



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica

Dissertação de Mestrado

***“Novas Propostas para o Estudo de
Mecanismos de Reações Orgânicas por
Espectrometria de Massas”***

Vanessa Gonçalves dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Campinas, Fevereiro de 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Sa59n	Santos, Vanessa Gonçalves dos. Novas propostas para o estudo de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas / Vanessa Gonçalves dos Santos. -- Campinas, SP: [s.n], 2011. Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin. Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Monitoramento de reações. 2. Reação de <i>Hantzsch</i>. 3. Efeito Venturi. 4. Espectrometria de massas ambiente. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	--

Título em inglês: New approaches for reaction mechanism monitoring by mass spectrometry

Palavras-chaves em inglês: Reaction monitoring, Hantzsch reaction, Venturi effect, Ambient mass spectrometry

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (orientador), Prof. Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza (IQ-UFRJ), Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 18/02/2011

“Não se deve dar ouvidos àqueles que aconselham ao homem, por ser mortal, que se limite a pensar coisas humanas e mortais, ao contrário, porém, à medida do possível, precisamos nos comportar como imortais e tudo fazer para viver segundo a parte mais nobre que há em nós”

(Aristóteles)

À mamãe Maria e ao papai Joaquim dedico esta dissertação como parte de um trabalho que me empenho a fazer todos os dias para que no nosso reencontro eu possa ver em seus olhos um pouco do orgulho que sinto por vocês.

Ao Henrique, meu amado, dedico esta dissertação em agradecimento por tornar minha vida tão especial quanto ela pode ser.

Agradecimentos

À tia Hilda, tio Zé, Cris, vovó Onofra e a todas as pessoas especiais da minha família. Obrigada pelo apoio nos momentos em que eu mais precisei.

Ao Beto, pelo amor sincero que consegue arrancar sorrisos com uma única lambida.

Aos meus grandes amigos Ayane e Ge por torcer por mim e pela amizade sincera que eu quero conservar para sempre.

Aos meus amigos da química 04, pelas incontáveis manhãs de sono e noites de estudo que passamos juntos, vocês são pessoas muito especiais e estarão sempre presentes na minha vida. Saudades.

Às minhas amigas da EMS: Thais, Paty Pissolati e Pati Braga, Camards, Gi, Dani e Carol. Obrigada por todo incentivo. Eu aprendi muito com vocês.

Aos meus amigos da família ThoMSon que conseguem transformar cada dia de trabalho em uma grande diversão. À Núbia, a fada madrinha, por toda ajuda e apoio. E em especial à equipe de estudos de mecanismos de reação: Boniek, Thais e Marla, este trabalho é nosso.

Ao Prof. Marcos N. Eberlin pela orientação e por conseguir transmitir tão bem um amor contagioso pela espectrometria de massas.

Ao instituto de química da UNICAMP e a CPG por todo apoio para a realização deste mestrado e ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Prof. Simon J. Garden e ao Prof. Rodrigo O. M. A. de Souza pelas amostras cedidas e pela grande contribuição para realização deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Coelho e a Dra. Regina Sparrapan pelas contribuições no exame de qualificação.

E a Deus, o meu agradecimento especial, pelas pessoas maravilhosas que Ele tem colocado no meu caminho.

“Em todas as coisas somos mais vencedores pela virtude daquele que nos amou. Pois estou persuadido de que nem a morte, nem a vida, nem os anjos nem os principados, nem o presente nem o futuro, nem as potestades, nem as alturas nem os abismos, nem outra qualquer criatura nos poderá separar do amor que Deus nos testemunha em Cristo Jesus nosso senhor”
(*Romanos 8, 35-39*)

Vanessa Gonçalves dos Santos

Formação Acadêmica

- 2009 –2011** Mestrado em Química Orgânica.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
Campinas, Brasil.
Título: Novas Propostas para o Estudo de Mecanismos de
Reações Orgânicas por Espectrometria de Massas.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico (CNPq).
- 2004 - 2008** Graduação: Bacharelado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
Campinas, Brasil.
- 2002 - 2003** Curso técnico/profissionalizante em Bioquímica .
Escola Técnica Estadual "Conselheiro Antônio Prado",
Campinas, Brasil.

Atuação Profissional

- 2007 - 2009** Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional:
Pesquisador/ Supervisor de Projetos, Carga horária: 41,
Regime: Dedicação exclusiva.
Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas, IIPF,
Brasil.

Iniciação Científica

- 2006 –2007** Área: Química Orgânica
Título: Estudos Visando a Síntese da Antimicina A3.
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico (CNPq).

2005 –2006

Área: Bioquímica

Título: Alvos Moleculares para o Estudo da Indução de Apoptose em Células Leucêmicas pela Riboflavina.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Produção Científica

Publicações em Revistas Indexadas:

- ❖ Regiani, Thais, **Santos, Vanessa G.**, Godoi, Marla. N., Vaz, Boniek G., Eberlin Marcos. N., Coelho, Fernando. On the Mechanism of the Aza-Morita-Baylis-Hillman Reaction: Interception of a Unique New Intermediate. *Chemical Communication*, aceito para publicação.
- ❖ **Santos, Vanessa G.**, Regiani, Thais., Dias, Fernanda. F. G., Romão, Wanderson., Jara, Jose. L. P., Klitzke, Clécio. F., Coelho, Fernando., Eberlin, Marcos. N. Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization. *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, 1375-1380.
- ❖ Gonçalves, Renato S., Abdelnur, Patrícia V., **Santos, Vanessa G.**, Simas, Rosineide C., Eberlin, Marcos N., Magalhães, Alviclér, Pérez González, Eduardo R. Synthesis of Potentially Bioactive PABA-Related N-(aminoalkyl)lactamic Amino Acids and Esters Via Selective SNAr Reactions. *Amino Acids*. **2011**, 40, 197-204.
- ❖ Camargo, Maryene A., Neves, Ademir, Bortoluzzi, Adailton J., Szpoganicz, Bruno, Fischer, Franciele L., Terenzi, Hernan, Serra, Osvaldo A., **Santos, Vanessa G.**, Vaz, Boniek G., Eberlin, Marcos N. Efficient Phosphodiester Hydrolysis by Luminescent Terbium(III) and Europium(III) Complexes. *Inorganic Chemistry*. **2010**, 49, 6013–6025.

Trabalhos Apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais:

- ❖ **Vanessa G. dos Santos**; Boniek G. Vaz; Rodrigo O. M. A. de Souza; Simon J. Garden; Marcos N. Eberlin. *Charged-Reagents for Mechanism Studies of Organic Reactions by ESI-MS/MS – Insights into the Hantzsch reaction*. in: 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, **2010**, Salt Lake City, Utah - USA. Poster ThP618.
- ❖ **Vanessa G. Santos**; Boniek G. Vaz; Maryene A. Camargo; Ademir Neves; Marcos N. Eberlin. *Studies of Lanthanides Complexes Behavior in Solution Towards Mechanistic Elucidation in Diester Hydrolysis Through ESI-MS..* in: III BrMASS, **2009**, Campinas, SP - Brasil.

- ❖ **Vanessa G. Santos**; Ilton B. D. De Castro; Ronaldo A. Pilli. *A Simple Route to Blastmycinone Main Core.* in: 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, **2007**, Itapema, SC - Brasil. Book of Abstracts of 12th BMOS , **2007**, abstract PS231.

- ❖ **Vanessa. G. Santos**; Ana C. S. Souza; Carmen, V. Ferreira. *Alvos moleculares do estudo da indução da apoptose de células leucêmicas pela riboflavina.* In: IV Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, **2006**, Campinas - SP. Caderno de resumos do *IV Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp* - Resumo B0242, 2006. p. 85-85.

- ❖ Ana C. S. Souza; **Vanessa G. Santos**; Hiroshi, Aoyama; Carmen V. Ferreira; Eneida de Paula; Marcelo B. de Jesus. *Flavins-induced cell cycle arrest and apoptosis of human myeloid leukemia cells.* In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, **2005**, Águas de Lindóia - SP. Livro de resumos da *XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq*, **2005**. p. 79-79.

Atividades Complementares

2010	Programa de Estágio Docente (PED) Disciplina: QO622 – Química Orgânica Experimental (IQ-UNICAMP)
2007	Programa de Apoio Didático (PAD) Disciplina: QG102 – Química Geral Experimental (IQ-UNICAMP)

Índice Geral

	Página
Resumo	xix
Abstract	xxi
Lista de Esquemas	xxiii
Lista de tabelas	xxiv
Lista de Figuras	xxv
Capítulo I: Espectrometria de massas aplicada a estudos de mecanismos de reações	1
1.1 Introdução Geral	1
1.1.1 Métodos para o estudo de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas.	3
1.1.2 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS).	4
Objetivos Gerais	7
Capítulo II: Desenvolvimento e Aplicações da fonte de ionização <i>Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization</i> (V-EASI)	9
2.1 Introdução	9
2.1.1 Espectrometria de massas ambiente.	9
2.2 Objetivos Específicos	12
2.3 Parte Experimental	12
2.4 Resultados e Discussão	13
2.4.1 Desenvolvimento e aplicação da fonte de ionização V-EASI.	13
2.5 Conclusão	23
Capítulo III: Reagentes marcados com “etiqueta” de carga aplicados ao estudo do mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch	25
3.1 Introdução	25
3.1.1 Reagentes marcados com “etiqueta” de carga e sua aplicação em estudos de mecanismos de reações por espectrometria de massas.	25
3.1.2 A reação de Hantzsch	26

3.2	Objetivos Específicos	32
3.3	Parte Experimental	33
3.3.1	Experimentos realizados por ionização por ESI	33
3.3.2	Procedimento experimental para a reação de Hantzsch	33
3.4	Resultados e Discussão	34
3.4.1	Estudo mecanístico da reação multicomponente de Hantzsch por espectrometria de massas	34
3.4.1.1	Reagentes não marcados com “etiqueta” de carga empregados no estudo da reação de Hantzsch.	35
3.4.1.2	Reagentes marcados com “etiqueta” de carga (iodeto de <i>p</i> -trimetilamônio acetoacetamida e iodeto de <i>p</i> -trimetilamôniobenzaldeído) empregados no estudo da reação de Hantzsch	55
3.5	Conclusão	79
Capítulo IV: Reagentes Marcados com “Etiqueta” de Carga Aplicados ao Estudo <i>On-line</i> do Mecanismo da Reação Multicomponente de Hantzsch por V-EASI-MS		82
4.1	Introdução	82
4.1.1	A Espectrometria de massas ambiente e o estudo de mecanismos de reações	82
4.2	Objetivos Específicos	83
4.3	Parte Experimental	83
4.4	Resultados e Discussão	86
4.4.1	Reagentes marcados com “etiqueta” de carga aplicados ao monitoramento <i>on-line</i> da reação multicomponente de Hantzsch por V-EASI(+)-MS	86
4.5	Conclusão	88
Conclusão Geral		89

Resumo

Um estudo de mecanismo de reação, seja ele por espectrometria de massas ou por outras técnicas, deve garantir que as propostas estejam o mais próximo possível do mecanismo da reação estudada. Para isso o estudo deve reproduzir as condições experimentais para esta reação com a mínima interferência, deste modo, o uso de aditivos (sejam eles ácidos ou básicos) para protonar ou desprotonar os intermediários de reação podem perturbar o caminho reacional ou mesmo o equilíbrio da reação em estudo. Além disso, o favorecimento de uma espécie em relação as demais, de acordo com a afinidade por prótons, pode dificultar a detecção de alguns dos intermediários de interesse, prejudicando assim a interpretação do mecanismo. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo propor novas metodologias para o estudo de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas, de forma buscar soluções e contornar problemas inerentes da técnica. No presente trabalho, foi avaliado a utilização de reagentes carregados, (não ácidos e não básicos) não sendo necessário, neste caso, o uso de aditivos, uma vez que todos os intermediários irão carregar uma “etiqueta” de carga que facilita sua detecção por espectrometria de massas. Estes reagentes marcados foram utilizados no estudo do mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch. Além disso, uma nova fonte de ionização ambiente foi desenvolvida com o propósito de facilitar estudos *online* de mecanismos reacionais, a qual se mostrou útil sendo útil não apenas para monitorar o andamento da reação, mas também para um estudo mais detalhado do mecanismo, permitindo a detecção de intermediários transientes presentes no meio reacional que são de extrema importância para a elucidação do mecanismo da reação. Por fim, a nova fonte foi empregada no estudo *online* da reação multicomponente de Hantzsch de forma a avaliar cineticamente o mecanismo anteriormente estudado por ESI-MS(/MS).

Abstract

A study of reaction mechanisms, either by mass spectrometry or by another technique, should ensure that proposals are similar the possible mechanism of the reaction studied. For this study should accurately reproduce the experimental conditions for this reaction with minimal interference. Thereby, using additives (acids or basics) to protonated or deprotonated the intermediates in solution can disturb the reaction path or even the equilibrium of the reaction studied. Moreover, the encouragement of a species in relation to others, according to the affinity for protons, may hinder the detection of some of the intermediate of interest, thus hampering interpretation of the mechanism. This dissertation aims to propose new methodologies for studying the mechanisms of organic reactions by mass spectrometry, in order to seek solutions and to get over problems inherent in the technique. Thus, a new ionization source was developed aiming to became possible online mechanisms studies, this new source could be useful not only to monitor the progress of the reaction but also for a more detailed study of the mechanism, allowing the transient intermediates detection on solution, which are important to mechanism elucidation. Moreover, this source was applied in the analysis of commercial samples like drugs, alcoholics drinks and crude oil, in order to show its efficacy either to pure samples and complex matrices. Our work proposes also the use of charged tags in order to perform analysis without additives (acids or basics), since all intermediates are charged, making it easy its detection by mass spectrometry. These charged tags are going to be used in the investigation concerning the multicomponent Hantzsch reaction.

Lista de Esquemas

	Página
Esquema 1: Representação esquemática geral para a reação multicomponente de Hantzsch.	27
Esquema 2: Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a reação multicomponente de Hantzsch	30
Esquema 3: Reação entre acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio.	37
Esquema 4: Representação esquemática dos possíveis caminhos laterais que se encontram em equilíbrio no decorrer da RMC de Hantzsch utilizando benzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio.	43
Esquema 5: Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a reação multicomponente de Hantzsch mostrando em destaque as espécies detectadas por ESI(+)-MS utilizando benzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio.	46
Esquema 6: Reação entre o 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila, acetato de amônio e benzaldeído.	48
Esquema 7: Representação esquemática dos possíveis caminhos laterais que se encontram em equilíbrio no decorrer da RMC de Hantzsch utilizando benzaldeído, 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila e acetato de amônio.	49
Esquema 8: Reações multicomponente de Hantzsch estudadas utilizando reagentes marcados com a “etiqueta de carga”.	58

Esquema 9: Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a reação multicomponente de Hantzsch mostrando em destaque as espécies detectadas por ESI(+)-MS utilizando iodeto de *p*-trimetilamonio benzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio na reação de Hantzsch conduzida em etanol a 60°C. 66

Esquema 10: Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a reação multicomponente de Hantzsch mostrando em destaque as espécies detectadas por ESI(+)-MS utilizando iodeto de *p*-trimetilamonio acetoacetamida e/ou acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio na reação de Hantzsch conduzida em etanol a 60°C e em acetonitrila a temperatura ambiente. 73

Esquema 11: Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a reação multicomponente de Hantzsch mostrando em destaque as espécies detectadas por ESI(+)-MS utilizando iodeto de *p*-trimetilamonio acetoacetamida, iodeto de *p*-trimetilamonio benzaldeído e acetato de amônio na reação de Hantzsch conduzida em etanol a 60°C. 78

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1: Razão massa carga das espécies envolvidas no mecanismo da reação de Hantzsch. São mostrados as <i>m/z</i> das moléculas protonadas.	36
Tabela 2: Razão massa carga das espécies envolvidas no mecanismo da reação de Hantzsch.	56

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Representação esquemática de um reator para monitoramento <i>on-line</i> de reações	4
Figura 2: Ilustração esquemática de uma fonte de ionização por electrospray mostrando os principais mecanismos de transferência de íons para a fase gasosa.	6
Figura 3: Estrutura dos reagentes contendo a “etiqueta” de carga, utilizados neste trabalho.	7
Figura 4: A) Design clássico do Efeito Venturi; B) Design do V-EASI combinando o auto-bombeamento causado pelo Efeito Venturi e a ionização por <i>sonic spray</i> . C) Perfil do sinal medido por <i>total ion current</i> (TIC) de uma solução de cocaína em metanol acidificado.	15
Figura 5: Modo duplo de operação do V-EASI. (A) V_L -EASI(+) para uma solução de 30 ngmL ⁻¹ de sildenafil em metanol acidificado; (B) V_S -EASI(+) para um comprimido de sildenafil usando metanol acidificado como o solvente para o spray.	18
Figura 6: A) V-EASI(+)-MS de uma solução 30 µg mL ⁻¹ de cocaine em metanol 0,1% de ácido fórmico. B) V-EASI(+)-MS de uma solução 50 µg mL ⁻¹ de PEG 600 em metanol 0,1% de ácido fórmico. C) V-EASI(-)-MS de cachaça diluída 1:100 em metanol 0,1% de hidróxido de amônio. D) V-EASI(+)-MS de uma solução 100 µg mL ⁻¹ de petróleo em metanol 0,1% de ácido fórmico: tolueno (solução 1:1). E) Íons característicos encontrados em amostras de cachaça envelhecida em cascos de Amburana.	19
Figura 7: V-EASI(+)-MS de macromoléculas biológicas em água acidificada. A) Peptídeo sintético FSDGLK a 150 µg mL ⁻¹ . B)	21

Mioglobina de coração de cavalo a 1 mg mL^{-1} **C)** Citocromo C de coração de cavalo a 1 mg mL^{-1} . Os espectros deconvoluídos foram inseridos em cada espectro original.

Figura 8. Representação esquemática da técnica V-EASI-MS aplicado diretamente na análise de uma reação em andamento. 22

Figura 9: Espectro da RMC de Hantzsch empregando benzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio (reagentes não marcados). (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação. 39

Figura 10: (A) Espectro de MS/MS do produto de Hantzsch. (B) Espectro de MS/MS do produto de Hantzsch aromatizado. 40

Figura 11: Espectros de MS/MS do íon de m/z 348. (A) Após 30 minutos de reação. (B) Após 5 horas de reação. (C) Após 120 horas de reação. 41

Figura 12: Espectros de MS/MS atribuído aos intermediários formados devido ao excesso de reagentes disponíveis no meio reacional. (A) composto **22(acf)**. (B) composto **27(acf)**. 44

Figura 13: Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch. (A) intermediário **1(afii)**. (B) intermediário **6(acfii)**. (C) intermediário **16(af)**. 47

Figura 14: Espectro da RMC de Hantzsch empregando benzaldeído, 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila e acetato de amônio (reagentes não marcados). (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 6 dias de reação. 50

Figura 15: Espectros de MS/MS atribuídos aos intermediários formados devido ao excesso de reagentes disponíveis no meio reacional. (A) composto **46(c)**. (B) composto **45(c)**. (C) composto **44(c)**. (D) composto **22(acgii)**. (E) composto **23(acg)**. 51

- Figura 16:** Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch (A) intermediário **46(acg)**. (B) complexo formado pelos intermediários **11/12(acg)** e **46(acg)**. 53
- Figura 17:** Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch (A) intermediário **11/12(acg)**. (B) intermediários **13/14(acg)** ou **15(acg)**. (C) intermediários **5(acg)** ou **21(acg)**. 54
- Figura 18:** Reações estudadas utilizando o iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído (reagente marcado com “etiqueta de carga”), acetoacetato de etila e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação. 59
- Figura 19:** Ampliação do espectro obtido após 120 minutos de reação utilizando o iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído (reagente marcado com “etiqueta de carga”), acetoacetato de etila e acetato de amônio. 61
- Figura 20:** Espectro de MS/MS do íon de m/z 405. 62
- Figura 21:** Espectro de MS/MS do íon de m/z 423. 63
- Figura 22:** Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch utilizando reagente marcado. (A) produto de Hantzsch **4(adf)**. (B) aduto de Knoevenagel **5(adfi)**. (C) produto de Knoevenagel **6(adfi)**. (D) composto **22(adfii)** dicarregado. 64
- Figura 23:** Reações estudadas utilizando o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (reagente marcado com “etiqueta” de carga), acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação. (D) Reação conduzida em acetonitrila e temperatura ambiente após 24 horas. 68
- Figura 24:** Espectro de MS/MS do produto de Hantzsch **4abcf**. 69

- Figura 25:** Reação estudada utilizando o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (reagente marcado com “etiqueta” de carga), benzaldeído e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação. 71
- Figura 26:** A) Espectro da reação de Hantzsch empregando o iodeto de *p*-trimetilamonio acetoacetamida, iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído e acetato de amônio. Reação feita em etanol a 60°C, espectro da reação após 60 minutos. 74
- Figura 27:** Reação de Hantzsch empregando o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida, iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído (reagentes marcados com “etiqueta” de carga) e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação. 75
- Figura 28:** Ampliação do espectro obtido após 120 minutos de reação mostrando a modificação do perfil do íon de m/z 199 inicialmente dicarregado (intermediário **5bdf**) e ao final tricarregado (produto de Hantzsch **4bdf**). 76
- Figura 29:** Ampliação do espectro obtido após 48 horas de reação mostrando os intermediários tricarregados presentes em três diferentes vias mecanísticas da reação multicomponente de Hantzsch. 77
- Figura 30:** Monitoramento *online* da reação multicomponente de Hantzsch por V-EASI-MS. 85
- Figura 31:** Curva cinética obtida por V_L-EASI(+)-MS para o monitoramento da solução reacional da reação multicomponente de Hantzsch. 87

Capítulo I: Espectrometria de massas aplicada a estudos de mecanismos de reações

1.1 Introdução Geral

O entendimento acerca dos diversos fatores estéricos e eletrônicos, que ocorrem em nível molecular e direcionam a combinação de reagentes enquanto estes são transformados em produtos, mostra-se de extrema importância para um melhor controle e aperfeiçoamento de uma reação química. Entretanto, entender de forma completa o caminho pelo qual uma reação ocorre, nem sempre é uma tarefa fácil. De modo geral os mecanismos de reações podem ser propostos com base na reatividade dos compostos químicos envolvidos. Porém, frequentemente mais de um caminho pode ser proposto para uma mesma reação, gerando complexidade na elucidação do mecanismo.

Existem atualmente várias técnicas pelas quais pode-se estudar uma dada proposta mecanística. Dentre elas pode-se citar a ressonância magnética nuclear (RMN)¹ que vem sendo, há muitos anos, empregada tanto para caracterização de intermediários chave (isolados do meio reacional ou identificados na mistura reacional por meio de sinais característicos), bem como para estudos cinéticos possibilitando a avaliação direta da real participação de um dado reagente no mecanismo da reação.

Outra técnica bastante empregada é o uso de cálculos teóricos² que preveem a energia total de possíveis estados de transição envolvidos em uma dada proposta mecanística, além de avaliar energeticamente a formação de intermediários, o que, somado a dados experimentais, possibilita a comprovação ou a proposta de um mecanismo plausível.

¹a) Szendi, Z.; Forgo, P.; Tasi, G.; Bocskai, Z.; Nyerges, L.; Sweet, F. *Steroids* **2002**, 67, 31. b) van der Eide, E. F.; Piers, W. E. *Nature Chem.* **2010**, 2, 571.

² Li, X.; Guan, J.; Zheng, A.; Zhou, D.; Han, X.; Zhang, W.; Bao, X. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2010**, 330, 99.

Temos ainda, como uma opção para estudos de mecanismos reacionais a avaliação das perturbações cinéticas causadas por substituições isotópicas em moléculas de interesse no mecanismo, avaliando assim sua influência na reação global.³

Entretanto, técnicas que fazem uso de mudanças espectroscópicas ou eletroquímicas no meio reacional embora tragam valiosas informações a cerca de um mecanismo, mostram-se em certas situações, incapazes de elucidar estruturalmente intermediários reacionais em uma mistura reacional em andamento.⁴ Neste contexto, a espectrometria de massas apresenta-se como uma ferramenta extremamente rápida, capaz de interceptar e caracterizar estruturalmente intermediários transientes, mesmo em uma mistura reacional complexa.

O grande avanço da espectrometria de massas, dirigida pelo desenvolvimento dos métodos de Ionização a Pressão Atmosférica (API – *Atmospheric Pressure Ionization*), como Ionização por Electrospray (ESI – *Electrospray Ionization*)⁵, Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)⁶ e Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI – *Atmospheric Pressure Photoionization*),⁷ viabiliza a investigação direta de reações químicas em solução, tornando possível a detecção e estudo não apenas de reagentes e produtos de reações, mas também de intermediários transientes, dando luz a investigações dos mecanismos de reações.

O sucesso da aplicação da espectrometria de massas para elucidar ou ajudar a consolidar propostas de mecanismos de reações orgânicas pode ser vista em diversos trabalhos, nos quais várias reações clássicas da química orgânica

³ Monnat, F.; Vogel, P.; Sordo, J. A. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 712.

⁴ Ma, X.; Zhang, S.; Lin, Z.; Liu, Y.; Xing, Z.; Yang, C.; Zhang, X. *Analyst* **2009**, *134*, 1863.

⁵ Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64.

⁶ Horning, E. C.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Haegele, K. D.; Hornining, M. G.; Stillwell, R. N. *J. Chromatogr. Sci.* **1974**, *12*, 725.

⁷ a) Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3653. b) Kauppila, T. J.; Kuuranne, T.; Meurer, E. C.; Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5470.

foram estudadas, tais como as reações de substituição nucleofílica,⁸ cicloadição de Diels-Alder,⁹ reação de Wittig,¹⁰ adição de Michael,¹¹ condensação de Kolbe,¹² reação de Cannizzaro,¹³ reação de Claisen-Schmidt,¹⁴ Morita-Baylis-Hillman,¹⁵ Biginelli,^{15d} Tebbe,¹⁶ Heck¹⁷ e Stille¹⁸.

1.1.1 Métodos para o estudo de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas.

Para um melhor entendimento acerca dos experimentos que podem ser conduzidos em um estudo de mecanismos de reações por espectrometria de massas é possível classificar o monitoramento desta reação de duas maneiras: monitoramento *on-line* e *off-line*.¹⁹ O monitoramento *off-line* será, neste contexto, definido como o acompanhamento da reação em intervalos pré-definidos de tempo. Este acompanhamento pode se dar pela adição gradual dos reagentes, tentando interceptar os intermediários formados em cada etapa, ou pelo

⁸ a) Bowie, J. H. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 76. b) Riveros, J. M.; Jose, S. M.; Takashima, K. *Adv. Gas Phase Ion Chem.* **1985**, *21*, 197. c) DePuy, C. H.; Gronert, S.; Mullin, A.; Bierbaum, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8650. d) Gozzo, F. C.; Ifa, D. R.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3920. e) Davico, G. E.; Bierbaum, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1740. f) Girollo, T.; Xavier, L. A.; Riveros, J. M. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2004**, *43*, 3588.

⁹ a) Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9226. b) Eberlin, M. N. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *235*, 263. d) Bouchoux, G.; Nguyen, M. T.; Salpin, J. Y. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 5778.

¹⁰ a) Johlman, C. L.; Ijames, C. F.; Wilkins, C. L.; Morton, T. H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2628. b) Lum, R. C.; Grabowski, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7823.

¹¹ a) McDonald, R. N.; Chowdhury, A. K.; Setser, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6491. b) DePuy, C. H.; Van Doren, J. M.; Gronert, S.; Kass, S. R.; Motell, E. L.; Ellison, G. B.; Bierbaum, V. M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1846.

¹² Shen, J.; Evans, C.; Wade, N.; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9762.

¹³ Sheldon, J. C.; Bowie, J. H.; Dua, S.; Smith, J. D.; O'Hair, R. A. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3931.

¹⁴ Hass, G. W.; Gross, M. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 82.

¹⁵ a) Amarante, G.W.; Milagre, H. M. S.; Vaz, B. G.; Ferreira, B. R. V.; Eberlin M. N.; Coelho, F. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 3031. b) Santos, L. S.; Neto, B. A. D; Consorti, C. S.; Pavan, C. H.; Almeida, W.P.; Coelho, F.; Dupont, J.; Eberlin, M. N. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *11*, 731. c) Santos, L.S.; Pavan, C. H.; Almeida, W.P.; Coelho, F.; Eberlin, M. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *33*, 4330. d) De Souza, R. O. M. A.; da Penha E. T.; Milagre, H. M. S.; Garden, S. J.; Esteves, P. M. Eberlin, M. N.; Antunes, O. A. C. *Chem. Eur. J. CHEMISTRY-A EUROPEAN JOURNAL*

¹⁶ Meuer, E. C.; da Rocha, L. L.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2006**, *17*, 2626.

¹⁷ a) Santos, L. S.; Rosso, G. B.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. *J. Org. Chem.* **2007**, *15*, 5809.

¹⁸ Sabino, A. A.; Machado, A. H. L.; Correia, C. R. D.; Eberlin, M. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *19*, 2514.

¹⁹ Santos, L. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2*, 235.

monitoramento da formação dos produtos durante o progresso da reação. Alíquotas do meio reacional são retiradas e diluídas em um solvente apropriado para serem injetadas diretamente no espectrômetro de massas. A detecção do intermediários depende da concentração dos mesmos no meio reacional e de seus tempos de vida.

Como monitoramento *on-line* consideraremos a aquisição dos espectros de massas realizada simultaneamente ao andamento da reação, que ocorre por exemplo, em um reator diretamente acoplado ao espectrômetro de massas, conforme mostra a **Figura 1**. O monitoramento *on-line* possibilita a caracterização de produtos instáveis de intermediários reativos com tempo de vida de milissegundos. Este método é empregado em reações bicomponentes extremamente rápidas, uma vez que as soluções reagentes são injetadas no espectrômetro de massas no momento em que uma entra em contato com a outra. Podemos observar através do exposto na **Figura 1** que além do uso do microreator são necessárias duas bombas de infusão para impulsionar ambas as soluções que reagirão dentro do microreator.

