (46 x 64 x 44 cm, L x A x P) foi utilizada para conter o aparato fotoquímico descrito. Uma bomba de fluxo de seringa (Harvard Apparatus PHD ULTRA) foi utilizada para infundir as soluções no reator fotoquímico. Um regulador de pressão traseira (BPR, 75 psi, 5 atm) foi conectado ao final do reator e o efluente reacional foi coletado em um frasco.

A seguir serão mostradas imagens dos componentes do reator fotoquímico.



Imagem 11: **A)** Lâmpada UV (média pressão, vapor de mercúrio, 450 W, **B)** Filtro de absorção (Pyrex), **C)** Poço de imersão de quartzo (Ace-Thred connection) todos obtidos da Ace Glass INC

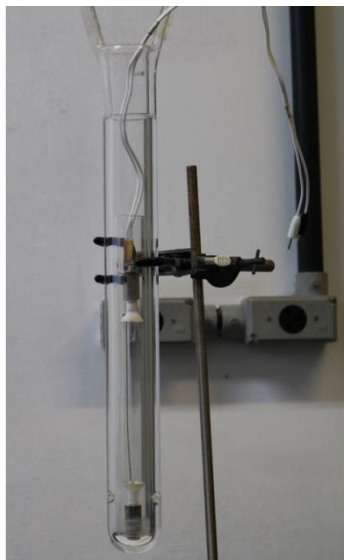


Imagem 12: Lâmpada UV com o filtro e poço de imersão posicionados

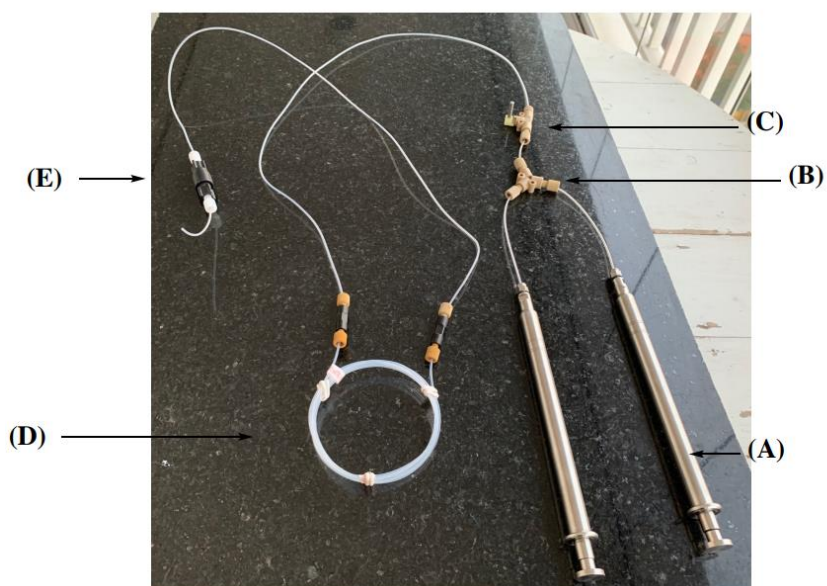


Imagem 13: **A)** Seringa de aço-inox (8 mL, SWAGELOK®) da Harvard apparatus, **B)** Conexão em Y de PEEK, **C)** Válvula de fechamento, **D)** Reator em bobina (1 mL, HPFA), **E)** regulador de pressão (75 psi), todos da IDEX Health & Science



Imagem 14: Visão interna do reator fotoquímico

8. 25. 2. *Preparação das soluções e operação do reator*

Duas soluções contendo os materiais de partida foram preparadas da seguinte forma:

Solução 1: Amidas **C5a-j** ($0,2 \text{ mol. L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mol %) e H_2SO_4 ($0,2 \text{ mol. L}^{-1}$) foram adicionadas a um balão volumétrico e formamida ou *N*-metilformamida foi adicionada até completar o volume do balão. Nitrogênio foi borbulhado por 5 minutos.

A amida **C5i** foi utilizada na concentração de $0,04 \text{ mol. L}^{-1}$

Na reação de imidação foi utilizado $0,2 \text{ mmol}$

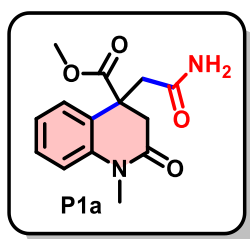
Solução 2: H_2O_2 (30 % m/m , $0,4 \text{ mol. L}^{-1}$) foi adicionado ao balão volumétrico e formamida ou *N*-metilformamida foi adicionada até completar o volume do balão. Nitrogênio foi borbulhado por 5 minutos.

Estas soluções foram utilizadas para carregar duas seringas de aço inox de 8 mL, as seringas foram encaixadas na bomba de fluxo. Para a equilibração do reator ambas foram injetadas em um fluxo de $50 \mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos. Este efluente que saiu do reator foi descartado. Após a estabilização, uma amostra de efluente reacional foi coletada a cada 10 minutos, foram coletadas três amostras para serem analisadas por CG-EM. Para extração das mostras adicionou-se solução aquosa saturada de NaHCO_3 (0,5 mL) e CHCl_3 (1,0 mL) ao frasco contendo a amostra e a fase orgânica removida, a fase aquosa foi extraída novamente com CHCl_3 (1,0 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas em MgSO_4 filtradas e analisadas por CCD e CG-EM. A injeção das soluções foi mantida por mais 45 minutos e o efluente que deixava o reator era coletado em um frasco de vidro contendo NaHCO_3 (0,038 g, $0,45 \text{ mmol}$) e Na_2SO_3



(0,113 g, 0,9 mmol). Esta mistura foi agitada por aproximadamente 15 minutos para remoção de gás. Então 4 mL foram transferidos para um balão de fundo redondo para a remoção da formamida a vácuo, fornecendo o produto bruto.

No caso da preparação das indolin-2-onas 3,3-dissubstituídas **P2a-e** o mesmo protocolo utilizado em fluxo foi aplicado. Para a etapa de imidação foi realizada a purificação dos compostos **P3a-p**, a formamida foi removida por destilação a vácuo. O bruto remanescente no balão foi rinsado com MeOH (4 mL) e adicionada sílica gel para cromatografia (800 mg), o solvente foi então removido e a sílica impreganada com o produto bruto foi utilizada para carregar uma coluna cromatográfica preenchida com sílica gel, a qual foi eluída com MeOH/CHCl₃ (5:95).



metil 4-(2-amino-2-oxoetil)-1-metil-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-4-carboxilato (P1a)

Sólido branco; rendimento: 91,7 mg (83 %); **pf**: 202 – 204 °C; **R_f** = 0,26 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

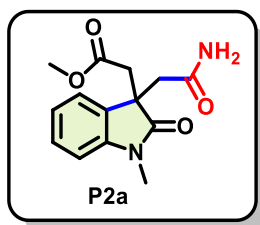
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,35 – 7,32 (m, 1 H); 7,27 – 7,25 (m, 1 H); 7,09 – 7,07 (m, 1 H); 7,06 – 7,02 (m, 1 H); 5,63 (sl, 1 H); 5,45 (sl, 1 H); 3,78 (s, 3 H); 3,38 (s, 3 H); 3,27 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 3,17 (d, *J* = 15,5 Hz, 1 H); 3,03 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,59 (d, *J* = 15,3 Hz, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD): δ = 173,0, 169,4, 164,7, 139,6, 128,8, 126,1, 125,6, 123,4, 115,7, 118,8, 118,5, 116,6, 52,0, 45,8, 40,4, 37,6, 28,6 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 276 (M⁺, 12), 217 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₆N₂O₃: 277,1188; obtido: 277,1176.

IV (puro): 3441, 3190, 2947, 1726, 1686, 1639, 1591, 1375, 1207, 1084, 770 cm⁻¹.



metil 2-(3-(2-amino-2-oxoetil)-1-metil-2-oxoindolin-3-il)acetato (P2a)

Sólido branco; rendimento: 96,1 mg (87 %); **pf**: 144 – 146 °C; **R_f** = 0,29 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,32 – 7,28 (m, 2H); 7,07 – 7,04 (m, 1 H); 6,87 – 6,86 (m, 1 H); 6,27 (sl, 1 H); 5,35 (sl, 1 H); 3,49 (s, 3 H); 3,26 (s, 3 H); 3,10 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 3,01 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 2,86 (d, *J* = 14,9 Hz, 1 H); 2,68 (d, *J* = 14,9 Hz, 1 H) ppm



RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 178,9, 170,7, 170,2, 143,8, 130,3, 128,8, 123,4, 122,8, 108,4, 51,7, 47,2, 42,4, 39,9, 26,6$ ppm.

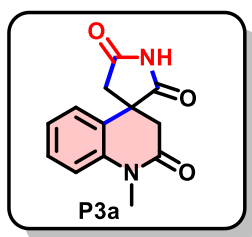
EM (IE $^+$): m/z (%) = 276 ($\text{M}^{+\bullet}$, 30), 130 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: 277,1188; obtido: 277,1180.

IV (puro): 3375, 3205, 2957, 2910, 1732, 1703, 1654, 1608, 1342, 1018, 758, 680 cm^{-1} .

8. 25. 2. 1. Reação de imidação com K_2CO_3 :

K_2CO_3 (55,3 mg, 0,4 mmol) e tolueno (6 mL) foram adicionados à mistura bruta das dihidroquinolinonas **3** (0,4 mmol). A mistura resultante foi aquecida em refluxo por 2 horas. O tolueno foi removido sob pressão reduzida. Adicionou-se solução aquosa de HCl (2 mol. L^{-1} , 5 mL). A mistura foi extraída com CHCl_3 (3 x 5mL). As fases orgânicas foram secas em MgSO_4 e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O bruto remanescente no balão foi rinsado com MeOH (4 mL) e adicionada sílica gel para cromatografia (800 mg), o solvente foi então removido e a sílica impreganada com o produto bruto foi utilizada para carregar uma coluna cromatográfica preenchida com sílica gel (**5a–i**: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5; **5j–o**: CHCl_3).



1'-Metil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3a)

Sólido branco; rendimento: 92,8 mg (91%); **pf**: 201 – 204 °C; **R_f**= 0,35 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5).

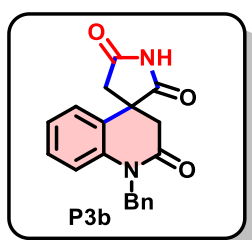
IV (puro): 3129, 3063, 2943, 2911, 1767, 1705, 1643, 1593, 1577, 1138, 764 cm^{-1} .

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,78$ (sl, 1 H); 7,39 – 7,35 (m, 1 H); 7,11 – 7,08 (m, 3 H); 3,41 (s, 3 H); 3,17 (d, $J = 15,8$ Hz, 1 H); 2,98 (d, $J = 18,4$ Hz, 1 H); 2,83 (d, $J = 18,6$ Hz, 1 H); 2,80 (d, $J = 16,1$ Hz, 1 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 178,4, 173,7, 166,5, 139,7, 129,5, 126,1, 124,8, 123,9, 116,0, 47,9, 43,1, 40,0, 29,7$ ppm.

EM (EI $^+$): m/z (%) = 244 ($\text{M}^{+\bullet}$, 73), 130 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$: 245,0926; obtido: 245,0930.





1'-Benzil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3b)

Sólido branco; rendimento: 78,2 mg (61%); **pf**: 263 °C (dec); **R_f** = 0,36 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

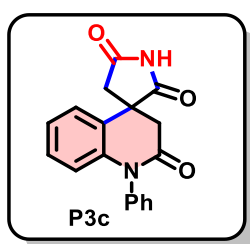
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,32 – 7,29 (m, 4 H); 7,22 (t, *J* = 6,5 Hz, 2 H); 7,16 (d, *J* = 6,8 Hz, 1 H); 7,08 – 7,05 (m, 2 H); 5,29 – 5,21 (m, 2 H); 3,19 (d, *J* = 15,9 Hz, 1 H); 3,06 – 3,00 (m, 2 H); 2,86 (d, *J* = 18,1 Hz, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 180,6, 176,5, 167,6, 139,3, 137,4, 129,3, 129,0, 127,4, 127,0 (2 C), 125,4, 123,0, 116,8, 47,5, 44,9, 42,9, 38,7 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 320 (M⁺, 10), 106 (20), 91 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₉H₁₆N₂O₃: 321,1239; obtido: 321,1245.

IV (puro): 3043, 2916, 2752, 1780, 1712, 1651, 1595, 1392, 759, 731 cm⁻¹.



1'-Fenyl-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3c)

Sólido amarelo pálido; Rendimento: 22,7 mg (74%); **pf**: 231 – 234 °C; **R_f** = 0,39 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

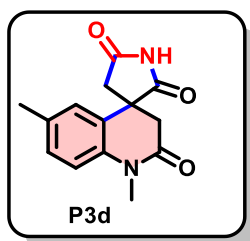
RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 10,76 (sl, 1 H); 7,55 (t, *J* = 7,4 Hz, 2 H); 7,46 (t, *J* = 7,2 Hz, 1 H); 7,26 (d, *J* = 7,4 Hz, 2 H); 7,19 – 7,15 (m, 2 H); 7,06 (t, *J* = 7,4 Hz, 1 H); 6,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H); 3,11 – 2,99 (m, 4 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 180,6, 176,7, 167,1, 141,7, 138,9, 130,2, 129,7, 129,1, 128,7, 126,6, 125,2, 123,7, 117,9, 49,1, 47,6, 42,5 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 306 (M⁺, 100), 234 (63).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₈H₁₄N₂O₃: 307,1083; obtido: 307,1077.

IV (puro): 2935, 2910, 2841, 1770, 1708, 1681, 1595, 1356, 761, 713 cm⁻¹.



1',6'-Dimetil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3d)

Sólido amarelo; rendimento: 93,0 mg (90%); **pf**: 227 – 229 °C; **R_f** = 0,39 (CHCl₃/MeOH, 95:5).



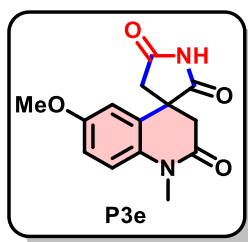
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,45 (sl, 1 H); 7,16 (d, J = 8,2 Hz, 1 H); 6,97 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 6,88 (s, 1 H); 3,39 (s, 3 H); 3,16 (d, J = 15,8 Hz, 1 H); 2,97 (d, J = 18,4 Hz, 1 H); 2,81 (d, J = 18,4 Hz, 1 H); 2,77 (d, J = 15,8 Hz, 1 H); 2,31 (s, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,6, 173,8, 166,4, 137,2, 133,7, 129,9, 126,0, 125,3, 115,9, 47,9, 43,2, 40,1, 29,7, 20,7 ppm.

EM (EI⁺): m/z (%) = 258 (M⁺, 98), 144 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₄N₂O₃: 259,1083; obtido: 259,1085.

IV (puro): 3211, 2931, 2907, 1775, 1715, 1643, 1611, 1344, 1179, 812 cm⁻¹.



6'-Metoxi-1'-metil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3e)

Sólido branco; rendimento: 54,8 mg (50%); **pf:** 216 – 218 °C; **R_f** = 0,33 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

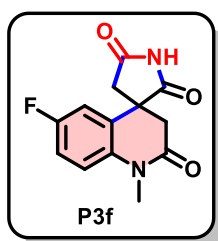
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,62 (sl, 1 H); 7,01 (d, J = 8,9 Hz, 1 H); 6,88 (dd, J = 8,9, 2,8 Hz, 1 H); 6,64 (d, J = 2,8 Hz, 1 H); 3,79 (s, 3 H); 3,28 (s, 3 H); 3,15 (d, J = 15,8 Hz, 1 H); 2,97 (d, J = 18,5 Hz, 1 H); 2,81 (d, J = 18,4 Hz, 1 H); 2,77 (d, J = 15,8 Hz, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,4, 173,7, 166,1, 155,9, 133,2, 127,5, 116,9, 113,5, 111,5, 55,7, 48,0, 43,1, 40,1, 29,9 ppm.

EM (EI⁺): m/z (%) = 274 (M⁺, 100), 203 (48).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₄N₂O₄: 275,1032; obtido: 275,1036.

IV (puro): 3210, 2932, 2913, 2883, 1778, 1717, 1649, 1581, 1503, 1036, 800 cm⁻¹.



6'-Fluoro-1'-metil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3f)

Sólido amarelo; rendimento: 80,8 mg (77%); **pf:** 229 – 232 °C; **R_f** = 0,26 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,25 – 7,23 (m, 1 H); 7,14 (td, J = 8,9, 2,8 Hz, 1 H); 6,94 (dd, J = 8,9, 2,8 Hz, 1 H); 3,38 (s, 3 H); 3,04 (d, J = 16,0 Hz, 1 H); 2,96 (d, J = 18,3 Hz, 1 H); 2,88 (d, J = 15,9 Hz, 1 H); 2,88 (d, J = 18,2 Hz, 1 H).

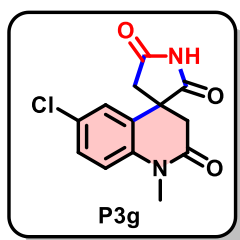


RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 180,1, 176,2, 166,7, 158,2$ (d, $J_{\text{C,F}} = 239$ Hz), $137,2$ (d, $J_{\text{C,F}} = 2,1$ Hz), $128,6$ (d, $J_{\text{C,F}} = 6,7$ Hz), $118,0$ (d, $J_{\text{C,F}} = 8,0$ Hz), $115,6$ (d, $J_{\text{C,F}} = 22,1$ Hz), $112,6$ (d, $J_{\text{C,F}} = 24,3$ Hz), $47,4, 42,3, 39,0, 29,9$.

MS (EI $^+$): m/z (%) = 262 ($\text{M}^{+\bullet}$, 74), 191 (67), 148 (100).

HRMS (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_3$: $263,0832$; obtido: $263,0828$.

IV (puro): $3210, 3065, 2947, 2913, 2830, 1778, 1717, 1649, 1582, 1503, 1177, 1036, 799$ cm^{-1} .



6'-Cloro-1'-metil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3g)

Sólido branco; rendimento: $74,7$ mg (67%); **pf:** $266 - 269$ °C; **R_f** = $0,35$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5).

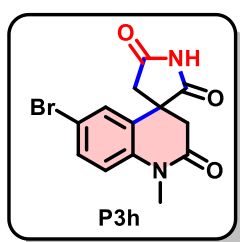
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7,39$ (dd, $J = 8,8, 2,3$ Hz, 1 H); $7,22$ (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H); $7,13$ (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H); $3,37$ (s, 3 H); $3,05$ (d, $J = 16,0$ Hz, 1 H); $2,96$ (d, $J = 18,2$ Hz, 1 H); $2,88$ (d, $J = 16,1$ Hz, 1 H); $2,88$ (d, $J = 18,2$ Hz, 1 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 180,1, 176,2, 166,8, 139,7, 129,1, 128,7, 127,3, 125,1, 118,2, 47,4, 42,3, 38,9, 29,7$ ppm.

MS (EI $^+$): m/z (%) = 278 ($\text{M}^{+\bullet}$, 58), 207 (64), 44 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3$: $279,0536$; obtido: $279,0525$.

IV (puro): $3224, 3074, 2931, 2912, 1774, 1724, 1645, 1591, 1415, 1176, 819$ cm^{-1} .



6'-Bromo-1'-metil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3h)

Sólido amarelo; rendimento: $126,7$ mg (98 %); **pf:** $240 - 243$ °C; **R_f** = $0,43$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 8,04$ (sl, 1 H); $7,53$ (d, $J = 8,7$ Hz, 1 H); $7,26$ (s, 1 H); $7,16$ (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H); $3,36$ (s, 3 H); $3,04$ (d, $J = 16,0$ Hz, 1 H); $2,97$ (d, $J = 18,2$ Hz, 1 H); $2,88$ (d, $J = 16,0$ Hz, 1 H); $2,87$ (d, $J = 18,2$ Hz, 1 H) ppm.

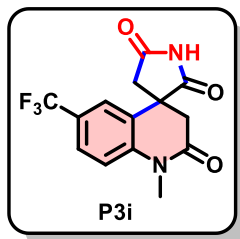
RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 180,1, 176,2, 166,8, 140,1, 132,0, 129,1, 127,8, 118,5, 115,1, 47,4, 42,4, 38,9, 29,7$ ppm.

MS (EI $^+$): m/z (%) = 324 ($\text{M}^{+\bullet}$, 100), 322 (98), 251 (84).



EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + H]^+$ calcd para $C_{13}H_{11}BrN_2O_3$: 323,0031; obtido: 323,0018.

IV (puro): 3180, 2939, 2914, 1774, 1712, 1658, 1614, 1330, 1280, 1187, 1114, 829 cm^{-1} .



1'-Metil-6'-(trifluorometil)-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quino-lina]-2,2',5(3'H)-triona (P3i)

Sólido branco; rendimento: 93,7 mg (75%); **pf:** 254 – 256 °C; **R_f** = 0,32 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

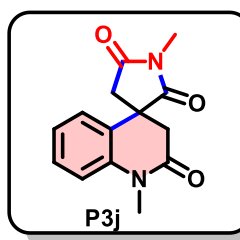
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,70 (d, J = 8,4 Hz, 1 H); 7,41 – 7,39 (m, 2 H); 3,42 (s, 3 H); 3,10 (d, J = 16,0 Hz, 1 H); 3,08 – 2,90 (m, 3 H).

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 180,1, 176,2, 167,2, 144,1, 128,0, 126,7 (m), 124,5 (q, J = 290 Hz), 123,6, 122,2 (m), 117,0, 47,4, 42,3, 38,9, 29,8.

EM (EI⁺): m/z (%) = 312 (M⁺, 72), 241 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + H]^+$ calcd para $C_{14}H_{11}F_3N_2O_3$: 313,0800; obtido: 313,0805.

IV (puro): 3344, 3332, 2943, 2908, 1776, 1695, 1637, 1589, 1379, 1138, 817 cm^{-1} .



1,1'-dimetil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3j)

Sólido branco; rendimento: 44,4 mg (43%); **pf:** 170 – 173 °C; **R_f** = 0,60 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

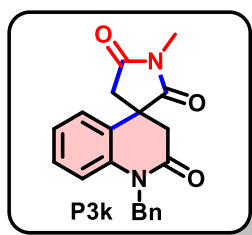
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,36 (td, J = 7,6, 1,4 Hz, 1 H); 7,09 – 7,05 (m, 2 H); 6,94 (dd, J = 7,6, 1,1 Hz, 1 H); 3,42 (s, 3 H); 3,18 (d, J = 15,8 Hz, 1 H); 3,14 (s, 3 H); 2,93 (d, J = 18,2 Hz, 1 H); 2,80 (d, J = 18,2 Hz, 1 H); 2,71 (d, J = 15,8 Hz, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,7, 174,1, 166,5, 139,8, 129,4, 126,5, 124,7, 123,8, 115,9, 46,6, 42,2, 40,2, 29,7, 25,5 ppm.

EM (EI⁺): m/z (%) = 258 (M⁺, 93), 130 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[M + H]^+$ calcd para $C_{14}H_{14}N_2O_3$: 259,1083; obtido: 259,1076.

IV (puro): 2951, 2916, 2848, 1780, 1693, 1666, 1597, 1365, 1286, 1053, 767 cm^{-1} .



1'-benzil-1-metil-1'H-spiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3k)

Sólido branco; rendimento: 44,1 mg (33%); **pf**: 146 – 148 °C; **R_f** = 0,68 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

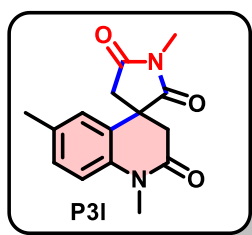
RMN 1H (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,31 – 7,30 (m, 4 H); 7,24 – 7,19 (m, 2 H); 7,08–7,03 (m, 3 H); 5,28 (d, *J* = 16,4 Hz, 1 H); 5,23 (d, *J* = 16,4 Hz, 1 H); 3,19 (d, *J* = 15,9 Hz, 1 H); 3,04 (s, 3 H); 3,03 – 2,99 (m, 2 H); 2,90 (d, *J* = 18,0 Hz, 1 H) ppm.

RMN 13C (500 MHz, CD₃OD): δ = 179,1, 175,0, 168,2, 138,8, 136,6, 128,8, 128,4, 126,9 (2 C), 126,4, 124,7, 123,6, 116,8, 46,2, 45,3, 41,2, 38,9, 24,1 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 334 (M⁺, 11), 91 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₂₀H₁₈N₂O₃: 335,1396; obtido: 335,1397.

IV (puro): 2953, 2912, 2845, 1772, 1697, 1664, 1600, 1373, 1282, 777, 715 cm⁻¹.



1,1',6'-Trimethyl-1'H-spiro[pyrrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-trione (P3I)

Sólido branco; rendimento: 46,8 mg (43%); **pf**: 195 – 197 °C; **R_f** = 0,68 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

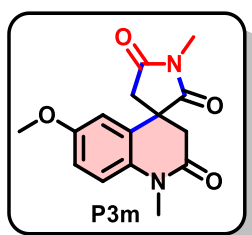
RMN 1H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,14 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H); 6,96 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 6,71 (s, 1 H); 3,39 (s, 3 H); 3,17 – 3,13 (m, 4 H); 2,93 (d, *J* = 18,2 Hz, 1 H); 2,78 (d, *J* = 18,2 Hz, 1 H); 2,68 (d, *J* = 15,8 Hz, 1 H); 2,29 (s, 3 H) ppm.

RMN 13C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,8, 174,2, 166,4, 137,4, 133,5, 129,8, 126,4, 125,3, 115,8, 46,6, 42,3, 40,3, 29,7, 25,5, 20,7 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 272 (M⁺, 79), 144 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₅H₁₆N₂O₃: 273,1239; obtido: 273,1241.

IV (puro): 2938, 2911, 2830, 1778, 1715, 1649, 1580, 1177, 1036, 797 cm⁻¹.





6'-Metoxi-1,1'-dimetil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3m)

Sólido branco; rendimento: 23,0 mg (20%); **pf**: 180 – 182 °C; **R_f** = 0,45 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

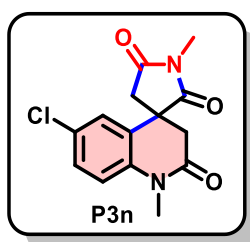
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,00 (d, *J* = 8,9 Hz, 1 H); 6,86 (d, *J* = 8,9 Hz, 1 H); 6,48 (s, 1 H); 3,77 (s, 3 H); 3,39 (s, 3 H); 3,16 – 3,13 (m, 4 H); 2,92 (d, *J* = 18,2 Hz, 1 H); 2,78 (d, *J* = 18,3 Hz, 1 H); 2,68 (d, *J* = 15,8 Hz, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,5, 174,1, 166,1, 155,8, 133,3, 127,9, 116,8, 113,2, 111,7, 55,7, 46,7, 42,1, 40,2, 29,8, 25,5 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 288 (M⁺, 100), 203 (40).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₅H₁₆N₂O₄: 289,1188; obtido: 289,1193.

IV (puro): 2930, 2918, 1778, 1679, 1665, 1595, 1364, 1288, 812, 692 cm⁻¹.



6'-Cloro-1,1'-dimetil-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3n)

Sólido branco; rendimento: 59,7 mg (51%); **pf**: 232 – 235 °C; **R_f** = 0,64 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

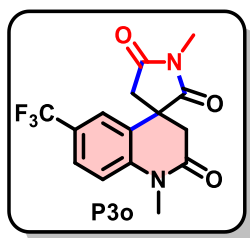
RMN ¹H (125 MHz, CDCl₃): δ = 7,33 (dd, *J* = 8,7, 2,0 Hz, 1 H); 7,01 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H); 6,92 (d, *J* = 2,0 Hz, 1 H); 3,39 (s, 3 H); 3,17 – 3,14 (m, 4 H); 2,93 (d, *J* = 18,3 Hz, 1 H); 2,78 (d, *J* = 18,4 Hz, 1 H); 2,71 (d, *J* = 15,9 Hz, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,0, 173,6, 166,1, 138,5, 129,3, 129,0, 128,0, 125,0, 117,1, 46,5, 41,9, 40,0, 29,8, 25,6 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 294 (M⁺, 31) 292 (92), 207 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₃ClN₂O₃: 293,0693; obtido: 293,0690.

IV (puro): 2930, 2918, 1778, 1679, 1665, 1595, 1364, 1288, 812, 692 cm⁻¹.



1,1'-Dimetil-6'-(trifluorometil)-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-2,2',5(3'H)-triona (P3o)

Sólido branco; rendimento: 64,0 mg (49%); **pf**: 182 – 184 °C; **R_f** = 0,61 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,63 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,18 – 7,17 (m, 2 H); 3,44 (s, 3 H); 3,19 – 3,14 (m, 4 H); 2,95 (d, *J* = 18,2 Hz, 1 H); 2,82 (d, *J* = 18,3 Hz, 1 H); 2,76 (d, *J* = 15,9 Hz, 1 H) ppm.

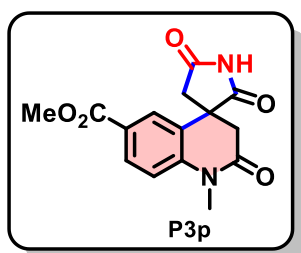


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 177,8, 173,5, 166,3, 142,9, 126,9, 126,7$ (q, $J = 3,6$ Hz), $125,8$ (q, $J = 33,1$ Hz), $123,6$ (q, $J = 270$ Hz), $122,0$ (q, $J = 3,6$ Hz), $116,0, 46,4, 41,8, 40,1, 29,9, 25,7$ ppm.

EM (EI*): m/z (%) = 326 ($\text{M}^{+\bullet}$, 81), 241 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 327,0956; obtido: 327,0961.

IV (puro): 2938, 2911, 2830, 1778, 1715, 1649, 1582, 1177, 1036, 799, 671 cm^{-1} .



Metil 1'-Metil-2,2',5-trioxo-2',3'-dihidro-1'H-espiro[pirrolidina-3,4'-quinolina]-6'-carboxylata (P3p)

Pó branco; rendimento: 90,7 mg (75%); **pf:** 219 – 220 °C; **R_f** = 0,29 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5).

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 11,64$ (sl, 1 H); 7,95 (dd, $J = 14,2, 3,2$ Hz, 1 H); 7,61 (d, $J = 3,2$ Hz, 1 H); 7,31 (d, $J = 14,4$ Hz, 1 H); 3,83 (s, 3 H); 3,33 (s, 3 H); 2,90 (m, 4 H) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 180,2, 176,4, 167,3, 165,9, 144,5, 130,8, 127,1, 125,8, 124,1, 116,6, 52,6, 47,4, 42,7, 38,4, 29,8$ ppm.

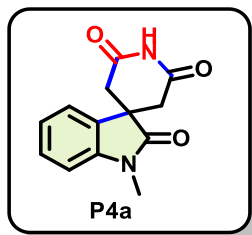
EM (EI*): m/z (%) = 302 ($\text{M}^{+\bullet}$, 96), 231 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$: 303,0981; obtido: 303,0987.

IV (puro): 3022, 2945, 2905, 1773, 1707, 1657, 1599, 1252, 772, 642 cm^{-1} .

8. 25. 2. 2. Reação de imidação com nah:

A um balão de fundo redondo equipado com barra de agitação magnética foi adicionado o oxindol 3,3 dissustituído (0,4 mmol), o THF (6 mL) e o balão foi resfriado em banho de gelo a 0°C. A seguir foi adicionado NaH (9,6 mg, 0,4 mmol) aos poucos e a mistura resultante foi mantida sob agitação na temperatura ambiente durante 1 hora. Adicionou-se solução aquosa de HCl (2 mol. L^{-1} , 5 mL). A mistura foi extraída com CHCl_3 (3 x 5mL). As fases orgânicas foram secas em MgSO_4 e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O bruto remanescente no balão foi rinsado com MeOH (4 mL) e adicionada sílica gel para cromatografia (800 mg), o solvente foi então removido e a sílica impreganada com o produto bruto foi utilizada para carregar uma coluna cromatográfica preenchida com sílica gel.



1-Metilespiro[indolina-3,4'-piperidina]-2,2',6'-triona (P4a)²³⁹

Sólido branco; rendimento: 88,9 mg (79%); **pf**: 199 – 200 °C; **R_f** = 0,22 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

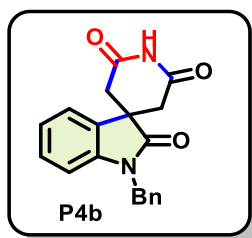
IV (puro): 3209, 3078, 2953, 2918, 1707, 1681, 1652, 1610, 1265, 1128, 738 cm⁻¹.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,47 (sl, 1 H); 7,37 (td, *J* = 7,8, 1,2 Hz, 1 H); 7,23 (d, *J* = 7,5 Hz, 1 H); 7,10 (td, *J* = 7,6, 0,9 Hz, 1 H); 6,93 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H); 3,26 (s, 3 H); 2,99 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H); 2,66 (d, *J* = 17,3 Hz, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,2, 169,9 (2 C), 142,6, 129,8, 129,7, 123,6, 122,5, 109,1, 45,0, 38,7 (2 C), 26,7.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 244 (M⁺, 100), 159 (39).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₃H₁₂N₂O₃: 245,0926; obtido: 245,0920.



1-Benzilespiro[indolina-3,4'-piperidina]-2,2',6'-triona (P4b)

Sólido branco; rendimento: 29,4 mg (46%); **pf**: 181 – 183 °C; **R_f** = 0,54 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,43 (sl, 1 H); 7,35 – 7,22 (m, 7 H); 7,05 (t, *J* = 7,4 Hz, 1 H); 6,82 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H); 4,93 (s, 2 H); 3,04 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H); 2,72 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H) ppm.

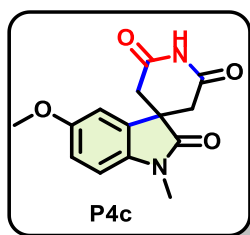
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,4, 169,8 (2 C), 141,7, 135,1, 129,8, 129,6, 129,0, 128,0, 127,2, 123,6, 122,6, 110,2, 45,0, 44,1, 38,8 (2 C) ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 320 (M⁺, 5), 91 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₉H₁₆N₂O₃: 321,1239; obtido: 321,1238.

IV (puro): 3199, 2943, 2899, 2841, 1710, 1697, 1647, 1610, 1351, 1267, 750 cm⁻¹.

²³⁹ Efange, S. M. N.; Kamath, A. P.; Khare, A. B.; Kung, M.-P.; Mach, R. H.; Parsons, S. M. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3905.



5-Metoxi-1-metilespiro[indolina-3,4'-piperidina]-2,2',6'-triona (P4c)

Sólido branco rendimento: 39,5 mg (36%); **pf**: 208 – 210 °C; **R_f** = 0,45 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

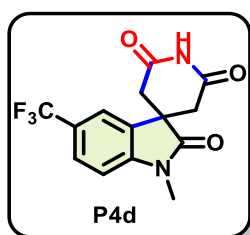
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,23 (sl, 1 H); 6,88 – 6,82 (m, 3 H); 3,78 (s, 3 H); 3,22 (s, 3 H); 2,98 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H); 2,65 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 175,8, 169,7 (2 C), 156,6, 135,9, 131,1, 113,3, 110,6, 109,5, 55,9, 45,3, 38,7 (2 C), 26,7 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 274 (M⁺, 100), 259 (65).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₄N₂O₄: 275,1032; obtido: 275,1037.

IV (puro): 3174, 3074, 2956, 2912, 2839, 1714, 1681, 1629, 1600, 1257, 1029, 798, 692 cm⁻¹.



1-Metil-5-(trifluorometil)espiro[indolina-3,4'-piperidina]-2,2',6'-triona (P4d)

Sólido branco; rendimento: 108,7 mg (87%); **pf**: 190 – 192 °C; **R_f** = 0,36 (CHCl₃/MeOH, 95:5).

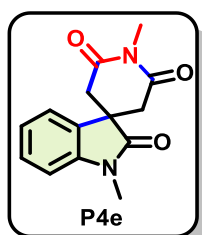
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,47 (sl, 1 H); 7,67 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H); 7,44 (m, 1 H); 7,02 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H); 3,29 (s, 3 H); 2,98 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H); 2,73 (d, *J* = 17,2 Hz, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,3, 169,2 (2 C), 145,7, 130,3, 127,6 (q, *J* = 3,9 Hz), 125,9 (q, *J* = 32,9 Hz), 123,8 (q, *J* = 270 Hz), 119,6 (q, *J* = 3,6 Hz), 109,0, 44,9, 38,4 (2 C), 26,9 ppm.

EM (EI⁺): *m/z* (%) = 312 (M⁺, 100), 227 (38).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₁F₃N₂O₃: 313,0800; obtido: 313,0803.

IV (puro): 3208, 3061, 2936, 2911, 2898, 1776, 1715, 1649, 1580, 1503, 1039, 799 cm⁻¹.



1,1'-Dimetilespiro[indolina-3,4'-piperidina]-2,2',6'-triona (P4e)

Sólido branco; rendimento: 64,0 mg (62%); **pf**: 215 – 217 °C; **R_f** = 0,58 (CHCl₃/MeOH, 95:5).



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,37 – 7,34 (m, 1 H); 7,09 – 7,03 (m, 2 H); 6,92 (d, J = 7,7 Hz, 1 H); 3,32 (s, 3 H); 3,24 (s, 3 H); 3,05 (d, J = 16,9 Hz, 2 H); 2,74 (d, J = 16,9 Hz, 2 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,3, 170,1 (2 C), 142,7, 130,0, 129,6, 123,4, 122,3, 109,1, 44,2, 39,5 (2 C), 26,7, 26,5 ppm.

EM (EI⁺): m/z (%) = 258 (M⁺, 100), 159 (76).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + H]⁺ calcd para C₁₄H₁₄N₂O₃: 259,1083; encontrado: 259,1083.

IV (puro): 2956, 2918, 2912, 2841, 1710, 1703, 1672, 1610, 1257, 1089, 794 cm⁻¹.

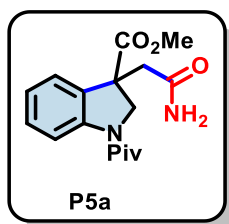
8. 26. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A SÍNTESE DE INDOLINAS SOB IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM

A um frasco de vidro (\varnothing = 2.5 cm; 15 mL) foi adicionado os 2-(((*N*-aril)amino)metil)acrilatos (**C7a-k**) (0,15 mmol, 1,0 eq) e a formamida (3 mL), a seguir o ácido sulfúrico 98 % (7,9 μ L, 0,15 mmol, 1,0 eq). A essa mistura foi adicionada uma solução recentemente preparada de FeSO₄·7H₂O (15 μ L, 100 mmol. L⁻¹, 1 mol %) e solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30 % (30,6 μ L, 0,3 mmol, 2,0 eq). A mistura reacional foi irradiada durante 60 s por uma sonda ultrassônica (Branson, 20 kHz, amplitude 60%, \varnothing = 12,7 mm) com a sonda inserida no centro do frasco e distante do fundo do frasco por 0,2 mm. A mistura foi sonicada constantemente ou em modo pulsado.

Para análise por CG-EM, uma amostra da mistura bruta (500 μ L) foi removida e adicionada uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ e então a mistura foi extraída com CHCl₃ (2 \times 0,5 mL). A fase orgânica foi removida e seca em MgSO₄, filtrada em uma pipeta Pasteur de vidro contendo algodão inserido no fundo e então essa amostra foi analisada por TLC e CG-EM.

À mistura remanescente (2,5 mL) foi adicionado NaHCO₃ (10,5 mg, 0,125 mmol, 1,0 eq). Uma amostra de 2,0 mL foi transferida para um balão de fundo redondo e a formamida foi removida por destilação a vácuo. O bruto remanescente no balão foi rinsado com MeOH (2 mL) e adicionada sílica gel para cromatografia (400 mg), o solvente foi então removido e a sílica impregnada com o produto bruto foi utilizada para carregar uma coluna cromatográfica preenchida com sílica gel, a qual foi eluída com MeOH/CHCl₃ (5:95).

Nota: Para as reações assistidas por ultrassom com os compostos **C7h**, **C7i** e **C7k**, 30 % de *t*-BuOH foi empregado como cosolvente para solubilização dos substratos.



metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5a)

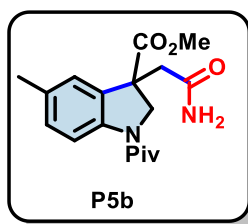
Sólido amarelo pálido; rendimento: 30,9 mg (97 %); **pf**: 174 – 177 °C; **R_f** = 0,28 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,23 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,29 – 7,22 (m, 2 H); 7,04 (td, *J* = 7,5 Hz, 1 H); 5,64 (sl, 1 H); 5,51 (sl, 1 H); 5,08 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,26 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,72 (s, 3H); 3,34 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,57 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 1,40 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,8, 172,6, 171,9, 144,2, 131,1 129,5, 124,0, 122,9, 119,0 57,6, 52,9, 52,9, 43,0, 40,3, 27,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 318 (M⁺, 5), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₇H₂₂N₂O₄: 341,1477; obtido: 341,1477.



metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5b)

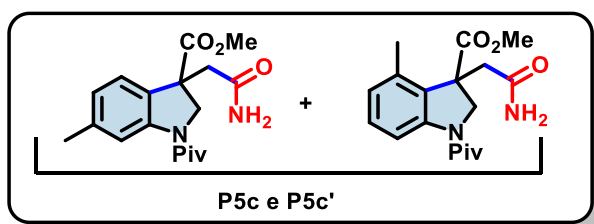
Sólido branco; rendimento: 33,1 mg (99 %); **pf**: 199 – 202 °C; **R_f** = 0,30 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,11 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,07 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,02 (s, 2 H); 5,59 (sl, 1 H); 5,46 (sl, 1 H); 5,06 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,24 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,72 (s, 3H); 3,34 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,55 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,30 (s, 3H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,5, 172,7, 171,9, 144,9, 133,7 131,1, 130,0, 123,3, 118,7 57,7, 52,9, 52,9, 43,0, 40,2, 27,5, 21,0 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 332 (M⁺, 3), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₄N₂O₄: 355,1634; obtido: 355,1628.





metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-1-pivaloilindolína-3-carboxilato (P5c) e metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-4-metil-1-pivaloilindolína-3-carboxilato (P5c')

Sólido branco; rendimento: 28,5 mg (86 %); **pf**: 159 – 161 °C; **R_f** = 0,48 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

(P5c)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,11 (s, 1 H); 7,10 (d, *J* = 7,7 Hz, 1 H); 6,86 (d, *J* = 7,7 Hz, 1 H); 5,72 (sl, 1 H); 5,65 (sl, 1 H); 5,08 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,23 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,70 (s, 3H); 2,54 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H); 2,44 (d, *J* = 15,8 Hz, 1 H); 2,33 (s, 3H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,6, 172,7, 172,0, 144,2, 139,7 128,3, 126,8, 122,5, 119,6 57,9, 52,9, 52,6, 43,1, 40,3, 27,5, 18,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 332 (M⁺, 3), 57 (100).

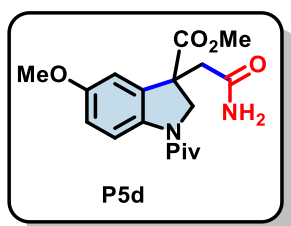
(P5c')

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,12 (s, 1 H); 7,16 (t, *J* = 7,9 Hz, 1 H); 6,81 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H); 5,52 – 5,49 (m, 2 H); 4,76 – 4,71 (m, 2H); 3,73 (s, 3H); 3,31 – 3,28 (m, 2 H); 2,27 (s, 3H); 1,38 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,8, 173,4, 172,3, 144,7, 133,8 129,7, 129,1, 124,7, 116,8 57,8, 53,7, 52,8, , 40,3, 39,3, 27,6, 21,7 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 332 (M⁺, 3), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₈H₂₄N₂O₄: 355,1814; obtido: 355,1798.



metil -3-(2-amino-2-oxoetil)-5-metoxi-1-pivaloilindolína-3-carboxilato (P5d)

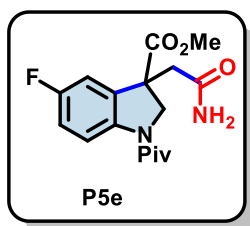
Sólido branco; rendimento: 34,0 mg (97 %); **pf**: 205 – 208 °C; **R_f** = 0,36 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,17 (dd, *J* = 8,5, 0,8 Hz, 1 H); 6,87 – 6,71 (m, 2 H); 5,58 (sl, 1 H); 5,42 (sl, 1 H); 5,06 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,26 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,78 (s, 3H); 3,73 (s, 3H); 3,31 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,56 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,2, 172,4, 171,7, 156,4, 137,8 132,5, 119,7, 113,8, 109,2 57,7, 55,7, 53,0, 52,9, 42,9, 40,0, 27,6 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 348 (M⁺, 5), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₄N₂O₅: 371,1583; obtido: 371,1586.



metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-5-fluoro-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5e)

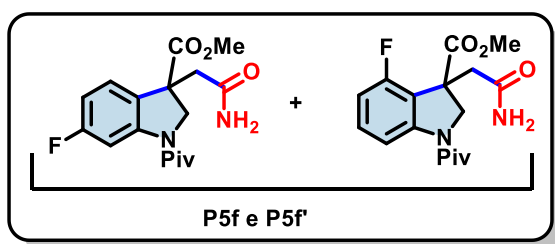
Sólido branco; rendimento: 33,4 mg (99 %); **pf**: 180 – 183 °C; **R_f** = 0,29 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,24 – 8,17 (m, 1 H); 7,05 – 6,86 (m, 2 H); 5,64 (sl, 1 H); 5,52 (sl, 1 H); 5,09 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,27 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,74 (s, 3H); 3,73 (s, 3H); 3,30 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,59 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,6, 172,1, 171,5, 159,3 (d, *J_{C,F}* = 243,7 Hz), 140,3 (d, *J_{C,F}* = 2,3 Hz), 132,8 (d, *J_{C,F}* = 7,8 Hz), 120,0 (d, *J_{C,F}* = 2,3 Hz), 115,9 (d, *J_{C,F}* = 22,5 Hz), 110,3 (d, *J_{C,F}* = 24,6 Hz), 57,8, 53,1, 53,0, 52,8, 42,8, 40,1, 27,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 336 (M⁺, 3), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₇H₂₁FN₂O₄: 359,1383; obtido: 359,1380.



metil -3-(2-amino-2-oxoetil)-6-fluoro-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5f) e metil -3-(2-amino-2-oxoetil)-4-fluoro-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5f')

Sólido branco; rendimento: 39,1 mg (93 %); **pf**: 152 – 154 °C; **R_f** = 0,51 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

(P5f)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,03 – 7,99 (m, 1 H); 7,17 – 7,13 (m, 1 H); 6,75 – 6,70 (m, 1 H)*, 5,73 (sl, 1H); 5,65 (sl, 1 H); 5,13 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,26 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,72 (s, 3 H); 3,34 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 2,57 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H)* ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,0, 172,5, 171,8, 159,0 (d, *J_{C,F}* = 245,5 Hz), 145,6 (d, *J_{C,F}* = 12,7 Hz), 126,5 (d, *J_{C,F}* = 2,5 Hz), 114,9 (d, *J_{C,F}* = 3,1 Hz), 111,1 (d, *J_{C,F}* = 20,0 Hz), 107,1 (d, *J_{C,F}* = 29,4 Hz), 58,3, 53,0*, 52,3, 40,3, 40,1, 27,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 336 (M⁺, 1), 57 (100).

