



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Albert Leder St. John

**ANÁLISE DAS REAÇÕES EM *TANDEM* NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-FLUORÓFOROS
DA 4-METILUMBELIFERONA MEDIADAS POR PALÁDIO (II): UMA
PERSPECTIVA DOS EFEITOS ELETRÔNICOS**

Florianópolis
2023

Albert Leder St. John

**ANÁLISE DAS REAÇÕES EM *TANDEM* NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-FLUORÓFOROS
DA 4-METILUMBELIFERONA MEDIADAS POR PALÁDIO (II): UMA
PERSPECTIVA DOS EFEITOS ELETRÔNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
Coorientador: Dr. Gean Michel Dal Forno

Florianópolis

2023

St. John, Albert Leder

Análise das reações em tandem na ativação de pró-fluoróforos da 4-metilumbeliferona mediadas por paládio (II): Uma perspectiva dos efeitos eletrônicos / Albert Leder St. John ; orientador, Josiel Barbosa Domingos, coorientador, Gean Michel Dal Forno, 2023.

138 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. Reação de O-despropargilação. 3. Reação de eliminação 1,4. 4. Química Bio-ortogonal. I. Domingos, Josiel Barbosa. II. Dal Forno, Gean Michel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Albert Leder St. John

Análise das reações em *tandem* na ativação de pró-fluoróforos da 4-metilumbeliferona mediadas por paládio (II): uma perspectiva dos efeitos eletrônicos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 06 de Julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Tula Beck Bisol, Dra.
Instituição Federal de Santa Catarina

Prof. Eduard Westphal, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Josiel Barbosa Domingos, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minha irmã e familiares, que sempre apoiaram durante minha trajetória de vida e estiveram torcendo para dias melhores nos momentos mais difíceis durante o mestrado e, futuramente, o doutorado.

Ao Professor Dr. Josiel B. Domingos e colegas de laboratório do LaCBio, pelos ensinamentos, discussões científicas, conversas no momento do café, etc., e pelo ambiente de excelência na convivência de trabalho existente durante os 6 anos de pesquisa e estudo.

Ao Dr. Gean M. Dal Forno, coorientador do trabalho, pelos ensinamentos valiosos, e pela paciência em relação a minha teimosia em muitas partes deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço e pela excelência em pesquisa e ensino. Aos professores, que colaboraram para o meu crescimento.

Ao órgão de financiamento CNPq, pela bolsa de pesquisa de mestrado e por apoiar a ciência de qualidade no país, mesmo após períodos difíceis de contingências.

E a minha namorada Ma. Maryelle Andrea Gobatto de Carvalho, pelo afeto e carinho, aventuras em trilhas, e pelo apoio durante os momentos difíceis do mestrado e pelas comemorações nas pequenas vitórias.

O segredo da vida, porém, é cair sete vezes e levantar oito. (Paulo Coelho, O Alquimista, 1991, 62ª Edição)

RESUMO

O trabalho atual discute o estudo de reações em tandem, caracterizadas pela clivagem da ligação C-O na reação de despropargilação e a eliminação 1,4 de substratos pró-fluoróforos da 4-metilumbeliferona, que contêm o núcleo *O*-propargilbenzil com diferentes substituintes aromáticos, mediado por Pd(II) em água a pH 7,4, com foco no efeito eletrônico dos grupos substituintes. A síntese dos substratos das reações desejadas foi realizada em cinco etapas, com rendimentos que variam de moderados a altos, e suas caracterizações foram feitas através de RMN de ^1H e ^{13}C . Os estudos de efeitos eletrônicos foram conduzidos por meio de cinéticas de reação utilizando técnicas espectroscópicas de absorção na região UV-vis, fluorimetria e RMN de ^1H . Esses estudos mostraram a interdependência das constantes de velocidade observadas com os valores da constante do substituinte previstos na equação de Relação Linear de Energia Livre de Hammett, assim como o aumento da estabilidade do grupo de saída no estado de transição por substituintes que retiram elétrons. Além disso, ao variar as concentrações de reagentes para a reação de *O*-despropargilação para o substrato *O*-propargilbenzil álcool contendo o substituinte nitro, observou-se que a reação é de 1ª ordem em relação ao substrato propargílico e de 1ª ordem em relação ao paládio.

Palavras-chave: Reação de *O*-despropargilação. Reação de eliminação 1,4. Química Bio-ortogonal.

ABSTRACT

The current work discusses the study of tandem reactions, characterized by the cleavage of the C-O bond in the despropargylation reaction and the 1,4 elimination of pro-fluorophoric substrates of 4-methylumbelliferone, which contain the O-propargylbenzyl core with different aromatic substituents, mediated by Pd(II) in water at pH 7.4, with a focus on the electronic effect of the substituent groups. The synthesis of the desired reaction substrates was carried out in five steps, with yields ranging from moderate to high, and their characterizations were made through ^1H and ^{13}C NMR. The studies of electronic effects were conducted through reaction kinetics using spectroscopic absorption techniques in the UV-vis region, fluorimetry, and ^1H NMR. These studies showed the interdependence of the observed rate constants with the values of the substituent constant predicted in the Hammett Linear Free Energy Relationship equation, as well as the increase in the stability of the leaving group in the transition state by electron-withdrawing substituents. In addition, by varying the concentrations of reagents for the O-despropargylation reaction for the O-propargylbenzyl alcohol substrate containing the nitro substituent, it was observed that the reaction is of 1st order with respect to the propargylic substrate and 1st order with respect to palladium.

Keywords: O-depropargylation reaction. 1,4 elimination reaction. Bio-ortogonal Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de publicações contendo a palavra " <i>bio-ortogonal chemistry</i> " em função do tempo.....	18
Figura 2 - Aplicações das reações bio-ortogonais em células.....	20
Figura 3 – Ilustração esquemática sobre (A) Ativação de pró-fármacos via uma ligação bioreversível, introduzida sinteticamente, e sua posterior liberação após um gatilho abiótico. E exemplos genéricos da liberação de fármacos por reações bio-ortogonais mediadas (B) por metais de transição ou (C) por uma molécula abiótica.	21
Figura 4 – Estudo sistemático para a adaptação de uma reação protótipo, e seu comportamento sob condições biologicamente compatíveis.	22
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de uma reação IEDDA (a), e a influência da estrutura, por meio de efeitos eletrônicos, na velocidade da reação (b) do dieno e (c) do dienófilo.	23
Figura 6 – Exemplos de reações bio-ortogonais (A) associativas e (B) dissociativas mediadas por metais de transição.....	25
Figura 7 – Modificação da proteína RAS via reação de acoplamento de Sonogashira e de Mizoroki-Heck.....	28
Figura 8 – Detecção de espécies de paládio em meios aquosos por meio da reação (A) de O-desalilação mediada por Pd ⁰ (SONG; GARNER; KOIDE, 2007) e (B) de O-despropargilação mediada por Pd ^{II} (SANTRA et al., 2010).....	29
Figura 9 – Uso de (A) metalopeptídeos de paládio em reações de (B) O-despropargilação e de (C) acoplamento C-C.....	30
Figura 10 – Reação de O-despropargilação mediada por sais de Pd(II).....	31
Figura 11 – Reação de clivagem C-C por meio da despropargilação mediada por Pd ^{II} e seu respectivo mecanismo por cálculos computacionais de DFT.	33
Figura 12 – Representação esquemática do grupo autoimolativos e a liberação da espécie ativa via uma etapa espontânea.	34
Figura 13 – Exemplos de espaçadores autoimolativos. A reação de eliminação via deslocalização de elétrons (A) pode ser via: i) eliminação 1,6; ii) eliminação 1,4; ou iii) descarboxilação. Enquanto a reação de ciclização intramolecular (B) pode ocorrer via: i) 1,5-ciclização; ii) 1,6-ciclização; e iii) 1,7-ciclização.	35
Figura 14 – Relação entre estrutura e reatividade para reações bio-ortogonais associativas.....	36

Figura 15 – Os valores de σ são referentes as reações (i) reação de ionização do ácido benzoíco. Enquanto os valores de σ^+ e de σ^- são das reações de (ii) ionização do fenol e da (iii) heterólise do fenildimetil clorometano, respectivamente	38
Figura 16 – Obtenção dos salicilaldeídos a partir de <i>para</i> -fenóis substituídos a partir da reação de formilação (A). As reações de S_EAr são suscetíveis a efeitos eletrônicos (B), que por sua vez podem ser indutivos ou mesoméricos.....	57
Figura 17 – <i>orto</i> -Formilação de <i>para</i> -fenóis utilizando paraformaldeído (A) e o mecanismo de reação sugerido para a formação de 2 (B)	58
Figura 18 – Representação esquemática da reação de <i>orto</i> -formilação pela reação de Duff e o mecanismo proposto para obtenção do benzaldeído 2c	59
Figura 19 – Espectro de RMN de (A) 1H a 200 MHz e de (B) $^{13}C\{^1H\}$ a 50 MHz do composto 2a , em $CDCl_3$ a 19 °C.....	61
Figura 20 – Representação esquemática e o mecanismo da reação de <i>o</i> -formilação para diferentes substituintes aromáticos.	64
Figura 21 – Espectros de RMN (A) de 1H a 200 MHz e (B) de $^{13}C\{^1H\}$ a 50 MHz do composto 3a , em $CDCl_3$ a 19 °C.....	65
Figura 22 – Representação esquemática e o mecanismo sugerido da reação de <i>O</i> -propargilação para diferentes substituintes aromáticos.	66
Figura 23 – Espectros de RMN (A) de 1H a 200 MHz e (B) de $^{13}C\{^1H\}$ a 50 MHz do composto 4a , em $CDCl_3$ a 19 °C.....	67
Figura 24 – Espectro bidimensionais de (A) HSQC $^1H - ^{13}C$ e (B) de HMBC $^1H - ^{13}C$ a 400 MHz do composto 3d em $CDCl_3$	69
Figura 25 – Representação esquemática e o mecanismo da reação de bromação para diferentes substituintes aromáticos.	70
Figura 26 – Espectros de RMN (A) de 1H a 200 MHz e (B) de ^{13}C -APT a 50 MHz do composto 4a , em $CDCl_3$ a 19 °C.....	71
Figura 27 – Representação esquemática da reação de proteção do 4-MU para diferentes substituintes aromáticos.	72
Figura 28 – Espectros de RMN (A) de 1H a 400 MHz e (B) de $^{13}C\{^1H\}$ a 100 MHz do composto 6a , em $CDCl_3$ a 19 °C.....	73
Figura 29 – Variação espectral na região do UV-vis em função do pH para os substratos (A) 3a , (B) 3b , (C) 3c , e (D) 3d . As condições de análise foram: T = 37 °C, I = 140 mmol L ⁻¹ , e concentração de DMSO de 10% v/v.....	76

Figura 30 – Linearização da equação de Henderson-Hasselbach para diferentes substratos fenólicos 3	77
Figura 31 – Comparação entre o efeito eletrônico do substituinte aromático dos compostos 3 com o composto 3'	78
Figura 32 – Efeito substituinte hidroximetil no equilíbrio da reação de dissociação ácida dos substratos 3a-d	79
Figura 33 – Experimento de recuperação inversa. (A) Representação esquemática da sequência de pulso em diferentes períodos de τ . E (B) os espectros obtidos para 3a em diferentes valores de τ , cortou-se a janela espectral entre 3,7 ppm e 4,2 ppm para melhor visualização dos sinais de interesse. Condições: $[3b] = 20 \text{ mmol L}^{-1}$, $[AM] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$, 20% v/v de D ₂ O e 80% v/v de (CD ₃)SO a 19 °C. e 19 °C.....	80
Figura 34 – Obtenção dos valores de T_1 para os hidrogênios de interesse em função da intensidade dos sinais, ilustrados anteriormente na Figura 32.....	81
Figura 35 – Espectros de RMN de ¹ H da mistura reacional de 0,02 mol L ⁻¹ do composto 4b e do catalisador Na ₂ PdCl ₄ em (A) função do tempo de reação e (B) em 62,5 min. Condições reacionais: em 20% D ₂ O e 80% (CD ₃)SO à 19 °C.	82
Figura 36 – Gráfico de concentração das espécies 4b e 3b na reação de 0,02 mol L ⁻¹ do composto 4b e do catalisador Na ₂ PdCl ₄ em 20% D ₂ O e 80% (CD ₃)SO a 19 °C. .	83
Figura 37 – Linearização dos dados cinéticos experimentais normalizados para a reação de despropargilação do 3b com as leis de velocidade (A) de primeira e (B) de segunda ordem.	84
Figura 38– Perfil cinético para a reação de 0,02 mol L ⁻¹ de 4b com 0,02 mol L ⁻¹ de Na ₂ PdCl ₄ em 80% v/v de (CD ₃)SO e 20% v/v de D ₂ O e 19 °C.	85
Figura 39 – Linearização dos gráficos $\log k_{obs}, Xk_{obs}, H$ versus σ da reação de O-despropargilação mediada por Pd.....	86
Figura 40 - Esquema geral da reação de O-despropargilação mediada por Na ₂ PdCl ₄ a partir dos substratos 4a-d	87
Figura 41 – Espectros de absorção na região do UV-vis sobrepostos dos fenóis 3a-d e dos éteres de propargila 4a-d a 50 mmolL ⁻¹ e em PBS (0,01 mol L ⁻¹) com pH = 7,4 com 10% v/v DMSO. A) 3a e 4b . B) 3b e 4b . C) 3c e 4c . D) 3d e 4d	88
Figura 42 – Perfil de concentração obtida com $[3c] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: 0,01 mol L ⁻¹ PBS (pH = 7,4), $[Na_2PdCl_4] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$, 10 % v/v DMSO, T = 37 °C.	90

Figura 43 – Interdependência do logaritmo da $v_{inicial}$ com o logaritmo da concentração de (A) Pd e de (B) 4c. Condições gerais: 0,01 mol L ⁻¹ de PBS, pH = 7,4, 10 % v/v DMSO e 37 °C.....	91
Figura 44 – Esquema geral da reação de liberação da 4-MU a partir dos substratos 6a-d.....	92
Figura 45 – Espectros sobrepostos de emissão de fluorescência dos compostos 6a-d e da 4-MU, $\lambda_{excitação} = 376$ nm. Condições gerais: 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ das cumarinas, 0,01 mol L ⁻¹ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.	93
Figura 46 – Curvas de calibração utilizando concentrações entre 0 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 4-MU (A) sem Na ₂ PdCl ₄ e (B) com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Na ₂ PdCl ₄ . Condições gerais: 0,01 mol L ⁻¹ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.....	94
Figura 47 – Perfil de concentração da (■) reação de liberação de 4-MU em função do tempo, sendo [6b] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [Na ₂ PdCl ₄] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e de (●) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 4-MU com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Na ₂ PdCl ₄ . Condições gerais: 0,01 mol L ⁻¹ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.....	95
Figura 48 – Linearização dos gráficos $\log k_{obs}$, Xk_{obs} , H versus σ_{para} e σ_{meta} da reação de O-despropargilação mediada por Pd.....	96
Figura 49 – Esquema geral da reação de liberação da 4-MU, por meio das reações de O-despropargilação mediada por Pd ^{II} e de eliminação 1,4	97
Figura 50 - Perfil de concentração de 3c da reação de O-despropargilação mediada por Pd ^{II} em função do tempo, sendo [3c] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [Na ₂ PdCl ₄] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: 0,01 mol L ⁻¹ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Padronização das soluções de NaOH e de HCl.	52
Quadro 2 – Preparação das soluções tampões com valores de $I = 140 \text{ mmol L}^{-1}$	53
Quadro 3 – Constantes observadas de primeira ordem (k_{obs}) obtidas pelas regressões não lineares para a reação de <i>O</i> -despropargilação, referentes ao consumo do reagente, para diferentes substituintes aromáticos (R). Condições gerais: $[\mathbf{4a-d}] = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$, 20% v/v D_2O , 80% v/v $(\text{CD}_3)\text{SO}$ e $19 \text{ }^\circ\text{C}$	85
Quadro 4 – Velocidades iniciais obtidas para a reação de <i>O</i> -despropargilação de 4c com Na_2PdCl_4 e constantes de velocidades (k) calculadas a partir da Equação 17. Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e $37 \text{ }^\circ\text{C}$	90
Quadro 5 - Constantes observadas de primeira ordem (k_{obs}) obtidas pelas regressões não lineares para a reação liberação de 4-MU , referentes à formação de produto, para diferentes substituintes aromáticos (R). Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\mathbf{6a-d}] = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	QUÍMICA BIO-ORTOGONAL.....	18
2.1	APLICAÇÕES DA QUÍMICA BIO-ORTOGONAL.....	19
2.2	O DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS.....	22
2.3	REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS MEDIADAS POR METAIS DE TRANSIÇÃO 24	
2.3.1	Reações bio-ortogonais mediadas por paládio	27
2.3.2	Mecanismo da reação de eliminação espaçadores autoimolativos	34
2.3.2.1	<i>Tratamento quantitativo dos efeitos eletrônicos na reatividade de reações</i>	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	SEÇÃO EXPERIMENTAL	41
4.1	INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES	41
4.1.1	Reagentes	41
4.1.2	Instrumentação	41
4.1.2.1	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono-13 – RMN de ¹H e ¹³C</i>	42
4.1.2.2	<i>Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível – UV-vis</i> 42	
4.1.2.3	<i>Espectroscopia de fluorescência ou espectrofluorimetria</i>	42
4.1.2.4	<i>Ponto de fusão</i>	42
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	43
4.2.1	Síntese dos substratos modelos	43
4.2.1.1	<i>Síntese de derivados de 1-hidroxi-2-formilbenzeno (2)</i>	43
4.2.1.1.1	<i>4-metoxi-1-hidroxi-2-formilbenzeno (2a) e 4-metil-1-hidroxi-2- formilbenzeno (2b)</i>	43
4.2.1.1.2	<i>1-hidro-4-nitro-2-formilbenzeno (2c)</i>	44
4.2.1.2	<i>Síntese de derivados de 2-hidroxi-benzil álcool (3a-c)</i>	45
4.2.1.3	<i>Síntese de derivados de 2-hidroximetil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (4a-d)</i> ..	46
4.2.1.4	<i>Síntese de derivados de 2-(bromometil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (5a-d)</i>	48

4.2.1.5	Síntese de derivados de 4-metil-7-((2-(prop-2-il-1-oxi)benzil)oxi)-2H-cromen-2-onas (6a-d).....	49
4.2.2	Determinação de pK_a de derivados de 2-hidroxibenzil álcoois 3a-d	51
4.2.3	Estudos cinéticos	53
4.2.3.1	Experimentos de RMN de ¹ H.....	53
4.2.3.2	Experimentos de absorção na região do UV-vis.....	54
4.2.3.3	Experimentos de fluorescência.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS PARA AS REAÇÕES DE CLIVAGEM C-O	56
5.1.1	Formilação dos para-fenóis	56
5.1.1.1	orto-Formilação dos para-fenóis contendo grupos doadores de elétrons ...	57
5.1.1.2	orto-Formilação do para-fenol contendo o substituinte nitro	59
5.1.1.3	Caracterização dos benzaldeídos 2a-c por RMN de ¹ H e de ¹³ C{ ¹ H}	60
5.1.2	Redução do grupo formila	63
5.1.3	Propargilação dos grupos fenóis	65
5.1.4	Reação de bromação	70
5.1.5	Reação de proteção da 4-metilumbeliferona (4-MU).....	71
5.2	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ÁCIDA DE DERIVADOS 2-HIDROXIBENZIL ÁLCOOIS 3A-D.	74
5.3	ESTUDOS CINÉTICOS	79
5.3.1	Reação de O-despropargilação mediada por Pd dos éteres de propargila 4a-d	79
5.3.1.1	Estudos de espectroscopia de RMN de ¹ H.....	79
5.3.1.2	Estudos de espectroscopia de absorção na região do UV-vis.....	86
5.3.2	Reação de liberação dos protótipos 6a-d	92
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ¹H E DE ¹³C{¹H}.....	110
	APÊNDICE B – CURVAS DE PEFIL CINÉTICO E QUADROS	124
	APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO	133
	ANEXO A – DIREITO AUTORAIS.....	136

1 INTRODUÇÃO

O uso de reações bio-ortogonais como ferramenta na ativação de pró-fármacos, na implantação de sondas ou na marcação e ativação de proteínas, marcam a transição de reações realizadas em bancada para o meio biológico complexo. Tais reações, conforme compreendidas, possibilitam entregar fármacos às células de interesse pela liberação controlada da espécie ativa ou acompanhar processos biológicos com maior precisão por meio de metodologias de marcação com grupos fluorescentes.

Compreende-se como química bio-ortogonal o desenvolvimento de reações químicas ortogonais, que quando aplicadas *in vivo*, são seletivas e rápidas suficientes ($k > 1 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para não reagirem e nem interferirem com o meio biológico, além de envolverem o uso de reagentes e solventes atóxicos para as células e o organismo de interesse. As reações bio-ortogonais podem assumir um caráter associativo ou dissociativo, podendo ser mediadas por outra espécie ou condições reacionais. Por exemplo, comumente a liberação de pequenas moléculas, como a de fármacos, ocorre através de reações bio-ortogonais dissociativas pelo encontro de duas moléculas, como as reações de Diels-Alder de demanda inversa de elétrons (IEDDA), ou pela clivagem de grupos protetores mediada por espécies metálicas.

Entre as reações bio-ortogonais dissociativas, a clivagem de ligações C-O, C-N e C-C por meio da reação de despropargilação mediada por paládio (Pd) é uma ferramenta promissora para a ativação de pró-sondas fluorescentes e pró-fármacos. Em virtude ao potencial catalítico e à seletividade de espécies de Pd em relação a esses grupos protetores, é possível temporariamente suprimir a função biológica dessas espécies e liberá-las sob demanda do catalisador metálico. Essa abordagem proporciona um maior controle espaço-temporal das espécies durante o processo de administração de pró-fármacos e do catalisador metálico.

Além disso, a inserção de espaçadores autoimolativos, entre o grupo protetor e o fármaco, têm gerado grande interesse devido ao controle espaço-temporal adicional que eles oferecem, ou seja, após um período de ativação por uma reação bio-ortogonal, ocorrem uma ou mais etapas de eliminações que podem desencadear a liberação de uma ou mais espécies em locais de interesse e/ou de forma simultânea. Tais espaçadores são espontaneamente removidos por reações de eliminação do tipo

1,4 e 1,6 ou por ciclização. Estudos de relação estrutura-atividade com esses espaçadores autoimolativos apresentam oportunidades para pesquisa, dado o conhecimento ainda incipiente sobre os efeitos eletrônicos nas reações de eliminação 1,4 e O-despropargilação mediada por Pd.

Em virtude desta lacuna, neste trabalho serão empregados grupos O-propargiloxibenzílicos contendo substituintes distintos como grupos protetores do fluoróforo 4-metilumbeliferona, que é um agente modelo para o acompanhamento e avaliação dos perfis cinéticos derivados da reação de desproteção. Os parâmetros cinéticos e o conhecimento de conversão e formação de subprodutos foram obtidos via técnicas espectroscópicas de absorção na região do UV-vis, de RMN de ^1H , e de fluorescência, sob condições fisiológicas para a simulação do comportamento da reação em meio biológico.

Via estudos cinéticos e relações lineares de energia livre, obtidos a partir da reação de O-despropargilação e da ativação de pró-fluoróforos inéditos contendo substituintes aromáticos distintos, busca-se otimizar e compreender os efeitos eletrônicos na velocidade de reação e, conseqüentemente, a compreensão mecanística das reações de eliminação 1,4 e de O-despropargilação dos substratos propostos. Nesse sentido, a hipótese é que se a velocidade de quebra da ligação carbono-oxigênio via eliminação 1,4 dos grupos O-propargiloxibenzílicos for a etapa determinante, então a recuperação de fluorescência de derivados O-propargiloxibenzílicos da 4-metilumbeliferona poderá ser otimizada em função dos efeitos eletrônicos de substituintes distintos, de modo que o intermediário reacional sofra eliminações de 1,4 com maior velocidade e espontaneamente.

