

Sara Eulália Coelho

**Investigação Mecanística da Reação de *O*-Despropargilação  
Catalisada por Sais de Paládio (II)**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Química  
Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa  
Domingos

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coelho, Sara Eulália  
Investigação mecanística da reação de O  
despropargilação catalisada por sais de paládio (II)  
/ Sara Eulália Coelho ; orientador, Josiel Barbosa  
Domingos, 2019.  
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

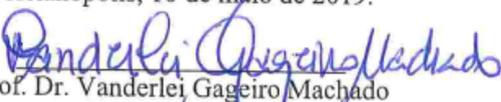
1. Química. 2. Catálise bio-ortogonal. . 3. O  
despropargilação. . 4. Sais de paládio (II). . I.  
Domingos, Josiel Barbosa. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Química. III. Título.

Sara Eulália Coelho

**Investigação Mecânica da Reação de *O*-Despropargilação  
Catalisada por Sais de Paládio (II)**

Esta Dissertação/Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

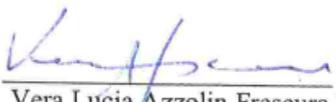
Florianópolis, 10 de maio de 2019.

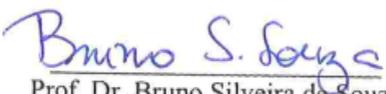
  
Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos  
Orientador  
UFSC

  
Prof. Dr. Adriano L. Monteiro  
UFRGS

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lucia Azzolin Frescura Bascuñan  
UFSC

  
Prof. Dr. Bruno Silveira de Souza  
UFSC

Aos meus avós.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos dias que eu sei que caminha ao meu lado e pelos tantos outros que eu sinto que me carrega no colo.

Aos meus familiares, que sempre apoiaram e torceram pelas minhas decisões. Foi vocês, tem sido vocês e vai continuar sendo vocês.

Ao professor Dr. Josiel Barbosa Domingos, seus familiares, vizinhos e amigos. Obrigada pelo que você me fez sentir e por ter me feito descobrir que eu era e sou muito mais do que eu pensava. Obrigada por ter sido meu aconchego e por ser essa lembrança bonita.

Aos colegas de Laboratório.

Aos amigos de longa data e aqueles conquistados durante essa caminhada. Ainda bem que eu sempre tenho vocês.

Aos meus alunos das E.E.B. Jacinto Machado, Catulo da Paixão Cearense e Normélio Cunha, obrigada por me ensinarem muitas coisas, nada muito sensacional, coisas simples... pequenas alegrias.

Aos colaboradores Daniela, Felipe e Guilherme.

Ao Departamento de Química da UFSC, aos professores que colaboraram para o meu crescimento, e ao CNPq pela bolsa concedida durante este tempo.



“If an experiment agree with a theory it means for  
the latter “Maybe”, and if it does not agree it  
means “No”.  
(Albert Einstein, 1922)



## RESUMO

O presente trabalho aborda o estudo detalhado da clivagem da ligação C-O na reação de despropargilação do composto pró-fármaco éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (2,4-DNPPE) mediada pela adição de sais simples de Pd(II) ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) em água a pH 7,41. O trabalho compreende uma combinação de estudos de reatividade através de métodos cinéticos, espectroscopia de absorção de raios X, espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*, cálculos de estrutura eletrônica e experimentos de envenenamento. A conversão completa do substrato propargílico ocorre através de uma cinética bifásica com diferentes velocidades, onde a fase de reação mais rápida envolve uma hidratação anti-Markonikov da porção propargila assistida pelo Pd(II), seguida pela quebra da ligação C-O através de uma  $\beta$ -O eliminação com duração de apenas dois *turnovers* devido à inibição do catalisador. A fase de reação mais lenta envolve a hidrólise do substrato promovida por espécies de Pd(0) formadas durante a primeira fase da reação.

**Palavras-chave:** Catálise bio-ortogonal. *O*-despropargilação. Sais de paládio (II)



## ABSTRACT

The present work broaches the detailed studies of the C-O bond cleavage in the depropargylation reaction of the prodrug compound 2,4-dinitrophenyl propargyl ether (2,4-DNPPE) triggered by the addition of simple Pd(II) salts ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) in water at pH 7,41. The work involves a combination of reactivity studies using kinetic methods, X-ray absorption spectroscopy, high-resolution electrospray ionization mass spectrometry, theoretical calculations and poisoning experiments. The full propargylic substrate conversion occurs through biphasic kinetics of different rates, where the fastest reaction phase involves a Pd(II) anti-Markonikov hydration of the propargyl moiety, followed by the C-O bond breaking through a  $\beta$ -O elimination and lasts only for two turnovers due to product inhibition. The second slower reaction phase involves the hydrolysis of the substrate promoted by Pd(0) species formed during the first phase of the reaction.

**Keywords:** Bioorthogonal catalysis. *O*-depropargylation. Palladium (II) salts.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplos de reações bio-ortogonais de desproteção catalisadas por paládio. .... 28
- Figura 2 – Representação esquemática da reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE na liberação de uma molécula de 2,4-DNP promovida pelos sais de Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. .... 29
- Figura 3- Três exemplos de transformações seletivas de dois grupos: (a) labilidade modulada, (b) transformação ortogonal sequencial e (c) transformações simultâneas. Grupos funcionais A e B podem estar em duas moléculas separadas.<sup>25</sup> ..... 30
- Figura 4 - Estratégia utilizada pela química bio-ortogonal. Um grupo químico funcional ligado ao substrato é introduzido em uma biomolécula através do metabolismo celular. Numa segunda etapa, o grupo funcional se liga covalentemente a uma sonda exógena. Tanto o substrato com o grupo funcional quanto a sonda exógena, não podem reagir com as biomoléculas não marcadas.<sup>33</sup>..... 32
- Figura 5– Sintonização do grupo funcional para uma melhoria na reatividade bio-ortogonal. (a) Estratégias de ativação do grupo funcional para uma ligação bio-ortogonal eficiente. (b) Exemplos de estratégias usadas para ativar alcinos para uma reação covalente com azidas orgânicas. Sob condições ambientes, nenhuma reação entre o grupo funcional é observada. Alcinos ativados via tensão no anel ou por catálise metálica sofrem rápida cicloadição com azidas.<sup>33</sup>..... 33
- Figura 6 – Visão geral da química extracelular e intracelular mediada por paládio. Exemplos de (a) marcação extracelular, (b) marcação intracelular, (c) ativação intracelular de fármacos e (d) ativação extracelular de fármacos.<sup>5</sup> ..... 35
- Figura 7 – Esquema das reações de acoplamento carbono-carbono mediadas por paládio em células vivas de bactérias gram-negativas. (a) O acoplamento de Suzuki foi conduzido em pIPhe contido na proteína OmpC na membrana celular simplificada de *E. coli*. (b) O acoplamento de Sonogashira foi conduzido no HPG da ubiquitina funcionalizada dentro de células de *E. coli*. (c) O acoplamento de Sonogashira foi empregado dentro de células de *Shigella* incorporado a proteína OspF.<sup>31</sup> ..... 39
- Figura 8 - Os grupos de proteção fotolábeis permitem um controle espaço/temporal sobre a ativação de um substrato protegido. Enquanto estratégias de fotodesproteção contam com uma fonte de luz e um operador, reações de ativação mediadas por catalisadores

organometálicos podem ser desencadeadas por processos biológicos ou independentes do estímulo de luz externa. <sup>2</sup> .....	41
Figura 9 – (a) Estrutura do catalisador fluorescente de Pd com o peptídeo cíclico. (b) Representação esquemática da ativação e síntese intracelular dos fármacos mediadas por Pd(0). (c) Mudanças na viabilidade celular após o tratamento das células de câncer de mama com os compostos 5-7 e cRGDFE-PdNP. <sup>37</sup> .....	48
Figura 10 – (a) Estrutura dos catalisadores híbridos Pd-peptídeo. (b) Representação esquemática da ativação intracelular do pró-fluoróforo mediada por Pd(II). (c) Imagem de microscopia confocal de células PC-3 incubadas com 10 e 12 (azul: núcleo celular, rosa: Pd-peptídeo 10 e verde: 13 sintetizado <i>in situ</i> ). <sup>62</sup> .....	49
Figura 11 – Mecanismo proposto para a clivagem dos grupos <i>N</i> - e <i>O</i> -propargila catalisada por Pd(0). <sup>6,12</sup> .....	55
Figura 12 – Mecanismo proposto para a clivagem do grupo <i>O</i> -propargila catalisada por Pd(0). <sup>10</sup> .....	56
Figura 13 – Mecanismo proposto para a reação de <i>O</i> -despropargilação catalisada por espécies de Pd(0), Pd(II) e Pd(IV). <sup>71</sup> .	56
Figura 14 – Rota sintética para a obtenção do substrato éter aril propargílico. ....	67
Figura 15 - Espectro na região do IV registrado em pastilha de KBr para o éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico. ....	68
Figura 16 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H na região de 0,0 a 9,0 ppm, obtido para o éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico em CDCl <sub>3</sub> . ....	69
Figura 17 – Representação esquemática do substrato modelo sintetizado para os estudos deste trabalho com numeração para os átomos de hidrogênio utilizados nas atribuições de RMN de H <sup>1</sup> . ....	72
Figura 18 – (a) Representação esquemática da reação de <i>O</i> -despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE na liberação de uma molécula de 2,4-DNP promovida pelos sais de Pd(II) (Pd(OAc) <sub>2</sub> , PdCl <sub>2</sub> e Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> ). (b) Variação espectral de UV-vis da mistura reacional de 0,106 mmol.L <sup>-1</sup> de 2,4-DNPPE com 0,0106 mmol L <sup>-1</sup> de Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> , em H <sub>2</sub> O (5% DMSO), pH 7,41 a 48 °C. ....	73
Figura 19 – (a) Perfil cinético da formação do produto a 400 nm. (b) Linearização dos dados cinéticos experimentais normalizados para a reação de despropargilação do 2,4-DNPPE. ....	75
Figura 20 - Gráfico de <i>k</i> <sub>obs</sub> para a reação de 0,106 mmol L <sup>-1</sup> de 2,4-DNPPE com (quadrado e círculo) e sem (triângulo) 0,0106 mmol L <sup>-1</sup> de (a) Pd(OAc) <sub>2</sub> , (b) PdCl <sub>2</sub> e (c) Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> em meio aquoso de tampão c (tampão) = 0,01 mol L <sup>-1</sup> (5% DMSO) a 48 °C. ....	76

- Figura 21 – Perfis cinéticos para a reação de 0,106 mmol L<sup>-1</sup> de 2,4-DNPPE com e sem 0,0106 mmol L<sup>-1</sup> de (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH 7,41 e 48 °C. .... 79
- Figura 22 – Números de *Turnoveres* (TON) *versus* concentração de Pd(II) para a reação de 0,106 mmol L<sup>-1</sup> de 2,4-DNPPE, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH 7,41 e 48 °C. .... 81
- Figura 23 – Perfis cinéticos para a reação de 0,106 mmol L<sup>-1</sup> de 2,4-DNPPE com adições sequenciais de 0,0106 mmol L<sup>-1</sup> de (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH 7,41 e 48 °C.. 82
- Figura 24 - RPKA de estabilidade do catalisador durante a conversão do 2,4-DNPPE. Condições: experiência 1: c (2,4DNPPE)<sub>0</sub> = 0,2 mmol L<sup>-1</sup>, c (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>)<sub>0</sub> = 0,05 mmol L<sup>-1</sup> e experiência 2: c (2,4DNPPE)<sub>0</sub> = 0,175 mmol L<sup>-1</sup>, c (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>)<sub>0</sub> = 0,05 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,41 a 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO). .... 85
- Figura 25 – Dependência da velocidade de reação com a concentração do substrato 2,4-DNPPE para Rx1 e Rx2 promovida por (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições: c (Pd(II)) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,050 a 0,850 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 89
- Figura 26 – Transformada de Fourier do espectro de EXAFS para (a) padrão comercial sólido de Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>; (b) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO) (pH 7,4) após 3 h a 48 °C e padrões teóricos de PdO e folha de Pd(0)..... 93
- Figura 27 - Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> com a adição de CS<sub>2</sub> a 10 e 120 minutos de reação e a reação sem aditivo para comparação. Condições: c (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; c (CS<sub>2</sub>) = 0,0604 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 a 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 95
- Figura 28 – ESI(-)-HRMS do meio reacional após 10 min de reação. O íon de *m/z* 212,8 (b) foi detectado em menor abundância comparado ao íon do produto 2,4-DNP, assim a região amplificada do espectro está apresentada. Condições: c (2,4-DNPPE) = 2,12 mmol L<sup>-1</sup>, c (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 20 mol%, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C. .. 96

Figura 29 – ESI(-)-HRMS do meio reacional após 10 min de reação. Os íons de  $m/z$  434,8 (a) e  $m/z$  416,9 foram detectados em menores abundâncias comparados ao íon do produto 2,4-DNP, assim as regiões amplificadas do espectro estão apresentadas. Condições:  $c$  (2,4-DNPPE) = 2,12 mmol L<sup>-1</sup>,  $c$  (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 20 mol%, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C)..... 97

Figura 30 - ESI(-)-HRMS do meio reacional após 10 min de reação. O íon de  $m/z$  638,9 foi detectado em menor abundância comparados ao íon do produto 2,4-DNP, assim a região amplificada do espectro está apresentada. Condições:  $c$  (2,4-DNPPE) = 2,12 mmol L<sup>-1</sup>,  $c$  (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 20 mol%, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C).. 98

Figura 31 – ESI(-)-MS/MS do íon **3** de  $m/z$  638. .... 99

Figura 32 – Reações induzidas por CID em fase gasosa para o intermediário **3** de  $m/z$  638..... 100

Figura 33 – Perfil energético (kcal mol<sup>-1</sup>) calculado para a reação catalisada por [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> em água..... 102

Figura 34 - Caminhos propostos para Rx1 na reação de despropargilação do substrato 2,4-DNPPE mediada por sais de Pd(II). ..... 103

Figura 35 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> com a adição de álcool propargílico e a reação sem aditivo para comparação. Condições:  $c$  (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 0,025 mmol L<sup>-1</sup>;  $c$  (2,4-DNPPE) = 0,175 mmol L<sup>-1</sup>;  $c$  (C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>OH) = 0,050 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 a 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO). ..... 104

Figura 36 – Micrografias eletrônica de transmissão e histogramas de distribuição de tamanho do precipitado formado na reação de despropargilação do 2,4-DNPPE promovida por (a) Pd(OAc)<sub>2</sub> (diâmetro médio = 5,05 (1,94) nm), (b) PdCl<sub>2</sub> (diâmetro médio = 10,43 (4,32) nm) e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (diâmetro médio = 4,65 (1,88) nm). Condições:  $c$  (Pd(II)) = 0,212 mmol L<sup>-1</sup>;  $c$  (2,4-DNPPE) = 2,12 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 105

Figura 37 – Espectros de XAS do precipitado formado na reação de despropargilação do 2,4-DNPPE promovida por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. (a) região do XANES dos padrões da folha Pd(0), Pd(II) na forma de PdO e a amostra; (b) região do EXAFS; espectro, ajuste experimental e trajetórias teóricas Pd-O (proveniente do PdO), Pd-Pd (proveniente da folha de Pd e Pd-Pd (proveniente do PdO)). Condições:  $c$  (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 0,350 mmol L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 3,50 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO). . 107

Figura 38 – Espalhamento de luz dinâmico após 5 minutos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. A razão hidrodinâmica (R<sub>H</sub>) e a porcentagem da população estão inseridas. Condições: c (Pd(II)) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO). . 109

Figura 39 – Perfis cinéticos da reação da despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada pelos sais (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> com adição de Hg(0) (213%) e CS<sub>2</sub> (57% mol) a 120 min de reação. Condições: c (Pd(II)) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 111

Figura 40 - Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> e Pd(0)-NPs (preparadas pela redução de Pd(OAc)<sub>2</sub> com NaBH<sub>4</sub> na presença de PVP). Condições: c (Pd) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 a 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 113

Figura 41 – Linearização de primeira-ordem dos dados cinéticos experimentais para a reação do 2,4-DNPPE com (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições: c (Pd(II)) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 129

Figura 42 - Perfil cinético da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> com a adição de 40 mol% de 2,4-DNP a 10 minutos de reação e a reação sem aditivo para comparação. Condições: c (Pd(II)) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,148 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5 e 50% DMSO)..... 131

Figura 43 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> com a adição de 1-hidroxi-2-propanona a 10 minutos de reação e a reação sem aditivo para comparação. Condições: c (Pd(II)) = 0,0106 mmol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; c (1-hidroxi-2-propanona) = 0.0424 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO)..... 133

Figura 44 - Dependência da velocidade de reação para a clivagem da ligação C-O do 2,4-DNPPE com a concentração dos catalisadores e razão das velocidades iniciais de Rx1 e Rx2. (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e

(c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições:  $c(\text{Pd(II)}) = 0,021 \times 10^{-4}$  a  $1,27 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$  (5% DMSO).. 135

Figura 45 - Efeito da concentração do tampão fosfato de sódio e potássio nas  $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$  para a reação de 0,106 mmol  $\text{L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com 0,0106 mmol  $\text{L}^{-1}$  de (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5,00 \times 10^{-3}$  a  $1,50 \times 10^{-1}$  mol  $\text{L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e 48 °C. .... 137

Figura 46 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com diferentes quantidades do co-solvente DMSO e a reação espontânea para comparação. Condições:  $c(\text{Pd(II)}) = 0,0106$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$  (5 e 50% DMSO)..... 139

Figura 47 – Linearização de primeira-ordem dos dados cinéticos experimentais do efeito isotópico de solvente para a reação do 2,4-DNPPE com (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições:  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ; 10 mol% de Pd(II) ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso ( $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{D}_2\text{O}$ ) de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$  (5% DMSO). .... 141

Figura 48 - Linearização dos gráficos de  $\ln k$  versus  $1000/T$  da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições:  $c(\text{Pd(II)}) = 0,0106$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 44, 48 e 52 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$  (5% DMSO).. 143

Figura 49 – Espectros de ESI-HRMS calculados para as espécies de Pd apresentadas nas Figura 26b, Figura 27 e Figura 28 ..... 145

Figura 50 – Espectros experimental (a) e calculado (b) de ESI-HRMS da espécie iônica de Pd com  $m/z$  473, da análise do precipitado formado após 35 min de reação. Condições:  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 2,12$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 20$  mol%, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01$  mol  $\text{L}^{-1}$  (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C. . 147

Figura 51 – Caminhos mecanísticos calculados para o primeiro turnover da reação Rx1 a partir da hidratação regioquímica anti-Markovnikov do complexo Pd-propargil, incluindo barreiras de energia e diferenças de energia livre para as reações. .... 149

Figura 52 - Caminhos mecanísticos calculados para o primeiro turnover da reação Rx1 a partir da hidratação regioquímica Markovnikov do complexo Pd-propargil, incluindo barreiras de energia e diferenças de energia livre para as reações. .... 149

Figura 53 – Caminho mecanístico calculado para o segundo *turnover*, assim que o segundo substrato se coordena ao complexo de paládio **E**, incluindo barreiras de energia e diferenças de energia livre para as reações. .... 150

Figura 54 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do material bruto da reação de *O*-despropargilação do 2,4-DNPPE mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  liofilizado e dissolvido em DMSO- $d_6$ . Condições:  $c$  (2,4-DNPPE) = 3,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $c$  (catalisador) = 10% molar; em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C, após 47 h de reação..... 151

Figura 55 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por diferentes quantidades de (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$ , (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  e a reação não catalisada para comparação. Condições:  $c$  (2,4-DNPPE) = 0,106  $\text{mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  (5% DMSO). .. 153

Figura 56 - Espalhamento de luz dinâmico em diferentes tempos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . A razão hidrodinâmica ( $R_H$ ) e a porcentagem da população estão inseridas. Condições:  $c$  ( $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) = 0,0106  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $c$  (2,4-DNPPE) = 0,106  $\text{mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  (5% DMSO)..... 155



## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1 – Representação esquemática da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura para a marcação da proteína SBL com  $^{18}\text{F}$  utilizando  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  e os ligantes L1 – 2-amino-4,6-dihidroxipiridina (ADHP), L2 – 2-dimetilamino-4,6-dihidroxipiridina (DMADHP), L3 – dimetilguanidina (DMG) e L4 – tetrametilguanidina (TMG).<sup>17</sup>..... 36
- Esquema 2 – Representação esquemática da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura intracelular catalisado por  $\text{Pd}(0)$  de um derivado de triflato de fluoresceína e arilboronato contendo um grupo trifenilfosfônio. O acoplamento leva a um produto fluorescente e o direcionamento para a mitocôndria.<sup>17,37</sup> ..... 37
- Esquema 3 – Representação esquemática da síntese intracelular do agente anticâncer PP-121 mediada por nanopartículas de  $\text{Pd}(0)$  suportadas em material polimérico modular.<sup>48</sup> ..... 40
- Esquema 4 – (a) Representação esquemática da detecção de espécies de paládio (II) em sistemas vivos pela sonda **1**. (b) Peixe zebra de 5 dias incubado com a sonda **1** (20 mM) e  $\text{PdCl}_2$  (20 mM) (esquerda: imagem de contraste de fase, direita: imagem microscópica de fluorescência).<sup>53</sup> ..... 42
- Esquema 5 – (a) Representação esquemática do mecanismo de reconhecimento de espécies de paládio (II) pela sonda **3**. (b) Imagens de fluorescência confocal de células de macrófagos RAW 264.7 (esquerda: incubadas com **3**, direita: incubadas com **3** e  $\text{PdCl}_2$ ).<sup>55</sup> ..... 43
- Esquema 6 – (a) Representação esquemática do mecanismo de detecção de paládio por Cy-1 através da reação específica de Tsuji-Trost catalisada por paládio. (b) Imagens de fluorescência confocal de células HeLa (encima: incubadas com o quimiosensor Cy-1 e abaixo: incubadas com Cy-1 e paládio).<sup>57</sup> ..... 44
- Esquema 7 – Representação esquemática da desproteção intracelular catalisada por  $\text{Pd}(0)$  do reagente **1** (bis-N,N'-aliloxicarbonil rodamina 110) gerando o composto fluorescente **2** (rodamina 110).<sup>1</sup>.. 45
- Esquema 8 – Reações de desproteção extracelular de aminas protegidas com grupos propargílico (1 e 4), e propargilcarbamato (2), e de fenól protegido com grupo propargílico (5) em meios de cultura celular cancerígenas, catalisadas por microesferas de  $\text{Pd}(0)$ .<sup>59</sup> ..... 47
- Esquema 9 – Representação esquemática da reação de despropargilação mediada por PdNPs em células vivas. a) Neu5proc é utilizado como um análogo do Neu5Ac para geração *in situ* do ácido neuramínico a partir da reação de eliminação catalisada por paládio. b) Neu5Proc são incorporados metabolicamente na superfície celular através

da sialilação dos carboidratos terminais dos glicoconjugados. Com a adição do catalisador de paládio, o grupo Proc é eliminado para formar o Neu *in situ*.<sup>63</sup> ..... 50

Esquema 10– Representação esquemática da despropargilação do Neu5Proc mediada por paládio para a manipulação das cargas na superfície das células e agregação celular. a) A conversão *in situ* do Neu5Proc em Neu por paládio gera aminas livres em C5 e assim alteram a carga da superfície celular causando agregação celular.<sup>63</sup> ..... 51

Esquema 11 – (a) Ativação de proteínas dentro da célula; (b) desproteção química de análogos da lisina protegidos por grupos carbamatos alílico ou propargílico catalisada por diferentes sais de paládio e (c) representação esquemática da ativação da enzima bacteriana OspF catalisada por Pd.<sup>12,17</sup> ..... 52

Esquema 12 - Mecanismos propostos para a reação de despropargilação na presença de  $(PPh_3)_2PdCl_2$ .<sup>69</sup> ..... 53

Esquema 13 - Mecanismo proposto para a reação de despropargilação catalisada por Pd/C.<sup>70</sup> ..... 54

Esquema 14 – Esquema para os mecanismos, sugeridos na literatura, para a reação de despropargilação mediada por Pd(0) (via i) e Pd(II/IV) (via ii). ..... 57

Esquema 15 - Representação esquemática do envenenamento do catalisador pelo  $CS_2$ .<sup>101</sup> ..... 94

Esquema 16 – Representação esquemática proposta para a inibição do catalisador pelo produto. .... 104

Esquema 17 – Proposta mecanística da reação de quebra da ligação C-O do substrato 2,4-DNPPE em  $H_2O$  catalisada pelos sais de paládio (II) ( $Pd(OAc)_2$ ,  $PdCl_2$  e  $Na_2PdCl_4$ ). ..... 114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuição para as principais bandas de absorção na região do IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) registradas para o substrato éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico. ....	71
Tabela 2 - Atribuições dos sinais registrados por espectrometria de RMN de $^1\text{H}$ para o substrato 2,4-DNPPE em $\text{CDCl}_3$ . ....	72
Tabela 3 - Constantes de velocidade de primeira-ordem ( $k_{obs1}$ e $k_{obs2}$ ) para a reação de $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ de 2,4-DNPPE com $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , $\text{PdCl}_2$ e $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato c ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (5% DMSO), pH 7,41 e $48 \text{ }^\circ\text{C}$ . ...	80
Tabela 4 – Efeito da concentração do tampão fosfato de potássio nas $k_{obs1}$ e $k_{obs2}$ para a reação de $0,106 \text{ mmol.L}^{-1}$ de 2,4-DNPPE com $0,0106 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , $\text{PdCl}_2$ e $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato c ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = $5,00 \times 10^{-3}$ a $1,50 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ (5% DMSO), pH 7,41 e $48 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	87
Tabela 5 - Efeito isotópico de solvente ( $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ) para a reação de clivagem da ligação C-O do 2,4-DNPPE pelos sais de paládio (II). ....	88
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos para a reação de clivagem da ligação C-O do 2,4-DNPPE pelos sais de paládio (II). ....	91
Tabela 7 – Parâmetros Termodinâmicos de Arrhenius obtidos da linearização dos gráficos de $\ln k$ versus $1000/T$ (Figura 48 - APÊNDICE H). ....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $^{18}\text{F}$  - radioisótopo de flúor  
2,4-DNP - 2,4-dinitrofenol  
2,4-DNPPE – éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico  
5-FU - 5-fluorouracila  
ADHP - 2-amino-4,6-dihidroxi-pirimidina  
Alloc - aliloxicarbonil  
BFA - ácido borônico funcionalizado com fluoresceína  
BOOM - *Bioorthogonal Organometallic Reactions*  
 $\text{Bu}_3\text{SnH}$  - hidreto de tributilestanho  
c - concentração  
CCD - Cromatografia em Camada Delgada  
CuAAC - ciclo adição azida-alcino catalisada por cobre (I)  
Cy5 e CyK - *Cyanine dye*  
d - duplete  
dba - dibenzilidenoacetona  
dd - duplo duplete  
DLS - *Dynamic Light Scattering*  
DMADHP - 2-dimetilamino-4,6-dihidroxipiridina  
DMF - *N, N*-dimetilformamida  
DMG - dimetilguanidina  
E. coli - *Escherichia coli*  
ESI-CID-MS/MS - *Electron Spray Ionization Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry*  
ESI-HRMS - *High Resolution Electron Spray Ionization-Mass Spectrometry*  
 $\text{Et}_2\text{O}$  - éter dietílico  
 $\text{Et}_3\text{N}$  - trietilamina  
EtOH - etanol  
EXAFS - *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*  
f - fator catalítico  
FUdR - floxuridina  
GFP - *Green fluorescent protein*  
HeLa - Henrietta Lacks  
HPG - homopropargilglicina  
IV - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho  
k - constante de velocidade  
 $k_{\text{obs0}}$  - constante de velocidade de hidrólise da reação espontânea  
 $K_{\text{ass}}$  - constante de associação  
 $k_{\text{cat}}$  - constante de velocidade catalítica

$K_M$  - constante de Michaelis-Menten  
 $k_{obs}$  - constante de velocidade observada  
Lys - *Lysine*  
m - múltiplo  
MET - Microscopia de Transmissão Eletrônica  
Neu - ácido neurâmico  
Neu5Ac - ácido *N*-acetilneurâmico  
Neu5Proc - ácido *N*-propargiloxicarbonilneurâmico  
OmpC - membrana externa de proteína C  
OspF - superfície externa de proteína F  
PBS - *phosphate-buffered saline*  
Pd-Nps - nanopartículas de paládio  
pH - potencial hidrogeniônico  
pIPhe - p-iodofenilalanina  
pKa - constante de ionização ácida em escala logarítmica  
Poc ou Proc - propargiloxicarbonil  
Pro-5FU - 5-fluoro-1-propargiluracila  
Pro-FUDR - *N*-propargilfloxuridina  
RMN de  $^1\text{H}$  - ressonância magnética nuclear de Hidrogênio  
s - simples  
SmI<sub>2</sub> - iodeto de samário  
SPAAC - ciclo adição azida-alcino promovida por tensão  
Src - *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*  
t - triplo  
T3S - secreção toxina tipo III  
TMG - tetrametilguanidina  
TMS - tetrametilsilano  
UV - ultravioleta  
XANES - *X-ray Absorption Near Edge Structure*  
XAS - *X-ray Absorption Spectroscopy*  
 $\delta$  - deformação angular simétrica no plano  
 $\delta$  - deslocamento químico (RMN)  
v - estiramento axial simétrica ou assimétrica



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1	QUÍMICA BIO-ORTOGONAL .....	29
1.2	CATÁLISE METÁLICA BIO-ORTOGONAL.....	33
<b>1.2.1</b>	<b>Paládio na catálise bio-ortogonal</b> .....	<b>34</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Reações de acoplamento Carbono-Carbono</b> .....	<b>35</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Reações de desproteção</b> .....	<b>40</b>
1.2.3.1	Ativação de quimiosensores fluorescente .....	41
1.2.3.2	Ativação de pequenas moléculas e biomoléculas.....	44
<b>1.2.4</b>	<b>Mecanismos propostos para a reação de despropargilação catalisada por paládio</b> .....	<b>53</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	59
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>61</b>
3.1	MATERIAIS.....	61
3.2	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO .....	61
<b>3.2.1</b>	<b>Espectrofotometria no Infravermelho</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de <sup>1</sup>H</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Investigação Mecanística</b> .....	<b>62</b>
3.2.3.1	Estudos Cinéticos.....	62
3.2.3.2	Estudos das Espécies Envolvidas.....	62
3.2.3.2.1	<i>Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - RMN de <sup>1</sup>H</i> .....	62
3.2.3.2.2	<i>Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS)</i> 63	
3.2.3.2.3	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS</i> .....	64
3.2.3.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET</i> .....	64
3.2.3.2.5	<i>Espectroscopia de Absorção de Raios X - XAS</i> .....	65

3.2.3.2.6	Testes de Envenenamento dos Catalisadores .....	65
3.2.3.3	Métodos Computacionais .....	66
3.2.4	<b>Síntese do substrato 2,4-dinitrofenilpropargil éter (2,4-DNPPE) 66</b>	
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>71</b>
4.1	Síntese e Caracterização do substrato modelo 2,4-dinitrofenilpropargil éter (2,4-DNPPE) .....	71
4.1.1	Espectroscopia Vibracional no Infravermelho.....	71
4.1.2	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H 71	
4.2	Estudos Cinéticos.....	72
4.3	Estudos das Espécies Envolvidas.....	92
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
6	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>117</b>
7	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
8	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>129</b>
	APÊNDICE A – Linearização dos perfis cinéticos.....	129
	APÊNDICE B – Efeito da adição do 2,4-DNP.....	131
	APÊNDICE C – Efeito da adição de 1-hidroxi-2-propanona .....	133
	APÊNDICE D – Influência da concentração dos catalisadores de Pd(II).....	135
	APÊNDICE E – Influência da concentração do tampão fosfato de sódio e potássio .....	137
	APÊNDICE F – Influência da quantidade do co-solvente DMSO .....	139
	APÊNDICE G – Efeito isotópico do solvente .....	141
	APÊNDICE H – Influência da temperatura.....	143
	APÊNDICE I – Espectros de ESI-HRMS calculados ....	145
	APÊNDICE J – Caracterização por ESI-HRMS do precipitado formado na reação de <i>O</i> -despropargilação	147
	APÊNDICE K – Estudo computacional para diferentes caminhos propostos para o mecanismo de reação .....	149

<b>APÊNDICE L – Caracterização dos produtos de reação por RMN de <math>H^1</math>.....</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE M – Perfis cinéticos para diferentes quantidades dos catalisadores de Pd(II).....</b>	<b>153</b>
<b>APÊNDICE N – Espalhamento de luz dinâmico em diferentes tempos da reação de despropagação do 2,4-DNPPE catalisada por <math>Na_2PdCl_4</math>. ....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE O – Publicação .....</b>	<b>157</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Processos biológicos celulares são governados por uma infinidade de proteínas, naturalmente projetadas para realizar uma grande variedade de diferentes reações químicas.<sup>1</sup> Muitas dessas reações são catalisadas por metais de transição, tipicamente na forma de metaloproteínas, que modulam uma ampla variedade de transformações, de oxidações altamente seletivas à eficiente formação, lise ou isomerização de múltiplas ligações químicas.<sup>1,2</sup> Nesse contexto, muitos grupos de pesquisa se aproveitam dessas propriedades dos catalisadores biológicos (enzimas) em síntese, medicina, ciência dos materiais e pesquisa básica, e seu uso tem se estendido com sucesso dos sistemas biológicos aquosos para solventes orgânicos.<sup>1,3</sup>

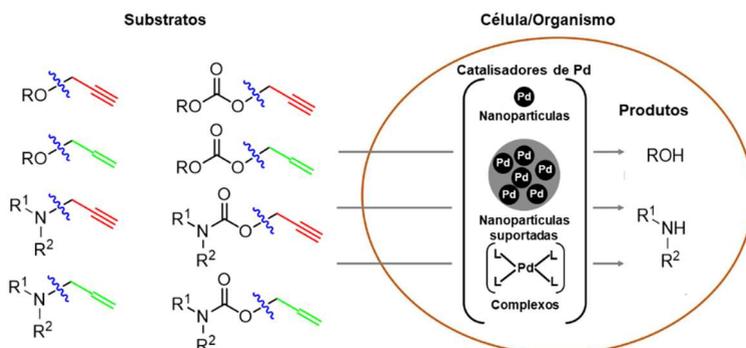
No entanto, o uso de metais de transição não-bióticos para mediar transformações quimiosseletivas em sistemas biológicos é uma adição recente ao campo da biologia química.<sup>3,4</sup> Esses processos biocompatíveis, são também conhecidos como reações organometálicas bio-ortogonais (BOOM).<sup>5,6</sup> A tradução de importantes processos bio-ortogonais estequiométricos em processos catalíticos dentro de organismos vivos destaca o potencial da química organometálica no campo da biologia química e da química medicinal, proporcionando novas oportunidades no desenvolvimento de métodos quimiosseletivos, sítio específicos e espacialmente resolvidos, para a manipulação estrutural e funcional de biomoléculas.<sup>3,7,8</sup>

Contudo, projetar um catalisador artificial que seja estável em uma solução de água, ar e na presença de uma infinidade de componentes celulares, tais como concentrações milimolares de tióis e, ao mesmo tempo, seja altamente reativo às condições fisiológicas (por exemplo, temperatura e pH) e em baixas concentrações celulares dos reagentes e seu substrato, é um desafio complexo.<sup>7</sup> Ainda assim, apesar desta complexidade de balancear a reatividade *versus* estabilidade destes catalisadores em ambientes biológicos, já é possível observar o progresso no campo da “catálise bio-ortogonal”. As reações de cicloadição [3+2], formação de ligações C-C, C-S, C-N e C-O, bem como reações de clivagem de ligações C-O e C-N em reações de “desproteção”, são exemplos da aplicação de reações mediadas por metais em sistemas biocompatíveis.<sup>2,8,9</sup>

Dentre estas reações, as reações bio-ortogonais de desproteção catalisadas por paládio surgiram recentemente como uma estratégia poderosa na ativação de pequenas moléculas e biomoléculas *in vitro* e *in vivo*, devido às suas propriedades catalíticas únicas.<sup>10</sup> Manipulação da

superfície celular<sup>11</sup>, ativação de proteínas<sup>10,12</sup>, pequenas sondas<sup>13</sup> e pró-fármacos<sup>2,6,14,15</sup>, fora ou dentro de células vivas, através da clivagem de ligações C-N e C-O de derivados propargílicos ou alílicos de anilinas, aminas, fenóis e álcoois, são exemplos das aplicações recentes das reações de desproteção mediadas por paládio (Figura 1).

Figura 1 – Exemplos de reações bio-ortogonais de desproteção catalisadas por paládio.



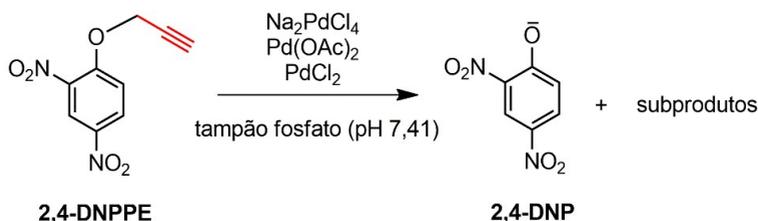
FONTE: A autora.

Embora a reação de *N*- e *O*-desalilação mediada por paládio encontra-se bem estabelecida através de um mecanismo  $\pi$ -alilpaládio, sendo paládio de valência zero a espécie ativa do catalisador,<sup>16</sup> o mecanismo da reação de *N*- e *O*-despropargilação mediada por Pd permanece incerto até o presente momento.<sup>17</sup> Ainda, a reação de despropargilação é relatada como sendo relativamente lenta, o que consequentemente leva a baixos rendimentos, exigindo altas doses de catalisador, um parâmetro de extrema importância ao se projetar um protocolo biortogonal, visto que envolve conceitos de solubilidade e toxicidade.<sup>18</sup> Assim, estudos mais detalhados e sistemáticos são necessários para avaliar a estabilidade de catalisadores de paládio em condições biocompatíveis, a natureza da espécie ativa e o entendimento do seu modo de ação em reações de *N*- e *O*-despropargilação.