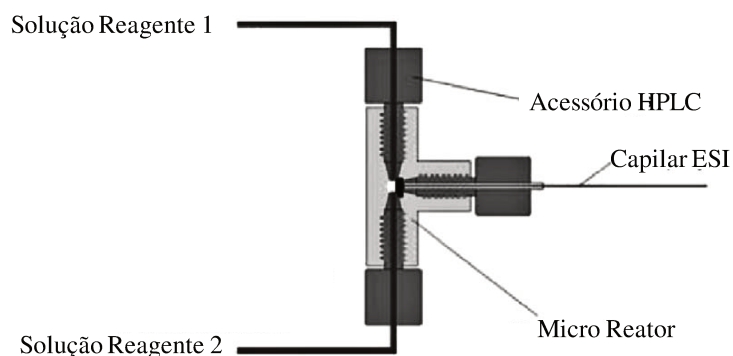


Figura 1: Representação esquemática de um micro reator para monitoramento *on-line* de reações.

1.1.2 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS).

O tremendo sucesso e amplo uso da ionização por electrospray resultam, principalmente, de sua habilidade em transferir íons, de massa molecular quase ilimitada, do ambiente de uma solução real diretamente para a fase gasosa de

maneira branda e eficiente, o que possibilita a caracterização desses íons com espetacular rapidez. Deste modo, interações e/ou ligações fracas, tais como ligações de hidrogênio, são preservadas na passagem da fase condensada para fase gasosa, o que é de grande valia para o mapeamento de caminhos reacionais.

Em ESI moléculas de baixa ou alta massa molecular, alta polaridade e complexidade estrutural são facilmente analisadas por espectrometria de massas. Para explicar a liberação dos íons a partir das gotículas carregadas, existem duas propostas, o Modelo de Cargas Residuais (MCR) e o Modelo da Dessorção dos Íons (MDI) mostrados em detalhe na **Figura 2**. O MCR propõe que as gotículas carregadas saem da ponta do capilar num spray de formato cônico (cone de Taylor) e com o auxílio de um fluxo de gás aquecido (N_2), as gotículas carregadas com várias unidades de carga sofrem a evaporação do solvente. A redução no tamanho e conseqüentemente o aumento da densidade de carga torna a repulsão entre as cargas maior que a tensão superficial. Este efeito faz com que as gotículas se desintegrem em gotículas ainda menores e o mesmo processo pode ser repetido até que o solvente seja evaporado por completo, restando apenas os íons da amostra.

O MDI propõe que o aumento da densidade superficial de carga devido à evaporação do solvente cria um campo superficial que supera as forças de solvatação dos íons antes de exceder a tensão superficial do solvente, causando a ejeção do íon antes da explosão coulômbica. Estes mecanismos favorecem a formação de íons multiplamente carregados, característica que pode ser utilizada na determinação de macromoléculas.²⁰

²⁰ Paul Kebarle, P.; Verkerk, U. H. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, 28, 898.

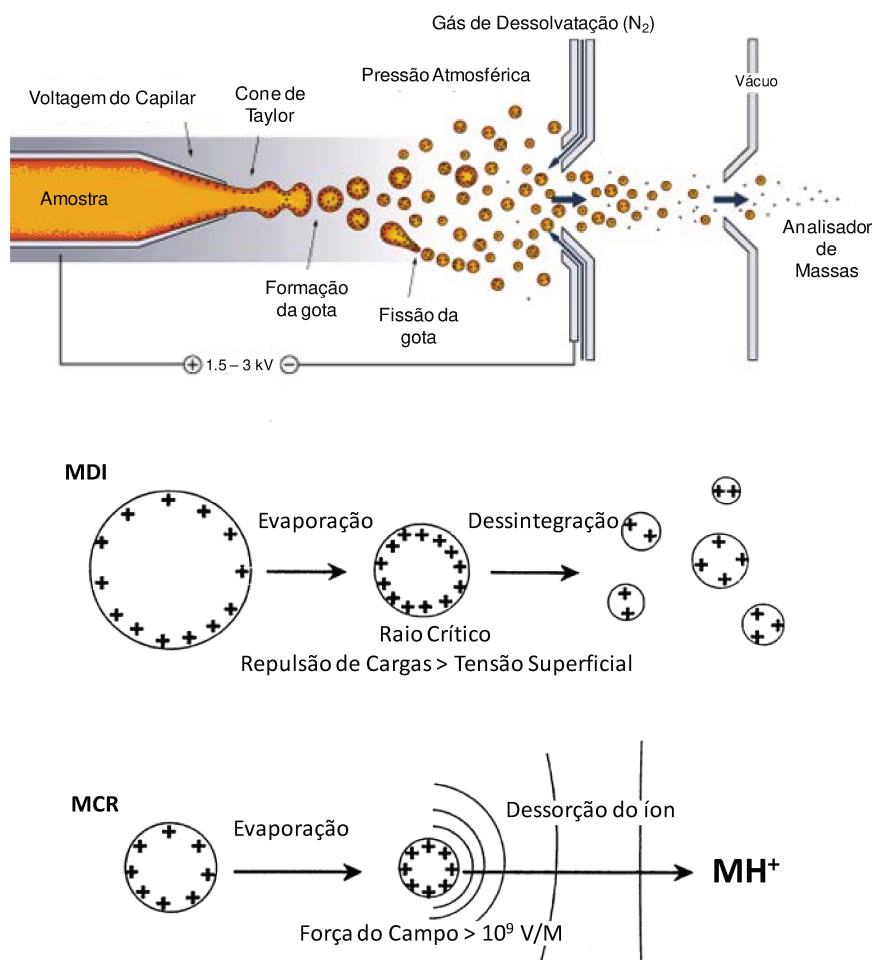


Figura 2. Ilustração esquemática de uma fonte de ionização por electrospray mostrando os principais mecanismos de transferência de íons para a fase gasosa.

Conforme mencionado anteriormente, no processo de ionização por electrospray a amostra, é ionizada em solução, e transferida diretamente para a fase gasosa através de um processo brando. Entretanto, para favorecer a formação destes íons em solução faz-se necessário um controle no pH da amostra analisada, favorecendo a protonação/desprotonação das espécies de interesse. Utiliza-se comumente a adição de ácido fórmico (em análises em modo positivo) ou hidróxido de amônio (em análises em modo negativo) para favorecer a protonação de moléculas de maior basicidade ou a desprotonação de moléculas de maior acidez produzindo respectivamente íons positivos e negativos.

Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo principal propor novas metodologias para o estudo de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas, de forma a buscar soluções, contornar problemas inerentes da técnica e melhorar a detecção de espécies presentes no meio reacional, contribuindo desta forma para a elucidação do mecanismo estudado.

Este trabalho esteve focado no monitoramento do mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch. Para isso, foi desenvolvida uma nova fonte de ionização ambiente baseada na ionização por *sonic spray*, que foi denominada *Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization* (V-EASI) com o propósito de facilitar o estudo *online* desta reação. O mecanismo da reação de Hantzsch foi inicialmente estudado, utilizando reagentes marcados com “etiqueta” de carga, mostrados na **Figura 3**, com objetivo de melhorar a detecção de intermediários e minimizar interferências no meio reacional. E, por fim, foi feito um monitoramento *online* desta reação possibilitando a construção de uma curva cinética que auxilie no entendimento do mecanismo.

Deste modo, estas propostas colaboram para garantir que o mecanismo proposto para uma dada reação esteja o mais próximo possível do mecanismo real da reação estudada.

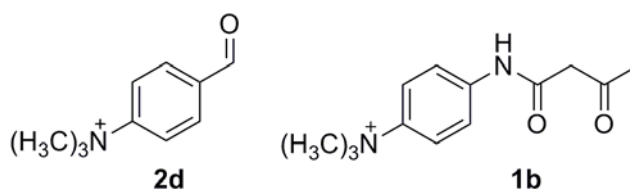


Figura 3: Estrutura dos reagentes contendo a “etiqueta” de carga, utilizados neste trabalho.

Capítulo II: Desenvolvimento e Aplicações da fonte de ionização *Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization* (V-EASI)

2.1 Introdução

2.1.1 Espectrometria de massas ambiente.

Após a revolução causada pela introdução das técnicas API-MS⁵⁻⁷ que permitiram a análise de compostos não voláteis e de elevada massa molecular, a espectrometria de massas ambiente surge como uma segunda revolução permitindo a análise direta de compostos em suas matrizes originais sem necessidade de preparo de amostras.

Tendo sua primeira publicação no início em 2004 a técnica *Dessorption Electrospray Ionization* (DESI)²¹ surge como a primeira técnica de ionização ambiente sendo resultado de um trabalho realizado por Cooks e colaboradores, que desde então, vem se dedicando ao desenvolvimento e aprimoramento desta técnica inovadora. A partir do trabalho de Cooks, novas técnicas de ionização ambiente foram surgindo e hoje mais de trinta métodos diferentes de ionização ambiente já são conhecidos²². Alguns trabalhos recentes²² definem a espectrometria de massas ambiente como uma classe de técnicas em que o processo de ionização ocorre externamente ao espectrometro de massas e os íons analitos e não a amostra como um todo, são introduzidos no espectrômetro de massas. Entretanto, mais do que isso, a análise ambiente permite que amostras em seus estados nativos, em ambiente aberto e sem preparo de amostra, sejam analisadas de maneira rápida e principalmente de forma nunca antes tão simples.

Dentre as principais técnicas ambiente utilizadas atualmente pode-se citar: (a) aquelas baseadas em spray de solventes tais como DESI, *Easy Ambient*

²¹ Takáts, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. *Science* **2004**, 306, 471.

²² a) Weston, D. J. *Analyst* **2010**, 135, 661. b) Ila, D. R.; Wu, C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2010**, 135, 669.

Sonic-Spray Ionization (EASI) e *Extractive Electrospray Ionization* (EESI);²³ (b) as baseadas em spray de solvente acoplado a um laser tais como *Electrospray-Assisted Laser Desorption Ionization* (ELDI)²⁴ e *Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization* (MALDESI);²⁵ (c) as baseadas em descarga elétrica tais como *Direct Analysis in Real Time* (DART),²⁶ *Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (DAPCI),²⁷ *Low-Temperature Plasma Ionization* (LTP)²⁸ e *Atmospheric Pressure Solid Analysis Probe* (ASAP).²⁹

No Brasil, Eberlin e colaboradores desenvolveram a técnica EASI, primeiramente denominada *Desorption Sonic-Spray Ionization* (DeSSI)³⁰. Neste trabalho esta técnica receberá um maior destaque haja vista que a mesma foi utilizada como base para o desenvolvimento de uma nova ferramenta para estudos de mecanismo de reações.

Na técnica de ionização por EASI a fonte é de fácil fabricação podendo ser utilizada com qualquer analisador de massas. O mecanismo de ionização é baseado em *Sonic-Spray Ionization* (SSI)³¹ sem utilização de radiação, voltagem ou temperatura como na maioria das técnicas de ionização conhecidas.³² A hipótese que melhor explica o fenômeno de ionização por EASI está baseado na possibilidade de gotas carregadas, com desequilíbrio entre as cargas positivas e negativas serem formadas no spray sônico. O bombeamento de um solvente polar, através de um capilar de sílica fundida (d.i. 100 µm) com vazão de 20 µL.min⁻¹ junto com vazão do gás de arraste (~4 L.min⁻¹), promove um cisalhamento intenso com a liberação no spray de microgotículas. Estas

²³ Chen, H.; Venter, A.; Cooks, R. G. *Chem. Commun.* **2006**, 19, 2042.

²⁴ Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Lee, J. Y.; Jeng, J.; Shiea, J. *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 1107.

²⁵ Sampson, J. S.; Hawkridge, A. M.; Muddiman, D. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, 17, 1712.

²⁶ Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2297.

²⁷ Williams, J. P.; Patel, V. J.; Holland, R.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 1447.

²⁸ Harper, J. D.; Charipar, N. A.; Mulligan, C. C.; Zhang, X.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9097.

²⁹ McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7826.

³⁰ Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 2901.

³¹ a) Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4557. b) Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2878.

³² a) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. I Chem.* **1984**, 88, 4451. b) Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; Takáts, Z.; Wiseman, J. M. *Science* **2006**, 311, 1566. c) Watson, J. T. S.; Parkman, O. D. (2007) Introduction to mass spectrometry: instrumentation, application and strategies for data interpretation. West Sussex: John Wiley & Sons.

microgotículas têm uma capacidade bem limitada de acomodar carga e assim apresentam baixa densidade de cargas com a probabilidade estatística de ocorrer um desequilíbrio tanto a favor das cargas positivas quanto das cargas negativas. Ao entrar em contato com a amostra, estas microgotículas desolvem moléculas do analito que estão na superfície.³³ A evaporação do solvente é favorecida pela energia térmica do ambiente e por auxílio do gás do spray que age como secante. Após a dessorção, o processo é semelhante ao ESI, assim conforme a gota perde solvente, a densidade de cargas aumenta até um ponto que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e os íons são ejetados da gota. Depois de formados, os íons agora dessolvatados e na fase gasosa alcançam o orifício (da ordem de poucos micrometros) do cone de amostragem (*skimmer*). Um campo elétrico na entrada do cone é responsável por atrair os íons formados, assim os íons são guiados ao analisador de massas.³⁴ A composição do solvente no spray, a superfície de ionização, a pressão do gás de nebulização e a polaridade do solvente são parâmetros importantes no desenvolvimento de um método ESI-MS.

Conforme já mencionado anteriormente, estes novos métodos de ionização/dessorção ambiente acrescentaram a análise por espectrometria de massas uma nova característica marcante: a simplicidade. Esta simplicidade tem levado a espectrometria de massas a um estado sem precedentes de facilidade de operação onde já não é mais necessário o preparo de amostra.

A relevância da espectrometria de massas ambiente é refletida pelo seu explosivo crescimento e particularmente no número de aplicações, que variam da análise de drogas, produtos farmacêuticos, lipídeos, metabólitos, peptídeos, proteínas, análise forense e ambiental, combustíveis, bebidas, óleos vegetais e minerais, polímeros, perfumes e imageamento de tecidos biológicos.²²

A combinação entre o uso simples e a análise direta da amostra acoplada a espectrômetros de massa portáteis possibilitarão que, em um futuro próximo que a

³³ Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Romão, W.; Lalli, P. M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 265.

³⁴ Hirabayashi, A.; Hirabayashi, Y.; Sakairi, M.; Koizumi, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 10, 1703.

espectrometria de massas esteja presente em qualquer lugar em que ela seja necessária.

2.2 Objetivos específicos

Uma nova fonte de ionização baseada na ionização por *sonic spray* foi desenvolvida, com o propósito de facilitar estudos *online* de mecanismos reacionais. Seu desenvolvimento e construção foi seguido de uma etapa de otimização visando adequá-la a diversas aplicações analíticas. A fonte foi, também, aplicada na análise de amostras comerciais tais como fármacos, bebidas alcoólicas e petróleo, de forma a mostrar sua versatilidade e eficácia tanto em análise de amostras puras como em matrizes mais complexas.

2.3 Parte experimental

Nos experimentos de V-EASI-MS utilizou-se metanol e tolueno grau HPLC obtidos da Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI - USA), ácido fórmico foi obtido da Acros e hidróxido de amônio da Fluka. A amostra de petróleo brasileiro encontrava-se disponível no laboratório. A cachaça artesanal da marca Seleta® envelhecida em barris de amburana foi obtida de um distribuidor local. A amostra de cocaína foi cedida pela polícia federal e PEG 600 foi obtido da Acros. A Mioglobina e o Citocromo C ambos de coração de cavalo foram adquiridos da Sigma Aldrich e a amostra de peptídeo sintético foi gentilmente cedida pelo Dr. Robson L. Melo (Centro para Toxicologia Aplicada-CAT/CEPID, Instituto Butantan). Todos os reagentes foram utilizados sem previa purificação. Água deionizada foi obtida da unidade purificadora Milli-Q (Millipore, Billerica, MA. USA).

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas mono-quadrupolo LCMS-2010 EV (Shimadzu Co.) usando uma fonte de ionização V-EASI (desenvolvida no laboratório). Na fonte V-EASI a ionização por *sonic spray*

é assistida apenas por N₂ comprimido a 10 bar a um fluxo de 3,5 L min⁻¹. A amostra é auto-succionada a um fluxo de aproximadamente 20 µL min⁻¹ (considerando metanol como solvente) por efeito Venturi (sem auxílio de bomba injetora) através de um capilar de sílica fundida com 100 e 125 µm de diâmetro interno e externo respectivamente. Nenhum aquecimento ou voltagem é aplicado durante o processo de ionização.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Desenvolvimento e aplicação da fonte de ionização V-EASI

Neste contexto, nosso objetivo foi desenvolver uma nova técnica para a investigação de mecanismos de reações orgânicas com a construção de uma fonte de ionização simples que tornasse possível a análise direta de soluções, podendo ser acoplada a espectrômetros de massas em miniatura que poderiam ser levados a laboratórios sintéticos de uma forma acima de tudo simples e acessível. Introduzindo assim, uma nova opção para o estudo de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas ambiente, bem como facilitar, tanto instrumentalmente como analiticamente o modo pelo qual estes estudos são conduzidos.

O desenvolvimento da fonte *Venturi easy ambient sonic-spray ionization* (V-EASI) esteve alicerçado na técnica EASI,³⁵ também desenvolvida no Laboratório ThoMSon da UNICAMP. Em ambos os casos o processo de ionização está baseado no efeito que um gás a alta velocidade pode provocar nas gotas de um líquido durante a formação do spray (*sonic spray* – SSI)³⁶. O gás (que pode ser N₂ ou ar comprimido) impulsionado a uma velocidade supersônica encontra o líquido, que passa através de um capilar de sílica fundida, causando o cisalhamento das gotas. Convenientemente, ocorre um desequilíbrio de cargas

³⁵ Haddad, R. H.; Milagre, M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2744.

³⁶ Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4557.

nestas gotas colaborando para suas posteriores subdivisões até a ejeção de íons isolados para fora da gota.

Em EASI, o solvente (geralmente metanol ácido em modo positivo, ou básico em modo negativo) é impulsionado através de uma bomba de seringa e encontra o gás a alta velocidade formando moléculas de solvente carregadas positiva ou negativamente. Estas moléculas carregadas encontram uma superfície de dessorção para a qual transferem a carga além de colaborar para a dessorção dessas espécies que serão, desta forma, introduzidas ao espectrômetro de massas.

No caso do V-EASI percebemos que a alta velocidade do gás poderia criar, com uma pequena adaptação da fonte, um efeito conhecido como efeito Venturi. Neste caso não teríamos a necessidade de utilizar a bomba de seringa, uma vez que o próprio gás a alta velocidade criaria uma diferença de pressão que iria impulsionar a amostra (líquida ou sólida solubilizada em solvente apropriado) por efeito Venturi e, na ausência da superfície de dessorção, as moléculas carregadas seriam diretamente introduzidas no espectrômetro de massas.

Em V-EASI, assim como em EASI, o processo de ionização ocorre sem a necessidade de aplicação de voltagem, temperatura ou radiação e, devido a pouca energia fornecida aos íons gasosos teremos uma menor quantidade média de cargas nas gotas, isso torna a ionização mais seletiva, ou seja, a amostra é ionizada preferencialmente ao solvente e/ou impurezas presentes o que eleva a relação sinal-ruído resultando em um espectro mais limpo. Além disso, a ausência de voltagem e temperatura evitam que processos térmicos e eletroquímicos, processos estes, que são bem conhecidos para eletrospray (ESI) e técnicas derivadas³⁷, possam gerar interferentes redox ou mecanismos competitivos diferentes durante a ionização, produzindo formas iônicas a princípio inesperadas, como por exemplo, $[M+H]^+$ e M^+ , complicando as atribuições e interpretações dos espectros.

Conforme mencionado anteriormente, a técnica utiliza o princípio de efeito Venturi, efeito este descoberto há mais de dois séculos, pelo físico italiano

³⁷ Pasilis, S. P.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1208.

Giovanni Battista Venturi,³⁸ que desde então tem sido amplamente utilizado em muitos dispositivos. Em espectrometria de massa, foi aplicado a alguns poucos processos de auto-bombeamento e a alguns dispositivos relativamente complexos propostos para o ESI-MS convencional³⁹.

Por definição, o efeito Venturi ocorre quando um gás ou líquido (representado na **Figura 4** pela cor azul) atravessa uma seção que apresenta uma restrição em seu caminho. Ao passar por esta restrição o fluido tem sua velocidade aumentada causando uma diferença de pressão. Essa diferença de pressão impulsiona o segundo fluido (representado na **Figura 4** pela cor verde) que está em contato com o primeiro causando seu auto-bombeamento.

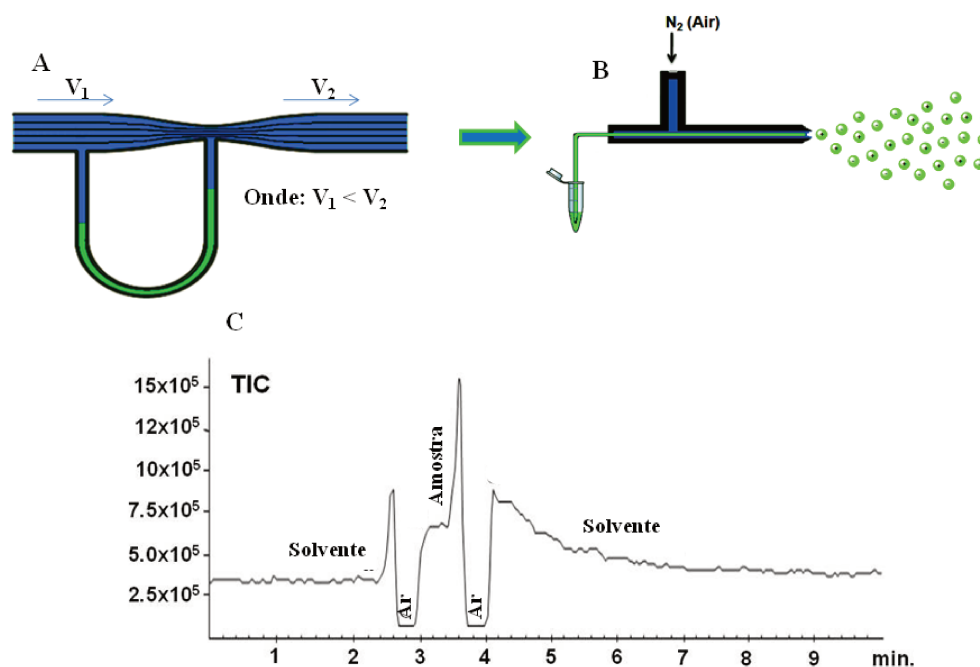


Figura 4: A) Design clássico do Efeito Venturi; B) Design do V-EASI combinando o auto-bombeamento causado pelo Efeito Venturi e a ionização por sonic spray. C) Perfil do sinal medido por *total ion current* (TIC) de uma solução de cocaína em metanol acidificado.

³⁸ Geankoplis, C. J. *Transport processes and unit operations* 3rd ed. (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1993).

³⁹ a) Wachs, T.; Henion, J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 632. b) Asano, K. G.; Ford, M. J.; Tomkins, B. A.; Van Berkel, G. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2305. c) Geromanos, S.; Philip, J.; Freckleton, G.; Tempst, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 551. d) Geromanos, S.; Freckleton, G.; Tempst, P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 777.

Usando este conceito, o V-EASI foi desenvolvido para acoplar a alta velocidade do gás de nebulização (*sonic spray*) usado no EASI com o autobombeamento resultante do Efeito Venturi (**Figura 4B**), permitindo, assim, um manuseio ainda mais fácil de qualquer substância sem o auxílio de bombeamento elétrico.

A fonte de ionização V-EASI foi construída utilizando peças comuns, facilmente encontradas em um laboratório. Um sistema T metálico encaixado a uma agulha de aço inoxidável de 53 mm de comprimento que conta com um diâmetro interno e externo de 400 μm e 728 μm respectivamente. Um capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 100 μm e diâmetro externo de 125 μm atravessa o T-metálico fixando-se, pouco antes da saída da agulha, estando a outra ponta do capilar mergulhada na solução amostra (ou solvente). É de extrema importância que o sistema esteja completamente vedado (exceto pela saída da agulha), caso contrário o efeito Venturi não será observado.

O sistema montado, com um fluxo de N_2 de 10 bar e uma vazão de 3,5 L min^{-1} é capaz de promover o bombeamento de uma amostra de metanol puro a uma vazão média de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. Sob as mesmas condições, o bombeamento de uma amostra de água foi feito a uma vazão média de 6 $\mu\text{L min}^{-1}$ indicando a direta dependência do fluxo com a viscosidade do líquido a ser bombeado.

Considerando a **Figura 4C** observamos o perfil do sinal obtido com a técnica V-EASI. Inicialmente, com o capilar introduzido em um *vial* contendo apenas solvente observamos um sinal constante devido ao ruído químico natural promovido por íons do solvente e impurezas residuais. Entretanto, a retirada do capilar do líquido leva ao bombeamento de ar juntamente com o restante de líquido ainda presente no capilar. Este bombeamento terá uma maior velocidade devido a menor resistência oferecida pelo ar, e veremos uma elevação da linha de base, seguida de sua queda devido ao bombeamento exclusivo de ar neste período da análise. Na sequência, a introdução da amostra leva a uma nova elevação na contagem de íons e o processo se repete. Ao final a nova introdução de solvente faz com que a linha de base volte ao patamar inicial conforme esperado.

A nova fonte de ionização V-EASI pode ser empregada tanto na análise de amostras líquidas, conforme descrito anteriormente (**Figura 5A**), bem como para amostras sólidas. Neste último caso, o bombeamento pelo efeito Venturi de um solvente adequado somado com um fluxo SSI forma gotas carregadas na superfície da amostra, causando uma eficiente dessorção e ionização, produzindo assim espectros limpos (**Figura 5B**). Tanto na análise de líquidos como de sólidos, o ângulo de posicionamento da fonte mostrou-se como um parâmetro de extrema importância para eficiência de análise dos íons formados. O ângulo ideal obtido, adequado para ambos os tipos de amostras, foi de aproximadamente 40°. Neste ângulo temos uma melhor incidência do spray, promovendo assim uma melhor dessorção da amostra sólida (V_s-EASI). No caso de amostras líquidas, apesar do ângulo de 40° promover uma análise eficiente, damos preferência para a análise em *z-spray* utilizando um ângulo de 90° que promove uma análise eficiente com uma melhor contaminação do equipamento. É importante ressaltar que sempre antes de cada análise o posicionamento da fonte é devidamente ajustado com uma amostra conhecida afim de se obter um melhor aproveitamento dos íons formados na fonte.

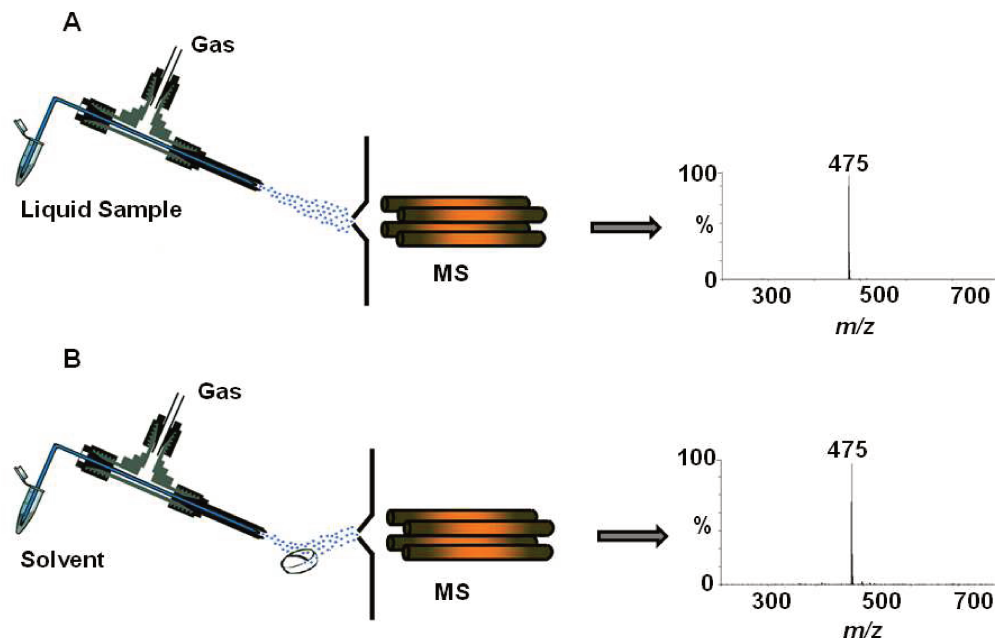


Figura 5: Modo duplo de operação do V-EASI. (A) V_L-EASI(+) para uma solução de 30 ngmL⁻¹ de sildenafil em metanol acidificado; (B) V_S-EASI(+) para um comprimido de sildenafil usando metanol acidificado como o solvente para o spray.

Após a montagem e otimização da fonte, com o intuito de demonstrar a versatilidade da técnica foi realizado uma gama de experimentos com diferentes amostras, dentre elas algumas comerciais, como por exemplo: cocaína, uma droga ilícita, polietilenoglicol (PEG), um polímero de grande uso, e cachaça, uma bebida alcoólica comercial e petróleo, que está entre as misturas químicas mais complexas que se conhece. Estes experimentos mostraram que a técnica pode ser utilizada na análise de substâncias comerciais (**Figura 6**).

A **Figura 6A** mostra o espectro de V-EASI(+)-MS para uma solução de cocaína em metanol acidificado com ácido fórmico 0,1% (v/v). Foi possível observar um espectro no qual o analito se apresenta na forma de molécula protonada de m/z 304 não sendo observado, nenhuma fragmentação, dímero ou aduto. Tal constatação nos dá indícios de que a técnica V-EASI pode tornar-se uma técnica promissora para a análise de fármacos em comprimidos e principalmente para a detecção de drogas ilícitas em investigações forenses, uma vez que sua instrumentação simples facilita seu emprego *in situ*.

A **Figura 6B** mostra o espectro V-EASI(+)-MS para a solução metanólica de PEG 600 no qual é possível observar novamente um espectro com apenas a distribuição oligomérica característica das moléculas de PEG. Conforme é tipicamente observado em amostras de PEG, na qual se utiliza KOH na síntese, adutos de K^+ de m/z 453, 497, 541, 585, 629, 673, 717, 761 e 805 foram detectados sendo possível assim observar a massa média de aproximadamente 600 Da.