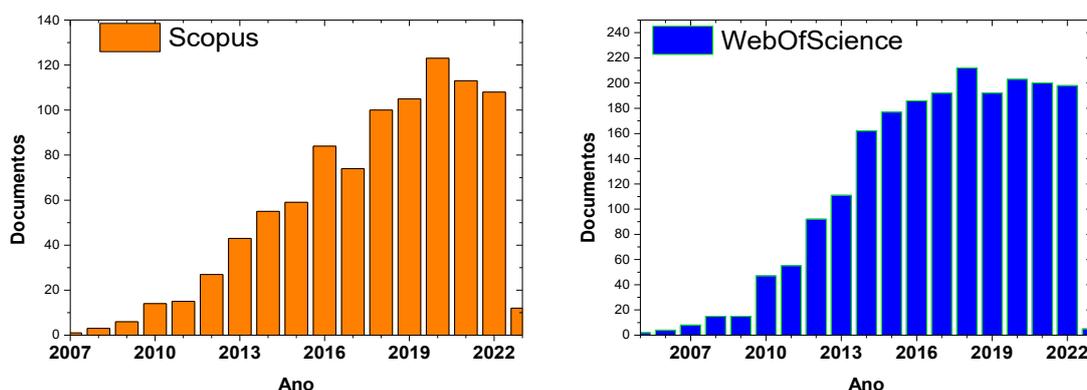
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUÍMICA BIO-ORTOGONAL

A partir dos desafios de imageamento e acompanhamento de processos celulares, originou-se uma nova subárea do conhecimento, segmentada da biologia química e estabelecida como química bio-ortogonal. Reações consideradas bio-ortogonais são transformações químicas seletivas, com altas velocidades de reação e com reatividade “ortogonal”^{*} aos processos bioquímicos (BIRD et al., 2021; SLETTEN; BERTOZZI, 2009). Atualmente, suas contribuições à ciência vão além de sua proposta inicial, como no desenvolvimento de novas estratégias para o combate de doenças (LATOCHESKI et al., 2020; PORTE et al., 2021; YI et al., 2022).

O termo “*bioorthogonal chemistry*” foi cunhado por Carolyn R. Bertozzi em 2003 (HANG et al., 2003), desde então houve um aumento considerável no número de publicações, como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Número de publicações contendo o termo “*bioorthogonal chemistry*” em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em 2022, a Academia Real das Ciências da Suécia laureou a Dra. Carolyn R. Bertozzi, o Dr. Morten Meldal e o Dr. K. Barry Sharpless pelo desenvolvimento da

^{*} Termo originalmente cunhado por Barany e Merrifield (1977), como grupos protetores que poderiam ser removidos independentemente da ordem e na presença dos outros, e expandido para outras áreas além da síntese. Para mais detalhes, consultar o artigo de revisão de Wong e Zimmerman (2013).

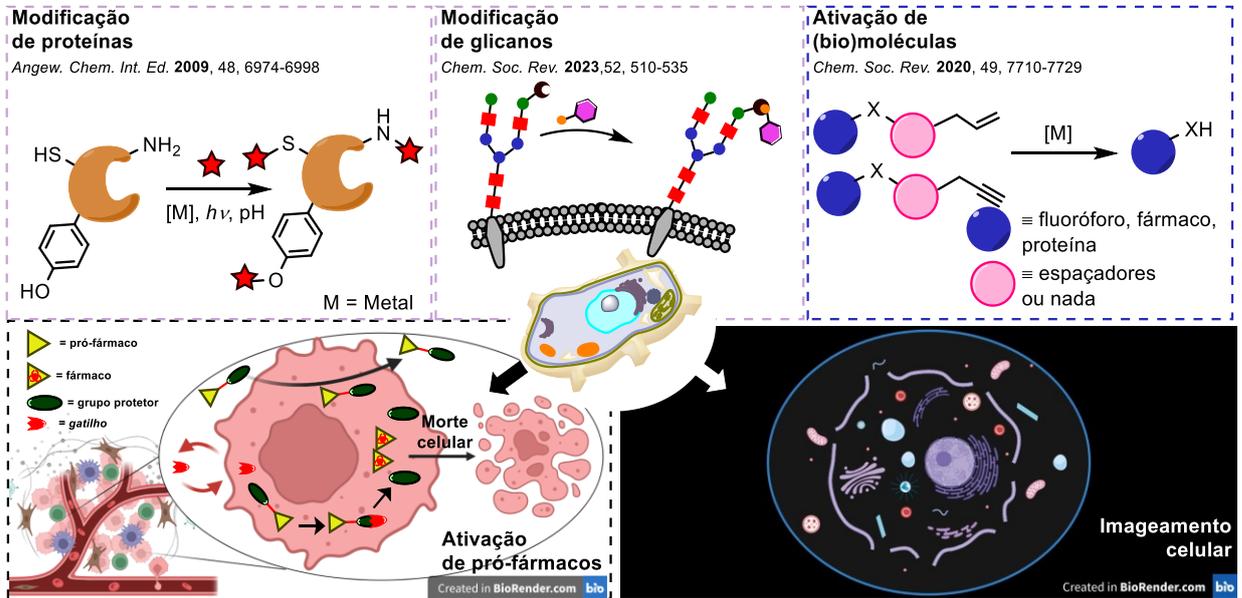
química *click* e da química bio-ortogonal (traduzido livremente a partir de “*for the development of click chemistry and bioorthogonal chemistry*”, “The Nobel Prize in Chemistry 2022”, [s.d.])), em reconhecimento à praticidade das estratégias propostas e às contribuições que estudos subsequentes trarão para a sociedade. Dentre as contribuições da química bio-ortogonal no período entre 2010 e 2020, a incorporação de grupos bio-ortogonais em biomoléculas, como proteínas, DNA, RNA, lipídeos, carboidratos, glicanos e outros, possibilitou o acompanhamento mais eficiente de processos biológicos (BIRD et al., 2021).

2.1 APLICAÇÕES DA QUÍMICA BIO-ORTOGONAL

O uso de proteínas fluorescentes geneticamente modificadas, como a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP), tornou-se uma das principais abordagens para seletivamente visualizar organelas em célula sob microscópio óptico (LIN; YANG; NEW, 2021; NIENHAUS, 2008). Com o avanço das técnicas de clonagem e expressão de genes específicos em células alvos, o uso da GFP em proteínas de interesse se tornou rapidamente uma inovação tecnológica em imageamento celular. Contudo a introdução de proteínas a organelas pode vir a interferir em processos biológicos, tornando a técnica inviável para imagear biomoléculas individualizadas, como lipídeos, ácidos nucleicos e glicanos (SLETTEN; BERTOZZI, 2009).

Inspirado por esses desafios, a adaptação de reações ao longo do século e o desenvolvimento de novas reações surgiram para atender às demandas científicas, e tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química bio-ortogonal, que por sua vez tornou-se um arcabouço de ferramentas para diversas outras modificações e aplicações (Figura 2), entre elas modificações de proteínas (STUMP, 2022; WU; CHENG, 2023), ativação de moléculas (LATOCHESKI et al., 2020), modificação de glicanos (KUFLEITNER; HAIBER; WITTMANN, 2023; YI et al., 2022), e no imageamento celular (JIN et al., 2023; NGUYEN; PRESCHER, 2020; ZHAO et al., 2004) e na ativação de pró-fármacos (SHU et al., 2021; WANG et al., 2021; WU et al., 2022).

Figura 2 – Representações ilustrativas de usos da química bio-ortogonal em (A) Modificação de proteínas, glicanos e na ativação de moléculas *in vivo* e (B) suas aplicações na ativação de pró-fármacos e no imageamento celular.



Fonte: Elaborado pelo autor.

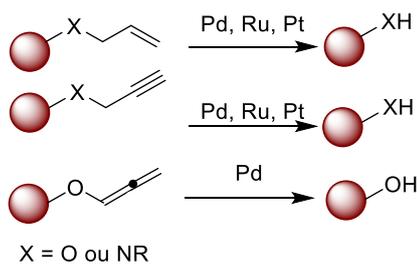
Entre as aplicações, o tratamento de doenças cancerosas usando a química bio-ortogonal é uma das tecnologias mais promissoras provindas da área (DONG et al., 2022; JI et al., 2019; SABATINO; UNNIKRISHNAN; BERNARDES, 2022; WU et al., 2022). Nesta abordagem, recorre-se frequentemente ao uso do termo “*pró-fármaco*”, agente terapêutico inativo e derivado sintético de um fármaco de interesse (Figura 3A). Na forma de pró-fármaco há uma ligação que pode ser quebrada entre o fármaco (ou protótipo de fármaco) e outra molécula sensível a um gatilho externo. A ativação da molécula alvo pode ser mediada pela catálise de metais de transição (LATOCHESKI et al., 2020; SABATINO; UNNIKRISHNAN; BERNARDES, 2022) ou por influência de uma segunda molécula bio-ortogonal (WU et al., 2022).

Figura 3 – Ilustração esquemática sobre (A) Modificação sintética de um fármaco convencionalmente, sob condições reacionais controladas, e a posterior ativação do pró-fármacos em sistemas biológicos e após um gatilho abiótico. E exemplos genéricos da liberação de fármacos por reações bio-ortogonais mediadas (B) por metais de transição ou (C) por uma molécula abiótica.

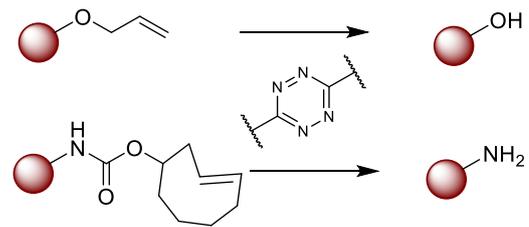
A. Ativação de pró-fármacos pequenos



B. Ativação mediada por metais de transição



C. Liberação mediada por uma molécula abiótica



Fonte: Elaborado pelo autor.

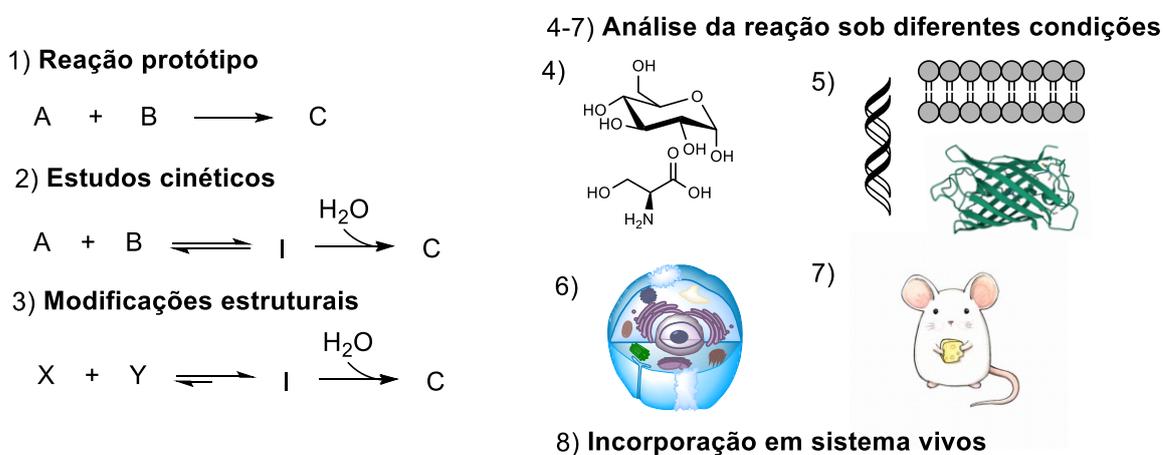
As vantagens do uso de pró-fármacos podem ser resumidos em (RAUTIO et al., 2018): aumento na solubilidade aquosa do composto, melhora na permeabilidade passiva ou no transporte por proteínas pela membrana celular, aumento na estabilidade metabólica, tempo de ação prolongada e amenização de efeitos adversos. Por meio dessa abordagem, a química bio-ortogonal possibilitou o desenvolvimento de novos pró-fármacos, ampliando o número de moléculas candidatas para o tratamento de novas doenças, e acentuando a seletividade de tratamentos convencionais às células de interesse, que por sua vez servem como incentivos para a modernização dos tratamentos convencionais (MEGHANI; AMIN; LEE, 2017).

2.2 O DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS

Segundo a pesquisadora Carolyn R. Bertozzi (2011), o primeiro trabalho de desenvolvimento de uma reação bio-ortogonal foi o de Rideout e colaboradores (1990). Os autores racionalizaram uma reação bio-ortogonal a partir de uma reação protótipo (reação de condensação entre hidrazinas e aldeídos), e a adaptaram às condições biologicamente compatíveis, i.e., conduziram-se experimentos iniciais em soluções tamponadas a 37 °C, e prosseguiram para estudos *in celula* (RIDEOUT et al., 1990). O estudo sistemático e a obtenção dos parâmetros físico-químicos é essencial para avaliar a bio-ortogonalidade de uma reação, afim de evitar falsas hipóteses na transposição do meio controlado reacional para o meio biológico complexo (SLETTEN; BERTOZZI, 2011).

A sequência dos experimentos sugeridos para o desenvolvimento de uma reação bio-ortogonal encontra-se ilustrada na Figura 4 (SLETTEN; BERTOZZI, 2011), e discutida a seguir. A primeira etapa (Figura 4, 1)) corresponde a identificação de uma reação protótipo, no qual os reagentes **A** e **B** devem ser inertes e estáveis às condições biológicas e após algum “gatilho”, i.e., ação de um catalisador ou de outro reagente, forma-se o produto **C**, que por sua vez pode ser um fluoróforo, biomolécula ou fármaco.

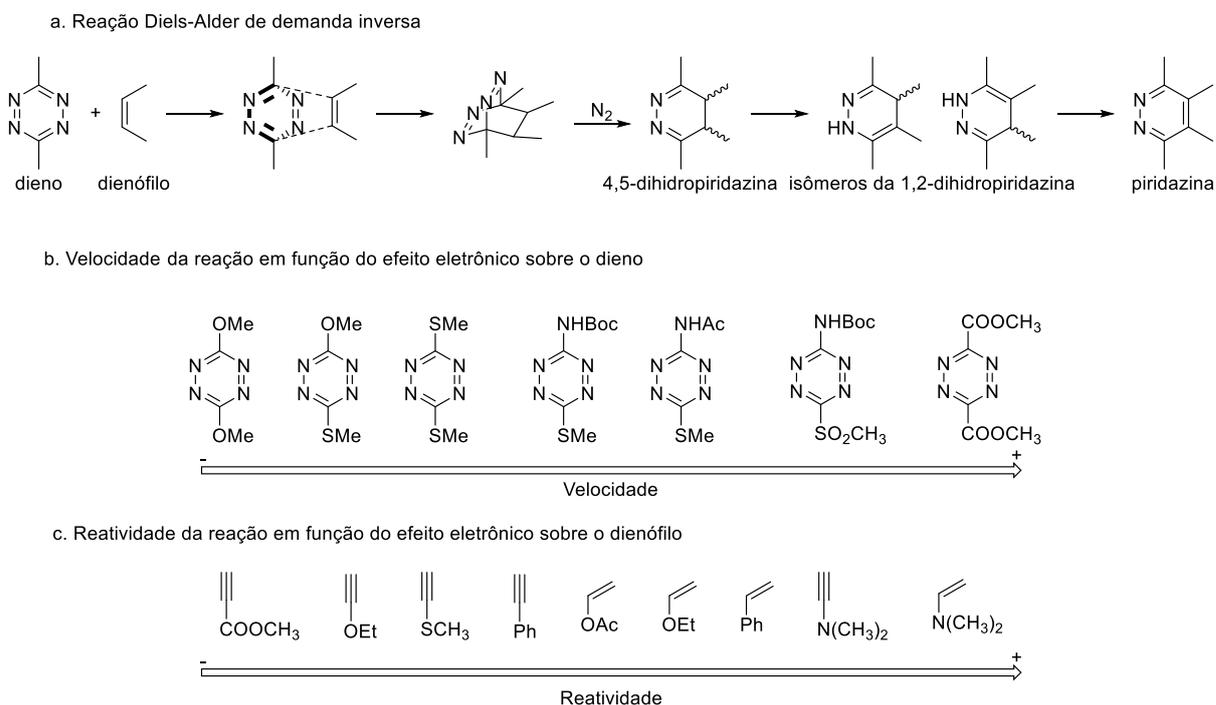
Figura 4 – Estudo sistemático para a adaptação de uma reação protótipo, e seu comportamento sob condições biologicamente compatíveis.



Fonte: Elaborado pelo autor

A segunda etapa (Figura 4, 2)) é a compreensão da reatividade dos reagentes e dos intermediários formados, e também do mecanismo reacional. Os estudos cinéticos devem ser conduzidos sob condições pré-biológicas, ou seja, em soluções aquosas tamponadas, sob temperaturas biologicamente compatíveis, e contendo o mínimo de cossolvente necessário para os estudos iniciais. Posteriormente, modificações estruturais dos substratos **A** e **B** para **X** e **Y** devem ser realizadas (Figura 4, 3)) de forma racional, para contornar problemas de reatividade ou de solubilidade, evitando-se baixas conversões e longos tempos reacionais. Nesse sentido, o artigo de revisão de Oliveira et al. (2017) enfatiza a importância das estruturas do dieno e do dienófilo da reação de Diels-Alder de demanda inversa (Figura 5A), e a influência dos efeitos eletrônicos de ambos (Figura 5B e 5C).

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de uma reação IEDDA (a), e a influência da estrutura, por meio de efeitos eletrônicos, na velocidade da reação (b) do dieno e (c) do dienófilo.



Fonte: Adaptado de **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 16, p. 4895–4950.

Posteriormente, aumenta-se gradualmente a complexidade do meio reacional, para meios contendo aminoácidos e açúcares (Figura 4, 4)), meios contendo biomoléculas provenientes de células lisadas (Figura 4, 5)), células vivas (Figura 4, 6)), e, por fim, em organismos multicelulares, como peixes zebras ou ratos (Figura 4,

7)). Avaliar o comportamento da reação em função do meio reacional abre janela para considerar modificações estruturais adicionais, e ainda, analisar se há alguma preferência onde a reação sucede, de forma intracelular ou extracelular, em células cancerígenas ou saudáveis, em alguma organela celular, etc. (SLETTEN; BERTOZZI, 2011).

Por fim, as reações bio-ortogonais devem ser biocompatíveis, possuírem altas taxas de conversão, seletivas aos grupos funcionais ou às moléculas envolvidas na reação, inicialmente atóxicos e biologicamente inertes, e de engenharia acessível. Podem ser de caráter dissociativo ou associativo (TU; XU; FRANZINI, 2019), e subdividas em reações mediadas ou livres de metais de transição. Entre as reações bio-ortogonais com elevada aplicabilidade na manipulação estrutural e funcional de biomoléculas, estão: cicloadições 1,3-dipolar entre azidas e ciclo-octinos e entre nitronas e ciclo-octinos, na formação de oxima/hidrazona a partir de aldeídos e cetonas, na ligação da tetrazina, em reações de acoplamento carbono-carbono ou de desproteções mediadas por metais (BEUTICK; VERMEEREN; HAMLIN, 2022; CHINOY; FRISCOURT, 2023; PATTERSON; NAZAROVA; PRESCHER, 2014; SABATINO; UNNIKRISHNAN; BERNARDES, 2022; WU et al., 2022).

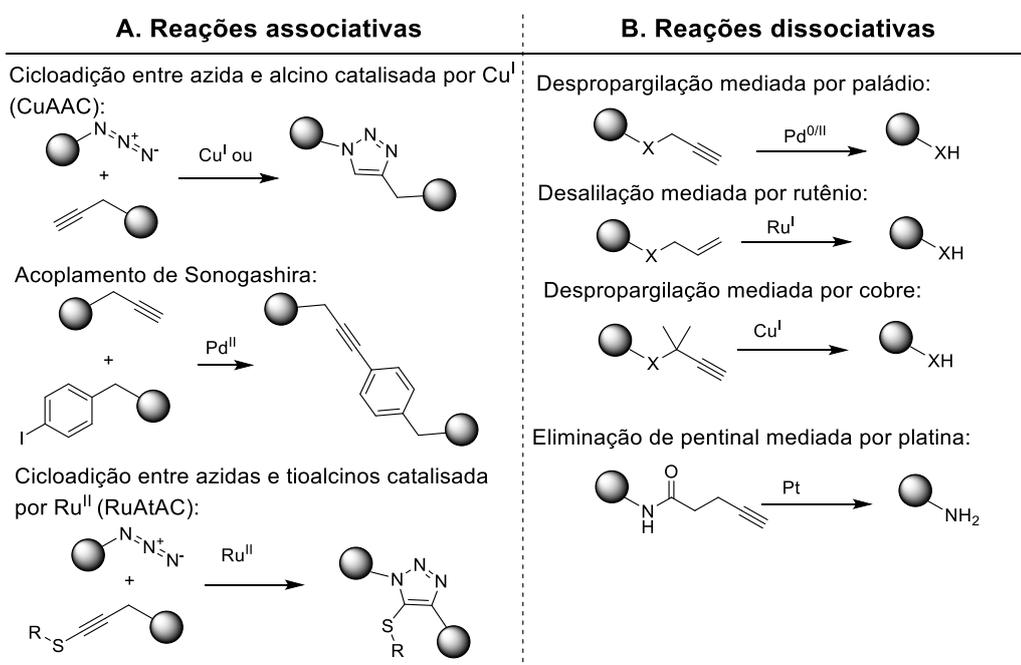
2.3 REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS MEDIADAS POR METAIS DE TRANSIÇÃO

A utilização de metais de transição, seja na forma de complexos metálicos ou de nanopartículas, é amplamente explorada em diversas áreas de aplicação, tais como no desenvolvimento de catalisadores, agentes quimioterápicos (MEI et al., 2020; ROMERO; SADLER, 2014; ZHANG et al., 2023), na catálise assimétrica (ZHANG; HU; MORKEN, 2021), catálise por átomos isolados (MURZIN, 2023; SAMANTARAY et al., 2021), catálise suportada em redes metalorgânicas (CHEN et al., 2021), na química verde (COLACOT; LIPSHUTZ, 2022), entre outros (RASMUSSEN, 2020). Apesar da sensibilidade dos metais de transição à ambientes biológicos, devido aos processos de desativação por meio da interação de glutations, tióis ou bases nucleofílicas *in celula*, grandes esforços tornaram possível o desenvolvimento de novas reações bio-ortogonais, e observou-se que as velocidades de reações, modificações possíveis, propriedades catalíticas, etc., observadas quando tais

compostos são empregados, são características únicas desses sistemas (DESTITO et al., 2021; SEOANE; MASCAREÑAS, 2022).

As reações bio-ortogonais mediadas por metais de transição podem ser de caráter dissociativo ou associativo (TU; XU; FRANZINI, 2019), conforme ilustradas na Figura 6. Em geral, na química bio-ortogonal os metais rutênio (Ru), paládio (Pd), cobre (Cu), ouro (Au) e platina (Pt) são os mais recorrentes na literatura, devido a alta seletividade e biocompatibilidade das reações, na forma de *gatilhos* (Figura 6B), como comentado no tópico 2.1, ou em reações de acoplamento (Figura 6A).

Figura 6 – Exemplos de reações bio-ortogonais (A) associativas e (B) dissociativas mediadas por metais de transição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As reações bio-ortogonais dissociativas são projetadas com o intuito de quebrar uma ligação química específica, além de preservar temporalmente as funções biológicas de uma molécula por meio de um grupo protetor, e posteriormente, a liberação sob demanda das moléculas de interesse (TU; XU; FRANZINI, 2019). Enquanto que a finalidade das reações bio-ortogonais associativas é a formação de uma ligação específica, entre aminoácidos não naturais, grupos funcionais introduzidas em biomoléculas, ou resíduos de aminoácidos naturais (PATTERSON; NAZAROVA; PRESCHER, 2014). Ressalta-se ainda que ambas as definições podem

ser usadas para reações mediadas ou livres de metais de transição. Embora não exista um consenso na academia científica de que reações com ou livres de metais são mais promissoras, o uso de catalisadores metálicos permite que mais de uma modificação bio-ortogonal seja mediada por uma única espécie catalítica (LATOCHESKI et al., 2020).

O envenenamento ou degradação de catalisadores por grupos ácidos, básicos, coordenantes e redox presentes nos meios biológicos, e a toxicidade intrínseca, são agentes limitantes no uso de espécies metálicas em reações bio-ortogonais (KODAMA et al., 2007). Para contornar tais limitações torna-se necessário o desenvolvimento de novas reações protótipo, novos ligantes ou estabilizantes, aprimorando ainda a permeabilidade destes compostos pela membrana celular, sua estabilidade, o número de ciclos catalíticos reacionais (número de conversão ou TON), a não perturbação das funções biológicas, e serem seletivos e suficientemente velozes para minimizarem reações paralelas e efeitos adversos (DESTITO et al., 2021).