Neste sentido, o presente trabalho se concentra no estudo mecanístico da reação de clivagem da ligação C-O do grupo hidroxila protegido por um grupo propargil, mediada por sais de Pd(II) (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub> e PdCl<sub>2</sub>), em condições biocompatíveis. O substrato utilizado neste estudo foi o composto éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (2,4-DNPPE), um pró-fármaco. O 2,4-DNPPE é um protonóforo protegido,

que se torna um desacoplador mitocondrial ativo após a remoção do grupo protetor propargílico, o 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) (Figura 2).<sup>19</sup> O 2,4-DNP é o agente farmacológico mais amplamente estudado e é um agente de desacoplamento consistentemente eficaz em modelos experimentais de condições neurodegenerativas.<sup>20-22</sup> Além disso, o 2,4-DNP é um análogo da tirosina, um resíduo catalítico presente em muitas enzimas e, conseqüentemente, um composto modelo para a bioconjugação de proteínas.<sup>10,23</sup>

Figura 2 – Representação esquemática da reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE na liberação de uma molécula de 2,4-DNP promovida pelos sais de Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>.



FONTE: A autora.

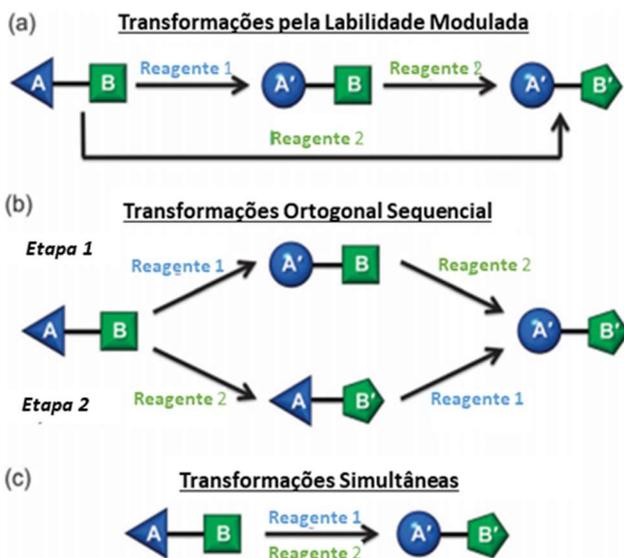
A seguir, será apresentado uma conceitualização sobre a química bio-ortogonal, e o estado da arte das estratégias organometálicas bio-ortogonais mediadas por paládio em sistemas biológicos, com particular ênfase nas reações de desproteção de grupos aminas e hidroxílicos dentro e fora das células, mediadas por catalisadores homogêneos e heterogêneos de paládio.

## 1.1 QUÍMICA BIO-ORTOGONAL

O termo "ortogonal" tem sido estabelecido por mais de 30 anos com o trabalho pioneiro de Barany e Merrifield na proteção de grupos aminos na síntese de peptídeos.<sup>24,25</sup> Merrifield reportou a expressão "ortogonalidade" como uma estratégia de remoção de grupos protetores. Era um conceito simples, mas muito poderoso visto que até aquele momento as estratégias empregadas na química dos grupos protetores eram baseadas apenas na labilidade gradual, e não nos mecanismos de clivagem de cada grupo, tornando assim impossível inverter a ordem das etapas de desproteção (Figura 3a).<sup>25,26</sup>

Uma vez que a ortogonalidade está relacionada com transformações controladas por mecanismos alternativos e não pela velocidade das reações (Figura 3b), o uso de um conjunto de reações ortogonais nos permite vislumbrar uma multi-funcionalização de várias etapas, porém de maneira simultânea, onde todos os reagentes são adicionados num único balão. Este tipo de transformação, ilustrado na Figura 3c, representa um exemplo mais robusto para o campo da ortogonalidade química, pois além dos reagentes serem seletivos para as suas respectivas funcionalidades eles não devem afetar um ao outro. Deste modo, conduzir todas as operações simultaneamente pode oferecer maior eficiência, com condições globais mais brandas, em tempos menores e com diminuição de resíduos reacionais.<sup>26</sup>

Figura 3- Três exemplos de transformações seletivas de dois grupos: (a) labilidade modulada, (b) transformação ortogonal sequencial e (c) transformações simultâneas. Grupos funcionais A e B podem estar em duas moléculas separadas.<sup>25</sup>



FONTE: Adaptada da referência 22.

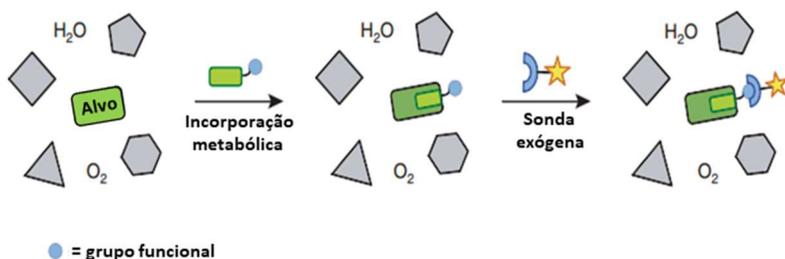
Estes sistemas ortogonais de transformações simultâneas já são possíveis e têm encontrado particular importância no estudo não invasivo de uma grande variedade de biomoléculas em seus ambientes nativos,

numa combinação da síntese orgânica com a biologia química, as chamadas “reações bio-ortogonais”.<sup>18,27</sup> Tais reações são transformações químicas realizadas por um material sintético biocompatível, que deve reagir rapidamente e seletivamente em condições fisiológicas, e ser inerte à multiplicidade de funcionalidades encontradas no meio celular.

Em comparação com a abordagem baseada em sondas geneticamente codificadas, como as proteínas fluorescentes, a química bio-ortogonal, baseada na ligação covalente específica, oferece muitos benefícios: (i) é aplicável a todas as classes de biomoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e polissacarídeo; (ii) é extremamente versátil com a escolha do material sintético biocompatível, limitada apenas pela imaginação do pesquisador; (iii) é altamente escalável, adequado para a manipulação funcional de biomoléculas específicas em células vivas, bem como uma classe de biomoléculas em um perfil funcional genômico amplo.<sup>28,29</sup> Devido estas características únicas, as reações bio-ortogonais têm sido exploradas com sucesso em processos que vão desde a marcação/ativação espaço temporal de proteínas em células vivas e manipulação direta de células intactas sob condições fisiológicas<sup>12,30-32</sup> a ativação de pequenas sondas<sup>13</sup> e pró-fármacos no espaço extra e intracelular.<sup>4,6,14</sup>

A aplicação da química bio-ortogonal *in vivo* envolve, tipicamente, duas etapas. Em primeiro lugar, um grupo químico funcional, que inclui hidroxilaminas, azidas, alcinos, alcenos, ou halogenetos, é incorporado a um substrato metabólico (por exemplo, um anticorpo) (Figura4, etapa 1). Uma vez que o grupo funcional atinge o seu alvo, uma biomolécula, a segunda etapa envolve uma reação altamente seletiva (bio-ortogonal) com uma sonda funcional exógena (Figura4, etapa 2). Na maioria dos casos, a sonda é equipada com um marcador visual ou agente de afinidade para facilitar a detecção direta ou isolamento da biomolécula alvo.<sup>5,27,33,34</sup> Ao passo que o substrato metabólico deve ser biocompatível, as exigências para o grupo funcional são mais rigorosas. Além de ser biocompatível, o grupo químico tem que ser estável ao ambiente celular por longos períodos de tempo e não deve interferir na atividade normal da biomolécula alvo.<sup>35</sup>

Figura 4 - Estratégia utilizada pela química bio-ortogonal. Um grupo químico funcional ligado ao substrato é introduzido em uma biomolécula através do metabolismo celular. Numa segunda etapa, o grupo funcional se liga covalentemente a uma sonda exógena. Tanto o substrato com o grupo funcional quanto a sonda exógena, não podem reagir com as biomoléculas não marcadas.<sup>33</sup>

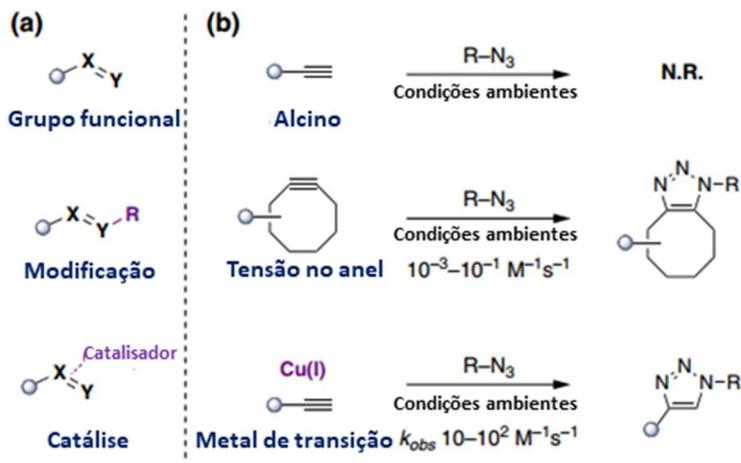


FONTE: Adaptada da referência 30.

Os grupos químicos funcionais utilizados na primeira etapa, normalmente estão associados a aminoácidos, muitas vezes não naturais, incorporados diretamente na biomolécula de interesse através de meios genéticos, bioquímicos ou químicos. Embora as abordagens tradicionais que envolvem conjugação nas cadeias laterais de aminoácidos naturais, por exemplo: cisteína ou lisina, também permitem a incorporação do grupo funcional adequado.<sup>33</sup>

Contudo, devido à natureza exclusiva do conceito bio-ortogonal, os métodos de ligação na segunda etapa tem se limitado as reações de ligação Staudinger (azida e fosfina), cicloadição azida-alcino promovida por tensão e as reações que envolvem ligação tetrazina.<sup>5,33</sup> No entanto, a utilização da simplicidade e do poder dos metais de transição para mediar estas transformações quimiosseletivas em células, têm se mostrado um verdadeiro desafio para a biologia química e a química medicinal, abrindo espaço para um novo campo denominado de “catálise metálica bio-ortogonal” (Figura 5).<sup>5,7,36</sup>

Figura 5– Sintonização do grupo funcional para uma melhoria na reatividade bio-ortogonal. (a) Estratégias de ativação do grupo funcional para uma ligação bio-ortogonal eficiente. (b) Exemplos de estratégias usadas para ativar alcinos para uma reação covalente com azidas orgânicas. Sob condições ambientais, nenhuma reação entre o grupo funcional é observada. Alcinos ativados via tensão no anel ou por catálise metálica sofrem rápida cicloadição com azidas.<sup>33</sup>



FONTE: Adaptada da referência 30.

## 1.2 CATÁLISE METÁLICA BIO-ORTOGONAL

A catálise metálica em água é um campo de pesquisa que ganhou força principalmente dentro do contexto da "química verde". Deste modo, nos últimos anos diversos trabalhos têm apresentado reações catalisadas por metais em água incluindo acoplamentos, isomerizações, ciclizações, cicloadições ou mesmo processos de hidrólise.<sup>17</sup>

Dado que o solvente dos sistemas vivos é a água, não é difícil imaginar que algumas dessas transformações possam ser alcançadas em meios biocompatíveis.<sup>37</sup> No entanto, a complexidade do meio biológico, devido à presença de uma alta concentração de componentes celulares, como tióis ou aminas, que podem envenenar ou degradar o catalisador metálico inibindo sua atividade catalítica, exigem uma elevada estabilidade do catalisador.<sup>7,17</sup> Ao mesmo tempo, as condições fisiológicas (por exemplo, temperatura e pH) e baixas concentrações celulares dos reagentes requerem uma elevada reatividade frente ao seu substrato. Além disso, nem o catalisador nem o substrato devem afetar intrinsecamente a homeostase bioquímica do receptor, por conseguinte,

se torna extremamente desafiador traduzir as reações catalisadas por metais para células vivas.<sup>37,38</sup>

Apesar dos desafios descritos acima, a capacidade de alcançar a catálise em sistemas biológicos oferece um grande potencial e tem atraído um interesse crescente de muitos grupos de pesquisa. Uma das principais aplicações é a capacidade de usar reações não naturais em sínteses sítio dirigidas de moléculas específicas dentro da célula. Por exemplo, um fármaco anticancerígeno só pode ser sintetizado em células cancerígenas se seus precursores e o catalisador dirigirem-se seletivamente para estas células. Assim, como uma molécula de catalisador atua repetidamente gerando muitas moléculas de fármaco, esta abordagem é muito mais eficiente que o uso de um grupo reativo ligado a pequenas moléculas bioativas para direcionar reações seletivas em um ambiente biológico complexo. Além disso, moléculas maiores são menos permeáveis às células; de modo que dirigir seus precursores para dentro da célula pode resolver o problema de absorção que impediu o desenvolvimento de muitos fármacos.<sup>37</sup>

Sem dúvida, uma das principais descobertas que trouxe um impacto significativo para o desenvolvimento da catálise metálica bio-ortogonal foi a reação de cicloadição azida-alcino catalisada por Cu(I) (CuAAC), desenvolvida de forma independente por Sharpless<sup>39</sup> e coautores e Meldal<sup>40</sup> e coautores em 2002. CuAAC representa uma reação “click” prototípica, e que tem sido amplamente adotada pela química sintética, ciências dos materiais, bem como pela indústria farmacêutica. No entanto, a citotoxicidade dos íons de Cu(I) impediram a utilização direta de CuAAC dentro de células vivas.<sup>9,31</sup> Para contornar este problema, outros metais de transição como rutênio, irídio, ferro ou paládio, têm sido explorados como fontes alternativas para promover reações biocompatíveis na superfície das células, bem como num ambiente intracelular.<sup>5,31</sup>

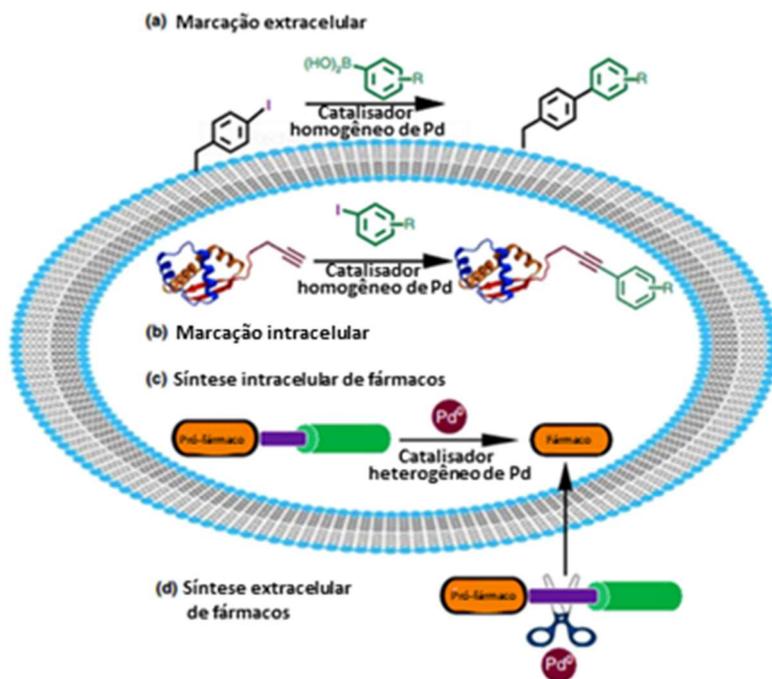
Estudos recentes têm destacado o progresso em potencial da química do paládio mediando reações bio-ortogonais em sistemas biológicos. Seguem abaixo alguns exemplos delineando como os catalisadores homogêneos e heterogêneos de Pd têm sido empregados em sistemas biomiméticos e, mais recentemente, em sistemas vivos.

### **1.2.1 Paládio na catálise bio-ortogonal**

O paládio tem se destacado no campo da biologia química devido as suas propriedades catalíticas ímpares e a sua inércia biológica, sendo que o paládio de valência zero (Pd(0)) apresenta o perfil de toxicidade

mais seguro entre todas as espécies de paládio.<sup>41</sup> Estas propriedades, que tornam o paládio um potencial metal exógeno, aliadas a diversidade de reações mediadas por paládio, que variam de novas reações de formação de ligação carbono-carbono a clivagem de ligações C-O e C-N, ilustram como os catalisadores de paládio tem sido utilizado para modificar várias biomoléculas e, mais recentemente, desempenhado transformações químicas dentro ou fora dos sistemas vivos (Figura 6).<sup>1,5,9,27,38,41,42</sup>

Figura 6 – Visão geral da química extracelular e intracelular mediada por paládio. Exemplos de (a) marcação extracelular, (b) marcação intracelular, (c) ativação intracelular de fármacos e (d) ativação extracelular de fármacos.<sup>5</sup>



FONTE: Adaptada da referência 5.

## 1.2.2 Reações de acoplamento Carbono-Carbono

Os primeiros exemplos de sucesso do paládio mediando reações de acoplamento carbono-carbono em sistemas biocompatíveis foram os trabalhos de Davis e coautores<sup>43,44</sup>. Primeiro, os autores demonstraram que

utilizando o sal de paládio (II),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , em combinação com o ligante 2-amino-4,6-dihidroxipiridina, comumente utilizados em reações de acoplamento Sonogashira em solventes orgânicos, é possível obter-se com sucesso o acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura em proteínas contendo 4-iodobenzil cisteína, em tampões biológicos. Posteriormente, os autores exploraram a mesma reação de acoplamento porém utilizando  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  em combinação com os ligantes L1-L4 (Esquema 1) para a marcação da proteína bacteriana SBL, geneticamente modificada com a 4-iodofenilalanina, por meio de moléculas de ácido fenilborônico marcadas com  $^{18}\text{F}$ .<sup>8,17</sup>

Esquema 1 – Representação esquemática da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura para a marcação da proteína SBL com  $^{18}\text{F}$  utilizando  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  e os ligantes L1 – 2-amino-4,6-dihidroxipiridina (ADHP), L2 – 2-dimetilamino-4,6-dihidroxipiridina (DMADHP), L3 – dimetilguanidina (DMG) e L4 – tetrametilguanidina (TMG).<sup>17</sup>

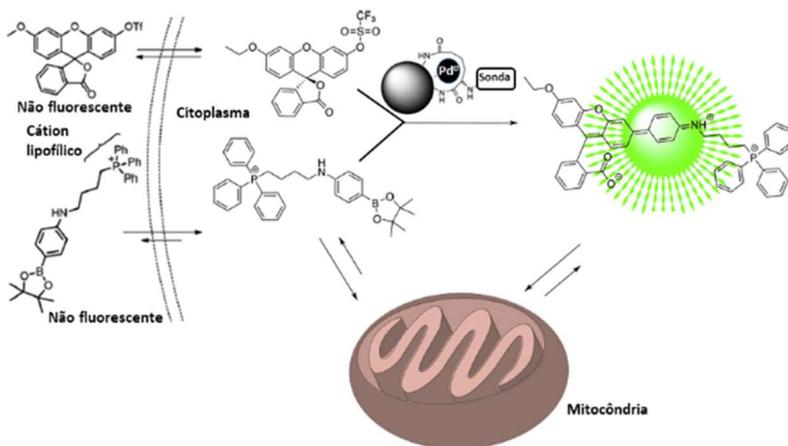


FONTE: Adaptado da referência 17.

Em 2011, Bradley e coautores<sup>1</sup>, utilizaram-se da natureza biocompatível das transformações conseguidas por Davis para alcançar a primeira reação de acoplamento Suzuki-Miyaura catalisada por metal em sistemas vivos. Os autores incubaram células HeLa por 24 h com nanopartículas de paládio de 5 nm suportadas em microesferas de poliestireno amino funcionalizadas. Após lavagem, as células foram incubadas com 20 mM de um derivado de triflato de fluoresceína não fluorescente e um arilboronato contendo um grupo trifenilfosfônio durante 48 h (Esquema 2). A reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura entre os dois substratos exógenos levou à abertura do anel lactona,

ativando a fluorescência, enquanto o grupo trifenilfosfônio o direcionou as mitocôndrias.

Esquema 2 – Representação esquemática da reação de acoplamento Suzuki-Myiaura intracelular catalisado por Pd(0) de um derivado de triflato de fluoresceína e arilboronato contendo um grupo trifenilfosfônio. O acoplamento leva a um produto fluorescente e o direcionamento para a mitocôndria.<sup>17,37</sup>



FONTE: Adaptado das referências 17 e 34.

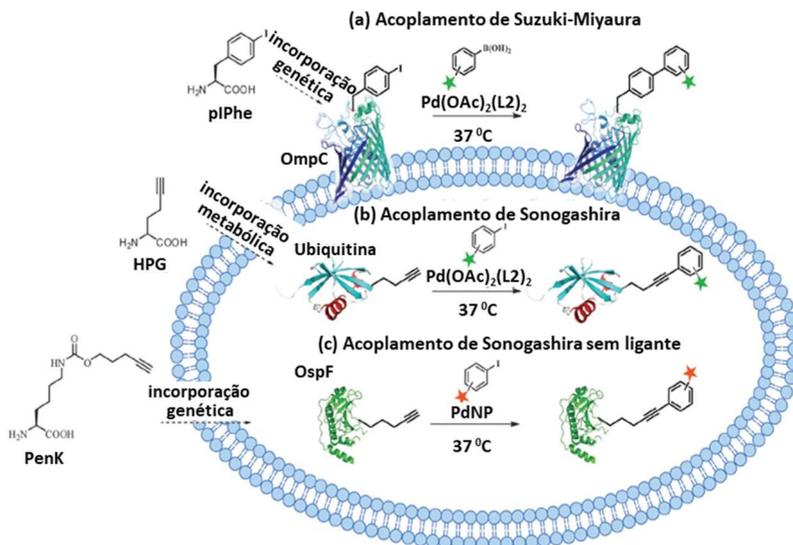
No mesmo ano, Lin e coautores, utilizando o catalisador de paládio  $\text{Pd}(\text{OAc})_2(\text{ADHP})_2$ , relataram um acoplamento do tipo Sonogashira sem cobre em células bacterianas (Figura 7b), *Escherichia coli*, geneticamente modificada para sobre-expressar a proteína de ubiquitina.<sup>45</sup> O tratamento de tais células geneticamente manipuladas com iodofluoresceína (100 mM) e o catalisador de paládio (II) (1 mM) na presença de 5 mM de ascorbato de sódio em tampão fosfato de sódio, seguido de crescimento a 37 °C por 4 h, resultou em células verdes fluorescentes. A lise das células e o processamento permitiu o isolamento da proteína ubiquitina fluorescente, que os autores afirmam ser resultado do acoplamento cruzado entre o alcino terminal presente na proteína e a iodofluoresceína dentro das células de *Escherichia coli*. Contudo, este estudo baseou-se no uso de um excesso de catalisador, necessário devido ao seu sequestro inespecífico por proteínas celulares, ou seja, a labilidade das ligações coordenadas ao paládio, combinada com a afinidade do paládio pela grande quantidade de grupos tióis (nucleófilos macios) no meio,

evidencia um dos principais desafios inerentes ao uso da catálise mediada por paládio de forma eficiente em sistemas biológicos.<sup>5,31,38,46</sup>

Um pouco depois, Spicer e coautores aplicaram a reação de acoplamento Suzuki-Miyaura mediada por Pd para marcar a proteína OmpC presente na superfície celular de *Escherichia coli* (Figura 7a).<sup>47</sup> Em seu trabalho, a proteína OmpC foi modificada pela incorporação da 4-iodo-fenilalanina (pIPhe) através da estratégia de expansão do código genético, que permitiu a modificação de um local específico de uma dada proteína, em vez de todas as proteínas celulares por incorporação metabólica. A reação subsequente com BAF (ácido borônico funcionalizado com fluoresceína) (1,6 mM) e o catalisador de paládio, solúvel em água e livre de fosfina, Pd(OAc)<sub>2</sub>(ADHP)<sub>2</sub> (0,35 mM), durante 1 h à 37 °C em pH 8, levou a obtenção de células de *Escherichia coli* azuis fluorescentes, por marcação covalente de OmpC com o fluoróforo. O catalisador de Pd foi demonstrado ser eficaz em concentrações para as quais não foi observada nenhuma toxicidade celular significativa sob as condições de reação.<sup>5,27,31,38,46</sup>

Atraídos pela compatibilidade e aplicações das espécies de paládio em células de bactérias, Chen e coautores descreveram a marcação sítio-específica de proteínas mediadas por paládio livre de ligantes dentro de bactérias gram-negativas (Figura 7c). Neste estudo, o sal Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foi utilizado como fonte de paládio, um reagente simples, eficiente e biocompatível, e ascorbato de sódio como agente redutor na formação de PdNPs, para a marcação fluorescente de proteínas-alvo através de uma reação de acoplamento tipo Sonogashira sem cobre. Novamente, dois aminoácidos não-naturais, pirrolisina modificada com 4-pentililoxycarbonil ou 4-iodobenziloxycarbonil, foram codificados sob a forma de proteínas de interesse dentro de *Escherichia coli*. Os análogos dos aminoácidos não-naturais codificados foram aplicados para identificar e visualizar a toxina OspF Tipo-III (T3S) em células de *Shigella*, pela marcação da proteína intracelular com fluoróforo funcionalizado. A eficiência da marcação da proteína, mediada por nanopartículas de paládio, foi comparável à reação de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC), obtendo-se > 90% de rendimento da marcação durante 1 h.<sup>5,27,31,38</sup>

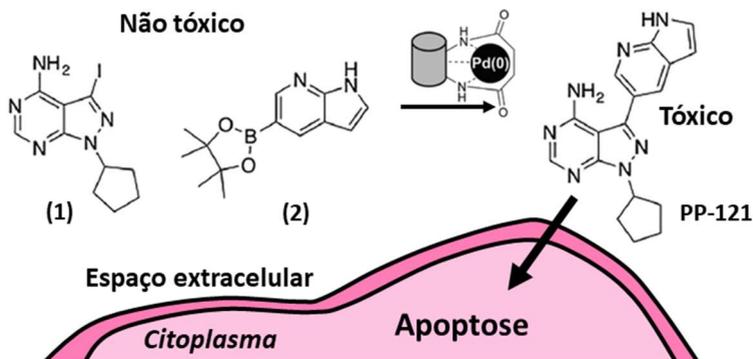
Figura 7 – Esquema das reações de acoplamento carbono-carbono mediadas por paládio em células vivas de bactérias gram-negativas. (a) O acoplamento de Suzuki foi conduzido em pIPhe contido na proteína OmpC na membrana celular simplificada de *E. coli*. (b) O acoplamento de Sonogashira foi conduzido no HPG da ubiquitina funcionalizada dentro de células de *E. coli*. (c) O acoplamento de Sonogashira foi empregado dentro de células de *Shigella* incorporado a proteína OspF.<sup>31</sup>



FONTE: Adaptada de referência 28.

Mais recentemente, Bradley e coautores estenderam o escopo das reações de acoplamento C-C catalisadas por paládio para a síntese *in situ* de fármacos.<sup>48</sup> Os autores demonstraram através de um acoplamento Suzuki-Miyaura a síntese do agente anticâncer PP-121 (Esquema 3). A reação foi realizada em meio extracelular de células PC-3 incubando 2 mM do iodopirazol (1) e 10 mM do éster borônico (2) com 0,5 mmol de nanopartículas de paládio ( $9,2 \pm 1,5$  nm) suportadas em material polimérico modular (9,9 X 7,5 mm) por 5 dias, em cultura celular. A viabilidade celular diminuiu em 50% sob estas condições.

Esquema 3 – Representação esquemática da síntese intracelular do agente anticâncer PP-121 mediada por nanopartículas de Pd(0) suportadas em material polimérico modular.<sup>48</sup>



FONTE: Adaptado da referência 45.

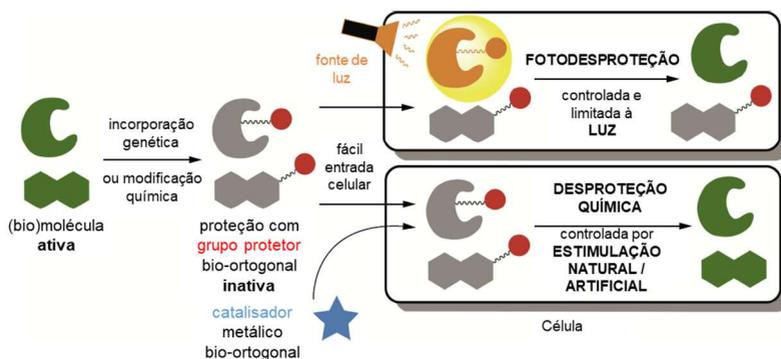
Embora uma variedade de reações bio-ortogonais mediadas por paládio tenham sido desenvolvidas e provadas serem ferramentas poderosas, elas têm sido aplicadas principalmente em reações de acoplamento, ou seja, formação de ligações. Para reações de clivagem de ligações, como as reações de desproteção de grupos funcionais, o método preferencial tem sido a utilização de luz. Por exemplo, ativação de uma enzima ou uma molécula pequena, tal como uma toxina, a partir de um precursor não funcional pelo uso de grupos protetores fotolábeis.<sup>2,49</sup>

### 1.2.3 Reações de desproteção

Os grupos de proteção fotolábeis têm sido amplamente utilizados em estratégias de ativação de substratos protegidos dentro de células. Como mostrado na Figura 8, a conjugação de um composto biologicamente ativo com um grupo de proteção pode resultar na perda de função.<sup>2</sup> Em contraste com as estratégias gerais de proteção utilizadas na síntese orgânica, os grupos fotolábeis podem ser removidos sob condições celulares para restaurar a funcionalidade inicial do composto protegido. Embora amplamente adotada, esta estratégia de fotodesproteção tem desvantagens devido à fototoxicidade da luz UV e a sua baixa capacidade de penetração em tecidos ou amostras animais, assim como a sítio-ativação e o tempo de exposição depender do operador da fonte de luz.<sup>12,30,31,49</sup> Por estas razões, um método de ativação no qual, em vez de luz, compostos químicos são utilizados como ativadores serve

como abordagem alternativa e, por vezes, vantajosa para ativar compostos biológicos, especialmente para aplicações que necessitam serem realizadas de maneira sintonizável, sustentável e minimamente invasiva.<sup>49</sup>

Figura 8 - Os grupos de proteção fotolábeis permitem um controle espaço/temporal sobre a ativação de um substrato protegido. Enquanto estratégias de fotodesproteção contam com uma fonte de luz e um operador, reações de ativação mediadas por catalisadores organometálicos podem ser desencadeadas por processos biológicos ou independentes do estímulo de luz externa.<sup>2</sup>



FONTE: Adaptada da referência 2.

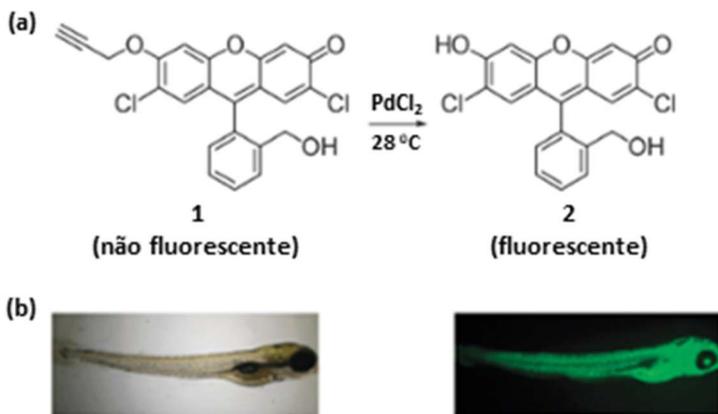
Deste modo, com o desejo de controlar quimicamente o processo de clivagem de ligações em sistemas vivos, avanços recentes em reações bio-ortogonais mediadas por paládio têm mostrado que tais catalisadores apresentam potencial, como elementos desencadeantes de reações de ativação.<sup>6,12,31</sup> Os primeiros exemplos da aplicação de paládio mediando reações de clivagem de ligação em organismos vivos, foram relatados em trabalhos de monitoramento do acúmulo de espécies de paládio através da ativação de quimiosensores fluorescentes.<sup>50,51</sup>

### 1.2.3.1 Ativação de quimiosensores fluorescente

A primeira sonda fluorescente baseado em fluoresceína capaz de monitorar espécies de paládio (II) em sistemas vivos foi reportada por Ahn e coautores em 2010.<sup>52</sup> Os compostos de fluoresceína não apresentam fluorescência quando o grupo hidróxi fenólico encontra-se alquilado porém se apresenta verde fluorescente quando o grupo hidróxi está livre (Esquema 4a), assim, utilizou-se o derivado propargílico da

fluoresceína como sonda para o monitoramento de espécies de paládio em peixes zebra (Esquema 4b), a temperatura ambiente, através da reação de clivagem da ligação C-O catalisada por PdCl<sub>2</sub>.<sup>37,53</sup>

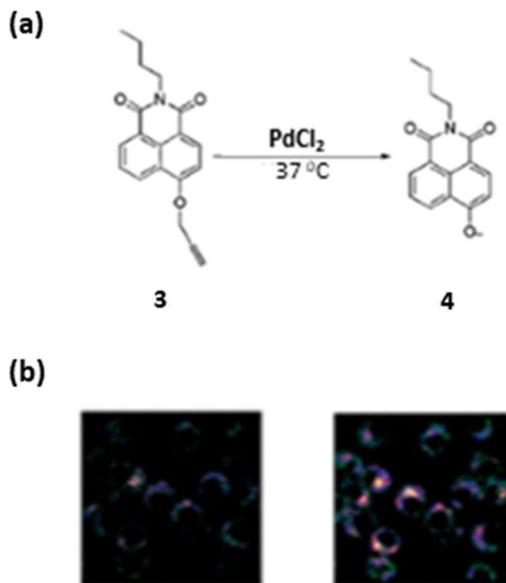
Esquema 4 – (a) Representação esquemática da detecção de espécies de paládio (II) em sistemas vivos pela sonda **1**. (b) Peixe zebra de 5 dias incubado com a sonda **1** (20 mM) e PdCl<sub>2</sub> (20 mM) (esquerda: imagem de contraste de fase, direita: imagem microscópica de fluorescência).<sup>53</sup>



FONTE: Adaptada de referência 50.

Em 2011, Du e Zhang e coautores projetaram e sintetizaram um quimiodosímetro ratiométrico fluorescente altamente seletivo, a partir da 4-hidroxi-naftalimida, para monitorar espécies de paládio em células vivas.<sup>54</sup> O sistema desenvolvido pelos autores também foi baseado na reação de *O*-despropargilação catalisada por paládio para o reconhecimento das espécies de paládio (Esquema 5a). As células de macrófagos RAW 264.7 foram incubadas com o quimiodosímetro **3** (5 mM) e após 15 min a fluorescência intrínseca do quimiodosímetro pode ser observada, resultado este que possibilitou aos autores afirmarem que **3** é capaz de penetrar a membrana celular. Então, 40 mM de PdCl<sub>2</sub> foram adicionados às células e após 10 min, como esperado, mudanças de fluorescência foram observadas, ou seja, o fluoróforo foi ativado na presença de paládio (Esquema 5b).<sup>37,55</sup>

Esquema 5 – (a) Representação esquemática do mecanismo de reconhecimento de espécies de paládio (II) pela sonda **3**. (b) Imagens de fluorescência confocal de células de macrófagos RAW 264.7 (esquerda: incubadas com **3**, direita: incubadas com **3** e PdCl<sub>2</sub>).<sup>55</sup>

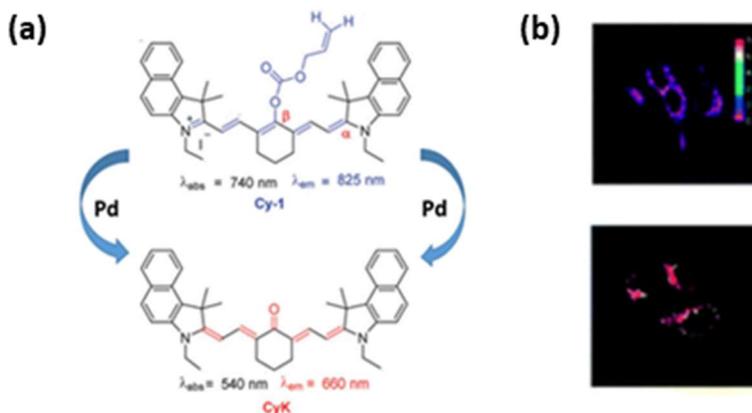


FONTE: Adaptado de referência 48.

Além do mecanismo de ativação de fluorescência, algumas sondas metálicas têm sido projetadas para sofrerem mudanças no comprimento de onda de fluorescência quando o grupo de proteção é removido pela catálise metálica. Como exemplo, podemos citar o sensor ratiométrico e calorimétrico de paládio reportado por Guo e Zhu em 2014.<sup>56</sup> A sonda foi construída através da alilação do átomo de oxigênio meso presente na cianina CyK, os autores utilizaram esta estratégia como uma forma de modular o sistema de conjugação de elétrons  $\pi$  presente entre os nitrogênios da molécula e assim alterar tanto o comprimento de onda de absorção, quanto o de emissão do sensor (Esquema 6a). Na presença de espécies de paládio, o sensor Cy-1 sofre a remoção do grupo de proteção pela reação específica de Tsuji-Trost catalisada por paládio e conseqüentemente os comprimentos de onda de absorção e emissão são restaurados. Neste trabalho os autores utilizaram células HeLa para

demonstrar a habilidade da sonda Cy-1 no monitoramento de espécies de paládio em sistemas vivos (Esquema 6b).<sup>37,57</sup>

Esquema 6 – (a) Representação esquemática do mecanismo de detecção de paládio por Cy-1 através da reação específica de Tsuji-Trost catalisada por paládio. (b) Imagens de fluorescência confocal de células HeLa (encima: incubadas com o quimiossensor Cy-1 e abaixo: incubadas com Cy-1 e paládio).<sup>57</sup>



FONTE: Adaptado da referência 54.

Contudo, a aplicação das reações de desproteção catalisadas por paládio não se limita à ativação de fluorescência na detecção de espécies de paládio em sistemas vivos. Ao se remover um grupo de proteção, a atividade biológica de uma molécula pode ser significativamente alterada. Como resultado, catalisadores de paládio capazes de mediar eficientemente as reações de clivagem de ligações C-O e C-N de derivados propargílicos ou alílicos de anilinas, aminas, fenóis e álcoois têm sido convenientemente utilizados na ativação ou modulação de pequenas moléculas e biomoléculas *in vitro* e *in vivo*.

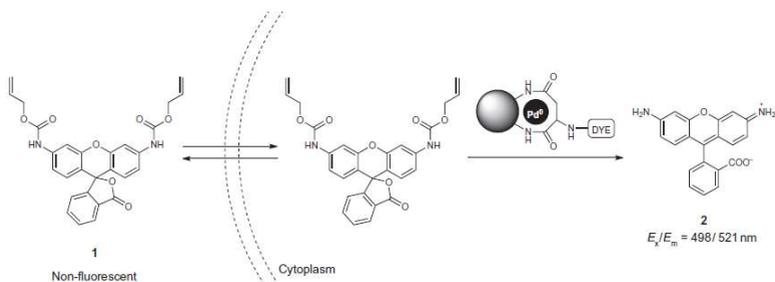
### 1.2.3.2 Ativação de pequenas moléculas e biomoléculas

Em 2011, Bradley e coautores<sup>1,58</sup> relataram o primeiro catalisador heterogêneo baseado em Pd(0) com a capacidade de atravessar membranas celulares, permanecendo dentro do citoplasma por dias sem causar danos, e mediar a reação de clivagem da ligação C-N. Isto foi conseguido através da aplicação de duas tecnologias, em primeiro lugar,

foi utilizado microesferas (500 nm), as quais já tinham sido aplicadas em marcação celular e distribuição intracelular de biomateriais, mostrando notável biocompatibilidade celular e localização exonuclear.

