

ANNA LUÍSA LACERDA DE ALMEIDA SOUSA

**SÍNTESE DE *BIS*-TIOCARBAZONAS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DE
UREASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sergio Antonio Fernandes

Coorientadora: Luzia Valentina Modolo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Viçosa

T

S725s
2021 Sousa, Anna Luísa Lacerda de Almeida, 1995-
 Síntese de bis-tiocarbazonas como potenciais inibidores de urease
 / Anna Luísa Lacerda de Almeida Sousa. - Viçosa, MG, 2021.
 99 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sergio Antonio Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 55-60.

1. Química Verde. 2. Iminas. 3. Compostos orgânicos - Síntese.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.04


ANNA LUÍSA LACERDA DE ALMEIDA SOUSA

SÍNTESE DE *BIS*-TIOCARBAZONAS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DE UREASE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de março de 2021.

Assentimento:



Anna Luísa Lacerda de Almeida Sousa
Autora



Sergio Antonio Fernandes
Orientador

*Dedico este trabalho a Deus e a
minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para completar essa jornada. Se estou concluindo mais essa etapa, é graças a Ele. Aos meus avôs mais que queridos e amados que olham por mim lá do céu, João e José Ananias que sempre estiveram e estarão caminhando comigo.

Ao meu professor e orientador Sergio, meu imenso obrigada por toda paciência, ensinamentos e broncas que foram fundamentais para meu crescimento.

Aos membros da banca, professor Marcelo e professor Vagner, por aceitarem o convite e participarem da avaliação desse trabalho.

Aos meus amados pais, Catarina e Alberto, por todo apoio carinho, paciência e amor incondicional, sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos que eu tanto amo, Anna Beatriz e Vinícius, ao meu afilhado, Júlio, vocês foram essenciais nessa jornada, me deixando sempre mais feliz. Aos meus avós Aurora, Terezinha, Iracema e Basílio, por todas as orações, por todo carinho e amor de sempre.

Aos amigos do GQSB, por sempre estarem disponíveis e dispostos a ajudar. Por todo carinho, por todas as companhias nos lanches da tarde e pela amizade, vocês estão no meu coração. Em especial ao Gabriel, que esteve comigo na execução desse trabalho e sempre esteve disposto a ajudar e apoiar no que fosse preciso. Ao Walysson por estar ao meu lado em todos os momentos, ajudando, apoiando passando por muitos perrengues e alegrias desde que entramos na graduação. À Sarah e Amanda que se tornaram mais que colegas de trabalho, minhas amigas que levarei no meu coração sempre.

Às minhas amigas, Renata e Ana Flávia, que mesmo distante se fizeram sempre presente nos momentos mais necessários.

À professora Luzia Valentina Modolo (Universidade Federal de Minas Gerais), pela realização da atividade antiurease.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química e ao Grupo de Química Supramolecular e Biomimética, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

SOUSA, Anna Luísa Lacerda de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Síntese de *bis*-tiocarbazonas como potenciais inibidores de urease.** Orientador: Sergio Antonio Fernandes. Coorientadora: Luzia Valentina Modolo.

A busca por novos compostos para contornar questões que emergem a partir da perda do nitrogênio do solo – um problema muito comum e recorrente na agricultura – que tem como causadora a reação natural de uma enzima produzida pelas plantas, a urease, que catalisa a hidrólise da ureia formando amônia, água e gás carbônico é o foco deste trabalho. Apesar do baixo custo, a ureia, quando aplicada ao solo, sofre perda de nitrogênio por volatilização ao ser hidrolisada. Com essa limitação, o desenvolvimento de potenciais inibidores de urease é fundamental, visto que o mercado nacional não dispõe desta tecnologia. Neste trabalho, foram sintetizadas 20 *bis*-tiocarbazonas para avaliar seu potencial antiurease no solo. As *bis*-tiocarbazonas foram obtidas a partir de dois equivalentes de diferentes aldeídos aromáticos e a tiocarbazida – um composto com semelhança estrutural à tiureia. As condições otimizadas para a síntese foram de 30 mol % de ácido acético como catalisador, temperatura de 110 °C e 3 horas de reação, sendo os rendimentos determinados por CLAE nessa etapa. Após otimizar as condições reacionais, foram avaliados diferentes aldeídos aromáticos para verificar a generalidade da reação, obtendo-se rendimentos que variaram de 27 % a 95 %. Além disso, algumas moléculas foram submetidas ao teste antiurease a fim de se verificar a eficiência desses compostos e obteve-se inibição variando de 19 a 46%. No desenvolvimento do trabalho, alguns princípios da química verde estiveram em foco, como um catalisador verde – que pode ser obtido a partir da biomassa – e o emprego de solventes não clorados. A obtenção de inibidores de urease, como as *bis*-tiocarbazonas, pode constituir um passo importante para o desenvolvimento de tecnologias para a indústria de fertilizantes brasileira. A confirmação das estruturas e caracterização das moléculas foram possíveis graças espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.

Palavras-chave: Química Verde. Iminas. Organoatálise.

ABSTRACT

SOUSA, Anna Luísa Lacerda de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2021. **Synthesis of *bis*-thiocarbazonas as potential urease inhibitors.** Adviser: Sergio Antonio Fernandes. Co-adviser: Luzia Valentina Modolo.

The search for new compounds to overcome issues that emerge from the loss of nitrogen from the soil - a very common and recurrent problem in agriculture - caused by the natural reaction of an enzyme produced by plants, called urease, which catalyzes the hydrolysis of urea, generating the formation of ammonia, water and carbon dioxide is the focus of this work. Despite the low cost, urea, when applied to the soil, suffers loss of nitrogen due to volatilization when hydrolyzed. By this limitation, the development of potential urease inhibitors is essential, because the national market does not have this technology. In this work, 20 *bis*-thiocarbazonas were synthesized to evaluate their antiurease potential in the soil. *Bis*-thiocarbazonas were obtained from two equivalents of different aromatic aldehydes and thiocarbazide - a compound with structural similarity to thiourea. The optimized conditions for the synthesis were 30 mol % of acetic acid as a catalyst, temperature of 110 °C and 3 hours of reaction, these yields were determined by HPLC. After optimizing the reaction conditions, different aromatic aldehydes were evaluated to verify the generality of the reaction and yields ranging from 27 % to 95 % were obtained. In addition, some molecules were submitted to an antiurease test in order to verify the efficiency of these compounds and the inhibition ranging 19 % to 46%. In the development of these work, some principles of green chemistry were in focus, such as a green catalyst - which can be obtained from biomass - and the use of non-chlorinated solvents. The obtention of urease inhibitors, such as *bis*-thiocarbazonas, can be an important step in the development of technologies for the Brazilian fertilizer industry. The confirmation of structures and characterization of the molecules were possible thanks to mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon.

Keywords: Green Chemistry. Imines. Organocatalysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Fertilizantes	10
1.2. Urease	11
1.3. Inibidores de urease	13
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
3.1. Caracterização da tiocarbazida [57]	19
3.2. Otimização das <i>bis</i>-tiocarbazonas	23
3.3. Avaliação da generalidade das reações	26
3.4. Proposta mecanística da síntese da tiocarbazida	29
3.5. Proposta mecanística para a formação da <i>bis</i>-tiocarbazona	29
3.6. Caracterização da <i>bis</i>-tiocarbazona B1	30
3.7. Testes preliminares para atividade antiurease	36
4. CONCLUSÃO	36
5. PERSPECTIVAS	37
6. PARTE EXPERIMENTAL	37
6.1. Solventes e reagentes	37
6.2. Síntese da tiocarbazida[57]	37
6.3. Testes de atividade antiurease[62]	38
6.4. Instrumentação e condições	39
6.4.1. Espectrometria de massas (EM)	39
6.4.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)	39
6.4.3. Temperatura de fusão (TF)	40

6.4.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
6.5. Otimização das condições reacionais para a síntese das <i>bis</i> - tiocarbazonas	40
6.6. Quantificação das <i>bis</i> -tiocarbazonas por CLAE para a otimização da síntese	41
6.6.1. Preparo das soluções padrão para curva de calibração	42
6.7. Caracterização das <i>bis</i> -tiocarbazonas B2 a B20	43
7. REFERÊNCIAS	55
8. ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

Como parte das grandes conquistas da ciência, a influência da química orgânica – como um segmento dessa abrangente área – auxiliou e levou à evolução de processos industriais na obtenção de fármacos e agroquímicos[1][2]. Tudo isso foi possível graças ao começo da indústria química no século XIX e é possível destacar que, sem esse ramo importante, a vida nos dias atuais se tornaria cada vez mais difícil e caótica, visto que a qualidade e expectativa de vida crescente dos seres humanos se deve a todo estudo e empenho de cientistas ao redor do mundo ao longo dos anos[3]. Porém, a busca desenfreada por melhorias em todos os âmbitos – como toda escolha – gera consequências. Apenas em meados do século XX, as questões ambientais sobre o crescimento das atividades industriais começaram a ser discutidas[4].

Na busca para melhorias no setor industrial, por volta dos anos 1990, um programa chamado *Responsible Care* (Cuidado Responsável) foi criado para transformar e melhorar o comportamento industrial. A partir desse programa, as atividades passaram a ser realizadas procurando minimizar os efeitos nocivos ao ambiente[5].

No final do século XX, Anastas e Warner[6] publicaram o primeiro manual de Química Verde. São princípios que se baseiam na minimização da utilização de solventes tóxicos em processos com pouca ou nenhuma geração de resíduos, que é profundamente ligado a economia atômica, além do desenvolvimento de produtos que se decomponham de forma inofensiva ao ambiente[7].

A demanda crescente e infinita por alimentos e energia e a utilização de fontes não renováveis são uma preocupação, isso induz e acelera a necessidade de se adequar o máximo possível aos princípios da Química Verde[8]. O uso de recursos naturais finitos e a industrialização excessiva de alimentos, acarretaram – e continua acarretando – o aumento da poluição e o esgotamento desses recursos[9].

De um modo geral, a sociedade atual procura por alimentos e recursos que alcancem o máximo de suas expectativas, incluindo as que se relacionam à qualidade e, principalmente, ao valor atribuído àquele produto[10].

Para que se possa ter alimentos, moradia, ciência, indústria e evolução é preciso terras cultiváveis e/ou férteis disponíveis e, com o constante crescimento da população, chegará um momento em que esses interesses entrarão em conflito[11].

1.1. Fertilizantes

O crescimento exponencial da população mundial acaba desencadeando problemas de segurança alimentar. As terras para plantio diminuem enquanto a urbanização e a industrialização aumentam[12]. Em se tratando do solo brasileiro, de acordo com a Embrapa[13], a parte predominante do solo presente no território é ácida e de baixa fertilidade natural. A correção da acidez dos solos é feita a partir da calagem, geralmente com carbonatos, comumente chamados de calcário. Eles possuem menor custo do que óxidos ou hidróxidos (de cálcio e magnésio) e também produzem o efeito desejado[14]. Com essa aplicação, os teores de cálcio e magnésio são elevados e o pH do solo é corrigido. Além disso, para que a fertilidade do solo seja melhor, é possível desenvolver sistemas com uso de fertilizantes de liberação controlada, para que a capacidade de produtividade seja elevada[15].

De um modo geral, a agricultura produz suprimentos suficientemente calóricos para uma alimentação equilibrada; a falta de nutrientes em certos alimentos gera desnutrição e fome oculta[16], que decorre do déficit de subnutrientes. Como uma forma de contornar esse problema, a fertilização com liberação controlada se torna uma alternativa muito atraente, visto que, além de auxiliar a fertilidade, pode suprir a deficiência desses micronutrientes[17].

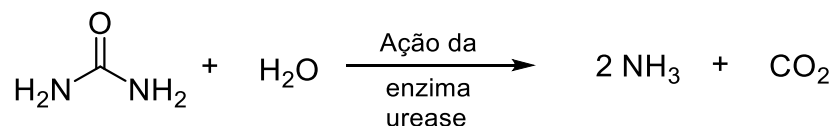
Para o aumento da produtividade agrícola mundial, o uso de fertilizantes se tornou peça-chave para um bom cultivo. O Brasil ocupa lugar de potência agrícola no mundo, porém a produção nacional de fertilizantes vem crescendo pouco nos últimos anos e, com isso, a dependência de importações desses insumos continua grande, já que a demanda interna precisa ser atendida[18].

Um solo, para ser considerado fértil precisa de muitos nutrientes. Alguns elementos são essenciais para que haja vida, tais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, entre outros. Um dos nutrientes mais importantes e necessários para as plantas é o nitrogênio já que ele atua em todas as fases da planta, desde seu crescimento, passando por sua floração, até sua frutificação[19]. Em vista disso,

dentre os fertilizantes orgânicos utilizados, os fertilizantes nitrogenados e, principalmente, a ureia tem um grande destaque na agricultura[20].

Apesar do baixo custo e da baixa corrosividade, a ureia gera desafios na agricultura porque ao utilizá-la, é preciso evitar a perda de nitrogênio que é liberado na forma de amônia (NH₃). Essa perda ocorre a partir da hidrólise[21] provocada pela enzima urease – que é produzida por bactérias e fungos do solo[22] (**Esquema 1**).

Esquema 1: Reação de hidrólise da ureia.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Para superar as perdas de nitrogênio após a aplicação da ureia, um dos métodos utilizados é o de liberação controlada. Esse controle consiste em revestir a ureia, apresentada na forma de grânulos, com polímeros degradáveis, ou até mesmo a base de água para que ela não seja absorvida em sua totalidade imediatamente ao entrar em contato com o solo. Os resultados têm mostrado que a liberação controlada pode melhorar a produção agrícola, devido à maior absorção de nitrogênio[23].

Há outras propostas apresentadas na literatura para que seja possível contornar essa perda, como por exemplo o uso dos inibidores de nitrificação[24] e a produção de inibidores de urease que visam inibir ou pelo menos reduzir a hidrólise da ureia[25].

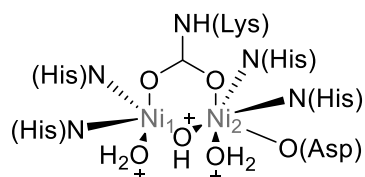
O uso de inibidores de urease é investigado há décadas. Desde então, um grande número deles vêm sendo desenvolvidos e essa temática tem despertado muito interesse da comunidade acadêmica e industrial[26].

1.2. Urease

A enzima urease foi descoberta e identificada, no século XIX, como responsável por hidrolisar a ureia gerando amônia e ácido carbônico[27]. Em 1926, o químico e ganhador do prêmio Nobel[28], James Batcheller Sumner, foi o primeiro a isolar e cristalizar essa enzima presente no feijão de porco (*Canavalia ensiformis*)[29].

A enzima urease possui, em seu centro ativo, dois átomos de níquel que tem a função de ativar o substrato[30][31].

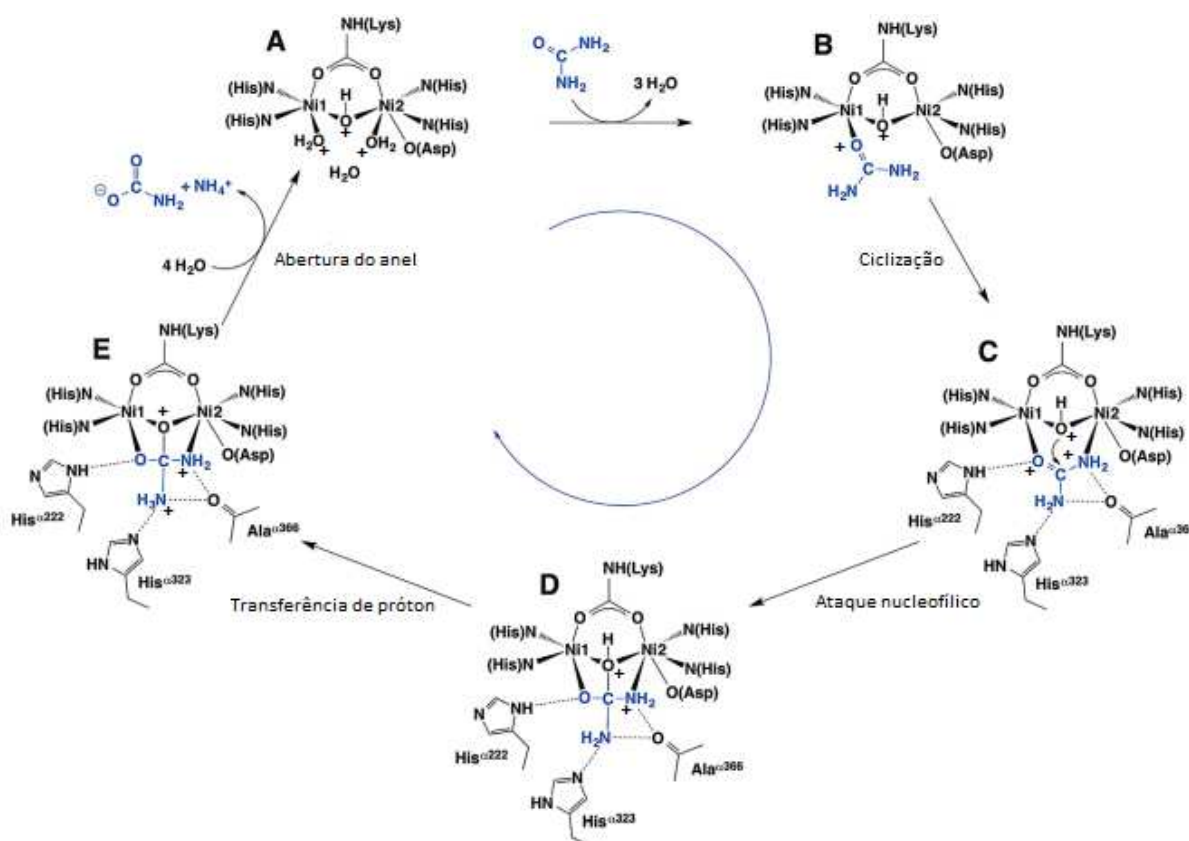
Figura 1: Esquema do sítio ativo da enzima urease.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

O mecanismo para hidrólise da ureia é tema de debate na literatura até hoje, sendo o mecanismo mais aceito o proposto em 2014 por Maroney e Ciurli[32]. O mecanismo de hidrólise da ureia inicia pela substituição das moléculas de água do sítio ativo da urease, permitindo a ligação da ureia ao átomo de níquel (Ni₁) através do oxigênio da carbonila (**Figura 2 – Parte A**). Um dos átomos de nitrogênio da ureia se liga ao segundo átomo de níquel. Além disso, essa ligação formada entre oxigênio e o Ni₁, fez com que o carbono da ureia se tornasse mais eletrofílico e então se estabelece uma ligação bidentada com a urease (**Figura 2 – Partes B e C**). Se acredita que ligação entre o átomo de nitrogênio e o átomo de níquel pode facilitar o ataque ao carbono da urease, resultando em um intermediário tetraédrico (**Figura 2 – Parte D**). A partir desse intermediário, o carbamato e a amônia são liberados e com isso a urease se reestrutura novamente (**Figura 2 – Parte E**).

Figura 2: Mecanismo catalítico da urease[33].



Fonte: Adaptado de Kappaun, 2018.

Essa enzima é sintetizada por vários organismos vivos, tais como as plantas, bactérias, invertebrados, etc. e ela sobrevém também no solo. A urease é uma das enzimas mais eficientes das conhecidas até o presente momento e as características variam de acordo com a sua origem, mas, independentemente da fonte e da composição estrutural, todas elas têm em comum o centro de bi-níquel[34].

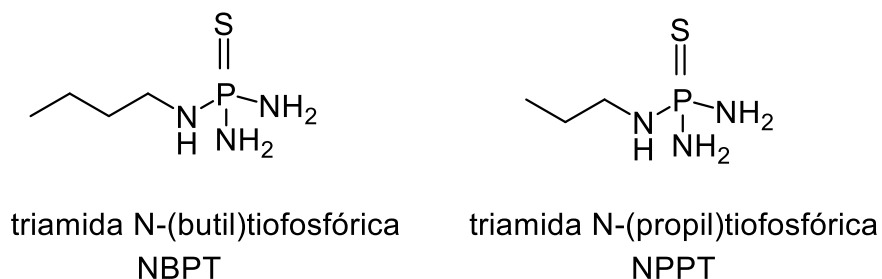
Dados os diversos problemas acarretados pela enzima urease, cada vez mais se torna necessária a busca por novos compostos e, como o substrato da urease é a ureia, nada mais apropriado do que projetar a síntese de estruturas similares a ela[35].

1.3. Inibidores de urease

Devido à hidrólise da ureia pela enzima urease presente no solo, diversos pesquisadores vêm tentando contornar o problema através do uso de compostos sintéticos e produtos naturais como inibidores da enzima urease. Dentre os vários compostos avaliados como inibidores da enzima urease, o *N*-(butil)tiofosfórico

triamida (NBPT) combinado com a triamida N-(propil)tiofosfórica (NPPT) (**Figura 3**) aplicados juntamente da ureia são capazes de diminuir a perda de N em mais de 50% pela volatilização de NH_3 [36].

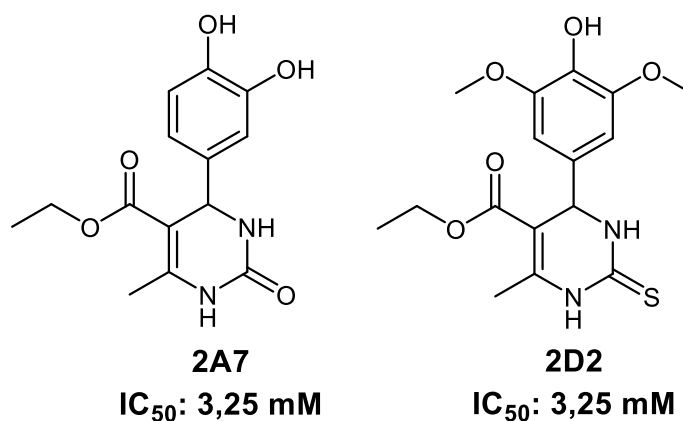
Figura 3: Estruturas dos inibidores NBPT e NPPT.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Outra classe de inibidores da enzima urease descritos na literatura podem ser facilmente sintetizados através da reação multicomponentes de Biginelli empregando aldeídos fenólicos de origem natural como aldeído protocatecuico (3,4-diidroxibenzaldeído), o siringaldeído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído) e a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído)[37]. Os resultados mostraram que algumas estruturas derivadas desses aldeídos naturais inibiram a atividade enzimática de 58 % a 94 % quando adicionados à ureia[38].

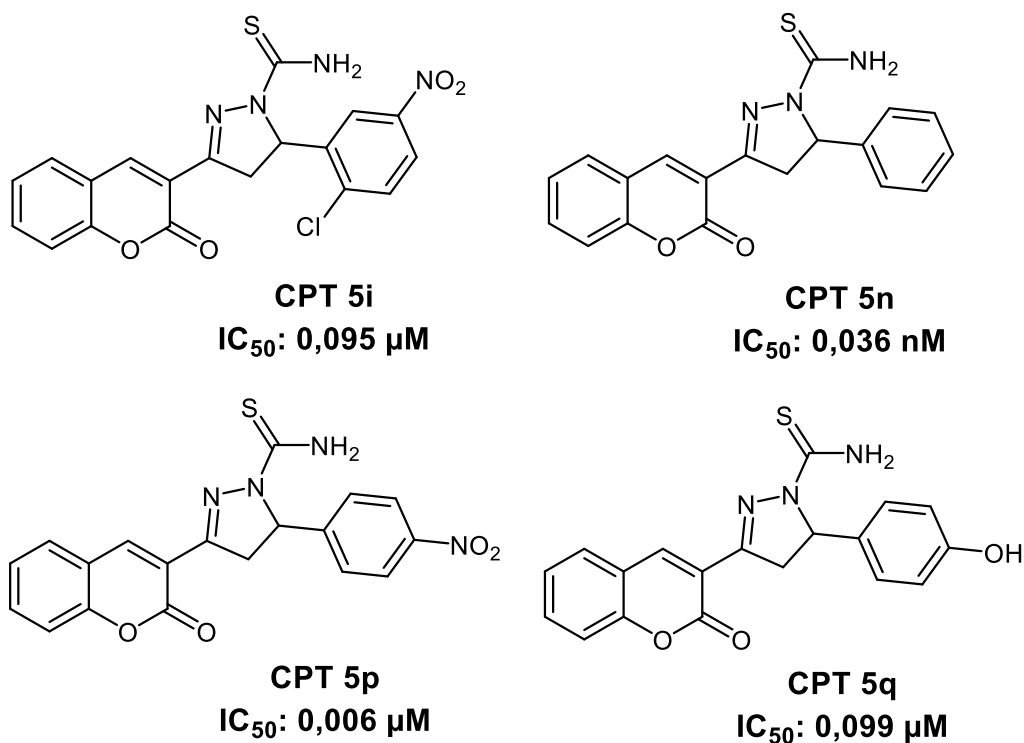
Figura 4: Estruturas de alguns inibidores obtidos através da reação multicomponente de Biginelli[38].



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Outras estruturas de interesse agrícola são os derivados da cumarina que apresentaram atividades *in vitro* como inibidores de urease, com IC₅₀ de 0,036 nM para o derivado 5n (**Figura 5**)[39].

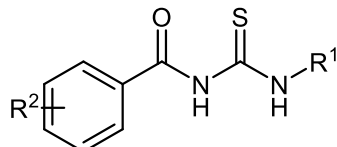
Figura 5: Estruturas dos inibidores derivados da cumarina, sendo o CPT 5n apresentado como mais ativo[39].



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Outra classe de inibidores de urease são as benzoiltioureias (**Figura 6**), que foram avaliadas empregando a enzima isolada de feijão de porco (jack beans) com resultados promissores 51-74% [40].

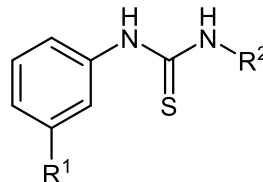
Figura 6: Estruturas das benzoiltioureias (BTUs) que apresentaram atividades inibitórias[40]

	Porcentagem de inibição		
	$R^1 = 4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = 3\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4$	67%
	$R^1 = 4\text{-(CH}_3\text{)-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	52%
	$R^1 = 4\text{-(C}_4\text{H}_9\text{)-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	64%
	$R^1 = 4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	74%
	$R^1 = 3\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	60%
	$R^1 = 3\text{-Br-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	65%
	$R^1 = 2\text{ OMe-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	51%
	$R^1 = 2\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4$	$R^2 = \text{H}$	57%

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Khan e colaboradores sintetizaram uma série de tioureias dissustituídas e avaliaram a atividade inibitória da enzima urease do feijão de porco e obtiveram valores de IC_{50} de 8,4 a 24,1 μM , inferiores aos obtidos para a tioureia IC_{50} de 21 μM . [41].

Figura 7: Estruturas das tioureias dissustituídas[41].

	$R^1 = \text{H}$	$R^2 = \text{C}_5\text{H}_4\text{N}$	$IC_{50}: 8,43 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 20,33 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 2\text{-OMe-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 20,03 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 2,5\text{-Me-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 24,10 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 3,4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 11,03 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 5\text{-Cl-2-Me-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 20,10 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 4\text{-F-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 19,10 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 3,4\text{-F-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 16,30 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 3\text{-Me-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 15,03 \mu\text{M}$
	$R^1 = \text{Cl}$	$R^2 = 4\text{-Me-C}_6\text{H}_4$	$IC_{50}: 18,60 \mu\text{M}$

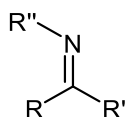
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Tendo em mente todas essas estruturas promissoras, é possível propor e sintetizar análogos como potenciais inibidores de urease.

Com o exposto acima – e tendo em mente a similaridade estrutural das tiocarbazidas com a ureia e a tioureia – foi proposto sintetizar uma série de *bis*-tiocarbazonas derivadas da tiocarbazidas como potenciais inibidores da enzima urease, focando no desenvolvimento de tecnologias para a indústria de fertilizantes brasileira.

É sabido que, há mais de um século, o alemão Hugo Schiff[42] foi responsável por reportar as primeiras iminas na literatura, elas são caracterizadas por uma dupla ligação entre um átomo de carbono e um átomo de nitrogênio. As iminas, que serão foco desse trabalho, na química orgânica, são caracterizadas por serem uma imina análoga a um aldeído que possuem a fórmula geral dada a seguir[43].

Figura 8: Fórmula estrutural de uma imina.



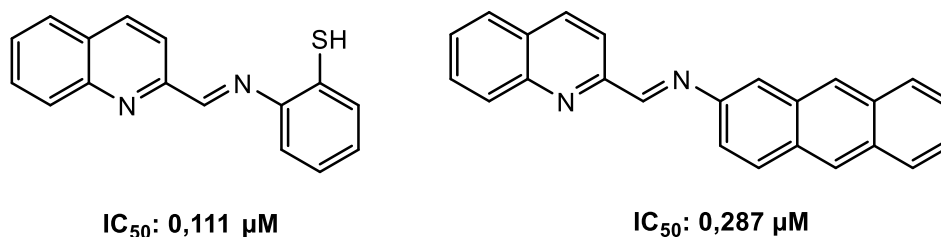
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A rota sintética tradicional para acessar as iminas se dá através da condensação entre um composto carbonílico (podendo ser um aldeído ou uma cetona) e uma amina primária, geralmente catalisada por ácido[44].

Na literatura, as iminas como base de Schiff vêm sendo reportadas com diversas atividades biológicas a citar: i) atividade citotóxica[45], ii) atividade antifúngica[46], iii) atividade antiviral[47], iv) atividade herbicida[48], entre muitas outras. Recentemente, essa classe de moléculas vem merecendo destaque na área agrícola como potenciais inibidores de urease do solo[49].

As atividades biológicas promissoras apresentadas pelos derivados da base de Schiff incentiva a pesquisa de novos compostos capazes de inibir a ação da enzima urease. Os compostos quinolinicos sintetizados por Vanjare[50] e colaboradores apresentaram IC_{50} na ordem de μM para a enzima urease do feijão de porco.

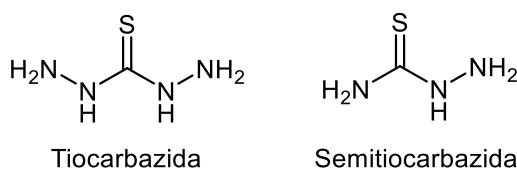
Figura 9: Fórmula estrutural das iminas derivados da quinolina[50].



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Iminas sintetizadas a partir da tiocarbazida possuem alta similaridade estrutural com alguns inibidores a base de ureia e tioureia ($IC_{50}=21,0 \mu M$)[51], apresentando potencial como inibidores de urease[52]. As atividades biológicas reportadas na literatura para essa classe de compostos incluem tuberculose[53], câncer[54], além da aplicação em química supramolecular[55].

Figura 10: Fórmulas estruturais das tiocarbazidas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Alguns estudos relacionados às atividades inibitórias dos compostos derivados da semitiocarbazida mostram que eles apresentam valores significativos de IC_{50} , como por exemplo no trabalho de Taha e colaboradores[56], uma de suas estruturas precisou de uma concentração de $0,5 \mu M$ para inibição de 50 % da enzima em testes utilizando a tioureia como controle, isso indica que novos compostos podem ser otimizados para que sejam desenvolvidos como inibidores líderes de urease.

De acordo com o exposto acima, a obtenção de potentes inibidores de urease, como as *bis-tiocarbazonas*, foco desse trabalho, constitui um passo importante para o desenvolvimento de tecnologias para a indústria de fertilizantes brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Este trabalho tem como proposta sintetizar diferentes *bis*-tiocarbazonas com o intuito de avaliar suas atividades biológicas quanto a inibição de urease.

2.2. Objetivos específicos

- Obter a tiocarbazida;
- Otimizar diferentes parâmetros de reação (quantidade de catalisador, temperatura e tempo reacional) para a síntese de *bis*-tiocarbazonas;
- Sintetizar uma série de *bis*-tiocarbazonas empregando tiocarbazida e diferentes aldeídos aromáticos;
- Avaliar o potencial das tiocarbazonas como inibidores de urease.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização da tiocarbazida [57]

A tiocarbazida foi sintetizada empregando metodologia já descrita na literatura na forma de cristais brancos [58], com 56 % de rendimento (**Figura 11**).

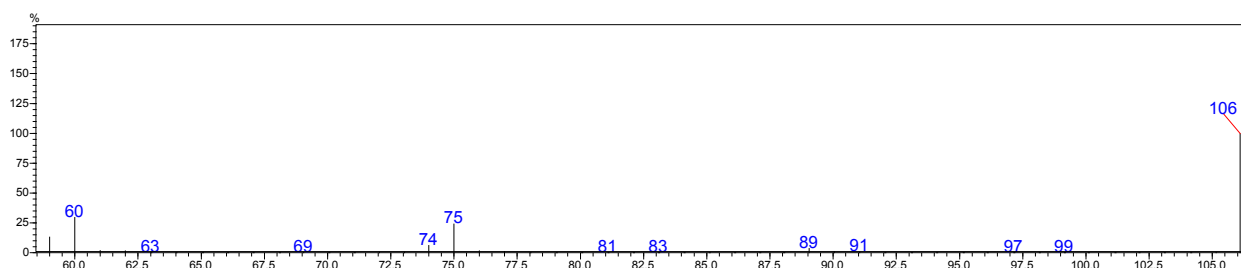
Figura 11: Cristais da tiocarbazida.



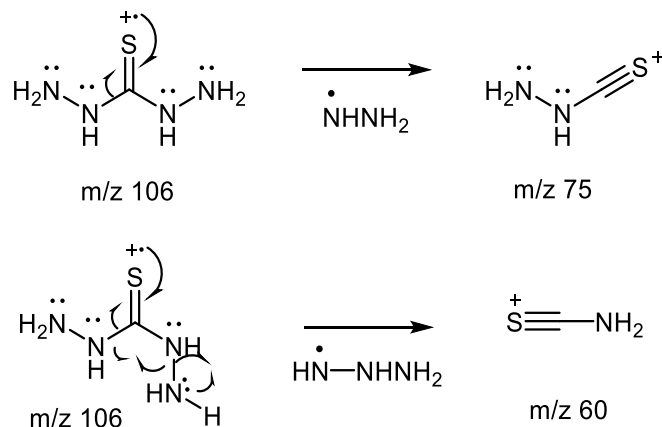
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A caracterização estrutural da tiocarbazida foi realizada inicialmente analisando o espectro de massas onde foi possível observar a presença do íon molecular em m/z 106 (**Figura 12**). O íon molecular com massa par está de acordo com o esperado, já que o produto contém quatro átomos de nitrogênio. Ainda no espectro de massas foi possível observar ainda o íon de m/z 75, que pode ser explicado através da perda de N_2H_3 a partir do íon molecular (**Esquema 3**).

Figura 12: Espectro de massas (IE, 70 eV) da tiocarbazida.

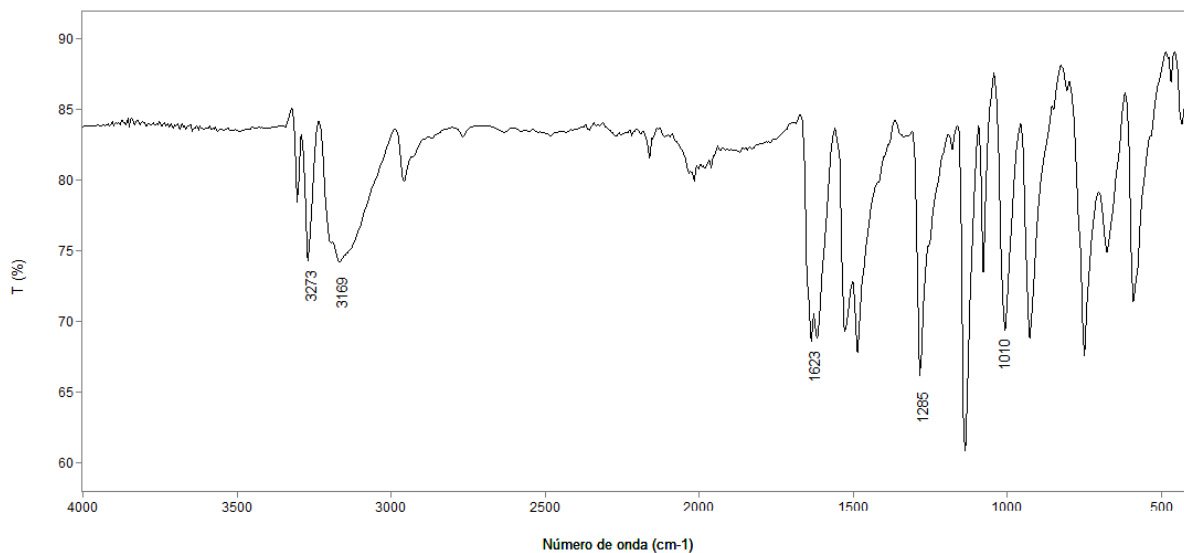


Esquema 3: Proposta mecanística para a fragmentação da tiocarbazida[57].