Apesar das dificuldades supracitadas, os metais de transição em sistemas biológicos tornam possíveis modificações químicas seletivas, sob condições biologicamente compatíveis, que seriam impossíveis de serem realizadas na sua ausência ou por outros meios (ZHANG; FAN, 2022). Ademais, quando na forma de catalisadores, como nanopartículas, enzimas sintéticas, complexos metálicos, etc., proporcionam reações novas à natureza em meios biológicos, diferentes das reações enzimáticas naturais às células, como na produção de agentes bioativos com controle espaço-temporal (REBELEIN; WARD, 2018; WANG et al., 2021). Dessa maneira, a regeneração e o reuso *in vivo* de um catalisador metálico permitem que várias moléculas bioativas sejam preparadas sob concentrações baixas de metal, tornando a abordagem mais efetiva que o emprego de reações bio-ortogonais não mediadas por metais de transição.

Sob grandes perspectivas, o uso dos metais de transição Ru, Pd, Au e Pt em reações bio-ortogonais e com foco na liberação controlada sob demanda de agentes quimioterápicos, tornou-se uma das metodologias promissoras para o desenvolvimento de novos tratamentos (SABATINO; UNNIKRISHNAN; BERNARDES, 2022). O uso de pró-fármacos permite minimizar os efeitos adversos causados pela quimioterapia, modalidade terapêutica amplamente difundida para tratar doenças cancerosas (AHMAD et al., 2023; UPADHYAY, 2021), por meio do

aumento da seletividade às células cancerosas e diminuindo os sintomas causados pela concentração de fármacos em células saudáveis.

2.3.1 Reações bio-ortogonais mediadas por paládio

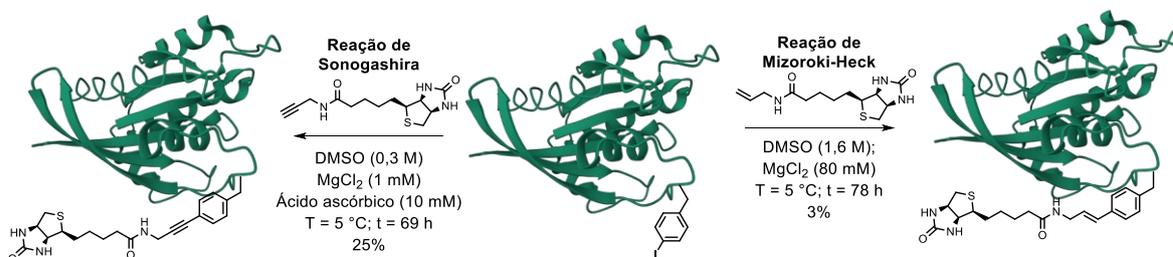
Dentre os metais de transição usados na química bio-ortogonal, destacam-se os reagentes e catalisadores de Pd, devido às suas propriedades catalíticas e à capacidade de mediar diversos tipos de reação (SEOANE; MASCAREÑAS, 2022). Inicialmente, sabia-se que as reações mediadas por esse metal eram tolerantes a grupos hidroxil (HOR) ou carbonila (R_2CO), e são versáteis para a formação de ligações carbono-carbono (TSUJI, 2004). Entre essas reações, os acoplamentos de Suzuki, de Negishi, de Heck, de Sonogashira, e de Stille são de notório reconhecimento em inúmeras aplicações (MILLER et al., 2017). Com base nesses protótipos de reações, surgiu um grande interesse em adaptá-las para o meio biológico, visando o desenvolvimento de novas reações bio-ortogonais.

Dependendo dos ligantes aos quais o paládio está coordenado, o complexo metálico pode apresentar atividades citotóxicas em células de interesse (DAS et al., 2023; DENISOV, 2023; ZHANG et al., 2023), ou atuar como catalisador atóxico (CHANKESHWARA; INDRIGO; BRADLEY, 2014; DONG et al., 2023; MILLER et al., 2017). No caso de reações bio-ortogonais, a segunda abordagem é a mais promissora devido à baixa citotoxicidade do paládio, além de possuir um maior potencial como ferramenta para mediar reações sob condições biológicas e em células.

Em 2007, Kodama e coautores modificaram uma proteína do vírus do sarcoma do rato (ou *RAS*), via reações de acoplamento C-C mediadas por acetato de paládio ($Pd(OAc)_2$, Figura 7) (KODAMA et al., 2007). Após a incorporação do aminoácido não natural 4-iodo-*L*-fenilalanina na proteína de interesse, fez-se a inserção da biotina (Vitamina B₇) propargilada ou alilada por meio das reações de Sonogashira e de Mizoroki-Heck, respectivamente. Dependendo das condições empregadas, como a concentração dos aditivos usados, força iônica, temperatura, e o tempo reacional, havia variações significativas na conversão e na posição preferencial de funcionalização. Sob condições biológicas, relataram a primeira inserção de grupos bio-ortogonais em uma proteína a partir de complexos organometálicos de paládio, preservando a estabilidade da proteína e com rendimentos de baixo a moderado,

sendo 3% para a reação Mizoroki-Heck e 25% para a reação Sonogashira, respectivamente.

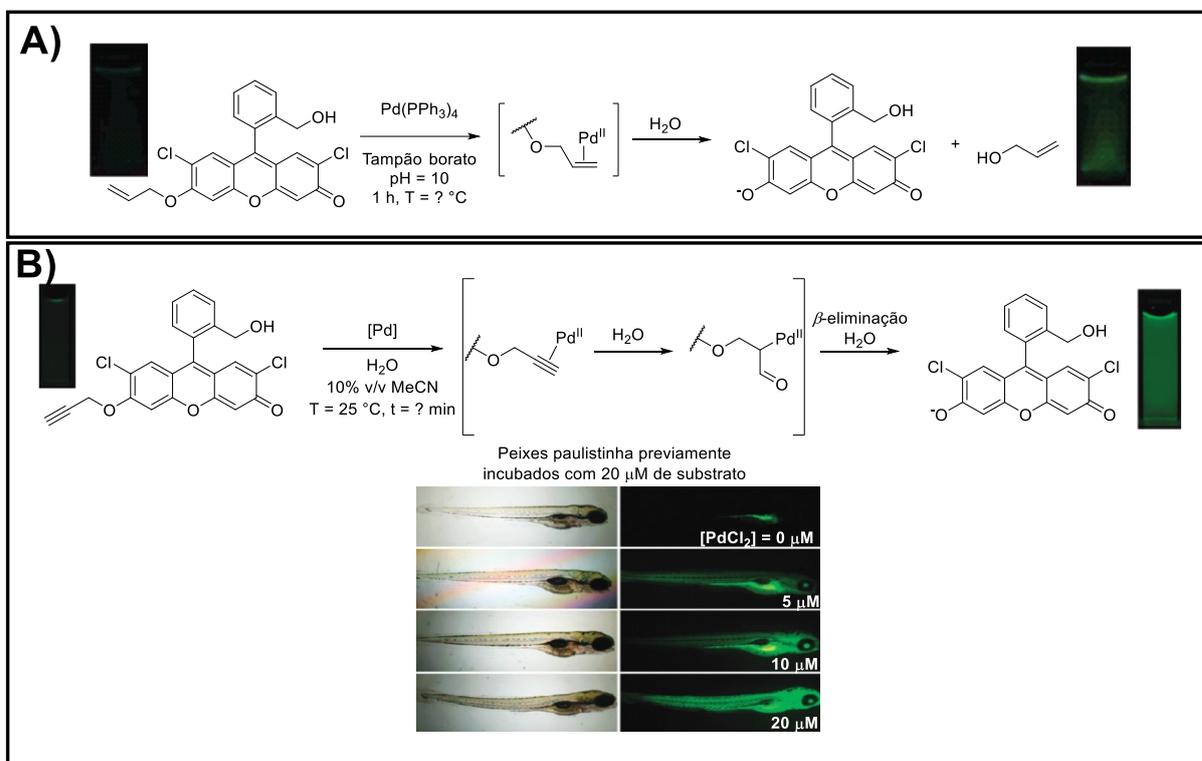
Figura 7 – Modificação da proteína RAS via reação de acoplamento de Sonogashira e de Mizoroki-Heck.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No mesmo ano, Song e coautores relataram a detecção de espécies de Pd⁰ por meio da clivagem da ligação C-O de grupos alílicos (Figura 8A), reação estilo Tsuji-Trost (LATOCHESKI et al., 2020). E, três anos depois, os pesquisadores Santra e coautores (2010), relataram de forma inédita a detecção de espécies de paládio através da clivagem de ligações C-O de grupos propargílicos da pró-sonda fluorescente (ou pró-fluoresceína) em sistemas *in vivo* (Figura 8B). Como parte do experimento, eles incubaram a pró-sonda em peixes paulistinhas (*Zebrafish*) com uma concentração de 20 μmol L⁻¹ por 5 dias. Trinta minutos após a adição de cloreto de paládio (PdCl₂), os modelos vivos apresentaram fluorescência quando observados no microscópio, com intensidade dependente da concentração de paládio utilizada. Dessa maneira, eles demonstraram o notável potencial do paládio em mediar reações de O-despropargilação e O-desalilação de moléculas fluorescentes sob condições biológicas em sistemas *in vivo* (SANTRA et al., 2010).

Figura 8 – Detecção de espécies de paládio em meios aquosos por meio da reação (A) de O-desalilação mediada por Pd⁰ (SONG; GARNER; KOIDE, 2007) e (B) de O-despropargilação mediada por Pd^{II} (SANTRA et al., 2010).



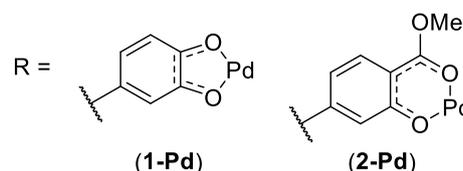
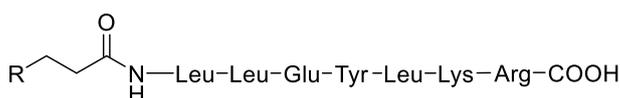
Fonte: Adaptado de **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 41, p. 12354–12355, 1 out. 2007, e de **Chemical Communications**, v. 46, n. 22, p. 3964–3966, 14 jun. 2010.

Os trabalhos supracitados, pioneiros na utilização do Pd como um metal para reações de acoplamento C-C em enzimas ou de clivagem de ligações C-O em sistemas biológicos, serviram de motivação para o desenvolvimento de novos sistemas que empregassem o metal na sua forma biocompatível e catalítico (CHASTEEN et al., 2023; CLAVADETSCHER et al., 2017; DAL FORNO et al., 2023; DENG et al., 2023; DOS SANTOS et al., 2021; HOOP et al., 2018; LI et al., 2017, 2015; MANCUSO et al., 2020; MARTÍNEZ et al., 2020; MILLER et al., 2017; “Neutrophil-Membrane-Directed Bioorthogonal Synthesis of Inflammation-Targeting Chiral Drugs”, 2020; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2023; RONG et al., 2023; RUBIO-RUIZ; WEISS; UNCITI-BROCETA, 2016; SANCHO-ALBERO et al., 2019; TEVET et al., 2021; WANG et al., 2018; WEI et al., 2022).

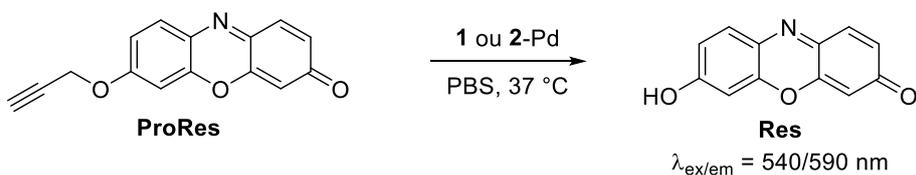
Entre as reações mediadas por Pd, as reações de *O,N*-despropargilação são importantes metodologias bio-ortogonais para ativar pró-fármacos e/ou pró-fluoróforos, sendo de grande aplicação na introdução de espécies citotóxicas ou fluorescentes. A clivagem das ligações C-O ou C-N permite a recuperação da atividade desejada em locais que contenham catalisadores a base de Pd (CHO et al., 2021; LATOCHESKI et al., 2020; LEARTE-AYMAMÍ et al., 2020; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2023; SABATINO; UNNIKRISHNAN; BERNARDES, 2022). Em particular, Pérez-López e coautores (2023) relataram o uso de metalopeptídeos contendo a cadeia peptídica marcada com salicilato de metila complexado com Pd⁰ (Figura 9), como catalisador homogêneo bio-ortogonal em reações de *O*-despropargilação e de acoplamento C-C. Por meio de estudos cinéticos das reações de *O*-despropargilação do pró-fluoróforo **ProRes** (Figura 9B) e de acoplamento C-C entre o HNIBr e PBA (Figura 9C), os autores obtiveram maiores constantes de reação e conversões para produto com metalopeptídeos, como os ilustrados na Figura 9A, em comparação com os ligantes livres de cadeia peptídica.

Figura 9 – Uso de (A) metalopeptídeos de paládio em reações de (B) *O*-despropargilação e de (C) acoplamento C-C

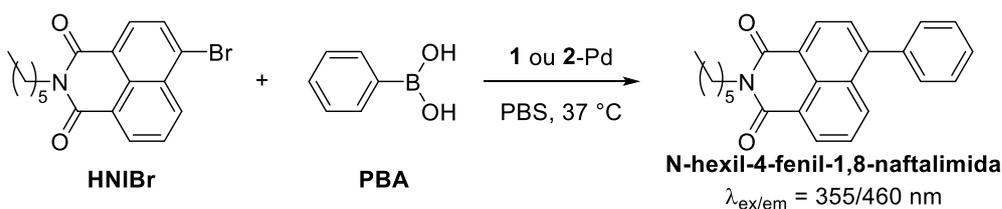
A) Representação dos metalopeptídeos



B) Reação de *O*-despropargilação



C) Reações de acoplamento C-C

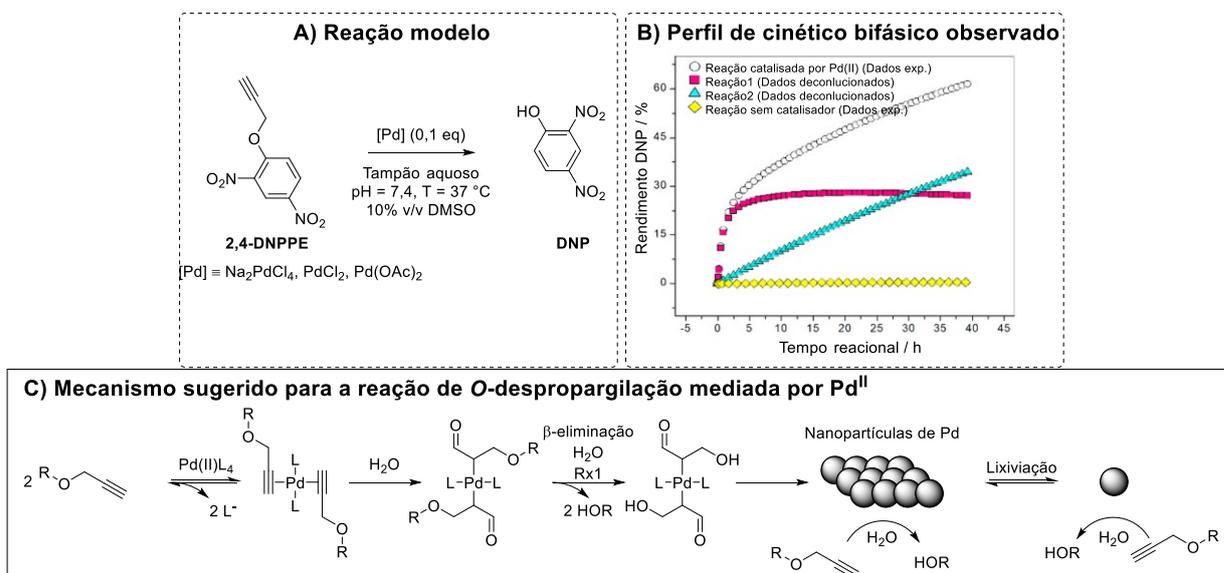


Fonte: Adaptado de **J. Med. Chem.**, v. 66, 3301-3311, 23 fev. 2023.

Em relação ao mecanismo da reação de acoplamento de C-C em meio aquoso, até o momento não foram realizados estudos cinéticos nem o isolamento de intermediários. No entanto, propõe-se que esse mecanismo deve ser similar ao acoplamento Suzuki-Miyaura (D'ALTERIO et al., 2021).

Já em relação ao mecanismo das reações de *O*-despropargilação, um estudo conduzido por Coelho e coautores (2019) explorou a reação sob condições biológicas, i.e., em soluções tamponadas com fosfato com potencial hidrogeniônico (pH) igual a 7,4 e a 37 °C, e com o substrato éter 2,4-dinitrofenílico e propargílico (*2,4-dinitrophenyl propargyl ether*, DNPPE, Figura 10A) (COELHO et al., 2019).

Figura 10 – Reação de *O*-despropargilação mediada por sais de Pd(II).



Fonte: Adaptado de **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 3792–3799, 2019.

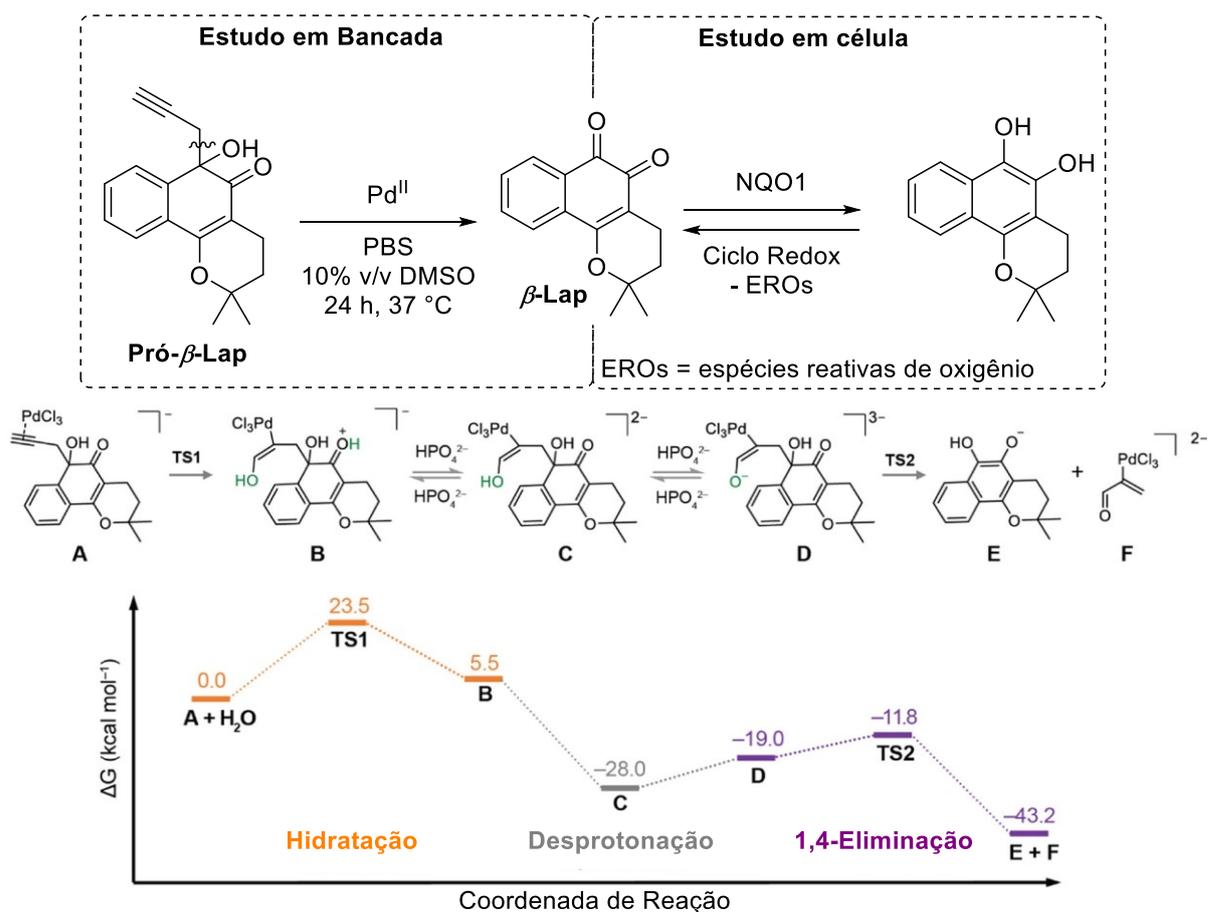
As cinéticas de reação de *O*-despropargilação contendo sais de Pd^{II}; como Pd(OAc)₂, tetracloropaladato de sódio (Na₂PdCl₄) e cloreto de paládio (PdCl₂); exibiram um perfil bifásico (Figura 10B), ou seja, a primeira etapa (Rx1) correspondeu a uma reação rápida com a espécie mais ativa de Pd ($k_{obs} = 0,66 \text{ h}^{-1}$), enquanto a segunda etapa (Rx2) envolveu a espécie de Pd menos ativa ($k_{obs} = 0,045 \text{ h}^{-1}$). Por meio do monitoramento da reação por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (*High-resolution electrospray ionization mass spectrometry*, HRMS–ESI), foram identificados intermediários da reação, que

posteriormente contribuíram para a construção de um modelo teórico do mecanismo da reação (Figura 10C) por meio de cálculos computacionais.

O mecanismo sugerido por Coelho e coautores (2019), tem início com a troca dos ligantes lábeis do paládio por dois grupos propargis, seguido por um ataque nucleofílico anti-Markovnikov da água, levando a formação de um intermediário enolato. Após sofrer tautomerização para a espécie cetona, ocorre a eliminação β -O do intermediário cetona, seguida de hidratação da cetona α,β -insaturada. Por meio de cálculos computacionais, observou-se pelo perfil energético que a etapa determinante é a eliminação β -O unimolecular, e que a formação de nanopartículas de Pd *in situ* seriam responsáveis por uma reação paralela, mais lenta, formando o mesmo produto.

Recentemente, o trabalho de Dal Forno e coautores (2023) expandiram o uso do Pd para clivagem de ligações C-C, na ativação de pró-fármacos quimioterápicos (Figura 11). Os autores observaram com ineditismo a reação de despropargilação do pró-fármaco da β -Lapachona (**β -Lap**), protegida com o grupo propargil (**Pró- β -Lap**), sob condições biologicamente compatíveis. E em ensaios em células e *in vivo* da **Pró- β -Lap**, observou-se a diminuição da viabilidade de células cancerosas e do tamanho do tumor sólido em ratos, respectivamente, utilizando nanopartículas de paládio (II) (Pd-NPs). Devido a formação de **β -Lap** livre, há um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando as células cancerosas a um estresse oxidativo e sua consequente morte.

Figura 11 – Reação de clivagem C-C por meio da despropargilação mediada por Pd^{II} e seu respectivo mecanismo por cálculos computacionais de DFT.



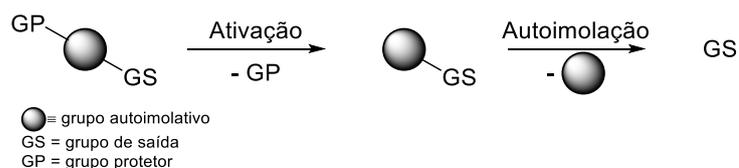
Fonte: Adaptado de *J. Am. Chem. Soc.*, v. 145, n. 19, 10790-10799, 2023.

Por meios de cálculos computacionais e do acompanhamento da distância da ligação C-C a ser clivada, observou-se que, inicialmente, ocorre uma etapa de hidratação do grupo alcino (Figura 11) (DAL FORNO et al., 2023), esta etapa é semelhante ao mecanismo proposto anteriormente (Figura 10C). Durante o processo da tautomerização do grupo enolato, em que ocorre a desprotonação, o mecanismo prossegue por uma etapa de eliminação 1,4, que é responsável pela liberação da dihidroquinona.

2.3.2 Mecanismo da reação de eliminação espaçadores autoimolativos

Para o controle espaço-temporal da liberação de fármacos e/ou de fluoróforos, o uso de grupos espaçadores que possam ser espontaneamente eliminados se tornaram componentes essenciais no desenvolvimento de sistemas moleculares sofisticados e eficientes (WANG et al., 2023). Esses grupos são chamados de espaçadores autoimolativos (Figura 12) e possuem ligações covalentes dinâmicas sensíveis a *gatilhos* externos (etapa de ativação), e intermediam a reação de desproteção com a liberação (reação de eliminação) de uma ou mais espécies em solução, de forma sequencial (reações em tandem).

Figura 12 – Representação esquemática do grupo autoimolativo e a liberação da espécie ativa via uma etapa espontânea.



Fonte: Elaborado pelo autor.

