



MARCOS VINICIOS DA SILVA

**SÍNTESE MULTICOMPONENTE E A FORMAÇÃO DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE
DIHIDRIPYRIMIDINONA E β -CICLODEXTRINA E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOLÓGICO EM TESTES
*IN VITRO***

**LAVRAS - MG
2024**

MARCOS VINICIOS DA SILVA

**SÍNTESE MULTICOMPONENTE E A FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE
INCLUSÃO ENTRE DIHIDROPIRIMIDINONA E β -CICLODEXTRINA E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOLÓGICO EM TESTES *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de atuação Química/Bioquímica, para a obtenção de título de Mestre.

Prof. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Marcos Vinicios da.

Síntese multicomponente e a formação de complexos de
inclusão entre dihidropirimidinona e β -ciclodextrina e avaliação do
seu potencial biológico em testes in vitro / Marcos Vinicios da
Silva. - 2024.

104 p. : il.

Orientador(a): Luciana de Matos Alves Pinto.

Coorientador(a): Sérgio Scherrer Thomasi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Ciclodextrina. 2. Complexo de inclusão. 3. Síntese
multicomponente. I. Pinto, Luciana de Matos Alves. II. Thomasi,
Sérgio Scherrer. III. Título.

MARCOS VINICIOS DA SILVA

**SÍNTESE MULTICOMPONENTE E A FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE
INCLUSÃO ENTRE DIHIDROPIRIMIDINONA E β -CICLODEXTRINA E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOLÓGICO EM TESTES *IN VITRO***

**MULTICOMPONENT SYNTHESIS AND INCLUSION COMPLEX FORMATION
BETWEEN DIHYDROPYRIMIDINONE AND B-CYCLODEXTRIN AND
EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL POTENTIAL IN *IN VITRO* ASSAYS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 24 de julho de 2024.

Dra. Luciana de Matos Alves Pinto, UFLA

Dra. Bárbara Sayuri Belleste, UFLA

Dra. Adneia de Fátima Abreu Venceslau, EMEAR

Dr. Sérgio Scherrer Thomasi, UFLA

Prof. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

Dedico esta dissertação aos meus pais, Ilza e Romulo, a quem devo tudo o que sou. Aos meus irmãos, Renato, Raquel, Rafaela, Vanessa e Romário, por acreditarem no meu potencial. Às minhas sobrinhas, Emanuely, Laís e Helena, por serem luz, equilíbrio e felicidade em nossa família. Ao meu avô, João dos Santos (*in memoriam*) que com toda certeza está feliz e orgulhoso de mim, por conseguir chegar até aqui! Sinto muita sua falta, vovô! Por onde estiver, saiba que sempre vou te amar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, não poderia deixar de agradecer a Deus. Simplesmente pela vida, discernimento, por guiar os meus passos até aqui e por ser sempre meu alicerce e minha fortaleza, quando muitas vezes já pensei em desistir.

Ao meu pai, Romulo e à minha mãe, Ilza por nunca ter me deixado faltar nada. Obrigado pelos ensinamentos, incentivo, por acreditar no meu potencial e principalmente pelo amor incondicional. Espero um dia poder retribuir tudo em dobro, o que vocês tanto fazem por mim. Certamente, essa conquista é totalmente pra vocês.

Aos meus irmãos, Renato, Raquel, Rafaela, Vanessa e Romário, por não medirem esforços para que mais esse sonho pudesse ser realizado. Essa vitória também é de vocês!

Às minhas sobrinhas, Emanuely, Laís e Helena, por serem luz e esperança em nossos corações! Vocês são joias que merecem ser lapidadas e preservadas eternamente. O titio ama muito vocês!

À minha orientadora, Prof. Dr^a Luciana de Matos Alves Pinto e coorientador Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi por toda orientação, confiança, parceria, companheirismo e paciência para a elaboração deste trabalho.

À banca examinadora por aceitarem fazer parte e por contribuírem para a finalização dessa dissertação. Suas contribuições serão essenciais para a complementação deste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Síntese Orgânica, pela oportunidade de ingresso, crescimento e amizades. Fazer parte deste Grupo, me deu mais entusiasmo e vontade de aprender sobre Química Orgânica.

À minha amiga, Aline de Fátima Silva Lago, por toda coorientação, auxílio e ajuda pela execução dos experimentos. Sou muito grato por todas as vezes que você dispôs me ajudar. Com toda certeza, foi extremamente importante para a finalização deste trabalho, pois aprendi muitas coisas ao seu lado!

Ao meu companheiro e amor Joelson, que de forma especial e carinhosa sempre me deu apoio, força e coragem. Me apoiou em todos os momentos com muito amor e respeito. Obrigado por me colocar em suas orações e por sempre estar torcendo por mim. Sou extremamente grato por ter entrado em minha vida e por ter me proporcionado tanto amor, cumplicidade e felicidade. Dividir a vida com você é um privilégio!

Aos meus amigos, Diego, Alessa, Raiuri, Cleiziane, Cleidimara, Vinícios, Flavia, Luan, Marlon, Maria Elisa e Vitória, por estarem, desde sempre, juntos nessa jornada, independente da distância.

Aos meus amigos da graduação que permaneceram até hoje. Em especial, ao Antônio, Fabiana, Gislaine, Joyce, Kika, Laís, Mariane, Pedro, Shênnia e Wanderleia. Também aos que conheci e tive mais proximidade durante o meu mestrado: Ruth, Bruna, Natânia e Isadora. Obrigado por fazerem dos meus dias em Lavras mais felizes e leves. Gratidão por todos os momentos de risos, desesperos, alegrias e por todos os melhores e piores momentos juntos!

Aos meus amigos que fiz no Reserva Beer, onde me acolheram tão bem. Foram sempre solícitos, amigáveis e de corações enormes. Gratidão por todos os momentos de lazer e pelas jornadas de trabalho.

Ao Rafael Lago e ao Departamento de Fitopatologia da UFLA, pela facilitação das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À Prof^a. Dr^a Heloisa Oliveira dos Santos, pela concessão das sementes de alface.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Química (DQI) e ao Programa de Pós Graduação em Agroquímica pela oportunidade de estudos, pela infraestrutura e pelo ambiente amigável proporcionado.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Agroquímica e outros programas, por todos os ensinamentos passados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado. À Fapemig e Capes pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para os experimentos envolvendo análises.

À Universidade de Campinas (Unicamp) pela realização das análises de RMN.

Por fim, a todos: amigos e familiares que torceram por mim ao longo dessa trajetória.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

As reações multicomponentes (RMCs) ocorrem quando três ou mais reagentes são colocados em um único frasco reacional, para geração de uma molécula maior, sem a necessidade de purificação de cada intermediário. Um exemplo disso, são as dihidropirimidinonas (DHPM), que foi descrita pelo italiano Pietro Biginelli, partindo-se de um aldeído, ureia e acetoacetato de etila. Essa classe de compostos vem sendo muito explorada, devido as suas atividades farmacológicas, como atividade antimalárica, antituberculose e atividade citotóxica. Porém, muitas das vezes esses compostos, apresentam baixa solubilidade em água, e com isso, utilizam-se as ciclodextrinas (CDs), para melhorar tal característica. As CDs são estruturas com um formato de cone truncado, compostas por vários monômeros de glicose. Elas são utilizadas para abrigar diversas moléculas em sua cavidade, formando-se então os complexos de inclusão (CI). O objetivo deste trabalho, é obter o CI entre a DHPM e a β -ciclodextrina (β -CD), pelo método da liofilização. Para isso, a síntese da molécula utilizou-se um sistema de refluxo a uma temperatura de 80 °C, por um período de 1,5h. Para a caracterização dos CI, foram utilizadas técnicas espectroscópicas como espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , calorimetria exploratória de varredura (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O ensaio de isotermas de solubilidade foi usado para determinar a constante de associação (K_a), permitindo avaliar o comportamento e a mudança de solubilidade do sistema (DHPM + β -CD), mediante ao aumento da concentração da molécula hospedeira. Ensaio de dissolução *in vitro*, foram realizados, para estabelecer a relação entre o tempo e a porcentagem de DHPM dissolvida. Propôs também analisar o potencial biológico dos CI e a molécula obtida do produto de síntese, avaliando a toxicidade aos efeitos na germinação, utilizando modelo vegetal *Lactuca sativa L.* (alface). Como resultados obtidos, a DHPM foi caracterizada pelas técnicas de FTIR e RMN de ^1H , confirmando sua obtenção. No ensaio de solubilidade em solução aquosa, foi observado que a solubilidade aumentou 1,73; 1,53 e 1,43 vezes nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C, respectivamente, com o aumento na concentração de ciclodextrina. As análises espectroscópicas, térmicas e microscópicas puderam confirmar a formação dos complexos de inclusão. Ensaio de dissolução *in vitro* mostraram que os complexos de inclusão melhoraram significativamente a solubilidade da DHPM em água e sua taxa de dissolução, indicando potenciais benéficos para liberação controlada e biodisponibilidade. No ensaio utilizando o modelo vegetal, os CI e a molécula não apresentaram toxicidade nas sementes de alface, na concentração testada. Adicionalmente, estudos como por exemplo, Biologia Molecular, podem ser necessários para investigar potenciais efeitos citogenetóxicos e os mecanismos de ação que estas substâncias podem causar em células vegetais. Ainda, por se tratar de um composto relacionado a área farmacêutica, testes *in vivo* são de extrema importância e devem ser realizados pois confirmam a biodisponibilidade do fármaco, garantindo ao mesmo tempo a segurança toxicológica antes de considerar sua aplicação clínica e terapêutica.

Palavras-chave: Reação multicomponente; dihidropirimidinona; ciclodextrina; complexo de inclusão; biodisponibilidade; ensaios *in vitro*

ABSTRACT

Multicomponent reactions (MCRs) occur when three or more reactants are placed in a single reaction vessel to generate a larger molecule, without the need to purify each intermediate. An example of this is the dihydropyrimidinones (DHPMs), described by the Italian scientist Pietro Biginelli, starting from an aldehyde, urea, and ethyl acetoacetate. This class of compounds has been extensively explored due to their pharmacological activities, including antimalarial, antitubercular, and cytotoxic activities. However, these compounds often present low water solubility, which is why cyclodextrins (CDs) are used to improve this characteristic. CDs are structures with a truncated cone shape, composed of multiple glucose monomers. They are used to encapsulate various molecules in their cavity, thus forming inclusion complexes (ICs). The objective of this work is to obtain the IC between DHPM and β -cyclodextrin (β -CD) via the lyophilization method. For this, the synthesis of the molecule utilized a reflux system at 80 °C for a period of 1.5 hours. To characterize the ICs, spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), and scanning electron microscopy (SEM) were used. Solubility isotherm assays were used to determine the association constant (K_a), allowing the evaluation of the system's (DHPM + β -CD) solubility behavior and changes in response to increased host molecule concentration. In vitro dissolution assays were performed to establish the relationship between time and the percentage of DHPM dissolved. Additionally, this study proposed analyzing the biological potential of the ICs and the synthesized product, evaluating toxicity effects on germination using the plant model *Lactuca sativa L.* (lettuce). As for the results, DHPM was characterized using FTIR and ^1H NMR techniques, confirming its synthesis. In the solubility assay in an aqueous solution, solubility increased by 1.73, 1.53, and 1.43 times at 25, 35, and 45 °C, respectively, with increased cyclodextrin concentration. Spectroscopic, thermal, and microscopic analyses confirmed the formation of inclusion complexes. In vitro dissolution assays showed that inclusion complexes significantly improved DHPM's solubility in water and its dissolution rate, indicating potential benefits for controlled release and bioavailability. In the plant model assay, the ICs and the molecule showed no toxicity at the tested concentration on lettuce seeds. Additionally, studies such as Molecular Biology may be necessary to investigate potential cytogenotoxic effects and the mechanisms of action that these substances might exert on plant cells. Furthermore, as this is a compound related to the pharmaceutical field, in vivo tests are extremely important and should be conducted to confirm drug bioavailability, ensuring toxicological safety before considering clinical and therapeutic applications.

Keywords: Multicomponent reaction; dihydropyrimidinone; cyclodextrin; inclusion complex; bioavailability; in vitro assays

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

A indústria sintética apresenta atualmente uma grande relevância para a população, pois diversas formulações são destinadas para a mesma afim de trazer melhorias. Um exemplo disso, é a indústria farmacêutica, que tenta sempre melhorar a expectativa de vida dos humanos. Nesse cenário, a utilização de compostos farmacêuticos advindos de reações multicomponentes tem chamado atenção, devido ao seu fácil manuseio, aplicação e estudos interessantes devido as suas propriedades farmacológicas. As reações multicomponentes são definidas como reações rápidas, que ocorrem em uma única etapa, sem causar impactos ambientais, visto que engloba princípios que são estudados e elucidados pela Química Verde. O impacto deste trabalho transcende o campo econômico e cultura, atingindo também o meio ambiente, pois a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas em fármacos é de grande importância. No contexto econômico, as ciclodextrinas melhoram a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis, o que permite o desenvolvimento de formulações mais eficientes com quantidades reduzidas de princípio ativo. Isso gera economia nos custos de produção e desenvolvimento. Além disso, ajudam a estabilizar moléculas farmacêuticas, prolongando a vida útil dos medicamentos, o que reduz perdas financeiras relacionadas à degradação de compostos instáveis. Sob o aspecto ambiental, esses carreadores são obtidos a partir de fontes renováveis, como o amido, sendo compatíveis com os princípios da química verde. Seu uso pode reduzir a necessidade de solventes orgânicos durante a produção e diminuir a toxicidade ambiental, já que possibilitam a administração de doses menores de fármacos, contribuindo para uma menor pegada ecológica das indústrias farmacêuticas. No campo social, os complexos de inclusão com ciclodextrinas trazem benefícios à saúde pública ao aumentar a eficácia e a segurança dos medicamentos. Ao melhorar a biodisponibilidade de fármacos de difícil absorção, as ciclodextrinas viabilizam o desenvolvimento de novos tratamentos, inclusive para doenças crônicas e raras, tornando os tratamentos mais acessíveis e promovendo maior qualidade de vida para a população. A utilização destes materiais está alinhada com diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU). O trabalho contribui para o crescimento econômico e a geração de emprego (ODS 8), fomenta a inovação na indústria química (ODS 9), promove o consumo e a produção responsável (ODS 12) e possibilita o estabelecimento de parcerias entre indústrias de diferentes setores (ODS 17). Dessa forma, essa iniciativa não só reduz custos e valoriza a cultura local, mas também fortalece práticas sustentáveis e promove impactos sociais e econômicos positivos e significativos.

Social, technological, economic, and cultural impacts

The synthetic industry currently holds significant relevance for society, as various formulations are designed to bring improvements to it. An example of this is the pharmaceutical industry, which is always striving to improve human life expectancy. In this context, the use of pharmaceutical compounds derived from multicomponent reactions has gained attention due to their easy handling, application, and interesting studies on their pharmacological properties. Multicomponent reactions are defined as fast reactions that occur in a single step, without causing environmental impacts, as they encompass principles studied and elucidated by Green Chemistry. The impact of this work transcends the economic and cultural fields, also reaching the environment, as the formation of inclusion complexes with cyclodextrins in drugs is of great importance. From an economic perspective, cyclodextrins improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs, allowing the development of more efficient formulations with reduced amounts of active ingredients. This results in cost savings in production and development. Furthermore, they help stabilize pharmaceutical molecules, extending the shelf life of medications, which reduces financial losses related to the degradation of unstable compounds. From an environmental standpoint, these carriers are obtained from renewable sources, such as starch, aligning with the principles of green chemistry. Their use can reduce the need for organic solvents during production and decrease environmental toxicity since they enable the administration of lower doses of drugs, contributing to a smaller ecological footprint for pharmaceutical industries. On the social front, inclusion complexes with cyclodextrins offer public health benefits by enhancing the efficacy and safety of medicines. By improving the bioavailability of poorly absorbed drugs, cyclodextrins facilitate the development of new treatments, including for chronic and rare diseases, making treatments more accessible and promoting a higher quality of life for the population. The use of these materials is aligned with several Sustainable Development Goals (SDGs) of the United Nations (UN). The work contributes to economic growth and job creation (SDG 8), fosters innovation in the chemical industry (SDG 9), promotes responsible consumption and production (SDG 12), and enables partnerships between industries from different sectors (SDG 17). In this way, this initiative not only reduces costs and values local culture but also strengthens sustainable practices and promotes positive and significant social and economic impacts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de como ocorre as sínteses tradicionais e as sínteses multicomponentes. Dentro do Erlenmeyer, a cor em roxo, representa uma substância A; em vermelho, representa a substância B e em verde, representa a substância C.	22
Figura 2 – Os princípios da Química Verde	23
Figura 3 – Linha do tempo das sínteses multicomponentes descritas na literatura.	24
Figura 4 – Síntese multicomponente proposta por Strecker.	24
Figura 5 – Reação multicomponente a) Reação de Hantzsch b) Representação da estrutura química do fármaco Felodipino.	25
Figura 6 – Síntese proposta por Biginelli (a). Em (b) a fórmula estrutural do monastrol.	26
Figura 7 – Síntese multicomponente proposta por Mannich.	26
Figura 8 – Síntese multicomponente. Em a) Síntese de Passerini b) Síntese de Ugi.	27
Figura 9 – Número de publicações na Web of Science utilizando as sínteses multicomponentes dos anos de 1995 até final do ano de 2023.	28
Figura 10 – Proposta de mecanismo de Folkers e Johnson – Rota do íon imínio.	29
Figura 11 – Proposta de mecanismo de Folkers e Johnson – Rota da enamina.	29
Figura 12 – Mecanismo reacional de Knoevenagel.	30
Figura 13 – Algumas atividades biológicas das dihidropirimidinonas.	31
Figura 14 – Exemplo de dihidropirimidinona com atividades anti-inflamatória.	32
Figura 15 – Exemplos de dihidropirimidinonas com atividade antibacteriana.	32
Figura 16 – Exemplos de dihidropirimidinonas com atividades anti-HIV.	33
Figura 17 – Estruturas químicas dos derivados das dihidropirimidinonas com atividades anti-hipertensiva.	34
Figura 18 – Estruturas químicas de derivados de dihidropirimidinonas com atividades antioxidantes.	35
Figura 19 – Estrutura química de derivado da dihidropirimidinona com atividade antifúngica.	36
Figura 20 – Estruturas químicas das hexahidropirimidina com atividades anticancerígenas (câncer de colo).	37
Figura 21 – Estruturas químicas das dihidropirimidinas ligadas a diarilpirazol com atividade anticancerígenas (contra o câncer de mama).	38
Figura 22 – Estruturas químicas de derivados de dihidropirimidina com atividade analgésica.	39

Figura 23 – Representação esquemática das ciclodextrinas. A α -CD, β -CD e γ -CD contém seis, sete e oito monômeros de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas.	40
Figura 24 – Exemplos de ciclodextrinas modificadas: Me β -CD, HP β -CD e SBE β -CD.	42
Figura 25 – Representação esquemática da formação do complexo de inclusão. A molécula com formato de cone truncado representa a molécula hospedeira (ciclodextrina); as esferas em vermelho representam os átomos de oxigênio e em branco os hidrogênios na molécula de água.	43
Figura 26 – Possíveis estequiometrias para a formação de complexos de inclusão entre a molécula hóspede e hospedeira.	44
Figura 27 – Perfis de isotermas de solubilidade desenvolvidos por Higuchi e Connors.	47
Figura 28 – Esquema de bioensaio no modelo utilizando sementes de alface.	55
Figura 29 – Esquema de ação das Fosfolipases A2 no processo inflamatório.	57
Figura 30 – Proposta de mecanismo reacional para a formação da dihidropirimidinona.	64
Figura 31 – Espectro FTIR da molécula de DHPM obtida através de síntese.	66
Figura 32 – Espectro de Absorção na região do UV para a DHPM em meio aquoso.	67
Figura 33 – Curva analítica da DHPM em meio aquoso.	68
Figura 34 – Diagrama de solubilidade de fase para a dihidropirimidinona em presença de quantidades crescentes de β -CD, nas temperaturas de 25, 35 e 45 \pm 0,2 $^{\circ}$ C.	69
Figura 35 – Espectro na região do infravermelho para as amostras DHPM, β -CD, complexos liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2) e as misturas físicas (MF 1:1 e MF 1:2).	71
Figura 36 – Perfil calorimétrico de DSC para as amostras de DHPM, β -CD, complexos liofilizados e misturas físicas. Em (a), mostra o perfil calorimétrico de todas as substâncias. Em (b), mostra o perfil calorimétrico das mesmas substâncias, após separação das curvas calorimétricas.	74
Figura 37 – Micrografias de varredura. Em (A) β -CD; (B) DHPM; (C) MF 1:1; (D) MF 1:2; (E) CI 1:1 e (F) CI 1:2. Todas as amostras foram apresentadas em quatro ampliações distintas, seguindo a ordem de (I) 200X, (II) 500X, (III) 1500X e (IV) 2000X.	77
Figura 38 – Espectro de RMN de 1 H para a DHPM em DMSO-d ₆ , 600 MHz.	79
Figura 39 – Espectro de RMN de 1 H (600 MHz). Em (a) DHPM pura, (b) β -CD, (c) CI 1:1 e (d) CI 1:2.	83
Figura 40 – Sugestão de como ocorre a formação do complexo de inclusão entre DHPM e CD.	85

Figura 41 – Perfil de dissolução em água da DHPM pura (DHPM) e dos complexos de inclusão liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2).....	86
Figura 42 – Placas de Petri contendo solução de CD com as sementes de alface germinadas...	90
Figura 43 – Placas de Petri contendo solução de DHPM com as sementes de alface germinadas.	90
Figura 44 – Placas de Petri contendo solução de CI 1:1 com as sementes de alface germinadas..	90
Figura 45 – Placas de Petri contendo solução de CI 1:2 com as sementes de alface germinadas.	91
Figura 46 – Placas de Petri contendo solução de água ultrapura com as sementes de alface germinadas.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico químicas das CDs.	41
Tabela 2 – Valores de Energia Livre de Gibbs (ΔG°) para solubilização da DHMP em solução aquosa de β -CD, nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C.	70
Tabela 3 – Valores referentes aos picos observados nas curvas calorimétricas de DSC para DHPM, β -CD, complexos liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2) e misturas físicas (MF 1:1 e MF 1:2).	76
Tabela 4 – Valores de deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e constante de acoplamentos (J), obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H experimentalmente (^1H 600 MHz, DMSO- d_6) e RMN de ^1H encontrado na literatura (500 MHz, DMSO- d_6).	81
Tabela 5 – Valores de deslocamentos químicos para a β -CD, DHPM e complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2 e $\Delta\delta$ dos deslocamentos químicos entre complexos e moléculas livres.....	84
Tabela 6 – Taxa de dissolução em água para a dihidropirimidinona pura (DHPM) e complexos de inclusão DHPM/ β -CD nas proporções 1:1 (CI 1:1) e 1:2 (CI 1:2), sob temperatura de $37 \pm 0,2$ °C.....	87
Tabela 7 – Valores médios de taxa de germinação (%GR), índice de velocidade de germinação (IVG), taxa de crescimento radicular (CR) e taxa de crescimento da parte aérea (PA). Os controles negativos e positivos são representados por água ultrapura e a molécula não complexada, respectivamente.....	89
Tabela 8 – Resultados obtidos pelo teste índice de velocidade de germinação (IVG).	102
Tabela 9 – Resultados obtidos pela taxa de germinação (% GR), através do Teste de Tukey.	103
Tabela 10 – Resultados obtidos pelo crescimento radicular, através do Teste de Tukey.....	103
Tabela 11 – Resultados obtidos pelo crescimento da parte aérea, através do Teste de Tukey.....	104

LISTA DE SIGLAS

CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CGTase	Ciclodextrina glicosiltransferase
CI	Complexo de inclusão
DHPM	3,4-dihidropiridin-2-(1H)-ona (nome IUPAC: 5- Ácido pirimidina carboxílico, 1, 2, 3, 4- tetrahydro- 6- metil- 2- oxo- 4- fenil-, éster etílico)
DOSY	Espectroscopia ordenada por difusão
DP ₃₀	Porcentagem da amostra dissolvida após 50 minutos
DRX	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
FTIR FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GI ₅₀	Concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular
HP β -CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
IC ₅₀	Concentração inibitória para reduzir 50% a atividade
K _a	Constante de associação
LIO	Liofilização
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Me β -CD	Metil- β -ciclodextrina
MM	Modelagem molecular
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
RMCs	Síntese multicomponentes
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Enxofre
SBE β -CD	Sulfobutileter- β -ciclodextrina
T ₅₀	Tempo necessário para dissolver 50% da molécula
TG	Termogravimetria
UV/Vis	Espectroscopia de ultravioleta/visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
γ -CD	Gama-ciclodextrina
Å	Angström
μ g	Micrograma
ϵ	Épsilon
°C	Graus Celsius
K	Constante de Boltzmann
η	Viscosidade do líquido
r_s	Raio hidrodinâmico
μ M	Micromolar
ΔH	Valor de entalpia
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	Sínteses Multicomponentes - RMCs	22
3.2	Dihidropirimidinonas	28
3.2.1	Atividades biológicas das dihidropirimidinonas	30
3.2.1.1	Atividade anti-inflamatória	31
3.2.1.2	Atividade antibacteriana	32
3.2.1.3	Atividade anti-HIV	33
3.2.1.4	Atividade anti-hipertensiva	34
3.2.1.5	Atividade antioxidante	35
3.2.1.6	Atividade anti-fúngica	35
3.2.1.7	Atividade anticancerígena	36
3.2.1.7.1	Câncer de colo	36
3.2.1.7.2	Câncer de mama	37
3.2.1.8	Atividade analgésica	38
3.3	Ciclodextrinas	39
3.4	Complexos de Inclusão	42
3.5	Caracterização de compostos orgânicos e complexos de inclusão	45
3.5.1	Espectroscopia na região do UV-Vis	46
3.5.2	Diagrama de solubilidade de fase	46
3.5.3	Calorimetria diferencial exploratória - DSC	47
3.5.4	Termogravimetria	48
3.5.5	Modelagem molecular	48
3.5.6	Difratometria de raios-X	49
3.5.7	Microscopia eletrônica de varredura	50
3.5.8	Ressonância magnética nuclear (RMN)	50
3.5.8.1	Deslocamento químico e blindagem	52
3.5.8.2	Acoplamento spin-spin	53
3.6	Atividades biológicas com complexos de inclusão	54
3.6.1	Bioensaio em modelo vegetal, utilizando <i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	54
3.6.2	Atividade antibacteriana	55

3.6.3	Atividade fosfolipásica	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1	Síntese multicomponente da DHPM, purificação e caracterização por infravermelho	58
4.2	Determinação dos parâmetros para a preparação dos complexos de inclusão ..	58
4.2.1	Curva analítica e determinação da absortividade molar	58
4.2.2	Isotermas de solubilidade de fase, determinação da constante de associação (Ka) e energia livre de Gibbs padrão (ΔG°)	59
4.3	Preparação dos complexos de inclusão	60
4.4	Caracterização dos complexos de inclusão	60
4.4.1	Espectroscopia na região do infravermelho	60
4.4.2	Calorimetria diferencial exploratória - DSC	60
4.4.3	Microscopia Eletrônica de varredura - MEV	61
4.4.4	Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H	61
4.5	Testes <i>in vitro</i>	61
4.5.1	Ensaio de dissolução	61
4.5.2	Ensaio biológico utilizando <i>Lactuca sativa L.</i>	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5.1	Proposta de mecanismo para a formação da dihidropirimidinona	64
5.2	Caracterização da síntese da DHPM por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	66
5.3	Determinação dos parâmetros dos complexos de inclusão	67
5.3.1	Curva analítica	67
5.3.2	Isotermas de solubilidade, determinação da constante de associação (Ka) e parâmetros da Energia Livre de Gibbs padrão (ΔG°)	68
5.4	Caracterização dos complexos de inclusão	70
5.4.1	Espectroscopia na região do infravermelho	70
5.4.2	Calorimetria diferencial exploratória - DSC	73
5.4.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	76
5.4.4	Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H	78
5.5	Testes <i>in vitro</i>	85
5.5.1	Ensaio de dissolução	85
5.5.2	Atividade biológica utilizando o modelo <i>Lactuca sativa L.</i>	88
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE A – Tratamentos estatísticos para o Teste de Germinação <i>in vitro</i>	102

1 INTRODUÇÃO

Um das maiores preocupações dos pesquisadores na área de síntese orgânica, é o aprimoramento da eficiência nas reações, redução e gerenciamento dos resíduos químicos. Toda essa preocupação está diretamente relacionada com o bem estar do ser humano e do meio ambiente. Dentre essa vertente, surge-se então a Química Verde que tem por objetivo reduzir ou eliminar o uso de substâncias que sejam prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, buscando soluções com base em conhecimentos químicos e ambientais. Ela é composta por doze princípios, procurando sempre minimizar o uso de solventes tóxicos em sínteses e análises químicas, o que conseqüentemente gera resíduos ambientalmente desfavoráveis (DUVAUCHELLE; MEFFRE; BENFODDA, 2023).

Dessa forma, as sínteses multicomponentes (RMCs) vem ganhando espaço na indústria sintética, pois engloba todos os princípios postulados pela Química Verde. Elas são reações que ocorrem em apenas uma única etapa, partindo de três ou mais reagentes em um único frasco reacional. A finalidade desse tipo de reação é a construção de uma molécula maior, sem a formação de subprodutos ou derivados. Elas são consideradas eficientes, pois não requerem um método de purificação e não há a necessidade de isolamento de intermediários, o que facilita a sua execução e também a redução de resíduos químicos, que são descartados indevidamente na natureza (ZHANG; YOU; HONG, 2018).

A produção de uma classe de moléculas notáveis, são os derivados de dihidropirimidinonas (DHPM), descoberta pelo italiano Pietro Biginelli, em 1893. Ela é considerada uma síntese multicomponente, produzida a partir de um aldeído, acetoacetato de etila e ureia. Diversas moléculas pertencentes à classe, possuem diversas atividades biológicas importantes, sendo amplamente utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão. Além disso, são conhecidas por sua ação antibacteriana, antituberculose e citotóxica (anticâncer) (MATOS *et al.*, 2018).

No entanto, essas moléculas obtidas por processos sintéticos, apresentam uma desvantagem no que diz respeito a sua solubilidade aquosa. Para melhorar a biodisponibilidade das mesmas, diversas metodologias foram desenvolvidas, como a utilização por exemplo de lipossomas e microemulsões. Dentre essas metodologias, a formação de complexos de inclusão (CI) utilizando as ciclodextrinas (CDs), tem chamado atenção (PINTO *et al.*, 2021).

As ciclodextrinas são considerados oligossacarídeos, formados por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$. São compostos cíclicos produzidos a partir da degradação enzimática do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (EC

2.4.1.19) , encontradas abundantemente na mandioca, milho, batata, trigo e seus derivados. Possuem formato de um cone truncado, possuindo a cavidade interna hidrofóbica e a parte externa, hidrofílica (PESTOVSKY; MARTÍNEZ-ANTONIO, 2018).

Podem ser encontradas em suas formas naturais ou modificadas. As ciclodextrinas naturais são denominadas: α -CD, β -CD e γ -CD, contendo seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente, em sua composição. Dentre elas, a mais comum é a β -CD, devido a sua cavidade interna poder suportar uma molécula hospedeira com massa molecular entre 100 e 400 g mol⁻¹. Além disso, devido as suas grandes propriedades, ela é amplamente utilizada pelo seu custo benefício e por ter um uma cavidade com um diâmetro com cerca de 7 Å, capaz de acomodar um anel aromático. Já as ciclodextrinas modificadas, são submetidas a processos químicos através de reações com várias moléculas. O intuito desse processo é formar derivados com diferentes propriedades físico-químicas, afim de melhorar a solubilidade e estabilidade (CARVALHO, 2018).

A finalidade de formar o complexo de inclusão com as CDs, é modificar as propriedades físico-químicas do sistema hóspede-hospedeiro, melhorando a dissolução da molécula hóspede em água, e assim, aumentando a sua biodisponibilidade (CARVALHO, 2018).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é preparar um complexo de inclusão entre ciclodextrina e DHPM e aliar a síntese orgânica, através da síntese multicomponente, para obtenção de princípios ativos e promover melhorias no potencial dessas substâncias. Propôs também analisar o potencial biológico da molécula de DHPM e dos complexos de inclusão, avaliando a toxicidade dos compostos e seus efeitos na germinação, utilizando o modelo vegetal *Lactuca sativa L.* (alface).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é preparar o complexo de inclusão entre DHPM e β -CD, combinando a síntese orgânica, através de reações multicomponentes, para obter princípios ativos e aprimorar o potencial dessas substâncias. Propôs analisar o potencial biológico da molécula de DHPM e dos complexos de inclusão, avaliando a toxicidade dos compostos e seus efeitos na germinação, utilizando o modelo vegetal *Lactuca sativa L.* (alface).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização da dihidropirimidinona por técnicas espectroscópicas como: Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Avaliar a afinidade da molécula pela ciclodextrina e verificar alterações na solubilidade intrínseca em água, utilizando as isotermas de solubilidade;
- Obtenção e caracterização da formação do complexo de inclusão (CI), utilizando espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H ;
- Realizar ensaio de dissolução *in vitro* dos complexos de inclusão e da molécula em sua forma pura
- Investigar as potencialidades do complexo de inclusão em ensaios biológicos.