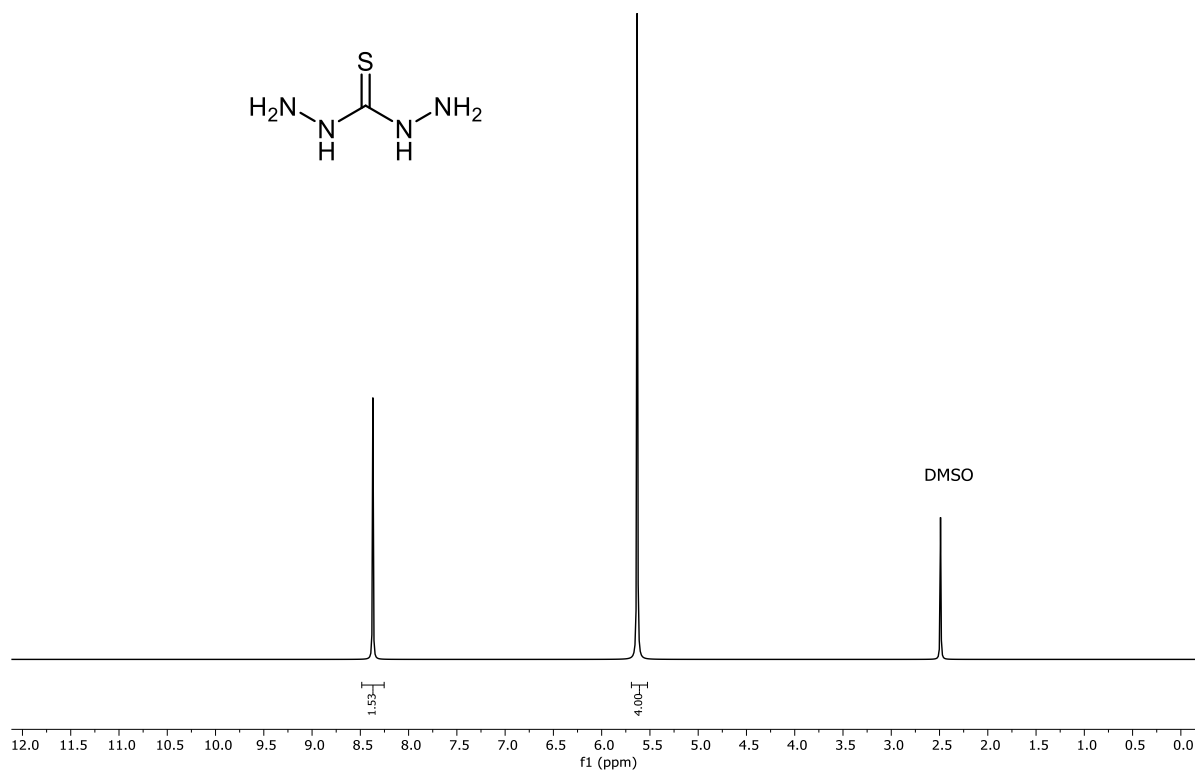
No espectro no infravermelho da tiocarbazida foram observadas bandas características de absorção do estiramento da ligação N-H dos grupos NH e NH₂ em 3273 cm⁻¹ e 3169 cm⁻¹ outra banda em 1623 cm⁻¹ caracterizando a deformação da ligação NH₂. A banda em 1285 cm⁻¹ foi atribuída para o estiramento da ligação C=S. Uma banda em 1010 cm⁻¹ ao estiramento da ligação C-N[59].

Figura 13: Espectro no infravermelho (reflectância) da tiocarbazida.



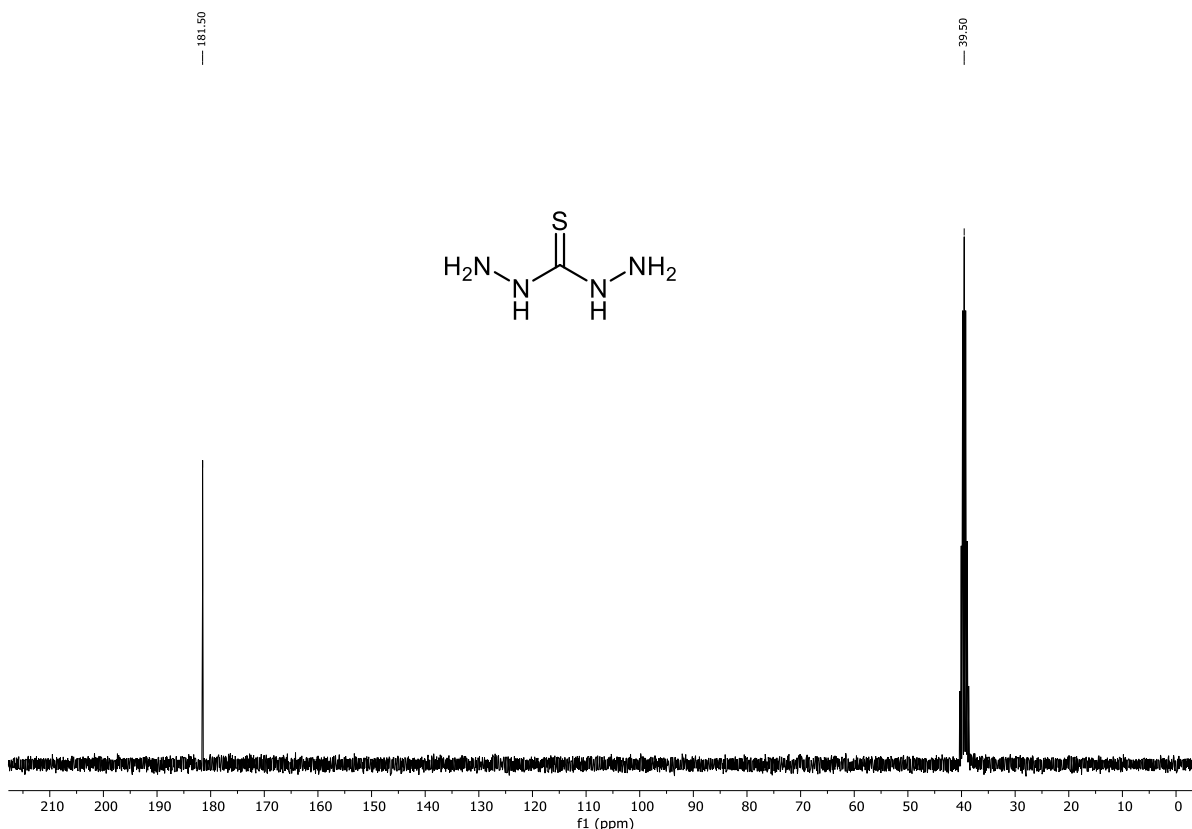
No espectro de RMN de ^1H da tiocarbazida (**Figura 14**) foi observado a presença de dois simpletos em δ 5,63 e 8,37 ppm, integrados para quatro e dois hidrogênios cada que foram atribuídos aos 2 NH_2 e 2 NH , respectivamente.

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; $\text{DMSO-}d_6$; δ_{DMSO} 2,49) da tiocarbazida.



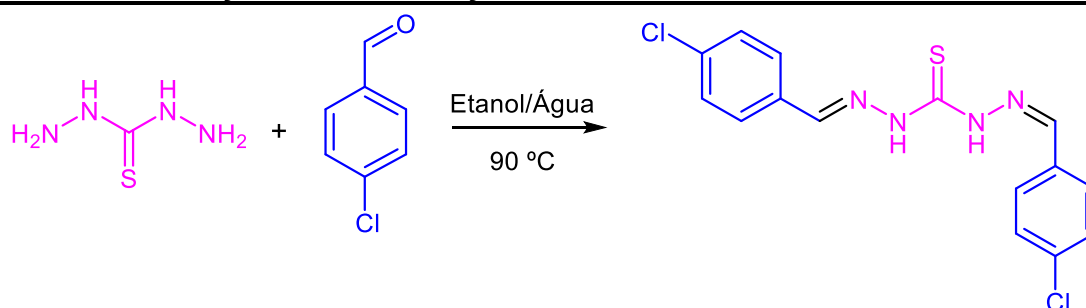
No espectro de RMN de ^{13}C da tiocarbazida (**Figura 15**), como esperado só foi observado um sinal em δ 181,5 ppm, referente carbono da tiocarbazida ($\text{C}=\text{S}$) [60].

Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; $\text{DMSO-}d_6$; δ_{DMSO} 39,5) da tiocarbazida.



3.2. Otimização das *bis*-tiocarbazonas

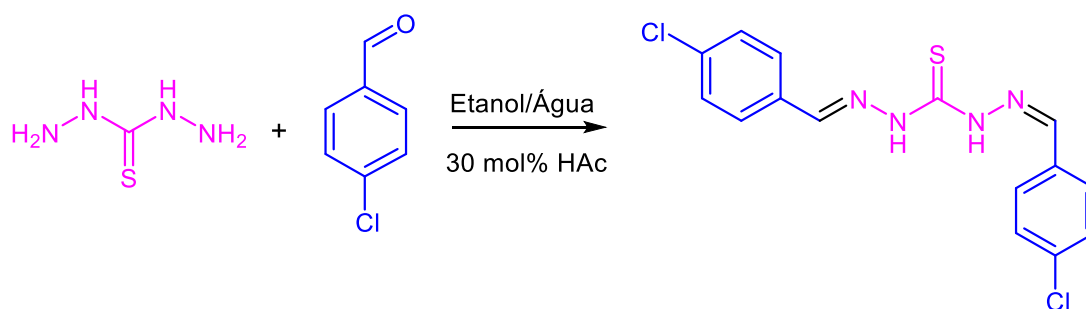
Inspirados no trabalho de Li e colaboradores [61] decidiu-se otimizar as condições de reação foram selecionados como substratos modelo a tiocarbazida (0,5 mmol) e o 4-clorobenzaldeído (1,3 mmol) na ausência de catalisador, 3 horas, temperatura de 90 °C e uma mistura de solventes 1,5/1,3 mL de água/etanol, sendo obtido a *bis*-tiocarbazona com 72% de rendimento (**Tabela 1, experimento 1**). Na tentativa de melhorar o rendimento da reação foram avaliados diferentes proporções de ácido acético como catalisador (5, 10, 20 e 30 mol%), sendo os rendimentos obtidos de 76, 77, 87 e 90 %, respectivamente (**Tabela 1, experimento 2-5**). Ao avaliar quantidades superiores a 30 mol%, tais como 60 e 120 mol% o rendimento diminui para 89 e 86 %, respectivamente (**Tabela 1, experimento 6 e 7**).

Tabela 1 – Otimização da concentração de catalisador^a.

Experimento	Ácido acético (mol %)	Rendimento (%) ^b
1	0	72
2	5	76
3	10	77
4	20	87
5	30	90
6	60	89
7	120	86

^aReagentes e condições: 4-clorobenzaldeído (1,3 mmol), tiocarbazida (0,5 mmol), 1,5 mL de H₂O e 1,3 mL de EtOH em 3 horas de reação. ^bRendimentos determinados por CLAE.

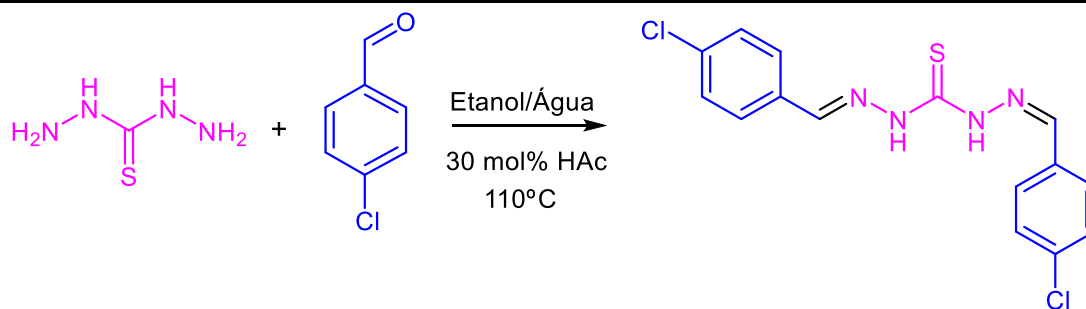
Após estabelecer a quantidade de ácido acético (30 mol%) empregado como catalisador, foi avaliado a influência da temperatura no rendimento da *bis*-tiocarbazonas (**Tabela 2**). Foram avaliadas temperaturas inferiores a 90 °C, sendo observado um decréscimo no rendimento 37 e 76%, para as temperaturas de 70 e 80 °C, respectivamente (**Tabela 2, experimentos 1 e 2**). Para as temperaturas de 90, 100 e 110 °C, foram observados rendimentos similares na ordem de 90% (**Tabela 2, experimentos 3-5**) enquanto que para a temperatura de 120 °C, o rendimento diminuiu para 77% (**Tabela 2, experimento 6**).

Tabela 2 – Otimização da temperatura^a

Experimento	Temperatura (°C)	Rendimento (%) ^b
1	70	37
2	80	46
3	90	90
4	100	91
5	110	94
6	120	77

^aReagentes e condições: 4-clorobenzaldeído (1,3 mmol), tiocarbazona (0,5 mmol), 1,5 mL de H₂O e 1,3 mL de EtOH em 3 horas de reação. ^bRendimentos determinados por CLAE.

Após otimizar a quantidade de catalisador e a temperatura de reação para a síntese de *bis*-tiocarbazona foi avaliado o tempo de reação. Para tempos de reação de 1 e 2 horas foram observados rendimentos de 92% e 93%, respectivamente (**Tabela 3, experimentos 1 e 2**). Já para tempo de reação superiores a 3 horas o rendimento diminui para 78% e 60 %, respectivamente (**Tabela 3, experimentos 4 e 5**). Neste ponto foi estabelecido que as melhores condições de reação são: 30 mol % de catalisador e uma temperatura de 110 °C.

Tabela 3 – Otimização do tempo reacional^a

Experimento	Tempo (h)	Rendimento (%) ^b
1	1	92
2	2	93
3	3	97
4	4	78
5	5	60

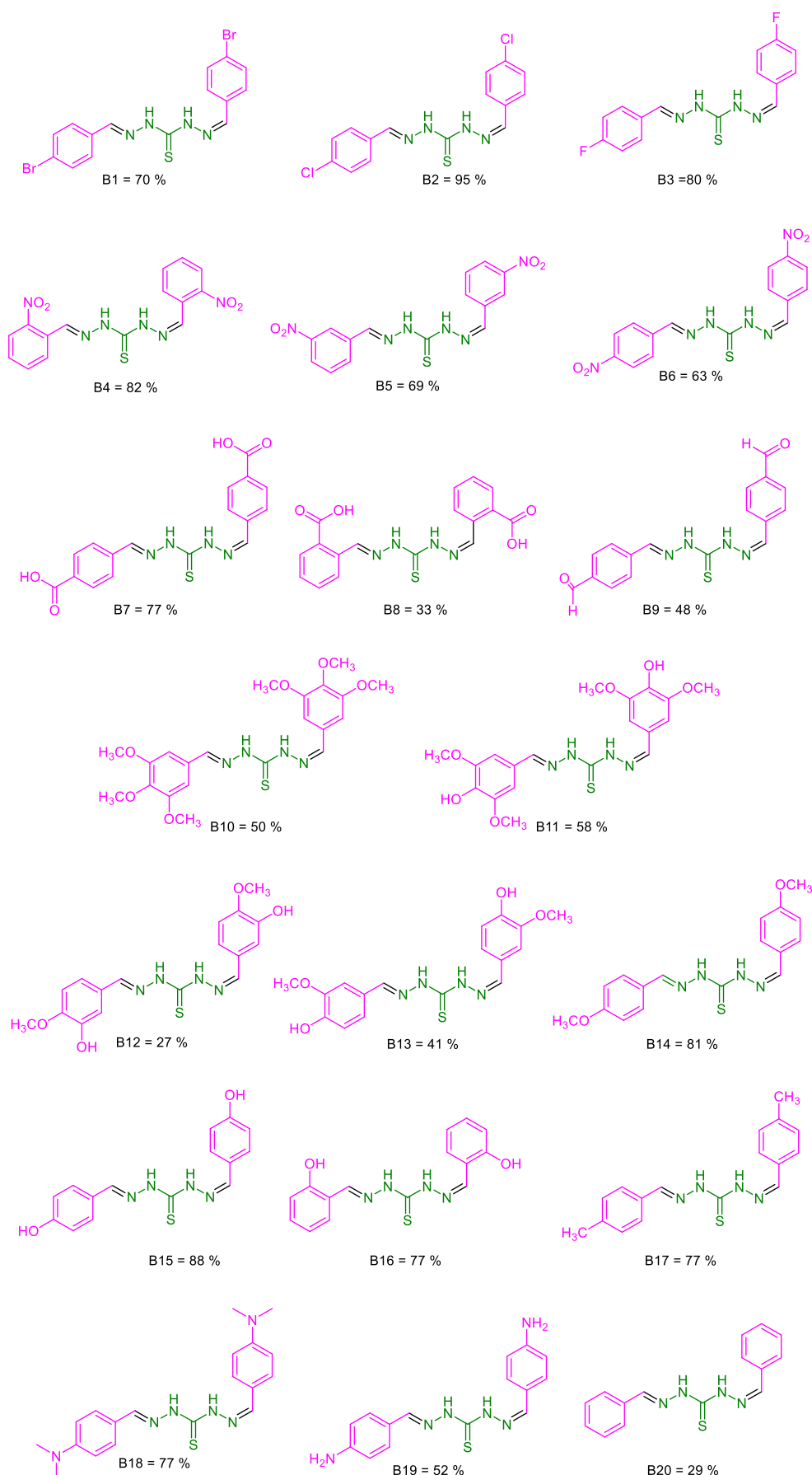
^aReagentes e condições: 4-clorobenzaldeído (1,3 mmol), tiocarbazida (0,5 mmol), 1,5 mL de H₂O e 1,3 mL de EtOH. ^bRendimentos determinados por CLAE.

3.3. Avaliação da generalidade das reações

Após otimizar as condições de reação (30 mol% de ácido acético, 110 °C e 3 horas de reação) foram avaliadas as generalidades da reação para a síntese de *bis*-tiocarbazonas empregando diferentes aldeídos aromáticas com grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica.

Para a série de *bis*-tiocarbazonas contendo os halogênios Cl, Br e F em posição *para* ao aldeído de partida, foram obtidos bons rendimento (**Figura 16**), sendo o melhor rendimento obtido empregando o *p*-clorobenzaldeído (95%). Para as *bis*-tiocarbazonas contendo grupos nitro em posições *orto*, *meta* e *para*, o melhor resultado foi obtido para o produto contendo o grupo nitro em posição *orto* (82%), enquanto o menor rendimento foi obtido para o produto contendo o grupo nitro em posição *para* (63%) (**Figura 16**). Para os compostos contendo a carboxila na posição *para* (B7) e *orto* (B8) o rendimento observado foi de 77% e 33%, respectivamente. Já para os compostos B10-B13 contendo grupos doadores de densidade eletrônica os rendimentos ficaram abaixo de 50% (**Figura 16**). Para os compostos contendo hidroxilas nas posições *para* e *orto* B15 e B16 foram observados bons rendimentos 88 e 77%, respectivamente (**Figura 16**). Para as *bis*-tiocarbazonas B17, B18 e B19 contendo os grupos doadores de densidade eletrônica em posição *para* (CH₃, N(CH₃)₂ e NH₂) foram observados rendimentos de 77%, 77% e 52%, respectivamente. Para a

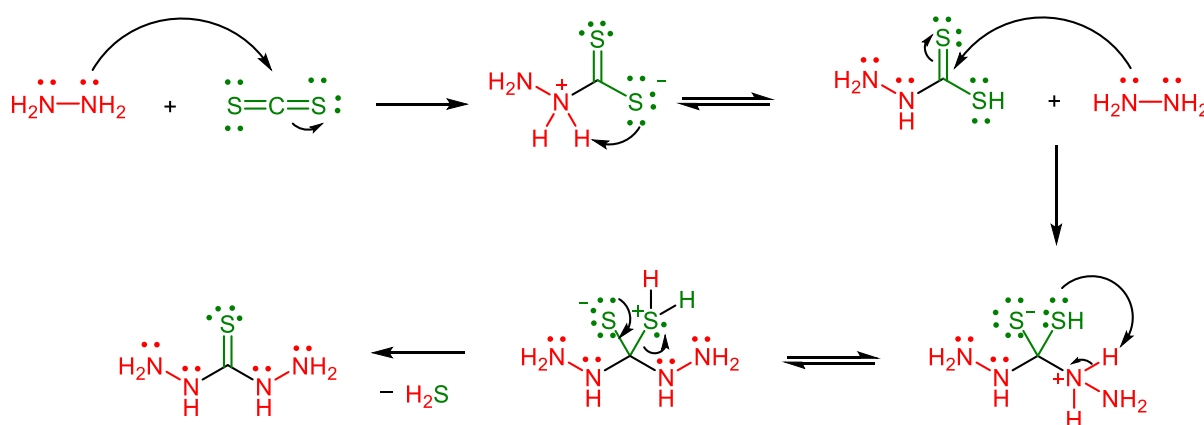
bis-tiocarbazona B20 sem substituinte no anel aromático, o rendimento foi de 29% (**Figura 16**). De modo geral, não foi possível estabelecer correlação entre os substituintes no anel aromático e os rendimentos obtidos para as *bis*-tiocarbonas (**Figura 16**).

Figura 16: Estruturas e rendimentos das tiocarbazonas B12 a B20

3.4. Proposta mecanística da síntese da tiocarbazida

Na primeira etapa a hidrazina ataca o carbono do CS_2 , sendo formado o intermediário trigonal plano, seguido de prototropismo. Posteriormente uma segunda molécula de hidrazida adiciona-se à tiocarbonila, seguida de um novo prototropismo e posterior restituição da dupla ligação e eliminação de uma molécula de ácido sulfídrico (**Esquema 3**).

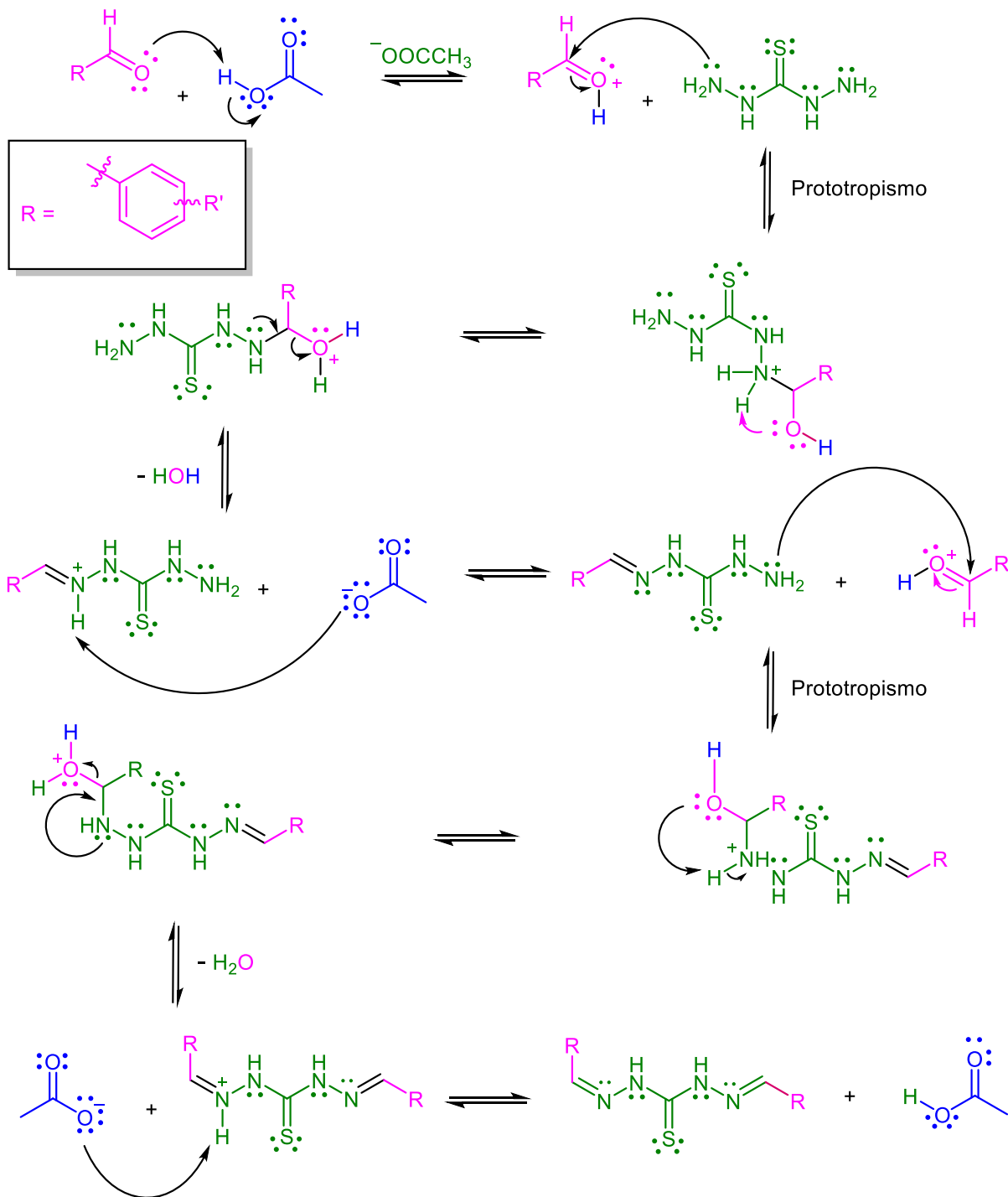
Esquema 3: Proposta mecanística para a reação da tiocarbazida[57].



3.5. Proposta mecanística para a formação da *bis*-tiocarbazona

O mecanismo proposto para a síntese das *bis*-tiocarbazonas inicia-se com a ativação da carbonila do aldeído pelo hidrogênio do ácido acético (**Esquema 4**). Numa segunda etapa, o par de elétrons do nitrogênio da tiocarbazida ataca a carbonila ativada, levando a formação de um intermediário tetraédrico (**Esquema 4**). Posteriormente acontece um prototropismo, seguido da perda de uma molécula de água e formação do íon imínio. Por fim, uma molécula de água ou o ânion acetato captura um hidrogênio levando a formação da respectiva tiocarbazona. Para a formação da *bis*-tiocarbazona acontece novamente todas as etapas descritas anteriormente.

Esquema 4: Proposta mecanística para a reação da *bis*-tiocarbazona.

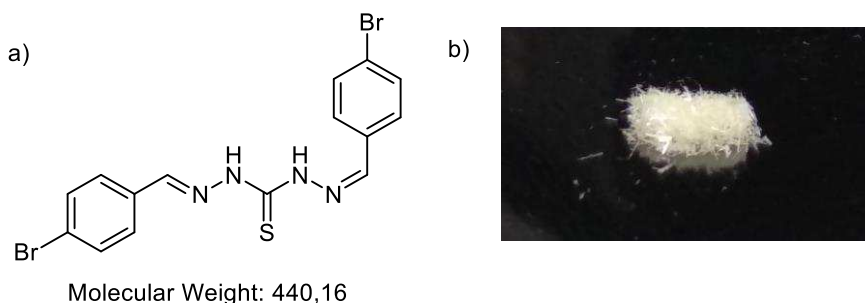


3.6. Caracterização da *bis*-tiocarbazona B1

Devido à similaridade estrutural entre as *bis*-tiocarbazonas sintetizadas, optou-se por apresentar e discutir a caracterização somente do composto **B1**. A *bis*-

tiocarbazona **B1** foi sintetizada a partir da tiocarbazida e dois equivalentes do 4-bromobenzaldeído com 70% de rendimento.

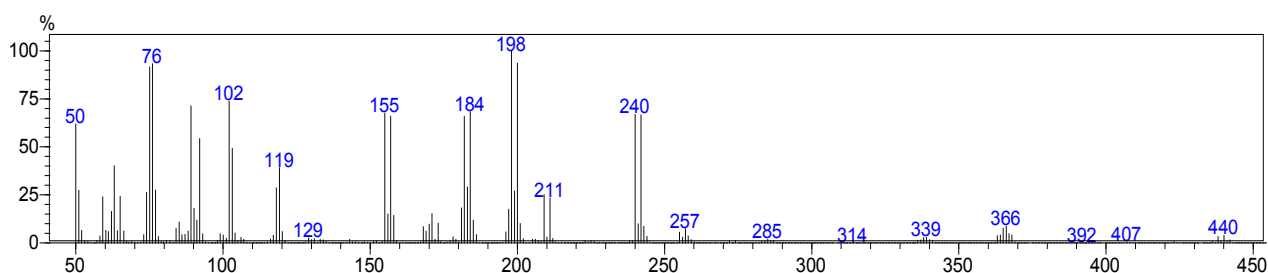
Figura 17: a) Formula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B1** e b) Cristais da *bis*-tiocarbazona **B1**.



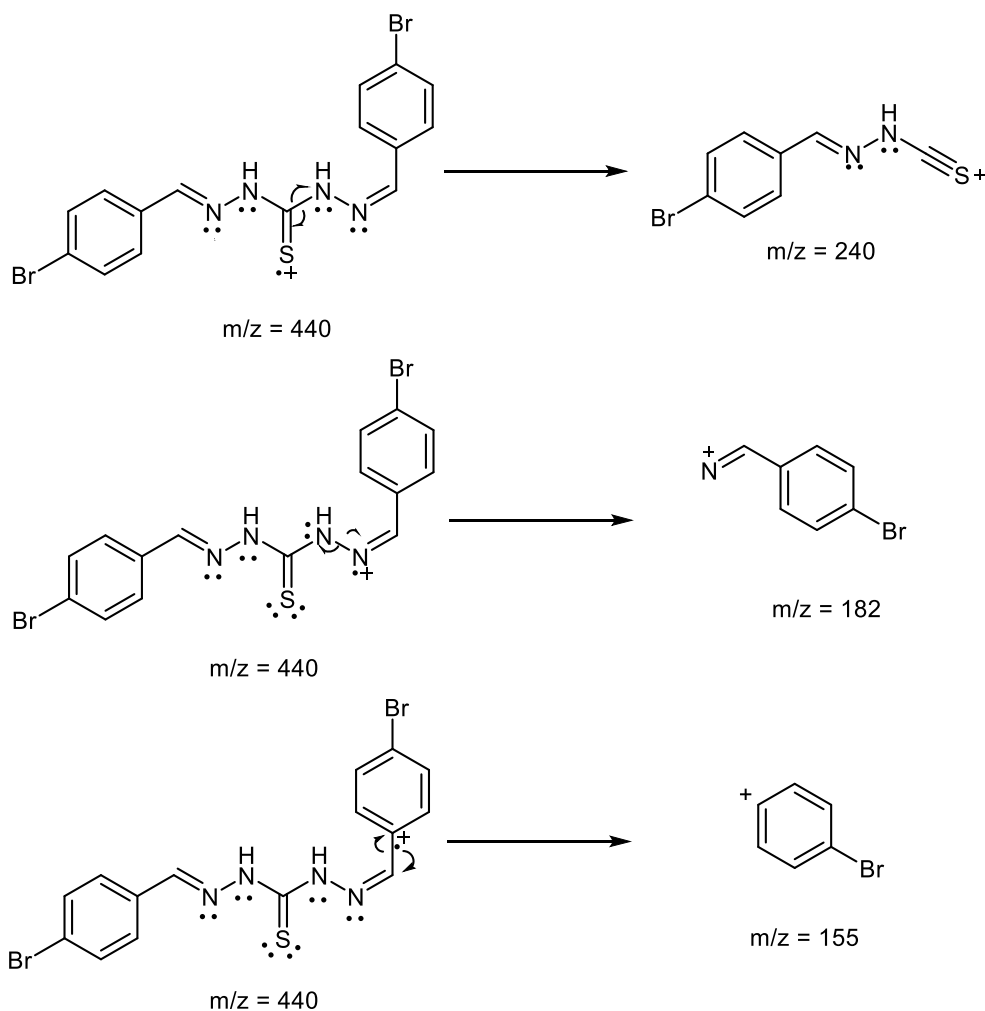
A faixa de temperatura de fusão para o composto **B1** foi de 209,8 °C a 211,7 °C, indicando que o composto **B1** está puro.

Ao analisar o espectro de massas da *bis*-tiocarbazona **B1**, foi possível observar a presença do íon molecular em m/z 440 e como esperado o íon molecular possui massa par o que está de acordo com a presença de quatro átomos de nitrogênio (**Figura 18**). Também foi observado o pico base em m/z 198 (**Esquema 2**).

Figura 18: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B1**.

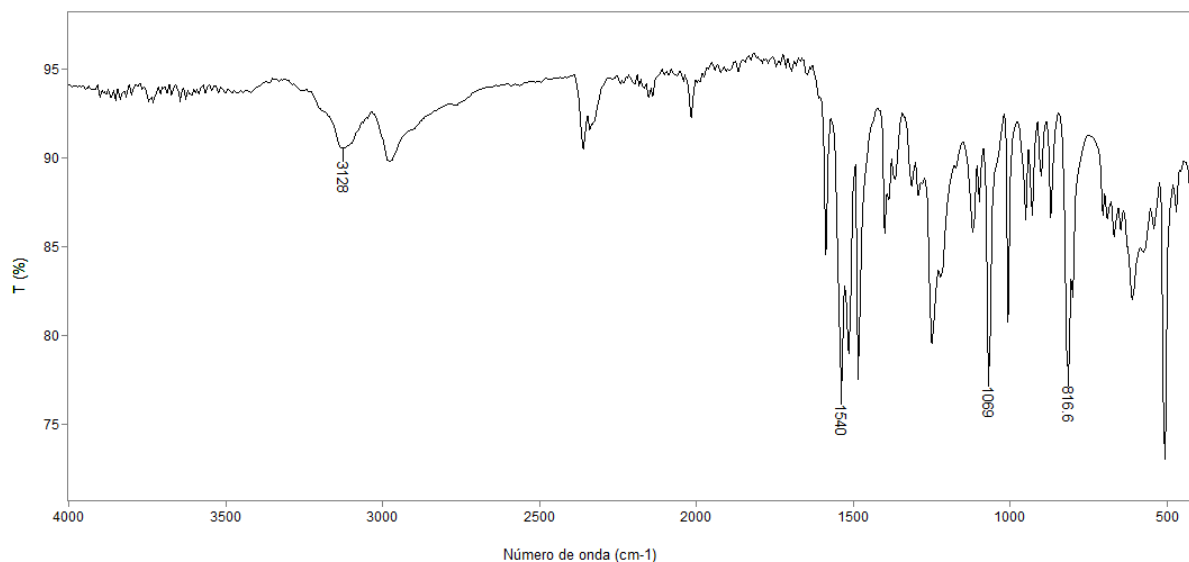


Esquema 2: Proposta de fragmentação para explicar os íons m/z 240, 184 e 155.



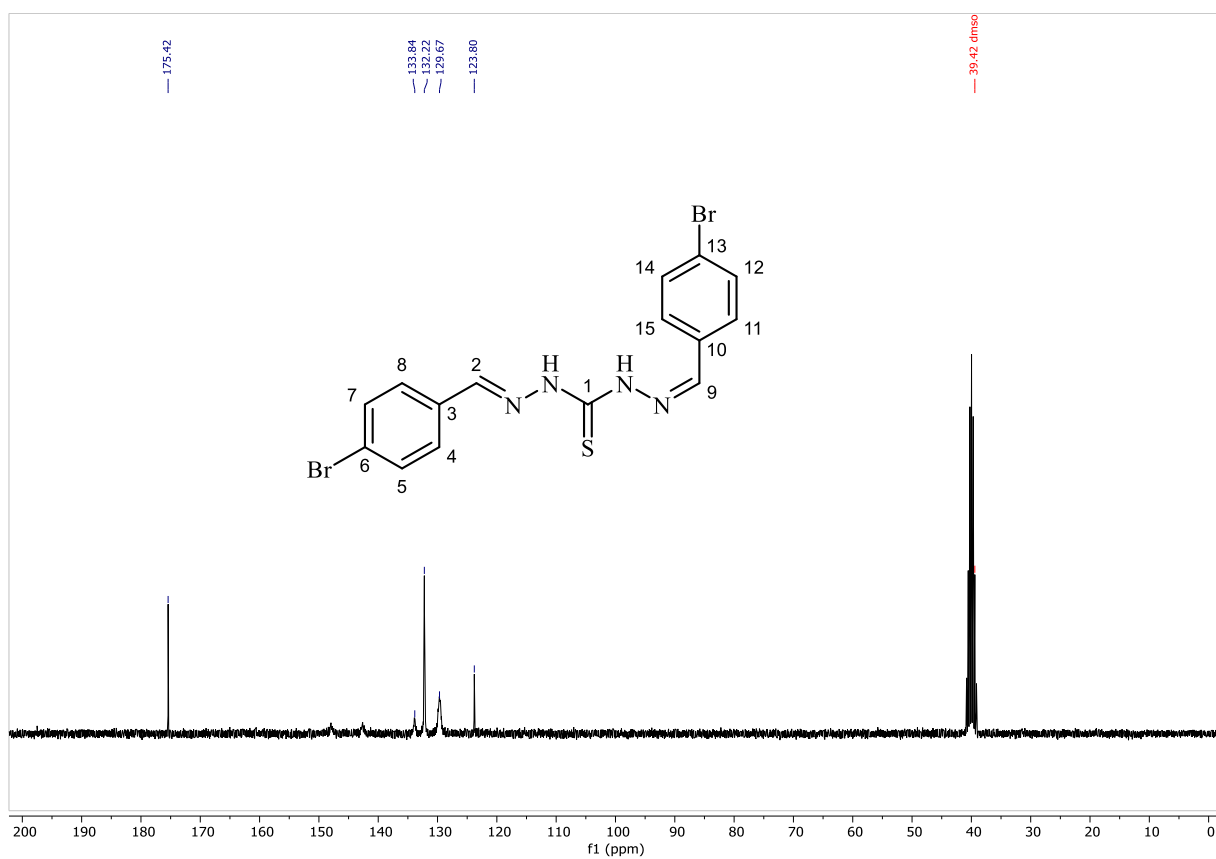
No espectro no infravermelho da *bis*-tiocarbazona **B1** foram observadas bandas características de absorção do estiramento da ligação NH (ν =NH) em 3128 cm^{-1} , da ligação C=N em 1540 cm^{-1} e ν C=S em 1069 cm^{-1} (**Figura 19**). Foi possível notar também em 816 cm^{-1} correspondente a deformação angular da ligação C-H de benzeno 1,4 dissubstituído.

Figura 19: Espectro no IV (reflectância) da *bis*-tiocarbazona **B1**.



Ao analisar o espectro de RMN de ¹H da *bis*-tiocarbazona **B1** (**Figura 20**), foi possível observar dois simpletos largos, integrados para um hidrogênio cada, em δ 12,00 e 11,67 que foram atribuídos ao hidrogênios diretamente ligados aos átomos de nitrogênio. Em δ 8,56 e 8,11 foram observados dois simpletos largos, integrados para um hidrogênio cada, que foram atribuídos aos hidrogênios H2 e H9 referentes ao HC=N. Por fim, foi observado um multipletto com integração para oito hidrogênios em δ 7,89-7,58 atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos (H4, H5, H7, H8, H11, H12, H14 e H1).

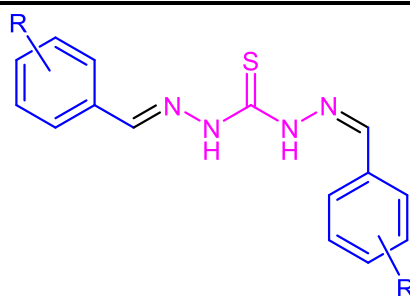
Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; $\text{DMSO-}d_6$; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B1**.



3.7. Testes preliminares para atividade antiurease

Inicialmente, foi realizado teste de solubilidade em etanol para as 7 *bis*-tiocarbazonas avaliadas, das quais somente 6 foram solúveis neste solvente. Para as *bis*-tiocarbazonas solúveis em etanol os testes foram realizados utilizando os compostos na concentração de 250 μ M (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Porcentagem de inibição das *bis*-tiocarbazonas avaliadas sobre a atividade da enzima urease e do controle positivo Hidroxiureia (HU).