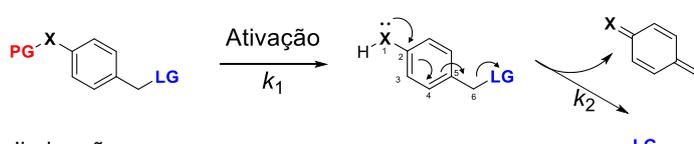
Desde 1981, esses espaçadores têm recebidos significativa atenção devido às suas aplicações em adesivos degradáveis sob demanda, quimiosensores, e detectores de compostos tóxicos (GAVRIEL et al., 2022), bem como no desenvolvimento de novos pró-fármacos usados contra o câncer (EDUPUGANTI; TYNDALL; GAMBLE, [s.d.]). Com a descoberta contínua de novas aplicações para esses sistemas moleculares, torna-se necessário a realização de estudos cinéticos para avaliar a reatividade e o controle espaço-temporal da etapa de eliminação (ALOUANE et al., 2015).

A etapa de eliminação pode decorrer da deslocalização de um par de elétrons de um grupo hidroxil (OH), amina (NH₂) ou tiol (SH) por um centro aromático (Figura 13A) ou, alternativamente, por meio de reações de ciclização intramoleculares (Figura 13B). Apesar das diferenças, ambos levam a um caminho onde a última etapa é espontânea e irreversível, devido ao aumento na entropia do sistema, acompanhado pela formação de produtos termodinamicamente estáveis (ALOUANE et al., 2015; GAVRIEL et al., 2022).

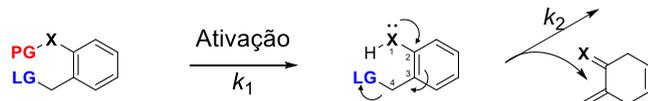
Figura 13 – Exemplos de espaçadores autoimolativos. A reação de eliminação via deslocalização de elétrons (**A**) pode ser via: **i**) eliminação 1,6; **ii**) eliminação 1,4; ou **iii**) descarboxilação. Enquanto a reação de ciclização intramolecular (**B**) pode ocorrer via: **i**) 1,5-ciclização; **ii**) 1,6-ciclização; e **iii**) 1,7-ciclização.

A) Eliminação via deslocalização de elétrons

i) 1,6 eliminação

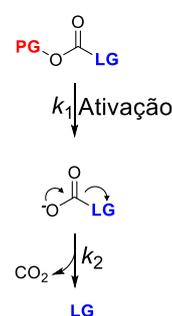


ii) 1,4 eliminação



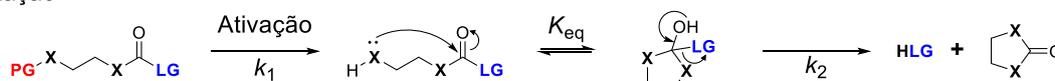
X = NH, O, S

iii) Descarboxilação

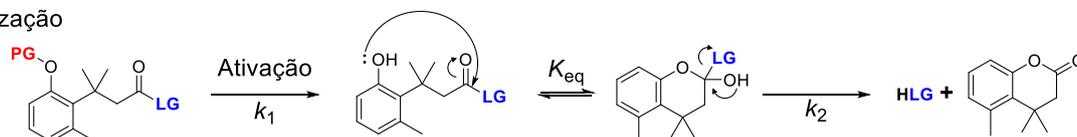


B) Eliminação via reação de ciclização intramolecular

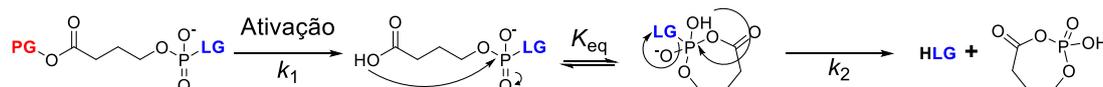
i) 1,5-ciclização



ii) 1,6-ciclização



iii) 1,7-ciclização

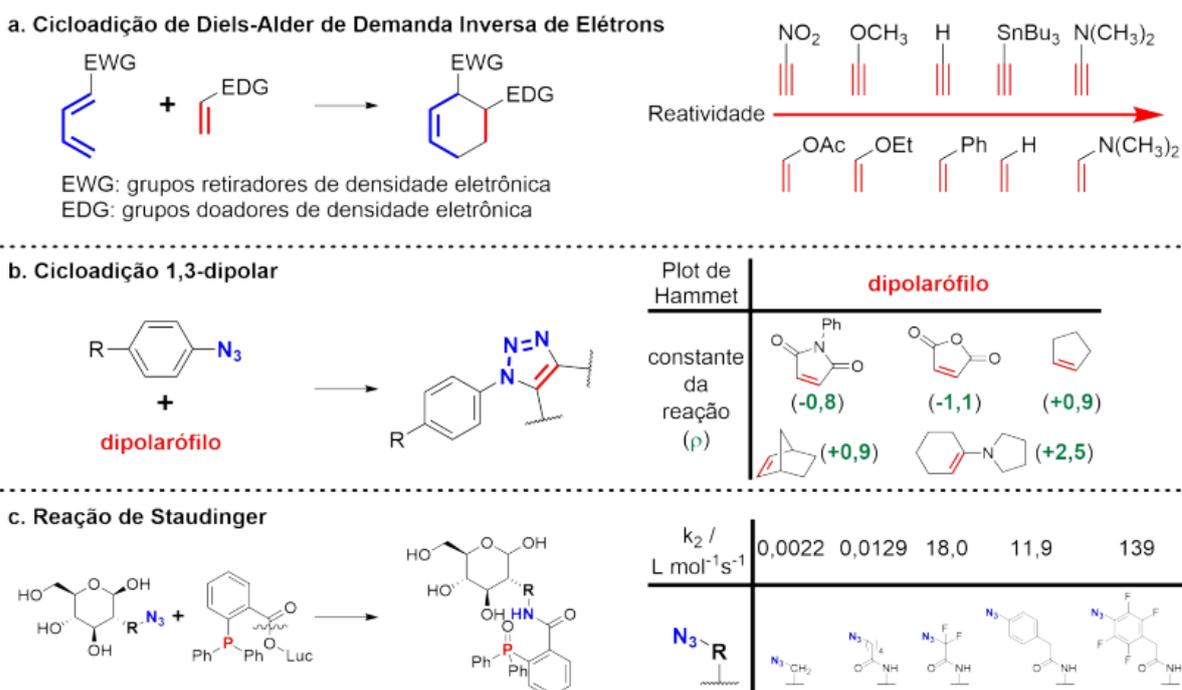


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para fins cinéticos, as constantes de velocidades k_1 e k_2 das reações de eliminação estão associadas as etapas de ativação e eliminação, respectivamente (ALOUANE et al., 2015). É possível observar que as reações de ciclização intramolecular (Figura 13B) possuem uma etapa de equilíbrio (K_{eq}), devido à reversibilidade entre a forma cíclica e aberta, e que as tensões angulares e estéricas influenciam as constantes de velocidade e de equilíbrio da etapa de eliminação. Por outro lado, nas reações de eliminação via deslocalização de elétrons, não há etapas de equilíbrio no modelo proposto, e as velocidades das reações dependem dos efeitos eletrônicos do heteroátomo **X**, do grupo de saída, e dos substituintes aromáticos. Com

base em efeitos de estrutura-reatividade, modificações estruturais do espaçador autoimolativos podem modular as velocidades de reações da etapa de ativação e eliminação e, conseqüentemente, permitem controlar a liberação espaço-temporal de fármacos e/ou de fluoróforos (“Perspectives About Self-Immolative Drug Delivery Systems”, 2020). No entanto, até o momento, essas relações são conhecidas apenas para as reações bio-ortogonais associativas (DEB; TU; FRANZINI, 2021) e pouco exploradas em reações bio-ortogonais dissociativas e de eliminação. Para as reações bio-ortogonais associativas, podemos citar a cicloadição de Diels-Alder de demanda inversa de elétrons (Figura 14a), a cicloadição 1,3-dipolar (Figura 14b) e a reação de Staudinger (Figura 14c).

Figura 14 – Relação entre estrutura e reatividade para reações bio-ortogonais associativas



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.2.1 Tratamento quantitativo dos efeitos eletrônicos na reatividade de reações

As relações lineares de energia fornecem informações sobre os mecanismos de reações químicas e podem ser oriundos de efeitos eletrônicos, estéricos e de

solvatação. O primeiro e o segundo são provocados por mudanças ou adição de substituintes, e o terceiro por mudanças no solvente. Para o estudo de reações bio-ortogonais, onde o solvente é a água, as mudanças estruturais nos reagentes são de suma importância. Ao associá-las a parâmetros cinéticos ou termodinâmicos, é possível obter informações valiosas sobre os intermediários da reação (ANSLYN; DOUGHERTY, 2007), o que permite adquirir conhecimento sobre a reatividade dos reagentes e realizar modificações racionais, uma etapa essencial no desenvolvimento de reações bio-ortogonais.

Entre as relações lineares de energia mais utilizadas, temos o modelo quantizado dos efeitos eletrônicos de diferentes substituintes proposto por Hammett em 1935, conforme a Equação 1 (BRAGATO; RUDORFF; LILIENFELD, 2020). Nessa equação, k_x representa a velocidade da reação com o substituinte X, k_H é a velocidade da reação com hidrogênio na posição do substituinte, σ é a constante do substituinte para a reação padrão, e ρ é a constante da reação, que mensura o efeito da reação com substituintes doadores ou retiradores de elétrons.

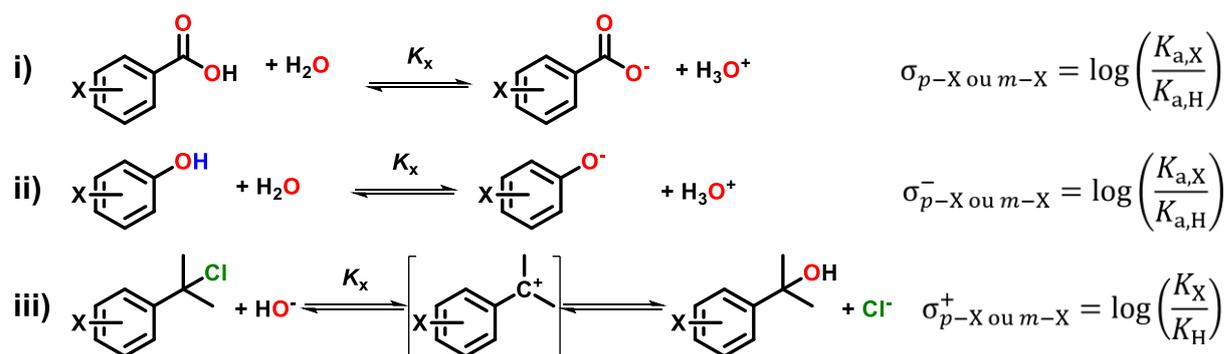
$$\log\left(\frac{k_x}{k_H}\right) = \sigma\rho \quad \text{Equação 1}$$

A equação de Hammett é um método geral para correlacionar a interdependência entre constantes de equilíbrios e de velocidades obtidos com efeitos eletrônicos de cada substituinte. Os valores de σ podem ser positivos ou negativos, para substituintes retiradores de elétrons e doadores de elétrons, respectivamente, assim como a magnitude de ρ pode ser negativa ou positiva, referente a reações favorecidas por substituintes doadores ou retiradores de elétrons, respectivamente (ANSLYN; DOUGHERTY, 2007). Os parâmetro da equação de Hammett podem ser inferidos em outros experimentos, como utilizando constantes de equilíbrios, deslocamentos químicos de sinais obtidos na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou de absorção na região do infravermelho, ressonância de quadrupolo, transferência de carga, ou de polarização eletroquímica (BRAGATO; RUDORFF; LILIENFELD, 2020).

Quanto a obtenção das constantes de σ , se faz uso de reações padrões, onde o mecanismo e a constante de equilíbrio são conhecidos (YADAV, 2016). Por exemplo, os valores de σ_{meta} e de σ_{para} são derivados da reação de dissociação ácida de derivados do ácido benzóico (XC_6H_4COOH) à 25 °C (Figura 15, i)), e obtidos para

cada substituinte de X nas posições *meta* (*m*-X, efeitos indutivos) e *para* (*p*-X, efeitos mesoméricos), respectivamente. Como as influências de X nas reações padrões devem ser exclusivamente eletrônicas, a posição *orto* em relação ao(s) centro(s) de reação não deve ser ocupada por X devido a efeitos estéricos.

Figura 15 – Os valores de σ são referentes as reações (i) reação de ionização do ácido benzoico. Enquanto os valores de σ^+ e de σ^- são das reações de (ii) ionização do fenol e da (iii) heterólise do fenildimetil clorometano, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores de ρ descrevem a sensibilidade de reações químicas em função dos efeitos eletrônicos, ou seja, sua magnitude é proporcional às cargas que estão sendo formadas ou suprimidas no complexo ativado da etapa determinante. A relação prevista na Equação 1, entre as constantes de velocidade (k) com os parâmetros termodinâmicos (K) de reações conhecidas (Figura 15), gera uma equação linear com valor da inclinação igual a ρ . Dessa forma, para valores de $\rho > 0$ (inclinações positivas) a reação em estudo é mais sensível aos efeitos eletrônicos do que a reação padrão, e carga negativa está sendo formada no estado de transição ou há diminuição da carga negativa em relação ao reagente. Por outro lado, para valores de $\rho < 0$ (inclinações negativas) temos o oposto da situação anterior.

De modo geral, para as reações de eliminação via deslocalização de elétrons dos espaçadores autoimolativos, tem sido postulado que a formação da base conjugada do espaçador autoimolativo (Figura 13A, itens i e ii) facilitaria a etapa de eliminação, e que sua protonação (ácido conjugado, $pK_a \approx 10$) em meios aquosos neutros ou ácidos diminuí dramaticamente o valor de k_2 (XIAO et al., 2020). No entanto, em estudos cinéticos de liberação de espécies em solução aquosa contendo espaçadores autoimolativos semelhantes aos da Figura 13A, observou-se que não há

dependência da etapa de dissociação ácida na velocidade de reação de formação do produto (ALOUANE et al., 2013, 2014; SERRA et al., 2018), sugerindo que há pouca ou nenhuma influência dessa etapa na reação de eliminação dos espaçadores autoimolativos. A hipótese de que essas reações dependem ou não do valor do pK_a poderia ser resolvido por meio da equação de Hammett, em virtude da formação de carga negativa ($\rho > 0$) no estado de transição, que por sua vez seria estabilizada com grupos retiradores de elétrons.

Nesse contexto, atraídos pela lacuna do conhecimento existente em relação aos efeitos eletrônicos em reações de *O*-despropargilação mediada por paládio e de reações de eliminação 1,4 de espaçadores autoimolativos, na liberação de fármacos ou fluoróforos em sistemas biológicos, este trabalho pretende contribuir diretamente no estudo cinético e na compreensão mecanística destas reações. Utilizando diferentes substituintes aromáticos, presentes no espaçador autoimolativo, e pelo acompanhamento das reações por métodos espectroscópicos, será possível determinar parâmetros cinéticos, com o intuito de elucidar o seu mecanismo em função dos efeitos eletrônicos e com base em conhecimentos prévios, identificando o melhor grupo protetor para aplicações em condições bio-ortogonais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender a reatividade de pró-fluoróforos da 4-metilumbeliferona, protegidos com grupos O-propargiloxibenzílicos e ativados por paládio(II), através de estudos de relações lineares de energia livre do substituinte, em condições reacionais biológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a síntese de grupos protetores O-propargiloxibenzílicos com diferentes substituintes aromáticos.
2. Obter pró-fluoróforos da 4-metilumbeliferona e caracterizar via espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN ^1H e ^{13}C).
3. Caracterizar os compostos contendo o núcleo O-propargilbenzil via espectroscopia de RMN e de absorção na região do ultravioleta e do visível (UV-vis).
4. Determinar os valores de pK_a dos fenóis contendo diferentes substituintes na posição *para* e contendo o substituinte hidroximetil na posição *orto* por meio da espectroscopia de absorção na região do UV-vis.
5. Realizar estudos cinéticos de O-despropargilação dos álcoois O-propargilbenzil, contendo diferentes substituintes aromáticos por RMN de ^1H .
6. Realizar estudos cinéticos de liberação dos pró-fluoróforos em condições biológicas, com tampões biológicos em pH 7,4 e temperatura 37 °C.
7. Propor mecanismos das reações.

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

A condução dos experimentos a seguir, tomou-se na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Florianópolis, sob a orientação do Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos e sob coorientação do Dr. Gean Michel Dal Forno. A síntese dos compostos de interesse, e as análises por espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-vis) e de fluorescência, foram realizados no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio). Enquanto os experimentos de caracterização, como as análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), foram conduzidas na Central de Análise do Departamento de Química da UFSC.

4.1 INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na síntese dos compostos de interesse do projeto foram utilizados conforme recebidos, sem purificação prévia. Em todos os experimentos utilizou-se água deionizada em um deionizador da TKA modelo Smart2Pure.

Solventes utilizados na purificação por cromatografia em coluna, como hexano, acetato de etila e diclorometano, foram previamente destilados.

4.1.2 Instrumentação

A purificação dos compostos por cromatografia em coluna, utilizando uma coluna de vidro, continham como fase estacionária e fase móvel a Sílica gel (60 Å, 70-230 mesh ASTM) e diferentes proporções de hexano e acetato de etila, respectivamente.

4.1.2.1 *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono-13 – RMN de ^1H e ^{13}C*

Obteve-se todos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos sintetizados em espectrômetros BRUKER-AVANCE-DRX 400 MHz e 200 MHz, disponíveis na Central de Análise do Departamento de Química/UFSC, empregando clorofórmio (CDCl_3), dimetilsulfóxido ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), água (D_2O) ou uma mistura dos mesmos, como solventes deuterados nas análises. Os deslocamentos químicos de hidrogênio e de carbono foram registrados em ppm utilizando como referência o sinal do solvente (FULMER et al., 2010). Ressalvando os estudos cinéticos, manteve-se o tempo de recuperação (d1) dos experimentos em 1 s.

4.1.2.2 *Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível – UV-vis*

Os espectros de absorção molecular na região do UV-vis foram realizados empregando-se os espectrofotômetros UV-vis Varian Cary 50 Bio, acoplado a um banho termoestabilizado e em cubetas de quartzo (1 cm), e *SpectraMax Plus 384 Microplate Reader*, em microplacas de propileno contendo 96 micropoços, ambos disponíveis no LaCBio.

4.1.2.3 *Espectroscopia de fluorescência ou espectrofluorimetria*

Os acompanhamentos cinéticos das reações com diferentes substituintes aromáticos ou concentrações de paládio, foram realizados utilizando o fluorímetro da TECAN modelo Infinite M200, com capacidade para cubetas ou placas de 96 micropoços, disponível no LaCBio. Manteve-se a temperatura ($T = 37\text{ }^\circ\text{C}$) e o pH = 7,4 constante em todas as reações.

4.1.2.4 *Ponto de fusão*

As medidas de ponto de fusão foram realizadas em um aparelho da marca Microquímica, modelo MQAPF – 301, disponível no LaCBio.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

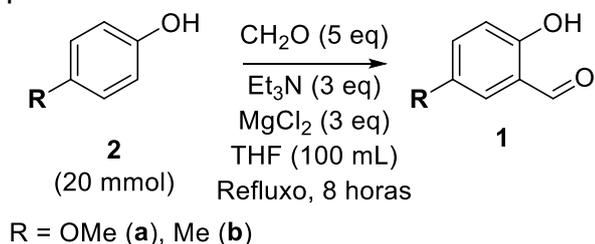
4.2.1 Síntese dos substratos modelos

4.2.1.1 Síntese de derivados de 2-formil-1-hidroxibenzeno (**1**)

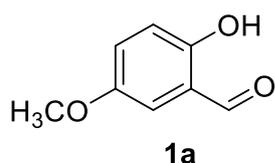
4.2.1.1.1 2-formil-1-hidroxi-4-metoxibenzeno (**1a**) e 2-formil-1-hidroxi-4-metilbenzeno (**1b**)

A obtenção dos benzaldeídos **1a** e **1b**, a partir dos fenóis *para*-substituídos **2a** e **2b** disponíveis comercialmente, conforme ilustrado no Esquema 1, foram realizadas através de procedimentos previamente descritos na literatura (FUGARD et al., 2015; RATSCH et al., 2021).

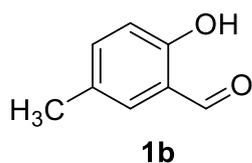
Esquema 1 - Síntese dos benzaldeídos **1a** e **1b**.



Em um balão de três bocas, manteve-se a mistura reacional contendo o cloreto de magnésio (MgCl_2 , $95,211 \text{ g mol}^{-1}$, 60 mmol, 5,71 g), o paraformaldeído (CH_2O , 3,00 g, $30,031 \text{ g mol}^{-1}$, 100 mmol), a trietilamina (Et_3N , 8,40 mL, 60 mmol) e o tetrahydrofurano (THF, 100 mL) sob agitação por 10 min à temperatura ambiente (t.a.). Em seguida, acrescentou-se o fenol **2** (20 mmol) e, sob atmosfera de nitrogênio (N_2), manteve-se a reação sob refluxo por 8 horas. A mistura reacional foi diluída em éter etílico (Et_2O) e tratada com uma solução de HCl 1 mol L^{-1} , até solubilizar todo o sólido amarelo. Lavou-se a fase orgânica com HCl 1 mol L^{-1} (3 x 50 mL) e água destilada (2 x 30 mL). Após secar a fase orgânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), concentrou-se a fase orgânica e purificou-se o produto por cromatografia em coluna.



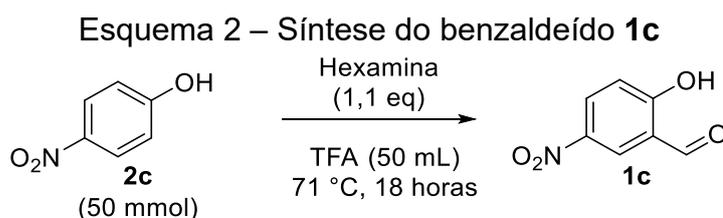
2-formil-1-hidroxi-4-metoxibenzeno (**1a**) (SANG et al., 2018):
Rendimento: 80%. **Ponto de fusão (P.F.)** < 30 °C. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 10,66 (s, 1H), 9,86 (s, 1H), 7,15 (dd, ³J = 9,0 Hz, ⁴J = 3,0 Hz, 1H), 7,00 (d, ⁴J = 3,0 Hz, 1H), 6,93 (d, ³J = 9,0 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H). **RMN de ¹³C{¹H}** (50 MHz, CDCl₃, ppm): 196,10, 155,84, 152,62, 125,08, 119,95, 118,50, 115,07, 55,71.



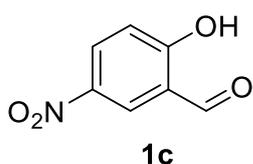
2-formil-1-hidroxi-4-metilbenzeno (**1b**) (ZHANG et al., 2018):
Rendimento: 48%. **P.F.** = 50-51 °C. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 10,83 (s, OH), 9,85 (s, 1H), 7,34 (m, 2H), 6,90 (d, ³J = 9,1 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H). **RMN de ¹³C{¹H}** (50 MHz, CDCl₃, ppm): 196.65, 159.65, 138.12, 133.50, 129.23, 120.46, 117.48, 20.31.

4.2.1.1.2 2-formil-1-hidroxi-4-nitrobenzeno (**1c**)

O benzaldeído **1c** foi obtido a partir do 4-nitrofenol (**2c**), comercialmente disponível, conforme ilustrado no Esquema 2, através de procedimentos previamente descritos na literatura (TANNOURI et al., 2014).



Em um balão de fundo redondo com a mistura de ácido trifluoracético (TFA, 50 mL) e 4-nitrofenol (**1c**, 6,95 g; 50 mmol; 139,03 g mol⁻¹; 98 %), acrescentou-se a hexamina (140,86 g mol⁻¹; 7,71 g; 55 mmol), e, sob atmosfera inerte, manteve-se a reação sob agitação a 71 °C por 18 horas. Após o período reacional cessou-se o aquecimento, e adicionou-se 30 mL de HCl 30%, onde a reação prosseguiu sob agitação por mais 1 horas. Em seguida, lavou-se a mistura reacional com éter etílico (Et₂O, 3x30 mL), adicionou-se carbonato de potássio (Na₂CO₃) até obter pH = 5 e extraiu-se a fase orgânica com acetato de etila (3 x 20 mL). Acidificou-se a fase aquosa até o pH igual a 2 e filtrou-se o precipitado alaranjado.