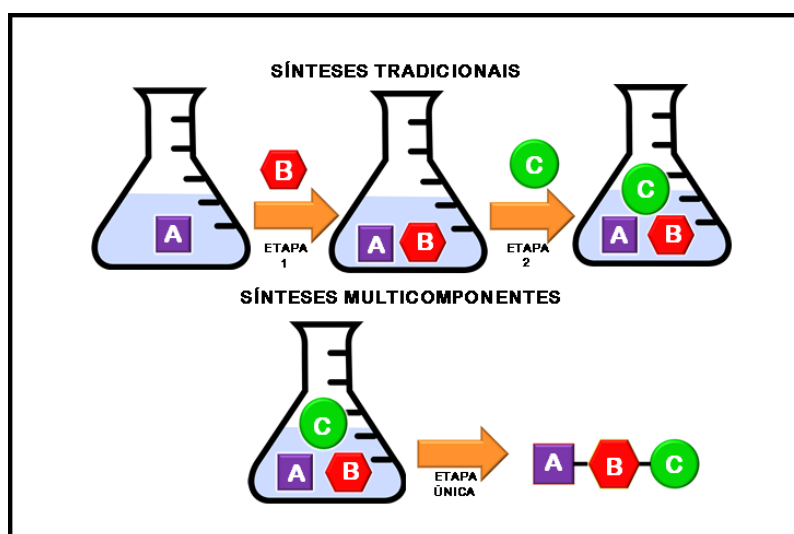
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Sínteses Multicomponentes - RMCs

Atualmente, os químicos têm buscado alternativas sustentáveis para o desenvolvimento de novas sínteses e para a conservação e preservação do meio ambiente. Um exemplo disso, são as reações multicomponentes (RMCs), que consiste na formação de moléculas maiores, possibilitando a formação de diversas novas estruturas com diferentes grupos funcionais e suas aplicações, por meio de variações nos materiais de partidas (TABASSUM; GOVINDARAJU; PASHA, 2017; ZHU *et al.*, 2022).

Elas são definidas como reações que partem de três ou mais reagentes, em um único frasco reacional (denominada *one pot*) com a finalidade de gerar uma estrutura mais complexa, fazendo com que todos os compostos reajam entre si, para a formação do produto. Além disso, nessas reações não há a formação de derivados e subprodutos (CIMARELLI, 2019; DÖMLING, 2006). Essa síntese tem chamado muito atenção da indústria química, pois apresenta vantagens em relação as sínteses tradicionais e está de acordo com os princípios da química verde. Como exemplo, pode estar relacionado a eficiência das reações, redução de resíduos, prevenção de uso de reagentes tóxicos e utilização de forma responsável dos recursos disponíveis (NISHANTH RAO *et al.*, 2021). A Figura 1, mostra o esquema de como ocorre as reações tradicionais e as sínteses multicomponentes.

Figura 1 – Representação esquemática de como ocorre as sínteses tradicionais e as sínteses multicomponentes. Dentro do Erlenmeyer, a cor em roxo, representa uma substância A; em vermelho, representa a substância B e em verde, representa a substância C.



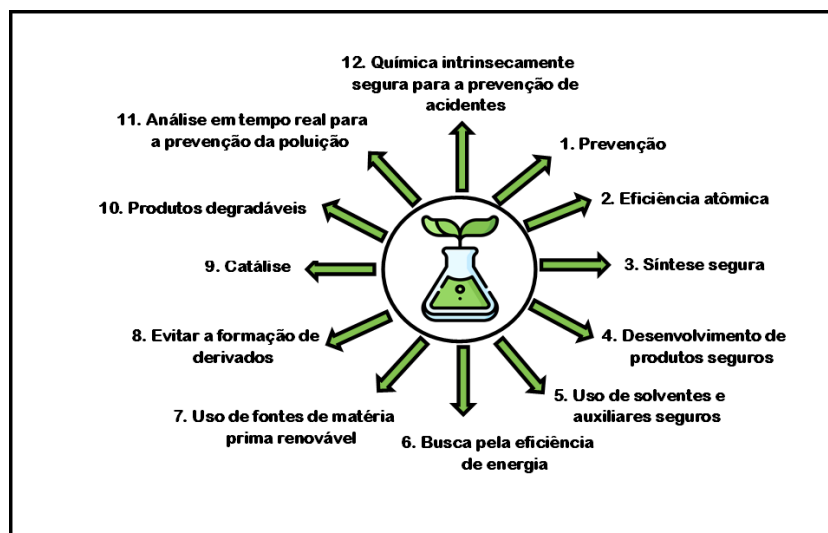
Fonte: Do autor (2024).

No entanto, as RMCs se tornam vantajosas e mais eficientes do que as sínteses orgânicas tradicionais, pois conseguem formar grandes estruturas, a partir de uma única etapa e somente um processo de purificação, ou seja, não necessita fazer o isolamento de intermediários. Isso é ecologicamente viável, pois facilita a simplificação da síntese e reduz a produção de resíduos químicos (CIMARELLI, 2019; ELDERS *et al.*, 2009).

Nesse contexto, a busca por maiores lucros nas indústrias químicas, juntamente com o avanço dos métodos sintéticos e o uso de produtos naturais, a busca de substâncias naturais e artificiais estão em ascensão no mercado, pois estão diretamente ligadas ao desenvolvimento de fármacos e outras substâncias que podem ser benéficas ao ser humano e ao meio ambiente. Dessa forma, é inegável a presença da química orgânica, em conjunto com a indústria sintética, uma vez que muitos produtos obtidos através destas sínteses são explorados de produtos e fontes naturais, devido as suas propriedades que muitas das vezes são satisfatórias e benéficas para fins medicinais (SANGI, 2016).

Diante do exposto, as RMCs surgem como estratégias sintéticas fundamentais, pois estão em consonância com os 12 (doze) princípios da química verde, formulados por Anastas e Warner, conforme mostra a Figura 2, abaixo.

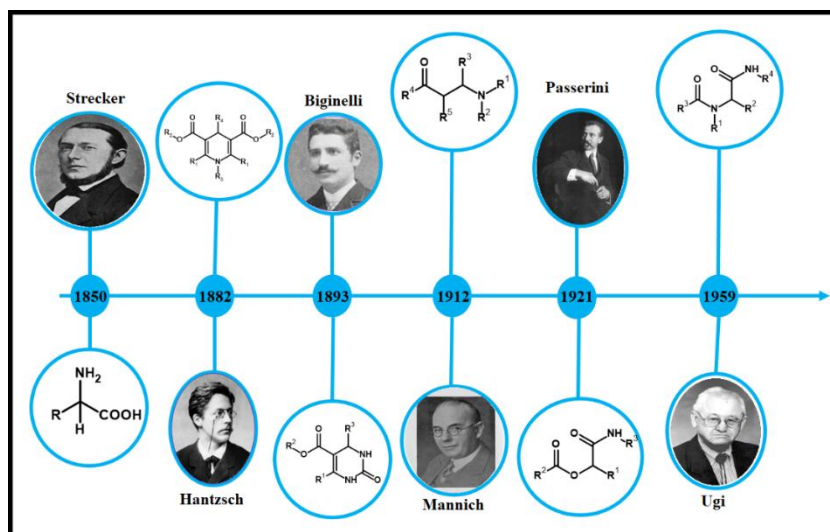
Figura 2 – Os princípios da Química Verde.



Fonte: Do autor (2024).

No entanto, há vários relatos de sínteses multicomponentes que já foram descritas e elucidadas na literatura, conforme mostra a linha do tempo ilustrada na Figura 3.

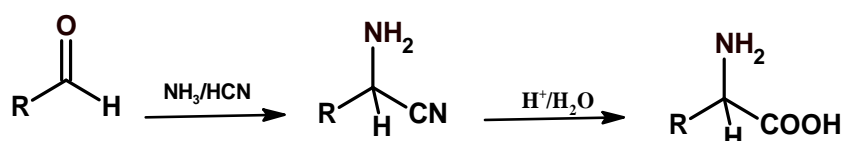
Figura 3 – Linha do tempo das sínteses multicomponentes descritas na literatura.



Fonte: Do autor (2024).

A primeira, foi postulada em 1850, através de estudos de Von Adolph Strecker. Essa reação tem como princípio a formação de α -aminoácidos e α -aminonitrilas, partindo de aldeído ou cetonas, aminas primárias ou secundárias e sais de cianeto, conforme mostra a Figura 4. Ela foi de extrema importância, uma vez que foi a primeira síntese que constituiu de um método simples e eficiente, para a obtenção de aminoácidos, cujas moléculas são biologicamente importantes aos seres vivos (EZZATZADEH; HOSSAINI, 2020; KOUZNETSOV, GALVIS, 2018). Além disso, estudos demonstraram que essa classe de moléculas possui atividade como inibidores da enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) e moduladores do bioprocessamento de carboidratos (ROGERIO *et al.*, 2016).

Figura 4 - Síntese multicomponente proposta por Strecker.

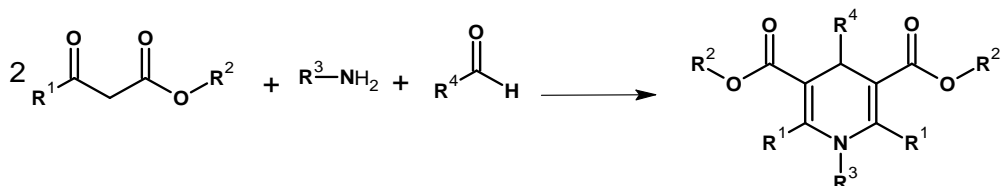


Fonte: Do autor (2024).

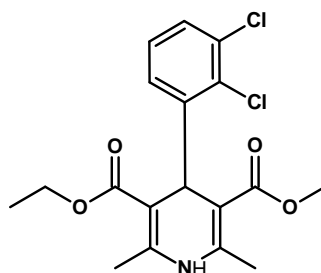
Em 1882, o alemão Hantzsch, estudou as sínteses das dihidropiridina (DHP), utilizando dois compostos dicarbonil, uma amina e um aldeído, conforme mostra a Figura 5a. As dihidropiridinas tem demonstrado grande importância para a indústria farmacêutica, pois se destacam principalmente por sua atividade anti-hipertensiva. Um dos exemplos dessa síntese, é a obtenção do fármaco felodipino (Figura 5b), que tem ação vasodilatadora, bloqueador dos canais de cálcio e utilizado também para o tratamento de hipertensão (BRINKERHOFF *et al.*, 2019).

Figura 5 - Reação multicomponente a) Reação de Hantzsch b) Representação da estrutura química do fármaco Felodipino.

a)



b)

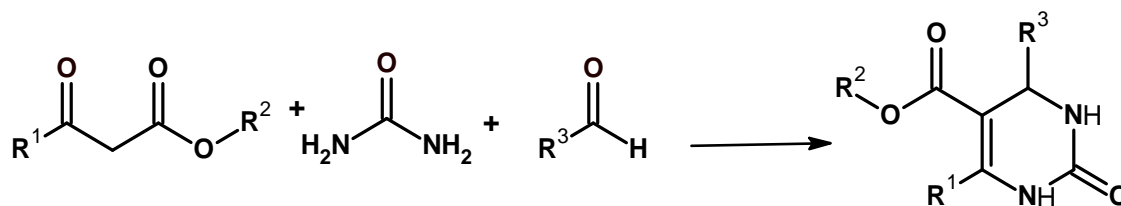


Fonte: Do autor (2024).

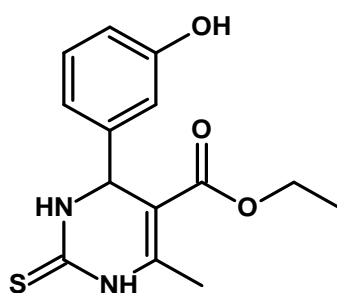
Na Universidade de Florença, em 1893, o italiano Pietro Biginelli, foi capaz de estudar a síntese multicomponente, investigando as sínteses de 3,4-dihidropiridin-2-(1H)-ona (DHPM), partindo de três reagentes: aldeído, acetoacetato de etila e ureia, conforme mostra a Figura 6a. Essa classe de compostos tem chamado atenção dos pesquisadores em relação as suas propriedades farmacológicas, visto que derivados dessa síntese tem atividade antimalárica, antituberculose e citotóxica (anticancerígena) (NAGARAJAIAH; MUKHOPADHYAY; MOORTHY, 2016; RAMOS; RODRIGUES; NETO, 2019). Um exemplo de derivado dessa classe, é o monastrol (Figura 6b), um inibidor alostérico da proteína cinesina Eg5, que tem a capacidade de atuar com agentes anticâncer, o que impossibilita a proliferação de células cancerígenas, sem conter efeitos colaterais (AL-OBAIDI *et al.*, 2016; SEBASTIAN; RAGHAV; RATHINASAMY, 2022; WU *et al.*, 2020).

Figura 6 - Síntese proposta por Biginelli (a). Em (b) a fórmula estrutural do monastrol.

a)



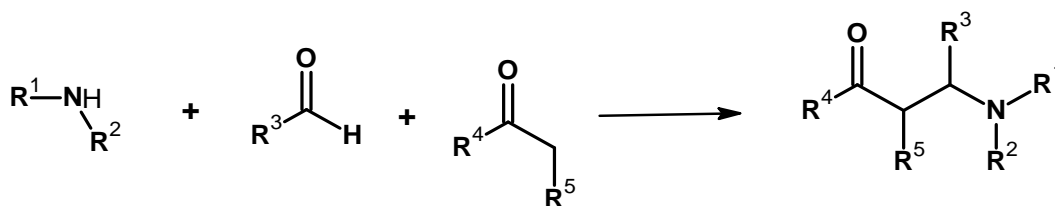
b)



Fonte: Do autor (2024).

Partindo de uma amina, um aldeído e um reagente com uma carbonila, em meio ácido, como é mostrado na Figura 7, é possível obter uma classe de compostos com propriedades bioativas de enorme interesse, essa classe de substâncias ficou conhecida como bases de Mannich, em homenagem ao pesquisador que desenvolveu essa síntese, Carl Mannich (1912). Essas bases são conhecidas pelo seu grande potencial, por serem usadas como intermediários sintéticos em compostos que possuem N (nitrogênio). Além disso, estudos relatados na literatura, inferem que essa classe de compostos tem demonstrado seu potencial em diversas atividades biológicas como antimicrobianas, anti-inflamatórias e analgésicas (FILHO *et al*, 2017; ROGERIO *et al*, 2016).

Figura 7 - Síntese multicomponente proposta por Mannich.

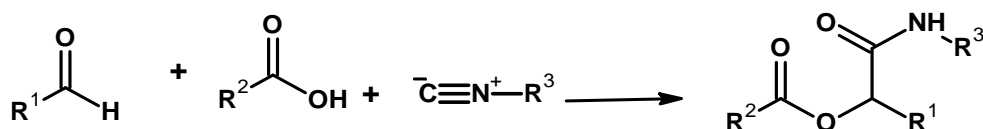


Fonte: Do autor (2024).

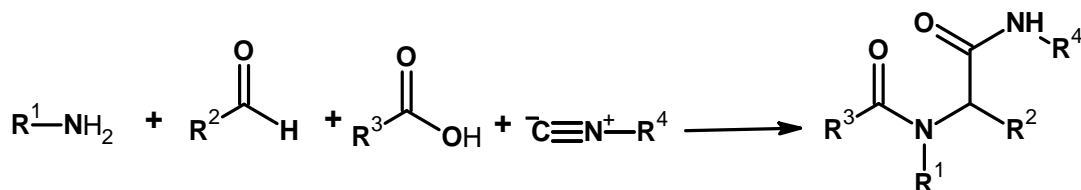
Também foi possível estudar sobre a reatividade das isonitrilas, através de estudos propostos por Passerini (1921) e Ugi (1959). Da reação de Passerini (Figura 8a), utilizam-se materiais de partidas como ácido carboxílico, aldeído e uma isonitrila, para a produção de α -acilocarboxamidas, que possuem propriedades fungicidas (ROGERIO *et al*, 2016) Enquanto as sínteses de Ugi (Figura 8b), dispõem de quatro componentes, sendo um aldeído, uma amina, um ácido carboxílico e uma isonitrila, para fabricação e obtenção de α -aminoacilamidas, que são produtos com alta aplicabilidade no ramo medicinal (ROGERIO *et al*, 2016).

Figura 8 - Síntese multicomponente. Em a) Síntese de Passerini b) Síntese de Ugi.

a)



b)



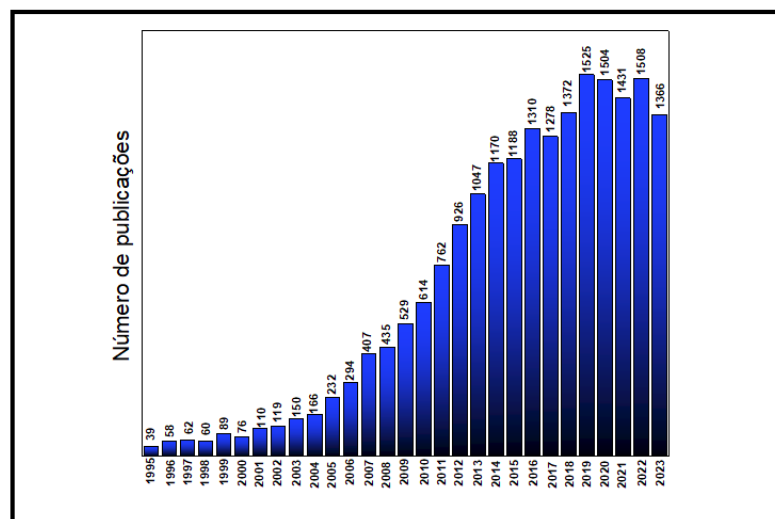
Fonte: Do autor (2024).

Nota-se então, que com as reações multicomponentes, já foram comercializadas diversas substâncias das mais variadas classes. Diante disso, estas sínteses não só despertam o interesse dos químicos, mas também constituem um grande desafio da pesquisa em sintetizá-las, devido à grande versatilidade de reagentes dispostos em nosso meio, para a construção de diversas estruturas químicas (PINTO *et al*, 2021).

Por algum tempo, houve pouco interesse por esse tipo de síntese entre os pesquisadores. No entanto, o gráfico ilustrado na Figura 9, revela um aumento significativo desse interesse, impulsionado pelas descobertas recentes e pelas vantagens das reações multicomponentes, em comparação com as metodologias de sínteses tradicionais. Uma análise na base de dados *Web of Science* do portal Periódicos Capes, utilizando as palavras-chaves “*multicomponent and synthesis*”, revela uma tendência de crescimento consistente. Em 1995, foram identificadas apenas 39 publicações utilizando as sínteses multicomponentes. Após o decorrer dos anos, houve um aumento gradativo, mesmo após ao cenário mundial enfrentado pela pandemia do Covid-19, o número de publicações não diminuiu. Esse aumento na produção científica

demonstra o crescente interesse dos pesquisadores nas RMCs, motivado pela sua grande versatilidade e potencial para impulsionar avanços significativos na área.

Figura 9 - Número de publicações na Web of Science utilizando as sínteses multicomponentes dos anos de 1995 até final do ano de 2023.



Fonte: Do autor (2024).

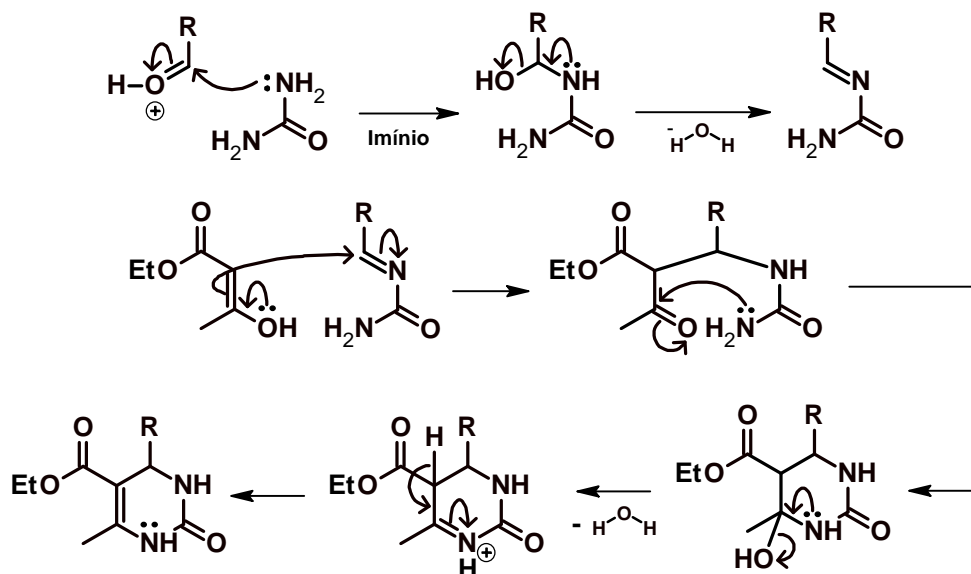
3.2 Dihidropirimidinonas

Os compostos orgânicos heterocíclicos são de grande importância na química orgânica, sendo encontrados em aproximadamente um terço de todas as publicações na área. Esses compostos possuem uma cadeia carbônica cíclica, contendo um heteroátomo, geralmente O (oxigênio), N (nitrogênio) ou S (enxofre). Desempenham um papel crucial em diversas aplicações farmacológicas, uma vez que são componentes essenciais de ácidos nucleicos (DNA e RNA), aminoácidos e produtos naturais (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ; *et al.*, 2019; KAUR *et al.*, 2017).

Como já mencionado, a síntese das DHPM é realizada através de um aldeído, ureia e acetoacetato de etila, em meio ácido. Entretanto, a literatura dispõe de três propostas possíveis de mecanismo, formando assim três intermediários diferentes de reação. Essas propostas são denominadas de rota do íon imínio, enamina e Knoevenagel.

A rota do íon imínio, surgiu no ano de 1993, por Folkers e Johnson, considerando o meio reacional ácido. Ocorre inicialmente, uma condensação aldólica entre a ureia e o aldeído, tendo como intermediário da reação, o íon imínio. Posteriormente, ocorre uma adição nucleofílica com o acetoacetato de etila, fornecendo a molécula de interesse, conforme é elucidado o mecanismo reacional, na Figura 10.

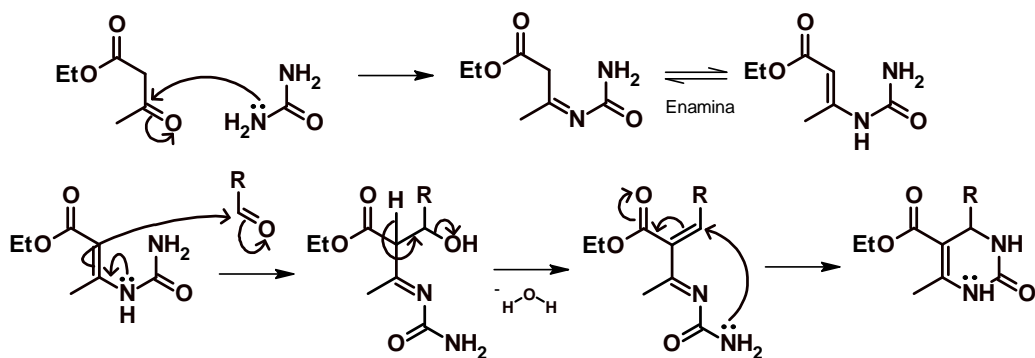
Figura 10 - Proposta de mecanismo de Folkers e Johnson – Rota do íon imínio.



Fonte: Do autor (2024).

A segunda proposta, também desenvolvida por Folkers e Johnson, relatado no ano de 1993, ficou conhecida como rota da enamina. O mecanismo reacional é descrito na Figura 11, abaixo.

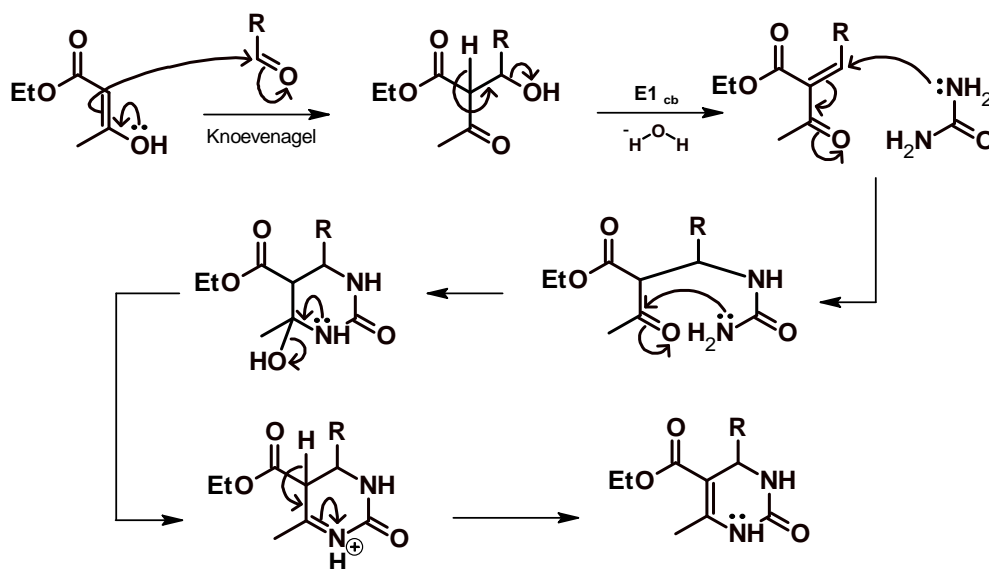
Figura 11 - Proposta de mecanismo de Folkers e Johnson – Rota da enamina.



Fonte: Do autor (2024).

Já em 1973, Sweet e Fissekis propuseram o mecanismo denominado reação de Knoevenagel. O intermediário dessa reação é denominado carbânio e ocorre inicialmente uma condensação aldólica entre o benzaldeído e o acetoacetato de etila. Por fim, ocorre a reação com a ureia, para dar origem ao produto da síntese de Biginelli. A Figura 12, evidencia o mecanismo reacional.

Figura 12 - Mecanismo reacional de Knoevenagel.



Fonte: Do autor (2024).

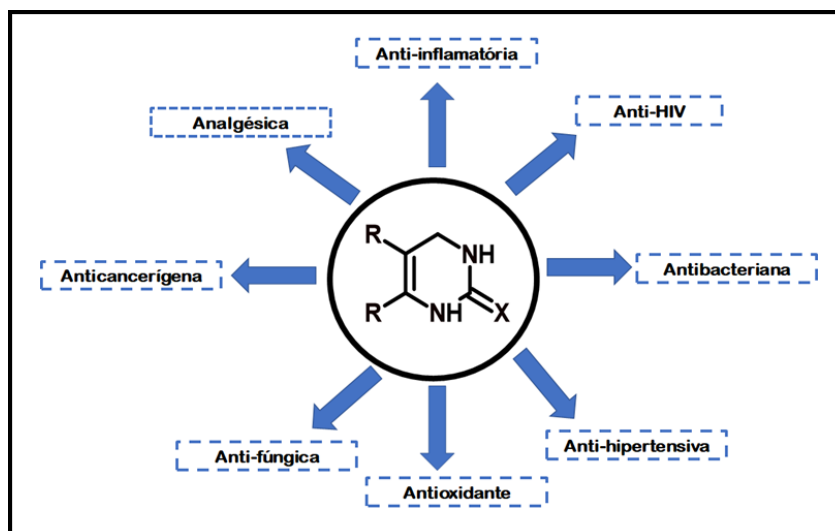
Estudos realizados por Souza e colaboradores (2009), demonstraram que a rota do íon carbânio ocorre de forma muito lenta, o que ocasiona uma contribuição muito lenta para a formação do produto. Ainda, os autores inferem que a reação de Knoevenagel possui uma energia de ativação maior. Dessa forma, através de cálculos teóricos, evidencia que a rota do íon imínio, proposto em 1993 é o mecanismo mais plausível em termos cinéticos e termodinâmicos.

Através das sínteses das dihidropirimidinonas, uma ampla variedade de fármacos e compostos com potencial farmacológico possuem estruturas contendo heterocíclicos. Desde o final do século XIX, esses compostos vêm ganhando espaço na química medicinal, devido as suas atividades biológicas (KAZEMI, 2020; MATOS *et al.*, 2018).

3.2.1 Atividades biológicas das dihidropirimidinonas

Os compostos heterocíclicos são de extrema importância para a química orgânica e química biológica, pois desempenham vários mecanismos de ação, devido as suas propriedades farmacológicas. Dentre elas, destacam-se atividade antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica e atividade inibidora dos canais de cálcio (SAFARI *et al.*, 2020; SAGHA *et al.*, 2022; SANA *et al.*, 2019). Um esboço das diferentes atividades biológicas das dihidropirimidinonas é mostrada na Figura 13.

Figura 13 - Algumas atividades biológicas das dihidropirimidinonas.

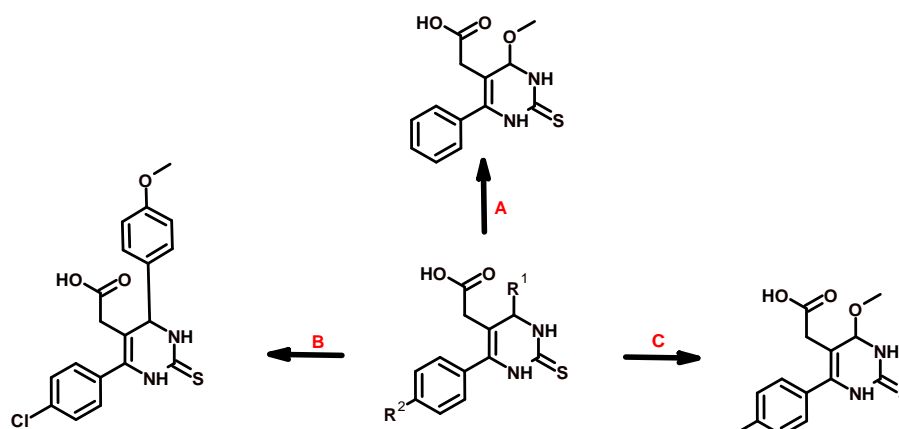


Fonte: Kaur *et al* (2017), com modificações pelo autor (2024).

3.2.1.1 Atividade anti-inflamatória

Em 2004, Kumar e colaboradores puderam sintetizar e avaliar derivados do ácido 4,6-(*-*aril substituído)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroirimidina-5-il]-acético como possíveis agentes anti-inflamatórios. A atividade desses compostos foi avaliada com base no diclofenaco sódico, que é um medicamento padrão de referência. No trabalho, foi realizada a atividade anti-inflamatória em ratos albinos, no qual a redução percentual na inflamação foi registrada após 3 horas da administração de carragenina (um polissacarídeo sulfatado extraído de algas vermelhas marinhas), comparando-se os compostos testados com os animais tratados com o fármaco (diclofenaco sódico) e o carboidrato (carragenina). Três séries de moléculas foram sintetizadas, cada uma com diferentes grupos funcionais, mencionados como R¹ e R² conforme mostrado na Figura 14. Alguns compostos demonstraram atividade anti-inflamatória, sendo denominados de A, B e C os mais potentes, destacando-se a importância do grupo 4-metoxi em C-4 na atividade dos compostos. A presença do grupo 4-metoxi fenil aumentou a atividade dos compostos, enquanto o grupo fenil em C-6 reduziu essa atividade. Substituições diferentes para o grupo metoxi em C-4 resultaram em uma diminuição da atividade anti-inflamatória (KAUR *et al*, 2017).

Figura 14 - Exemplo de dihidropirimidinona com atividades anti-inflamatória.

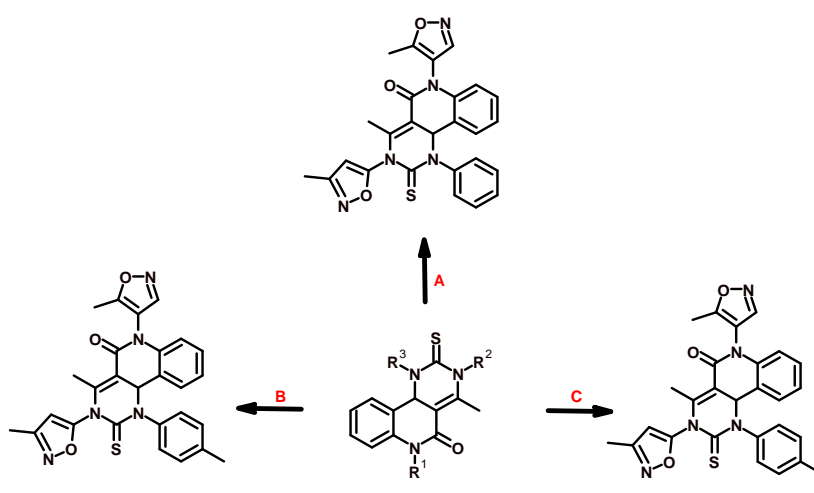


Fonte: Do autor (2024).