A segunda tecnologia envolveu a aplicação de nanopartículas de paládio suportadas numa resina de poliestireno por ligações cruzadas, as quais apresentaram atividade catalítica heterogênea. A atividade catalítica intracelular das microesferas de Pd(0) foi investigada dentro de células vivas através da reação de desproteção da bis-*N,N'*-aliloxicarbonil rodamina 110 (Esquema 7), utilizando células HeLa como sistema modelo. O método de clivagem da ligação C-N também foi aplicado em um estudo preliminar de citotoxicidade de um derivado de amsacrina (um agente antineoplásico disponível comercialmente) protegido pelo grupo carbamato alílico. A proteção pelo grupo aliloxicarbonil (Alloc) levou a uma redução mensurável nas propriedades citotóxicas do derivado quimicamente modificado em relação à amsacrina livre, e a presença das microesferas de Pd(0) em células incubadas com amsacrina protegida mostrou um incremento de sete vezes na citotoxicidade, ou seja, a amsacrina é liberada *in situ* pela atividade catalítica do catalisador heterogêneo Pd(0).

Esquema 7 –Representação esquemática da desproteção intracelular catalisada por Pd(0) do reagente 1 (bis-*N,N'*-aliloxicarbonil rodamina 110) gerando o composto fluorescente 2 (rodamina 110).<sup>1</sup>



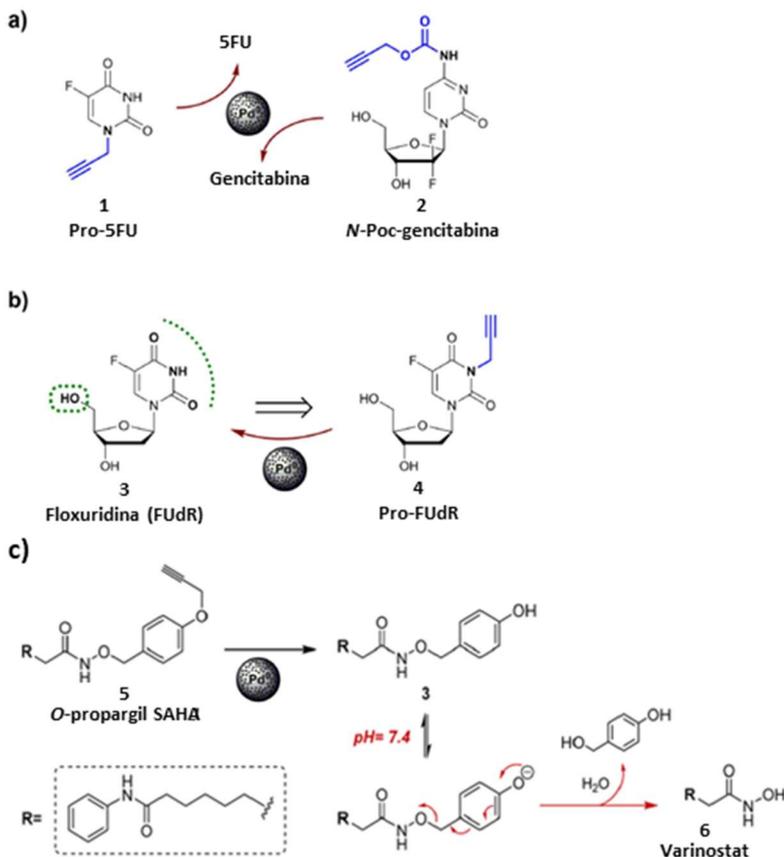
FONTE: Adaptado da referência 1.

Este estudo abriu espaço para Unciti-Broceta e coautores, utilizando as mesmas nanopartículas de Pd(0), de 5 nm suportadas numa resina de poliestireno, demonstrarem a possibilidade de ativar bio-ortogonalmente, em cultura de células cancerígenas, pela desproteção do grupo amino, a *N*-propargiloxicarbonilgencitabina<sup>6</sup>, a 5-fluoro-1-propargiluracila<sup>4,14</sup> e a *N*-propargilfloxuridina<sup>59</sup>, e pela desproteção do

grupo éter fenólico a *O*-propargil SAHA<sup>60</sup>, quatro pró-fármacos biologicamente inertes da gencitabina, 5-fluorouracila, floxuridina e vorinostat, respectivamente (Esquema 8). A desproteção heterogênea do grupo propargílico utilizando nanopartículas de paládio habilitou o controle sobre o local de reação, as nanopartículas de Pd(0) puderam ficar dias ao redor das células sem ocasionar danos.

Alguns desses estudos também foram realizados em peixes-zebra. Em particular, os autores demonstraram que o implante das microesferas de Pd(0) no saco vitelino de embriões de peixe-zebra, após a fertilização, não causou qualquer toxicidade ou defeito de desenvolvimento (por exemplo, alteração no fenótipo). O catalisador reteve sua atividade *in vivo* que foi visualizada pelo aumento na fluorescência após a incubação com a sonda fluorogênica bis-*N,N'*-propargiloxycarbonil rodamina.<sup>8,17</sup> Esta baixa toxicidade em sistemas vivos, aliada a outras importantes características dos sistemas nanoparticulados, como capacidade de recuperação e controle sobre o local de reação, ressaltam a importância em se desenvolver novos sistemas catalíticos baseados em nanopartículas metálicas.

Esquema 8 – Reações de desproteção extracelular de aminas protegidas com grupos propargílico (1 e 4), e propargilcarbamato (2), e de fenól protegido com grupo propargílico (5) em meios de cultura celular cancerígenas, catalisadas por microesferas de Pd(0).<sup>59</sup>

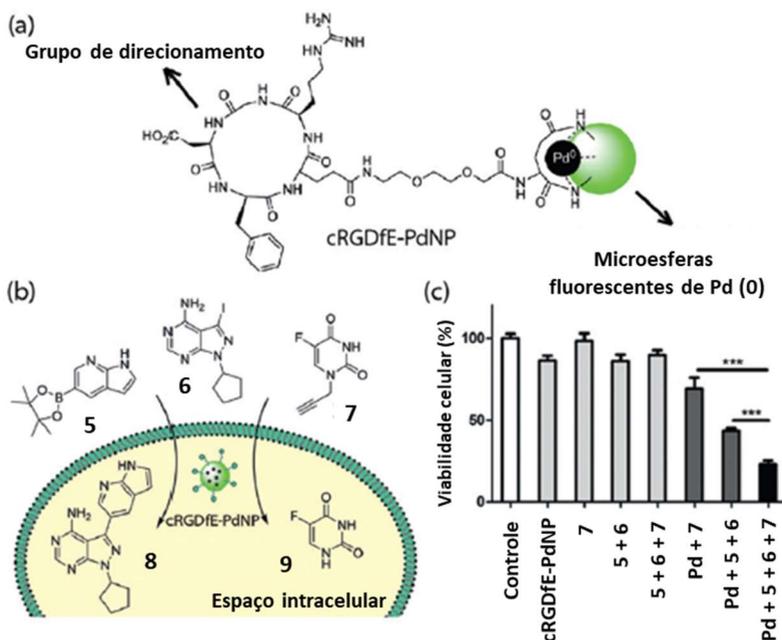


FONTE: Adaptado das referências 56 e 57.

Ainda utilizando microesferas de Pd(0) como catalisadores de reações bio-ortogonais, Bradley e coautores relataram recentemente o primeiro exemplo de um processo catalítico duplo no qual microesferas fluorescentes de Pd(0) funcionalizadas com o peptídeo cíclico cRGDfE (Figura 9a) foram capazes de mediar simultaneamente duas reações distintas (desproteção e acoplamento Suzuki-Miyaura) para a síntese dos fármacos antineoplásicos 5-FU (9) e PP-121.7 (8) (Figura 9b).<sup>8,61</sup> Os

autores reportaram a formação intracelular de ambos os produtos em células de câncer de mama verificando a diminuição da viabilidade celular na presença dos precursores benignos de ambos os produtos (5, 6 e 7), e as microsferas de Pd(0), enquanto que nos casos em que pelo menos um dos componentes esteve ausente, a viabilidade celular não foi afetada (Figura 9c). E ainda, os estudos de citometria de fluxo comprovaram o efeito de direcionamento específico para células cancerígenas do grupamento cRGDfE. Esta abordagem, combinando dupla síntese de agentes antitumorais com especificidade do catalisador por células cancerígenas, representa um passo à frente na terapia com pró-fármacos catalisada por paládio.<sup>61</sup>

Figura 9 – (a) Estrutura do catalisador fluorescente de Pd com o peptídeo cíclico. (b) Representação esquemática da ativação e síntese intracelular dos fármacos mediados por Pd(0). (c) Mudanças na viabilidade celular após o tratamento das células de câncer de mama com os compostos 5-7 e cRGDfE-PdNP.<sup>37</sup>

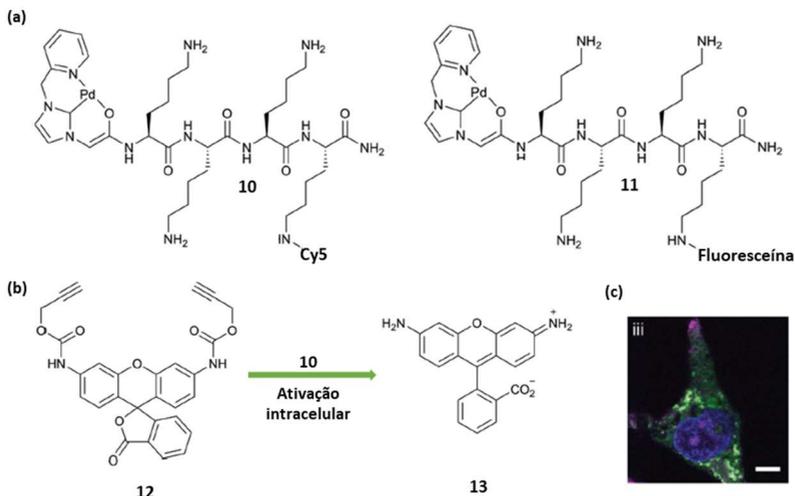


FONTE: Adaptada da referência 34.

Um outro exemplo da aplicação das reações de desproteção intracelular mediadas por paládio com controle espacial é o trabalho de

Bradley e coautores.<sup>62</sup> Um complexo não citotóxico de paládio (II) à base de carbeno, foi conjugado à peptídeos marcados com Cy5 sulfonado (10) e 5(6)carboxifluoresceína (11) para direcionar e possibilitar o rastreamento da ativação de biomoléculas em sistemas vivos (Figura 10a). A atividade catalítica dos catalisadores híbridos em células foi investigada utilizando-se o catalisador Pd-peptídeo (10) via despropargilação do pró-fluoróforo Proc-rodamina 110 (12) (Figura 10b). As células PC-3 foram incubadas com o composto 10 (30 mM) por 2 h, lavadas para remover qualquer catalisador extracelular, e subsequentemente incubadas com o composto 12 (50 mM) durante 18 h. A microscopia de fluorescência confirmou a presença do catalisador 10 bem como do fluoróforo 13, produto da ativação de 12 mediada por paládio, no citoplasma e núcleo das células de mamíferos (Figura 10c).<sup>17,62</sup>

Figura 10 – (a) Estrutura dos catalisadores híbridos Pd-peptídeo. (b) Representação esquemática da ativação intracelular do pró-fluoróforo mediada por Pd(II). (c) Imagem de microscopia confocal de células PC-3 incubadas com 10 e 12 (azul: núcleo celular, rosa: Pd-peptídeo 10 e verde: 13 sintetizado *in situ*).<sup>62</sup>

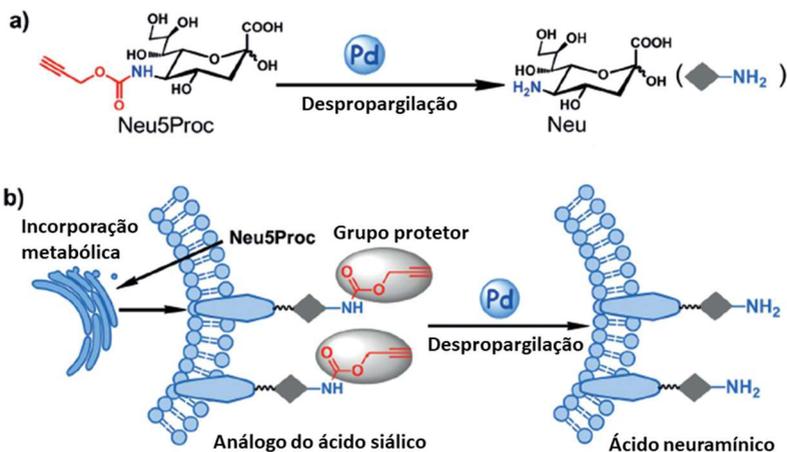


FONTE: Adaptada da referência 59.

Juntas, estas reações de clivagem biocompatíveis catalisadas por paládio serviram como estratégia para o estudo de Wang e coautores<sup>63</sup>, na qual geraram *in situ* o ácido neurâmico (Neu), a partir do precursor *N*-

(propargiloxycarbonil) neuramínico (Neu5Proc), através da reação de despropargilação catalisada por nanopartículas de paládio (preparadas pela redução com borohidreto de sódio) (Esquema 9b). Esta conversão química imita a reação enzimático de *N*-desacetilação do ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), um mecanismo proposto para a ocorrência natural de Neu nas posições terminais de glicoconjugados da superfície celular.

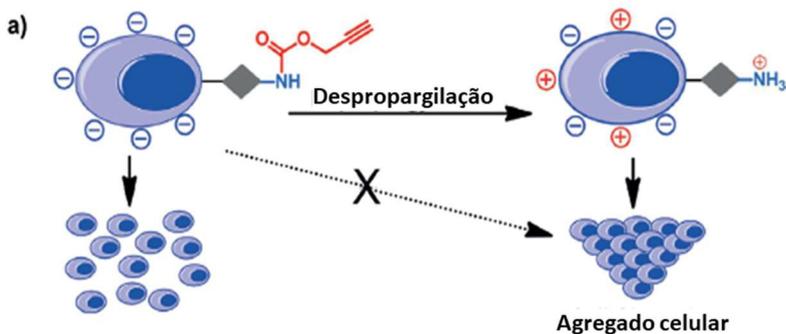
Esquema 9 – Representação esquemática da reação de despropargilação mediada por PdNPs em células vivas. a) Neu5proc é utilizado como um análogo do Neu5Ac para geração *in situ* do ácido neuramínico a partir da reação de eliminação catalisada por paládio. b) Neu5Proc são incorporados metabolicamente na superfície celular através da sialilação dos carboidratos terminas dos glicoconjugados. Com a adição do catalisador de paládio, o grupo Proc é eliminado para formar o Neu *in situ*.<sup>63</sup>



FONTE: Adaptado da referência 60.

Os pesquisadores também utilizaram a eliminação bio-ortogonal para explorar a manipulação das cargas negativas geradas pelos ácidos neuramínicos presentes na superfície celular. Com a despropargilação do Neu5Proc, as aminas livres geradas no C5 são capazes de neutralizar os grupos carboxílicos presentes no C1 nos ácidos siálicos, provocando assim a agregação celular (Esquema 10).

Esquema 10– Representação esquemática da despropargilação do Neu5Proc mediada por paládio para a manipulação das cargas na superfície das células e agregação celular. a) A conversão *in situ* do Neu5Proc em Neu por paládio gera aminas livres em C5 e assim alteram a carga da superfície celular causando agregação celular.<sup>63</sup>

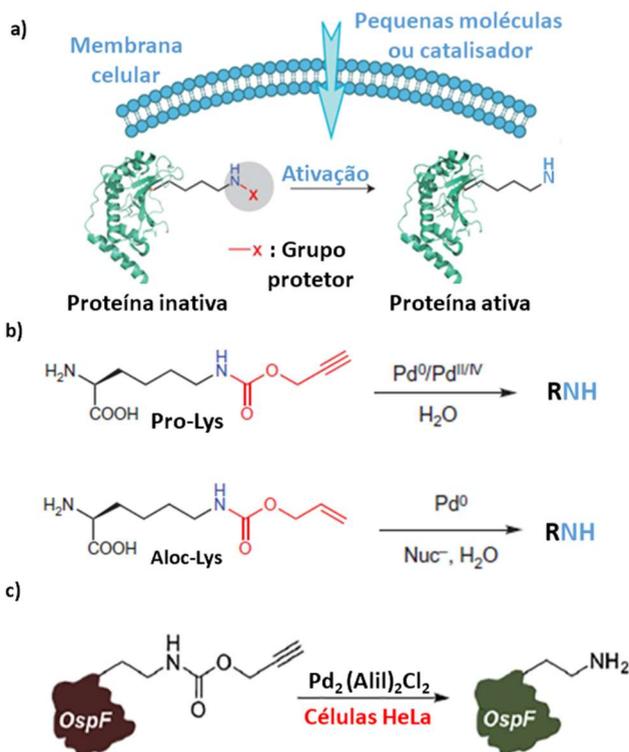


FONTE: Adaptado da referência 60.

Por fim, estas reações de desproteção catalisadas por paládio também vêm ganhando espaço como estratégia na ativação intracelular de proteínas. Em 2014, Chen e coautores reportaram o uso da reação de clivagem de uma ligação C-O para a ativação em condições fisiológicas de análogos da lisina protegidos por grupos carbamato alílico ou propargílico, utilizando diferentes sais de paládio ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{Pd}(\text{NO})_3$ ,  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ,  $\text{Pd}(\text{dba})_2$ ,  $\text{Pd}_2(\text{Alil})_2\text{Cl}_2$  e  $\text{K}_2\text{PdCl}_6$ ) como catalisadores (Esquema 11).<sup>12</sup>

Neste trabalho, foi identificado que todos os sais de paládio utilizados foram mais eficientes na catálise da reação de despropargilação. Além disso, a desproteção do grupo propargílico pode ser realizada com catalisadores de paládio em todos os estados de oxidação típicos (0, +2 e +4), enquanto o grupo alílico pode ser apenas desprotegido por espécies de  $\text{Pd}(0)$ . Deste modo, a eficiência da estratégia de ativação de proteínas *in vivo* envolveu a reação de desproteção da Proc-Lys para a ativação da enzima bacteriana OspF dentro de células HeLa, utilizando como catalisador  $\text{Pd}_2(\text{alil})_2\text{Cl}_2$  (Esquema 11c), sal que apresentou os melhores resultados na despropargilação *in vitro* da proteína verde fluorescente (GFP) incorporada com o resíduo Proc-Lys.<sup>12,17,37</sup>

Esquema 11 – (a) Ativação de proteínas dentro da célula; (b) desproteção química de análogos da lisina protegidos por grupos carbamatos alílico ou propargílico catalisada por diferentes sais de paládio e (c) representação esquemática da ativação da enzima bacteriana *OspF* catalisada por Pd.<sup>12,17</sup>



FONTE: Adaptado das referências 12 e 17.

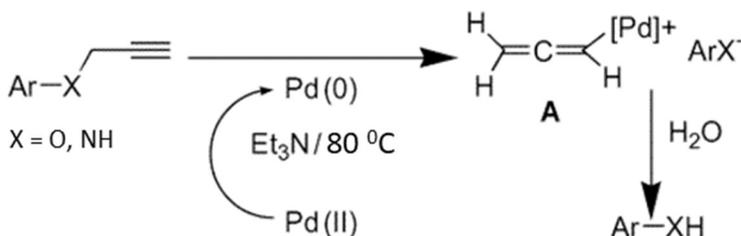
Em geral, podemos afirmar que a aplicação das reações de desproteção mediadas por paládio em contextos biológicos e celulares, é uma área de pesquisa notavelmente recente, ainda com poucos exemplos presentes na literatura,<sup>2,8,17,37,38</sup> como os exemplificados acima. Ainda que as estratégias mais utilizadas até o momento tenham sido a ativação de pequenas moléculas e biomoléculas protegidas com carbamatos alílicos e propargílicos, é importante notar que estes grupos de proteção não são verdadeiramente bio-ortogonais e podem ser desprotegidas *in vivo* através de reações com vários nucleófilos e enzimas digestivas, diferentemente de aminas e éteres propargílicos, embora menos reativos, são mais adequados para aplicações *in vivo*.<sup>8</sup> Além disso, a química da reação de

dealilação de grupos aminas/álcoois através da clivagem de ligações C-N e C-O catalisadas por paládio é uma estratégia comum, e bem estabelecida há algum tempo.<sup>64</sup> No entanto, para as reações de *N*- e *O*-despropargilação, embora mais eficientes que as reações de dealilação, poucos exemplos são encontrados na literatura, na sua maioria mediados por aditivos como Bu<sub>3</sub>SnH ou SmI<sub>2</sub>.<sup>65-70</sup> Contudo, o mecanismo destas reações até o presente momento é incerto, visto que nenhum estudo mecanístico sistemático foi realizado.<sup>12,17</sup> Porém, alguns trabalhos reportados na literatura propõem dois possíveis mecanismos da reação de despropargilação catalisada por paládio, via Pd(II)/Pd(IV)<sup>12,53,55,71-73</sup> ou Pd(0)/Pd(II/IV)<sup>4,6,10,12,69-71</sup>, embora sem nenhum estudo cinético.

### 1.2.4 Mecanismos propostos para a reação de despropargilação catalisada por paládio

Em 2003, Yeleswarapu e coautores estudaram a reação de despropargilação de aminas e éteres utilizando como pré-catalisador o sal (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub> em DMF-H<sub>2</sub>O (2:1), na presença de trietilamina a 80 °C. Neste trabalho os autores propõem que o Pd(II) se reduz no meio a Pd(0), esse processo é normalmente assumido como sendo promovido por uma base, através de uma redução intramolecular de troca de ligante ou por um ataque de um solvente nucleofílico, seguido por uma eliminação redutiva.<sup>10,12</sup> Então, o Pd(0) se adiciona à tripla ligação para formar um intermediário alenilpaládio com a clivagem da ligação C-X (X=O, N) (A, Esquema 12). Este intermediário sofre um ataque nucleofílico no carbono *sp* central por uma molécula de água, liberando assim a anilina desejada ou fenol com a regeneração de Pd(0).<sup>69</sup>

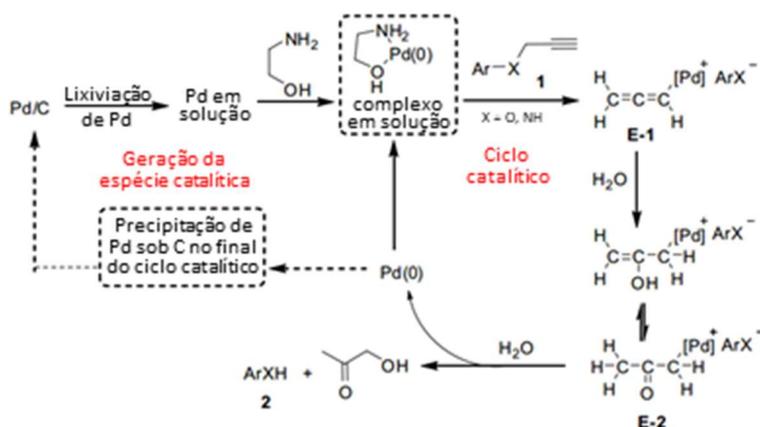
Esquema 12 - Mecanismos propostos para a reação de despropargilação na presença de (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>.<sup>69</sup>



FONTE: Adaptado da referência 66.

Em 2013, Pal e coautores estudaram a reação de despropargilação de aminas e éteres utilizando como catalisador Pd/C em H<sub>2</sub>O, na presença de etanolamina a 80 °C, sob atmosfera de nitrogênio. Os autores propõem que a clivagem da ligação C-X prossegue através da geração *in situ* de espécies ativas de Pd(0) complexado com etanolamina, que reage com o éter ou amina propargílica levando à formação de um intermediário alenilpaládio (**E-1**, Esquema 13). O alenilpaládio é então submetido a um ataque nucleofílico no carbono *sp* central por uma molécula de água, seguido de uma tautomerização para se obter o intermediário  $\alpha$ -Pd carbonil (**E-2**). A hidrólise subsequente de **E-2** libera o fenol desejado ou anilina (**2**), uma 1-hidroxi-2-propanona e a regeneração de Pd(0) para completar o ciclo catalítico.<sup>70</sup>

Esquema 13 - Mecanismo proposto para a reação de despropargilação catalisada por Pd/C.<sup>70</sup>

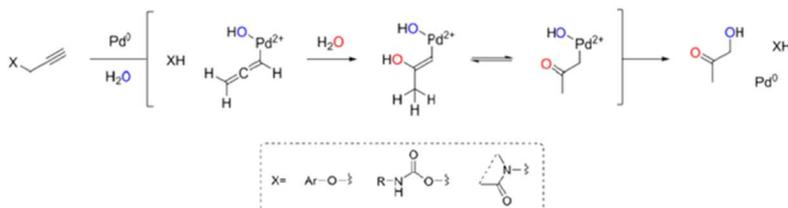


FONTE: Adaptado da referência 67.

É importante ressaltar que os dois trabalhos pertencem ao mesmo grupo de pesquisa e que estes mecanismos foram propostos sem nenhum estudo cinético, detecção/determinação de seus intermediários e espécies catalíticas ou qualquer outra análise mecanística sistemática. Baseados nestes dois trabalhos, Unciti-Broceta e coautores e Chen e coautores propuseram o mesmo mecanismo, ou seja, clivagem oxidativa mediada por Pd(0) passando pelo intermediário alenilpaládio (Figura 11), para a desproteção heterogênea do grupo propargílico na ativação dos pró-fármacos biologicamente inertes da gencitabina e 5-fluorouracila (5-

FU)<sup>4,6</sup> e para a desproteção homogênea do grupo propargílico na ativação de análogos da lisina em proteínas ou enzimas.<sup>12</sup>

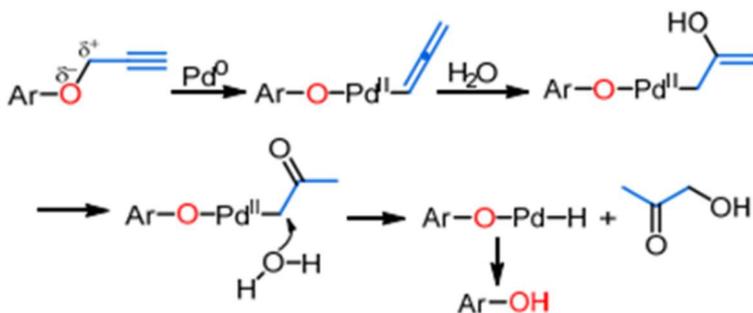
Figura 11 – Mecanismo proposto para a clivagem dos grupos *N*- e *O*-propargila catalisada por Pd(0).<sup>6,12</sup>



FONTE: Adaptada da referência 6.

Espelhados nesta mesma proposta mecanística e supondo que o complexo alenilpaládio é o intermediário chave, ou seja, o processo de isomerização (alenilação) durante a formação do intermediário é a etapa limitante da velocidade da reação de despropargilação catalisada por paládio, Chen e coautores<sup>10</sup> chegaram a propor que o grupo alenil seria mais sensível a desproteção catalisada por paládio do que o grupo propargil. Para testar essa hipótese, os autores utilizaram resíduos de tirosina protegidos com grupos aleno na ativação homogênea de duas proteínas, uma Src quinase tirosina-dependente e uma toxina antraz letal, em células vivas.<sup>8,10</sup> Após 5 minutos de reação os autores observaram uma maior sensibilidade do grupo aleno por catalisadores de Pd(0), porém a dealenilação também foi observada quando se empregou um catalisador de Pd(II). No entanto, a reação controle, ativação de resíduos de tirosina protegidos por grupamento propargila, se mostrou mais sensível a catalisadores de Pd(II). Com relação a velocidade de reação os autores asseguram que a desproteção do grupamento aleno é mais rápida, no entanto os autores só acompanham a cinética das reações utilizando catalisadores de Pd(0). Ainda assim, os autores propõem que a despropargilação procede via clivagem oxidativa mediada por Pd(0) passando pelo intermediário alenilpaládio (Figura 12).<sup>10</sup>

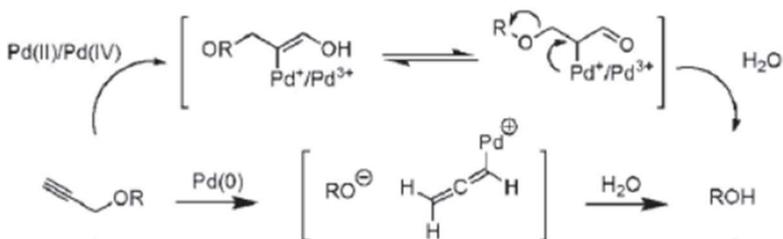
Figura 12 – Mecanismo proposto para a clivagem do grupo *O*-propargila catalisada por Pd(0).<sup>10</sup>



FONTE: Adaptada de referência 10.

O mesmo mecanismo é citado em trabalhos que relatam espécies de Pd(0) mediando reações de *O*-despropargilação aplicadas para a ativação de quimiossensores fluorescentes<sup>53,71,73</sup> (Figura 13). Entretanto, estes trabalhos também propõem um mecanismo alternativo quando a reação de despropargilação é catalisada por espécies de Pd(+2)<sup>53,71-75</sup> e Pd(+4)<sup>53,71,73</sup>, este ocorrendo através da formação de intermediários de hidratação. No caso de éteres propargílicos terminais, para formar um composto carbonílico terminal, este pode sofrer uma  $\beta$ -eliminação e a consequente despropargilação do substrato (Figura 13). Nestes trabalhos, os mecanismos também foram propostos sem nenhum estudo cinético ou qualquer outra análise mecanística sistemática.

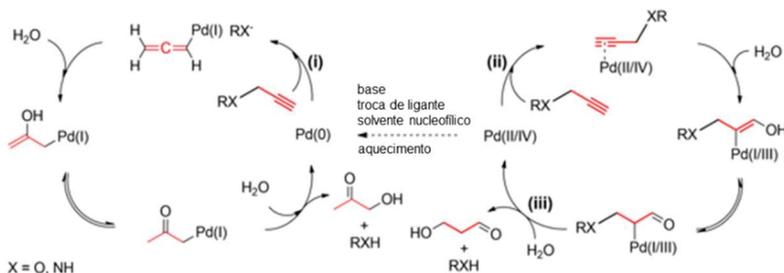
Figura 13 – Mecanismo proposto para a reação de *O*-despropargilação catalisada por espécies de Pd(0), Pd(II) e Pd(IV).<sup>71</sup>



FONTE: Adaptada da referência 68.

De um modo geral, o que tem sido frequentemente postulado é, mesmo quando as formas iniciais do catalisador são sais simples de Pd(II), o mecanismo de reação de despropargilação envolve a formação *in situ* da espécie catalítica Pd(0). Assume-se então, que o Pd(0) sofre uma adição oxidativa com o grupo propargila para formar o intermediário alenilpaládio, que pode ser hidrolisado para produzir como produto secundário a 1-hidroxi-2-acetona e regenerar o Pd(0) (via (i), Esquema 14). A hipótese menos comum é um mecanismo de hidratação mediado por Pd(II) (via (ii)), para formar um intermediário que pode se decompor para formar Pd(II) por hidrólise (iii) em uma oxidação tipo Wacker.<sup>12,17,71</sup>

Esquema 14 – Esquema para os mecanismos, sugeridos na literatura, para a reação de despropargilação mediada por Pd(0) (via i) e Pd(II/IV) (via ii).



FONTE: A autora.

Por fim, no contexto geral das estratégias utilizadas nas reações de despropargilação, algumas considerações de ordem prática sobre estes sistemas precisam ser explicitadas, como: (i) problemas de solubilidade, a maioria dos compostos orgânicos são solúveis em solvente orgânico, mas as moléculas protegidas precisam ser solúveis no meio fisiológico; (ii) os catalisadores precisam ser solúveis em água e dependendo da aplicação, permeáveis à membrana celular; (iii) os poucos trabalhos existentes relatam que a reação de despropargilação em condições fisiológicas é muito lenta, podendo levar até 72 h para a reação ocorrer parcialmente, o que conseqüentemente leva a baixos rendimentos, exigindo altas doses de catalisador, um parâmetro de extrema importância ao se projetar um protocolo biorrortogonal, visto que envolve conceitos de solubilidade e toxicidade.<sup>14,18</sup>

Neste contexto, atraídos pela grande lacuna existente entre as recentes aplicações da catálise bio-ortogonal por paládio nas reações de *N*- e *O*-despropargilação, o conhecimento da estabilidade de catalisadores

de paládio em condições biocompatíveis, a natureza da espécie ativa e o entendimento do seu modo de ação, pré-requisitos para o desenvolvimento racional de novos catalisadores, este trabalho pretende contribuir diretamente no estudo e manipulação de proteínas, que contenham resíduos essenciais ou catalíticos de tirosina, na ativação de pró-fármacos em sistemas vivos, bem como para o entendimento das reações químicas dos sistemas vivos, através do estudo mecanístico da reação de clivagem da ligação C-O do grupo hidroxila protegido por um grupamento propargil, mediada por sais simples de Pd(II) ( $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  e  $\text{PdCl}_2$ ), em condições biocompatíveis.

Esperamos que, dessa maneira também estaremos colaborando de maneira indireta com o desenvolvimento de novos catalisadores bio-ortogonais de reações de *O*-despropargilação. Como indutores de reações brandas, seletivas e sítio-dirigidas, *i.e.*, projetadas para ambientes específicos (por exemplo: condições fisiológicas).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo contribuir com o estado-da-arte do modo de ação de sais de paládio (II) como catalisadores nas reações de *O*-despropargilação através da investigação mecanística da clivagem da ligação C-O do substrato modelo éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (2,4-DNPPE) em água promovida pelos sais de paládio (II), acetato de paládio (Pd(OAc)<sub>2</sub>), cloreto de paládio (PdCl<sub>2</sub>) e tetracloropaladato de sódio (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>), em condições fisiológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização do éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (2,4-DNPPE) para utilizar como substrato modelo;
- Investigação da reatividade dos sais de paládio (Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) frente à catálise da quebra da ligação C-O do substrato 2,4-DNPPE;
- Obtenção das constantes cinéticas e parâmetros termodinâmicos para estes sistemas;
- Investigação *in situ* e no meio reacional (ausência de substrato) dos catalisadores na reação de *O*-despropargilação do substrato 2,4-DNPPE;
- Caracterização dos intermediários de reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE mediada pelo sal de paládio Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> por técnicas de ESI-HRMS e ESI-CID-MS/MS;
- Testes de envenenamento dos catalisadores pela adição de Hg(0) e CS<sub>2</sub> na reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE;
- Propor um mecanismo para a reação de *O*-despropargilação com os sais de paládio selecionados.



### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS

Os reagentes e solventes de grau analítico:  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , DMF (Vetec),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (Nuclear),  $\text{Et}_2\text{O}$  (Quimidrol),  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{EtOH}$  (Synth), brometo de propargila (Fluka),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Diprolab),  $\text{HCl}$  (Lafan),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KBr}$ , acetato de paládio (II), cloreto de paládio (II), tetracloropaladato de sódio (II) (Aldrich),  $\text{KCl}$  (Cromoline), dissulfeto de carbono,  $\text{Hg}(0)$ , álcool propargílico e 1-hidroxi-2-propanona, foram adquiridos de fontes comerciais, com grau de pureza compatível com a utilização. O reagente 2,4-dinitrofenol foi adquirido da marca Sigma-Aldrich e submetido à recristalização com etanol quente antes do uso. Os solventes deuterados  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{DMSO-d}_6$  foram da marca Aldrich. A água utilizada em reações e demais experimentos foi deionizada através de um sistema de troca iônica pelo equipamento TKA Smart2Pure.

#### 3.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

##### 3.2.1 Espectrofotometria no Infravermelho

O espectro na região do infravermelho para o substrato foi obtido em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrofotometer Spectrum 100, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC) do DQ/UFSC, na região entre  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . A amostra sólida foi analisada em pastilha de  $\text{KBr}$  (grau espectroscópico) previamente seco.

##### 3.2.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de $^1\text{H}$

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o substrato foi obtido em um espectrômetro VARIAN-FT-NMR 400 MHz, na Central de Análises do DQ/UFSC, utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0$  ppm).

### 3.2.3 Investigação Mecânica

#### 3.2.3.1 Estudos Cinéticos

Os estudos de atividade catalítica para a reação de *O*-despropargilação do substrato éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (2,4-DNPPE) foram realizados em um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 Bio, acoplado a um banho termoestabilizado. Os experimentos foram realizados em duplicata monitorando-se o aparecimento do ânion 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP) em 400 nm ( $\epsilon = 11326 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , determinado a 48 °C em DMSO:H<sub>2</sub>O 5:95 v:v). O valor aparente de  $\epsilon$  foi determinado em cada pH e esse valor foi o utilizado em todas as medições. Em todos os experimentos foram utilizadas cubetas de quartzo (com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm) seladas com tampa de teflon e avolumadas para que o volume final da mistura reacional na cubeta fosse de 3 mL. O pH das soluções foi ajustado através de pHmetro digital Expandable ionAnalyzer EA 920 (Orion research). Soluções tampão de CH<sub>3</sub>COOH/NaOH (pH 5,00), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH (pH 6,00 a 8,00), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,41), Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>/HCl (pH 8,50 e 9,0) e NaHCO<sub>3</sub>/NaOH (pH 10,00 e 11,00) foram usadas para manter o pH constante e a concentração final de tampão foi mantida em 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Num experimento típico as condições experimentais foram as seguintes: c (tampão) = 0,01 mol L<sup>-1</sup>; c (catalisador) = 1,06 X 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> em DMSO); c (2,4-DNPPE) = 1,06 X 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (em DMSO). A reação foi iniciada com a adição do substrato após cinco minutos de incubação à temperatura desejada e o aumento da absorbância foi medido para se obter os parâmetros cinéticos. A *O*-despropargilação espontânea do substrato, para todos os experimentos, foi acompanhada em paralelo através de experimentos em condições idênticas exceto pela ausência dos sais de paládio.