Composto	R	Média de Inibição a 250 μ M
B1	4-Br	35,3
B2	4-Cl	35,5
B3	4-F	18,9
B10	3,4,5-OMe	-
B11	3,5-OMe-4-OH	27,8
B15	4-OH	45,5
B16	2-OH	46,0
HU	-	58,3

De acordo com a triagem das 7 *bis*-tiocarbazonas, os compostos **B15 e B16** são os mais promissores para inibição da enzima urease, inibindo, respectivamente, em 45,5% e 46,0% - isso quando comparado à porcentagem do controle positivo que foi a hidroxiureia (58,3 %).

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi desenvolvida uma nova metodologia de síntese de *bis*-tiocarbazonas. Foram avaliadas diferentes concentrações de catalisador em diferentes temperaturas e tempo reacional. A partir dessa condição ótima, foram sintetizadas 20 *bis*-tiocarbazonas empregando diferentes aldeídos aromáticos com

rendimentos que variaram de 27-95%. A metodologia avaliada para síntese das *bis*-tiocarbazona está dentro de alguns princípios da química verde, sendo estes o emprego de um catalisador que pode ser obtido através da biomassa (ácido acético) e uma mistura de solventes verdes etanol/água, além do processo de purificação que foi através de recristalização utilizando esses mesmos solventes ambientalmente amigáveis. Das 20 *bis*-tiocarbazonas, testes preliminares foram feitos com 7 moléculas para avaliarmos se sua capacidade em inibir a urease seria promissora. Das sete moléculas, uma delas não foi solúvel para a realização dos testes, porém, das 6 disponíveis, as porcentagens de inibição de urease variaram de 19% a 46%, sendo a hidroxíurea o composto utilizado como inibidor de referência.

5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se avaliar as atividades biológicas de todas as 20 *bis*-tiocarbazonas – obtidas de acordo com as novas condições – como potenciais inibidores da enzima urease. Assim como a capacidade de complexação dessas moléculas com metais e a avaliação das atividades antiurease. Além disso, deseja-se trabalhar com a ciclização das *bis*-tiocarbazonas e sintetizar uma nova série de moléculas com potenciais atividades biológicas.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Solventes e reagentes

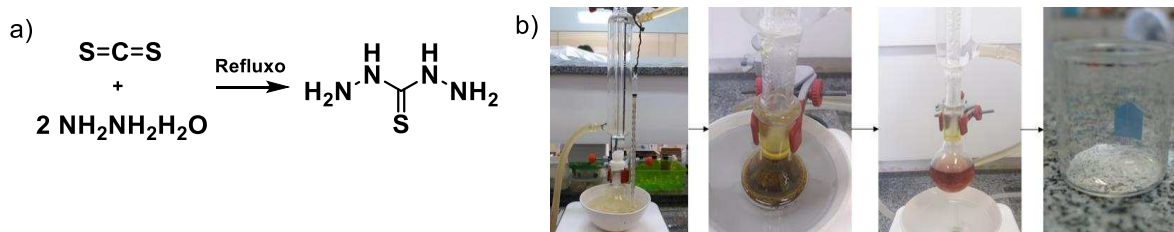
Os solventes e reagentes utilizados na síntese eram produtos analiticamente puros indicados pelos fabricantes. Quando necessário, os solventes e reagentes foram submetidos a métodos de purificação[58].

6.2. Síntese da tiocarbazida[57]

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 3,3 mL de solução de hidrazina (80 %, v/v) e, posteriormente foi gotejado 1 mL de dissulfeto (CS_2) com

o auxílio de um funil de adição à temperatura ambiente. Após a adição de CS₂ a mistura reacional foi colocada em refluxo por duas horas. Ao fim deste período o aquecimento foi removido, sendo observado a formação de um precipitado amarelo que foi filtrado através de funil de buchner, e em seguida lavado com etanol a frio.

Figura 22: a) Esquema de reação e b) Imagens da reação de síntese da tiocarbazida.



O sólido foi recristalizado, empregando uma mistura de etanol e água 1:1 (v/v). Após recristalização os cristais foram filtrados a vácuo com o auxílio de um funil de buchner e lavados novamente com etanol a frio.

6.3. Testes de atividade antiurease[62]

A triagem *in vitro* das *bis*-tiocabazonas foi realizada na presença da urease de feijão de porco tipo III (Sigma) [40]. As reações foram instituídas em tampão de fosfato 20 mM (pH 7,0) contendo EDTA 1 mM e urease 12,5 mU, ureia 10 mM na presença ou ausência de cada um dos compostos. As reações foram incubadas a 25 ° C por 15 min e interrompidas pela adição de 0,5 vol. de 1 % m/v fenol em 5 mg L⁻¹ de nitroprussiato de sódio (SNP) e 0,7 vol. de 0,5 % m/v NaOH em 0,1 % m/m hipoclorito de sódio. Os sistemas foram incubados a 50 ° C por 5 min, seguido pela quantificação de NH₄⁺ a 630 nm. A hidroxiiureia (HU) foi usada como a referência do inibidor. As experiências foram realizadas em triplicata.

Os compostos se mostraram capazes de inibir a urease do feijão de porco e então foram posteriormente testados em um Latossolo Vermelho distrófico argiloso (Latosolo) coletado em uma área agrícola localizada no Cerrado brasileiro (19 ° 28'01,2 " S, 44 ° 10 ' 24,5 " W). As características físico-químicas do solo utilizadas foram 10% areia, 12% silte e 78% argila, pH 6,3, 10 mg dm⁻³ P_{Mehlich-1}, 129 mg dm⁻³ K, 4,4 cmol_c dm⁻³ Ca²⁺, 0,9 cmol_cdm⁻³ Mg²⁺, 0,1 cmol_c dm⁻³Al³⁺, 2,6 cmol_c dm⁻³ H + Al, soma de bases de 5,6 cmol_c dm⁻³, 68% de saturação de bases e matéria orgânica

de 2,5 dag kg⁻¹. Para análise da inibição das ureases do solo o procedimento foi realizado conforme descrito por Kandeler e Gerber[63], com algumas modificações[40]. Amostras do solo foram peneiradas (<2 mm; 0,5 g), incubadas a 37 °C com uréia 72 mM na presença ou ausência de cada composto (250 µM) por 1 h. As reações foram interrompidas pela adição de 1 M de KCl em 1 M de HCl. Cada sistema foi incubado por 30 min a 25 ° C e centrifugado a 5000 × g. Uma solução contendo 3,4% de salicilato de sódio, 2,5% citrato de sódio, 2,5% tartarato de sódio e 120 mg L⁻¹ SNP foi adicionada ao sobrenadante, o qual foi incubado por 15 min a 25 °C. Cada mistura recebeu 0,1 vol de NaOH 3,0% / hipoclorito de sódio 1,0% seguido de incubação por 1 h a 25 ° C no escuro sob agitação. O NH⁴⁺ formado foi quantificado a 660 nm. A hidroxiiureia (HU) foi usada como a referência do inibidor. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

6.4. Instrumentação e condições

6.4.1. Espectrometria de massas (EM)

As análises de massas das *bis*-tiocarbonas foram realizadas através de inserção direta, em um espectrômetro de massas (SHIMADZU) modelo GC/MS QP2010, pertencente ao Núcleo de Análises Química de Amostras Ambientais e Agroindustrias (NAQAA), do Departamento de Química-UFV, que operou com a temperatura da interface a 300 °C e da fonte de íons a 300 °C por 15 minutos. Os valores de *m/z* foram registrados no intervalo de 35-700 *m/z*.

6.4.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro FTIR Varian 660 equipado com GladiATR (Departamento de Química – UFV). Os valores foram expressos em números de onda e registrados no intervalo de 4000 - 450 cm⁻¹, pertencente ao Núcleo de Análises Química de Amostras Ambientais e Agroindustrias (NAQAA), do Departamento de Química-UFV.

6.4.3. Temperatura de fusão (TF)

As faixas de temperatura de fusão foram obtidas no equipamento PF 1500 FARMA (GEHAKA) empregando uma taxa de 0,5 °C/minuto. O equipamento pertence ao Laboratório de Química Supramolecular e Biomimética (LQSB), do Departamento de Química - UFV.

6.4.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram obtidos no espectrômetro Varian Mercury 300 MHz ($B_0 = 7\text{ T}$), operando a 300,069 MHz para ^1H e 75,459 MHz para ^{13}C , pertencente ao Núcleo de Análises Química de Amostras Ambientais e Agroindustrias (NAQAA), do Departamento de Química – UFV. Em todos os casos o solvente deuterado utilizado foi DMSO- d_6 . Os sinais foram caracterizados como simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), multiplete (m), duplo duplete (dd) e triplo duplete (td). Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm, o sinal residual do DMSO (δ_{DMSO}) 2,49 ppm para ^1H e δ_{DMSO} 39,5 ppm para ^{13}C .

6.5. Otimização das condições reacionais para a síntese das *bis*-tiocarbazonas

Inspirados no trabalho de Li e colaboradores, em 2011, foi decidido avaliar diferentes condições para a obtenção das *bis*-tiocarbazonas, sendo o ácido acético (HAc) empregado como catalisador[61]. Para que fosse possível otimizar os parâmetros da reação, os substratos modelos selecionados foram o 4-clorobenzaldeído e a tiocarbazida, sendo essa última o reagente limitante.

Uma série de experimentos foram realizados e as condições reacionais como a temperatura (70, 80, 90, 100, 110 e 120 °C), o tempo (1, 2, 3, 4 e 5 horas), o solvente e a quantidade de catalisador (0, 5, 10, 20, 30, 60 e 120 mol %) foram variados. A melhor condição de cada etapa foi selecionada e com ela, se seguiu para encontrar a próxima varável a ser otimizada. Ao fim de cada reação, o sólido formado foi filtrado

e, a partir dele, foi preparada uma solução em metanol de 200 ppm, que foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

6.6. Quantificação das *bis*-tiocarbazonas por CLAE para a otimização da síntese

Uma curva de calibração foi elaborada durante a realização das reações de otimização dos parâmetros com a finalidade de quantificar a *bis*-tiocarbazona em cada experimento. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um sistema LC Thermo Scientific Accela (detector de arranjo de diodos (DAD), autoinjeter e bomba Accela) (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX). A coluna empregada na separação foi a de fase reversa Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 4,6 µm e 12 nm de poro) (Shimadzu, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Como fase móvel, foi utilizada a mistura constituída por água (A), acetonitrila (B) e metanol (C), a eluição foi em modo gradiente linear de 0 a 10 min (30 - 27 % A, 15 % B e 55 - 58 % C), de 10 a 18 min (27 - 23 % A, 15 % B e 58 - 62 % C), 18 a 23 min (23 - 10 % A, 15 - 30 % B e 62 - 60 % C), de 23 a 26 min (10 - 0 % A, 30 - 50 % B e 60 - 50 % C) e de 26 a 27 min (50 - 0 % B e 50 - 100 % C). Eluição isocrática de 27 a 32 min (100 % C), gradiente de 32 a 33 min (0 - 30 % A, 0 - 15 % B e 100 - 55 % C). Nos 5 minutos finais, eluição isocrática de 33 a 38 min (30 % A, 15 % B e 55 % C).

O fluxo na coluna foi de 600 µL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL (loop parcial), com temperatura de 25 °C para injetor e coluna. Os picos foram identificados nos comprimentos de onda de máxima absorção dos compostos que deveriam ser separados: 254 nm (tiocarbazida e 4-clorobenzaldeído), 321 nm (1-(4-clorobenzaldeído)tiocarbazona) e 328 nm 1,5-*bis*(4-clorobenzaldeído)tiocarbazona.

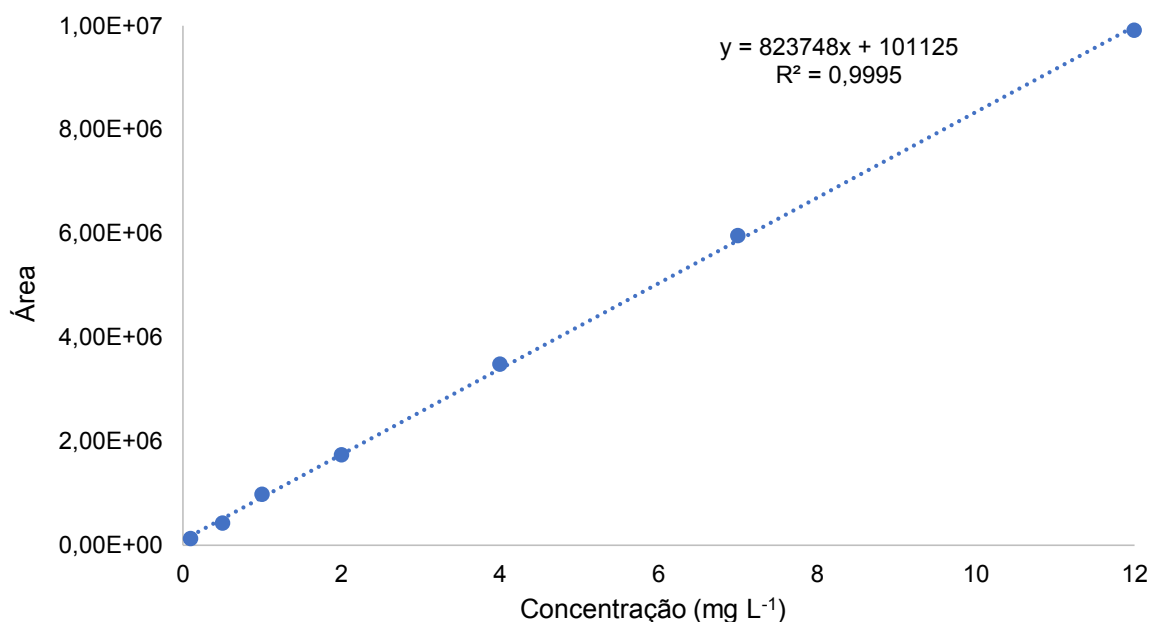
Os picos foram identificados por comparação no tempo de retenção em cada cromatograma e os espectros obtidos no ultravioleta das reações e dos produtos injetados separadamente. A concentração da 1,5-*bis*(4-clorobenzaldeído)tiocarbazona pode ser calculada a partir da área de cada pico, em 328 nm, empregando a equação da curva de calibração.

6.6.1. Preparo das soluções padrão para curva de calibração

Foi preparada uma solução estoque da 1,5-bis(4-clorobenzaldeído)tiocarbazona a 200 mg L^{-1} em metanol. Em seguida foram preparadas sete soluções nas concentrações 12; 7; 4; 2; 1; 0,5; 0,1 mg L^{-1} mediante sucessivas diluições a partir da solução estoque.

A curva de calibração (**Figura 23**) obtida para 1,5-bis(4-clorobenzaldeído)tiocarbazona foi obtida com um $R^2 = 0,9995$. O limite de detecção (LD) e o de quantificação (LQ) foram determinados baseados nos parâmetros da curva de calibração, obtendo $0,161 \text{ mg L}^{-1}$ para LD e $0,537 \text{ mg L}^{-1}$ para LQ

Figura 23: Curva de calibração obtida 1,5-bis(4-clorobenzaldeído)tiocarbazona.



6.7. Caracterização das *bis*-tiocarbazonas B2 a B20

B2

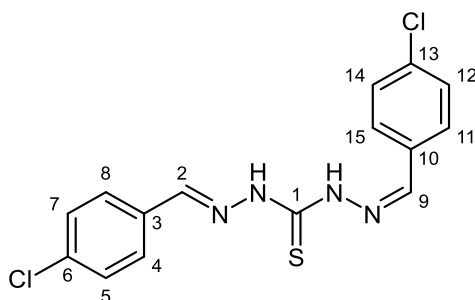


Figura 24: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B2**.

Massa Molar: 350,02 g/mol.

Rendimento: 95 %.

EM m/z (abundância em %): 350 (5, M⁺), 352 (2, M+2) 111 (100), 75 (65).

Faixa de fusão: 203,7 – 205,1 °C.

IV (cm⁻¹) v max: 3120, 2974, 1486, 1086, 511.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,86 (1H, sl, NH); 11,65 (1H, sl, NH); 8,52 (1H, sl, H2); 8,14 (1H, sl, H9); 7,95-7,70 (4H, m, H4, H8, H11 e H15); 7,55-7,45 (4H, m, H5, H7, H12 e H14).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 175,3 (C1); 134,9 (C2 e C9); 133,4 (C5, C6, C7, C12, C13 e C14); 129,2 (C3, C4, C8, C10, C11 e C15).

B3

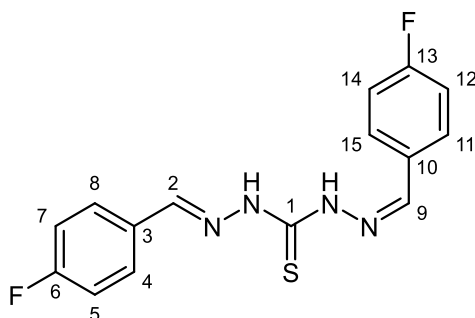


Figura 25: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B3**.

Massa Molar: 318,08 g/mol

Rendimento: 80 %

Faixa de fusão: 202,0 – 203,1 °C

EM m/z (abundância em %): 318 (25, M⁺), 95 (100), 122 (90).

IV (cm⁻¹) v max: 3138, 2988, 1504, 1227, 831.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,91 (1H, sl, NH); 11,60 (1H, sl, NH); 8,58 (1H, sl, H2); 8,14 (1H, sl, H9); 7,99-7,71 (4H, m, H5, H7, H12 e H14); 7,29 (4H, m, H4, H8, H11 e H15).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 174,9 (C1); 164,9 (C2 e C9); 161,6 (C3, C6, C4, C8, C11 e C15); 129,7 (C5, C7, C12 e C14); 116,1 (C6 e C13, d, J = 21 Hz).

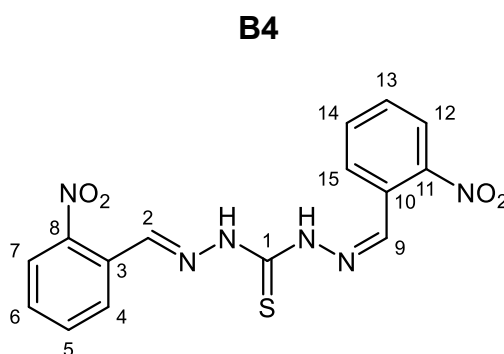


Figura 26: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B4**.

Massa Molar: 372,06 g/mol

Rendimento: 82 %

Faixa de fusão: 203,5 – 204,7 °C

EM m/z (abundância em %): 370 (1, M⁺), 76 (100), 91 (72)

IV (cm⁻¹) v max: 2923, 1519, 1243, 813, 512.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 12,15 (2H, sl, 2 x NH); 8,96 (1H, sl, H2); 8,65 (1H, sl, H9); 8,07 (2H, d, H4 e H15, 6 Hz); 7,83 (2H, t, H5 e H15, 7,6 Hz); 7,80 - 7,58 (2H, m, H6 e H13, 1Hz).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5): δ (integração, multiplicidade, atribuição): 175,8 (C1); 168,6 (C2 e C9); 148,3 (C8 e C11); 133,6 (C5, C6, C13 e C14); 130,7 (C3 e C10); 128,5 (C4 e C15); 124,7 (C7 e C12).

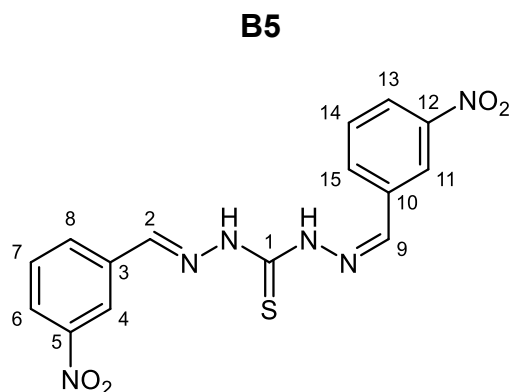


Figura 27: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B5**.

Massa Molar: 372,06 g/mol

Rendimento: 69 %

Faixa de fusão: 218,1 – 219,7 °C

EM m/z (abundância em %): 372 (2, M⁺), 119 (100), 65 (98).

IV (cm⁻¹) v max: 3267, 3106, 2970, 1516, 1347, 1247, 673.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 12,14 (1H, sl, NH); 11,99 (1H, sl, NH); 8,63 (2H, sl, H4 e H11); 8,36 (4H, d, H6, H8, H13 e H15, 6 Hz); 7,76 (2H, t, H7 e H14, 8Hz).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 175,5 (C1); 148,3 (C5 e C12); 135,9 (C2 e C9); 133,7 (C3 e C10); 130,4 (C7, C8, C14 e C15); 124,3 (C4, C6, C11 e C13).

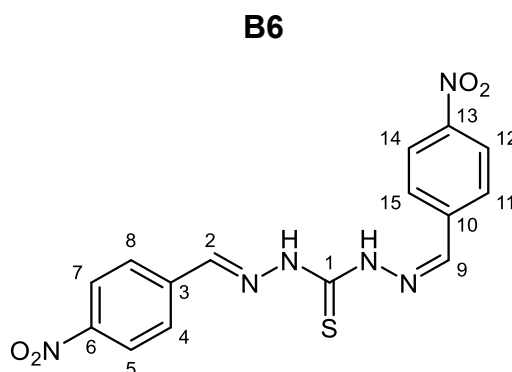


Figura 28: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B6**.

Massa Molar: 372,06 g/mol

Rendimento: 63 %

Faixa de fusão: 234,2 – 235,6 °C

EM m/z (abundância em %): 372 (3, M+.), 40 (100), 207 (98).

IV (cm⁻¹) v max: 3063, 1692, 1517, 1341, 840.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 12,29 (1H, sl, δN-H); 12,01 (1H, sl, δN-H); 8,54 - 7,6 (4H, m, H5, H7, H12, H14, H4, H9, H11 e H15).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 175,6 (C1); 147,9 (C6 e C13); 127,8 (C3, C4, C8, C10, C11 e C15); 124,1 (C5, C7, C12 e C14).

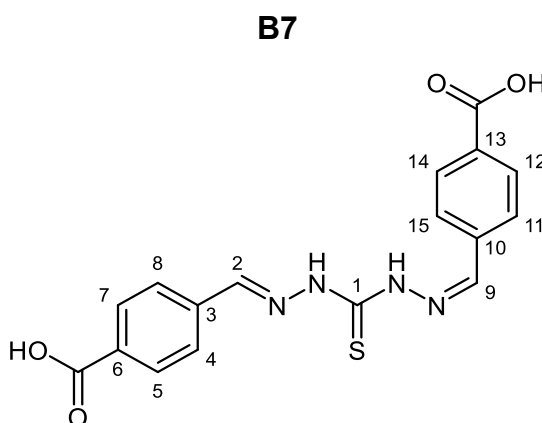


Figura 29: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B7**.

Massa Molar: 370,07 g/mol

Rendimento: 56 %

Faixa de fusão: > 360 °C

EM m/z (abundância em %): 370 (1, M+.), 40 (100), 164 (42).

IV (cm⁻¹) v max: 3189, 2970, 1720, 1218, 766.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 12,11 (1H, sl, δN-H); 11,80 (1H, sl, δN-H); 8,71 (1H, sl, H2); 8,23 (1H, sl, H9); 8,08 - 7,64 (8H, m, H4, H5, H7, H8, H11, H12, H14 e H15).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 175,2 (C1); 166,9 (δCOOH); 138,2 (C2 e C9); 132,7 (C3 e C10); 131,7 (C6, C13, C5, C7, C12 e C14); 127,5 (C4, C8, C11 e C15).

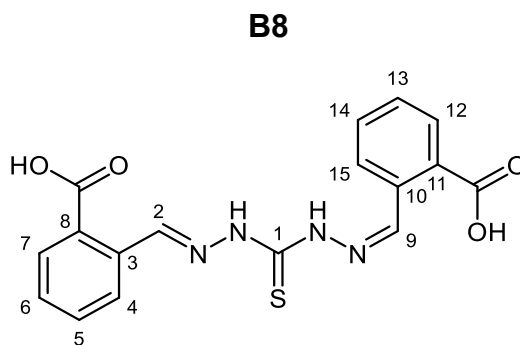


Figura 30: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B8**.

Massa Molar: 370,07 g/mol

Rendimento: 33 %

Faixa de fusão: 175,9 – 176,7 °C

EM m/z (abundância em %): 370 (1, M⁺), 40 (100), 146 (55).

IV (cm⁻¹) v max: 3167, 3006, 2361, 1673, 1239, 748.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,92 (2H, sl, δN-H); 9,18 (1H, sl, H2); 8,96 (1H, sl, H9); 8,41 - 8,06 (2H, m, H7 e H12); 7,89 (2H, d, H4 e H15, 7,6 Hz); 7,65 (2H, t, H5 e H14, 7,6 Hz); 7,53 (2H, t, H6 e H13, 7,6Hz).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 175,5 (C1); 168,1 (δCOOH); 134,4 (C2 e C9); 131,9 (C7, C12); 130,9 (C3 e C10); 130,2 (C4, C5, C14 e C15); 129,6 (C6 e C13); 127,3 (C8 e C11).

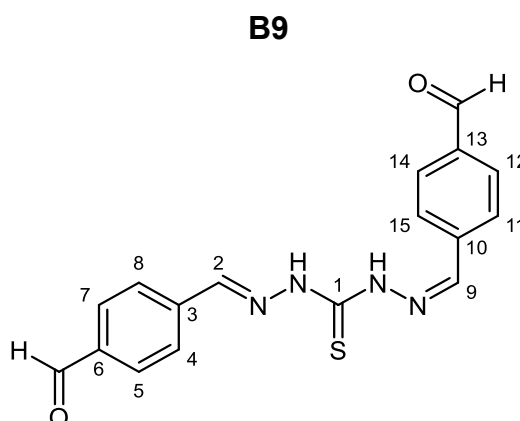


Figura 31: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B9**.

Massa Molar: 338,08 g/mol

Rendimento: 47 %

Faixa de fusão: > 360 °C

EM m/z (abundância em %): 338 (1, M⁺), 40 (100), 76 (26).

IV (cm⁻¹) v max: 3167, 2923, 1673, 1523, 1236, 748.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 12,13 (1H, sl, δN-H); 11,87 (1H, sl, δN-H); 10,05 (2H, s, δCHO,); 8,69 (1H, sl, H2); 8,26 (1H, sl, H9); 8,17 – 7,84 (8H, m, H4, H5, H7, H8, H11, H12, H14, H15)

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 192,7 (δCHO); 175,3 (C1); 139,7 (C2 e C9); 136,8 (C6 e C13); 137,7 (C3 e C10); 129,9 (C5, C7, C12 e C14); 127,9 (C4, C8, C11 e C15).

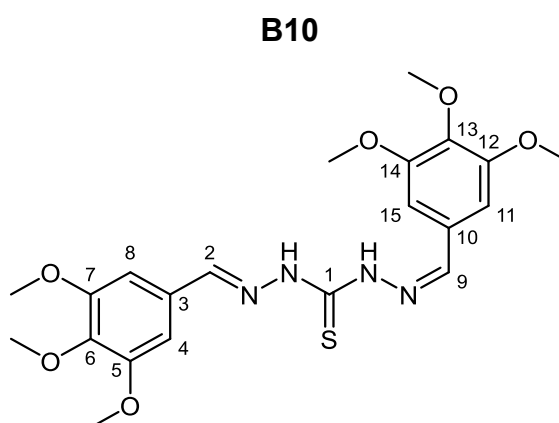


Figura 32: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B10**.

Massa Molar: 462,16 g/mol

Rendimento: 50 %

Faixa de fusão: 207,4 – 208,9 °C

EM m/z (abundância em %): 462 (2, M⁺), 388 (100), 345 (24).

IV (cm⁻¹) v max: 3279, 3146, 1495, 1233, 1123, 995, 629.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,85 (1H, sl, δN-H); 11,61 (1H, sl, δN-H); 8,44 (1H, sl, H2); 8,07 (1H, sl, H9); 3,85 (12H, s, δ *o*-OCH₃ e δ *p*-OCH₃); 3,71 (6H, s, δ *m*-OCH₃).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 174,5 (C1); 153,2 (C5, C7, C12 e C14); 139,4 (C2 e C9); 104,78 (C3, C4, C6, C8, C10, C11, C13 e C15); 60,2 (δ *m*-OCH₃); 56,1 (δ *o*-OCH₃ e δ *p*-OCH₃).

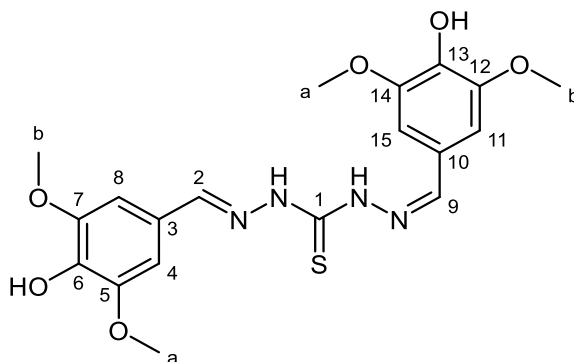
B11

Figura 33: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B11**.

Massa Molar: 434,13 g/mol

Rendimento: 58 %

Faixa de fusão: 213,6 – 214,8 °C

EM m/z (abundância em %): 434 (2, M⁺), 360 (100), 179 (72).

IV (cm⁻¹) v max: 3443, 3131, 2981, 1505, 1324, 1102, 504.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,60 (1H, sl, δN-H); 11,43 (1H, sl, δN-H); 9,19 (2H, s, δO-H,); 7,21 (2H, s, H4 e H15); 7,20 (2H, s, H8 e H11); 3,78 (6H, s, Ha), 3,72 (6H, s, Hb).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 168,6 (C1); 162,4 (C5, C7, C12 e C14); 148,4 (C6 e C13); 140,9 (C2); 138,3 (C9); 122,2 (C3); 115,4 (C10); 106,5 (C7 e C12); 105,9 (C5 e C14); 56,4 (δOCH₃).

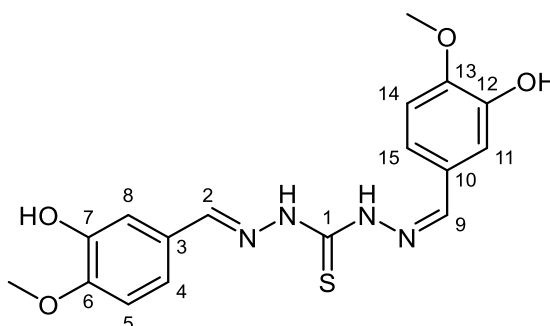
B12

Figura 34: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B12**.

Massa Molar: 374,10 g/mol

Rendimento: 27 %

Faixa de fusão: Não foi possível medir, amostra degradou.

EM m/z (abundância em %): 374 (1, M⁺), 134 (100), 300 (95).

IV (cm⁻¹) v max: 3257, 3146, 2361, 1504, 1263, 794, 584.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,59 (1H, sl, δN-H); 11,36 (1H, sl, δN-H); 9,29 (1H, s, δO-H,); 9,12 (1H, sl, H2); 8,50 (1H, s, δO-H); 8,41 (1H, sl, H9); 8,01 (1H, sl, H8); 7,35 (1H, s, H11); 6,96 (4H, d, H4, H5, H14 e H15, 8,3 Hz); 3,35 (6H, s, δ OCH₃).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 174,1 (C1); 160,6 (C6 e C13); 150,6 (C7 e C12); 149,8 (C2); 146,8 (C9); 126,9 (C3); 121,8 (C10); 120,5 (C4 e C15); 113,4 (C8 e C11); 111,8 (C5 e C14); 55,6 (δOCH₃).

B13

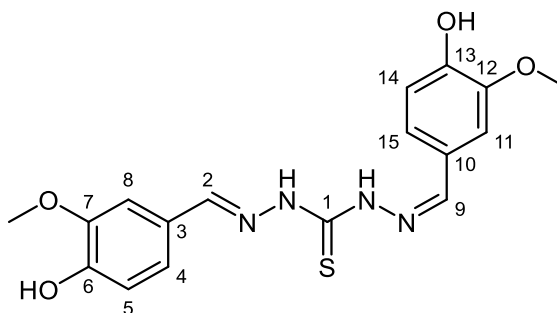


Figura 35: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B13**.

Massa Molar: 374,10 g/mol

Rendimento: 41 %

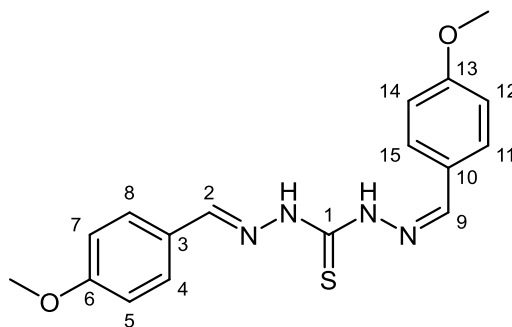
Faixa de fusão: 224,0 – 224,8 °C

EM m/z (abundância em %): 374 (1, M⁺), 40 (100), 300 (54).

IV (cm⁻¹) v max: 3501, 3156, 1505, 1265, 548.

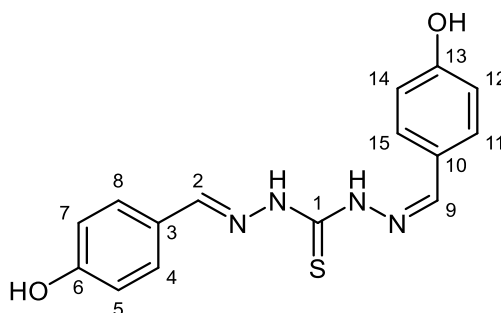
RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,70 (1H, s, δN-H); 10,35 (1H, s, δN-H); 9,51 (1H, s, δO-H); 7,99 (2H, s, H8 e H11); 7,54 (1H, s, δO-H); 7,10 (2H, d, H4 e H15, 6,3 Hz); 6,80 (2H, d, H5 e H14, 8,1 Hz); 3,84 (6H, s, δ OCH₃).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 177,1 (C1); 149,1 (C6 e C13); 148,1 (C7 e C12); 143,7 (C2 e C9); 125,4 (C3 e C10); 122,6 (C4 e C15); 115,3 (C5 e C14); 109,5 (C8 e C11); 55,8 (δ OCH₃).

B14**Figura 36:** Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B14**.**Massa Molar:** 342,12 g/mol**Rendimento:** 81 %**Faixa de fusão:** 182,7 – 184,4 °C**EM** m/z (abundância em %): 342 (2, M⁺), 77 (100), 134 (93).**IV** (cm⁻¹) v max: 3178, 1604, 1455, 1025, 823.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,70 (1H, sl, δN-H); 11,68 (1H, sl, δN-H); 8,51 (1H, sl, H2); 8,09 (1H, sl, H9); 7,01 (8H, d, H4, H5, H7, H8, H11, H12, H14 e H15, 8,3 Hz); 3,33 (6H, s, δ OCH₃).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 174,2 (C1); 160,8 (C6 e C13); 148,4 (C2); 143,1 (C9); 128,9 (C4, C8, C11 e C15); 126,7 (C3 e C10); 114,3 (C5, C7, C12 e C14); 55,3 (δ OCH₃).

B15**Figura 37:** Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B15**.**Massa Molar:** 314,08 g/mol**Rendimento:** 88 %

Faixa de fusão: 210,5 – 211,1 °C

EM m/z (abundância em %): 314 (1, M⁺), 40 (100), 147 (98).

IV (cm⁻¹) v max: 3282, 3142, 3002, 1508, 1163, 828, 526.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,58 (1H, sl, δN-H); 11,27 (1H, sl, δN-H); 9,92 (2H, s, δO-H); 8,45 (1H, sl, H2); 8,04 (1H, sl, H9); 7,79 - 7,41 (4H, m, H4, H8, H11 e H15); 6,83 (4H, d, H5, H7, H12, H14, 8,4 Hz).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 173,9 (C1); 159,4 (C6 e C13); 148,7 (C2 e C9); 143,5 (C4, C8, C11 e C15); 129,3 (C3 e C10); 115,7 (C5, C7, C12 e C14).

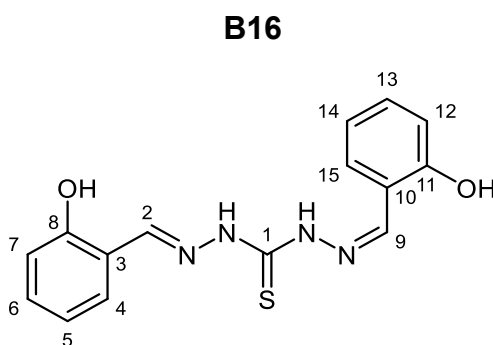


Figura 38: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B16**.

Massa Molar: 314,08 g/mol

Rendimento: 77 %

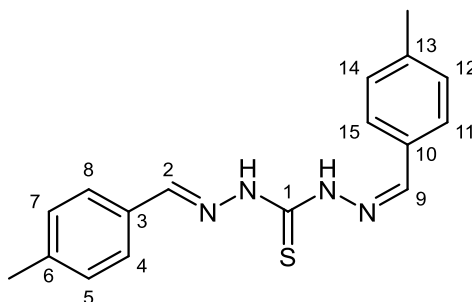
Faixa de fusão: 187,6 – 188,7 °C

EM m/z (abundância em %): 314 (24, M⁺), 120 (100), 65 (92).

IV (cm⁻¹) v max: 3138, 2981, 1556, 1278, 953, 743.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 12,02 (1H, sl, δN-H); 11,89 (1H, sl, δN-H); 11,61 (1H, sl, δO-H); 10,03 (1H, sl, δO-H); 8,74 (1H, sl, H2); 8,52 (1H, sl, H9); 8,06 (1H, sl, H4); 7,41 (1H, sl, H15); 7,28 (2H, t, H6 e H13, 7,7 Hz); 6,91 (4H, d, H5, H7, H12 e H14, 7,9 Hz).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 174,4 (C1); 157,1 (C8 e C11); 149,4 (C2 e C9); 141,2 (C6 e C13); 131,5 (C4 e C15); 126,9 (C5 e C14); 119,4 (C7 e C12); 116,4 (C3 e C10).

B17**Figura 39:** Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B17**.