3.2.1.2 Atividade antibacteriana

Rajaarendar e colaboradores puderam sintetizar compostos derivados da piperazina e pirimidina ligados à morfolina para testar como agentes antimicrobianos. Eles avaliaram a atividade desses compostos contra diferentes tipos de bactérias, sendo Gram-positivas, quanto Gram-negativas. Os resultados indicaram que os compostos possuíam uma boa atividade antibacteriana, até superando a ciprofloxacina, um antibiótico comum. Os compostos mais eficazes denominados de A, B e C, demonstraram atividade comparável à ciprofloxacina (KAUR *et al.*, 2017). As estruturas desses compostos estão ilustradas na Figura 15.

Figura 15 - Exemplos de dihidropirimidinonas com atividade antibacteriana.

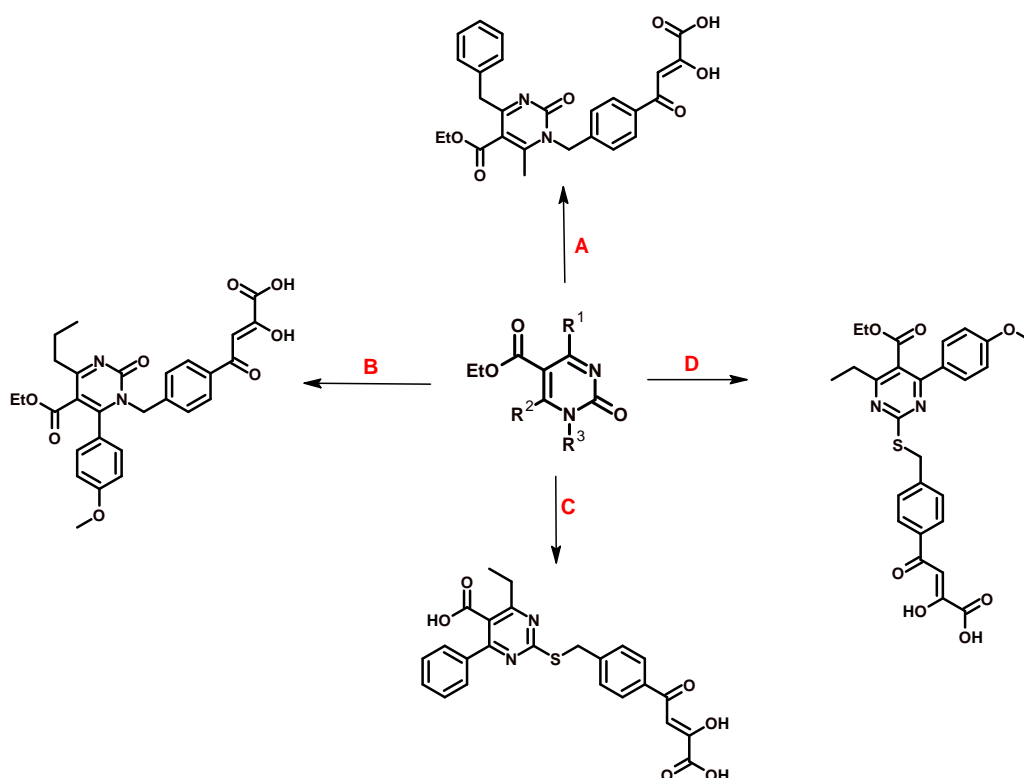


Fonte: Do autor (2024).

3.2.1.3 Atividade anti-HIV

No ano de 2015, Sari e pesquisadores puderam sintetizar derivados do ácido dihidropirimidina α,γ -dicetobutanóico para atingir a integrase do HIV (uma enzima essencial para o ciclo de vida do Vírus da Imunodeficiência Humana). Eles sintetizaram duas classes de compostos, denominados de primeira e segunda geração. O objetivo principal foi avaliar a atividade enzimática contra a integrase do HIV. Os compostos A, B, C e D (Figura 16) foram os que mais inibiram a transferência e as cadeias submicromolares.

Figura 16 - Exemplos de dihidropirimidinonas com atividades anti-HIV.



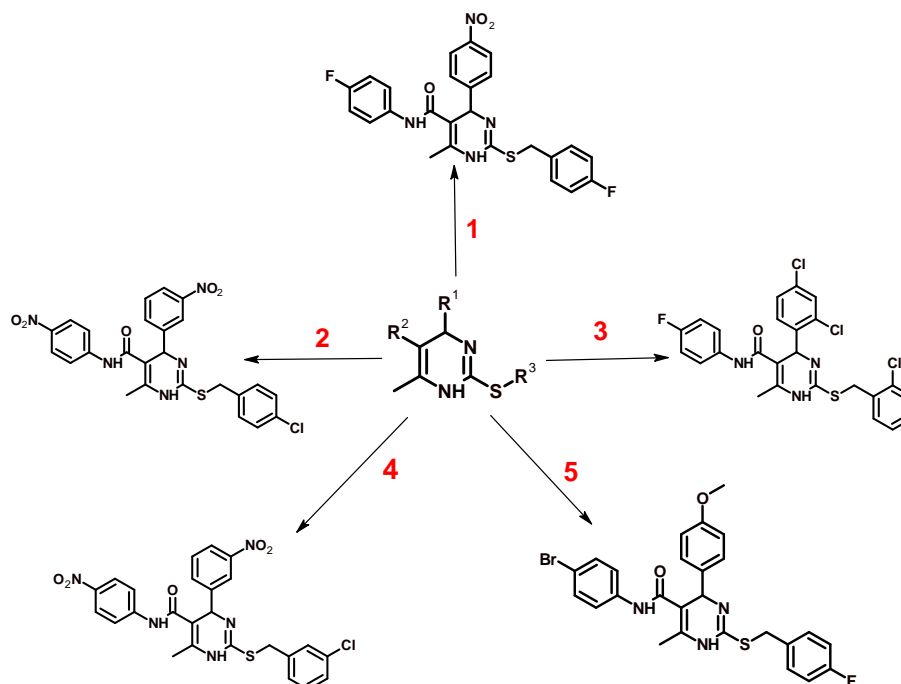
Fonte: Do autor (2024).

Os estudos revelaram que a substituição do C-6 emerge como um determinante crítico da eficácia dos compostos em questão. Quando o grupo funcional R^2 foi substituído por radicais menores (como metila ou etila), uma notável elevação da atividade biológica foi constatada. Em contrapartida, a substituição do R^2 por grupos volumosos, como fenil e isopropil, resultou em uma diminuição progressiva da atividade. Este fenômeno evidencia a intolerância ao impedimento estérico no carbono 6, sugerindo sua influência direta na potência dos compostos (KAUR *et al.*, 2017).

3.2.1.4 Atividade anti-hipertensiva

Em 2010, Alam e pesquisadores, conduziram a síntese de 1,4-dihidro-5-pirimidina carboxamidas visando sua aplicação como agente anti-hipertensivos. Foram sintetizadas um total de trinta moléculas e submetidos à avaliação da sua atividade por meio do método do manguito de cauda, que mede a pressão arterial sistólica. Estas moléculas foram comparadas ao nifedipino, um medicamento padrão. Entre os trinta compostos, apenas cinco se destacaram como os mais potentes. A análise da relação de atividade estrutura revelou que substituições variadas no anel fenil, ligado a porção pirimidina, desempenharam papel crucial na modulação da atividade anti-hipertensiva. Especificamente, a introdução de grupos doadores de elétrons, como $-OCH_3$ nas posições 3 e 4, resultou em um aumento da atividade anti-hipertensiva. Substituições em outros anéis fenil também influenciaram a atividade, destacando-se a maior atividade observada nos derivado benzil substituídos. Além disso, constatou-se que os derivados substituídos por cloro demonstraram ser mais ativos em comparação com outros halogênios. Também, o anel fenil ligado à ligação amida não apresentou efeito significativo na atividade biológica em pesquisa (KAUR *et al.*, 2017). A Figura 17, evidencia as estruturas dos 5 derivados que apresentaram melhor atividade anti-hipertensiva.

Figura 17 - Estruturas químicas dos derivados das dihidropirimidinonas com atividades anti-hipertensiva.

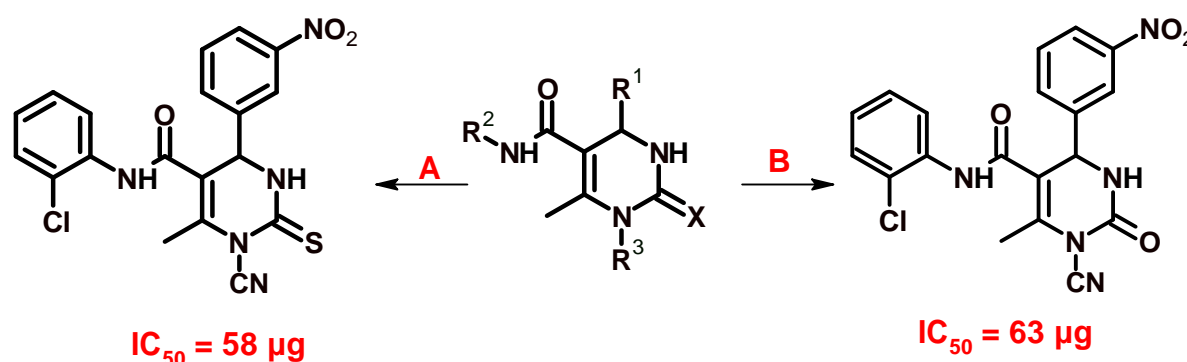


Fonte: Do autor (2024).

3.2.1.5 Atividade antioxidante

No ano de 2009, Kumar e colaboradores, realizaram a síntese de trinta e dois compostos, os quais foram submetidos à avaliação de atividade antioxidante utilizando o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). De todos os compostos, apenas dois destacaram-se (Composto A e B), sendo os mais potentes, conforme mostra a Figura 18. Os autores relatam que a presença da porção 3- nitro fenil na posição da dihidropirimidina demonstrou ser responsável pela atividade antioxidante, com os valores de IC_{50} de 58 e 63 μg , respectivamente (KAUR *et al.*, 2017).

Figura 18 - Estruturas químicas de derivados de dihidropirimidinonas com atividades antioxidantes.

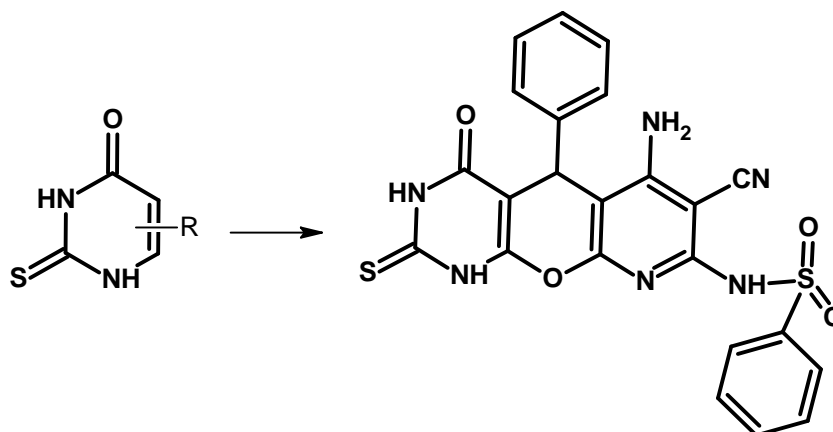


Fonte: Do autor (2024).

3.2.1.6 Atividade anti-fúngica

No ano de 2012, Aly e Kamal, desenvolveram um derivado fundido de cromono [2,3-d] pirimidina e pirano [2,3-d] pirimidina e realizaram uma triagem *in vitro* para avaliar a atividade fúngica. Os testes foram conduzidos contra duas espécies de fungos: *Aspergillus flavus* e um fungo de levedura *Candida albicans*, utilizando o método de difusão em poço de ágar. Nove compostos foram testados e comparados com a Anfotericina B, um medicamento padrão para determinar sua potência. Os resultados indicaram que o composto apresentou uma maior potência e relevância que a Anfotericina B contra o fungo *Aspergillus flavus*, mas foi considerado inativo contra a *Candida albicans* (KAUR *et al.*, 2017). A estrutura do composto mais potente é mostrada na Figura 19, abaixo.

Figura 19 - Estrutura química de derivado da dihidropirimidinona com atividade antifúngica.



Fonte: Do autor (2024).

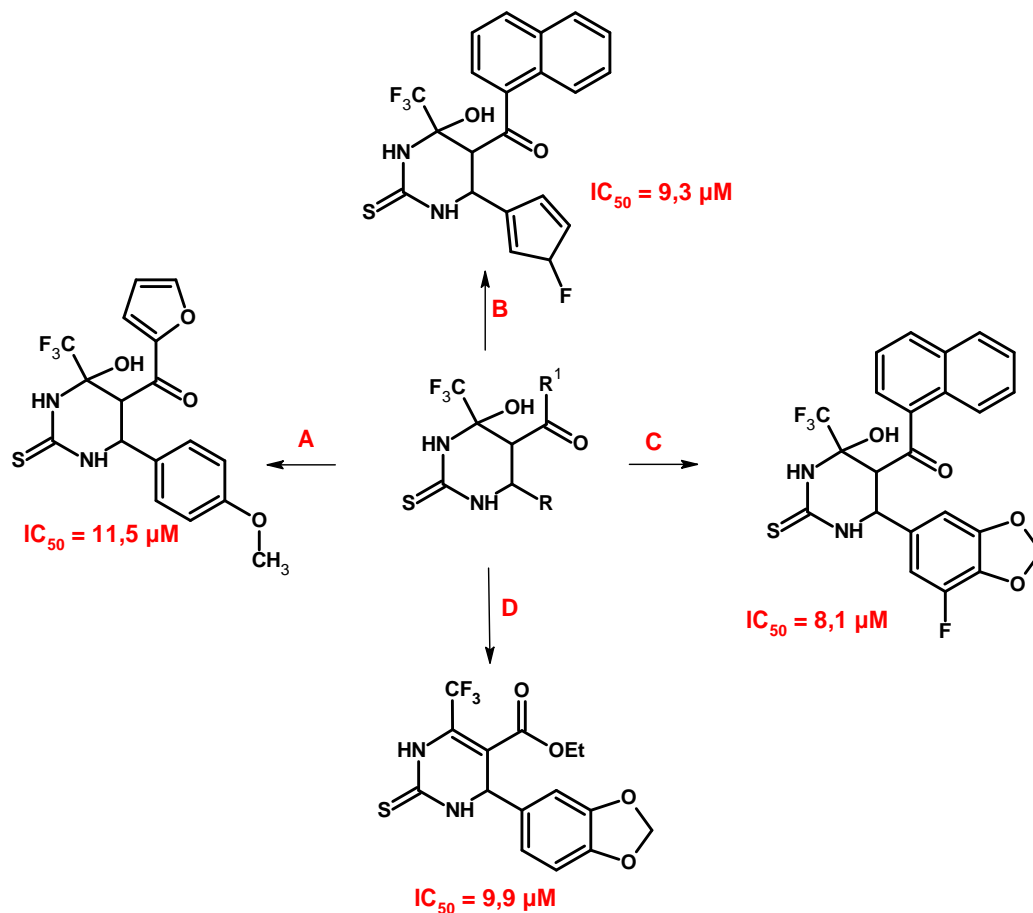
3.2.1.7 Atividade anticancerígena

As pirimidinas e seus derivados demonstram atividades anticancerígenas ao interagir com diversas enzimas, tais como, tirosinase (EC 1.14.18.1), citocromo P450 e também com processos facilitados pela glutatona. Além disso, esses compostos interagem com receptores específicos, tais como somatostatina, receptores de estrogênio e progesterona, contribuindo para sua eficácia no combater ao câncer (KUMAR *et al.*, 2017).

3.2.1.7.1 Câncer de colo

Em 2011, estudos realizados por Agbaje e colaboradores, demonstraram as sínteses de dezessete derivados de hexahidropirimidina. Essas moléculas foram avaliadas quanto à toxicidade contra a linhagem celular COLO 320. Dentre elas, apenas quatro compostos (A, B, C e D) apresentaram atividade cancerígena com valores de IC_{50} iguais a 11,5, 9,3, 8,1 e 9,9 μ M (KUMAR *et al.*, 2017). A Figura 20, exemplifica as estruturas dos quatro compostos que apresentaram as melhores atividades anticancerígenas.

Figura 20 - Estruturas químicas das hexahidropirimidina com atividades anticancerígenas (câncer de colo).

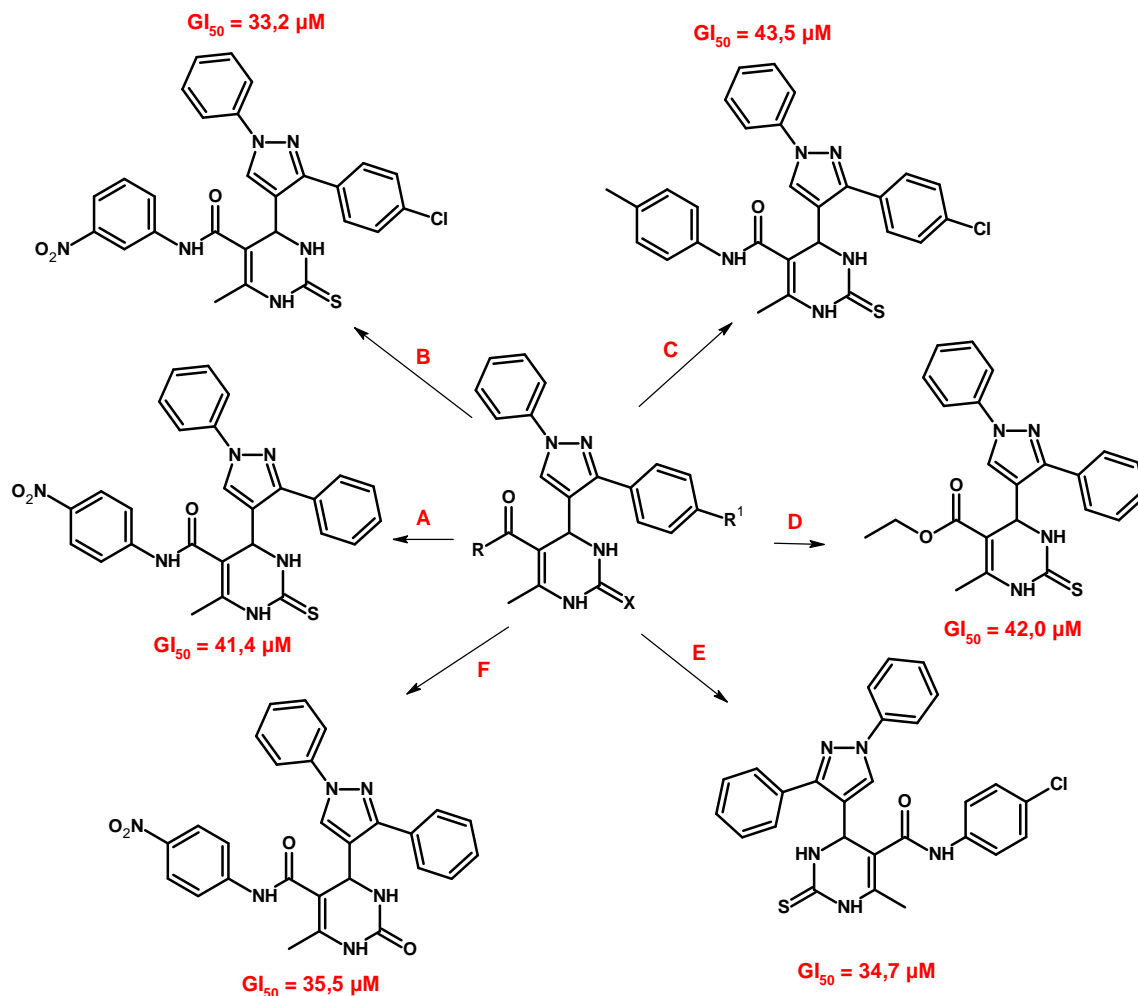


Fonte: Do autor (2024).

3.2.1.7.2 Câncer de mama

Yadlapalli e colaboradores, no ano de 2012, puderam sintetizar dihidropirimidinas ligadas a diarilpirazol e pesquisar a respeito da sua atividade anticancerígena *in vitro* contra a linha celular de câncer de mama humano MCF-7. Foram sintetizados cerca de vinte e três compostos, sendo somente seis considerados os mais ativos (Composto A até F). A seleção dos compostos foi realizada utilizando o protocolo de ensaio SRB, sendo todos testados em quatro diferentes concentrações sendo 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M e 1×10^{-4} M. Todos os seis compostos apresentaram excelente inibição do crescimento das células no GI_{50} (concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular). A Figura 21, evidencia as estruturas químicas dos compostos sintetizados.

Figura 21 - Estruturas químicas das dihidropirimidinas ligadas a diarilpirazol com atividade anticancerígenas (contra o câncer de mama).



Fonte: Do autor (2024).

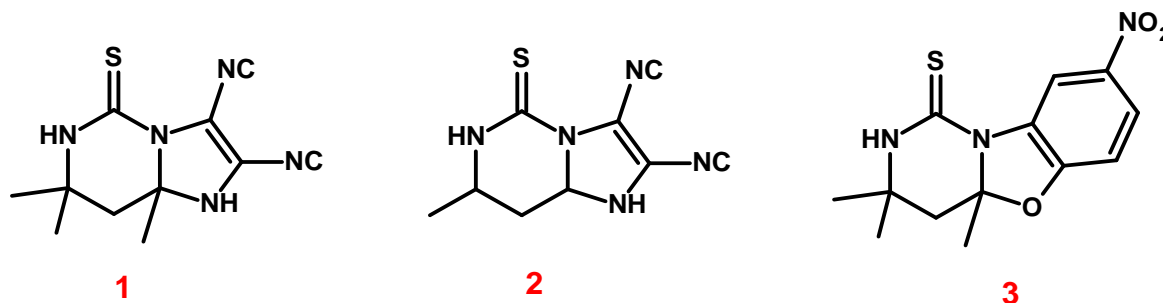
Os autores ainda inferem que o estudo da relação estrutura-atividade indicou que compostos contendo o grupo tio são mais potentes do que aqueles contendo o grupo oxo. Além disso, a presença do grupo funcional tio-ureia nas dihidropirimidinas aumentou sua atividade anticancerígena (KAUR *et al.*, 2017)

3.2.1.8 Atividade analgésica

No ano de 2005, Sondhi e colaboradores puderam sintetizar derivados de pirimidina mono, bi e tricíclicos as quais conseguiram avaliar a sua atividade analgésica. No estudo conduzido, foram sintetizadas dez moléculas, onde foram examinadas utilizando o ensaio de contorção de fenilquinona. O medicamento utilizado como referência para comparação da atividade, foi o ibuprofeno. Os compostos 1, 2 e 3 mostrados na Figura 22, demonstraram

apresentar 100%, 70% e 75% de atividade respectivamente, na dose de 100 mg/Kg (KAUR *et al.*, 2017).

Figura 22 - Estruturas químicas de derivados de dihidropirimidina com atividade analgésica.



Fonte: Do autor (2024).

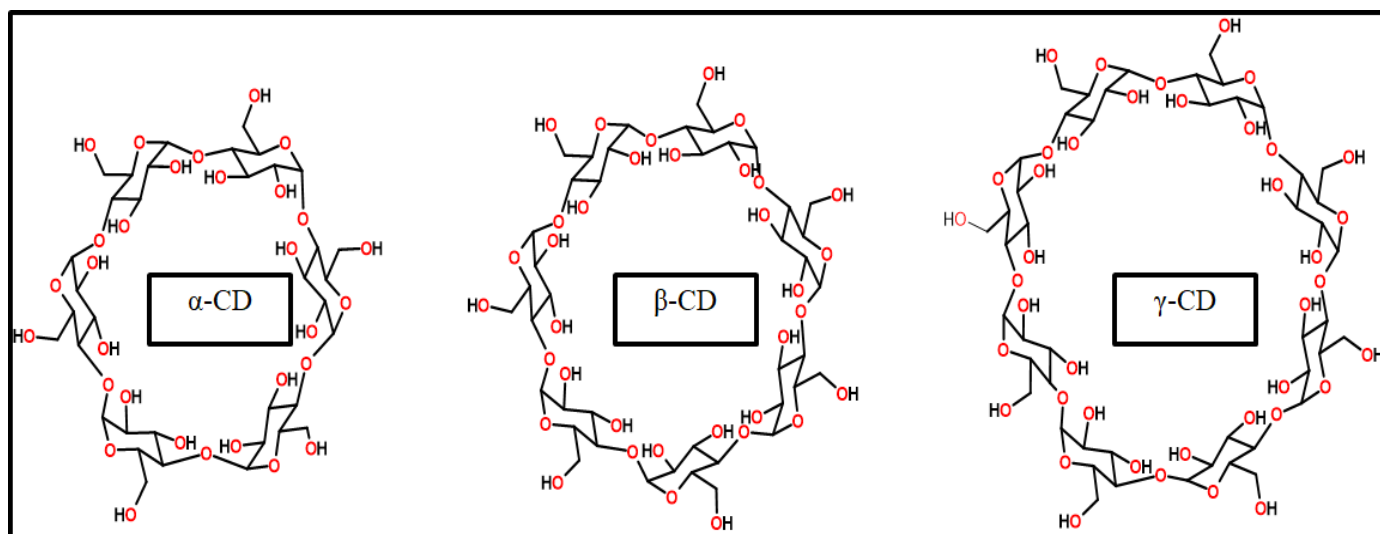
3.3 Ciclodextrinas

De acordo com o contexto histórico, em 1891, Villiers obteve uma pequena quantidade de uma substância cristalina a partir do meio cultural da bactéria *Bacillus* contendo amido, o qual a denominou de celulosina, devido a sua semelhança com a celulose. Após alguns anos, essa substância ficou conhecida como ciclodextrinas (CDs). (AMEEN *et al.*, 2019; CID-SAMAMED *et al.*, 2022).

As ciclodextrinas (CDs) são denominadas oligossacarídeos formadas por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$ (PESTOVSKY; MARTÍNEZ-ANTONIO, 2018). São compostos cíclicos, produzidos a partir do meio da degradação enzimática do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase – CGTase (EC 2.4.1.19) e encontradas abundantemente na mandioca, milho, batata, trigo e seus derivados (CARNEIRO *et al.*, 2019; GUEDES *et al.*, 2020).

Esses carboidratos em sua forma natural, podem ser formadas por seis (α -CD), sete (β -CD) ou oito (γ -CD) subunidades de glicose. Essas ligações são capazes de permitir que as CDs apresentem uma forma de um tronco cônico ou de um cilindro oco. Dentre suas interações, as hidroxilas primárias (C6), que estão localizadas na parte de baixo, estas apresentam uma rotação livre, o que reduz o diâmetro efetivo da cavidade das CDs. Já na parte superior é capaz de se encontrar hidroxilas secundárias, encontradas no C2 e C3, que apresentam uma cadeia relativamente rígida e sem rotação (TANG *et al.*, 2020). A Figura 23, evidencia a representação das diversas ciclodextrinas existentes.

Figura 23 – Representação esquemática das ciclodextrinas. A α -CD, β -CD e γ -CD contêm seis, sete e oito monômeros de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas.



Fonte: Silva (2023).

A sua cavidade tem um caráter hidrofóbico, o que caracteriza a sua alta insolubilidade em água, devido a cadeia carbônica. Por outro lado, em sua superfície, possui um caráter hidrofílico. Nesse contexto, fica explícito que há o aumento da solubilidade de molécula hospedeiras hidrofóbicas quando são complexadas com esses sistemas carreadores (MARTINS, 2018).

Dentre as CDs naturais, comumente se utiliza a β -CD, devido a sua cavidade interna poder suportar uma molécula hospedeira com massas moleculares entre 100 e 400 g mol⁻¹. Além disso, ela é amplamente utilizada pelo baixo custo e por ter uma cavidade com um diâmetro com cerca de 7 Å, capaz de acomodar um anel aromático (CARVALHO, 2014). Algumas de suas propriedades físico químicas, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físico químicas das CDs.

Propriedades	Ciclodextrinas		
	α -CD	β -CD	γ -CD
nº de unidades de glicose	6	7	8
Massa molar (g.mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	472
Forma dos cristais	Lâminas hexagonais	Paralelogramos monoclínicos	Primas quadráticos

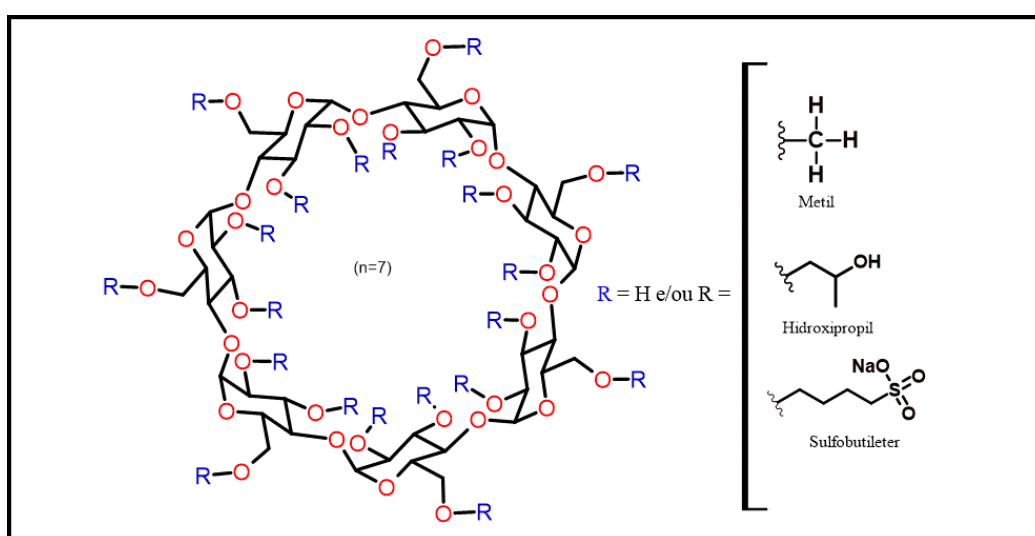
Fonte: Del Valle, 2004; Frömring; Szejtli, 1994.

As ciclodextrinas apresentam variação a respeito de sua solubilidade em água. A β -CD é a menos solúvel (1,85 g/mL), seguida pela α -CD (14,5 g/mL) e γ -CD (23,2 g/mL), conforme determinado em uma temperatura de 25 °C. A menor solubilidade da β -CD é atribuída à sua estrutura dimensional, pois as hidroxilas estão dispostas externamente, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares e conferindo rigidez à estrutura. A α -CD apresenta uma glicose distorcida que dificulta a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, resultando em maior solubilidade em comparação com a β -CD. Por sua vez, a γ -CD exibe maior flexibilidade estrutural, o que contribui para sua maior solubilidade em água (LIU *et al.*, 2022; ARRUDA *et al.*, 2022).

As ciclodextrinas (CDs) apresentam interações intermoleculares significativas, principalmente ligações de hidrogênio, no estado cristalino, resultando em uma redução na solubilidade desses compostos. Para superar essa limitação, foram desenvolvidas ciclodextrinas modificadas, nas quais os grupos hidroxila foram substituídos por grupos alquil. Esses derivados podem ser categorizados como modificados quimicamente ou naturalmente. Os derivados naturalmente modificados são obtidos por meio da ação de enzimas como a pululanase (EC. 3.2.1.41). Exemplos incluem a glicosil-CD (970 mg/mL) e a maltosil-CD (>1500 mg/mL) (JAMBHEKAR; BREEN, 2016; SZENTE; SZEJTLI, 1999).

Existem várias metodologias disponíveis para a obtenção de ciclodextrinas (CDs) quimicamente modificadas. Um exemplo é a metilação de Kuhn-Trischmann, que é utilizada para produzir metil-ciclodextrinas (Me β -CD). As hidroxipropil-ciclodextrinas (HP β -CD) são obtidas através da reação das CDs com óxido de propileno. Além disso, outros derivados das CDs comumente utilizados incluem a sulfobutiletil-ciclodextrina (SBE β -CD) e as CDs sulfatadas. A solubilidade de diferentes derivados, como HP β -CD, Me β -CD e SBE β -CD, varia, sendo, respectivamente, 1200, >500 e >1200 mg/mL (SAOKHAM et al., 2018). A Figura 24, evidencia a estrutura das ciclodextrinas modificadas, sendo a Me β -CD, HP β -CD e SBE β -CD.

Figura 24 – Exemplos de ciclodextrinas modificadas: Me β -CD, HP β -CD e SBE β -CD.



Fonte: Silva (2023).