#### 3.2.3.2 Estudos das Espécies Envolvidas

##### 3.2.3.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - RMN de <sup>1</sup>H

O espectro de RMN <sup>1</sup>H para os produtos de reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE mediada pelo sal de paládio Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> foi obtido em um espectrômetro VARIAN-FT-NMR 400 MHz, na Central de Análises do DQ/UFSC, utilizando DMSO-d<sub>6</sub> como solvente. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram

registrados em ppm utilizando como referência o solvente. Para o espectro de RMN  $^1\text{H}$  uma reação mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  ( $c$  (2,4-DNPPE)  $3,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c$  ( $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ )  $= 3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c$  (tampão)  $= 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 5% DMSO; pH 7,41 a  $48^\circ\text{C}$ ), foi liofilizada após a conclusão da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE (monitoradas por UV-vis) e o sólido resultante solubilizado em DMSO- $d_6$  (700  $\mu\text{L}$ ) para posterior análise.

### 3.2.3.2.2 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS)

Os espectros de massas foram obtidos no Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas, com auxílio do mestrando Guilherme Tripodi. Os experimentos de ESI-HRMS foram obtidos em um espectrômetro de massas Q-ToF iFunnel 6550 com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Aliquotas (500  $\mu\text{L}$ ) da reação ( $c$  (2,4-DNPPE)  $= 2,12 \times 10^{-3}$ ;  $c$  (catalisador)  $= 4,24 \times 10^{-4}$ ;  $c$  (tampão)  $= 0,001 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 5% DMSO; pH 7,41 a  $48^\circ\text{C}$ ) foram retiradas periodicamente e do meio reacional, diluídas em acetonitrila para  $\sim 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e injetadas com um fluxo contínuo de  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ . As amostras foram analisadas no modo negativo utilizando os seguintes parâmetros da fonte: voltagem do capilar 3,0 kV; voltagem do fragmentador 175 V; OCT 1RF;  $V_{pp}$  750 V; temperatura do gás  $250^\circ\text{C}$ ; temperatura do gás de injeção  $290^\circ\text{C}$ ; fluxo do gás de secagem  $11 \text{ L min}^{-1}$ . A faixa de aquisição dos espectros de massa foi de 50 a 1500  $m/z$ . Os experimentos de CID foram obtidos em um espectrômetro de massas de baixa resolução (Thermo Scientific LTQ FT Ultra) com fonte de ionização por *electrospray*. As mesmas amostras previamente analisadas por ESI-HRMS foram injetadas no espectrômetro de massas de baixa resolução para a obtenção dos espectros de fragmentação (ESI-MS/MS). As amostras foram introduzidas com velocidade de fluxo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  e analisadas no modo negativo. Os seguintes parâmetros da fonte foram utilizados: voltagem do spray 3 kV, temperatura no capilar  $300^\circ\text{C}$ , S-Lens RF nível 70 V. Os espectros de massas foram tratados com os softwares Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent MassHunter, Califórnia, EUA) e Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

### 3.2.3.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS

Análises de espalhamento de luz dinâmico foram obtidas utilizando-se o sistema Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Aliquotas (1 mL) da reação ( $c$  (2,4-DNPPE) =  $1,06 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c$  (catalisador) =  $1,06 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) ;  $c$  (tampão) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); 5% DMSO; pH 7,41 a 48 °C) foram retiradas periodicamente (para as reações mediadas pelos sais Pd(OAc)<sub>2</sub> e PdCl<sub>2</sub> somente após 5 min) e medidas a temperatura constante de  $48 \pm 1$  °C. Os raios hidrodinâmicos ( $R_H$ ) foram determinados a partir das medidas de correlação de intensidade  $g_2(t)$  convertidas para distribuição dos tempos de relaxação e posteriormente para as distribuições de tamanho utilizando a equação de Stokes-Einstein (1).

$$R_H = \frac{k_B T q^2}{6 \pi \eta} \tau \quad (1)$$

Onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $\eta$  é a viscosidade do solvente,  $\tau$  é o tempo de relaxação relacionado ao movimento de difusão das nanopartículas e  $q$  é o vetor espalhamento dado por:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$

Onde  $n$  é o índice de refração do solvente ( $n_{\text{água}} = 1.33$ ),  $\lambda$  é o comprimento de onda do feixe incidente ( $\lambda = 633$  nm) e  $\theta$  é o ângulo de espalhamento ( $\theta = 173^\circ$ ). Aqui, as distribuições de intensidade de tamanho foram convertidas em distribuições de tamanho ponderadas por volume considerando o espalhamento Rayleigh de partículas esféricas.

### 3.2.3.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas em um microscópio JEOL JEM1011 a uma voltagem de aceleração de 100 kV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. As amostras foram preparadas pelo gotejamento de alíquotas de 5  $\mu$ L da reação ( $c$  (2,4-DNPPE) =  $2,12 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>;  $c$  (catalisador) =  $2,12 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> ((Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>);  $c$  (tampão) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); 5% DMSO; pH 7,41 a 48 °C) após a

conclusão da despropargilação do 2,4-DNPPE (monitoradas por UV-vis), em grades de cobre recobertos por carbono (200 mesh). Aguardou-se até que ocorresse a evaporação total do solvente de todas as amostras para posterior análise no microscópio. A distribuição estatística de tamanho das partículas foi construída pela contagem manual do máximo de partículas isoladas utilizando-se um software apropriado (ImageJ). Utilizando o programa Origin, os histogramas de distribuição de tamanho foram construídos e os valores de diâmetro médios e distribuição estatística de tamanho foram obtidos.

### 3.2.3.2.5 Espectroscopia de Absorção de Raios X - XAS

Os espectros de absorção de raios X na borda K do Pd (24350 eV) para as amostras foram coletados utilizando a linha de luz XDS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os dados para a investigação *in situ* do catalisador  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  no meio reacional ( $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{tampão}) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 5% DMSO; pH 7,41) foram adquiridos na região EXAFS (absorção de raios X de estrutura fina), e os dados para a investigação do precipitado coletado após a conclusão da reação ( $c(2,4\text{-DNPPE}) = 3,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 3,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c(\text{tampão}) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 5% DMSO; pH 7,41 a 48 °C) de despropargilação do 2,4-DNPPE mediado pelo sal de paládio  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  foram adquiridos em ambas regiões, EXAFS (absorção de raios X de estrutura fina) e XANES (absorção de raios X próximo à borda). Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente no modo de transmissão com três câmaras de ionização, utilizando um duplo cristal de Si (311) como monocromador e um espelho toroidal de ajuste de foco. Uma folha de Pd foi utilizada como padrão para realizar a calibração de energia para todas as varreduras. Cinco a dez espectros foram coletados para melhorar o sinal em relação ao ruído. Cada espectro foi obtido na faixa de 24150–25400 eV com 2-6 s/ponto. Os dados foram processados utilizando os softwares Ifeffit e Demeter.<sup>76</sup>

### 3.2.3.2.6 Testes de Envenenamento dos Catalisadores

As condições experimentais para os testes de envenenamento foram as mesmas descritas para o estudo da influência do pH, porém no início da reação e a 120 minutos de reação adicionou-se  $6,04 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de uma solução de  $\text{CS}_2$  em DMSO. A 120 minutos de reação também experimentou-se testes de envenenamento adicionando-se, com o auxílio

de um micropipetador,  $2,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de Hg(0). As cubetas contendo Hg(0) foram agitadas vigorosamente com o auxílio de um agitador do tipo Vortex, durante 30 segundos, antes de dar continuidade as leituras de UV-vis.

### 3.2.3.3 Métodos Computacionais

Os cálculos de DFT foram realizados no Grupo de Estrutura Eletrônica Molecular – GEEM, com auxílio do doutorando Felipe S. S. Schneider e supervisão dos professores, Prof. Dr. Bernardo Souza e Prof. Dr. Giovanni F. Caramori. Otimizações geométricas e cálculos de frequência dos sistemas modelo foram realizados aplicando-se o software ORCA versão 4.0.1.2<sup>77</sup>, e o conjunto de funções de base gaussianas utilizado foi o PBE0-D3 (BJ)/ma-def2-TZVP(-f)<sup>78-83</sup>. A aproximação RIJCOSX foi aplicada para acelerar o cálculo das funções de troca, com a base apropriada de ajuste<sup>84</sup>. Estruturas implicitamente solvatadas em água foram calculadas utilizando os modelos CPCM e SMD<sup>85,86</sup>. As estruturas foram verificadas como mínimos ou estados de transição na superfície de energia potencial pela ausência de frequências imaginárias, com algumas apresentando rotações negativas muito pequenas (sempre menores que  $34 \text{ cm}^{-1}$ ). As energias livres foram corrigidas para a fase condensada através da equação (3)<sup>87</sup>:

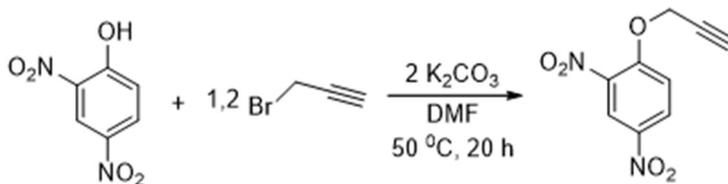
$$G_{1M} = G_{1at} + RT \ln(V) \quad (3)$$

Onde  $V$  representa o volume molar de um gás ideal à temperatura  $T$  e pressão  $p$ . A 298,15 K e 1 atm, esta correção é igual a  $2,1984 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

### 3.2.4 Síntese do substrato 2,4-dinitrofenilpropargil éter (2,4-DNPPE)

Para estes estudos de clivagem de ligação C-O escolheu-se como substrato modelo o composto pró-fármaco éter 2,4-dinitrofenílico propargílico (2,4-DNPPE). O substrato em questão foi sintetizado conforme o procedimento adaptado da literatura (Figura 14), e detalhado abaixo.<sup>88,89</sup>

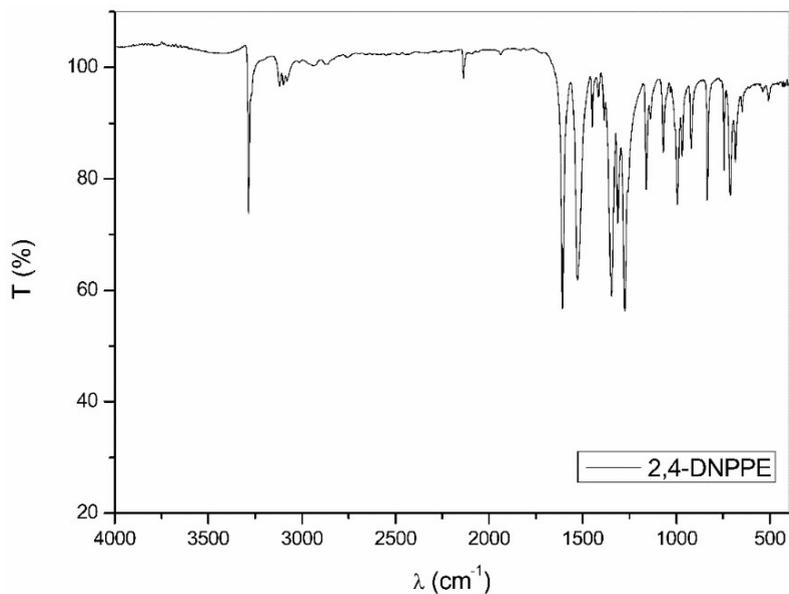
Figura 14 – Rota sintética para a obtenção do substrato éter aril propargílico.



A uma solução, sob aquecimento a 50 °C, do 2,4-dinitrofenol (0,460 g, 2,5 mmol) em DMF (3 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 mmol) e brometo de propargila (3 mmol) são adicionados. Após monitorar a reação por CCD (20 h), a mistura reacional é então diluída com água (10 mL) e extraída com Et<sub>2</sub>O (2X10 mL). A fase orgânica é lavada com solução salina saturada (*brine*), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo produzindo o correspondente éter aril propargílico como um sólido amarelo canário (0,315 g, 1,43 mmol, 57,0%).

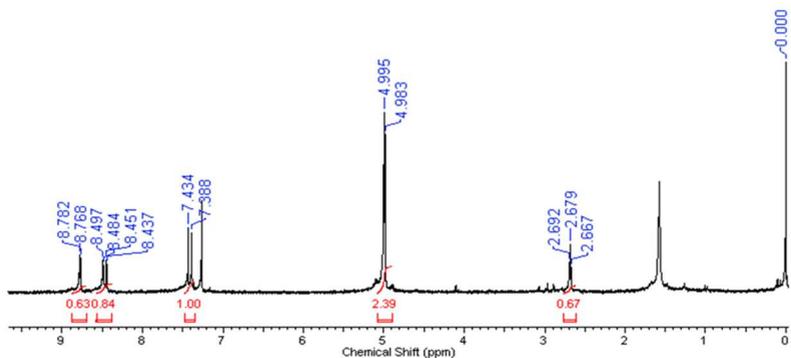
**IV (cm<sup>-1</sup>)** – 3284  $\nu$  (C<sub>sp</sub>-H); 3125 – 3078  $\nu$  (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>); 2143  $\nu$  (C $\equiv$ C); 1613  $\nu$  (C=C<sub>ar</sub>); 710  $\delta$  (C-H<sub>ar</sub>); 1531  $\nu_{\text{ass}}$  ((N=O)<sub>2</sub>); 1325  $\nu_{\text{sim}}$  ((N=O)<sub>2</sub>); 835  $\nu$  (C-N).

Figura 15 - Espectro na região do IV registrado em pastilha de KBr para o éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico.



**RMN de  $^1\text{H}$**  –  $\delta_{\text{H}}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ), em ppm: 8,77 (d,  $J(\text{H,H}) = 2,72$  Hz, 1H, *HAr*), 8,47 (dd,  $J(\text{H,H}) = 2,72$  and 9,1 Hz, 1H, *HAr*), 7,43 (d,  $J(\text{H,H}) = 9,1$  Hz, 1H, *HAr*), 4,98 (d,  $J(\text{H,H}) = 2,13$  Hz, 2H, *CH2*), 2,67 (t,  $J(\text{H,H}) = 2,13$  Hz, 1H, *CH*)

Figura 16 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região de 0,0 a 9,0 ppm, obtido para o éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico em  $\text{CDCl}_3$ .





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Síntese e Caracterização do substrato modelo 2,4-dinitrofenilpropargil éter (2,4-DNPPE)

Para os estudos deste trabalho foi sintetizado, conforme procedimento descrito na seção 4.3, o éter aril propargílico 2,4-DNPPE com rendimento satisfatório e grau de pureza adequado para a utilização deste como substrato modelo para a reação de *O*-despropargilação. A discussão da caracterização deste éter por RMN de  $^1\text{H}$  e também por espectrofotometria no IV são apresentadas a seguir.

#### 4.1.1 Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

A Tabela 1 apresenta as principais bandas e atribuições<sup>90</sup> para o substrato 2,4-DNPPE, o espectro no IV foi apresentado na Figura 15. Como observado na Tabela 1 o espectro de IV apresenta bandas características do grupamento alquinil referentes aos estiramentos das ligações  $\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$  e  $\text{C}\equiv\text{C}$ , confirmando a presença do grupo propargil no substrato. São observados também bandas dos grupamentos nitro, substituintes no anel, referentes aos estiramentos das ligações  $(\text{N}=\text{O})_2$  e  $(\text{C}-\text{N})$ . Além das bandas características de  $\text{C}-\text{H}$  de aromáticos e alifáticos

Tabela 1 - Atribuição para as principais bandas de absorção na região do IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) registradas para o substrato éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico.

Atribuições <sup>(a)</sup>	2,4-DNPPE ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\nu (\text{C}_{\text{sp}}\text{-H})$	3284
$\nu (\text{C}\equiv\text{C})$	2143
$\nu_{\text{ass}} ((\text{N}=\text{O})_2)$	1531
$\nu_{\text{sim}} ((\text{N}=\text{O})_2)$	1325
$\nu (\text{C}-\text{N})$	835
$\nu (\text{C}-\text{H}_{\text{ar}} \text{ e } \text{C}-\text{H}_{\text{alif}})$	3125 – 3078

<sup>(a)</sup> SILVERSTEIN, 1994

#### 4.1.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Os valores de deslocamento químico e atribuições dos sinais<sup>90</sup> registrados para o éter aril propargílico 2,4-DNPPE (Figura 17) estão apresentados na

Tabela 2. As proporções de prótons obtidas nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são coerentes com o número total de hidrogênios esperados para o substrato em questão. A presença do grupamento propargil no substrato foi confirmada pelo aparecimento do duplete referente aos hidrogênios alquínicos e do triplete referente ao hidrogênio acetilênico, em deslocamentos característicos para estes sinais.

Figura 17 – Representação esquemática do substrato modelo sintetizado para os estudos deste trabalho com numeração para os átomos de hidrogênio utilizados nas atribuições de RMN de  $^1\text{H}$ .

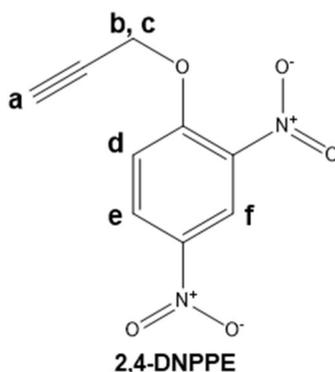


Tabela 2 - Atribuições dos sinais registrados por espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$  para o substrato 2,4-DNPPE em  $\text{CDCl}_3$ .

$\delta$ observado (ppm)	Multiplicidade	Nº de átomos de hidrogênio	Atribuição <sup>(a)</sup>
2,67	Tripleto	1	$\text{H}_a$ ( $J(\text{H}/\text{H}) = 2,13$ Hz)
4,98	Duplete	2	$\text{H}_b, \text{H}_c$ ( $J(\text{H}/\text{H}) = 2,13$ Hz)
7,43	Duplete	1	$\text{H}_d$ ( $J(\text{H}/\text{H}) = 9,1$ Hz)
8,47	Duplo-duplete	1	$\text{H}_e$ ( $J(\text{H}/\text{H}) = 2,72$ e $9,1$ Hz)
8,77	Duplete	1	$\text{H}_f$ ( $J(\text{H}/\text{H}) = 2,72$ Hz)

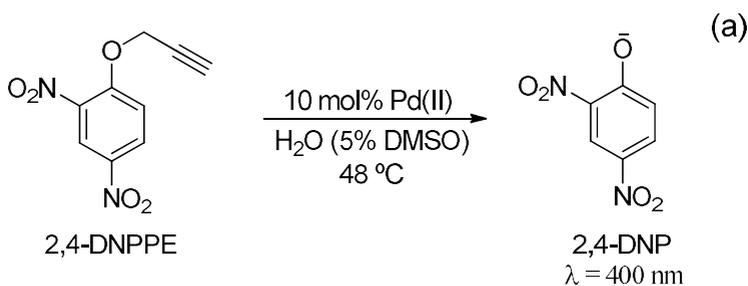
<sup>(a)</sup> SILVERSTEIN, 1994

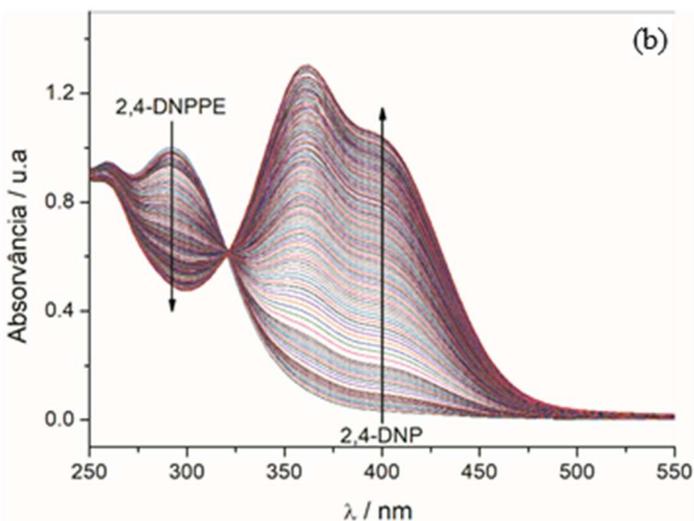
## 4.2 Estudos Cinéticos

Considerando que o pH da solução pode ser um fator de interferência importante, a reatividade da reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE foi investigada em diferentes valores de

pH na ausência ou presença dos sais de paládio (II) ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) como catalisadores. Como todas as reações de clivagem da ligação C-O foram monitoradas pelo aparecimento do fenol 2,4-DNP (Figura 18a) a influência do pH pode ser acompanhada em uma ampla faixa de pH, pois o respectivo fenol possui um valor de  $pK_a$  relativamente baixo, 4,07.<sup>91</sup> Além disso, para a faixa de pH estudada, 5,0 -11,0, o 2,4-DNP encontra-se preferencialmente na sua forma aniônica, apresentando uma banda de absorção característica em 400 nm facilitando assim o estudo cinético por espectrofotometria no UV-vis (Figura 18b).

Figura 18 – (a) Representação esquemática da reação de *O*-despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE na liberação de uma molécula de 2,4-DNP promovida pelos sais de Pd(II) ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ). (b) Variação espectral de UV-vis da mistura reacional de 0,106  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com 0,0106  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em  $\text{H}_2\text{O}$  (5% DMSO), pH 7,41 a 48 °C.





Como pode ser visto no gráfico, da formação do produto com o tempo (Figura 19a, para a reação mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ), as reações do 2,4-DNPPE com os sais de Pd (II) estudados, na faixa de pH de 5,00 a 11,0, apresentaram um desvio da cinética de primeira ordem, ou seja, as curvas não apresentaram o perfil de saturação esperado para reações de hidrólise de um único substrato.

A partir da linearização do perfil cinético (Figura 19

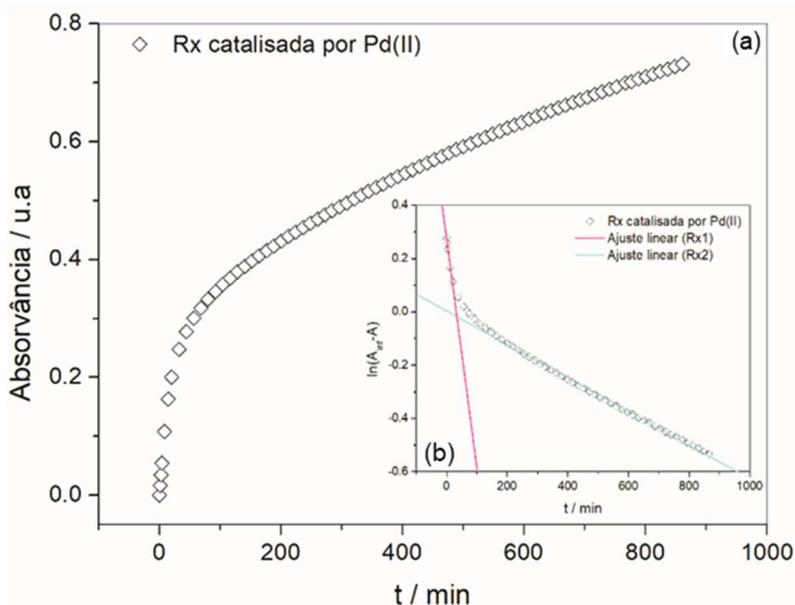
Figura 19b) foi possível observar uma curva bi exponencial, um perfil típico de cinética bifásica. Ou seja, a conversão do substrato está sendo dada por duas reações em diferentes velocidades. Uma reação rápida, denominada aqui de Rx1, e uma reação lenta, Rx2.<sup>92,93</sup>

Como as duas reações levam a formação do mesmo produto é dito que essas reações estão ocorrendo paralelamente e o ajuste linear desse tipo de curva é feito pela lei de velocidade apresentada na Eq. 4, sendo que a formação do produto é dada pela soma da contribuição de cada uma das duas reações de primeira ordem. Com  $F^0$  representando a magnitude de rendimento da fase rápida e  $S^0$  a da fase lenta.

O ajuste linear da Eq. 4 permitiu a determinação de duas constantes de velocidade macroscópicas observadas ( $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$ , Figura 19b) e as magnitudes de rendimento das fases rápida ( $k_{obs1}$ ) e lenta ( $k_{obs2}$ ),  $F^0$  (25%) e  $S^0$  (75%), respectivamente.

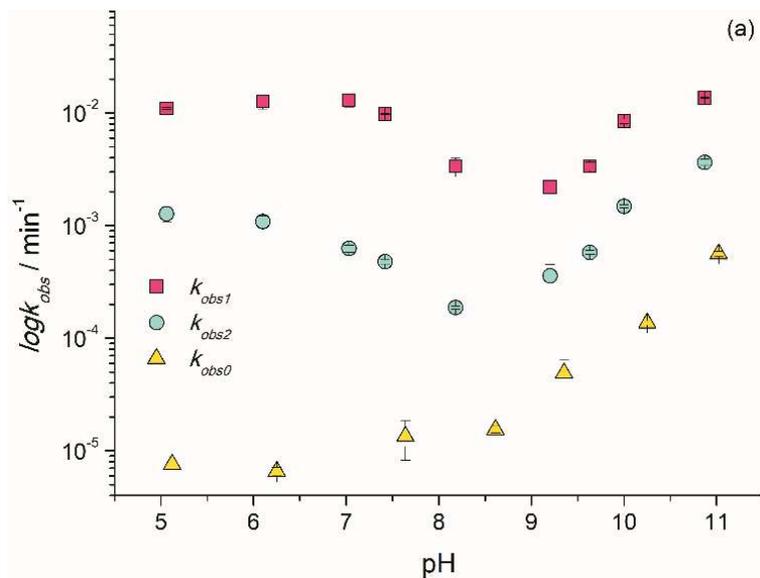
$$\frac{[2,4 - DNP]_{inf}}{[2,4 - DNP]_t} = F^0 e^{-k_1 t} + S^0 e^{-k_2 t} \quad (4)$$

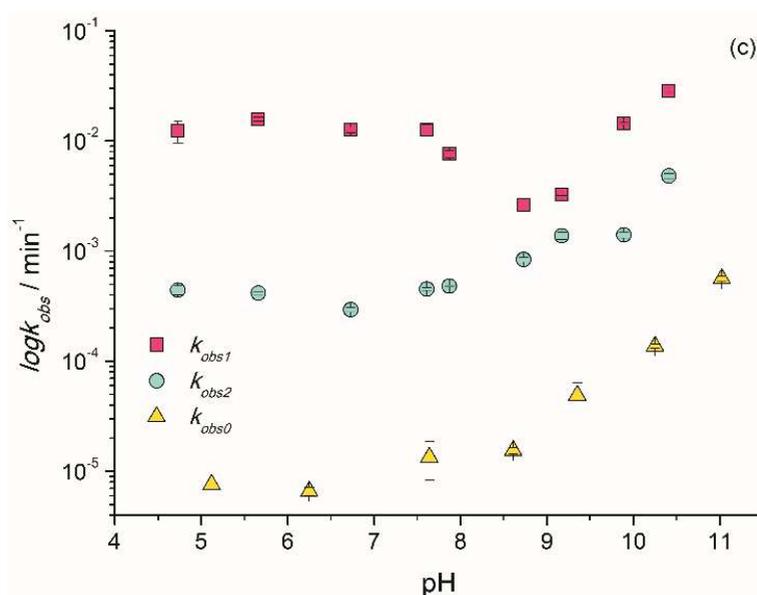
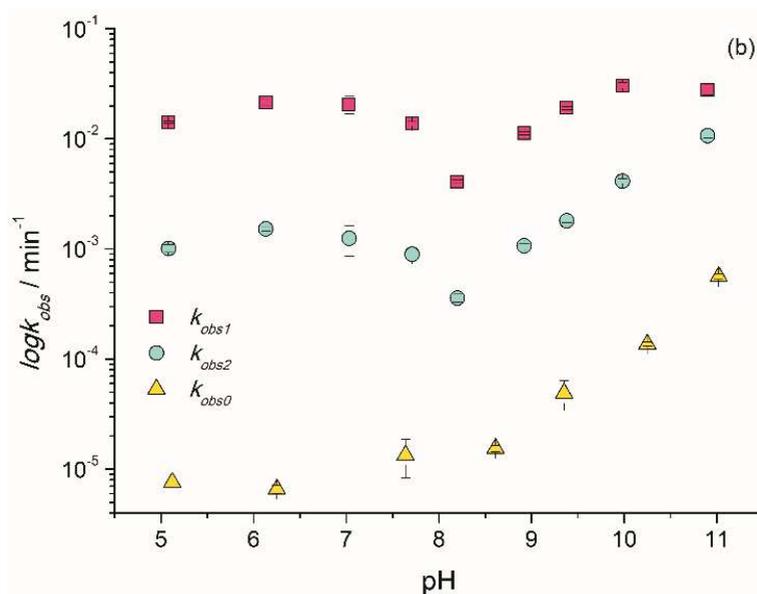
Figura 19 – (a) Perfil cinético da formação do produto a 400 nm. (b) Linearização dos dados cinéticos experimentais normalizados para a reação de despropargilação do 2,4-DNPPE.



A Figura 20 mostra os valores de  $k_{obs}$  para as duas reações paralelas ( $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$ ) do 2,4-DNPPE com (a)  $Pd(OAc)_2$ , (b)  $PdCl_2$  e (c)  $Na_2PdCl_4$  e a constante de velocidade para a reação espontânea ( $k_{obs0}$ ), *i.e.*, na ausência do catalisador, em função do pH.

Figura 20 - Gráfico de  $k_{obs}$  para a reação de  $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com (quadrado e círculo) e sem (triângulo)  $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$  de (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em meio aquoso de tampão c (tampão) =  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO) a  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ .





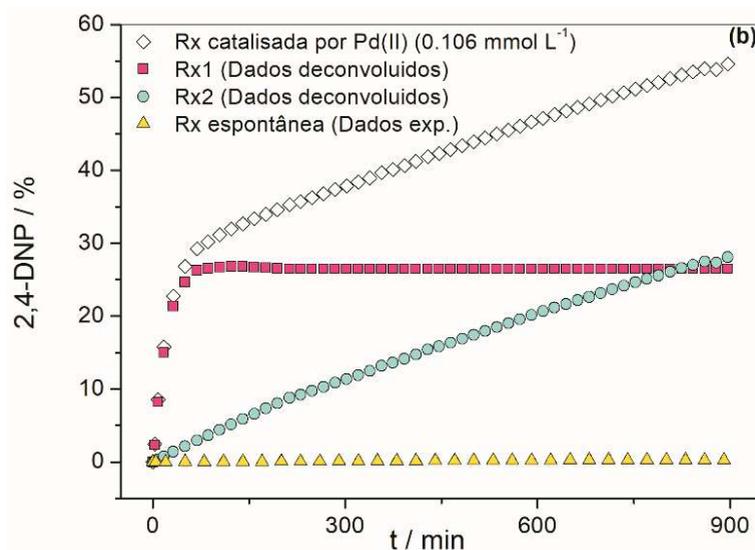
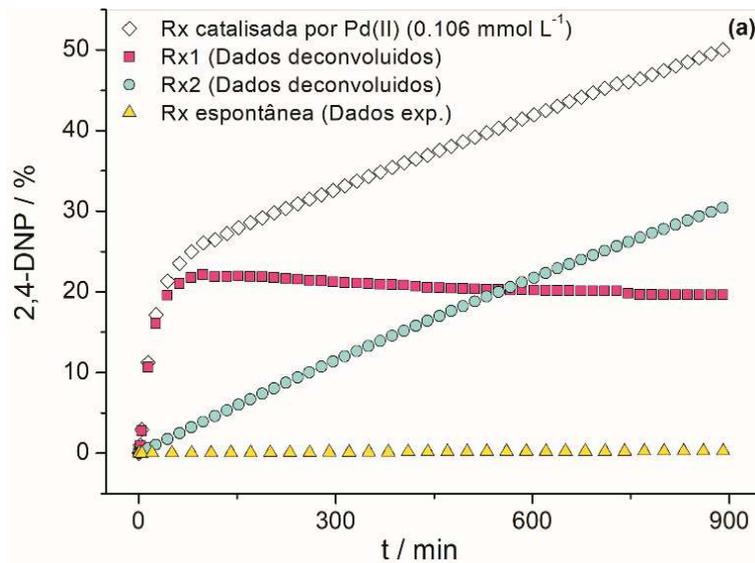
Como representado na Figura 20, a diferença entre os valores de  $k_{obs1}$ ,  $k_{obs2}$  e  $k_{obs0}$  revelam que a reatividade da reação de  $O$ -

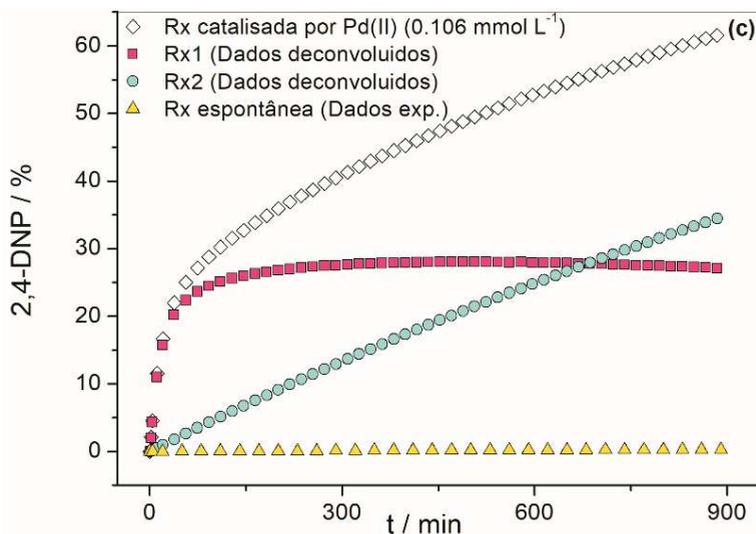
despropargilação do substrato modelo 2,4-DNPPE na ausência dos sais de paládio (II) ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) é praticamente negligenciável ao pH no intervalo de 5,0 a 8,5. Por outro lado, na presença dos íons de paládio (II) dentro da faixa de pH biologicamente relevante (6,5 a 8,0) a reatividade foi evidente e, além disso, a diferença entre a reação espontânea ( $k_{obs0}$ ) e a reação catalisada ( $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$ ) é mais pronunciada que no intervalo de pH de 8,5 a 11,0. Estes resultados indicam que a clivagem da ligação C-O do substrato modelo 2,4-DNPPE mediada por sais de paládio (II) pode ser aplicada em células vivas sem interferência dos efeitos do pH.

Assim, com o intuito de contribuir com o estado-da-arte do modo de ação de sais de paládio (II) como catalisadores bio-ortogonais de reações de *O*-despropargilação, escolheu-se como pH de estudo o pH fisiológico ( $\sim 7,41$ ) e como tampão o fosfato de sódio e potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), normalmente utilizado para mimetizar o meio fisiológico, para a investigação cinética apresentada.

Os perfis típicos de cinética bifásica, produzindo o mesmo produto 2,4-DNP, em meio aquoso tamponado com fosfato (pH 7,41) para todos os sais de Pd (II), estão apresentados na Figura 21 ((a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ). O ajuste linear da Eq. 4 permitiu a determinação das duas constantes de velocidade macroscópicas (Figura 41 - APÊNDICE A). Com base nestas constantes de velocidade macroscópica, a evolução do produto 2,4-DNP pode ser deconvoluída em dois perfis cinéticos de reação (Figura 21), ou seja, Rx1 e Rx2 para as fases rápida e lenta, respectivamente.

Figura 21 – Perfis cinéticos para a reação de  $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com e sem  $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$  de (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e  $48^\circ\text{C}$ .





Pode-se observar que Rx1 é cerca de 17 vezes mais rápido que Rx2 e cerca de 650 vezes mais rápido que a reação não catalisada sob as mesmas condições (Tabela 3). A meia-vida da Rx1 é de cerca de 1 h, o que torna essa reação viável para aplicações bio-ortogonais.<sup>94</sup>

Tabela 3 - Constantes de velocidade de primeira-ordem ( $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$ ) para a reação de  $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com  $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato c ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) =  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ .

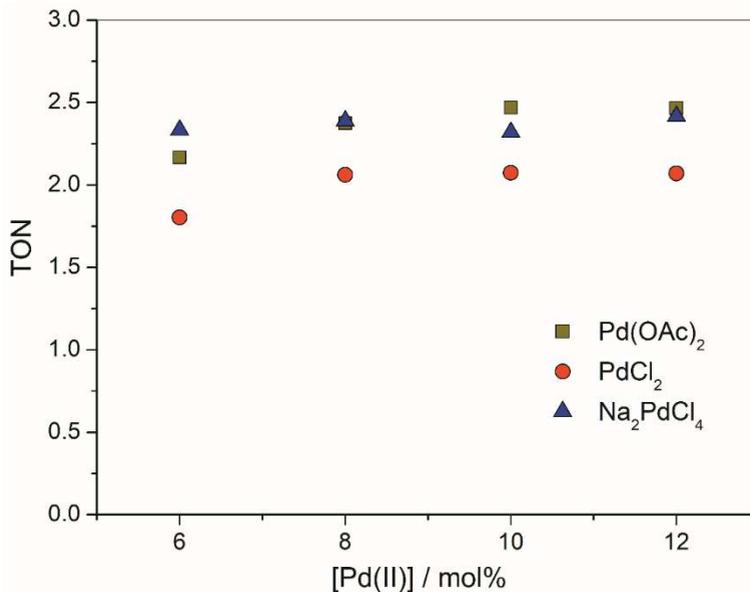
Catalisador	$k_{obs1} / \text{min}^{-1} \times 10^2$	$k_{obs2} / \text{min}^{-1} \times 10^4$
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	0,85	4,50
$\text{PdCl}_2$	0,97	4,80
$\text{Na}_2\text{PdCl}_4$	1,10	7,50

$k_{obs0} = 1,7 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  a  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 7,41.

Além disso, uma importante observação nestas reações é que a fase rápida (Rx1) é responsável pela conversão de cerca de 20 mol% do substrato em produto, isto é, apenas dois *turnovers* (Figura 22). A partir deste ponto a conversão do substrato em 2,4-DNP se dá praticamente pela Rx2, uma vez que a reação não catalisada é muito lenta.

Mecanicamente, essa informação mostra que Rx1 não é só apenas mais rápida que Rx2, mas é completamente desativada após dois *turnovers*.

Figura 22 – Números de *Turnovers* (TON) versus concentração de Pd(II) para a reação de  $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE, em meio aquoso de tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) =  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ .

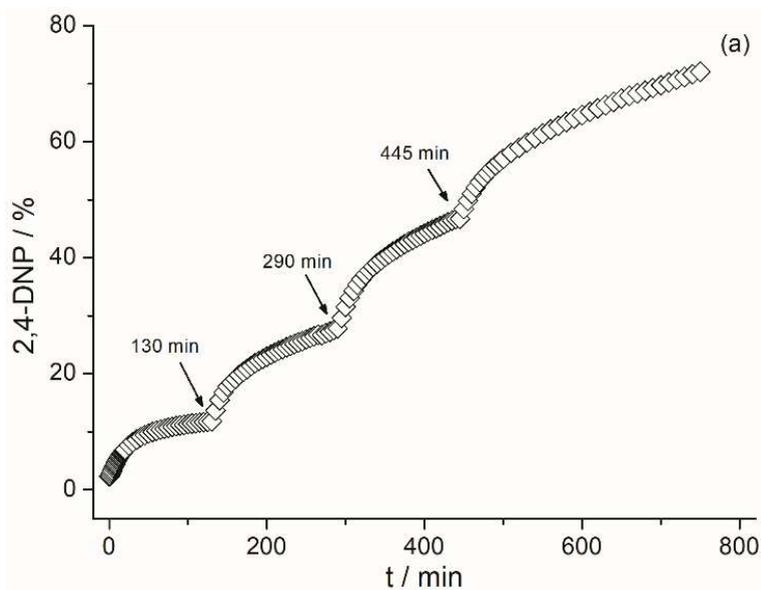


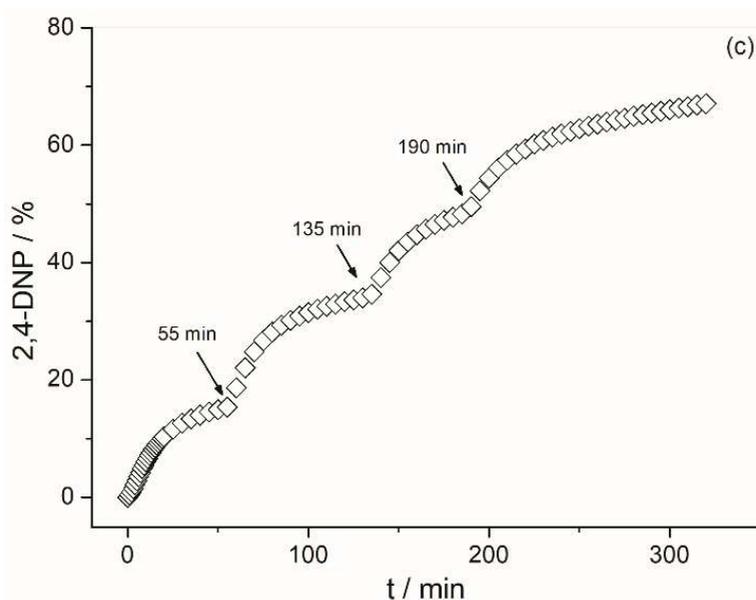
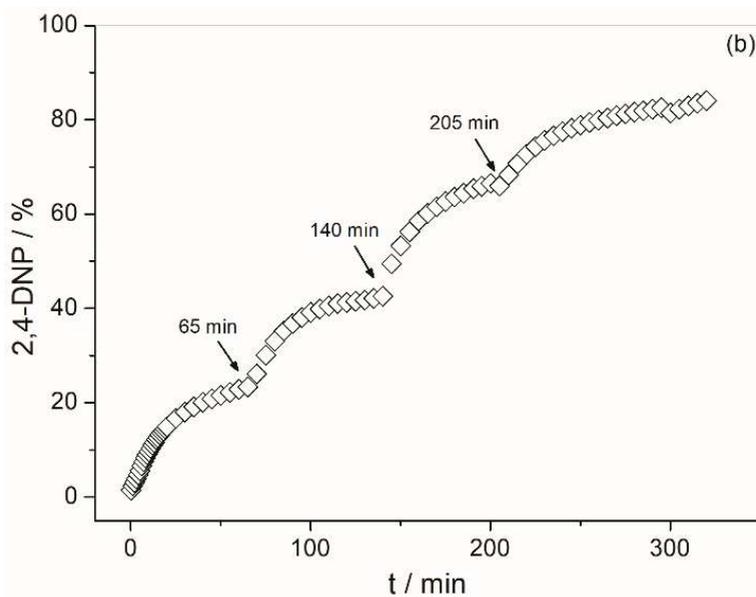
De fato, realizando-se experimentos sob as mesmas condições descritas para o estudo da influência do pH, porém com adições sequenciais de uma nova carga ( $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ) dos catalisadores de paládio (II) ( $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  e  $\text{PdCl}_2$  em DMSO) ( $c$  (catalisador) =  $4,24 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), a cada tempo final da fase rápida (Rx1), leva a um aumento acentuado na produção de 2,4-DNP, que também dura cerca de dois *turnovers* (Figura 23).

Neste ponto, estes dados cinéticos não só evidenciam de que pelo menos duas espécies principais de Pd estão envolvidas na conversão total do substrato em produto, mas também concordam que a Rx1 está sendo completamente inibida após dois *turnovers*. Esta é uma observação muito importante, uma vez que para a maioria dos catalisadores de Pd reportados neste trabalho, a reação foi monitorada por um curto período

de tempo e o número de *turnovers*, especialmente intracelularmente, nunca foi adequadamente estabelecido.<sup>37</sup>

Figura 23 – Perfis cinéticos para a reação de  $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com adições sequenciais de  $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$  de (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato c ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) =  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ .





Para uma reação de clivagem catalítica de um único substrato, um perfil cinético bifásico é consistente com uma mudança no mecanismo

devido a uma mudança na atividade do catalisador. Assim, um experimento fundamentado no método de análise cinética do progresso da reação (RPKA) foi realizado para estabelecer a estabilidade do catalisador ao longo da reação.

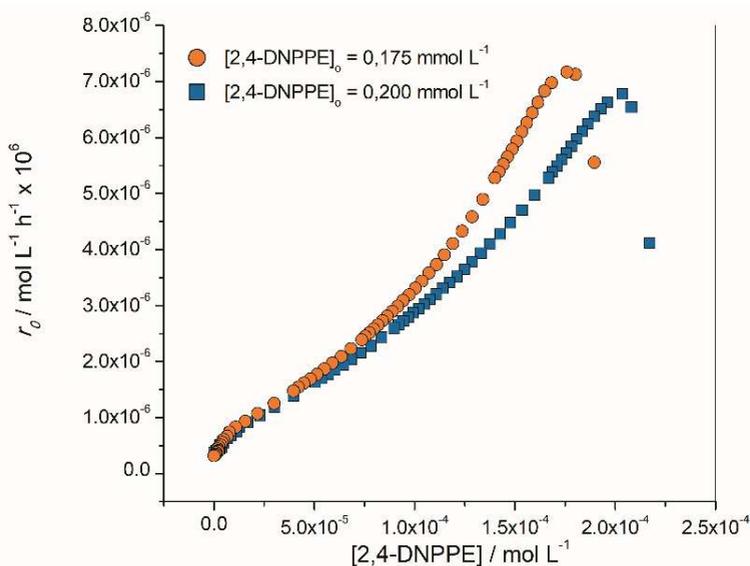
O RPKA é um subconjunto de uma ampla gama de técnicas cinéticas utilizadas para determinar as leis de velocidade de reações químicas e para auxiliar na elucidação de mecanismos de reação inclusive, sugerir alguns conjuntos iniciais de experimentos para encontrar qualquer evidência de desativação do catalisador ou inibição do produto.<sup>95</sup>

Portanto, duas reações iniciadas com diferentes concentrações de  $[2,4\text{-DNPPE}]_0$  e a mesma concentração de catalisador devem apresentar perfis cinéticos de velocidade vs. concentração de substrato idênticos quando há ausência de processos de desativação de catalisador ou de inibição do produto.

Conseqüentemente, duas reações utilizando o catalisador  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  foram realizadas: experimento 1 com :  $c(2,4\text{-DNPPE})_0 = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4)_0 = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  e experiência 2:  $c(2,4\text{-DNPPE})_0 = 0,175 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4)_0 = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,41 a 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO). (Figura 24).

Como pode ser visto na Figura 24, através da sobreposição dos gráficos de velocidade do experimento 1 e 2 é possível observar um comportamento distinto, sugerindo que  $[\text{Pd}]$  é desigual para ambos os experimentos. Este resultado indica que o catalisador não é estável, o que é ainda suportado por experiências posteriores revelando que o catalisador está mudando para se ajustar a uma mudança no mecanismo.

Figura 24 - RPKA de estabilidade do catalisador durante a conversão do 2,4-DNPPE. Condições: experiência 1:  $c(2,4\text{DNPPE})_0 = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4)_0 = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  e experiência 2:  $c(2,4\text{DNPPE})_0 = 0,175 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4)_0 = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,41 a 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) =  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).



Além disso, outros experimentos cinéticos sob as mesmas condições descritas para o estudo da influência do pH, porém adicionando-se a 10 minutos de reação 40 mol% de 2,4-DNP ou 40 mol% de 1-hidroxi-2-propanona (o subproduto mais frequentemente relatado para esta reação, porém nunca identificado e/ou caracterizado) ao meio reacional mostraram que o perfil de reação também não é afetado (Figura 42– APÊNDICE B e Figura 43– APÊNDICE C). Assim, uma possível inibição devido à presença dos produtos 2,4-DNP ou 1-hidroxi-2-propanona é descartada.

No entanto, caso o subproduto da reação seja mesmo a 1-hidroxi-2-propanona a sua coordenação ao centro de paládio pode estar relacionada com o processo de hidrólise do grupo propargila e não a capacidade coordenante dos átomos de oxigênio presentes na molécula, o que é suportado por experimentos posteriores.

A influência na velocidade de reação dos outros componentes do meio reacional também foi investigada. Por exemplo, experimentos cinéticos sob as mesmas condições descritas para o estudo da influência

do pH, porém aumentando a concentração de Pd de 2 a 12% molar de Pd (II) resultou em um aumento na velocidade de reação por fatores de 10 a 27 para Rx1 e 45 a 150 para Rx2, dependendo da fonte de Pd(II) utilizado como catalisador. (Figura 44 – APÊNDICE D).

Assim, considerando que tanto Rx1 quanto Rx2 são afetadas pela concentração de Pd, podemos afirmar que as espécies de Pd devem estar envolvidas na etapa determinante da velocidade. E ainda, concluir que essa resposta não linear da velocidade de reações Rx1 / Rx2 com mudanças na concentração de Pd sugere uma diferente nuclearidade no catalisador para esses dois processos.

A concentração de tampão fosfato também alterou a velocidade de reação, a Tabela 4 e a Figura 45 (APÊNDICE E) mostram que um aumento na concentração de tampão fosfato, de 0,005 a 0,15 mol L<sup>-1</sup>, diminui a capacidade catalítica de Rx1, cerca de 6 vezes para os catalisadores PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> e de 3 vezes para o Pd(AOc)<sub>2</sub>. Entretanto, o efeito do tampão sobre a capacidade catalítica de Rx2, em todas as concentrações estudadas, é bastante pequeno podendo ser negligenciável.

Tabela 4 – Efeito da concentração do tampão fosfato de potássio nas  $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$  para a reação de  $0,106 \text{ mmol.L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com  $0,0106 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato c  $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5,00 \times 10^{-3}$  a  $1,50 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e  $48^\circ\text{C}$ .

<b>Catalisador</b>		<b><math>\text{Pd}(\text{OAc})_2</math></b>	
<b>[Tampão] / <math>\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b><math>k_{obs1} /</math> <math>\text{min}^{-1} \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>k_{obs2} /</math> <math>\text{min}^{-1} \times 10^{-4}</math></b>	
0,005	$1,24 \pm 0,03$	$7,88 \pm 0,20$	
0,01	$1,20 \pm 0,20$	$7,37 \pm 0,44$	
0,05	$0,53 \pm 0,10$	$5,34 \pm 0,66$	
0,10	$0,51 \pm 0,02$	$6,25 \pm 0,50$	
0,15	$0,40 \pm 0,04$	$5,82 \pm 0,44$	
<b>Catalisador</b>		<b><math>\text{PdCl}_2</math></b>	
<b>[Tampão] / <math>\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b><math>k_{obs1} /</math> <math>\text{min}^{-1} \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>k_{obs2} /</math> <math>\text{min}^{-1} \times 10^{-3}</math></b>	
0,005	$2,45 \pm 0,23$	$1,15 \pm 0,01$	
0,01	$1,36 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,07$	
0,05	$0,70 \pm 0,04$	$1,02 \pm 0,09$	
0,10	$0,48 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,08$	
0,15	$0,44 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,17$	
<b>Catalisador</b>		<b><math>\text{Na}_2\text{PdCl}_4</math></b>	
<b>[Tampão] / <math>\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b><math>k_{obs1} /</math> <math>\text{min}^{-1} \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>k_{obs2} /</math> <math>\text{min}^{-1} \times 10^{-4}</math></b>	
0,005	$1,42 \pm 0,05$	$5,99 \pm 0,30$	
0,01	$1,30 \pm 0,09$	$6,17 \pm 0,04$	
0,05	$0,39 \pm 0,01$	$5,45 \pm 0,16$	
0,10	$0,27 \pm 0,01$	$6,36 \pm 0,12$	
0,15	$0,24 \pm 0,01$	$6,53 \pm 0,38$	

Um aumento na quantidade do co-solvente DMSO também diminui a velocidade de reação, por exemplo, variando de 5 a 50% de DMSO ambas as reações são completamente inibidas (Figura 46 - APÊNDICE F).

Isto é importante, uma vez que o DMSO é de longe o co-solvente mais comumente utilizado nestas reações para a solubilização de substratos e/ou catalisadores em solução aquosa, *in vitro* ou *in vivo*. Devido às conhecidas capacidades de coordenação do fosfato e DMSO em relação aos metais de transição, o tampão e o co-solvente estão provavelmente inibindo a reação através da complexação com as espécies

catalíticas, ou seja, competem com o substrato pelos centros de paládio. Ainda, o efeito de inibição pronunciado pelo tampão fosfato no caso de Rx1 (Figura 45 - APÊNDICE E) mostra que as espécies de Pd envolvidas nesta reação são mais lábeis.

Também, como uma forma de elucidar o mecanismo de despropargilação do 2,4-DNPPE, mediu-se para os catalisadores Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, o efeito isotópico de solvente (Figura 47 - APÊNDICE G). O estudo foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas onde o tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH e pD = 7,41 foram previamente preparados em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O. As condições experimentais seguiram as descritas para o estudo da influência do pH.

De acordo com Deal e colaboradores<sup>96</sup>, uma razão  $k_H/k_D$  entre 0,80 e 1,50 para reações idênticas realizadas em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O respectivamente, indicam que não há transferência de próton durante a etapa determinante da reação. Sendo assim, os valores de  $k_H/k_D$  para ambas reações, Rx1 e Rx2, apresentados na Tabela 5, indicam que o tampão não está assistindo o ataque da água no substrato, eliminando a possibilidade de uma catalise básica geral na etapa determinante de ambas reações.

Tabela 5 - Efeito isotópico de solvente ( $k_H/k_D$ ) para a reação de clivagem da ligação C-O do 2,4-DNPPE pelos sais de paládio (II).

Catalisador	Rx	$k_H/k_D$
Pd(OAc) <sub>2</sub>	1	1,07
	2	1,01
PdCl <sub>2</sub>	1	1,00
	2	1,03
Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub>	1	1,04
	2	1,02

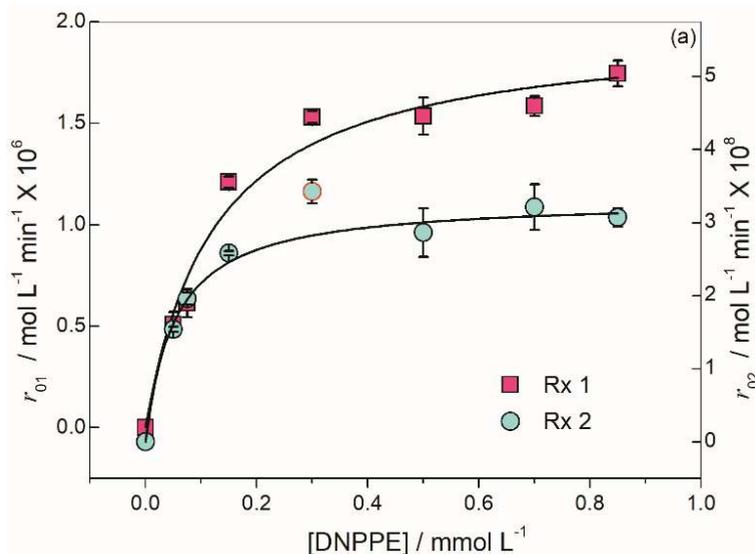
A fim de se obter maiores detalhes do mecanismo de reação, a dependência da velocidade de reação de *O*-despropargilação do 2,4-DNPPE com a concentração inicial do substrato promovida pelos sais de paládio (II) foi investigada.

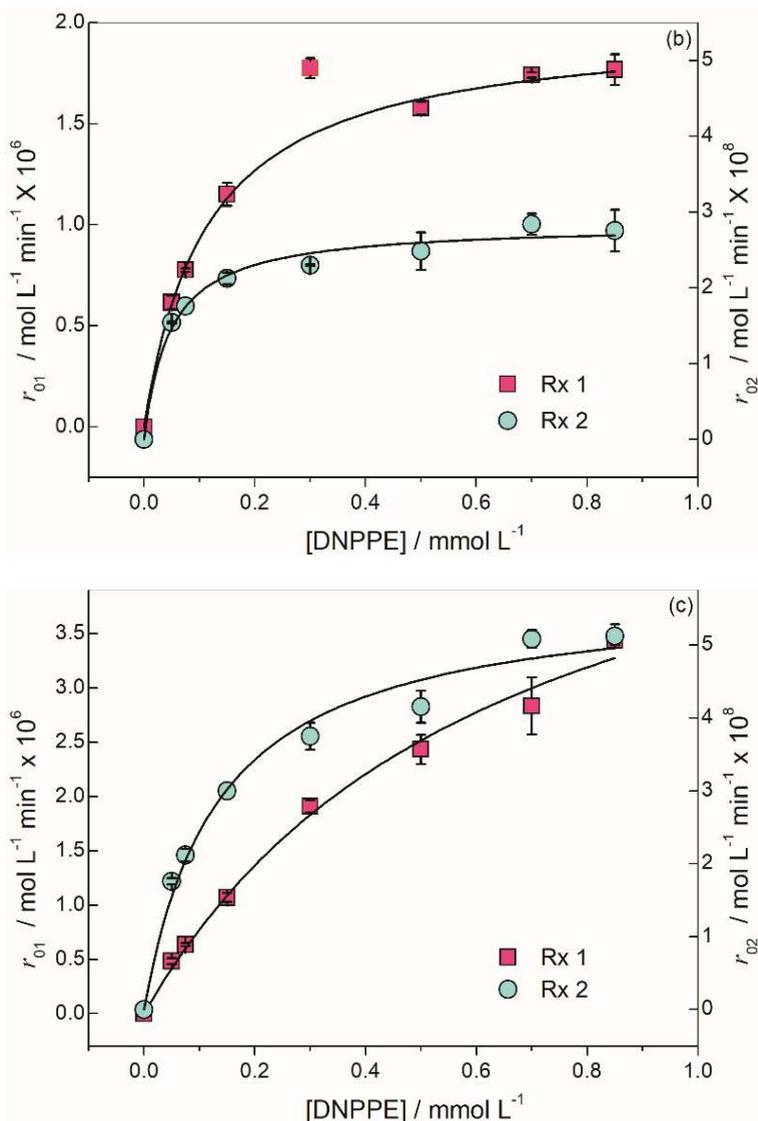
Os experimentos de variação da concentração de substrato foram realizados no pH fisiológico a 48 °C. As condições experimentais foram as seguintes: c (tampão) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), c (catalisador) = 1,06 X 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> em DMSO); c (2,4-DNPPE) = 5,00 X 10<sup>-5</sup> a 8,50 X 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (em DMSO).

Como apresentado na Figura 25, as velocidades iniciais ( $r_0$ ) para Rx1 e Rx2 têm um comportamento de saturação. A saturação da velocidade inicial com o aumento da concentração de substrato é típica

de mecanismos de reação que envolvem um pré-equilíbrio de associação do catalisador com o substrato antes da atividade em si, assim como o mecanismo de Michaelis-Menten (MM) para enzimas e muitas reações catalisadas por metais de transição.<sup>97,98</sup> Este tipo de sistema pode ser tratado com a equação derivada por MM para se obter a constante de primeira ordem,  $k_{cat}$  e a constante  $K_M$ , que é aproximadamente igual a constante de dissociação do complexo catalisador-substrato.

Figura 25 – Dependência da velocidade de reação com a concentração do substrato 2,4-DNPPE para Rx1 e Rx2 promovida por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,050$  a  $0,850 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).





Através dos parâmetros cinéticos obtidos, é possível afirmar que os catalisadores  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  e  $\text{PdCl}_2$ , apresentam praticamente a mesma atividade na reação de clivagem da ligação C-O do substrato 2,4-DNPPE (Tabela 6). Com Rx1 sendo cerca de 11000 vezes mais rápida que a

reação espontânea ( $k_{cat}/k_0$ ), 60 vezes mais catalítica do que Rx2, comparada com a reação espontânea ( $f_{Rx1}/f_{Rx2}$ ), e 25 vezes mais eficiente do que a reação Rx2 ( $E_{Rx1}/E_{Rx2}$ ).

Com relação às constantes de *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ), ambos catalisadores apresentam praticamente o mesmo valor nas duas reações, Rx1 e Rx2, indicando que tanto a reação catalisada por Pd(OAc)<sub>2</sub> quanto por PdCl<sub>2</sub> passam provavelmente pelos mesmos intermediários em Rx1 e Rx2, no entanto, o intermediário para Rx1 é diferente do intermediário para Rx2.

Contudo, mesmo o catalisador Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> apresentando os maiores valores de  $k_{cat}$  e as melhores atividades catalíticas ( $f$ ) para ambas reações, Rx1 e Rx2, a sua eficiência catalítica é menor que a apresentada pelos outros dois sais de paládio (II), especialmente devido aos maiores valores de  $K_M$ . Estes resultados implicam que para ambas as reações (Rx1 e Rx2) o substrato deve interagir com as espécies catalíticas antes da quebra da ligação C-O, e este intermediário tem interação mais forte com os sais de Pd(OAc)<sub>2</sub> e PdCl<sub>2</sub>.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos para a reação de clivagem da ligação C-O do 2,4-DNPPE pelos sais de paládio (II).

Catalisador	Rx	$k_{cat} / \text{min}^{-1} \times 10^3$	$K_M / \text{mol L}^{-1} \times 10^4$	$f^{(a)}$	$E^{(b)} / \text{mol}^{-1} \text{L min}^{-1}$
Pd(OAc) <sub>2</sub>	1	188 ± 0,01	1,2 ± 0,2	11059	1567
	2	3,1 ± 0,1	0,53 ± 0,06	182	59
PdCl <sub>2</sub>	1	186 ± 0,01	1,1 ± 0,1	10941	1691
	2	2,7 ± 0,1	0,47 ± 0,07	159	57
Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub>	1	540 ± 0,05	6,4 ± 0,1	31765	844
	2	5,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	318	42

<sup>(a)</sup>  $f = k_{cat}/k_0$  (fator catalítico), onde  $k_0 = 1,7 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  à 48 °C e pH 7,41 para a hidrólise da reação espontânea; <sup>(b)</sup>  $E = k_{cat}/K_M$  (eficiência catalítica).

Objetivando explicar ainda mais os dados cinéticos obtidos acima, foram realizadas medidas das constantes de velocidade através de experimentos sob as mesmas condições descritas para o estudo da

influência do pH a temperaturas de 44, 48 e 52 °C. As constantes de primeira-ordem,  $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$ , foram plotadas na equação de Arrhenius (3),

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{Ea}{RT} \quad (3)$$

e a partir de um gráfico de  $\ln k/T$  em função de  $1/T$  foi possível se obter uma reta cujo coeficiente é a energia de ativação da reação ( $Ea$ ) dividida pela constante universal dos gases perfeitos ( $R=8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e cujo intercepto no eixo das ordenadas fornece o logaritmo natural do fator pré-exponencial  $A$  (Tabela 7 e Figura 48 - APÊNDICE H). Sendo assim, os dados termodinâmicos, apresentados na Tabela 7, revelam que em Rx1 o rearranjo das ligações é mais importante do que em Rx2 e que o estado de transição de Rx1 é mais organizado.

Tabela 7 – Parâmetros Termodinâmicos de Arrhenius obtidos da linearização dos gráficos de  $\ln k$  versus  $1000/T$  (Figura 48 - APÊNDICE H).

<b>Parâmetros Termodinâmicos de Arrhenius</b>			
<b>Catalisador</b>	<b>Rx</b>	<b><math>Ea</math> (kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>logA</b>
Pd(OAc) <sub>2</sub>	1	110,36	15,86
	2	146,51	20,14
PdCl <sub>2</sub>	1	77,51	10,57
	2	108,49	14,04
Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub>	1	78,45	10,97
	2	100,43	13,02

### 4.3 Estudos das Espécies Envolvidas

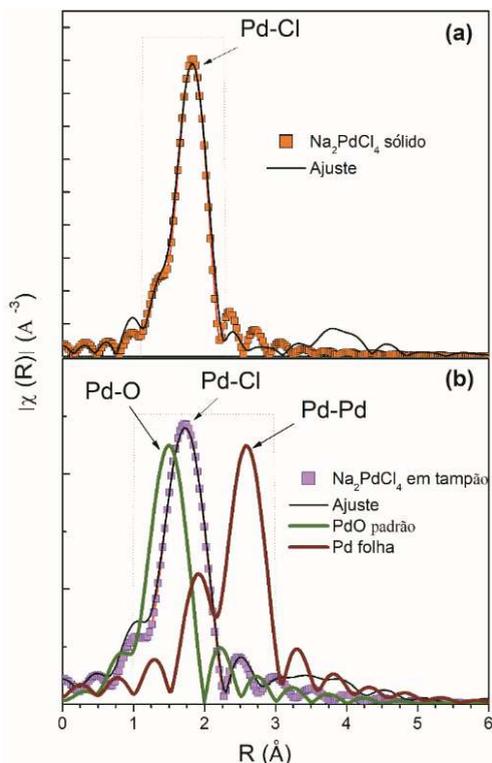
Como discutido anteriormente, a hipótese mais geral na literatura é que esse mecanismo de reação ocorre via adição oxidativa da ligação propargil C-O ao centro metálico de Pd(0). Assim, para investigar a verdadeira natureza das espécies catalíticas, foi avaliado a hipótese do envolvimento de Pd(0) formado espontaneamente a partir da redução de Pd(II) no meio reacional, uma etapa comumente reportada na literatura.

Primeiramente, foi realizada a análise por espectroscopia de absorção de raios X (XAS) do meio reacional, após 3 h nas mesmas condições utilizadas durante a reação padrão (meio aquoso tamponado, pH 7,41, a 48 °C), porém sem adição de substrato. O sal Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> foi escolhido devido a sua maior solubilidade em água.

Como mostrado na Figura 26, os resultados do ajuste do EXAFS mostram um sinal intenso de ligação Pd(II)-Cl e a ausência dos sinais de ligação Pd(0)-Pd(0) ou Pd(II)-O, que seriam observados se espécies de Pd(0) ou produtos de hidrólise de Pd(II) tivessem sido formadas no meio reacional durante as 3 h de experimento.<sup>99,100</sup>

Assim, a partir destes resultados fica claro que, sob estas condições reacionais, não se forma espontaneamente Pd(0), mas não se exclui a possível formação de Pd(0) na presença do substrato, devido a uma reação do tipo Wacker, por exemplo. A natureza dos catalisadores na presença do substrato não foi investigada por XAS devido à baixa solubilidade do 2,4-DNPPE.

Figura 26 – Transformada de Fourier do espectro de EXAFS para (a) padrão comercial sólido de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ; (b)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em meio aquoso de tampão fosfato c ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO) (pH 7,4) após 3 h a 48 °C e padrões teóricos de PdO e folha de Pd(0).

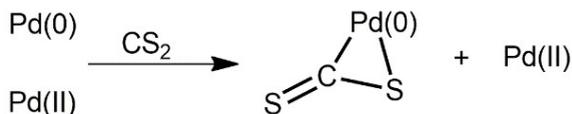


Com estas informações, podemos propor que existe, pelo menos, dois caminhos mecanísticos atuando na fase cinética mais rápida. Se Pd(0) está de alguma forma se formando na presença do substrato, então a reação está passando pelo caminho de adição oxidativa do Pd(0) no grupo propargila ou, o outro caminho seria a hidratação do grupo propargila coordenada a um átomo de Pd(II) (Esquema 14, vias i e ii, respectivamente).

Para distinguir entre esses possíveis caminhos, foi realizado dois experimentos cinéticos adicionando-se CS<sub>2</sub> a reação com Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> como catalisador. Em um experimento o CS<sub>2</sub> foi adicionado no início da reação (tempo zero) e no outro após 2 h de reação. O CS<sub>2</sub> atua como um envenenador de catalisador para os catalisadores homogêneos e heterogêneos de Pd(0) em temperaturas abaixo de 50 °C, enquanto as espécies de Pd(II) não são afetadas (Esquema 15).<sup>101</sup>

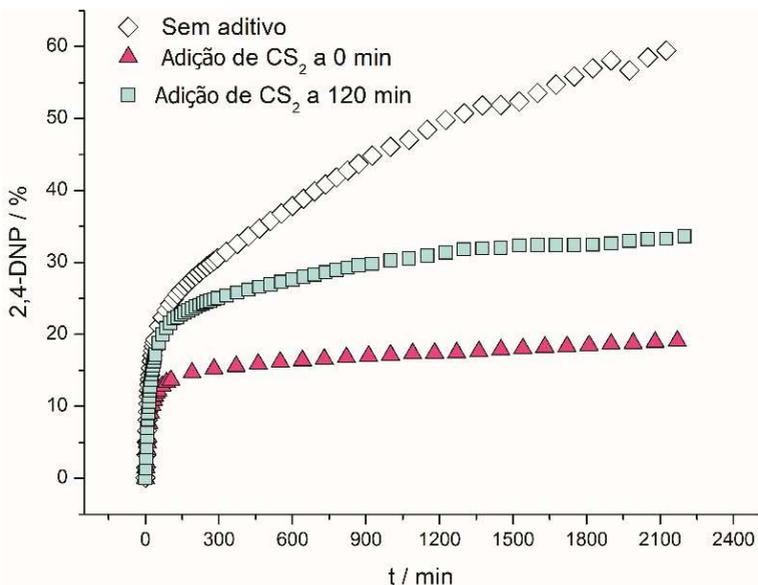
Como pode ser visto na Figura 27, a velocidade de reação inicial para a fase mais rápida em todos os casos é semelhante. Este resultado indica que não há participação de espécies de Pd(0) na fase mais rápida (Rx1). Por outro lado, a velocidade de reação da fase mais lenta (Rx2) foi intensamente afetada pela adição de CS<sub>2</sub>, e muito provavelmente devido à participação de Pd(0) nesta fase da reação.

Esquema 15 - Representação esquemática do envenenamento do catalisador pelo CS<sub>2</sub>.<sup>101</sup>



FONTE: Adaptada da referência 101.

Figura 27 - Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com a adição de  $\text{CS}_2$  a 10 e 120 minutos de reação e a reação sem aditivo para comparação. Condições:  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(\text{CS}_2) = 0,0604 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 a  $48^\circ\text{C}$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).



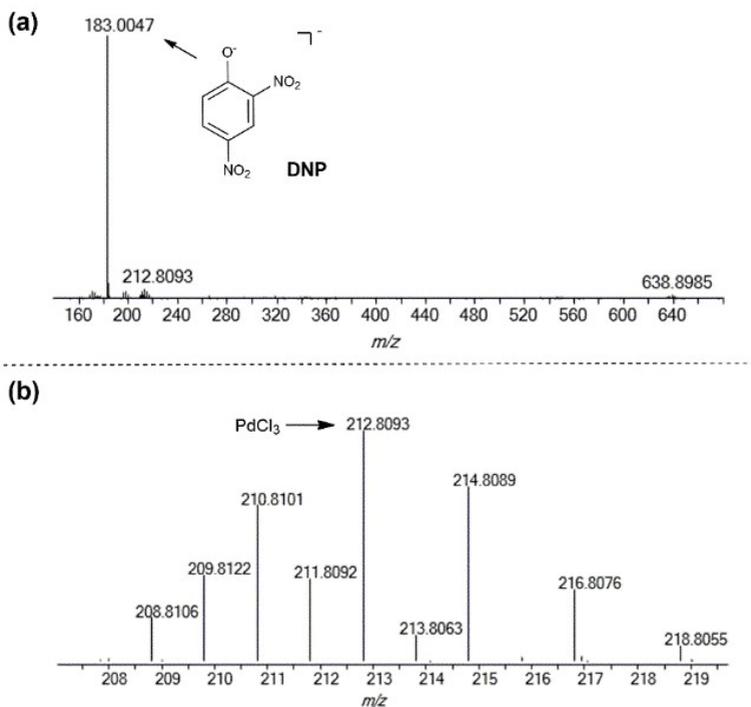
Dando continuidade ao objetivo de se obter uma descrição com mais detalhes da natureza das espécies catalíticas envolvidas nas reações de quebra da ligação C-O, espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (ESI-HRMS) foi utilizada para monitorar a reação e possivelmente detectar intermediários chave de reação.<sup>46,102-104</sup>

A ESI é uma técnica de ionização suave que pode ser usada para analisar tanto cátions quanto ânions, exibe alta sensibilidade e permite a transferência imediata para a fase gasosa da maioria das espécies iônicas presentes em solução.

Trabalhando no modo de íons negativos, o monitoramento *in situ* da reação, com 20 mol% de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em solução aquosa tamponada com fosfato de sódio e potássio (pH 7,4, 5% DMSO), forneceu, após 10 minutos do início da reação, a identificação das seguintes espécies: o produto 2,4-DNP ( $m/z = 183$ ) como a espécie principal (Figura 28a),  $\text{PdCl}_3$  ( $m/z = 212,8$ ) como a principal espécie de Pd livre (Figura 28b) e

três outras espécies de Pd interagindo com o substrato, com  $m/z$  434,8, 416,9 e 638,9 (Figura 29a-b e Figura 30). No modo de íons positivos não foi observado nenhuma espécie contendo distribuição isotópica para paládio e nem mesmo espécies relevantes na investigação mecanística proposta. .

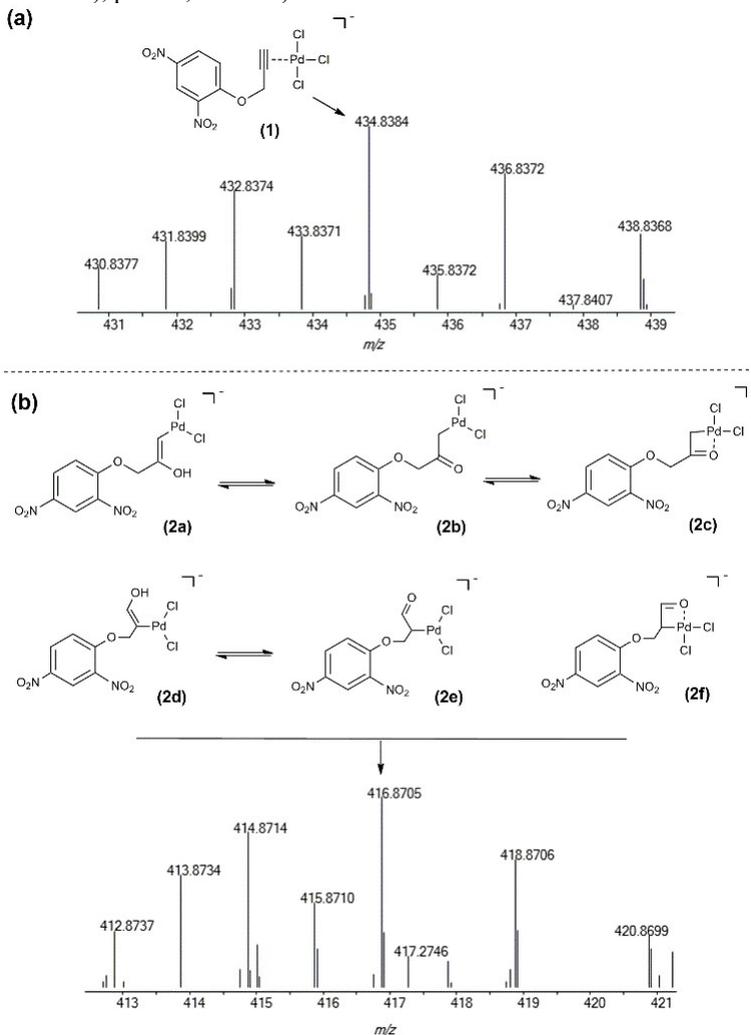
Figura 28 – ESI(-)-HRMS do meio reacional após 10 min de reação. O íon de  $m/z$  212,8 (b) foi detectado em menor abundância comparado ao íon do produto 2,4-DNP, assim a região amplificada do espectro está apresentada. Condições:  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 2,12 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 20 \text{ mol}\%$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (5% DMSO),  $\text{pH} = 7,4$  a  $48^\circ\text{C}$ .



A espécie com  $m/z$  434,8 (1, Figura 29a) é um  $\pi$ -complexo de  $\text{PdCl}_3$  com uma molécula de 2,4-DNPPE, já o sinal de Pd com  $m/z$  416,9 pode ser um dos vários isômeros possíveis formados a partir da hidratação (Markonikov ou anti-Markonikov) do complexo  $\pi$ -[2,4-DNPPE- $\text{PdCl}_3$ ] (2, Figura 29b). Mais adiante, veremos que os cálculos computacionais

revelam o isômero cetona como sendo a espécie mais estável (em torno de 16 kcal mol<sup>-1</sup>).

Figura 29 – ESI(-)-HRMS do meio reacional após 10 min de reação. Os íons de  $m/z$  434,8 (a) e  $m/z$  416,9 foram detectados em menores abundâncias comparados ao íon do produto 2,4-DNP, assim as regiões amplificadas do espectro estão apresentadas. Condições:  $c$  (2,4-DNPPE) = 2,12 mmol L<sup>-1</sup>,  $c$  (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 20 mol%, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C).