2-formil-1-hidro-4-nitrobenzeno (**1c**) (TANNOURI et al., 2014):

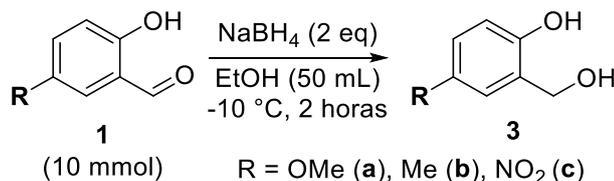
Rendimento: 40%. **P.F:** 126-127 °C **RMN de ¹H** (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm):12,21 (s, OH), 10,30 (s, 1H), 8,42 (d, ⁴J = 2,9 Hz, 1H), 8,35 (dd, ³J = 9,1 Hz, ⁴J = 2,9 Hz, 1H), 7,18 (d, ³J = 9,1 Hz,

1H).

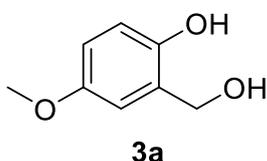
4.2.1.2 Síntese de derivados de álcoois 2-hidroxibenzílicos (**3a-c**)

Os álcoois 2-hidroxibenzílicos **3a-c** foram obtidos a partir dos benzaldeídos **1a-c**, previamente preparados e purificados, conforme ilustrado no Esquema 3, por meio do procedimento descrito na literatura (ARENZ; GIANNIS, 2001; ZIANI-CHERIF; IMACHI; MATSUDA, 1999).

Esquema 3 – Síntese dos álcoois 2-hidroxibenzílicos **3**.



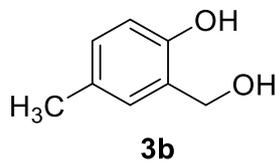
Em um balão de 100 mL, em uma solução contendo o benzaldeído **2** (10 mmol) em etanol (EtOH, 50 mL) adicionou-se pequenas porções de borohidreto de sódio (NaBH₄, 37,83 g mol⁻¹, 20 mmol, 0,76 g) à 10 °C. Manteve-se a mistura reacional à 10 °C por 2 horas. Em seguida, dilui-se a reação com 10 mL de água destilada e neutralizou-se a solução com HCl concentrado até cessar a formação de bolha (pH = 5). Filtrou-se e concentrou-se o filtrado sob pressão reduzida. Dissolveu-se o resíduo em metanol, filtrou-se novamente o precipitado formado e concentrou-se o filtrado sob pressão reduzida. Repetiu-se o processo três vezes. Por fim, purificou-se o resíduo por recristalização em água.



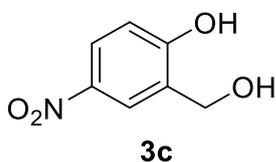
1-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-metoxibenzeno (**3a**) (LI et al., 2014):

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, ppm): 6,82 (d, ³J = 9,0 Hz, 1H), 6,75 (dd, ³J = 8,8, ⁴J = 2,7 Hz, 1H), 6,61 (d, ³J = 2,3 Hz, 1H),

5,09 (s, OH), 4,81 (s, 2H), 3,75 (s, 3H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (50 MHz, CDCl_3 , ppm): 153,24, 149,48, 125,83, 117,14, 114,40, 113,68, 64,24, 55,94.



1-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-metilbenzeno (**3b**) (ASSOAH et al., 2018): **Rendimento:** 57%. **P.F.** = 100-101 °C. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,01 (dd, $^3J = 8,1$, $^4J = 1,9$ Hz, 1H), 6,85 (d, $^4J = 1,9$ Hz, 1H), 6,78 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H), 4,81 (s, 2H), 2,25 (s, 3H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (50 MHz, CDCl_3 , ppm): 153,72, 129,96, 129,46, 128,58, 124,68, 116,40, 64,59, 20,51.

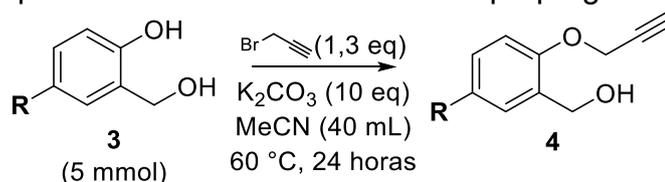


1-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-nitrobenzeno (**3c**) (ZHOU et al., 2008): **Rendimento:** 67%. **P.F.** = 116 – 117 °C. **RMN de ^1H** (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): 11,12 (OH), 8,21 (d, $^4J = 2,9$ Hz, 1H), 8,02 (dd, $^3J = 8,9$, $^4J = 3,0$ Hz, 1H), 6,94 (d, $^3J = 8,9$ Hz, 1H), 5,36 (OH), 4,50 (s, 2H).

4.2.1.3 Síntese de derivados de 2-(hidroximetil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4a-d**)

Os derivados de 2-(hidroximetil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno **4a-d** foram obtidos a partir dos álcoois 2-hidroxibenzílicos **3a-c** e do álcool 2-hidroxibenzil (**3d**), comercialmente disponível sob o nome de saligenin, conforme ilustrado no Esquema 4, por meio da adaptação do procedimento descrito na literatura (LUO et al., 2007).

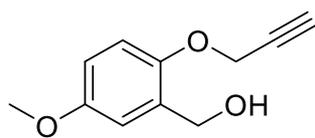
Esquema 4 – Síntese dos éteres de propargila **4a-d**.



$\text{R} = \text{OMe}$ (a), Me (b), NO_2 (c), H (d)

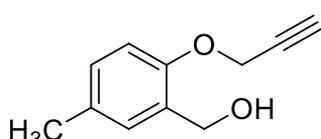
Em um balão de 100 mL, dissolveu-se todo o salicilálcool **3** (5 mmol) em 40 mL de acetonitrila (MeCN) e adicionou-se o carbonato de potássio (K_2CO_3 , 138,21 g

mol⁻¹, 50 mmol, 7,0 g). Em seguida, acrescentou-se o brometo de propargila (80% tolueno, 5,5 mmol, 0,63 mL) e manteve-se a reação sob agitação a 60 °C por 24 horas. Concentrou-se a mistura reacional sob pressão reduzida, e filtrou-se a mistura reacional, lavando com AcOEt. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida, e purificou-se os produtos por cromatografia em coluna ou por recristalização.



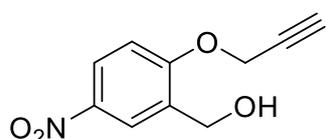
4a

2-hidroximetil-4-metoxi-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (4a) (GUO et al., 2018): **Rendimento:** 64%. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 6,92 (d, ³J = 8,8 Hz, 1H), 6,91 (d, ⁴J = 3,1 Hz, 1H), 6,77 (dd, ³J = 8,9, ⁴J = 3,0 Hz, 1H), 4,68 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 2H), 4,66 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), 2,51 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1H). **RMN de ¹³C{¹H}** (50 MHz, CDCl₃, ppm): 154,56, 149,42, 131,43, 114,72, 113,72, 113,19, 78,87, 75,69, 61,53, 56,99, 55,79.



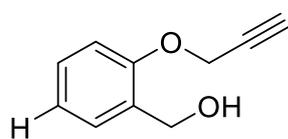
4b

2-hidroximetil-4-metil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (4b): **Rendimento:** 65%. **P.F.** < 24 °C. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 7,13 (d, ⁴J = 2,2 Hz, 1H), 7,08 (dd, ³J = 8,0, ⁴J = 2,2 Hz, 1H), 6,89 (d, ⁴J = 8,2 Hz, 1H), 4,73 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 2H), 4,67 (s, 2H), 2,51 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1H), 2,30 (s, 3H). **RMN de ¹³C{¹H}** (50 MHz, CDCl₃, ppm): 153,31, 131,12, 129,81, 129,65, 129,05, 112,05, 78,70, 75,74, 61,67, 56,24, 20,58. Análise elemental calculada para C₁₁H₁₂O₂ (176,0837): C = 74,98, H = 6,86, O = 18,16. Encontrado: C = 74,91, H = 6,86.



4c

2-hidroximetil-4-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (4c) (HU et al., 2022): **Rendimento:** 85%. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 8,31 (d, ⁴J = 2,8 Hz, 1H), 8,19 (dd, ³J = 9,0, ⁴J = 2,8 Hz, 1H), 7,07 (d, ³J = 9,0 Hz, 1H), 4,85 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 2H), 4,76 (s, 1H), 2,59 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1H). **RMN de ¹³C{¹H}** (50 MHz, CDCl₃, ppm): 159,60, 142,25, 131,25, 124,85, 123,95, 111,42, 77,80, 77,16, 76,53, 60,34, 56,68.



4d

2-hidroximetil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (4d): **Rendimento:** 95%. **P.F.** = 30-31 °C. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 7,38 – 7,26 (m, 2H), 7,07 – 6,96 (m, 2H), 4,77 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 2H), 4,72 (s, 2H), 2,54 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1H). **RMN de ¹³C{¹H}** (50

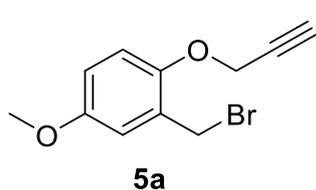
MHz, CDCl₃, ppm): 155,56, 129,97, 129,14, 128,97, 121,84, 112,05, 78,53, 75,93, 61,87, 56,18.

4.2.1.4 Síntese de derivados de 2-(bromometil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5a-d**)

Os brometos de benzila **5a-d** foram obtidos a partir dos éteres de propargila **4a-d**, conforme ilustrado no Esquema 5, por meio da adaptação do procedimento descrito na literatura (CARDINEAU et al., 2012).



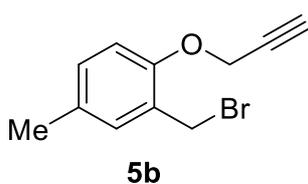
Em um balão de 5 mL, dissolveu-se o salicilálcool **4a-d** (1 mmol) em diclorometano (CH₂Cl₂) e adicionou-se a solução aquosa de HBr (48% v/v; 1,99 g mL⁻¹, 80,9 g mol⁻¹; 1,69 mL). Manteve-se a reação sob agitação a t.a. por 4 horas. Diluiu-se a mistura reacional em 10 mL de água destilada e extraiu-se a fase orgânica com CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Posteriormente, lavou-se a fase orgânica com uma solução de bicarbonato de sódio saturado (NaHCO₃ sat., 10 mL) e secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄. Filtrou-se o precipitado e concentrou-se o filtrado sob pressão reduzida. A purificação prosseguiu-se em cromatografia em coluna.



2-(bromometil)-5-metoxi-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5a**):

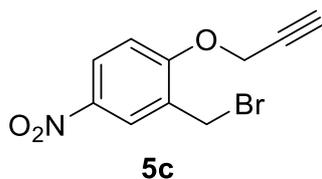
Rendimento: 72%. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 6,97 (d, ³J = 8,9 Hz, 1H), 6,92 (d, ⁴J = 3,0 Hz, 1H), 6,83 (dd, ³J = 8,9, ⁴J = 3,1 Hz, 1H), 4,74 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 2H), 4,54 (s, 2H),

3,78 (s, 2H), 2,51 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1H). **RMN de APT ¹³C{¹H}** (50 MHz, CDCl₃, ppm): 154,44, 149,72, 128,29, 116,50, 115,13, 114,78, 78,88, 75,69, 57,31, 55,86, 28,65.



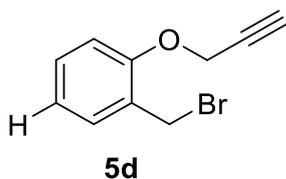
2-(bromometil)-5-metil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5b**):

Rendimento: 80%. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,17 (d, $^4J = 2,0$ Hz, 1H), 7,09 (dd, $^3J = 8,6$, $^4J = 2,4$ Hz, 1H), 6,91 (d, $^3J = 8,3$ Hz, 1H), 4,76 (d, $^4J = 2,4$ Hz, 1H), 4,55 (s, 1H), 2,51 (t, $^4J = 2,4$ Hz, 1H), 2,29 (s, 3H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (50 MHz, CDCl_3 , ppm): 153,32, 131,64, 131,13, 130,39, 126,65, 112,80, 78,58, 75,51, 56,37, 28,75, 20,36.



2-(bromometil)-5-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5c**):

Rendimento: 50%. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 8,29 (d, $^4J = 2,8$ Hz, 1H), 8,22 (dd, $^3J = 9,0$, $^4J = 2,8$ Hz, 1H), 7,12 (d, $^3J = 9,0$ Hz, 1H), 4,91 (d, $^4J = 2,4$ Hz, 2H), 4,54 (s, 2H), 2,60 (t, $^4J = 2,4$ Hz, 1H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (50 MHz, CDCl_3 , ppm): 160,06, 141,94, 128,03, 126,77, 126,01, 112,34, 77,79, 77,29, 76,96, 76,52, 56,92, 26,56.

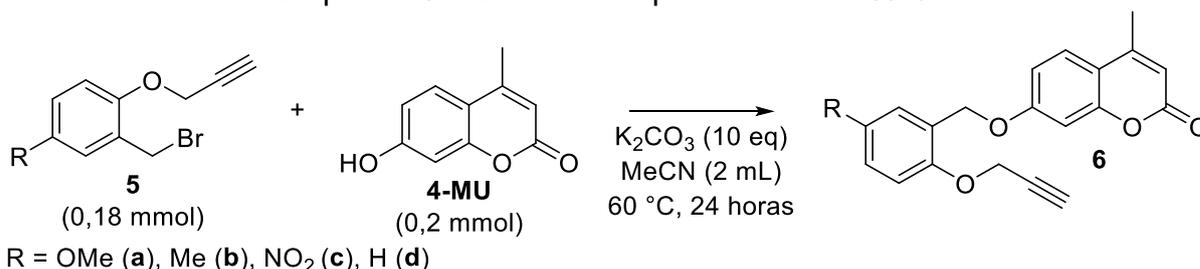


2-(bromometil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5d**): **Rendimento:**

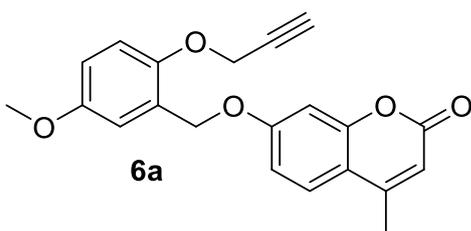
95%. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,42 – 7,27 (m, 2H), 7,10 – 6,93 (m, 2H), 4,81 (d, $^4J = 2,4$ Hz, 2H), 4,60 (s, 2H), 2,56 (t, $^4J = 2,4$ Hz, 1H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (50 MHz, CDCl_3 , ppm): 155,49, 131,20, 130,11, 126,91, 121,79, 112,70, 78,50, 75,87, 56,27, 28,75.

4.2.1.5 Síntese de derivados de 4-metil-7-[[2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-onas (**6a-d**)

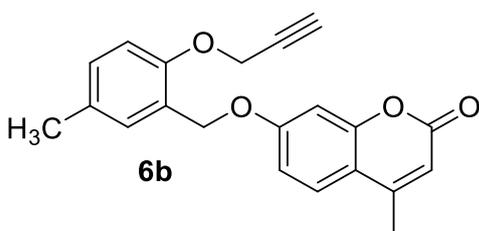
As pró-cumarinas **6a-d** foram obtidas a partir dos brometos de benzila **5a-d** e da 4-metilumbeliferona (**4-MU**), comercialmente disponível, conforme ilustrado no Esquema 4, por meio da adaptação do procedimento anteriormente descrito (Seção 4.2.1.3) (LUO et al., 2007).

Esquema 6 – Síntese das pró-cumarinas **6a-d**.

Em um balão de 5 mL, dissolveu-se a **4-MU** (98%, 176,17 g mol⁻¹, 0,2 mmol, 0,035 g) em 2 mL de MeCN e adicionou-se o K₂CO₃ (138,21 g mol⁻¹, 2 mmol, 0,27 g). Em seguida, adicionou-se o brometo de alquila **5a-d** (0,18 mmol) e manteve-se a reação sob agitação a 60 °C por 24 horas. Concentrou-se a mistura reacional sob pressão reduzida, e filtrou-se a mistura reacional, lavando com AcOEt. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida, e purificou-se os produtos por cromatografia em coluna ou por recristalização.

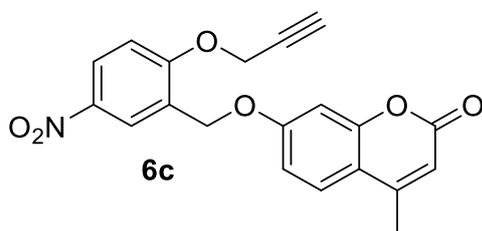


4-metil-7-[[5-metoxi-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6a**): **Rendimento:** 83%. **RMN de ¹H** (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7,50 (d, ³J = 8,8 Hz, 1H), 7,01 (m, 2H), 6,96 (dd, ³J = 8,8, ⁴J = 2,5 Hz, 1H), 6,91 (d, ⁴J = 2,5 Hz, 1H), 6,83 (dd, ³J = 8,9, ⁴J = 3,1 Hz, 1H), 6,13 (d, ⁴J = 1,3 Hz, 1H), 5,19 (s, 1H), 4,74 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,54 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1H), 2,39 (d, ⁴J = 1,1 Hz, 3H). **RMN de ¹³C{¹H}** (100 MHz, CDCl₃, ppm): 161,86, 161,47, 155,40, 154,70, 152,65, 148,99, 126,63, 125,64, 114,66, 114,09, 113,90, 113,70, 113,07, 112,17, 102,21, 78,81, 75,85, 65,43, 57,21, 55,85, 18,83.

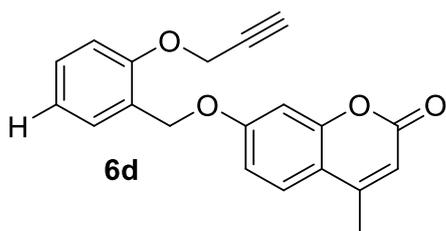


4-metil-7-[[5-metil-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6b**): **Rendimento:** 11%. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃, ppm): 7,50 (d, ³J = 8,4 Hz, 1H), 7,24 (d, ⁴J = 1,4 Hz, 1H), 7,12 (dd, ³J = 8,3, ⁴J = 1,7 Hz, 2H), 6,95 (d, ³J = 8,1 Hz, 3H), 6,13 (d, ⁴J = 1,1 Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,75 (d, ⁴J = 2,4 Hz, 3H), 2,53 (t, ⁴J = 2,1 Hz, 1H), 2,39 (d, ⁴J = 1,2 Hz, 3H), 2,30 (s, 3H). **RMN de ¹³C{¹H}** (100 MHz, CDCl₃, ppm):

162,07, 155,41, 152,93, 152,71, 131,32, 129,79, 129,69, 125,60, 124,86, 113,81, 113,08, 112,51, 112,12, 102,20, 78,70, 75,84, 65,57, 56,52, 20,75, 18,82.



4-metil-7-[[5-nitro-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6c**): **Rendimento:** 8%. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 8,40 (d, $^4J = 2,7$ Hz, 1H), 8,26 (dd, $^3J = 9,1$, $^4J = 2,8$ Hz, 1H), 7,54 (d, $^3J = 8,8$ Hz, 1H), 7,15 (d, $^3J = 9,1$ Hz, 1H), 7,01 (dd, $^3J = 8,8$, $^4J = 2,5$ Hz, 1H), 6,89 (d, $^4J = 2,5$ Hz, 1H), 6,16 (q, $^4J = 1,2$ Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,91 (d, $^4J = 2,4$ Hz, 2H), 2,64 (t, $^4J = 2,4$ Hz, 1H), 2,41 (d, $^4J = 1,2$ Hz, 3H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 162,07, 155,41, 152,93, 152,71, 131,32, 129,79, 129,69, 125,60, 124,86, 113,81, 113,08, 112,51, 112,12, 102,20, 78,70, 75,84, 65,57, 56,52, 20,75, 18,82.



4-metil-7-[[2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6d**): **Rendimento:** 65%. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,57 – 7,28 (m, 3H), 7,10 – 6,85 (m, 3H), 6,13 (d, $^4J = 1,5$ Hz, 1H), 5,21 (s, 1H), 4,79 (d, $^4J = 2,4$ Hz, 1H), 2,55 (t, $^4J = 2,3$ Hz, 1H), 2,39 (d, $^4J = 0,8$ Hz, 3H). **RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$** (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 162,02, 155,39, 154,98, 152,78, 129,40, 128,93, 125,61, 125,09, 121,85, 113,84, 113,13, 112,31, 102,21, 78,50, 76,02, 65,55, 56,32, 18,83.

4.2.2 Determinação de pK_a de derivados de 2-hidroxibenzil álcoois 3a-d

Os valores das constantes de dissociação ácida (pK_a) foram obtidos para os salicilálcoois **3a-d**, por meio da adaptação do procedimento descrito por Martínez e Dardonville (2013). Os valores de pH das soluções tampões foram ajustadas através do pHmetro digital Expandable ionAnalyzer EA 920 (Orion research) à 23 °C com soluções padronizadas de ácido clorídrico (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada. Na padronização das soluções empregou-se a fenolftaleína como indicador ácido-base (Quadro 1). Padronizou-se uma solução de 250 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹, diluindo previamente 10 mL da solução desta solução em 30 mL de água deionizada, seguida por titulação

volumétrica com o padrão primário ácido oxálico 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, padronizou-se uma solução de 250 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹, diluindo previamente 10 mL desta solução em 30 mL de água deionizada, seguida por titulação com o padrão secundário NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Quadro 1 – Padronização das soluções de NaOH e de HCl.

Solução	[Solução] ₁	[Solução] ₂	[Solução] ₃	[Solução] _{média}
NaOH / mol L ⁻¹	0,0928	0,0926	0,0917	0,0924
HCl / mol L ⁻¹	0,1107	0,1111	0,1105	0,1108

Na sequência, preparou-se as soluções tampões com concentração e volume final de 50 mmol L⁻¹ e 10 mL, respectivamente. Para o preparo das soluções tampões, considerou-se os valores de pK_a e o valor de pH desejado para calcular as concentrações das espécies dissolvidas no tampão. As concentrações (c_i) e as cargas (z_i) dos íons em solução foram consideradas na equação da força iônica (I, Equação 2), e a adição de quantidades distintas de cloreto de sódio (NaCl) se fez necessário para manter-se a força iônica constante em 140 mmol L⁻¹.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: c_i = concentração molar do íon i; z_i = valor da carga do íon i.

As soluções tampões foram preparadas com diferentes ácidos com valores de pK_a distintos, são eles: ácido fórmico (HCOOH/HCOO⁻, pK_a = 3,75), ácido propiônico (CH₃CH₂COOH/CH₃CH₂COO⁻, pK_a = 4,86), dihidrogenofosfato de sódio (H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻, pK_a = 7,2), ácido N-cicloexil-2-aminoetanosulfônico (CHES, pK_a = 9,41) e ácido N-cicloexil-2-aminopropilsulfônico (CAPS, pK_a = 10,51). Na Quadro 2 encontram-se os valores de massas de tampão e os valores das massas de NaCl em cada tampão.

Quadro 2 – Preparação das soluções tampões com valores de $I = 140 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tampão	m _{tampão} OU V _{tampão}		m _{NaCl} / g		pH	
	T	E	T	E	T	E
HCOOH/ HCOO ⁻	0,0189 mL	18,9 μL	0,0785	0,0787	2,75	2,76
		18,9 μL	0,0693	0,0696	3,50	3,51
CH ₃ CH ₂ COOH/ CH ₃ CH ₂ COO ⁻	0,0374 mL	37,4 μL	0,0711	0,0710	4,50	4,51
		37,4 μL	0,0569	0,0564	5,50	4,90
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	0,0685 g	0,0687 g	0,0354	0,0353	6,40	6,51
		0,0692 g	0,0227	0,0225	6,80	6,83
		0,0687 g	0,0103	0,0105	7,20	7,21
		0,0694 g	0,0054	0,0059	7,40	7,44
CHES	0,1036 g	0,1038 g	0,0757	0,0760	8,50	8,50
		0,1052 g	0,0684	0,0692	9,00	9,00
		0,1037 g	0,0619	0,0618	9,40	9,40
		0,1037 g	0,0572	0,0570	9,80	9,80
CAPS	0,1106 g	0,1104 g	0,0667	0,0667	10,20	10,20
		0,1106 g	0,0605	0,0605	10,60	10,60
		0,1116 g	0,0564	0,0566	11,00	11,04
		0,1105 g	0,0542	0,0544	11,40	11,44

T = teórico; E = experimental.