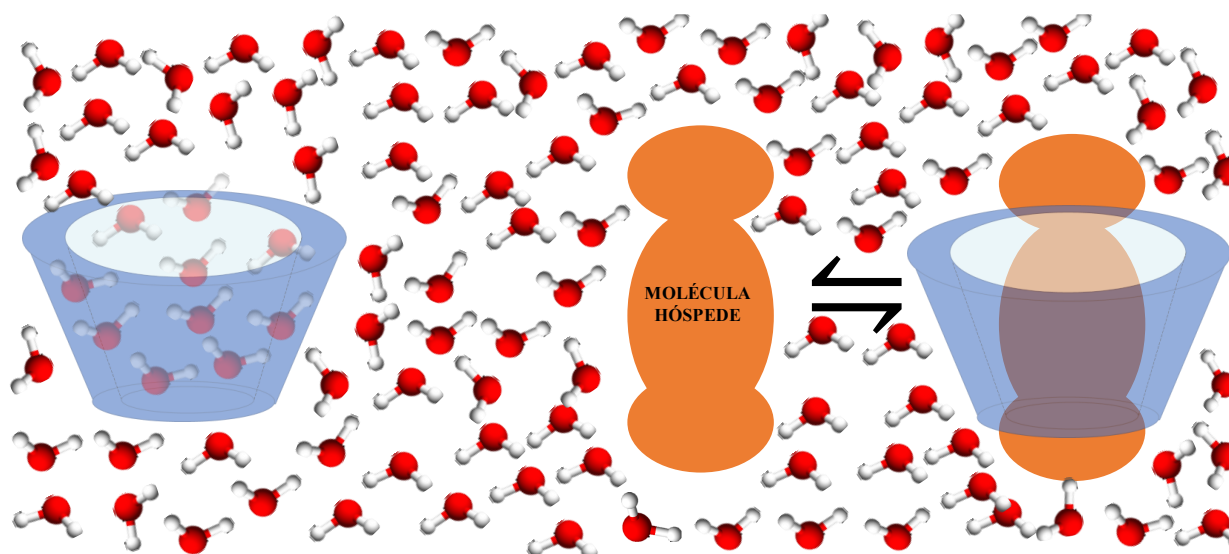
O interesse por esses sistemas carreadores aumentou gradativamente, pois o investimento em pesquisas foi capaz de possibilitar redução no custo de produção das mesmas, viabilizando uma maior aplicação em diversas áreas. As CDs, apesar de aumentar a solubilidade em água de moléculas hidrofóbicas, são utilizadas para poder mascarar os sabores e os odores desagradáveis, fixar substâncias voláteis, proteger contra substâncias sensíveis a luz e oxigênio, dentre outras aplicabilidades (TANG *et al.*, 2022).

3.4 Complexos de Inclusão

As CDs possuem uma grande versatilidade, e uma delas é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas, sendo elas sólidas, líquidas ou gasosas. Esses complexos formados são denominados “hospedeiro-hóspede”, pois a molécula hóspede é capaz de ser mantida dentro da cavidade da molécula hospedeira, através de um ajuste dimensional entre ambas (WADHWA *et al.*, 2017).

Quando são adicionadas em soluções aquosas, sua cavidade hidrofóbica é preenchida por moléculas de água. Em contato com moléculas hidrofóbicas, como fármacos e óleos essenciais, promove o deslocamento destas moléculas de água, que se encontram originalmente no interior da cavidade da ciclodextrina. Esse fenômeno pode ser explicado devido ao microambiente termodinamicamente desfavorável entre a interação polar e apolar da cavidade. Como as moléculas de água tendem a sair da cavidade da ciclodextrina, há um aumento da entropia do sistema, pois tem uma maior liberdade conformacional, devido as ligações de hidrogênio. Nesse contexto, este processo leva a encapsulação total ou parcial da molécula hóspede na cavidade da CD, fazendo com que se torne solúvel em água (MUÑOZ-SHUGULÍ *et al.*, 2021). A Figura 25, evidencia a representação da formação do complexo de inclusão.

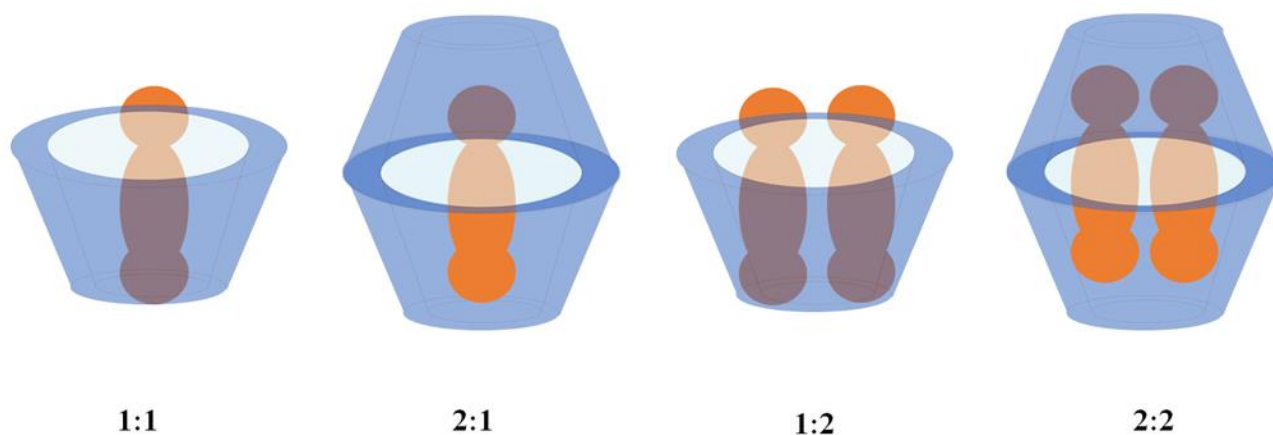
Figura 25 – Representação esquemática da formação do complexo de inclusão. A molécula com formato de cone truncado representa a molécula hospedeira (ciclodextrina); as esferas em vermelho representam os átomos de oxigênio e em branco os hidrogênios na molécula de água.



Fonte: SZEJTLI, 1988, com modificações pelo autor (2024).

Os complexos de inclusão são identificados com diversas estequiometrias, sendo possíveis nas proporções 1:1, 1:2, 2:1 ou 2:2. Essa proporção entre molécula hospedeira e hóspede é determinada pelo tamanho da molécula hóspede. A Figura 26, mostra as possíveis estequiometrias para a formação de complexo de inclusão entre a molécula hóspede e hospedeira.

Figura 26 – Possíveis estequiometrias para a formação de complexos de inclusão entre a molécula hóspede e hospedeira.



Fonte: Do autor (2024).

Kurkov e Loftsson (2013) enfatizam que no processo de formação dos complexos de inclusão, as forças envolvidas são as interações de van der Waals e as ligações de hidrogênio. Embora individualmente a primeira interação é considerada fraca, quando ocorrem em conjunto, elas proporcionam efeitos sinérgicos, ou seja, a interação entre esses elementos amplifica ou potencializa os resultados, resultando em um efeito conjunto mais significativo do que o esperado se considerarmos apenas os efeitos isolados de cada componente. Portanto, as moléculas interagem umas com as outras, resultando na formação de CI com estabilidade suficiente par garantir seu isolamento.

Em solução aquosa, as moléculas de água ocupam o interior das ciclodextrinas, resultando em um ambiente termodinamicamente desfavorável devido às interações com a água, que é polar. Moléculas menos polares que a água pode ser inserida nas ciclodextrinas, expulsando as moléculas de água e formando os complexos de inclusão. Além disso, a formação desses complexos depende de vários fatores, incluindo o efeito estérico, o tamanho da ciclodextrina, seu diâmetro interno e o tamanho da molécula hóspede ou dos grupos inseridos na cavidade da ciclodextrina (SZEJTLI, 1998; WANKAR et al, 2020).

A polaridade das moléculas também influencia, sendo que compostos hidrofílicos são fracamente complexados, enquanto moléculas menos polares que a água é preferencialmente complexada. A presença de grupos substituintes hidrofóbicos aumenta a estabilidade dos complexos de inclusão (SZEJTLI, 1998).

A temperatura elevada é outro fator influenciador. Pois aumentando a solubilização da ciclodextrina e da molécula, pode ocorrer desestabilização dos complexos de inclusão, podendo

até mesmo causar decomposição. Estudos indicam que a decomposição dos complexos geralmente ocorre entre 50-60 °C, embora em casos de interações fortes ou moléculas altamente insolúveis, essa temperatura possa ser mais elevada. A formação de complexos de inclusão é facilitada quando as moléculas estão dispersas em partículas finas ou solubilizadas. Normalmente, a solubilização é realizada em água, porém quando a molécula apresenta uma baixa solubilidade, é necessário que se faça o uso de solventes orgânicos para aumentar a velocidade ou viabilizar a complexação (DEL VALLE, 2004).

A solubilização e liberação controlada de diversos fármacos tem sido relatada quando complexadas com α , β e γ -CD. Como exemplos têm-se a Carbamazepina (BREWSTER *et al.*, 1991), nifedipino (SKALKO *et al.*, 1996). Além disso, estudos realizados por Carvalho e colaboradores (2014), conseguiram desenvolver agroquímicos, como adsorvente na remoção de poluentes orgânicos da água.

As ciclodextrinas desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, pois pode ser empregada em diversos princípios ativos. Tem como exemplo, na França, a comercialização do 17 β -estradiol em conjunto com a ciclodextrina modificada metilada (Me- β -CD), utilizado como spray nasal. Nos Estados Unidos, a ziprazidona (antipsicótico) e o voriconazol (antimicótico) são formulados com a presença de SBE- β -CD. Já no Brasil, temos o piroxicam, utilizado como um anti-inflamatório e analgésico, formulado com a β -CD (BHARGAV; SHEEBA, 2021).

3.5 Caracterização de compostos orgânicos e complexos de inclusão

A avaliação e caracterização da formação de um complexo de inclusão entre uma molécula convidada e uma ciclodextrina, é uma tarefa complexa que geralmente requer a combinação de diferentes métodos analíticos. Cada método explorará uma característica específica do CI, e o uso simultâneo de diversas técnicas, é capaz de proporcionar uma compreensão mais completa das interações entre o hóspede e o hospedeiro (MURA, 2014).

Normalmente, as técnicas empregadas se baseiam nas alterações físico-químicas da molécula incluída. Em solução aquosa, o diagrama de solubilidade de fase e a espectroscopia de UV-visível são comumente utilizados para o estudo da complexação. Além disso, outros métodos de análise são empregados para a caracterização dos CI com a ciclodextrina, tais como espectroscopia de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX) e análises térmicas, como calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria (TG) e termogravimetria diferencial (DTG).

A seguir, estão descritas brevemente as técnicas que podem ser utilizadas para a caracterização dos complexos de inclusão.

3.5.1 Espectroscopia na região do UV-Vis

Considerada uma técnica não destrutiva e frequentemente utilizadas em diversas análises, a espectroscopia na região do ultravioleta e visível trata-se de um método simples, rápido e econômico para avaliar a formação de complexos em solução. A absorção de radiação em comprimentos de onda específicos provoca a transição de elétrons de um estado fundamental para um estado energético, chamado de estado excitado. Essa absorção de energia está relacionada à estrutura eletrônica da molécula, o que confere a essa técnica um amplo espectro de aplicações. No entanto, vale ressaltar que esse método não é específico e pode ser afetado pela presença de substâncias interferentes.

De acordo com a Lei de Lambert-Beer, quando um feixe de luz atinge uma amostra, parte desse feixe é absorvido por ela. Ainda, essa lei estabelece que a fração de luz absorvida é sempre constante, ou seja, a absorbância (A) é diretamente proporcional ao percurso que a luz percorre na amostra (b), à concentração (c) e à absorvidade molar (ϵ). A Lei de Lambert é descrita, conforme mostra a Equação 1, abaixo:

$$A = \epsilon cb \quad (\text{Eq. 1})$$

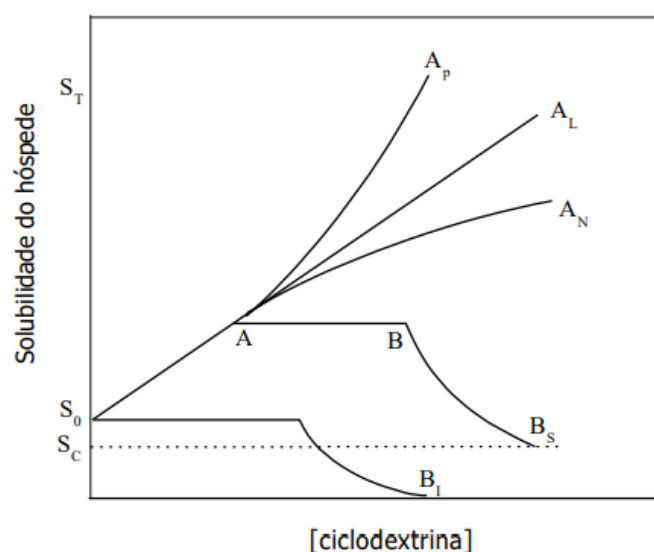
A transferência da molécula convidada do meio aquoso para a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, pode resultar em alterações na forma como a molécula incluída absorva a radiação incidente. Ou seja, depende da posição do grupo cromóforo. Isso ocorre porque há modificação do ambiente de solvatação e das diferentes interações entre o hóspede e o hospedeiro. Essas alterações podem ser observadas através de mudanças na intensidade e em deslocamentos hipocrômicos ou batocrômicos das bandas de absorção.

3.5.2 Diagrama de solubilidade de fase

No processo de complexação, o conhecimento a respeito da constante de associação (K_a) é de extrema importância, pois esses valores podem indicar as alterações nas propriedades físico-químicas resultantes da inclusão de uma molécula hóspede na cavidade da ciclodextrina, especialmente em relação à solubilidade. A análise de solubilidade de um composto sob a influência de agentes complexantes é uma abordagem tradicional que permite determinar tanto a constante de estabilidade, quanto a estequiometria do equilíbrio (BREWSTER; LOFTSSON; 2007).

Estudos desenvolvidos por Higuchi e Connors (1965), permitem avaliar a solubilidade do complexo de inclusão formado com base na variação da solubilidade do soluto com o aumento da concentração da molécula hospedeira. Esse método é representado por um diagrama de fases e dependendo do complexo de inclusão formado, a solubilidade pode apresentar diferentes perfis de isoterma, com aumento ou diminuição da solubilidade. A correlação entre a solubilidade do composto a ser incorporado e a concentração de ciclodextrina é ilustrado na Figura 27.

Figura 27 – Perfis de isoterma de solubilidade desenvolvidos por Higuchi e Connors.



Legenda: S_T = [soluto] dissolvido (livre + complexado); S_0 = solubilidade do soluto na ausência de CD; S_C = solubilidade limite do complexo pouco solúvel; Isoterma dos tipos A_p, A_L e A_N = complexos muito solúveis (limite de solubilidade determinado pela solubilidade da CD); Isoterma do tipo B_s = complexo de solubilidade limitada é formado; Isoterma B_l = complexo insolúvel é formado.

Fonte: Higuchi & Connors (1965, adaptado por Carvalho *et al.*, 2014, p. 35).

3.5.3 Calorimetria diferencial exploratória - DSC

As análises térmicas, especialmente a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA), são amplamente utilizadas para a caracterização de sistemas sólidos multicomponentes, incluindo os CI (MURA, 2015). A DSC fornece informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas dos complexos de inclusão, através da comparação das curvas térmicas dos componentes isolados, sua mistura e o complexo formado (MURA, 2015; GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). Por meio dos termogramas obtidos,

é possível avaliar se ocorre a formação de complexos de inclusão na razão testada, monitorando mudanças nas temperaturas de fusão e na entalpia dos compostos antes e após a complexação (CARVALHO; PINTO, 2012; LOFTSSON, MASSON, 2001).

O princípio fundamental do método é que quando uma amostra passa por uma transformação física, como transições de fase, o calor deve fluir pela amostra para que ela mantenha a mesma temperatura da célula de referência. A quantidade de calor que deve fluir para a amostra depende se o processo é exotérmico ou endotérmico. No caso do processo endotérmico, a amostra exigirá mais calor para aumentar sua temperatura. Por outro lado, se o processo for exotérmico, menos calor será necessário para aumentar a temperatura da amostra. Assim, observando a diferença de fluxo de calor entre a amostra e a referência, a calorimetria diferencial de varredura é capaz de medir a quantidade de calor absorvido ou liberado durante as transições (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2015).

3.5.4 Termogravimetria

A termogravimetria (TG) é uma técnica comumente empregada na análise de complexos de inclusão (CIs), frequentemente em conjunto com a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), para fornecer suporte e facilitar a interpretação dos resultados. A TG possibilita a determinação das mudanças na massa da amostra em função da variação de temperatura, mediante uma programação controlada de temperatura. A derivada termogravimétrica (DTG) é então utilizada para converter os eventos de perda de massa em picos, a fim de melhor visualizar esses eventos (MOTHE; AZEVEDO, 2009). No caso das ciclodextrinas naturais, quando submetidas à análise por termogravimetria sob atmosfera de nitrogênio, observa-se uma primeira perda de massa em torno da temperatura de 100 °C, correspondente à evaporação da água adsorvida e à cristalização, seguida por uma segunda perda de massa entre 250 e 400 °C, atribuída à degradação, o que resulta em uma diminuição de 70 a 80% da massa (GIORNANO, NOVAK, MOYANO, 2001).

A detecção dos CI formados baseia-se na comparação entre a temperatura de início da degradação da molécula hospedeira isolada e a do suposto CI formado. Pressupõe-se que, se houve complexação, a degradação da molécula hospedeira ocorrerá em temperaturas mais elevadas, uma vez que estará protegida pela CD (MURA, 2015).

3.5.5 Modelagem molecular

A aplicação da química computacional na simulação molecular em nível atômico está amplamente desenvolvida e possui diversas aplicações na química. Essa abordagem teórica

permite complementar e racionalizar observações experimentais, adotando uma perspectiva molecular. Sua aplicação no estudo dos fenômenos de inclusão é relativamente recente e enfrenta limitações devido ao tamanho e flexibilidade das moléculas de ciclodextrina (CD), bem como à complexidade das interações em meio aquoso, o que requer a introdução de múltiplas restrições nos modelos matemáticos utilizados pelos programas de computador. No entanto, de forma em geral, uma boa correlação com os dados experimentais é alcançada, permitindo a representação da conformação tridimensional mais estável do complexo de inclusão (CUNHA-FILHA; SÁ-BARRETO, 2007).

O estudo de modelagem molecular (MM) analisa a formação dos complexos de inclusão e a orientação da molécula hospedeira na cavidade da CD (LYRA et al., 2010). Estudos teóricos, tanto em fase gasosa quanto em meio aquoso, têm sido conduzidos para investigar os modos de inclusão de moléculas hospedeiras na cavidade das CDs, revelando as diversas orientações que essas moléculas podem assumir durante o processo de inclusão (BANERJEE et al., 2006).

Os diferentes modos de inclusão dessas moléculas na cavidade da CD são influenciados por forças direcionais, como as forças de van der Waals, fatores estéricos e interações dipolo-dipolo, que governam o processo de complexação. Geralmente, há consenso sobre o papel crucial dessas forças na formação e estabilização do complexo. Portanto, o tamanho, forma e graus de liberdade conformacionais da cavidade da CD são recursos essenciais para a obtenção da complexação (QUEVEDO; ZOPPI, 2018). Essas forças têm sido estudadas teoricamente, demonstrando que esse processo frequentemente está associado a mudanças conformacionais nos anéis glicosídicos das CDs (HAPIOT; TILLOY; MONFLIER, 2006).

3.5.6 Difractometria de raios-X

A técnica de difratometria de raios-X (DRX) é amplamente empregada na determinação da estrutura cristalina de amostras, possibilitando a identificação precisa das posições dos átomos dentro da rede cristalina, assim como a medição dos comprimentos e ângulos de ligação entre eles (MURA, 2015). Por meio desta técnica, os átomos cristalinos dispersam um feixe de raios X incidentes em diversas direções específicas. A análise dos ângulos e intensidades dos feixes difratados permite a reconstrução tridimensional da distribuição de elétrons dentro do cristal. A partir desta distribuição, é possível determinar as posições médias dos átomos no cristal, bem como suas interações químicas, desordens e outras propriedades relevantes (EWALD, 1962). Uma das vantagens fundamentais da DRX é sua natureza não destrutiva, permitindo a obtenção da estrutura tridimensional de moléculas sem comprometer a integridade da amostra (MURA, 2015). Ao analisar um material na forma de pó, o padrão de difração obtido

corresponde a uma "impressão digital" da estrutura cristalina, que pode ser comparada com padrões cristalográficos conhecidos. Materiais cristalinos apresentam picos distintos indicativos das reflexões de planos atômicos, enquanto amostras amorfas exibem uma protuberância difusa, conhecida como halo amorfo (ARAÚJO, 2016).

3.5.7 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) emergiu como uma técnica fundamental em uma variedade de campos, incluindo eletrônica, ciência e engenharia de materiais, geologia e ciências da vida, devido à sua capacidade de fornecer detalhes microestruturais abrangentes dos materiais analisados. Na MEV, uma amostra é submetida a um fino feixe de elétrons, resultando na emissão de várias radiações. Os sinais de interesse primário para a formação de imagens são os elétrons secundários e retroespalhados, cujas variações na superfície da amostra são influenciadas pelo feixe de elétrons primários, fornecendo dados sobre variações na composição. No contexto da avaliação de complexos de inclusão com CDs, a microscopia eletrônica de varredura é comumente empregada para investigar a redução da cristalinidade das partículas obtidas por diferentes métodos de síntese. Mudanças significativas no formato, aspecto e tamanho das partículas sugerem a presença de novas fases sólidas. Embora a MEV, por si só, não seja suficiente para confirmar a formação do complexo de inclusão, estudos adicionais são necessários para validar essa transformação, destacando a complexidade da caracterização desses sistemas (LYRA et al., 2010; SINGH et al., 2010; REIMER, 1998).

3.5.8 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido considerada a técnica mais eficaz para estudar a estrutura e a dinâmica molecular de substâncias químicas, na qual se baseia na interação entre núcleos atômicos com spin nuclear e um campo magnético externo (PAVIA *et al.*, 2021). Na química orgânica, pode ser aplicada na elucidação de estruturas de compostos naturais e sintéticos, identificação de grupos funcionais e a estereoquímica de compostos. Já na área da bioquímica, pode ser empregada em estudos metabolômicos, interações moleculares, análise de polissacarídeos, estudos de estruturas de proteínas e ácidos nucleicos. Outra aplicação é na caracterização de complexos de inclusão, com potencial para determinar a orientação da molécula hospedeira na cavidade da ciclodextrina e identificar sua estequiometria de forma precisa (MURA, 2014).

O princípio da técnica envolve a aplicação de um campo magnético externo uniforme a aplicação de pulsos de radiofrequência para excitar os núcleos atômicos. Quando os núcleos

são excitados, eles são capazes de absorver energia e entram em ressonância magnética, o que é capaz de gerar um sinal detectável. A frequência dessa ressonância é determinada pela quantidade de energia absorvida, que por sua vez está relacionada às propriedades do núcleo e ao ambiente químico (PAVIA *et al.*, 2021).

A análise de determinados compostos por RMN requer a presença de núcleos com propriedades magnética, cujas características são descritas em termos de momento angular e spin nuclear. Essas propriedades são verificadas por meio de cálculos matemáticos. Um núcleo com número de spin igual a zero indica a ausência de propriedades magnéticas, tornando-o incapaz de realizar análise pela técnica. Os exemplos mais comuns de átomos com número de spin diferente de zero, são: ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F (PAVIA *et al.*, 2021).

Quando um material é submetido a um campo magnético, pode absorver energia eletromagnética, resultando na inversão do spin nuclear. A frequência de absorção está diretamente relacionada à posição dos núcleos na molécula e também a intensidade do campo magnético. Posteriormente, a energia absorvida é liberada durante de relaxação (liberação) é detectada na forma de espectros (SILVERSTEIN *et al.*, 2014).

Para investigar complexos de inclusão, uma abordagem eficaz envolve a análise de mudanças nos sinais de espectros de RMN de próton, ou seja, ^1H ou do carbono-13 (^{13}C), permitindo observar variações nos deslocamentos químicos. No entanto, técnicas unidimensionais podem não ser suficientes para obter informações detalhadas. Por isso, são frequentemente empregados métodos bidimensionais, os quais simplificam a interpretação de espectros complexos, especialmente aqueles com múltiplas bandas sobrepostas. Através dessas técnicas, é possível obter informações cruciais, como estabilidade, estequiometria e orientação das moléculas hospedeiras no interior de ciclodextrinas (CDs), por exemplo (PAVIA *et al.*, 2021).

Um exemplo de técnica bidimensional é a espectroscopia ordenada por difusão – DOSY - "*Diffusion Ordered Spectroscopy*"), que utiliza medidas de difusão molecular por RMN, geralmente pelo núcleo de próton (^1H). Nessa técnica, os deslocamentos químicos são representados em uma dimensão, enquanto o coeficiente de difusão é representado em outra. Isso permite a obtenção de informações valiosas, como a constante de associação entre as moléculas. A DOSY separa os sinais de RMN com base no coeficiente de difusão, utilizando sequências de pulso de eco de spin com diferentes intensidades de gradiente de campo pulsado. A partir da atenuação do sinal, é possível calcular os coeficientes de difusão (D). A difusão molecular é o movimento aleatório das moléculas em solução, cujo fatores são influenciados pelo tamanho, forma, viscosidade e temperatura (PAVIA *et al.*, 2021).

Stokes-Einstein propôs uma equação que permite avaliar estimativas a respeito do tamanho das partículas quando são maiores que solvente. Essa equação ficou definida como a Equação do coeficiente de difusão, conforme mostra a Equação 2.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s} \quad (\text{Eq. 2})$$

Os parâmetros da equação podem ser descritos pela constante de Boltzmann (k), temperatura (T), η : viscosidade do líquido e r_s o raio hidrodinâmico da molécula.

No estudo da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas, pode-se verificar que há uma redução no coeficiente de difusão das moléculas envolvidas. Esse fator pode ser explicado devido a diferença na difusão entre a molécula hóspede em solução na presença de CD e o hóspede livre (sem CD), onde é proporcional à fração que é complexada. Dessa forma, a quantidade de hóspede participante do processo de complexação está diretamente relacionada aos coeficientes de difusão das espécies nas formas livre e complexada, o que também permite a determinação da constante de associação (K_a) (RYMDÉN; CARLFORS; STILBS, 1983; CLARIDGE, 2016).

3.5.8.1 Deslocamento químico e blindagem

A RMN baseia-se principalmente na interação dos núcleos atômicos com um campo magnético externo. Os núcleos que possuem número ímpar de prótons ou nêutrons possuem um momento magnético nuclear, denominado spin, que quando submetido a um campo magnético externo (B_0), tende a se alinhar paralelamente ou antiparalelamente a este campo. Quando esses núcleos são excitados por uma radiação eletromagnética de frequência apropriada, eles absorvem energia e, posteriormente, emitem sinais de RMN que são detectados e analisados (PAVIA *et al.*, 2021).

O deslocamento químico é um parâmetro que é de extrema importância na ressonância magnética nuclear, pois ele fornece informações detalhadas sobre o ambiente químico ao redor de um núcleo específico. Ele é definido como a diferença na frequência de ressonância de um núcleo em relação a uma referência padrão, que normalmente é o tetrametilsilano (TMS) para espectros de ^1H e ^{13}C . Essa diferença pode ser expressa em ppm (partes por milhão), cuja unidade permite comparar diferentes espectros (PAVIA *et al.*, 2021).

Os elétrons dispostos ao redor dos núcleos atômicos são capazes de gerar campos magnéticos que podem reforçar ou se opor ao campo magnético externo aplicado durante a RMN. Essa interação entre os campos magnéticos locais e externos podem causar uma mudança na frequência de ressonância dos núcleos, conhecida como o deslocamento químico. A

magnitude do deslocamento químico pode ser influenciada por fatores como a hibridização dos átomos, visto que diferentes estados de hibridização (sp^3 , sp^2 e sp), afetam a densidade eletrônica e conseqüentemente, o deslocamento químico. Outro fator é a anisotropia de ligações π , visto que sistemas conjugados e anéis aromáticos possuem campos magnéticos que influenciam significativamente. Outro fator é a eletroafinidade dos grupos funcionais vizinhos, pois estes podem retirar ou doar densidade eletrônica ao núcleo.

Esses fatores combinados fornecem uma assinatura única para cada ambiente químico, permitindo que a RMN seja uma ferramenta poderosa para a determinação estrutural de moléculas. A análise cuidadosa dos deslocamentos químicos pode revelar detalhes sobre a estrutura molecular, a conformação e as interações intermoleculares.

3.5.8.2 Acoplamento spin-spin

Além dos efeitos de blindagem e desblindagem magnética causados pela densidade eletrônica, o próton também pode ser influenciado pelo spin de prótons vizinhos magneticamente não equivalentes. Por isso, um próton raramente gera um único pico de ressonância. Nesse sentido, resulta-se na divisão do sinal em vários picos, formando o que é denominado de multipletos. O acoplamento spin-spin pode ocorrer entre núcleos do mesmo tipo, denominado de acoplamento homonuclear, ou entre núcleos de diferentes tipos, denominados de acoplamento heteronuclear (PAVIA *et al.*, 2021).

A regra de separação de spin, conhecida como “Regra no N+1”, é capaz de explicar a formação de multipletos e fornece informações sobre a estrutura molecular. Conforme mencionado, os spins dos núcleos vizinhos magneticamente não equivalentes é capaz de influenciar diretamente o sinal gerado. O “N”, na regra faz referência ao número de átomos magneticamente não equivalentes vizinhos ao núcleo analisado. Por exemplo, um núcleo que é vizinho a apenas um outro núcleo não magneticamente equivalente pela regra mencionada, é capaz de gerar um duplete (PAVIA *et al.*, 2021).

A constante de acoplamento (J) indica a intensidade com que um núcleo é afetado pelos estados de spin de seu vizinho e sua medida é calculada em hertz (Hz). A magnitude da constante de acoplamento depende principalmente do número de ligações que separam os átomos ou grupos interagentes. Embora outros fatores possam influenciar a interação entre dois núcleos, em geral, acoplamentos via uma ligação são mais intensos, e a intensidade do acoplamento diminui à medida que aumenta o número de ligações (PAVIA *et al.*, 2021).

O mecanismo de acoplamento spin-spin é complexo e envolve a transmissão de informações entre os spins nucleares e os spins dos elétrons nas ligações químicas. Isso permite

a observação de acoplamentos entre núcleos separados por uma, duas, três ou mais ligações, gerando constantes de acoplamento 1J , 2J , 3J , nJ , etc (PAVIA *et al.*, 2021).

3.6 Atividades biológicas com complexos de inclusão

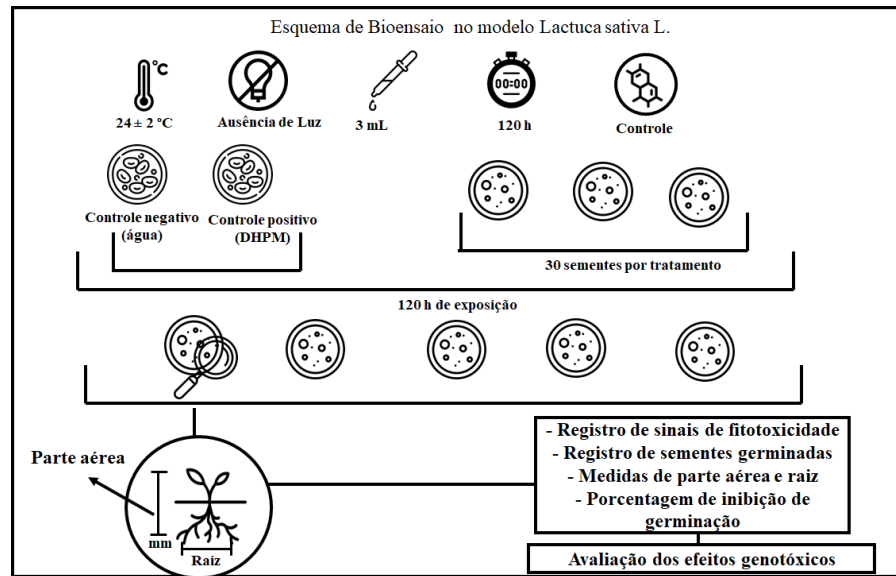
Os complexos de inclusão formados entre ciclodextrinas e moléculas orgânicas com potenciais biológicos têm atraído crescente interesse na pesquisa científica devido às suas diversas aplicações nas áreas farmacêuticas, alimentícia e cosmética. Além das melhorias nas propriedades físico-químicas, os complexos de inclusão têm demonstrado uma melhora na biodisponibilidade de compostos em diversas atividades biológicas, como por exemplo, atividade anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatório, antimalárico, dentre outros (PINTO *et al.*, 2020). As atividades biológicas podem ser realizadas utilizando testes *in vitro* e *in vivo*. Em relação aos ensaios *in vitro*, dispõe de diferentes microorganismos antimicrobianos, utilizando enzimas, enquanto que os ensaios *in vivo*, são usados animais como ratos e camundongos, por exemplo.