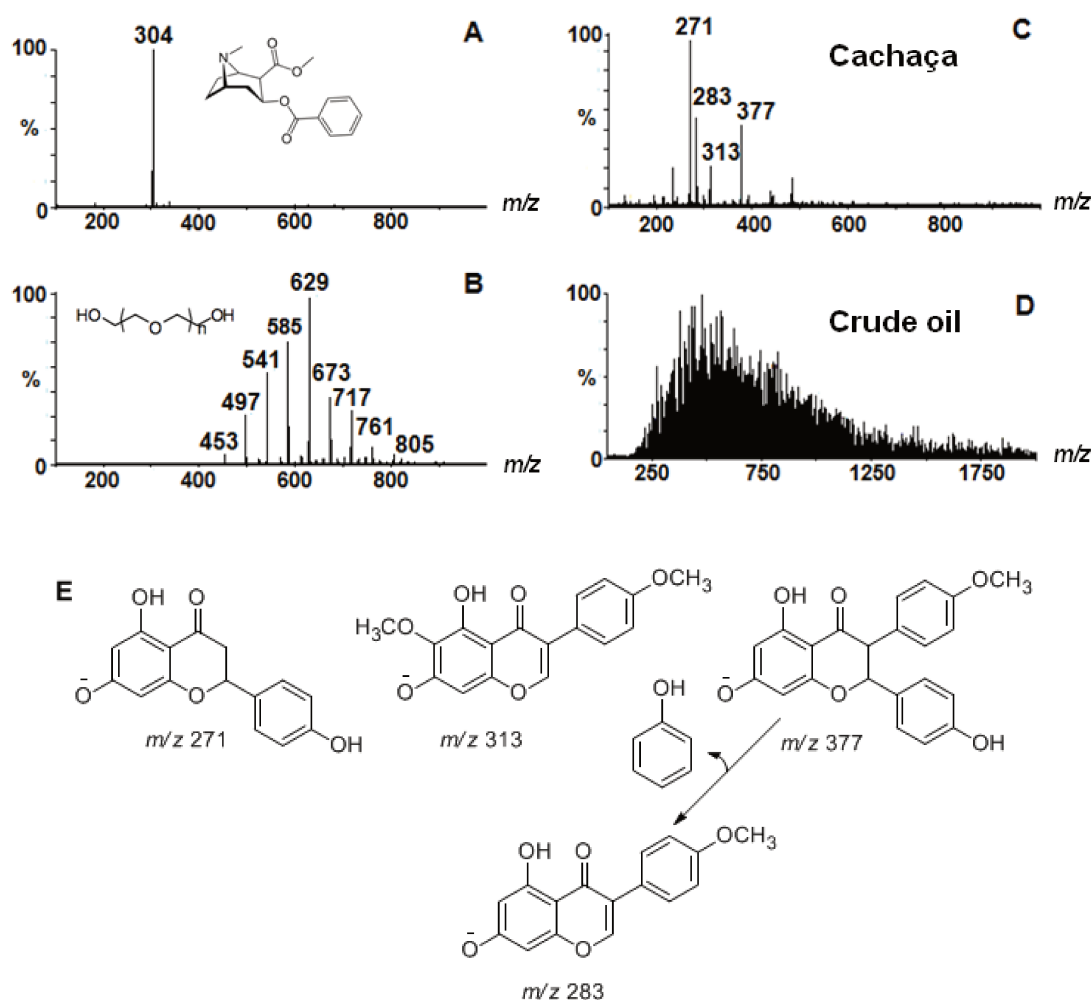


Figura 6: **A)** V-EASI(+)-MS de uma solução $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaine em metanol 0,1% de ácido fórmico. **B)** V-EASI(+)-MS de uma solução $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PEG 600 em metanol 0,1% de ácido fórmico. **C)** V-EASI(-)-MS de cachaça diluída 1:100 em metanol 0,1% de hidróxido de amônio. **D)** V-EASI(+)-MS de uma solução $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de petróleo em metanol 0,1% de ácido fórmico: tolueno (solução 1:1). **E)** Íons característicos encontrados em amostras de cachaça envelhecida em cascos de Amburana.

Uma variedade de bebidas e sucos de frutas também podem ser analisadas por V-EASI(-)-MS como mostra a **Figura 6C** para a cachaça, uma bebida alcóolica tipicamente brasileira. Com esta análise, foi possível encontrar íons de m/z 271, 313 e 377, que são fenóis característicos para cachaça envelhecida em cascos de amburana (*Amburana cearensis*)⁴⁰ conforme mostra a **Figura 6E**. O espectro de V-EASI(-)-MS da **Figura 6C** é semelhante ao obtido em um trabalho recente que utilizou infusão direta por ESI e demonstrou diversos perfis para essa bebida, contendo íons diagnósticos diferentes de acordo com a madeira dos cascos utilizados para o envelhecimento da cachaça.⁴⁰

A **Figura 6D** mostra também o espectro V-EASI(+) para o petróleo no qual foi observado a ionização e detecção de uma variedade de componentes polares mostrando a distribuição gaussiana com m/z entre 200 e 2000 sendo os dados de V-EASI(+)-MS comparáveis aqueles obtidos por ESI(+)-MS⁴¹ e EASI(+)-MS⁴². O petróleo é considerado a mistura natural mais complexa já conhecida, sua variedade de constituintes oferece um desafio para a análise química. Desde seu início a espectrometria de massas tem se esforçado para analisar petróleo e seus derivados. V-EASI permite, portanto, a caracterização direta destes óleos sem necessidade de métodos de pré-separação.⁴³

A **Figura 7** ilustra a aplicação do V-EASI para análise de macromoléculas biológicas. Embora soluções de água acidificada sejam utilizadas, estas são comumente empregadas com adição de metanol em proporção 1:1 em técnicas como ESI⁴⁴ e DESI⁴⁵, já em V-EASI o espectro obtido em água acidificada, sem adição de metanol, mostra sinais intensos demonstrando a eficaz ionização dessas espécies multicarregadas. Deste modo, V-EASI-MS mostra-se como uma técnica promissora para a aquisição de espectros de peptídeos e proteínas a partir

⁴⁰ De Souza, P. P.; Augusti, D. V.; Catharino, R. R.; Siebald, H. G. L.; Eberlin, M. N.; Augusti, R. J. *Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1294.

⁴¹ Marshall, A. G.; Rodgers, R. P. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 53.

⁴² Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Nascimento, H. D. L.; Klitzke, C. F.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Santos Neto, E. V.; Rodgers, R. P.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2010**, *10*, 3990.

⁴³ Kim, S.; Rodgers, R. P.; Blakney, G. T.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2009**, *20*, 263.

⁴⁴ Nemes, P.; Goyal, S.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 387.

⁴⁵ Shin, Y. S.; Drolet, B.; Mayer, R.; Dolence, K.; Basile, F. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3514.

de soluções aquosas livres de solventes orgânicos, o que facilitaria, deste modo, sua aplicação na análise de fluídos biológicos.

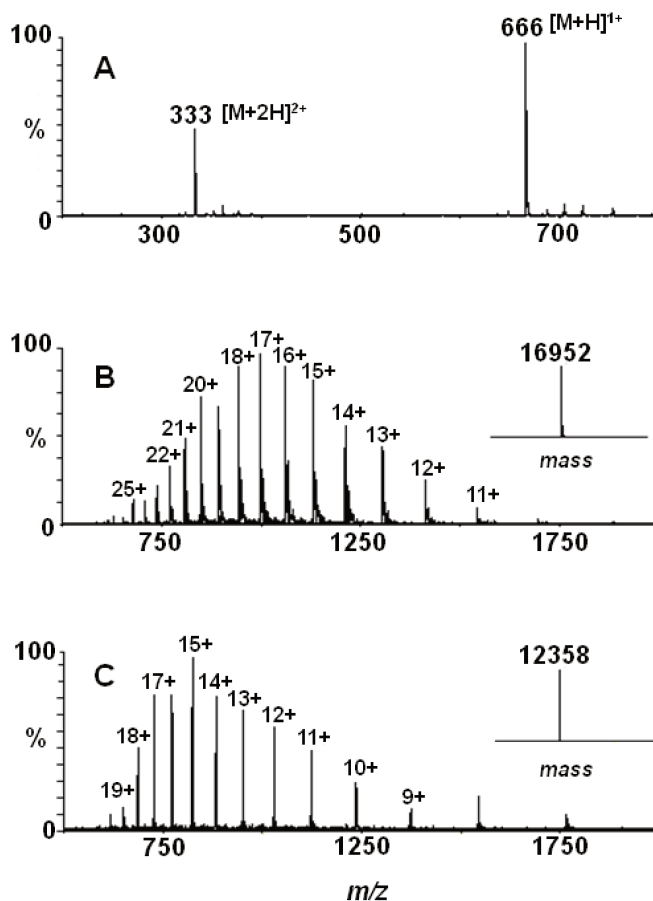


Figura 7: V-EASI(+)-MS de macromoléculas biológicas em água acidificada. **A)** Peptídeo sintético FSDGLK a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. **B)** Mioglobina de coração de cavalo a 1mg mL^{-1} . **C)** Citocromo C de coração de cavalo a 1mg mL^{-1} . Os espectros deconvoluídos foram inseridos em cada espectro original.

A **Figura 7A** mostra o espectro V-EASI(+)-MS de um peptídeo sintético FSDGLK no qual é possível observar a molécula mono e dicarregada de m/z 666 e 333 respectivamente. A **Figura 7B** mostra o espectro V-EASI(+)-MS para mioglobina de coração de cavalo (16,9 kDa) onde se observam moléculas multiprotonadas centralizadas na espécie 17⁺ de m/z 998, embora a distribuição varie de 25⁺ (m/z 679) a 12⁺ (m/z 1413)⁴⁶. A **Figura 7C** mostra o espectro V-

⁴⁶ Katta, V.; Chait, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8534.

EASI(+)-MS para o citocromo C (12,3 kDa) também adquirido em solução aquosa acidificada. De forma semelhante moléculas multiprotonadas são observados variando de 7^+ (m/z 1766) a 19^+ (m/z 651) sendo que tal distribuição encontra-se centralizada em cerca de 15^+ (m/z 825)⁴⁷. Para ambos os casos analisados a deconvolução de cada molécula protonada resulta na massa correta para cada proteína.

Entretanto, como apresentado inicialmente, nosso grande interesse está em aplicar essa técnica como uma ferramenta confiável e de fácil operação para o monitoramento de reações orgânicas em solução. A **Figura 8** mostra uma representação esquemática deste monitoramento.

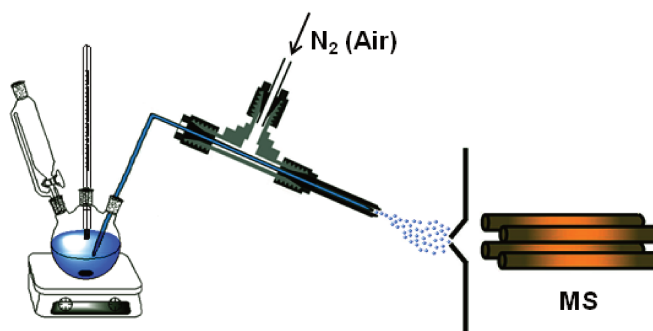


Figura 8. Representação esquemática da técnica V-EASI-MS aplicado diretamente na análise de uma reação em andamento.

O objetivo a partir de agora será empregar esta técnica no monitoramento de uma reação cujo mecanismo tenha sido previamente estudado por outra técnica já estabelecida para estudos de mecanismos de reação, como por exemplo ESI-MS. A reação escolhida foi a reação multicomponente de Hantzsch, foco de estudo do capítulo III deste trabalho.

⁴⁷ Chowdhury, S. K.; Katta, V.; Chait, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9012.

2.5 Conclusão

No presente trabalho, foi desenvolvido uma nova fonte de ionização denominada *Venturi easy ambient sonic spray ionization* (V-EASI), passível de ser utilizada em estudos de mecanismos de reações (foco do estudo realizado no capítulo III desta dissertação), podendo também ser empregada em diversas aplicações analíticas as quais foram largamente demonstradas neste trabalho. Com estas diferentes aplicações, podemos concluir que a técnica V-EASI mostra ter potencial para ser empregada na análise de amostras em suas matrizes originais, sendo obtidos espectros de qualidade, com elevada relação sinal-ruído e praticamente nenhuma fragmentação. A fonte mostrou-se eficaz tanto em análises de amostras líquidas (V_L -EASI) como para análises de amostras sólidas (V_S -EASI) sendo deste modo uma fonte versátil e simples tal como se espera de uma análise por espectrometria de massas ambiente.

Capítulo III: Reagentes marcados com “etiqueta” de carga aplicados ao estudo do mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch

3.1 Introdução

3.1.1 Reagentes marcados com “etiqueta” de carga e sua aplicação em estudos de mecanismos de reações por espectrometria de massas

ESI-MS e sua versão tandem ESI-MS/MS são atualmente técnicas de escolha para estudos de mecanismos de reações. Esta técnica é utilizada para interceptar espécies iônicas presentes na solução reacional e transferir estas espécies gasosas para o espectrômetro de massas, permitindo a detecção de intermediários e espécies transientes que são de extrema importância para o entendimento a cerca dos mecanismos das reações.

Entretanto, como uma limitação da técnica ESI, aplicada a este tipo de estudo, podemos citar o fato de que o mecanismo de uma reação orgânica é, muitas vezes, dependente do meio reacional, sendo assim, este mecanismo seria diretamente afetado pelo uso de aditivos (sejam eles ácidos ou básicos) utilizados para protonar ou desprotonar os intermediários de reação que se apresentam como espécies neutras (ou zwitteriônicas) e portanto não seriam de outra forma detectados. Deste modo, esses aditivos poderiam perturbar o caminho reacional ou mesmo o equilíbrio da reação em estudo. Além disso, o favorecimento de uma espécie em relação as demais, de acordo com a afinidade por prótons, pode dificultar a detecção de alguns dos intermediários de interesse, prejudicando assim a interpretação do mecanismo.

Neste contexto, o presente trabalho propõe, como uma alternativa para contornar esta limitação, que é inerente à técnica, a utilização de reagentes carregados (não ácidos e não básicos) não sendo necessário, neste caso, o uso de aditivos, uma vez que todos os intermediários irão carregar uma “etiqueta” de carga facilitando sua detecção por espectrometria de massas.

Embora exista na literatura alguns exemplos do uso destes reagentes carregados em estudos de mecanismos de reações orgânicas por espectrometria de massas⁴⁸, a maioria destes se aplica a reações catalisadas por organometálicos. Além disso, pouco foi explorado acerca do emprego destes compostos como uma alternativa ao uso de aditivos (ácidos ou básicos) a solução analisada ou ainda sobre uma avaliação da influência do sítio de carga na reatividade dos compostos utilizados. Com isto, este trabalho visa utilizar o conceito de reagentes carregados para elucidar o mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch por ESI-MS(/MS) e por V-EASI-MS (foco de estudo do capítulo III).

3.1.2 A reação de Hantzsch

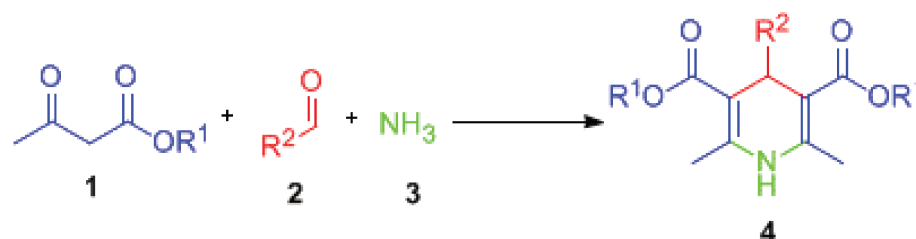
As reações multicomponentes (RMC) são conhecidas por sua elevada eficiência, não apenas devido a aspectos intrínsecos da reação como alta economia de átomos e seletividade, mas também devido a uma menor formação de produtos laterais, além de um protocolo reacional simples. Adicionalmente, trata-se de uma reação de baixo custo e que está de acordo com muitos dos princípios da química verde.

O conceito que diferencia uma reação multicomponente de demais processos *one-pot* tais como as reações *domino*, *tandem*, *zipper* ou cascata ainda gera um pouco de confusão entre os químicos. Entretanto, estas reações podem ser diferenciadas das RMC uma vez que estes processos envolvem reações entre dois reagentes resultando em um intermediário que é capturado por sucessivas adições de novos reagentes. Por outro lado, nas RMC três ou mais reagentes são adicionados simultaneamente chegando ao produto final com um elevado aproveitamento atômico.

⁴⁸ a) Colton, R.; Traeger, J. C. *Inorg. Chim. Acta.* **1992**, *201*, 153. b) Bryce, D. J. F.; Dyson, P. J.; Nicholson, B. K.; Parker, D. G. *Polyhedron* **1998**, *17*, 2899. c) Hinderling, C.; Adlhart, C.; Chen, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2685.

Embora a história das RMC remonte à segunda metade do século XIX com as reações de Strecker,⁴⁹ Hantzsch⁵⁰ e Biginelli,⁵¹ foi apenas nas últimas décadas com o trabalho de Ugi⁵² e colaboradores que o conceito de reações multicomponentes emergiu como uma poderosa ferramenta em química sintética.⁵³

Com sua primeira publicação em 1882 a reação de Hantzsch consiste no acoplamento entre dois equivalentes de acetoacetato (**1**) um equivalente de aldeído (**2**) e amônia (**3**) (**Esquema 1**), sendo esta uma das RMC mais antigas que se conhece⁵⁴. Essa reação resulta na formação principal de 1,4-dihidropiridinas-2,3,5,6-substituídas (**4**), comumente conhecidas como 1,4-dihidropiridinas (DHPs). Entretanto, dependendo da natureza dos reagentes utilizados, produtos inesperados podem ser formados⁵⁵ incluindo a formação de 1,2-DHPs.⁵⁶ A formação destes subprodutos podem mostrar a pluralidade do mecanismo da reação.



Esquema 1: Representação esquemática geral para a reação multicomponente de Hantzsch.

⁴⁹ A. Strecker, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, 75, 27.

⁵⁰ A. Hantzsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1882**, 215, 1.

⁵¹ P. Biginelli, *Gazz. Chim. Ital.* **1891**, 21, 497.

⁵² I. Ugi, R. Meyr, U. Fetzer, C. Steinbrückner, *Angew. Chem.* **1959**, 71, 386.

⁵³ Ramón, D. J.; Yus, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1602.

⁵⁴ (a) Han, Y. F.; Xia, M. *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 379. (b) Ganem, B. *Accounts Chem. Res.* **2009**, 42, 463. (c) Enders, D.; Grondal, C.; Huttl, M. R. M. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, 46, 1570. (d) Ramon, D. J.; Yus, M. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, 44, 1602; (e) Orru, R. V. A.; de Greef, M. *Synthesis* **2003**, 1471. (f) Nair, V.; Rajesh, C.; Vinod, A. U.; Bindu, S.; Sreekanth, A. R.; Mathen, J. S.; Balagopal, L. *Accounts Chem. Res.* **2003**, 36, 899; (g) Hulme, C.; Gore, V. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 51.

⁵⁵ (a) Balogh, M.; Hermecz, I.; Narayszabo, G.; Simon, K.; Meszaros, Z. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1986**, 753. (b) Zhou, Y. C.; Kijima, T.; Kuwahara, S.; Watanabe, M.; Izumi, T. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3757.

⁵⁶ (a) Shen, L.; Cao, S.; Wu, J. J.; Zhang, J.; Li, H.; Liu, N. J.; Qian, X. H. *Green Chem.* **2009**, 11, 1414; (b) Wan, J. P.; Gan, S. F.; Sun, G. L.; Pan, Y. J. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2862.

As 1,4-dihidropiridinas possuem uma elevada importância em síntese orgânica, química medicinal e bioquímica, uma vez que apresentam ação como bloqueadores do canal de cálcio e alguns deles exibem efeitos dilatadores cardiovasculares, broncodilatadores além de ação contra esclerose, diabetes, tuberculose, esquizofrenia cerebral e ainda efeitos antitumorais e hematoprotetores.⁵⁷

Além do interesse farmacêutico, estes compostos apresentam um grande potencial como reagentes de transferência de hidretos (ou hidrogênio) devido a sua similaridade com cofatores de enzimas naturais como NAD(P)H e sua forma oxidada NAD(P).⁵⁸

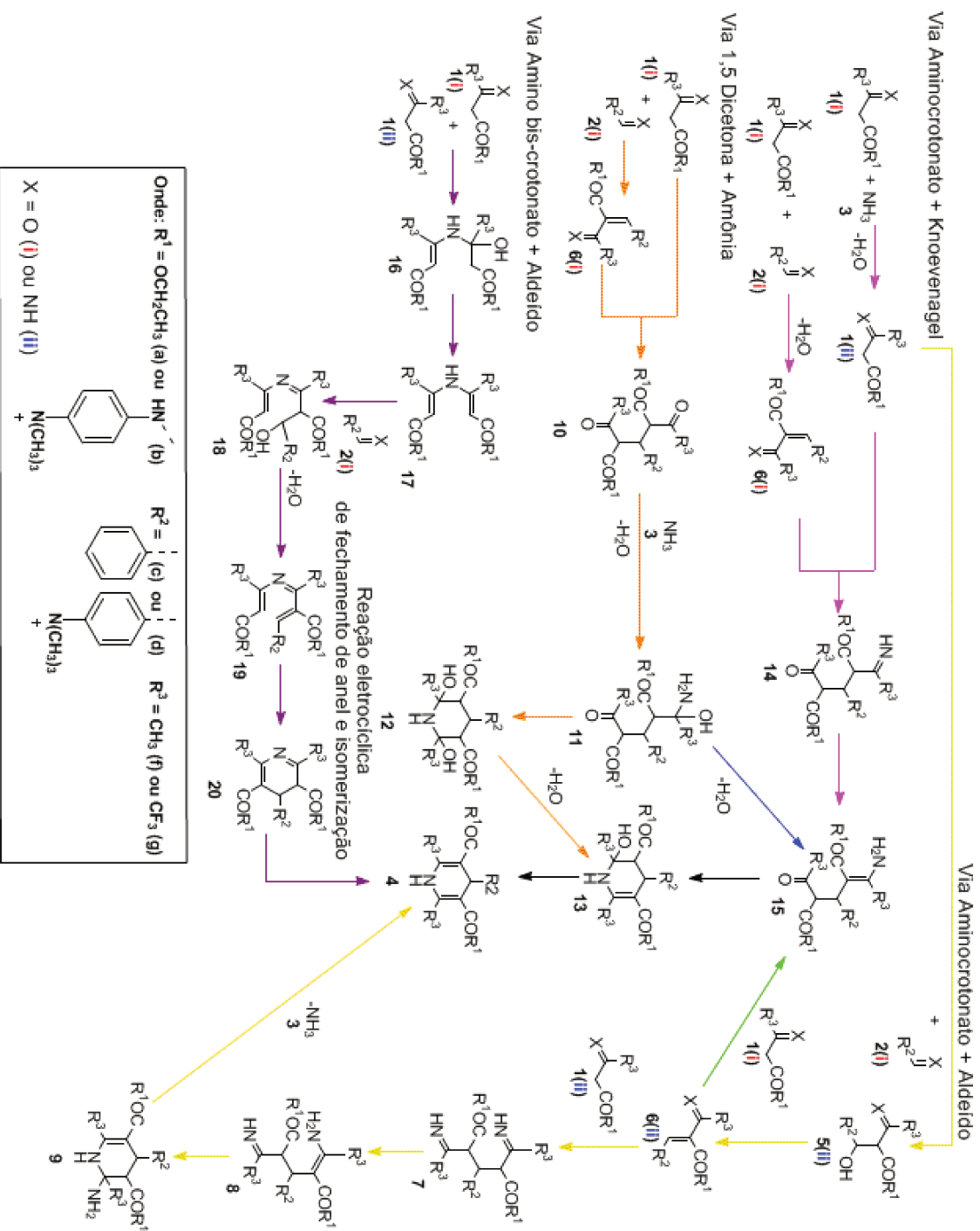
Por se tratar de uma reação multicomponente, teremos em consequência, um maior número de possíveis vias mecanísticas para essa reação. O **Esquema 2** mostra de forma detalhada as prováveis vias mecanísticas para esta reação. De forma simplificada consideramos neste trabalho quatro vias principais. A primeira via mostrada em rosa no **Esquema 2** passa pela adição de Michael do aminocrotonato (**1ii**) ao produto de Knoevenagel (**6i**), enquanto que o caminho mostrado em laranja (**Esquema 2**) ocorre via condensação de uma 1,5-dicetona (**10**) com amônia (**3**). A via mostrada em amarelo (**Esquema 2**) ocorre através da condensação do aminocrotonato (**1ii**) ao aldeído (**2**) e finalmente o mecanismo mostrado em roxo procede por meio da adição do aldeído (**2**) ao composto amino bis-crotonato (**17**).

Entretanto, mecanismos alternativos podem ser sugeridos, tais como os intercruzamentos mostrados no **Esquema 2**, como por exemplo o composto 1,5 dicetona (**10**) após adição de amônia (**3**) pode sofrer desidratação anterior ao fechamento do anel (**11**→**15** - saindo do caminho laranja) ou ainda o equivalente

⁵⁷ Edraki, N.; Mehdipour, A. R.; Khoshneviszadeh, M.; Miri, R. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 1058

⁵⁸ (a) Zhu, X. Q.; Wang, H. Y.; Wang, J. S.; Liu, Y. C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 344. (b) Garden, S. J.; Guimaraes, C. R. W.; Correa, M. B.; de Oliveira, C. A. F.; Pinto, A. D.; de Alencastro, R. B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8815. (c) Zhu, X. Q.; Cao, L.; Liu, Y.; Yang, Y.; Lu, J. Y.; Wang, J. S.; Cheng, J. P. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 3937. (d) Lavilla, R. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 715; (e) Connon, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3407; (f) Huang, Y. J. *Synlett* **2007**, 2304. (g) Wang, N. X.; Zhao, J. *Synlett* **2007**, 2785. (h) He, R.; Toy, P. H.; Lam, Y. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 54; (i) Zhu, X. Q.; Zhang, M. T.; Yu, A.; Wang, C. H.; Cheng, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2501; (j) Richter, D.; Mayr, H. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 1958; (k) Wang, N. X.; Zhao, J. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3045.

imínio do produto de Knoevenagel (**6ii**) pode sofrer adição do β -cetoester (**1i**) ao invés da adição do aminocrotonato (**6ii** $\rightarrow$ **15** - saindo do caminho amarelo).



Os mecanismos possíveis para a reação de Hantzsch apresentam implicações cinéticas. Por exemplo, um acoplamento envolvendo a adição de Michael do éster aminocrotonato (**1ii**) ao produto da condensação de Knoevenagel (**6**) necessita que a reação de condensação de Knoevenagel ocorra mais rapidamente que qualquer outra reação do aminocrotonato seja com o aldeído ou com o β -cetoéster, se cada reação for reversível ou mesmo lentamente reversível, a taxa de formação de aminocrotonato não limita a velocidade da reação.⁵⁹ Portanto, se a reação de Knoevenagel é relativamente lenta, então o produto DHP pode ser formado por um mecanismo alternativo (**Esquema 2**).

Katritzky e colaboradores⁵⁹ estudaram de forma *online* a RMC de Hantzsch utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{15}N e ^{13}C sendo possível caracterizar intermediários durante o andamento da reação. Neste estudo foi observado que os intermediários **6(i)** e **1(ii)** estão presentes no meio reacional durante todo o curso da reação. Embora não tenha sido possível a identificação dos intermediários **13**, **14** e **15** o autor conclui que a via mecanística aminocrotonato + Knoevenagel seria predominante durante a reação de Hantzsch e a etapa de adição de Michael do aminocrotonato ao produto de Knoevenagel seria a etapa lenta do mecanismo ao passo que a ciclização e eliminação de água ocorreria tão rapidamente que não haveria acúmulo suficiente destas espécies para a detecção.

Trabalhos anteriores ao de Katritzky⁵⁹ haviam, para o caso excepcional onde temos um grupo $-\text{CF}_3$ em R^3 do composto **1**, isolado o intermediário **12** indicando a participação da via 1,5 dicetona + amônia no mecanismo da RMC de Hantzsch.⁶⁰ Entretanto em seu estudo Katritzky⁵⁹ rebate esta proposta afirmando que eliminações de dióis são geralmente mais lentas que sua formação o que levaria a um acúmulo da espécie **12** no meio reacional. Uma vez que este intermediário não foi detectado, concluiu-se que o caminho via 1,5 dicetona não tinha uma contribuição significativa no mecanismo.

Embora outros grupos de pesquisa tenham discutido os possíveis

⁵⁹ Katritzky, A. R.; Ostercamp, D. L.; Yousaf, T. I. *Tetrahedron* **1986**, 42, 5729.

⁶⁰ Singh, B.; Leshner, G. Y. J. *Heterocyclic Chem.* **1980**, 17, 1109.

mecanismos para a reação de Hantzsch,^{61,56a} não é de nosso conhecimento a existência de um estudo por espectrometria de massas que tenha identificado e caracterizado os intermediários desta RMC.

3.2 Objetivos específicos

Reagentes marcados com uma “etiqueta” de carga foram utilizados no estudo do mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch. Essa reação foi inicialmente estudada utilizando os reagentes convencionais (não marcados) e os resultados obtidos nesta etapa serviram de base para comparação, avaliando assim uma possível melhora na detecção dos intermediários reacionais. Deste modo, os experimentos realizados tiveram por objetivo principal:

- Avaliar, inicialmente a reação empregando reagentes não marcados com a “etiqueta” de carga por meio do método convencional possibilitando a investigação da reação sem a influência de um sítio de carga.
- Utilizar o iodeto de *p*-trimetilamôniobenzaldeído (**2d**) como reagente marcado, avaliando assim se os intermediários detectados condizem com os observados por meio da reação tradicional, além de avaliar se a “etiqueta” de carga favorece a detecção de um maior número de espécies.
- Utilizar o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (**1b**) como reagente marcado, com intuito de detectar intermediários que não contavam com a participação da molécula de aldeído em sua estrutura.
- Combinar, em uma mesma reação, dois reagentes marcados possibilitando a detecção de intermediários multicarregados mostrando que o andamento da reação não é afetado pelo sítio de carga.

⁶¹ a) Berson, J. A.; Brown, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 444. b) Hinkel, L. E.; Ayling, E. E.; Morgan, W. H. *J. Chem. Soc.* **1931**, 1835.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Experimentos realizados por ionização por electrospray

Todos os solventes utilizados são de grau HPLC sendo que a acetonitrila foi obtida da Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI – USA), o etanol da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ – USA) e o ácido fórmico foi obtido da Acros.