(P5f')

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,06 – 8,04 (m, 1 H); 7,26 – 7,21 (m, 1 H); 6,75 – 6,71 (m, 1 H)*, 5,57 – 5,55 (m, 2 H); 5,07 (d, *J* = 11,2 Hz, 1 H); 4,40 (d, *J* = 11,2 Hz, 1 H); 3,72 (s, 3 H); 3,61 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H); 2,62 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H)* ppm.

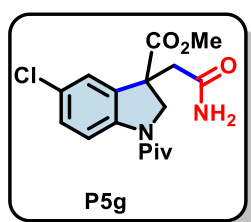


RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 176,8, 176,4, 163,5$ (d, $J_{CF} = 242,7$ Hz), $146,7$ (d, $J_{CF} = 6,6$ Hz), $131,2$ (d, $J_{CF} = 8,5$ Hz), $123,5$ (d, $J_{CF} = 10,4$ Hz), $117,4$ (d, $J_{CF} = 17,6$ Hz), $110,6$ (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz), $58,6, 53,0^*, 52,2$ (d, $J_{CF} = 2,6$ Hz), $43,1, 40,4, 27,5$ ppm.

* Sinal sobreposto no espectro

EM (IE^+): m/z (%) = 336 (M^+ , 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_4$: 359,1383; obtido: 359,1383.



metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-5-cloro-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5g)

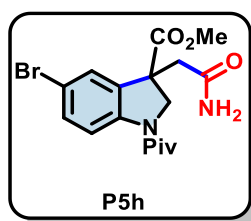
Sólido branco; rendimento: 35,2 mg (99 %); **pf:** 186 – 189 °C; **R_f** = 0,30 (MeOH/ CHCl_3 , 5:95).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,18$ (d, $J = 8,7$ Hz, 1 H); $7,26 - 7,17$ (m, 2 H); $5,58$ (sl, 1 H); $5,47$ (sl, 1 H); $5,10$ (d, $J = 11,4$ Hz, 1 H); $4,26$ (d, $J = 11,3$ Hz, 1 H); $3,75$ (s, 3H); $3,32$ (d, $J = 16,2$ Hz, 1 H); $2,58$ (d, $J = 16,2$ Hz, 1 H); $1,39$ (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 176,8, 172,0, 171,4, 142,9, 132,8, 129,5, 128,8, 123,2, 119,9, 57,8, 53,2, 52,7, 42,9, 40,3, 27,5$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 352 (M^+ , 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_4$: 375,1088; obtido: 375,1088.



metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-5-cloro-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5h)

Sólido branco; rendimento: 41,1 mg (69 %); **pf:** 203 – 206 °C; **R_f** = 0,34 (MeOH/ CHCl_3 , 2:98).

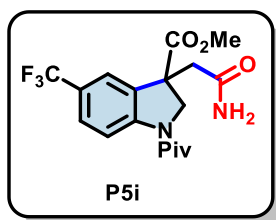
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,13$ (d, $J = 8,7$ Hz, 1 H); $7,43 - 7,30$ (m, 2 H); $5,58$ (sl, 1 H); $5,47$ (sl, 1 H); $5,10$ (d, $J = 11,3$ Hz, 1 H); $4,25$ (d, $J = 11,3$ Hz, 1 H); $3,75$ (s, 3H); $3,32$ (d, $J = 16,2$ Hz, 1 H); $2,58$ (d, $J = 16,1$ Hz, 1 H); $1,39$ (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 176,8, 172,0, 171,4, 143,4, 133,1, 132,4, 126,1, 120,3, 116,1, 57,8, 53,2, 52,7, 43,0, 40,3, 27,5$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 396 (M^+ , 1), 398 (1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_4$: 419,0582; obtido: 419,0584.

Nesse caso foi utilizado o volume total da reação para a determinação do rendimento.



metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-1-pivaloil-5-(trifluorometil)indolina-3-carboxylato (P5i)

Sólido amarelo pálido; rendimento: 41,7 mg (72 %); **pf**: 156 – 159 °C; **R_f** = 0,56 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

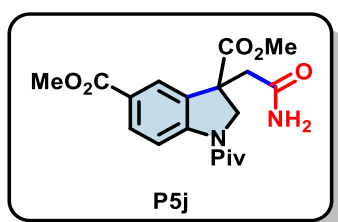
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,34 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,60 – 7,51 (m, 1 H); 7,47 (s, 1H); 5,55 (sl, 1 H); 5,45 (sl, 1 H); 5,18 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,30 (d, *J* = 11,4 Hz, 1 H); 3,75 (s, 3H); 3,39 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 2,62 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 1,41 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,2, 172,0, 171,3, 147,1, 131,6, 127,1 (q, *J_{CF}* = 3,5 Hz), 125,8 (q, *J_{CF}* = 32,6 Hz), 124,0 (q, *J_{CF}* = 270 Hz), 120,1 (q, *J_{CF}* = 3,9 Hz), 118,8, 58,0, 53,2, 52,6, 43,1, 40,4, 27,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 386 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₇H₂₁F₃N₂O₄: 409,1351; obtido: 409,1351.

Nesse caso foi utilizado o volume total da reação para a determinação do rendimento.



dimetil 3-(2-amino-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3,5-dicarboxilato (P5j)

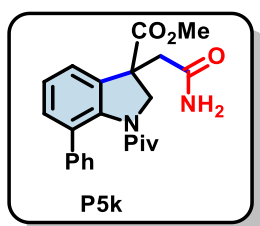
Sólido branco; rendimento: 26,2 mg (75 %); **pf**: 104 – 106 °C; **R_f** = 0,46 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,28 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 8,00 – 7,87 (m, 1 H); 7,91 (d, *J* = 1,8 Hz, 1 H); 5,67 (sl, 1 H); 5,54 (sl, 1 H); 5,19 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,28 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,73 (s, 3H); 3,44 (d, *J* = 16,3 Hz, 1 H); 2,60 (d, *J* = 16,2 Hz, 1 H); 1,41 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,3, 172,2, 171,6, 166,5, 148,2, 131,8, 131,3, 125,5, 124,5, 118,2, 58,3, 53,2, 52,5, 52,1, 43,0, 40,5 27,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 376 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₉H₂₄N₂O₄: 399,1532; obtido: 399,1530.





metil 3-(2-amino-2-oxoetil)-7-fenil-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P5k)

Sólido branco; rendimento: 21,3 mg (36 %); **pf**: 227 – 230 °C; **R_f** = 0,43 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

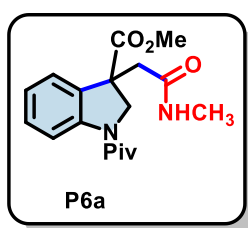
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,43 – 7,37 (m, 2 H); 7,38 – 7,32 (m, 2 H); 7,28 – 7,31 (m, 1 H); 7,25 – 7,15 (m, 1 H); 5,88 (sl, 1 H); 5,34 (sl, 1 H); 4,91 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,25 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,73 (s, 3H); 3,16 (d, *J* = 16,4 Hz, 1 H); 2,39 (d, *J* = 16,4 Hz, 1 H); 1,13 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 178,4, 172,6, 172,0, 141,7, 140,5, 135,5, 133,7, 130,3, 128,4, 127,0, 126,6, 125,6, 121,8, 58,1, 54,1, 52,8, 41,6, 39,9, 27,9 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 394 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₂₃H₂₆N₂O₄: 417,1790; obtido: 417,1791.

Nesse caso foi utilizado o volume total da reação para a determinação do rendimento.



metil 3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6a)

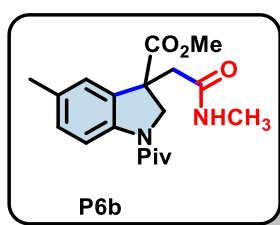
Sólido amarelo pálido; rendimento: 22,5 mg (68 %); **pf**: 138 – 140°C; **R_f** = 0,16 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,25 – 8,23 (m, 1 H); 7,29 – 7,22 (m, 1 H); 7,05 – 7,02 (m, 1 H); 5,55 – 5,54 (m, 1 H); 5,10 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,28 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,71 (s, 3H); 3,27 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 2,82 (d, *J* = 4,8 Hz, 3 H); 2,57 (d, *J* = 15,6 Hz, 1 H); 1,40 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,8, 172,7, 170,3, 144,2, 131,3 129,4, 123,9, 122,9, 119,0 57,7, 53,1, 52,9, 43,6, 40,3, 27,5, 26,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 332 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₄N₂O₄: 355,1634; obtido: 355,1631.



metil 3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6b)

Sólido branco; rendimento: 22,5 mg (65 %); **pf**: 119 – 122°C; **R_f** = 0,16 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,06 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,02 (s, 1 H); 5,65 – 5,64 (m, 1 H); 5,08 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,25 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,71 (s, 3H); 3,27 (d,

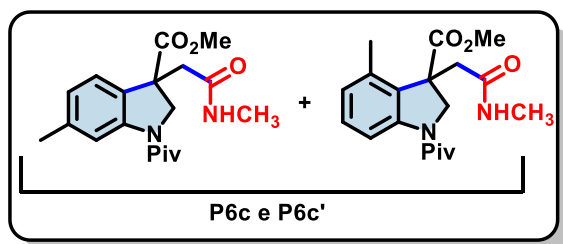


$J = 15,7$ Hz, 1 H); 2,82 (d, $J = 4,8$ Hz, 3 H); 2,48 (d, $J = 15,6$ Hz, 1 H); 2,29 (s, 3H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 176,5, 172,7, 171,9, 141,9, 133,7, 131,1, 130,0, 123,3, 118,7, 57,7, 52,9, 52,9, 43,0, 40,2, 27,5, 21,0$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 346 (M^+ , 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$: 369,1790; obtido: 369,1783.



metil -3-(2-amino-2-oxoetil)-6-metil-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6c) e metil -3-(2-amino-2-oxoetil)-4-metil-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6c')

Sólido branco; rendimento: 23,9 mg (69 %); **pf:** 69 –71 °C; **R_f** = 0,28 (MeOH/ CHCl_3 , 1:99).

(P6c)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,14 - 8,11$ (m, 1 H)*, 7,10 (d, $J = 7,7$ Hz, 1 H); 6,81 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H); 5,61 – 5,60 (m, 1 H); 5,10 (d, $J = 11,4$ Hz, 1 H); 4,25 (d, $J = 11,3$ Hz, 1 H); 3,72 (s, 3H); 3,26 (d, $J = 15,7$ Hz, 1 H); 2,83 – 2,81 (m, 3H); 2,48 (d, $J = 15,6$ Hz, 1 H); 2,33 (s, 3H); 1,40 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 176,8, 173,5, 170,6, 144,3, 133,8, 129,9, 126,7, 124,7, 116,8, 58,0, 54,0, 52,8, 43,7, 40,3, 27,5, 26,4, 18,4$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 346 (M^+ , 1), 57 (100).

(P11c')

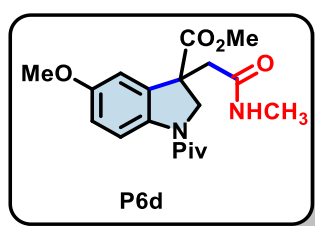
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,13 - 8,12$ (m, 1 H)*, 7,16 (t, $J = 7,9$ Hz, 1 H); 6,85 (d, $J = 7,7$ Hz, 1 H); 5,67 – 5,66 (m, 1 H); 4,78 – 4,73 (m, 2 H); 3,69 (s, 3H); 3,22 (d, $J = 15,3$ Hz, 1 H); 2,81 – 2,81 (m, 3 H); 2,40 (d, $J = 15,3, 1\text{H}$); 2,26 (s, 3H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 176,7, 172,8, 170,3, 144,7, 139,7, 129,0, 128,5, 122,5, 119,6, 58,1, 57,8, 53,7, 52,8, , 40,3, 40,0, 27,6, 21,7$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 346(M^+ , 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$: 369,1790; obtido: 369,1784.

*Sinal sobreposto no espectro.




metil 5-metoxi-3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6d)

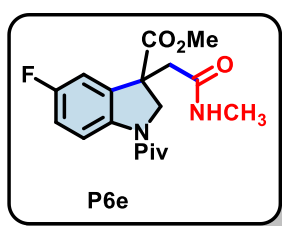
Sólido pálido amarelo; rendimento: 20,5 mg (57 %); **pf**: 92 – 95 °C; **R_f** = 0,10 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,17 – 8,11 (m, 1 H); 6,80 – 6,78 (m, 2 H); 5,60 – 5,59 (m, 1 H); 5,07 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,27 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,77 (s, 3 H); 3,71 (s, 3 H); 3,24 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 2,82 (d, *J* = 4,8 Hz, 3 H); 2,50 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,2, 172,5, 170,2, 156,4, 137,8 132,7, 119,6, 113,7, 109,2 57,7, 55,7, 53,1, 52,9, 43,5, 40,0, 27,6, 26,4ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 362 (M⁺, 4), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₉H₂₆N₂O₅: 385,1739; obtido: 385,1743.


metil 6-fluoro-3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6e)

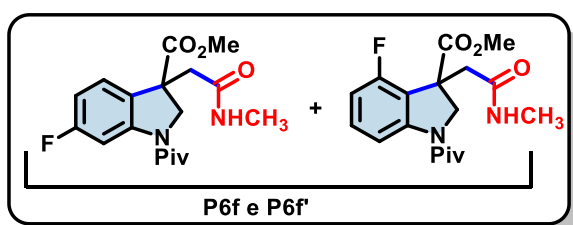
Sólido branco; rendimento: 24,6 mg (70 %); **pf**: 145 – 147 °C; **R_f** = 0,11 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,25 – 8,15 (m, 1 H); 6,99 – 6,90 (m, 2 H); 5,75 – 5,74 (m, 1 H); 5,10 (d, *J* = 11,4 Hz, 1 H); 4,28 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,73 (s, 3H); 3,22 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 2,82 (d, *J* = 4,8 Hz, 3 H); 2,52 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,6, 172,2, 169,9, 159,2 (d, *J_{C,F}* = 243,4 Hz), 140,2 (d, *J_{C,F}* = 2,1 Hz), 133,0 (d, *J_{C,F}* = 8,0 Hz), 119,9 (d, *J_{C,F}* = 7,9 Hz), 115,8 (d, *J_{C,F}* = 22,5 Hz), 110,3 (d, *J_{C,F}* = 24,7 Hz), 57,9, 53,0, 53,0, 43,4, 40,1, 27,5, 26,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 350 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₃FN₂O₄: 373,1540; obtido: 373,1539.


metil -6-fluoro-3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6f) metil -4-fluoro-3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6f')

Sólido branco; rendimento: 24,8 mg (71 %); **pf**: 62 –64 °C; **R_f** = 0,43 (MeOH/CHCl₃, 1:99).
(P6f)



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,01 – 7,99 (m, 1 H); 7,15 – 7,13 (m, 1 H); 6,73 – 6,69 (m, 1 H)*, 5,77 (sl, 1 H); 5,15 (d, J = 11,3 Hz, 1 H); 4,27 (d, J = 11,3 Hz, 1 H); 3,71 (s, 3 H); 3,26 (d, J = 15,7 Hz, 1 H); 2,81* (d, J = 4,8 Hz, 1 H); 2,51 (d, J = 15,7, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 175,0, 172,5, 170,1, 163,4 (d, $J_{C,F}$ = 242,8 Hz), 145,5 (d, $J_{C,F}$ = 12,8 Hz), 126,7 (d, $J_{C,F}$ = 2,4 Hz), 114,9 (d, $J_{C,F}$ = 3,1 Hz), 111,0 (d, $J_{C,F}$ = 20,0 Hz), 107,0 (d, $J_{C,F}$ = 29,5 Hz), 58,4, 52,9*, 52,4, 40,7 (d, J = 2,5 Hz), 40,3, 27,4, 26,3* ppm.

EM (IE*): m/z (%) = 350 (M⁺, 1), 57 (100).

(P6f)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,05 – 8,03 (m, 1 H); 7,24 – 7,20 (m, 1 H); 6,73 – 6,69 (m, 1 H)*, 5,82 (sl, 1 H); 5,09 (d, J = 11,2 Hz, 1 H); 4,44 (d, J = 11,2 Hz, 1 H); 3,70 (s, 3 H); 3,54 (d, J = 15,6 Hz, 1 H); 2,81* (d, J = 4,8 Hz, 3 H); 2,57 (d, J = 15,7 Hz, 1 H); 1,40 (s, 9 H) ppm.

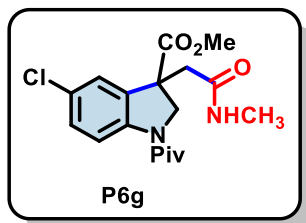
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,8, 172,1, 170,4, 159,1 (d, $J_{C,F}$ = 245,6 Hz), 146,8 (d, $J_{C,F}$ = 6,6 Hz), 131,0 (d, $J_{C,F}$ = 8,4 Hz), 123,6 (d, $J_{C,F}$ = 10,3 Hz), 117,6 (d, $J_{C,F}$ = 17,4 Hz), 110,5 (d, $J_{C,F}$ = 23,3 Hz), 58,7, 52,9*, 52,4 (d, $J_{C,F}$ = 2,2 Hz), 43,7, 40,4, 27,4, 26,3* ppm.

* Sinal sobreposto no espectro

EM (IE*): m/z (%) = 350 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₃FN₂O₄: 351,1720; obtido: 351,1701.

* Sinal sobreposto no espectro



metil 5-cloro-3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6g)

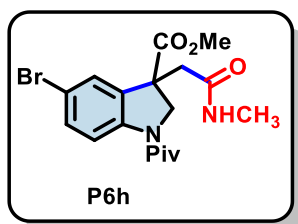
Sólido branco; rendimento: 23,9 mg (65 %); **pf**: 138 – 140 °C; **R_f** = 0,13 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,18 (d, J = 8,7 Hz, 1 H); 7,25 – 7,18 (m, 2 H); 5,58 – 5,59 (m, 1 H); 5,12 (d, J = 11,4 Hz, 1 H); 4,28 (d, J = 11,4 Hz, 1 H); 3,73 (s, 3H); 3,24 (d, J = 15,6 Hz, 1 H); 2,82 (d, J = 4,8 Hz, 3 H); 2,52 (d, J = 15,6 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,8, 172,1, 169,9, 142,9, 133,0, 129,4, 128,7, 123,2, 119,9, 57,9, 53,1, 52,9, 43,5, 40,3, 27,4, 26,4ppm.

EM (IE*): m/z (%) = 366 (M⁺, 2), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₃ClN₂O₄: 367,1425; obtido: 367,1420.



metil 5-bromo-3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3-carboxilato (P6h)

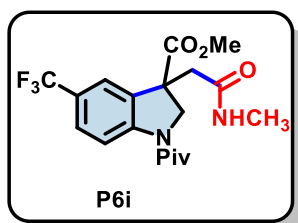
Sólido branco; rendimento: 22,0 mg (53 %); **pf**: 133 – 135 °C; **R_f** = 0,12 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,13 (d, *J* = 8,7 Hz, 1 H); 7,38 – 7,34 (m, 2 H); 5,61 – 5,60 (m, 1 H); 5,11 (d, *J* = 11,4 Hz, 1 H); 4,27 (d, *J* = 11,4 Hz, 1 H); 3,73 (s, 3H); 3,24 (d, *J* = 15,6 Hz, 1 H); 2,82 (d, *J* = 4,8 Hz, 3 H); 2,51 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 176,8, 172,1, 169,9, 143,4, 133,0, 132,3, 126,1, 120,3, 116,1, 57,8, 53,1, 52,9, 43,5, 40,3, 27,4, 26,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 378 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₃BrN₂O₄: 433,0739; obtido: 433,0740.



metil 3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloil-5-(trifluorometil)indolina-3-carboxilato (P6i)

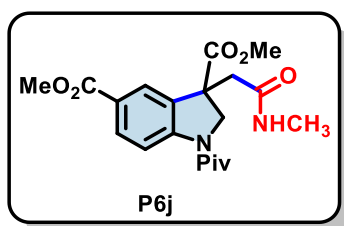
Sólido branco; rendimento: 24,1 mg (60 %); **pf**: 173 – 176 °C; **R_f** = 0,11 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,33 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,53 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 5,65 – 5,64 (m, 1 H); 5,19 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,32 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,74 (s, 3 H); 3,31 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 2,84 – 2,83 (m, 3 H); 2,55 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 1,41 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,1, 172,1, 169,8, 147,1, 131,8, 127,1 (q, *J_{C,F}* = 3,87 Hz), 125,8 (q, *J_{C,F}* = 32,5 Hz), 124,0 (q, *J_{C,F}* = 270 Hz), 120,2 (q, *J_{C,F}* = 3,73 Hz), 118,7, 58,1, 53,2, 52,8, 43,6, 40,5, 27,4, 26,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 400 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₉H₂₃F₃N₂O₄: 401,1688; obtido: 401,1688.



dimetil 3-(2-(metilamino)-2-oxoetil)-1-pivaloilindolina-3,5-dicarboxilato (P6j)



Sólido branco; rendimento: 24,0 mg (61 %); **pf**: 75 – 72 °C; **R_f** = 0,22 (MeOH/CHCl₃, 1:99).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,29 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,98 (d, *J* = 8,6, 1,8 Hz, 1 H); 7,90 (d, *J* = 1,8 Hz, 1 H); 5,61 – 5,60 (m, 1 H); 5,20 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 4,31 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H); 3,89 (s, 3H); 3,72 (s, 3 H); 3,35 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 2,83 (d, *J* = 4,8 Hz, 3 H); 2,54 (d, *J* = 15,7 Hz, 1 H); 1,41 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,3, 172,3, 170,0, 166,5, 148,3, 131,8, 131,5, 125,5, 124,6, 118,2, 58,3, 53,1 52,1, 43,6, 40,5, 27,4, 26,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 390 (M⁺, 1), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₂₀H₂₆F₃N₂O₄: 413,1689; obtido: 413,1687.

8. 27. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA A GERAÇÃO DO RADICAL CARBAMOÍLA EM FLUXO CONTÍNUO SOB IRRADIAÇÃO ULTRASSÔNICA

8. 27. 1. Montagem do reator ultrassônico em fluxo contínuo

As reações sob irradiação de ultrassom foram realizadas em um instrumento Branson Digital Sonifier-450 (EDP N° 100-132-890R; 20 kHz, 400 W, diâmetro da sonda de 12,7 mm). Um reator tubular (400 µL de perfluoro alcoxi alcano de alta pureza de 1,6 mm x 0,8 mm x 0,88 m) foi envolvido em forma de bobina e foi conectado às seringas através de um misturador em Y. A cabine de proteção do equipamento de ultrassom foi utilizada para conter o aparato descrito. Uma bomba de fluxo de seringa (Harvard Apparatus PHD ULTRA) foi utilizada para infundir as soluções no reator fotoquímico. Um regulador de pressão traseira (BPR, 75 psi, 5 atm) foi conectado ao final do reator o efluente reacional foi coletado em um frasco.

A seguir são mostradas as imagens dos componentes do reator ultrassônico.

A **Imagem 15** mostra o reator de perfluoroalcoxi alcano de alta pureza de 400 µL.

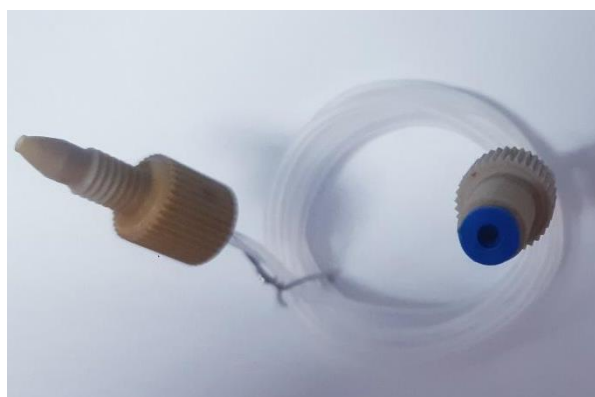


Imagem 15: Reator tubular em forma de bobina

A Imagem 16 **A** mostra a sonda ultrassônica inserida no centro do reator tubular que foi fixado em um béquer de 50 mL preso por uma garra.

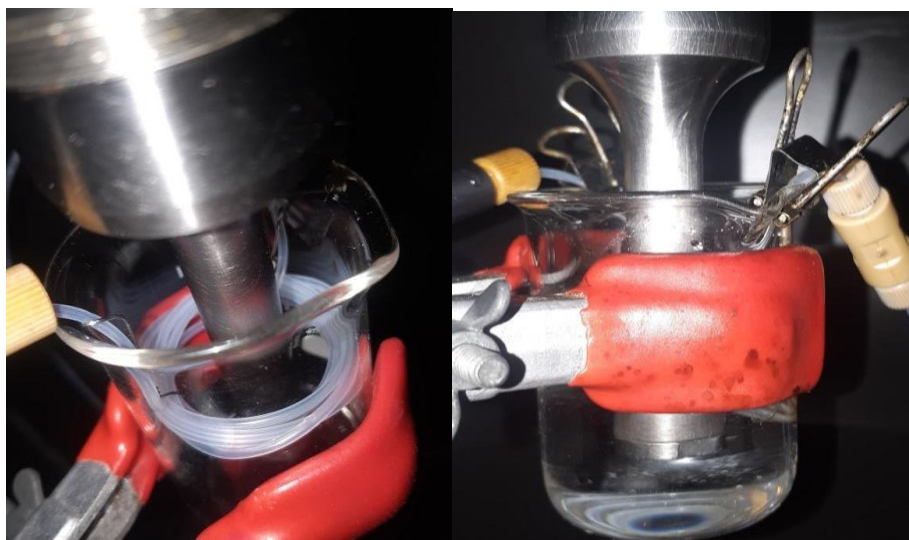


Imagem 16: Sonda ultrassônica centralizada no reator

A **Imagem 16 B** mostra o béquer preenchido com glicerol e o reator tubular fixado com clips, de modo que o reator foi totalmente imerso no banho de glicerol e a sonda ultrassônica centralizada.

Como mostra a **Imagem 17**, as soluções de reagentes foram injetadas através de uma bomba de seringa, conectada a um misturador em Y e a seguir a uma válvula manual que foi conectada a uma tubulação para levar os fluídos ao reator.



Imagem 17: Bomba de seringa (Harvard Apparatus PHD ULTRA)



Imagem 18: Reator ultrassônico em fluxo contínuo montado

8. 27. 2. Procedimento geral para a reação de carbamilação e imidação em fluxo contínuo

As soluções com os materiais de partida foram preparados em balões volumétricos como descrito:

Solução 1: Em um balão volumétrico de 5 mL foi adicionado, o material de partida **C7**, **C8** ou **C9** ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mol %), H_2SO_4 ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$) e o volume foi completado com formamida. Nitrogênio foi borbulhado na solução durante 5 minutos.

Notas:

Para o composto **C7a** a concentração inicial foi de $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ devido à maior solubilidade.

Quando a *N*-metil formamida foi utilizada como solvente, a concentração inicial dos reagentes foi $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ devido a maior solubilidade dos materiais de partida, exceto para o composto **C9b** que foi usado em $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$.



Para o composto **C7d** foi utilizado 10% de ^tBuOH para completa solubilização do material de partida (0,05 mol. L⁻¹).

Para o composto **C7f**, devido à baixa solubilidade, a concentração inicial foi de 0,025 mol. L⁻¹ preparado em um balão volumétrico de 10 mL.

Para o composto **C8a** foi utilizado 10 % de ^tBuOH para a completa solubilização do material de partida (0,1 mol. L⁻¹).

Para o composto **C8b** foi utilizado 10 % de ^tBuOH para a completa solubilização do material de partida (0,05 mol. L⁻¹).

Para o composto **C9a** foi utilizado 10% de ^tBuOH para a completa solubilização do material de partida.

Solução 2: Em um balão volumétrico de 5 mL foi adicionada solução aquosa de H₂O₂ (30% *m/m*), 0,1 mol. L⁻¹), o volume foi completado com formamida. Gás nitrogênio foi borbulhado na solução durante 5 minutos.

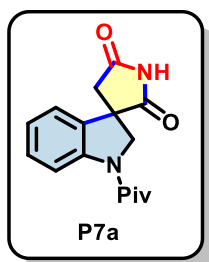
Considerando duas seringas e um volume de reator de 400 μL, o fluxo de injeção foi de 66.7 μL.min⁻¹ para um tempo de residência de 3 minutos. As soluções previamente preparadas foram utilizadas para carregar duas seringas de aço inox de 8 mL e as seringas foram posicionadas na bomba. Para a equilibração do reator ambas soluções foram indusionadas com fluxo de 66.7 μL.min⁻¹ durante 24 minutos, o efluente reacional coletado durante este tempo de estabilização foi descartado. Após o tempo de estabilização uma amostra da efluente reacional foi coletado a cada 3 minutos para análise por CG-EM. Esta coleta foi realizada quatro vezes. Para extração das amostras foi adicionado ao frasco solução aquosa saturada de NaHCO₃ (0,4 mL) e CHCl₃ (0,8 mL) a fase orgânica foi removida. A fase aquosa foi extraída com CHCl₃ (0,8 mL) no mesmo frasco. As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO₄ filtradas e analisados por CCD e CG-EM. A infusão dos reagentes foi mantida por mais 40 minutos e o efluente reacional que deixava o reator era coletada em um frasco de vidro contendo NaHCO₃ (0,175 mmol).

8. 27. 3. Procedimento geral para a purificação dos compostos P7, P8, P9 e P10

Um volume de 3,5 mL da mistura reacional foi transferido com pipeta volumétrica para um balão de fundo redondo. A formamida foi então destilada sob pressão reduzida, o material bruto remanescente foi suspenso em MeOH (5 mL), e então adicionada sílica gel para cromatografia em coluna flash (800 mg) para formar uma pasta homogênea, a seguir o solvente foi removido sob pressão reduzida. e a sílica impreganada com o produto bruto foi utilizada para carregar uma coluna cromatográfica preenchida com sílica gel, a qual foi eluída com MeOH/CHCl₃ (5:95). Para o composto **P7f** um efluente de 9 mL foi transferido para um balão



volumétrico e a formamida foi destilada. Para os compostos **P8a-d** uma mistura de AcOEt/Hexano foi utilizada como eluente.



1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P7a)

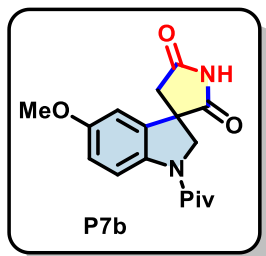
Sólido branco; rendimento: 54,8 mg (85 %); **pf**: 176 – 179 °C; **R_f** = 0,15 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,49 (sl, 1H); 8,28 – 8,26 (m, 1H); 7,35 – 7,30 (m, 1 H); 7,10 – 7,09 (m, 2 H); 4,75 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 4,26 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 3,06 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 3,01 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 1,39 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,9, 176,2, 174,1, 144,3, 131,3, 129,9, 124,7, 121,3, 119,1, 58,3, 53,7, 44,3, 40,2, 27,6 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 286 (M⁺, 6), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₆H₁₈N₂NaO₃: 309,1215; obtido: 309,1212.



5-metoxi-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P7b)

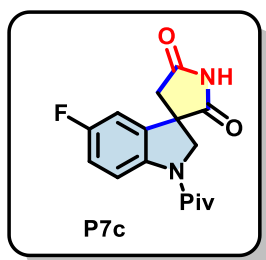
Sólido laranja claro; rendimento: 21,7 mg (78 %); **pf**: 198 – 200 °C; **R_f** = 0,19 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 11,49 (sl, 1 H); 8,08 (d, *J* = 8,9 Hz, 1 H); 6,92 (d, *J* = 2,3 Hz, 1 H); 6,88 (dd, *J* = 8,9 Hz, 2,5 Hz, 1 H); 4,73 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 4,33 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 3,78 (s, 3 H); 3,10 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 3,05 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 1,33 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 180,2, 177,0, 175,0, 156,6, 138,7, 134,5, 119,1, 114,2, 108,4, 58,8, 56,0, 53,5, 43,1, 39,9, 27,8 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 326 (M⁺, 27), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₇H₂₀N₂NaO₄: 339,1321; obtido: 339,1319.



5-fluoro-1-pivaloilspiro[indoline-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P7c)

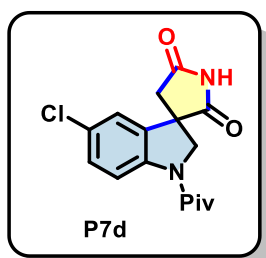
Sólido branco; rendimento: 18,0 mg (68 %); **pf**: 212 – 215 °C; **R_f** = 0,19 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 11,46 (sl, 1 H); 8,10 (dd, *J* = 9,0 Hz, *J_{H,F}* = 5,0 Hz, 1 H); 7,26 (dd, *J* = 8,4 Hz, *J_{H,F}* = 2,7 Hz, 1 H); 7,09 (td, *J* = 9,0 Hz, *J_{H,F}* = 2,7 Hz, 1 H); 4,71 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 4,32 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 3,02 (s, 2 H); 1,27 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 179,9, 176,8, 175,5, 159,1 (d, *J_{C,F}* = 241 Hz), 141,6 (d, *J_{C,F}* = 2 Hz), 135,1 (d, *J_{CF}* = 8 Hz), 119,2 (d, *J_{CF}* = 8 Hz), 115,4 (d, *J_{CF}* = 23 Hz), 110,6 (*J_{CF}* = 25 Hz), 59,1, 53,3, 42,9, 40,0, 27,7 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 304 (M⁺, 9), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₆H₁₇FN₂NaO₃: 327,1121; obtido: 327,1135.



5-cloro-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P7d)

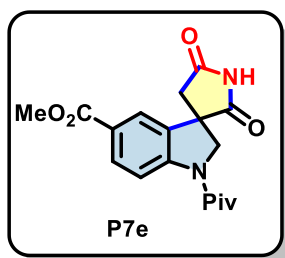
Sólido branco; rendimento: 15,6 mg (43 %); **R_f** = 0,22 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 11,53 (sl, 1 H); 8,15 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H); 7,49 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H); 7,37 (dd, *J* = 8,6 Hz, 2,1 Hz, 1 H); 4,77 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 4,38 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 3,02 (s, 2 H); 1,33 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 179,8, 176,8, 175,9, 144,2, 135,3, 128,9, 127,9, 123,3, 119,4, 59,0, 53,2, 40,0, 42,9, 27,8 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 320 (M⁺, 7), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₆H₁₇ClN₂NaO₃: 343,0825; obtido: 343,0816.



metil 2',5'-dioxo-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-5-carboxilato (P7e)

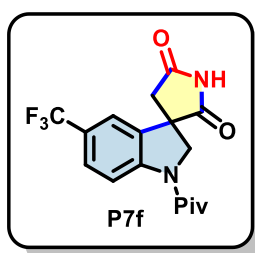
Sólido branco; rendimento: 17,0 mg (46 %); **pf**: 250 – 252 °C; **R_f** = 0,19 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 11,60 (sl, 1 H); 8,26 (d, *J* = 8,7 Hz, 1 H); 7,97 (dd, *J* = 8,7, 1,4 Hz, 1 H); 7,82 (d, *J* = 1,3 Hz, 1 H); 4,81 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 4,45 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 3,88 (s, 3 H); 3,17 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 3,08 (d, *J* = 18 Hz, 2 H); 1,36 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 180,0, 177,0, 176,5, 166,0, 149,0, 133,8, 131,3, 125,4, 123,7, 117,8, 58,9, 53,1, 52,5, 43,3, 40,4, 27,6 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 358 (M⁺, 8), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₈H₂₀N₂NaO₅: 367,1270; obtido: 367,1261.



1-pivaloil-5-(trifluorometil)spiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P7f)

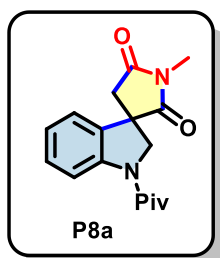
Sólido branco; rendimento: 14,3 mg (36 %); **R_f** = 0,19 (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,64 (sl, 1 H); 8,38 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,60 (d, *J* = 8,6, 1 H); 7,32 (s, 1 H); 4,81 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 4,31 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 3,10 (d, *J* = 19 Hz, 1 H); 3,04 (d, *J* = 19 Hz, 1 H); 1,40 (s, 9 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 177,2, 176,6, 173,5, 147,3, 131,8, 127,6 (q, *J*_{C,F} = 4 Hz), 126,7 (q, *J*_{C,F} = 33 Hz), 123,8 (q, *J*_{C,F} = 272 Hz), 119,0, 118,7 (q, *J*_{C,F} = 3 Hz), 58,7, 53,4, 44,1, 40,4, 27,5 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 354 (M⁺, 5), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₇H₁₇N₂NaO₃: 377,1089; obtido: 377,1099.



1'-metil-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P8a)

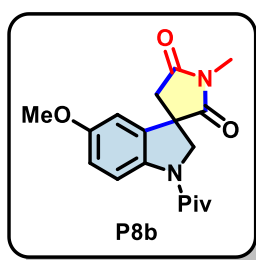
Sólido amarelo pálido; rendimento: 48,0 mg (71 %); $R_f = 0,23$ (AcOEt/Hexano, 3:2).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,27$ (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,31 (td, $J = 7,6$ Hz, 1,3 Hz, 1 H); 7,07 (td, $J = 7,5$, 1,0 Hz, 1 H); 6,98 (dd, 7,6 Hz, 1,0 Hz, 1 H); 4,72 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 4,24 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 3,12 (s, 3 H); 3,04 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 2,97 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 1,40 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 178,2$, 176,1, 174,5, 144,4, 131,7, 129,8, 124,6, 121,3, 119,0, 58,5, 52,4, 43,4, 40,2, 27,6, 25,5 ppm.

EM (IE $^+$): m/z (%) = 300 (M^{+} , 7), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_3$: 323,1372; obtido: 323,1368.



5-metoxi-1'-metil-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P8b)

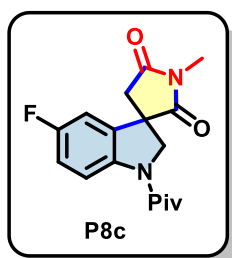
Sólido laranja claro; rendimento: 25,2 mg (43 %); $R_f = 0,40$ (AcOEt/Hexano, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,20$ (d, $J = 9,0$ Hz, 1 H); 6,83 (dd, $J = 9,0$ Hz, 2,5 Hz, 1 H); 6,50 (td, $J = 2,5$ Hz, 1 H); 4,70 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 4,22 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 3,76 (s, 3 H); 3,11 (s, 3 H); 3,03 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 2,95 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 1,37 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 178,0$, 175,5, 174,4, 156,9, 138,0, 132,9, 119,8, 114,1, 107,6, 58,7, 55,8, 52,5, 43,2, 40,0, 27,7, 25,6 ppm.

EM (IE $^+$): m/z (%) = 330 (M^{+} , 28), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_4$: 353,1477; obtido: 353,1471.





5-fluoro-1'-metil-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P8c)

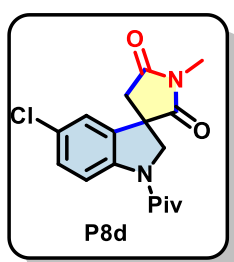
Sólido amarelo pálido; rendimento: 25,4 mg (46 %); $R_f = 0,35$ (AcOEt/Hexano, 55:45).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,25$ (dd, $J = 9,0$ Hz, $J_{H,F} = 4,8$ Hz, 1 H); 7,01 (td, $J = 8,9$ Hz, $J_{H,F}$ 2,6 Hz, 1 H); 6,69 (dd, $J = 7,6$ Hz, $J_{H,F} = 2,6$ Hz, 1 H); 4,73 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 4,25 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 3,12 (s, 3 H); 3,02 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 2,97 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 1,38 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 177,6$, 175,9, 174,0, 159,5 (d, $J_{C,F} = 244$ Hz), 140,6 (d, $J_{C,F} = 3$ Hz), 133,1 (d, $J_{C,F} = 8$ Hz), 120,2 (d, $J_{C,F} = 8$ Hz), 116,3 (d, $J_{C,F} = 22$ Hz), 108,7, (d, $J_{C,F} = 24$ Hz), 58,9, 52,3, 52,5, 43,1, 40,1, 27,6, 25,7 ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 318 (M^+ , 6), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{NaO}_3$: 341,1277; obtido: 341,1281.



5-cloro-1'-metil-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pirrolidina]-2',5'-diona (P8d):

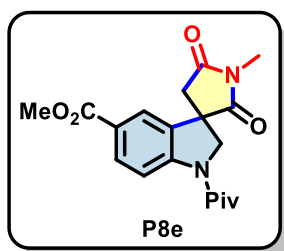
Sólido amarelo pálido; rendimento: 33,1 mg (56 %); $R_f = 0,40$ (AcOEt/Hexane, 55:45).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,23 - 8,21$ (m, 1 H); 7,28 - 7,27 (m, 1 H); 6,94 (s, 1 H); 4,73 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 4,25 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 3,12 (s, 3 H); 3,02 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 2,97 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 1,38 (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 177,6$, 175,9, 174,0, 159,5 (d, $J_{C,F} = 244$ Hz), 140,6 (d, $J_{C,F} = 3$ Hz), 133,1 (d, $J_{C,F} = 8$ Hz), 120,2 (d, $J_{C,F} = 8$ Hz), 116,3 (d, $J_{C,F} = 22$ Hz), 108,7, (d, $J_{C,F} = 24$ Hz), 58,9, 52,3, 52,5, 43,1, 40,1, 27,6, 25,7 ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 318 (M^+ , 6), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{NaO}_3$: 341,1277; obtido: 341,1281.



metil 1'-metil-2',5'-dioxo-1-pivaloilspiro[indolina-3,3'-pyrrolidina]-5-carboxylato (P8e)

Sólido amarelo pálido; rendimento: 23,4 mg (37 %); $R_f = 0,27$ (AcOEt/Hexane, 55:45).

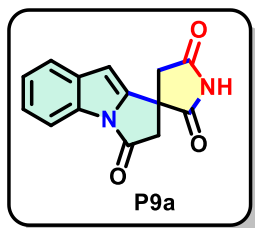


RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,32$ (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H); $8,02$ (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H); $7,66$ (s, 1 H); $4,78$ (d, $J = 11$ Hz, 1 H); $4,28$ (d, $J = 11$ Hz, 1 H); $3,88$ (s, 3 H); $3,13$ (s, 3H); $3,08$ (d, $J = 18$ Hz, 1 H); $2,98$ (d, $J = 18$ Hz, 1 H); $1,39$ (s, 9 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 177,8$, $176,6$, $174,1$, $166,1$, $148,3$, $132,1$, $131,9$, $126,2$, $123,0$, $118,3$, $59,1$, $52,2$, $52,9$, $43,4$, $27,5$, $25,7$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 358 (M^+ , 9), 57 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_5$: $381,1426$; obtido: $381,1457$.



espiro[pirrolidina-3,1'-pirrolo[1,2-a]indol]-2,3',5(2'H)-triona (P9a)

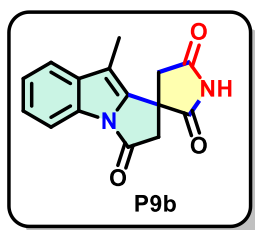
Sólido amarelo pálido; rendimento: $22,2$ mg (50 %); $R_f = 0,20$ (AcOEt/Hexane, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 11,72$ (sl, 1 H); $7,99$ (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H); $7,67$ (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H); $7,42 - 7,35$ (m, 2 H); $6,74$ (s, 1 H); $3,49$ (s, 2 H); $3,32 - 3,24$ (m, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 179,6$, $176,9$, $169,9$, $145,6$, $134,9$, $130,1$, $124,7$, $124,5$, $122,0$, $113,4$, $100,2$, $46,5$, $45,9$, $42,9$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 253 (M^+ , 55), 183 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$: $255,0770$; obtido: $255,0766$.



9'-metilespiro[pirrolidina-3,1'-pirrolo[1,2-a]indol]-2,3',5(2'H)-triona (P9b)

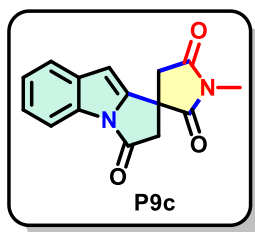
Sólido branco; rendimento: $14,6$ mg (62 %); **pf:** $224 - 226$ °C; $R_f = 0,42$ (AcOEt/Hexano, 1:1).

RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 11,84$ (sl, 1H); $7,98 - 7,96$ (m, 1 H); $7,66 - 7,64$ (m, 1 H); $7,44 - 7,38$ (m, 2 H); $3,53 - 3,43$ (m, 2 H); $3,36$ (d, $J = 18$ Hz, 1 H); $3,27$ (d, $J = 18$ Hz, 1 H); $2,18$ (s, 3 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 179,3$, $177,1$, $169,4$, $139,8$, $135,7$, $129,6$, $124,7$, $124,5$, $120,0$, $113,3$, $108,7$, $46,3$, $45,9$, $42,2$, $8,0$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 268 (M^+ , 100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_3$: $291,0746$; obtido: $291,0751$.