Massa Molar: 310,03 g/mol

Rendimento: 77 %

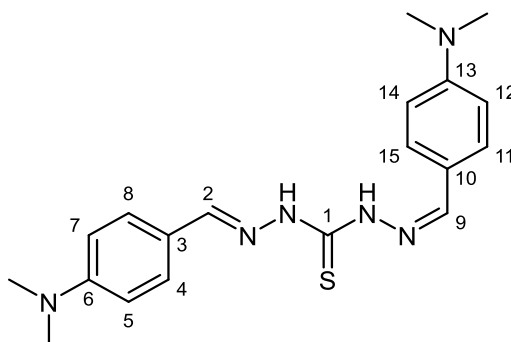
Faixa de fusão: Não foi possível medir, amostra degradou.

EM m/z (abundância em %): 310 (2, M⁺), 145 (100), 91 (74).

IV (cm⁻¹) v max: 3282, 3138, 2992, 1505, 813, 512.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,72 (1H, sl, δN-H); 11,47 (1H, sl, δN-H); 8,53 (1H, sl, H2); 8,10 (1H, sl, H9); 7,85 - 7,46 (4H, m, H4, H8, H11 e H15); 7,26 (4H, d, H5, H7, H12 e H14, 7,8 Hz); 2,32 (6H, s, δ OCH₃).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 174,7 (C1); 140,2 (C2 e C9); 131,5 (C6 e C13); 129,6 (C4, C5, C7, C8, C11, C12, C14 e C15); 127,6 (C3 e C10); 56,3 (δ CH₃).

B18**Figura 40:** Fórmula estrutural *bis*-tiocarbazona **B18**.

Massa Molar: 368,18 g/mol

Rendimento: 79 %

Faixa de fusão: 216,4 – 218,2 °C

EM m/z (abundância em %): 368 (1, M⁺), 40 (100), 174 (79).

IV (cm⁻¹) v max: 3436, 3274, 3135, 1597, 1512, 807, 515.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,44 (1H, sl, δN-H); 11,16 (1H, sl, δN-H); 8,41 (1H, sl, H2); 8,01 (1H, sl, H9); 6,74 (8H, d, H4, H5, H7, H8, H11, H12, H14 e H15, 8,5 Hz); 2,97 (12H, s, δ CH₃).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 173,2 (C1); 151,4 (C6 e C13); 148,9 (C2 e C9); 143,8 (C4, C8, C11 e C15); 128,6 (C3 e C10); 121,5 (C5, C7, C12 e C14); 111,7 (δ CH₃)

B19

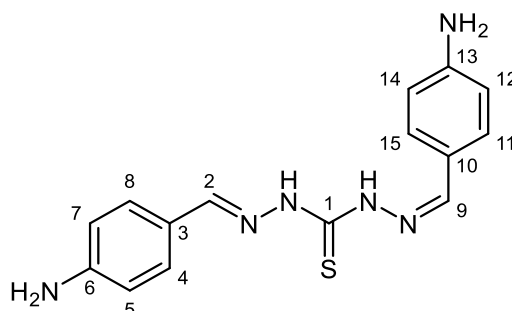


Figura 41: Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B19**.

Massa Molar: 312,12 g/mol

Rendimento: 52 %

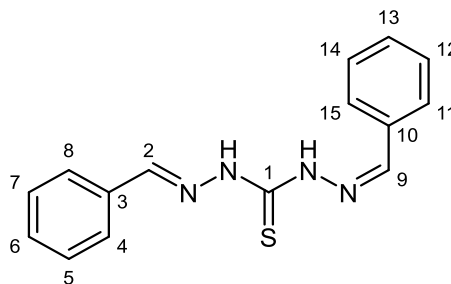
Faixa de fusão: 193,2 – 194,5 °C

EM m/z (abundância em %): 312 (1, M⁺), 238 (100), 93 (98).

IV (cm⁻¹) v max: 3282, 3174, 1505, 1171, 836, 526.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,35 (1H, sl, δN-H); 11,10 (1H, sl, δN-H); 8,34 (1H, sl, H2); 7,94 (1H, sl, H9); 7,58 - 7,30 (4H, m, H4, H8, H11 e H15); 6,58 (4H, s, δ NH₂); 5,83 - 5,48 (4h, m, H5, H7, H12, H14)

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 173,1 (C1); 150,9 (C6 e C13); 149,2 (C2); 144,1 (C9); 128,8 (C4, C8, C11 e C15); 121,3 (C3 e C10); 113,5 (C5, C7, C12 e C14).

B20**Figura 42:** Fórmula estrutural da *bis*-tiocarbazona **B20**.

Massa Molar: 282,09 g/mol

Rendimento: 29 %

Faixa de fusão: 200,1 – 201,3 °C

EM m/z (abundância em %): 282 (1, M⁺), 77 (100), 104 (77).

IV (cm⁻¹) v max: 3156, 2994, 1515, 1243, 584.

RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,40 (1H, s, δN-H); 9,79 (1H, s, δN-H); 7,99 (2H, s, H2 e H9); 7,81 (4H, dd, H4, H8, H11 e H15, 6,7 e 2,9 Hz); 7,38 (6H, dd, H5, H6, H7, H12, H13 e H14, 5,1 e 2,0 Hz).

RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{DMSO} 39,5): δ (atribuição): 175,8 (C1); 142,1 (C2 e C9); 134,3 (C3 e C10); 129,7 (C6 e C13); 128,6 (C5, C7, C12 e C14); 127,3 (C4, C8, C11 e C15).

7. REFERÊNCIAS

[1] TOZAKI, H. et al. Chitosan Capsules for Colon-Specific Drug Delivery: Improvement of Insulin Absorption from the Rat Colon. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 9, p. 1016–1021, set. 1997.

[2] SARWAR, G. et al. Improvement of soil physical and chemical properties with compost application in rice-wheat cropping system. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 275–282, 2008.

[3] BUTLER, J. C.; SHAPIRO, E. D.; CARLONE, G. M. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. **The American Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 69–76, jul. 1999.

[4] MARCO, B. A. DE et al. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 1, p.

1–8, 2019.

[5] Responsible Care. Disponível em : <https://responsiblecare.americanchemistry.com/>. Acesso em: 06 de abril de 2020.

[6] ANASTAS, P.T., WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press, New York, 1998, 160 p.

[7] XIA, H. et al. Potential Utilization of Unavoidable Food Supply Chain Wastes – Valorisation of Pea Vine Wastes. **Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 11, p. 6002-6009, 2016.

[8] DAVID, G. F. et al. Effect of acid additives on sugarcane bagasse pyrolysis: Production of high yields of sugars. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 74–83, jan. 2017.

[9] KHOSHNEVISAN, B. et al. Environmental life cycle assessment of different biorefinery platforms valorizing municipal solid waste to bioenergy, microbial protein, lactic and succinic acid. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109493, jan. 2020.

[10] SAITONE, T. L.; SEXTON, R. J. Agri-food supply chain : evolution and performance with conflicting consumer and societal demands. **European Review of Agricultural Economics**, v. 44, n. 4, p. 634–657, 2017.

[11] MALEK, Ž. et al. Global change effects on land management in the Mediterranean region. **Global Environmental Change journal**, v. 50, p. 238–254, 2018.

[12] MARTIN-GUAY, M.-O. et al. The new Green Revolution: Sustainable intensification of agriculture by intercropping. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 767–772, fev. 2018.

[13] Solos do Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-solos-brasileiros/solos-do-brasil>. Acesso em: 14 de abril de 2020.

[14] FAGERIA, N. K.; CARVALHO, M. DA C. S.; OLIVEIRA, I. P. DE. **Calagem e adubação**. Brasília. Embrapa, 2014. p. 59–76.

[15] CHEN, P. et al. Yield advantage and nitrogen fate in an additive maize-soybean relay intercropping system. **Science of The Total Environment**, v. 657, p. 987–999, mar. 2019.

[16] EGGERSDORFER, M. et al. Hidden hunger: Solutions for America’s aging populations. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2018.

[17] MIKULA, K. et al. Controlled release micronutrient fertilizers for precision

agriculture – A review. **Science of the Total Environment**, v. 712, p. 136365, 2020.

[18] OLIVEIRA, M. P.; MALAGOLLI, G. A.; CELLA, D. Mercado de fertilizantes: dependência de importações do Brasil. **Revista Interface Tecnológica**, v. 16, n. 1, p. 489–498, 2019.

[19] Nutrientes. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_361443.html. Acesso em 14 de abril de 2020.

[20] LI, P. et al. Nitrogen losses, use efficiency, and productivity of early rice under controlled-release urea. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 251, p. 78–87, jan. 2018.

[21] NASCIMENTO, C. A. C. DO et al. Ammonia volatilization from coated urea forms. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 4, p. 1057–1063, 2013.

[22] OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. D. C. Aspectos agronômicos da ureia tratada com inibidor de urease / Agronomic aspects of urease inhibitor-treated urea. **Revista Ambiência**, v. 8, n. 2, p. 403–414, ago. 2012.

[23] ZHENG, W. et al. Combining controlled-release urea and normal urea to improve the nitrogen use efficiency and yield under wheat-maize double cropping system. **Field Crops Research**, v. 197, p. 52–62, out. 2016.

[24] SUBBARAO, G. V. et al. Genetic mitigation strategies to tackle agricultural GHG emissions: The case for biological nitrification inhibition technology. **Plant Science**, v. 262, p. 165–168, 2017.

[25] MIRA, A. B. et al. Optimizing urease inhibitor usage to reduce ammonia emission following urea application over crop residues. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 248, p. 105–112, out. 2017.

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

[27] FEARON, W. R. Urease. Part I. The chemical changes involved in the zymolysis of urea. **Biochemical Journal**, v. 17, n. 1, p. 84–93, 1923.

[28] SUMNER, J. B. **Biographical. Nobel Prize**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/sumner/biographical/>. Acesso em 21 de janeiro de 2021.

[29] SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 435–441, 1926.

[30] PACHECO, V. L.; COLLA, L. M. A enzima urease e suas aplicações na

agricultura e engenharia. **Revista CIATEC - UPF**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2019.

[31] DIXON, N. E. et al. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

[32] MARONEY, M. J.; CIURLI, S. Nonredox Nickel Enzymes. **Chem. Rev.**, v. 114, n. 8, p. 4206–4228, 2014.

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

[34] KRAJEWSKA, B. Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 59–67, set. 2018.

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

[36] LI, Q. et al. Effect of a new urease inhibitor on ammonia volatilization and nitrogen utilization in wheat in north and northwest China. **Field Crops Research**, v. 175, p. 96–105, 2015.

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

[38] HORTA, L. P. et al. Urease inhibitors of agricultural interest inspired by structures of plant phenolic aldehydes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 8, p. 1512–1519, 2016.

[39] SAEED, A. et al. Hybrid Pharmacophoric Approach in the Design and Synthesis of Coumarin Linked Pyrazolinyl as Urease Inhibitors , Kinetic Mechanism and Molecular Docking. **Chem. Biodiversity**, v. 14, n. 8, p. e1700035, 2017.

[40] BRITO, O. T.; et al. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances**, v. 5, p. 44507–44515, 2015.

[41] KHAN, K. M.; NAZ, F.; TAHA, M.; KHAN, A.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY, M. I.; VOELTER, W. Synthesis and in vitro urease inhibitory activity of N, N'-disubstituted thioureas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 314–323, 2014.

[42] SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universittslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 131, n. 1, p.

118–119, 1864.

[43] CHALK, S. J.; MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”)**. [s.l: s.n.]. v. 67

[44] LAYER, R. W. The chemistry of imines. **Chemical Reviews**, v. 63, n. 5, p. 489–510, 1963.

[45] KIM, S. et al. Direct Synthesis of 2-Acyl Acridines Using Aldimines and Anthranils: Evaluation of Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Activity. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 2069–2075, out. 2018.

[46] PATIL, C. J.; PATIL, M. C. Studies on Synthesis of Aldimines: Part-I. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Aldimines from Benzaldehyde with variedly substituted anilines. **Recent Research in Science and Technology**, v. 10, p. 23–27, 1 jan. 2018.

[47] BAI, S. et al. Asymmetric synthesis and antiviral activity of novel chiral amino-pyrimidine derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 33, p. 3179–3183, ago. 2018.

[48] WEI, W. et al. Design, synthesis and herbicidal activity study of aryl 2,6-disubstituted sulfonylureas as potent acetohydroxyacid synthase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 15, p. 3365–3369, ago. 2017.

[49] BEKTAS, H.; ALBAY, C.; MENTESE, E.; DEMIRBAS, N. New pyridine derivatives as antiurease inhibitors: Synthesis and their evaluation for antimicrobial activities. **Revue. Roumaine. Chimie.**, v. 62, n. 3, p. 199–205, 2017.

[50] VANJARE, B. D. et al. Design, Synthesis, Photophysical Properties, Biological Estimation and Molecular Docking Studies of Novel Schiff Base Derivatives as Potential Urease Inhibitors. **Journal of Fluorescence**, v. 28, p. 1295–1304, 2018.

[51] IFTIKHAR, F. et al. Design, synthesis, in vitro Evaluation and docking studies on dihydropyrimidine-based urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 74, p. 53–65, 2017.

[52] DE FÁTIMA, Â. et al. Schiff bases and their metal complexes as urease inhibitors - a brief review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 113–126, 2018.

[53] EBRAHIM TEHRANI, K. H. M. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of symmetric thiocarbohydrazone derivatives against mycobacterium bovis BCG. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 331–346, 2013.

[54] ALAJMI, M. F. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of benzimidazole-derived biocompatible copper(II) and zinc(II) complexes as anticancer

chemotherapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1492, maio 2018.

[55] ZHANG, Q. et al. Formation of a Supramolecular Polymeric Adhesive via Water-Participant Hydrogen Bond Formation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, p. 8058–8063, 2019.

[56] TAHA, M. et al. Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modeling studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 152–160, 2018.

[57] LIU, X. H. et al. Microwave-assisted synthesis of novel fluorinated 1,2,4-triazole derivatives, and study of their biological activity. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 8, p. 2605–2612, 2014.

[58] ARMAREGO, W. L. **Recrystallisation. In: Purification of laboratory chemicals**. 4^a ed. Oxford. Butterworth-Heinemann. 1997, 544 p.

[59] KURZER, F.; WILKINSON, M. The chemistry of carbonylhydrazone and thiocarbonylhydrazone. **Chemical Reviews**, v. 70, n. 1, p. 111–149, 1970.

[60] LIU, X., WENG, J., WANG, B. ET AL. Microwave-assisted synthesis of novel fluorinated 1,2,4-triazole derivatives, and study of their biological activity. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, p. 2605–2612, 2014.

[61] LI, G. et al. Synthesis of new ferrocene bis thiocarbazonones under solvent-free conditions using microwave. **Journal of Chemical Research**, v. 35, n. 5, p. 278–281, 2011.

[62] CHAVES-SILVA, S. et al. Do schiff bases-based urease inhibitors improve plant growth and affect the activity of soil arginase? **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 111995, 2020.

[63] KANDELER, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 1, p. 68–72, 1988.

8. ANEXOS

Figura 43: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B2**.

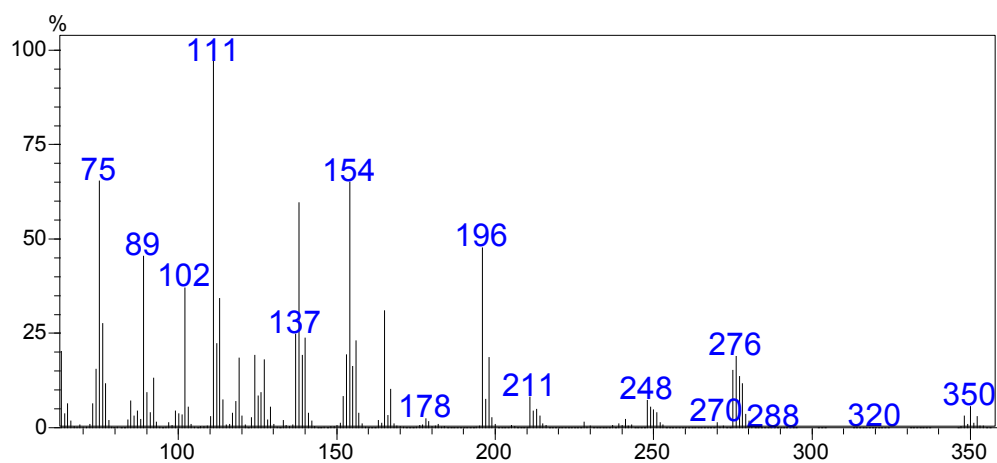


Figura 44: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B2**.

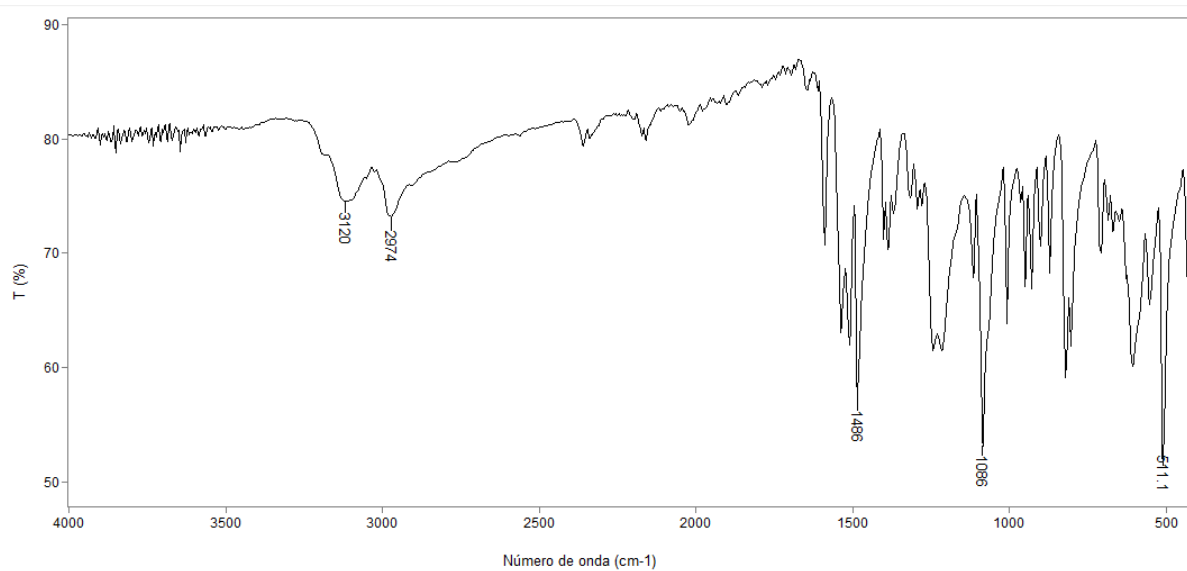


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B2**.

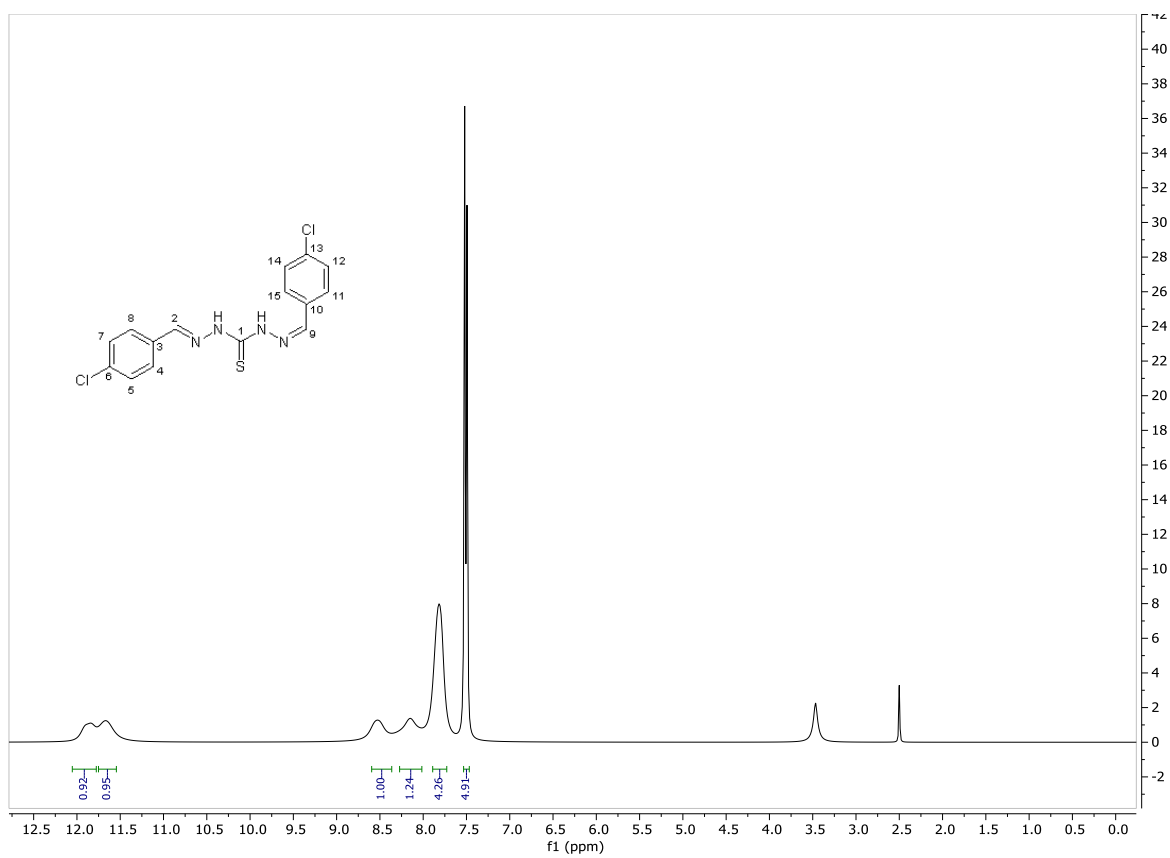


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B2**.

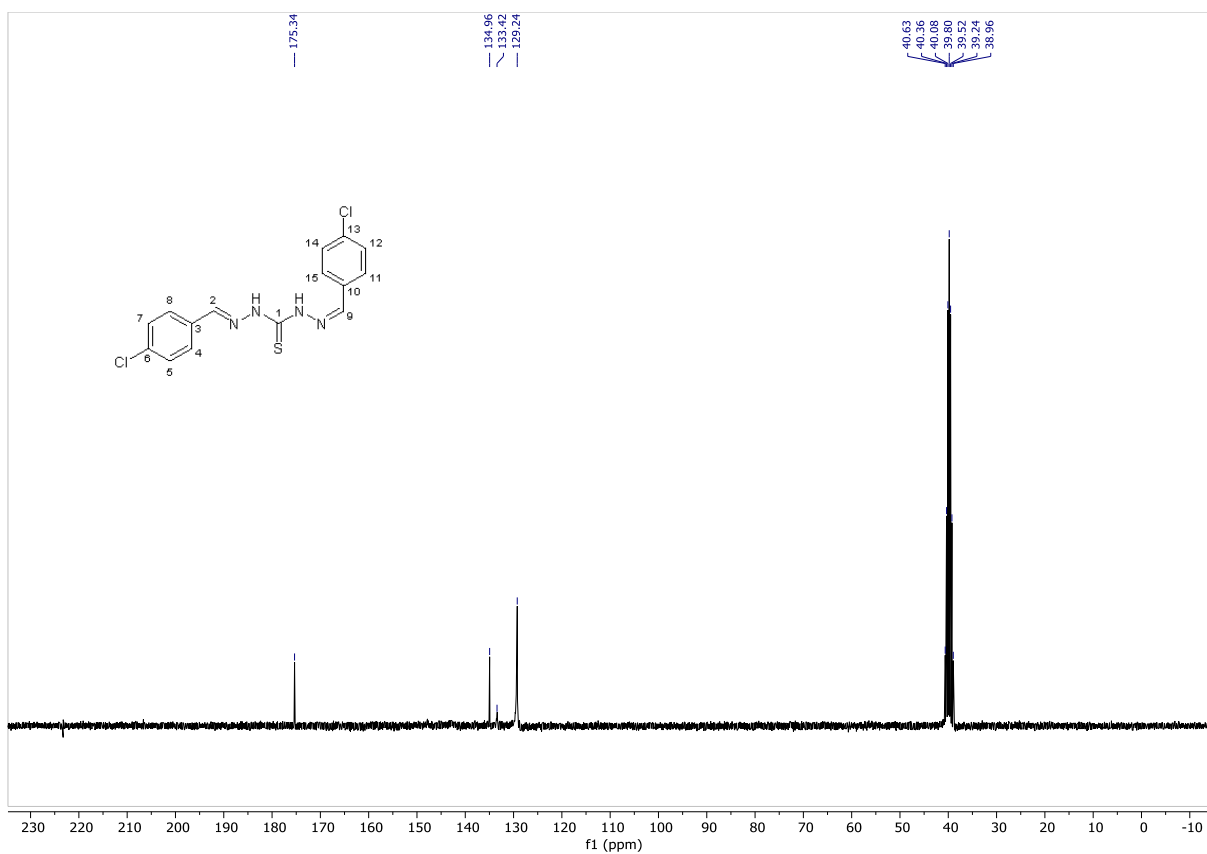


Figura 47: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B3**.

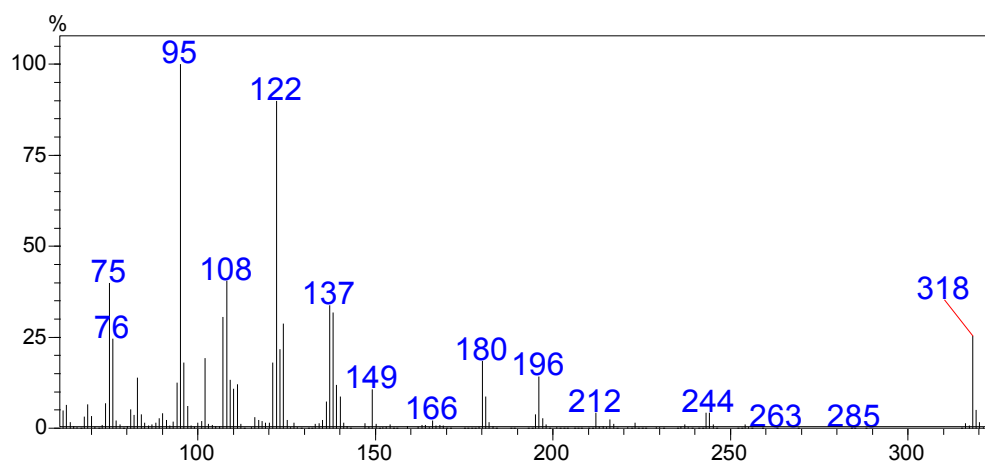


Figura 48: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B3**.

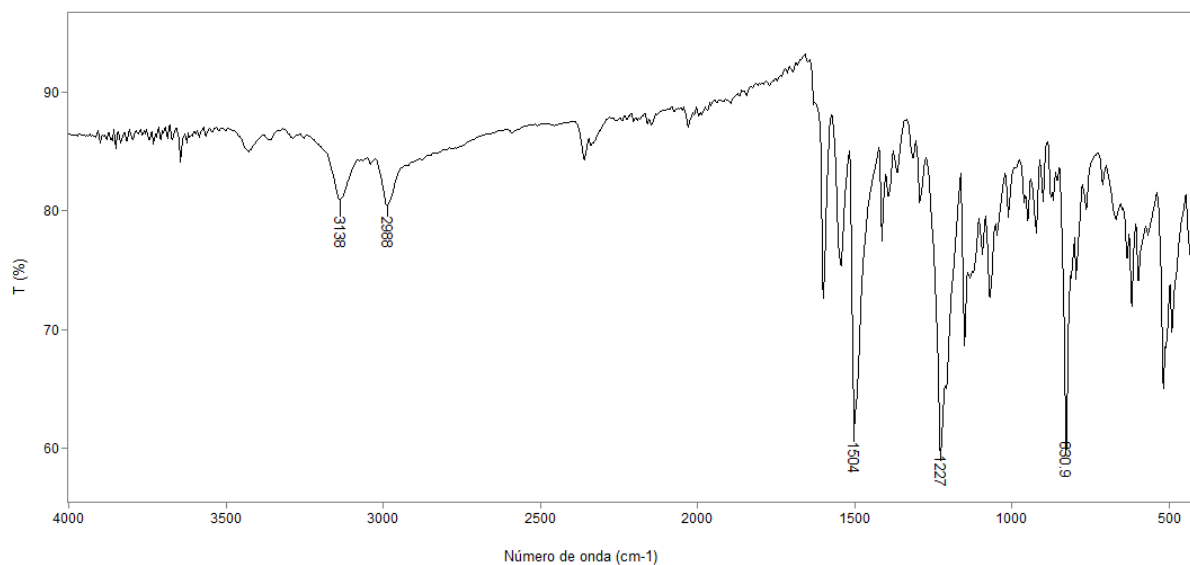


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B3**.

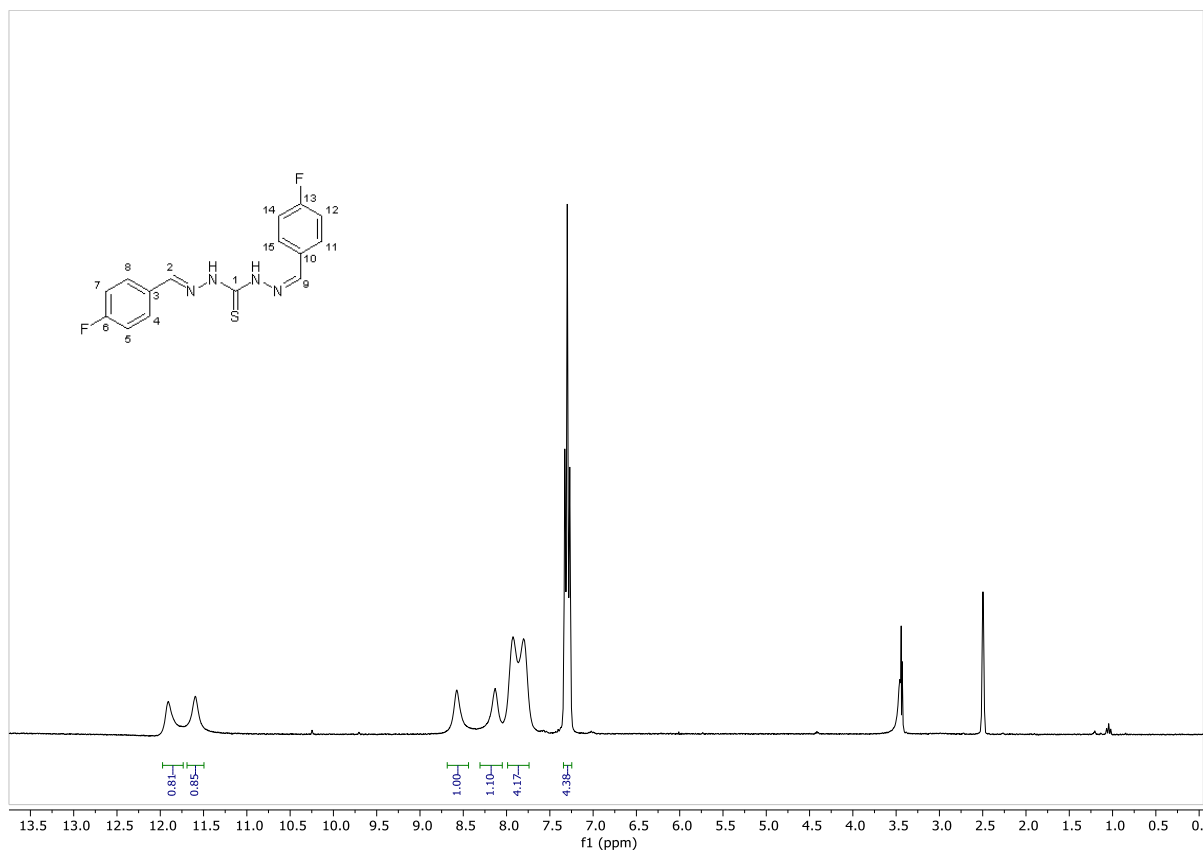


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B3**.

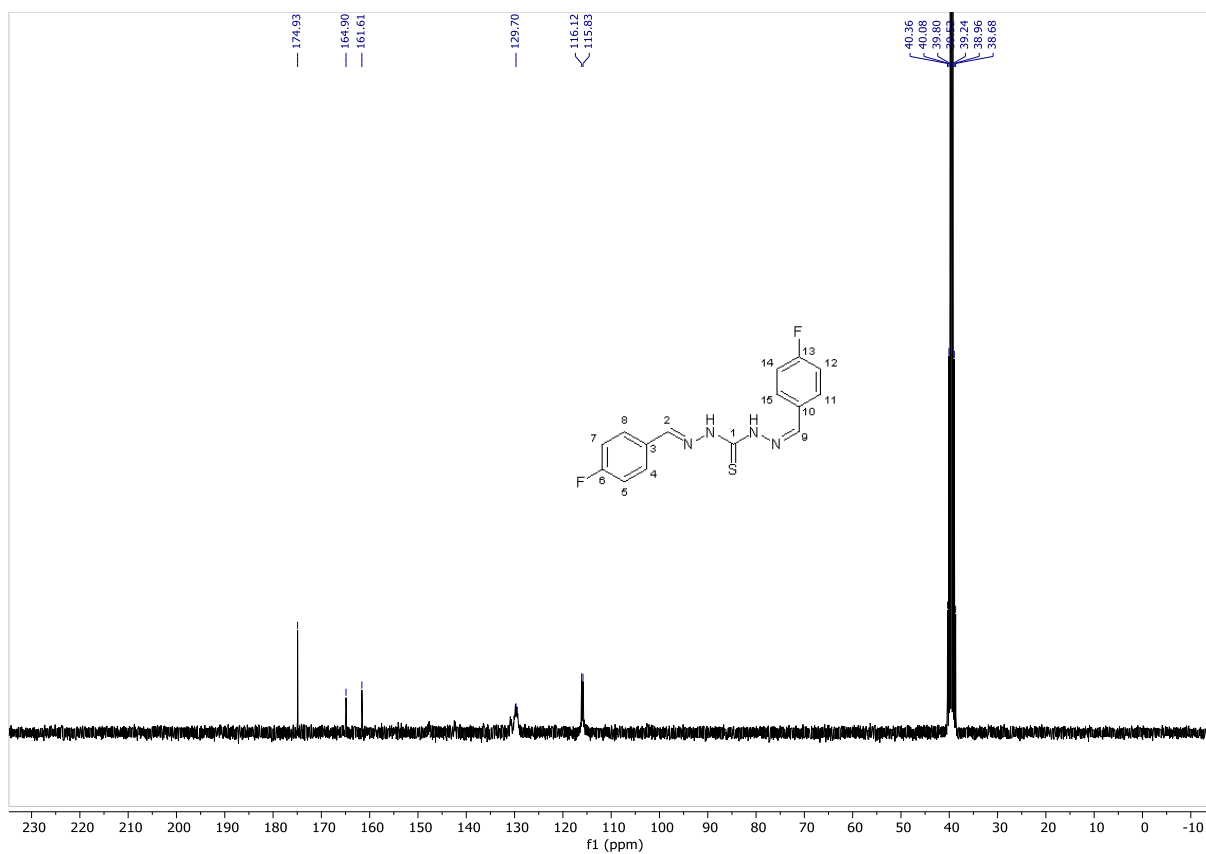


Figura 51: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B4**.

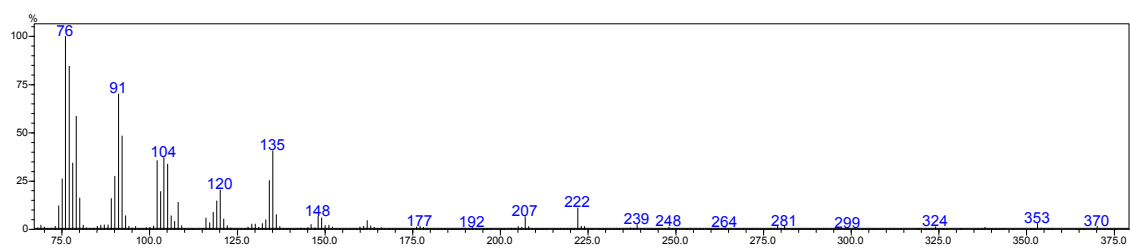


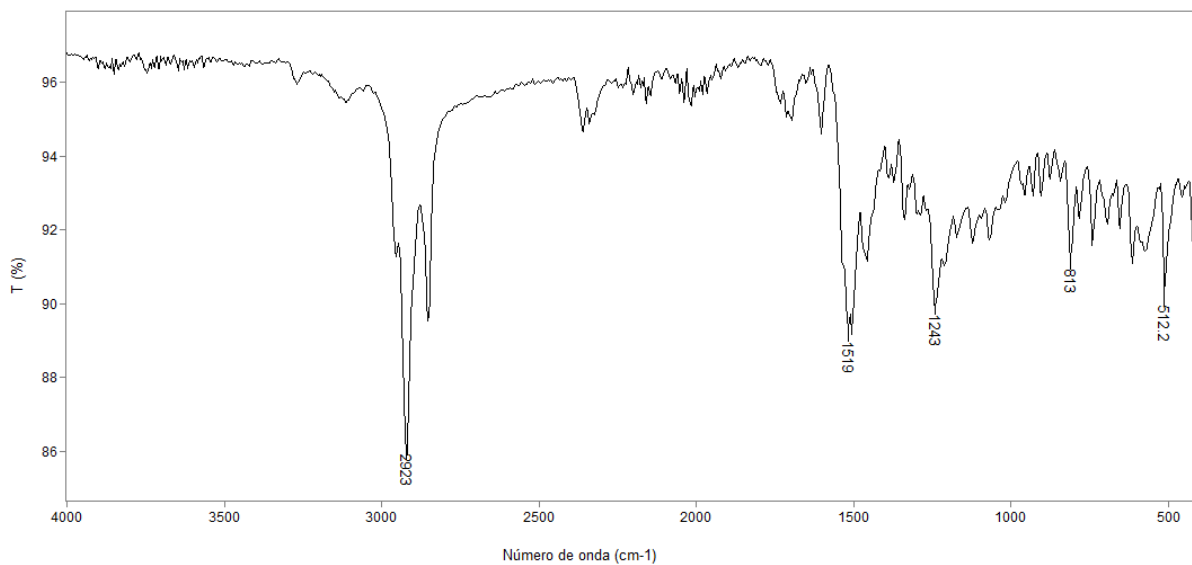
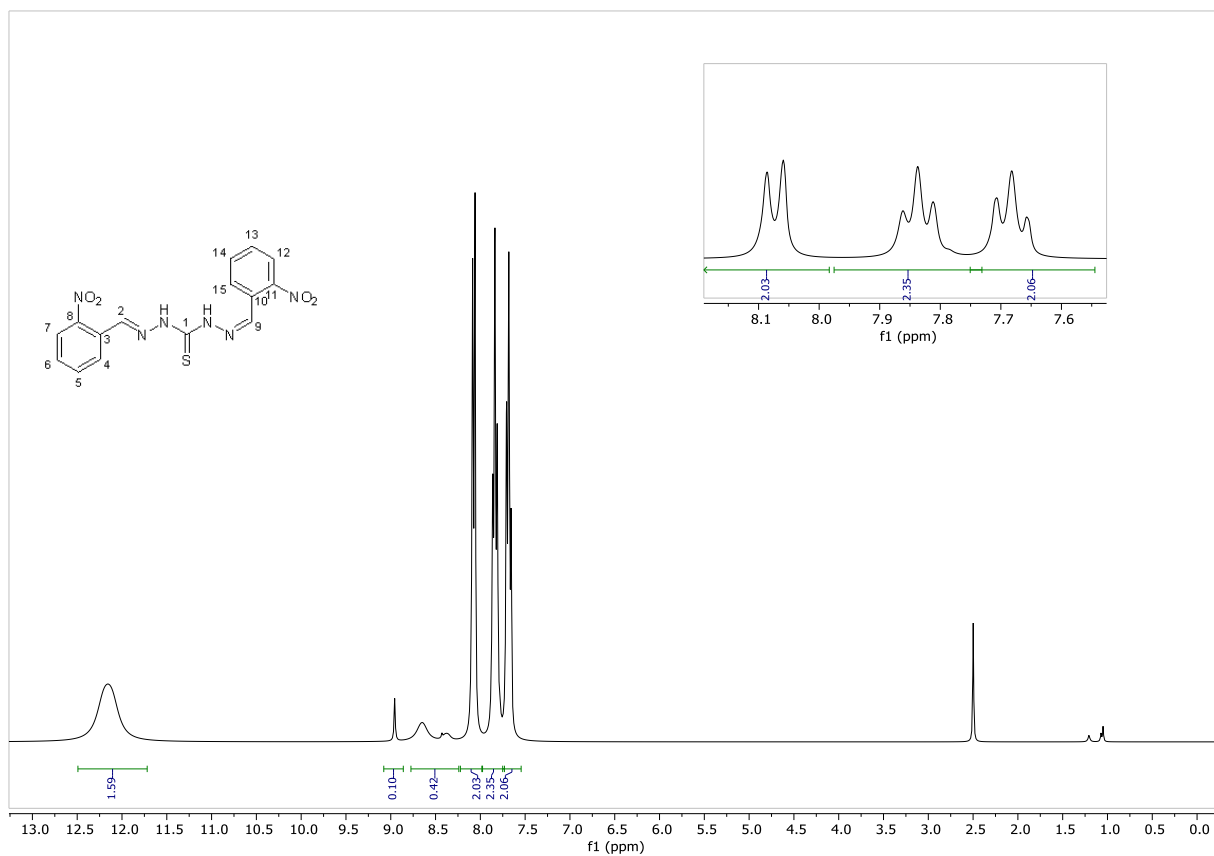
Figura 52: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B4**.**Figura 53:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B4**.

Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B4**.

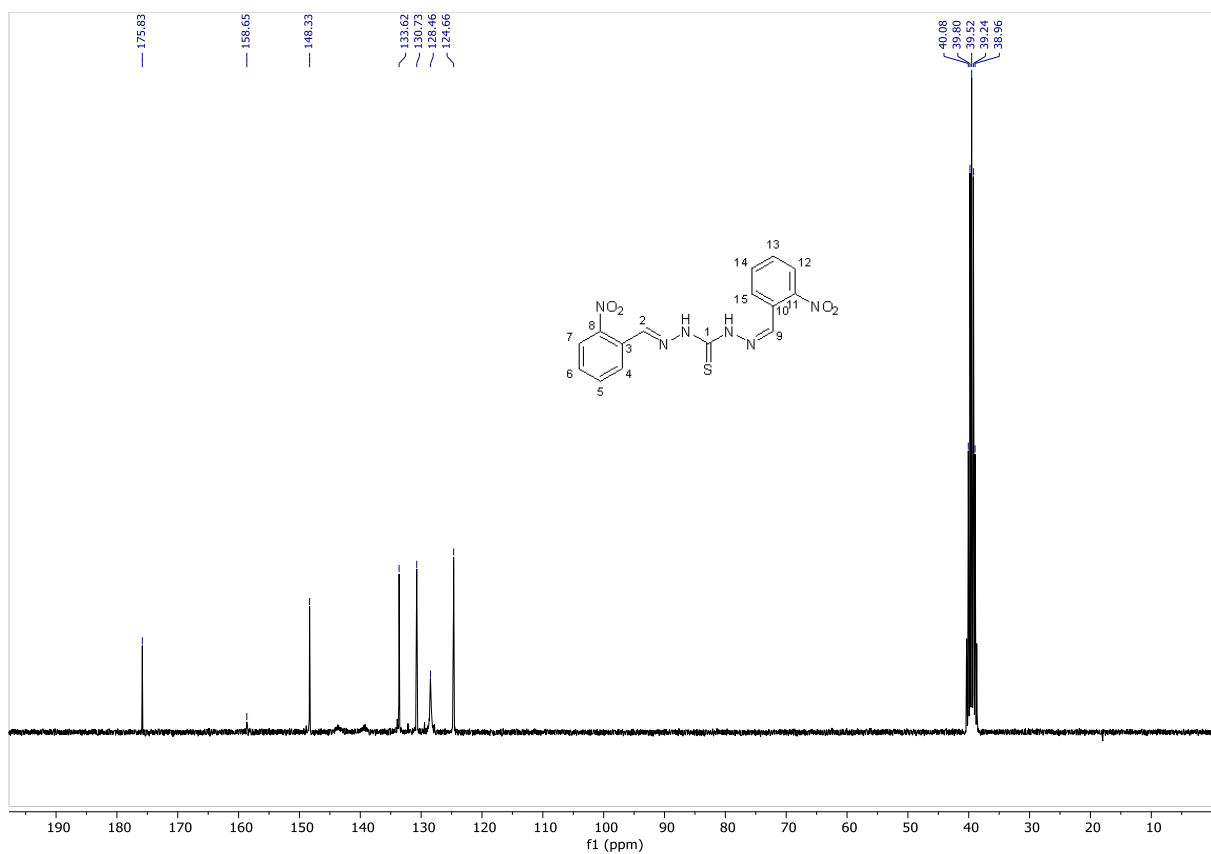


Figura 55: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B5**.

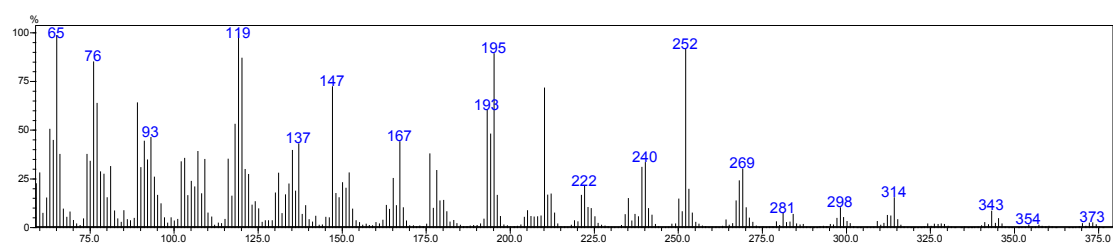


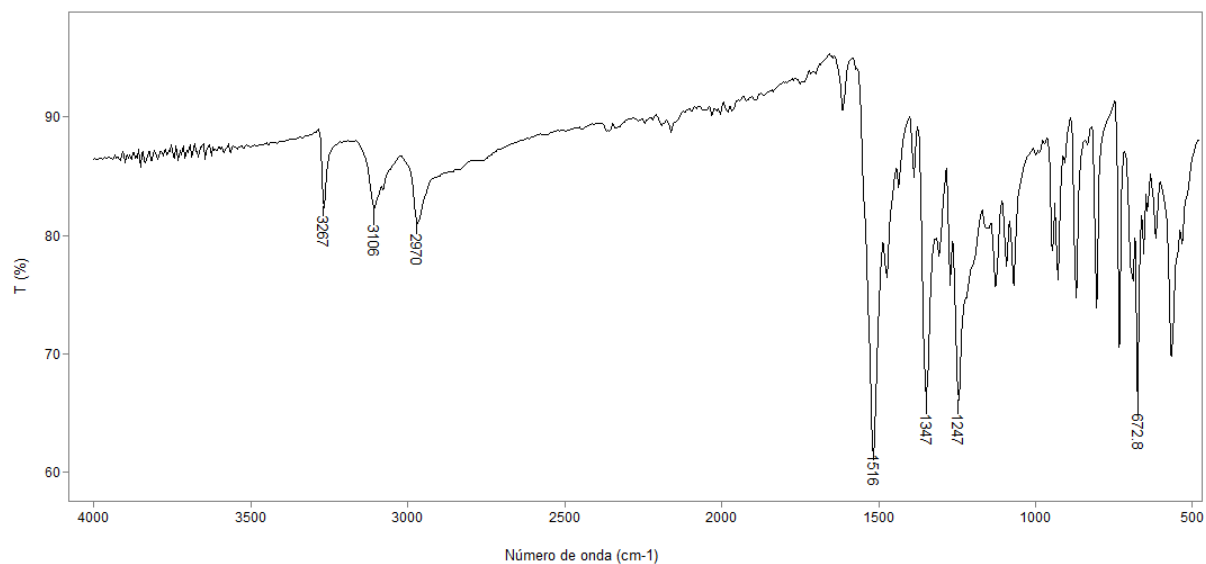
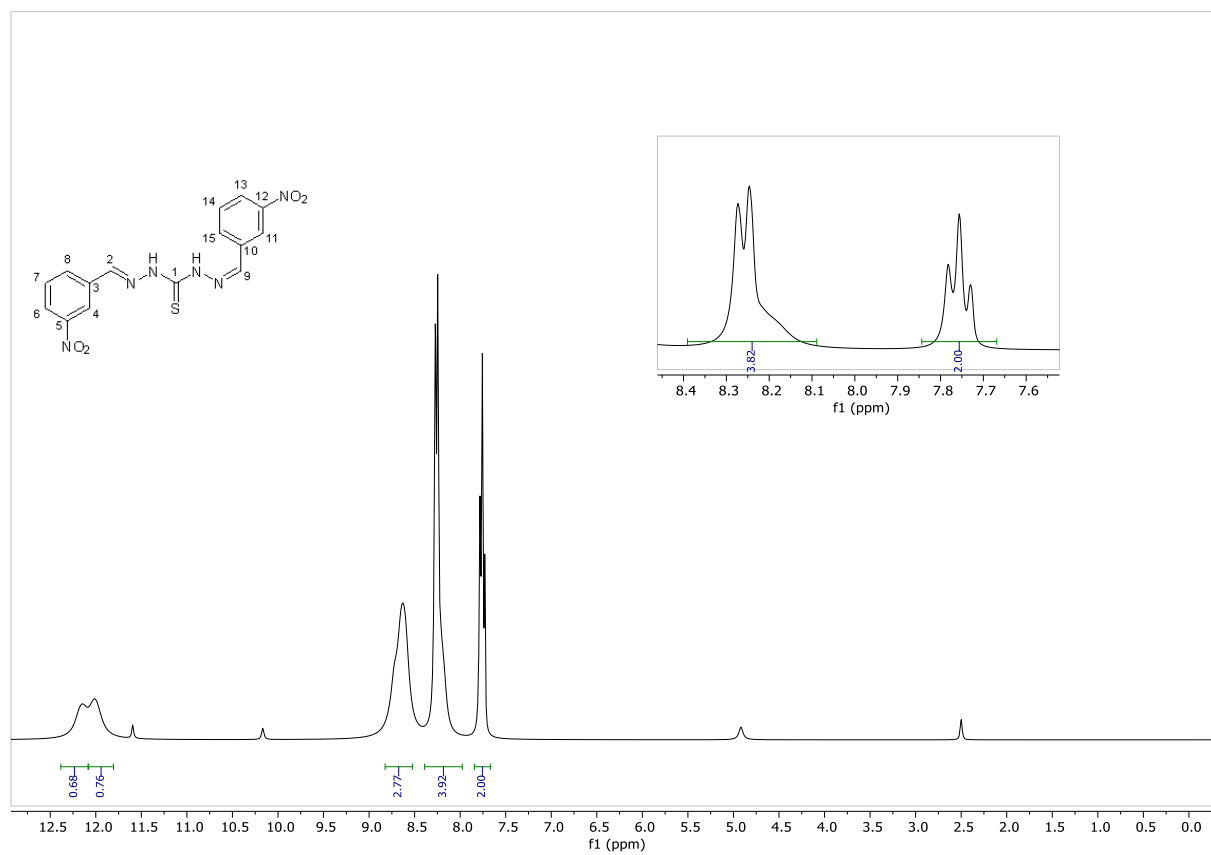
Figura 56: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B5**.**Figura 57:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B5**.

Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B5**.

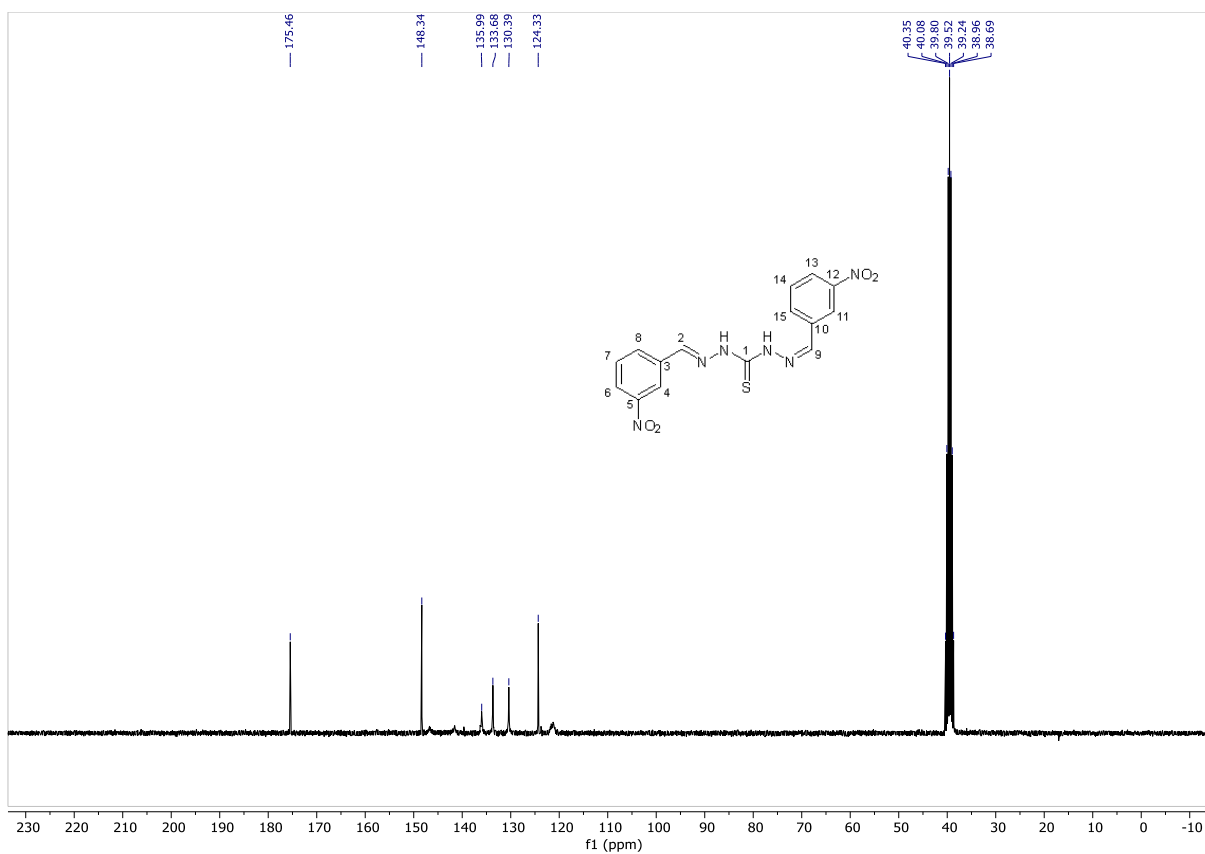


Figura 59: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B6**.

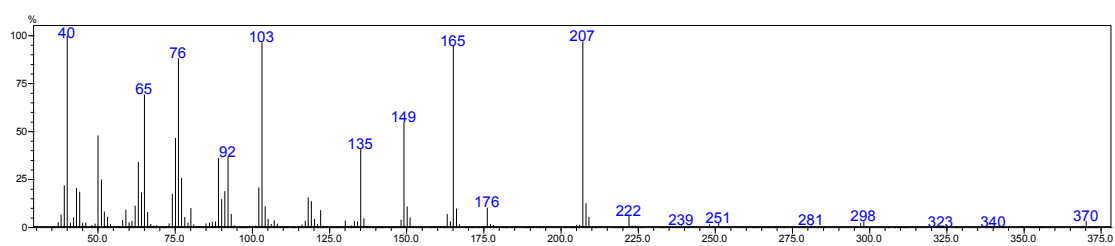


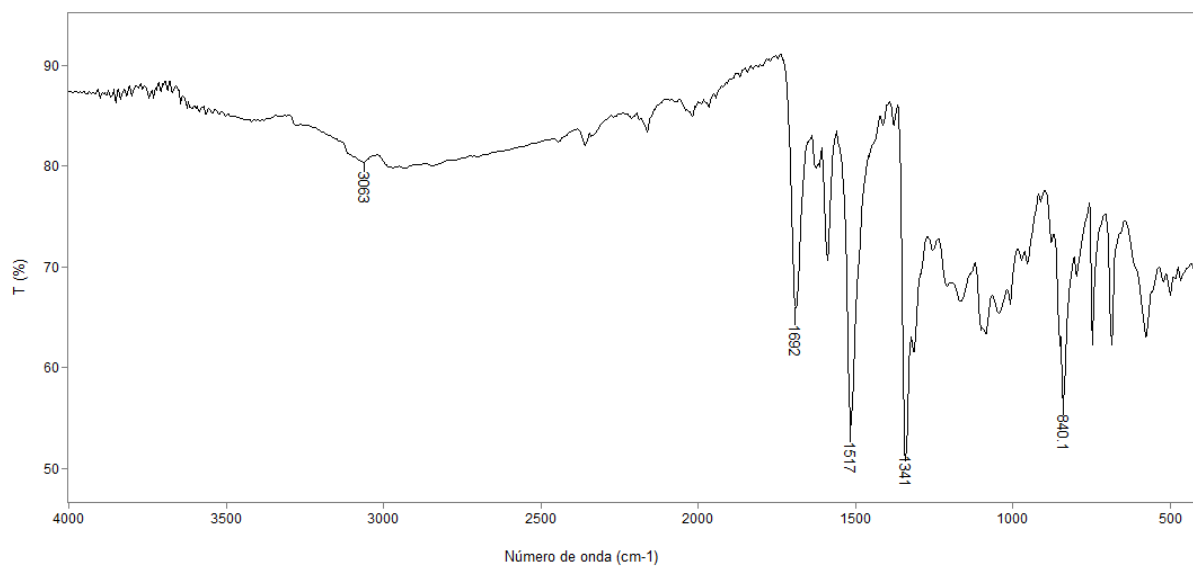
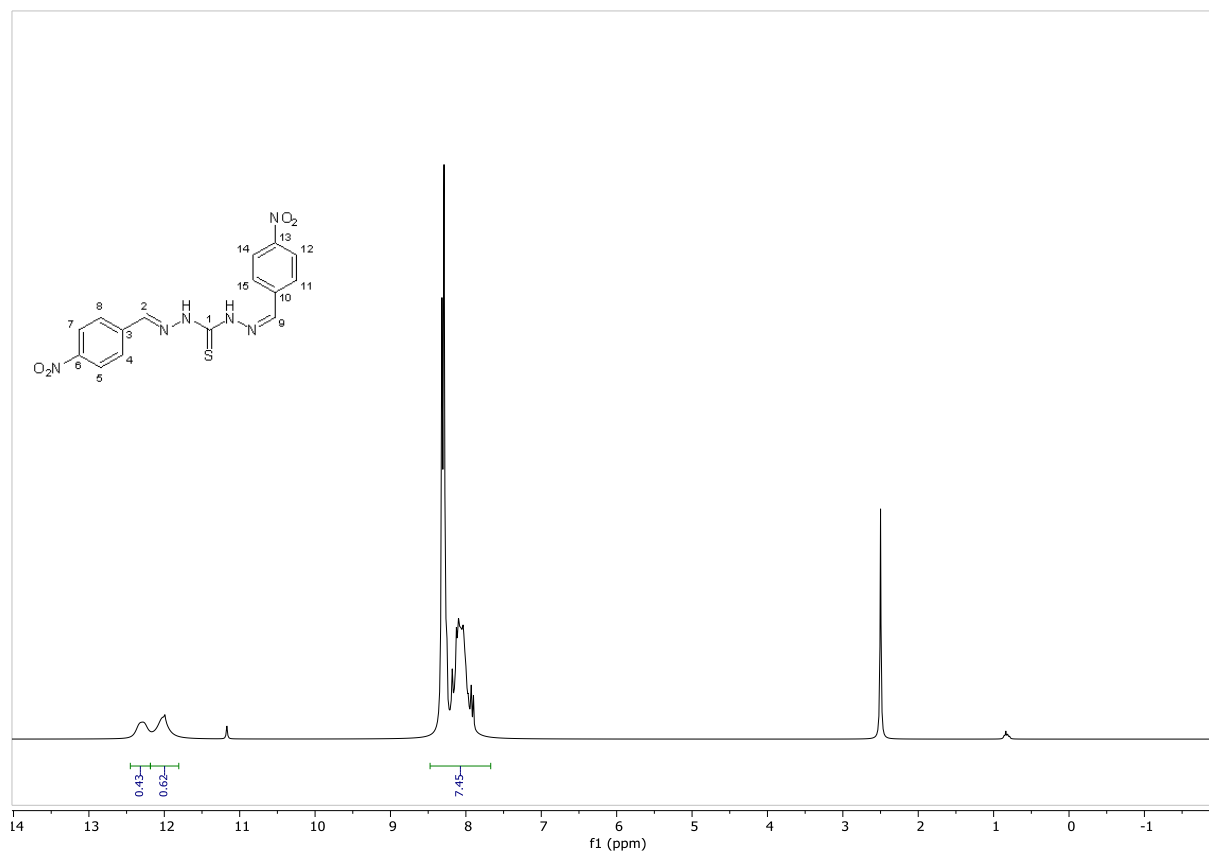
Figura 60: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B6**.**Figura 61:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B6**.

Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B6**.

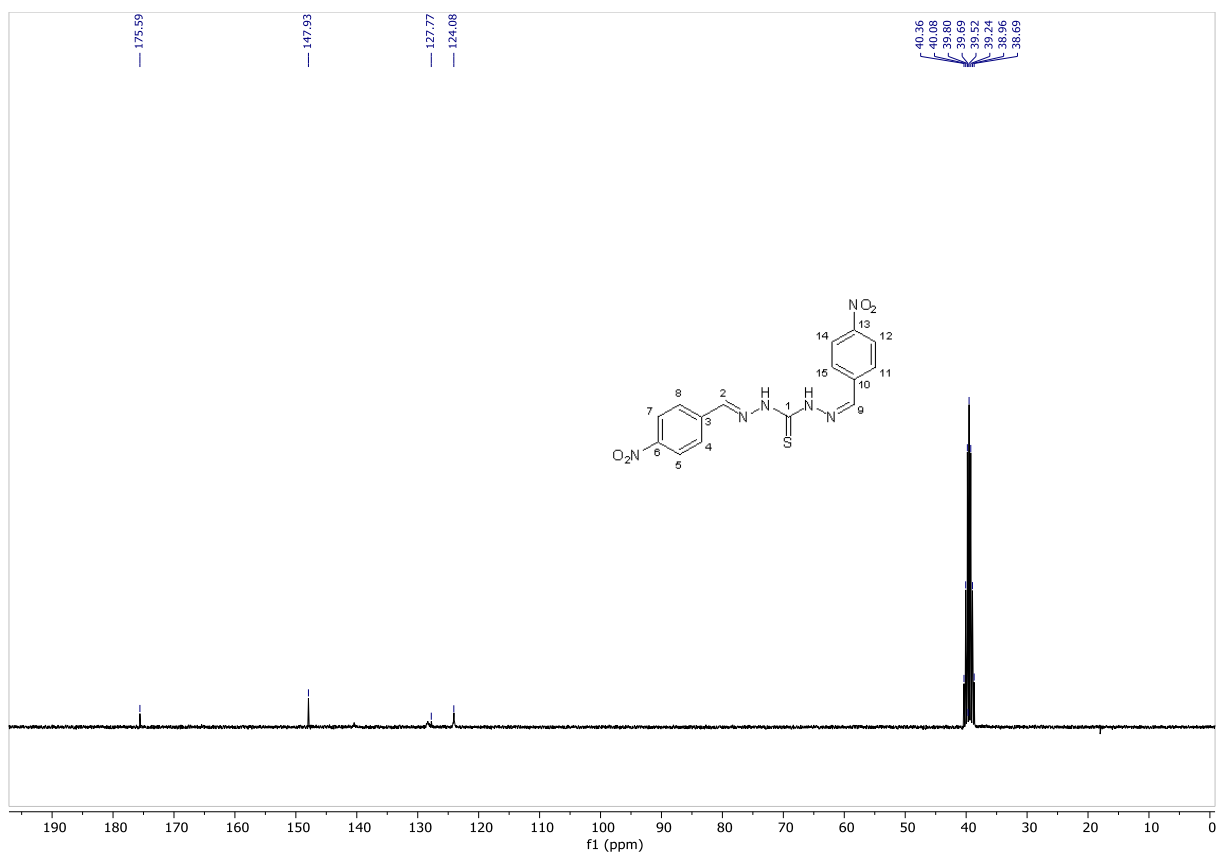


Figura 63: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B7**.

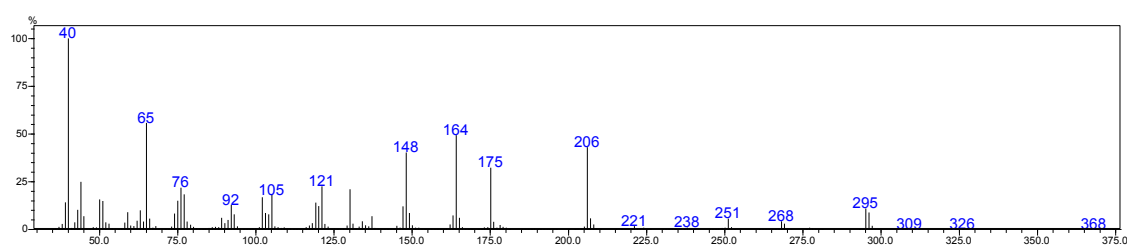


Figura 64: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B7**.

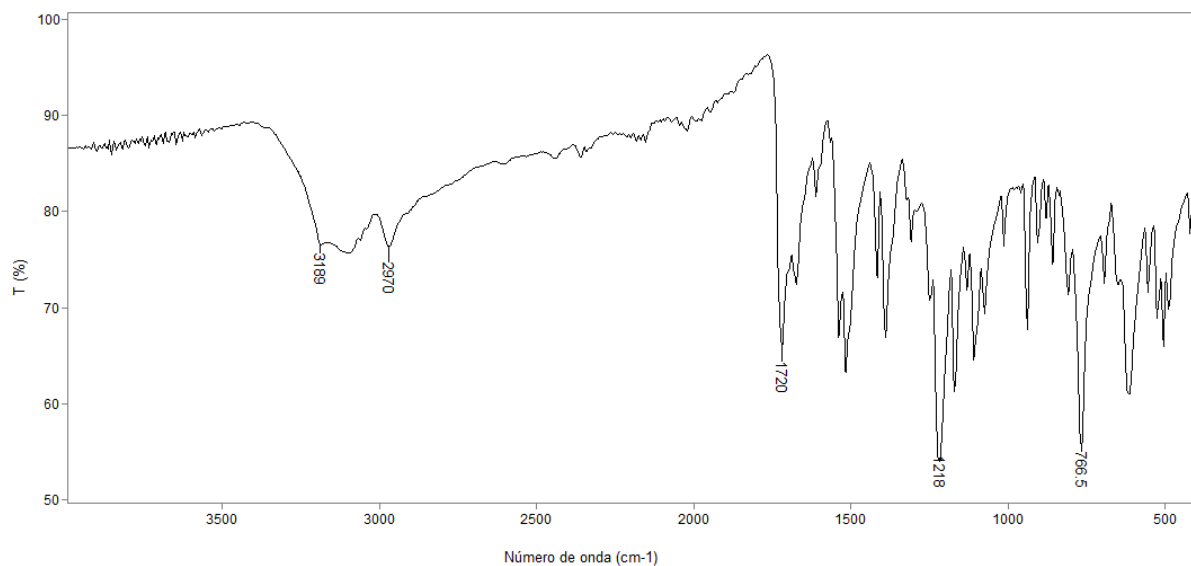


Figura 65: Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B7**.

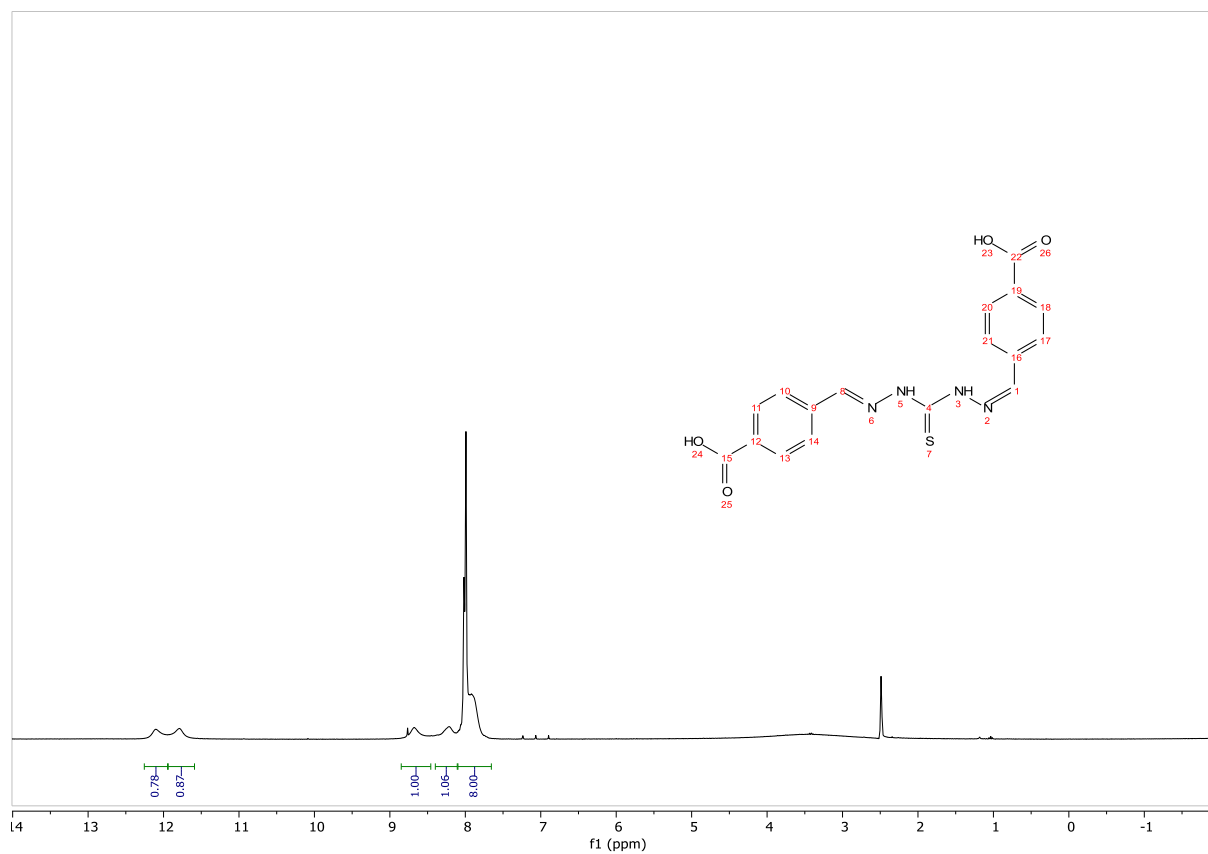


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B7**.

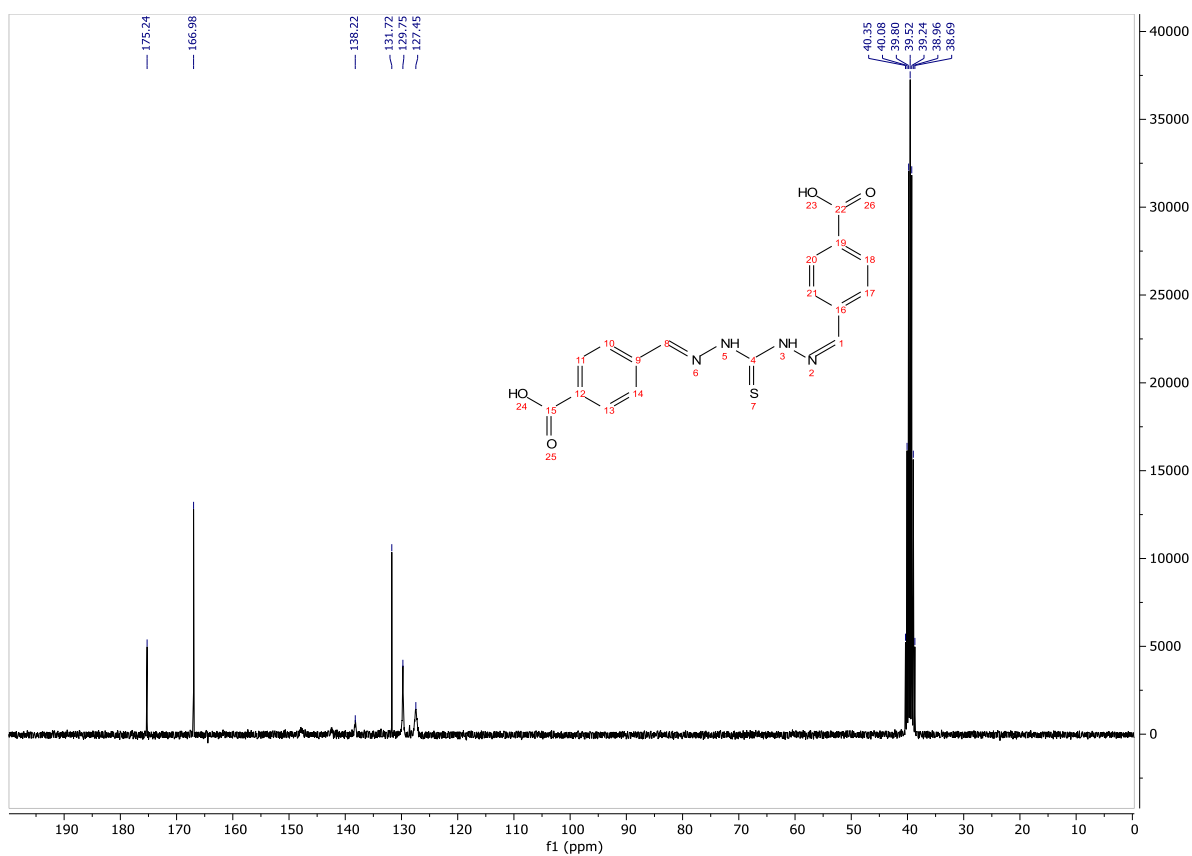


Figura 67: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B8**.

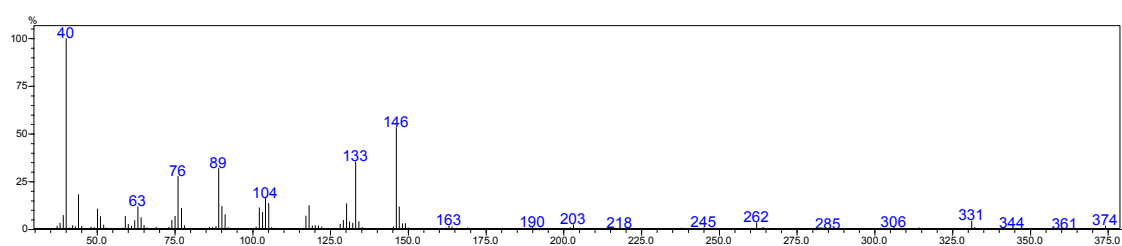


Figura 68: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B8**.

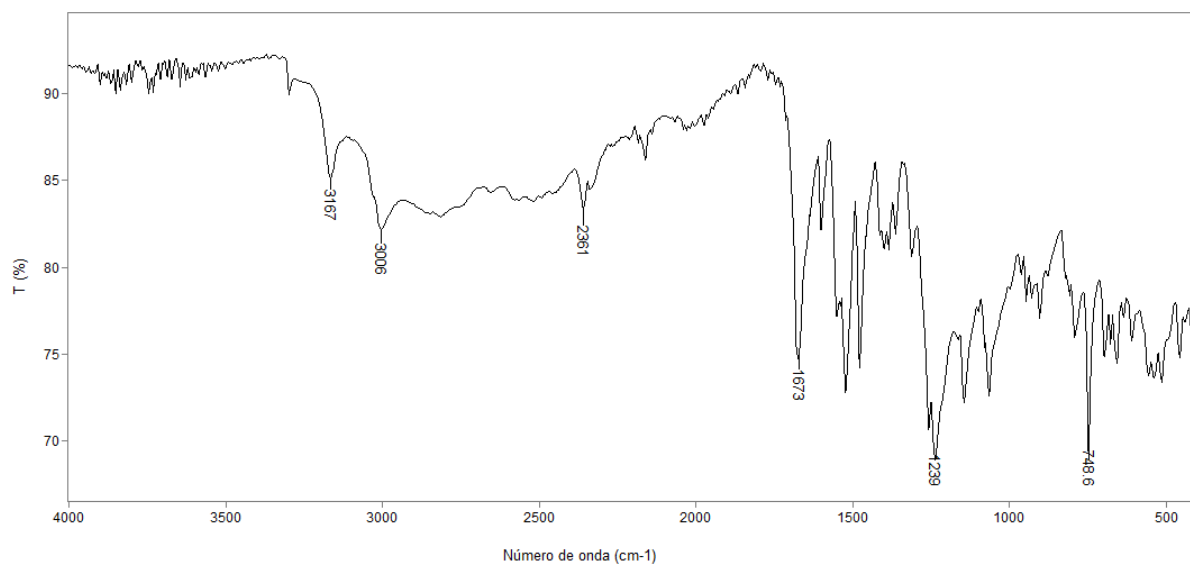


Figura 69: Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B8**.