Os espectros de ESI-MS foram obtidos em um espectrômetro de massa Q-TOF (Micromass, Manchester, U.K.). Estes estudos foram realizados utilizando ionização por electrospray em modo positivo (ESI(+)-MS) e as condições típicas utilizadas foram: temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 100 °C, voltagem do capilar 3 kV e a voltagem do cone de 30 V. As amostras foram injetadas com auxílio de uma bomba injetora (Harvard Apparatus) a um fluxo de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Os experimentos de ESI-MS/MS foram realizados através da seleção por razão massa/carga, do íon de interesse utilizando o primeiro quadrupolo (Q1). O íon selecionado foi transmitido para o segundo quadrupolo “*rf-only*”, que é a cela de colisão (q2), onde foi submetido a colisões com gás argônio com energia variando entre 4 a 40 eV. Na sequência, a análise dos íons fragmentos foi por fim realizada no analisador por tempo de voo com configuração ortogonal. Em cada caso a energia de colisão foi otimizada de forma a produzir extensiva dissociação com mínima perda do íon de interesse.

3.3.2 Procedimento experimental para a reação de Hantzsch

Os reagentes não marcados empregados na reação de Hantzsch, sendo estes o acetoacetato de etila, benzaldeído, acetato de amônio e o 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila, foram obtidos comercialmente (Sigma - Aldrich Co) e utilizados sem previa purificação. Já os reagentes marcados com “etiqueta” de carga sendo estes o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida e iodeto de *p*-

trimetilamôniobenzaldeído foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Simon J. Garden da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Todas as reações estudadas foram montadas seguindo o método geral descrito abaixo, sendo que casos excepcionais serão descritos ao longo do texto.

Procedimento geral:

Em um balão de fundo redondo (10 mL) contendo 2 mL de solvente (etanol ou acetonitrila), adiciona-se 0,1 mmol da dicetona, 0,1 mmol de acetato de amônio e 0,1 mmol de aldeído. A solução reacional permanece sob agitação e aquecimento em banho de óleo a 60°C durante todo o tempo.

As reações foram acompanhadas ao longo de 48 horas e alíquotas do meio reacional (1 µL para os reagentes marcados com “etiqueta” de carga e 5 µL para os reagentes não marcados) eram coletadas em intervalos pré determinados. As alíquotas das soluções reacionais foram transferidas a um eppendorf®, diluídas a 1 mL de volume total com acetonitrila com ou sem adição de aditivos (dependendo do experimento) e injetadas diretamente no espectrômetro de massas.

Para cada reação serão mostrados os espectros nos tempos de reação que melhor reflitam o comportamento da reação, ou seja que apresentem um maior número de intermediários reacionais.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Estudo mecanístico da reação multicomponente de Hantzsch por espectrometria de massas

Neste trabalho, a RMC de Hantzsch foi inicialmente estudada seguindo a metodologia convencional, empregando aditivos para promover a protonação das espécies formadas em solução. Em seguida a reação foi monitorada utilizando reagentes marcados com um grupo carregado positivamente. Este grupo encontra-se ligado de forma covalente a dois diferentes componentes da reação. Estes reagentes foram empregados na reação de maneira individual e de forma combinada sendo este último caso um exemplo inédito em estudos de

mecanismos de reações.

Serão usados diferentes combinações de reagentes contendo os marcadores carregados ou reagentes neutros. Estes experimentos foram, para um melhor entendimento, subdivididos e os resultados obtidos utilizando reagentes não marcados com “etiqueta” de carga serão inicialmente demonstrados e em um segundo momento serão apresentados os resultados dos experimentos empregando de forma individual e combinada os reagentes marcados.

3.4.1.1 Reagentes não marcados com “etiqueta” de carga empregados no estudo da reação de Hantzsch.

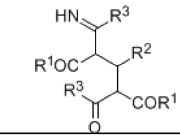
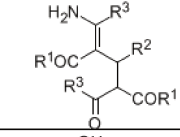
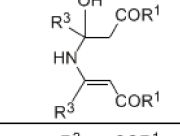
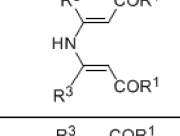
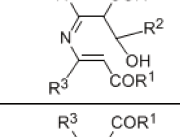
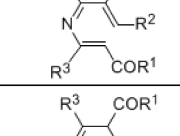
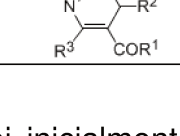
Os estudos mecanísticos da RMC de Hantzsch foram iniciados utilizando reagentes que não continham a “etiqueta” de carga seguindo o método tradicional empregando aditivos para favorecer a protonação/desprotonação dos intermediários.

A reação de Hantzsch foi, deste modo, estudada utilizando dois diferentes acetoacetatos de etila, sendo que um destes continha o substituinte $-\text{CF}_3$ em R^3 , reproduzindo assim o experimento realizado por Leshner e colaboradores⁶⁰ que utilizando este reagente obtiveram como único produto o diol **12**.

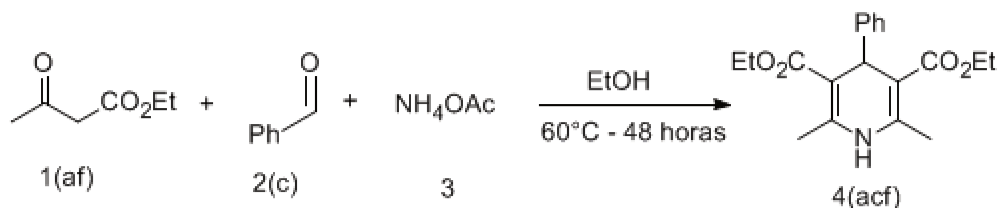
Para facilitar a visualização das espécies detectadas as razões massa/carga esperadas para cada intermediário segundo a numeração do **Esquema 2**, são apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1: Razão massa carga das espécies envolvidas no mecanismo da reação de Hantzsch. São mostrados as m/z das moléculas protonadas.

Estrutura X = O (i) ou NH (ii)		(acf) $R^1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ $R^2 = \text{Ph}$ $R^3 = \text{CH}_3$	(acg) $R^1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ $R^2 = \text{Ph}$ $R^3 = \text{CF}_3$
1		(i) m/z 131 (ii) m/z 130	(i) m/z 185 (ii) m/z 184
2		(i) m/z 107 (ii) m/z 106	(i) m/z 107 (ii) m/z 106
4		m/z 330	m/z 438
5		(i) m/z 237 (ii) m/z 236	(i) m/z 291 (ii) m/z 290
6		(i) m/z 219 (ii) m/z 218	(i) m/z 273 (ii) m/z 272
7		m/z 347	m/z 455
8		m/z 347	m/z 455
9		m/z 347	m/z 455
10		m/z 349	m/z 457
11		m/z 366	m/z 474
12		m/z 366	m/z 474
13		m/z 348	m/z 456

14		m/z 348	m/z 456
15		m/z 348	m/z 456
16		m/z 260	m/z 368
17		m/z 242	m/z 350
18		m/z 348	m/z 456
19		m/z 330	m/z 438
20		m/z 330	m/z 438

Deste modo, foi inicialmente testada a reação utilizando acetoacetato de etila e acetato de amônio e benzaldeído conforme mostra o **esquema 3**. Alíquotas do meio reacional foram coletadas e diluídas em acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico.



Esquema 3: Reação entre acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio.

O espectro da reação, após 10 minutos, pode ser visto na **Figura 9A** no qual foi possível observar alguns dos intermediários propostos para a RMC de

Hantzsch. O intermediário de imino Knoevenagel **6acfi** (m/z 218) formado a partir da adição do benzaldeído ao aminocrotonato **1afii** de m/z 130 foi detectado e permaneceu presente durante todo o curso da reação. Estes dados deram indícios da participação da via aminocrotonato + aldeído no mecanismo da reação. Após 120 minutos de reação (**Figura 9B**) o intermediário **6acfi** permanece presente, sendo neste momento o intermediário mais intenso do espectro. Este fato já era esperado uma vez que, conforme proposto por Katrizky e colaboradores⁵⁹ a etapa subsequente de adição de Michael do acetoacetato de etila ao produto de Knoevenagel seria a etapa lenta desta reação.

Apesar de não ser mostrado a ampliação do espectro, o produto de Hantzsch é observado desde o início da reação (10 minutos), porém, ao final de 48 horas de reação (**Figura 9C**) vemos como, praticamente único íon no espectro o produto aromatzado de Hantzsch **24acf** m/z 328. Este processo de aromatzação já era previsto uma vez que, embora esses compostos sejam estáveis no estado sólido ou em solução quando mantidos em frascos âmbar, existe uma grande tendência destes compostos a se aromatzarem na presença de luz e em soluções etanólicas.⁶² A **Figura 10** mostra os espectros de MS/MS do produto de Hantzsch, bem como de seu equivalente aromatzado, comprovando estruturalmente sua formação no meio reacional.

⁶² Berson, J. A.; Brown, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *2*, 447.

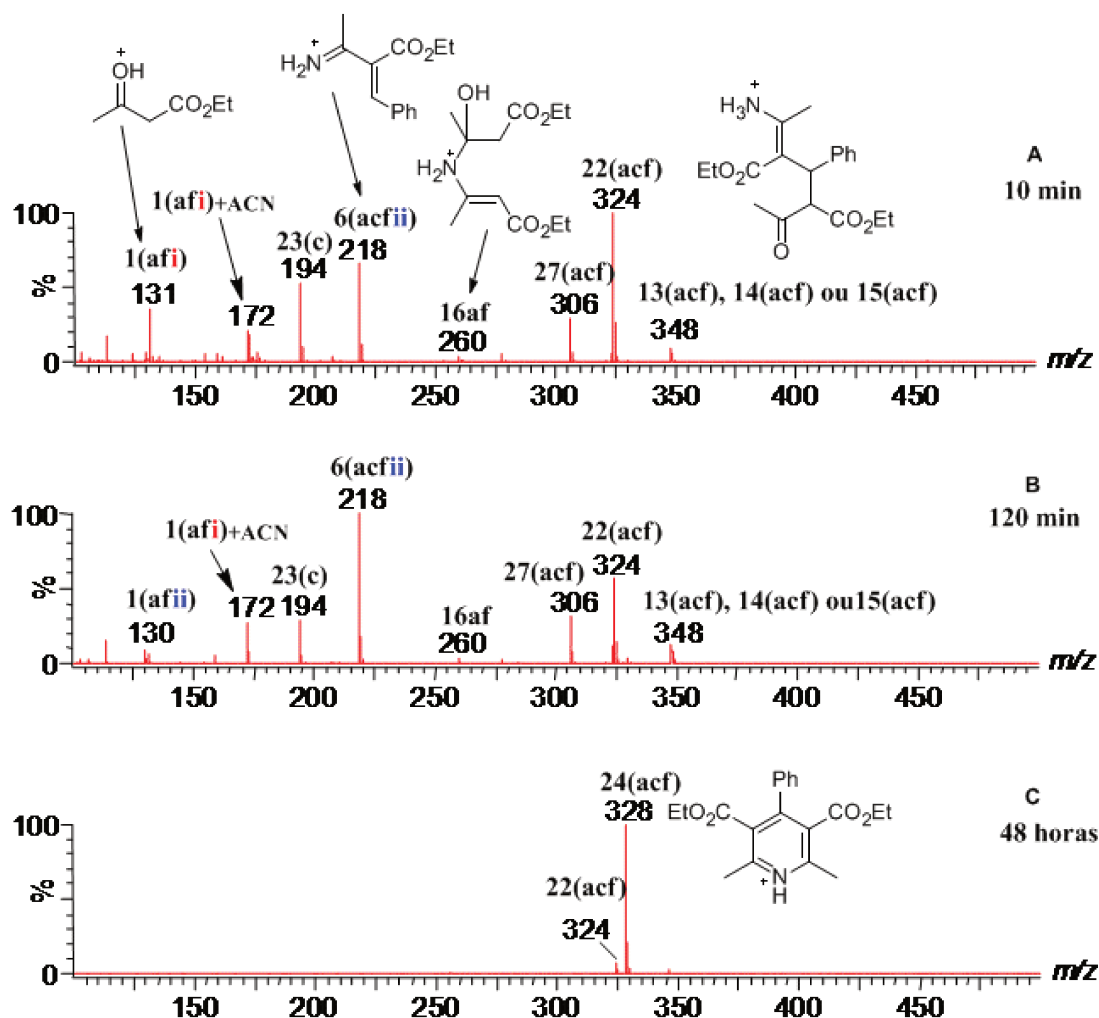


Figura 9: Espectro da RMC de Hantzsch empregando benzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio (reagentes não marcados). (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação.

Adicionalmente foi detectado o intermediário **16af** de m/z 260 proveniente da adição de uma molécula de acetoacetato de etila (**1afi**) ao iminocrotonato (**1afii**). Este intermediário já havia sido detectado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear no trabalho realizado por Katrizky⁵⁹, entretanto a presença deste intermediário mostra apenas um caminho lateral tomado pela reação, uma vez que devido ao fato da etapa lenta da reação exigir a adição de um segundo equivalente de acetoacetato de etila (**1afi**) ao produto de Knoevenagel (**6acfii**), a disponibilidade dos reagentes no meio leva a formação de

produtos laterais que, provavelmente, não tem participação direta no mecanismo adotado pela reação estudada.

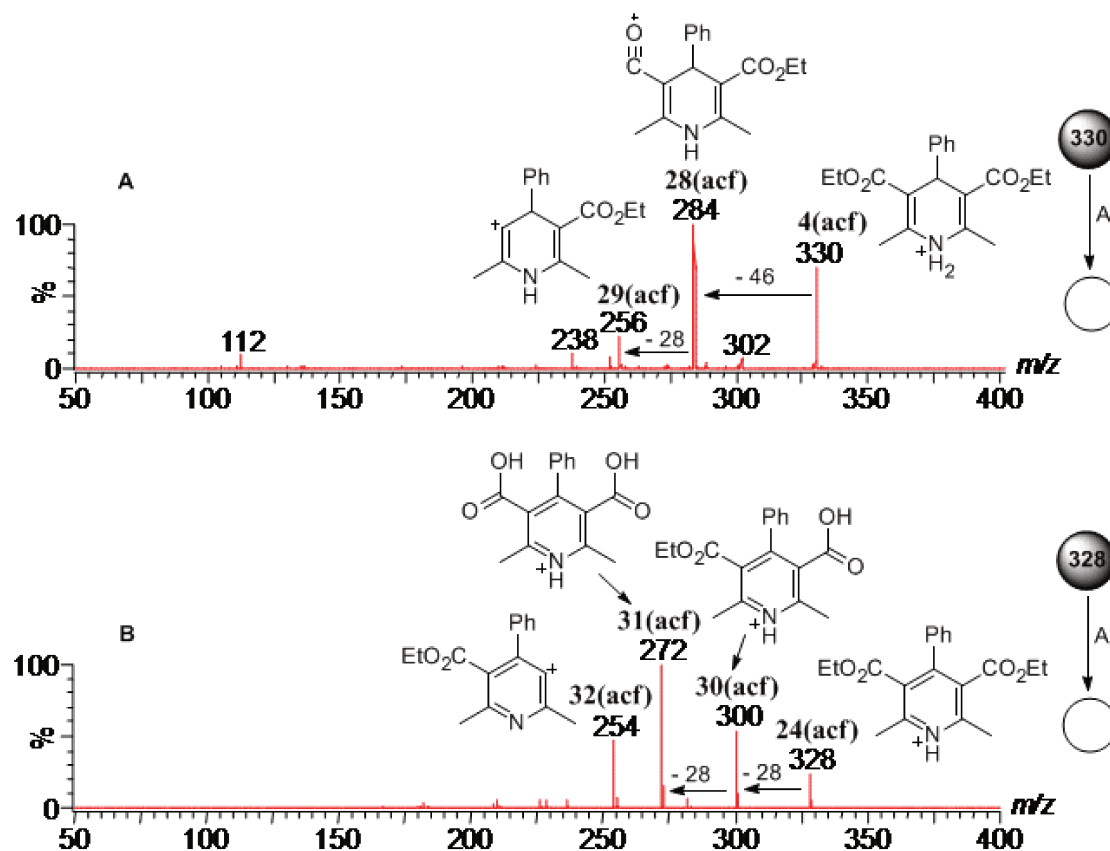


Figura 10: (A) Espectro de MS/MS do produto de Hantzsch. (B) Espectro de MS/MS do produto de Hantzsch aromatizado.

A baixa intensidade do intermediário **16af** nos espectros mostrados na **Figura 9**, bem como a não detecção do intermediário **17af** corroboram com a proposta de Katrizky⁵⁹ de que a via amino-bis-crotonato + aldeído não teria uma participação relevante no mecanismo da RMC de Hantzsch. Entretanto, a detecção do intermediário de m/z 348 (**Figura 9 A e B**) poderia ser atribuída a quatro diferentes compostos mostrados no **Esquema 2**, são eles os intermediários **13acf**, **14acf**, **15acf** e **18acf**.

A presença do intermediário **18acf** seria contrária a proposta de Katrizky⁵⁹ indicando a participação da via amino-bis-crotonato + aldeído no mecanismo da reação. Deste modo, a diferenciação destes compostos isômeros no meio

reacional mostrava-se essencial para a elucidação do mecanismo da RMC de Hantzsch. Felizmente, essa diferenciação foi possível através de experimentos de MS/MS realizados ao longo de todo o curso da reação conforme mostra a **Figura 11**.

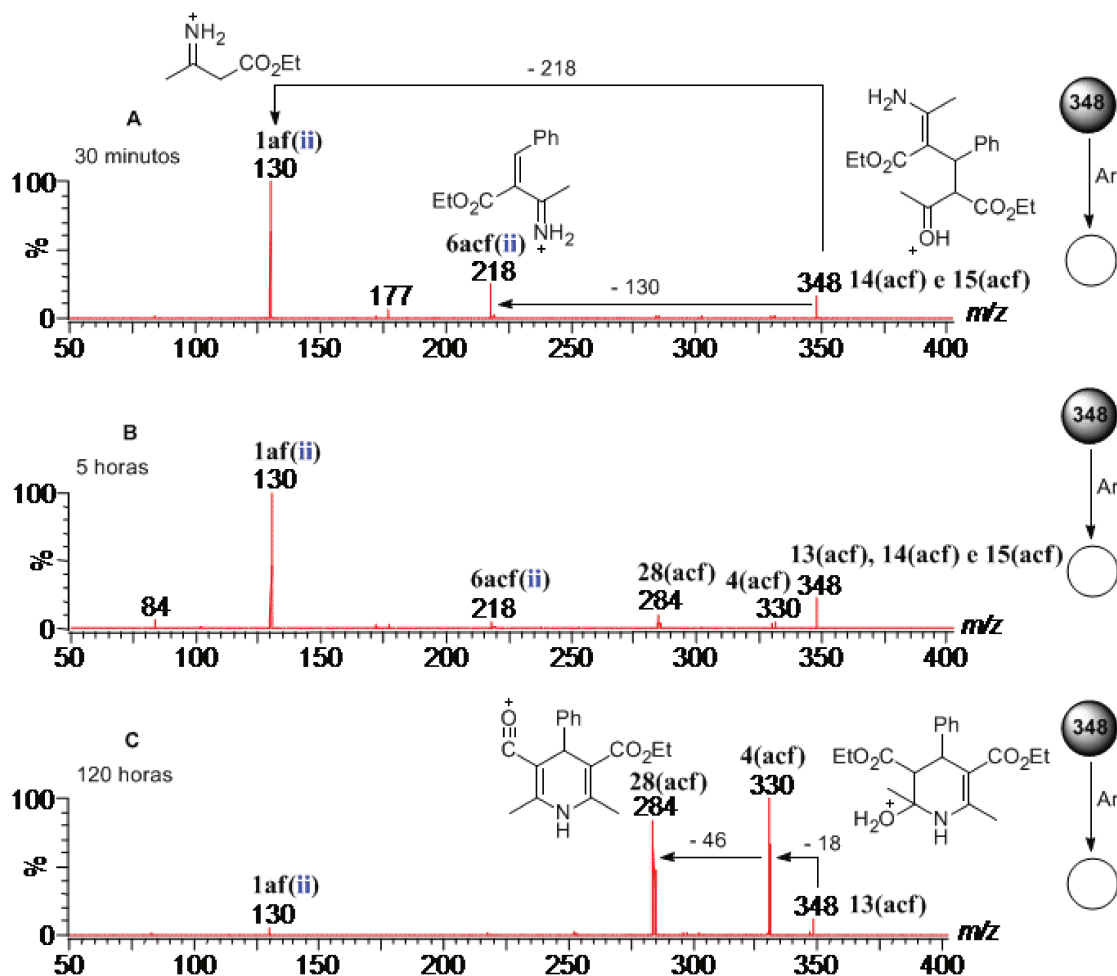


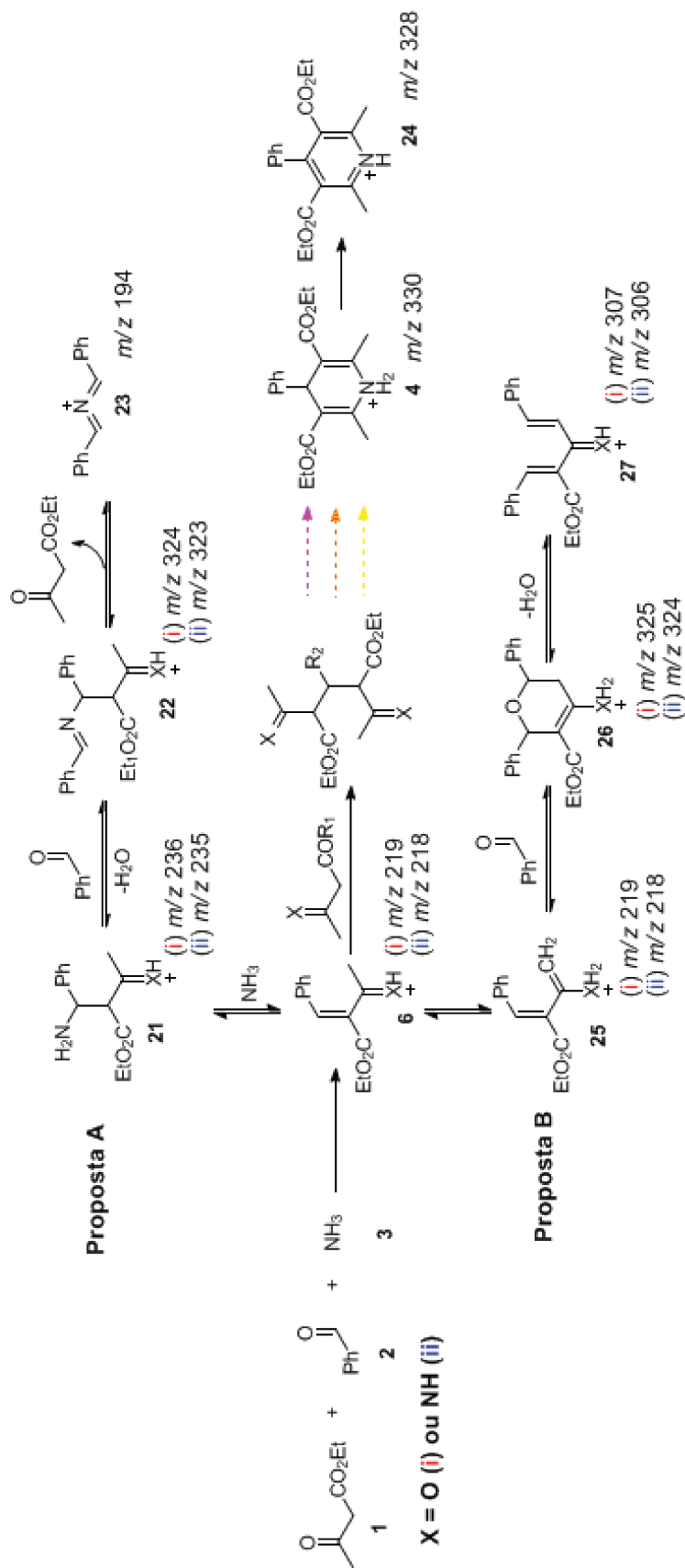
Figura 11: Espectros de MS/MS do íon de m/z 348. (A) Após 30 minutos de reação. (B) Após 5 horas de reação. (C) Após 120 horas de reação.

A fragmentação observada no espectro da **Figura 11A** obtido no estágio inicial da reação indica a presença dos intermediários **14acf** e **15adf** que se interconvertem em um equilíbrio imina/enamina. Esta fragmentação exclui a possibilidade do intermediário **18adf** estar presente neste momento da reação. Esta informação traz novos indícios de que a via amino-bis-crotonato + aldeído não tem grande participação no mecanismo da reação.

Após 5 horas vemos uma pequena mudança no padrão de fragmentação do intermediário (**Figura 11B**) indicando a presença de uma mistura de isômeros no meio reacional. Ao final da reação (**Figura 11C**) vemos uma fragmentação diferente daquela inicialmente observada, sendo esta dividida a presença de um único intermediário provavelmente referente ao composto **13acf**.

A detecção dos intermediários isoméricos **13acf**, **14acf** e **15adf** de m/z 348, bem como sua diferenciação ao longo do tempo, indicam a adição de uma molécula de acetoacetato de etila (**1afi**) ao intermediário imino Knoevenagel (**6acfii**) o que mostra um possível desvio da via aminocrotonato + aldeído inicialmente observada.

Além dos intermediários já descritos observou-se também a presença de dois intermediários inesperados. São eles os intermediários **22acf** de m/z 324 e **27acf** de m/z 306. A proposta para a formação destes intermediários e sua participação no mecanismo da reação de Hantzsch é mostrado em detalhes no **Esquema 4**.



Esquema 4: Representação esquemática dos possíveis caminhos laterais que encontram-se em equilíbrio no decorrer da RMC de Hantzsch utilizando benzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio.

O **Esquema 4** mostra os possíveis caminhos pelos quais a reação de Hantzsch pode seguir partindo do intermediário **6**. Na **Proposta A** a adição de amônia ao intermediário **6** leva a formação de **21** que com adição de uma segunda molécula de aldeído seguida da perda de água leva a formação do intermediário **22**. Este intermediário pode ser isômero ao intermediário **26** descrito na **Proposta B**. Na **Proposta B**⁶³ a adição aldólica de um segundo equivalente do aldeído ao intermediário **6** leva a formação do intermediário **26** que após perda de água forma o composto **27**. A **Figura 12** mostra os espectros de MS/MS dos compostos de m/z 306 e 324.

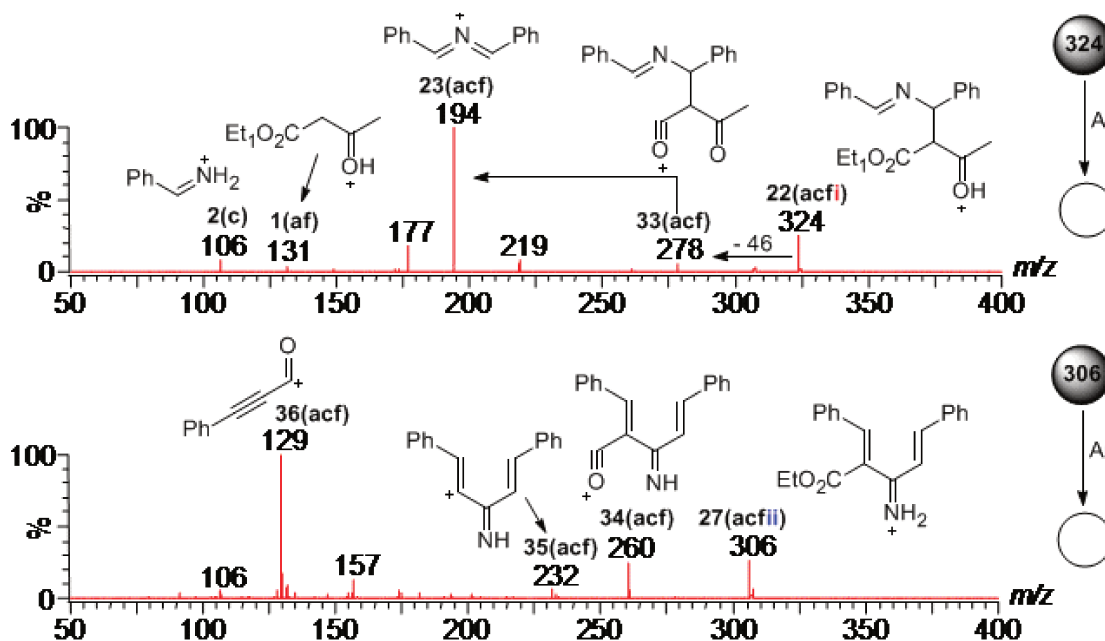


Figura 12: Espectros de MS/MS atribuído aos intermediários formados devido ao excesso de reagentes disponíveis no meio reacional. (A) composto **22(acf)**. (B) composto **27(acf)**.