**1-metilspiro[pirrolidina-3,1'-pirrolo[1,2-a]indol]-2,3',5(2'H)-triona (P9c)**

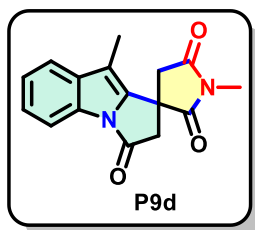
Sólido bege; rendimento: 14,3 mg (30 %); $R_f = 0,25$ (AcOEt/Hexano, 45:55).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,08$ (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H); 7,52 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H); 7,38 – 7,37 (m, 1 H); 7,32 – 7,29 (m, 1 H); 6,35 (s, 1 H); 3,69 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 3,30 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 3,13 – 3,10 (m, 5 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 175,9$, 173,0, 166,6, 142,4, 133,5, 129,5, 123,8, 123,7, 120,4, 113,0, 99,1, 44,8, 43,6, 41,9, 24,8 ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 268 (M^+ , 75), 183 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$: 269,0924; obtido: 269,0926.

**1,9'-dimetilspiro[pirrolidina-3,1'-pirrolo[1,2-a]indol]-2,3',5(2'H)-triona (P9d)**

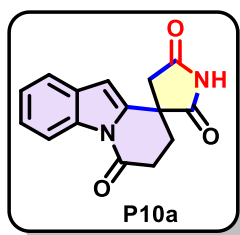
Sólido branco; rendimento: 38,5 mg (78 %); $R_f = 0,25$ (AcOEt/Hexano, 45:55).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,04$ (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H); 7,46 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H); 7,38 – 7,32 (m, 2 H); 3,70 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 3,32 (d, $J = 18$ Hz, 1 H); 3,15 (s, 5 H); 3,11 (d, $J = 7$ Hz, 1 H); 3,07 (d, $J = 7$ Hz, 1 H); 2,09 (s, 3 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 177,0$, 174,2, 167,2, 137,9, 135,6, 130,1, 124,9, 124,4, 119,3, 113,9, 109,9, 46,5, 44,5, 42,4, 25,7, 8,0 ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 282 (M^+ , 100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{NaO}_3$: 305,0902; obtido: 305,0902.



7,8-dihidro-6H-espíro[pirido[1,2-a]indol-9,3'-pirrolidina]-2',5',6-triona (P10a)

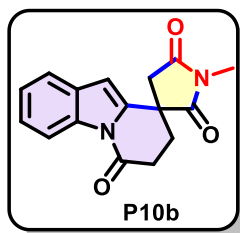
Sólido branco; rendimento: 8,3 mg (35%); **pf**: 256 – 258 °C; **R_f** = 0,35 (AcOEt/Hexano, 1:1).

RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 11,63 (sl, 1 H); 8,41 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H); 7,63 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H); 7,39 (t, *J* = 8,2 Hz, 1 H); 7,34 (t, *J* = 7,3 Hz, 1 H); 6,77 (s, 1 H); 3,31 – 3,28 (m, 1 H); 3,15 – 3,07 (m, 2 H); 2,94 – 2,89 (m, 1 H); 2,53 – 2,48 (m, 1 H); 2,41 – 2,36 (m, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 179,8, 176,7, 169,0, 139,1, 135,0, 129,2, 125,1, 124,5, 121,1, 116,2, 105,2, 45,4, 43,3, 30,8, 30,1 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 268 (M⁺, 100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + Na]⁺ calcd para C₁₅H₁₂N₂NaO₃: 291,0746; obtido: 291,0741.



1'-metil-7,8-dihidro-6H-espíro[pirido[1,2-a]indol-9,3'-pirrolidina]-2',5',6-triona (P10b)

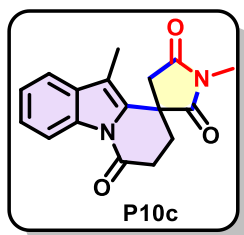
Sólido branco; rendimento: 5,4 mg (22%); **R_f** = 0,29 (AcOEt/Hexano, 45:55).

RMN ¹H (500 MHz, (CDCl₃): δ = 8,50 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H); 7,49 (d, *J* = 7,7 Hz, 1 H); 7,36 (t, *J* = 7,6 Hz, 1 H); 7,30 – 7,26 (m, 1 H); 6,38 (s, 1 H); 3,46 – 3,40 (m, 1 H); 3,22 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 3,08 (s, 3 H); 2,95 (d, *J* = 18 Hz, 1 H); 2,88 – 2,83 (m, 1 H); 2,51 – 2,46 (m, 1 H); 2,32 – 2,26 (m, 1 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 176,3, 173,2, 166,6, 136,0, 134,4, 127,5, 124,6, 123,4, 119,5, 115,7, 104,5, 42,8, 41,7, 30,0, 29,6, 24,4 ppm.

EM (IE⁺): *m/z* (%) = 282 (M⁺, 88), 227 (100).

EMAR (ESI-TDV): *m/z* [M + H]⁺ calcd para C₁₆H₁₅N₂O₃: 283,1083; obtido: 283,1079.



1',10-dimetil-7,8-dihidro-6H-espiro[pirido[1,2-a]indol-9,3'-pirrolidina]-2',5',6-triona (P10c)

Sólido creme; rendimento: 12,9 mg (50%); $R_f = 0,29$ (AcOEt/Hexano, 45:55).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,47$ (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H); 7,46 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H); 7,37 (td, $J = 8,3$ Hz, 1,2 Hz, 1 H); 7,31 (td, $J = 7,6$ Hz, 1,0 Hz, 1 H); 3,17 (s, 3 H); 3,09 – 3,03 (m, 1 H); 3,02 (s, 2 H); 2,84 – 2,77 (m, 1 H); 2,67 – 2,61 (m, 1 H); 2,11 – 2,06 (m, 1 H); 2,03 (s, 3 H) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): $\delta = 178,1, 174,4, 167,0, 134,3, 131,6, 130,5, 125,8, 124,2, 118,4, 116,7, 114,1, 44,2, 42,1, 31,8, 30,4, 25,5, 8,8$ ppm.

EM (IE^+): m/z (%) = 296 (M^{+} , 13), 241 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: 297,1239; obtido: 297,1236.

8. 28. PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO DO TBADT

A um frasco erlenmeyer sob agitação magnética contendo água deionizada (150 mL) foi adicionado o brometo de tetrabutilamônio (2,4 g, 1,56 mmol) a seguir aquecido até 90 °C em vigorosa agitação. A outro frasco erlenmeyer contendo água deionizada (150 mL) foi adicionado o tungstato de sódio dihidratado (5,0 g, 1,52 mmol) e o aquecido até 90 °C. O pH de ambas soluções foi ajustado com HCl (37 %) até 2 (a solução de decatungstato torna-se levemente verde). Os conteúdos dos frascos foram reunidos e mantidos sob agitação a 90 °C durante 30 minutos. Uma suspensão branca de TBADT foi formada, a seguir resfriada a t.a. e filtrada em funil de Buchner. O sólido foi lavado com água e secado em forno a 120 °C por 3 horas. A seguir foi resfriado a temperatura ambiente (mantido em dessecador) o sólido foi suspenso em diclorometano (20 mL para cada 1 g de TBADT) e mantido em agitação por 2 horas. O TBADT foi separado da solução sobrenadante por filtração em um funil de Buchner.

Rendimento: 80 % (4,05 g, 1,22 mmol)

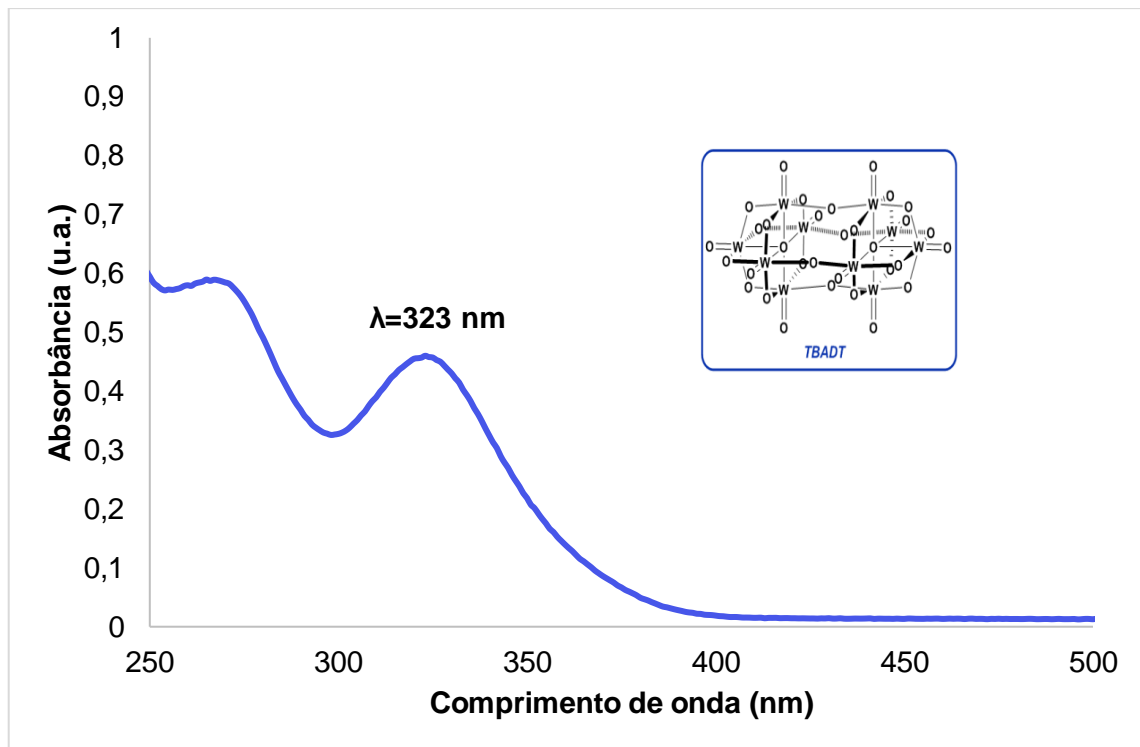
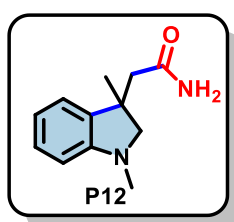


Gráfico 5: Espectro de absorção em acetonitrila (UV-VIS) do TBADT preparado, concentração nm.L^{-1}



8. 29. PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO COM TBADT E FORMAMIDA

A um tubo de vidro com tampa de rosquear foi adicionado o substrato **C1-C4** (0,1 mmol, 1,0 equiv.), a seguir o TBADT (0,004 mmol, 4 mol %), a formamida (2,0 mmol, 25 equiv.) e a ACN (grau HPLC, (2 mL). Ao tubo reacional foi borbulhado N₂ novamente por 5 minutos. O tubo foi mantido fechado em agitação a uma distância de 4 cm da fonte de luz (LED) durante 72 horas. A seguir a ACN foi totalmente removida sob pressão reduzida, e adicionou-se MeOH (2 mL), e (400 mg) de sílica para cromatografia flash, o solvente foi removido sob pressão reduzida. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna flash de sílica gel utilizando-se MeOH em clorofórmio como eluente.



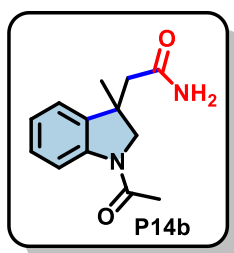
2-(1,3-dimetilindolin-3-il)acetamida (P12)

Sólido amorfo; $R_f = 0,28$ (MeOH/CHCl₃, 5:95).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,12$ (td, $J = 7,7$ Hz, 1,3 Hz, 1 H); 7,03 (dd, $J = 7,3$ Hz, 0,9 Hz, 1 H); 6,71 (td, $J = 7,4$ Hz, 0,9 Hz, 1 H); 7,51 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H); 5,42 (sl, 1 H); 5,34 (bl, 1 H); 3,49 (d, $J = 9,0$ Hz, 1 H); 3,10 (d, $J = 9,1$ Hz, 1 H); 2,76 (s, 3 H); 2,52 (d, $J = 14$ Hz, 1 H); 2,46 (d, $J = 14$ Hz, 1 H); 1,45 (s, 3 H) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 173,3, 152,2, 136,5, 128,3, 122,0, 117,9, 107,6, 67,8, 45,9, 42,6, 35,7, 25,0$ ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 204 (M⁺, 15), 145 (100).



2-(1-acetil-3-metilindolin-3-il)acetamida (P14b)

Sólido branco; rendimento: 16,9 mg (73 %); **pf:** 93 – 95 °C; $R_f = 0,14$ (MeOH/CHCl₃, 5:95)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,18$ (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 7,25 – 7,23 (m, 1 H); 7,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 7,30 – 7,26 (m, 2 H); 7,13 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 7,05 (t, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 5,45 (sl, 1 H); 5,33 (sl, 1 H); 4,37 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 3,84 (d, $J = 11$ Hz, 1 H); 2,55 – 2,49 (m, 2 H); 2,23 (s, 3 H); 1,48 (s, 3H) ppm.



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 172,4, 168,4, 156,5, 139,9, 135,7, 118,0, 112,3, 108,6, 60,9, 55,7, 46,2, 42,5, 26,2, 24,0 ppm.

EM (IE⁺): m/z (%) = 232 (M⁺, 10), 131 (100).

EMAR (ESI-TDV): m/z [M + Na]⁺ calcd para C₁₃H₁₆N₂NaO₂: 255,1109; obtido: 255,1099.

Todos os produtos (**P**) apresentados anteriormente revelam em solução reveladora de vanilina como uma mancha amarela. Exceto as espiroimidaz metiladas. Os compostos **P** contendo o núcleo indólico *N*-fusionado revelam como mancha rosada em vanilina.

8. 30. DADOS DA AMOSTRA DE ALGA UTILIZADA

<p>INSTITUTO DE PESQUISAS AMBIENTAIS SP 514108</p> <p>Reino: Plantae Filo: Rhodophyta Classe: Florideophyceae Ordem: Ceramiales Família: Rhodomelaceae <i>Laurencia dendroidea</i> J.Agardh Det.: M. T. Fujii Data: 12/11/2015 Local: Brasil, Espírito Santo, Serra, Enseada das Garças GPS: 20° 01' 47" N 40° 09' 26" W Col.: M.T.Fujii & D.Barata Data: 26/07/2014</p>
--

8. 31. TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM FENOL VERMELHO (ABS 590 NM)¹⁸⁴

8. 31. 1. Branco

Em um microtubo de 2,0 mL adicionou-se 882 μ L do tampão utilizado no teste, 100 μ L de solução aquosa de KBr (100 mmol. L⁻¹), 17,7 μ L de solução aquosa de fenol vermelho (1 mg.mL⁻¹) e por fim último 0,5 μ L da solução aquosa de peróxido de hidrogênio (30 % *m/m*). Após a homogeneização dos reagentes a mistura foi analisada imediatamente, em um espectrofotômetro (Biospectro SP220), comprimento de onda de 590 nm, com cubeta de poliestireno de caminho ótico de 1 cm.

8. 31. 2. Sem vanádio



Em um microtubo de 2,0 mL adicionou 882 μL do extrato bruto, 100 μL de solução aquosa de KBr (100 mmol. L^{-1}), 17,7 μL de solução aquosa de fenol vermelho (1 mg.mL^{-1}) e por fim último 0,5 μL da solução aquosa de peróxido de hidrogênio (30 % m/m). A mistura reacional ficou sob agitação em Thermomixer, Eppendorf, à 600 rpm, 25°C por 30 minutos. A atividade enzimática foi observada qualitativamente, pela mudança visual da coloração da mistura reacional de amarelado para azul, e/ou quantitativamente, adicionando a mistura a uma cubeta de poliestireno de caminho óptico de 1 cm, e analisando-a em espectrofotômetro (Biospectro SP220), em um comprimento de onda de 590 nm.

8. 31. 3. Com vanádio ¹⁹¹

Em um microtubo de 2,0 mL adicionou 882 μL do extrato bruto, 100 μL de solução aquosa de KBr (100 mmol. L^{-1}), 17,7 μL de solução aquosa de fenol vermelho (1 mg.mL^{-1}), 0,5 μL da solução aquosa de peróxido de hidrogênio (30 % m/m) e 10 μL de solução aquosa de ortovanadato de sódio (50 mmol. L^{-1}). Deixou-se a mistura reacional sob agitação em Thermomixer, Eppendorf, à 600 rpm, 25 °C por 30 minutos. A atividade enzimática foi observada qualitativamente, pela mudança visual da coloração da mistura reacional de amarelado para azul, e/ou quantitativamente, adicionando a mistura a uma cubeta de poliestireno de caminho óptico de 1 cm, e analisando-a em espectrofotômetro (Biospectro SP220), em um comprimento de onda de 590 nm.

8. 32. PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E SEMI-PURIFICAÇÃO DA V-BrPO

Uma amostra de 750 g de alga foi triturada em liquidificador com 750 mL de tampão Tris- H_2SO_4 (50 mM, pH 7,0) por 5 minutos. A seguir a mistura bruta foi transferida para um frasco Erlenmeyer e mantida em agitação durante 1 hora. O extrato protéico foi transferido para tubos de centrifugação de 50 mL e a amostra centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 12000 rpm. Retirou-se o sobrenadante (extrato 1) de cada tubo armazenando-os em frasco tipo Schott. O pellet formado em cada tubo foi ressuspensionado com tampão Tris (10 mL, por tubo) e reunido para realização da segunda extração. A mistura de material ressuspensionado foi novamente liquidificada durante 5 minutos e deixada em agitação magnética por 1 hora. A seguir, o processo de centrifugação foi repetido e o sobrenadante removido (extrato 2), mais uma vez os pellets recuperados e novamente liquidificados durante 5 minutos foram extraídos por 1 hora e centrifugados (extrato 3).

A seguir, cada solução de extrato foi transferida para microtubos de 2 mL e novamente centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi removido e transferido para frasco tipo Schott e armazenado a 4°C. Os pellets formados em cada microtubo não foram recuperados nessa etapa.



Na sequência, cada extrato foi concentrado individualmente. Volumes de 12 mL do extrato foram transferidos para tubos contendo a membrana de ultrafiltração Amicon 15 (10 kDa) e centrifugados durante 15 minutos a 10000 rpm. O volume remanescente no filtro (1,0 – 0,5 mL) foi transferido para tubos tipo Falcon de 50 mL estéril. Após a transferência a membrana era lavada com 500 µL de tampão e a solução armazenada em tubo falcon. Após um ciclo de ultrafiltração as membranas eram centrifugadas com tampão durante 10 minutos. A solução filtrada não era descartada antes de se realizar teste qualitativo de atividade enzimática com fenol vermelho. As amostras concentradas foram aplicadas com amostrador de 50 mL na coluna Hiprep DEAE FF 16/10 no FPLC. Cada extrato bruto obtido foi aplicado individualmente. Um método previamente definido para esta etapa foi empregado, para cada 50 mL de extrato centrifugado injetado coletasse 56 frações de 4 mL num gradiente de salinidade de 0% a 100% de NaCl em tampão Tris-H₂SO₄ (50 mmol. L⁻¹, pH 7,0).

Um PAGE gel foi corrido para as frações recuperadas da coluna. Também realizou-se o teste de atividade qualitativo para cada fração. Cada fração coletada foi separadamente concentrada na membrana de ultrafiltração Amicon 15 (10 kDa) por durante 10 minutos a 10000 rpm. O concentrado obtido foi transferido para tubo tipo Falcon (15 mL), dessa vez as frações pertencentes a cada extrato foram reunidas (frações do mesmo extrato semi-purificado). Cada volume contendo o extrato purificado foi concentrado na membrana de ultrafiltração Amicon 15 (10 kDa). A seguir o tampão descartado Tris-H₂SO₄ (após teste qualitativo de atividade) e adicionado tampão citrato (50 mmol. L⁻¹, pH 6,3) para troca de tampão da amostra e o tubo novamente centrifugado por durante 10 minutos a 10000 rpm. As amostra obtidas foram alvo de determinação protéica pelo método de Bradford.

8. 33. PROCEDIMENTO PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Preparo das soluções:

Quadro 1: Tampão Tris-HCl 1 mol. L⁻¹, pH 8,8

	Concentração final	Quantidade
Tris Base (Sigma)	1 mol/L	24,2 g
HCl	Ajustar pH 8.8	~ 3,0 mL
Água ultra pura		Ajustar para 200 mL

Quadro 2: Tampão Tris-HCl 1 mol. L⁻¹, pH 6,8

	Concentração final	Quantidade
Tris Base (Sigma)	1 mol/L	24,2 g
HCl	Ajustar pH 6.8	~ 6,0 mL



Água ultra pura		Ajustar para 200 mL
-----------------	--	---------------------

Quadro 3: Solução de azul de bromofenol 1%*

	Concentração final	Quantidade
Azul de bromofenol (Sigma)	1 %	50 mg
Água ultra pura		Ajustar para 5 mL

*filtrar a solução

Quadro 4: Solução de Persulfato de Amônio 10% (PSA) *

	Concentração final	Quantidade
Persulfato de Amônio (Sigma)	10 %	40 mg
Água ultra pura		Ajustar para 400 µL

*Aliquotar em microtubos e manter a -20° C

Quadro 5: Tampão da amostra*

	Concentração final	Quantidade
Solução Tris-HCl 1 mol/L pH 6.8	0,18 M	0,9 mL
Glicerina	30 %	1,5 mL
Solução Azul de Bromofenol 1%	0,1 %	0,5 mL (solução 1%)
Água ultra pura		Ajustar para 5 mL

*Aliquotar em microtubos e manter a -20° C

Quadro 6: Solução de acrilamida*

	Concentração final	Quantidade
Acrilamida (Sigma)	30 %	29,2 g
Bisacrilamida (Sigma)	0,8 %	0,8 g
Água ultra pura		Ajustar para 100 mL

*Filtrar e manter em frasco âmbar a 4 ° C

Quadro 7: Tampão de Corrida Concentrado

	Concentração final	Quantidade
Tris Base (Sigma)	25 mmol. L ⁻¹	15 g
Glicina	192 mmol. L ⁻¹	72 g
Água ultra pura		Ajustar para 1000 mL



8. 33. 1. *Preparo do gel de poliacrilamida 10% não desnaturante*

As placas de vidro e espaçadores foram cuidadosamente limpas com isopropanol. A seguir foram montadas no suporte de acordo com as instruções do fabricante, foi verificada a presença de vazamento com água ultrapura. Após verificação o espaço entre-placas cuidadosamente seco com papel de filtro. O gel para resolução foi preparado em Béquer (50 mL), adicionando-se as soluções conforme descrito nos **Quadro 8**. A seguir a solução foi agitada e todo o conteúdo vertido entre as placas (Verter todo o conteúdo, logo após a adição do TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametilenodiamina) para evitar a polimerização no béquer). O gel foi vertido até altura de 0,7 cm abaixo dos poços de aplicação das soluções protéicas. Após a adição do gel foi colocado água em cima para o gel polimerizar de maneira nivelada. A seguir, a água foi vertida e o espaço entre-vidro cuidadosamente seco com papel de filtro.

O gel de empacotamento foi então preparado em um Béquer (50 mL) adicionando as soluções conforme **Quadro 9**. A seguir adicionou-se o pente de poços (para evitar a polimerização do gel no Béquer, todo o conteúdo foi rapidamente vertido logo após a adição de TEMED). A seguir aguardou-se a polimerização.

8. 33. 2. *Preparo da amostra protéica*

Em microtubo de 1,5 mL adicionar 15 μ L da amostra a ser analisada e 3 μ L do tampão de amostra, agitar levemente e deixar em estufa a 100^o C por quinze minutos (ou termomixer), centrifugar 7000 rpm por dois minutos.

8. 33. 3. *Eletroforese*

A cuba eletroforética foi montada adicionando-se os suportes com gel. A seguir o pente de poços foi removido cuidadosamente e o tampão de corrida diluído (1:5; 100 mL de tampão para 800 mL de água ultrapura) foi vertido cuidadosamente, após homogeneização do mesmo. As amostras foram aplicadas nos poços, e o marcador padrão de proteína (peso molecular) (Lifetechnology, NativeLeader). A cuba foi conectada à fonte e iniciada a corrida em 80 V (voltagem) e 15 mA (corrente), quando a amostra atingiu o gel de resolução (observado pela migração do azul de bromofenol) os parâmetros da corrida foram modificados para 180 V (voltagem) e 40 mA (corrente) as condições foram mantidas até a observação do corante sair do gel.

Quadro 8: Gel de resolução 8%.

	Quantidade
Solução Tris-HCl 1mol/L pH 8,8	5,8 mL



Solução de acrilamida	2,15 mL
Solução de PSA 10 %	75 µL
TEMED (<i>N-N-N'-N'</i> tetrametiletilenodiamino, Sigma)	15 µL

Quadro 9: Gel de empacotamento 6%.

	Quantidade
Solução Tris-HCl 1mol/L pH 6,8	0,4 mL
Solução de acrilamida	0,5 mL
Água ultra pura	2,3 mL
Solução de PSA 10 %	30 µL
TEMED (<i>N-N-N'-N'</i> tetrametiletilenodiamino, Sigma)	10 µL
Solução de azul de bromofenol 1 %	1 gota

8. 33. 4. Procedimento para corado com $AgNO_3$

Para detectar as proteínas utilizou o protocolo descrito no **Quadro 10**.

Quadro 10: Sequência de etapas para corado com nitrato de prata.

Reagentes	Tempo	Quantidade
1. FIXAÇÃO		
Etanol	1 hora	50 mL
Ácido acético		12 mL
Formaldeído 37%		5 mL
Água destilada		p/ 100 mL
2. LAVAGEM		
Etanol	3 x 20 mim.	50 mL
Água destilada		p/ 100 mL
3. PRÉ-TRATAMENTO		
Tiosulfato de sódio	1 mim.	0,02 g
Água destilada		p/ 100 mL
4. LAVAGEM		
Água destilada	3 X 20 seg.	100 mL



5. IMPREGNAÇÃO		
Nitrato de prata	20 min.	0,2 g
Formaldeído 37%		75 □l
Água destilada		p/ 100 mL
6. LAVAGEM		
Água destilada	2 X 20 seg.	100 mL
7. REVELAÇÃO		
Carbonato de sódio	Até aparecer	6 g
Tiosulfato de sódio	as bandas	0,0004 g
Formaldeído 37%		50 □L
Água destilada		p/ 100 mL
8. LAVAGEM		
Água destilada	2 X 20 seg.	100 mL
9. BLOQUEIO		
Etanol	10 mim.	50 mL
Ácido acético		12 mL
Água destilada		p/ 100 mL
10. LAVAGEM		
Etanol	>20 min.	50 mL
Água destilada		p/ 100 mL
11. DESTAIN		
Ácido acético	Armazenar o	7 mL
Álcool	gel	30 mL
Água destilada		p/ 100 mL



8. 34. CONCENTRAÇÃO PROTÉICA PELO MÉTODO DE BRADFORD²⁴⁰

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford, utilizando a albumina de soro bovino (BSA, Sigma-aldrich) como padrão. A curva padrão foi obtida utilizando as concentrações de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 mg. mL⁻¹ da BSA. Os valores de absorbância obtidos foram plotados em um gráfico, e a equação obtida foi utilizada para determinação das concentrações proteicas das amostras desejadas.

O reagente de Bradford foi utilizado conforme instrução do fabricante. Em um microtubo foram adicionados 1500 µL do reagente e 50 µL da solução proteica que se desejava quantificar, o conteúdo foi homogeneizado, agitando levemente o tubo por inversão durante alguns segundos. O conteúdo foi transferido para uma cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm e analisado no espectrofotômetro (BECKMAN DU 7400) em um comprimento de onda de 595 nm.

As amostras de contendo a enzima desejada foram diluídas em um fator de 1:20, para que a concentração fosse determinada.

8. 35. CINÉTICA ENZIMÁTICA EM MICROPLACA 24 POÇOS

8. 35. 1. Branco

A um dos poços da microplaca foi adicionado solução aquosa de fenol vermelho (8,85 µL, 1 mg.mL⁻¹), KBr_(aq) (50 µL, 100 mmol. L⁻¹), 441 µL de tampão citrato (pH 6,3, 50 mmol. L⁻¹) e por último solução aquosa de H₂O₂ 30% *m/m* (0,25 µL). No caso da placa de 96 poços as quantidades foram diminuídas 2,5 vezes. As microplacas foram analisadas na plataforma de detecção multimodal (Molecular Devices Spectra Max[®] Paradigm[®]) em um comprimento de onda de 590 nm.

8. 35. 2. Reação enzimática

A um dos poços da microplaca foi adicionado solução aquosa de fenol vermelho (8,85 µL, 1 mg.mL⁻¹), KBr_(aq) (50 µL, 100 mmol. L⁻¹), 1 µL da amostra de enzima, 441 µL de tampão citrato (pH 6,3, 50 mmol. L⁻¹) e por último solução aquosa de H₂O₂ 30% *m/m* (0,25 µL). A cinética enzimática foi realizada em leitor de microplaca.

8. 36. PROCEDIMENTO DE EQUILIBRAÇÃO LAVAGEM DO SUPORTE

Em um microtubo de 2 mL foram adicionados 400 mg de Purolite[®] (ECR82215F) a seguir 800 µL de solução tampão citrato (pH 6,3, 50 mmol. L⁻¹) foram adicionados e o microtubo agitado

²⁴⁰ Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)



em termomixer durante 60 minutos a 600 rpm a 25 °C. A seguir a mesma foi filtrada em coluna e lavada com mais 800 µL de solução tampão, mais uma vez a lavagem foi repetida e por fim a resina filtrada a vácuo em funil de placa sinterizada. A resina foi armazenada na geladeira a 4°C.

8. 37. PROCEDIMENTO PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A um microtubo de 2 mL foram adicionados 80 mg de resina Purolite® (pré-equilibrada e lavada), o mesmo procedimento foi repetido em 4 microtubos de 2 mL. A seguir foram adicionados 320 µL da solução protéica contendo (7,9 mg.mL⁻¹) de proteína. A resina foi agitada em termomixer por 18 horas a 600 rpm a 25 °C. A seguir a agitação foi cessada e os microtubos foram deixados em repouso por mais 20 horas. O conteúdo dos microtubos foi filtrado em coluna, cada um deles foi lavado com tampão citrato (4 x 500 µL) Na última lavagem a resina foi filtrada à vácuo em funil de placa sinterizada.

8. 38. TESTE QUALITATIVO COM ENZIMA SUPORTADA

A um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 1,2 mg de suporte, a seguir 900 µL de tampão citrato (pH 6,3, 50 mmol. L⁻¹), a solução aquosa de fenol vermelho 17,7 µL (1 mg.mL⁻¹), KBr_(aq) (100 µL) e solução aquosa de H₂O₂ 30% *m/m* (0,25 µL). A reação foi mantida em agitação durante 15 minutos, a 25°C e 800 rpm.

8. 39. PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO DE BROMAÇÃO DO TIMOL COM V-BrP-Pur

A um microtubo de 1,5 mL foram adicionados timol (15 mg, 0,1 mmol), KBr (11,9 mg, 0,1 mmol) e o tampão (990 µL, quando **VBrP-Pur** foi utilizada como catalisador e 890, quando a solução com enzima livre foi empregada). A seguir foi adicionado o catalisador **VBrP-Pur** (5mg) ou VBrPO (100 µL), em seguida a solução aquosa de H₂O₂ 30% *m/m* (1 x 10 µL ou 10 x 1 µL, durante 10 min). A reação foi mantida sob agitação em termomixer a 30 °C em 600 rpm durante 24 ou 48 horas. A seguir, a reação foi extraída com éter etílico (3 x 1 mL) as fases orgânicas reunidas e secas sob MgSO₄.

APÊNDICE

ESPECTROS SELECCIONADOS

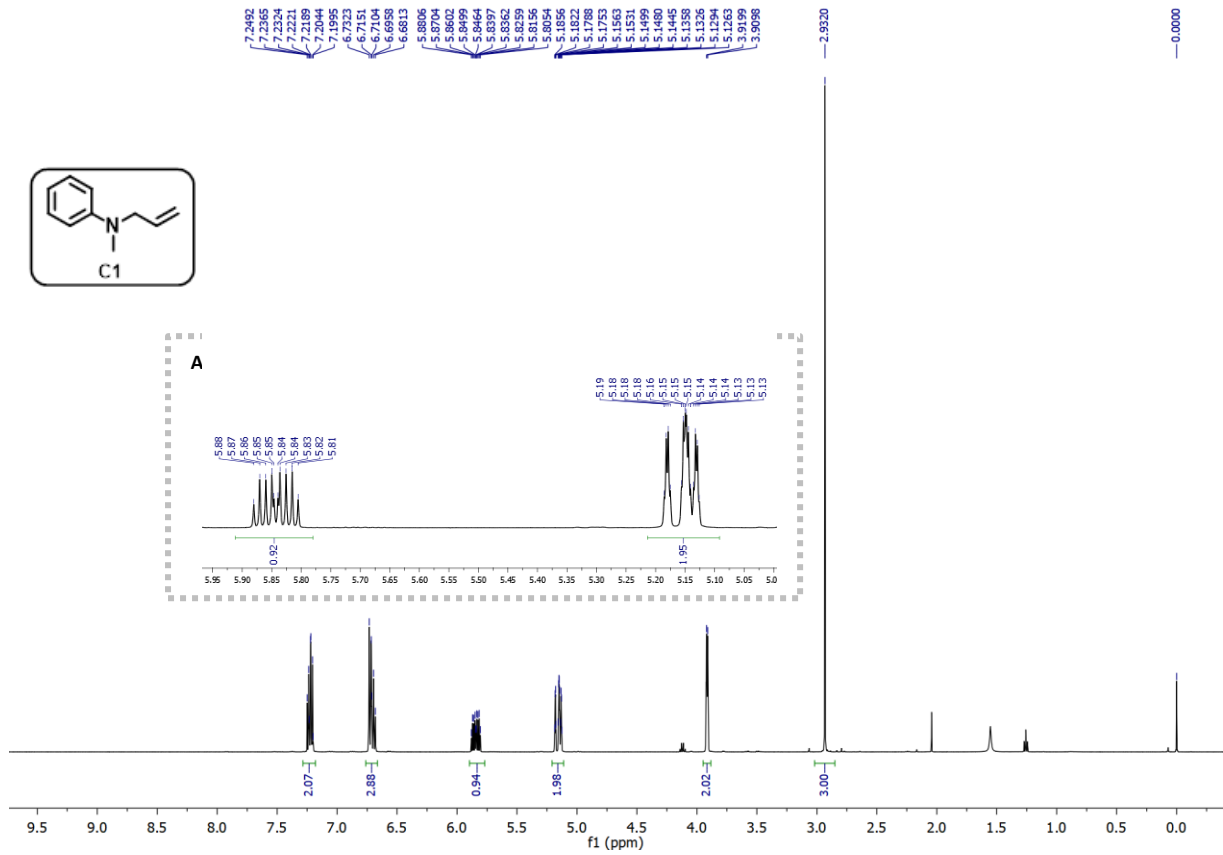


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C1.

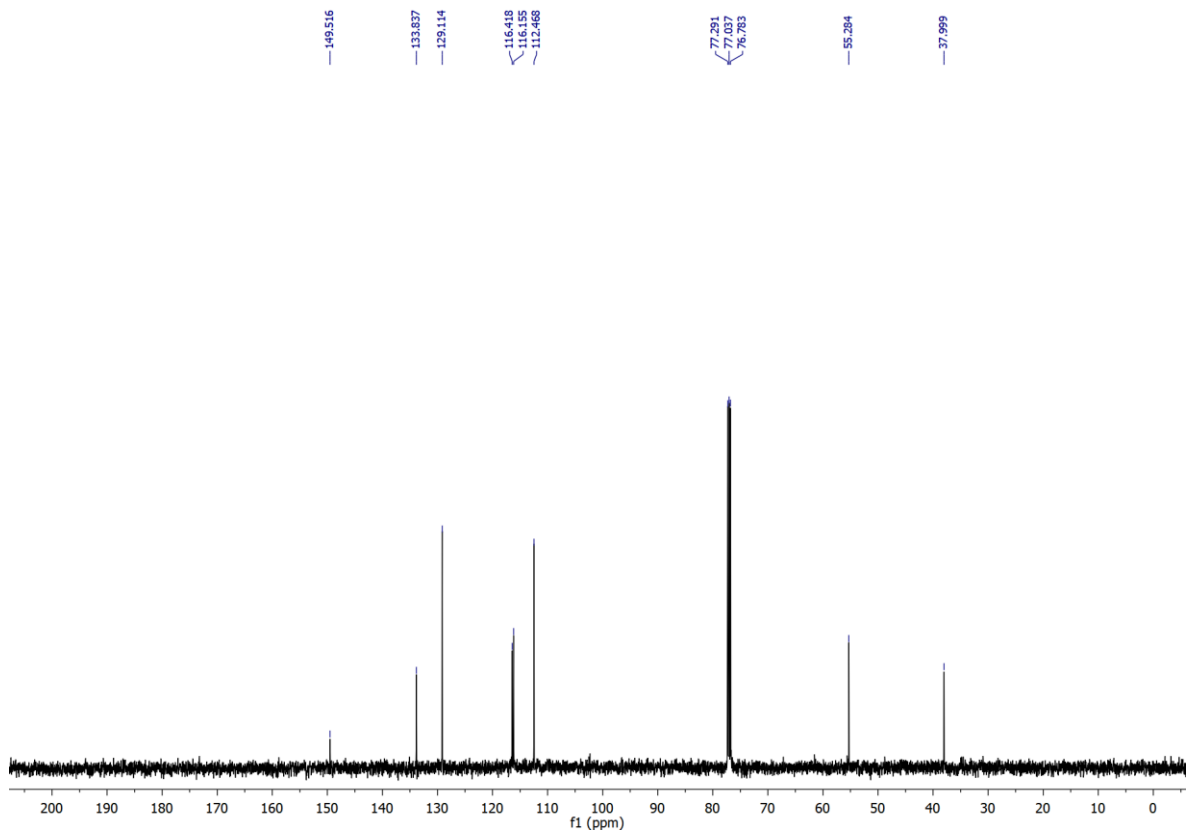


Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C1.

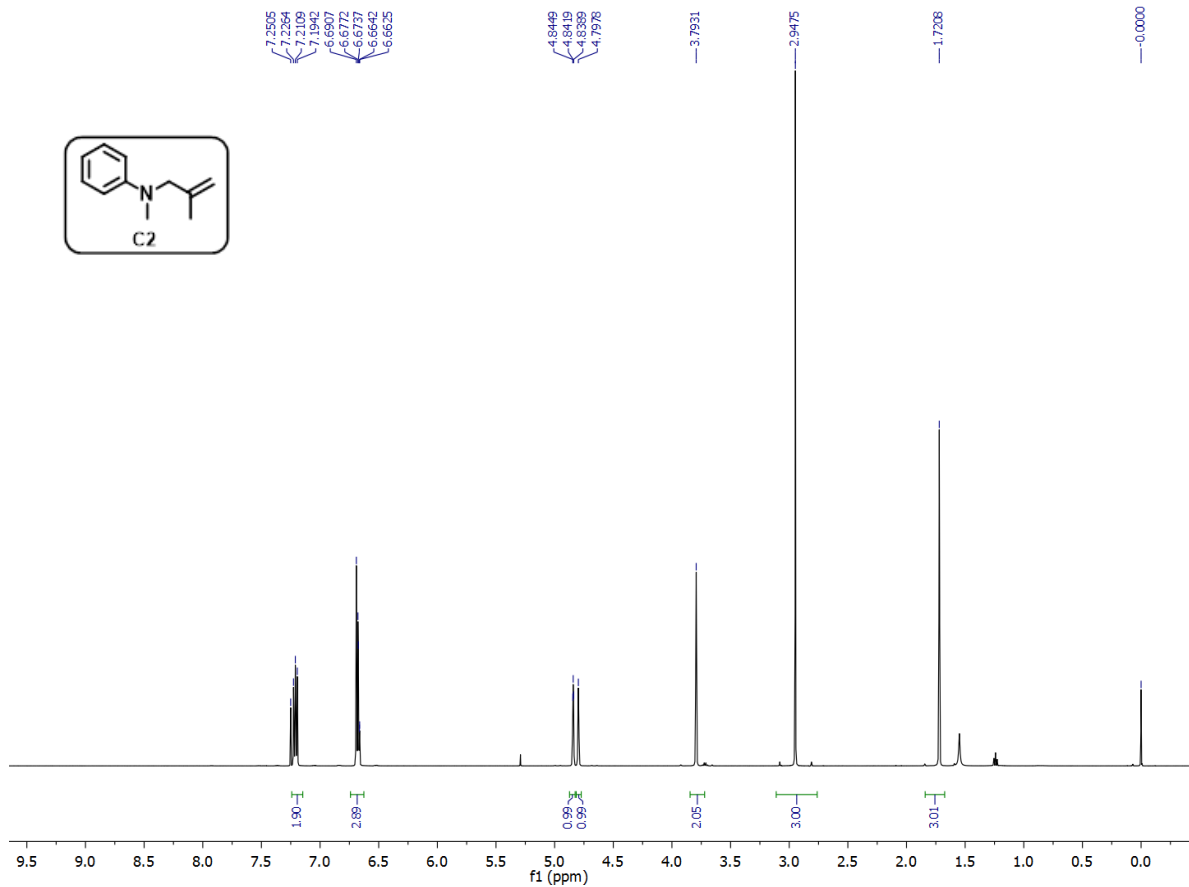


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C2.

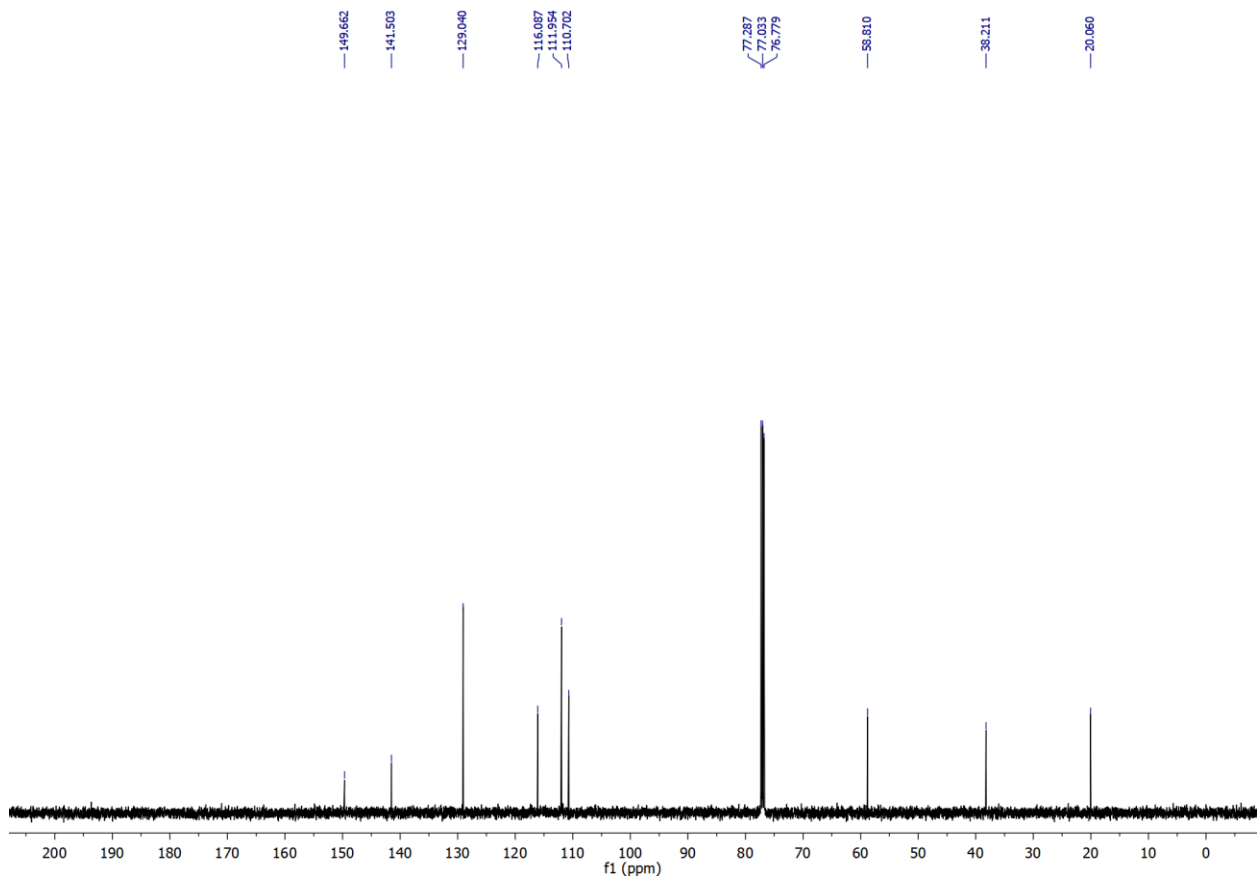


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C2.