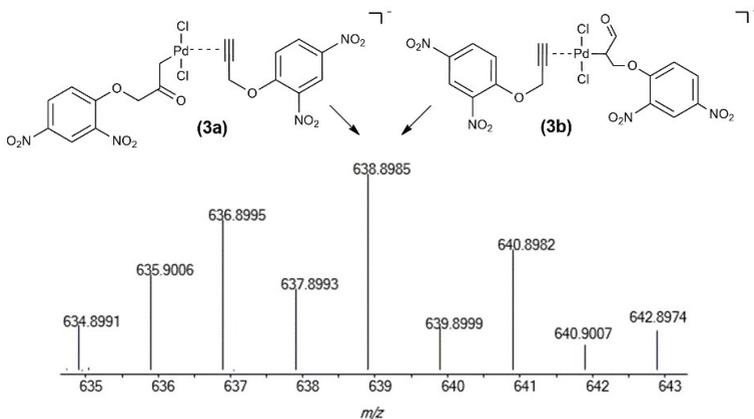


A terceira espécie identificada é um intermediário hidrolisado (Markovnikov ou anti-Markovnikov) complexado com outra molécula de substrato 2,4-DNPPE através de uma interação  $\pi$  (**3**, Figura 30).

A concordância entre os padrões isotopológicos e as massas exatas experimentais e calculadas (Figura 49 - APÊNDICE I) corrobora as estruturas e composições elementares propostas.

Além disso, a análise de ESI-HRMS após 35 min de reação mostra que as espécies **1** e **2** ainda estão presentes, mas após 120 min somente o produto 2,4-DNP pode ser observado. E mais, a análise de um precipitado formado após 35 min de reação, também identificou um íon de  $m/z$  473 (Figura 50 - APÊNDICE J), correspondente ao intermediário hidrolisado **6**.

Figura 30 - ESI(-)-HRMS do meio reacional após 10 min de reação. O íon de  $m/z$  638,9 foi detectado em menor abundância comparados ao íon do produto 2,4-DNP, assim a região amplificada do espectro está apresentada. Condições:  $c$  (2,4-DNPPE) = 2,12 mmol L<sup>-1</sup>,  $c$  (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) = 20 mol%, em meio aquoso de tampão fosfato  $c$  (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C).

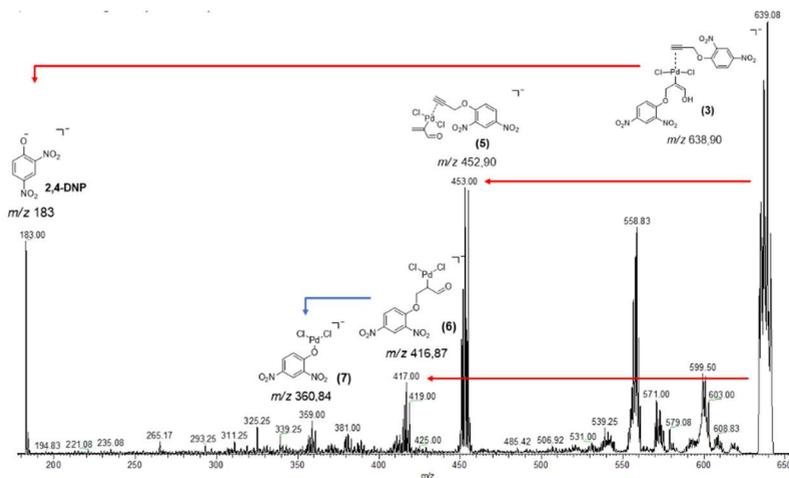


O íon **3** também teve sua caracterização confirmada por espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* através de dissociação induzida por colisão com nitrogênio (ESI-CID-MS/MS) (Figura 32). O mecanismo de fragmentação desse intermediário de reação reflete sua reatividade intrínseca além de, suportar muito bem a estrutura proposta para o intermediário **3**.

Curiosamente, este intermediário mostra dois tipos de ligação C-O, o que significa que existem dois caminhos possíveis para a reação de

despropargilação e, revela informações importantes sobre o mecanismo de reação.

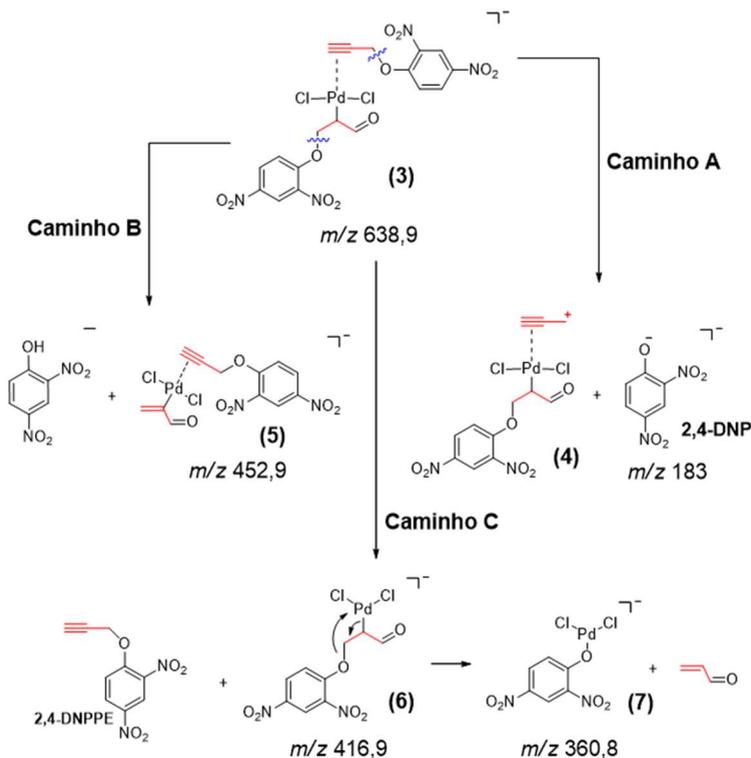
Figura 31 – ESI(-)-MS/MS do íon **3** de  $m/z$  638.



O caminho A (Figura 32) é a reação de quebra da ligação C-O na porção propargila de uma molécula de 2,4-DNPPE coordenada ao centro de Pd, para formar uma molécula de 2,4-DNP ( $m/z$  183) e um complexo Pd-carbocation propargílico, **4** (ou como sua forma mesomérica, um alenil carbocation).<sup>105</sup>

Por outro lado, o caminho B envolve a clivagem da ligação C-O de uma molécula de 2,4-DNPPE hidratada inserida no centro de Pd, produzindo uma molécula de 2,4-DNP e o íon **5** de  $m/z$  453, apresentando em sua estrutura uma molécula de 2,4-DNPPE e uma molécula de acrilaldeído coordenadas ao complexo PdCl<sub>2</sub>. A fragmentação de **3** pelo caminho C é improdutiva, mas suporta fortemente a estrutura proposta para o intermediário **3**.

Figura 32 – Reações induzidas por CID em fase gasosa para o intermediário **3** de  $m/z$  638.



Com a identificação dessas espécies por ESI-HRMS e juntamente com os resultados dos estudos cinéticos, sugere-se que o caminho de reação mais provável envolve a hidratação do alcino e não a adição oxidativa, pelo menos para a parte inicial da reação, ou seja, para a fase mais rápida Rx1. Assim, para explorar em detalhes a reação rápida, estudos computacionais para a Rx1 foram realizados.

Com base nos resultados de XAS e ESI-HRMS, o complexo [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> foi utilizado como catalisador e como substrato modelo foi escolhido o éter metil-propargílico a fim de simplificar os cálculos. Todas as simulações foram realizadas com um modelo implícito de solvente e duas moléculas extras de água foram adicionadas para levar em conta o efeito da solvatação explícita, uma interagindo com a parte enol e a outra com o grupo de saída. As geometrias e frequências foram calculadas com

o funcional PBE0<sup>106</sup> e, para obter valores de energias com maior precisão, DLPNO-CCSD(T)<sup>107</sup> foi utilizado para calcular as energias e a correção HF-gCP<sup>108</sup> foi adicionada para minimizar artefatos de conjunto de bases.

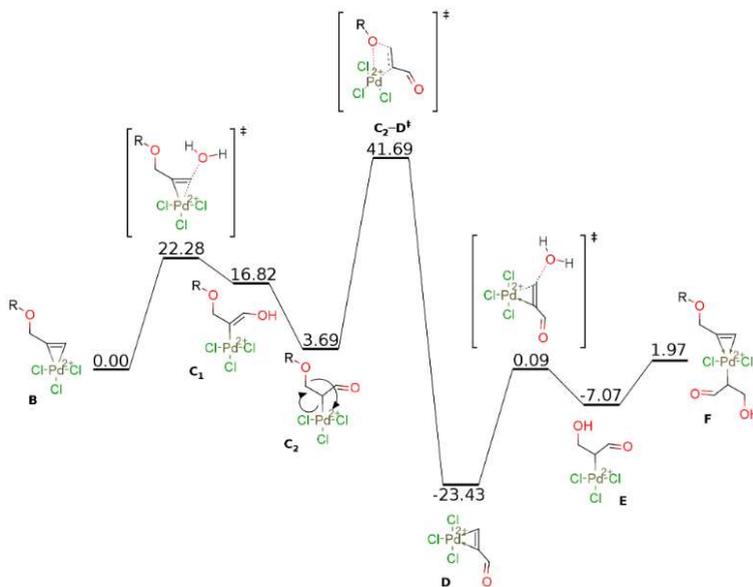
Surpreendentemente, a diferença de energia entre as hidratações regioquímicas de anti-Markonikov e Markonikov do complexo Pd-propargil para formar enóis é baixa (<1 kcal mol<sup>-1</sup>), ficando dentro do erro do método (Figura 51 e Figura 52 - APÊNDICE K). Assim, ambos os caminhos para a formação do produto foram explorados. Após a formação do enol, uma tautomerização pode ocorrer (também sugerida por ESI-HRMS, Figura 29b), e os cálculos mostraram que os tautômeros ceto são os mais estáveis.

Em seguida, foi feita a investigação para a etapa de quebra da ligação C-O para ambos intermediários regioquímicos. Para o intermediário ceto anti-Markonikov (C2, Figura 51 - APÊNDICE K), a primeira hidrólise tipo S<sub>N</sub><sup>2</sup> esperada não se apresentou muito mais rápida que a reação não catalisada, com o estado de transição sendo estabilizado por cerca de 8 kcal mol<sup>-1</sup>.

Assim, outros caminhos mecanísticos foram investigados, como um ataque intramolecular do oxigênio ( $\Delta G^\ddagger = 58,7$  kcal mol<sup>-1</sup>), a eliminação  $\beta$ -H do Pd seguida de uma hidrólise (esse caminho foi posteriormente descartado devido à alta acidez do “H” metilênico) e então, concluiu-se que um mecanismo de eliminação  $\beta$ -O é o caminho mais coerente, com a quebra da ligação de C-O antes do ataque subsequente de uma molécula de água ( $\Delta G^\ddagger = 38$  kcal mol<sup>-1</sup>).

Já, para o intermediário ceto Markonikov (C'2, Figura 52- APÊNDICE K), a hidrólise tipo S<sub>N</sub><sup>2</sup> apresentou uma energia de ativação muito maior ( $\Delta G^\ddagger = 56,76$  kcal mol<sup>-1</sup>) do que a eliminação  $\beta$ -O do intermediário ceto anti-Markonikov (Figura 51). O cálculo completo do mecanismo principal é mostrado na Figura 33.

Figura 33 – Perfil energético (kcal mol<sup>-1</sup>) calculado para a reação catalisada por [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> em água.



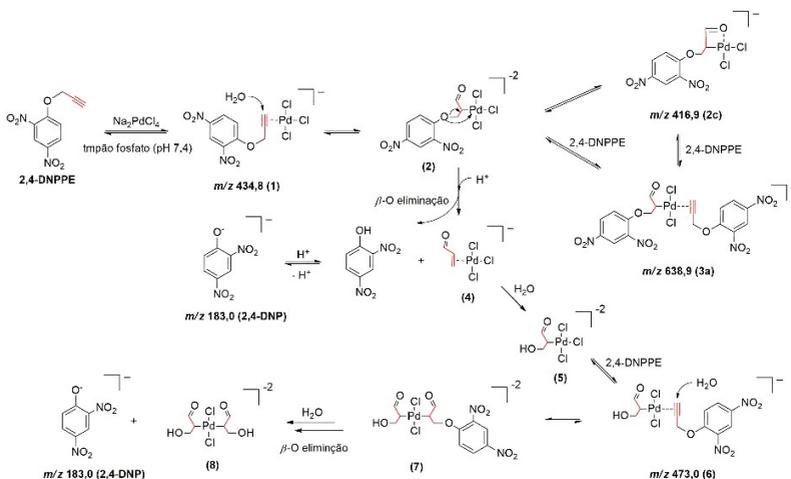
Portanto, é possível propor que o caminho de reação mais provável para Rx1 envolve a coordenação de uma molécula do substrato 2,4-DNPPE ao centro de Pd(II), seguido por um ataque anti-Markonikov de uma molécula de água na porção propargil, antes da quebra da ligação C-O via  $\beta$ -O eliminação (Figura 34).

O caminho proposto para Rx1 apresentado na Figura 34 assume que para o segundo *turnover*, assim que o segundo substrato se coordena ao complexo de paládio, o mecanismo de eliminação é o mesmo, também sugerido pela modelagem teórica (Figura 53 – APÊNDICE K). E assim, as etapas envolvidas na clivagem da ligação C-O na fase rápida são 2→4→5→6→7 e, como produtos finais tem-se dois equivalentes de 2,4-DNP e o complexo cloreto de bis(1-hidroxi-3-oxopropan-2-il) de paládio(II), **8**.

Embora a formação de **8** não possa ser confirmada por análises de ESI-HRMS ou mesmo por RMN H<sup>1</sup> (Figura 54 - APÊNDICE L), sua existência é suportada pela detecção de apenas dois *turnovers* durante a fase rápida Rx1 e ainda, após a segunda eliminação, a ligação de uma terceira molécula de substrato é menos provável, que deve estar

relacionado ao impedimento estérico e também ao menor caráter eletrofílico do átomo de Pd(II).

Figura 34 - Caminhos propostos para Rx1 na reação de despropargilação do substrato 2,4-DNPPE mediada por sais de Pd(II).



Para se certificar da ligação de apenas duas moléculas de substrato éter propargílico os valores de  $K_{\text{eq}}$  para a inserção de até três moléculas foram calculadas. Para a primeira inserção obteve-se um valor de  $6,9 \times 10^{-7}$  (Figura 51 – APÊNDICE K) e para a segunda  $2,4 \times 10^{-7}$  (Figura 53 – APÊNDICE K), porém quando se calcula o valor para o deslocamento de mais um cloreto por uma terceira molécula de substrato obtém-se uma constante de  $1,9 \times 10^{-12}$  (Figura 53 – APÊNDICE K) e provavelmente isto não deve estar ocorrendo, neste caso, o complexo **8** pode ser considerado um catalisador de Pd inibido pelo produto.

Para testar essa hipótese, um experimento foi realizado adicionando-se álcool propargílico no meio reacional na presença do catalisador  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Um período de 2 horas, a  $48^\circ\text{C}$ , foi aguardado antes da adição do substrato 2,4-DNPPE.

Com este experimento esperava-se que durante este tempo de incubação o álcool propargílico, complexando-se ao Pd(II), seria hidrolisado e inibiria a complexação adicional de uma terceira e até uma quarta molécula de substrato (Esquema 16). De fato, como apresentado na Figura 35, a fase rápida Rx1 foi muito mais lenta com a adição do álcool propargílico.

Esquema 16 – Representação esquemática proposta para a inibição do catalisador pelo produto.

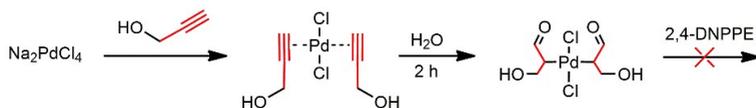
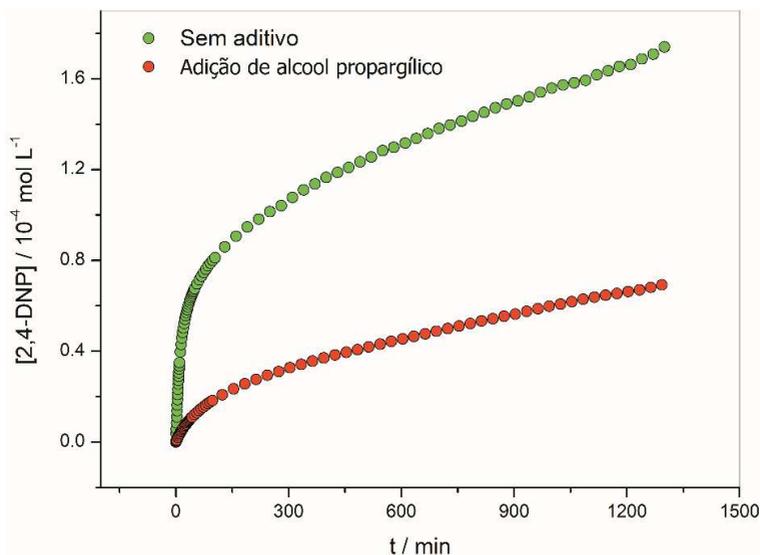


Figura 35 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com a adição de álcool propargílico e a reação sem aditivo para comparação. Condições:  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 0,025 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,175 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(\text{C}_3\text{H}_3\text{OH}) = 0,050 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 a  $48^\circ\text{C}$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).



Ainda, quando 50 mol% de Pd(II) é utilizado na catálise da reação de *O*-despropargilação do 2,4-DNPPE, a conversão quantitativa do substrato em 2,4-DNP é observada em menos de 2 h, através de um perfil cinético de uma única reação de primeira-ordem (Figura 55 - APÊNDICE M), para todos os três sais de Pd(II) utilizados neste estudo. Juntos, estes resultados corroboram com o mecanismo proposto para a fase rápida Rx1.

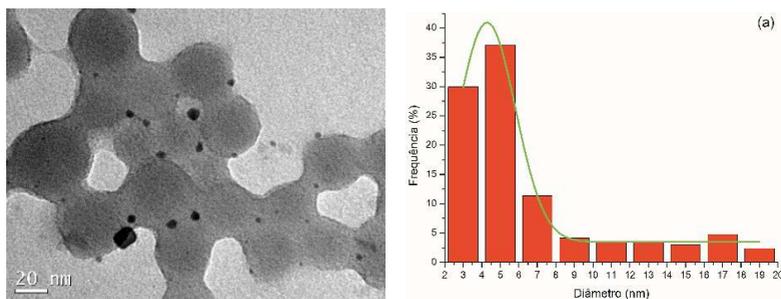
Assim sendo, pode-se concluir que o metal tem uma dupla função nesta primeira etapa: além de facilitar a hidratação da tripla ligação ele

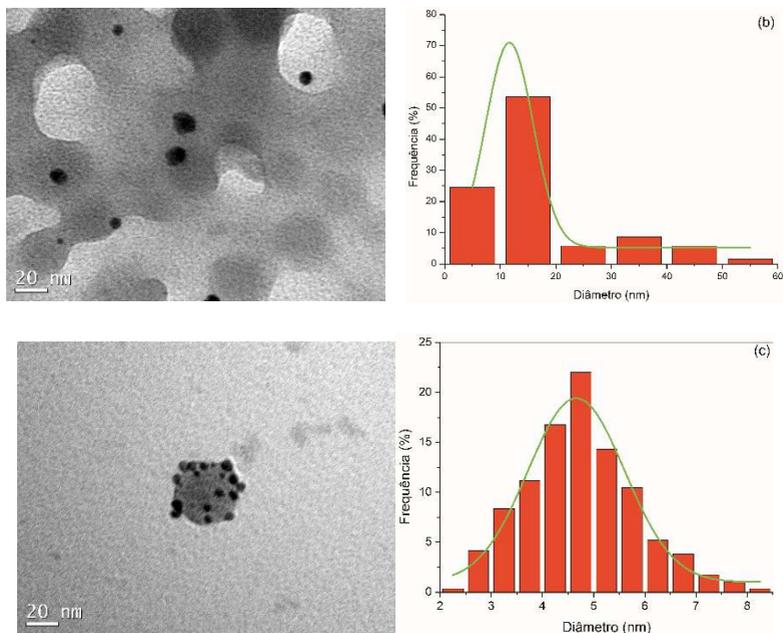
também atua estabilizando o intermediário tautômero ceto durante a quebra da ligação C-O.

Quando se faz uma análise das evidências cinéticas juntamente com o mecanismo já proposto para a fase rápida Rx1, com apenas dois *turnovers*, é possível sugerir que a fase lenta Rx2, atuando desde o início da reação, é governada por um caminho de reação diferente. Quando a reação de despropargilação do substrato 2,4-DNPPE catalisada por todos os sais de Pd(II) utilizados neste estudo foi realizada em concentrações maiores, a formação de um precipitado escuro foi observada.

O meio reacional, após completado a reação, contendo os precipitados foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 36) e o precipitado isolado da reação catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  foi analisado por espectroscopia de absorção de raios X (XANES/EXAFS) (Figura 37).

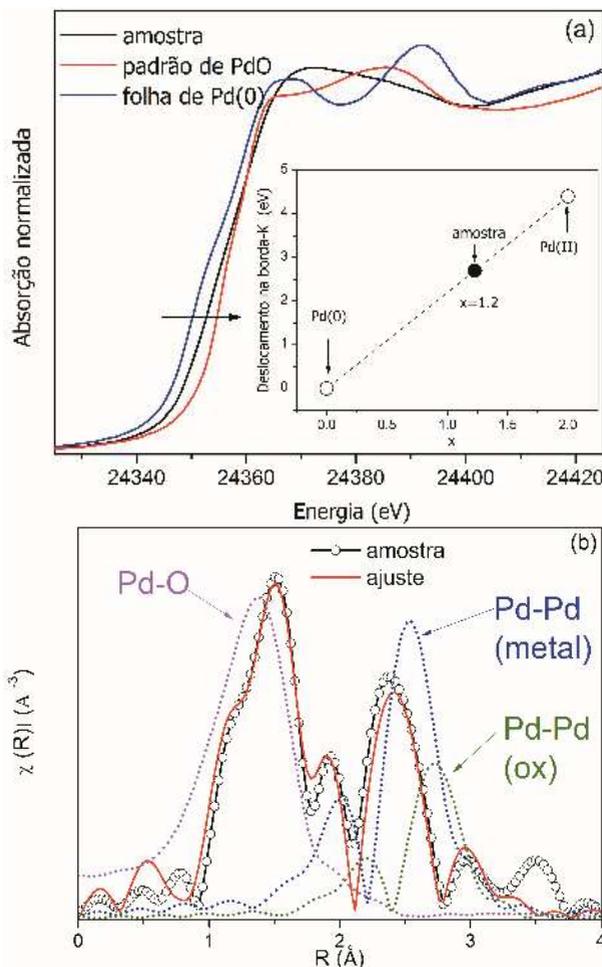
Figura 36 – Micrografias eletrônica de transmissão e histogramas de distribuição de tamanho do precipitado formado na reação de despropargilação do 2,4-DNPPE promovida por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (diâmetro médio = 5,05 (1,94) nm), (b)  $\text{PdCl}_2$  (diâmetro médio = 10,43 (4,32) nm) e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  (diâmetro médio = 4,65 (1,88) nm). Condições:  $c(\text{Pd(II)}) = 0,212 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 2,12 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).





Como apresentado na Figura 36, as análises por microscopia eletrônica de transmissão revelaram, embora em concentração muito baixa, a presença de nanopartículas de Pd com tamanho variando de 4 a 10 nm (Pd-NPs), dependendo da fonte de paládio utilizada como catalisador.

Figura 37 – Espectros de XAS do precipitado formado na reação de despropargilação do 2,4-DNPPE promovida por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . (a) região do XANES dos padrões da folha Pd(0), Pd(II) na forma de PdO e a amostra; (b) região do EXAFS; espectro, ajuste experimental e trajetórias teóricas Pd-O (proveniente do PdO), Pd-Pd (proveniente da folha de Pd e Pd-Pd (proveniente do PdO)). Condições:  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 0,350 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 3,50 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).



Já a análise por XANES na borda K do Pd indicou que o paládio presente no precipitado se encontra em um estado de oxidação mista quando confrontados com os padrões de Pd(0) e Pd(II) puros.

Para comparação, o limiar de energia da borda K foi definido como o ponto 0,4 no espectro de intensidade (seta preta na Figura 37a). O valor obtido (inserido) concorda com a literatura, onde o limiar se move para energias mais altas com o aumento do estado de oxidação dos átomos de Pd. O ponto intermediário, obtido por ajustes de combinação linear, sugere um estado de oxidação teórico médio de +1,2 para o Pd do precipitado, ou seja, uma predominância de Pd(II).

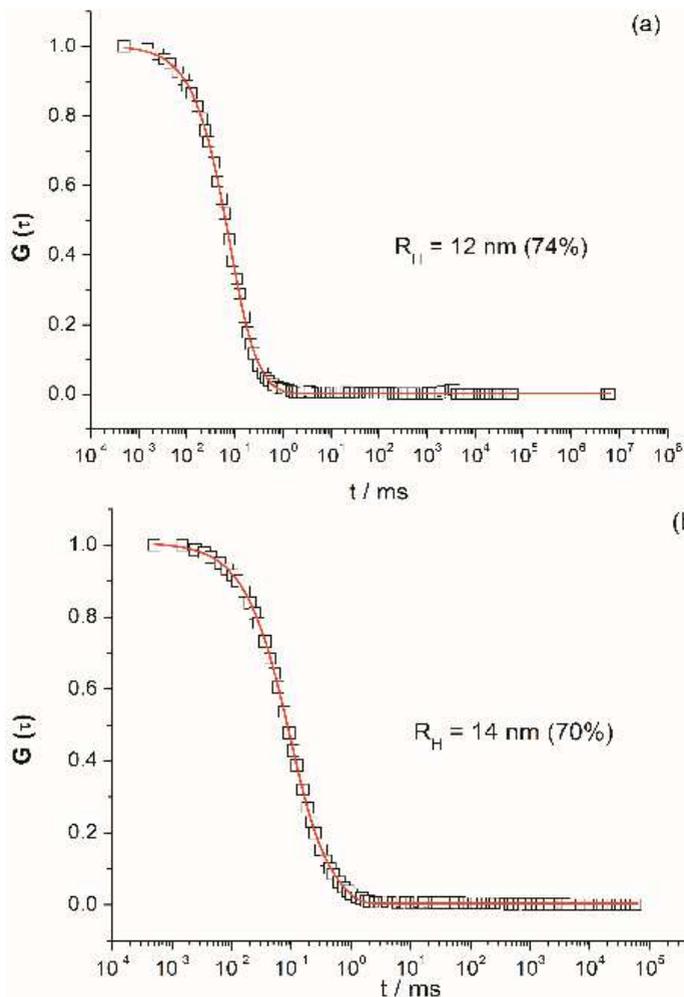
Os resultados da análise do mesmo espectro na região do EXAFS (Figura 37b) corroboram as informações obtidas pela XANES, que indica uma mistura de Pd em dois estados de oxidação.

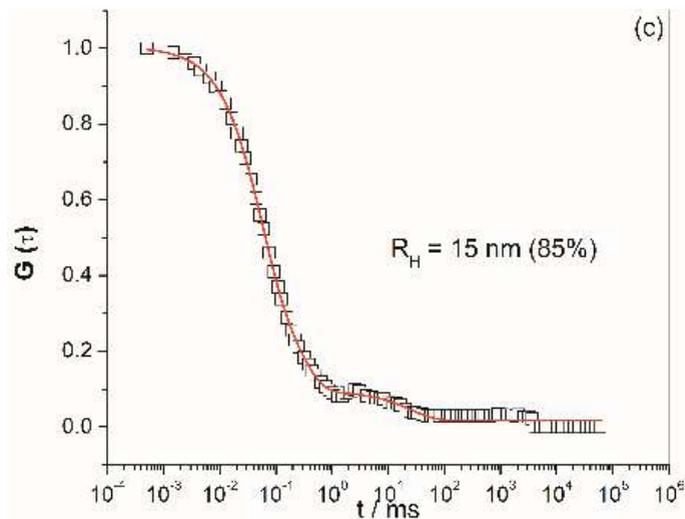
A razão estimada foi um parâmetro do procedimento de adaptação, onde a amplitude do sinal foi ponderada por um fator de proporcionalidade. Este fator indica que o sinal de EXAFS é formado por aproximadamente 70% de PdO e 30% Pd metálico. Além disso, a distância atômica linear para Pd-O obtida ( $R = 1,94 + 0,01 \text{ \AA}$ ) foi muito próxima do padrão sólido de PdO ( $R = 2,02 \text{ \AA}$ ). O mesmo pode ser visto para as distâncias atômicas Pd-Pd no PdO ( $R = 2,96 + 0,01 \text{ \AA}$  obtido,  $R = 3,03 \text{ \AA}$  teórico) e no Pd metálico ( $R = 2,72 + 0,01 \text{ \AA}$  obtido,  $R = 2,75 \text{ \AA}$  teórico).

A presença de Pd-NPs no meio reacional também foi confirmada monitorando-se a reação por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Como apresentado na Figura 38, as nanopartículas no meio reacional para todos os sais de Pd(II) utilizados neste estudo (razão hidrodinâmica entre 12 e 15 nm) já são observadas após os primeiros 5 min de reação, no entanto, como dito anteriormente, em baixas concentrações.

Na Figura 56 (APÊNDICE – N) é possível acompanhar a aparência das Pd-NPs através do espalhamento de luz dinâmico em diferentes tempos da reação de despropagilação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ .

Figura 38 – Espalhamento de luz dinâmico após 5 minutos da reação de despropagação do 2,4-DNPPE catalisada por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . A razão hidrodinâmica ( $R_H$ ) e a porcentagem da população estão inseridas. Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à  $48^\circ\text{C}$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).





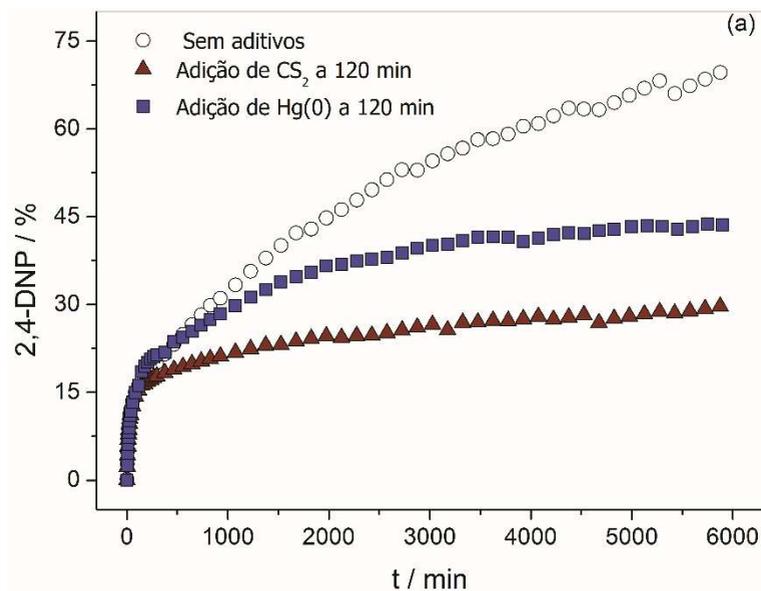
Essas observações motivaram um investimento maior em experimentos de envenenamento para determinar as espécies cataliticamente ativas responsáveis pela fase lenta da reação Rx2. Além dos estudos adicionando-se  $\text{CS}_2$  ao meio reacional também se realizou estudos cinéticos adicionando-se mercúrio metálico.

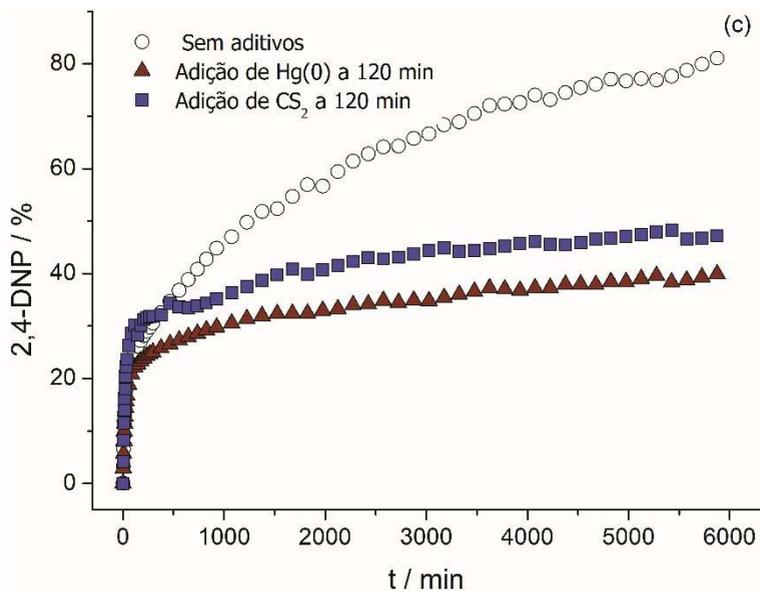
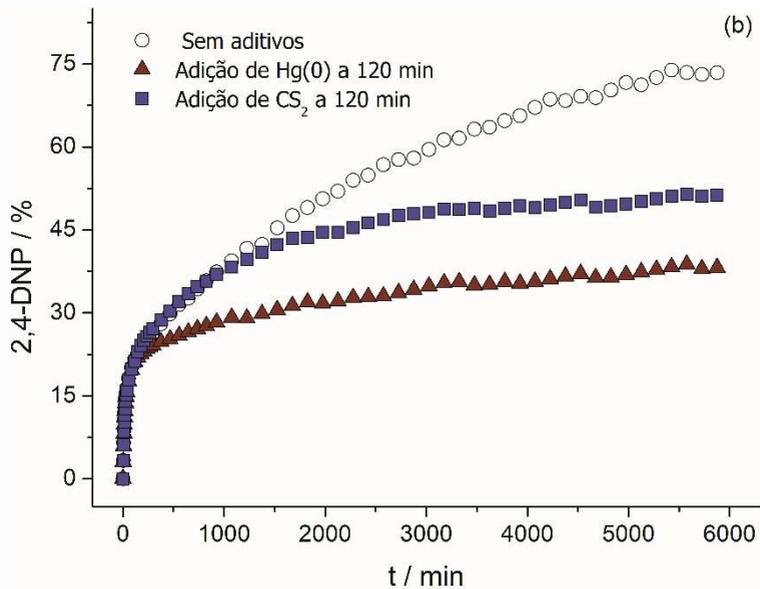
Como discutido anteriormente, o  $\text{CS}_2$  atua como um envenenador de catalisador para os catalisadores homogêneos e heterogêneos de Pd(0) em temperaturas abaixo de  $50^\circ\text{C}$ , enquanto as espécies de Pd(II) não são afetadas.<sup>101</sup> Já o Hg(0) envenena os catalisadores heterogêneos metálicos, amalgamando o metal ou adsorvendo na superfície do metal, especialmente paládio, com complexos homogêneos permanecendo inalterados.<sup>109</sup>

Os perfis cinéticos de reação com a adição no meio reacional de  $\text{CS}_2$  e Hg(0) após 120 min de reação, comparados com as reações sem os aditivos, estão apresentados na Figura 39. Como pode ser visto, a presença de  $\text{CS}_2$  inibiu completamente a atividade catalítica da fase mais lenta da reação Rx2, já a presença de mercúrio metálico inibiu a formação do produto 2,4-DNP em cerca de 60%.

Estes resultados indicam que a atividade catalítica de Rx2 está relacionada principalmente a presença de Pd(0)-NPs formadas durante a reação e/ou Pd(0) lixiviados das NPs. E ainda, explicam o porquê o complexo de Pd(II) **8** (Figura 34) não foi detectado por nenhuma ferramenta analítica empregada.

Figura 39 – Perfis cinéticos da reação da despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada pelos sais (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com adição de  $\text{Hg}(0)$  (213%) e  $\text{CS}_2$  (57% mol) a 120 min de reação. Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).

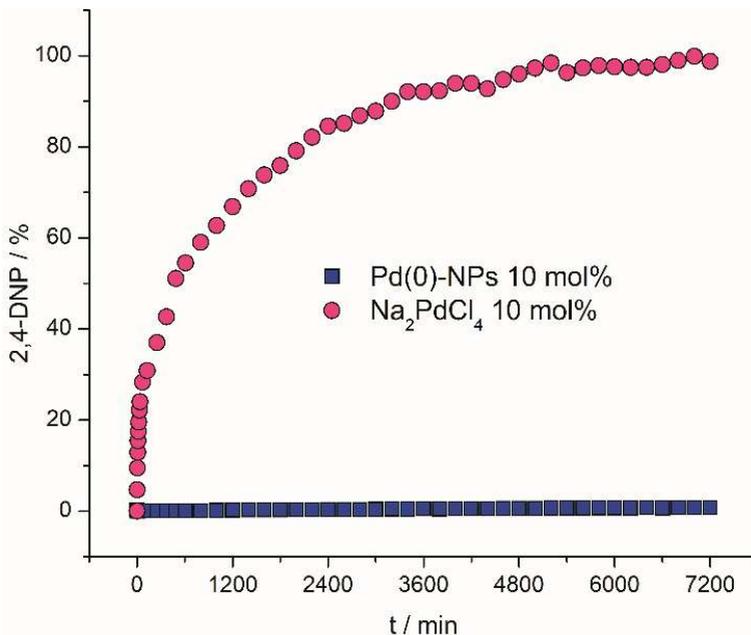




De fato, quando a reação foi realizada na presença de Pd(0)-NPs sintetizadas pelo grupo de pesquisa, através da redução do sal de Pd(II),

$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , com  $\text{NaBH}_4$  na presença de PVP, a reação foi extremamente lenta (Figura 40), suportando a natureza da fase lenta da reação  $\text{Rx}2$ .

Figura 40 - Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  e  $\text{Pd}(0)$ -NPs (preparadas pela redução de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  com  $\text{NaBH}_4$  na presença de PVP). Condições:  $c(\text{Pd}) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 a  $48^\circ\text{C}$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).



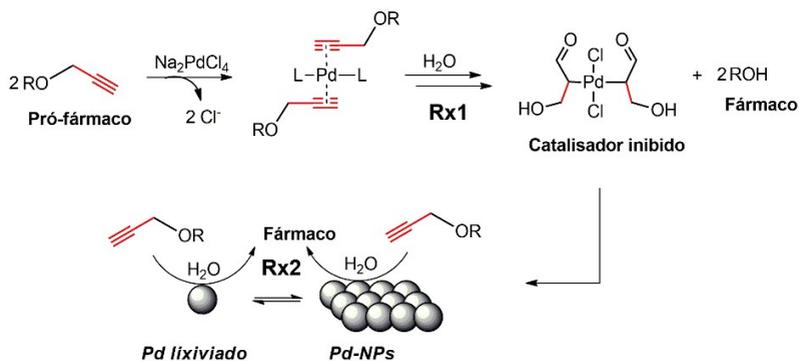
Baseado nestes resultados, um mecanismo simplificado da reação de quebra da ligação C-O do substrato 2,4-DNPPE em  $\text{H}_2\text{O}$  catalisada pelos sais de paládio (II) ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) é proposto e apresentado no Esquema 17.