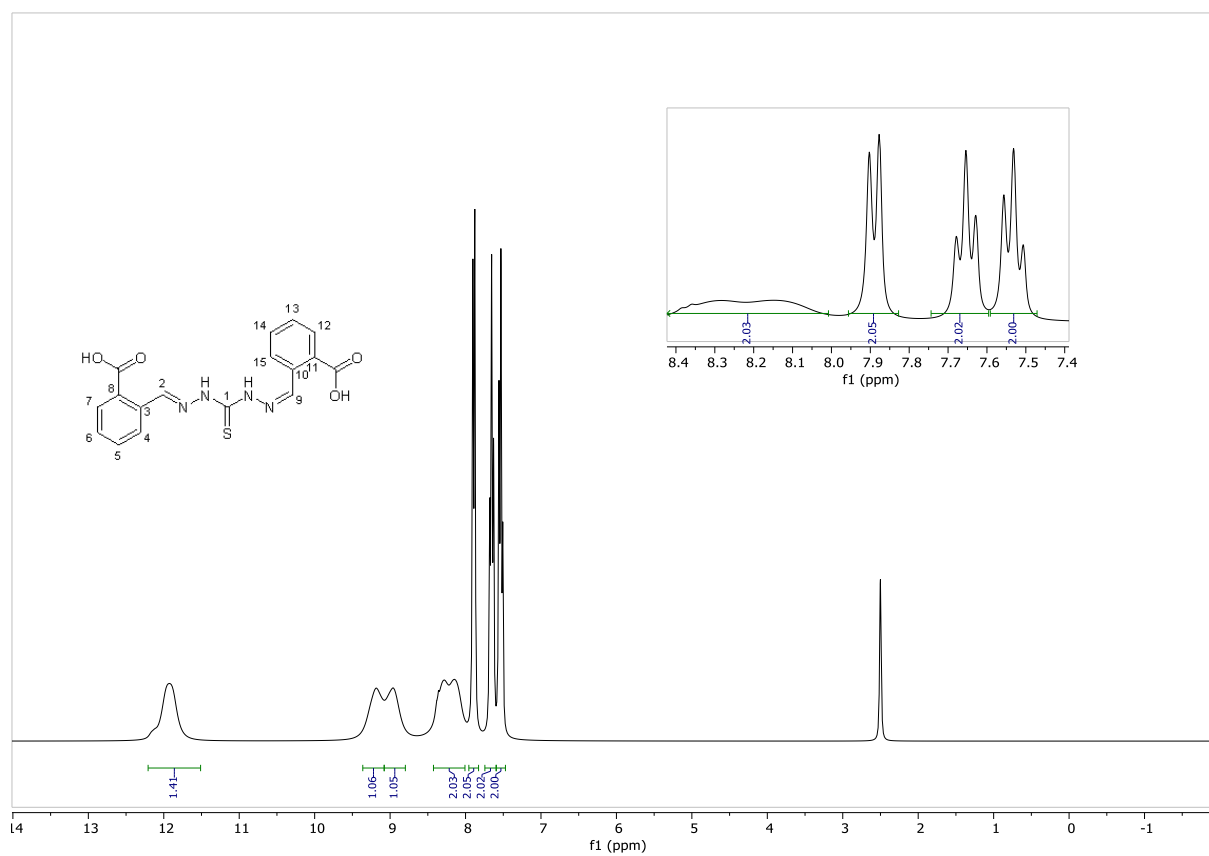


Figura 70: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B8**.

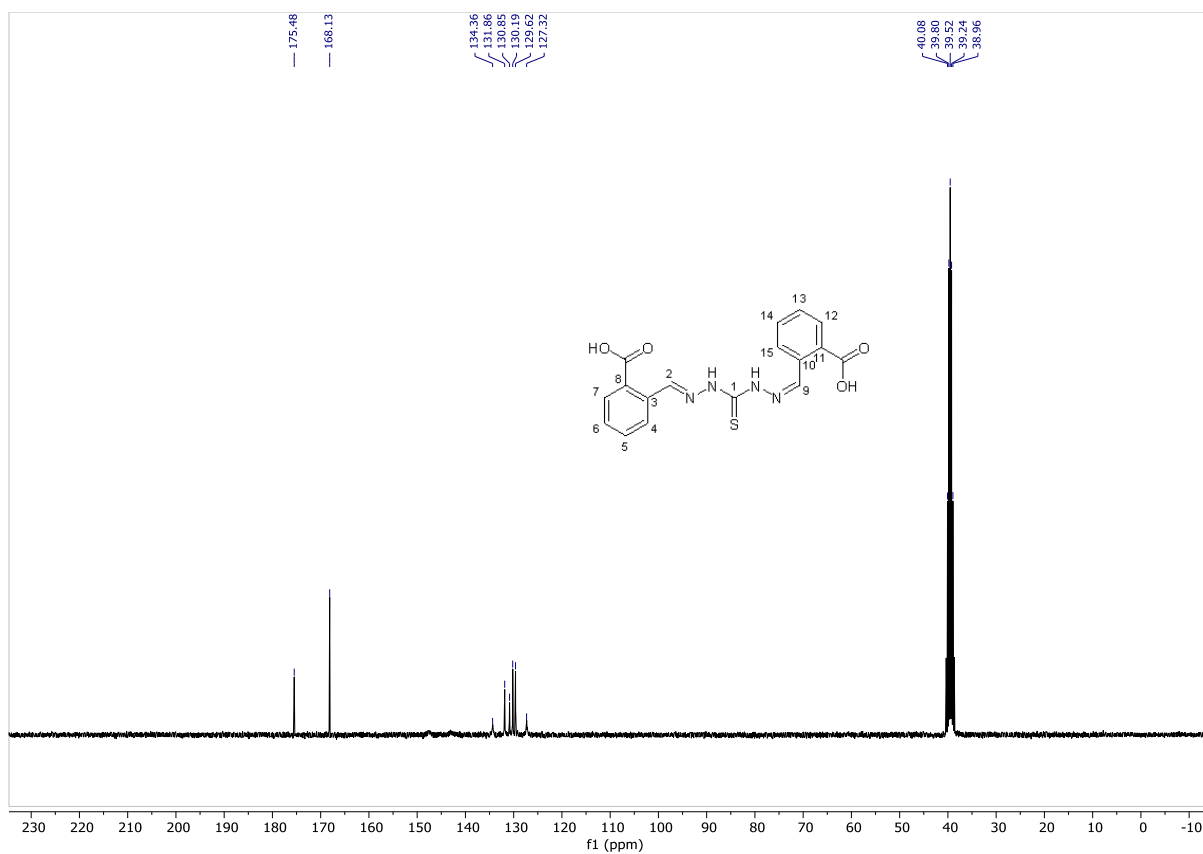


Figura 71: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B9**.

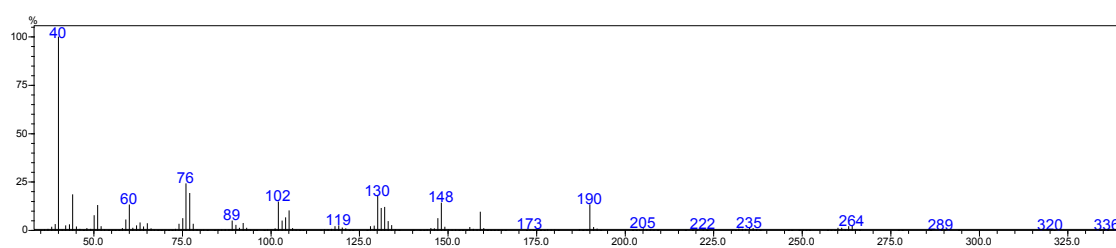


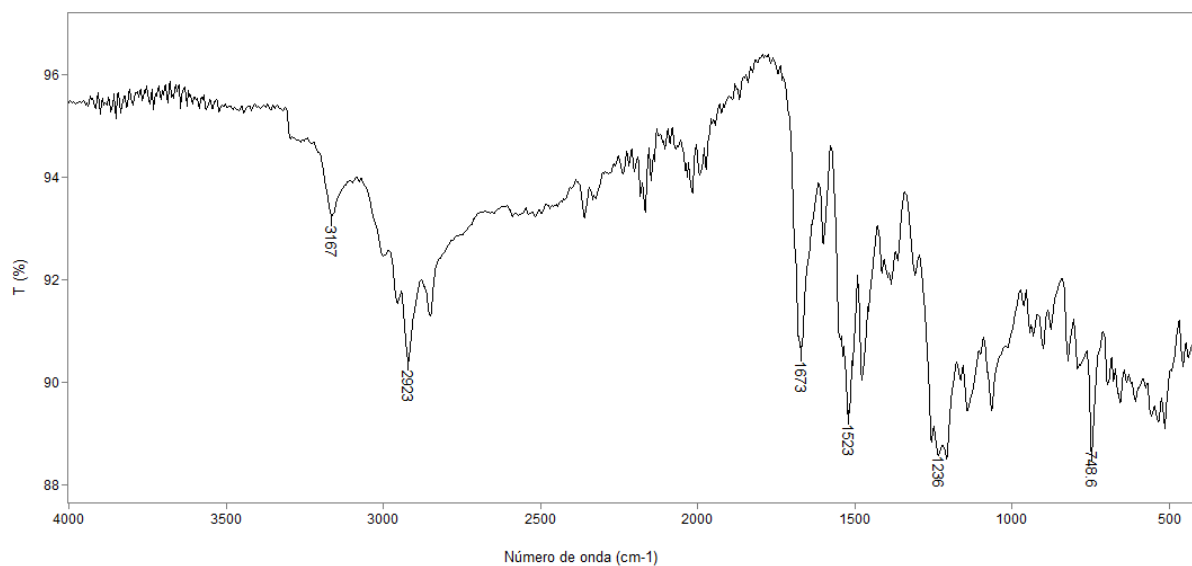
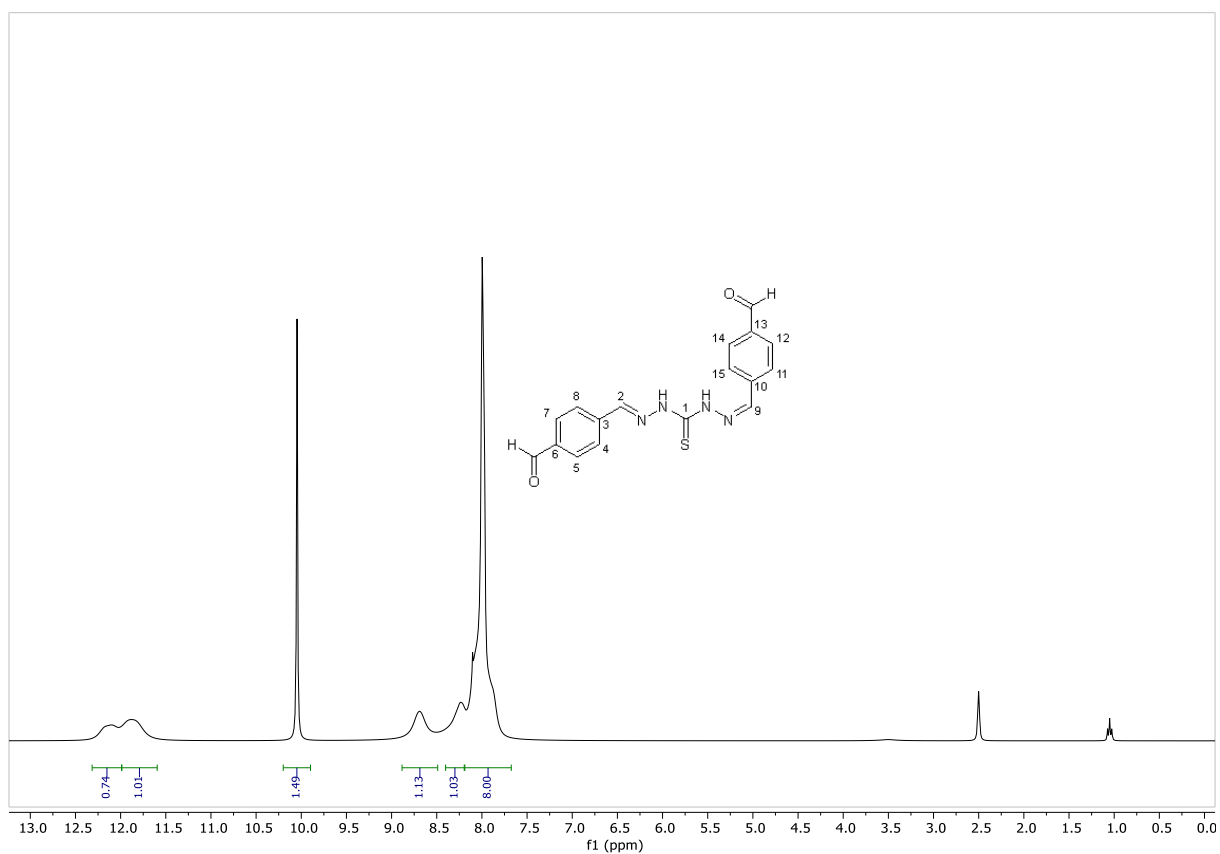
Figura 72: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B9**.**Figura 73:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B9**.

Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B9**.

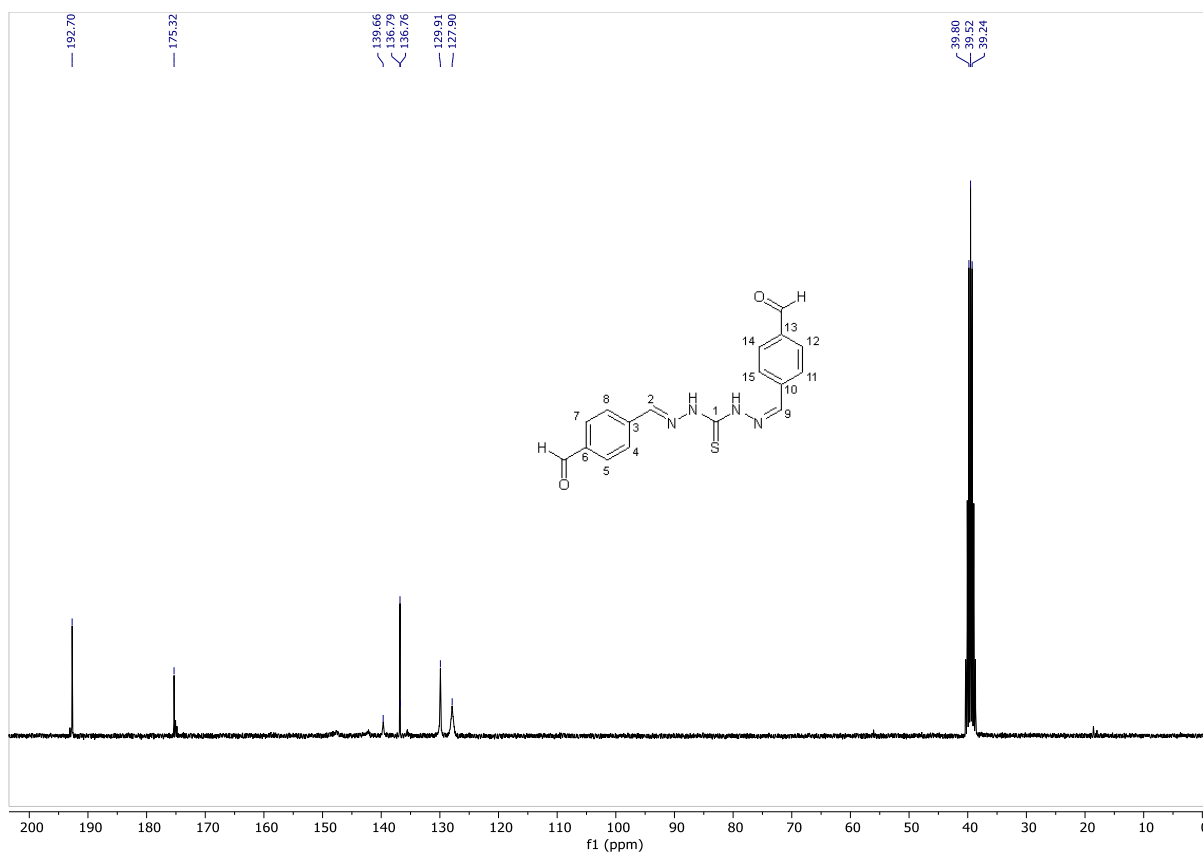


Figura 75: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B10**.

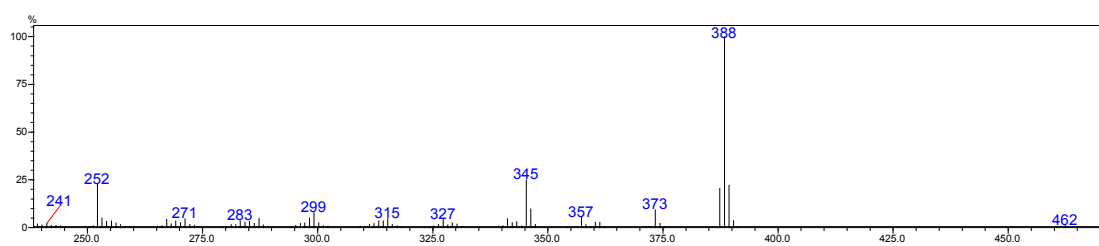


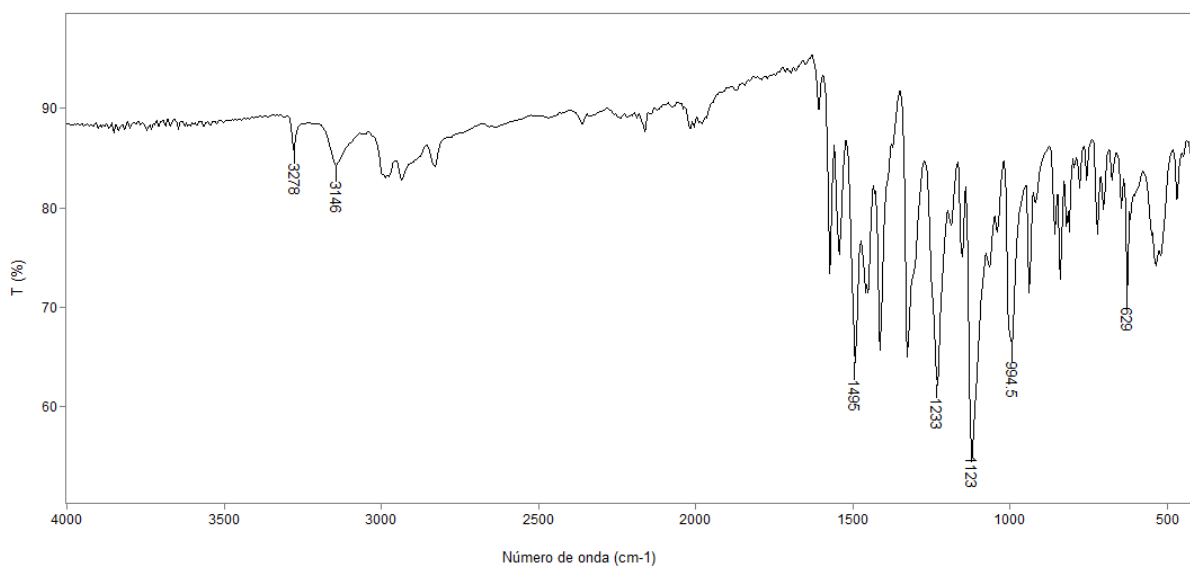
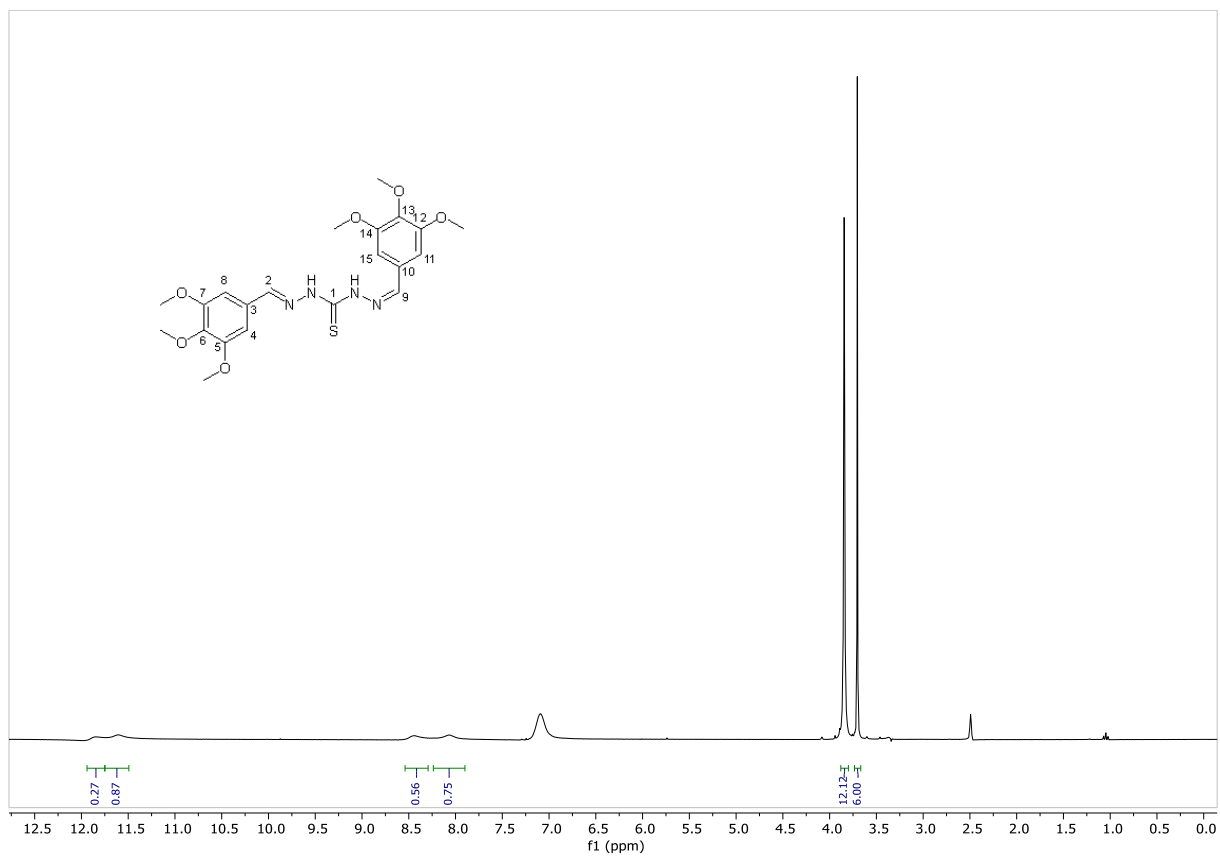
Figura 76: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B10**.**Figura 77:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B10**.

Figura 78: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B10**.

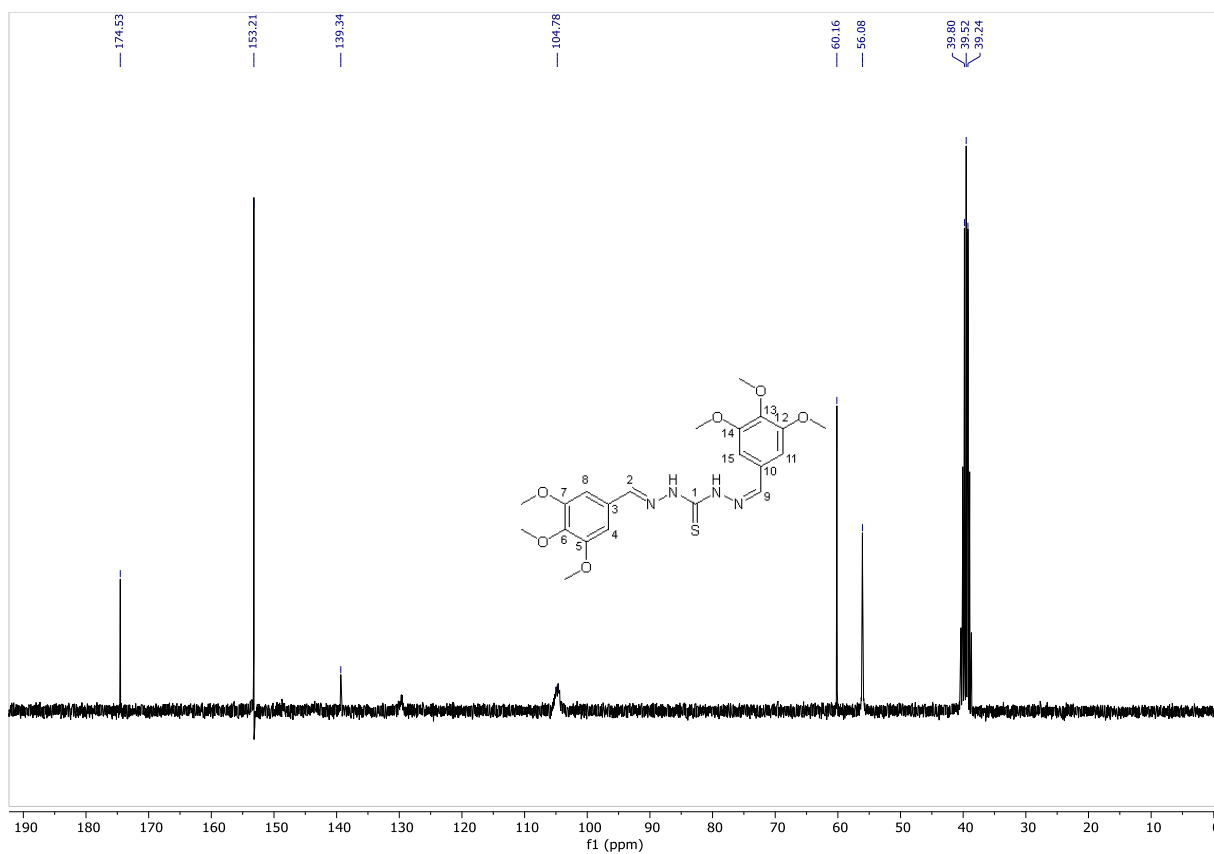


Figura 79: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B11**.

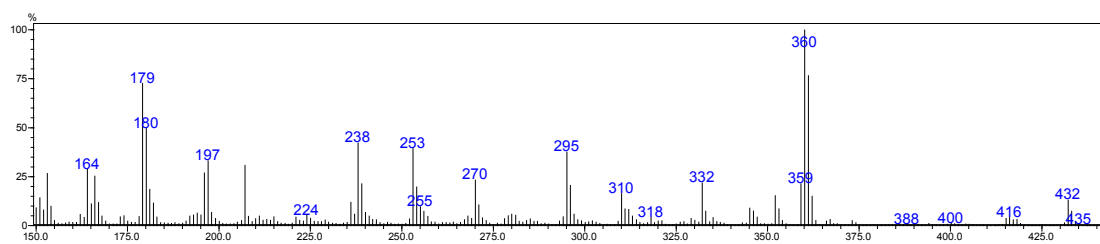


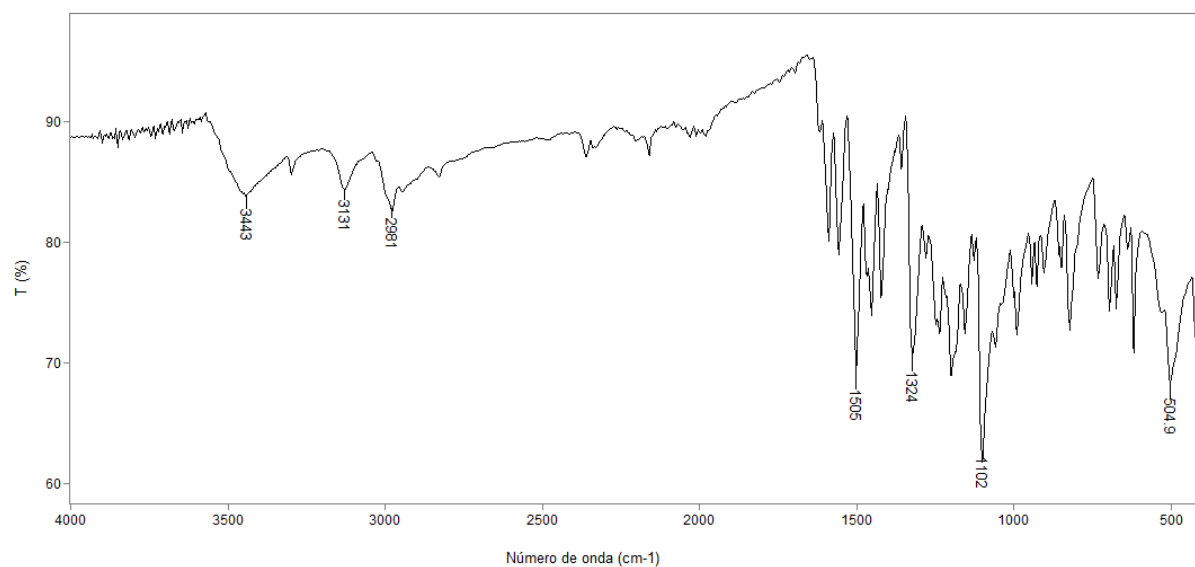
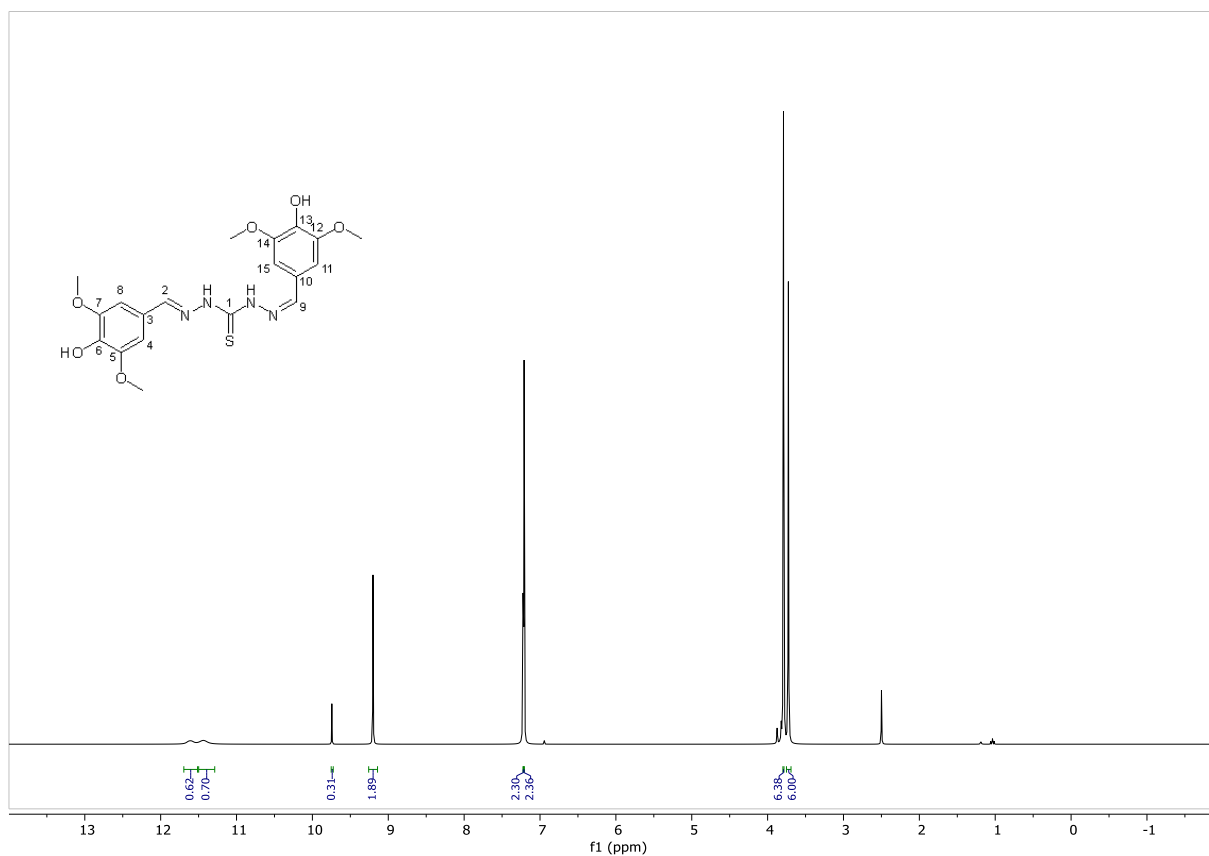
Figura 80: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B11**.**Figura 81:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B11**.

Figura 82: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B11**.

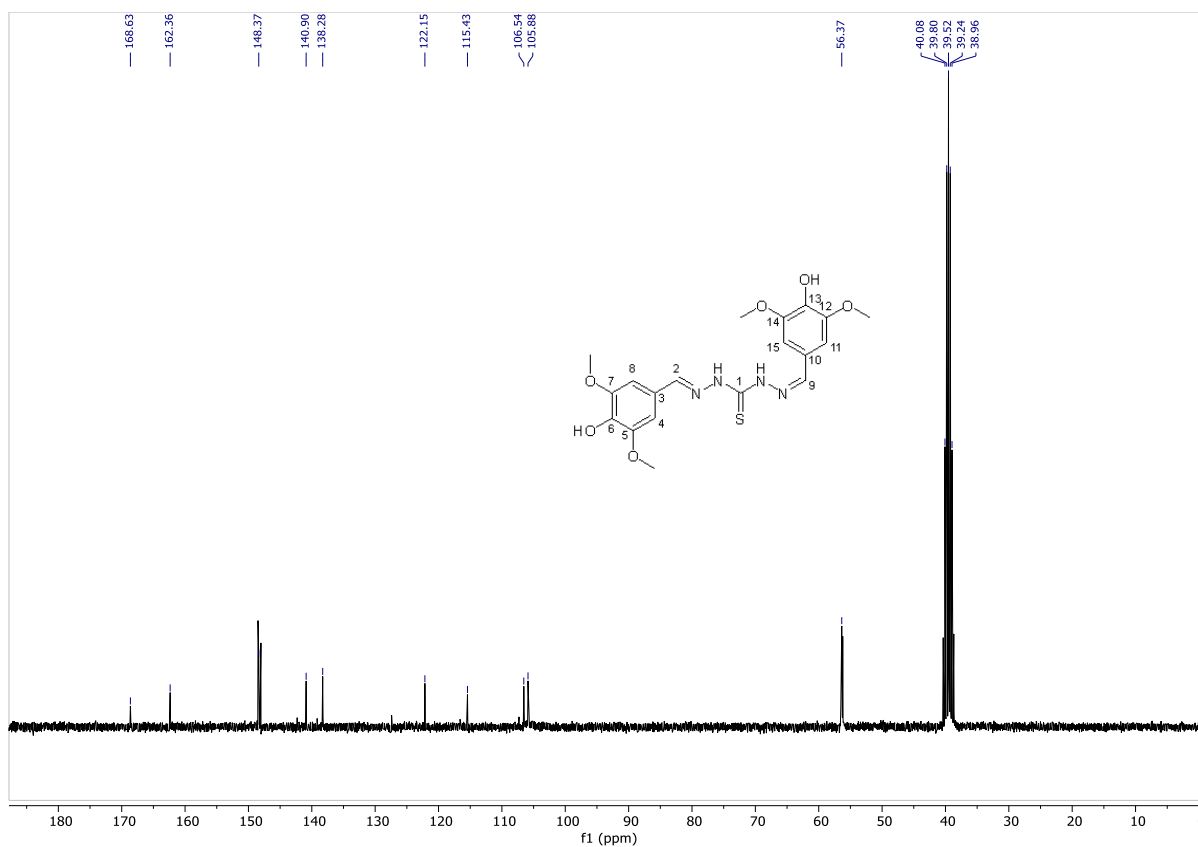


Figura 83: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B12**.

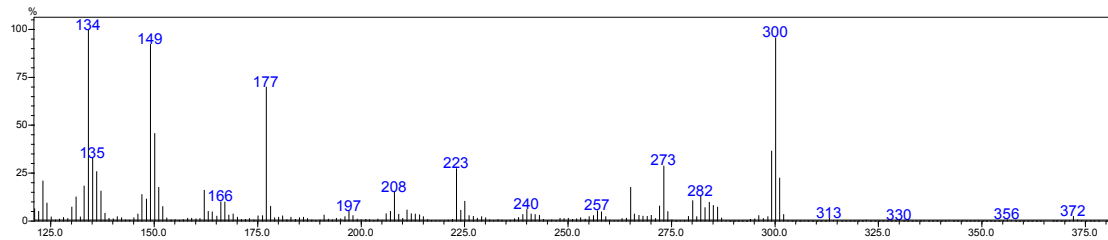


Figura 84: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B12**.

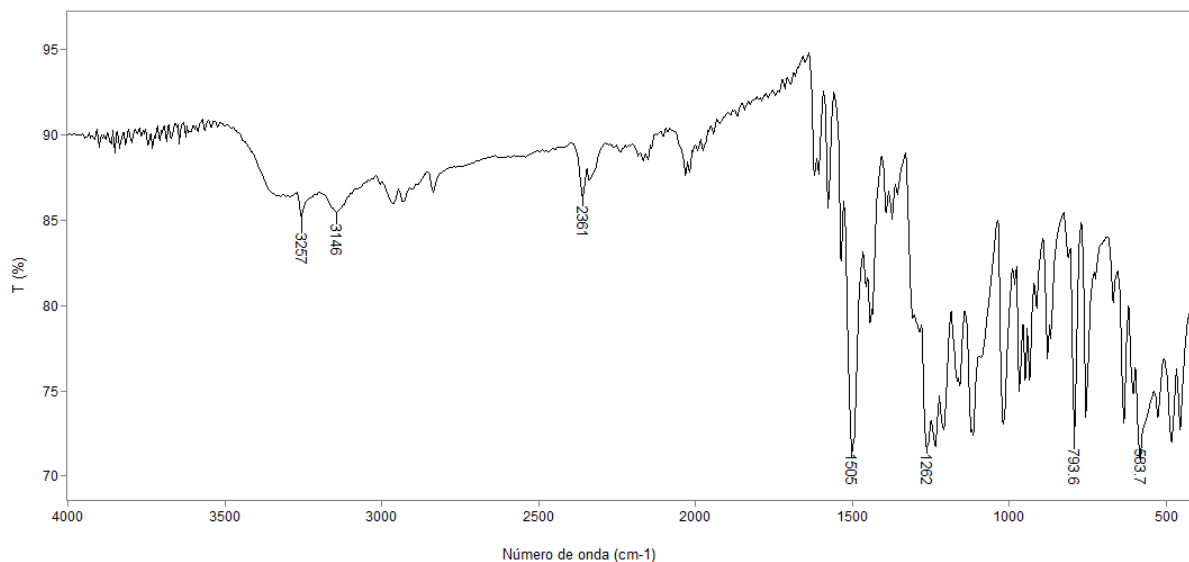


Figura 85: Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B12**.