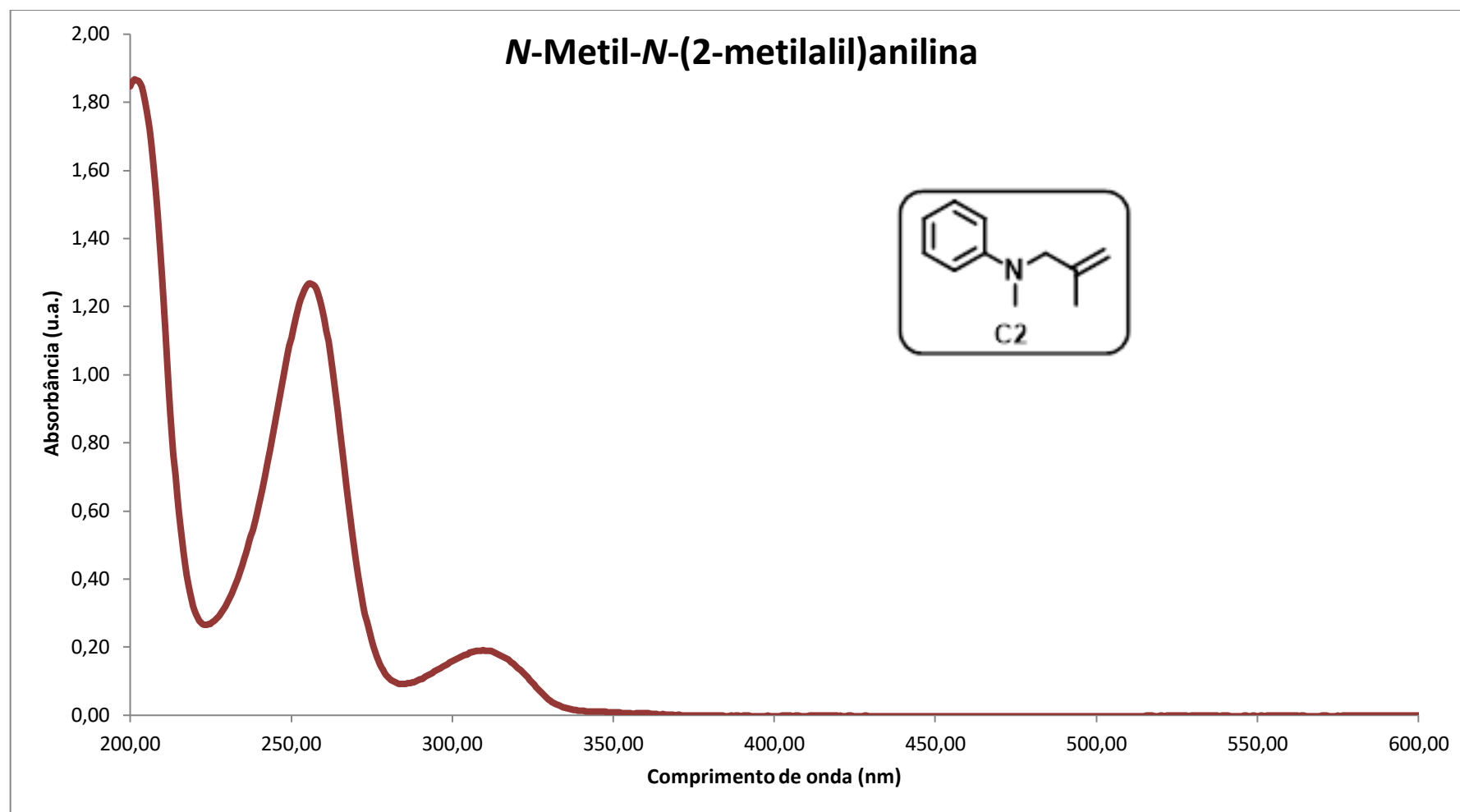


Figura 44: Espectro de absorção de **C2** em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$

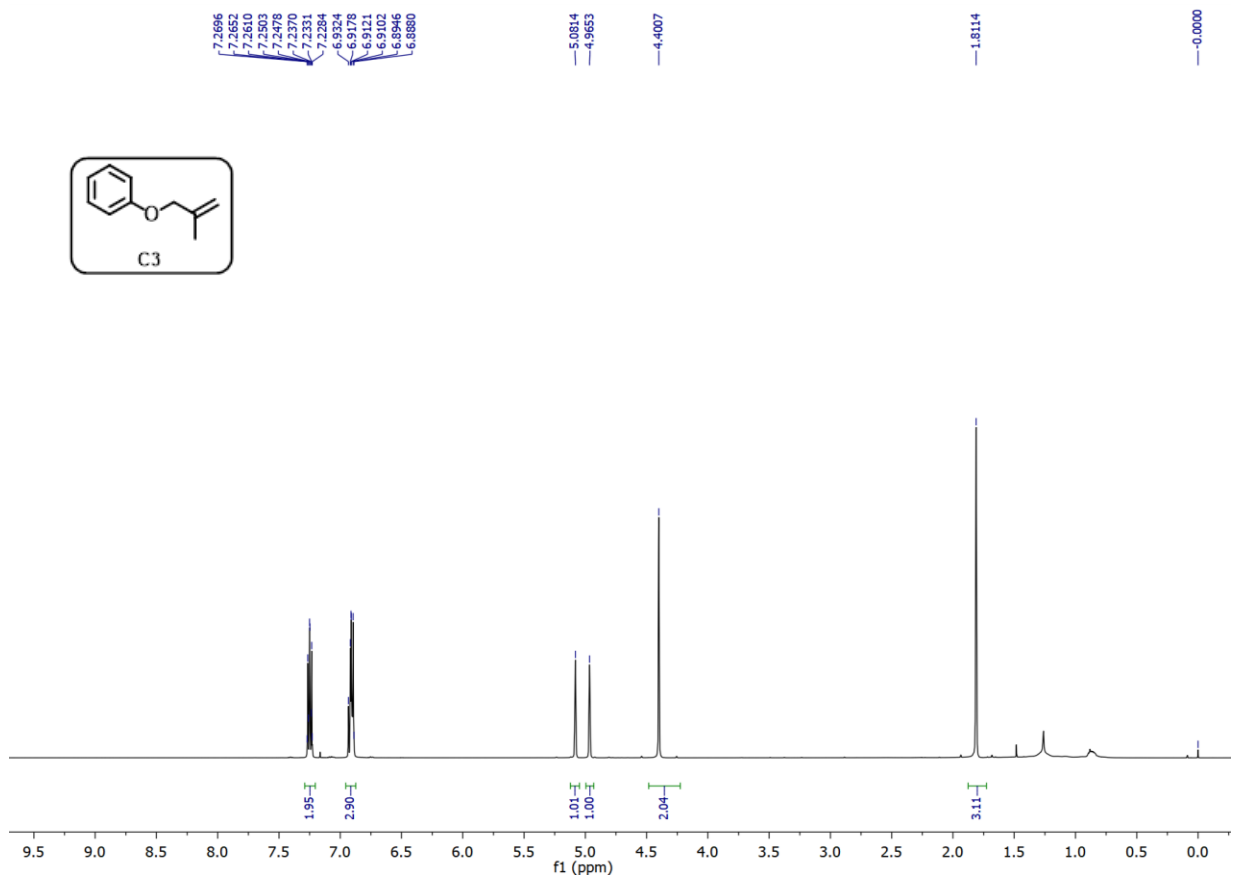


Figura 45: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de C3.

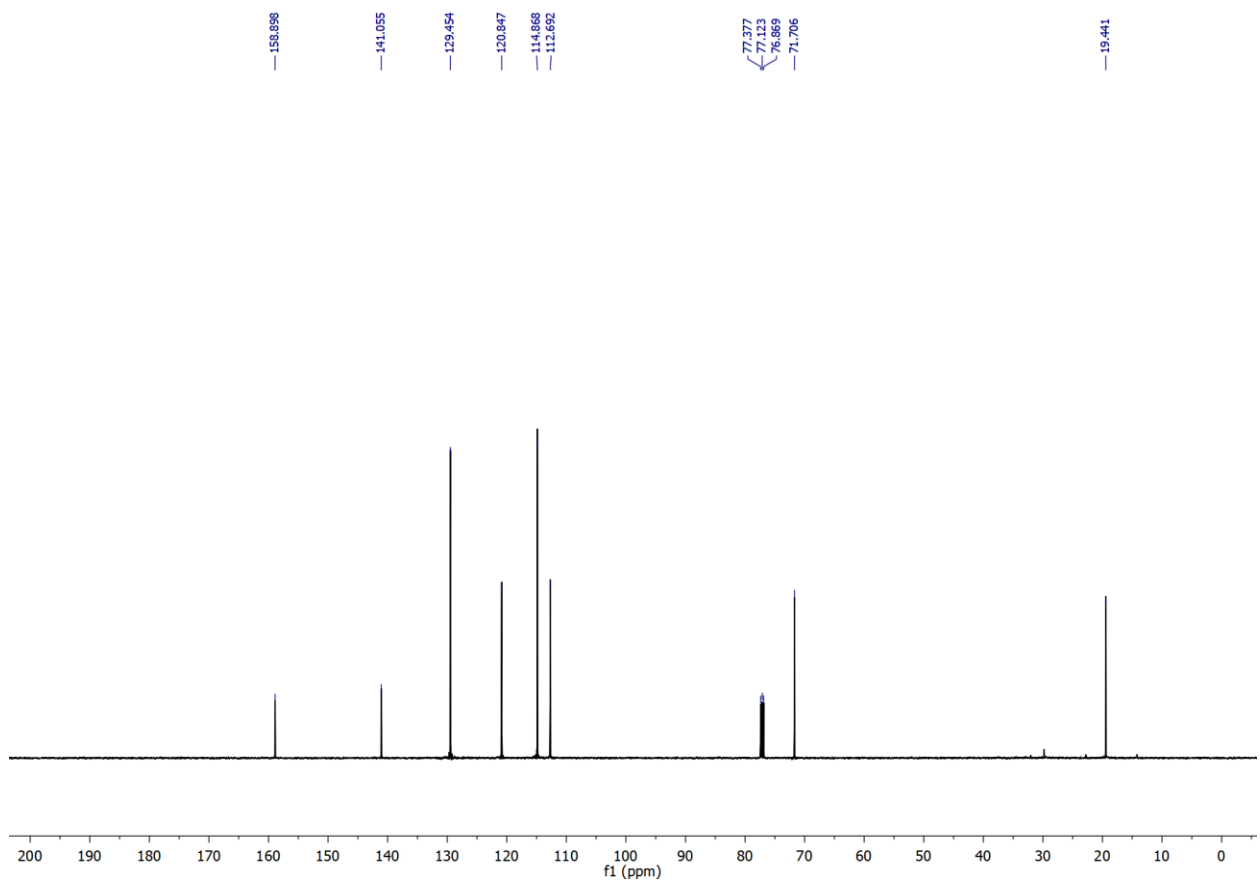


Figura 46: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de C3.

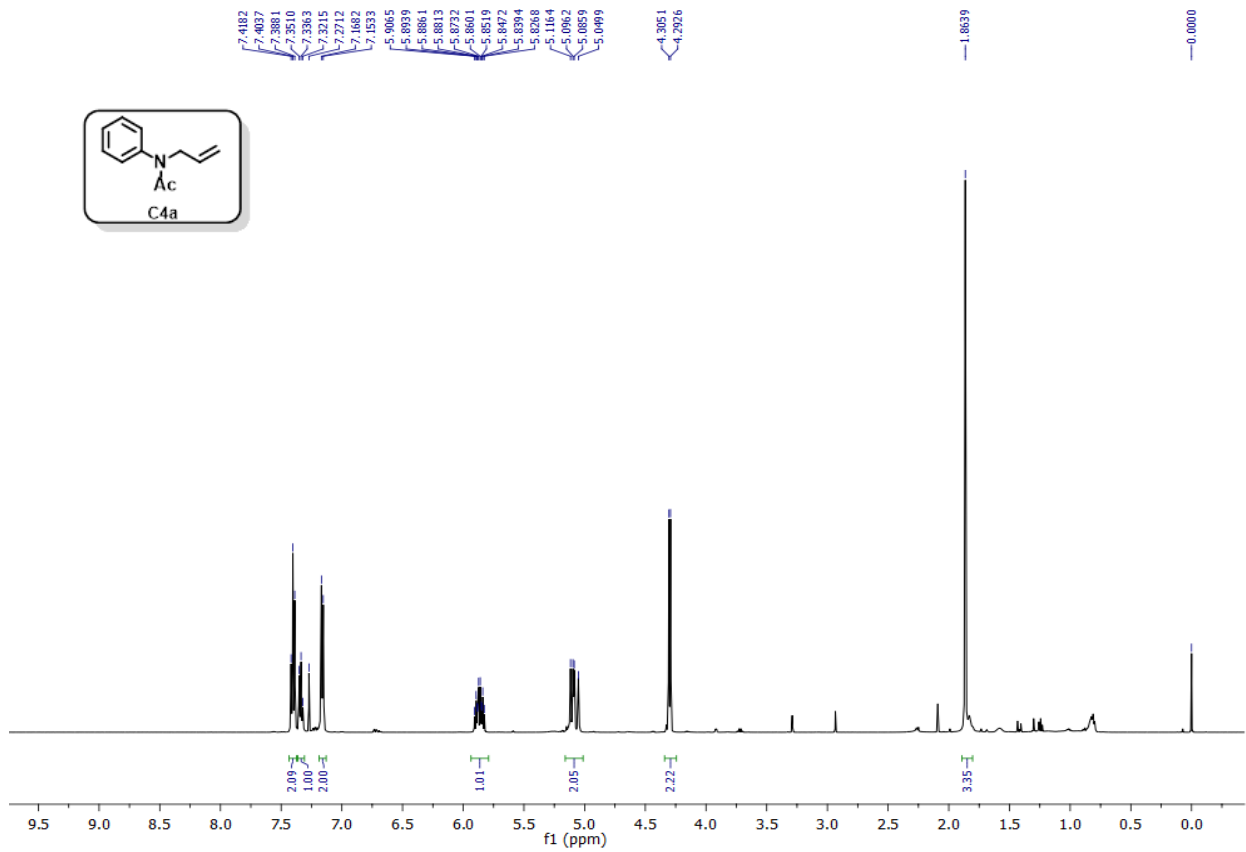


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C4a.

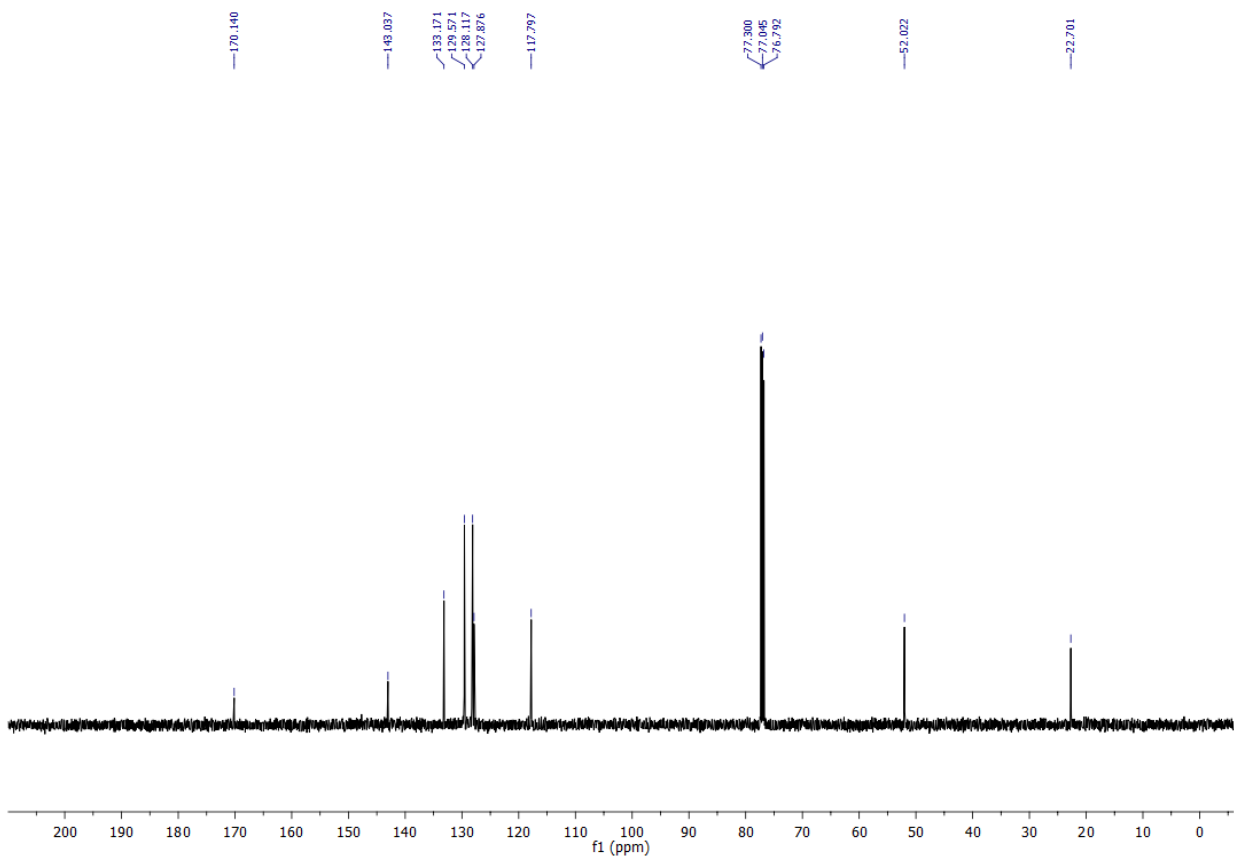


Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C4a.

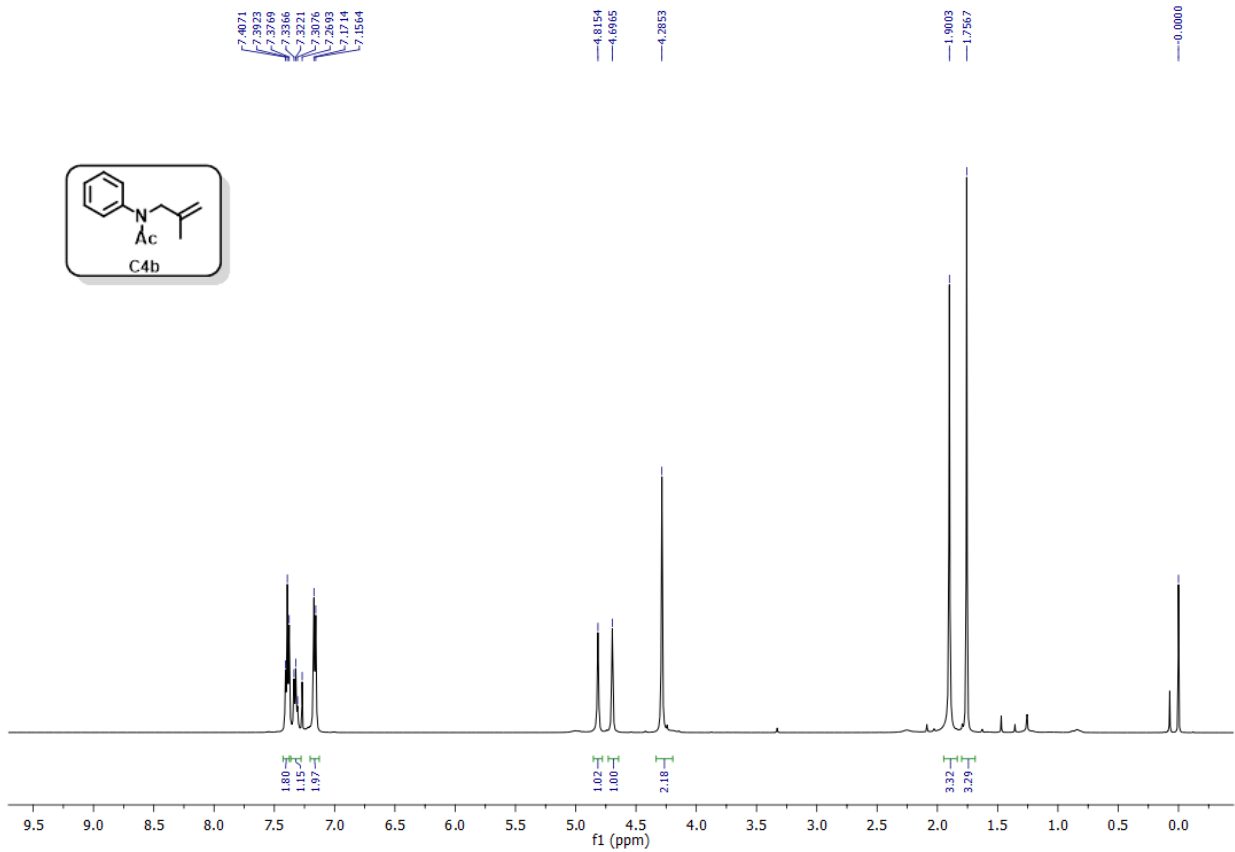


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **C4b**.

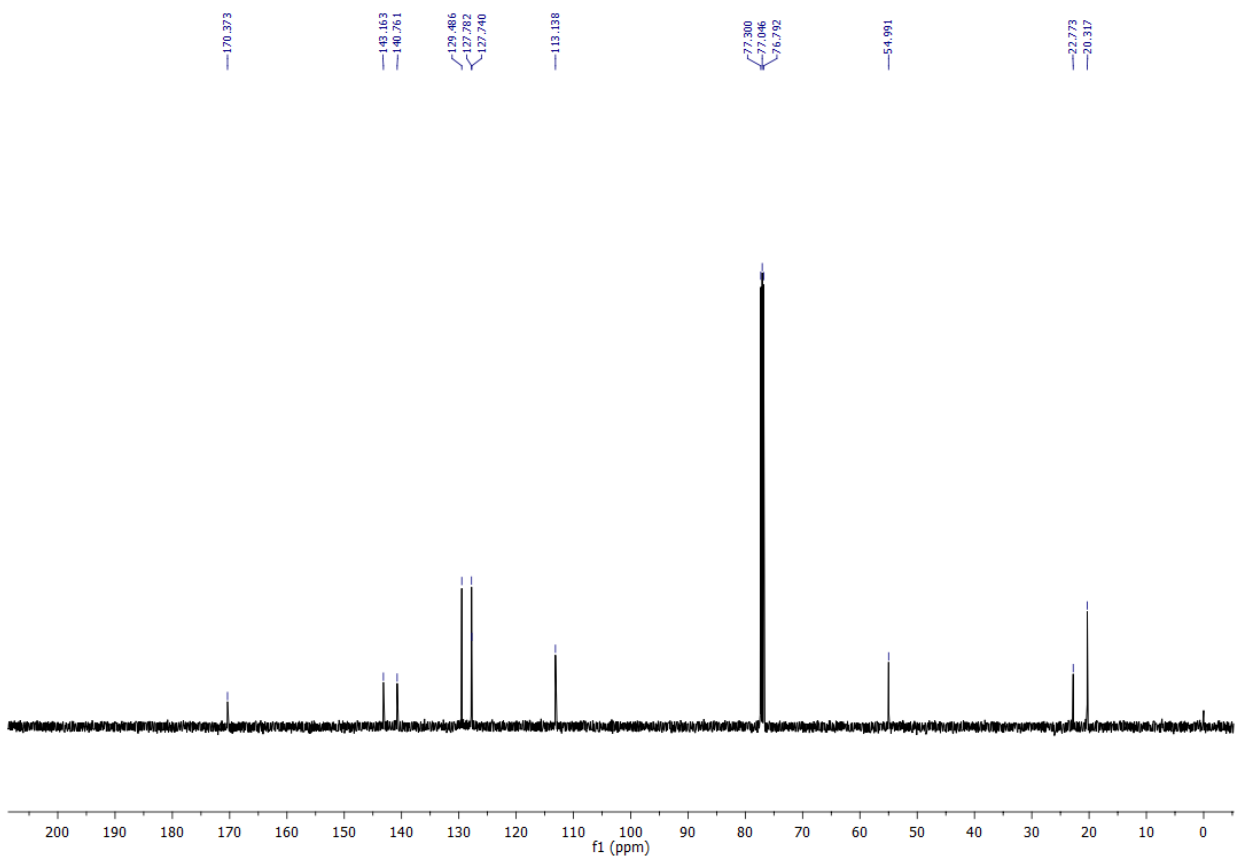


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **C4b**.

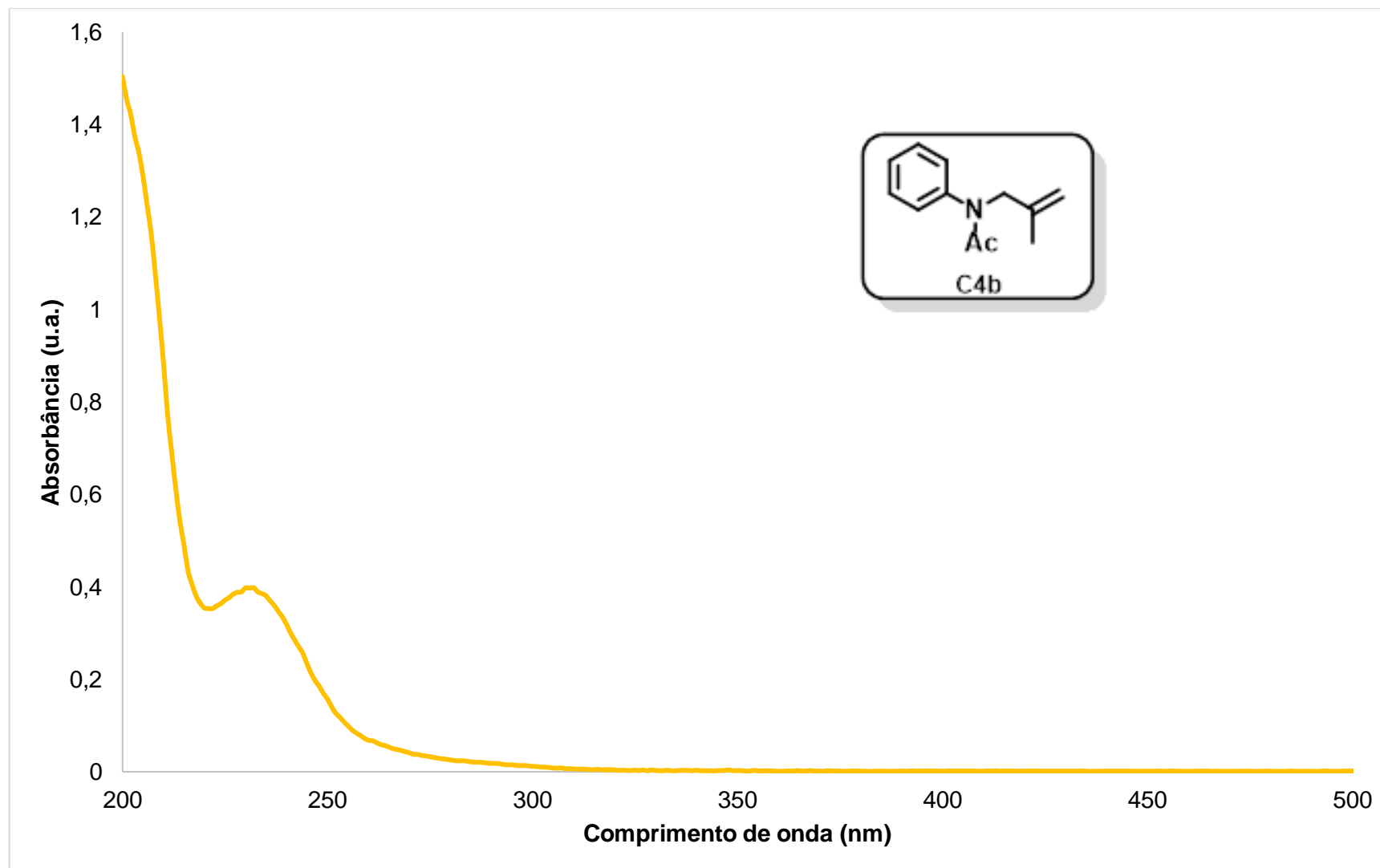


Figura 51: Espectro de absorção de **C4b** em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$

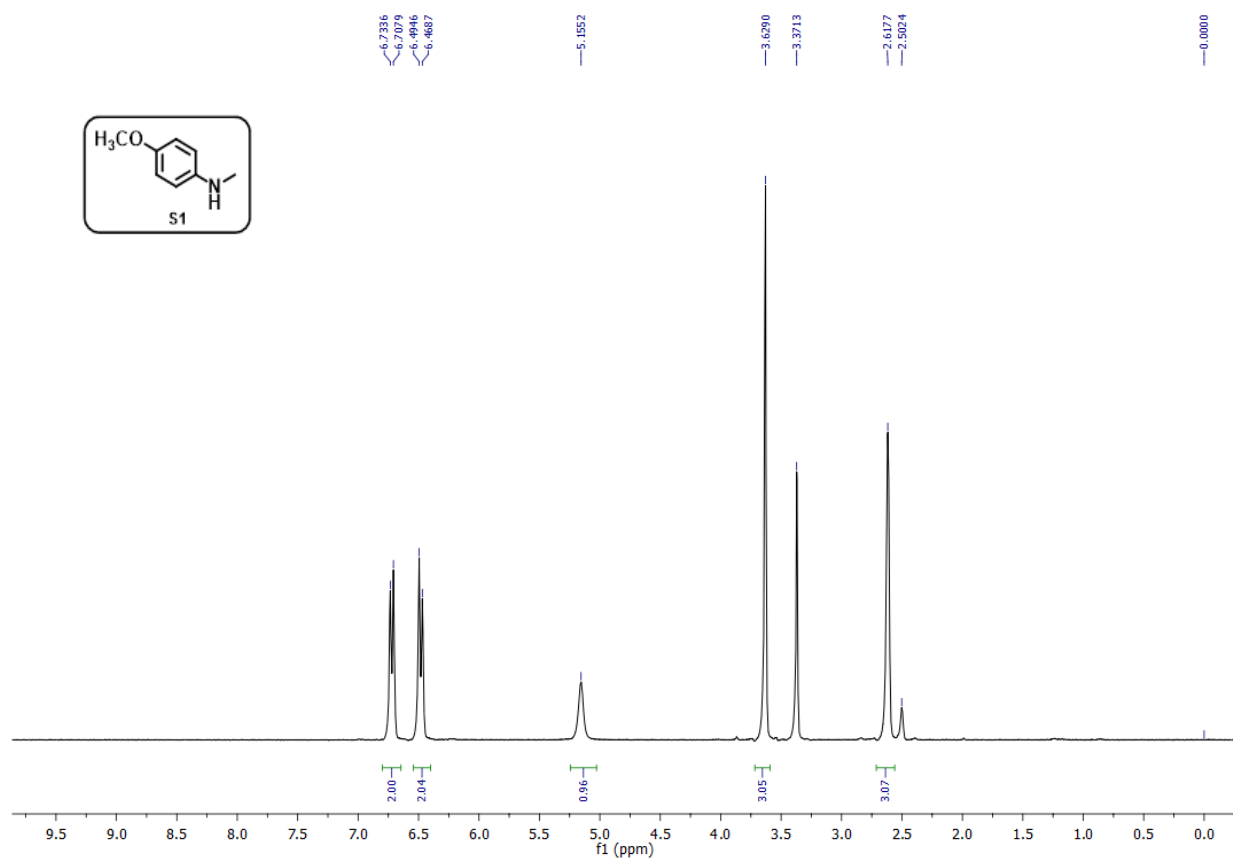


Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de S1.

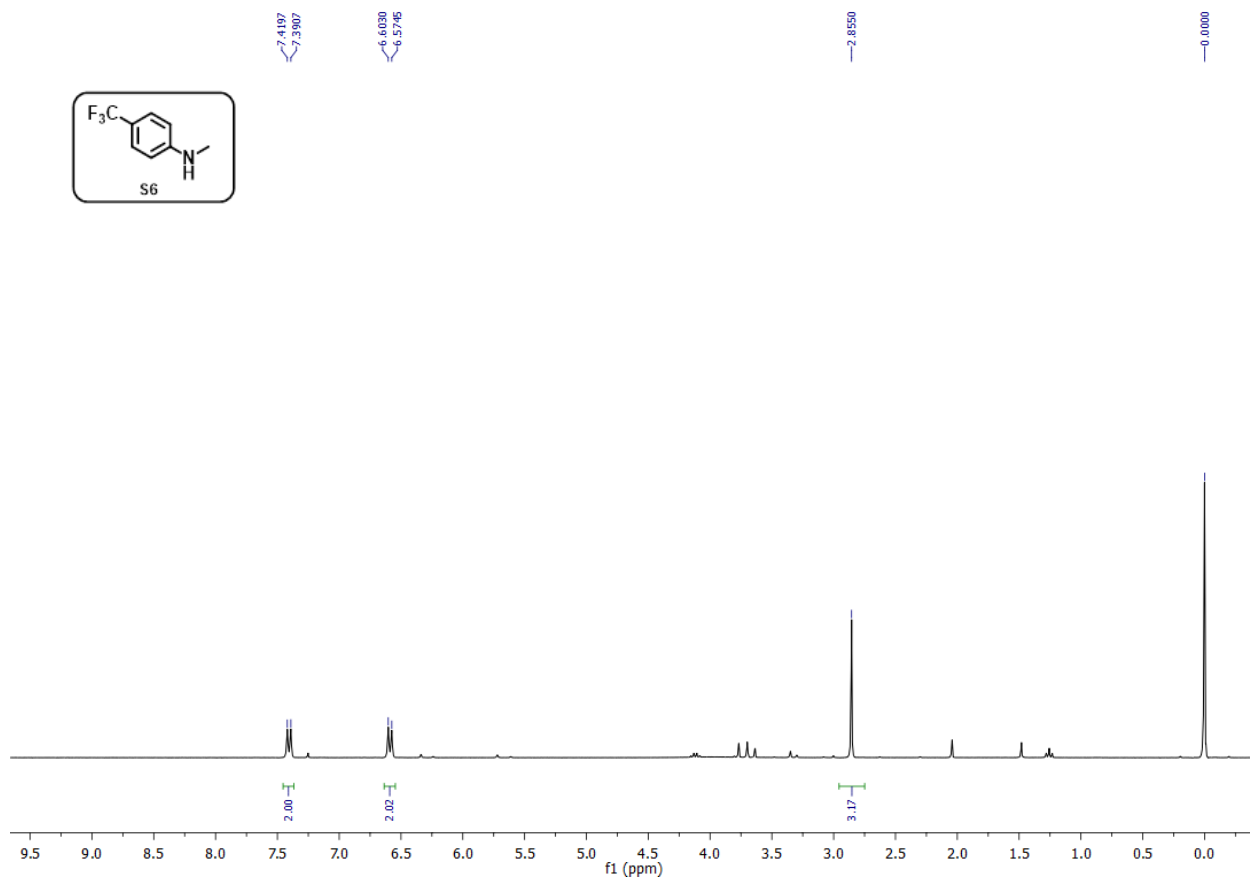


Figura 53: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S6.

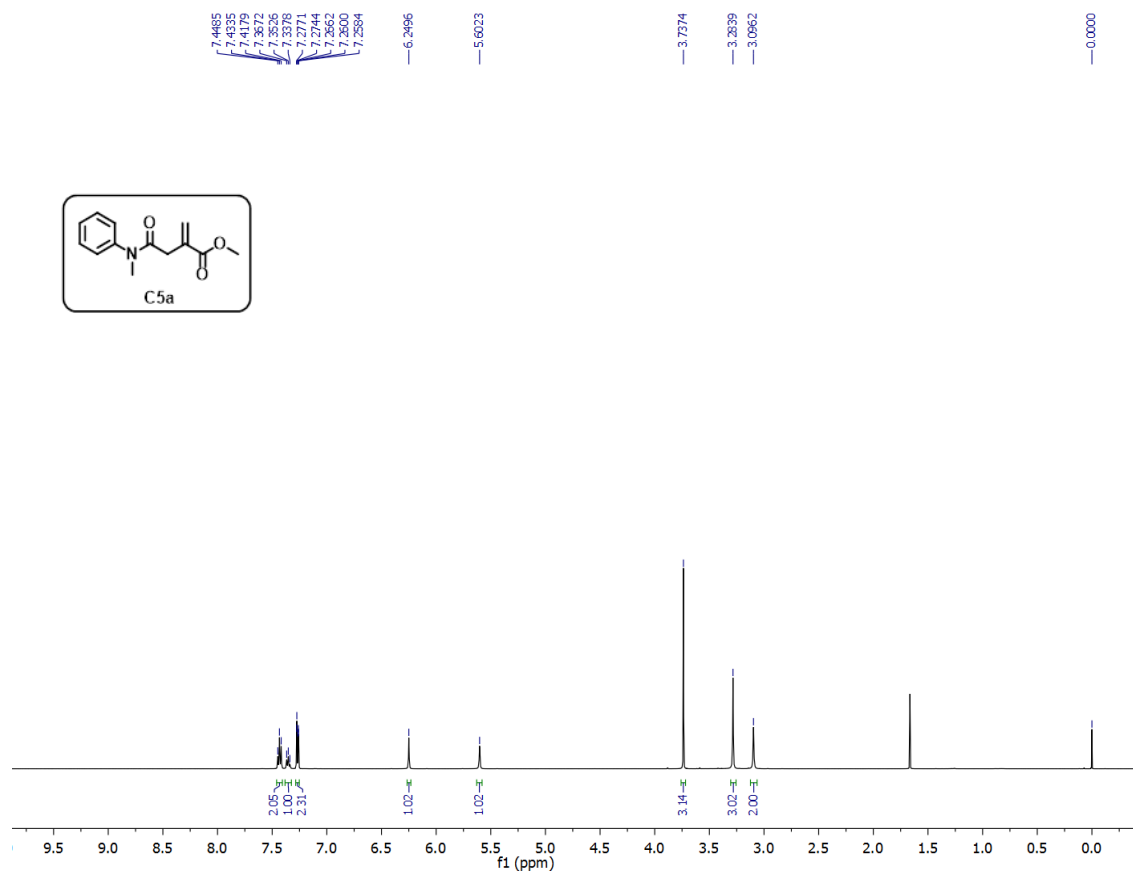


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **C5a**.

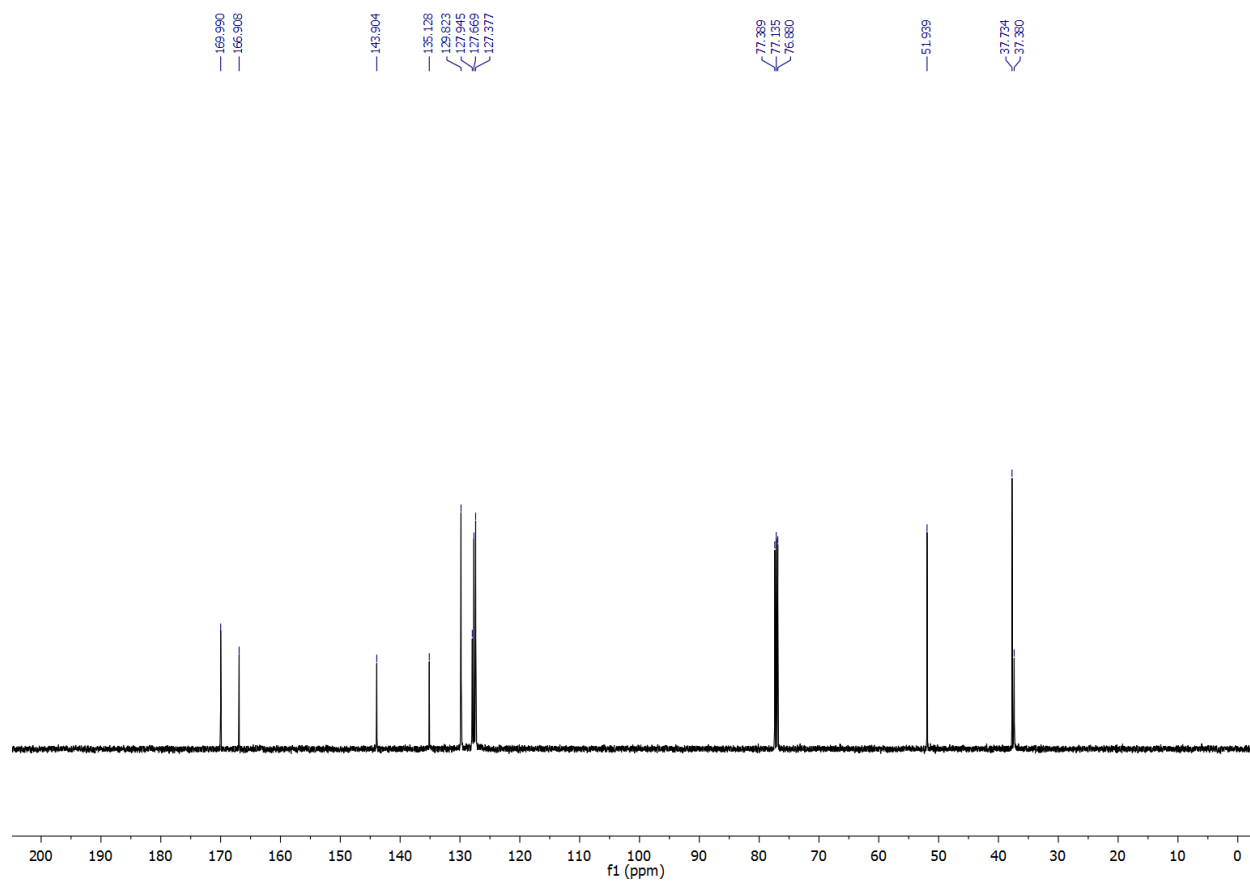


Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **C5a**.

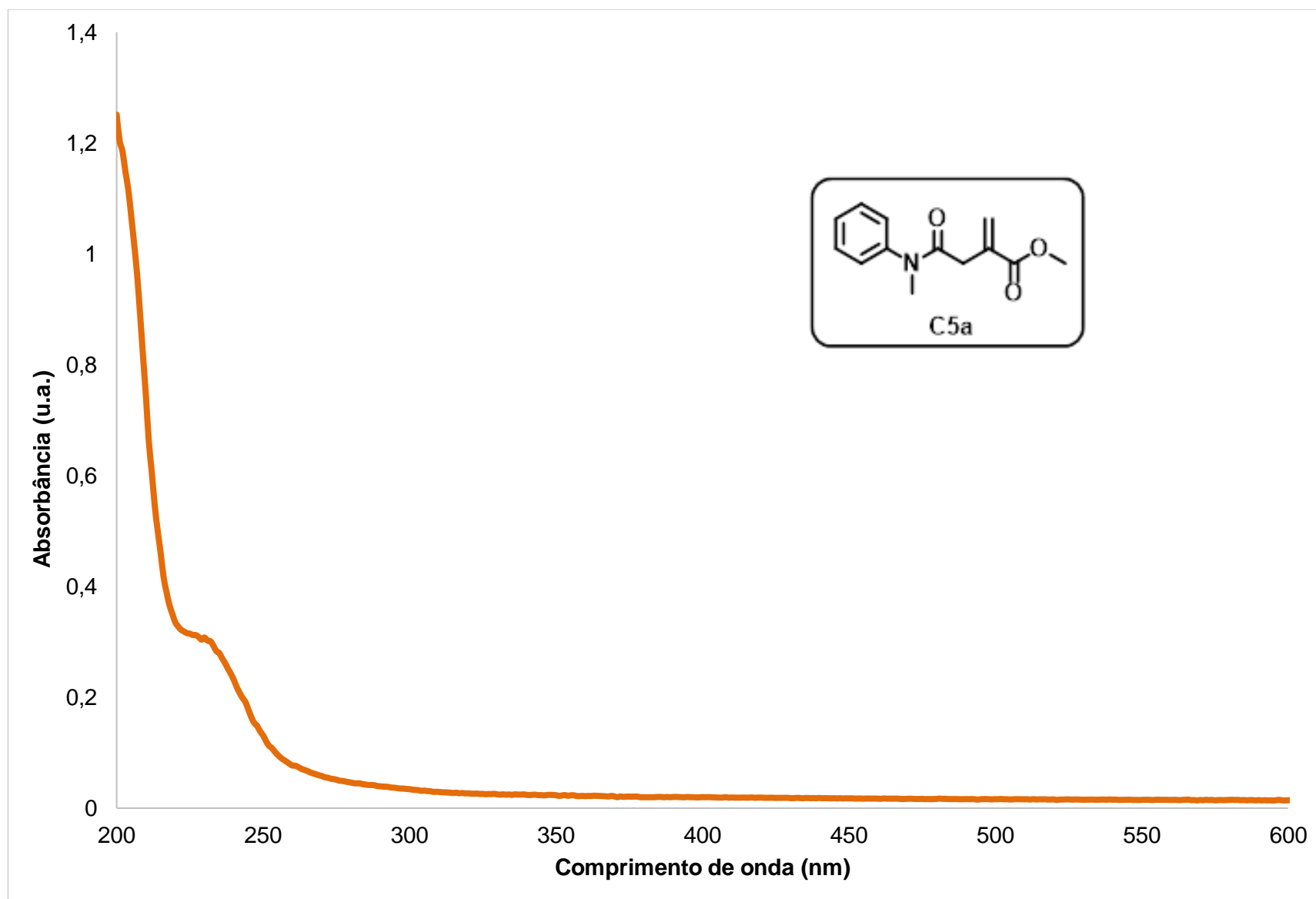


Figura 56: Espectro de absorção de **C4b** em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$

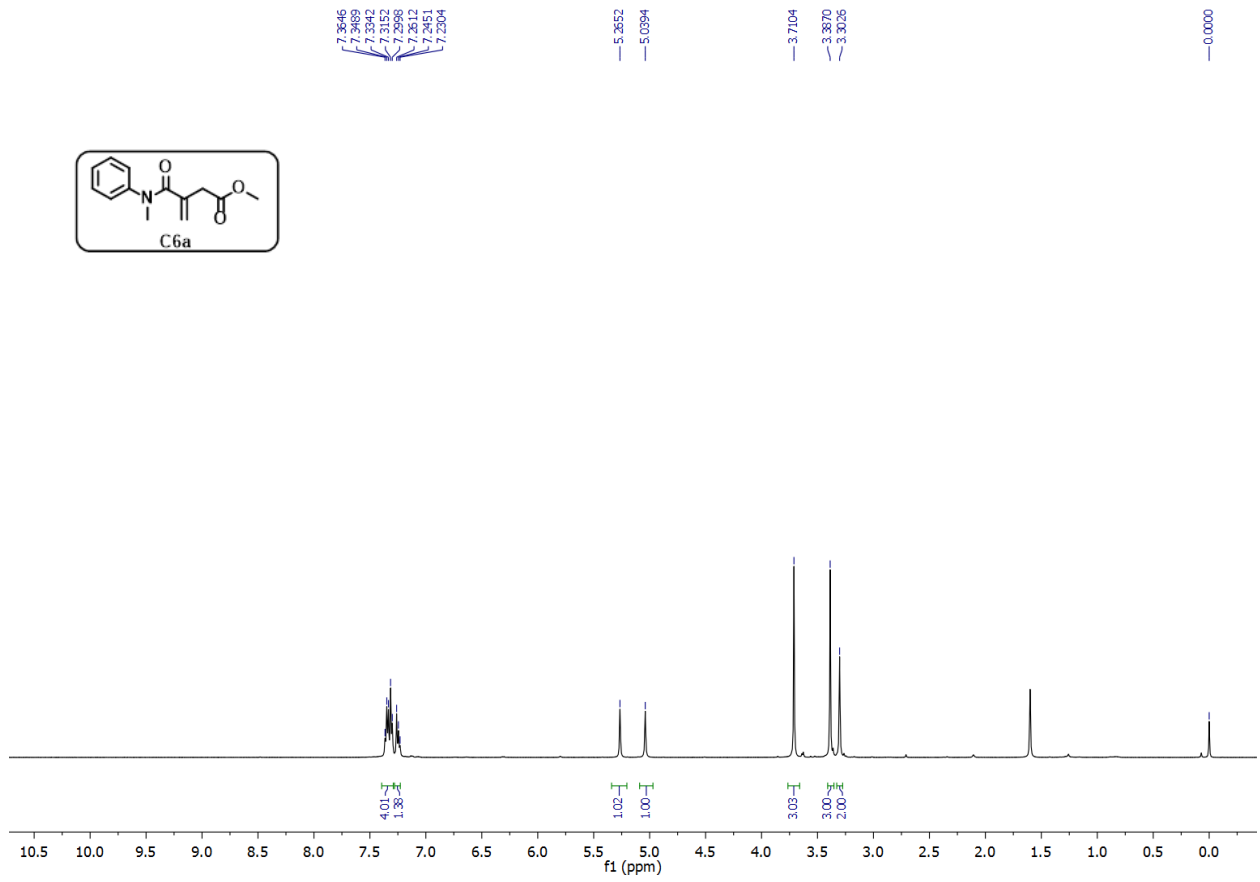


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C6a.