A cinética da reação é de caráter bifásico apresentando uma fase rápida e uma fase lenta, revelando que o catalisador está sendo alterado para acomodar uma mudança de mecanismo. A fase mais rápida tem constância de apenas dois *turnovers* devido à inibição do catalisador. Isso explica a necessidade frequentemente relatada de altas doses desses catalisadores para uma conversão rápida do substrato.

O mecanismo para a fase mais rápida envolve intermediários chave onde o  $\text{Pd}(\text{II})$  é inserido com orientação anti-Markonikov na porção

propargil, antes da clivagem da ligação C-O por uma  $\beta$ -O eliminação, como sugerido pela modelagem teórica. Enquanto a fase lenta envolve a hidrólise do substrato promovida pelas espécies de Pd(0) formadas durante a primeira fase da reação.

Esquema 17 – Proposta mecanística da reação de quebra da ligação C-O do substrato 2,4-DNPPE em H<sub>2</sub>O catalisada pelos sais de paládio (II) (Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>).



## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada com sucesso a síntese e a caracterização do substrato éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (2,4-DNPPE).

Este pró-fármaco sintetizado foi utilizado para o estudo da reatividade dos sais de paládio ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) frente à catálise da quebra da ligação C-O na da reação de *O*-despropargilação em  $\text{H}_2\text{O}$ .

O estudo da reação de *O*-despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada pelos sais de paládio  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  mostrou que o tampão e o co-solvente tem influência na velocidade inicial da reação, provavelmente inibindo a reação através de complexação com as espécies catalíticas e ainda, o efeito de inibição mais forte para a fase mais rápida Rx1 pelo tampão evidencia que as espécies de Pd envolvidas nesta reação são mais instáveis.

O estudo via técnicas de ESI-HRMS e ESI-CID-MS/MS, evidenciam intermediários chaves de Pd(II) como sendo as espécies ativas para a fase mais rápida da reação.

Os experimentos de RPKA, o estudo via técnicas de XAS, TEM e DLS e o envenenamento da reação com  $\text{CS}_2$  e  $\text{Hg}(0)$  não só demonstram a inibição do catalisador pelo produto como também indicam que a atividade catalítica de Rx2 está relacionada principalmente a presença de Pd(0)-NPs formadas durante a reação e/ou Pd(0) lixiviados das NPs.

O mecanismo da reação de *O*-despropargilação do 2,4-DNPPE foi proposto, onde as espécies de Pd(II), responsáveis pela fase rápida Rx1, se coordenam com as moléculas de 2,4-DNPPE com orientação anti-Markonikov na porção propargil, antes da clivagem da ligação C-O por uma  $\beta$ -O eliminação, como sugerido pela modelagem teórica. Enquanto as espécies de Pd(0), formadas durante a primeira fase da reação, são responsáveis pela hidrólise do substrato na fase lenta da reação.



## 6 PERSPECTIVAS

Essas descobertas ajudarão a projetar e controlar a reatividade seletiva de novos catalisadores de paládio para reações de desproteção de substratos *O*-propargílicos, especialmente complexos discretos de Pd. Por exemplo, imaginamos que os complexos de Pd com ligantes volumosos podem ser uma escolha melhor para esta reação, pois a expulsão do produto da reação pode ser ajustada pelo volume estérico dos ligantes, evitando a inibição do catalisador pelo produto de reação derivado da porção propargil.



## 7 REFERÊNCIAS

- (1) YUSOP, R. M. et al. Palladium-mediated intracellular chemistry. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 239-243, 2011.
- (2) VÖLKER, T. e MEGGERS, E. Transition-metal-mediated uncaging in living human cells — an emerging alternative to photolabile protecting groups. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 25, n., p. 48-54, 2015.
- (3) HSU, H.-T. et al. Bioorthogonal Catalysis: A General Method To Evaluate Metal-Catalyzed Reactions in Real Time in Living Systems Using a Cellular Luciferase Reporter System. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 376-382, 2016.
- (4) WEISS, J. T. et al. Extracellular palladium-catalysed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally activated prodrug approach. **Nature Communications**, v. 5:3277, n., p. 1-9, 2014.
- (5) CHANKESHWARA, S. V.; INDRIGO, E. e BRADLEY, M. Palladium-mediated chemistry in living cells. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 21, n., p. 128-135, 2014.
- (6) WEISS, J. T. et al. Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5395-5404, 2014.
- (7) VÖLKER, T. et al. Progress towards Bioorthogonal Catalysis with Organometallic Compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 39, p. 10536-10540, 2014.
- (8) VINOGRADOVA, E. V. Organometallic chemical biology: an organometallic approach to bioconjugation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 89, n. 11, p. 1619-1640, 2017.
- (9) LI, J. e CHEN, P. R. Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n., p. 129-137, 2016.
- (10) WANG, J. et al. Palladium-Triggered Chemical Rescue of Intracellular Proteins via Genetically Encoded Allene-Caged Tyrosine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 46, p. 15118-15121, 2016.
- (11) WANG, J. et al. Chemical Remodeling of Cell-Surface Sialic Acids through a Palladium-Triggered Bioorthogonal Elimination Reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 18, p. 5364-5368, 2015.
- (12) LI, J. et al. Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. **Nature Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 352-361, 2014.
- (13) TRACEY, M. P.; PHAM, D. e KOIDE, K. Fluorometric imaging methods for palladium and platinum and the use of palladium for imaging biomolecules. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 14, p. 4769-4791, 2015.

- (14) UNCITI-BROCETA, A. et al. Extracellular Palladium-Catalyzed Dealkylation of 5-Fluoro-1-propargyl-uracil as a Bioorthogonally Activated Prodrug Approach. **Synlett**, v. 25, n. 11, p. A90-A92, 2014.
- (15) TONGA, G. Y. et al. Supramolecular regulation of bioorthogonal catalysis in cells using nanoparticle-embedded transition metal catalysts. **Nature Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 597-603, 2015.
- (16) GARNER, A. L.; SONG, F. e KOIDE, K. Enhancement of a Catalysis-Based Fluorometric Detection Method for Palladium through Rational Fine-Tuning of the Palladium Species. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 14, p. 5163-5171, 2009.
- (17) MARTÍNEZ-CALVO, M. e MASCAREÑAS, J. L. Organometallic catalysis in biological media and living settings. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 359, n., p. 57-79, 2018.
- (18) SLETTEN, E. M. e BERTOZZI, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 38, p. 6974-6998, 2009.
- (19) CHALMERS, S. et al. Selective Uncoupling of Individual Mitochondria within a Cell Using a Mitochondria-Targeted Photoactivated Protonophore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 2, p. 758-761, 2012.
- (20) WU, B. et al. 2,4 DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington's disease. **Experimental Neurology**, v. 293, n., p. 83-90, 2017.
- (21) KHAN, R. S. et al. Mitochondrial Uncoupler Prodrug of 2,4-Dinitrophenol, MP201, Prevents Neuronal Damage and Preserves Vision in Experimental Optic Neuritis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n., p. 1-10, 2017.
- (22) GEISLER, J. G. et al. DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya. **Alzheimer's & dementia**, v. 13, n. 5, p. 582-591, 2017.
- (23) TRADER, D. J. e CARLSON, E. E. Chemoselective hydroxyl group transformation: an elusive target. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 10, p. 2484-2493, 2012.
- (24) TOMÁS-GAMASA, M. et al. Transition metal catalysis in the mitochondria of living cells. **Nature Communications**, v. 7, n., p. 12538-12548, 2016.
- (25) BARANY, G. e MERRIFIELD, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function [12]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 22, p. 7363-7365, 1977.
- (26) WONG, C.-H. e ZIMMERMAN, S. C. Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 49, n. 17, p. 1679-1695, 2013.

- (27)ISIDRO-LLOBET, A.; ÁLVAREZ, M. e ALBERICIO, F. Amino Acid-Protecting Groups. **Chemical Reviews (Washington, DC, United States)**, v. 109, n. 6, p. 2455-2504, 2009.
- (28)RAMIL, C. P. e LIN, Q. Bioorthogonal chemistry: strategies and recent developments. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 49, n. 94, p. 11007-11022, 2013.
- (29)LIM, R. K. V. e LIN, Q. Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 46, n. 10, p. 1589-1600, 2010.
- (30)MCKAY, CRAIG S. e FINN, M. G. Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 9, p. 1075-1101, 2014.
- (31)GONG, Y. e PAN, L. Recent advances in bioorthogonal reactions for site-specific protein labeling and engineering. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 17, p. 2123-2132, 2015.
- (32)YANG, M. Y.; LI, J. e CHEN, P. R. Transition metal-mediated bioorthogonal protein chemistry in living cells. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 18, p. 6511-6526, 2014.
- (33)MURAHASHI, T.; OGOSHI, S. e KUROSAWA, H. New direction in organopalladium chemistry: Structure and reactivity of unsaturated hydrocarbon ligands bound to multipalladium units. **Chemical Record**, v. 3, n. 2, p. 101-111, 2003.
- (34)PRESCHER, J. A. e BERTOZZI, C. R. Chemistry in living systems. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n., p. 13, 2005.
- (35)SHIH, H.-W.; KAMBER, D. N. e PRESCHER, J. A. Building better bioorthogonal reactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 21, n., p. 103-111, 2014.
- (36)SHIH, H. W.; KAMBER, D. N. e PRESCHER, J. A. Building better bioorthogonal reactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 21, n., p. 103-111, 2014.
- (37)UNCITI-BROCETA, A. Bioorthogonal catalysis: Rise of the nanobots. **Nature Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 538-539, 2015.
- (38)BAI, Y.; CHEN, J. e ZIMMERMAN, S. C. Designed transition metal catalysts for intracellular organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 5, p. 1811-1821, 2018.
- (39)SOLDEVILA-BARREDA, J. J. e SADLER, P. J. Approaches to the design of catalytic metallodrugs. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 25, n., p. 172-183, 2015.
- (40)ROSTOVTSEV, V. V. et al. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596-2599, 2002.

- (41)TORNØE, C. W.; CHRISTENSEN, C. e MELDAL, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3057-3064, 2002.
- (42)Environmental Health Criteria 226: Palladium. World Health Organization, 2002.
- (43)DUMAS, A. e COUVREUR, P. Palladium: a future key player in the nanomedical field? **Chemical Science**, v. 6, n. 4, p. 2153-2157, 2015.
- (44)CHALKER, J. M.; WOOD, C. S. C. e DAVIS, B. G. A Convenient Catalyst for Aqueous and Protein Suzuki–Miyaura Cross-Coupling. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 45, p. 16346-16347, 2009.
- (45)SPICER, C. D. e DAVIS, B. G. Palladium-mediated site-selective Suzuki–Miyaura protein modification at genetically encoded aryl halides. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 47, n. 6, p. 1698-1700, 2011.
- (46)LI, N. et al. Copper-Free Sonogashira Cross-Coupling for Functionalization of Alkyne-Encoded Proteins in Aqueous Medium and in Bacterial Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 39, p. 15316-15319, 2011.
- (47)NACHTIGALL, F. M. e EBERLIN, M. N. Organic Reaction Studies by ESI-MS. In: **Reactive Intermediates**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
- (48)DUMAS, A. et al. Self-Liganded Suzuki–Miyaura Coupling for Site-Selective Protein PEGylation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 14, p. 3916-3921, 2013.
- (49)INDRIGO, E. et al. Palladium-mediated in situ synthesis of an anticancer agent. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 52, n. 99, p. 14212-14214, 2016.
- (50)MARTIN, R. B. Hydrolytic Equilibria and N7 Versus N1 Binding in Purine Nucleosides of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II). In: **Platinum, Gold, and Other Metal Chemotherapeutic Agents**. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1983.
- (51)SONG, F. L.; GARNER, A. L. e KOIDE, K. A highly sensitive fluorescent sensor for palladium based on the allylic oxidative insertion mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 41, p. 12354+, 2007.
- (52)SANTRA, M. et al. Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein. **Chemical Communications**, v. 46, n. 22, p. 3964-3966, 2010.
- (53)SANTRA, M. et al. Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 46, n. 22, p. 3964-3966, 2010.

- (54)SANTRA, M. et al. Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 46, n. 22, p. 3964-3966, 2010.
- (55)ZHU, B. et al. A 4-hydroxynaphthalimide-derived ratiometric fluorescent chemodosimeter for imaging palladium in living cells. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 47, n. 30, p. 8656-8658, 2011.
- (56)ZHU, B. et al. A 4-hydroxynaphthalimide-derived ratiometric fluorescent chemodosimeter for imaging palladium in living cells. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 47, n. 30, p. 8656-8658, 2011.
- (57)WANG, X. et al. A naked-eye and ratiometric near-infrared probe for palladium via modulation of a  $\pi$ -conjugated system of cyanines. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 50, n. 88, p. 13525-13528, 2014.
- (58)WANG, X. et al. A naked-eye and ratiometric near-infrared probe for palladium via modulation of a  $\pi$ -conjugated system of cyanines. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 50, n. 88, p. 13525-13528, 2014.
- (59)UNCITI-BROCETA, A. et al. Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with Pd-0 nanoparticles to perform bioorthogonal organometallic chemistry in living cells. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1207-1218, 2012.
- (60)WEISS, J. T.; CARRAGHER, N. O. e UNCITI-BROCETA, A. Palladium-Mediated Dealkylation of N-Propargyl-Floxuridine as a Bioorthogonal Oxygen-Independent Prodrug Strategy. **Scientific Reports**, v. 5, n., p., 2015.
- (61)RUBIO-RUIZ, B.; WEISS, J. T. e UNCITI-BROCETA, A. Efficient Palladium-Trigged Release of Vorinostat from a Bioorthogonal Precursor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 9974-9980, 2016.
- (62)CLAVADETSCHER, J. et al. In-Cell Dual Drug Synthesis by Cancer-Targeting Palladium Catalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 24, p. 6864-6868, 2017.
- (63)INDRIGO, E. et al. Intracellular delivery of a catalytic organometallic complex. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 53, n. 50, p. 6712-6715, 2017.
- (64)WANG, J. et al. Chemical Remodeling of Cell-Surface Sialic Acids through a Palladium-Trigged Bioorthogonal Elimination Reaction. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 54, n. 18, p. 5364-5368, 2015.
- (65)WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W. e GREENE, T. W. **Greene's protective groups in organic synthesis**. 4th ed.; Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007.

- (66)ZHANG, H. X.; GUIBÉ, F. e BALAVOINE, G. Palladium catalyzed hydrostannation of alkynes and palladium-catalyzed hydrostannolysis of propargyl or propargyloxycarbonyl derivatives of various functional groups. **Tetrahedron Letters**, v. 29, n. 6, p. 619-622, 1988.
- (67)INANAGA, J.; SUGIMOTO, Y. e HANAMOTO, T. A novel method for the generation of 2,3-naphthoquinodimethanes utilizing samarium(II) iodide-promoted allene synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 46, p. 7035-7038, 1992.
- (68)AURRECOECHEA, J. M. e ANTÓN, R. F. S. Synthesis of homopropargyl cycloalkanols by Pd-catalyzed samarium diiodide-promoted intramolecular coupling of alkynyl esters with aldehydes and ketones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 702-704, 1994.
- (69)SWAMY, V. M.; ILANKUMARAN, P. e CHANDRASEKARAN, S. Selective Deprotection of Propargyl Ethers Using Tetrathiomolybdate. **Synlett**, v. 1997, n. Sup. I, p. 513-514, 1997.
- (70)PAL, M.; PARASURAMAN, K. e YELESWARAPU, K. R. Palladium-Catalyzed Cleavage of O/N-Propargyl Protecting Groups in Aqueous Media under a Copper-Free Condition1. **Organic Letters**, v. 5, n. 3, p. 349-352, 2003.
- (71)RAMBABU, D. et al. Pd/C-mediated depropargylation of propargyl ethers/amines in water. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 9, p. 1169-1173, 2013.
- (72)LIU, B. et al. A new ratiometric ES IPT sensor for detection of palladium species in aqueous solution. **Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)**, v. 48, n. 23, p. 2867-2869, 2012.
- (73)KUMAR, M.; KUMAR, N. e BHALLA, V. Highly selective fluorescent probe for detection and visualization of palladium ions in mixed aqueous media. **RSC Advances**, v. 3, n. 4, p. 1097-1102, 2013.
- (74)LIU, W. et al. Water-Soluble Colorimetric and Ratiometric Fluorescent Probe for Selective Imaging of Palladium Species in Living Cells. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 12590-12594, 2014.
- (75)CHEN, Y. et al. A depropargylation-triggered spontaneous cyclization based fluorescent "turn-on" chemodosimeter for the detection of palladium ions and its application in live-cell imaging. **RSC Advances**, v. 6, n. 10, p. 8380-8383, 2016.
- (76)HUO, F. et al. A novel alkyne compound as a Pd(II) fluorescent probe in aqueous medium and its bioimaging. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, n., p. 429-434, 2017.
- (77)RAVEL, B. e NEWVILLE, M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 12, n. 4, p. 537-541, 2005.

- (78)ADAMO, C. e BARONE, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. **Journal of Chemical Physics**, v. 110, n. 13, p. 6158-6170, 1999.
- (79)SCUSERIA, M. E. A. G. E. Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange–correlation functional. **The Journal of Chemical Physics**, v. 110, n. 11, p. 5029-5036, 1999.
- (80)STEFAN GRIMMEA, J. A., STEPHAN EHRLICH, AND HELGE KRIEG. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H–Pu. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 15, p. 154104, 2010.
- (81)GRIMME, S.; EHRLICH, S. e GOERIGK, L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1456-1465, 2011.
- (82)JENSEN, J. H. Predicting accurate absolute binding energies in aqueous solution: thermodynamic considerations for electronic structure methods. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 19, p. 12441-12451, 2015.
- (83)MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J. e TRUHLAR, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 18, p. 6378-6396, 2009.
- (84)NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2011.
- (85)NEESE, F. et al. Efficient, approximate and parallel Hartree–Fock and hybrid DFT calculations. A ‘chain-of-spheres’ algorithm for the Hartree–Fock exchange. **Chemical Physics**, v. 356, n. 1, p. 98-109, 2009.
- (86)
- (87)WEIGEND, F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 9, p. 1057-1065, 2006.
- (88)WEIGEND, F. e AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 7, n. 18, p. 3297-3305, 2005.
- (89)ALONSO-MARANON, L. et al. Indium-catalyzed intramolecular hydroarylation of aryl propargyl ethers. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 379-387, 2015.
- (90)ACHARD, T. et al. A Regio- and Diastereoselective Platinum-Catalyzed Tandem [2+1]/[3+2] Cycloaddition Sequence. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 15, p. 3552-3556, 2011.
- (91)SILVERSTEIN, R. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5ª ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- (92)DEGA-SZAFRAN, Z. e SOKOLOWSKA, E. Prototropic equilibrium in complexes of N-methylmorpholine betaine with phenols studied by NMR

and UV spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 565-566, n., p. 17-23, 2001.

(93)KAYASTHA, A. M. e GUPTA, A. K. AN EASY METHOD TO DETERMINE THE KINETIC-PARAMETERS OF BIPHASIC REACTIONS. **Biochemical Education**, v. 15, n. 3, p. 135-135, 1987.

(94)ANDERSON, T. G. e MCCONNELL, H. M. Interpretation of Biphasic Dissociation Kinetics for Isomeric Class II Major Histocompatibility Complex-Peptide Complexes. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 5, p. 2451-2461, 1999.

(95)DEVARAJ, N. K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. **ACS Central Science**, v. 4, n. 8, p. 952-959, 2018.

(96)BLACKMOND, D. G. Reaction Progress Kinetic Analysis: A Powerful Methodology for Mechanistic Studies of Complex Catalytic Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 28, p. 4302-4320, 2005.

(97)DEAL, K. A.; HENGGE, A. C. e BURSTYN, J. N. Characterization of Transition States in Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Activated Phosphate Diester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 7, p. 1713-1718, 1996.

(98)STRYER, L. **Bioquímica**. 4<sup>a</sup> ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

(99)WILKINS, R. G. **Kinetics and Mechanism of reactions of Transition Metal Complexes**. 2<sup>a</sup> ed.; Weinheim: Wiley-VCH, 1991.

(100)YAO, Y. et al. In Situ X-ray Absorption Spectroscopic Study of Fe@FexOy/Pd and Fe@FexOy/Cu Nanoparticle Catalysts Prepared by Galvanic Exchange Reactions. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 36, p. 21209-21218, 2015.

(101)CHANG, S. Y. et al. Detection and characterisation of sub-critical nuclei during reactive Pd metal nucleation by X-ray absorption spectroscopy. **CrystEngComm**, v. 18, n. 5, p. 674-682, 2016.

(102)CHARBONNEAU, M. et al. Support-Free Palladium–NHC Catalyst for Highly Recyclable Heterogeneous Suzuki–Miyaura Coupling in Neat Water. **Organometallics**, v. 33, n. 22, p. 6544-6549, 2014.

(103)SANTOS, L. S. On-line Monitoring Reactions by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In: **Reactive Intermediates**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

(104)ROGLANS, A. e PLA-QUINTANA, A. Palladium Intermediates in Solution. In: **Reactive Intermediates**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

(105)QIAN, R. et al. Studies of Reaction Mechanism Intermediates by ESI-MS. In: **Reactive Intermediates**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

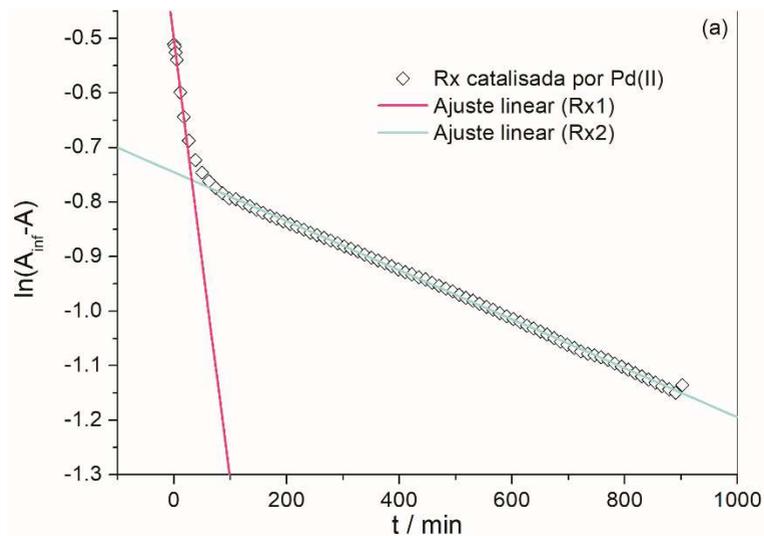
- (106)LALLI, P. M. et al. Intrinsic acidity and electrophilicity of gaseous propargyl/allenyl carbocations. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 2580-2585, 2010.
- (107)Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. **The Journal of Chemical Physics**, v. 110, n. 13, p. 6158-6170, 1999.
- (108)Natural triple excitations in local coupled cluster calculations with pair natural orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 139, n. 13, p. 134101, 2013.
- (109)A geometrical correction for the inter- and intra-molecular basis set superposition error in Hartree-Fock and density functional theory calculations for large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 15, p. 154101, 2012.
- (110)WIDEGREN, J. A. e FINKE, R. G. A review of the problem of distinguishing true homogeneous catalysis from soluble or other metal-particle heterogeneous catalysis under reducing conditions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 198, n. 1, p. 317-341, 2003.

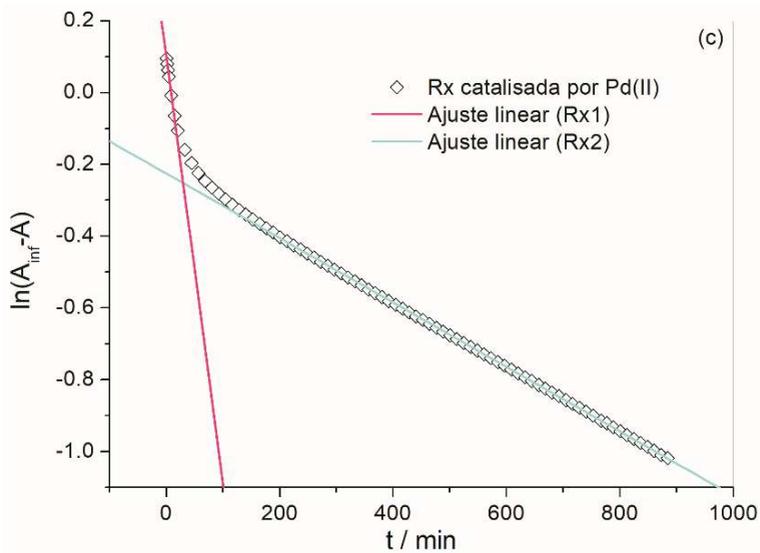
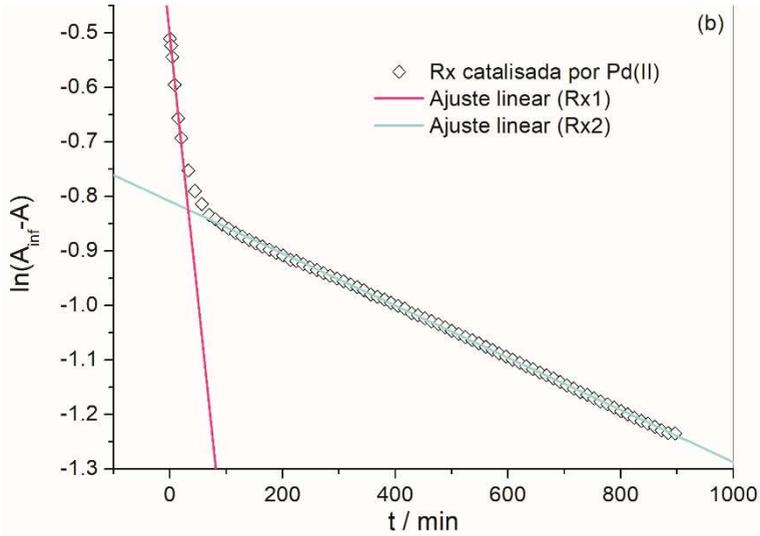


## 8 APÊNDICE

### APÊNDICE A – Linearização dos perfis cinéticos

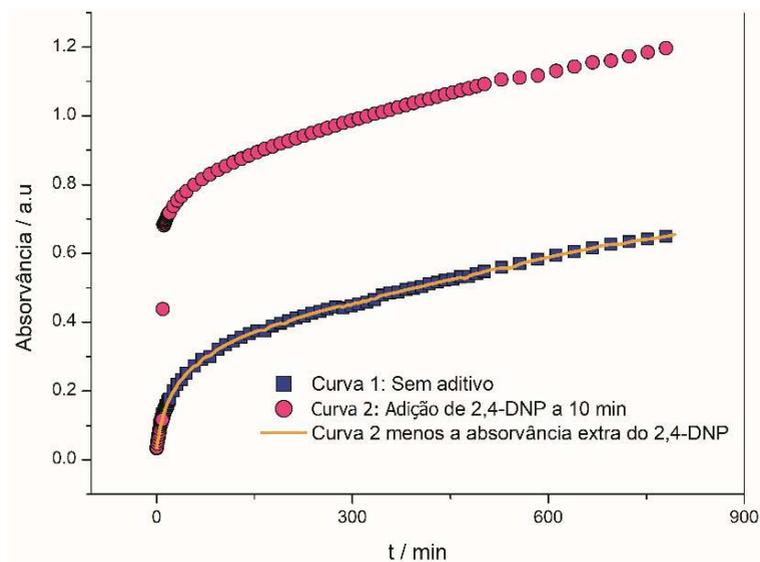
Figura 41 – Linearização de primeira-ordem dos dados cinéticos experimentais para a reação do 2,4-DNPPE com (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).





## APÊNDICE B – Efeito da adição do 2,4-DNP

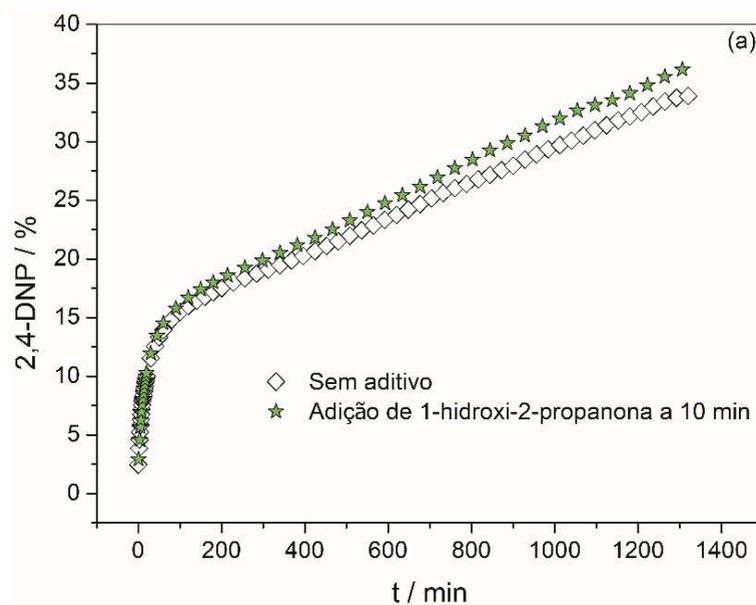
Figura 42 - Perfil cinético da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com a adição de 40 mol% de 2,4-DNP a 10 minutos de reação e a reação sem aditivo para comparação. Condições:  $c(\text{Pd(II)}) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,148 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5 e 50% DMSO).

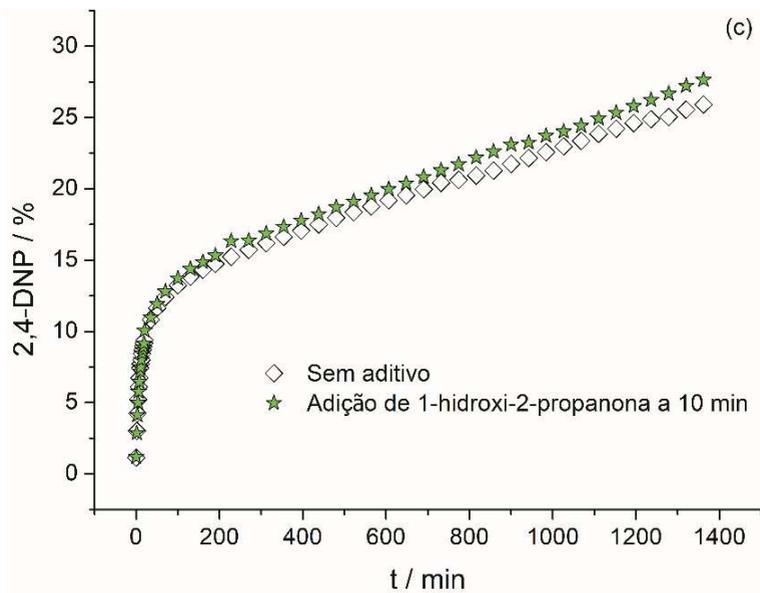
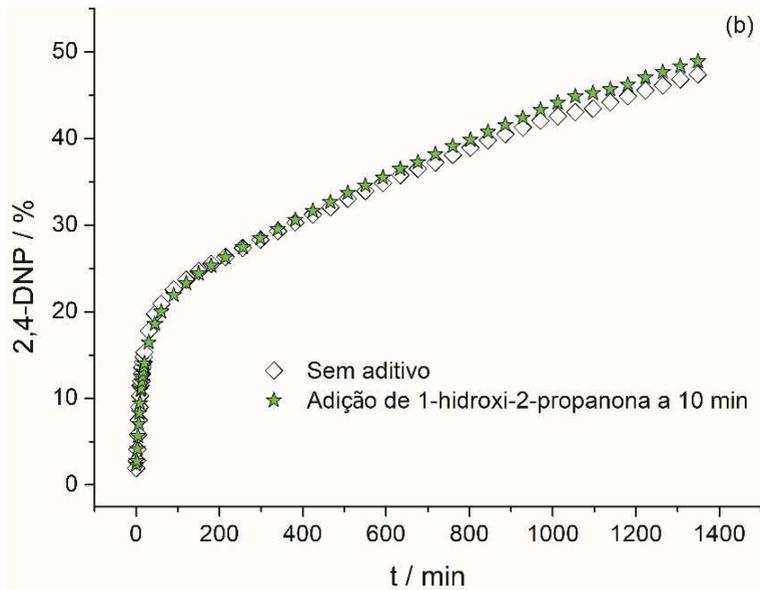




### APÊNDICE C – Efeito da adição de 1-hidroxi-2-propanona

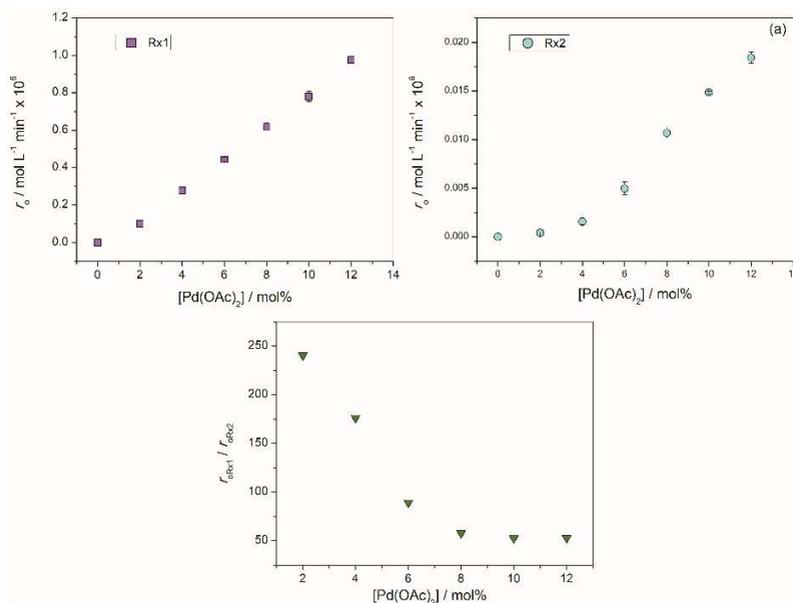
Figura 43 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com a adição de 1-hidroxi-2-propanona a 10 minutos de reação e a reação sem aditivo para comparação. Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(1\text{-hidroxi-2-propanona}) = 0,0424 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).

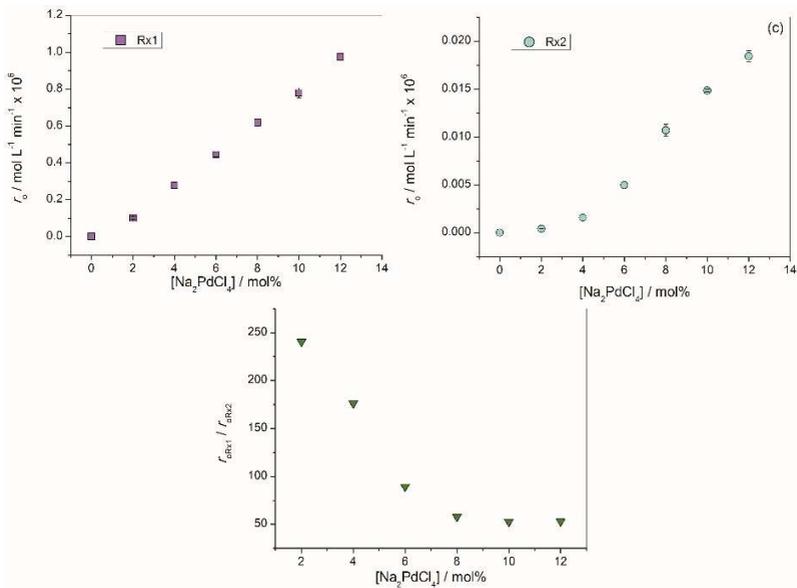
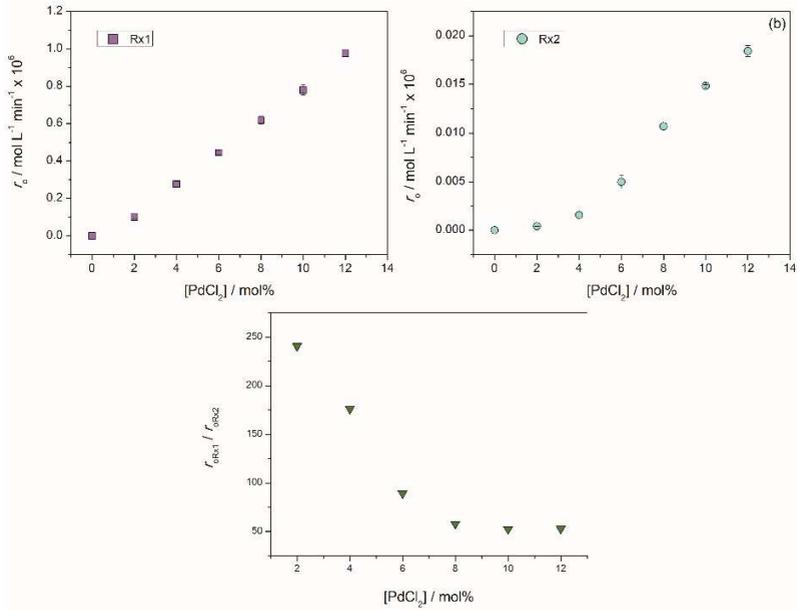




## APÊNDICE D – Influência da concentração dos catalisadores de Pd(II)

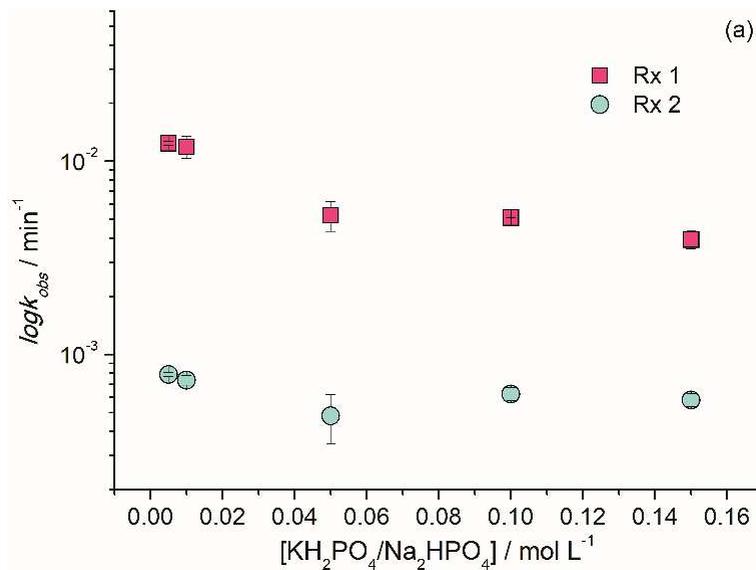
Figura 44 - Dependência da velocidade de reação para a clivagem da ligação C-O do 2,4-DNPPE com a concentração dos catalisadores e razão das velocidades iniciais de Rx1 e Rx2. (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições: c (Pd(II)) = 0,021x10<sup>-4</sup> a 1,27x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>; c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO).