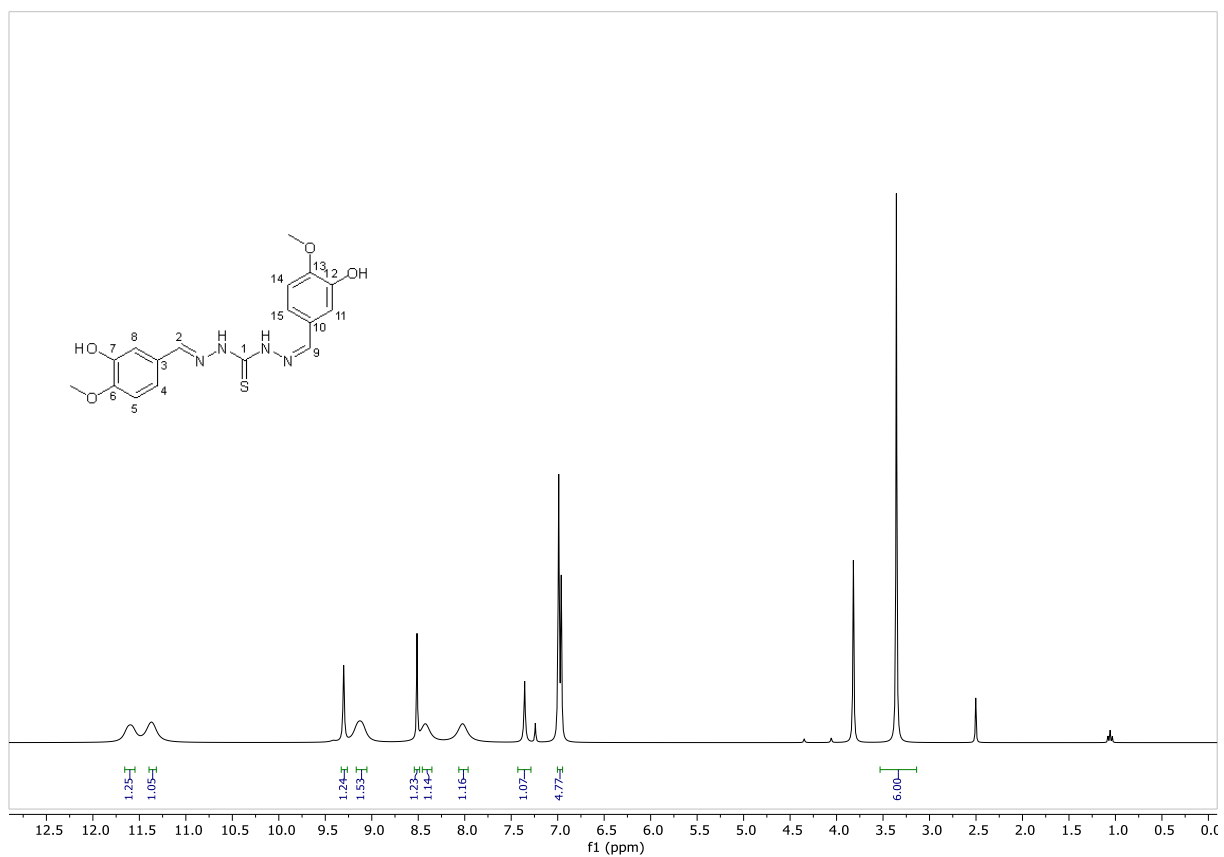


Figura 86: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B12**.

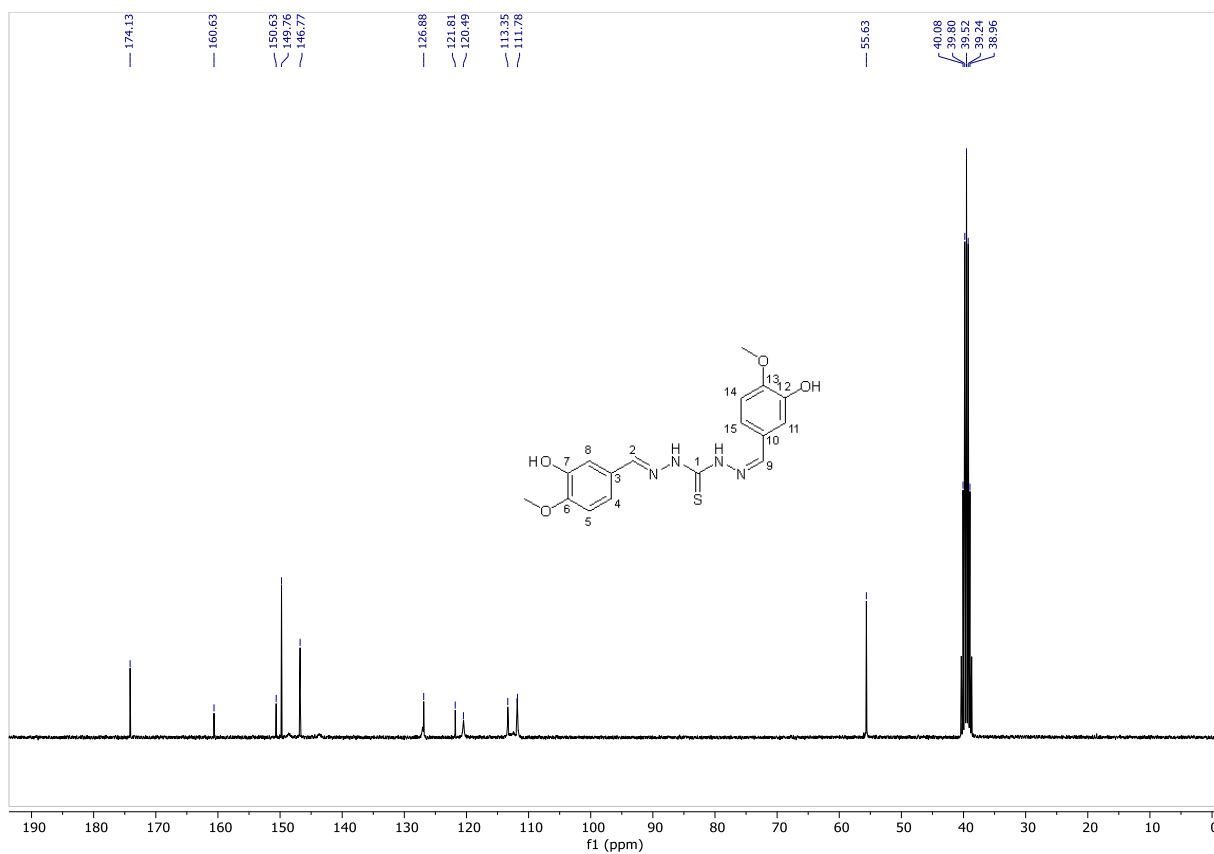


Figura 87: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B13**.

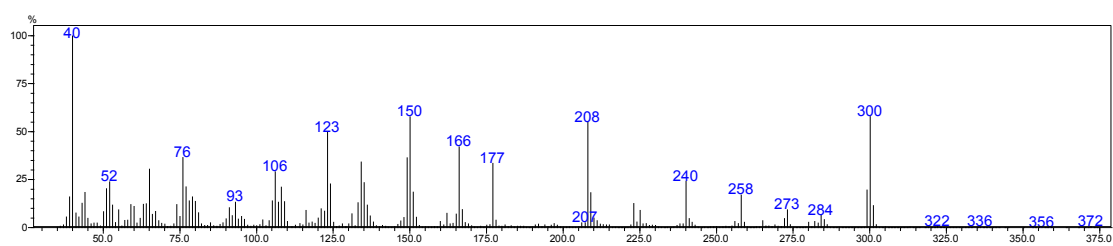


Figura 88: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B13**.

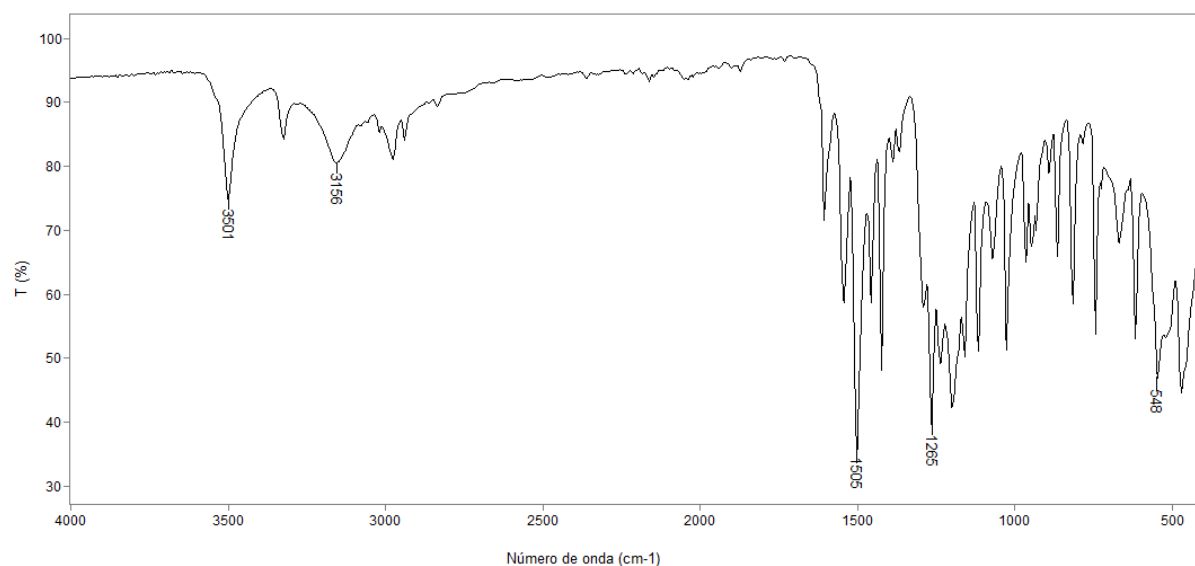


Figura 89: Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B13**.

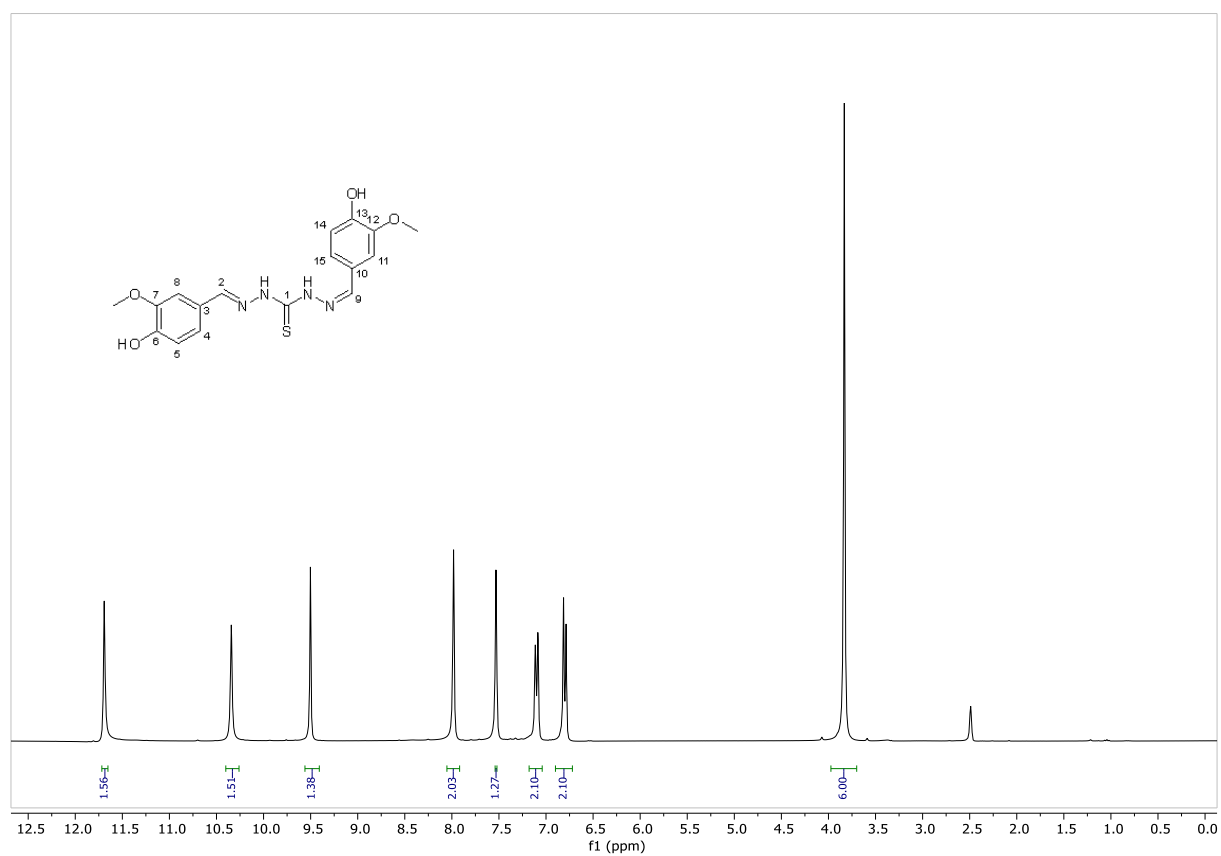


Figura 90: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B13**.

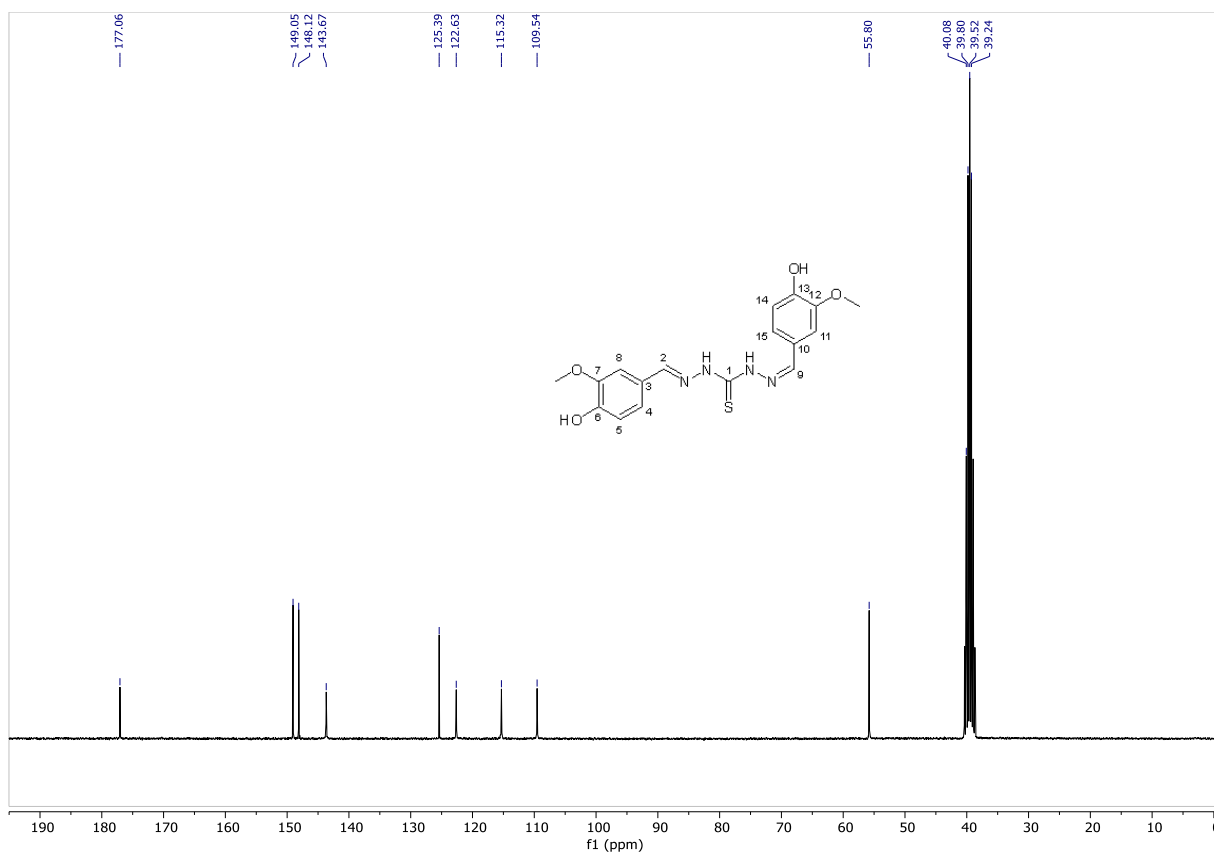


Figura 91: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B14**.

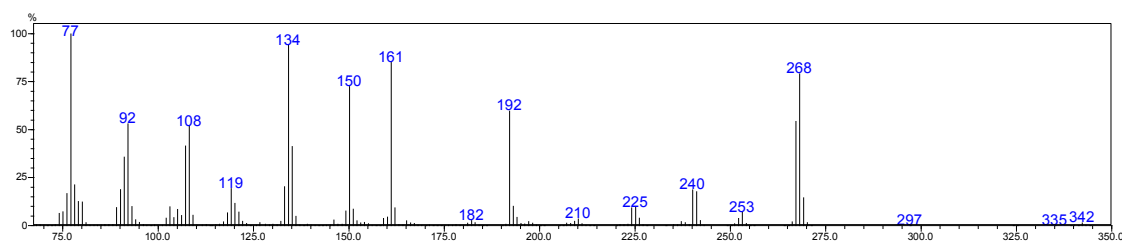


Figura 94: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B14**.

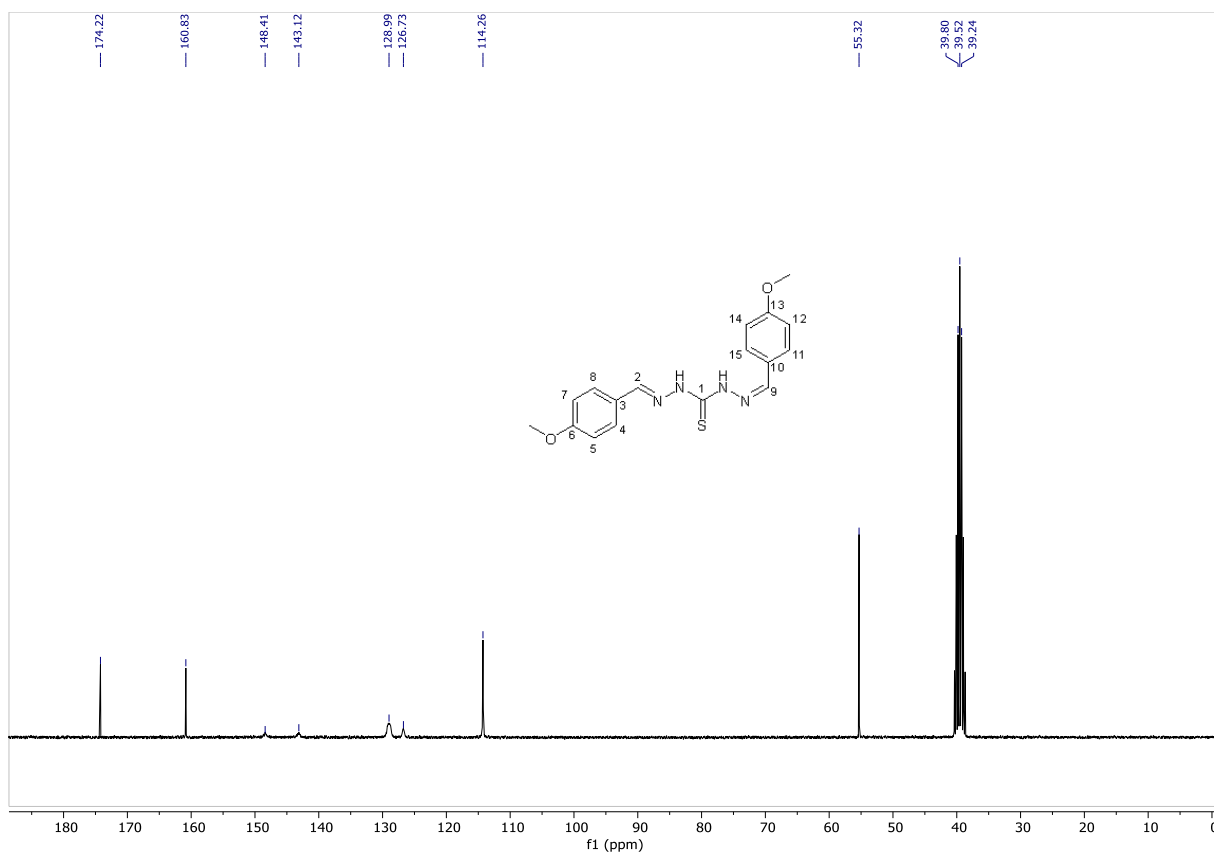


Figura 95: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B15**.

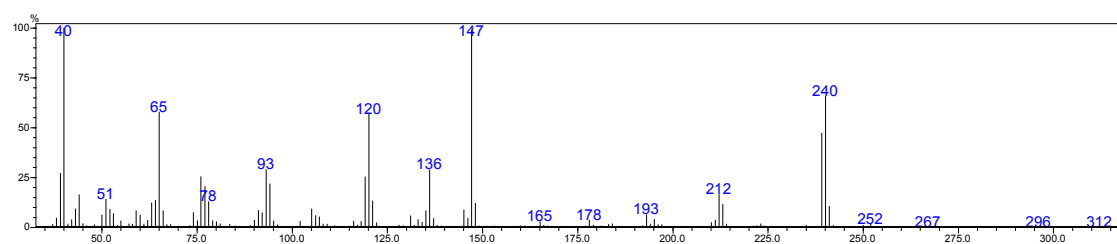


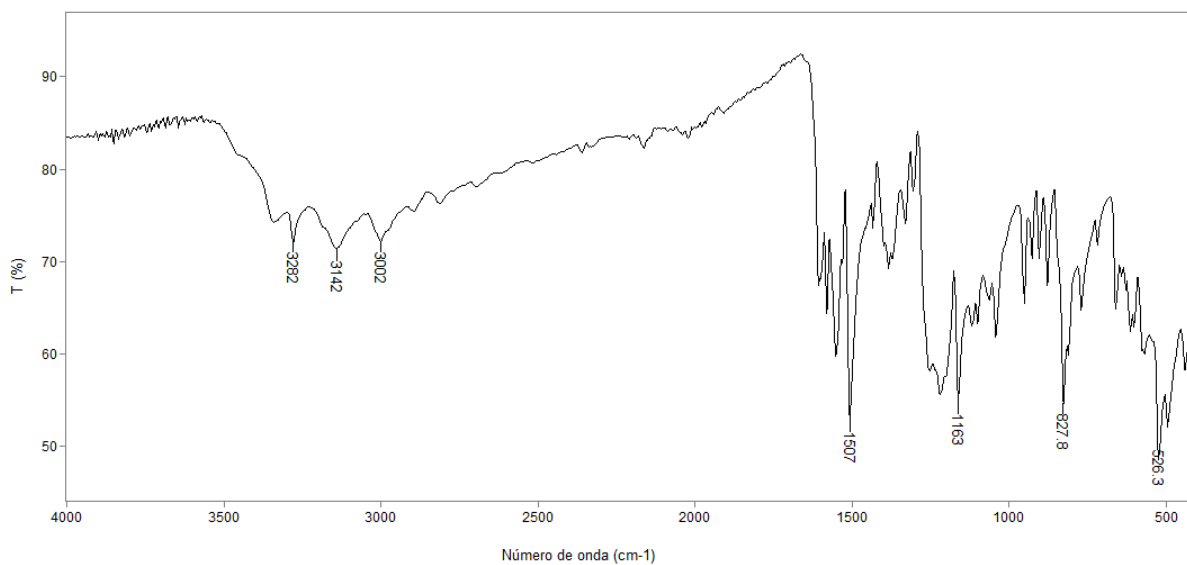
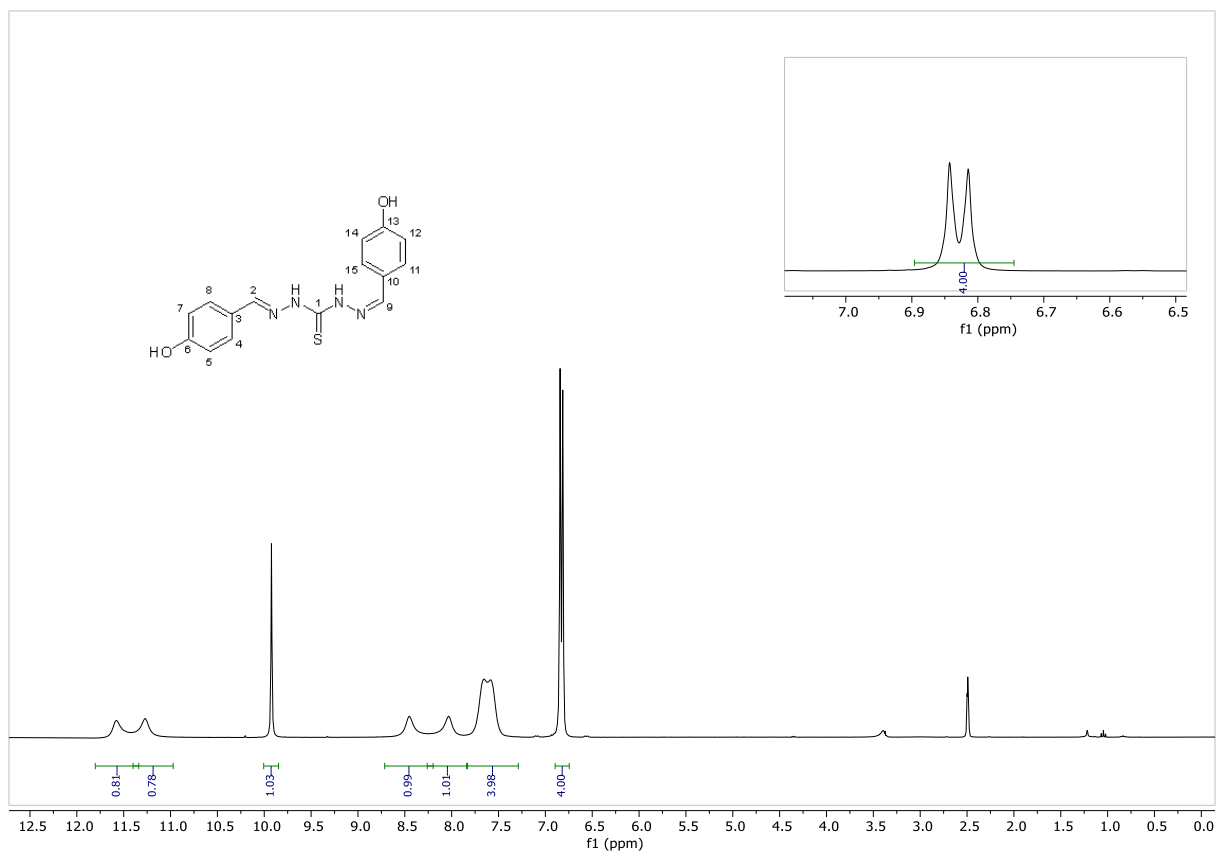
Figura 96: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B15**.**Figura 97:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B15**.

Figura 98: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B15**.

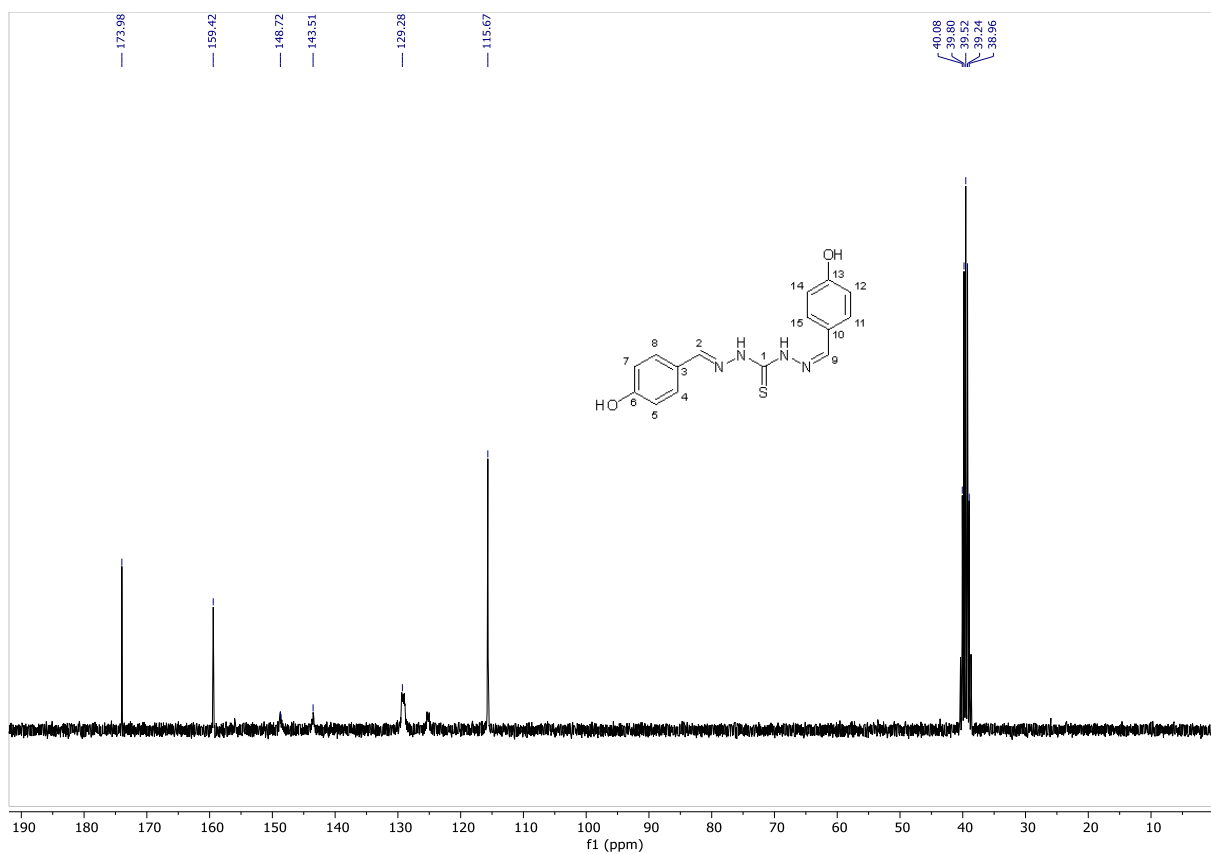


Figura 99: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B16**.

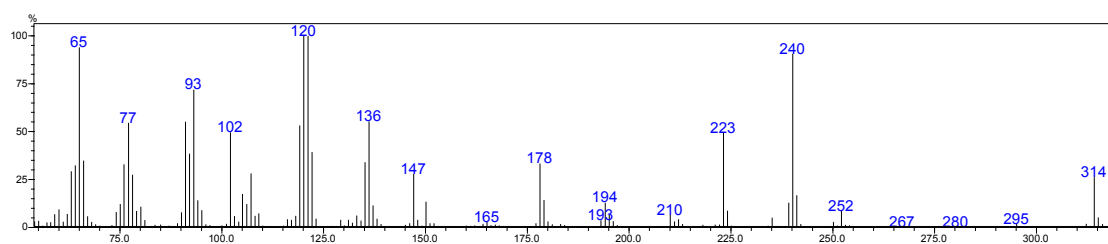


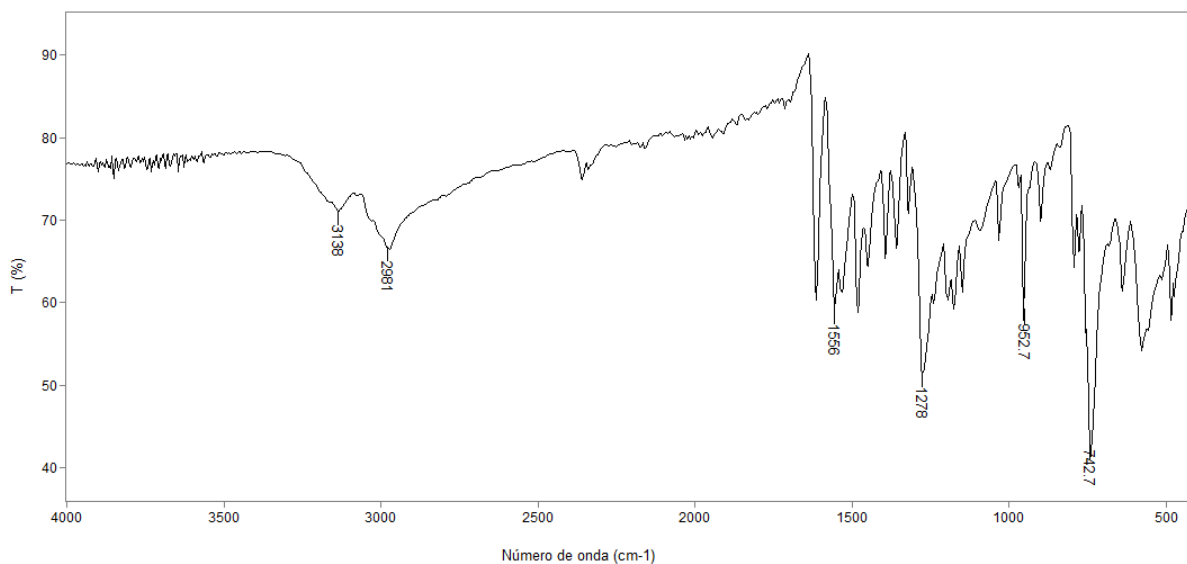
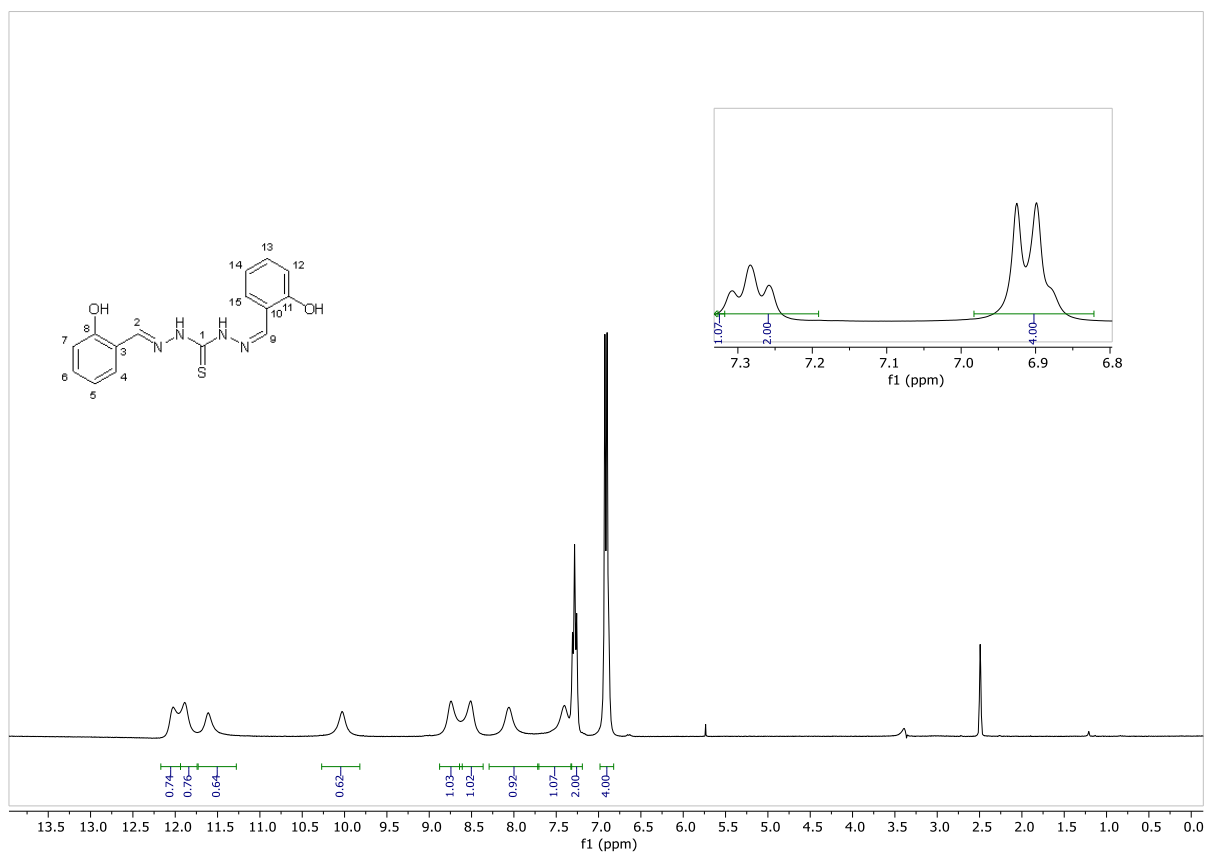
Figura 100: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B16**.**Figura 101:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B16**.

Figura 102: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B16**.