Após a preparação das soluções tampões, as medidas de absorção na região no UV-vis dos salicilálcoois **3a-d** em diferentes valores de pH foram executadas a 37 °C. Uma solução estoque do salicilálcool de 8 mmol L⁻¹ foi preparada em DMSO. As soluções dos salicilálcoois **3a**, **3b** e **3d** de 100 μmol L⁻¹, 10% v/v de DMSO e em diferentes meios aquosos tamponados, foram preparadas a partir das respectivas soluções estoques em cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 0,1 nm e deixadas atingir o equilíbrio pelo menos por 10 minutos à 37 °C antes de registrar o espectro de absorção. Adotou-se o mesmo procedimento para o salicilálcool **3c**, no entanto as soluções do **3c** de 50 μmol L⁻¹ foram preparadas em uma única microplaca de polipropileno contendo noventa e seis poços, termostatizados a 37 °C.

4.2.3 Estudos cinéticos

4.2.3.1 Experimentos de RMN de ¹H

Para os experimentos de acompanhamento por RMN de ¹H usou-se um tempo de aquisição (d1) de 30 s, como valor três vezes maior ao tempo de relaxamento spin-rede (T₁) do próton mais lento. Foi utilizado o composto ácido maleico (AM) como

referência interna para o cálculo da concentração relativa das espécies em solução. As reações foram acompanhadas à 19 °C, temperatura controlada pelo ar condicionado da sala onde se encontra o equipamento.

Uma solução de fração volumétrica de 80% (CD₃)SO e 20% de D₂O de 750 µL foi preparada previamente, como solvente das misturas reacionais. As três soluções estoques de MA, tetracloropaladato (Na₂PdCl₄) e dos compostos **4a-d** foram preparadas em microtubos de 2,5 mL com a solução reacional e a massa de reagente, previamente medida em uma balança analítica de cinco casas decimais. As misturas reacionais eram preparadas por meio de diluições em um tubo de RMN de ¹H, para um volume final de 500 µL, adaptado com um tubo coaxial, este contendo a referência interna MA, e o tempo entre a diluição e o primeiro registro do espectro de RMN de ¹H foi acrescentado manualmente após o término da reação.

4.2.3.2 *Experimentos de absorção na região do UV-vis*

As cinéticas de O-despropargilação dos substratos **4c** e **6c** foram acompanhadas pelo espectrofotômetro disponível no LaCBio, acoplado a um banho termoestabilizados à 37 °C. Os experimentos foram realizados monitorando-se o aparecimento do produto **3c** em 420 nm. O valor aparente de ε foi determinado em cada pH (tampão mais DMSO) e esse valor foi utilizado em todas as medições. Em todos os experimentos foram utilizadas cubetas de quartzo (com capacidade de 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 3,2 mL. As reações foram iniciadas com a adição de substrato após 30 minutos de incubação à 37 °C do Na₂PdCl₄ em solução, e o aumento da absorbância foi medido para se obter os parâmetros cinéticos. A O-despropargilação espontânea do substrato, para todos os experimentos, foi acompanhado em paralelo através de experimentos em condições idênticas exceto pela ausência de Na₂PdCl₄.

4.2.3.3 *Experimentos de fluorescência*

As cinéticas de liberação da **4-MU** a partir dos substratos **6a-d** foram acompanhadas pelo fluorímetro disponível no LaCBio, que possui capacidade de

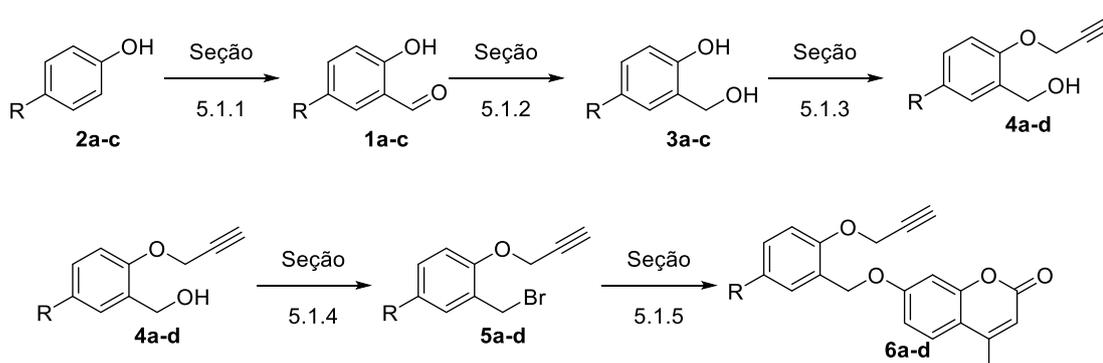
manter a temperatura à 37 °C por todo o tempo reacional, e foram realizadas em triplicata. Em todos os experimentos excitou-se as amostras em 380 nm e monitorou-se o incremento de emissão de fluorescência da **4-MU** em 512 nm. Os experimentos foram realizados em placas de 96 micropoços (com capacidade de 320 µL) seladas e avolumadas para que o volume final da mistura reacional no poço fosse 320 µL. As reações foram iniciadas com a adição de substrato após 30 minutos de incubação à 37 °C do Na_2PdCl_4 em solução, e o aumento da intensidade de fluorescência foi medido para se obter os parâmetros cinéticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS PARA AS REAÇÕES DE CLIVAGEM C-O

Devido o foco do trabalho ser a avaliação dos efeitos eletrônicos dos substituintes aromáticos, a síntese total dos substratos modelos dos estudos cinéticos iniciou-se a partir dos compostos **2** e progrediu via as várias etapas ilustradas no Esquema 7.

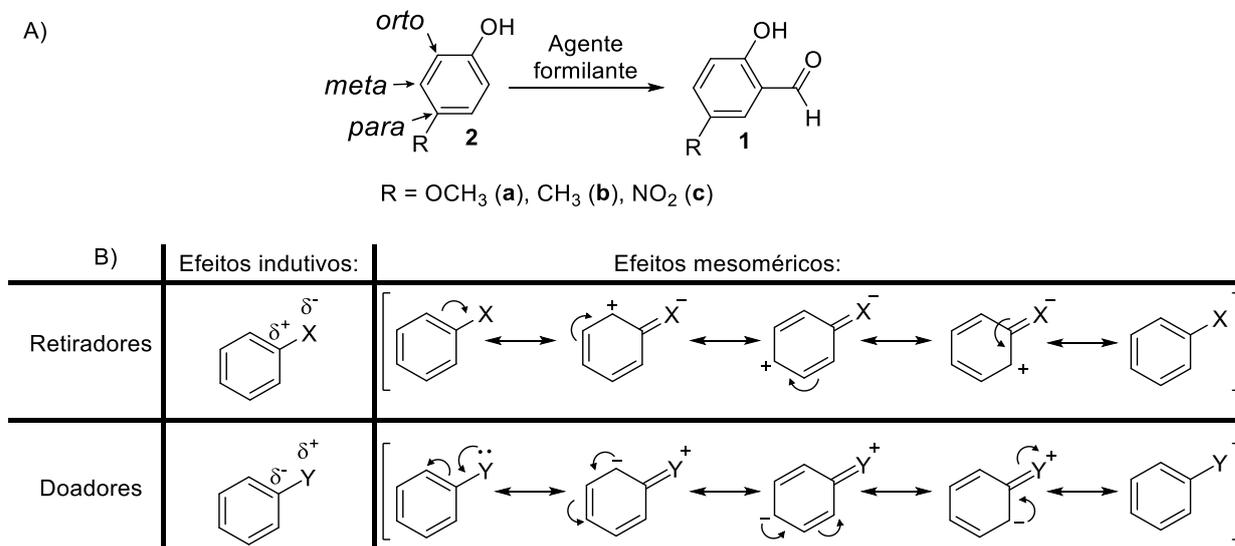
Esquema 7 – Síntese total dos substratos modelos dos estudos cinéticos



5.1.1 Formilação dos fenóis *para*-substituídos

A partir dos compostos **2a-c** disponíveis no laboratório, com diferentes substituintes na posição *para*, obteve-se os benzaldeídos substituídos **1a-c** por meio de reações de substituição eletrofílica aromática (S_{EAr} , Figura 16A), ocorridas na posição *orto*, em relação ao substituinte hidroxila (-OH). Os compostos **1a-c** foram caracterizados por RMN de 1H e de $^{13}C\{^1H\}$.

Figura 16 – Obtenção dos salicilaldeídos a partir de *para*-fenóis substituídos a partir da reação de formilação (A). As reações de S_EAr são suscetíveis a efeitos eletrônicos (B), que por sua vez podem ser indutivos ou mesoméricos.



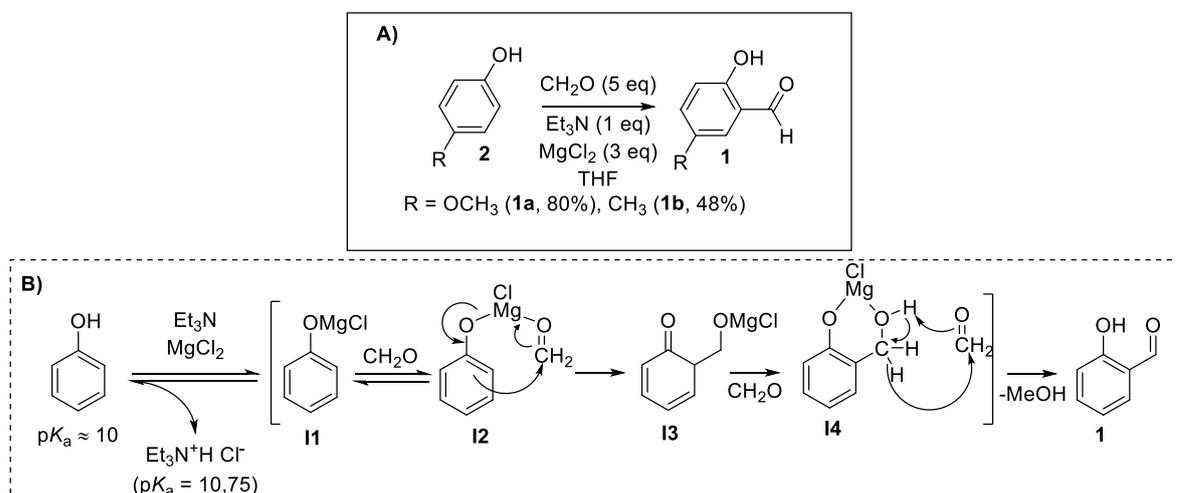
As reações de S_EAr se referem a substituição de eletrófilos a um centro aromático, e a presença de substituintes mediam as preferências de substituição e os rendimentos das reações. Os substituintes aromáticos presentes em **2** podem doar ou retirar densidades eletrônicas do centro aromático via efeitos indutivos e/ou mesoméricos (Figura 16B), tornando o centro aromático mais ou menos nucleofílico. Como os materiais de partida (**2**) são substituídos na posição *para* em relação a posição do grupo -OH, a sucessão da substituição é exclusiva para as posições *orto* ou *meta* (Figura 16A). Devido à natureza distinta entre os grupos doadores (-OCH₃ e -CH₃) e retiradores (-NO₂) de elétrons, observou-se a necessidade de duas metodologias de *orto*-formilação distintas para cada situação, conforme será discutido nas subseções seguintes.

5.1.1.1 *orto*-Formilação dos *para*-fenóis contendo grupos doadores de elétrons

Segundo metodologia e o mecanismo de reação descrita por Holsl kken e Skatteb l (1999), a primeira etapa da reação de *orto*-formilação consiste na desprotonação do fenol e a formação do sal (**I1**) (Figura 17B), nucleófilo responsável pelo ataque ao centro eletrofílico do formaldeído (formado a partir da decomposição em altas temperaturas do paraformaldeído) (GRAJALES; ALARCÓN; VILLA, 2015).

Após a formação do intermediário (**I2**) e uma etapa de regeneração da aromaticidade de **I3**, ocorre uma etapa redox entre o salicil álcool (**I4**) e o formaldeído, formando os produtos de interesse (**1**) e metanol. Os rendimentos dos produtos obtidos com os substituintes aromáticos OCH₃ (**1a**) e CH₃ (**1b**) foram de 80% e 48%, respectivamente, calculados a partir da massa dos compostos purificados por cromatografia em coluna, e para o substituinte NO₂ (**1c**) não observou-se a formação do produto por cromatografia em camada delgada (CCD).

Figura 17 – *orto*-Formilação de fenóis *para*-substituídos utilizando paraformaldeído (**A**) e o mecanismo de reação sugerido para a formação de **1** (**B**)



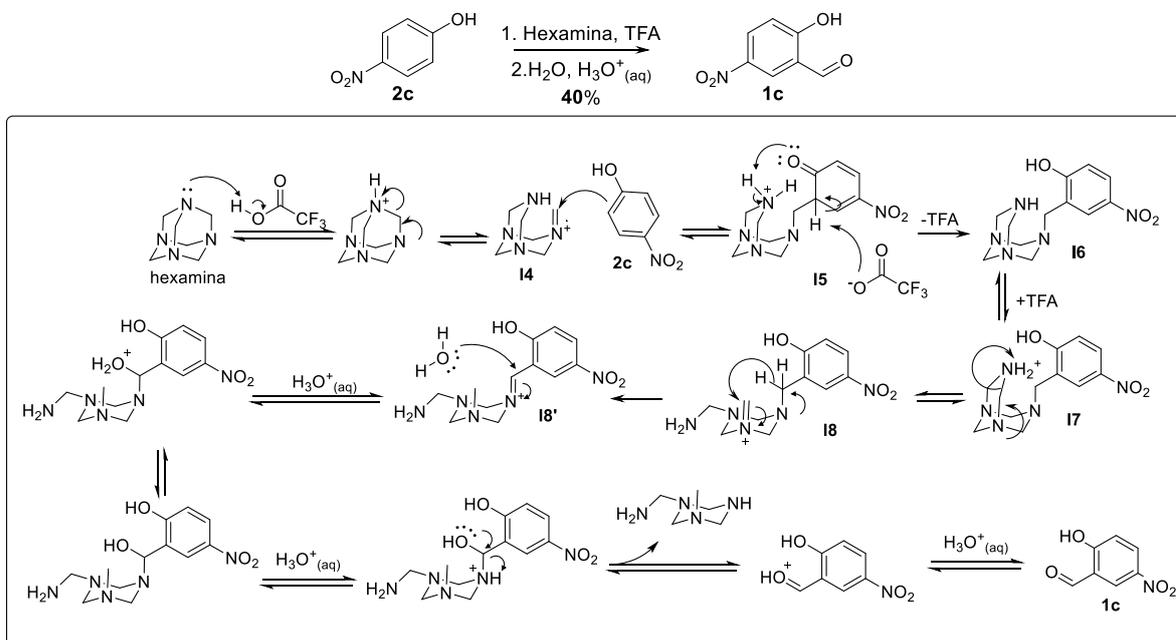
Ao testar a reação com cloreto de magnésio decahidratado (MgCl₂·10H₂O), não houve formação do produto de interesse com os substituintes OCH₃ e CH₃, o que sugere que essas reações sejam sensíveis a água e a necessidade do uso de reagentes anidros para a sucessão da reação.

Desta maneira, somente obteve-se os benzaldeídos **1a** e **1b** para os grupos doadores de elétrons OCH₃ e CH₃, que ativam o anel frente à S_EAr, enquanto para o composto contendo o substituinte NO₂ (**2c**) não observou-se a formação do produto, devido a baixa nucleofilicidade do anel aromático, pelo efeito retirador do grupo NO₂. Na literatura, a reação de Duff é usada para a obtenção de benzaldeídos a partir de fenóis contendo substituintes de diferentes naturezas, e como existem exemplos da obtenção de **1c** por essa metodologia, se estabeleceu como a metodologia padrão neste trabalho.

5.1.1.2 *orto*-Formilação do 4-nitrofenol contendo o substituinte nitro

A *orto*-formilação de **2c** prosseguiu por meio da reação de Duff, conhecida por sua versatilidade em formar benzaldeídos com o agente formilante hexametilenotetramina (também chamado de hexamina, Figura 18). Diferentemente da metodologia anterior, em que o eletrófilo empregado na S_EAr era o formaldeído, o eletrófilo formado *in situ* na reação de Duff é a espécie deficiente de elétrons, que é mais reativa a centros aromáticos. Embora a metodologia seja robusta para a obtenção de benzaldeídos, o rendimento atômico e da reação são baixos e moderados (40%), respectivamente, e a necessidade de ácidos fortes são pontos negativos da síntese. Por estas razões, a metodologia foi utilizada apenas para a obtenção de **1c**.

Figura 18 – Representação esquemática da reação de *orto*-formilação pela reação de Duff e o mecanismo proposto para obtenção do benzaldeído **1c**.



O mecanismo sugerido para a reação de Duff encontra-se ilustrado na Figura 18 (GRIMBLAT et al., 2016; ORTIZ-BLANCO et al., 2023; SMITH, 2013). Como o substituinte hidroxila é *orto* dirigente, o ataque nucleofílico à espécie eletrofílica (**14**) ocorre pela ligação π do centro aromático na posição *orto*. Após a formação de **15**, recupera-se a aromaticidade e forma-se o intermediário **16**. O mecanismo de reação é

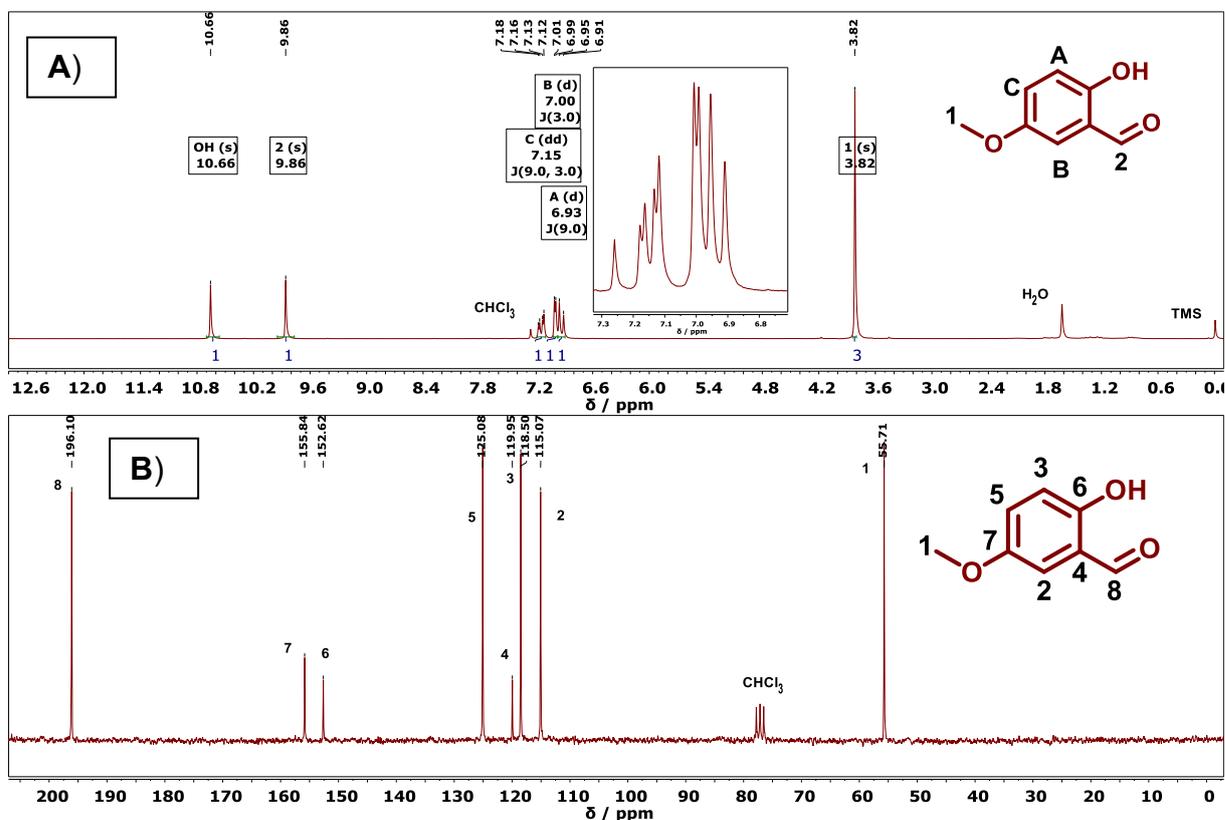
semelhante a metodologia anterior (*o*-formilação com paraformaldeído) até a formação de **16**, sendo o diferencial o eletrófilo mais reativo gerado *in situ*. Em seguida, ocorre a etapa de protonação, formando a espécie **17**, e a formação de sucessivo imínios **18** e **18'**. Após a reação, a etapa de hidrólise do imínio **18'** sucede por meio do tratamento da reação, em meio ácido do imínio, levando à formação do produto final **2c** (SMITH, 2013).

Após a extração da reação com éter etílico, foi realizada uma etapa de elevou-se o pH da fase aquosa com carbonato de sódio saturado até o valor de 5, no intuito de desprotonar o grupo fenol e aumentar sua solubilidade em água. Em seguida, a fase aquosa foi lavada com acetato de etila e observou-se por CCD a formação de um subproduto com fator de retenção (R_f) maior que o do produto. Quando a fase orgânica foi acidificada com HCl 1 mol L⁻¹, houve a formação de um precipitado que foi filtrado a vácuo. Por meio de análises de CCD e espectroscópicas de RMN, confirmou-se que o precipitado era o produto puro.

5.1.1.3 Caracterização dos benzaldeídos **1a-c** por RMN de ¹H e de ¹³C{¹H}

Por meio das análises espectroscópicas de RMN de ¹H e de ¹³C{¹H} (Figura 19 e Apêndice A) dos benzaldeídos **1a-c**, atribuiu-se os sinais observados nos espectros com base no deslocamento químico (δ) e nas multiplicidades, sendo que os valores de acoplamento (J) só foram determinados quando não houve sobreposição de sinais. Desta maneira, por meio da comparação com os resultados de outras análises de RMN descritos na literatura, para os mesmos produtos, e das atribuições previamente realizadas, foi possível caracterizar os reagentes de partidas da próxima etapa.

Figura 19 – Espectro de RMN de (A) ^1H a 200 MHz e de (B) $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ a 50 MHz do composto **1a**, em CDCl_3 a 19°C



Os espectros de RMN de ^1H dos aromáticos trissubstituídos (Figura 19A) apresentaram um padrão de sistema de *spin* entre os 3 sinais de hidrogênios na região dos aromáticos, que receberão as notações estenográficas de ABC (LAMPMAN; PAVIA; KRIZ, 2010), em função da proximidade dos sinais dentro da região espectral e as constantes de acoplamento observados. A atribuição dos sinais prosseguiu-se da seguinte forma:

- Observa-se a existência de dois dupletos e um dupleto de dupleto, referentes aos três hidrogênios A, B e C.
- Sabe-se que, pelos valores de J , dois hidrogênios estão separados por 3 ligações ($^3J_{CA} = 9,0$ Hz) e outros dois estão separados por 4 ligações ($^4J_{CB} = 3,0$ Hz).
- O único padrão de substituição de aromático que corrobora com a hipótese anterior é nas posições 1, 2 e 4.
- Como o hidrogênio da posição B está acoplado a longa distância com o hidrogênio C, o dupleto em 7,0 ppm corresponde ao hidrogênio B.

- Em 6,93 ppm o duplete é referente a um hidrogênio separado por 3 ligações de outro hidrogênio, e que não acopla com o hidrogênio B. Logo, esse sinal é referente ao hidrogênio A.
- Em 7,15 ppm um duplete de duplete, com valores de J equivalentes aos dupletos anteriores, corresponde ao hidrogênio C, por exclusão e por acoplar com os hidrogênios A e B.

Nestes sistemas, é comum o acoplamento entre hidrogênios espaçados por 4 ligações (4J), mencionados como acoplamentos de longa distância, devido à planaridade entre as ligações e o formato de W que eles formam.

Para os outros sinais, observa-se em 3,82 ppm um simpleto com integral relativa correspondente a 3 hidrogênios, referente ao substituinte metoxi ($-\text{OCH}_3$). Em 9,86 ppm um simpleto com deslocamento químico na região dos aldeídos, e de integral relativa a 1 hidrogênio, referente ao hidrogênio do grupo e formila ($-\text{CHO}$). Por fim, em 10,66 ppm o sinal de integral relativa a 1 hidrogênio, referente ao grupo hidroxila ($-\text{OH}$).