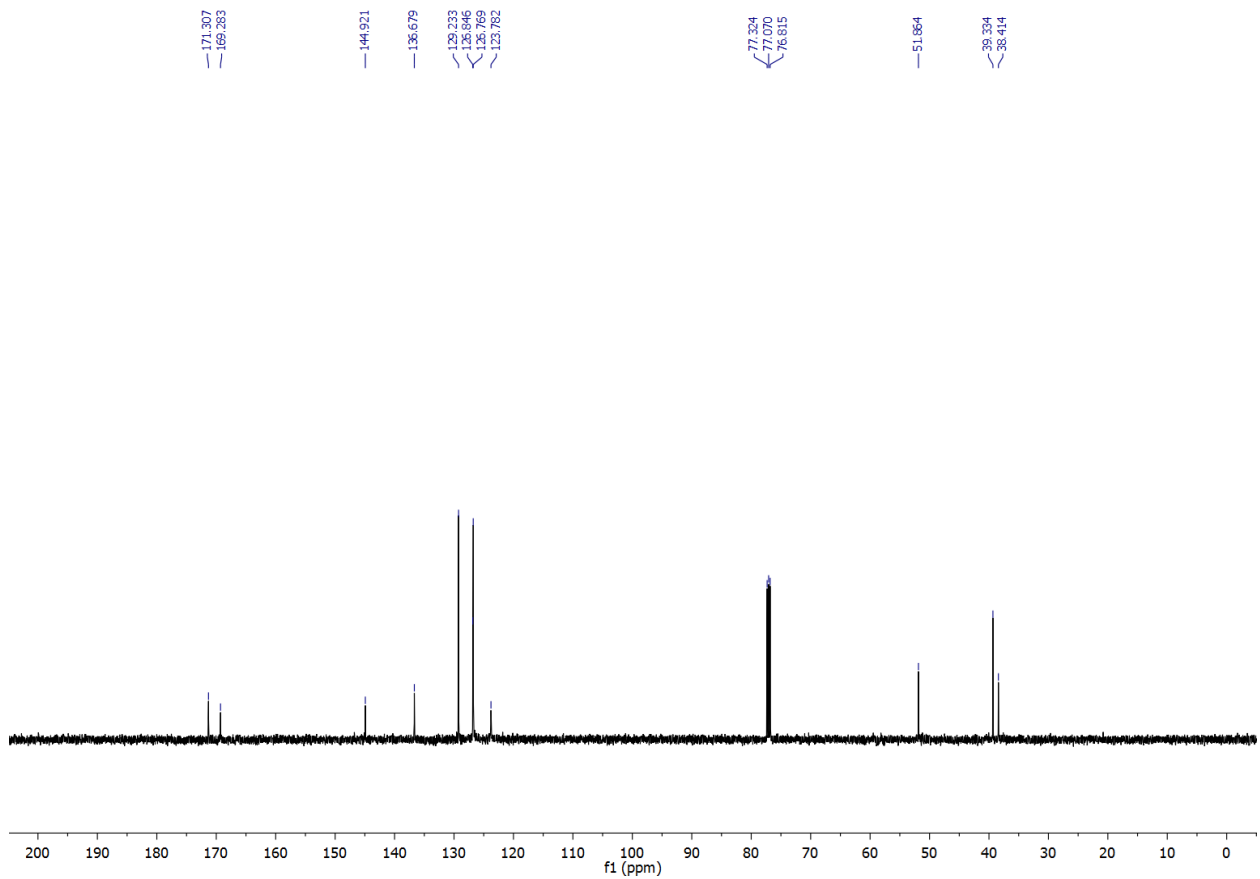


Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de C6a.

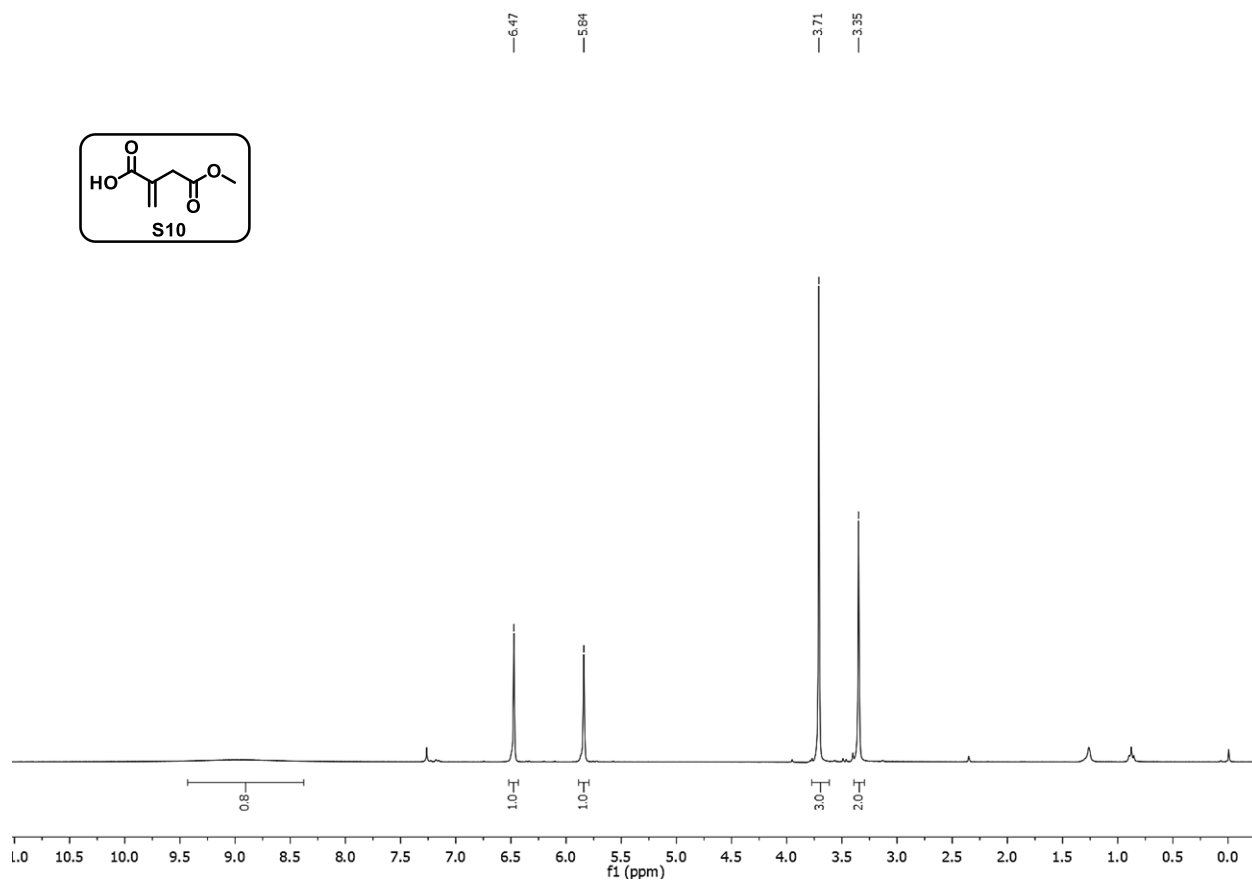


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S10.

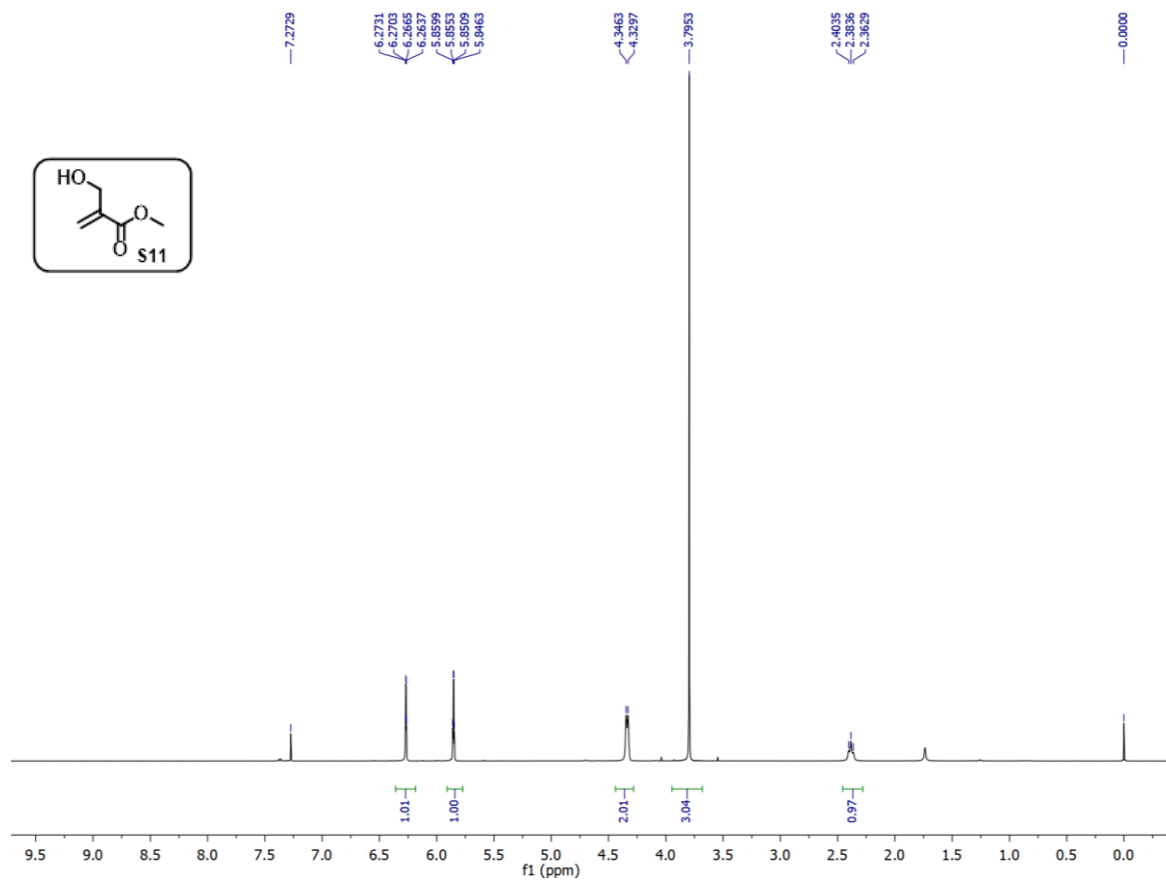


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de S11.

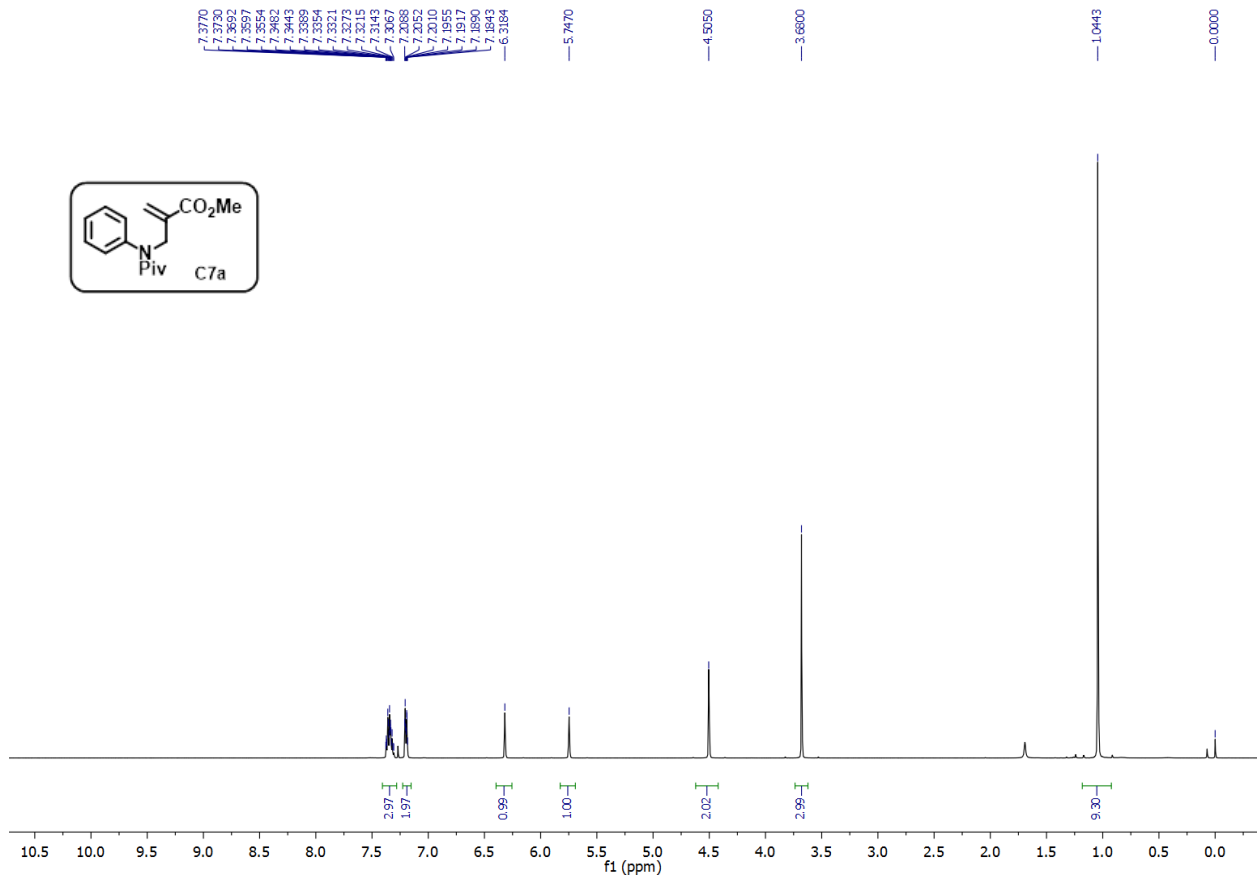


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **C7a**.

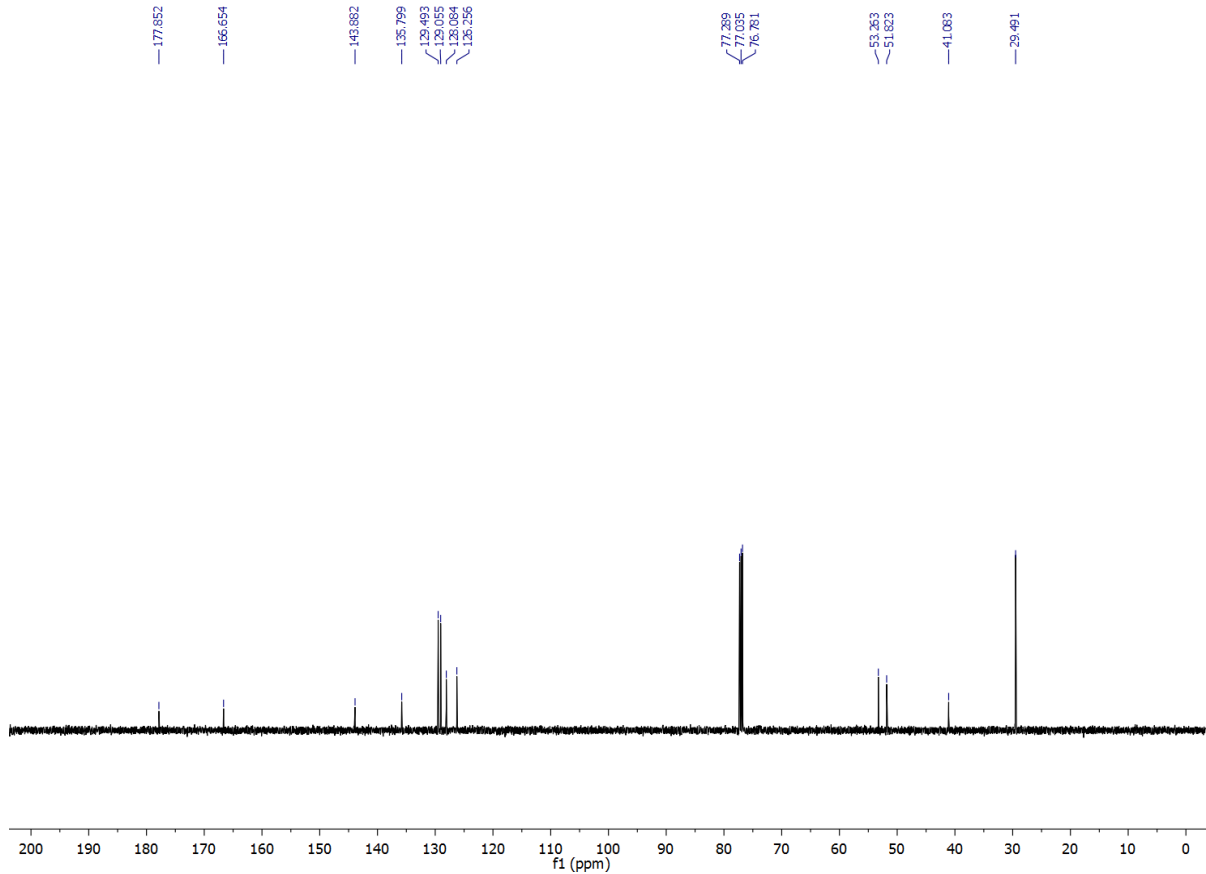


Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **C7a**.

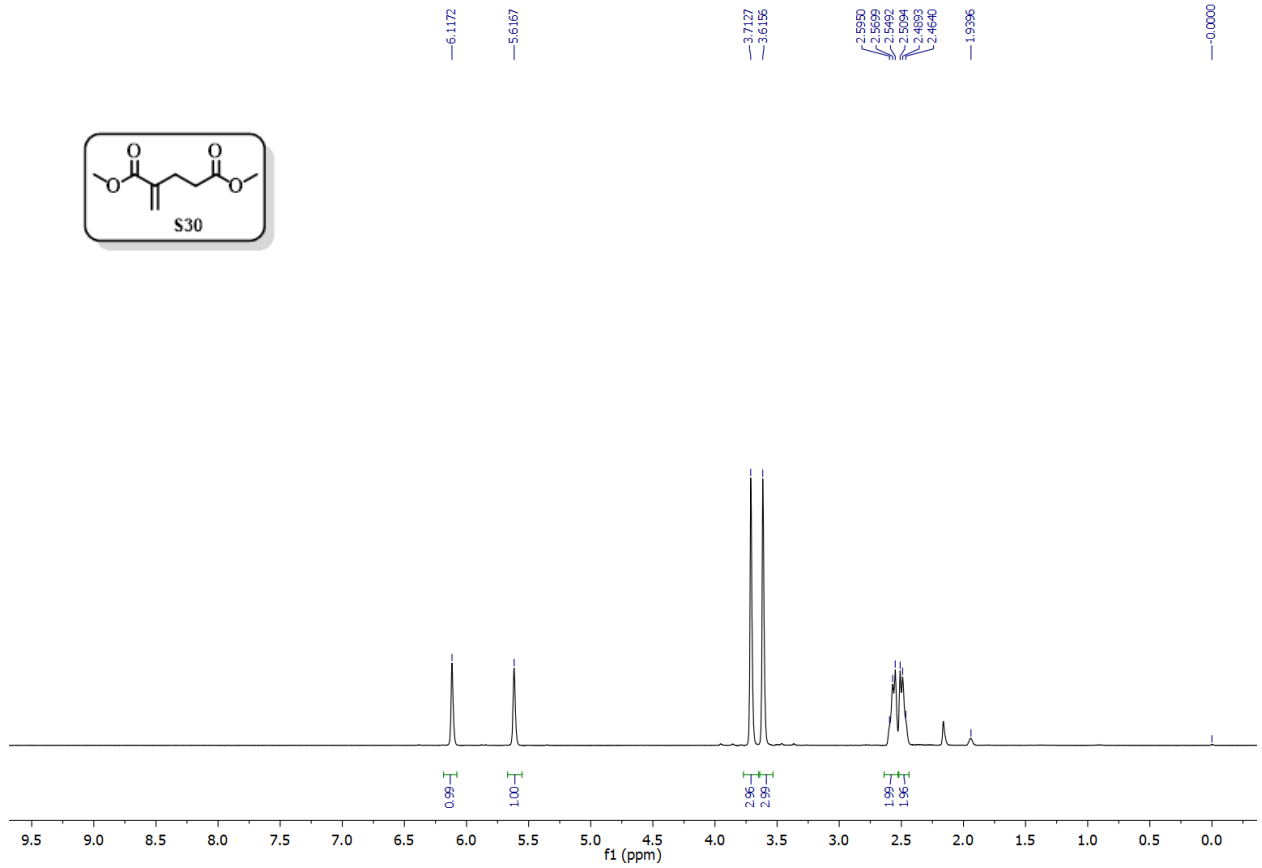


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3CN) de S30.

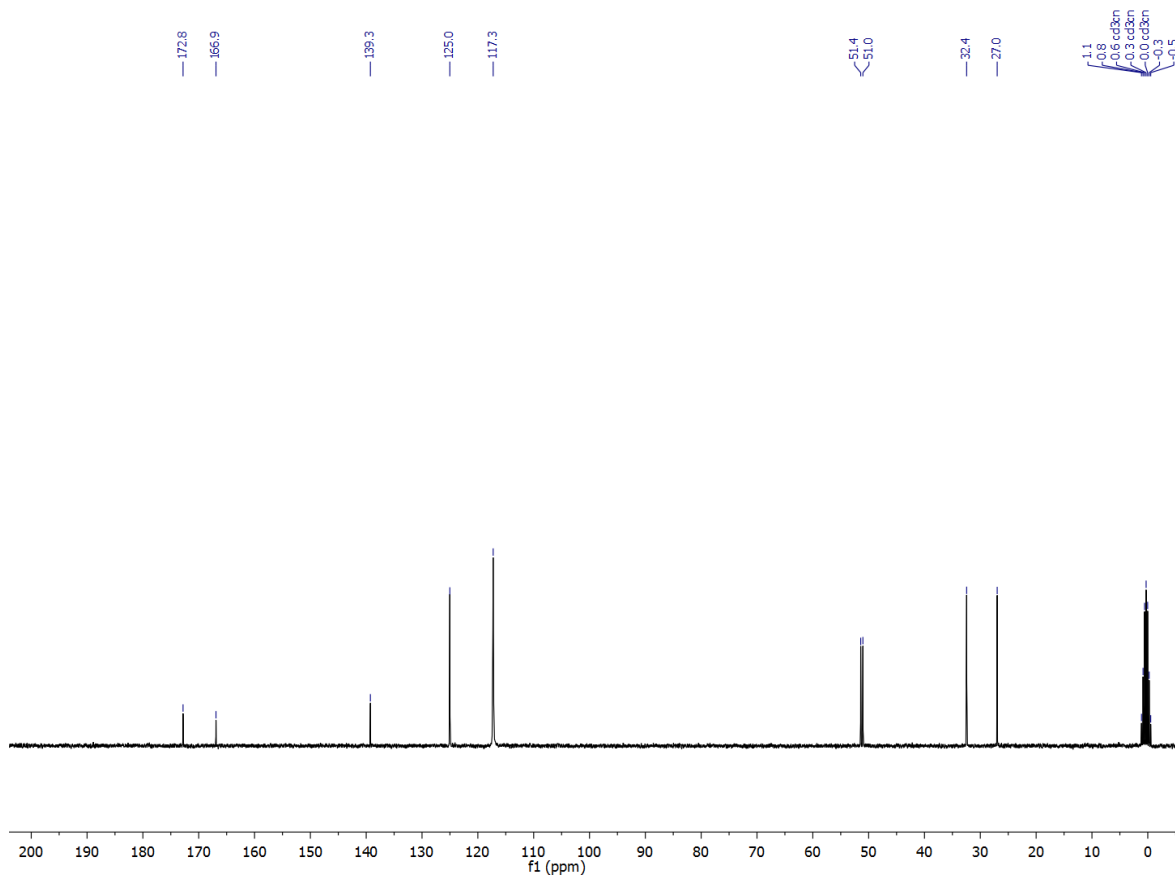


Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3CN) de S30.

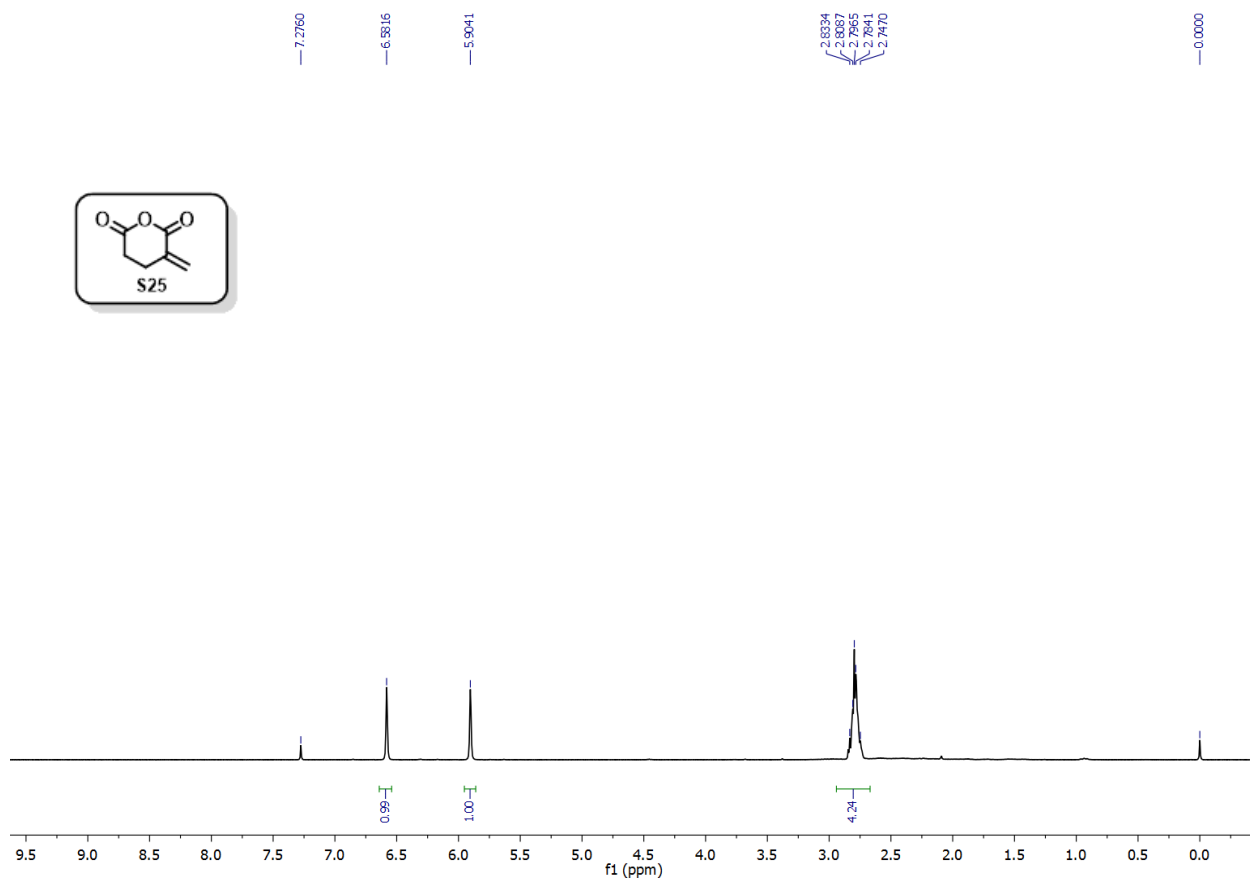


Figura 65: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S25.

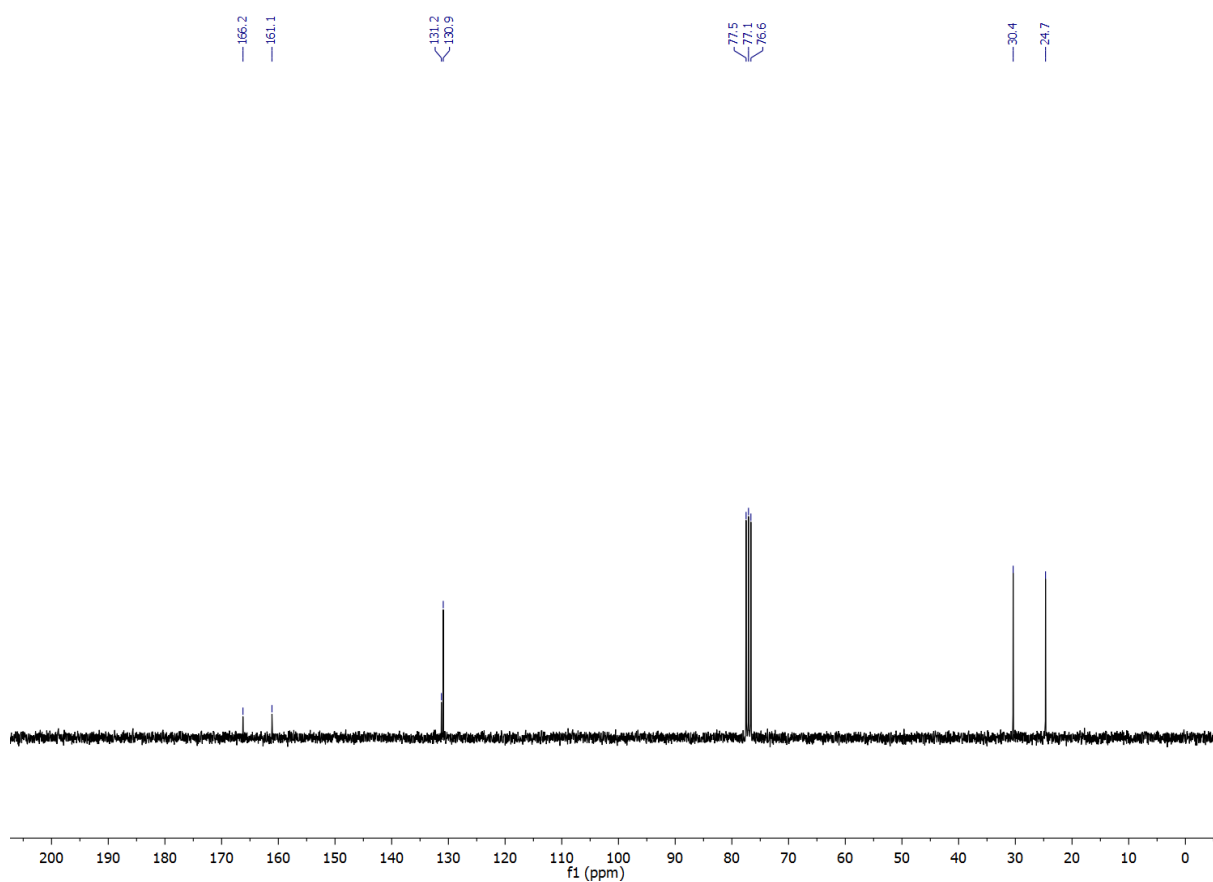


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S25.

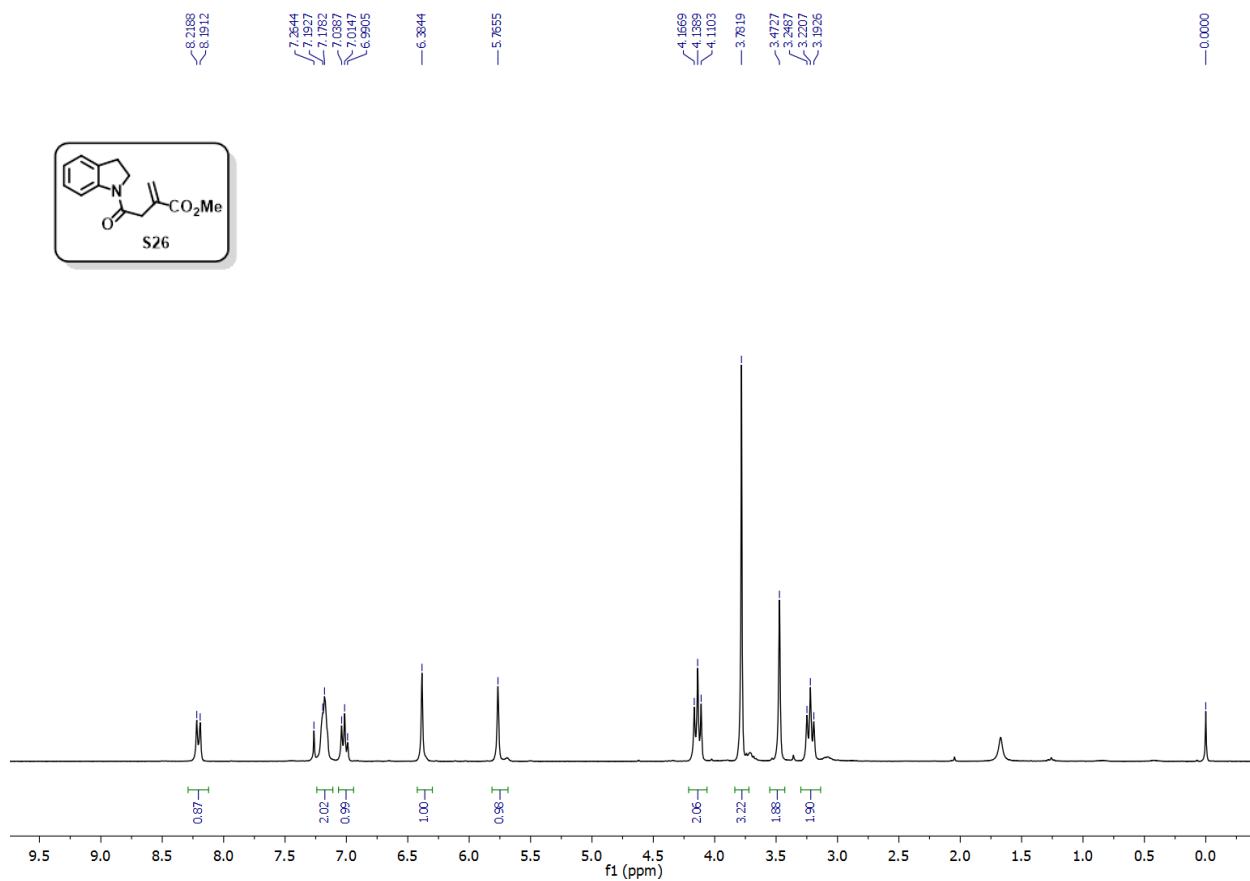
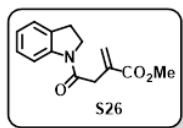


Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S26.

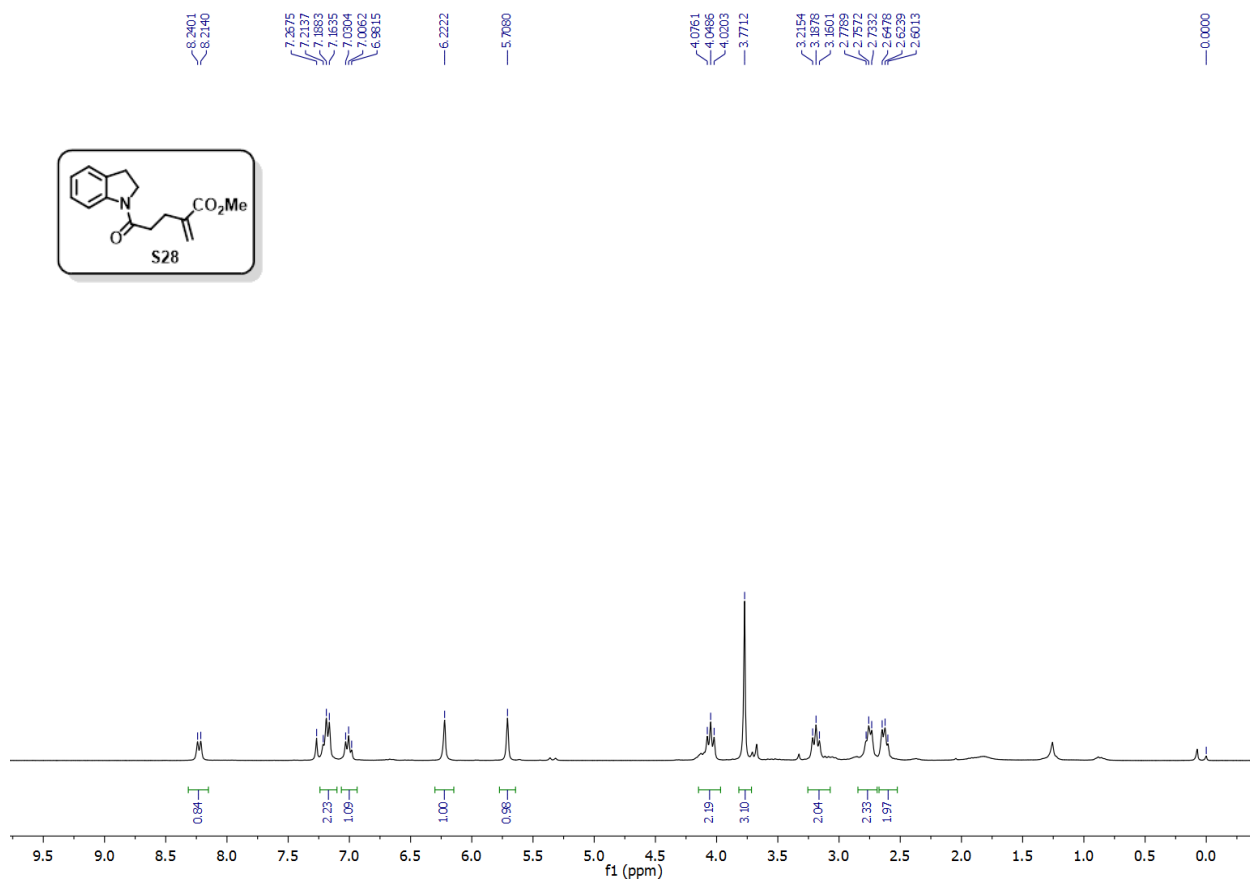
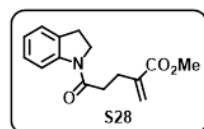


Figura 68: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S28.

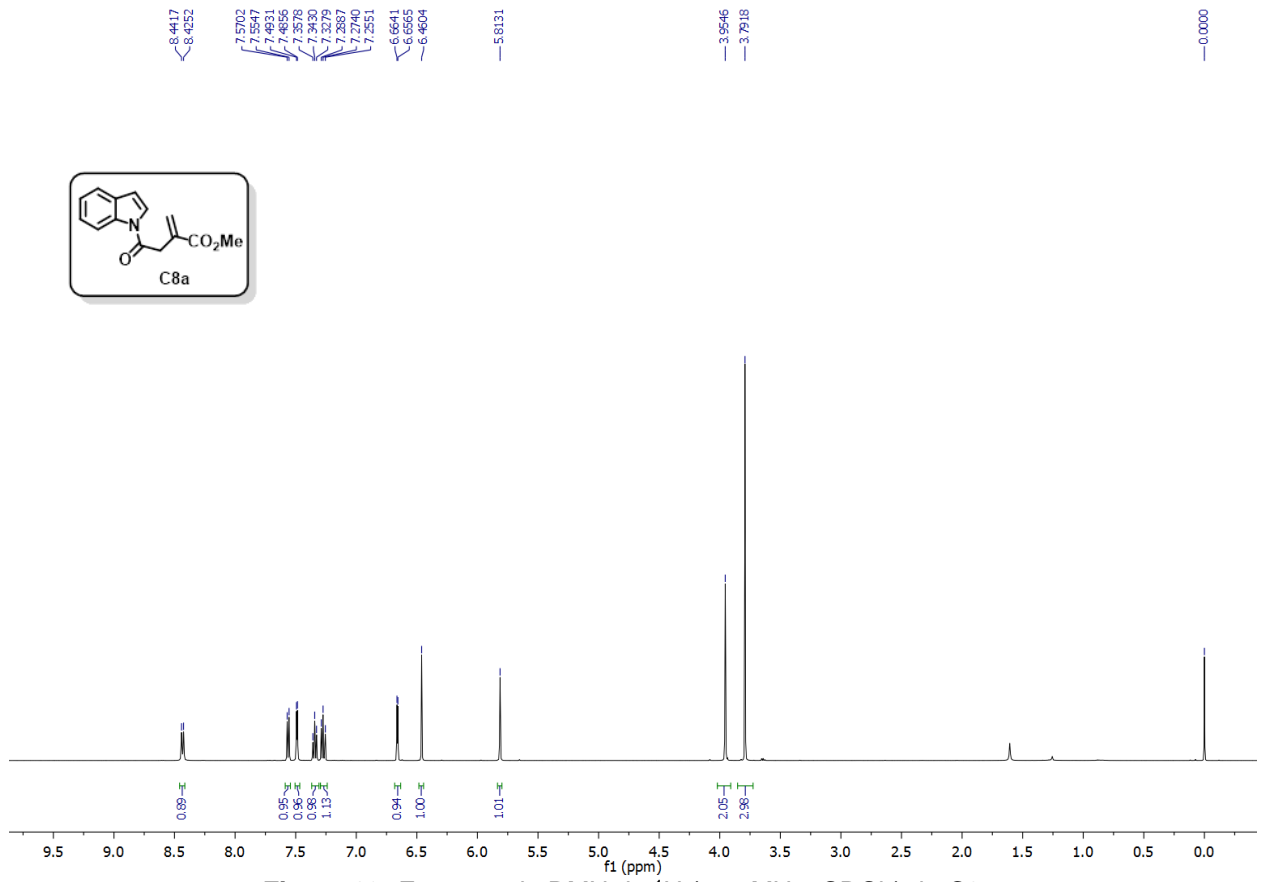


Figura 69: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C8a.

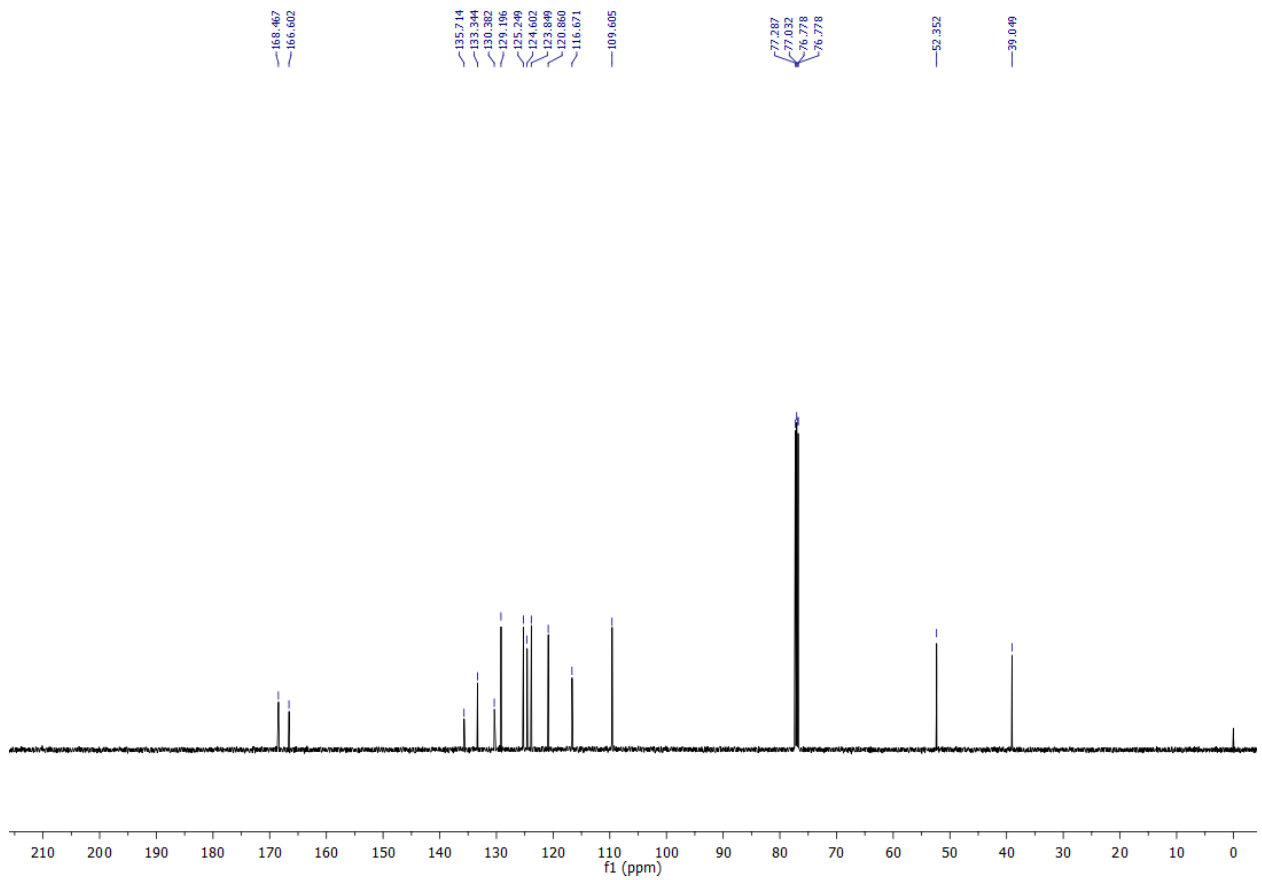


Figura 70: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de C8a.