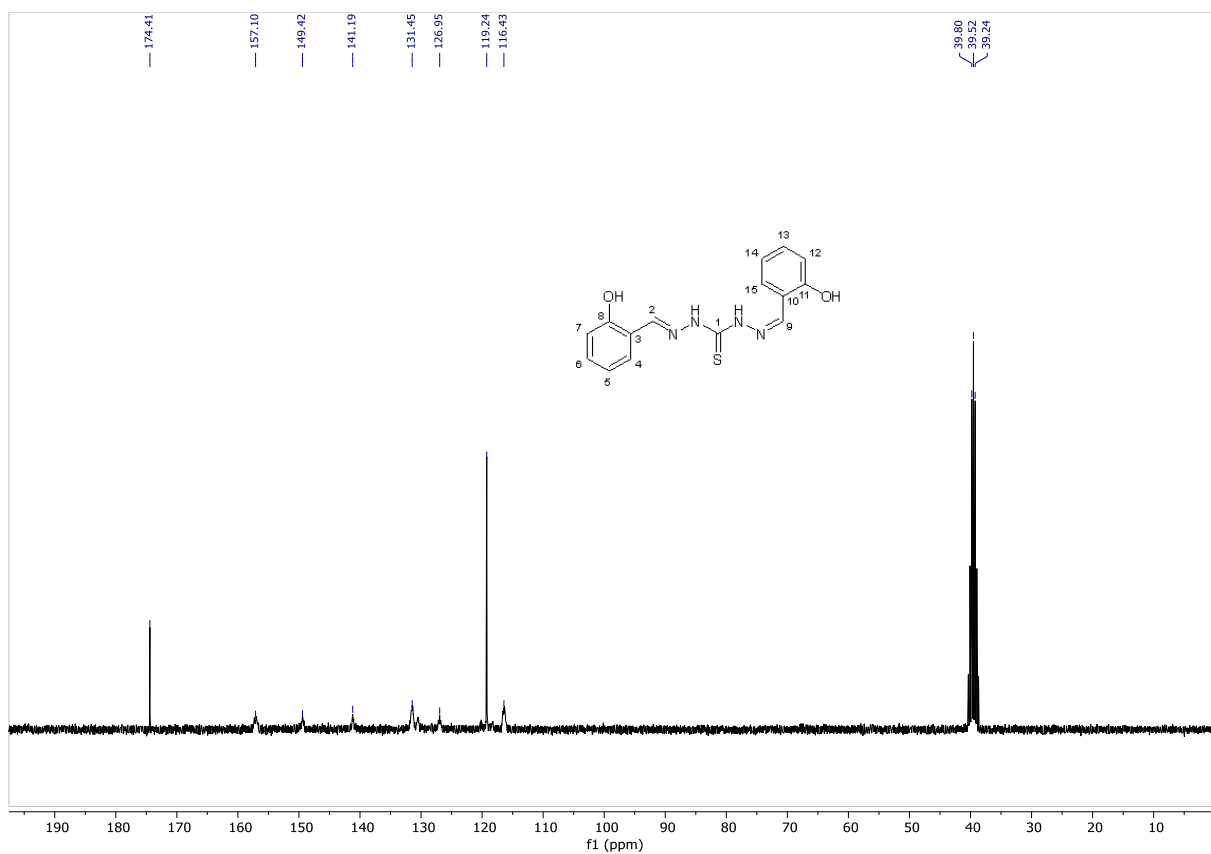


Figura 103: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B17**.

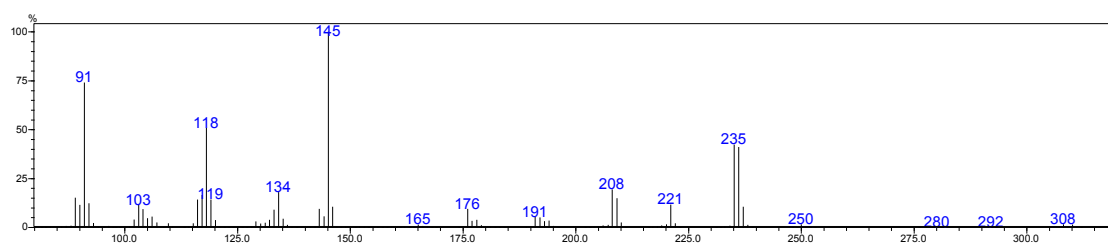


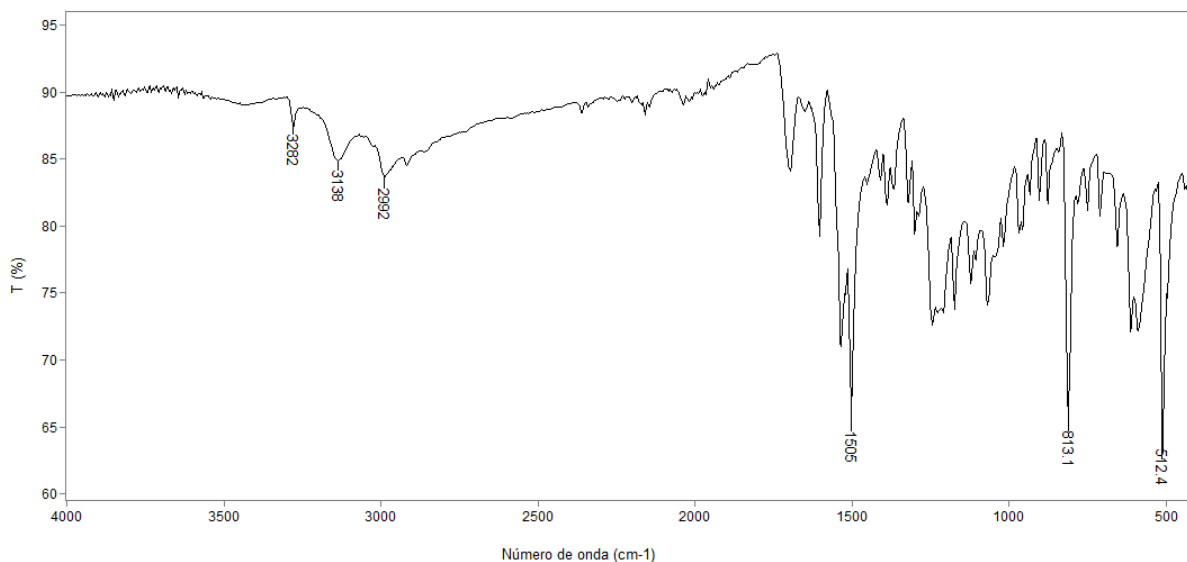
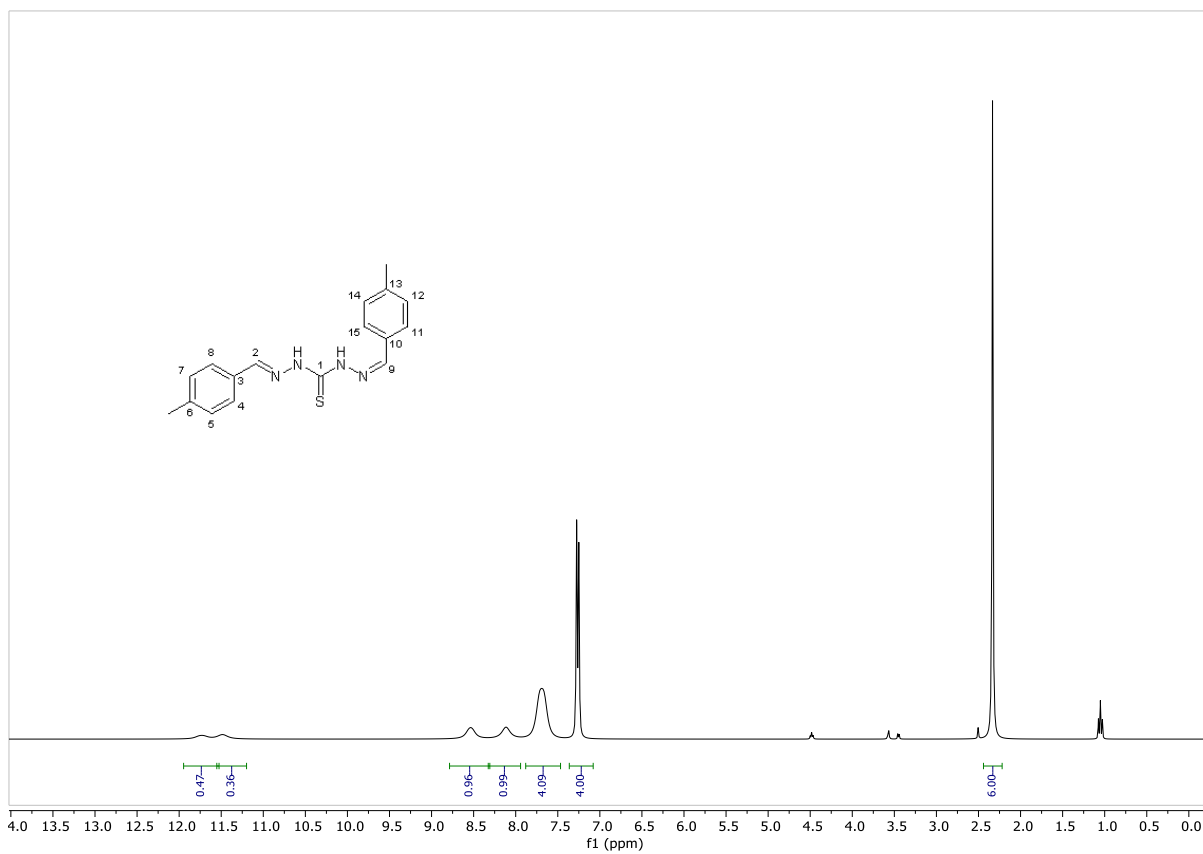
Figura 104: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B17**.**Figura 105:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B17**.

Figura 106: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B17**.

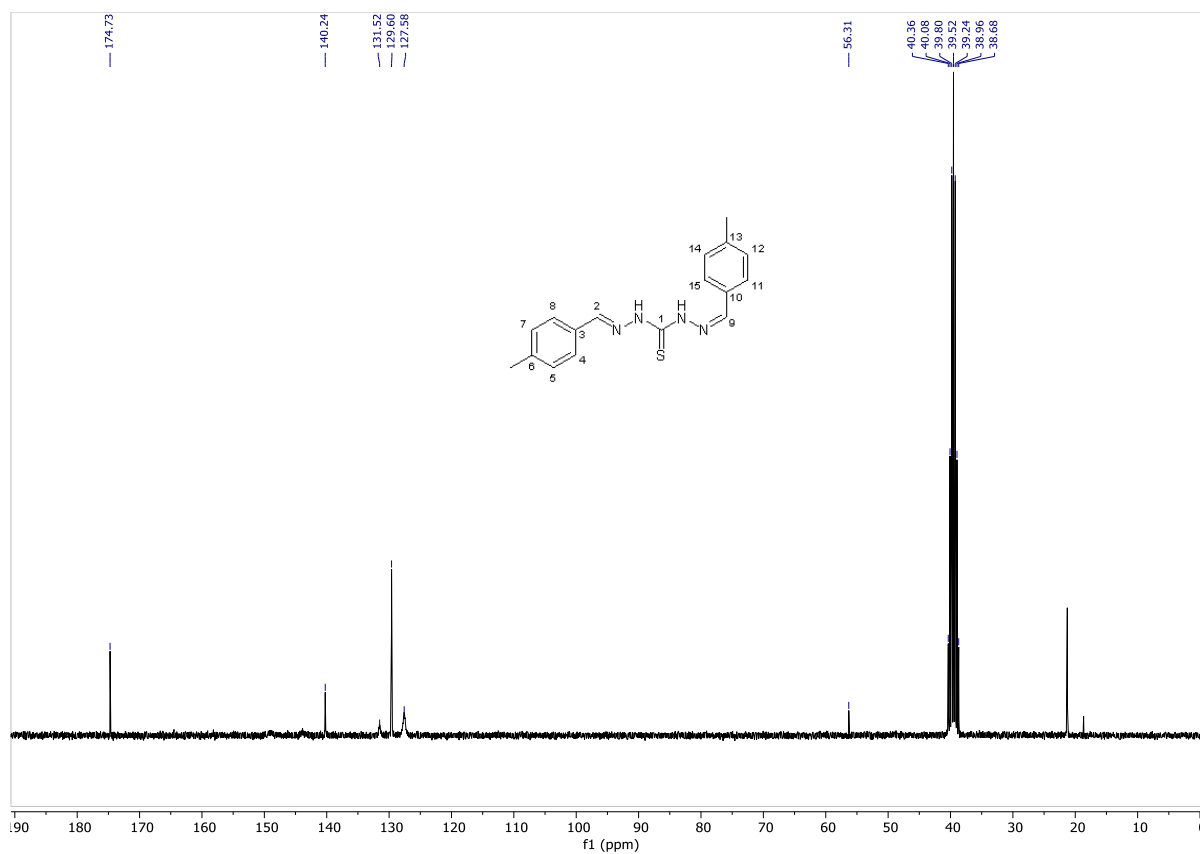


Figura 107: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B18**.

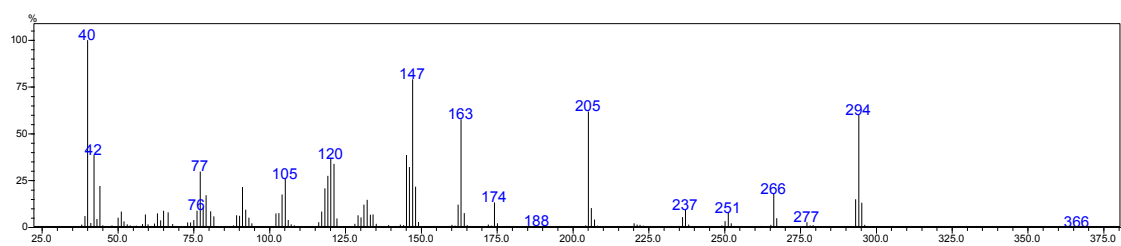


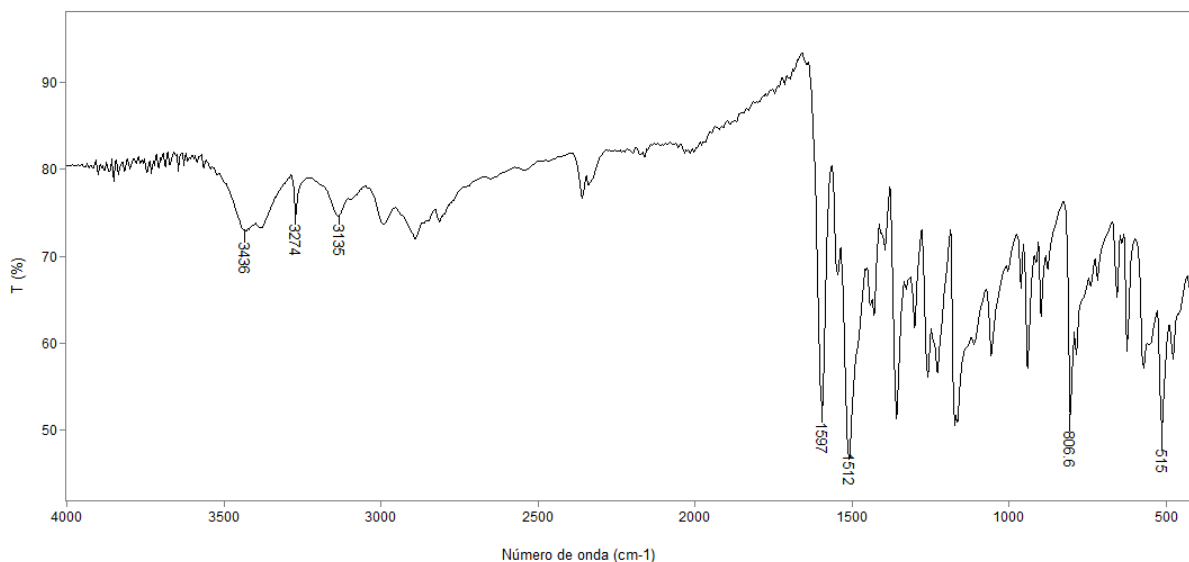
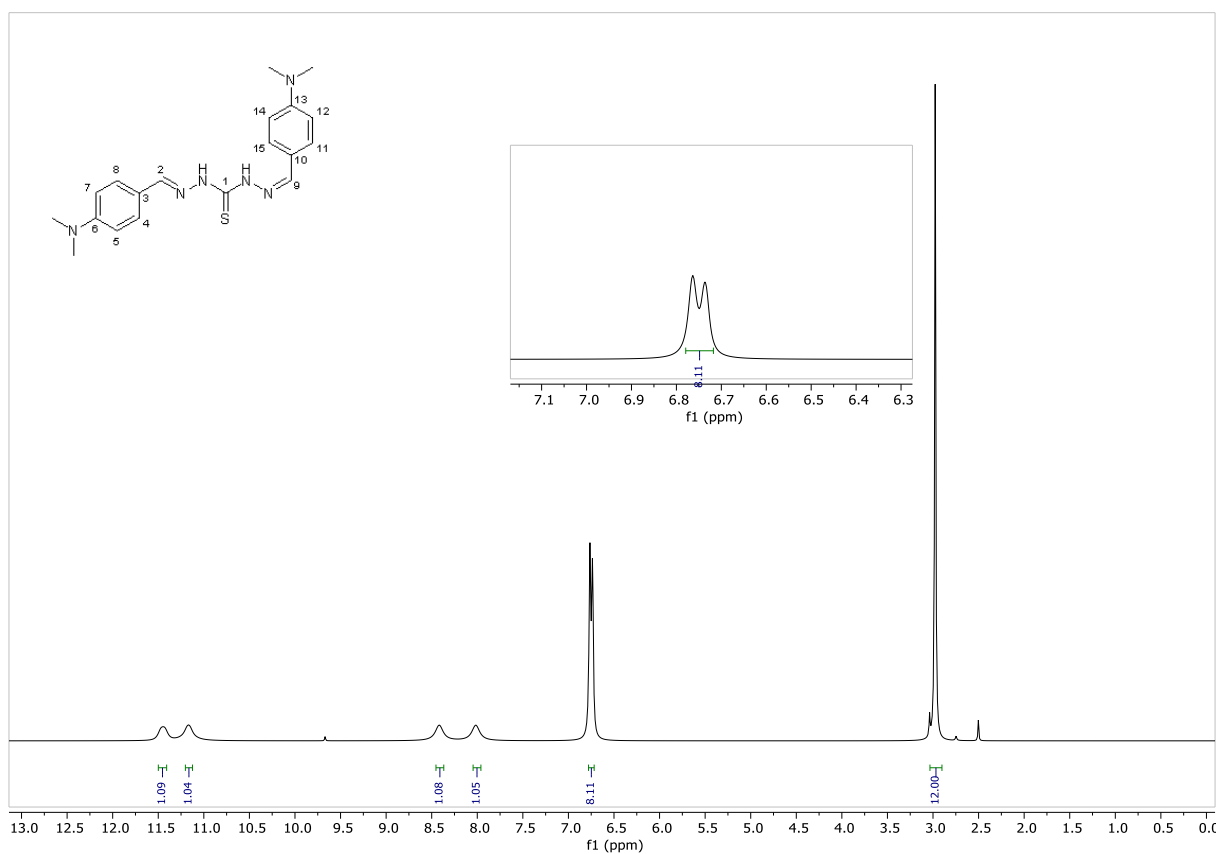
Figura 108: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B18**.**Figura 109:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B18**.

Figura 110: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B18**.

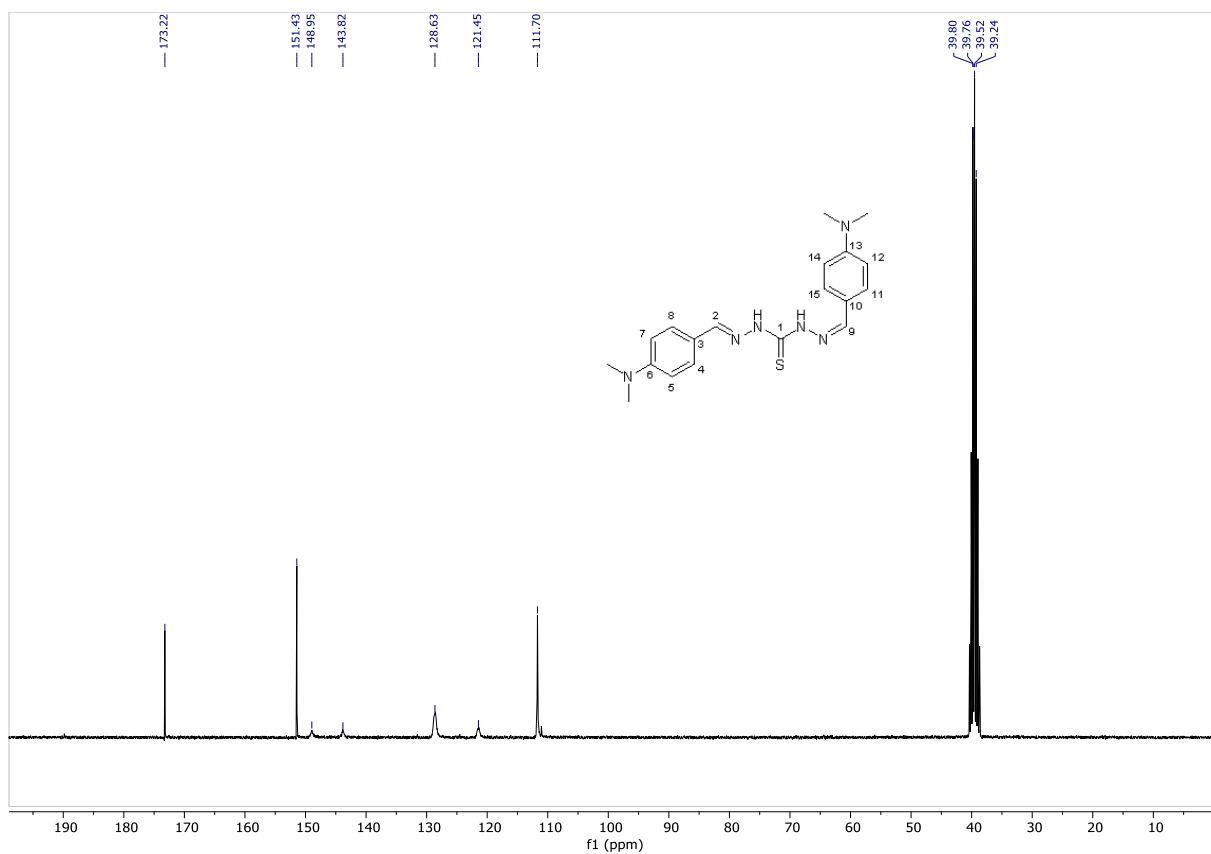


Figura 111: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B19**.

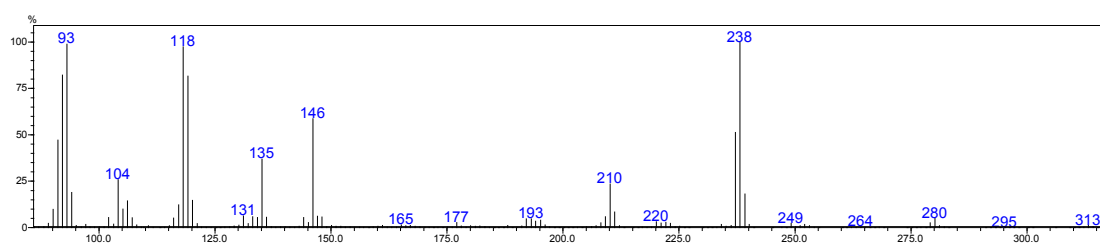


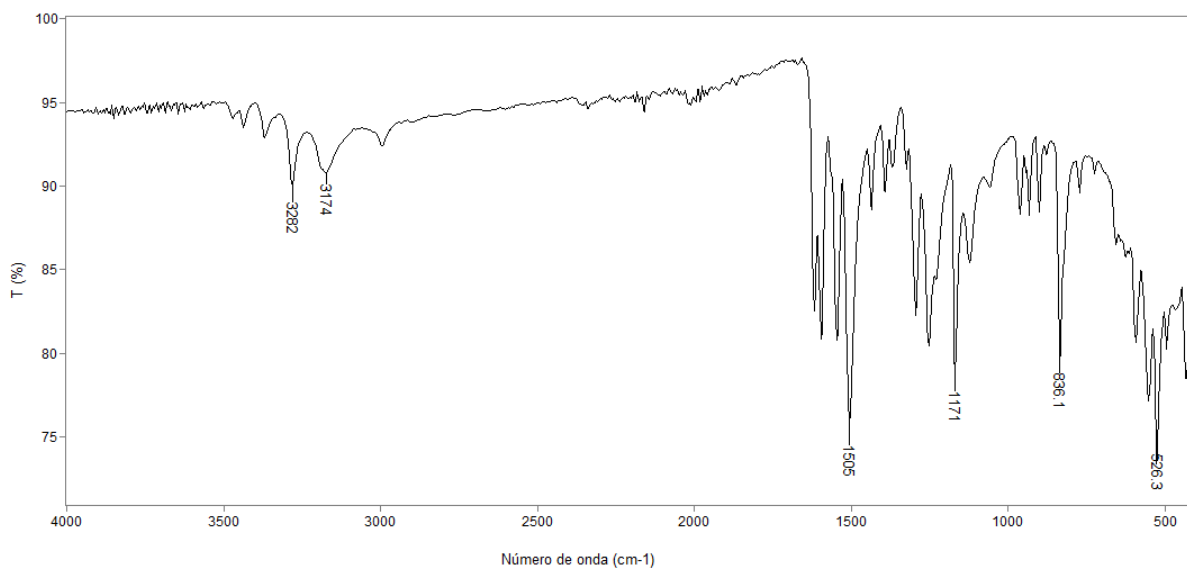
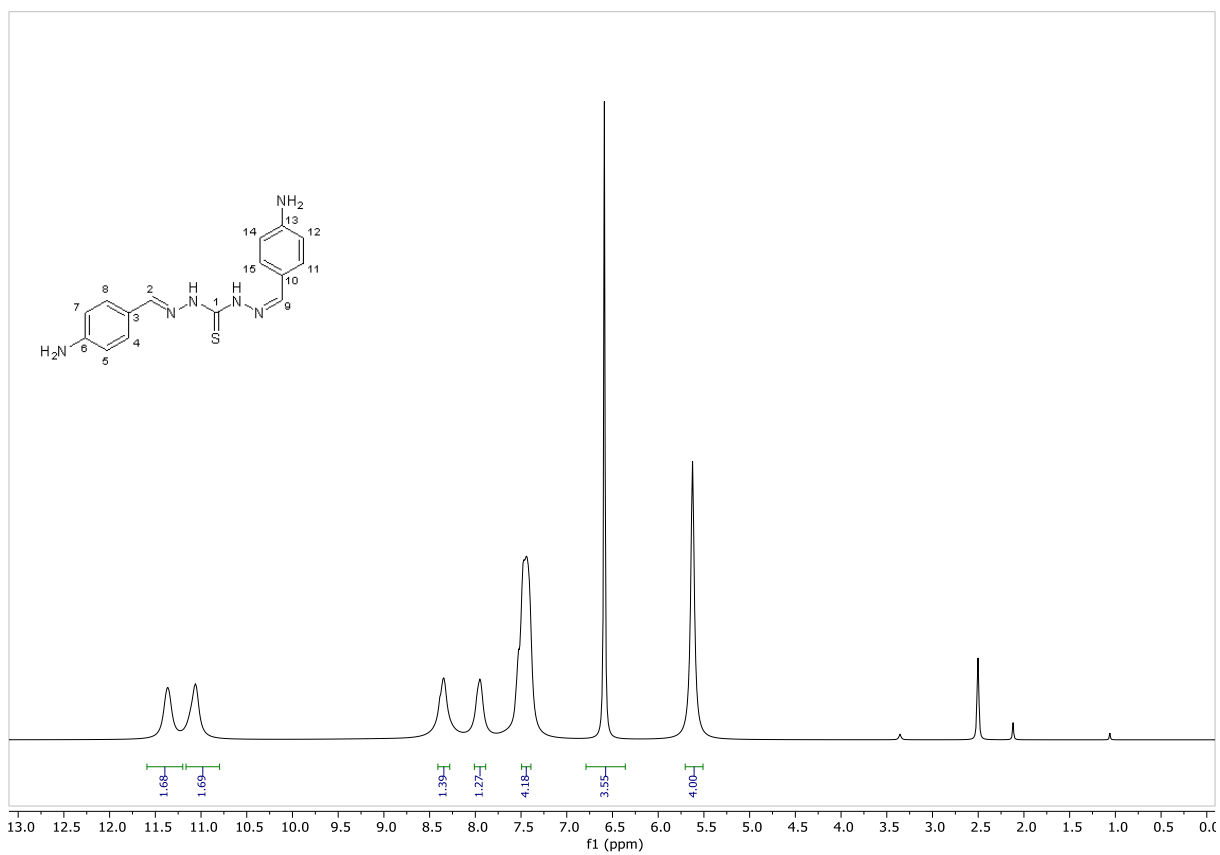
Figura 112: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B19**.**Figura 113:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B19**.

Figura 114: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B19**.

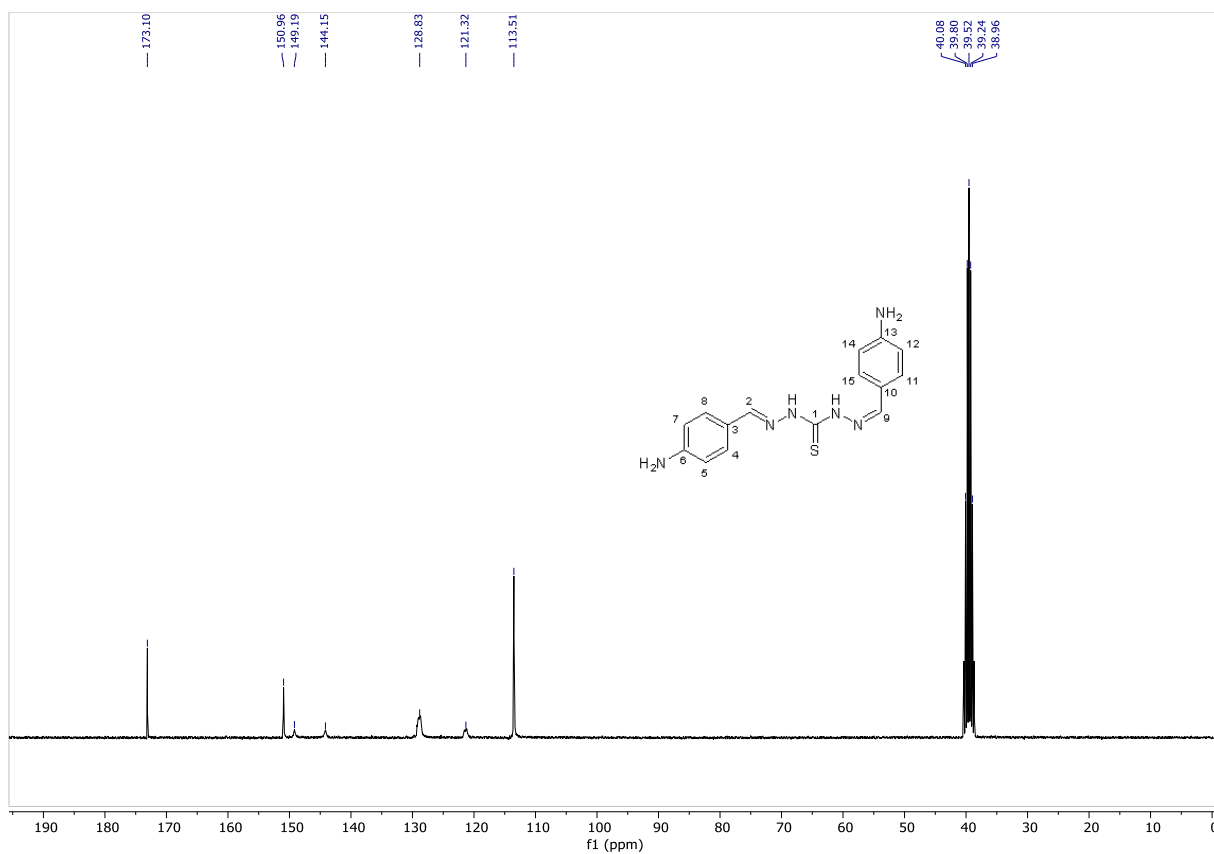


Figura 115: Espectro de massas (IE, 70 eV) da *bis*-tiocarbazona **B20**.

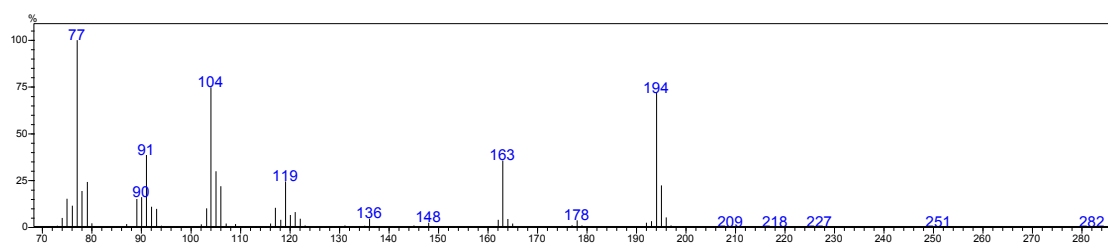


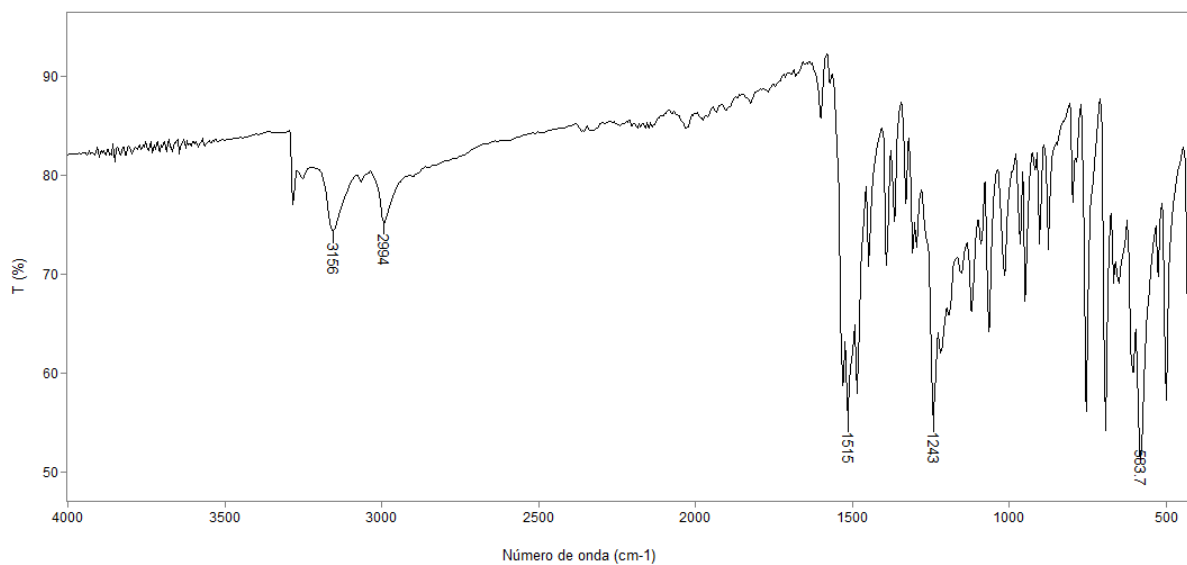
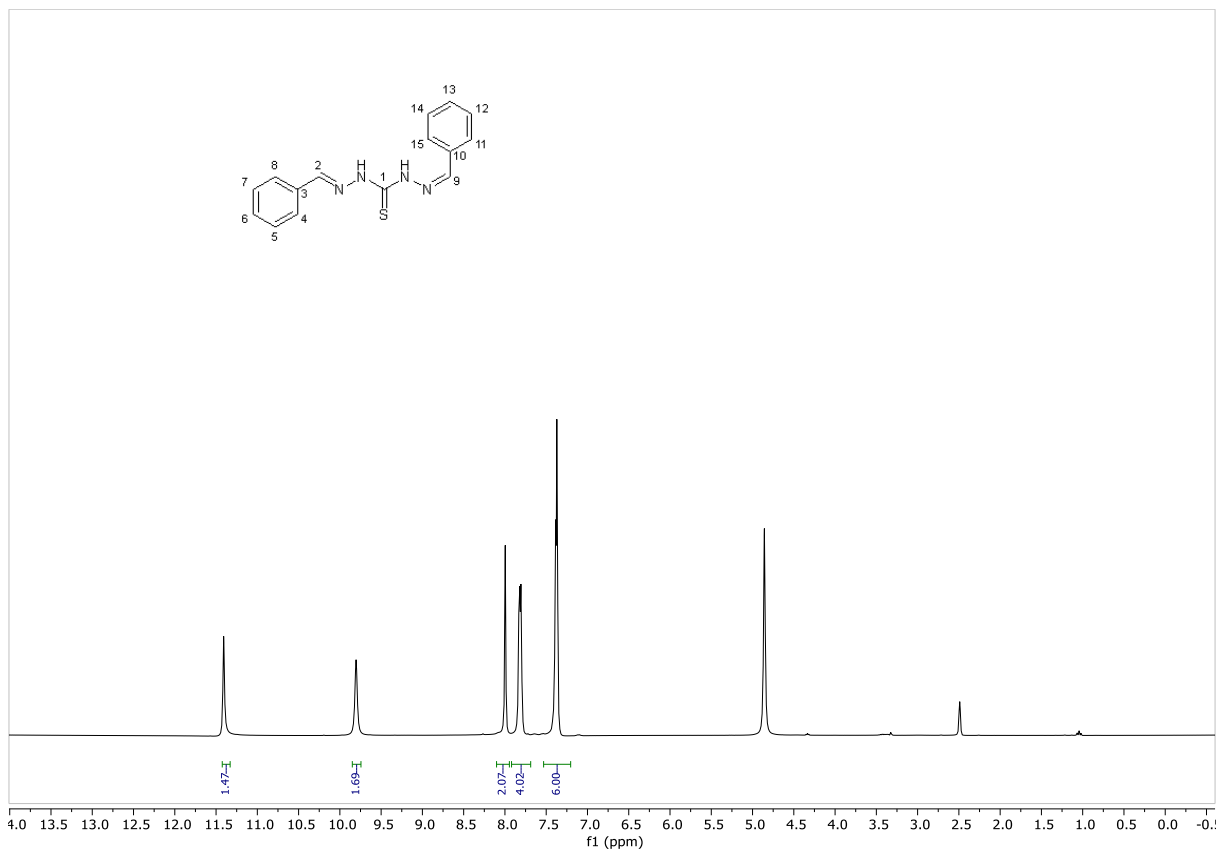
Figura 116: Espectro no IV (reflectância) da tiocarbazona **B20**.**Figura 117:** Espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 2,49) da *bis*-tiocarbazona **B20**.

Figura 118: Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δ_{DMSO} 39,5) da *bis*-tiocarbazona **B20**.