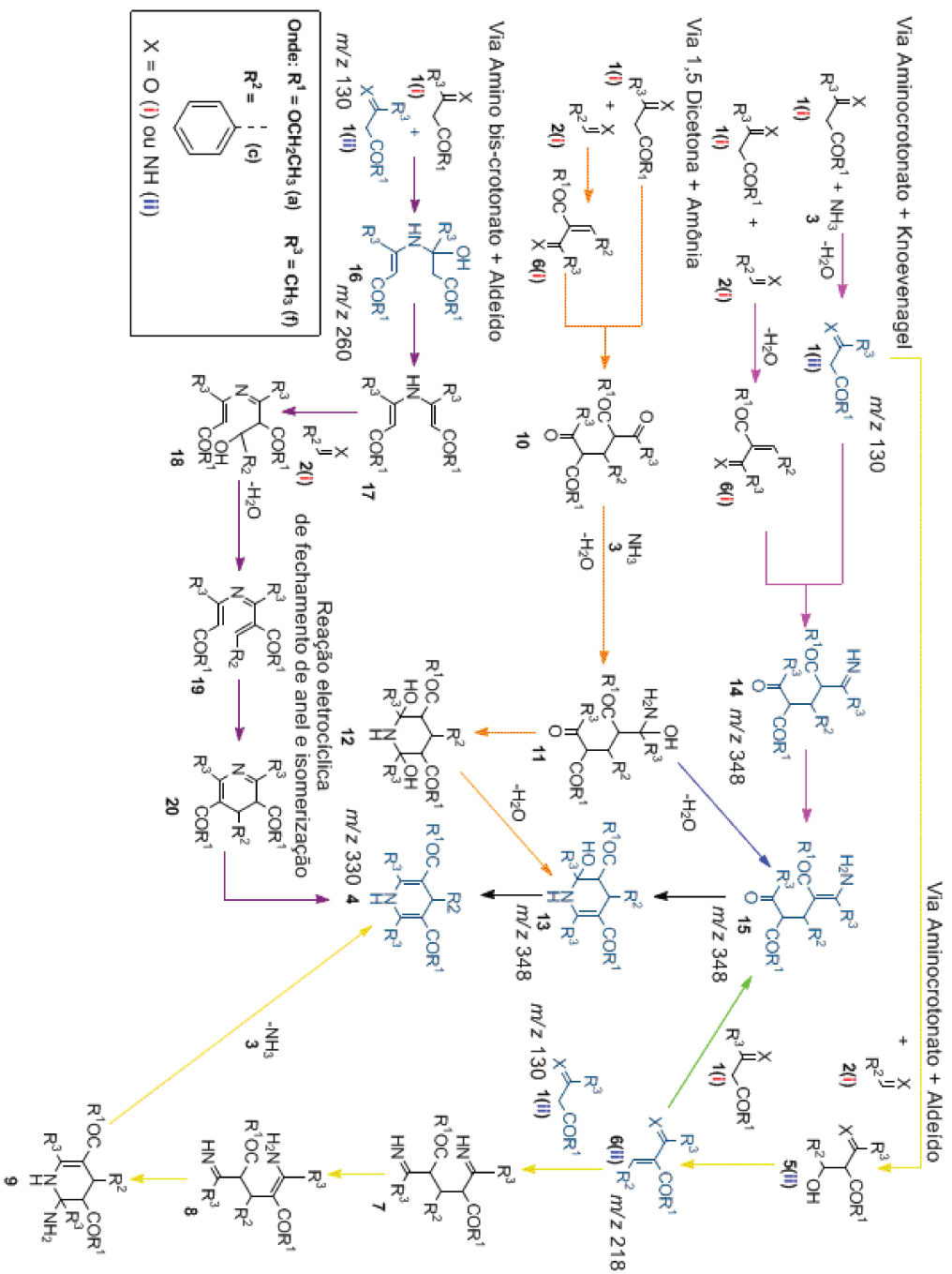
Embora o composto **27acf** de m/z 306, proveniente da **proposta B** (**Esquema 4**) tenha sido detectado (espectro da **Figura 9**) e seu espectro de MS/MS confirme sua estrutura (**Figura 12B**), não há indícios de que o composto de m/z 324 seja de fato o composto **26acf**. Em contrapartida, o espectro de MS/MS (**Figura 12A**) mostra como íon mais intenso o composto **23acf** de m/z 194 (que

⁶³ Litvić, M. F.; Litvić, M.; Ceganec, I.; Vinković, V. *Molecules* **2007**, *12*, 2546.

também é detectado no espectro da **Figura 9)** referente a perda de uma molécula neutra do β -cetoéster a partir do composto **22acf**. Deste modo, acredita-se que ambas as propostas estão corretas e as duas reações ocorrem em equilíbrio no meio reacional.

Adicionalmente, uma vez que o espectro de massas, ao final das 48 horas (**Figura 9C**) de monitoramento da RMC de Hantzsch, mostra apenas o produto aromatizado **24acf** para a reação com benzaldeído, consideraremos que a formação desses compostos (**22**, **23**, **26** e **27**) ocorre em equilíbrio, voltando portanto a formar o intermediário **6** que dará continuidade a reação de acordo com os mecanismos anteriormente propostos não seguindo nenhum outro caminho para a formação do produto.

Deste modo, para este caso utilizando benzaldeído, a presença dos intermediários detectados (**6acf**, **13acf**, **14acf** e **15acf**) indica a participação da via aminocrotonato + imino-Knoevenagel que é uma ramificação da via aminocrotonato + aldeído como sendo a principal via mecanística para a reação de Hantzsch. Os intermediários detectados neste estudo, bem como suas m/z estão destacados em azul no **Esquema 5**.



É de importante destacar que todos os intermediários detectados são compostos nitrogenados e que portanto terão uma maior afinidade por prótons. Esta informação nos traz uma dúvida acerca da real participação destas espécies no mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch, uma vez que sua detecção por espectrometria de massas utilizando a metodologia convencional tende naturalmente a favorecer a detecção destas espécies em detrimento das demais não nitrogenadas que poderiam também estar presentes no meio reacional, sendo neste caso suprimidas.

Por fim, a **Figura 13** mostra os espectros de MS/MS dos demais intermediários detectados neste estudo, comprovando assim, estruturalmente sua presença no meio reacional.

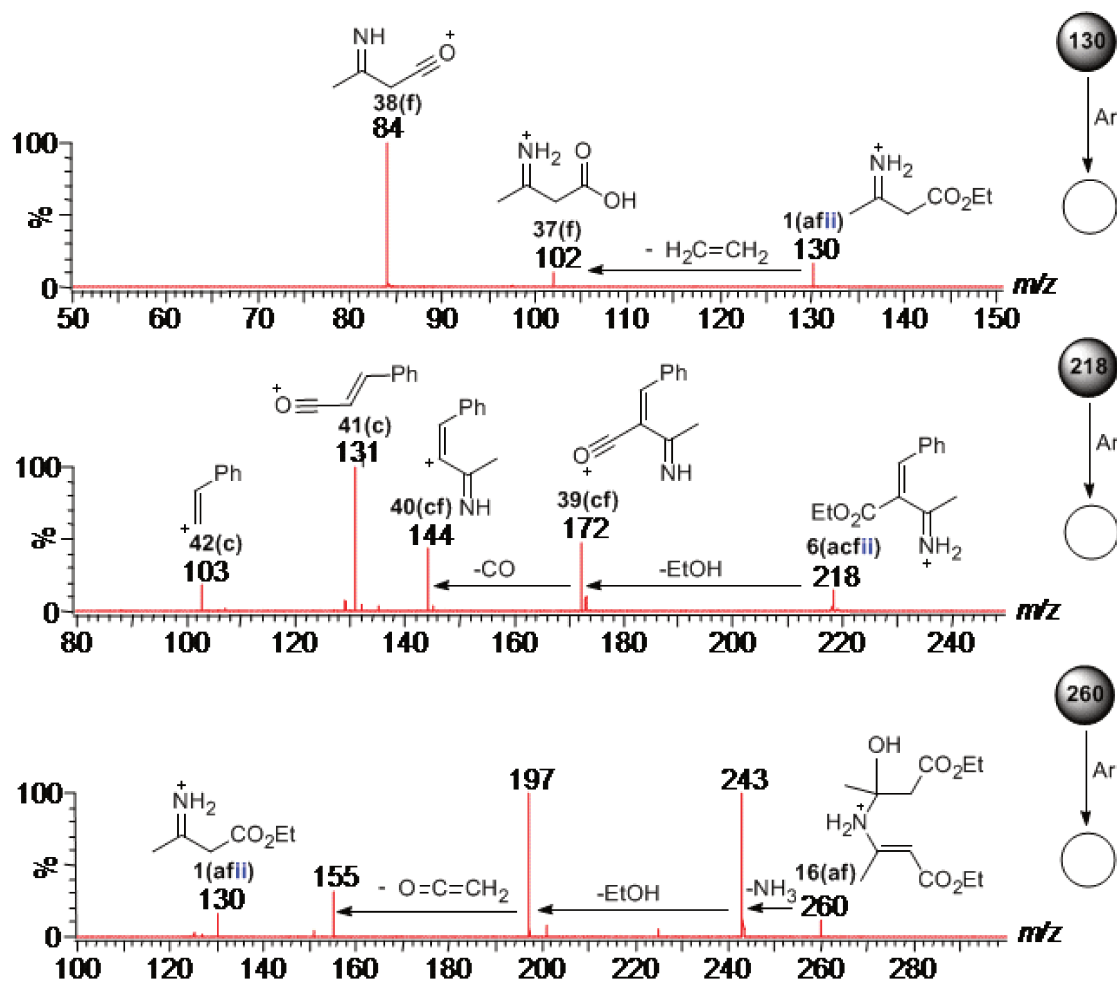
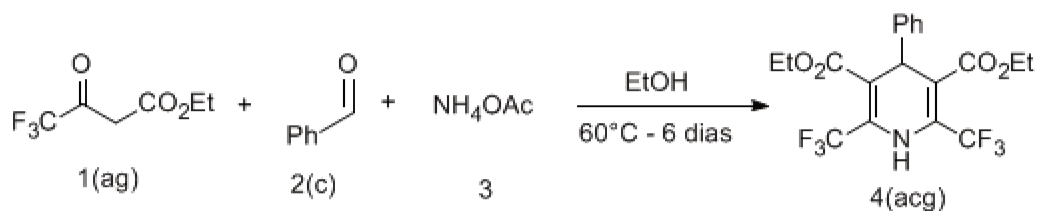


Figura 13: Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch. (A) intermediário 1(afii). (B) intermediário 6(acfii). (C) intermediário 16(af).

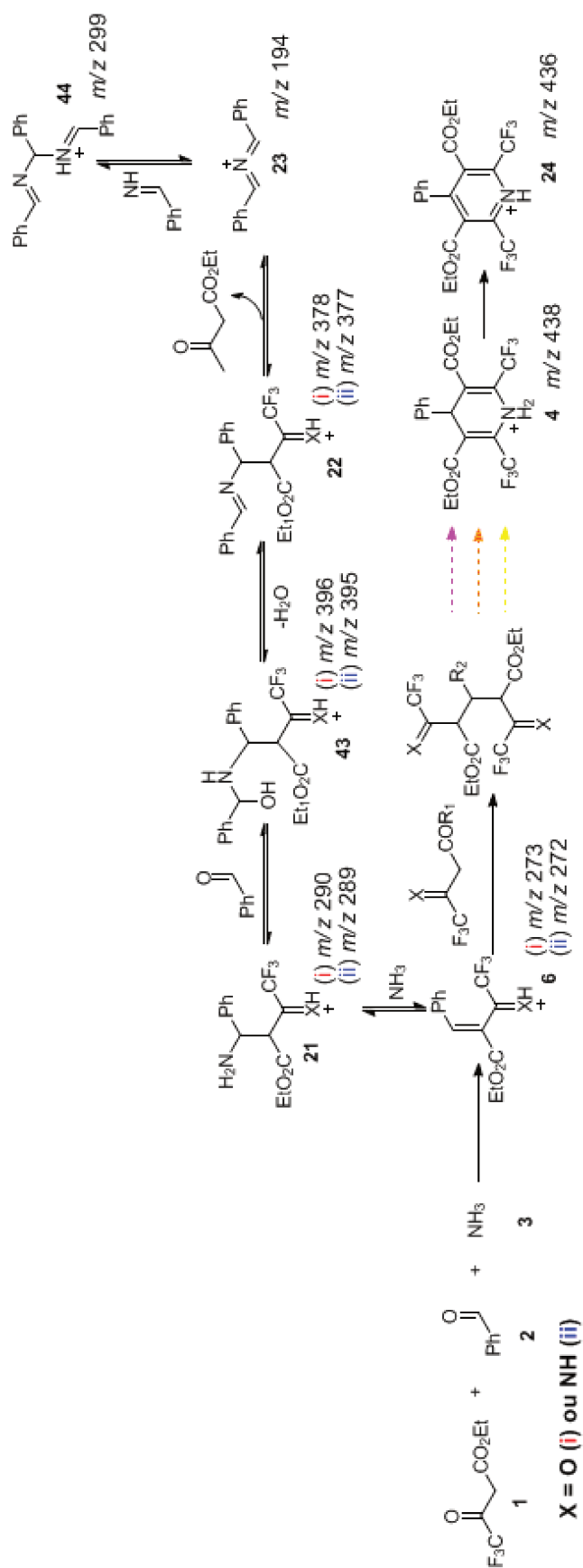
Dando continuidade aos estudos realizados com os reagentes não marcados, reproduzimos a reação de Hantzsch nas condições propostas por Leshner e colaboradores⁶⁰, utilizando o 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila, acetato de amônio e benzaldeído, esta reação foi conduzida em etanol a 60°C, conforme mostra o **Esquema 6**.



Esquema 6: Reação entre o 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila, acetato de amônio e benzaldeído.

Este experimento tinha como objetivo avaliar a formação do intermediário **12** descrito por Leshner e colaboradores⁶⁰ como único produto desta reação, bem como avaliar sua desidratação que levaria a formação do produto de Hantzsch.

O espectro após 10 minutos de reação (**Figura 14A**) mostra que sob estas condições temos uma maior ocorrência de reações laterais conforme descrito no **Esquema 7** e a reação parece proceder de forma mais lenta que o esperado.



Esquema 7: Representação esquemática dos possíveis caminhos laterais que encontram-se em equilíbrio no decorrer da RMC de Hantzsch utilizando benzaldeído, 4,4-trifluoroacetato de etila e acetato de amônio.

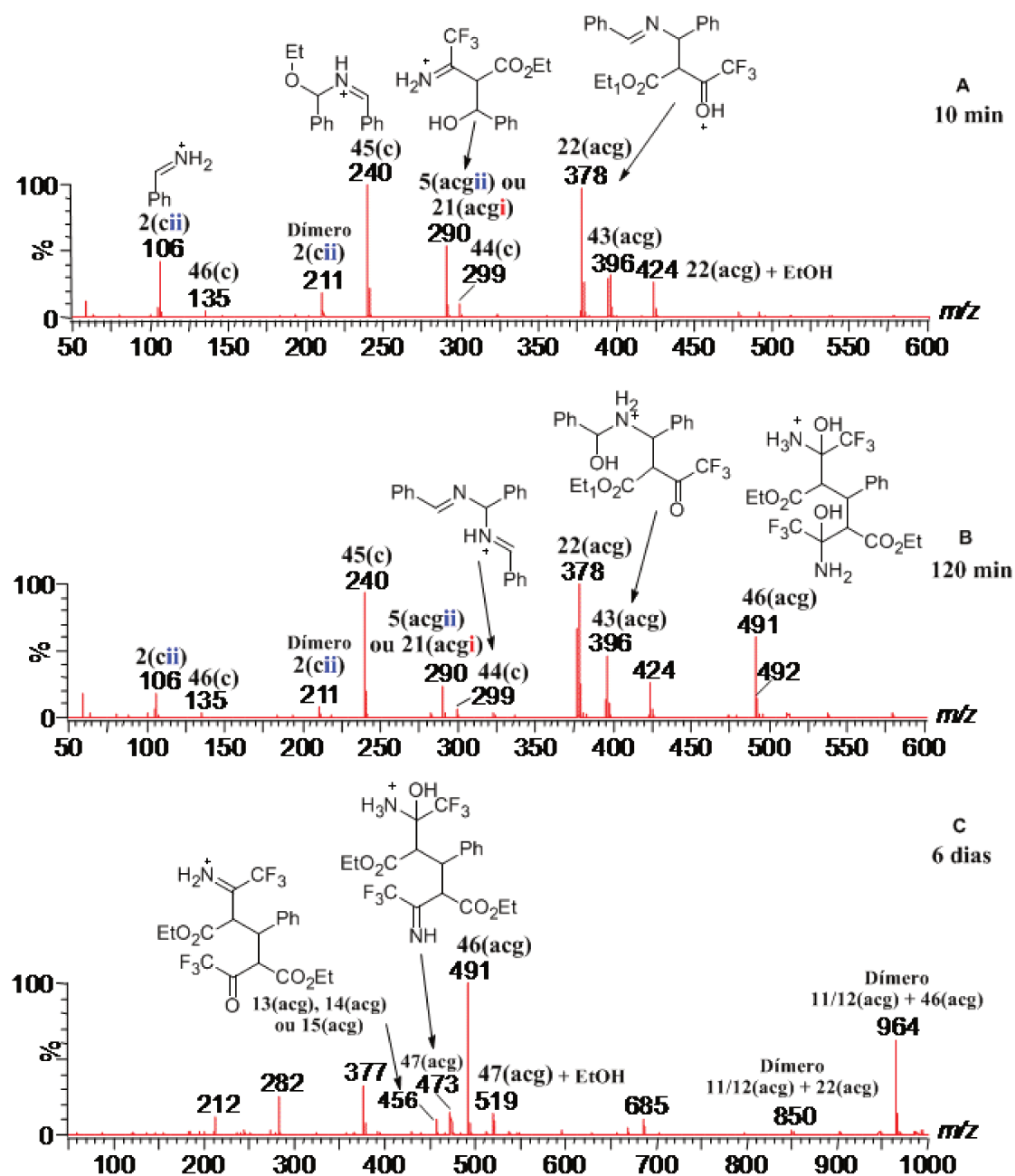


Figura 14: Espectro da RMC de Hantzsch empregando benzaldeído, 4,4,4-trifluoroacetato de etila e acetato de amônio (reagentes não marcados). (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 6 dias de reação.

A **Figura 15** mostra os espectros de MS/MS das espécies formadas por meio destas reações laterais que encontram-se em equilíbrio durante a reação de Hantzsch.

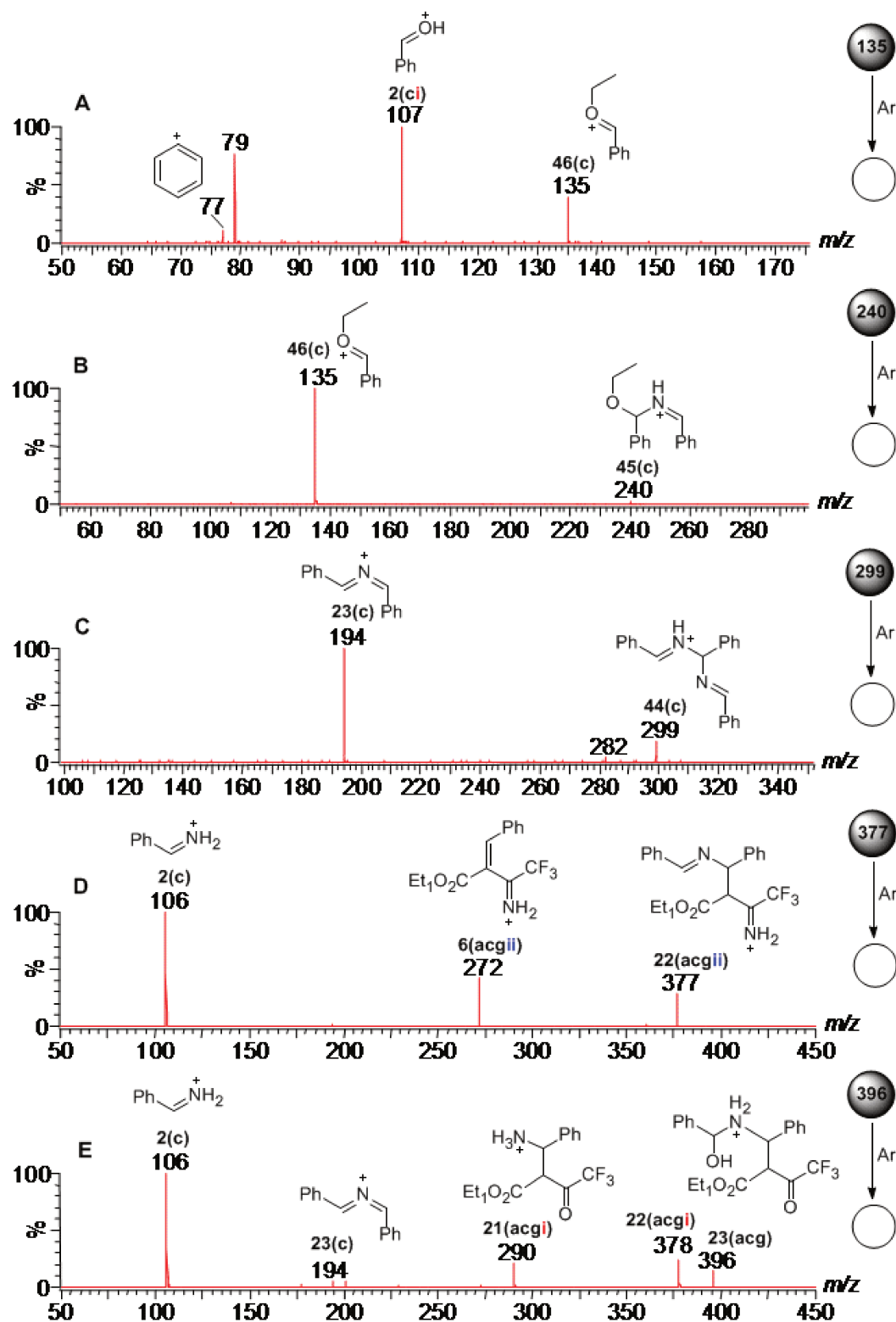


Figura 15: Espectros de MS/MS atribuídos aos intermediários formados devido ao excesso de reagentes disponíveis no meio reacional. (A) composto **46(c)**. (B) composto **45(c)**. (C) composto **44(c)**. (D) composto **22(acgii)**. (E) composto **23(acg)**.

Apesar da maior reatividade esperada para o 4,4,4 trifluoroacetoacetato de etila, que devido ao caráter retirador de elétrons do grupo $-\text{CF}_3$ elevaria consideravelmente a acidez dos hidrogênios α -carbonila facilitando a adição aldólica do enol/enamina (**1**) ao aldeído (**2**) vemos uma menor formação dos intermediários normalmente observados para a reação de Hantzsch.

Após 120 minutos de reação (**Figura 14B**) apenas o intermediário **5(acgii)** de m/z 290 que também pode ser atribuído ao composto **21** mostrado no **Esquema 7** é observado. Uma vez que o intermediário **6**, proveniente da desidratação do intermediário **5**, não é observado em nenhum momento durante todo o monitoramento desta reação, temos um primeiro indício de que a reação de Hantzsch sob estas condições teria uma menor tendência a formar o produto 1,4-dihidropiridina **4** devido a dificuldade de desidratação deste compostos. Este resultado estaria de acordo com o trabalho de Lesher e colaboradores⁶⁰ que, sob estas condições, isolaram o intermediário de Hantzsch **12** e tentaram, sem sucesso, proceder sua desidratação com ácido sulfúrico, anidrido acético, tetracloreto de titânio ou *N, N*-diciclohexilcarbodiimida na tentativa de se obter o produto de Hantzsch **4**.

A formação do intermediário **46(acg)** de m/z 491, que seria um equivalente hidratado do intermediário **11** ou **12(acg)**, corrobora com estes resultados, sendo mais um indício da dificuldade de desidratação dos compostos formados durante a reação utilizando o 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila. Essa dificuldade de desidratação seria uma prova de que o mecanismo passa por um intermediário carbocátion que seria, portanto, desestabilizado pelo grupo $-\text{CF}_3$ retirador de elétrons presente na molécula.

O espectro da **Figura 14C** mostra que mesmo após 6 dias de reação não foi possível observar a formação do produto de Hantzsch **4**. Entretanto, é possível observar, assim como foi mostrado para a reação com acetoacetato de etila (**Figura 9**), uma diminuição significativa dos compostos formados por reações laterais. Isto seria mais um indício de que estes compostos estariam em equilíbrio no meio reacional, sendo formados devido a um excesso de reagentes no meio e devido ao fato da reação apresentar uma cinética mais lenta neste caso.

Após 6 dias de reação vemos que o intermediário **46(acg)** de m/z 491 começa a sofrer um processo de desidratação formando os intermediários **47(acg)** de m/z 473 que seria o equivalente imínio dos intermediários isoméricos **11** ou **12(acg)** de m/z 474 que também estão presentes no espectro da **Figura 14C**. Além disso vemos a presença de complexos formados entre os o intermediário **46(acg)** e o intermediário que pode ser atribuído aos compostos isoméricos **11** ou **12(acg)**. Estas propostas estão de acordo as fragmentações observadas no espectro de MS/MS mostrado na **Figura 16**.

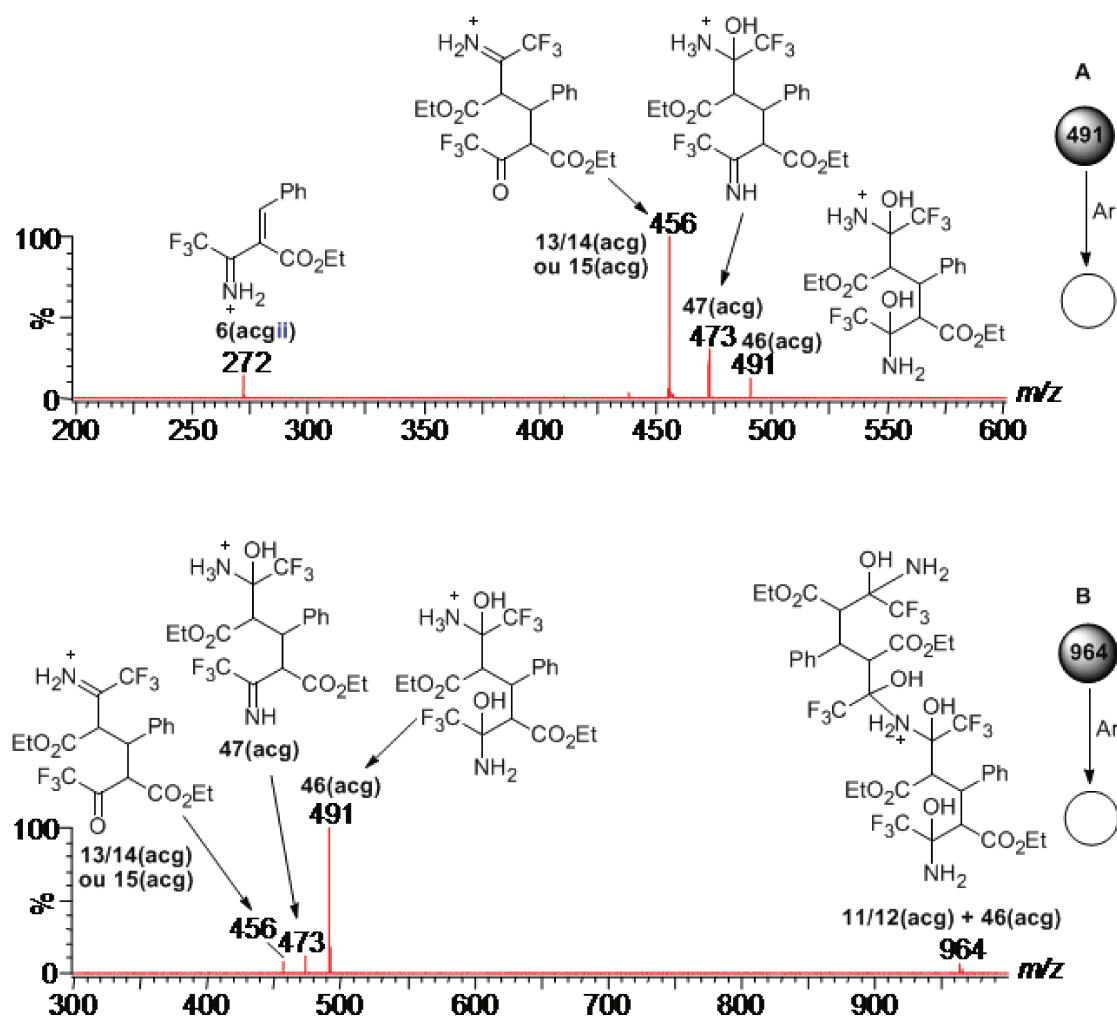


Figura 16: Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch (A) intermediário **46(acg)**. (B) complexo formado pelos intermediários **11/12(acg)** e **46(acg)**.

Por fim, os espectros de MS/MS mostrados na **Figura 17** confirmam, através da caracterização estrutural, a presença dos demais intermediários observados nesta reação.

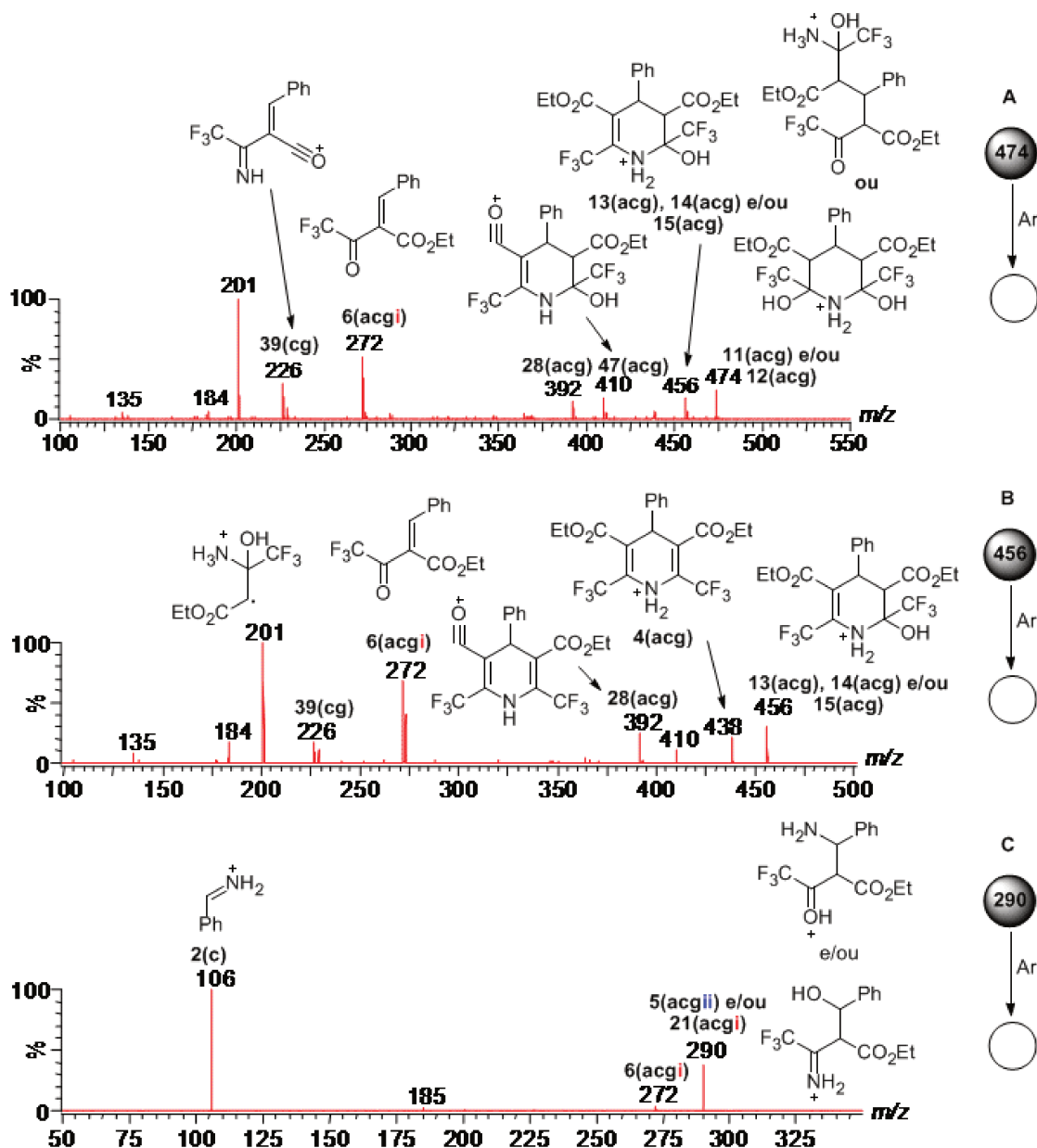


Figura 17: Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch (A) intermediário 11/12(acg). (B) intermediários 13/14(acg) ou 15(acg). (C) intermediários 5(acg) ou 21(acg).