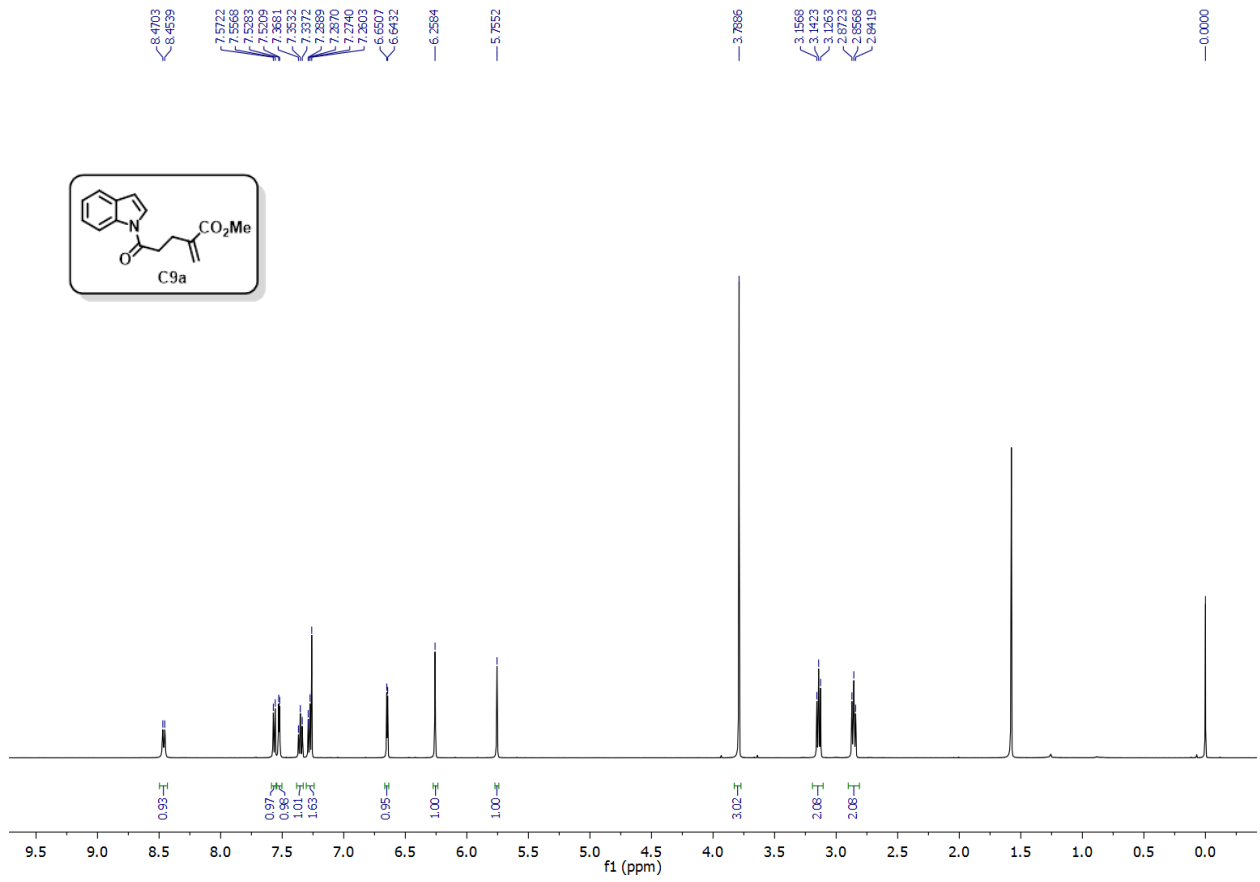


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de C9a.

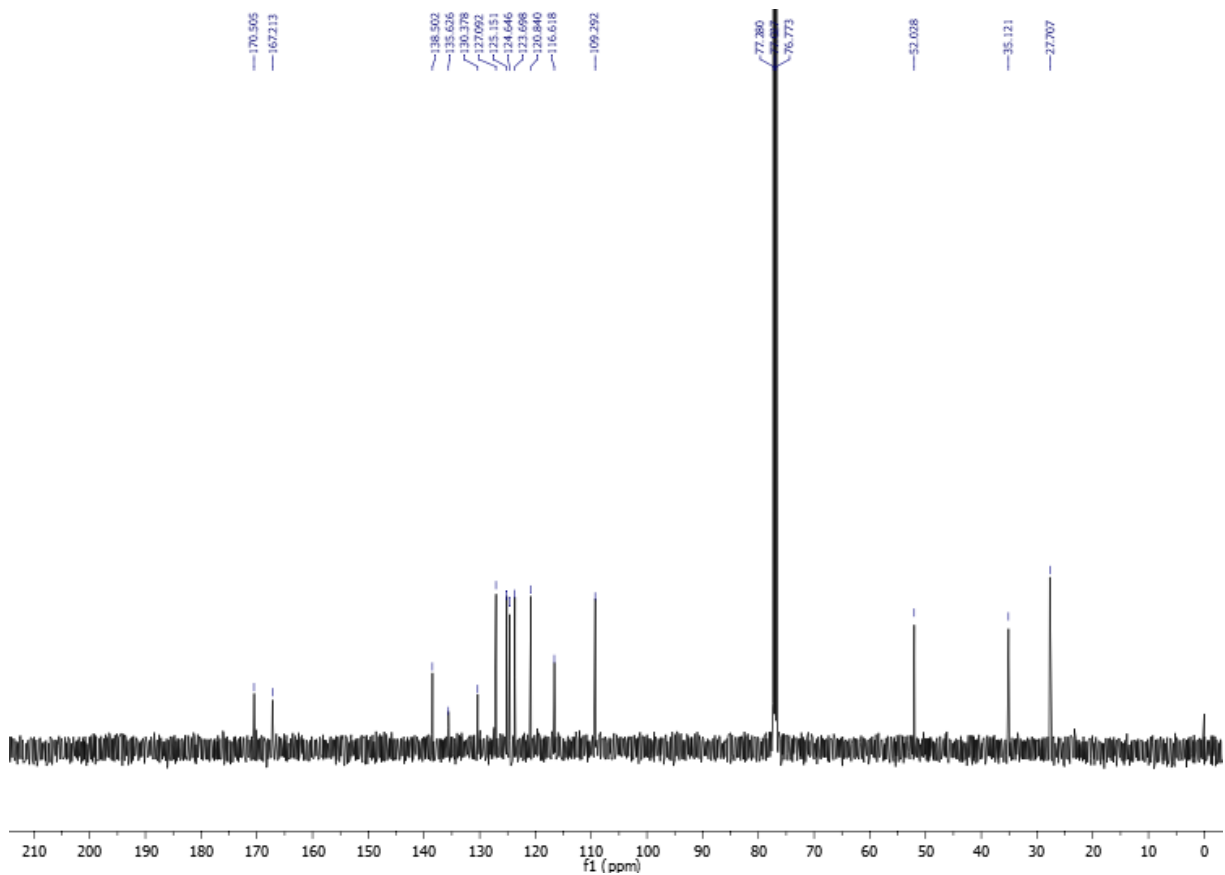


Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de C9a.

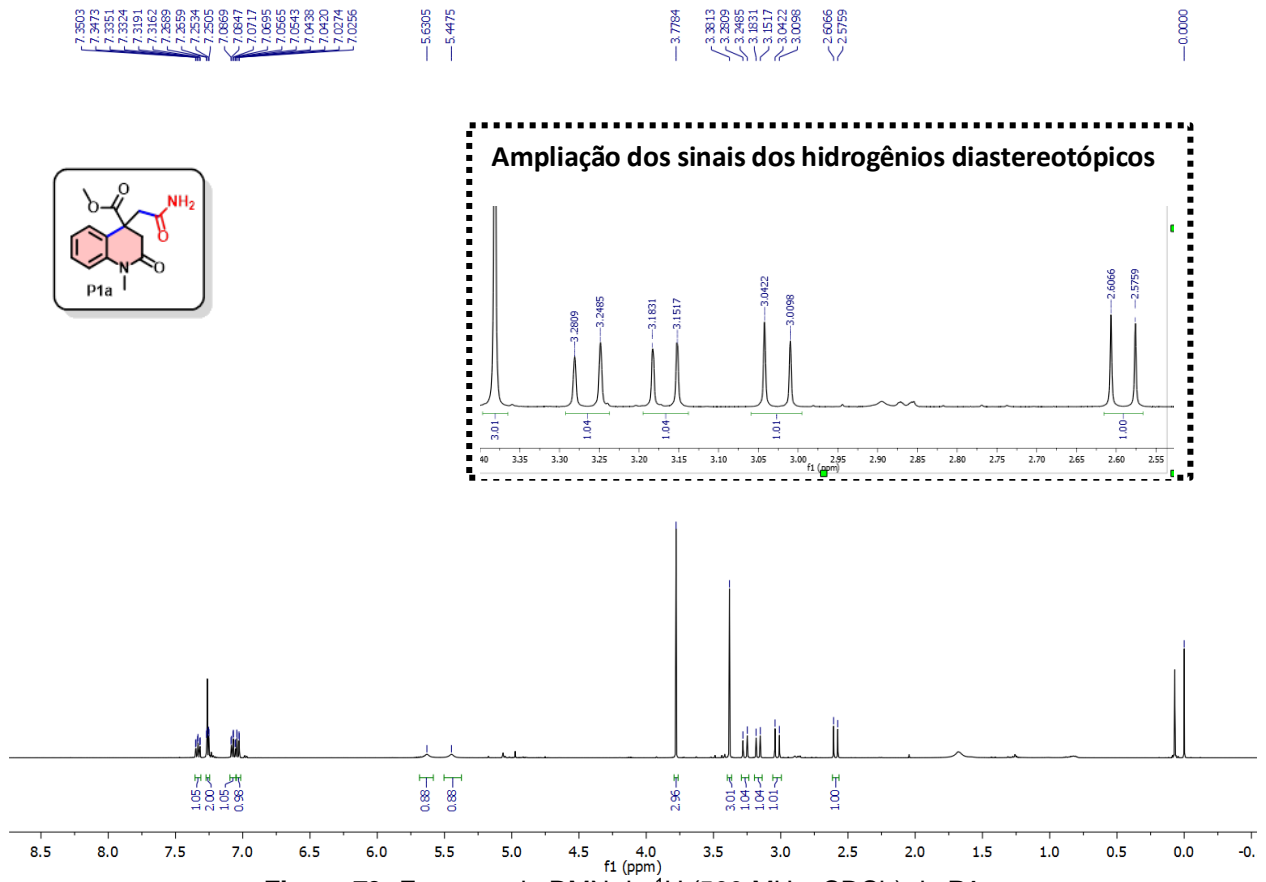


Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P1a.

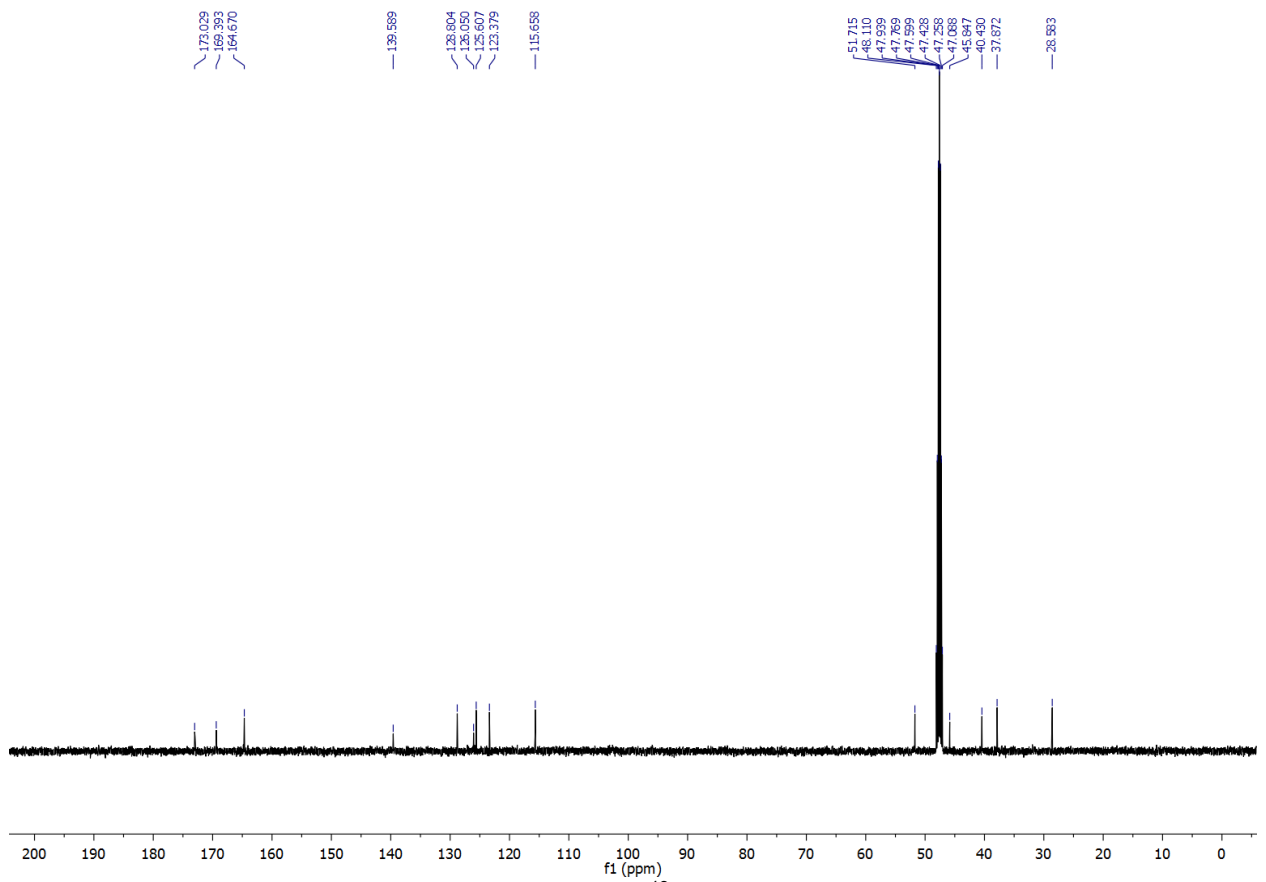


Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P1a.

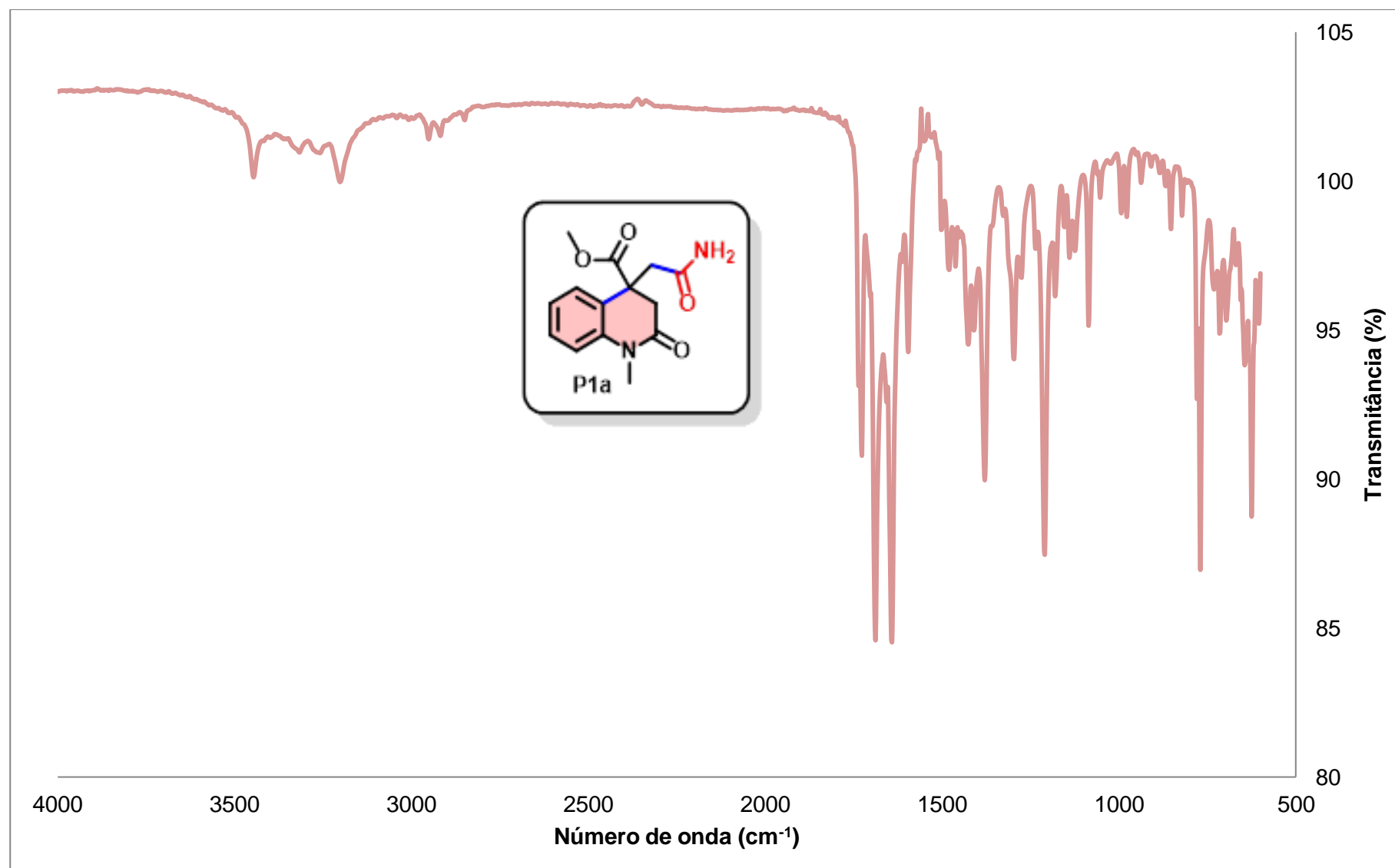


Figura 75:Espectro de IV (puro) do composto P1a.

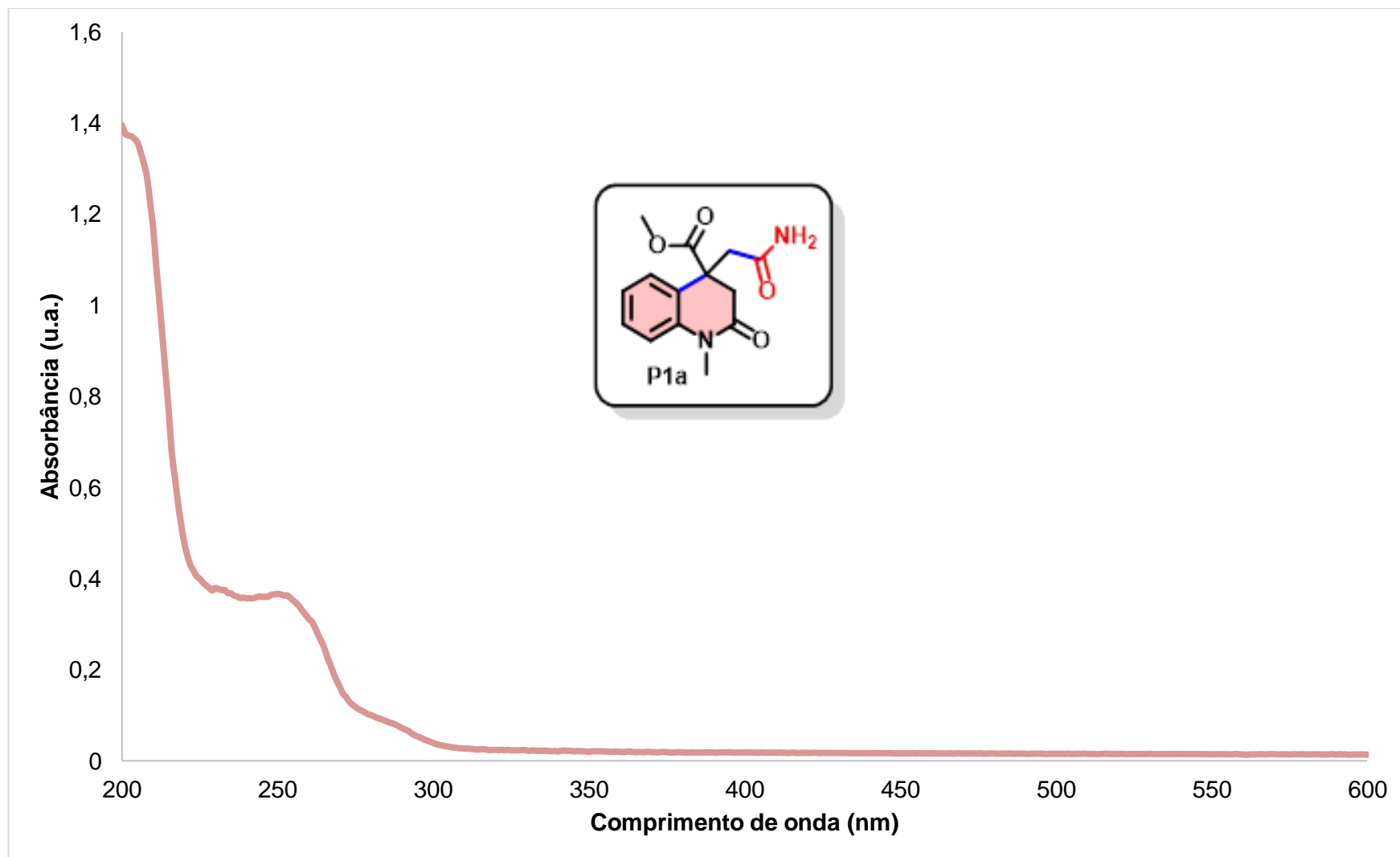


Figura 76: Espectro de absorção de P1a em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$

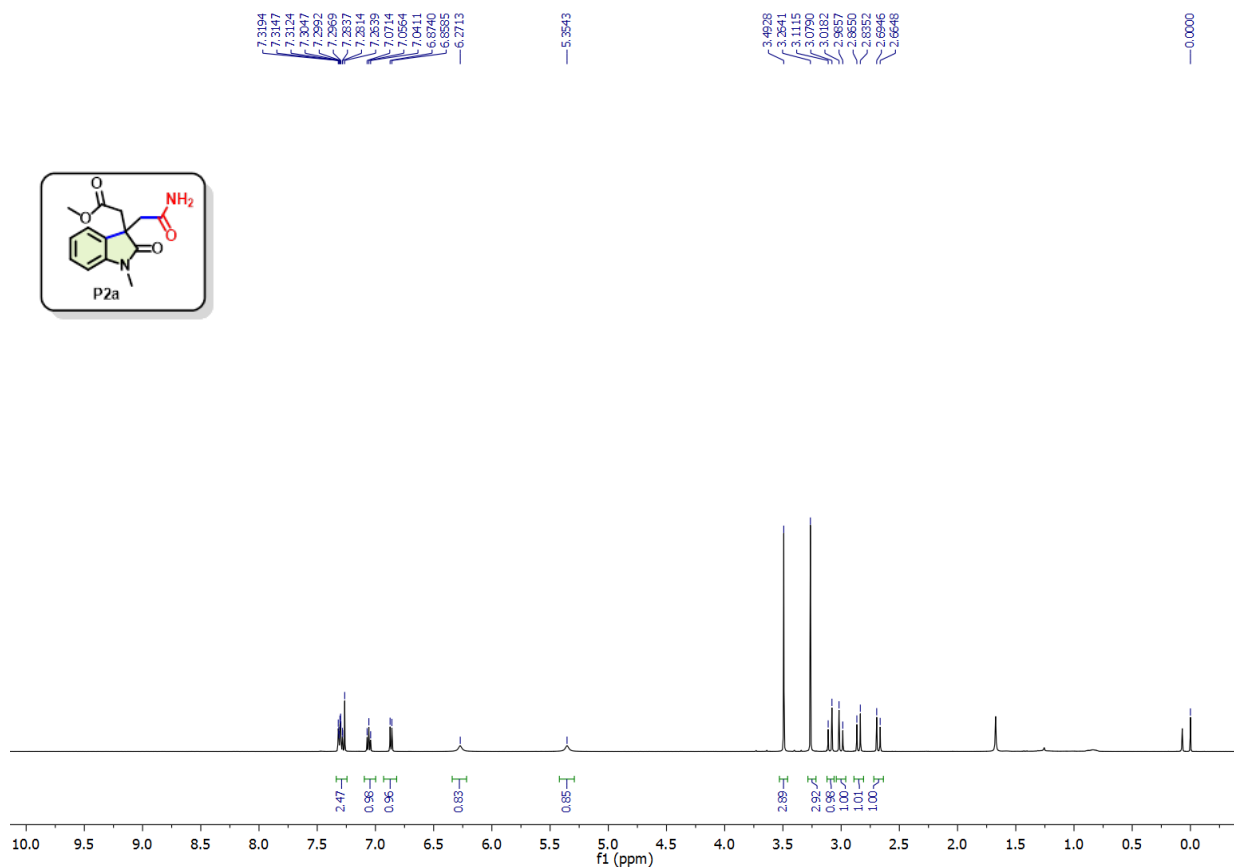


Figura 77: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de P2a.

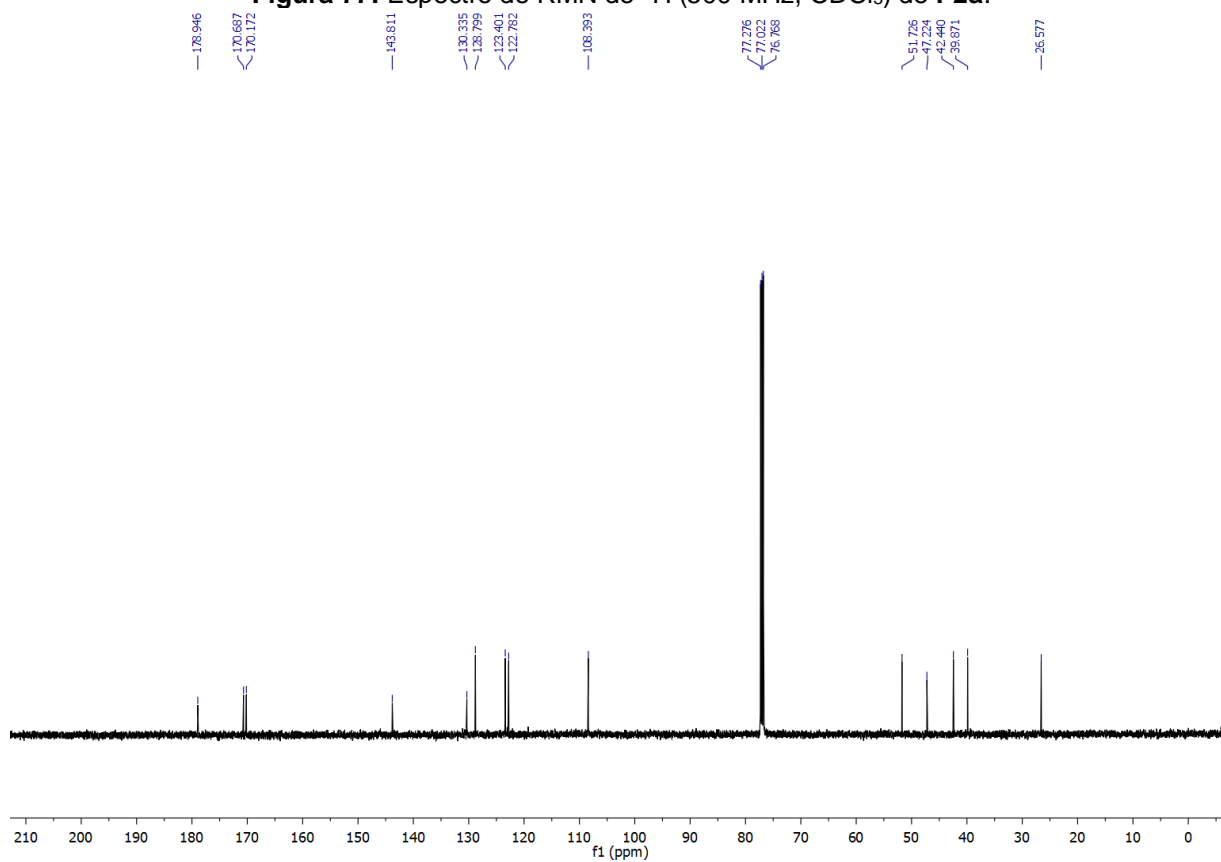


Figura 78: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de P2a.

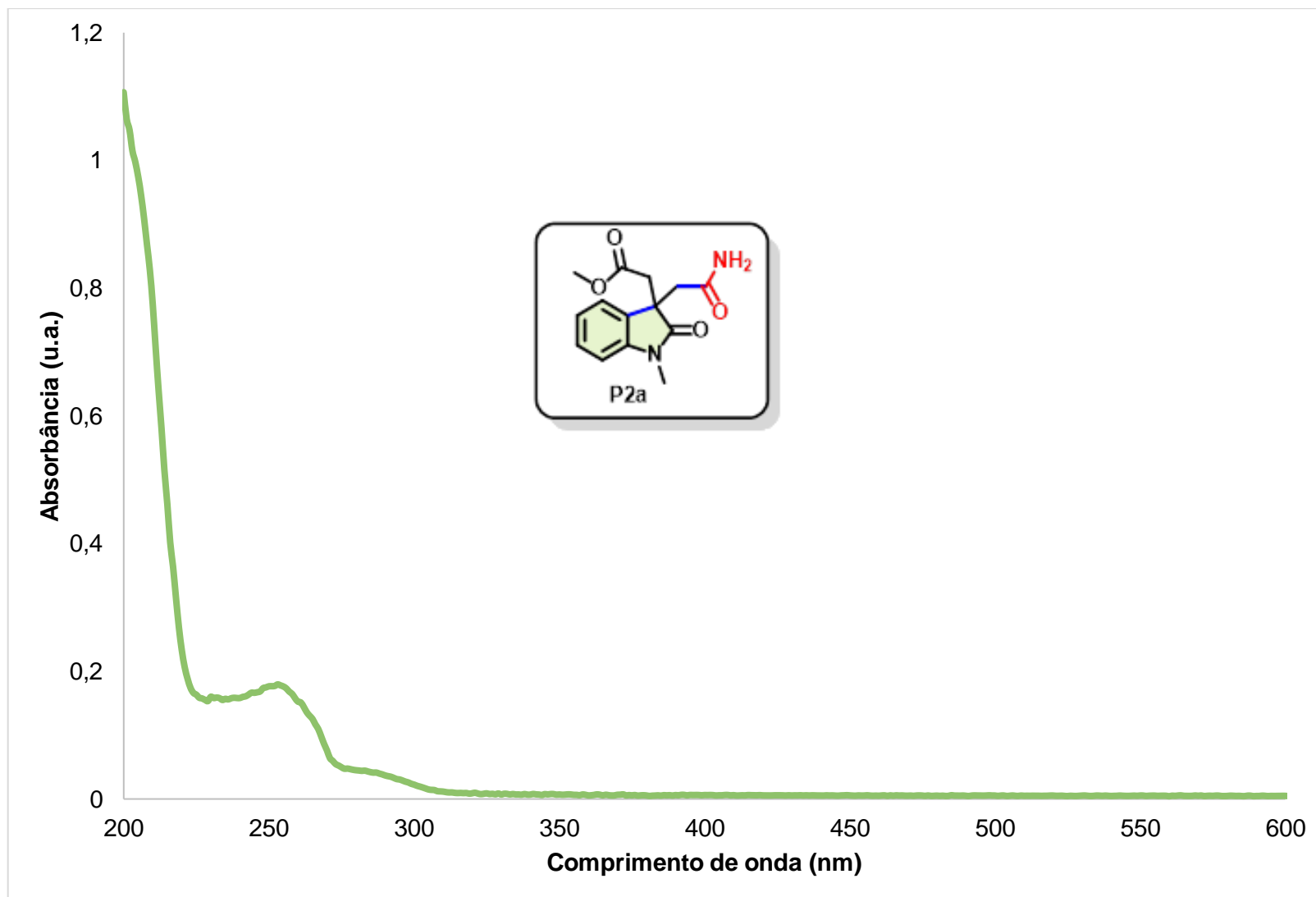


Figura 79: Espectro de absorção de P2a em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$

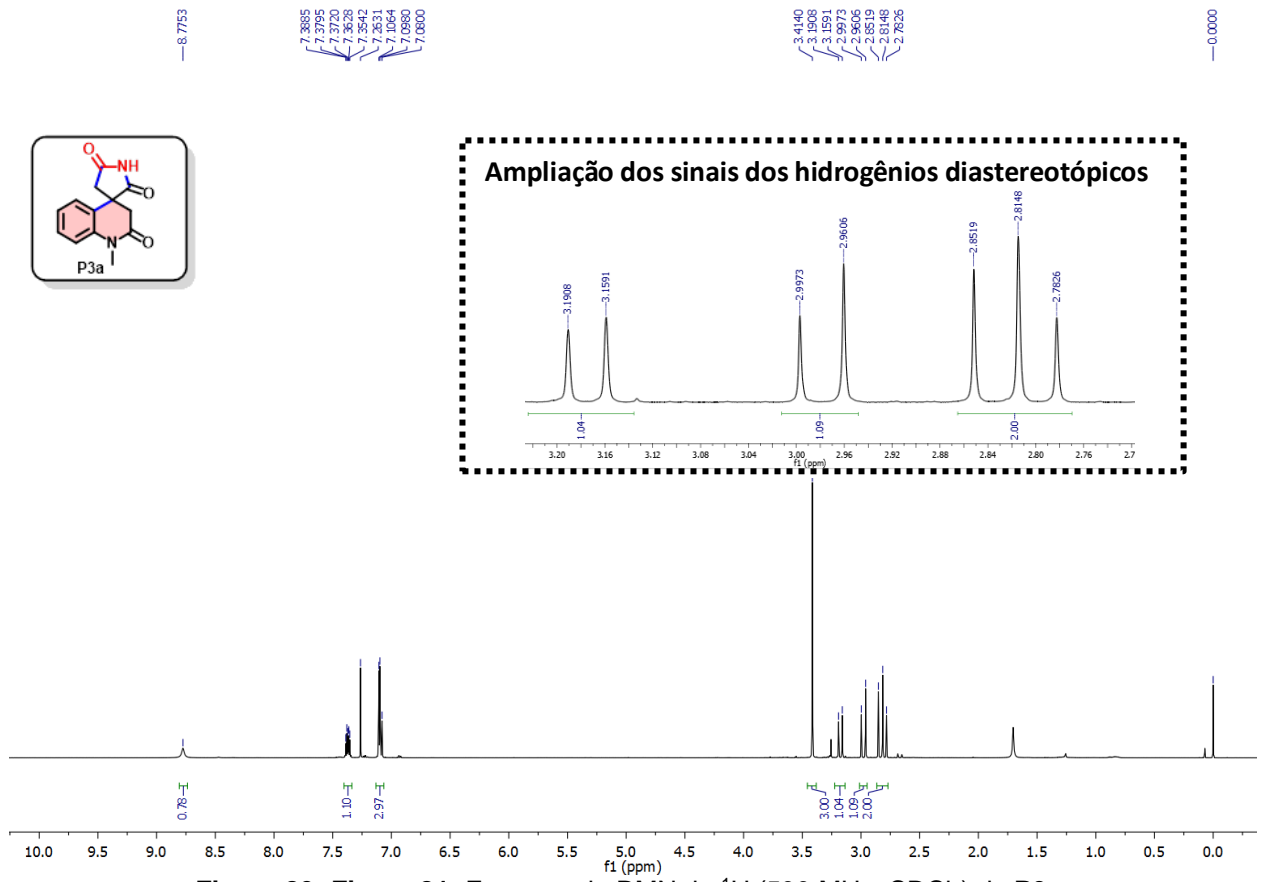


Figura 80: Figura 81: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P3a.

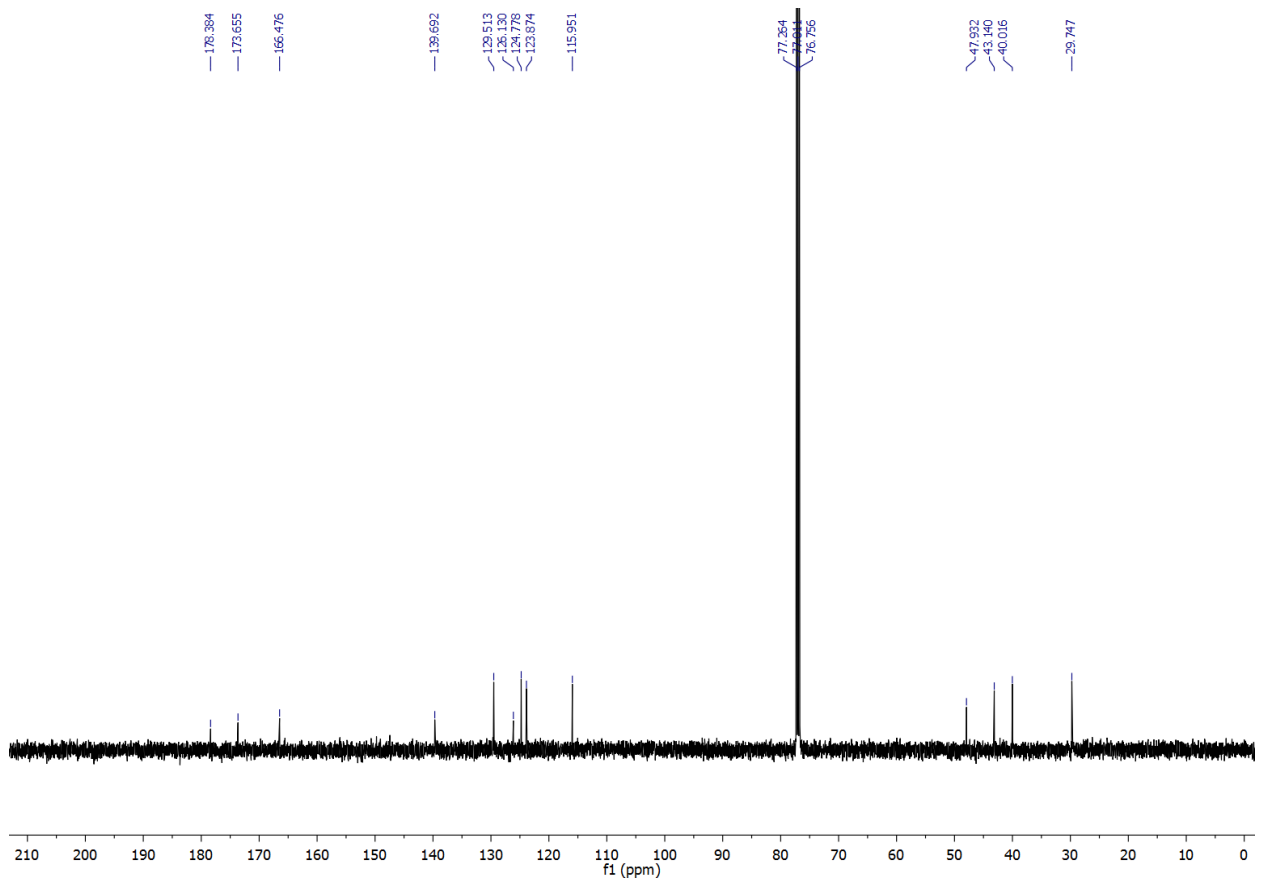


Figura 82: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P3a.

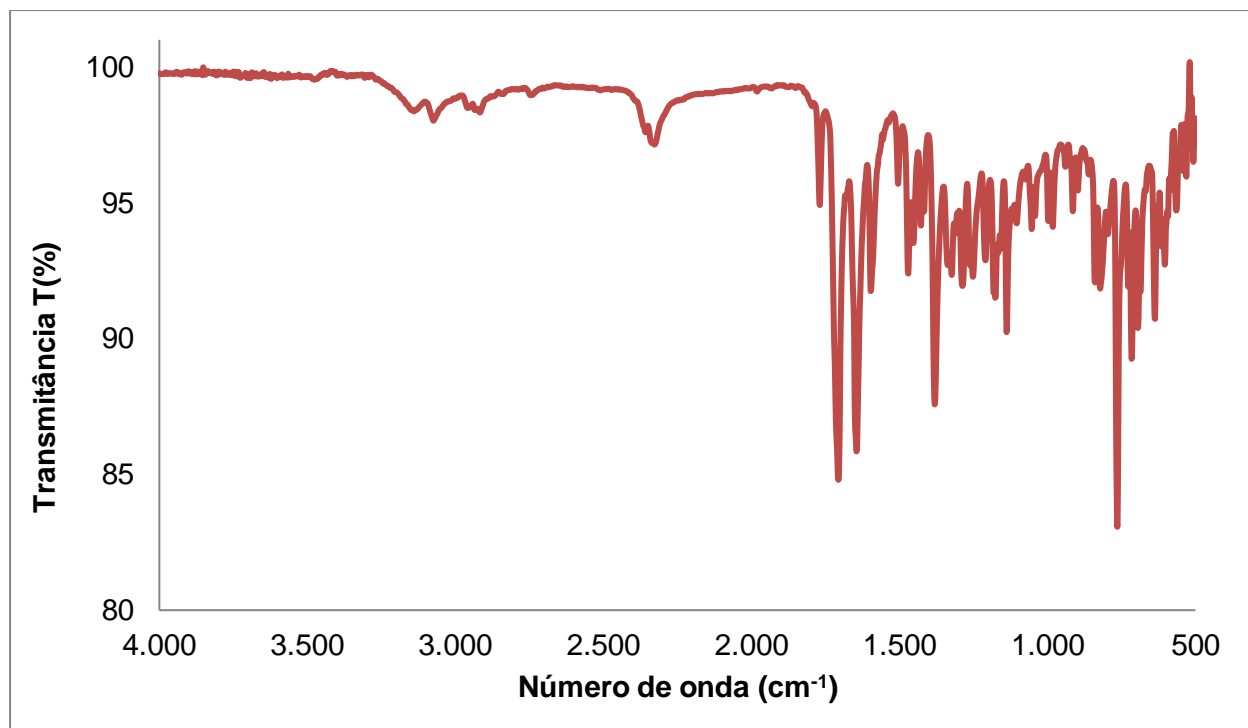


Figura 83: Espectro de IV (puro) do composto P3a.

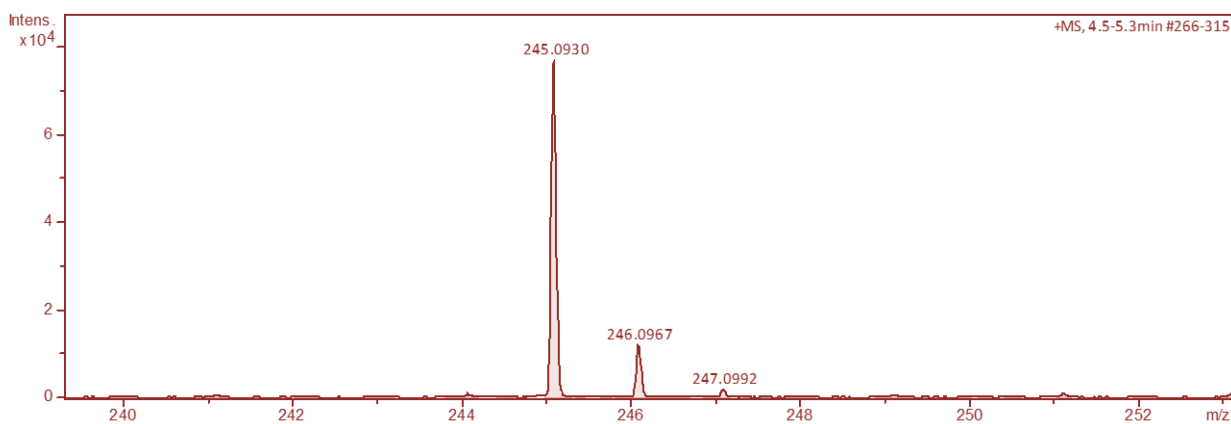
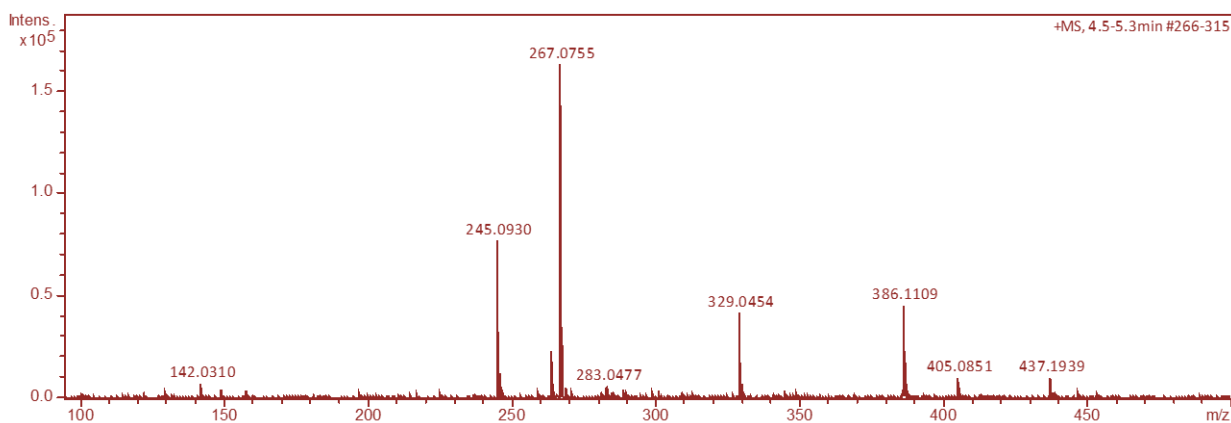


Figura 84: Espectro de EMAR-ESI (infusão direta, DCM e diluída em MeOH 0,1% ácido fórmico) do composto P3a.