3.6.1 Bioensaio em modelo vegetal, utilizando *Lactuca sativa* L. (alface)

Há diversos métodos disponíveis que possam avaliar danos causados por agentes químicos a organismos e ao seu DNA. Dentre um deles, destacam-se os bioensaios utilizando modelos vegetais, devido aos efeitos de certas substâncias causarem germinação, desenvolvimento inicial da plântula e no ciclo celular (ARAGÃO *et al.*, 2015). Esses ensaios, possuem extrema importância e são reconhecidos e validados como eficientes por órgãos e corporações superiores como a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (USEPA – do inglês *United States Environmental Protection Agency*) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD – do inglês *Organization for Economic Co-operation and Development*).

Um dos bioensaios mais explorados é com a utilização de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface). O esquema representado na Figura 28, mostra a utilização de placas de Petri, controles (negativo e/ou positivo), simulações de condições experimentais (ausência de luz e controle de temperatura), além da identificação das partes aéreas e radicular das plântulas.

Figura 28 – Esquema de bioensaio no modelo utilizando sementes de alface.



Fonte: Adaptado de Garcia *et al.*, 2009, com modificações pelo autor (2024).

Uma grande vantagem desse uso de plantas para estudos de toxicidade é a validação de seu baixo custo, a facilidade de manuseio e a alta sensibilidade. Além disso, esses estudos não precisam ser passados por conselhos de bioética, uma vez que não são utilizados animais para testes (ANDRADE, DAVIDE e GEDRAITE, 2010).

Entre os modelos vegetais disponíveis, as sementes de alface se destacam por permitir análises macroscópicas (germinação e desenvolvimento inicial) e microscópicas (alterações no ciclo celular) simultaneamente. Isso facilita a determinação do mecanismo de ação dos agentes químicos (ARAGAO *et al.*, 2015).

3.6.2 Atividade antibacteriana

Considerados organismos unicelulares invisíveis a olho nu, as bactérias possuem dimensões variando de 0,5 µm em diâmetro e de 2,0 µm de comprimento. São classificados de acordo com a sua morfologia em cocos, bacilos e espirilos (RANPARIYA; TARPORA, 2023).

Hans Christian Gram, em 1884, categorizou as bactérias como gram-positivas e gram-negativas, devido a sua coloração. As bactérias gram-positivas apresentam uma coloração azul sob o microscópio, devido à sua parede celular espessa de peptidoglicano, que é capaz de reter o corante. Em contrapartida, as bactérias gram-negativas não são capazes de reter o corante azul e apresentam uma coloração que varia do vermelho ao rosa, devido à sua parede celular composta por lipopolissacarídeos. Esta parede externa torna as bactérias gram-negativas menos suscetíveis a antibióticos (RANPARIYA; TARPORA, 2023).

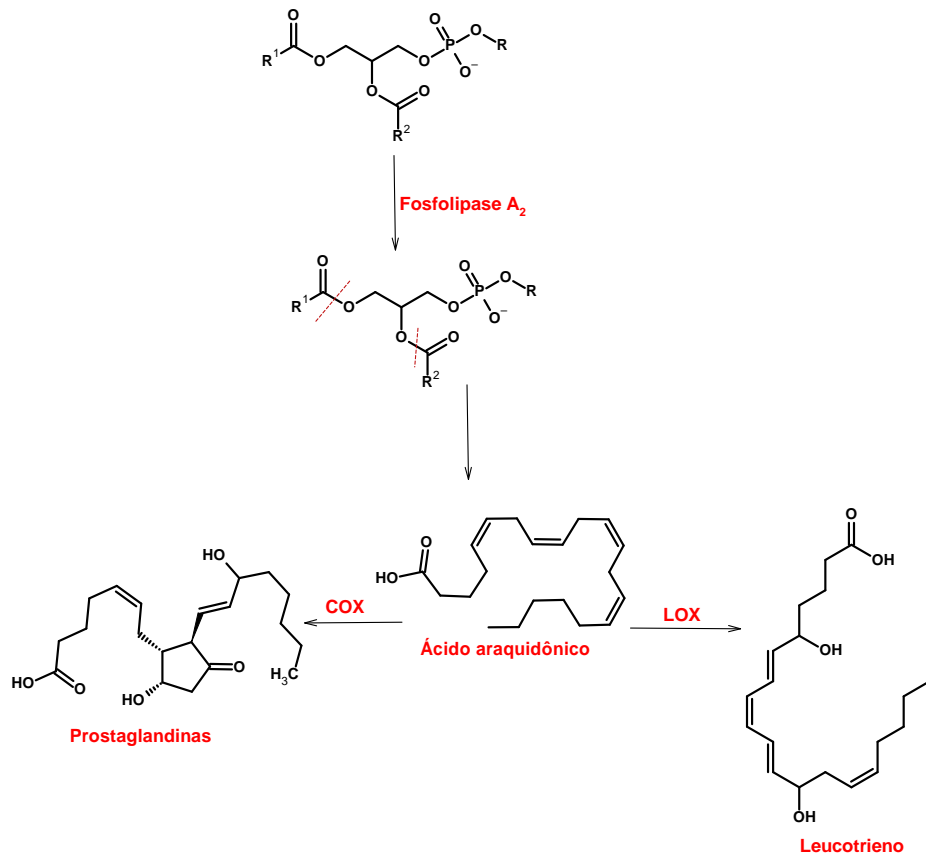
As doenças causadas por bactérias são comumente tratadas através de antibióticos, cujo desenvolvimento é indispensável para a saúde pública. A pesquisa e o desenvolvimento desses fármacos são cruciais e a pesquisa por novos compostos antibacterianos está em constante expansão. A resistência bacteriana frente aos antibióticos é um desafio crescente, resultante da rápida mutação e adaptação das bactérias. Este fenômeno de resistência ocorre quando bactérias são capazes de desenvolverem mecanismos para neutralizar ou expelir o antibiótico, tornando assim o tratamento ineficaz. Devido a isso, as indústrias farmacêuticas investem significativamente no desenvolvimento de novos princípios ativos e estratégias terapêuticas (RANPARIYA; TARPORA, 2023).

Alguns exemplos de bactérias gram-negativas que apresentam perigosas patologias são a *Treponema pallidum*, responsável pela sífilis (ROMEIS *et al.*, 2023), *Vibrio cholerae*, causadora da cólera (GRAFF *et al.*, 2013), *Neisseria meningitidis*, causadora da meningite (SHEVTSOV *et al.*, 2022). Alguns exemplos de gram-positivas que apresentam patologias são a *Bacillus nocardia*, originadora de infecções pulmonares e generalizadas, *Clostridium botulinum* é responsável por causar intoxicação alimentar, *Streptococcus pneumoniae*, causadora da pneumonia.

3.6.3 Atividade fosfolipásica

A espécie *Bothrops moojeni*, pertencente à família Viperidae é encontrada na América no Sul, especificamente na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. O veneno desta serpente possui ação rápida, provocando inflamação, dor e aumento do tempo de coagulação sanguínea. Quando não é tratado, pode acarretar diversos problemas, como necrose, edema e sangramento (AMÉLIO *et al.*, 2021). O constituinte principal pertencente a essa família são as enzimas fosfolipases A₂ (EC 3.1.1.4).

As fosfolipases A₂ são enzimas de grande importância nos processos inflamatórios, pois são capazes de catalisar a hidrólise dos fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas, liberando assim o ácido araquidônico. Este ácido pode ser metabolizado por outras enzimas, como o ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase (LOX), que se convertem em eicosanoides, incluindo prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Essas moléculas atuam como sinalizantes químicos da inflamação, sendo responsáveis pela dor, vasodilatação, febre, agregação plaquetária e quimiotaxia (MURAKAMI, KUDO, 2002). A Figura 29, mostra o esquema da ação das fosfolipases A₂ no processo inflamatório.

Figura 29 - Esquema de ação das Fosfolipases A₂ no processo inflamatório

Fonte: Do autor (2024).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese multicomponente da DHPM, purificação e caracterização por infravermelho

O produto obtido da síntese - DHPM, foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi – DQI/UFLA e o discente Danilo Forti Carvalho de Benedicto. Para a obtenção do produto, os autores utilizaram as metodologias propostas por Holden e Crouch (2001), Bose *et al.* (2004) e Maiti e colaboradores (2003).

Através de uma reação multicomponente, foram adicionados em um balão de fundo redondo 4 mmol de benzaldeído, 4 mmol de acetoacetato de etila e 4 mmol de ureia, juntamente com 5 mL de etanol e 4 gotas de HCl concentrado. A reação foi conduzida sob refluxo, em temperatura de 80 °C, durante um período de 1,5h.

Após a finalização da reação, a solução foi deixada em repouso sob resfriamento, por um período de 24h. Os cristais brancos obtidos foram filtrados e lavados com água destilada e após a filtração, deixados no dessecador por um período de 24h. Os produtos filtrados e secos foram recristalizados com etanol sob ebulição e deixados em repouso. Em seguida, foram filtrados, lavados com água destilada, deixados para secar por um dia.

A caracterização foi realizada no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ), da Universidade Federal de Lavras, utilizando análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, empregando um Espectrômetro Shimadzu FTIR modelo – 8201 A com transformada de Fourier (FTIR), em uma faixa espectral de 400 – 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando pastilhas de KBr.

4.2 Determinação dos parâmetros para a preparação dos complexos de inclusão

4.2.1 Curva analítica e determinação da absorvidade molar

Para a obtenção da curva analítica, foram pesados 0,0022 g de DHPM e transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL. Após, foram adicionados 150 mL de água ultrapura e com o auxílio de uma chapa com agitador magnético a solução permaneceu em agitação constante por aproximadamente 18h, para solubilizar a amostra em água.

Posteriormente, realizou a varredura entre 200 e 600 nm em um espectrofotômetro de ultravioleta-visível da solução de DHPM na concentração de 56 μM , com a finalidade de encontrar o comprimento de onda (λ) da molécula.

A partir da concentração inicial de 56 μM , foram realizadas diluições em triplicatas para as concentrações de 45, 35, 28, 14 e 9 μM . Em seguida, foram realizadas leituras de absorbância no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda máximo.

Com os valores encontrados, foi possível plotar o gráfico das concentrações *versus* absorvância. A quantidade de luz que uma substância consegue absorver é identificada pelo valor da absorvidade molar representada pela letra grega ϵ – épsilon, o qual é determinada pela inclinação da reta encontrada na curva analítica, com o intercepto fixo em zero. Esse valor está de acordo com a expressão empírica conhecida como Lei de Lambert-Beer.

4.2.2 Isotermas de solubilidade de fase, determinação da constante de associação (Ka) e energia livre de Gibbs padrão (ΔG°)

Para a determinação das isotermas de solubilidade de fase e a constante de associação (Ka), foi realizada a metodologia descrita por Higuchi e Connors (1965). O objetivo desse protocolo foi avaliar o comportamento e a mudança de solubilidade do sistema (DHPM + β -CD), mediante o aumento da concentração da molécula hospedeira.

Foi utilizada a β -CD para examinar os possíveis efeito da molécula hospedeira, na solubilidade da dihidropirimidinona. O ensaio foi realizado nas temperaturas de 25, 35 e 45 \pm 0,2 $^\circ\text{C}$, com água ultrapura. Foram adicionados (0, 3, 6, 9, 12, e 15 mM) de β -CD a um excesso de dihidropirimidinona, cujo processo foi realizado em triplicata e as misturas foram agitadas por um período de 48h. Posteriormente, foi retirada uma alíquota e as mesmas foram centrifugadas a 3600 rpm, por um tempo de 45 min. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma seringa com capacidade de 3 mL e filtrado utilizando membranas Millex de 0,22 μm .

Para a quantificação, foram realizadas leituras em 287 nm, utilizando um espectrofotômetro UV/Vis K37 Kasvi, pertencente ao Laboratório de Bioquímica. A constante de associação (Ka) foi calculada a partir da inclinação e do intercepto do gráfico, conforme mostra a Equação 3:

$$K_a = \frac{\text{inclinação}}{S_0 \times (1 - \text{inclinação})} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

S_0 = solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

Além disso, foi determinado o parâmetro termodinâmico da energia livre de Gibbs (ΔG°), utilizando a Equação 4, a seguir:

$$\Delta G^\circ = - 2,303 RT \log \frac{S_s}{S_0} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

R = Constante universal dos gases (8,31 J.mol⁻¹ · K⁻¹)

T = Temperatura (Kelvin)

S₀ = solubilidade da DHPM na ausência de β-CD

S_s = solubilidade da DHPM na presença de β-CD

4.3 Preparação dos complexos de inclusão

Os complexos de inclusão no estado sólido foram preparados nas razões molares 1:1 (CI 1:1) e 1:2 (CI 1:2), conforme proposto pela metodologia de Pinto *et al.* (2020). Utilizando o método de liofilização, foi pesada 0,0919 g da molécula hóspede (DHPM) e dissolvida em 30 mL de etanol absoluto; enquanto 0,4007 g da β-CD foi dissolvida em 15 mL de água ultrapura. Posteriormente, as soluções foram misturadas e agitadas por 48h, a uma temperatura ambiente. Em seguida, as mesmas foram rotoevaporadoras, reidratadas, congeladas e liofilizadas. Os complexos foram armazenados em tubos apropriados e conservados com papel alumínio a uma temperatura de - 24 °C, para posterior uso.

Além disso, foram preparadas as misturas físicas nas razões molares 1:1 (MF 1:1) e 1:2 (MF 1:2). Foram pesadas as amostras (DHPM e β-CD) e maceradas em um almofariz com o auxílio de um pistilo, durante um período de 30 min. A misturas foram armazenadas em tubos eppendorfs e também conservados com papel alumínio a uma temperatura de -24 °C para uso posterior.

4.4. Caracterização dos complexos de inclusão

Os complexos de inclusão no estado sólido foram caracterizados utilizando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria diferencial exploratória (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H.

4.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Para a obtenção dos espectros de infravermelho, foi empregado um Espectrômetro Shimadzu FTIR modelo - 8201 A com transformada de Fourier (FTIR), em uma faixa espectral de 400 - 4000 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras. Na análise, foram empregadas pastilhas de KBr, onde foram pesadas 2,00 mg da amostra e diluídos com 200,00 mg de KBr, cujo procedimento foi realizado no CAPQ/UFLA.

4.4.2 Calorimetria diferencial exploratória - DSC

A análise foi realizada no CAPQ/UFLA, em um equipamento DSC 60 Shimadzu. Para isso, foram pesadas 5 mg das amostras em panelas de amostras apropriadas, totalmente vedadas

e aquecidas a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob um intervalo de temperatura de 30 a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de N_2 com fluxo de 50 mL min^{-1} . O objetivo desta técnica, consiste em verificar o surgimento de picos endotérmicos ou exotérmicos das amostras de dihidropirimidinona, β -CD, complexos liofilizados e as misturas físicas.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de varredura - MEV

A análise morfológica dos complexos de inclusão foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio de varredura modelo Ultra-Resolução Tescan-Clara-UHR, disponibilizado pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. As amostras contendo DHPM, β -CD, os complexos DHPM/ β -CD liofilizados e as misturas físicas, foram preparadas em stubs de alumínio, fixadas com fita adesiva dupla face recobertas com uma camada de ouro coloidal em atmosfera de argônio, sob vácuo, durante 180 segundos. O procedimento teve como finalidade, conferir condutividade às amostras, viabilizando sua análise sob o microscópio eletrônico.

4.4.4 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

Para a caracterização do composto sintetizado e dos complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2, foi utilizado a técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Para o preparo das amostras, as mesmas foram solubilizadas em dimetilsufóxido deuterado (DMSO- d_6). Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance - III 600 MHz, da Universidade Federal de Campinas (Unicamp).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H foram construídos e analisados no software MestRenova (Versão 6.0.2-5475).

4.5 Testes *in vitro*

4.5.1 Ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução *in vitro* foi realizado seguindo a metodologia descrita por Pinto *et al.* (2020), com modificações. Foram pesadas 6,0 mg de DHPM, bem como a massa correspondente para garantir que cada complexo contenha 6,0 mg da referida molécula, estes em razões molares de 1:1 e 1:2. Após, as amostras foram colocadas em frascos apropriados juntamente com 10 mL de água ultrapura e levadas para o banho-maria. As amostras foram agitadas por um período de 180 minutos e a cada 5 minutos, alíquotas contendo aproximadamente 1 mL foram retiradas, filtradas, diluídas em 2 mL de água ultrapura e medidas no comprimento de 287 nm, em um espectrofotômetro UV/Vis.

Cada alíquota retirada das amostras, foi descartada e substituída pela mesma quantidade de água ultrapura, retornando para o banho-maria. O procedimento foi realizado até obtenção de um platô estável, entre a relação do tempo e a porcentagem de DHPM dissolvida.

4.5.2 Ensaio biológico utilizando *Lactuca sativa L.*

O presente ensaio tem como objetivo avaliar a toxicidade da molécula hóspede e os complexos de inclusão, através do teste de germinação *in vitro*, utilizando modelos vegetais. A utilização de plantas como modelos para estes estudos, tem como vantagens: seu baixo custo, facilidade do manuseio e não há necessidade de aprovação dos conselhos de bioética. Dentre os diversos modelos, as sementes de alface se destacam devido à realização de suas análises macroscópicas, sendo a germinação e o desenvolvimento inicial. Também se destaca devido as suas análises microscópicas, que estão ligadas nas alterações no ciclo celular, permitindo que o mecanismo de ação ao agente químico seja determinado e verificar possíveis alterações nas células dos modelos vegetais (ARAGÃO, ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2015).

O protocolo adotado, segue a metodologia estabelecido por Aragão *et al.* (2015) para investigar a determinação da porcentagem de germinação (% GR), índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de crescimento radicular (CR). O ensaio teve ênfase apenas as análises macroscópicas. Para isso, foram utilizadas a molécula DHPM e os complexos de inclusão liofilizados, todos em uma concentração de 5×10^{-4} mol L⁻¹. Os grupos controles negativos e positivos foram representados, por água ultrapura e a DHPM não complexada, respectivamente.

As sementes de *Lactuca sativa L.* (alface) foram posicionadas individualmente sobre papel de filtro dentro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, nas quais foram adicionados 3 mL das soluções correspondentes aos tratamentos em estudo. Cada placa de Petri acomodou 30 sementes, totalizando 5 placas preparadas para cada tratamento investigado. As placas foram lacradas com filme de PVC transparente para evitar contaminação e mantidas úmidas, em uma câmara de germinação (BOD) a 24 ± 2 °C. A contagem da germinação das sementes foi realizada a intervalos de 8 horas ao longo de um período total de 48 horas de exposição, possibilitando o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme descrito na Equação 5:

$$IVG = (N_y - (N_y - 1)) \times 1/y \quad (\text{Eq.5})$$

Onde:

N_y indica o número de sementes germinadas em um determinado período e y representa o número total de avaliações.

Após transcorrer um período de 48 horas, a determinação da taxa de germinação (GR) foi realizada mediante a aplicação da Equação 6 específica para esse cálculo.

$$GR = (SG/ST \times 100) \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde SG é o número total de sementes germinadas e ST, o número total de sementes por tratamento.

Em seguida, o comprimento das raízes e a parte aérea foi medido utilizando um paquímetro digital, após um total de 120 horas de exposição, permitindo assim a obtenção do valor correspondente à taxa de crescimento radicular (CR) e da parte aérea (PA).

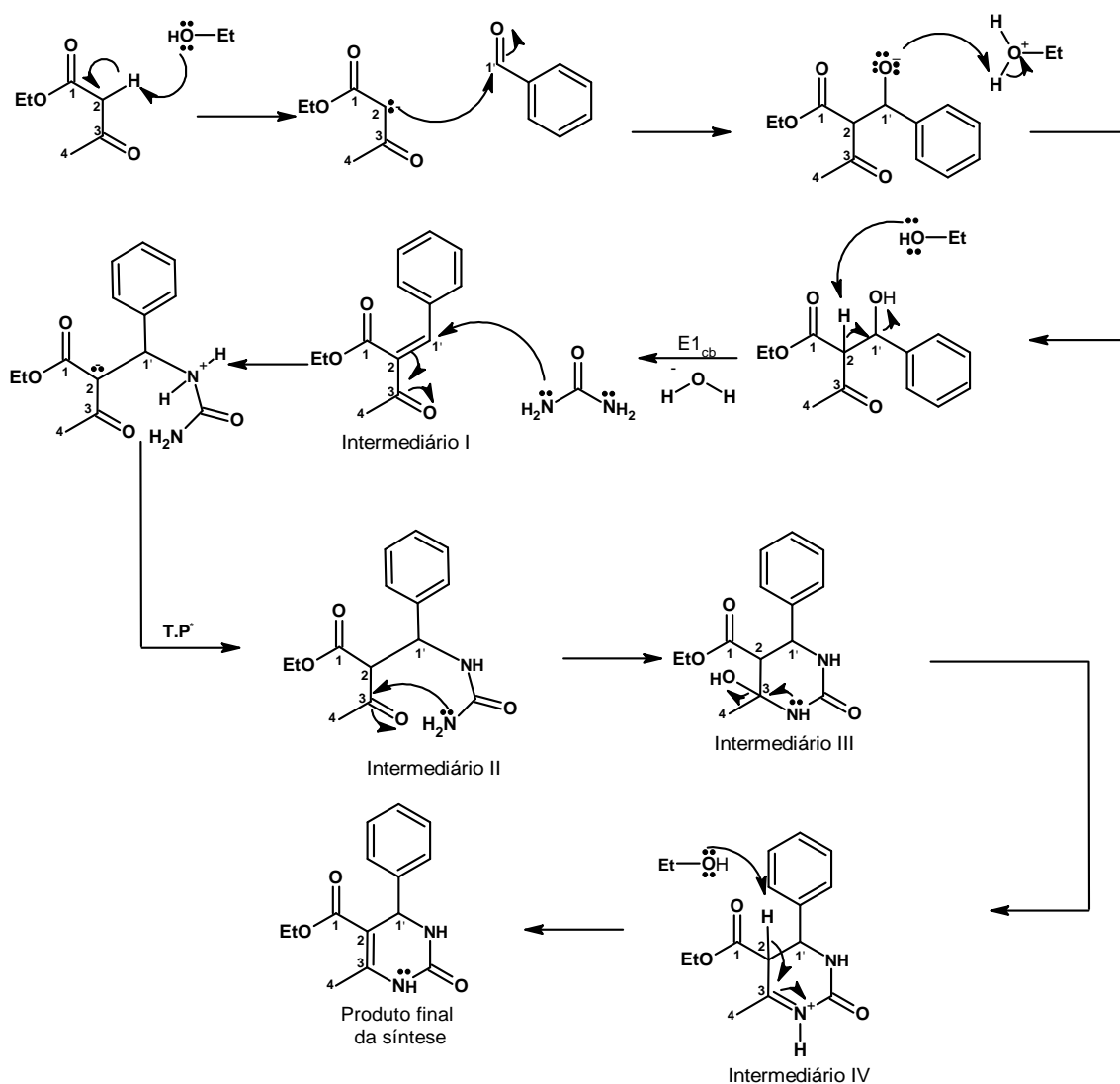
Os resultados deste ensaio, foi expresso como média \pm desvio padrão de cinco replicatas. Para a análise dos dados, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), empregando o software GraphPad Prism, versão 8.02. Os resultados obtidos pelos testes estatísticos, se encontram na seção de Apêndices, deste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Proposta de mecanismo para a formação da dihidropirimidinona

Foi sintetizado um composto através de uma reação multicomponente, partindo-se de três reagentes: benzaldeído, acetoacetato de etila e uréia. O mecanismo reacional é proposto na Figura 30.

Figura 30 - Proposta de mecanismo reacional para a formação da dihidropirimidinona.



Fonte: Do autor (2024).

Inicialmente, sugere-se que a primeira reação ocorre ao misturar todos os reagentes no balão de fundo redondo para a formação do intermediário I. Portanto, uma base, como por exemplo, o etanol, é capaz de remover o próton que está ligado ao carbono da posição 2 do acetoacetato de etila. Este próton é altamente ácido e pode ser removido facilmente, pois forma-

se um ânion que é capaz de se estabilizar por ressonância com os grupos carbonílicos da função orgânica cetona e éster presentes na estrutura.

Em seguida, o ânion que é formado se acopla com o benzaldeído, ligando-se ao carbono 1'. Posteriormente, o oxigênio que agora possui uma carga negativa, captura um próton do meio reacional, deixando o intermediário neutro. Uma base presente no meio reacional, pode remover o outro hidrogênio ácido presente no carbono 2, ao mesmo tempo que o par de elétrons que antes ligava esse hidrogênio e carbono, se move em direção aos carbonos 2 e 1', formando assim uma ligação C=C, expulsando a hidroxila como grupo abandonador, através de uma eliminação denominada E1_{cb}. Embora a hidroxila não seja um bom grupo abandonador, por ser uma base forte, esta etapa é válida e essencial, pois há a formação de um composto carbonílico α, β - insaturado, cujo produto é altamente estável, pois a ligação dupla é capaz de entrar em ressonância com o anel aromático e com as carbonilas.

O intermediário I é denominado de acceptor de Michael, caracterizado por uma carbonila e uma ligação dupla, separadas por uma ligação simples. Uma vez que no frasco reacional tem a presença de ureia, a mesma é capaz de reagir com o intermediário I através de uma adição conjugada. Então, um dos pares de elétrons do nitrogênio se liga ao carbono 1' do acceptor de Michael, ao mesmo tempo que o par de elétrons da ligação C1' e C3 se movimenta em direção do carbono 2, fazendo com que o mesmo fique com deficiência de elétrons. Posteriormente, ocorre uma transferência de próton com auxílio de uma base presente no meio reacional, para então formar o intermediário II.

O intermediário II, pode sofrer uma condensação intramolecular, uma vez que os orbitais da carbonila e os pares de elétrons do nitrogênio se encontram alinhados. Então, os elétrons livres do nitrogênio podem orientar-se em direção ao carbono carbonílico, o qual exibe uma carga parcial positiva, estabelecendo uma interação eletrostática, resultando na ligação do nitrogênio ao carbono. Simultaneamente, a ruptura da ligação dupla ocorre, com os pares de elétrons migrando em direção ao oxigênio, para a formação do intermediário III.

O intermediário III, tem um par de elétrons presente no átomo de nitrogênio que pode entrar em ressonância. Então, os pares de elétrons podem se alinhar com o orbital presente da ligação C-N e expulsar a hidroxila, gerando assim o intermediário IV.

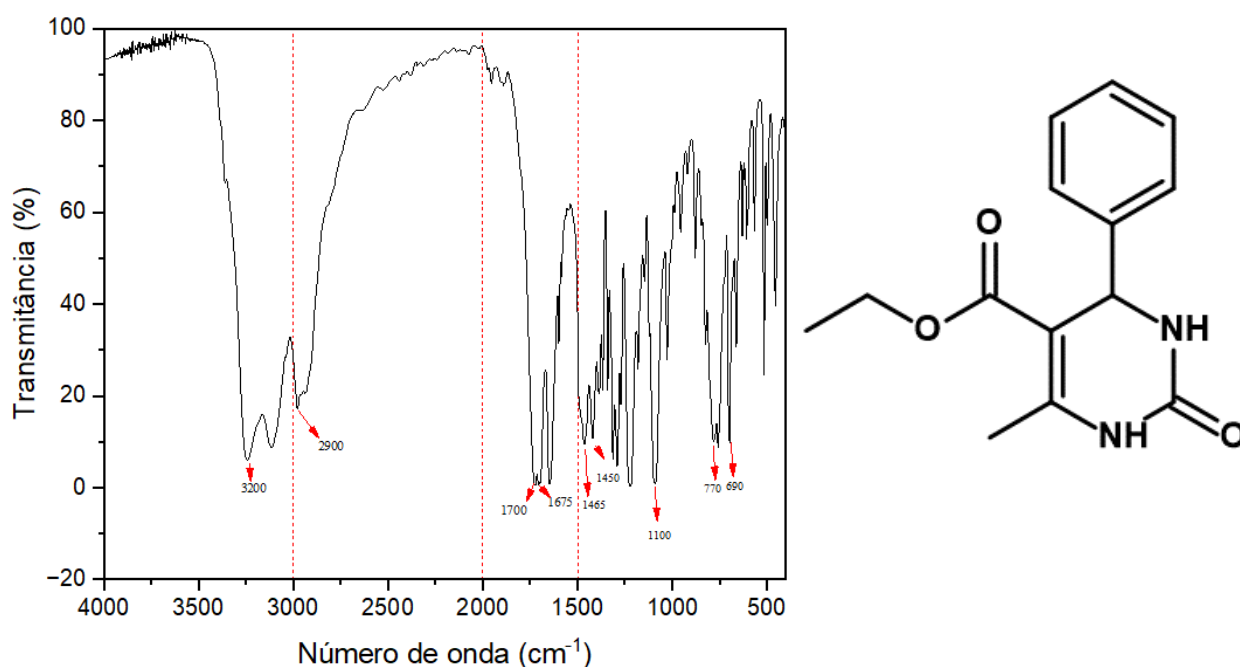
Novamente, uma reação de eliminação ocorre, visto que no intermediário IV ainda tem um hidrogênio ácido, o qual está ligado no carbono 2. Uma base, como por exemplo o etanol, pode empregar seus pares de elétrons para remover este próton. Ao fazê-lo, estabelece-se uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. Por fim, os pares de elétrons são retornados ao átomo de

nitrogênio, resultando na formação do produto da síntese, cujo sistema é altamente conjugado e estável.

5.2 Caracterização da síntese da DHPM por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Uma técnica utilizada para comprovação do derivado da dihidropirimidinona, foi a espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), onde é possível verificar as funções orgânicas presentes na amostra. A Figura 31, evidencia o espectro FTIR da molécula obtida na síntese.

Figura 31 – Espectro FTIR da molécula de DHPM obtida através de síntese.



Fonte: Do autor (2024).

Em um espectro na região do infravermelho, podemos retirar várias informações a respeito das posições e intensidades relativas de absorções ou picos. Geralmente, na faixa de $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, observa-se estiramentos de ligações O-H e N-H. Para o caso do estiramento O-H, a banda resultante apresenta um pico alargado, enquanto N-H produz uma ou duas bandas mais estreitas e de menor intensidade em comparação com as da ligação O-H. Já próximo de 3000 cm^{-1} , encontram-se estiramentos de ligações C-H, referentes aos carbonos com hibridizações sp^3 e sp^2 . Na faixa de $3000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, têm-se a região atribuídas às ligações triplas. Na região espectral entre $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, encontram-se os estiramentos das ligações

duplas, enquanto a faixa 1500-1000 cm^{-1} corresponde à impressão digital, sendo esta específica para cada molécula (PAVIA, 2021).

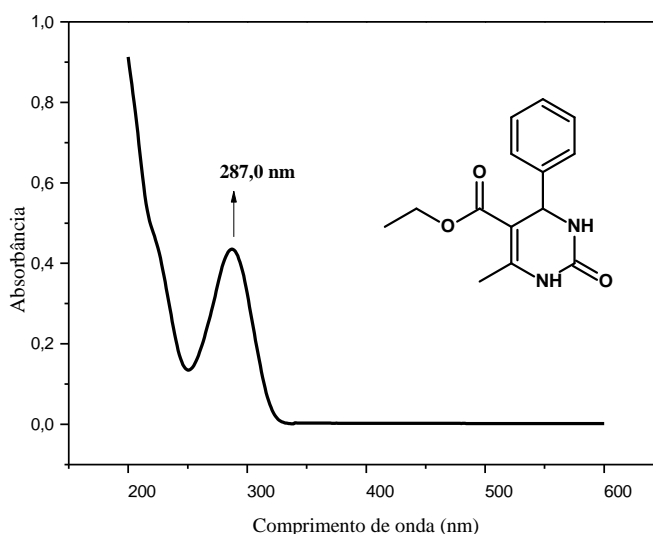
Assim no espectro obtido do produto de síntese, é possível verificar um pico obtido por volta de 3200 cm^{-1} , semelhante a um duplete, ao qual faz referência ao estiramento da ligação N-H, característico do grupo heterocíclico. Outra banda é observada próximo de 3000-2900 cm^{-1} , correspondente as ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ e $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, referente aos grupos alcanos e alenos presentes na molécula. Em 1700 cm^{-1} , vemos uma banda intensa referente as ligações C=O do grupo funcional éster e amida, enquanto em 1675 cm^{-1} , corresponde a ligação C=C . Próximos de 1450 e 1465 cm^{-1} , observa-se os dobramentos dos grupos -CH_3 e -CH_2 , respectivamente. Já em torno de 1100 cm^{-1} , refere-se as ligações C-N. Por fim, é observado picos em 770 e 690 cm^{-1} , característicos das ligações do anel aromático, conforme descrito na literatura.

5.3 Determinação dos parâmetros dos complexos de inclusão

5.3.1 Curva analítica

A absorvância é uma propriedade intrínseca de cada substância e pode trazer diversas informações a seu respeito. Diferentes materiais podem absorver radiações em comprimentos de ondas distintos (CARVALHO, 2014). Nesse sentido, foi realizado uma varredura da dihidropirimidinona nos comprimentos de onda variando entre 200 e 600 nm, para verificar em qual comprimento de onda a molécula é capaz de absorver. De acordo com a Figura 32, observa-se que a molécula apresenta absorção máxima em solução aquosa em um comprimento de onda igual a $\lambda = 287 \text{ nm}$.