Com base nos intermediários observados através da reação conduzida sob as condições descritas por Lesher e colaboradores, não foi possível associar uma via mecanística descrita no **Esquema 2** como atuante no mecanismo da reação de Hantzsch conduzida sob estas condições. Em contapartida, foi possível observar a dificuldade de desidratação dos intermediários formados o que concorda com as afirmações feitas tanto por Leser e colaboradores⁶⁰ quanto por Katrizky e colaboradores⁵⁹. Entretanto, uma vez que esta reação parece proceder de forma mais lenta, tempos reacionais mais longos (superiores aos 6 dias) deveriam ser avaliados para que uma conclusão mais concreta, acerca do mecanismo tomado por esta reação, pudesse ser tomada, de forma a termos uma resposta mais conclusiva.

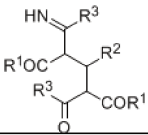
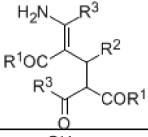
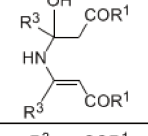
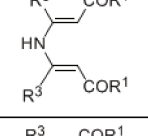
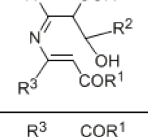
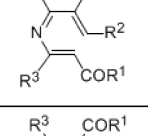
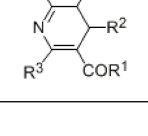
Deste modo, foi feito um acompanhamento da reação multicomponente de Hantzsch por ESI(+)-MS/(MS) utilizando o método convencional com adição de aditivos (ácido fórmico) para favorecer a protonação e portanto a detecção das espécies presentes no meio. Na sequência esta mesma reação será estudada utilizando reagentes marcados com uma “etiqueta” de carga afim de avaliarmos se a presença destes intermediários carregados colaboram para um melhor entendimento acerca do mecanismo pelo qual a reação de Hantzsch ocorre.

3.4.1.2 Reagentes marcados com “etiqueta” de carga (iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida e iodeto de *p*-trimetilamôniobenzaldeído) empregados no estudo da reação de Hantzsch

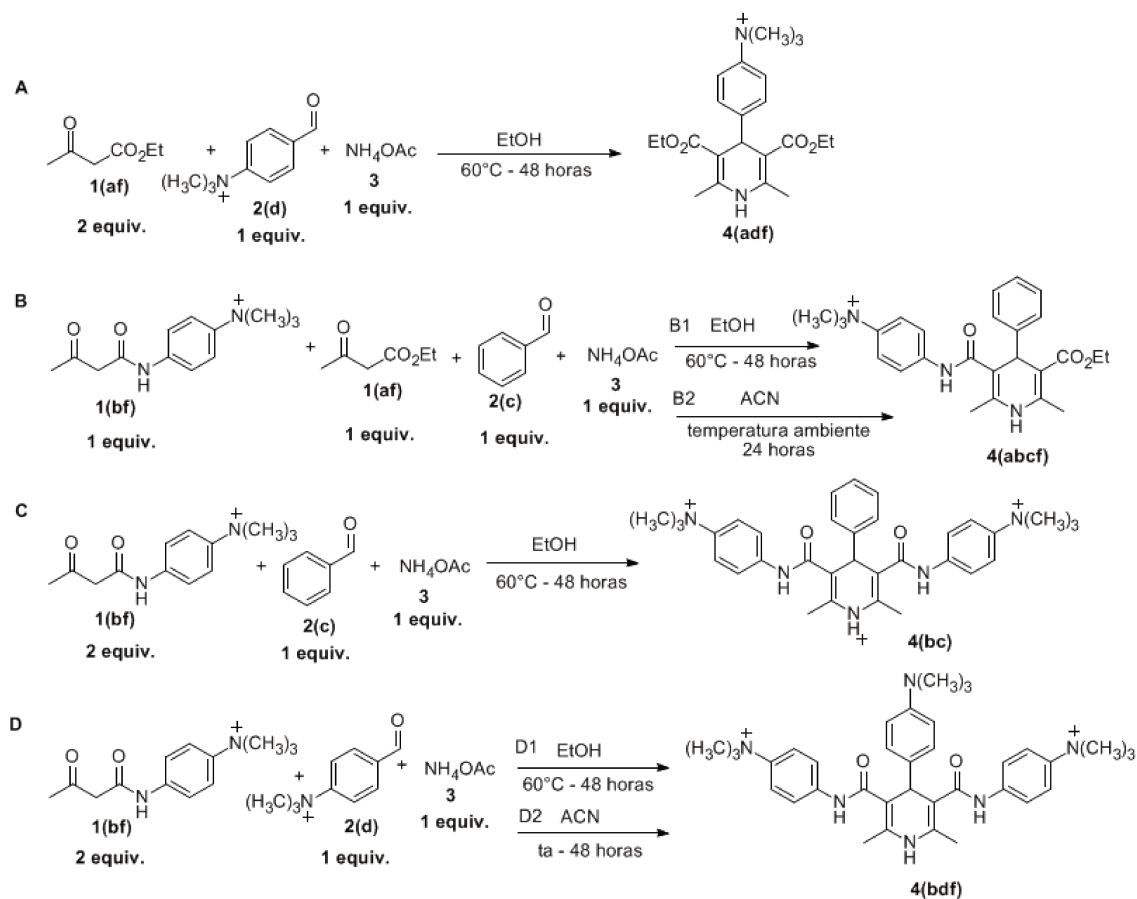
Para facilitar a visualização das espécies detectadas as razões massa/carga esperadas para cada intermediário segundo a numeração do **Esquema 2**, são apresentada na **Tabela 2**.

Tabela 2: Razão massa carga das espécies envolvidas no mecanismo da reação de Hantzsch.
 Legenda: * molécula dicarregada, ** molécula tricarregada.

Estrutura X = O (i) ou NH (ii)		(bcf) R ² = Ph R ³ = CH ₃ 	(adf) R ² =	(bdf) R ² =	(abcf) R ² = Ph R ³ = CH ₃
1		(i) m/z 235 (ii) m/z 234	(i) m/z 131 (ii) m/z 130	(i) m/z 235 (ii) m/z 234	(i) m/z 235 (ii) m/z 234
2		(i) m/z 107 (ii) m/z 106	(i) m/z 164 (ii) m/z 163	(i) m/z 164 (ii) m/z 163	(i) m/z 107 (ii) m/z 106
4		m/z 270*	m/z 387	m/z 199**	m/z 434
5		(i) m/z 341 (ii) m/z 340	(i) m/z 294 (ii) m/z 293	(i) m/z 200* (ii) m/z 199*	(i) m/z 341 (ii) m/z 340
6		(i) m/z 323 (ii) m/z 322	(i) m/z 276 (ii) m/z 275	(i) m/z 191* (ii) m/z 190*	(i) m/z 323 (ii) m/z 322
7		m/z 278*	m/z 404	m/z 205**	m/z 451
8		m/z 278*	m/z 404	m/z 205**	m/z 451
9		m/z 278*	m/z 404	m/z 205**	m/z 451
10		m/z 279*	m/z 406	m/z 206**	m/z 453
11		m/z 288*	m/z 423	m/z 211**	m/z 470
12		m/z 288*	m/z 423	m/z 211**	m/z 470
13		m/z 279*	m/z 405	m/z 205**	m/z 452

14		m/z 279*	m/z 405	m/z 205**	m/z 452
15		m/z 279*	m/z 405	m/z 205**	m/z 452
16		m/z 235*	m/z 260	m/z 235*	m/z 364
17		m/z 226*	m/z 242	m/z 226*	m/z 346
18		m/z 279*	m/z 405	m/z 205**	m/z 452
19		m/z 270*	m/z 387	m/z 199**	m/z 434
20		m/z 270*	m/z 387	m/z 199**	m/z 434

Para a investigação da reação de Hantzsch utilizando os reagentes contendo a “etiqueta” de carga foram realizados quatro experimentos descritos no **Esquema 8 (A-D)**.



Esquema 8: Reações multicomponente de Hantzsch estudadas utilizando reagentes marcados com a “etiqueta de carga”.

Nestes, apenas o acetato de amônio foi mantido em todos os experimentos e sempre na mesma proporção (1 equivalente). Nos demais experimentos, os reagentes iodeto de *p*-trimetilamôniobenzaldeído, em substituição ao benzaldeído convencional, e o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida, em lugar do β -cetoéster comumente utilizado, foram empregados na RMC de Hantzsch individualmente e em um caso particular (**Esquema 8D**) combinados. Vale ressaltar que o experimento mostrado no **Esquema 8B** empregou o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida em combinação com o acetoacetato de etila com o intuito de comparar a interferência de uma carga positiva na molécula na adição do segundo equivalente do composto dicarbonílico.

Em um primeiro momento a reação entre acetoacetato de etila (**1af**), iodeto de *p*-trimetilamôniobenzaldeído (**2d**) e acetato de amônio (**3**) foi realizada em

etanol a 60°C (**Esquema 8A**). Alíquotas do meio reacional foram coletadas e diluídas em acetonitrila (sem adição de ácido) e o espectro da reação após 10 minutos é mostrado na **Figura 18A** onde foi possível observar alguns dos intermediários propostos para a RMC de Hantzsch.

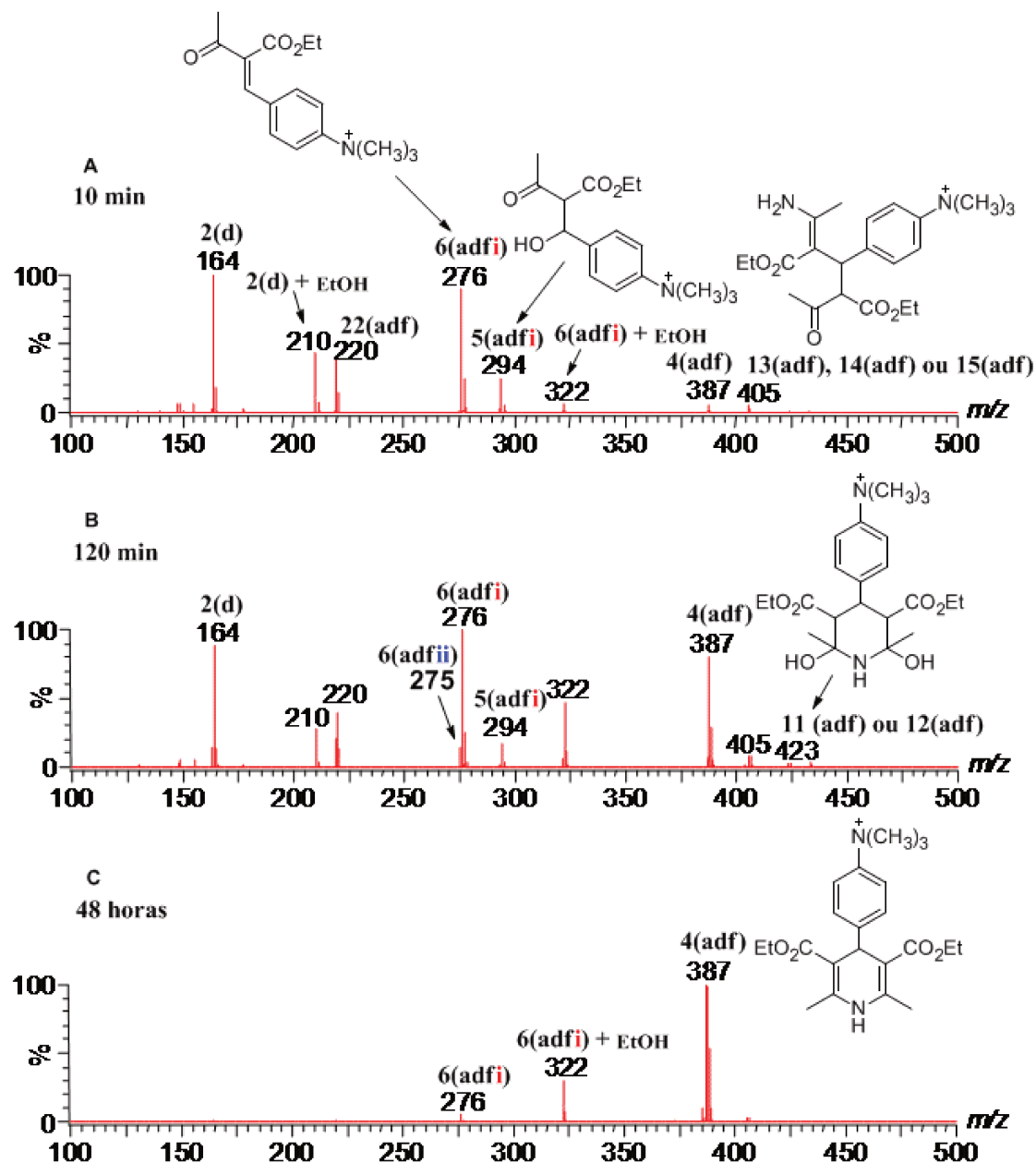


Figura 18: Reações estudadas utilizando o iodeto de *p*-trimetilamonioibenzaldeído (reagente marcado com “etiqueta de carga”), acetoacetato de etila e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação.

O intermediário **5adf** de m/z 294 proveniente da adição do aldeído ao β -cetoéster foi observado, assim como o produto de Knoevenagel **6adfi** (m/z 276) formado a partir da desidratação de **5adf**. Este mesmo intermediário foi observado, após 120 minutos de reação (**Figura 18B**) tanto na forma cetônica como na forma da imina (**6adfi** e **6adfii**) mostrando que mais de uma via mecanística está ocorrendo durante o curso da reação.

Foram observados também, após 120 minutos de reação (**Figura 18B**) intermediários isoméricos de m/z 423 referente aos compostos **11adf** ou **12adf** a presença destes intermediários indica que a via 1,5 Dicetona + amônia também estão ocorrendo no meio reacional. Apesar de Katrizky e colaboradores⁵⁹ não terem identificado nenhum dos intermediários desta via, sua detecção por espectrometria de massas concorda com as observações feitas por Leshner e colaboradores⁶⁰ que já haviam interceptado o diol **12** como único produto da reação quando utilizavam 4,4,4-trifluoroacetatoacetato, *m*-nitrobenzaldeído e acetato de amônio (reação semelhante a estudada no subitem anterior).

A detecção destes intermediários dão mais um indício de que mais de uma via mecanística pode estar ocorrendo, embora tenhamos uma predominante que leva ao produto desejado, enquanto que as demais estão em equilíbrio reestabelecendo os intermediários anteriores e formando o produto pela via principal.

Adicionalmente os intermediários isômeros **13adf**, **14adf** e **15adf** de m/z 405 foram detectados desde o início da reação, assim como o produto de Hantzsch **4adf** de m/z 387.

A **Figura 19** mostra uma ampliação do espectro em 120 minutos de reação no qual foi possível identificar intermediários que participam de três vias diferentes, sendo elas a via aminocrotonato + Knoevenagel, a via 1,5 Dicetona + amônia e a via aminocrotonato + aldeído (veja **Esquema 2**).

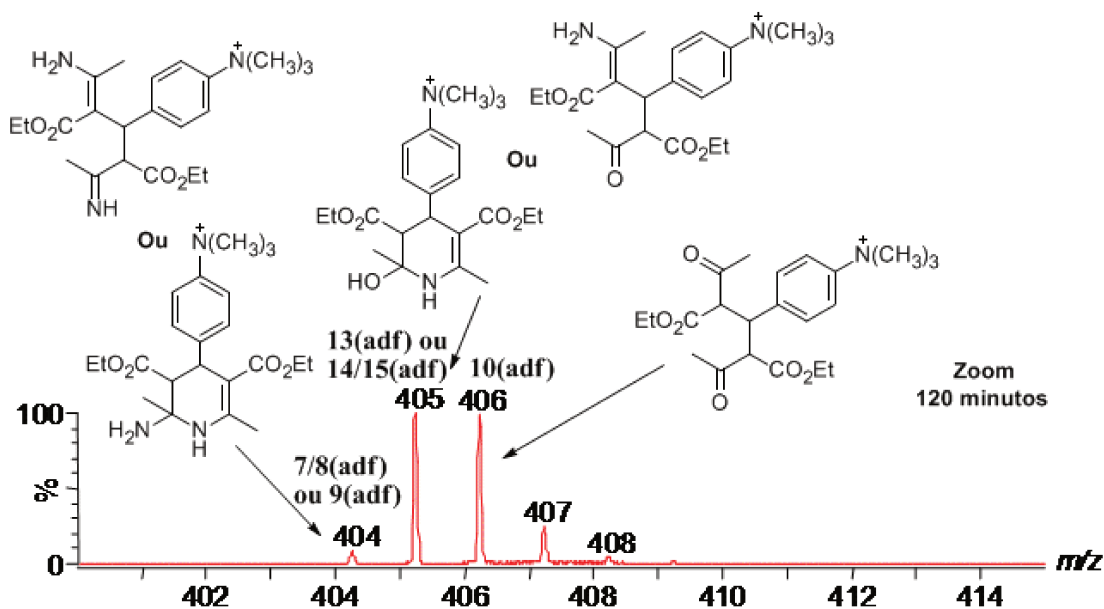


Figura 19: Ampliação do espectro obtido após 120 minutos de reação utilizando o iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído (reagente marcado com “etiqueta de carga”), acetoacetato de etila e acetato de amônio.

Também, foi possível observar, na **Figura 19**, a presença do intermediário *m/z* 406 (além do intermediário de *m/z* 405 anteriormente mencionado) referente ao composto **10adf** que vem corroborar para a hipótese da via 1,5 Dicetona + amônia estar ocorrendo durante o curso da reação podendo levar também a formação da 1,4-dihidropiridina de Hantzsch.

Infelizmente, os experimentos de MS/MS do intermediário de *m/z* 405 obtidos ao longo do tempo não possibilitaram, no período investigado, a diferenciação dos intermediários isômeros **13adf**, **14adf** e **15adf** conforme foi possível com a reação feita com reagentes não marcados. Isso pode ser explicado pela presença da carga positiva ligada covalentemente a esses compostos, que leva a fragmentações em sítios distantes da carga (*Charge Remoted Fragmentation*)⁶⁴ conforme pode ser observado no espectro da **Figura 20**.

Fragmentações que ocorrem em sítios distantes da carga são processos pelos quais um íon contendo uma longa cadeia ou anéis em sua estrutura e uma carga fixa, sob uma ativação energética por colisão são fragmentados em ligações

⁶⁴ Cheng, C.; Gross, M. L. *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, 19, 398.

distantes da carga, formando íons produtos que são característicos de cada estrutura. Embora estes processos tenham sido satisfatoriamente utilizados para determinação estrutural de ácidos graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos, triacilgliceróis, esteróides, peptídeos, ceramidas e outros compostos. Os mecanismos destas reações em fase gasosa são ainda muito debatidos não havendo um mecanismo que explique todos os dados obtidos.⁶⁴

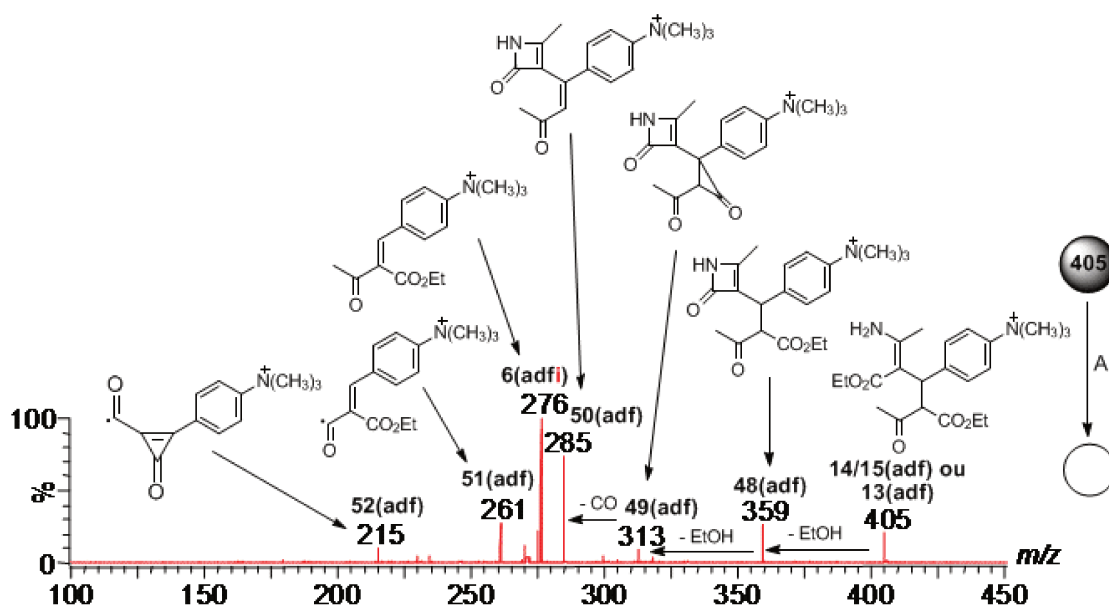


Figura 20: Espectro de MS/MS do íon de m/z 405.

Estas fragmentações complexas se repetiram nos espectros de MS/MS dos demais intermediários presentes no meio reacional e isto se mostrou como uma limitação do uso de reagentes carregados em investigações mecanísticas, uma vez que dificulta a caracterização estrutural dos intermediários formados ao longo da reação.

Um outro exemplo pode ser visto no espectro de MS/MS do íons de m/z 423 atribuído aos intermediários isoméricos **11adf** e/ou **12adf** mostrado na **Figura 21** cuja perda de água que seria esperada para esta estrutura não foi observada, seguindo este composto um outro caminho de fragmentação.

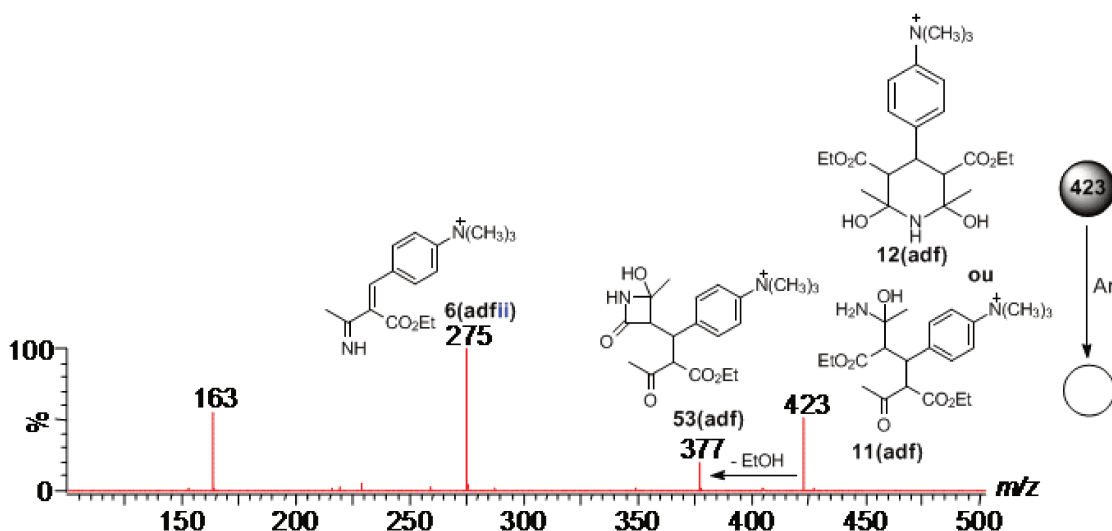


Figura 21: Espectro de MS/MS do íon de m/z 423.

Além dos intermediários esperados, foram observados também, na **Figura 18**, íons de m/z 220 referente ao composto **22adf** que é um composto dicarregado e m/z 155 também dicarregado referente ao composto **23adf**. Estes intermediários são, provavelmente, os mesmos identificados para a reação com benzaldeído (mostrado na **Figura 9**) e estão em equilíbrio no meio reacional.

Ao contrario do que era esperado, uma vez que o aldeído marcado apresenta uma reatividade maior que o benzaldeído, estes intermediários (**22adf** e **23adf**) se apresentaram menos intensos nos espectros da **Figura 18** que aqueles observados na reação com benzaldeído mostrada nos espectros da **Figura 9**. Entretanto isso se deve, provavelmente, ao fato de que sendo mais reativo a barreira energética a ser transposta na etapa lenta da reação (adição de Michael do aminocrotonato ao produto de Knoevenagel) torna-se menor, evitando o acúmulo destas espécies e deslocando o equilíbrio para a formação do produto de Hantzsch (**4**).

Por fim, a **Figura 22** mostra os espectros de MS/MS dos demais intermediários detectados utilizando o iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído, acetoacetato de etila e acetato de amônio na reação multicomponente de Hantzsch.

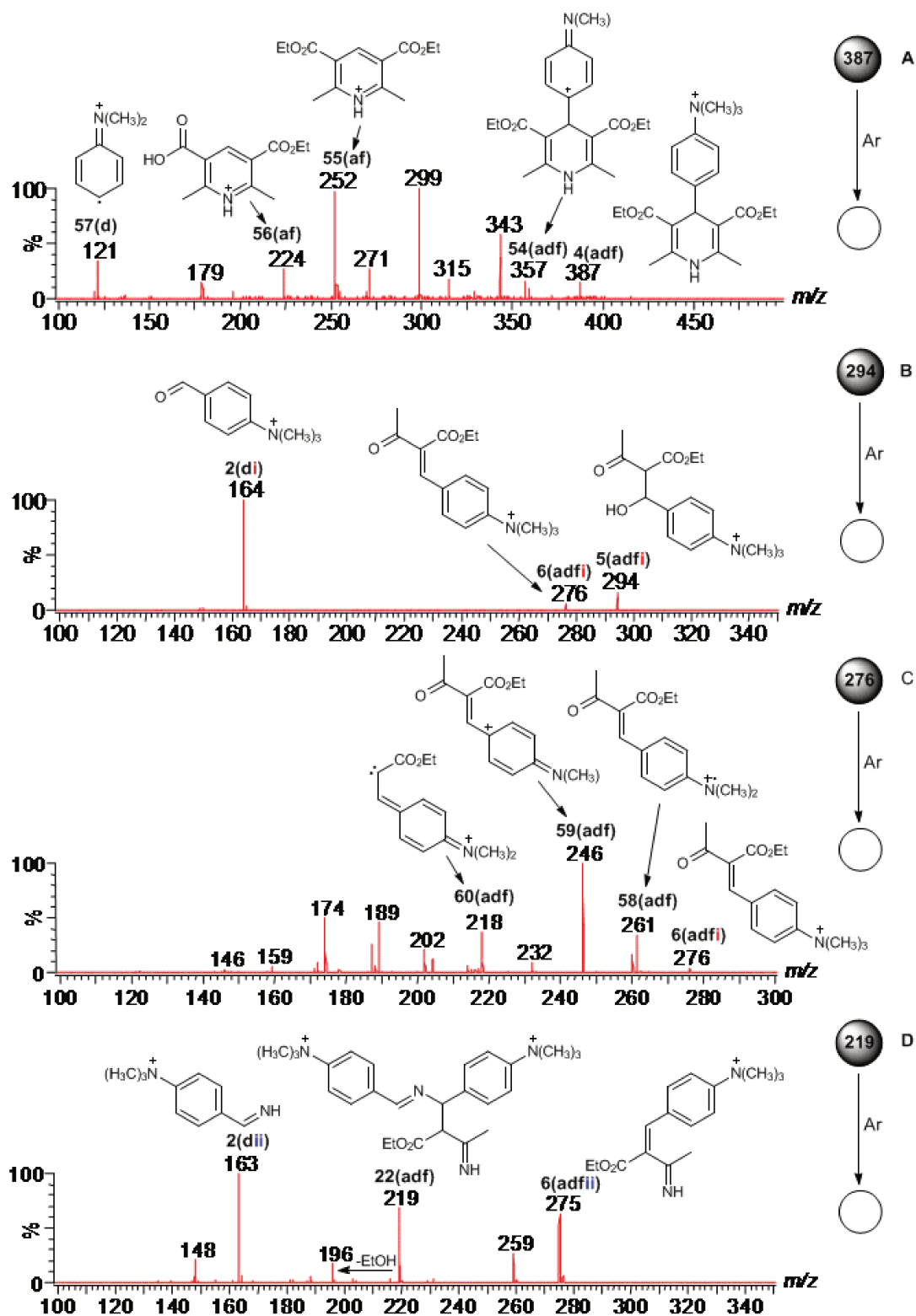
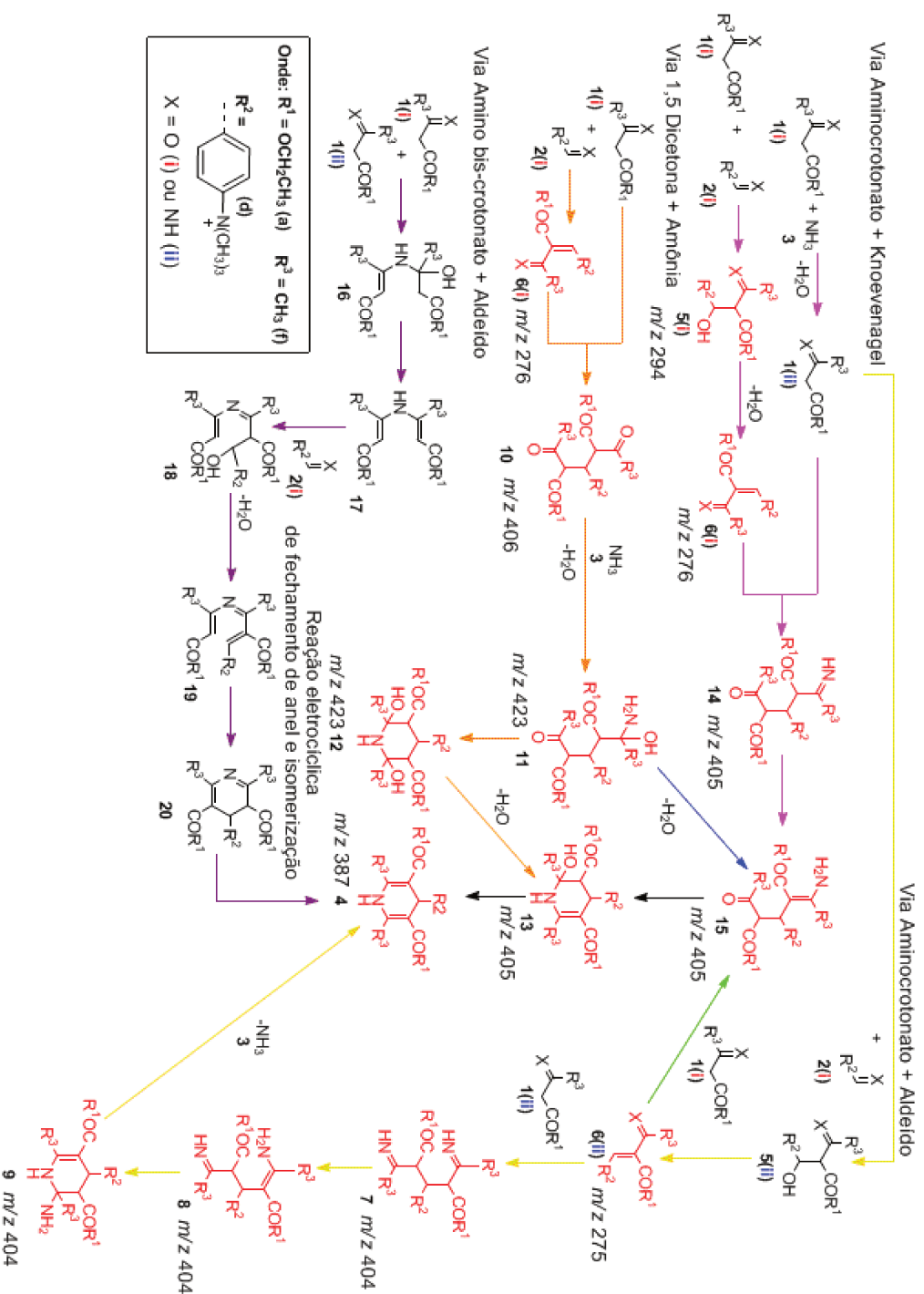


Figura 22: Espectros de MS/MS dos intermediários da reação de Hantzsch utilizando reagente marcado. (A) produto de Hantzsch **4(adf)**. (B) aduto de Knoevenagel **5(adfi)**. (C) produto de Knoevenagel **6(adfi)**. (D) composto **22(adfii)** dicarregado.