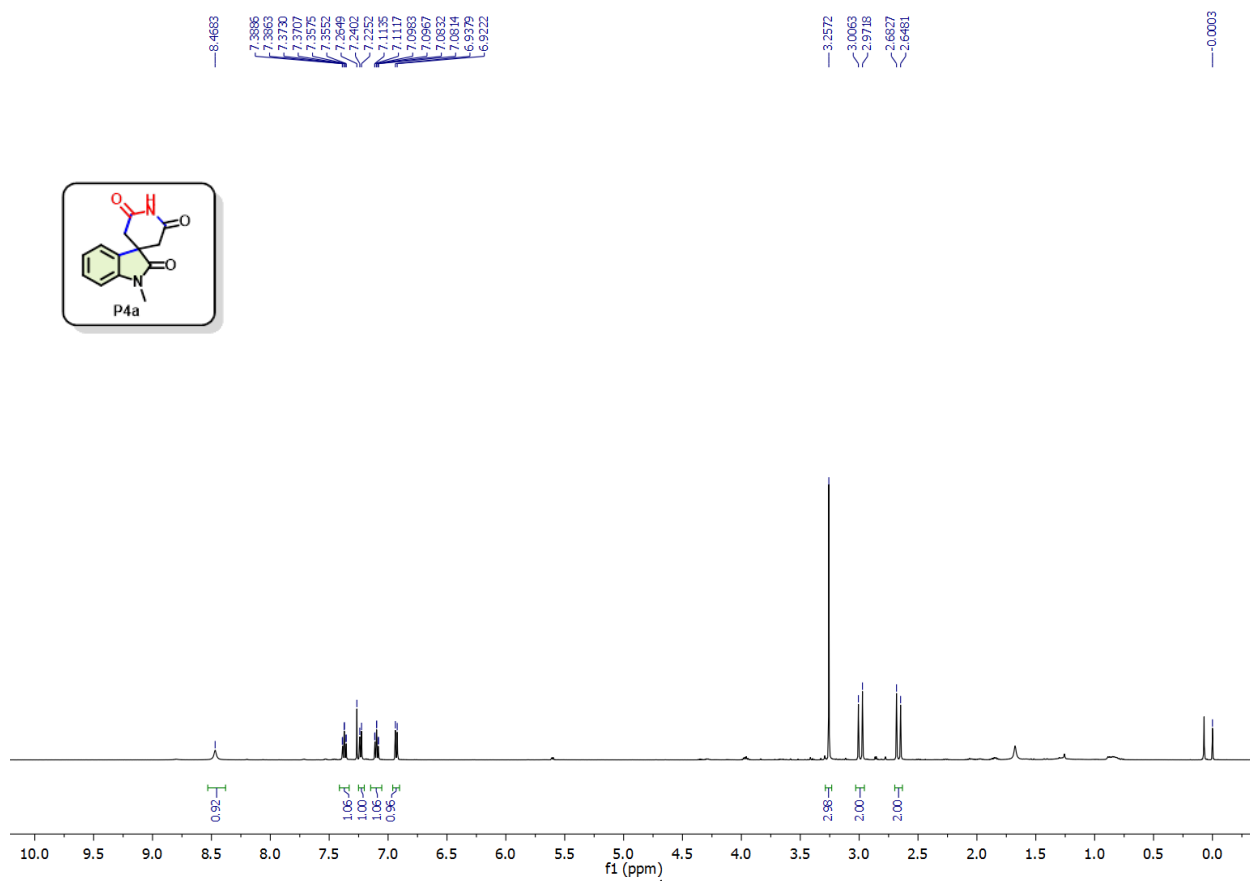


Figura 85: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P4a.

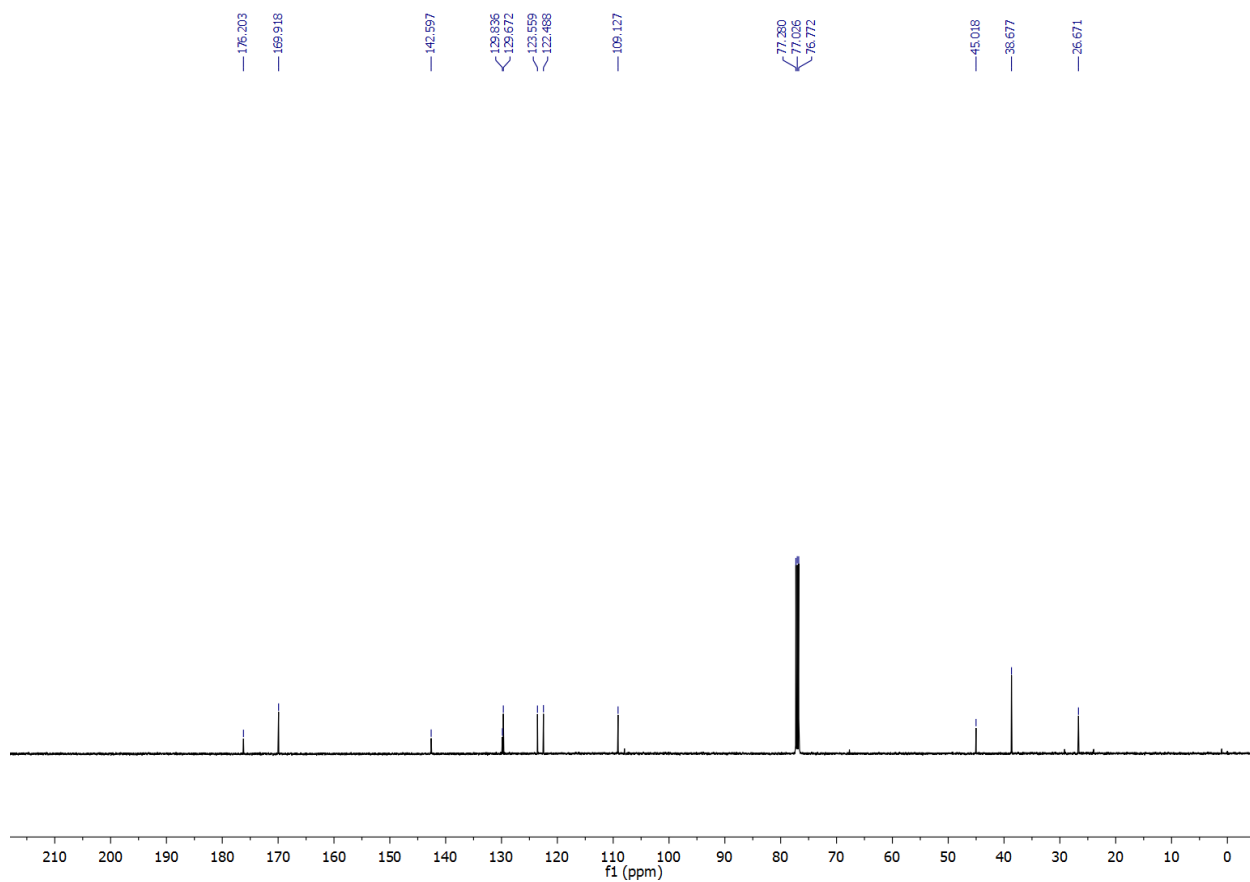


Figura 86: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P4a.

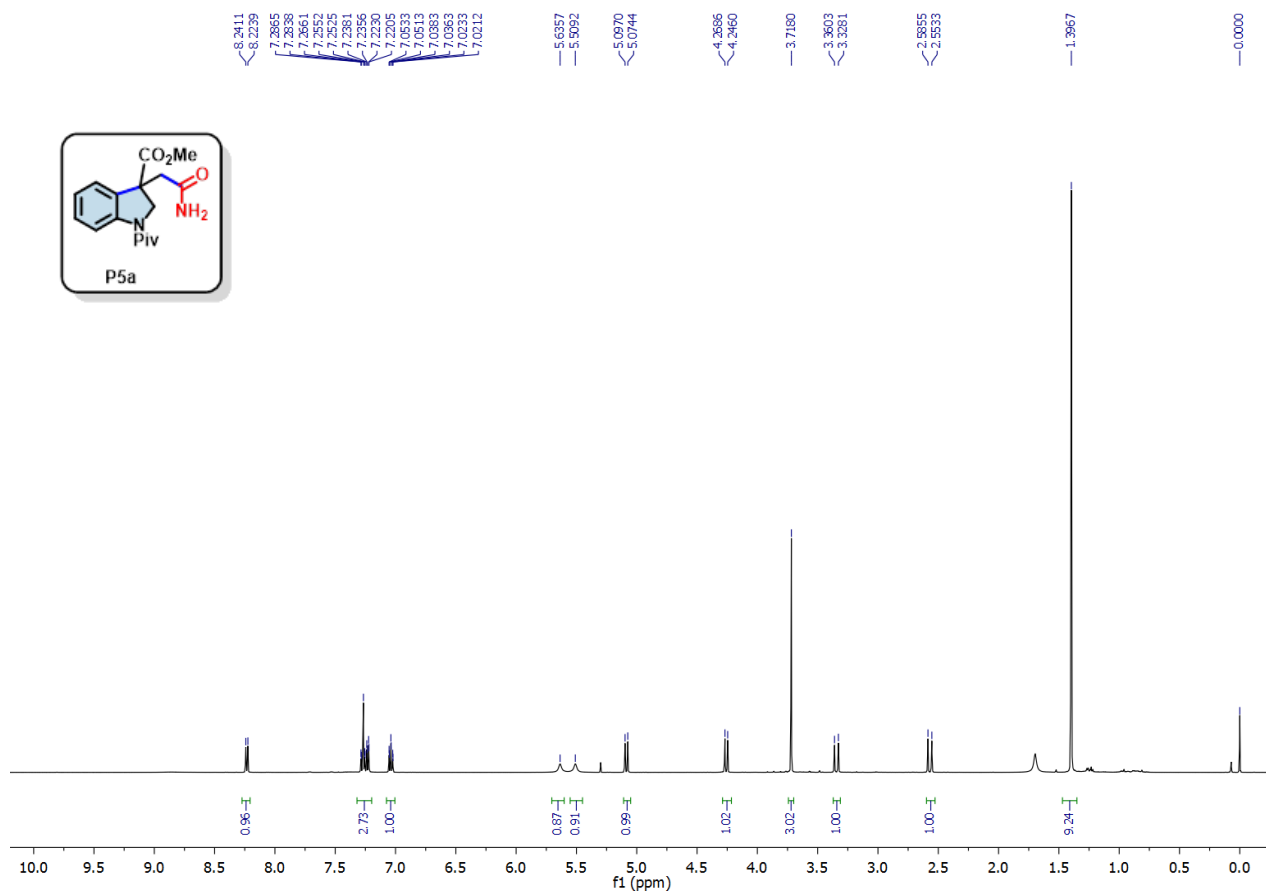


Figura 87: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P5a.

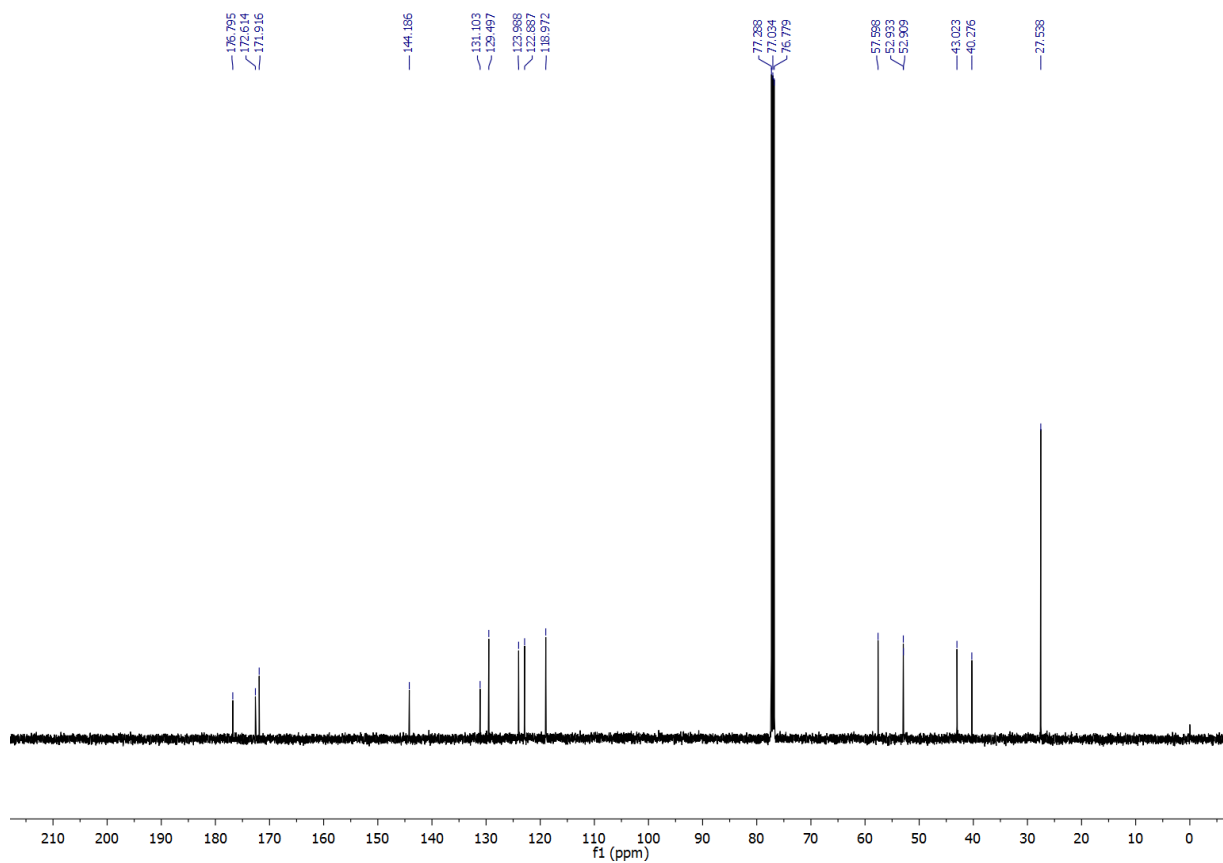


Figura 88: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P5a.

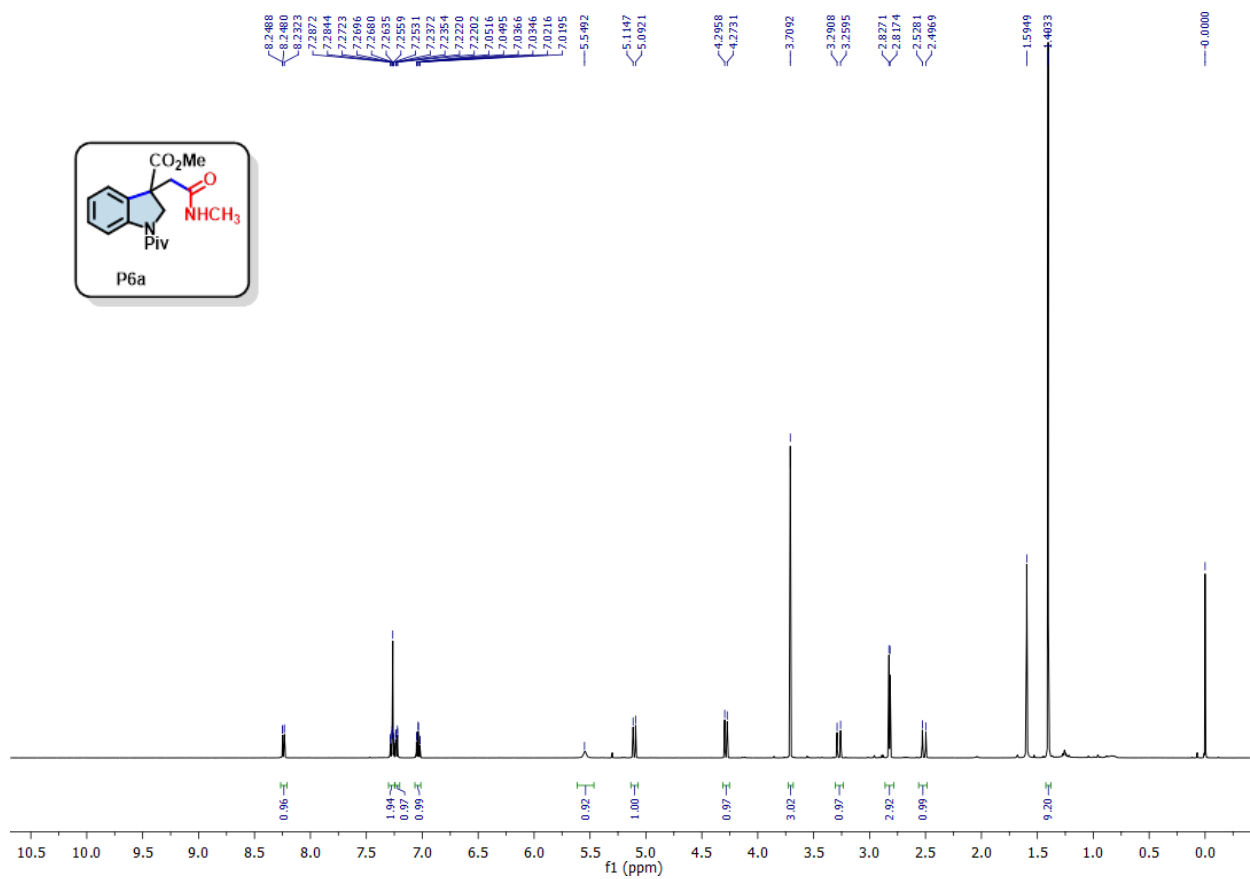


Figura 89: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de P6a.

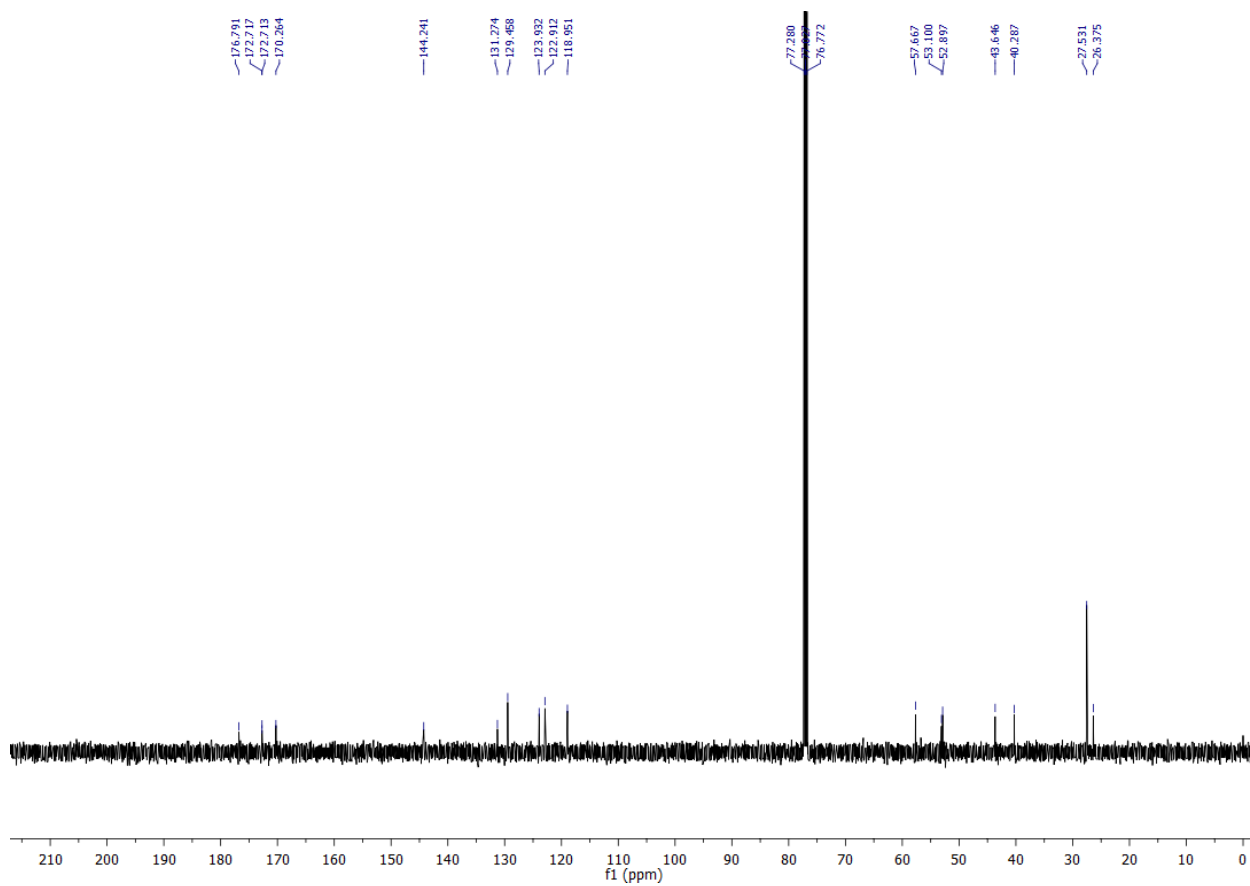


Figura 90: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de P6a.

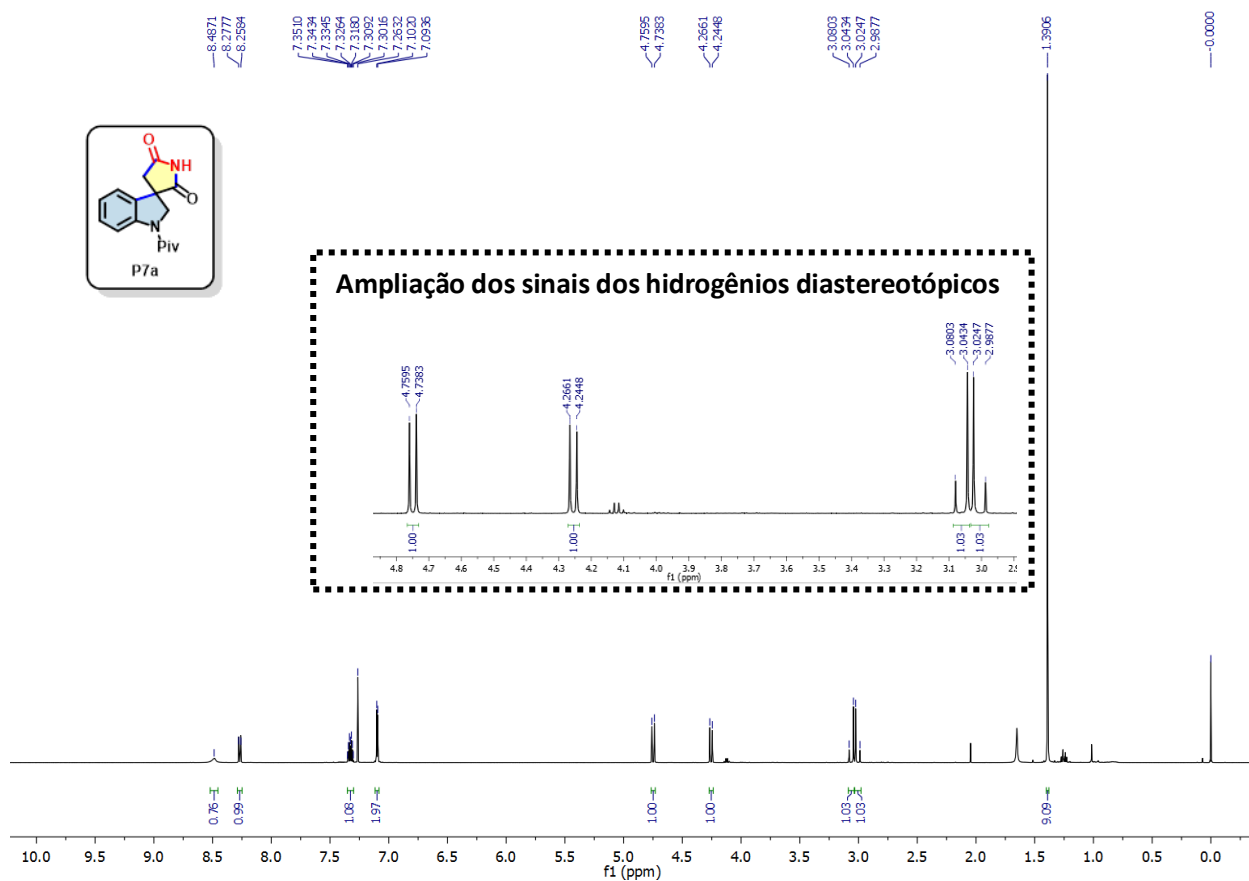


Figura 91: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P7a.

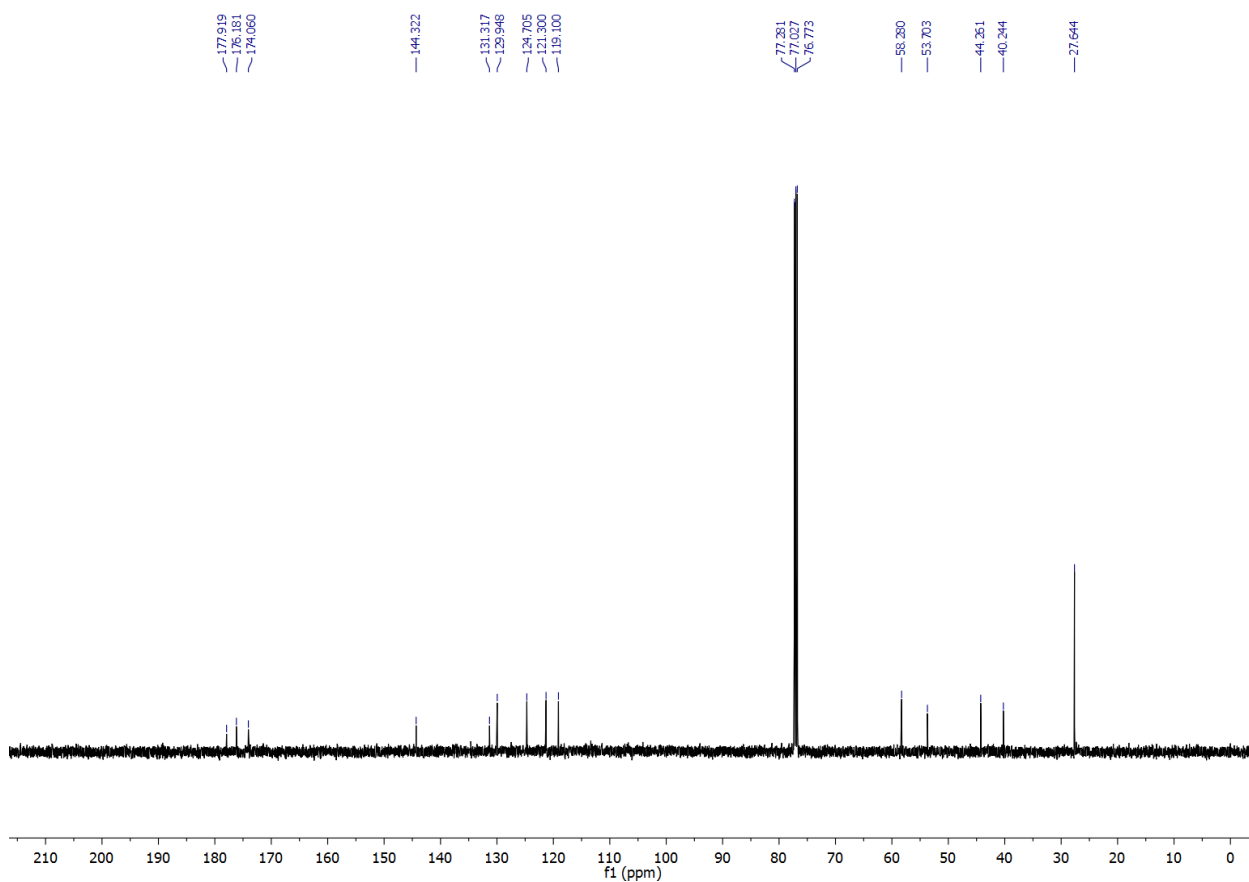


Figura 92: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P7a.

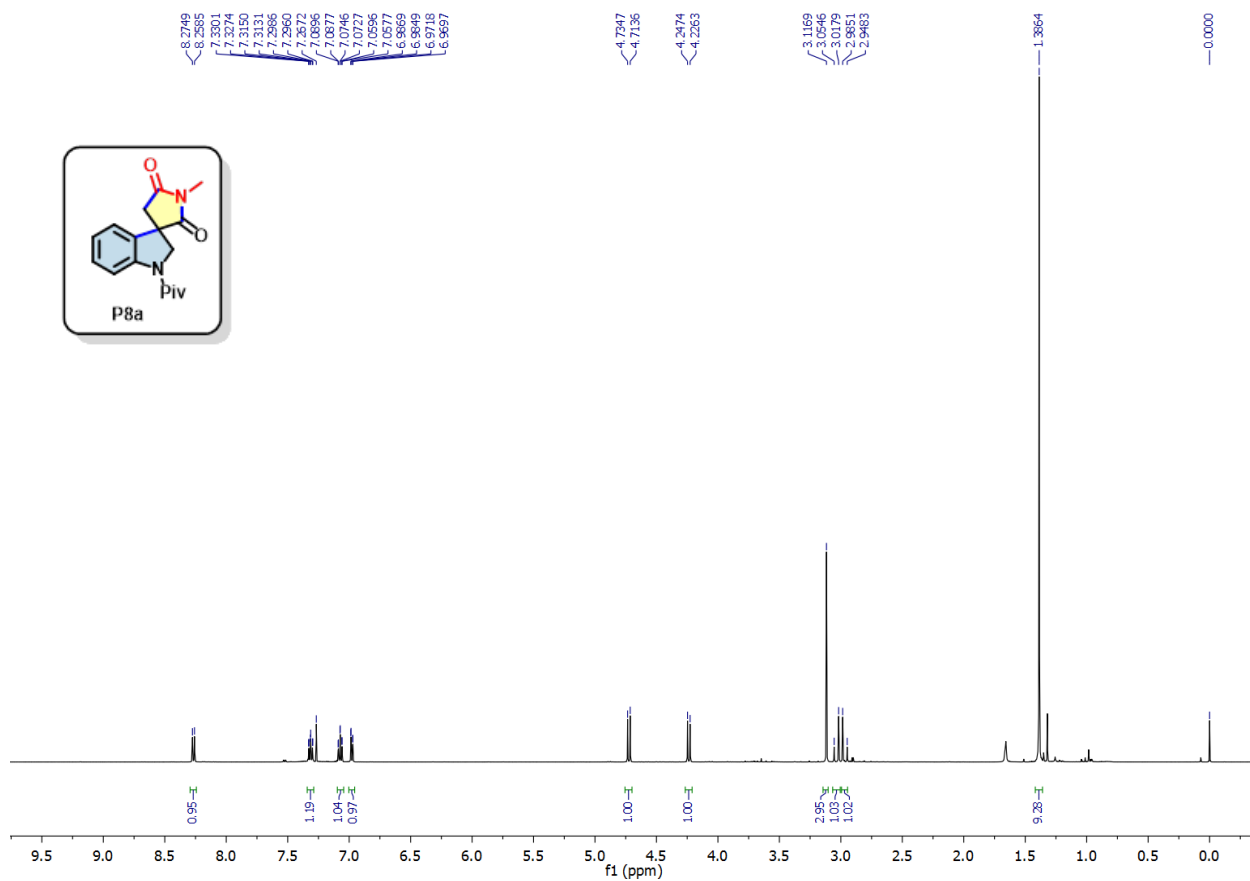


Figura 93: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P8a.

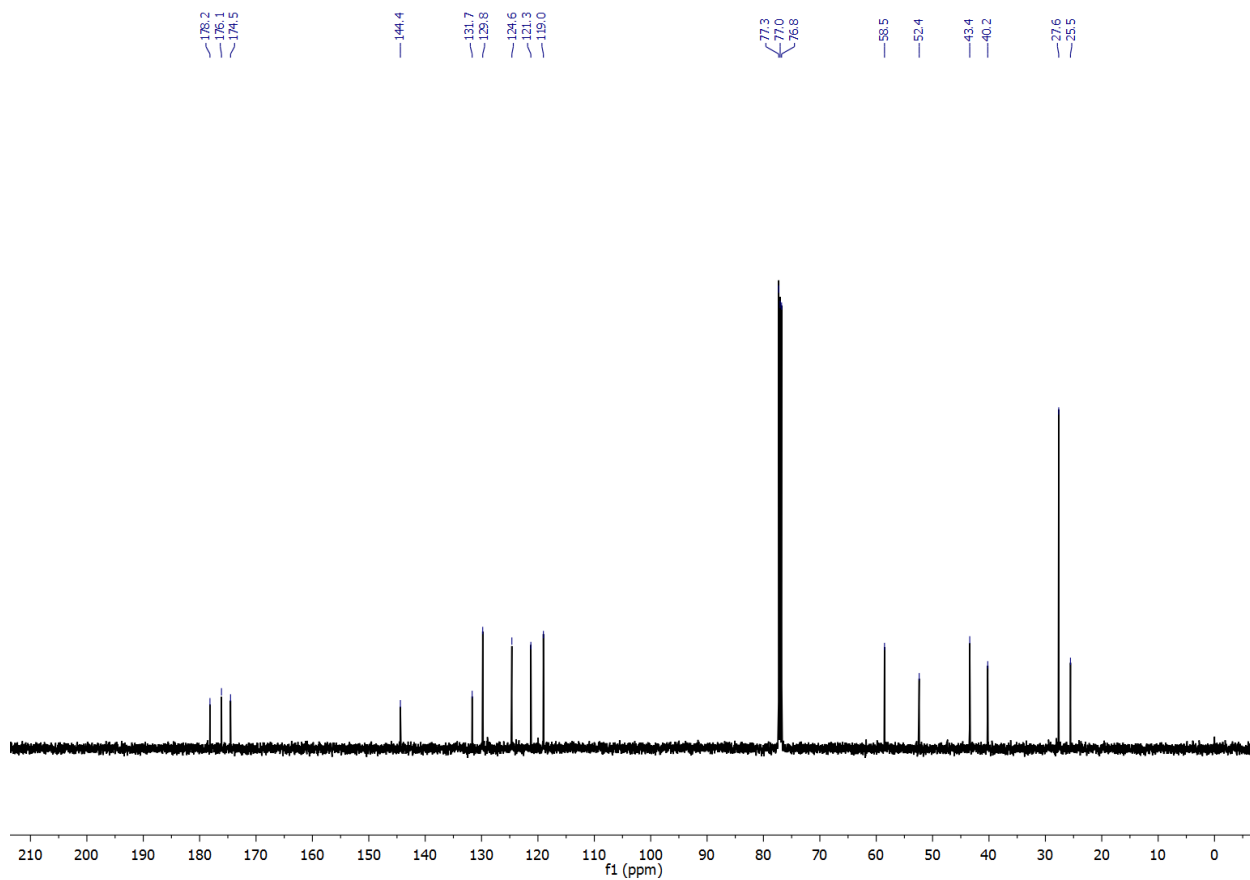


Figura 94: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P8a.

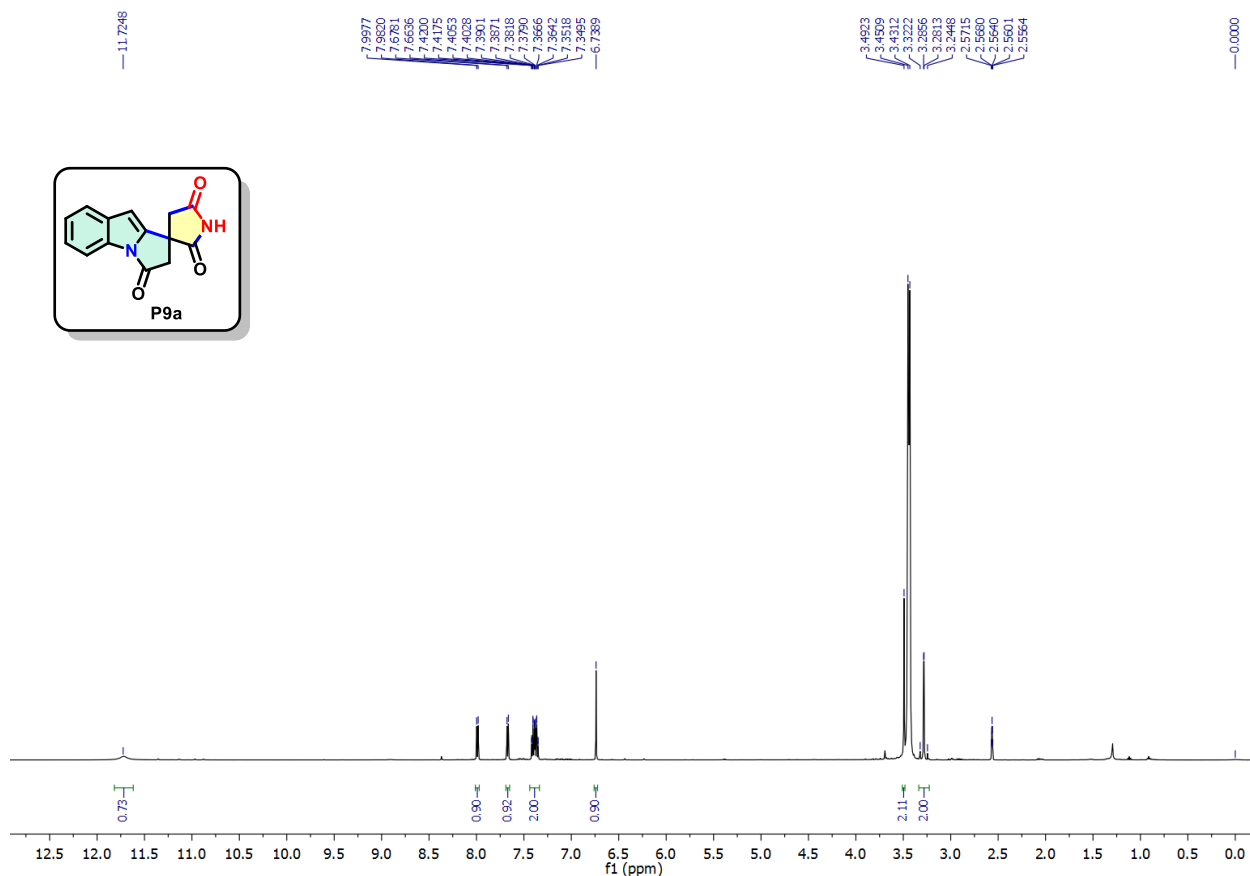


Figura 95: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO) de P9a.

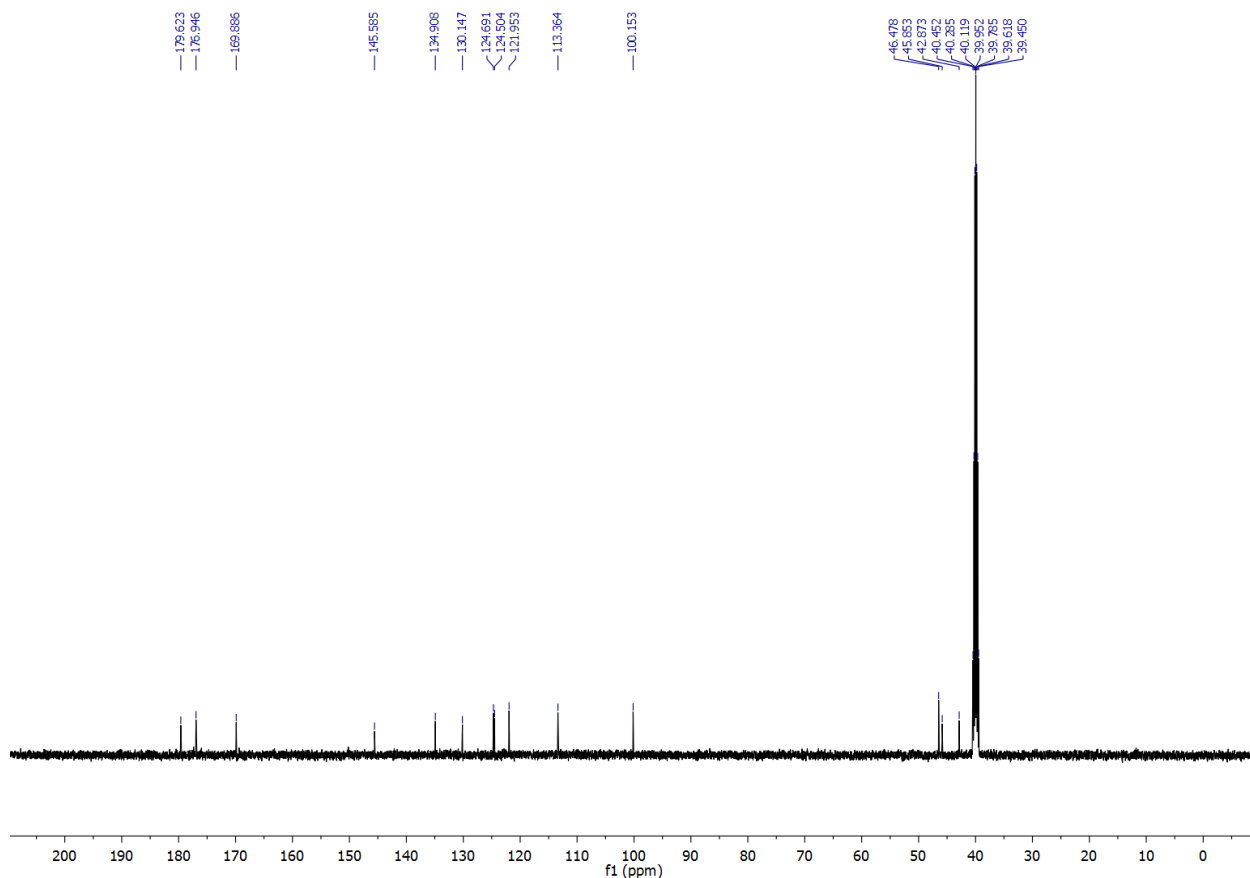


Figura 96: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, (CD₃)₂SO) de P9a.

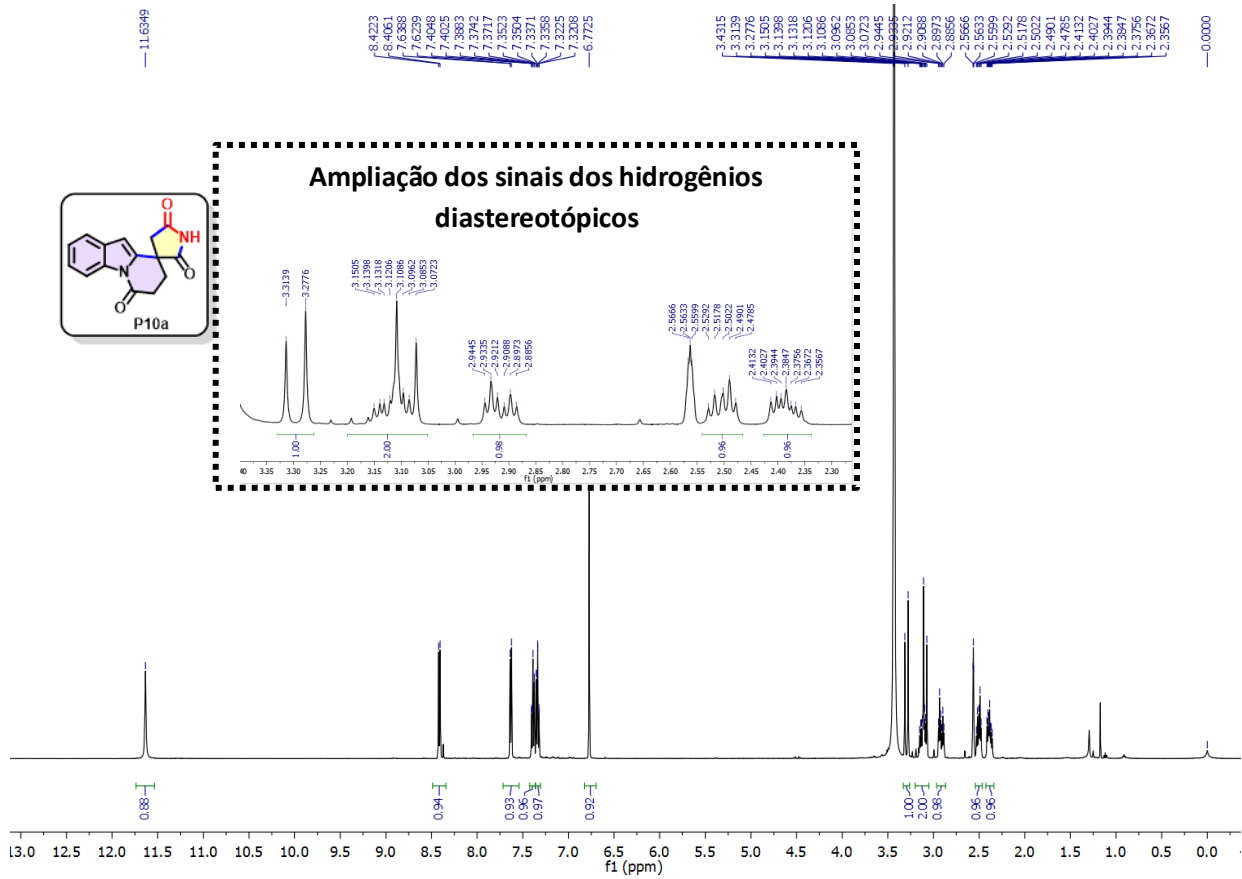


Figura 97: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P10a.