A discussão dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 19 e Apêndice A) prosseguirá da mesma forma. Em 196,10 ppm observa-se um carbono de carbonila referente ao grupo formila (^{-13}CHO), que por efeito da desblindagem do núcleo do ^{13}C , devido ligação π com o átomo de oxigênio, desloca o seu valor de δ para regiões de maior desblindagem. Os 3 sinais aromáticos de menor intensidade (155,86 ppm, 152,62 ppm e 119,95 ppm) são referentes aos carbonos com maior substituição do anel aromático, e outros 3 de maior intensidade (125,08 ppm, 118,50 ppm e 115,07 ppm) são referentes aos carbonos secundários do anel aromático. A distinção por intensidade de sinal no RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ é em função do tempo de relaxação spin-rede, ou seja, conforme diminuem-se os números de hidrogênios ligados a um carbono, menor o momento dipolo-dipolo entre as ligações e maiores são os tempos de relaxação longitudinal (T_1), conseqüentemente sinais de maior intensidade são referentes a carbonos menos substituídos que aqueles com mais substituições. A atribuição dos deslocamentos químicos de cada sinal pode ser feita a partir de quadros de deslocamento dos valores de δ em função dos substituintes aromáticos, por exemplo, atribuiu-se o sinal em 119,95 ppm ao carbono substituído pelo grupo formila

(δ_4), com base na sua intensidade e no valor de δ_4 calculado[†] de 125 ppm ($\delta_4 = 128,5 \text{ ppm} + 8,2 \text{ ppm} - 12,7 \text{ ppm} + 1 \text{ ppm} = 125 \text{ ppm}$ Equação 3).

$$\delta_4 = 128,5 \text{ ppm} + 8,2 \text{ ppm} - 12,7 \text{ ppm} + 1 \text{ ppm} = 125 \text{ ppm} \quad \text{Equação 3}$$

Desta maneira, atribuiu-se todos os sinais dos espectros de RMN para os compostos **1a-c**. Entre eles, os sinais em 9,87 ppm e em 196,10 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio e de carbono, respectivamente, do grupo funcional aldeído, que confirmam o êxito da reação de *o*-formilação e a obtenção dos produtos esperados. Para as próximas etapas, a discussão será realizada através do conhecimento dos sinais previamente atribuídos e com base nas modificações químicas realizadas.

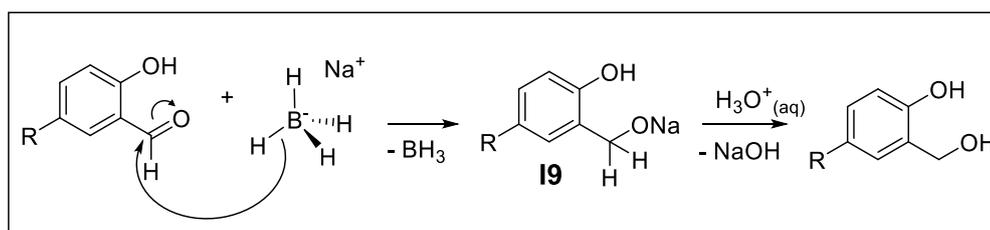
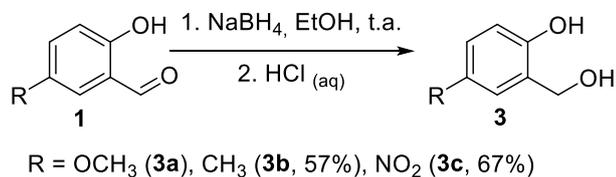
Outra metodologia avaliada para obtenção dos respectivos benzaldeídos **1a** e **1b** foi a reação de Reimer-Tiemann, utilizando clorofórmio e 3 equivalentes de hidróxido de potássio ou de sódio sob ebulição. No entanto, a mistura reacional obtida após o tratamento aquoso se mostrou de difícil purificação, e o número de subprodutos era maior do que das metodologias anteriores, por isso, essa metodologia foi descartada para a obtenção dos benzaldeídos **1a-d**.

5.1.2 Redução do grupo formila

A partir dos benzaldeídos **1a-c**, foi realizada a redução dos grupos aldeídos com NaBH_4 à álcoois (Figura 20). Esta é uma metodologia mais branda e de fácil execução em comparação com a redução de ácidos carboxílicos (COOH) ou ésteres ($-\text{COOR}$), que empregam o hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4) como agente redutor e solventes anidros e apróticos. Os rendimentos obtidos para as reações foram relativamente baixos (próximos a 60%) quando comparados aos da literatura (em torno de 90%), devido a perdas de produto na etapa de purificação, onde optou-se pela técnica de recristalização, em substituição a cromatografia em coluna.

[†] Os valores da Eq. 3 são referentes a Quadro 4.12 do livro "Silverstein R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; Spectrometric Identification of organic compounds, 8ª edição, 2015".

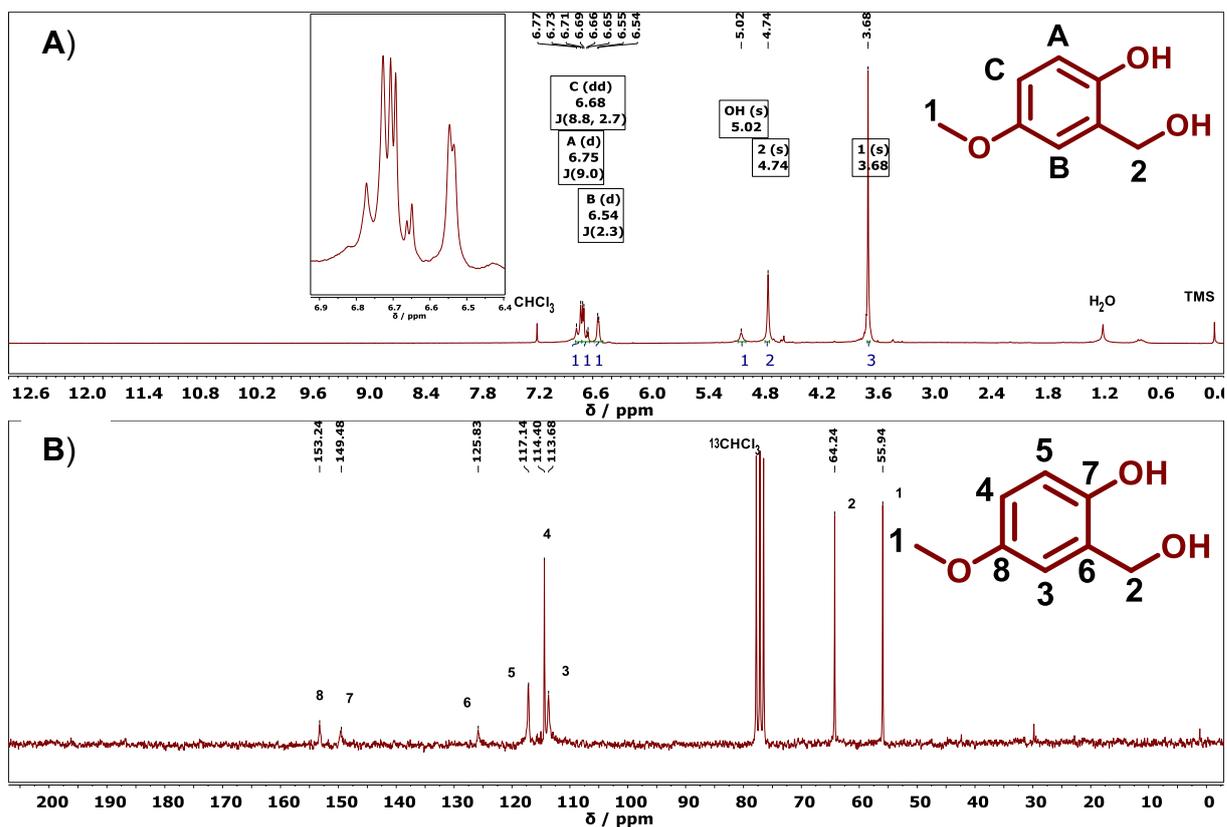
Figura 20 – Representação esquemática e o mecanismo da reação de redução empregada para os compostos **1a-c**.



O mecanismo sugerido para a reação de redução se encontra ilustrado na Figura 20. Inicia-se com o ataque nucleofílico do hidrogênio à carbonila, formando o sal **19**. A solução alcoólica é então tratada com HCl 1 mol L⁻¹, afim de neutralizar o sal **19** e formar o produto final **3**.

Por análises de RMN de ¹H e de ¹³C{¹H} (Figura 21 e Apêndice A) caracterizou-se os compostos **3a-c**. Da mesma forma que os compostos **1**, observa-se no RMN de ¹H o mesmo padrão de sistema *spin* na região dos aromáticos, referentes aos hidrogênios ABC, e os hidrogênios do substituinte metoxi em 3,6 ppm. No RMN de ¹³C, repete-se o perfil de intensidade dos sinais na região dos aromáticos, onde três são de menor intensidade (153,24 ppm, 149,48 ppm e 125,83 ppm) e três são de maior intensidade (117,14 ppm, 114,40 ppm e 113,68 ppm). Por fim, nas Figura 21A e Figura 21B, atribuiu-se o simpleto em 4,74 ppm, de integral relativa igual a 2, e o sinal em 64,24 ppm, respectivamente, ao substituinte hidroximetil (HOCH₂-), confirmando a obtenção do produto esperado.

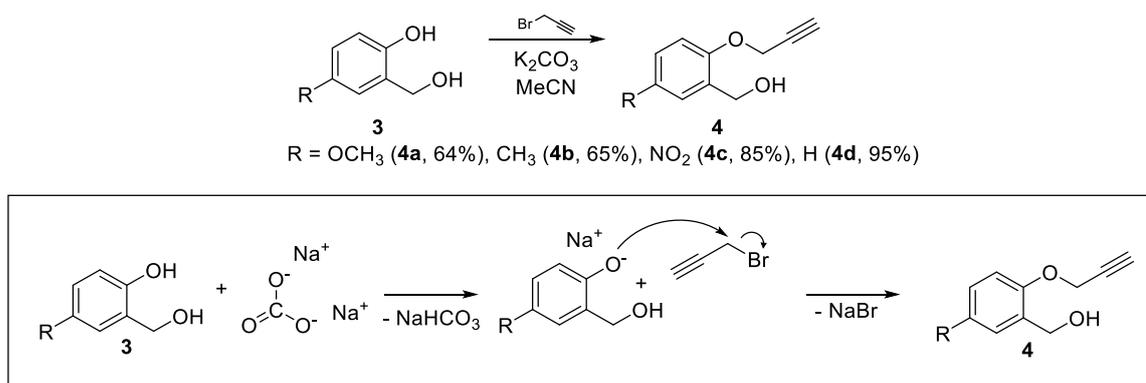
Figura 21 – Espectros de RMN (A) de ^1H a 200 MHz e (B) de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ a 50 MHz do composto **3a**, em CDCl_3 a 19°C .



5.1.3 Propargilação dos grupos fenóis

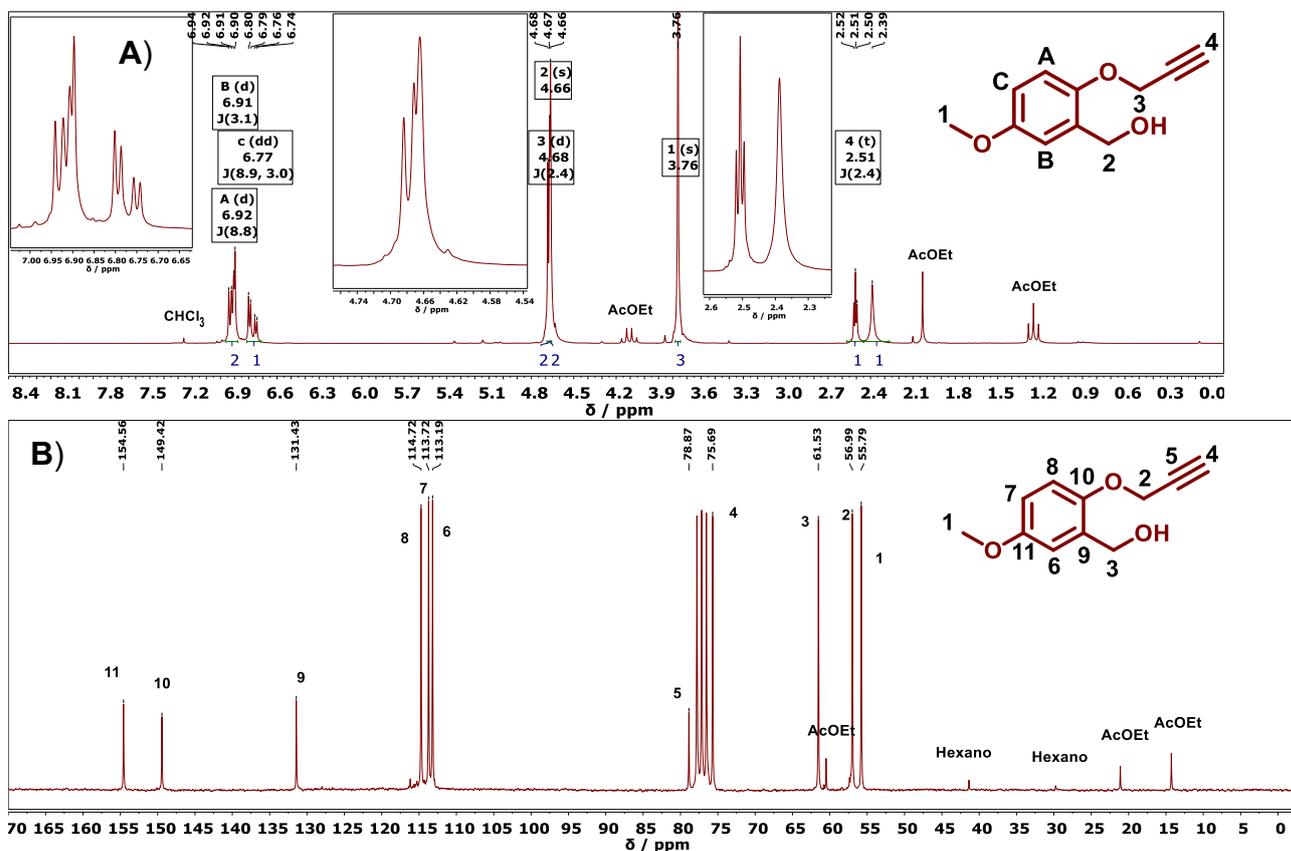
Na reação de propargilação, ou de proteção do espaçador autoimolativo, obteve-se os éteres de propargila **4a-d** (Figura 22), que serão usados para avaliação dos efeitos eletrônicos nas reações de O-despropargilação mediadas por Pd^{II} . O mecanismo sugerido para as reações de propargilação inicia com a formação do nucleófilo, nesse caso a espécie fenolato, a partir da reação de ácido-base entre o fenol **3a-d** e o K_2CO_3 . Em seguida, ocorre a substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) e a formação de **4a-d**. Após o tratamento aquoso das reações e a purificação por cromatografia em coluna, os produtos **4a-d** foram obtidos com rendimentos satisfatórios para todos os substituintes aromáticos.

Figura 22 – Representação esquemática e o mecanismo sugerido da reação de O-propargilação empregada para os compostos **3a-d**.



Os éteres de propargil **4a-d** foram caracterizados por RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 23). Na análise de RMN de ^1H (Figura 23A), observa-se os sinais do grupo propargil em 4,68 ppm (d, $^4J = 2,4$ Hz) e 2,51 ppm (t, $^4J = 2,4$ Hz), referentes aos hidrogênios CH_2 e CH , respectivamente. As hibridizações dos carbonos do grupo éter propargil diminuem as distâncias de ligações, devido ao maior caráter s das ligações dos carbonos central (**C**) e terminal (**CH**). Conseqüentemente, da mesma forma que os sinais de hidrogênios B e C do anel aromático, observa-se por RMN de ^1H o acoplamento de hidrogênios a longa distância (4J).

Figura 23 – Espectros de RMN (A) de ^1H a 200 MHz e (B) de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ a 50 MHz do composto **4a**, em CDCl_3 a 19°C .

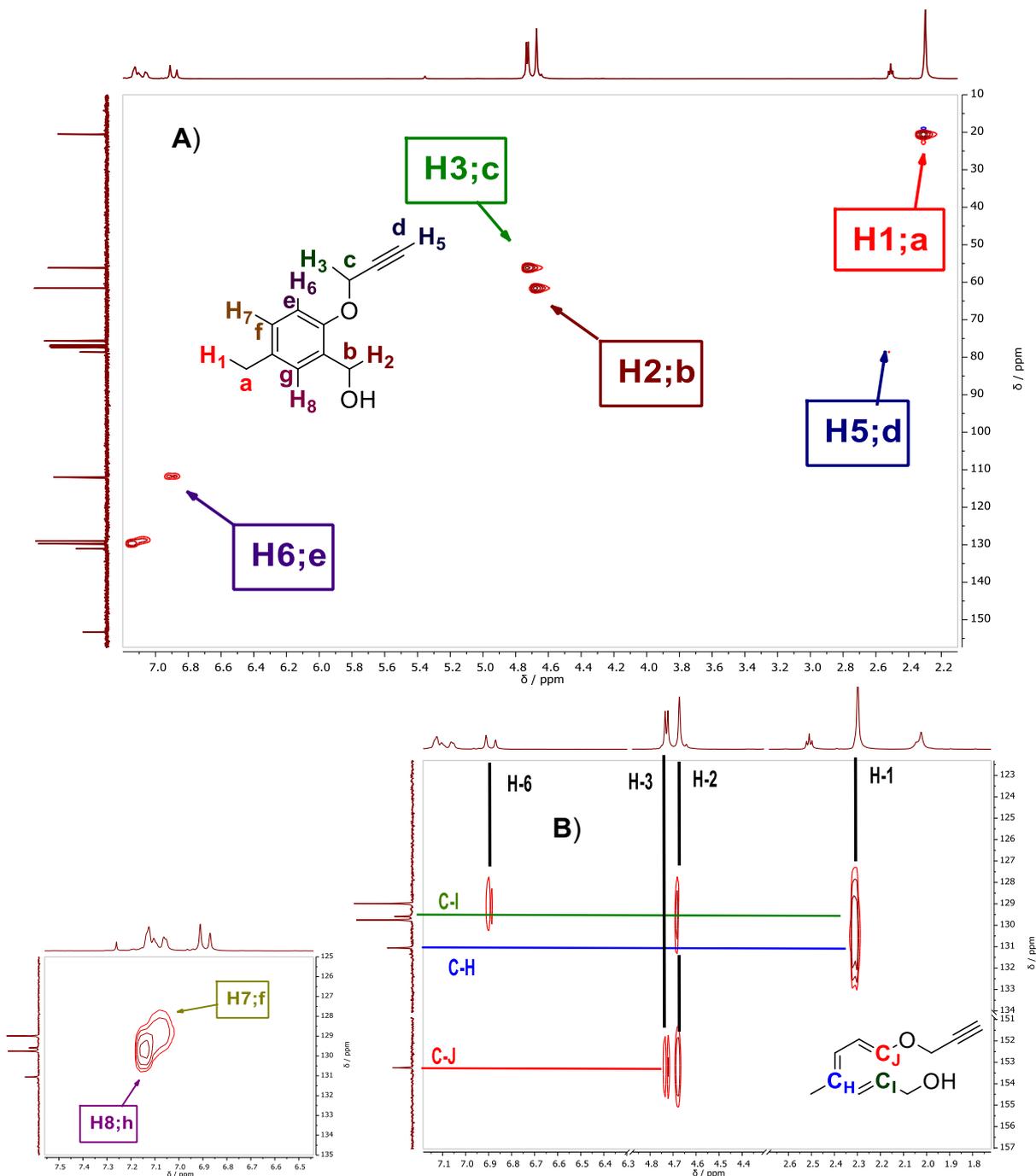


Nas análises de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 23B), podemos atribuir o sinal em 56,99 ppm ao carbono CH_2 do grupo éter propargil, uma vez que a região onde situa-se o sinal é coerente com a região de carbonos- α covalentemente ligados ao heteroátomo oxigênio, e, por comparação, é o único sinal diferente na mesma região no reagente **3** (Figura 21B). Localizado em 78,87 ppm e 75,09 ppm encontram-se os carbonos metino (**CH**) e **C**, respectivamente, e podem ser atribuídos em função da intensidade do sinal e do deslocamento. Como o carbono **C** do centro do grupo propargil está covalentemente ligado a dois átomos de carbono, o seu sinal deve ser de menor intensidade e de maior deslocamento químico que o carbono **CH** terminal do grupo propargil, que por sua vez está covalentemente ligado a um átomo de hidrogênio e o efeito de blindagem é maior.

Para o composto **4b**, inédito na literatura, realizou-se a atribuição correta dos sinais por meio de dois experimentos bidimensionais de RMN, são eles a correlação quântica heteronuclear única $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (*heteronuclear single quantum coherence*,

HSQC) e a correlação heteronuclear de ligações múltiplas $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (*heteronuclear multiple-bond correlation*, HMBC). Ambos os experimentos analisam os acoplamentos entre os átomos heteronucleares carbono e hidrogênio e a intensidade do acoplamento, resultando em um espectro 2D, ilustrado na Figura 24. A diferença entre os experimentos são os tipos de acoplamentos observados, no HSQC observa-se o acoplamento entre $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ diretamente ligados, e no HMBC observa-se os acoplamentos entre $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ com mais de uma ligação de distância, desta maneira uma técnica é complementar a outra para atribuição de todos os sinais corretamente.

Figura 24 – Espectro bidimensionais de (A) HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ e (B) de HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a 400 MHz do composto **4b** em CDCl_3 .



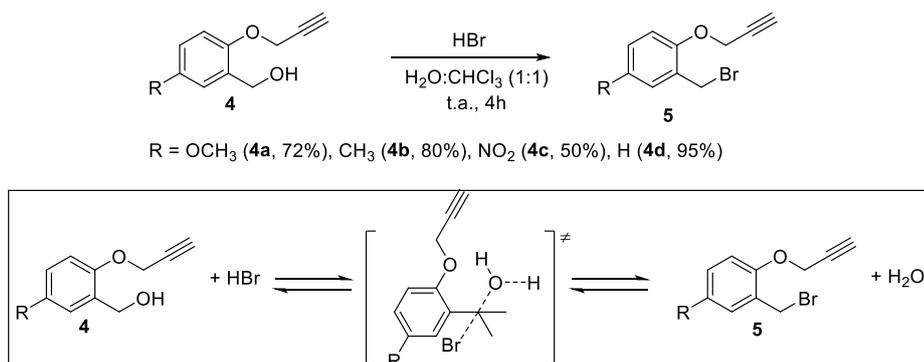
Como descrito na Seção 5.1.1.3, a atribuição dos hidrogênios ligados aos seus respectivos carbonos pode ser feita com base nos valores de δ e de J , na Figura 24A confirma-se as atribuições descritas anteriormente. Para os carbonos não ligados covalentemente a um átomo de hidrogênio, os quais foram atribuídos até o momento com base no δ calculado por quadros e nos átomos a quem estão covalentemente ligados, observa-se na Figura 24B que o único carbono acoplado ao grupo metileno

(-OCH₂CCH) do éter propargil está localizado em 153 ppm, logo pode-se atribuir este sinal ao carbono substituído C-J. Da mesma forma, observa-se que o carbono remanente com acoplamento ao metileno (-CH₂OH) é em 129,63 ppm, atribuído ao carbono substituído C-I. Por fim, o último sinaldo RMN de ¹³C restante é em 131,09 ppm, com acoplamento mais intenso com o grupo metil (-CH₃), e referente ao carbono substituído C-H.

5.1.4 Reação de bromação

Para obtenção dos brometos de alquila **5a-d**, utilizou-se como metodologia padrão um sistema bifásico de uma solução 40% de ácido bromídrico (HBr) e diclorometano (CH₂Cl₂), esquematizada na Figura 25. O mecanismo sugerido ocorre na interface do sistema H₂O/CH₂Cl₂, com base na solubilidade dos reagentes, através de uma reação de S_N2 entre o nucleófilo brometo e o eletrófilo carbono, forma-se o produto **5**, que por sua vez é mais hidrofóbico que o álcool **4** e se concentra na fase orgânica.