Deste modo, conforme mostra o **Esquema 9** todos os intermediários das vias aminocrotonato + Knoevenagel, 1,5 Dicetona + amônia e aminocrotonato + aldeído que continham o aldeído marcado com a “etiqueta” de carga foram detectados. Adicionalmente, avaliando a intensidade relativa do intermediário **6adf** em relação aos demais intermediários da via (**13adf**, **14adf** e **15adf**) vemos a concordância dos dados com os já anteriormente propostos por Katrizky⁵⁹, no qual a etapa lenta da reação seria a adição de Michael do aminocrotonato ao produto de Knoevenagel levando, desta forma, a um acúmulo do intermediário **6** no meio reacional.



Assim, foi possível observar, para a reação utilizando o aldeído marcado com a “etiqueta” de carga, uma quantidade maior de intermediários que os observados com a reação utilizando benzaldeído. Os intermediários marcados mostram a participação das vias 1,5 dicetona + amônia e da via aminocrotonato + Knoevenagel, bem como da via aminocrotonato + amino-Knoevenagel, que havia sido observada na reação mostrada no espectro da **Figura 9**.

Dando seguimento ao estudo utilizando os reagentes marcados a reação entre acetoacetato de etila (1 equivalente), iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (1 equivalente), benzaldeído (1 equivalente) e acetato de amônio (1 equivalente) foi realizada em etanol a 60°C (**Esquema 8B1**).

Alíquotas do meio reacional foram coletadas e diluídas em acetonitrila (sem adição de aditivos) e o espectro da reação após 10 minutos é mostrado na **Figura 23A** onde foi possível observar intermediários tanto da reação envolvendo o reagente marcado com a “etiqueta” de carga como os devido a reação sem envolvimento deste composto.

O íon **6(acfii)** de m/z 218 que corresponde ao produto de Knoevenagel formado pela reação do acetoacetato de etila e o benzaldeído e não possui a “etiqueta de carga”, deste modo vemos que o mesmo aparece no espectro em baixa intensidade uma vez que seu sinal está provavelmente sendo suprimido pelos demais sinais, que já se encontravam na forma iônica em solução, como é o caso do produto de Knoevenagel formado pela consensação entre o benzaldeído e o *p*-trimetilamônio acetoacetamida **6(bcfi)** de m/z 323 também observado no espectro da **Figura 23A**, que é isomero do intermediário **22acf** formado devido ao excesso de reagentes presente no meio.

Após 120 minutos de reação (**Figura 23B**) já é possível observar a presença do produto de Hantzsch **4bcf** de m/z 270, formado apenas com o reagente marcado, sendo portanto um íon dicarregado. Foi também possível observar a presença do produto de Hantzsch **4abcf** de m/z 434 formado por um equivalente de acetoacetato de etila e um equivalente de *p*-trimetilamônio acetoacetamida.

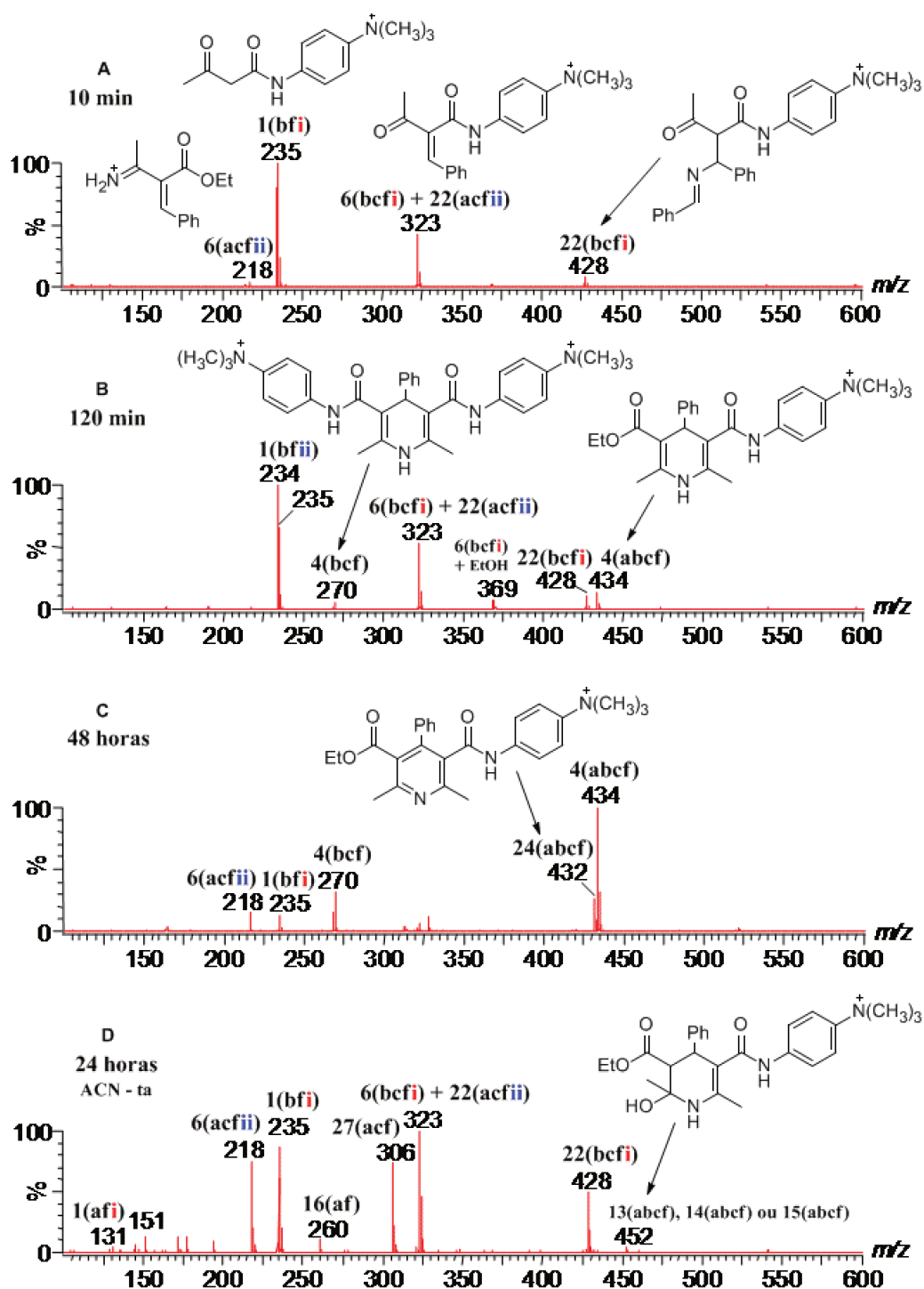


Figura 23: Reações estudadas utilizando o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (reagente marcado com “etiqueta” de carga), acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação. (D) Reação conduzida em acetonitrila e temperatura ambiente após 24 horas.

Mesmo após 48 horas de monitoramento da reação o produto de Hantzsch **4acf** não foi observado, embora seu equivalente aromatizado (**24acf**) tenha sido observado em baixa intensidade, possivelmente devido a supressão de sinal. Em contrapartida vemos uma maior formação do produto de Hantzsch **4abcf** de m/z 434 em detrimento ao **4bcf** de m/z 270 dicarregado. Este fato se deve possivelmente a uma maior probabilidade de formação do composto monocarregado uma vez que tanto o produto de Knoevenagel **6(acf)** como o **6(bcf)** podem dar origem a este produto. A **Figura 24** mostra o espectro de MS/MS do produto de Hantzsch **4abcf**.

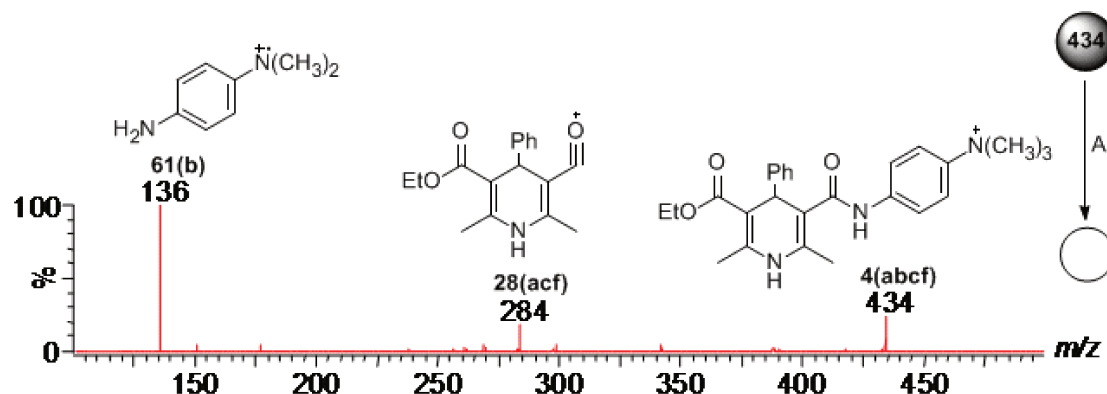


Figura 24: Espectro de MS/MS do produto de Hantzsch **4abcf**.

A **Figura 23D** mostra o espectro da reação entre acetoacetato de etila (1 equivalente), iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (1 equivalente), benzaldeído (1 equivalente) e acetato de amônio (1 equivalente) que foi realizada em acetonitrila a temperatura ambiente (**Esquema 8B2**). Nestas condições além dos intermediários descritos anteriormente foi possível observar a presença dos intermediários isoméricos **13abcf**, **14abcf** e **15abcf** que são precursores do produto de Hantzsch **4abcf**. Em contrapartida o produto de Hantzsch (**4abcf** de m/z 434) não foi detectado nestas condições.

Além disso o intermediário **16af** da via amino bis-crotonato + aldeído foi também detectado. Este intermediário já havia sido interceptado anteriormente

conforme mostrado no espectro da **Figura 9** para a reação realizada sem o uso dos reagentes marcados. Este intermediário havia sido também caracterizado por Katrizky⁵⁹ e colaboradores sendo este, segundo este autor, um intermediário metaestável que não tem participação no mecanismo da reação.

Deste modo, foi possível observar que a reação de Hantzsch realizada empregando uma mistura compostos dicetônicos (reagentes marcados e não marcados com a “etiqueta” de carga) possibilitou que a reação procedesse naturalmente embora tenha sido observado um número menor de intermediários que o esperado (conforme foi detectado na reação utilizando o aldeído marcado). Este menor número de intermediários interceptados neste caso pode ser devido ao fato da acetoacetamida marcada ser um composto menos reativo que o β -cetoéster comumente empregado.

A reação descrita no **Esquema 8C**, realizada sem a presença de acetoacetato de etila (o que levará ao produto digarregado) foi realizada em etanol sob aquecimento. O espectro da **Figura 25A** referente ao tempo reacional de 10 minutos mostra como íon mais intenso a imina (**1bii**) de m/z 234 formada a partir da adição de amônia ao íon *p*-trimetilamônio acetoacetamida, além deste o próprio *p*-trimetilamônio acetoacetamida (**1bi**) de m/z 235 é também detectado. A observação destes intermediários corrobora para a elucidação do mecanismo, uma vez que estes eram os intermediários que não haviam sido detectados no espectro da **Figura 18** (reação com aldeído marcado) devido a ausência de marcadores carregados nos compostos equivalentes a estas estruturas naquela reação.

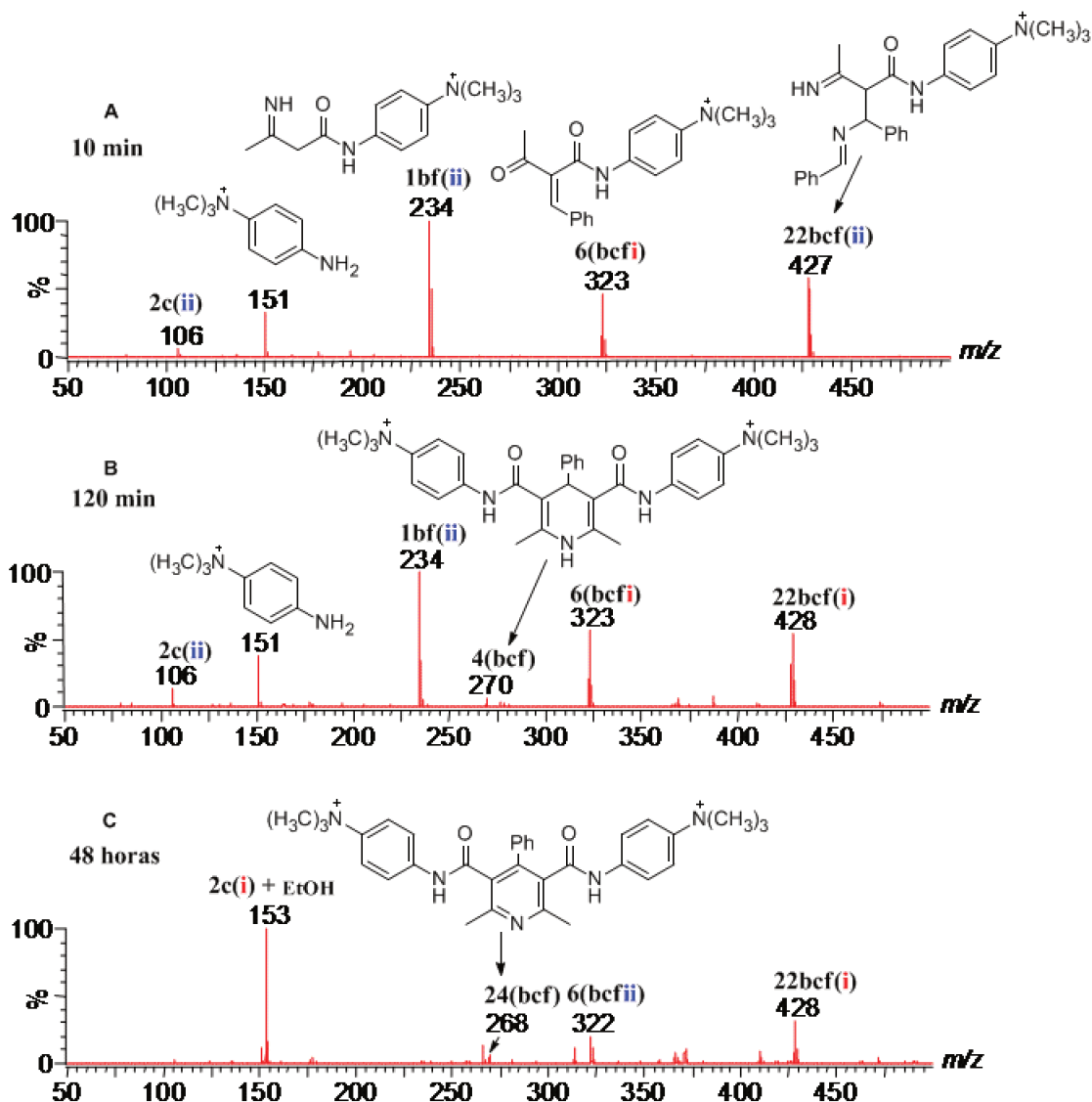
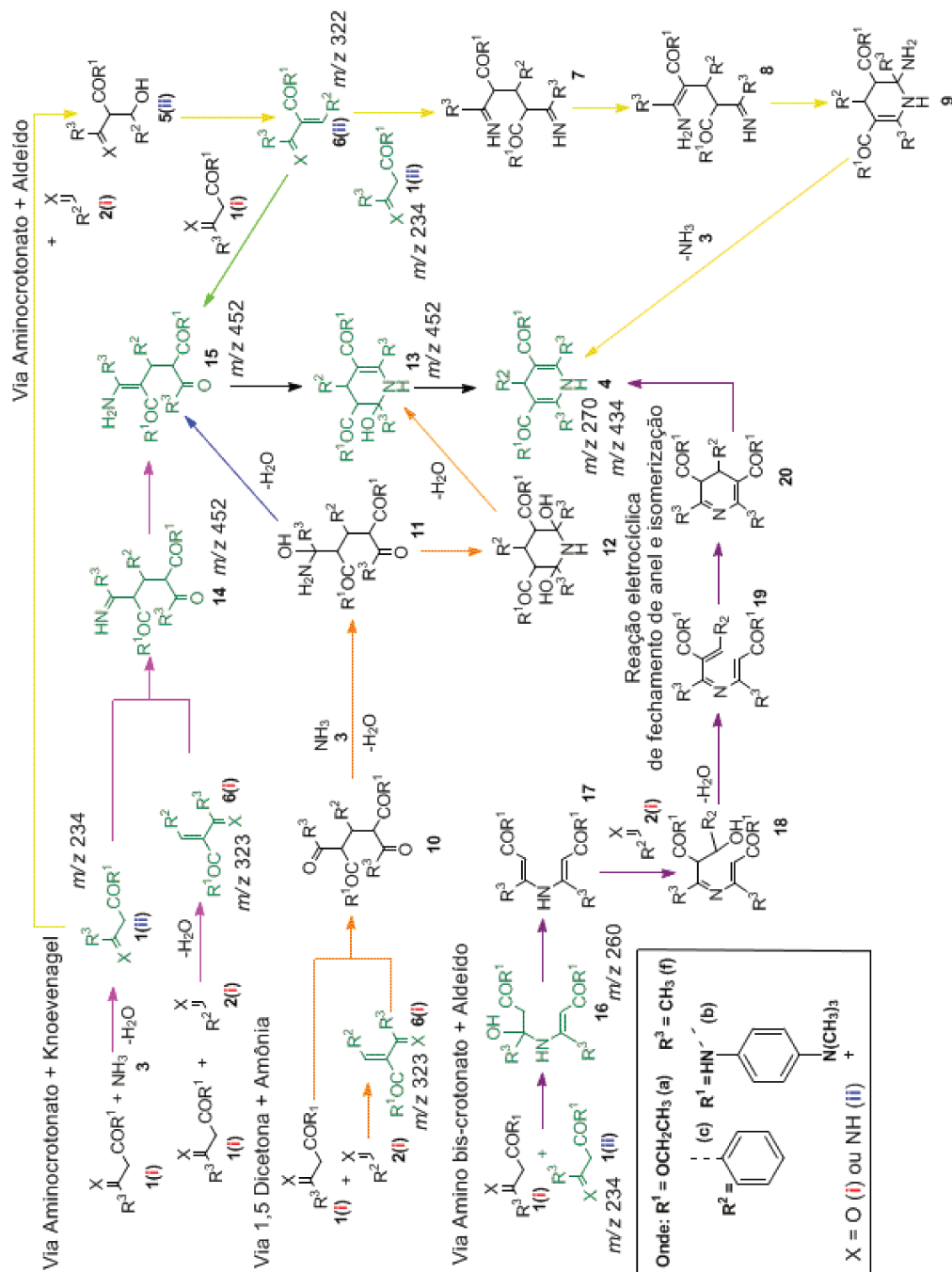


Figura 25: Reação estudada utilizando o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida (reagente marcado com “etiqueta” de carga), benzaldeído e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação.

Na **Figura 25B** é possível observar a formação do produto dicarregado **4bcf** de m/z 270. Entretanto a reação após 48 horas (**Figura 25C**) não leva com eficiência a formação do produto, ao contrário das reações anteriormente descritas. Acredita-se que a presença das duas cargas na molécula afete a formação do produto, tornando-o mais instável e portanto mais susceptível a fragmentações, sendo favorecida a formação de produtos laterais uma vez que

todo o *p*-trimetilamônio acetoacetamida é totalmente consumido ao final da reação.

Uma vez que este reagente foi utilizado com o único intuito de complementar as observações feitas com o aldeído marcado com a “etiqueta de carga”, este objetivo foi cumprido com a detecção da imina formada pelo *p*-trimetilamônio acetoacetamida. Deste modo pode-se detectar todos os intermediários envolvidos nas vias propostas.



Esquema 10: Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a reação de multicomponente de Hantzsch mostrando em destaque as espécies detectadas por ESI(+)-MS utilizando iodoeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida e/ou acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio na reação de Hantzsch conduzida em etanol a 60°C e em acetonitrila a temperatura ambiente.

Por fim, foi realizado um experimento combinando os reagentes marcados com a “etiqueta” de carga (**Esquema 8D1**). Esta reação foi feita primeiramente em etanol sob aquecimento e o espectro obtido é mostrado na **Figura 26**.

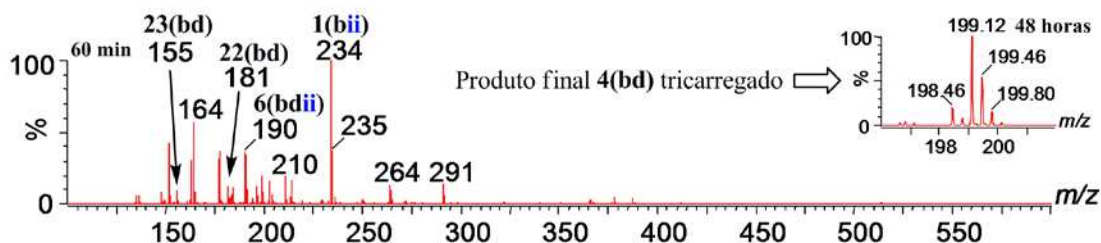


Figura 26: A) Espectro da reação de Hantzsch empregando o iodeto de *p*-trimetilamonio acetoacetamida, iodeto de *p*-trimetilamonio benzaldeído e acetato de amônio. Reação feita em etanol a 60°C, espectro da reação após 60 minutos.

Observa-se pelo espectro que alguns dos intermediários observados nas reações anteriores são também detectados neste caso, bem como o produto **4bdf** tricarregado de m/z 199 (mostrado como uma inserção no espectro) mostrando que a reação procede normalmente mesmo quando dois dos reagentes estão marcados com a “etiqueta” de carga, porém a presença de várias cargas em uma molécula pequena pode favorecer fragmentações que dificultaram a interpretação do espectro. Provavelmente, neste caso, estas fragmentações são acentuadas pelo uso de temperatura na reação.

Assim, a mesma reação foi testada, agora utilizando acetonitrila a temperatura ambiente (**Esquema 8D2**). A acetonitrila vem substituir o etanol, neste caso devido a melhor solubilidade dos componentes desta reação, bem como do produto formado, neste solvente em comparação ao etanol anteriormente utilizado.

A **Figura 27A** mostra o espectro da reação após 10 minutos, no qual além dos reagentes adicionados é possível ver ainda a formação do aminocrotonato **1bdf** de m/z 234. Já após 120 minutos de reação (**Figura 27B**) é possível observar o intermediário **5(bdfi)** de m/z 200 produto da adição do *p*-trimetilamônio acetoacetamida ao iodeto de *p*-trimetilamonio benzaldeído, bem como o mesmo após desidratação formando o produto de Knoevenagel **6(bdfi)** de m/z 191.

Por fim, após 48 horas de reação (**Figura 27C**), além dos intermediários anteriormente citados, o produto de Hantzsch **4bdf** tricarregado de m/z 199 pode ser detectado.

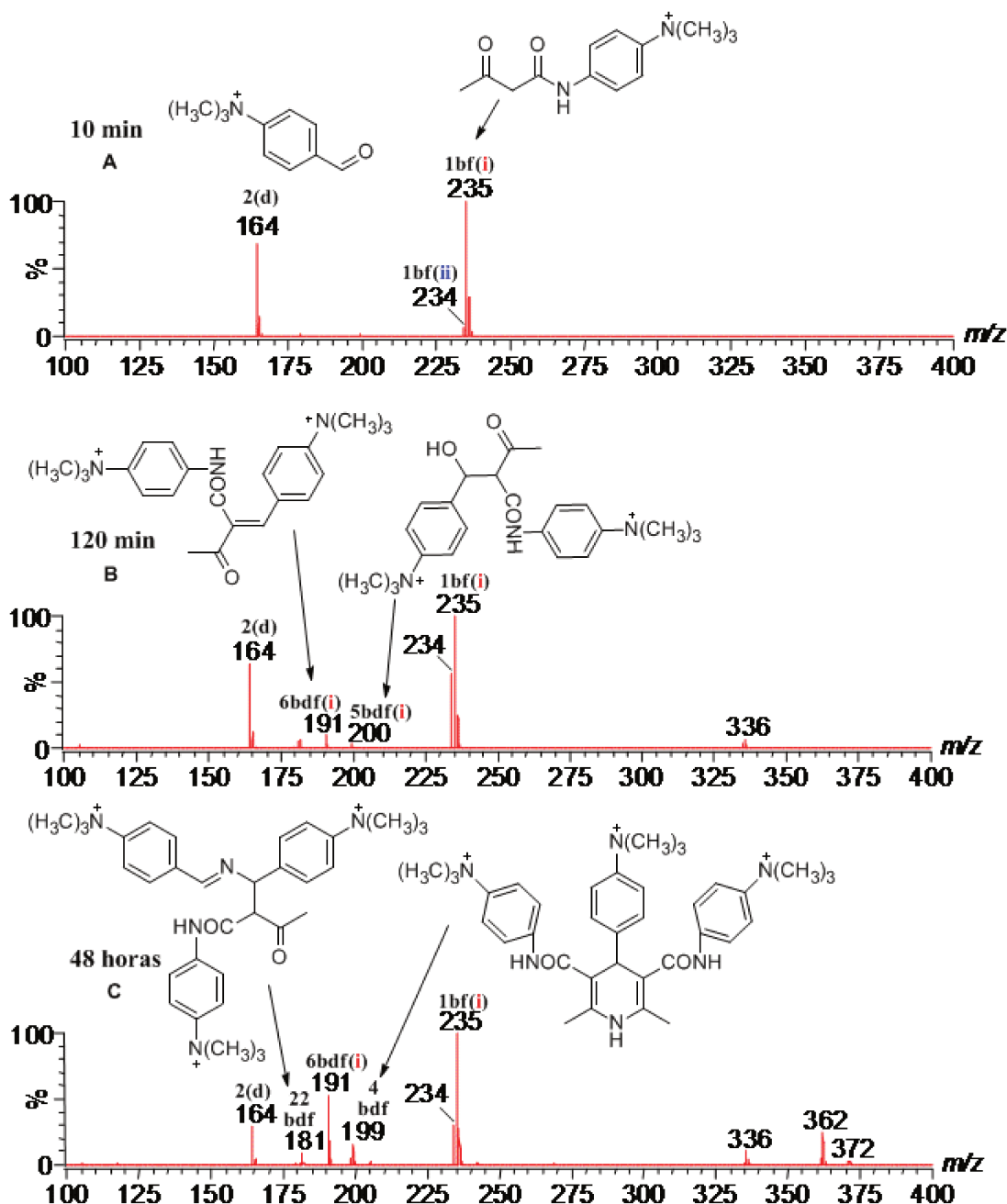


Figura 27: Reação de Hantzsch empregando o iodeto de *p*-trimetilamônio acetoacetamida, iodeto de *p*-trimetilamônio benzaldeído (reagentes marcados com “etiqueta” de carga) e acetato de amônio. (A) Após 10 minutos de reação. (B) Após 120 minutos de reação. (C) Após 48 horas de reação.