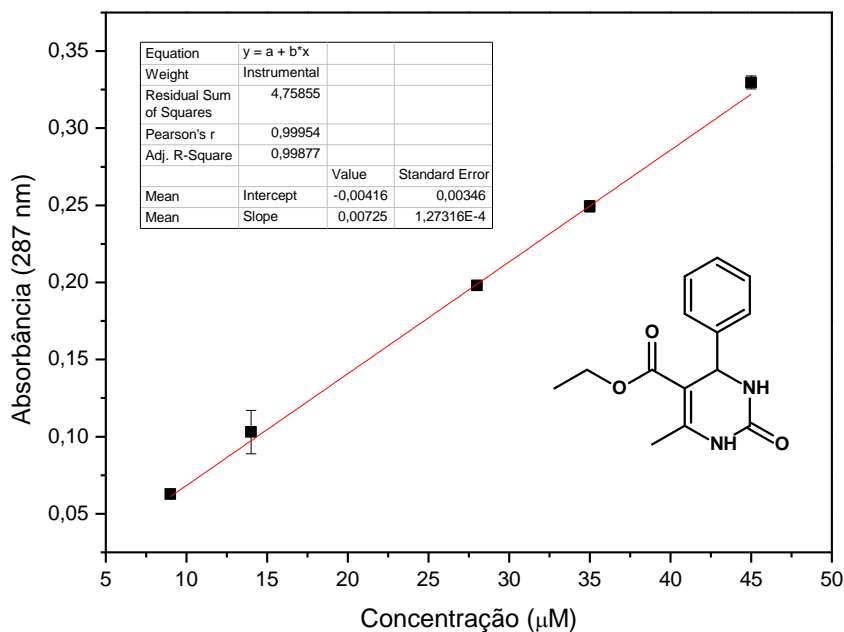
Figura 32 - Espectro de Absorção na região do UV para a DHPM em meio aquoso.



Fonte: Do autor (2024).

Também foram realizadas leituras das absorvâncias da solução em diferentes concentrações de DHPM, para construção da curva analítica, conforme mostra a Figura 33. A partir de sua inclinação, foi obtido um $\epsilon = 7.200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, indicando uma absorvidade molar relativamente alta. O resultado apresentado, evidencia que a molécula de DHPM apresenta uma intensa absorção de radiação na frequência utilizada.

Figura 33 - Curva analítica da DHPM em meio aquoso.

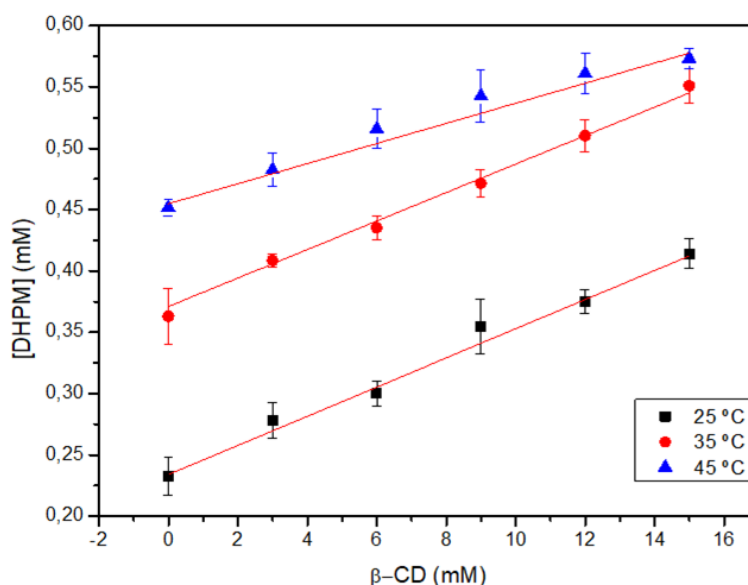


Fonte: Do autor (2024).

5.3.2 Isotermas de solubilidade, determinação da constante de associação (K_a) e parâmetros da Energia Livre de Gibbs padrão (ΔG°)

Os experimentos das isotermas de solubilidade de fase, permitiram avaliar a solubilidade da molécula hóspede (DHPM), mediante ao aumento da concentração da molécula hospedeira (β -CD). A Figura 34, identifica os diagramas de solubilidade de fase para DHPM na presença de β -CD nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C, respectivamente.

Figura 34 - Diagrama de solubilidade de fase para a dihidropirimidinona em presença de quantidades crescentes de β -CD, nas temperaturas de 25, 35 e 45 $\pm 0,2$ °C.



Fonte: Do autor (2024).

A formação dos complexos de inclusão com CDs, podem ter vários efeitos na molécula complexada, como por exemplo, melhora na solubilidade aquosa, acelerar ou retardar a absorção e estabilizar o fármaco em solução. No entanto, esses efeitos dependem da estabilidade e também da solubilidade do complexo formado (FRACETO *et al.*, 2008).

Fazendo uma inferência com os diagramas propostos por Higuchi e Connors (1965), um perfil do tipo A_L foi claramente observado em todos os diagramas de solubilidade de fase. A solubilidade aumentou cerca de 1,73; 1,53 e 1,43 vezes com a incorporação da β -CD, nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C, respectivamente.

Além disso, há uma correlação direta a respeito da estabilidade do complexo e a melhoria da solubilidade de fármacos poucos solúveis em água. O equilíbrio de um sistema formado pela β -CD e pela molécula convidada, pode ser descrita pela equação da constante de associação (K_a) (GRILLO *et al.*, 2008). Os valores de K_a , para os complexos formados nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C foram calculados e obteve-se os valores de 51,44 L mol⁻¹, 33,53 L mol⁻¹ e 31,97 L mol⁻¹, respectivamente. Os valores das constantes de afinidade dos complexos são dependentes da temperatura, ou seja, os valores de K_a tendem a diminuir, com o aumento da temperatura, devido a dissociação do complexo.

Pinto *et al.* (2020) enfatizam que valores de K_a entre 200 e 5000 L mol⁻¹ são considerados mais adequados para melhorar a solubilidade e estabilidade de moléculas com

baixa solubilidade em água. Dessa forma, pode-se fazer uma inferência de que os complexos formados entre DHPM e β -CD podem não ser estáveis.

Ainda, foi possível calcular o parâmetro termodinâmico da Energia Livre de Gibbs (ΔG°), conforme mostra a Tabela 2. Este princípio permite relacionar a transferência de moléculas da solução aquosa para a cavidade de β -CD. Além disso, fornece informações sobre a espontaneidade do processo, a pressão e temperatura constantes.

Tabela 2- Valores de Energia Livre de Gibbs (ΔG°) para solubilização da DHMP em solução aquosa de β -CD, nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C.

β -CD (mM)	ΔG° (KJ mol ⁻¹)		
	T = 25 °C	T = 35 °C	T = 45 °C
3	- 0,405	- 0,191	- 0,236
6	- 0,570	- 0,435	- 0,401
9	- 0,970	- 0,655	- 0,590
12	- 1,14	- 0,847	- 0,767
15	- 1,37	- 0,969	-1,00

Fonte: Do autor (2024).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 2, todos os valores de ΔG° foram negativos e diminuíram à medida que a concentração de β -CD foi aumentada. Sendo assim, há um indicativo de que o processo foi termodinamicamente espontâneo e que o ambiente dentro da cavidade da β -CD era mais propício para as moléculas de DHPM do que para as moléculas de água. Em outras palavras, as moléculas de água tendem a saírem da cavidade da molécula hospedeira, para adentrar a molécula hóspede.

5.4 Caracterização dos complexos de inclusão

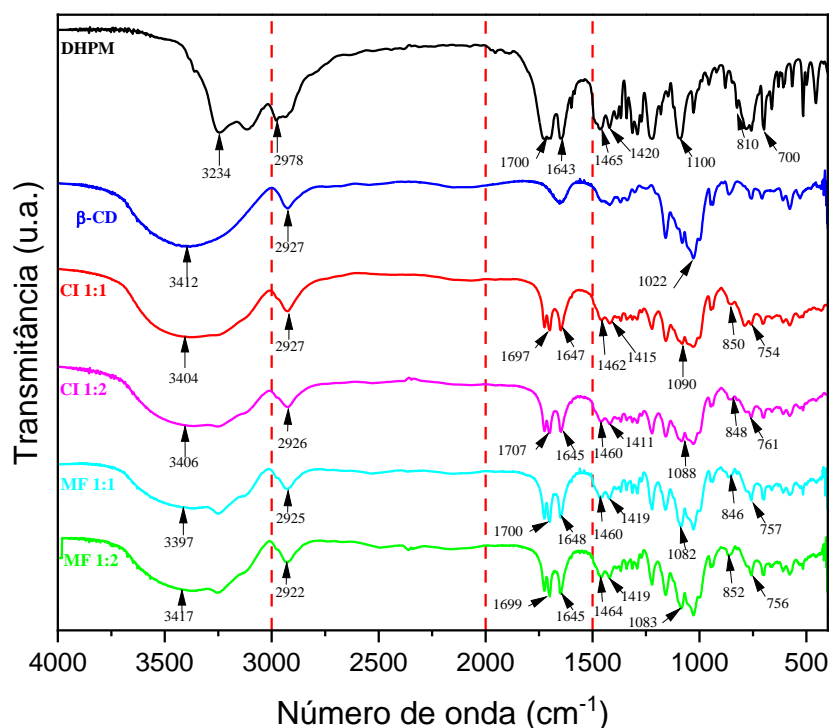
A confirmação dos complexos de inclusão no estado sólido, foi obtida por meio de diferentes técnicas, sendo elas: análise espectroscópica na região do infravermelho e do visível (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H.

5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Uma técnica eficaz para certificar a formação de complexo de inclusão no estado sólido é a espectroscopia na região do infravermelho. Pois, através desta técnica, é possível verificar alterações nas vibrações das moléculas ao se formarem os complexos de inclusão, como por

exemplo, desaparecimento de picos, alargamentos de bandas ou mudanças em suas intensidades (MURA, 2015). A Figura 35, mostra os espectros da DHPM pura, β -CD, os complexos de inclusão liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2) e as respectivas misturas físicas (MF 1:1 e MF 1:2).

Figura 35 - Espectro na região do infravermelho para as amostras DHPM, β -CD, complexos liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2) e as misturas físicas (MF 1:1 e MF 1:2).



Fonte: Do autor (2024)

Para o produto de síntese, observa-se um estiramento por volta de 3234 cm^{-1} referente ao grupo N-H do sistema heterocíclico. Por volta de 2978 cm^{-1} foi observado um estiramento das ligações C-H, estes que estão hibridizados em sp^2 e sp^3 . Já em torno de 1700 cm^{-1} vemos uma banda referente as ligações C = O do grupo funcional éster e amida. Em 1675 cm^{-1} é observado um sinal referente a ligação C = C. Próximos de 1450 e 1465 cm^{-1} , é notável os desdobramentos dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, respectivamente. Em 1100 cm^{-1} , é atribuído as ligações C-N, enquanto em 770 e 690 cm^{-1} é verificado um pico correspondente as ligações do anel aromático. Os valores obtidos estão em consonância com estudos relatados na literatura, pois Carvalho e Joshi (2019) evidenciaram o espectro da molécula DHPM com valores próximos de $3241,7\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento N – H da porção amida; $2930,2\text{ cm}^{-1}$ relacionados às ligações C – H com hibridizações sp^2 e sp^3 ; $1703,4\text{ cm}^{-1}$ referentes a ligação C

= O do grupo funcional éster e amida. Já em 1648,9 e 1468,8 cm^{-1} , notou os estiramentos referentes aos desdobramentos do grupamento $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, respectivamente. Em 1092 cm^{-1} , observou um estiramento atribuído as ligações C-N e por fim próximo de 780,4 cm^{-1} observou um pico correspondente as ligações do anel aromático.

No espectro da β -CD, uma banda larga próximo de 3406 cm^{-1} é indicativa da ligação O – H. A formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de ciclodextrina é a responsável pela ampliação dessa banda associada. Outra banda característica é observada próximo de 2925 cm^{-1} referente as ligações C – H localizadas nos carbonos com hibridizações sp^3 . Outra banda destaque é localizada por volta de 1028 cm^{-1} , correspondente às ligações C- O presente no anel pirano das unidades de glicose da β -ciclodextrina, bem como às ligações com hidroxilas (C-OH) e às ligações glicosídicas que conectam as diferentes unidades de glicose na molécula da β -CD. O espectro FTIR obtido para a β -CD, está de acordo com os espectros descritos na literatura (KFOURY *et al.*, 2014; RAKMAI *et al.*, 2017 e TORRES *et al.*, 2018).

No espectro do complexo de inclusão, obtido pelo processo de liofilização na proporção 1:1, observa-se uma banda característica da β -CD, com uma pequena variação deslocada para o valor de 3404 cm^{-1} . Uma banda é suprimida da porção N-H da molécula da DHPM, ao ocorrer a complexação com a ciclodextrina, fazendo com que ocorra o desaparecimento da banda referida. Em 1697 cm^{-1} observa-se um pequeno deslocamento referente a ligação C=O do grupo funcional amida e éster. Por volta de 1462 e 1415 cm^{-1} observa-se também uma redução na intensidade das ligações atribuídas ao grupo $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, referentes ao produto de síntese. Em 1090 cm^{-1} , observou-se uma redução no sinal atribuído a ligação C-N. Por fim, em 850 e 754 cm^{-1} , observa-se um alargamento e redução da intensidade da banda, referente as ligações do anel aromático.

Já no CI 1:2, pode-se observar uma banda deslocada para o valor de 3406 cm^{-1} , referente ao perfil da β -CD. Em 2926 cm^{-1} , observa-se uma variação ligeira para a ligação C-H referente aos carbonos sp^3 da molécula de ciclodextrina. Em 1707 cm^{-1} , apresenta um pequeno alargamento da banda, referente a ligação C=O do grupo éster e amida. Já em torno de 1460 e 1411 cm^{-1} , têm-se uma pequena redução referente as ligações atribuídas ao grupo $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$. Em 1088 cm^{-1} observou-se também uma variação ligeira sobre a ligação C-N. Em 848 e 761 cm^{-1} , observa-se uma redução da intensidade da banda, que é indicativo das ligações do anel aromático.

Tanto nas MF 1:1 e MF 1:2, os espectros não se diferenciaram, ambos apresentaram os mesmos picos, apenas com pequenas variações. Para a MF 1:1, observou-se uma banda em 3397 cm^{-1} , referente ao estiramento OH; em 2925 cm^{-1} atribuído ao estiramento do grupo CH_2 ,

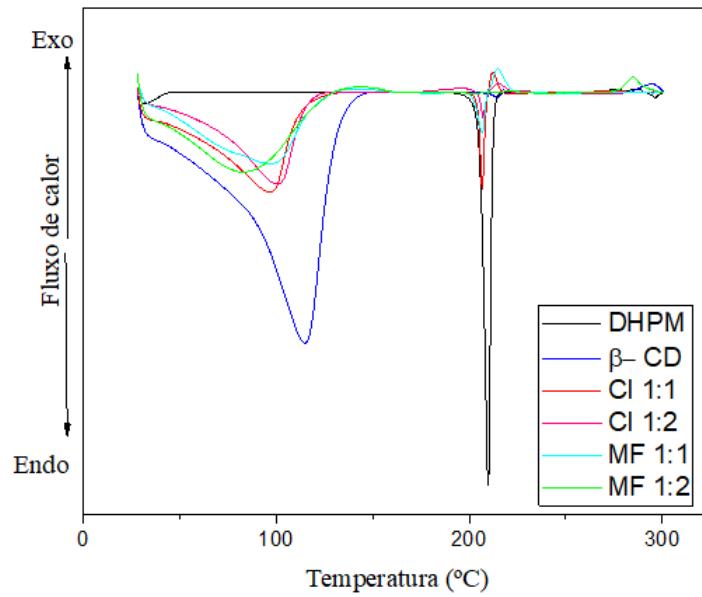
assim como as bandas em 1030 cm^{-1} , característico das β -CD. A bandas em 1700 cm^{-1} é encontrado na molécula de DHPM, referente a carbonila C=O da função éster e amida. Em 1460 cm^{-1} é possível verificar o desdobramento da porção $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, presente no produto de síntese. Em 1030 cm^{-1} é possível visualizar as ligações C–O do anel pirano, presente na ciclodextrina. Outros sinais são presentes em 846 e 757 cm^{-1} , referente a DHPM. O mesmo padrão se segue para a MF 1:2, com os respectivos valores de 3417 , 2922 , 1699 , 1645 , 1464 , 1419 , 1028 , 852 e 756 cm^{-1} . Contudo, há um indicativo de que esses valores não tiveram deslocamentos significativos, devido à baixa complexação ocasionada pela mistura mecânica entre a DHPM e β -CD, o que não foi suficiente para promover a inclusão.

5.4.2 Calorimetria diferencial exploratória - DSC

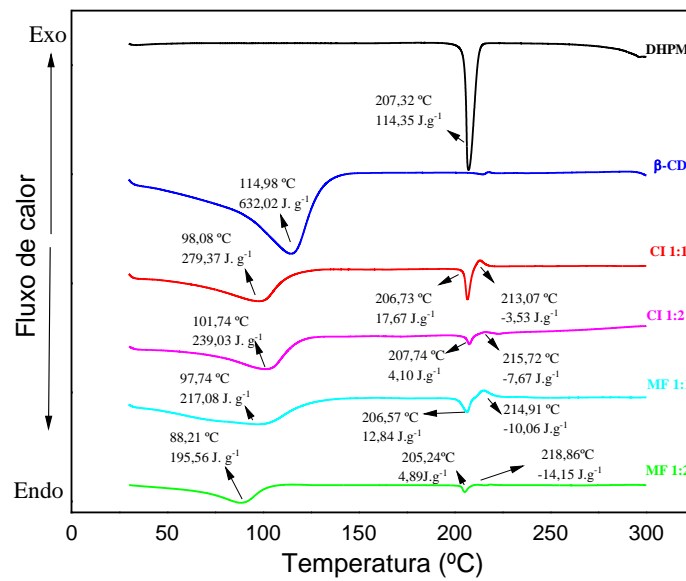
Também foi empregada na investigação da formação de complexos de inclusão, a calorimetria diferencial exploratória (DSC). Por meio dela, é possível observar o desaparecimento dos picos que correspondem a molécula hóspede, bem como os deslocamentos nas temperaturas e reduções nos valores de entalpia (ΔH). Assim, no contexto da análise de DSC realizada neste estudo, foram examinadas amostras contendo a β -CD, DHPM, os complexos de inclusão liofilizados e suas misturas físicas. Os termogramas obtidos por meio da técnica são apresentados na Figura 36 e os valores de temperatura e entalpia, podem ser observados na Tabela 3.

Figura 36 – Perfil calorimétrico de DSC para as amostras de DHPM, β -CD, complexos liofilizados e misturas físicas. Em (a), mostra o perfil calorimétrico de todas as substâncias. Em (b), mostra o perfil calorimétrico das mesmas substâncias, após separação das curvas calorimétricas.

a)



b)



Fonte: Do autor (2024).

Foi observado no perfil calorimétrico da molécula pura, um pico agudo endotérmico em 207,32 °C e $\Delta H = 114,35 \text{ J.g}^{-1}$, indicando a sua temperatura de fusão (T.F) e valor de entalpia, respectivamente. O valor da temperatura de fusão está de acordo com a literatura, pois diversos autores obtiveram de forma experimental, valores próximos, como por exemplo, Godugu e colaboradores (2020) que encontraram T.F = 207 °C.

Giordano, Novak e Moyano (2001) enfatizam que as ciclodextrinas apresentam um pico em temperaturas próximas de 120 °C, cujo valor está atribuído a eliminação de água do interior da sua cavidade. Dessa forma, o sinal observado em 114,98 °C, com valor de entalpia $\Delta H = 632,02 \text{ J.g}^{-1}$, denota a perda de moléculas de água da molécula hospedeira, cujo valor está de acordo com os autores.

Para o complexo de inclusão obtido pelo método de liofilização, na proporção 1:1, ocorreu uma diminuição de temperatura de transição de aproximadamente 16,9 °C. Ou seja, teve um deslocamento de temperatura para 98,08 °C e $\Delta H = 279,37 \text{ J.g}^{-1}$. Isso é um indicativo de que as moléculas de água saíram da ciclodextrina, para poder acomodar a molécula de DHPM. De acordo com Pinto *et al.* (2021) quando ocorre uma ausência ou diminuição próximo do pico da ciclodextrina, há um indicativo para a formação do complexo de inclusão. Além disso, outros dois picos são observados: o primeiro em 206,73 °C ($\Delta H = 17,67 \text{ J.g}^{-1}$) e o segundo em 213,07 ($\Delta H = -3,53 \text{ J.g}^{-1}$), respectivamente.

Já o complexo de inclusão na proporção molar 1:2, apresentou três eventos térmicos. O primeiro na temperatura de 101,74 °C ($\Delta H = 239,08 \text{ J.g}^{-1}$), correspondente à perda de água da β -CD. Assim como observou-se uma redução no valor entálpico, característico da CD ao formar o CI, indicando um possível deslocamento das moléculas de água pelas moléculas de DHPM. Outros sinais podem ser encontrados em torno de 207,74 °C, com valor de entalpia de $\Delta H = 4,10 \text{ J.g}^{-1}$ e em 215,72 °C com valor de entalpia $\Delta H = -7,67 \text{ J.g}^{-1}$.

Para a misturas físicas, ambos perfis calorimétricos apresentaram três eventos térmicos. Para a MF na proporção molar 1:1, o primeiro evento térmico se encontra na temperatura de 97,74 °C ($\Delta H = 217,08 \text{ J.g}^{-1}$), correspondente as perdas de água da cavidade hidrofóbica da molécula hospedeira. Os outros sinais são observados na temperatura de 206,57 °C ($\Delta H = 12,84 \text{ J.g}^{-1}$) e 214,91 °C ($\Delta H = -10,06 \text{ J.g}^{-1}$). Já para a MF 1:2, observou-se o primeiro sinal residual da ciclodextrina, em torno de 88,21 °C ($\Delta H = 195,56 \text{ J.g}^{-1}$), o segundo em 205,24 °C com valor de entalpia $\Delta H = 4,89 \text{ J.g}^{-1}$ e o último em 218,86 °C ($\Delta H = -14,15 \text{ J.g}^{-1}$).

Tabela 3 - Valores referentes aos picos observados nas curvas calorimétricas de DSC para DHPM, β -CD, complexos liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2) e as misturas físicas (MF 1:1 e MF 1:2).

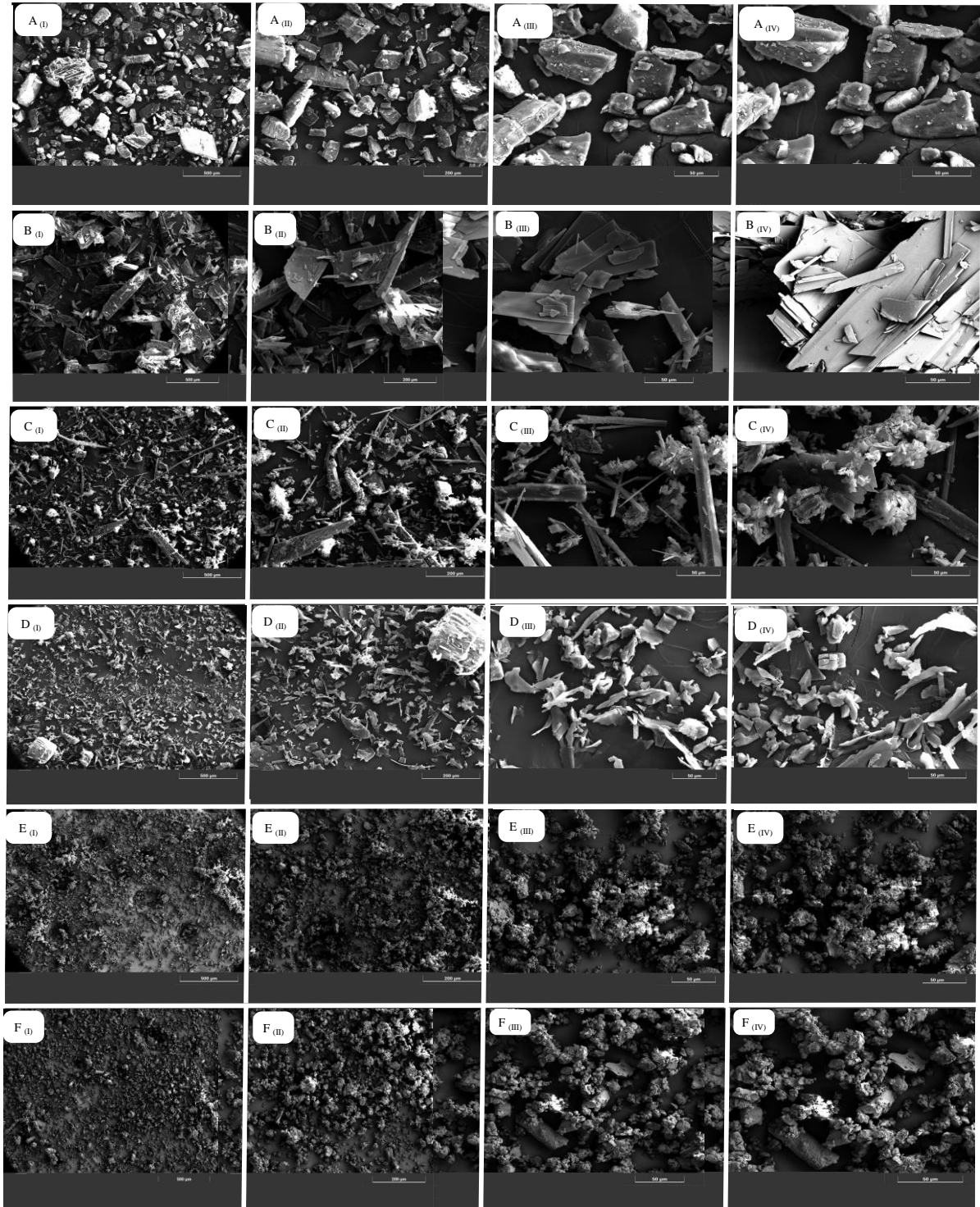
Amostras	Temperatura (°C)	Entalpia (ΔH) (J/g)
DHPM	207,32	114,35
β -CD	114,98	632,02
CI 1:1	98,08	279,37
	206,73	17,67
	213,07	-3,53
CI 1:2	101,74	239,03
	207,74	4,10
	215,72	-7,67
MF 1:1	97,74	217,08
	206,57	12,84
	214,91	-10,06
MF 1:2	88,21	195,56
	205,24	4,89
	218,86	-14,15

Fonte: Do autor (2024).

5.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas dos complexos de inclusão foram obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas em quatro ampliações diferentes (200X, 500X, 1500X e 2000X), conforme mostra a Figura 37.

Figura 37 - Micrografias de varredura. Em (A) β -CD; (B) DHPM; (C) MF 1:1; (D) MF 1:2; (E) CI 1:1 e (F) CI 1:2. Todas as amostras foram apresentadas em quatro ampliações distintas, seguindo a ordem de (I) 200X, (II) 500X, (III) 1500X e (IV) 2000X.



Fonte: Do autor (2024).

A Figura 37 (a), apresenta a micrografia da β -CD. É perceptível com as ampliações, que a molécula hospedeira, exibem algumas partículas no estado sólido com formato de cristais retangulares monocíclicos, com superfície e contorno bem definidos. A morfologia da molécula hospedeira se encontra em consonância com os trabalhos descritos na literatura (MARANGOCI *et al.*, 2008).

A Figura 37 (b) apresenta a micrografia do produto obtido da síntese, com seus cristais longos e bem definidos, confirmando que o mesmo estava totalmente puro e isento de contaminantes e outros resíduos.

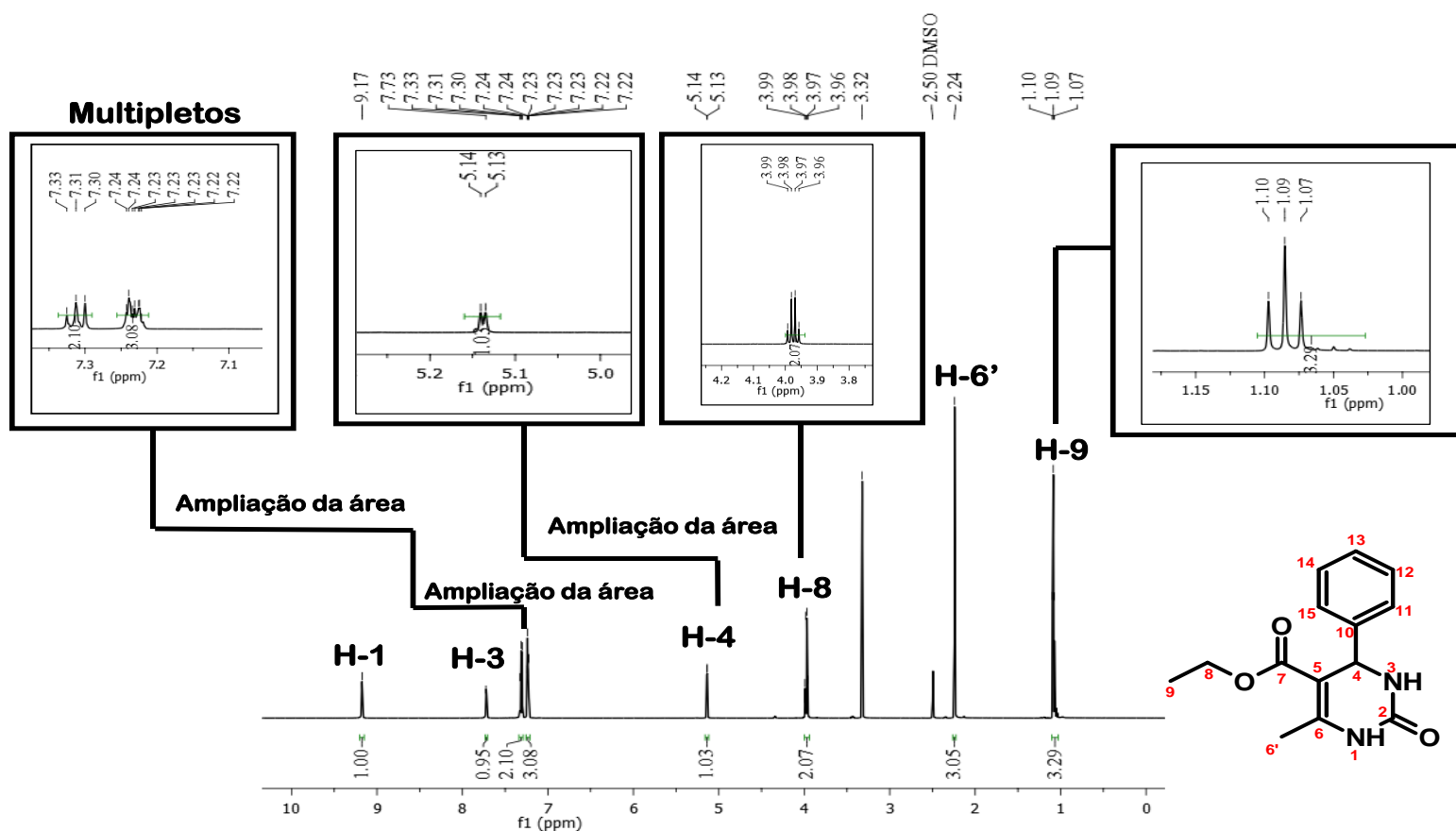
Já a Figura 37 (c) e 36 (d), apresentam as misturas físicas nas razões molares 1:1 e 1:2, respectivamente. É evidente que a morfologia apresenta uma pequena porção de aglomerados semelhantes a β -CD pura, com formatos de cristais irregulares, enfatizando a baixa capacidade de complexação através deste método.

Já a Figura 37 (e) e 36 (f), apresentam os complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2, respectivamente, obtidos pelo processo de liofilização. É evidente uma alteração significativa no formato e no aspecto das partículas na amostra, ocorrendo uma intensa redução da cristalinidade com agregados amorfos. De acordo com Carvalho (2017), quando se tem uma diminuição na cristalinidade para partículas menores e com uma forma mais lamelar, sugere a formação e presença de uma nova fase sólida, confirmando-se assim a complexação.

5.4.4 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

A molécula obtida do produto de síntese, possui fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ e teve a sua confirmação através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , em DMSO- d_6 .

A descrição da numeração da 3,4-diidropirimidinona, iniciou do nitrogênio do anel adjacente ao grupo metila do anel diidropirimidinônico. A numeração se segue para a direita no sistema cíclico, englobando também o carbono da metila conectada ao anel. O grupamento etila conectado ao éster foi numerado em seguida e por último o anel aromático ligado ao carbono 4 do anel. O espectro de RMN de ^1H para a DHPM é mostrado na Figura 38.

Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H para a DHPM em DMSO-d₆, 600 MHz.

Fonte: Do autor (2024).

A região que aparece à direita do espectro é denominada região de prótons altamente blindados, enquanto que à esquerda, é denominada de prótons menos blindados, ou desblindados. O solvente utilizado para a análise foi o DMSO-d₆, apresentando um pico em 2,50 ppm.

Na região alifática do espectro, é possível observar um sinal altamente blindado em $\delta = 1,09$ ppm, referente ao carbono 9. Este é capaz de se desdobrar em um sinal que se integra para três hidrogênios, gerando assim um tripleto, com valores de 1,10 e 1,07 ppm, respectivamente. Esse desdobramento é devido aos hidrogênios conectados do carbono 9 serem vizinhos a outros dois hidrogênios não magneticamente equivalentes, sendo eles presentes no carbono 8. Ainda, esse sinal é considerado o mais blindado, pois estes hidrogênios não são vizinhos a outros grupos que são capazes de promover uma desblindagem diamagnética.

Também é possível verificar a presença de um sinal na região de $\delta = 3,96$ a 3,99 ppm, referentes ao hidrogênios do carbono 8. Este sinal é integrado para dois, uma vez que neste carbono encontra-se dois hidrogênios magneticamente equivalentes. Estes hidrogênios estão vizinhos a outros três hidrogênios magneticamente não equivalentes, o que pela regra do

desdobramento spin – spin (também conhecida como regra do “n +1”), é capaz de gerar um quarteto.

Outro sinal característico é observado em $\delta = 2,24$ ppm. Ele faz referência ao carbono 6', ao qual gera um singlete, se integrando para três átomos de hidrogênio, característico do grupo metila (-CH₃). No entanto, esse valor de deslocamento químico é devido aos hidrogênios estarem ligados a um carbono adjacente a uma ligação dupla (hidrogênios alílicos), o que ocasiona a desblindagem pela anisotropia da ligação dupla.

Há um sinal presente entre $\delta = 5,13 - 5,14$ ppm, que comprova a formação do anel heterocíclico, referente ao hidrogênio 4 do sistema 3,4-diidropirimidinônico. Embora este hidrogênio esteja ligado a um carbono terciário, ele apresenta um maior deslocamento químico devido à proximidade de um carbono olefínico, de um anel aromático que cria um campo magnético mais intenso e de um nitrogênio que reduz a densidade eletrônica ao seu redor.

De forma geral, os compostos aromáticos apresentam um deslocamento químico próximo de 7,0 ppm e nessa região do espectro, eles estão desblindados devido ao campo anisotrópico gerados pelos elétrons do sistema π do anel. Dessa forma, os deslocamentos entre $\delta = 7,22 - 7,31$ ppm, referem-se aos hidrogênios ligados ao anel aromático. Porém, devido à sobreposição de sinais, não podem ser determinados, pois se tratam de sinais de segunda ordem e conseqüentemente geram-se sinais denominados de multipletos. Sendo assim, a única maneira de se confirmar a presença desses cinco átomos de hidrogênios no anel aromático, foi através da integração dos sinais e suas respectivas substituições químicas, que são compatíveis com os valores esperados para hidrogênios sujeitos a anisotropia magnética de anéis benzênicos.

Por fim, os hidrogênios ligados a um nitrogênio de amida, podem apresentar deslocamentos variáveis, sendo dependente dos fatores: temperatura, solvente e ambiente químico da molécula. Os sinais em $\delta = 7,73$ ppm e 9,17 ppm referem-se aos hidrogênio 3 e 1, respectivamente. Onde o primeiro, encontra-se levemente blindado, devido os pares de elétrons do nitrogênio possuírem a capacidade de estar em ressonância com a carbonila da amida. Já o segundo, refere-se ao hidrogênio 1, este considerado altamente desblindado, faz com que os pares de elétrons do nitrogênio sejam capazes de estarem em ressonância tanto com a carbonila da amida e com a ligação dupla presente no anel 3,4-diidropirimidinônico.

Os valores dos deslocamentos químicos, multiplicidade e a constante de acoplamento (J) obtidos experimentalmente, foram comparados com os dados abordados na literatura, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de deslocamentos químicos (δ), multiplicidade dos sinais e constante de acoplamentos (J), obtidos a partir de espectros de RMN de ^1H experimentalmente (^1H 600 MHz, DMSO-d6) e RMN de ^1H encontrado na literatura (500 MHz, DMSO-d6).

Atribuição	Valores experimentalmente em DMSO-d6; δ ^1H ; multiplicidade (J)	Valores obtidos na literatura (FARD; GHAFURI; RASHIDIZADEH (2018))
H-1	9,17 (s, 1H)	9,20 (s, 1H)
H-3	7,73 (s, 1H)	7,75 (s, 1H)
H-4	5,13 - 5,14 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H)	5,14 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H)
H-6'	2,24 (s, 3H)	2,25 (s, 3H)
H-8	3,96 - 3,99 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H)	3,98 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H)
H-9	1,09 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H)	1,09 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H)
H-11/H-15	nd	7,32 (m, Ar-H, 2H)
H-13	nd	Nd
H-12/H-14	nd	7,24 (m, Ar-H, 3H)

nd: não foi possível explorar, devido a sobreposição dos sinais.

Fonte: Do autor (2024).

Confirma-se então que com os dados obtidos experimentalmente estão em conformidade com os valores atribuídos com a literatura, apresentando uma ligeira variação de deslocamentos químicos e multiplicidades.

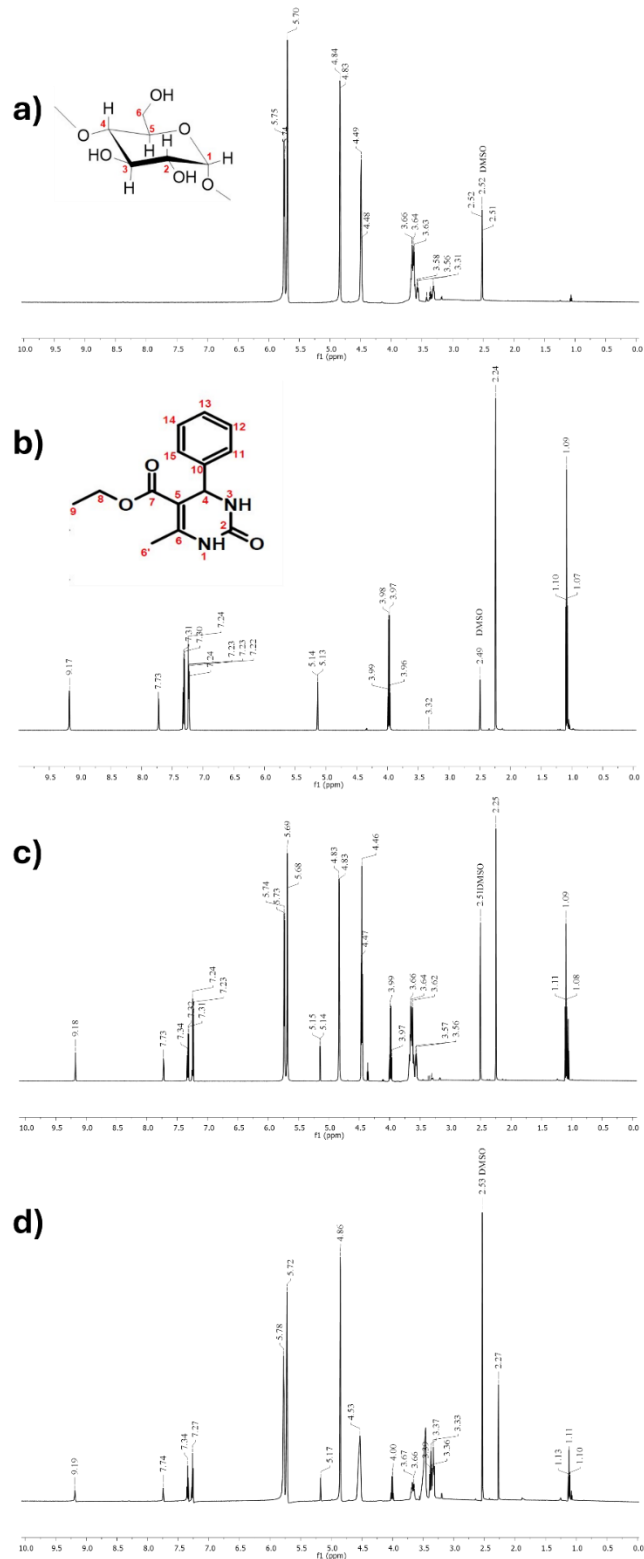
Na Figura 39 (a), mostra o espectro de RMN de ^1H da β -ciclodextrina também foi analisada, conforme mostrado espectro na Figura 39(b). Em sua composição, há os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono, sendo eles: $\text{H}_{\text{CD-1}}$ (4,83 ppm), $\text{H}_{\text{CD-3}}$ (3,66 ppm), $\text{H}_{\text{CD-4}}$ (3,36 ppm), $\text{H}_{\text{CD-5}}$ (3,44 ppm) e $\text{H}_{\text{CD-6}}$ (3,62 ppm). Há também os picos que são referentes as hidroxilas, sendo elas: a $\text{H}_{\text{OH-2}}$ (5,74 ppm), $\text{H}_{\text{OH-3}}$ (5,70 ppm) e $\text{H}_{\text{OH-6}}$ (4,48 ppm). Os valores apresentados foram comparados com a literatura e se encontram similares com o descrito neste trabalho (PINTO *et al.*, 2021).

Na Figura 39 (b), mostra o espectro de RMN de ^1H da DHPM como precursora, que foi detalhado anteriormente, evidenciando todos os picos, multiplicidades e deslocamentos químicos. Após a complexação com a ciclodextrina, observa-se alterações nos deslocamentos químicos, multiplicidade e intensidade dos picos.

Os complexos de inclusão também puderam ser analisados por RMN de ^1H . A Figura 39 (c) apresenta o espectro de RMN de ^1H para o complexo de inclusão em razão molar de 1:1. Observam-se algumas alterações nos deslocamentos químicos quando é comparado com seus precursores, indicando que os prótons envolvidos no processo estão sendo influenciados por prótons adjacentes. Ao analisar o espectro, foi possível verificar algumas variações nos deslocamentos químicos. Observou-se uma variação de 0,01 ppm para o H1 e H6' da dihidropirimidinona. O H8 (4,46 ppm) foi o próton mais afetado, verificando-se uma variação de 0,50 ppm. Também foi possível verificar alguns deslocamentos químicos da β -CD, sendo o $\text{H}_{\text{CD-4}}$ (3,62 ppm), $\text{H}_{\text{CD-5}}$ (3,36 ppm), $\text{H}_{\text{CD-6}}$ (3,66 ppm), com uma variação de 0,26 ppm, -0,08 ppm e 0,04 ppm, respectivamente. Os hidrogênios ligados a hidroxila também tiveram algumas alterações, sendo os prótons mais afetados OH_3 (5,73 ppm) e OH_6 (4,47 ppm), com variações de 0,03 ppm e -0,01 ppm, respectivamente. Os demais hidrogênios não mencionados, não tiveram nenhuma alteração em seus valores de deslocamento.

De forma análoga, analisou o espectro de RMN de ^1H para o complexo de inclusão, na razão molar 1:2, conforme mostra a Figura 39 (d). Observou alguns deslocamentos químicos com variação de 0,02 ppm presentes no H1 (9,19 ppm), H9 (1,11 ppm), $\text{H}_{\text{CD-3}}$ (3,68 ppm) e OH_3 (5,72 ppm). Uma variação pequena de 0,01 ppm foi atribuído ao próton H3 (7,74 ppm), presente na dihidropirimidinona. Uma variação de 0,03 ppm pôde ser encontrada nos prótons H4 (5,17 ppm) e H6' (2,27 ppm) da DHPM e $\text{H}_{\text{CD-1}}$ (4,86 ppm) da β -CD. Uma $\Delta\delta$ de 0,04 ppm, foi atribuído a hidroxila OH_2 (5,78 ppm) e $\Delta\delta$ de 0,05 ppm para $\text{H}_{\text{CD-6}}$ (3,67 ppm) e OH_6 (4,53 ppm). Ainda, alguns hidrogênios apresentaram deslocamentos químicos menores ou iguais a ($\Delta\delta \leq$) 0,05 ppm, sendo o H8 (3,56 ppm) e $\text{H}_{\text{CD-5}}$ (3,39 ppm).

Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz). Em (a) DHPM pura, (b) β -CD pura, (c) CI 1:1 e (d) CI 1:2.



Fonte: Do autor (2024).

Os valores de deslocamentos químicos e as variações das amostras de DHPM, β -CD e complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2, podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de deslocamentos químicos para a β -CD, DHPM e complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2 e $\Delta\delta$ dos deslocamentos químicos entre complexos e moléculas livres.

Atribuição	β -CD (ppm)	DHPM (ppm)	CI 1:1 (ppm)	$\Delta\delta$	CI 1:2	$\Delta\delta$
H _{CD-1}	4,83		4,83	0	4,86	0,03
H _{CD-2}	nd		nd	nd	Nd	nd
H _{CD-3}	3,66		3,64	-0,02	3,68	0,02
H _{CD-4}	3,36		3,62	0,26	3,56	0,20
H _{CD-5}	3,44		3,36	-0,08	3,39	-0,05
H _{CD-6}	3,62		3,66	0,04	3,67	0,05
OH ₂	5,74		5,74	0	5,78	0,04
OH ₃	5,70		5,73	0,03	5,72	0,02
OH ₆	4,48		4,47	-0,01	4,53	0,05
H-1		9,17	9,18	0,01	9,19	0,02
H-3		7,73	7,73	0	7,74	0,01
H-4		5,13 – 5,14	5,14	0	5,17	0,03
H-6'		2,24	2,25	0,01	2,27	0,03
H-8		3,96 – 3,99	4,46	0,50	3,56	-0,40
H-9		1,09	1,08	-0,01	1,11	0,02
H-11/ H-15		Nd	nd	nd	nd	nd
H-13		Nd	nd	nd	nd	nd
H-12/H-14		Nd	nd	nd	nd	nd

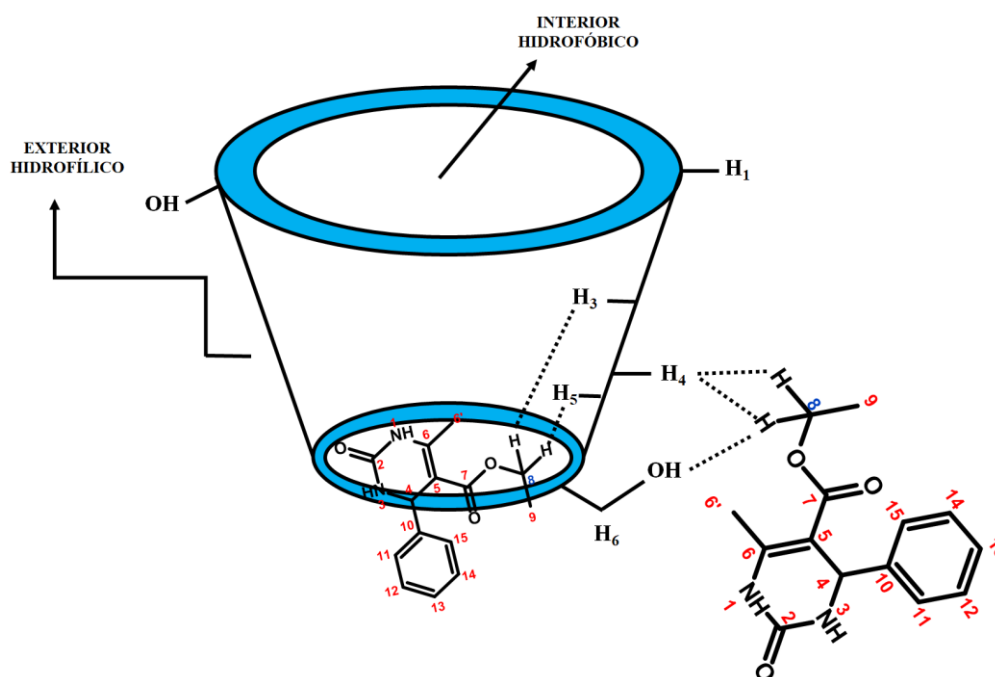
nd = não foi possível explorar, devido a sobreposição de picos.

Fonte: Do autor (2024).

Os dados sugerem para ambos os complexos de inclusão, a parte da molécula de DHPM, entra pela parte mais estreita da ciclodextrina (H_{CD-4}), devido à sua forte interação com o H-8 da molécula hóspede, realizando uma interação intermolecular de van der Waals. Também, os dados indicam uma ligação de hidrogênio fortemente, entre a hidroxila 6 (OH₆) da β -CD e o H-8 da molécula de dihidropirimidinona. Ainda, alguns prótons sofreram modificações em seus deslocamentos químicos, como por exemplo o H_{CD-3} e H_{CD-5} referentes a ciclodextrina, podendo

também realizar interações de van der Waals. Sugere-se também que a porção do anel aromático fique para fora da molécula hospedeira, devido ao impedimento estérico ocasionado, visto que o anel benzênico possui um grupo volumoso, capaz de gerar repulsão eletrostática. Uma possível sugestão de como ocorre a inclusão, pode ser visualizada na Figura 40.

Figura 40 - Sugestão de como ocorre a formação do complexo de inclusão entre DHPM e CD.



Fonte: Do autor (2024).

Para melhor elucidar a geometria de inclusão da molécula hóspede com a CD é necessário realizar experimentos para analisar a proximidade espacial entre os H, como por exemplo, a Espectroscopia Rotativa por Efeito Overhauser (ROESY), que são ferramentas cruciais para investigar interações intermoleculares. Esses espectros fornecem informações detalhadas sobre a proximidade espacial entre moléculas hospedeiras e hóspedes. A análise dos sinais nos espectros ROESY revela correlações cruzadas dipolares, permitindo a identificação de interações intermoleculares específicas. Essas correlações são fundamentais para compreender a dinâmica e a estrutura de complexos moleculares, sendo especialmente úteis em estudos de reconhecimento molecular (PAVIA *et al.*, 2015).

5.5 Testes *in vitro*

5.5.1 Ensaio de dissolução

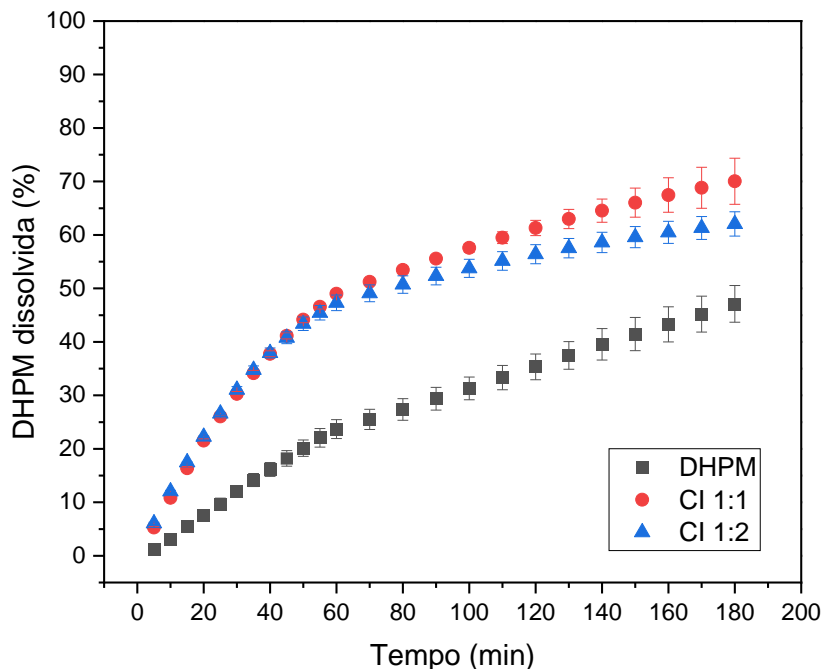
O teste de dissolução *in vitro* é considerado uma análise físico-química que determina e avalia a quantidade de uma substância que se dissolve em um meio específico durante um

determinado período. A finalidade deste ensaio é simular o comportamento de um princípio ativo, fornecendo assim o seu perfil de dissolução (OLIVEIRA, 2019). Através desta análise, é possível detectar o aumento intrínseco da solubilidade das moléculas após a formação dos complexos de inclusão. Esse aumento na solubilidade está diretamente ligado ao potencial de aumento da disponibilidade das moléculas, ou seja, verifica a quantidade e a taxa na qual uma substância pode se tornar disponível em seu local de ação.

Para verificar a eficácia da formação dos complexos de inclusão entre a molécula de dihidropirimidinona (DHPM) e β -CD, foram conduzidos testes de dissolução *in vitro*, comparando a molécula em sua forma pura, DHPM, e os complexos de inclusão, em proporções molares de 1:1 (CI 1:1) e 1:2 (CI 1:2).

Os perfis de dissolução do produto de síntese (DHPM) antes e após a complexação são mostrados na Figura 41. Os experimentos foram realizados com o objetivo de aumentar a porcentagem de DHPM dissolvida em água conforme o tempo avança, cujo procedimento possibilita a previsão da taxa de liberação da molécula hospedeira em solução.

Figura 41 - Perfil de dissolução em água da DHPM pura (DHPM) e dos complexos de inclusão liofilizados (CI 1:1 e CI 1:2).



Fonte: Do autor (2024).

É possível perceber que os complexos de inclusão são capazes de se dissolverem mais rapidamente do que a molécula pura, verificando-se assim um aumento em sua solubilidade intrínseca.

Foi determinado que 12,04% da molécula de DHPM estavam solúveis após 30 minutos (DP₃₀), enquanto após 3h (180 minutos), tempo total do experimento, não foram dissolvidos 50% do composto (T₅₀) para a amostra da molécula pura. Assim, verifica-se que foram dissolvidos aproximadamente cerca de 47,10% da molécula, durante esse intervalo do experimento.

Para o complexo de inclusão na proporção 1:1 (CI 1:1), verificou que 30,27 % foram dissolvidos após 30 min e 50% do composto foi detectado em solução após 70 minutos. De forma análoga, para o complexo de inclusão 1:2 (CI 1:2), percebe-se que 31,05% também foram dissolvidos após 30 minutos e 50% do composto foi detectado em solução após 80 minutos.

A taxa de dissolução em água para a molécula pura, DHPM, e os complexos de inclusão, estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Taxa de dissolução em água para a dihidropirimidinona pura (DHPM) e complexos de inclusão DHPM/ β -CD nas proporções 1:1 (CI 1:1) e 1:2 (CI 1:2), sob temperatura de $37 \pm 0,2$ °C.

Amostras	DP ₃₀ (%)	T ₅₀ (min)
DHPM	12,04	> 180
CI 1:1	30,27	70
CI 1:2	31,05	80

Fonte: Do autor (2024).

Para os complexos de inclusão, os valores de porcentagem de droga dissolvida após 30 minutos aumentaram. Para o CI 1:2 com 31,05%, foi capaz de aumentar cerca de 2,57 vezes a taxa de dissolução se comparada com a molécula de DHPM pura. Já para o complexo CI 1:1 com 30,27%, o mesmo foi capaz de aumentar cerca de 2,51 vezes a taxa de dissolução comparada com a molécula pura. Sendo assim, infere-se que em ambos os complexos de inclusão não houve diferença significativa, por possuírem valores próximos dentre as suas taxas de liberação.

Diversos estudos na literatura observaram o aumento da dissolução da molécula hóspede. Khan e colaboradores (2023) evidenciaram que a rivaroxabana, um composto derivado da oxazolidinona, é um agente anticoagulante amplamente empregado na prevenção e tratamento de diversos distúrbios metabólicos arteriais e venosos. O fármaco em sua forma pura exibiu cerca de 31,43% de liberação de dissolução em um intervalo de 60 min, enquanto após a implementação com β -CD, os complexos tiveram uma liberação de 54,25%.

Para o estudo conduzido por Liu et al. (2020), o complexo de inclusão composto por piperina e β -CD modificada com etilenodiamina, tiveram liberações completa da molécula com apenas 60 min. Em contrapartida, quando a molécula pura foi testada, apenas 40% dela foi liberada no mesmo período de tempo. Dessa forma, esses resultados indicam uma significativa melhoria na solubilidade da molécula, quando são incorporadas em um complexo de inclusão.

Estudos realizados por Pinto e colaboradores (2020), mostraram que a dibenzalacetona (DBA), um análogo sintético da curcumina, foi complexado através de duas metodologias distintas. A primeira, através do método de malaxagem, onde verificou que a liberação da amostra era muito lenta, concluindo que a técnica não parecia ser vantajosa. Por outro lado, também foi realizado o método de liofilização, nos quais os complexos preparados nas proporções molares 1:1 e 1:2, puderam aumentar a taxa de dissolução da molécula de DBA. Os complexos 1:1 conseguiram atingir liberações máximas após o equilíbrio em 120 min, já para o complexo 1:2, foi certificado que havia liberado 75% da DBA no mesmo intervalo. Contudo, concluiu-se com esse estudo, que na proporção molar 1:1, a molécula hóspede (DBA) teve uma liberação mais lenta quando comparada com o complexo na proporção molar 1:2.

A melhora na solubilidade e na taxa de dissolução pode ter implicações positivas para a liberação controlada da DHPM, aumentando sua estabilidade e biodisponibilidade. A formação dos complexos de inclusão parece proteger a molécula hóspede de processos de degradação e proporcionar uma liberação mais uniforme, o que é crucial para aplicações farmacêuticas.

Assim, esses estudos evidenciam a importância dos complexos de inclusão como uma abordagem valiosa para superar os desafios relacionados com a limitação de sua solubilidade. Não obstante, a inclusão dessas moléculas com as ciclodextrinas, representam uma estratégia promissora para aumentar a biodisponibilidade e conseqüentemente, a eficácia dos compostos farmacêuticos.

5.5.2 Atividade biológica utilizando o modelo *Lactuca sativa* L.

Os efeitos dos tratamentos na germinação das sementes da alface (*Lactuca sativa* L.) foram avaliados durante os cinco primeiros dias de crescimento (120h de exposição) e estão apresentados na Tabela 7, com os valores médio da taxa de germinação (%GR), índice de velocidade de germinação (IVG), taxa de crescimento de radicular (CR) e taxa de crescimento da parte aérea (PA).

Tabela 7 - Valores médios de taxa de germinação (%GR), índice de velocidade de germinação (IVG), taxa de crescimento radicular (CR) e taxa de crescimento da parte aérea (PA). Os controles negativos e positivos são representados por água ultrapura e a molécula não complexada, respectivamente.

Tratamento	(%GR)	IVG	CR	PA
β -CD	59,60 \pm 0,4	10,45 \pm 0,1167	18,33 \pm 0,5164	18,82 \pm 0,4470
DHPM	60,00	10,75 \pm 0,1687	25,43 \pm 3,427	18,91 \pm 1,374
CI 1:1	60,00	9,057* \pm 0,08003	19,65 \pm 0,5421	17 \pm 0,6587
CI 1:2	59,20 \pm 0,4899	9,090* \pm 0,1445	20,01 \pm 0,4780	16,85 \pm 0,4065
H ₂ O	59,20 \pm 0,4899	10,12 \pm 0,2177	20,63 \pm 0,6211	19,84 \pm 0,4542

Valores seguidos por * representam diferença significativa com 95% de confiança, em relação ao controle negativo (água ultrapura), segundo o teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2024).

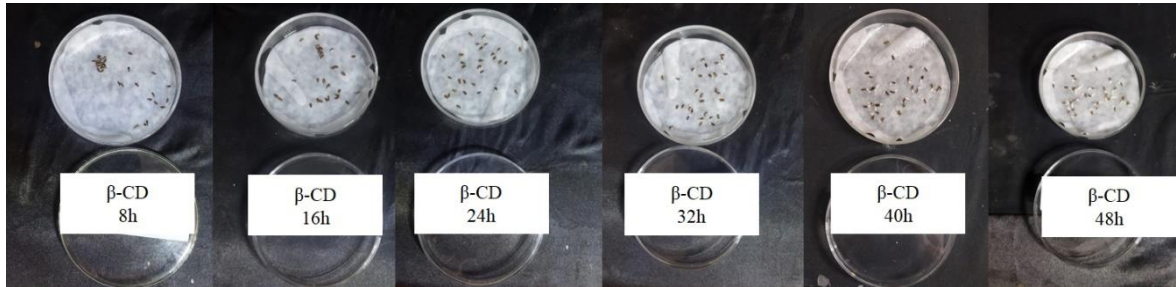
Os complexos de inclusão na proporção molar 1:1 e 1:2 apresentaram uma GR de 60,0 e 59,20%, respectivamente, com valores de IVG iguais a 9,057 e 9,090, sendo estes que se diferenciaram estatisticamente do controle negativo.

Valério e colaboradores (2007) enfatizam que dentre os parâmetros macroscópicos, os relacionados com a germinação (GR e IVG) são menos sensíveis. Esses fatores podem ser explicados, devido à sua capacidade de fornecer uma avaliação rápida e precisa do processo de germinação das sementes. O IVG, por exemplo, não se limita apenas a contar o número de sementes que germinaram, mas também o tempo necessário para que essa germinação ocorra. Assim, essas variações na toxicidade de compostos podem ser prontamente identificadas através de alterações na velocidade e na taxa de germinação das sementes expostas a esses compostos. Esses parâmetros sensíveis permitem uma detecção precoce de efeitos adversos, tornando-os valiosos na avaliação da toxicidade de substâncias químicas.

Já o fator CR por sua vez, destaca-se por sua eficácia em evidenciar a toxicidade do composto testado. Ele é diretamente impactado pelo efeito tóxico do composto sobre o atraso na germinação, o que se reflete na diminuição do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme destacado por Venceslau *et al.*, (2017).

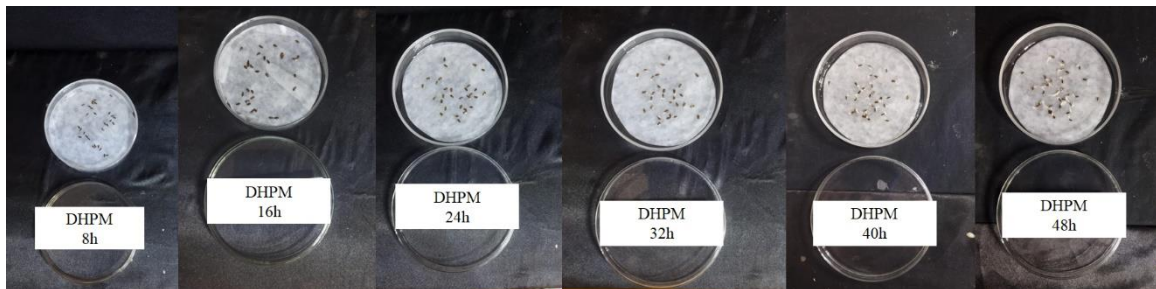
As Figuras 42, 43, 44, 45 e 46 mostradas a seguir, apresentam as sementes de alface germinadas durante o período de 48h, com os respectivos tratamentos contendo soluções de β -CD, DHPM, CI 1:1, CI 1:2 e água ultrapura.

Figura 42 - Placas de Petri contendo solução de CD com as sementes de alface germinadas.



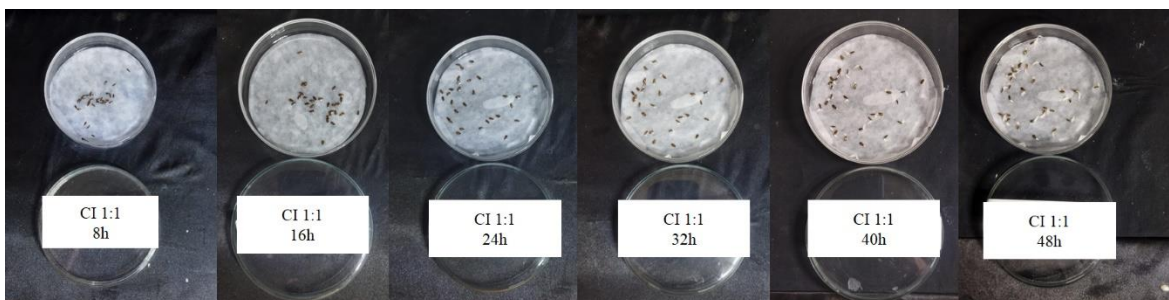
Fonte: Do autor (2024).

Figura 43 - Placas de Petri com solução de DHPM com as sementes de alface germinadas.



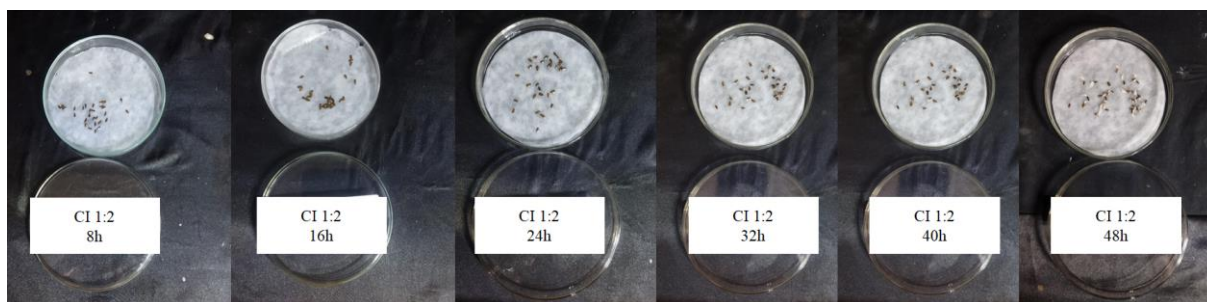
Fonte: Do autor (2024).