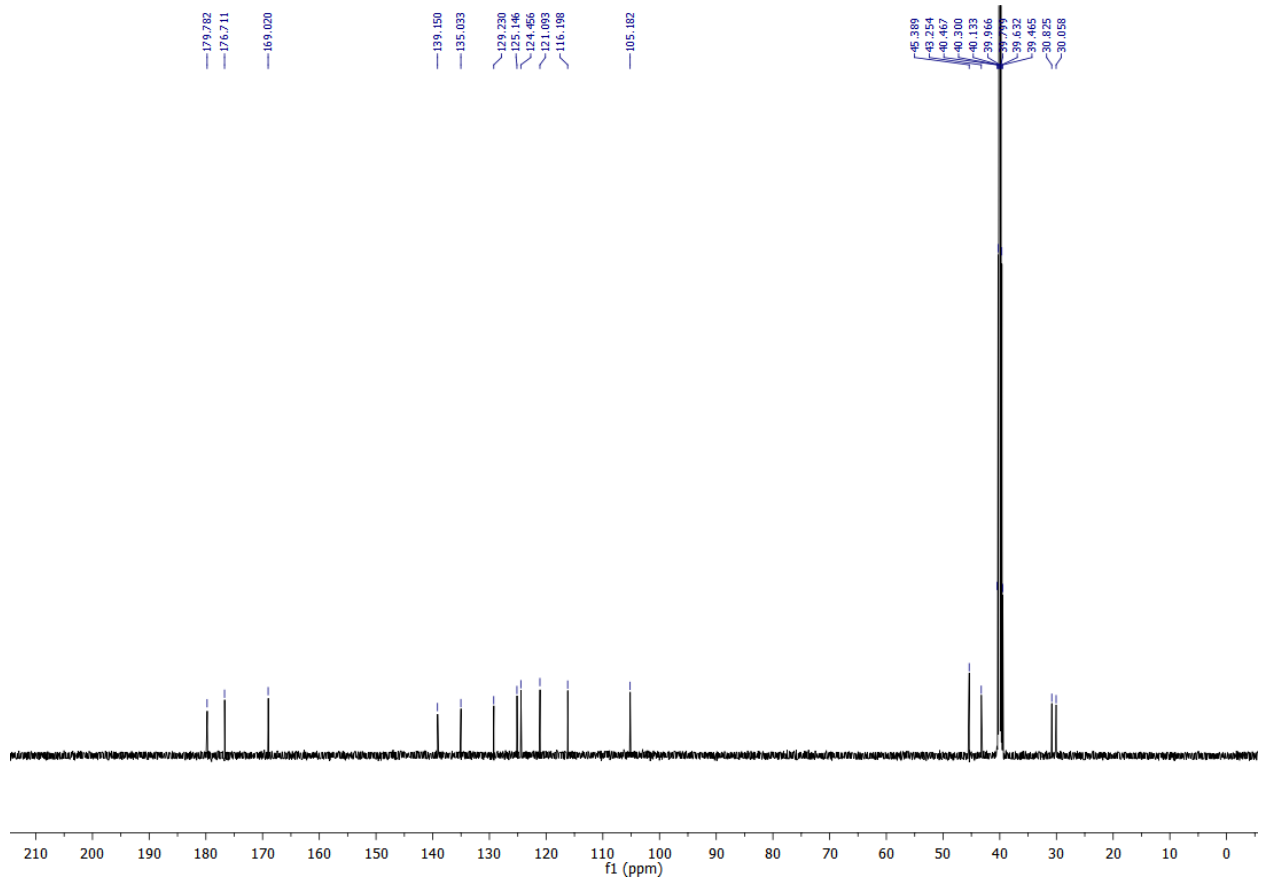


Figura 98: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de P10a.

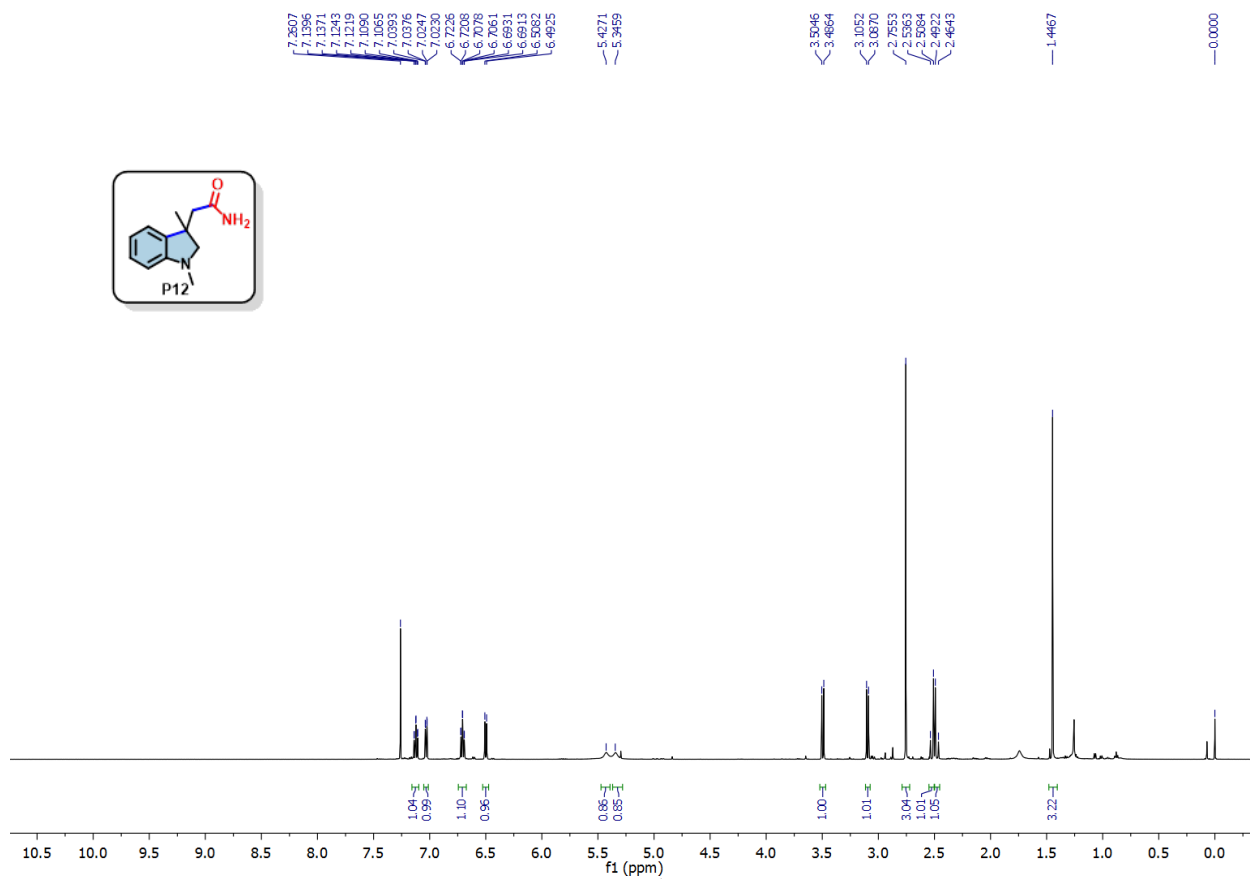


Figura 99: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P12.

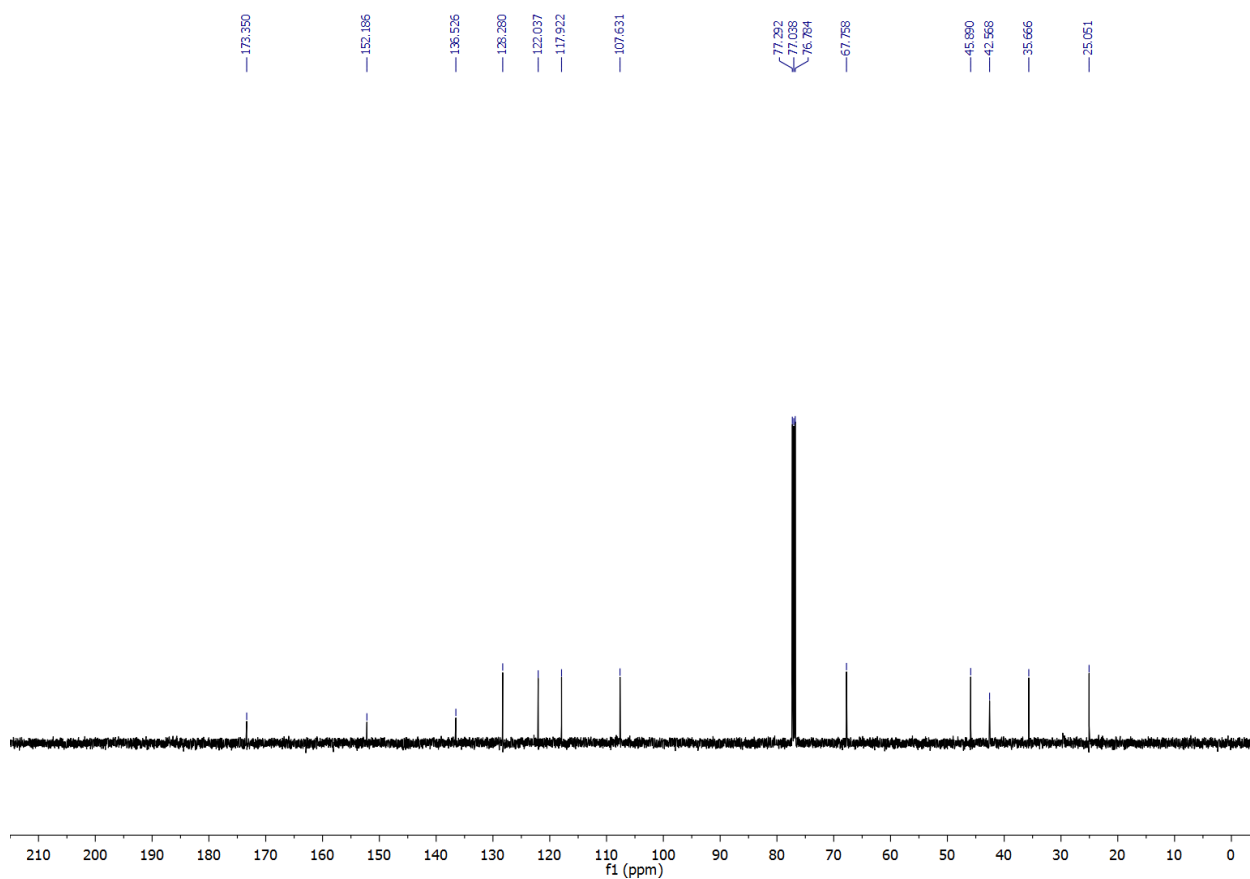


Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de P12.

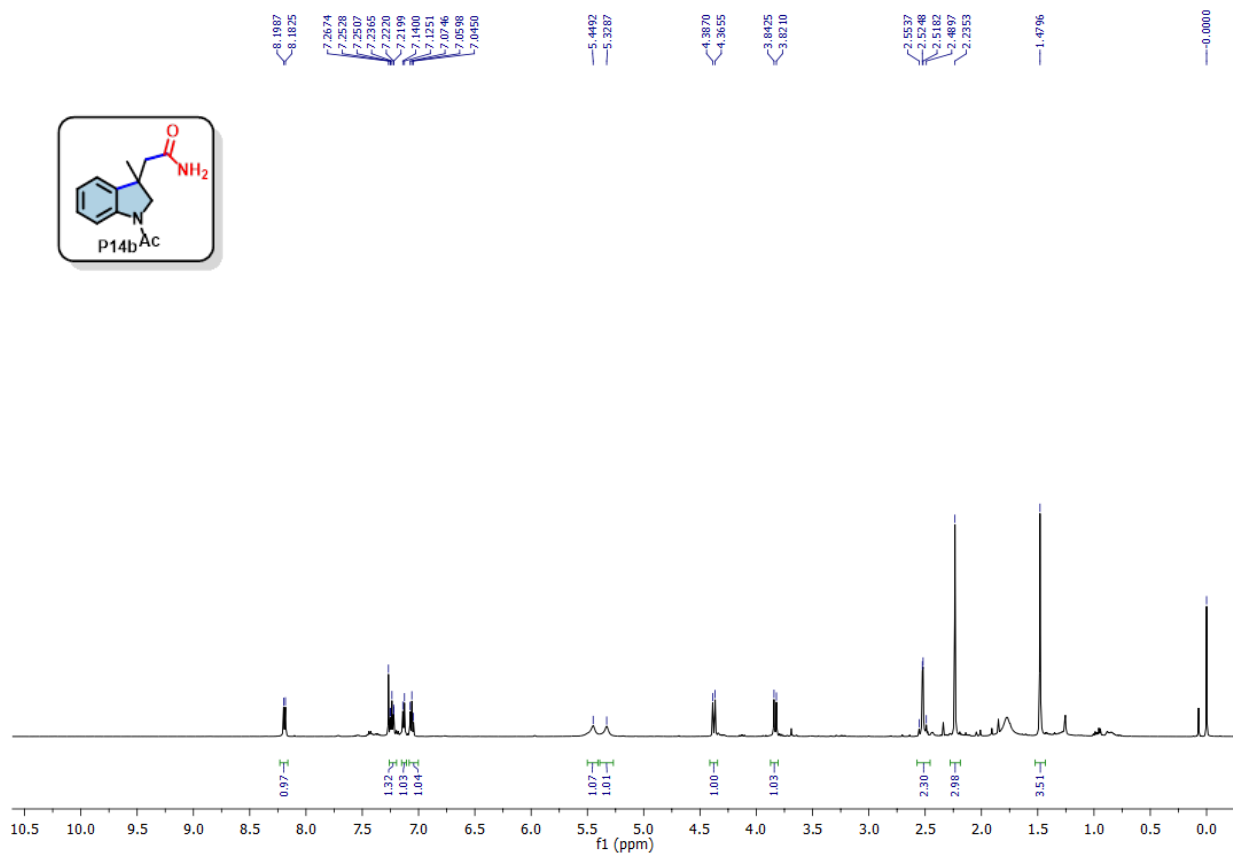


Figura 101: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P14b.

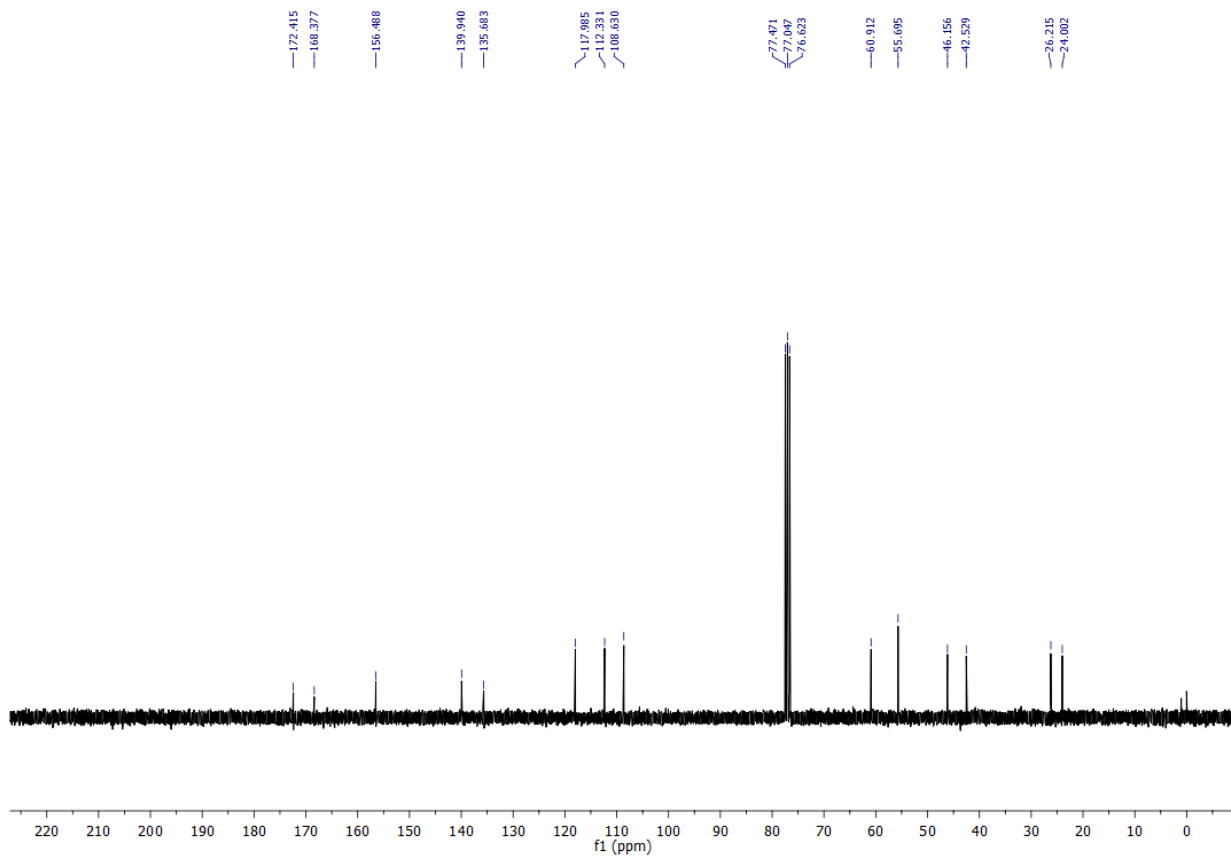


Figura 102: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de P14b.

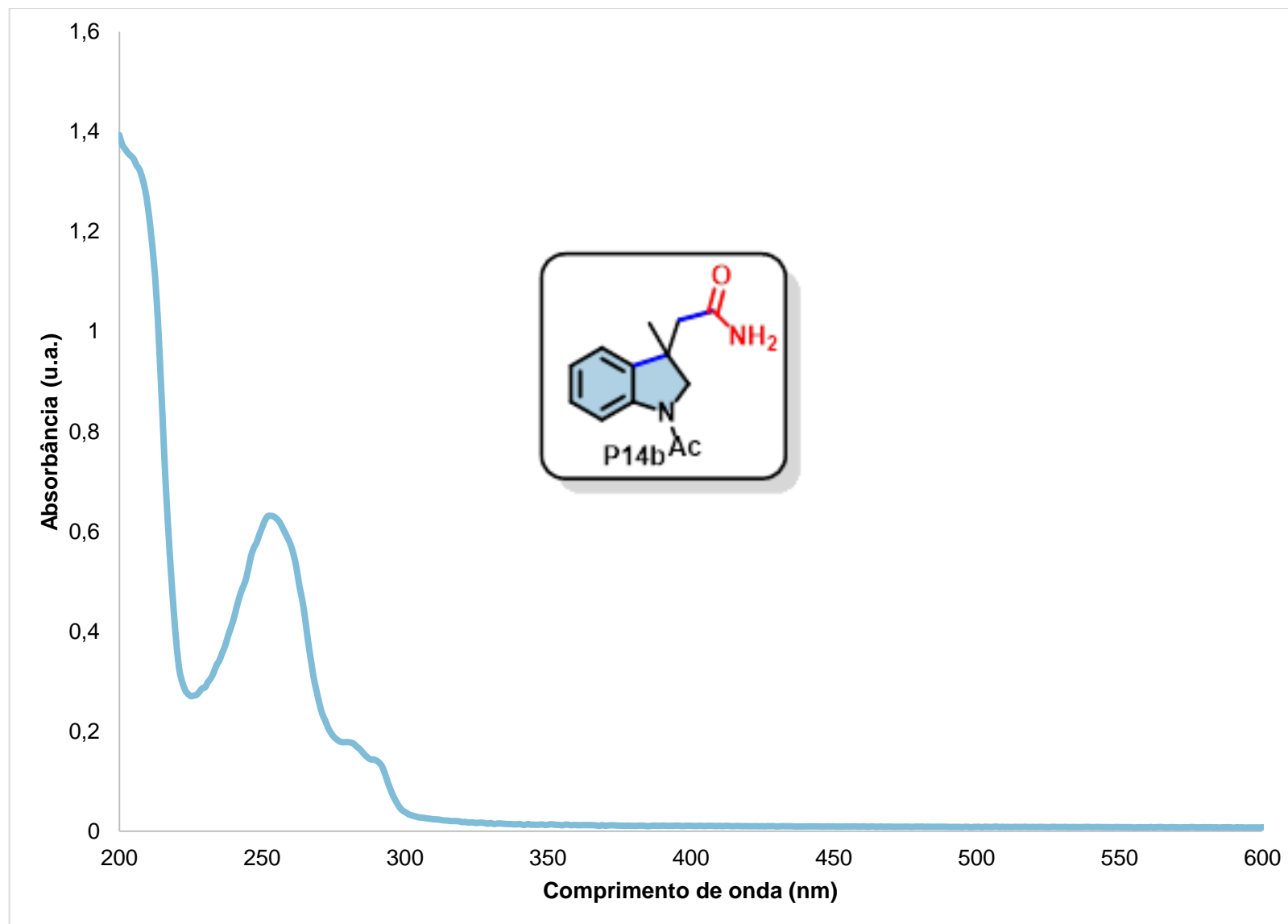
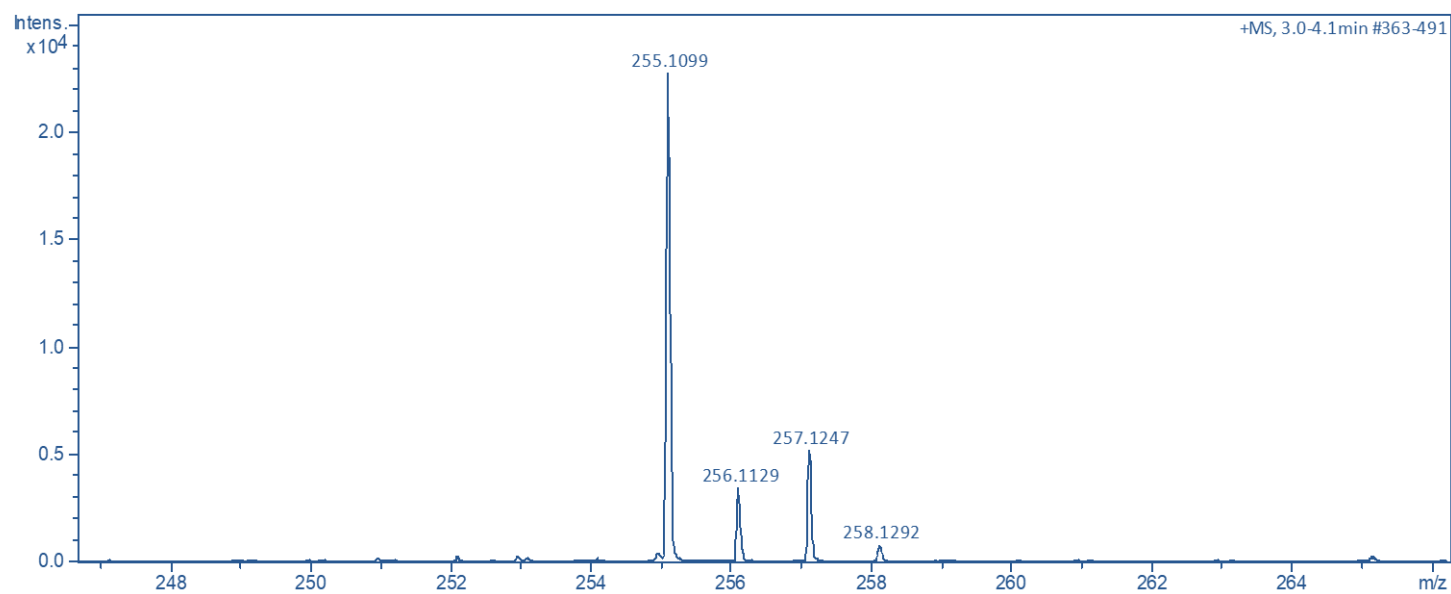
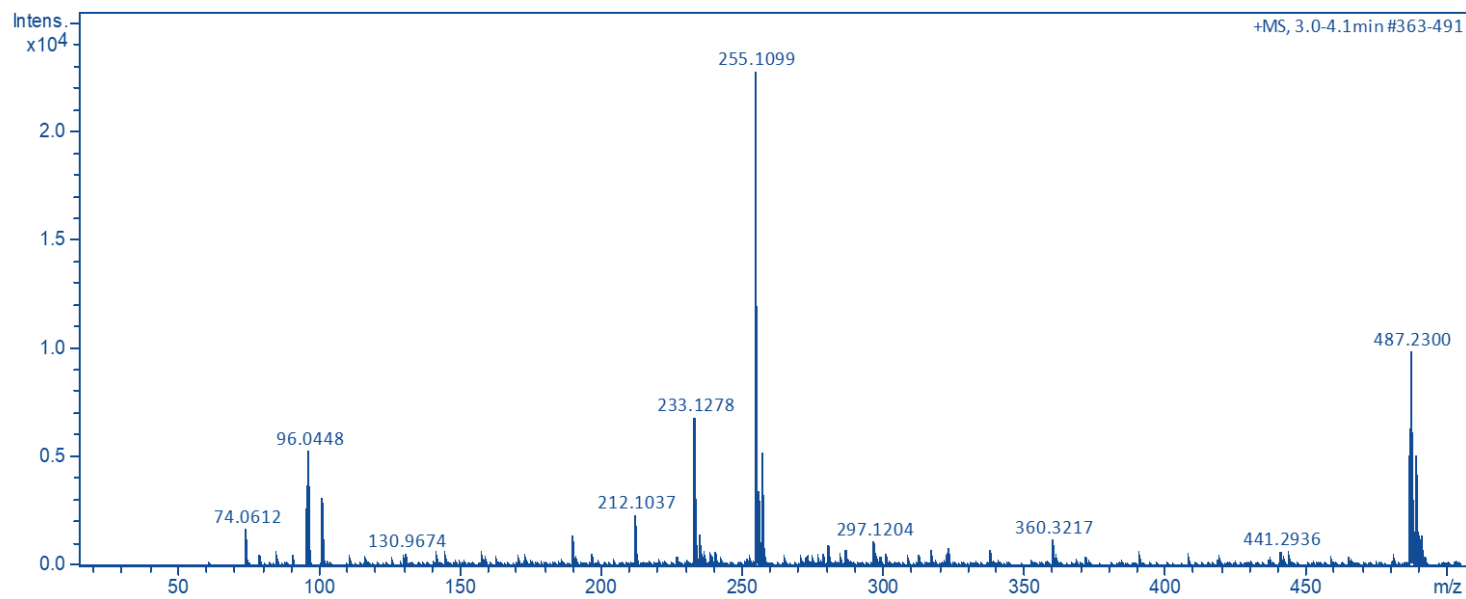


Figura 103: Espectro de absorção de **P14b** em acetonitrila em concentração $\mu\text{m.L}^{-1}$



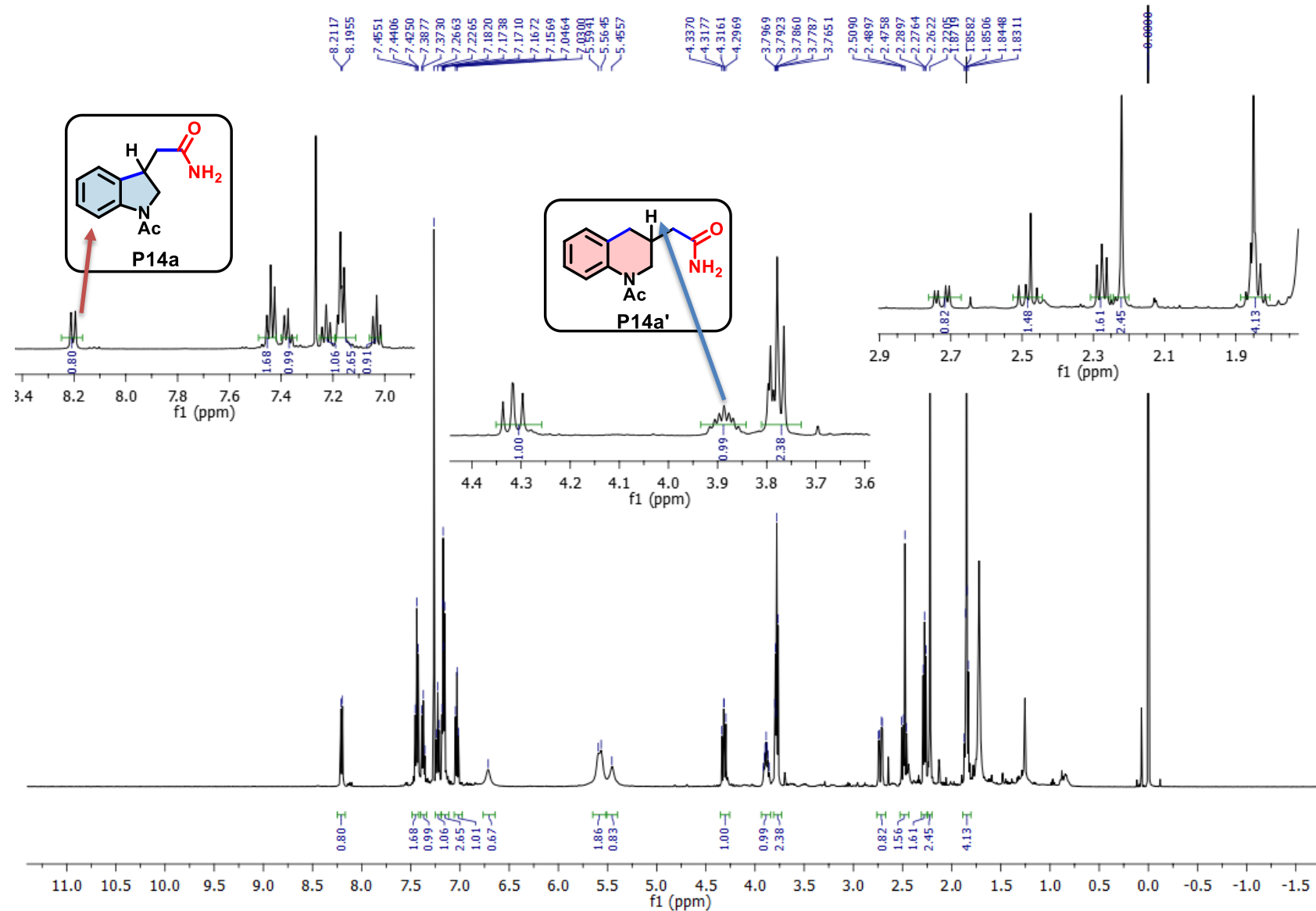
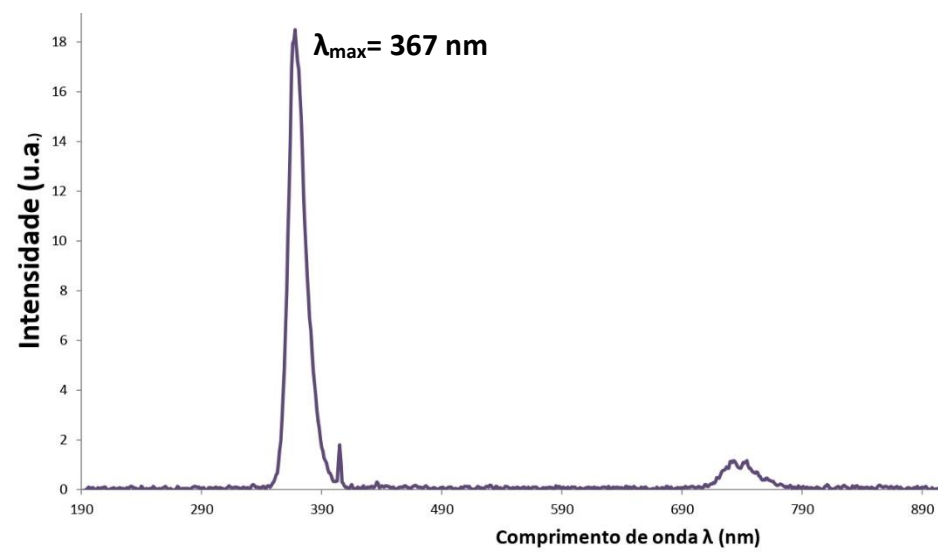
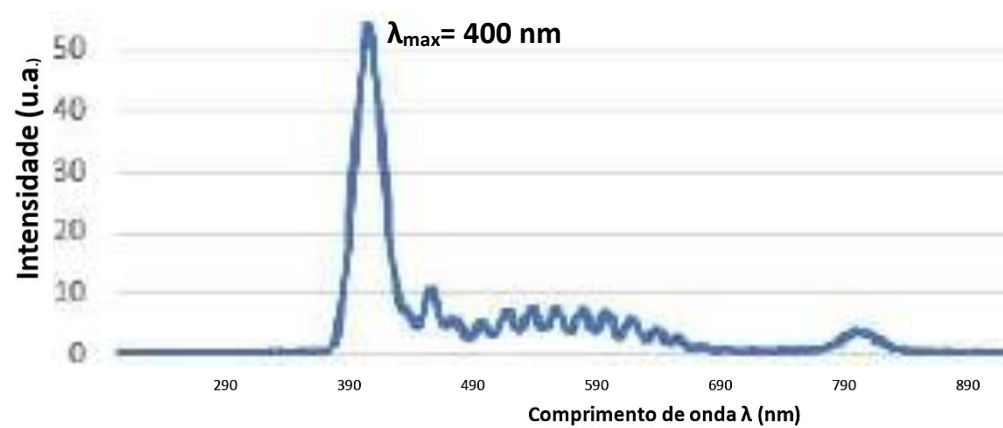


Figura 104: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de P14a e P14a'.

Espectro de Emissão da LED 16 W



Espectro de Emissão da LED 50 W



SÚMULA CURRICULAR**Milene Macedo Hornink**

Nascimento: 20/11/1995 **Nacionalidade:** Brasileira **Estado civil:** Casada

Endereço: Rua Paiquerê, 61, Cava Verde – São Paulo- SP, 02552-060

email: milenemacedohornink@usp.br

Link para CV lattes: <http://lattes.cnpq.br/4047013409405498>

Link para ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6832-7259>

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Técnico: ETEC Cel. Fernando Febeliano da Costa (Colégio Industrial) – Piracicaba, São Paulo (2012 – 2013).

Graduação: Licenciatura em Química, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) - Campus São Paulo (2014 – 2017).

Pós-Graduação: Doutorado Direto em Química- Instituto de Química, Universidade de São Paulo (IQ-USP) – Campus Capital (2018 – atual).

ATIVIDADES CIENTÍFICAS**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) - Campus São Paulo****Atividades de pesquisa e docência:**

Programa de Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência (PIBID) – “*Análise de uma atividade lúdica para aprender a Tabela Periódica*” (2015).

Orientador: Prof. Dr. Pedro Miranda Júnior

Principais atividades: Elaboração de sequência didática envolvendo o tema tabela periódica, desenvolvimento e preparação de um jogo para estudar a tabela periódica com a turma do 1º ano do ensino médio. Regência das aulas propostas na sequência didática, atividades de sondagem de conhecimentos prévios e elaboração de atividades de avaliação após aplicação da sequência didática. Participação semanal em reuniões em grupo e individuais com o orientador e apresentação e discussão dos resultados e experiências obtidas. Elaboração de relatórios mensais de evolução do projeto.

Iniciação científica (IC) – “*Estudos Sintéticos Visando o Alcaloide Indólico Prebalamida, uma Substância Isolada de uma Planta Medicinal Asiática*”, Bolsa institucional CNPq (2016 – 2017).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio de Carvalho

Principais atividades: Revisão orientada da literatura acerca do alvo proposto e pesquisa em bibliotecas digitais, para avaliar a importância da rota proposta. Síntese de compostos precursores da molécula-alvo. Análises por CCD, CG-EM, IV, e interpretação dos espectros.

Participação em Congressos e encontros:

- Apresentação do trabalho intitulado: *Análise de uma atividade lúdica para aprender a Tabela Periódica*, XVIII ENEQ (Encontro Nacional de Ensino de Química Florianópolis - SP (2016).
- Organização e Realização da oficina de processos de fermentação e abordagem do processo *Maillard*, VI SEQUIF (Semana Da Química do Instituto Federal De São Paulo) (2017).
- Apresentação do trabalho intitulado: *Estudos Sintéticos Visando o Alcaloide Indólico Prebalamida, uma Substância Isolada de uma Planta Medicinal Asiática*, VI Congresso de iniciação científica do IFSP Itapetininga- SP (2018).
- Participação no encontro de ex-alunos, VII SEQUIF (Semana Da Química do Instituto Federal De São Paulo) (2018).

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) - Campus capital

Atividades de Pesquisa:

Doutorado direto: Projeto intitulado: “*Aplicação de Haloperoxidase dependente de vanádio em sistema de fluxo contínuo visando reações seletivas*” – Bolsista FAPESP (nº processo 2018 /07152-4) (02/2018 -atual).

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

Principais atividades: Design, síntese, purificação e caracterização de substratos e produtos, utilizando-se CG-EM, IV, UV, RMN-¹H, ¹³C, HMBC, NOESY. Desenvolvimento de metodologias catalíticas para a preparação de compostos heterocíclicos envolvendo catálise homogênea e heterogênea. Otimização da síntese e obtenção de novos compostos heterocíclicos. Purificação de enzimas e imobilização. Desenvolvimento e aplicação de metodologias em fluxo contínuo. Preparação de artigos científicos. Desenvolvimento de atividades de cotação e compra de vidrarias, consumíveis e equipamentos para o laboratório.

Co-orientações de iniciação científica:

- Co-orientação da aluna de iniciação científica (bolsa mérito institucional CNPq) Alice Uva Lopes, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (2018-2019).
- Co-orientação da aluna de iniciação científica (bolsa mérito institucional CNPq) Caroline Souza Santos, Instituto de Química da USP (2020-2022)
- Co-orientação da aluna de iniciação científica Beatriz Rodrigues, Instituto de Química da USP (abril a junho de 2022).

Participação em Congressos e encontros:

- 26º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnologia da USP (SIICUSP): Avaliadora. (2018).

- 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Apresentação do pôster: “*Biobased Spirosuccinimides From Itaconic Anhydride: A Novel Synthetic Application Of Renewable Carbons For Important Biological Targets*”. Joinville – SC (2019).
- 18th Brazilian Meeting on Organic Synthesis: Apresentação do pôster: “*Exploitation of ultrasound and flow chemistry for the one-pot synthesis of new N-fused indoles*”. Tiradentes – MG (2022).

MINICURSOS

- *Planejamento de Fármacos Baseado em Fragmentos (FBDD) e Técnicas de Triagem em Larga Escala (HTS/HCS)* (2019)
- Curso teórico-prático de MALDI-TOF (2023)

PREMIAÇÕES

Prêmio Lavoisier- Diploma de Honra ao Mérito de Melhor Aluna do Curso (CRQ-IV) (2018)

IDIOMAS

Inglês (avançado)

FICHA DO ALUNO (SISTEMA JANUS)



Universidade de São Paulo
Instituto de Química
FICHA DO ALUNO

46136 - 10842328/1 - Milene Macedo Hornink

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
QFL5930-5/1	Noções de Segurança em Laboratórios de Química e Bioquímica, Ética e Responsabilidade em Pesquisa	07/03/2018	13/03/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5933-12/1	Fundamentos da Química Orgânica	13/03/2018	25/06/2018	150	10	100	A	N	Concluída
QFL5939-11/2	Tópicos Avançados de Química I	14/03/2018	26/06/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5931-3/1	Química Verde	02/04/2018	24/06/2018	120	8	100	A	N	Concluída
QFL5920-12/1	Mecanismos das Reações Orgânicas	14/08/2018	22/10/2018	150	10	90	A	N	Concluída
QFL5940-9/3	Tópicos Avançados de Química II	15/08/2018	27/11/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5947-3/2	Conceitos Básicos de Espectroscopia	16/08/2018	28/11/2018	150	10	100	A	N	Concluída
QFL5941-9/1	Tópicos Avançados de Química III	20/03/2019	02/07/2019	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5955-3/1	Tópicos em Síntese Orgânica	21/03/2019	03/07/2019	120	8	100	A	N	Concluída
QFL5942-12/1	Tópicos Avançados de Química IV	17/03/2020	29/06/2020	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	38	50	56
Estágios:			
Total:	38	50	56

Créditos Atribuídos à Tese: 280

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

ORGANIC PROCESS RESEARCH & DEVELOPMENT
OPR&D

pubs.acs.org/OPRD

Communication

Nontraditional Application of the Photo-Fenton Process: A Novel Strategy for Molecular Construction Using Formamide and Flow Chemistry

Marialy N. Sanabria, Milene M. Hornink, Valquíria G. Correia, and Leandro H. Andrade*

Cite This: *Org. Process Res. Dev.* 2020, 24, 2288–2297

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Instead of destroying organic compounds, for the first time the photo-Fenton reaction was employed to construct them. Oxindole and spiro-oxindole scaffolds, which are frequently found in natural products, were selected as molecular targets. The development of a photochemical flow reactor employing the photo-Fenton reaction in formamide resulted in an excellent synthetic methodology for oxindoles. Non-anhydrous conditions are required, and readily available chemicals and mild conditions are employed. Also, novel synthetic approaches for new spiro compounds were efficiently developed using functionalized oxindoles as key intermediates.

KEYWORDS: *photo-Fenton, formamide, construction, oxindoles, spiro-oxindoles*

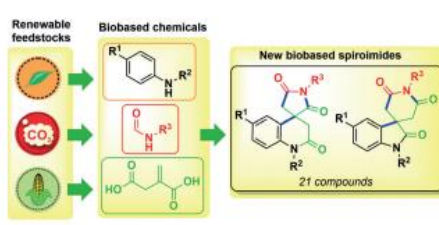
Figura 105: Artigo em colaboração com as Dras. Marialy Sanabria e Valquíria Graia. Nesta colaboração a doutoranda realizou a síntese de algumas acrilamidas, purificação dos oxindóis obtidos em fluxo contínuo pela Dra. Marialy e sua caracterização por EMAR, IV, RMN ^1H e ^{13}C . Também foi realizada a otimização das condições de obtenção dos compostos espiros, que foram encontradas pela Dra. Valquíria. Realizou-se a caracterização dos novos compostos espiro por EMAR, IV, RMN ^1H , ^{13}C , HMBC e NOESY. Quanto à escrita do manuscrito, teve participação ativa e ficou responsável pela elaboração do material suplementar.

Synthesis M. M. Hornink et al. **Feature**

Biobased Spiroimides from Itaconic Acid and Formamides: Molecular Targets for a Novel Synthetic Application of Renewable Chemicals

Milene Macedo Hornink
Alice Uva Lopes
Leandro Helgueira Andrade*

Institute of Chemistry, University of São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo,
SP 05508-000, Brazil
leandro@iq.usp.br



Renewable feedstocks → Biobased chemicals → New biobased spiroimides (21 compounds)

thor's personal reprint

Figura 106: Artigo derivado dos estudos de aplicação do sistema desenvolvido pela Dra. Marialy no artigo anterior, para a produção de novas espiroimidias a partir de blocos de construção renováveis.

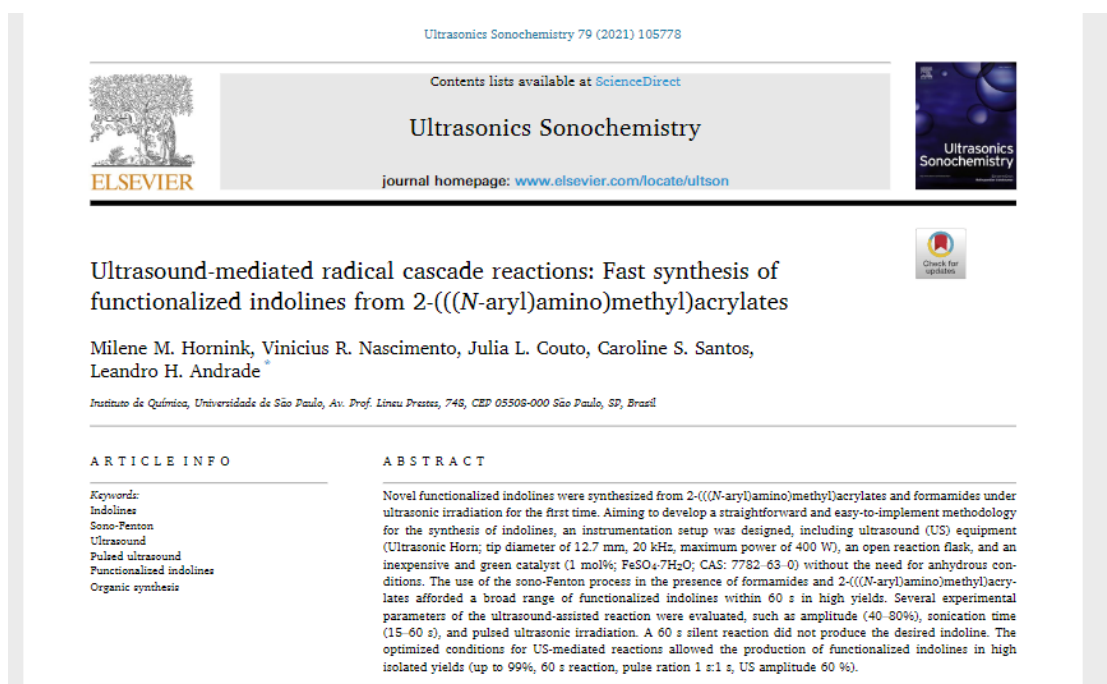


Figura 107: Artigo derivado dos estudos com os substratos C frente ao ultrassom e processo Fenton.




Figura 108: Artigo em colaboração com a Ma. Júlia Couto e o aluno de doutorado Vinicius Rodrigues. Nesta colaboração a doutoranda aplicou as condições encontradas pela Ma. Júlia para os substratos C5 apresentados nesta tese, e produção de diversas dihidroquinolinonas substituídas, além do desenvolvimento das reações de funcionalizações posteriores para espiroimidaz e novas espiro-lactonas. Ficou responsável pela caracterização de todos os substratos utilizados e produtos obtidos por EMAR, IV, RMN ¹H, ¹³C. Responsabilizou-se pela organização elaboração do material suplementar.

[Home](#) > [Journal of Flow Chemistry](#) > [Article](#)

Communications | [Published: 15 February 2023](#)

Continuous one-pot synthesis of new spiro-fused indoles from biobased building blocks using carbamoylation and imidation reactions under ultrasonic irradiation

[Milene M. Hornink](#), [Beatriz G. Rodrigues](#), [Caroline S. Santos](#) & [Leandro H. Andrade](#) 

[Journal of Flow Chemistry](#) (2023) | [Cite this article](#)

72 Accesses | 2 Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

The application of a flow reactor under ultrasonic irradiation enabled the fast synthesis of new spiro-fused indoles in a one-pot methodology. The exploitation of the reactivity of biobased building blocks, including acrylic acids and formamides, was essential to achieve such highly functionalized molecular targets. A four-step process with a 2–3 min residence time, and no aqueous work-up, created spiro[indoline-succinimides], spiro[indole-pyrrolo-succinimides] and spiro[indole-pyrrolo-succinimides] with high overall yields.

Figura 109: Artigo derivado dos estudos realizados com os substratos C em fluxo contínuo sob irradiação ultrassônica.