Adicionalmente, faz-se necessário uma ampliação do espectro, primeiramente na região referente ao íon de m/z 199, conforme mostrado na **Figura 28**. É possível observar que no início da reação (**Figura 28A**) este íon se apresenta como uma espécie dicarregada e refere-se, conforme descrito anteriormente, ao intermediário **5(bdfi)**. Enquanto que ao final da reação (**Figura 28B**) temos uma sobreposição de sinais, entretanto vemos claramente que o intermediário **5(bdfi)** ainda está presente no meio reacional, enquanto que o produto **4bdf** tricarregado está sendo formado no meio. Adicionalmente, a ampliação do espectro mostrou também a presença do intermediário **21(bdfii)** que levará a formação do intermediário **22bdf** (mostrado na **Figura 27C**) presente no meio devido ao excesso de reagentes disponível.

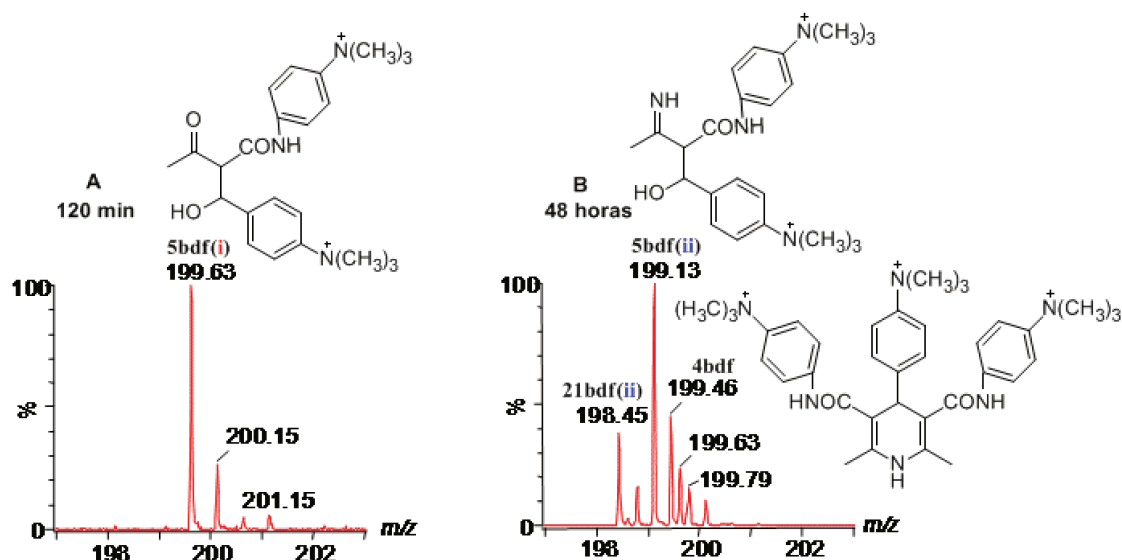


Figura 28: Ampliação do espectro obtido após 120 minutos de reação mostrando a modificação do perfil do íon de m/z 199 inicialmente dicarregado (intermediário **5bdf**) e ao final tricarregado (produto de Hantzsch **4bdf**).

Na sequência uma ampliação do espectro na reação do íon de m/z 205 mostra que, assim como para a reação utilizando o iodeto de *p*-trimetilamoniobenzaldeído, a combinação dos reagentes carregados permitiu a detecção de diversos intermediários presentes em diferentes vias mecanísticas da reação de Hantzsch. Foi possível detectar a presença dos intermediários

isoméricos **13bdf**, **14bdf** ou **15bdf** presentes na via aminocrotonato + Knoevenagel, bem como o intermediário **10bdf** presentes na via 1,5-dicetona + amônia. Além destes, estava também presente, embora em baixa intensidade, os intermediários isoméricos **7bdf**, **8bdf** ou **9bdf** participantes da via aminocrotonato + aldeído.

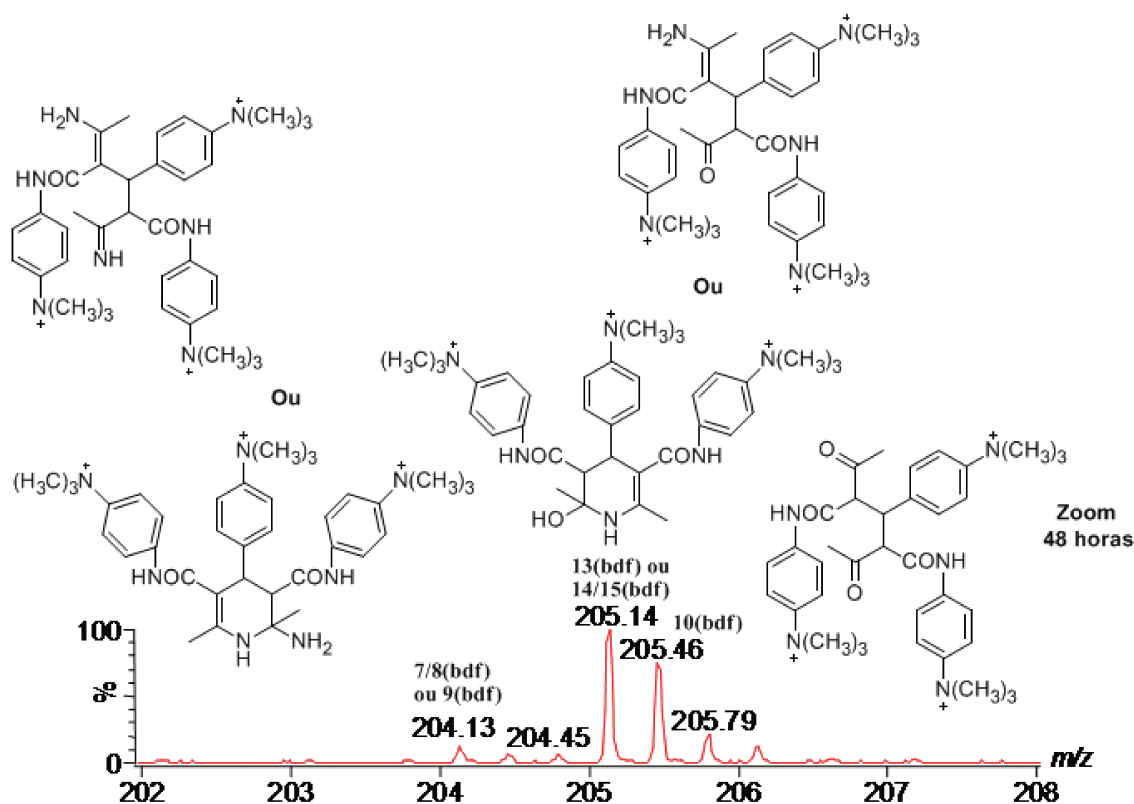
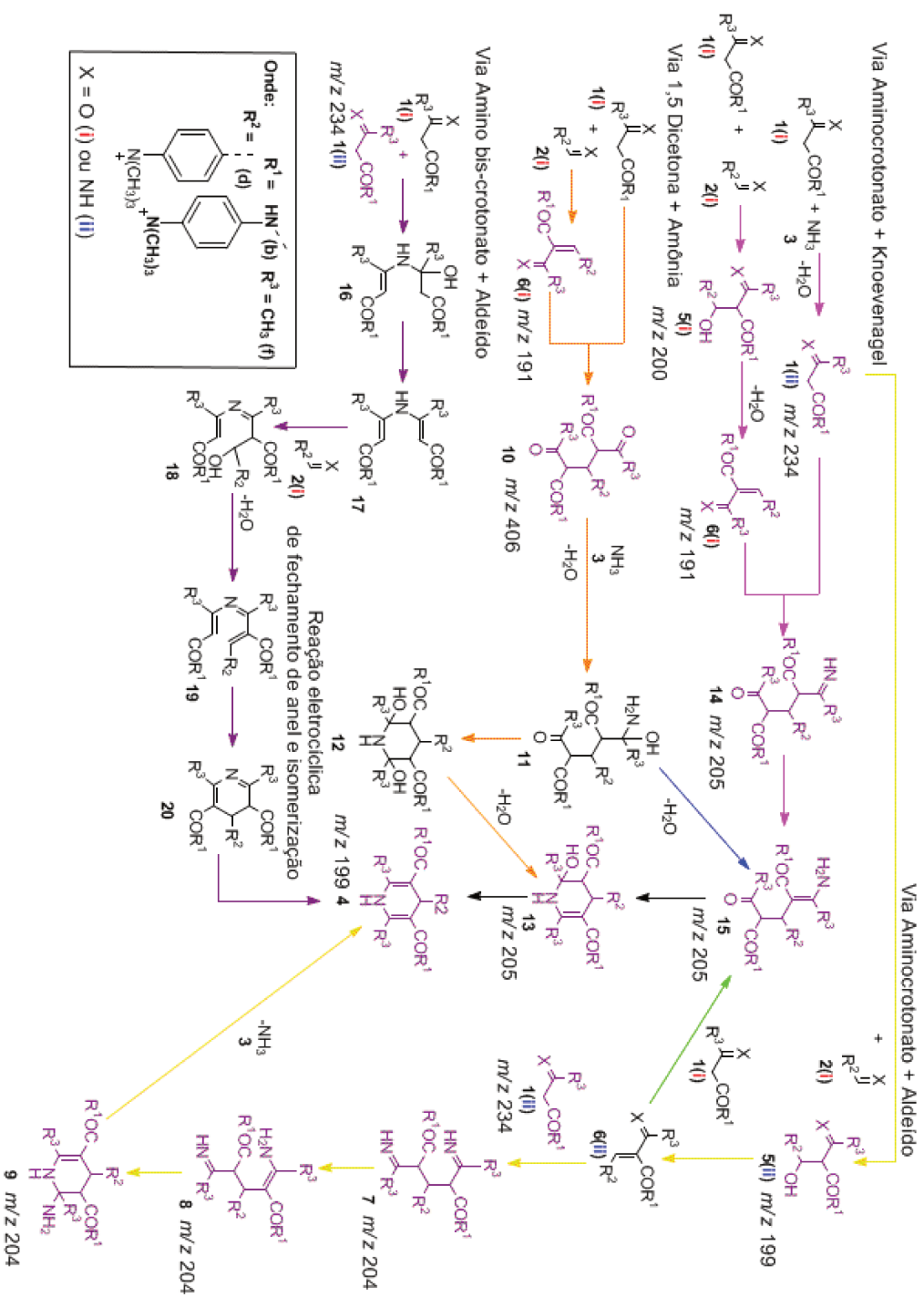


Figura 29: Ampliação do espectro obtido após 48 horas de reação mostrando os intermediários tricarregados presentes em três diferentes vias mecanísticas da reação multicomponente de Hantzsch.

Deste modo, o uso combinado de reagentes carregados mostrou-se muito eficaz na investigação mecanística realizada em acetonitrila a temperatura ambiente, uma vez que um grande número de intermediários pode ser detectado em um espectro com pouca fragmentação. Conforme mostra o **Esquema 11** foi detectado intermediários das vias aminocrotonato + Knoevenagel, 1,5 Dicetona + amônia e aminocrotonato + aldeído, possibilitando assim uma ampla visualização do mecanismo operante nesta reação multicomponente.



3.5 Conclusão

A reação multicomponente de Hantzsch foi inicialmente estudada utilizando reagentes não marcados com a “etiqueta” de carga. No caso dos reagentes convencionais (acetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio) foram observados predominantemente intermediários da via aminocrotonato + Knoevenagel favorecendo as propostas de Katritzky.⁵⁹ Os intermediários isoméricos de m/z 348 puderam ser diferenciados por meio de experimentos de MS/MS feitos ao decorrer da reação. Esta diferenciação nos deu indícios de que a via amino bis-crotonato + aldeído não tem grande participação no mecanismo desta reação uma vez que a fragmentação do íon m/z 348 ao início da reação não dá indícios da presença do intermediário **18acf** no meio reacional.

A grande intensidade do intermediário **6acf** presente nos espectros obtidos ao longo de toda a reação, em detrimento ao sinais referentes aos intermediários **13acf**, **14acf** e **15acf** concorda com a literatura que afirma ser a etapa de adição de Michael do aminocrotonato (**1**) ao produto de Knoevenagel (**6**) a etapa lenta da reação multicomponente de Hantzsch explicando assim o acúmulo deste intermediário no meio reacional.

Este acúmulo é aparentemente responsável pela formação de diversos intermediários formados ao longo da reação que estão em equilíbrio e provavelmente não tem grande influência no mecanismo da reação uma vez que temos ao final predominantemente a formação do produto de Hantzsch e seu equivalente aromatizado.

Na reação realizada para avaliar os resultados obtidos por Leshner e colaboradores⁶⁰ (empregando 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila, benzaldeído e acetato de amônio) foi observado, conforme proposto pelo autor, uma menor tendência dos intermediários da reação a sofrer desidratação (levando ao produto de Hantzsch esperado), isso pode ser visto, principalmente pela formação do intermediário **46acg** de m/z 491 que não havia sido observado anteriormente e que demonstra bem a dificuldade destes compostos de sofrer processos de desidratação. Entretanto, no período em que a reação foi monitorada, não foi

observado a presença do intermediário **12acg** o qual, segundo Leshner e colaboradores⁶⁰, seria o único produto desta reação.

Após a reação ter sido monitorada utilizando o método convencional, utilizando aditivos que favorecem a protonação das espécies presentes no meio reacional, a reação foi estudada agora utilizando reagentes marcados com “etiqueta” de carga, que surgem como um novo conceito no estudo de mecanismos de reação. Os espectros obtidos mostraram os íons intermediários de interesse com grande intensidade refletindo com maior precisão a composição iônica do meio reacional. Praticamente não foram observados interferentes, uma vez que não é adicionado ao meio reacional ácidos ou bases que podem interferir no equilíbrio da reação além de trazer interferentes para o meio

O estudo utilizando o aldeído marcado possibilitou a detecção de um número superior de intermediários que aqueles que haviam sido detectados no estudo utilizando os reagentes não marcados. Foram detectados intermediários participantes das vias aminocrotonato + Knoevenagel, 1,5 Dicetona + amônia e aminocrotonato + aldeído que continham o aldeído marcado com a “etiqueta” de carga. Adicionalmente, avaliando a intensidade relativa do intermediário **6adf** em relação aos demais intermediários da via (**13adf**, **14adf** e **15adf**) vemos a concordância dos dados com os já anteriormente propostos por Katrizky⁵⁹ no qual a etapa lenta da reação seria a adição de Michael do aminocrotonato ao produto de Knoevenagel levando, desta forma, a um acúmulo do intermediário **6adf** no meio reacional.

No estudo realizado utilizando o composto dicetônico marcado em conjunto com o acetoacetato de etila convencional mostrou uma maior tendência para a formação do produto monocarregado, enquanto que a reação empregando apenas o composto marcado não levou a formação predominante do produto dicarregado uma vez que este seria um produto mais instável levando predominantemente a fragmentações. Apesar disso foi possível a detecção de intermediários importantes para o mecanismo, intermediários estes tais como a enamina **1bcfii**, que não havia sido detectada no estudo com o aldeído marcado uma vez que o sítio de carga não estava presente neste composto.

Por fim o estudo empregando os reagentes marcados combinados em uma mesma reação mostrou-se, para o caso onde utilizou-se acetonitrila e temperatura ambiente, eficaz na detecção de intermediários reacionais uma vez que foram identificados quase todos os intermediários caracterizados nos demais estudos e isto em uma mesma reação. A presença da carga não se mostrou como barreira para a formação de intermediários di ou tri-carregados que foram de forma eficaz detectados no meio reacional. Uma vez que a reação não empregou temperatura foram observados poucos fragmentos sendo, portanto, os intermediários da reação as espécies predominantes no espectro.

Capítulo IV: Reagentes Marcados com “Etiqueta” de Carga Aplicados ao Estudo *On-line* do Mecanismo da Reação Multicomponente de Hantzsch por V-EASI-MS

4.1 Introdução

4.1.1 A Espectrometria de massas ambiente e o estudo de mecanismos de reações

O desenvolvimento de técnicas a pressão atmosférica permitiram a investigação direta de reações químicas em solução por espectrometria de massas. O monitoramento online de uma reação orgânica em andamento é útil não apenas para monitorar a formação do produto e o andamento da reação, mas também para um estudo de mecanismo mais detalhado, permitindo a detecção de intermediários transientes presentes no meio reacional que serão de extrema importância para a elucidação do mecanismo da reação.

Quando falamos em monitoramento online de uma reação química por espectrometria de massas por meio de técnicas a pressão atmosférica, faz-se necessário o uso de reatores, nos quais diferentes soluções reagentes são misturadas e diretamente infundidas no espectrômetro de massas. Esta técnica permite um monitoramento constante, capaz de detectar mudanças sutis no meio reacional através da captura de espécies transientes com tempos de vida na ordem de milissegundos. Em um caso mais simples o reator pode ser a própria seringa de injeção, tornando possível o monitoramento de reações que apresentem uma cinética bastante acelerada.

Entretanto, considerando as condições pelas quais uma reação é conduzida, nem sempre o uso destes reatores reproduz o ambiente reacional. Condições como agitação vigorosa e homogênea, temperatura, atmosfera inerte ou mesmo uso de ultrassom são fatores que dificultam este monitoramento real online da reação em andamento.

Neste contexto, o uso de técnicas ambiente como ferramenta de estudo para mecanismos de reações em seus frascos reacionais originais corrobora para a elucidação de mecanismos e cinéticas reacionais cada vez mais próximos dos propostos.

Algumas técnicas ambientes já foram usadas em investigações *online* de mecanismos de reações, como a *Low Temperature Plasma Ionization* (LTPI)⁴ e a *Membrane Introduction Mass Spectrometry* (MIMS)⁶⁵ acoplada a técnicas ambiente. Entretanto, estas técnicas exigem instrumentações complexas, além de, em alguns casos, restringir a análise de certos compostos o que dificulta sua aplicação geral.

4.2 Objetivos específicos

A nova fonte de ionização ambiente (V-EASI-MS) foi utilizada no monitoramento *online* da reação multicomponente de Hantzsch possibilitando a construção de uma curva cinética que auxilie no entendimento do mecanismo.

4.3 Parte experimental

Neste trabalho a nova fonte de ionização (V-EASI-MS), cujo desenvolvimento foi discutido no Capítulo I desta dissertação, foi empregada no estudo *online* do mecanismo da reação multicomponente de Hantzsch, cujo mecanismo já foi previamente estudado por ESI-MS, conforme descrito no Capítulo II também desta dissertação.

Na fonte V-EASI a ionização por sonic spray é assistida apenas por N₂ comprimido a 10 bar a um fluxo de 3,5 L min⁻¹. A amostra é auto-succionada a um fluxo de aproximadamente 20 µL min⁻¹ (considerando metanol como solvente) por efeito Venturi (sem auxílio de bomba injetora) através de um capilar de sílica fundida com 100 e 125 µm de diâmetro interno e externo respectivamente.

⁶⁵ a) Allen, T. M.; Falconer, T. M.; Cisper, M. E.; Borgerding, A. J.; Wilkerson, C. W. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4830. b) Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2166.

Nenhum aquecimento ou voltagem é aplicado durante o processo de ionização. Esta fonte foi, neste estudo, acoplada ao equipamento HCT Bruker (Bremen – Alemanha) com analisador de massas do tipo *Ion Trap* tridimensional.

O monitoramento *online* da reação multicomponente de Hantzsch foi realizado empregando o acetoacetato de etila e acetato de amônio obtidos comercialmente (Sigma - Aldrich Co) e utilizados sem previa purificação. Foi utilizado também o iodeto de *p*-trimetilamôniobenzaldeído, reagente marcado com “etiqueta” de carga que, conforme mencionado anteriormente, foi sintetizado e cedido pelo Professor Dr. Simon J. Garden da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A reação foi montada, da maneira convencional, em um balão de fundo redondo (10 mL) contendo 2 mL de etanol (J.T. Baker - Phillipsburg, NJ – USA), ao qual adiciona-se 0,1 mmol do acetoacetato de etila, 0,1 mmol de acetato de amônio e 0,1 mmol de aldeído marcado. A solução reacional permanece sob agitação e aquecimento em banho de óleo a 60°C durante todo o tempo.

Ao invés de alíquotas serem retiradas da reação, conforme descrito para o estudo realizado por ESI-MS (Capítulo II), neste estudo o capilar de sílica presente na fonte V-EASI foi introduzido na solução reacional por meio de uma agulha, sendo a reação deste modo, auto-succionada por efeito Venturi e analisada diretamente pelo espectrômetro de massas, conforme pode ser observado na foto mostrada na **Figura 30**.



Figura 30: Monitoramento *online* da reação multicomponente de Hantzsch por V-EASI-MS.

Devido ao reduzido volume de solvente utilizado na reação e elevado tempo reacional o monitoramento não foi, neste caso, contínuo. O capilar de sílica da fonte V-EASI era mantido no solvente de análise, no caso foi utilizado o etanol e em tempos determinados o capilar era introduzido na reação onde era mantido por cerca de 30 segundos, sendo o spray direcionado diretamente ao espectrômetro de massas com a fonte posicionada a 90° em relação a entrada do equipamento. Este ângulo mostrou-se como o mais adequado a este tipo de análise uma vez que seriam empregadas apenas amostras líquidas (V_L-EASI) levando assim a uma melhor eficiência com menor contaminação. A reação foi acompanhada ao longo de 4 horas e os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 50-1000.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Reagentes marcados com “etiqueta” de carga aplicados ao monitoramento *on-line* da reação multicomponente de Hantzsch por V-EASI(+)-MS

A reação de Hantzsch monitorada por V-EASI-MS empregou o iodeto de *p*-trimetilamôniobenzaldeído (reagente marcado), acetoacetato de etila e acetato de amônio, a reação foi feita em etanol e nenhum aditivo foi empregado na reação. As alíquotas da reação foram coletadas com auxílio de uma agulha pela qual o capilar de sílica da fonte V-EASI foi introduzido, não havendo, portanto a necessidade de abertura do frasco reacional.

A reação foi monitorada durante 4 horas e a intensidade relativa dos íons de interesse, previamente selecionados com base no estudo mecanístico descrito no Capítulo II, foi transferida para uma planilha do software Origin 8[®] gerando o gráfico mostrado na **Figura 31**.

No gráfico estão representados com símbolos vazados os íons referentes a um dos reagentes (m/z 164) uma vez que os demais não aparecem no espectro visto que não possuem a “etiqueta” de carga em suas estruturas. Além disso o produto (m/z 387) também se encontra destacado com símbolo vazado, enquanto que os demais intermediários são mostrados com símbolos cheios.

Vemos, portanto, que no início da reação temos uma predominância do aldeído reagente de m/z 164 além da rápida formação do intermediário **5adf** de m/z 294. É possível observar pelo gráfico que este intermediário sofre uma rápida desidratação levando a formação um segundo intermediário produto de Knoevenagel **6adf** de m/z 276 que tem o seu máximo de intensidade já por volta dos 30 minutos iniciais da reação. Podemos notar que o aumento do íon de m/z 276 acompanha o decréscimo do reagente de m/z 164 sendo este quase que totalmente consumido ao final da reação.

O intermediário de m/z 276 permanece, durante um grande período do monitoramento, como o íon mais intenso no espectro. Neste ponto torna-se claro

que a etapa subsequente de adição de Michael do aminocrotonato **1** ao produto de Knoevenagel **6** é de fato a etapa lenta da reação uma vez que fica evidente o acúmulo deste intermediário no meio reacional.

A presença dos demais intermediários de m/z 405, 406 e 423 é discreta, uma vez que estes são formados e consumidos logo na sequência não vemos uma acumulação dos mesmos no meio reacional. Em contrapartida a formação destes intermediários leva a formação do produto de Hantzsch **4adf** de m/z 387 que aumenta exponencialmente com o andamento da reação.

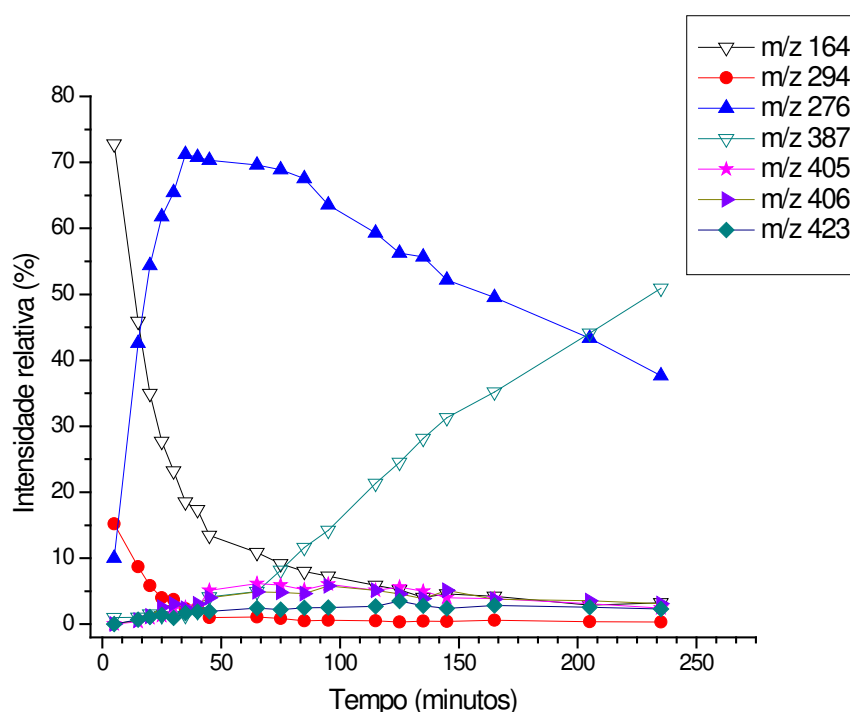


Figura 31: Curva cinética obtida por V_L -EASI(+)-MS para o monitoramento da solução reacional da reação multicomponente de Hantzsch.

Deste modo, vemos que a curva obtida demonstra com clareza o progresso normal da reação multicomponente de Hantzsch.

4.5 Conclusão

Estes resultados mostraram que a nova fonte de ionização V-EASI foi eficiente no monitoramento *online* da reação multicomponente de Hantzsch. Este monitoramento foi feito com mínima interferência no andamento da reação uma vez que a solução reacional pode ser analisada sem que houvesse a necessidade de abertura do frasco reacional e além disso, o próprio solvente da reação foi utilizado para formação do spray do V-EASI, sem a necessidade de diluições em outros solventes, ou mesmo de adição de aditivos (isto devido ao fato de utilizarmos reagentes marcados com a “etiqueta” de carga).

O gráfico obtido demonstra o andamento da reação, sendo possível identificar a etapa lenta da reação por meio do acúmulo do intermediário **6adf** de m/z 276 dados estes que estão de acordo com os resultados descritos na literatura⁵⁹. Deste modo foi demonstrado que a fonte de ionização ambiente *Venturi easy ambient sonic spray ionization* (V-EASI) é eficaz para o monitoramento *online* de reações orgânicas em solução.

Conclusão Geral

Uma nova fonte de ionização ambiente, simples, de fácil montagem e operação, que possibilita a análise tanto de amostras líquidas (V_L -EASI) como de amostras sólidas (V_S -EASI) através do autobombeamento por efeito Venturi, foi desenvolvida e algumas aplicações foram demonstradas para exemplificar sua versatilidade.

A técnica V-EASI utiliza a alta velocidade do gás, que pode ser nitrogênio ou ar, para proporcionar dois processos fundamentais para a ionização: o autobombeamento do analito ou solvente por meio do efeito Venturi e a ionização por *sonic spray*. Uma vez que a V-EASI não usa voltagem, aquecimento ou radiação seu processo de ionização é livre de interferências térmicas e elétricas sendo uma técnica branda minimizando processos de fragmentação.

Embora a intensidade absoluta dos íons analitos pareça menor que o obtido em técnicas que empregam sprays de alta voltagem, em V-EASI vemos uma redução do ruído químico que portanto eleva a relação sinal/ruído proporcionando um espectro mais limpo com menor formação de dímeros, adutos e fragmentos com o sinal concentrado na espécie iônica de interesse reduzindo assim efeitos de supressão.

O modo dual de operação em ambos (+/-) modos iônicos devido a formação de um spray bipolar, bem como via os modos V_L -EASI ou V_S -EASI para amostras líquidas ou sólidas, contribui para a flexibilidade e ampla aplicação da técnica V-EASI em diversos tipos e amostras.

A possibilidade de análise e de biomoléculas em água pura, sem a necessidade de adição de solventes, mostra-se atrativa para a análise de proteínas e peptídeos em soluções fisiológicas e fluidos biológicos.

Deste modo a fonte V-EASI foi desenvolvida e algumas aplicações foram demonstradas, exemplificando assim sua versatilidade e simplicidade tal como se propõe as técnicas classificadas como espectrometria de massas ambiente.

No segundo capítulo a reação multicomponente de Hantzsch foi estudada utilizando tanto reagentes marcados com a “etiqueta” de carga como os reagentes

convencionais para a reação. De um modo geral a via aminocrotonato + Knoevenagel foi considerada predominante para a formação do produto 1, 4-dihidropiridina, embora haja a participação de outras vias como a 1,5 dicetona + amônia também acontecendo no meio e possivelmente também podendo levar ao produto final. Foram detectados também intermediários de vias paralelas que encontram-se em equilíbrio no meio reacional servindo como estoque de reagentes haja vista que a etapa de adição de Michael do aminocrotonato ao intermediário **6** é a etapa lenta da reação.

Foi realizado, neste trabalho um estudo inédito no qual diversos intermediários da RMC de Hantzsch foram detectados por meio da nova proposta de estudo de mecanismos de reações: empregando reagentes marcados com “etiqueta” de carga. Estes reagentes possibilitaram a detecção de um maior número de intermediários reacionais se comparado ao estudo sem o uso destes compostos. Além disso o estudo foi realizado sem que houvesse interferência no meio reacional pela adição de aditivos possibilitando, assim de maneira eficaz a detecção dos intermediários, sejam eles transientes ou estáveis, contribuindo com isso para a elucidação do mecanismo.

Por fim, no capítulo final a RMC de Hantzsch foi estudada utilizando a nova técnica de ionização V-EASI-MS e o monitoramento foi realizado de maneira satisfatória e todos os intermediários interceptados durante o estudo realizado por ESI-MS puderam ser também identificados por V-EASI. Deste modo esta técnica surge como uma nova proposta para estudos de mecanismos de reação, estudo este que pode agora ser realizado com a mínima interferência no meio reacional, reproduzindo, assim de forma mais fiel o mecanismo da reação estudada.