Figura 44 - Placas de Petri contendo solução de CI 1:1 com as sementes de alface germinadas.



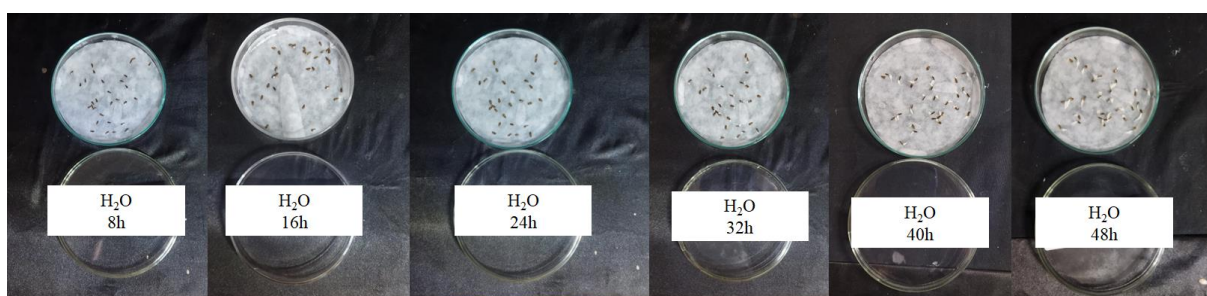
Fonte: Do autor (2024).

Figura 45 - Placas de Petri contendo solução de CI 1:2 com as sementes de alface germinadas.



Fonte: Do autor (2024).

Figura 46 - Placas de Petri com água ultrapura com as sementes de alface germinadas.



Fonte: Do autor (2024).

Os complexos de inclusão e a molécula pura não tiveram toxicidade na concentração testada, pois as sementes de *Lactuca sativa* L. germinaram. Também a β -CD não apresentou nenhuma toxicidade sob o modelo vegetal e o resultado abordado está em consonância com a literatura, visto que as CDs são praticamente atóxicas.

Outras substâncias já foram utilizadas para verificar a toxicidade utilizando o modelo vegetal. Santiago e colaboradores (2017) mostraram que o óleo essencial extraído de *Backhousia citriodora* apresentou efeitos citogenotóxicos notáveis nas células meristemáticas de *Lactuca sativa*. Estes efeitos englobaram danos ao DNA, indução de fragmentação do material genético e ativação do processo de apoptose celular. Adicionalmente, constatou-se que o óleo essencial exibiu efeitos clastogênicos (processo que resulta na quebra ou na reorganização dos cromossomos dentro das células) e aneugênicos (agente que causam aneuploidia - uma condição que as células possuem um número anormal de cromossomos) nas células meristemáticas da planta modelo. Estes resultados ressaltam a importância da investigação dos efeitos biológicos de compostos naturais sobre células vegetais, sublinhando o potencial do óleo essencial de *B. citriodora* como uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos, inclusive na produção de herbicidas naturais.

Venceslau e colaboradores (2017) puderam examinar como a toxicidade da atrazina pode ser alterada quando ela é misturada com ciclodextrinas ancoradas em sílica. Os autores

também utilizaram sementes de alface como modelo vegetal e descobriram que a atrazina pura causou danos genéticos às raízes. No entanto, quando a molécula pura foi complexada com γ -CD/sílica, os efeitos genéticos negativos foram consideravelmente reduzidos. Os resultados apresentados corroboram que essa abordagem pode ser uma maneira eficaz de diminuir a toxicidade da atrazina em plantas que não são alvo.

Os resultados expressos neste estudo utilizando a DHPM pura e os complexos liofilizados demonstraram como uma maneira eficaz para uso em germinação em sementes de alface, devido a sua não toxicidade na concentração testada. Além disso, estudos complementares como a expressão gênica, podem investigar como a molécula pura e os complexos estão sendo regulados em resposta ao tratamento e como essas mudanças estão relacionadas aos efeitos citogenetóxicos observados.

Contudo, ao integrar os resultados obtidos neste estudo com abordagens da Biologia Molecular, será possível obter uma compreensão mais abrangente dos efeitos dos compostos utilizados a nível molecular, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos de ação e os impactos biológicos que estas substâncias podem causar em células vegetais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi possível sintetizar a molécula derivada de dihidropirimidinona proposta por Pietro Biginelli, utilizando os princípios das reações multicomponentes. Os resultados demonstraram alta eficiência e otimização do processo, com significativa redução do uso de reagentes e do tempo de execução dos experimentos em comparação com sínteses orgânicas tradicionais de múltiplas etapas. O estudo também enfatizou a prevenção ambiental, promovendo economia atômica, minimização de subprodutos e outros princípios alinhados com a Química Verde.

A confirmação da molécula sintetizada foi realizada por meio de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , evidenciando sinais característicos de dihidropirimidinonas, e por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), cujos resultados foram comparados com a literatura.

Os estudos de solubilidade mostraram que a β -CD melhorou significativamente a taxa de dissolução da molécula de DHPM em água. As isotermas de solubilidade indicaram alta solubilidade dos complexos de inclusão, proporcional à concentração de ciclodextrina (CD) com um aumento de solubilidade de 1,73; 1,53 e 1,43 vezes nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C respectivamente. Além disso, os valores da Energia Livre de Gibbs foram calculados, sugerindo um processo termodinamicamente espontâneo.

Os complexos de inclusão nas razões molares 1:1 e 1:2, foram preparados pelo método da liofilização, obtendo-se êxito no processo. Além disso, os mesmos foram caracterizados e confirmados por técnicas espectroscópicas (FTIR e RMN de ^1H), análise térmica (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As análises espectroscópicas por FTIR revelaram alterações nas bandas espectrais dos complexos de inclusão, indicando interações entre a molécula hóspede e a ciclodextrina. Resultados similares foram obtidos por calorimetria diferencial exploratória (DSC), evidenciando mudanças nas propriedades térmicas dos complexos.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou a formação dos complexos de inclusão pela alteração na morfologia das partículas, após a incorporação da ciclodextrina. Os resultados apresentaram um material com baixa cristalinidade com agregados amorfos e com partículas menores com uma forma mais lamelar.

Os resultados obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H confirmou a formação dos complexos de inclusão. Os valores de deslocamentos químicos dos prótons mais afetados da DHPM e da β -CD sugeriram que o H-8 da molécula, entrou pela

cavidade da molécula hospedeira (H_{CD-4}). Estudos complementares, como a Espectroscopia Rotativa por Efeito Overhauser (ROESY), poderão elucidar de forma melhor e precisa a inclusão da molécula hóspede com a CD.

Os ensaios de dissolução *in vitro* mostraram que os complexos de inclusão melhoraram significativamente a solubilidade da DHPM em água e sua taxa de dissolução, indicando potenciais benefícios para liberação controlada e biodisponibilidade. O estudo indicou uma importância da ciclodextrina, como uma abordagem eficiente para a superação da baixa solubilidade de compostos orgânicos.

Para os testes utilizando o modelo vegetal, os resultados indicaram a não toxicidade dos complexos de inclusão e da molécula de DHPM, na concentração testada. Os resultados corroboram para uma possível aplicabilidade em um ramo agroquímico, embora estudos adicionais sejam necessários para investigar os potenciais efeitos citogenetóxicos sobre o DNA das sementes de alface.

Adicionalmente, pode-se ampliar esta pesquisa por meio da realização de novos ensaios biológicos *in vitro*. Como sugestões, realizar testes para avaliar a atividade antimicrobiana, atividade fosfolipásica e atividade antiviral das substâncias investigadas. Além disso, é possível realizar ensaios biológicos *in vivo*, estes fundamentais para complementar e validar os resultados obtidos nos estudos *in vitro*. Esses ensaios *in vivo* são essenciais para entender melhor o comportamento das substâncias em organismos vivos e para avaliar sua eficácia e segurança em um contexto mais próximo das condições humanas. Contudo, testes clínicos são de extrema importância, pois confirmam a biodisponibilidade do fármaco, garantindo ao mesmo tempo a segurança toxicológica antes de considerar sua aplicação clínica e terapêutica.

REFERÊNCIAS

- AL-OBAIDI, N.; MITCHISON, T. J.; CREWS, C. M.; MAYER, T. U. Identification of MAC1: A Small Molecule That Rescues Spindle Bipolarity in Monastrol-Treated Cells. **ACS Chemical Biology**, 11, n. 6, p. 1544-1551, 2016.
- AMEEN, H. M.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; BOGNÁR, B.; SZENTE, L. *et al.* Thermodynamic characterization of the interaction between the antimicrobial drug sulfamethazine and two selected cyclodextrins. **Molecules**, 24, n. 24, 2019.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2010. 626-631.
- ARAGAO, F. B. *et al.* Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa*. **Allelopathy Journal**, 2015. 259-272.
- ARAÚJO, R. F. M. Preparação e caracterização do complexo de inclusão da riparina em hidroxipropil- β -ciclodextrina, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí, p.139, 2016.
- ARRUDA, Tarsila Rodrigues; BERNARDES, Patrícia Campos; MORAES, Allan Robledo Fialho e; SOARES, Nildad e Fátima Ferreira. Natural bioactives in perspective: The future of active packaging based on essential oils and plant extracts themselves and those complexed by cyclodextrins. **Food Research International**, [S. l.], v. 156, n. March 2022. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111160.
- BANERJEE, A. *et al.* Encapsulation of Prodan in beta-cyclodextrin environments: A critical study via electronic spectroscopy and molecular mechanics, **Journal of Molecular Structure**, v.794, n.1-3, p.181- 189, 2006.
- BHARGAV, A.; SHEEBA, F. R. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development BetaCyclodextrin As An Excipient In Drug Formulation Bhargav. A. Bhargav. A, Beta-Cyclodextrin As An Excipient In Drug Formulation., **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 122–127, 2021.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Beerse, v. 59, p. 645–666, mai. 2007.
- BREWSTER, M. E. *et al.* Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 80, n. 4, p. 380-383, Apr. 1991.
- BRINKERHOFF, Rafael Centuriao *et al.* Evaluation of the antioxidant activities of fatty polyhydroquinolines synthesized by Hantzsch multicomponent reactions. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 43, p. 24688–24698, 2019. DOI: 10.1039/c9ra04758a.
- CARNEIRO, S. B.; COSTA DUARTE, F. Í.; HEIMFARTH, L.; SIQUEIRA QUINTANS, J. D. S. *et al.* Cyclodextrin–drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 3, p. 642, 2019.
- CARVALHO, B. R.; JOSHI, S. Solvent and catalyst free synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones by twin screw extrusion. **The Rotal Society of Chemistry**, India, 2019.

CARVALHO, L. B. et al. Cyclodextrin/silica hybrid adsorbent for removal of methylene blue in aqueous media, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Lavras, v. 78, n. 1-4, p. 77-87, abr. 2014.

CARVALHO, L. B.; PINTO, L. M. A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 74, n. 1-4, p. 375-381, Dec. 2012.

CARVALHO, L. B. et al. Complexes between methyltestosterone and β -cyclodextrin for application in aquaculture production. **Carbohydrate Polymers**, Lavras, v. 179, p. 386-393, jan. 2018.

CID-SAMAMED, A.; RAKMAI, J.; MEJUTO, J. C.; SIMAL-GANDARA, J. *et al.* Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. **Food Chemistry**, 384, p. 132467, 2022.

CIMARELLI, C. Multicomponent Reactions. **Molecules**, v.24, n. 13, DOI: 10.3390/molecules24132372.

CLARIDGE, Timothy DW. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. Elsevier, 2016.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.1-9, 2007.

DEL VALLE, E. M. Martin. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, [S. 1.], v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9.

DÖMLING, A. Recent Developments in Isocyanide Based Multicomponent Reactions in Applied Chemistry. **Chemical Reviews**, 106, n. 1, p. 17-89, 2006.

DUVAUCHELLE, V.; MEFFRE, P.; BENFODDA, Z. Green methodologies for the synthesis of 2-aminothiophene. **Environmental Chemistry Letters**, 21, n. 1, p. 597-621, 2023.

ELDERS, N.; VAN DER BORN, D.; HENDRICKX, L. J. D.; TIMMER, B. J. J. *et al.* The Efficient One-Pot Reaction of up to Eight Components by the Union of Multicomponent Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, 48, n. 32, p. 5856-5859, 2009. <https://doi.org/10.1002/anie.200902683>.

EWALD P.P. The Principles of X-ray Diffraction. In: Ewald P.P. (eds), Fifty Years of X-Ray Diffraction. Springer, chapter 6, 1962.

EZZATZADEH, Elham; HOSSAINI, Zinatossadat. A novel one-pot three-component synthesis of benzofuran derivatives via Strecker reaction: Study of antioxidant activity. **Natural Product Research**, [S. 1.], v. 34, n. 7, p. 923–929, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2018.1542389.

FILHO, João F. Allochio; LEMOS, Bárbara C.; DE SOUZA, Acácio S.; PINHEIRO, Sergio; GRECO, Sandro J. Multicomponent Mannich reactions: General aspects, methodologies and applications. **Tetrahedron**, [S. 1.], v. 73, n. 50, p. 6977–7004, 2017. DOI: 10.1016/j.tet.2017.10.063

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochim Acta**, Amsterdam, v. 380, n. 2, p. 123-151, Dec. 2001.

- GODUGU, K.; YADALA, V. D. S.; PINJARI, M. K. M.; GUNDALA, T. R.; SANAPAREDDY, L. R.; NALLAGONDU, L. R. Natural dolomitic limestone-catalyzed synthesis of benzimidazoles, dihydropyrimidinones, and highly substituted pyridines under ultrasound irradiation. **Journal of Organic Chemistry**, p. 1881-1900, Beilstein, 2020.
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, E.; APARICIO, R.; GARAYOA, M.; MONTERO, M. J. *et al.* Dihydropyrimidine-2-thiones as Eg5 inhibitors and L-type calcium channel blockers: Potential antitumour dual agents. **MedChemComm**, 10, n. 9, p. 1589-1598, 2019.
- GRAFF, Jason R. *et al.* *Vibrio cholerae* exploits sub-lethal concentrations of a competitor-produced antibiotic to avoid toxic interactions. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 8, 2013.
- GRILLO, Renato *et al.* Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-beta-ciclodextrina. **Química nova**, v. 31, p. 290-295, 2008.
- GUEDES, L. S.; MORGON, N. H.; MARTINS, M. H.; PESSINE, F. B. T. Imiquimod/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex: Experimental and Theoretical Studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 31, n. 8, p. 1732-1745, 2020.
- HAPIOT, F.; TILLOY, S.; MONFLIER, E. Cyclodextrins as Supramolecular Hosts for Organometallic 471 Complexes, **Chemical Reviews**, v.106, n3, p.1-15, 2006.
- HIGUCHI, T. K.; CONNORS, A. Phase-solubility techniques. *Advanced in Chemical Instrumentation*, 1965. 212-217.
- HOLDEN, M. S.; CROUCH, R. D. The biginelli reaction. **Journal of Chemical Education**, ACS Publications, v. 78, n. 8, p. 1104, 2001.
- JAMBHEKAR, Sunil S.; BREEN, Philip. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 356–362, 2016. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.11.017.
- KAUR, R.; CHAUDHARY, S.; KUMAR, K.; GUPTA, M. K. *et al.* Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 132, p. 108-134, 2017.
- KAZEMI, M. Magnetically reusable nanocatalysts in biginelli synthesis of dihydropyrimidinones (DHPMs). **Synthetic Communications**, 50, n. 10, p. 1409-1445, 2020.
- KFOURY, M. *et al.* Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, 490 spectroscopic, thermal and structural studies, **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.454–461, 2014.
- KHAN, W. H.; ASGHAR, S.; KHAN, I. U.; IRFAN, M. *et al.* Effect of hydrophilic polymers on the solubility and dissolution enhancement of rivaroxaban/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Heliyon**, 2023.
- KOUZNETSOV, Vladimir V.; GALVIS, Carlos E. Puerto. Strecker reaction and α -amino nitriles: Recent advances in their chemistry, synthesis, and biological properties. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 74, n. 8, p. 773–810, 2018. DOI: 10.1016/j.tet.2018.01.005.
- KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins, Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, p.167–180, 2013.

- LIU, Kai et al. Estudo de dissolução in vitro do complexo de inclusão de piperina com etilenodiamina- β -ciclodextrina. **Jornal de fenômenos de inclusão e química macrocíclica**, v. 96, p. 233-243, 2020.
- LIU, Yaowen; SAMEEN, Dur E.; AHMED, Saeed; WANG, Yue; LU, Rui; DAI, Jianwu; LI, Suqing; QIN, Wen. Recent advances in cyclodextrin-based films for food packaging. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 370, n. February 2021, p. 131026, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131026.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 15-30, Aug. 2001.
- LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina, **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.117-124, 2010.
- MAITI, G.; KUNDU, P.; GUIN, C. One-pot synthesis of dihydropyrimidinones catalysed by lithium bromide: an improved procedure for the biginelli reaction. **Tetrahedron Letters**, Elsevier, v. 44, n. 13, p. 2757–2758, 2003.
- MARANGOCI, N.; FARCAS, A.; PINTEALA, M.; HARABAGIU, V. *et al.* Polyrotaxanes composed of β -cyclodextrin and polydimethylsiloxanes:: synthesis, morphology and thermal behavior. **HIGH PERFORMANCE POLYMERS**, 20, n. 3, p. 251-266, JUN 2008.
- MARTINS, L. N. S. B. Complexo de inclusão entre óleo essencial de *Callistemon Viminalis* e β -ciclodextrina: preparação, caracterização, atividade antibacteriana, antifúngica e testes de toxicidade. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 109, 2018.
- MATOS, L. H. S.; MASSON, F. T.; SIMEONI, L. A.; HOMEM-DE-MELLO, M. Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 143, p. 1779-1789, 2018.
- MOTHE, C. G; AZEVEDO, A. D. Análise térmica de materiais. São Paulo: Artliber, 2009.
- MUÑOZ-SHUGULÍ, C.; VIDAL, C. P.; CANTERO-LÓPEZ, P.; LOPEZ-POLO, J. Encapsulation of plant extract compounds using cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, electrospinning and their combinations for food purposes. **Trends in Food Science & Technology**, 108, p. 177-186, 2021.
- MURA, Paola. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 101, p. 238–250, 2014. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.02.022.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.113, p.226–238, 2015.
- MURAKAMI, Makoto; KUDO, Ichiro. Phospholipase A2. **The journal of biochemistry**, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002.
- NAGARAJIAH, Honnappa; MUKHOPADHYAY, Arindam; MOORTHY, Jarugu Narasimha. Biginelli reaction: an overview. **Tetrahedron Letters**, [S. l.], v. 57, n. 47, p. 5135–5149, 2016. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.09.047.

NISHANTH RAO, R.; JENA, S.; MUKHERJEE, M.; MAITI, B. *et al.* Green synthesis of biologically active heterocycles of medicinal importance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 19, n. 4, p. 3315-3358, 2021.

OLIVEIRA, C. L. Teste de dissolução: conceitos, aplicações e relevancia no desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos. Trabalho de conclusão de curso de Especialização (Vigilancia Laboratorial em Saude Publica), São Paulo, 2019.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. Introdução à espectroscopia. 2º Ed trad ed. São Paulo: Cengage Learning, 2021.

PESTOVSKY, Y. S.; MARTÍNEZ-ANTONIO, A. SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES BY TETRACHLOROAUATE REDUCTION WITH CYCLODEXTRINS. **Química Nova**, 41, n. 8, p. 926-932, 2018.

PINTO, L. M. A. *et al.* Preparation and characterization of a synthetic curcumin analog inclusion complex and preliminary evaluation of in vitro antileishmanial activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Lavras, v. 589, n. 119764, p. 1-8, ago. 2020.

PINTO, L. M. A.; ADEOYE, O.; THOMASI, S. S.; FRANCISCO, A. P. *et al.* A single-step multicomponent synthesis of a quinoline derivative and the characterization of its cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Structure**, 1237, Aug 2021.

QUEVEDO, M. A.; ZOPPI, A. A. Current trends in molecular modeling methods applied to the study of cyclodextrin complexes, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.90, n.1, p.1-14, 2018.

RAKMAI, J. *et al.* Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: physicochemical characterization and evaluation of bio-efficacies, **CyTA - Journal of Food**, v.5, n.3, p.409-417, 2017.

RAMOS, Luciana M.; RODRIGUES, Marcelo O.; NETO, Brenno A. D. Mechanistic knowledge and noncovalent interactions as the key features for enantioselective catalysed multicomponent reactions: A critical review. **Organic and Biomolecular Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 31, p. 7260–7269, 2019. DOI: 10.1039/c9ob01088b.

RANPARIYA, Viren; TARPANA, Neha. A capacidade dos microrganismos de produzir antibióticos - uma revisão. **Jornal Mundial de Pesquisa Médica e Farmacêutica Atual** , p. 41-46, 2023.

REIMER, L. Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. New York: Springer, 1998.

ROGERIO, Kamilla Rodrigues; VITÓRIO, Felipe; KUMMERLE, Arthur Eugen; GRAEBIN, Cedric Stephan. Multicomponent reactions: A brief history and their versatility for the synthesis of biologically active molecules. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1934–1962, 2016. DOI: 10.21577/1984- 6835.20160132

ROMEIS, Emily *et al.* Treponema pallidum subsp. pallidum com um sistema de variação antigênica TprK artificialmente prejudicado é atenuado no modelo de sífilis em coelho. **PLoS Patógenos** , v. 3, pág. e1011259, 2023.

RYMDÉN, R.; CARLFORS, J.; STILBS, P. Substrate binding to cyclodextrins in aqueous solution: a multicomponent self-diffusion study. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 159-167, 1983

- SAFARI, S.; GHAVIMI, R.; RAZZAGHI-ASL, N.; SEPEHRI, S. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of dihydropyrimidine derivatives as potential anticancer agents. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 57, n. 3, p. 1023-1033, 2020.
- SAGHA, M.; MOUSAEI, F.; SALAHI, M.; RAZZAGHI-ASL, N. Synthesis of new 2-aminothiazolyl/benzothiazolyl-based 3,4-dihydropyrimidinones and evaluation of their effects on adenocarcinoma gastric cell migration. **Molecular Diversity**, 26, n. 2, p. 1039-1051, 2022.
- SANA, S.; TOKALA, R.; BAJAJ, D. M.; NAGESH, N. *et al.* Design and synthesis of substituted dihydropyrimidinone derivatives as cytotoxic and tubulin polymerization inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, 93, 2019.
- SANGI, Diego Pereira. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: O emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, [S. l.], v. 39, n. 8, p. 995–1006, 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20160089.
- SANTIAGO, J. A.; CARDOSO, M. G.; CRUZ, F. A.; PALMIERI, M. J.; SOUZA, R. V.; SOARES, L. I.; CAMPOS, J. M. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 515-20, 2017.
- SAOKHAM, Phennapha; MUANKAEW, Chutimon; JANSOOK, Phatsawee; LOFTSSON, Thorsteinn. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1–15, 2018. DOI: 10.3390/molecules23051161.
- SEBASTIAN, J.; RAGHAV, D.; RATHINASAMY, K. MD simulation-based screening approach identified tolvaptan as a potential inhibitor of Eg5. **Molecular Diversity**, 2022.
- SHEVTSOV, Alexandr *et al.* Whole genome sequence analysis of *Neisseria meningitidis* strains circulating in Kazakhstan, 2017–2018 **Plos um**, v. 17, n. 12, pág. e0279536, 2022.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J., & Bryce, D. L. (2014). Spectrometric identification of organic compounds. John wiley & sons.
- SINGH, R. *et al.* Characterization of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 2, n. 3, p. 171-183, Jan. 2010.
- SKALKO, N. *et al.* Nifedipine and nifedipine-cyclodextrin complexes in liposomes and microspheres. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 46, n. 2, p. 159- 168, Jan. 1996.
- SKOOG, Douglas A. *et al.* Fundamentos de química analítica. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- SOUZA, R. O. D. *et al.* The three-component biginelli reaction: a combined experimental and theoretical mechanistic investigation. **Chemistry—A European Journal**, Wiley Online Library, v. 15, n. 38, p. 9799–9804, 2009.
- SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, Budapest, v. 98, n. 5, p. 1743 – 1753, jan. 1998.
- SZENTE, Lajos; SZEJTLI, József. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 17–28, 1999. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00092-1.
- TABASSUM, S.; GOVINDARAJU, S.; PASHA, M. A. FeSO₄·7H₂O Catalyzed Rapid and Efficient One-Pot Multicomponent Synthesis of Functionalized Pyrazol-yl-pyrazolone

Methanes. **ChemistrySelect**, 2, n. 14, p. 4054-4057, 2017.
<https://doi.org/10.1002/slct.201700602>.

TANG, M.; SONG, Y.; LU, Y. L.; ZHANG, Y. M. *et al.* Cyclodextrin-Activated Porphyrin Photosensitization for Boosting Self-Cleavable Drug Release. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2022.

TANG, W.; ZOU, C.; DA, C.; CAO, Y. *et al.* A review on the recent development of cyclodextrin-based materials used in oilfield applications. **Carbohydrate polymers**, 240, p. 116321, 2020.

TORRES, L. H. *et al.* Characterization and cytotoxicity of a benzocaine inclusion complex, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.91, n.1-2, p.9-15, 2018.

VENCESLAU, A. F. A. *et al.* Cyclodextrins as effective tools to reduce the toxicity of atrazine, Energy, **Ecology and Environment**, v.3, p.81-86, 2017.

WADHWA, G. *et al.* Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.89, n.1-2, p.39–58, 2017.

WANKAR, Jitendra *et al.* Recent advances in host–guest self-assembled cyclodextrin carriers: Implications for responsive drug delivery and biomedical engineering. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 44, p. 1909049, 2020.

WU, L.; MA, X.; YANG, X.; ZHANG, C. Synthesis and biological evaluation of β -lapachone-monastrol hybrids as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 203, 2020.

ZHANG, Z.; YOU, Y.; HONG, C. Multicomponent Reactions and Multicomponent Cascade Reactions for the Synthesis of Sequence-Controlled Polymers. **Macromolecular Rapid Communications**, 39, n. 23, p. 1800362, 2018. <https://doi.org/10.1002/marc.201800362>.

ZHU, H.; CHEN, L.; BAI, R.; GU, Y. Acid-Catalyzed Synthesis of Diverse Indol-3-Yl-Substituted Tetrahydropyridines through Three-Component Reactions. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 364, n. 16, p. 2883-2888, 2022. <https://doi.org/10.1002/adsc.202200394>.

APÊNDICE A – Tratamentos estatísticos para o Teste de Germinação *in vitro*

Os resultados do teste de germinação *in vitro* utilizando o modelo *Lactuca sativa L*, foi expresso como média \pm desvio padrão das cinco replicatas. Para a análise dos dados, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), empregando o software GraphPad Prism, versão 8.02. Os resultados obtidos pelos testes estatísticos, se encontram na Tabela 8, 9,10 e 11, a seguir.

Tabela 8 - Resultados obtidos pelo teste índice de velocidade de germinação (IVG).

Teste de comparações múltiplas de Tukey	Diferença média	Intervalo de confiança de 95% de confiança	Significativo?	Resumo	Valor de P ajustado
β -CD vs. DHPM	-0,3000	-1,001 para 0,4009	Não	ns	0,6884
β -CD vs. CI 1:1	1,393	0,6925 para 2,094	Sim	*	0,0001
β -CD vs. CI 1:2	1,360	0,6591 para 2,061	Sim	*	0,0002
β -CD vs. H ₂ O	0,3300	-0,3709 para 1,031	Não	ns	0,6110
DHPM vs. CI 1:1	1,693	0,9925 para 2,394	Sim	*	<0,0001
DHPM vs. CI 1:2	1,660	0,9591 para 2,361	Sim	*	<0,0001
DHPM vs. H ₂ O	0,6300	-0,07086 para 1,331	Não	ns	0,0891
CI 1:1 vs. CI 1:2	-0,03333	-0,7342 para 0,6675	Não	ns	0,9999
CI 1:1 vs. H ₂ O	-1,063	-1,764 para -0,3625	Sim	*	0,0021
CI 1:2 vs. H ₂ O	-1,030	-1,731 para -0,3291	Sim	**	0,0029

Legenda: ns = não significativo

* = representa diferença significativa com 95% de confiança, em relação ao controle negativo (água ultrapura).

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 9 - Resultados obtidos pela taxa de germinação (% GR), através do Teste de Tukey.

Teste de comparações múltiplas de Tukey	Diferença média	Intervalo de confiança de 95% de confiança	Significativo?	Resumo	Valor de P ajustado
DHPM vs. β -CD	0,4000	-1,114 para 1,914	Não	ns	0,9304
CI 1:1 vs. β -CD	0,4000	-1,114 para 1,914	Não	ns	0,9304
CI 1:2 vs. β -CD	-0,4000	-1,914 para 1,114	Não	ns	0,9304
H ₂ O vs. β -CD	-0,4000	-1,914 para 1,114	Não	ns	0,9304
CI 1:1 vs. DHPM	0,000	-1,514 para 1,514	Não	ns	>0,9999
CI 1:2 vs. DHPM	-0,8000	-2,314 para 0,7140	Não	ns	0,5254
H ₂ O vs. DHPM	-0,8000	-2,314 para 0,7140	Não	ns	0,5254
CI 1:2 vs. CI 1:1	-0,8000	-2,314 para 0,7140	Não	ns	0,5254
H ₂ O vs. CI 1:1	-0,8000	-2,314 para 0,7140	Não	ns	0,5254
H ₂ O vs. CI 1:2	0,000	-1,514 para 1,514	Não	ns	>0,9999

Legenda: ns = não significativo

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 10 - Resultados obtidos pelo crescimento radicular, através do Teste de Tukey.

Teste de comparações múltiplas de Tukey	Diferença média	Intervalo de confiança de 95% de confiança	Significativo?	Resumo	Valor de P ajustado	
DHPM vs. β -CD	7,099	0,8201 para 13,38	Sim	*	0,0181	A-B
DHPM vs. CI 1:1	5,785	-0,4937 para 12,06	Não	ns	0,0864	A-C
DHPM vs. CI 1:2	5,425	-0,8542 para 11,70	Não	ns	0,1249	A-D
DHPM vs. H ₂ O	4,807	-1,472 para 11,09	Não	ns	0,2193	A-E
β -CD vs. CI 1:1	-1,314	-7,593 para 4,965	Não	ns	0,9781	B-C
β -CD vs. CI 1:2	-1,674	-7,953 para 4,605	Não	ns	0,9476	B-D
β -CD vs. H ₂ O	-2,292	-8,571 para 3,987	Não	ns	0,8512	B-E
CI 1:1 vs. CI 1:2	-0,3605	-6,639 para 5,918	Não	ns	0,9999	C-D
CI 1:1 vs. H ₂ O	-0,9778	-7,257 para 5,301	Não	ns	0,9928	C-E
CI 1:2 vs. H ₂ O	-0,6173	-6,896 para 5,662	Não	ns	0,9988	D-E

Legenda: ns = não significativo

* = representa diferença significativa com 95% de confiança, em relação ao controle negativo (água ultrapura).

Fonte: Do autor (2024).

Tabela 11 - Resultados obtidos pelo crescimento da parte aérea, através do Teste de Tukey.

Teste de comparações múltiplas de Tukey	Diferença média	Intervalo de confiança de 95% de confiança	Significativo?	Resumo	Valor de P ajustado	
DHPM vs. β -CD	0,09700	-2,878 para 3,072	Não	ns	>0,9999	A-B
DHPM vs. CI 1:1	1,913	-1,062 para 4,887	Não	ns	0,3914	A-C
DHPM vs. CI 1:2	2,066	-0,9091 para 5,040	Não	ns	0,3123	A-D
DHPM vs. H ₂ O	-0,9276	-3,928 para 2,073	Não	ns	0,9129	A-E
β -CD vs. CI 1:1	1,816	-1,159 para 4,790	Não	ns	0,4457	B-C
β -CD vs. CI 1:2	1,969	-1,006 para 4,943	Não	ns	0,3614	B-D
β -CD vs. H ₂ O	-1,025	-4,025 para 1,976	Não	ns	0,8794	B-E
CI 1:1 vs. CI 1:2	-0,1529	-2,822 para 3,128	Não	ns	>0,9999	C-D
CI 1:1 vs. H ₂ O	-2,840	-5,840 para 0,1600	Não	ns	0,0729	C-E
CI 1:2 vs. H ₂ O	-2,993	-5,993 para 0,007100	Não	ns	0,0509	D-E

Legenda:

ns = não significativo

Fonte: Do autor (2024).