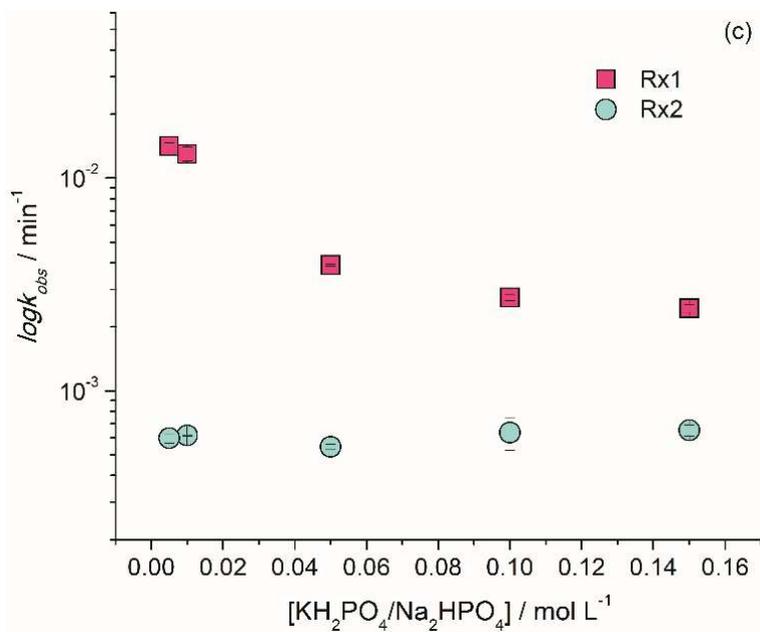
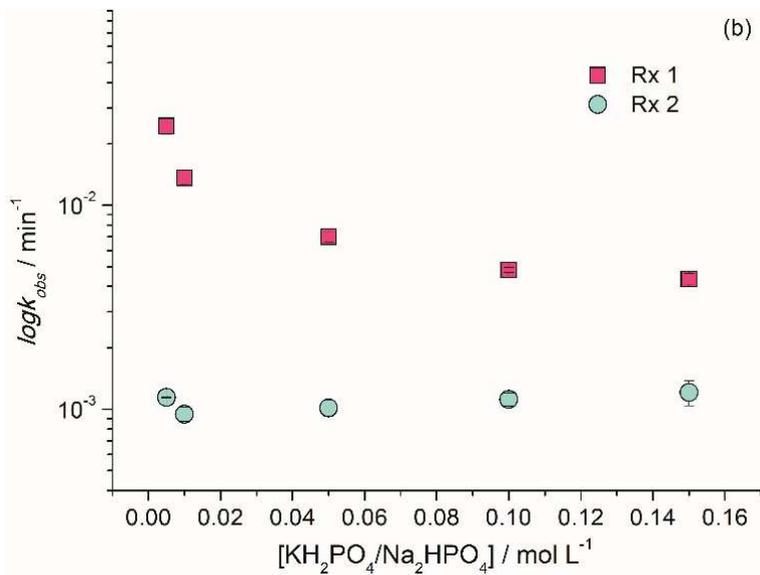




## APÊNDICE E – Influência da concentração do tampão fosfato de sódio e potássio

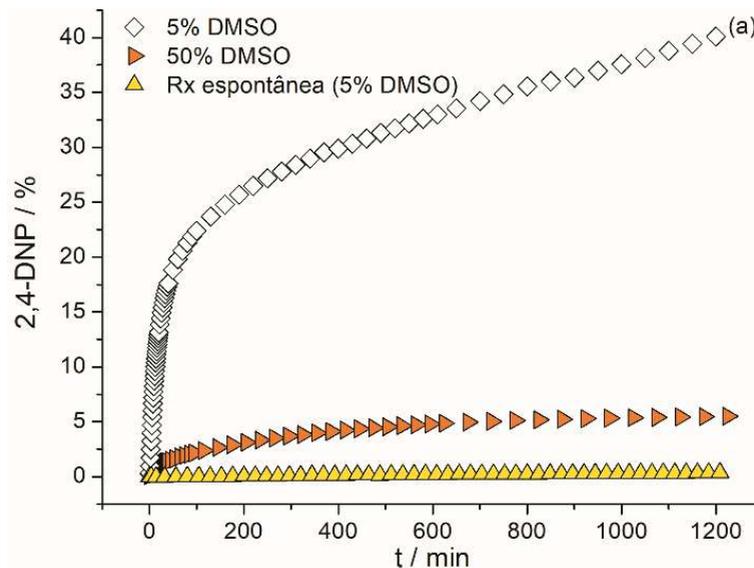
Figura 45 - Efeito da concentração do tampão fosfato de sódio e potássio nas  $k_{obs1}$  e  $k_{obs2}$  para a reação de  $0,106 \text{ mmol L}^{-1}$  de 2,4-DNPPE com  $0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$  de (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , em meio aquoso de tampão fosfato c  $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 5,00 \times 10^{-3}$  a  $1,50 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO), pH 7,41 e  $48^\circ\text{C}$ .

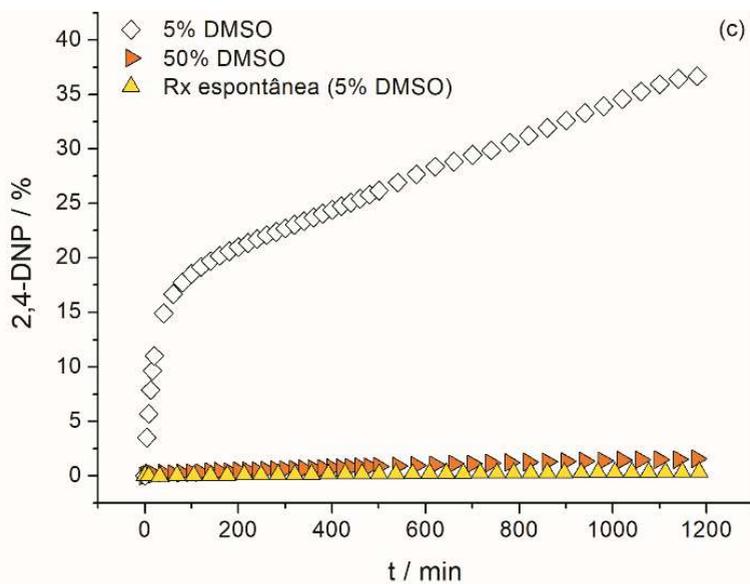
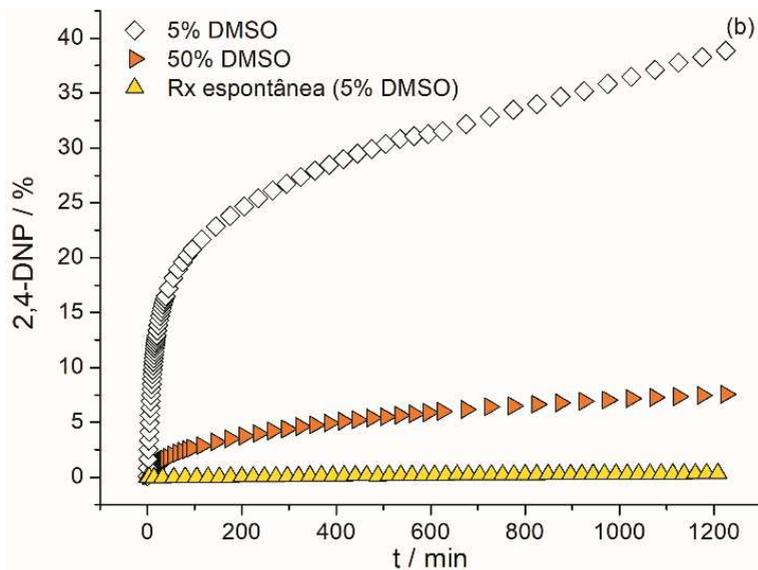




## APÊNDICE F – Influência da quantidade do co-solvente DMSO

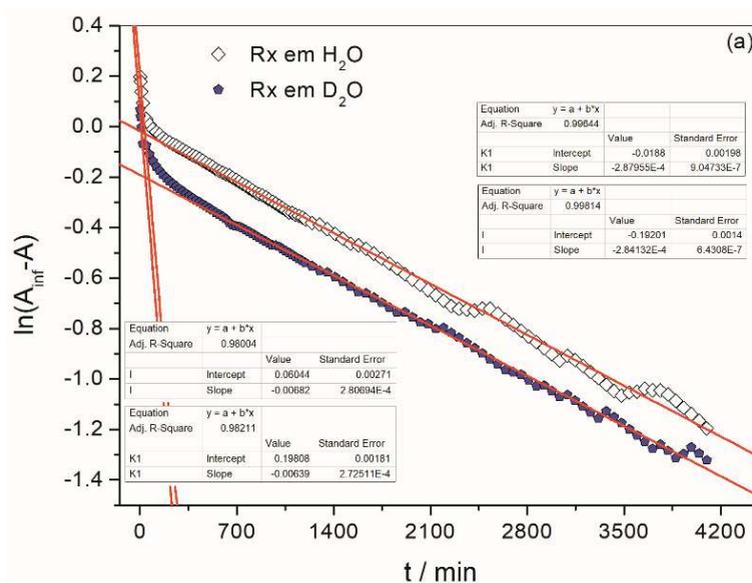
Figura 46 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  com diferentes quantidades do co-solvente DMSO e a reação espontânea para comparação. Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5 e 50% DMSO).

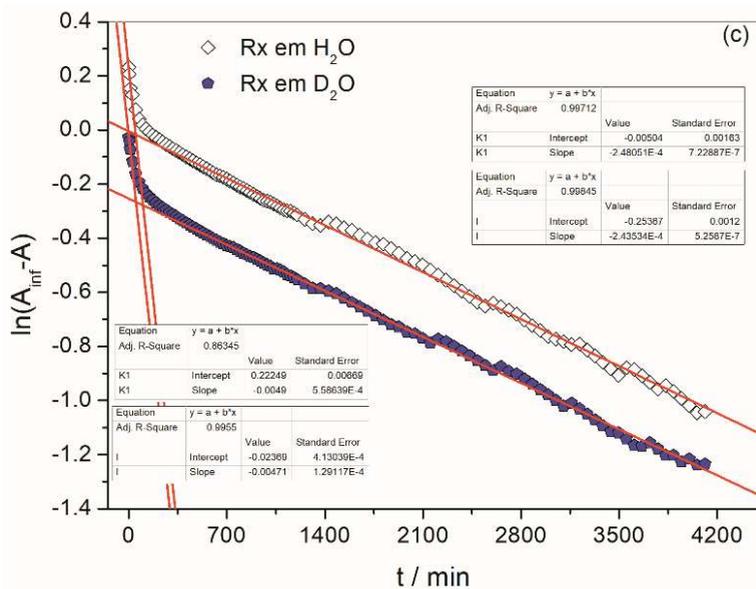
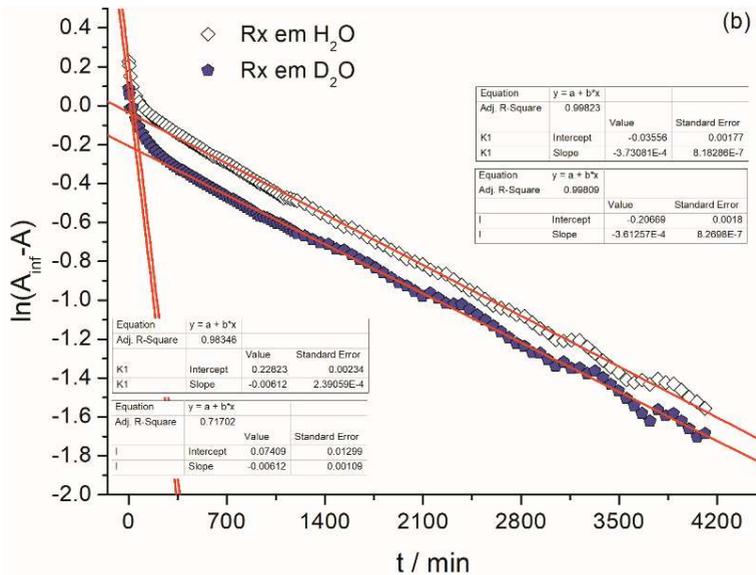




## APÊNDICE G – Efeito isotópico do solvente

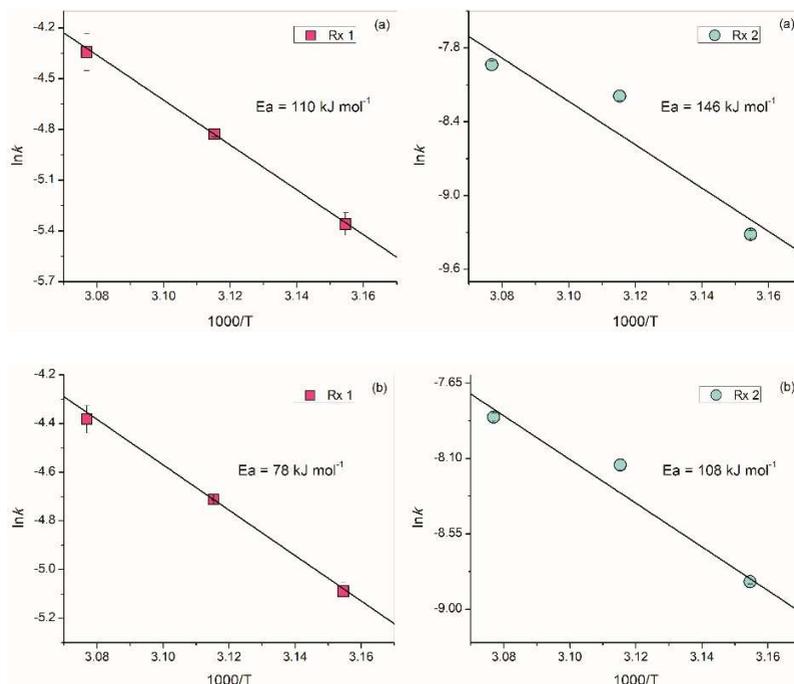
Figura 47 – Linearização de primeira-ordem dos dados cinéticos experimentais do efeito isotópico de solvente para a reação do 2,4-DNPPE com (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub> e (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições: c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; 10 mol% de Pd(II) ; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso (H<sub>2</sub>O ou D<sub>2</sub>O) de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO).

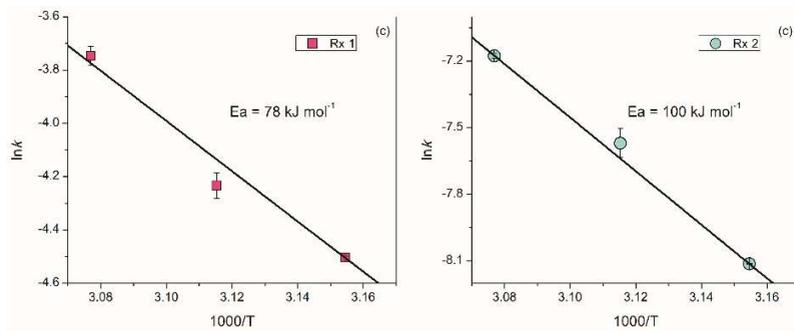




## APÊNDICE H – Influência da temperatura

Figura 48 - Linearização dos gráficos de  $\ln k$  versus  $1000/T$  da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por (a)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (b)  $\text{PdCl}_2$  e (c)  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições:  $c(\text{Pd}(\text{II})) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à 44, 48 e 52 °C, em meio aquoso de tampão fosfato  $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).

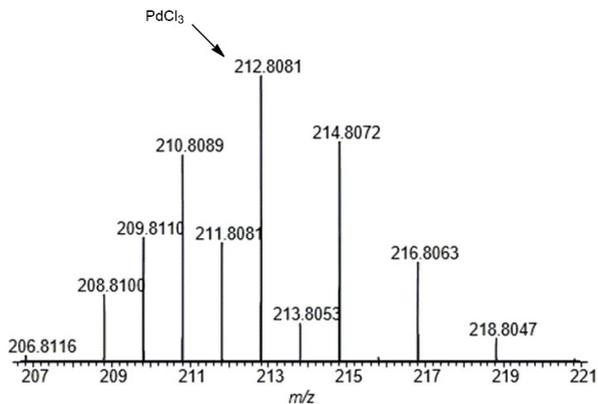




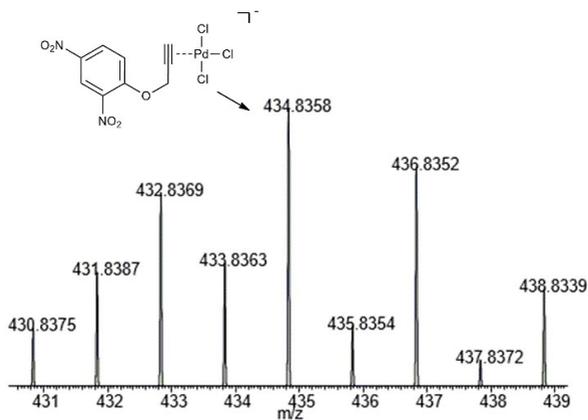
## APÊNDICE I – Espectros de ESI-HRMS calculados

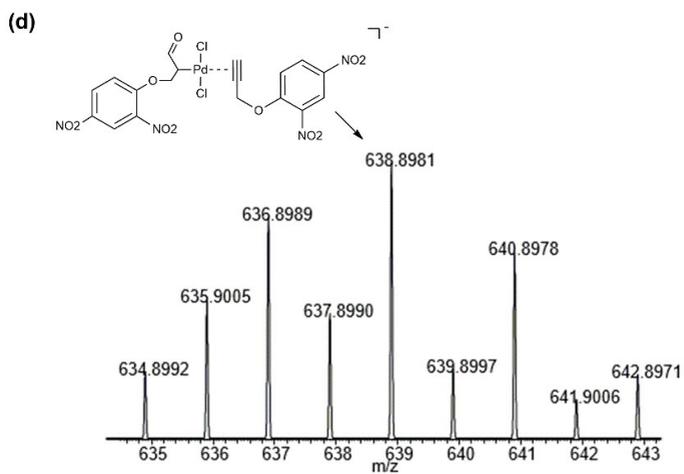
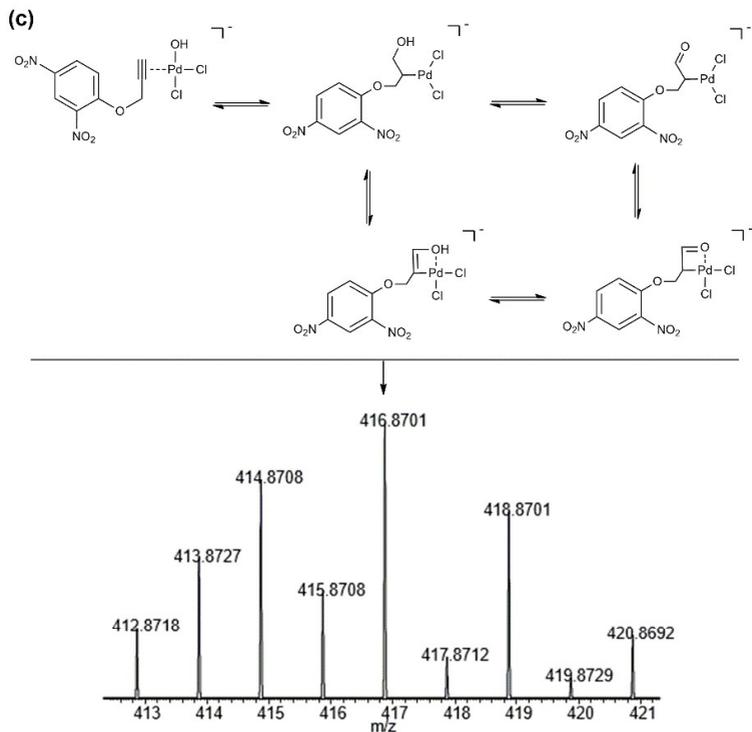
Figura 49 – Espectros de ESI-HRMS calculados para as espécies de Pd apresentadas nas Figura 28b, Figura 29 e Figura 30 .

(a)



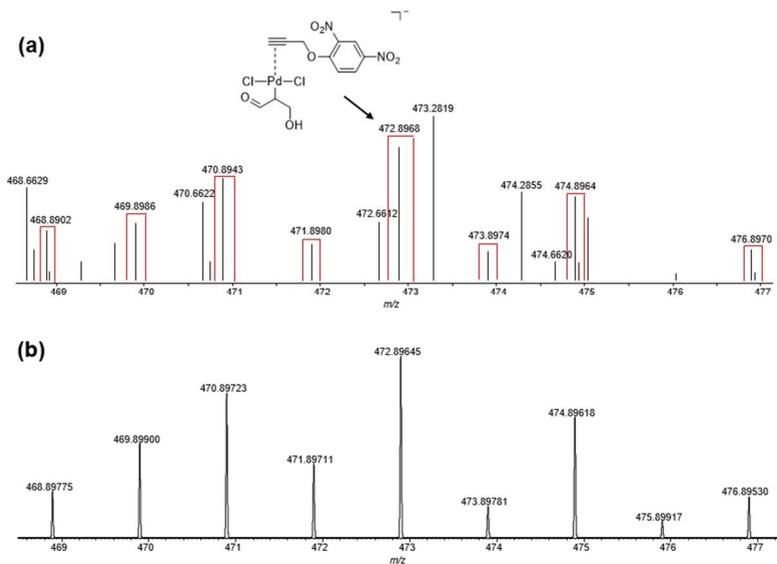
(b)





## APÊNDICE J – Caracterização por ESI-HRMS do precipitado formado na reação de *O*-despropargilação

Figura 50 – Espectros experimental (a) e calculado (b) de ESI-HRMS da espécie iônica de Pd com  $m/z$  473, da análise do precipitado formado após 35 min de reação. Condições:  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 2,12 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 20 \text{ mol}\%$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO),  $\text{pH} = 7,4$  a  $48^\circ\text{C}$ .





## APÊNDICE K – Estudo computacional para diferentes caminhos propostos para o mecanismo de reação

Figura 51 – Caminhos mecanísticos calculados para o primeiro turnover da reação Rx1 a partir da hidratação regioquímica anti-Markovnikov do complexo Pd-propargil, incluindo barreiras de energia e diferenças de energia livre para as reações.

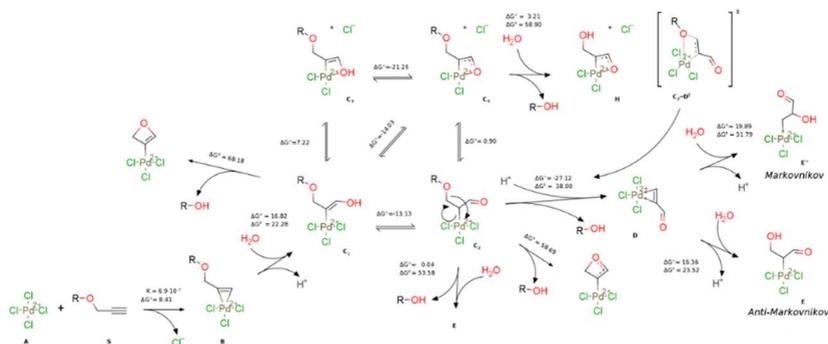


Figura 52 - Caminhos mecanísticos calculados para o primeiro turnover da reação Rx1 a partir da hidratação regioquímica Markovnikov do complexo Pd-propargil, incluindo barreiras de energia e diferenças de energia livre para as reações.

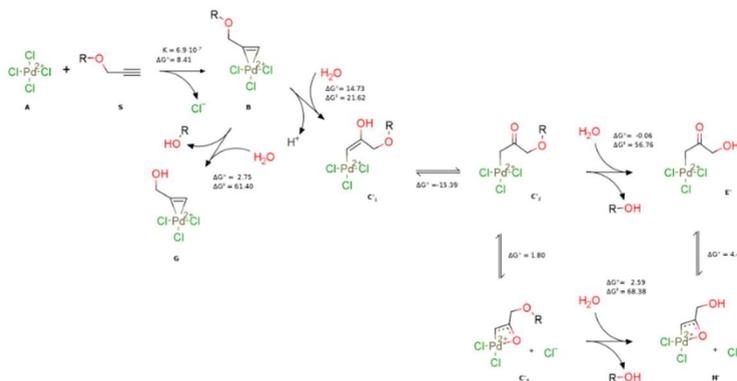
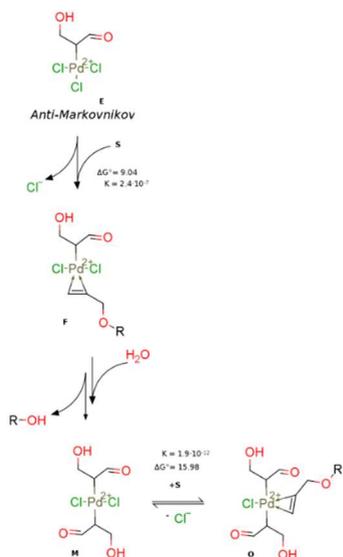
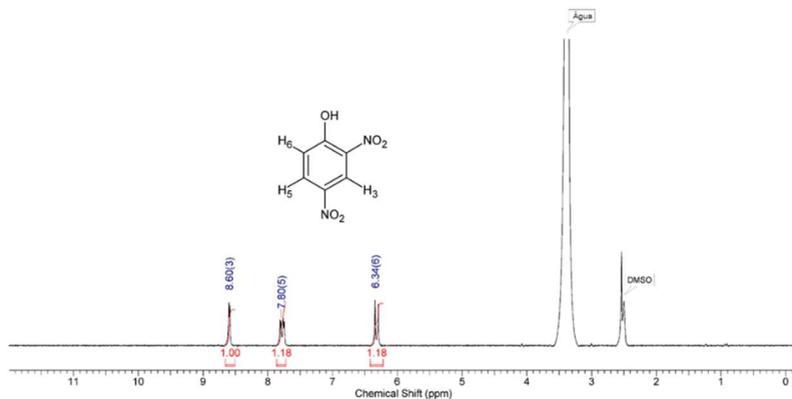


Figura 53 – Caminho mecanístico calculado para o segundo *turnover*, assim que o segundo substrato se coordena ao complexo de paládio **E**, incluindo barreiras de energia e diferenças de energia livre para as reações.



## APÊNDICE L – Caracterização dos produtos de reação por RMN de H<sup>1</sup>

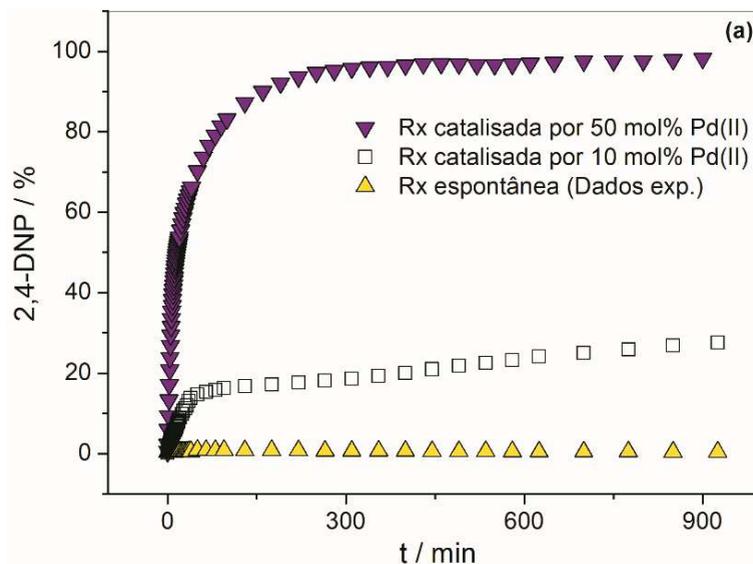
Figura 54 - Espectro de RMN de H<sup>1</sup> do material bruto da reação de *O*-despropargilação do 2,4-DNPPE mediada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> liofilizado e dissolvido em DMSO-d<sub>6</sub>. Condições: c (2,4-DNPPE) = 3,5 mmol L<sup>-1</sup>; c (catalisador) = 10% molar; em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO), pH = 7,4 a 48 °C, após 47 h de reação

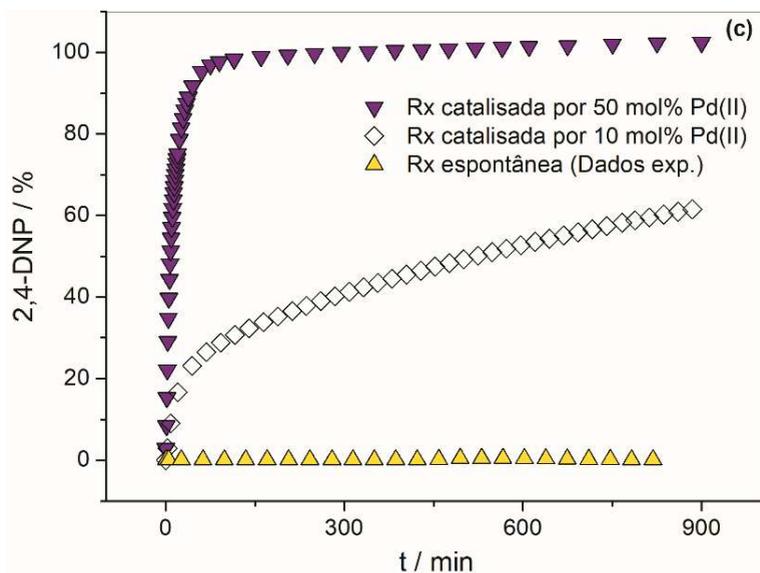
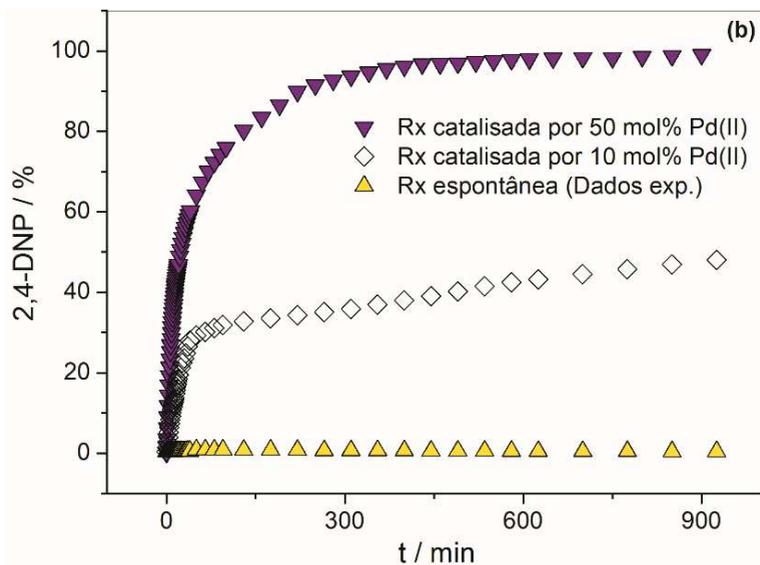




## APÊNDICE M – Perfis cinéticos para diferentes quantidades dos catalisadores de Pd(II)

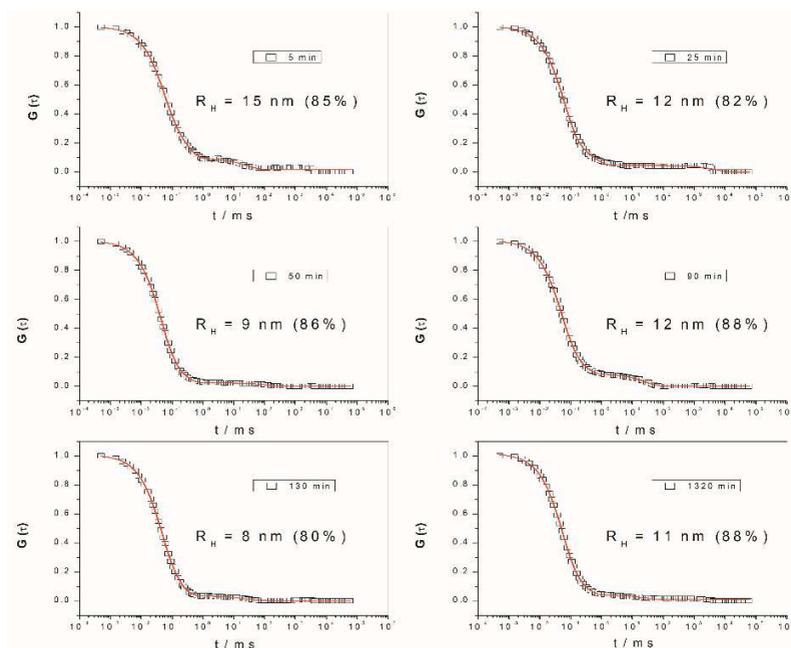
Figura 55 – Perfis cinéticos da reação de despropargilação do 2,4-DNPPE catalisada por diferentes quantidades de (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, (b) PdCl<sub>2</sub>, (c) Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> e a reação não catalisada para comparação. Condições: c (2,4-DNPPE) = 0,106 mmol L<sup>-1</sup>; pH 7,41 à 48 °C, em meio aquoso de tampão fosfato c (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,01 mol L<sup>-1</sup> (5% DMSO).





## APÊNDICE N – Espalhamento de luz dinâmico em diferentes tempos da reação de despropagação do 2,4-DNPPE catalisada por $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ .

Figura 56 - Espalhamento de luz dinâmico em diferentes tempos da reação de despropagação do 2,4-DNPPE catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . A razão hidrodinâmica ( $R_H$ ) e a porcentagem da população estão inseridas. Condições:  $c(\text{Na}_2\text{PdCl}_4) = 0,0106 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $c(2,4\text{-DNPPE}) = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 7,41 à  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ , em meio aquoso de tampão fosfato  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (5% DMSO).





## APÊNDICE O – Publicação

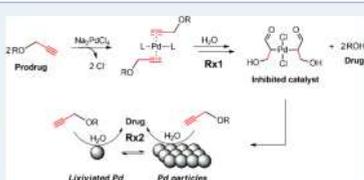
## Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates

Sara E. Coelho,<sup>†</sup> Felipe S. S. Schneider,<sup>†</sup> Daniela C. de Oliveira,<sup>‡</sup> Guilherme L. Tripodi,<sup>§</sup> Marcos N. Eberlin,<sup>§</sup> Giovanni F. Caramori,<sup>†</sup> Bernardo de Souza,<sup>†</sup> and Josiel B. Domingos<sup>\*†</sup><sup>†</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina - UFSC, Campus Trindade, C.P. 476, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil<sup>‡</sup>Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLS, C.P. 6192, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil<sup>§</sup>Thomson Mass Spectrometry Laboratory, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo 13083-872, Brazil

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The palladium(II)-mediated chemical uncaging reaction of propargylic substrates is a recent addition to the field of chemical biology and medicinal chemistry in the activation of bio and prodrug molecules. Most of the strategies used involve C–O bond breaking in molecules bearing protected amino and hydroxyl groups. Although this reaction has been known for many decades, its catalytic cycle in aqueous milieu remains unclear. Our mechanistic investigation results unveil that full propargylic substrate conversion occurs through biphasic kinetics of different rates, where the fastest reaction phase involves a Pd(II) anti-Markovnikov hydration of the propargyl moiety, followed by the C–O bond breaking through a  $\beta$ -O elimination and lasts only for two turnovers due to product inhibition. The second slower reaction phase involves the hydrolysis of the substrate promoted by Pd(0) species formed during the first phase of the reaction. These findings are crucial for the potential development of bioorthogonal Pd catalysts for the uncaging of propargylic protected bioactive and drugs molecules.

**KEYWORDS:** depropargylation reaction, palladium, mechanism, catalysis, hydrolysis



## 1. INTRODUCTION

The promotion of C–O bond cleavage by transition metals is one of the key strategies recently described for uncaging protected molecules possessing hydroxyl and amino functional groups under biocompatible conditions, extra- or intracellularly.<sup>1,2</sup> In particular, palladium-mediated bond-cleavage reactions have gained great interest owing to their unique catalytic properties.<sup>3–8</sup> Cell-surface engineering<sup>9</sup> and protein<sup>10,11</sup> and prodrug<sup>3,12–15</sup> activation outside or inside living cells, through the C–O bond cleavage of propargylic ethers, carbamates, and carbonates (Figure 1a), are examples of the recent applications of palladium-mediated uncaging reactions, taking advantage of a bioorthogonal approach.<sup>16,17</sup> Although it has been argued that carbamate groups are not truly bioorthogonal because they can be deprotected in vivo through the reaction with various nucleophiles and digestive enzymes, propargylic amines and ethers, while less reactive, are more suitable for in vivo applications.<sup>18</sup> Deallylation reactions are also a common strategy, although they are less efficient with simple palladium catalysts than depropargylation.<sup>19</sup> Whereas the mediation of deallylation by Pd(0) through a  $\pi$ -allylpalladium mechanism is well established,<sup>19</sup> the Pd-mediated depropargylation reaction mechanism remains challenging in the current stage, and no systematic mechanistic

studies have been performed.<sup>16</sup> However, it has been most frequently postulated that even when the initial forms of the catalyst are simple Pd(II) salts, the depropargylation reaction mechanism involves the in situ formation of the catalytic species Pd(0). This process is normally assumed to be promoted by a base through an intramolecular ligand exchange reduction or by an attack of a nucleophilic solvent, followed by a reductive elimination pathway.<sup>10,21,13,16,20–23</sup> The Pd(0) is then assumed to undergo an oxidative addition with the propargyl group to form an allenylpalladium intermediate, which can be hydrolyzed to produce acetol as a side product and to regenerate the Pd(0) (pathway (i), Figure 1b). The less common hypothesis is a Pd(II)-mediated hydration mechanism (pathway (ii)) to form an intermediate that can decompose to form Pd(II) by hydrolysis (iii) in a Wacker-like oxidation.<sup>10,16,24</sup>

However, these uncaging reactions are reported to be relatively slow and present low product yields, requiring high doses of catalyst. The catalyst solubility and toxicity therefore need to be considered when designing a bioorthogonal

Received: January 16, 2019

Revised: February 28, 2019

Published: March 21, 2019