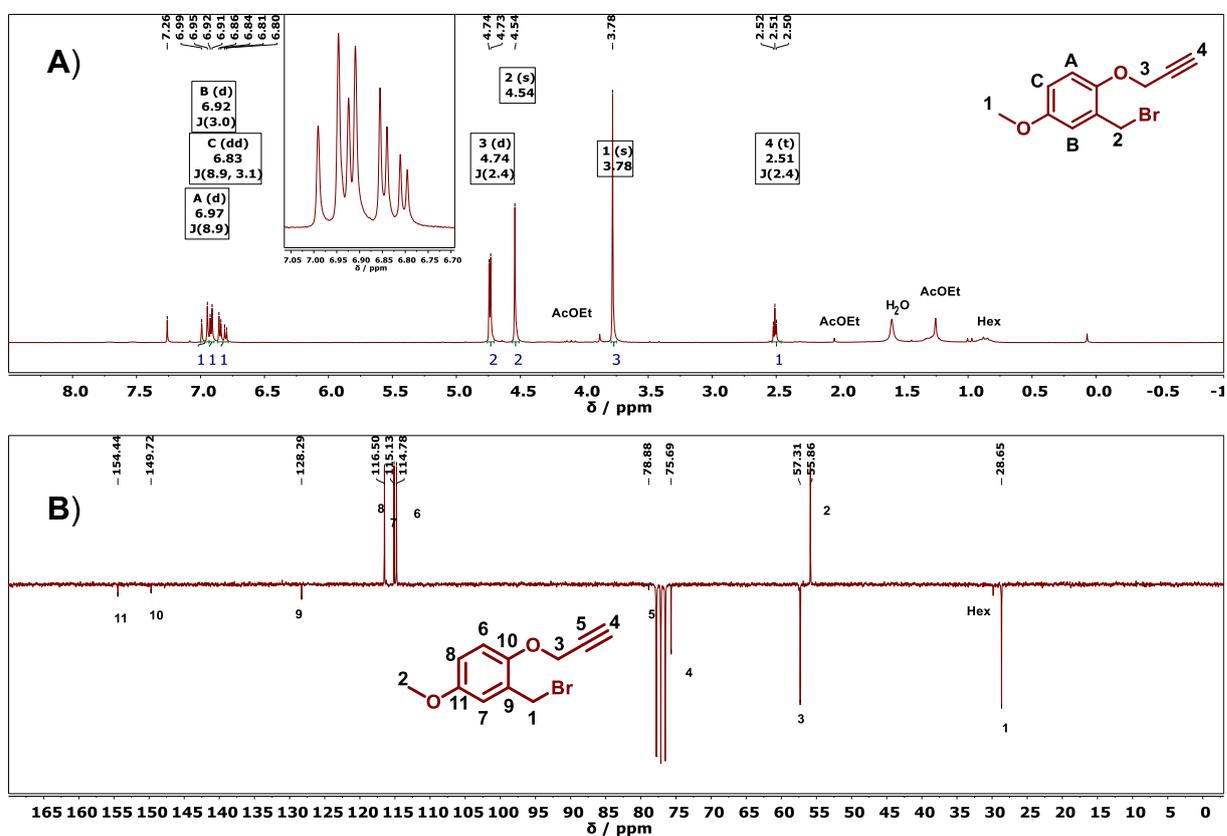
Figura 25 – Representação esquemática e o mecanismo da reação de bromação empregada para os compostos **4a-d**.



A caracterização dos compostos **5** foi realizada através das técnicas de RMN de ¹H e de ¹³C-APT (Figura 26). Da mesma forma que nos compostos anteriores, foi observado o mesmo perfil de sinais e acoplamentos entre hidrogênios, semelhante aos compostos **4a-d**, mostrados Figura 23, com exceção o deslocamento químico do grupo metileno (CH₂) do substituinte benzílico. O deslocamento químico desse grupo foi alterado de 4,65 ppm para 4,54 ppm no espectro de RMN de ¹H e de 61,53 ppm

para 28,65 ppm no espectro de RMN de ^{13}C -APT. O deslocamento para regiões de maior blindagem por átomos de bromo, como no exemplo acima, é devido a eletronegatividade do oxigênio ser maior que do bromo e pelos efeitos relativísticos dos elétrons ao redor do átomo pesado por outros átomos pesados (VÍCHA et al., 2020), que possuem um efeito de blindagem dos núcleos próximos a ligação C-Br, contrariamente ao efeito devido à diferença de eletronegatividade entre o carbono e o bromo, que ocasionaria a desblindagem dos núcleos.

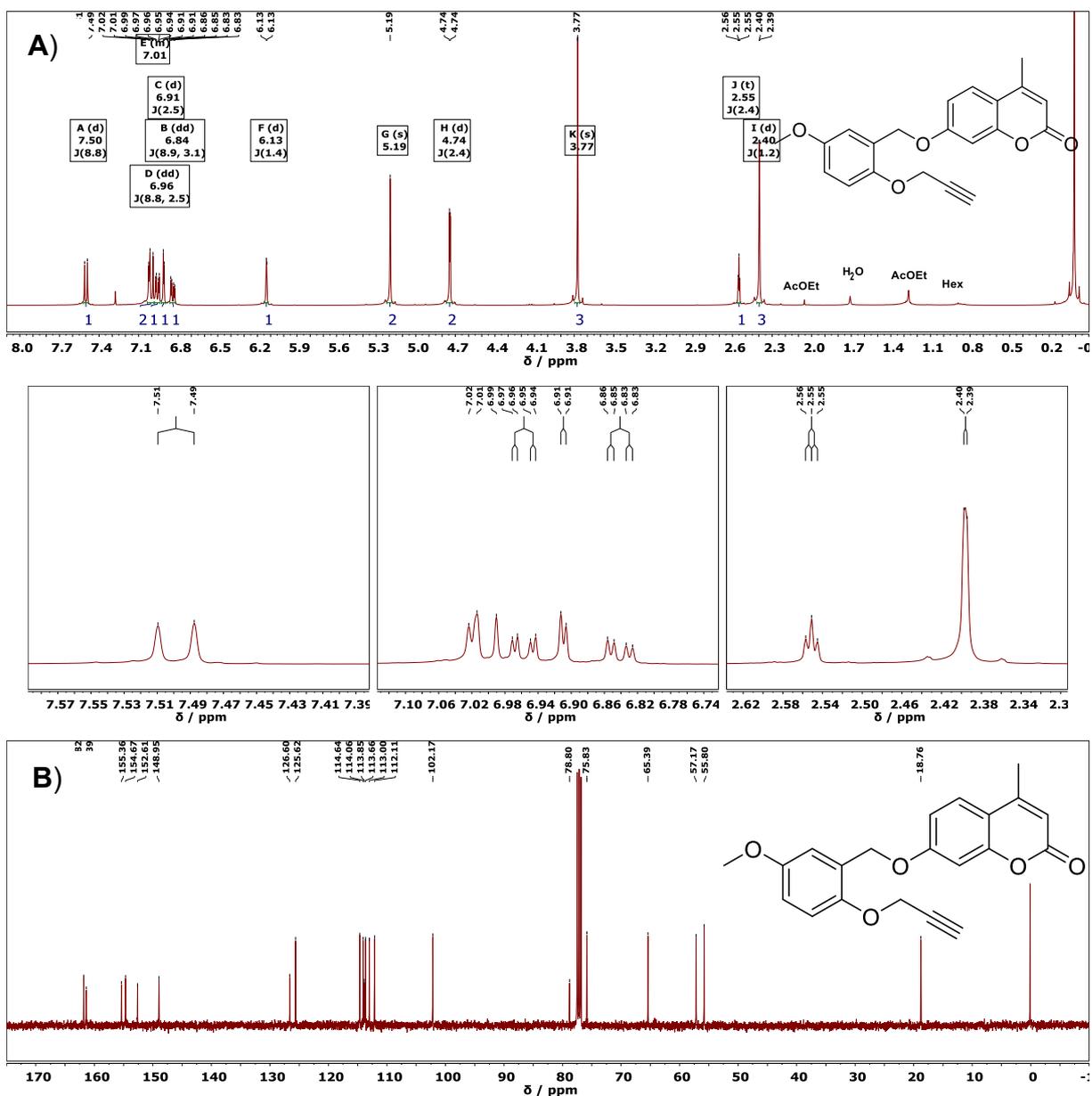
Figura 26 – Espectros de RMN (A) de ^1H a 200 MHz e (B) de ^{13}C -APT a 50 MHz do composto **4a**, em CDCl_3 a 19°C .



5.1.5 Reação de proteção da 4-metilumbeliferona (4-MU)

Por fim, realizou-se a síntese dos éteres inéditos **6a-d** (Pró-4-MU) como substratos modelos para os estudos cinéticos das reações de clivagem C-O seguido de 1,4 -eliminação. Esses éteres foram obtidos a partir do precursor 4-MU (Figura 27), por meio da adaptação da metodologia usada na reação de propargilação (Seção

Figura 28 – Espectros de RMN (A) de ^1H a 400 MHz e (B) de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ a 100 MHz do composto **6a**, em CDCl_3 a 19°C .



No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, atribuiu-se os sinais na região dos aromáticos, entre 100 ppm e 162 ppm, aos carbonos dos centros aromáticos e α e β à carbonila. Por comparação com o espectro da Figura 23B, na região dos alquílicos, o valor de δ de 65,43 ppm é próximo ao encontrado para o grupo metileno ($-\text{CH}_2\text{OH}$) do **4a**, logo atribui-se esse sinal ao carbono previamente ligado ao bromo e que fora substituído pela 4-MU. E atribuiu-se o sinal em 18,83 ppm ao carbono metil ($-\text{CCH}_3$), que por sua vez está covalentemente ligado a três hidrogênios e é o mais blindado entre os demais.

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ÁCIDA DE DERIVADOS 2-HIDROXIBENZIL ÁLCOOIS **3A-D**.

O valor da constante de dissociação ácida (K_a) de uma espécie ácida é referente ao equilíbrio termodinâmico entre a espécie ácida (HA) e sua respectiva base conjugada (A^-) em água, e é dada pelas seguintes equações:



$$K = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA][H_2O]} \rightarrow K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA]} \quad \text{Equação 5}$$

Aplicando a função logarítmica e multiplicando por -1 dos dois lados, tem-se que:

$$-\log K_a = -\log \frac{[A^-]}{[HA]} + -\log[H_3O^+] \quad \text{Equação 6}$$

Por outro lado, para escalas logarítmicas, temos que:

$$-\log K_a = pK_a \text{ e } -\log[H_3O^+] = \text{pH} \quad \text{Equação 7}$$

Substituindo na equação acima e reorganizando, conclui-se que:

$$\text{pH} = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad \text{Equação 8}$$

A Equação 8 é conhecida como a equação de Henderson-Hasselbalch, extensivamente usada para estimar valores de pK_a^\ddagger e de pH de ácidos fracos ou a partir de soluções preparadas por elas. Conhecendo o pK_a de uma espécie, pode-se calcular o pH de uma solução com base nas concentrações de ácido ($[A]$) e de base conjugada ($[A^-]$) em solução.

Por meio da técnica de absorção na região do ultravioleta-visível, os valores de concentrações do par ácido-base conjugada dos compostos **3a-d** em função do pH podem ser estimados em função de sua absorbância (A), devido a relação prevista

[‡] O pK_a é dependente da força iônica do meio, por isso que será representado como pK_a' os valores obtidos para a força iônica constante de 140 mmol L⁻¹.

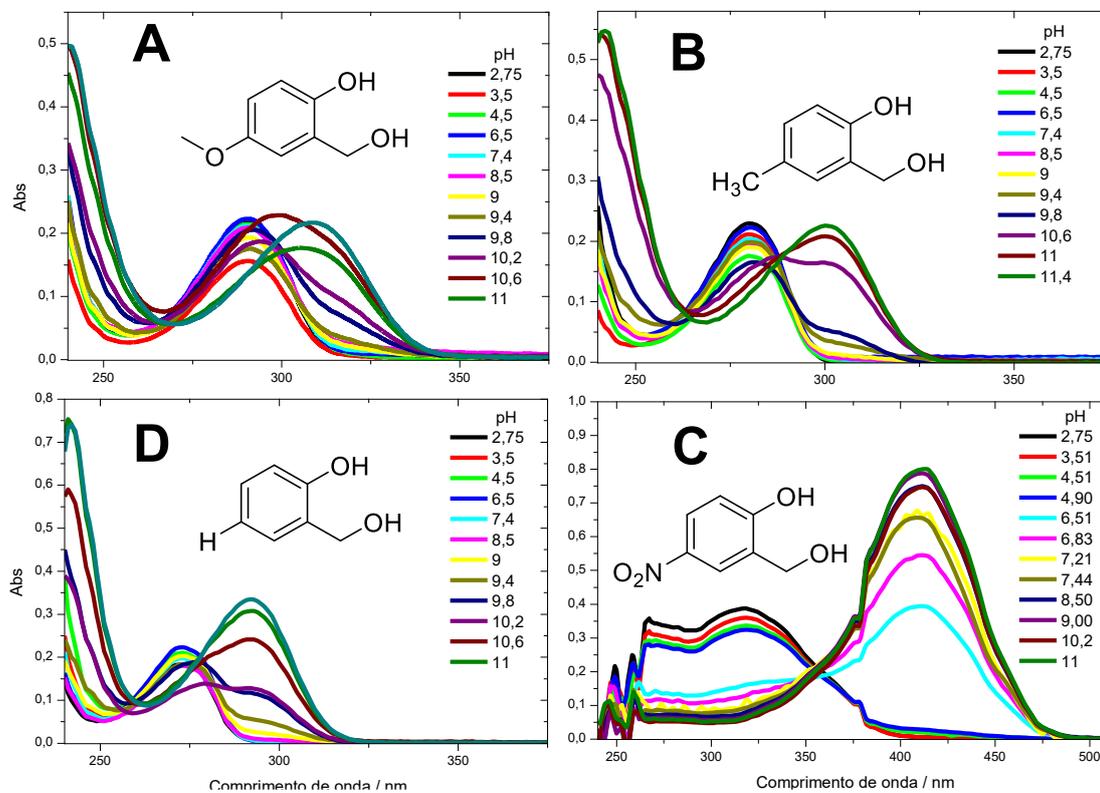
pela lei de Lambert-Beer (Equação 9). A partir de espectros de absorção em soluções contendo valores de pH distintos, podemos correlacionar a concentração de uma espécie ($[A]$) à sua absorvância, e obter os valores de pK_a' a partir da Equação 8.

$$A(\text{u. a.}) = \varepsilon(\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}) * b(\text{cm}) * [A](\text{mol L}^{-1}) \quad \text{Equação 9}$$

Onde ε =coeficiente de absorvância, b =caminho óptico.

As variações espectrais obtidas para os substratos **3a-d** encontram-se na Figura 29. Observou-se que, em valores de pH abaixo de 5, há uma banda de absorção máxima próximo à 280 nm para os compostos **3a**, **3b** e **3d** e em 325 nm para o composto **3c**, referentes as transições $n \rightarrow \pi^*$ do cromóforo fenólico em sua forma protonada (HA). Conforme aproxima-se a valores de pH mais altos, há um deslocamento batocrômico (deslocamento para o vermelho) da banda de absorção máxima, referente a base conjugada dos ácidos **3**, acompanhada por um aumento na intensidade da banda. O aumento de elétrons n no sistema é consequência da dissociação do hidrogênio ácido do grupo fenólico, em valores de pH próximos ou maiores ao pK_a . Concomitantemente, há diminuição da energia necessária para a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$, e, para os compostos **3c** e **3d**, há um aumento significativo no coeficiente de absorvância molar (ε) para esses sistemas.

Figura 29 – Variação espectral na região do UV-vis em função do pH para os substratos (A) 3a, (B) 3b, (C) 3c, e (D) 3d. As condições de análise foram: T = 37 °C, l = 140 mmol L⁻¹, e concentração de DMSO de 10% v/v.



Para a determinação dos valores de pK_a , manteve-se a concentração dos substratos constantes durante todo o experimento e, pela lei de Avogadro, para um equilíbrio ácido-base de um ácido monoprótico, a formação da base conjugada deve ser proporcional ao consumo do ácido:

$$[A] = [HA] + [A^-] \quad \text{Equação 10}$$

Acompanhou-se a banda de absorção da base conjugada (A_{λ_{\max}, A^-}) em diferentes pH (A_{pH}). A partir das diferenças entre os valores mínimo (pH = 2,75, A_a) e máximo (pH = 11,4, A_b) de A_{pH} , pode-se relacionar a intensidade da banda com as concentrações da base conjugada ($[A^-]$) e do ácido ($[HA]$) em solução:

$$[HA] = A_b - A_{pH} \text{ e } [A^-] = A_{pH} - A_a \quad \text{Equação 11}$$

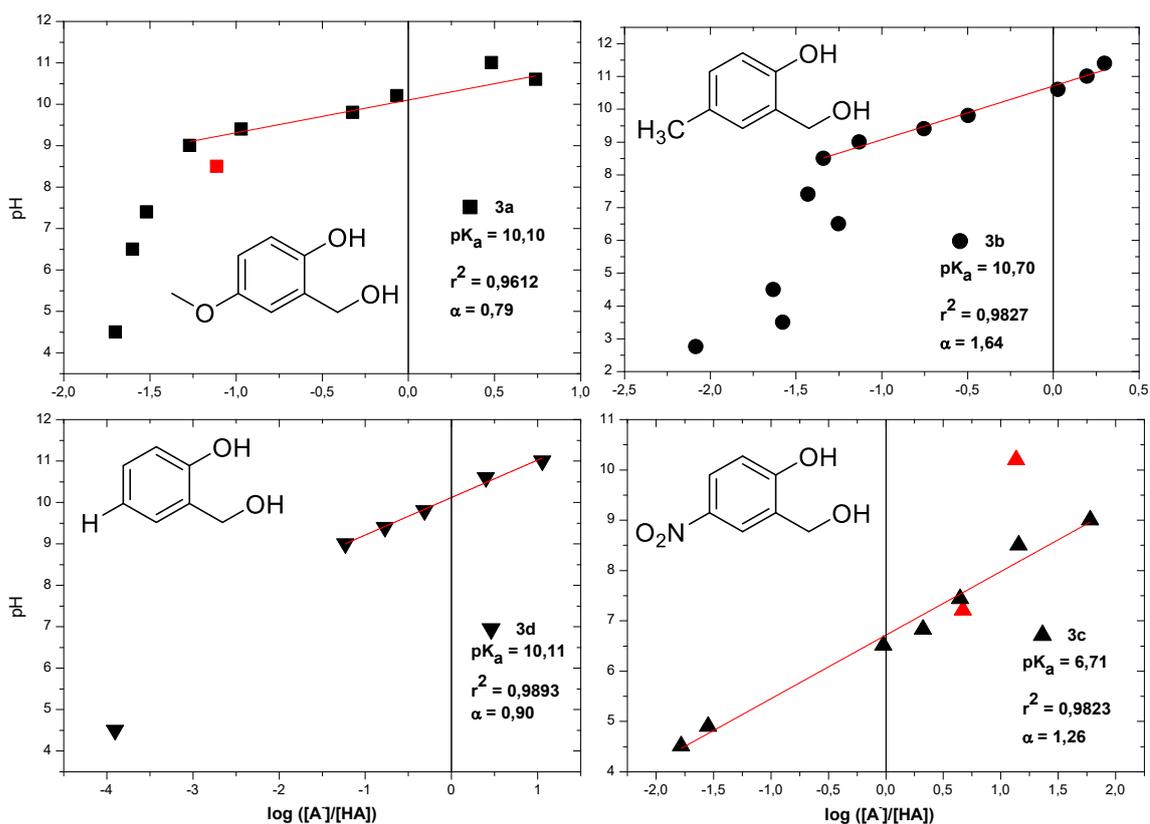
Substituindo as relações estabelecidas na Equação 11 na divisão das concentrações da Equação 8, temos:

$$\text{pH} = \text{p}K'_a + \log\left(\frac{A_{\text{pH}} - A_a}{A_b - A_{\text{pH}}}\right)$$

Equação 12

Desta forma, a construção de um gráfico do logaritmo da razão das concentrações das espécies dissociadas em solução em função do pH, permitem estimar os valores de $\text{p}K'_a$, previsto na Equação 12. O ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas representa o valor de $\text{p}K'_a$ do analito, conforme ilustrado na Figura 30. Nesses exemplos, pode-se observar que o menor valor de $\text{p}K'_a$ obtido é referente ao composto **3c**, devido ao caráter retirador de elétrons do substituinte NO_2 na estrutura, que por sua vez estabiliza a carga negativa formada no oxigênio.

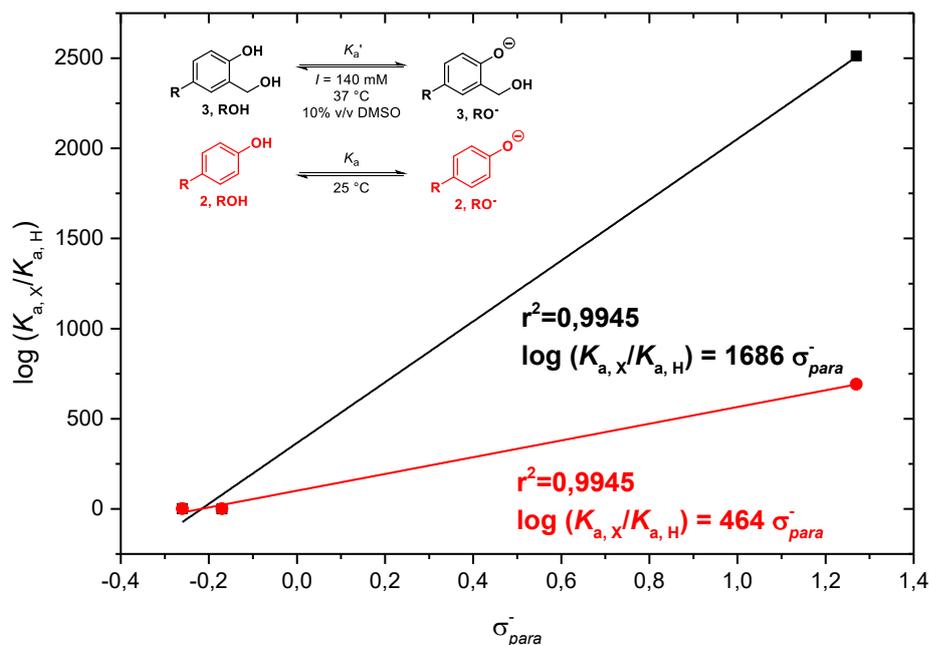
Figura 30 – Linearização da equação de Henderson-Hasselbach para diferentes substratos fenólicos **3**.



Em virtude da interdependência da dissociação ácida dos compostos **3** em função dos efeitos eletrônicos do substituinte na posição *para* ao grupo hidroxil, através da relação linear de energia proposto por Hammett, obteve-se a equação

apresentada na Figura 31 e comparou-se os valores obtidos[§] com o da reação padrão de dissociação ácida (compostos **2**).

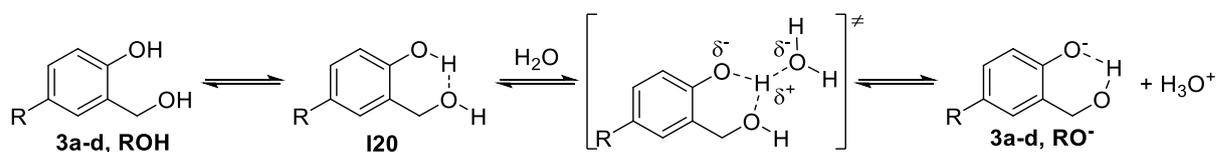
Figura 31 – Comparação entre o efeito eletrônico do substituinte aromático dos compostos **3** com o composto **2**.



Ao analisar a Figura 31, percebe-se uma diferença significativa entre as constantes de equilíbrio químico dos compostos **3a-d** e **2a-d**, os quais indicam que a dissociação ácida é mais afetada pelo pH quando o substituinte hidroximetil (-CH₂OH) está presente na posição *orto*. Esses resultados não apenas indicam que o equilíbrio químico de dissociação ácida é maior com o substituinte CH₂OH na posição *orto*, mas também sugerem que o hidrogênio ácido é afetado por ligações de hidrogênio com substituintes vizinhos (**I20**). Além disso, a estabilização da base conjugada (**3a-d, RO⁻**) através de uma ligação de hidrogênio com o substituinte CH₂OH contribui para a diminuição do valor de pK_a. Essas observações confirmam a maior sensibilidade dos valores de pK_a dos fenóis **3a-d** em relação aos fenóis **2a-d**.

[§] Os valores de pK_a dos compostos **1a-d** foram retirados do livro "D. E. LIDE; *CRC Handbook of Chemistry and Physics 2003-2004*, CRC Press, Edição 84.". Nome do composto (valor de pK_a): 4-Nitrophenol **1c** (7,15), phenol **1d** (9,99), 4-Methoxyphenol **1a** (9,53) e p-Cresol **1b** (10,26).

Figura 32 – Efeito substituinte hidroximetil no equilíbrio da reação de dissociação ácida dos substratos **3a-d**.



5.3 ESTUDOS CINÉTICOS

5.3.1 Reação de O-despropargilação mediada por Pd dos éteres de propargila **4a-d**

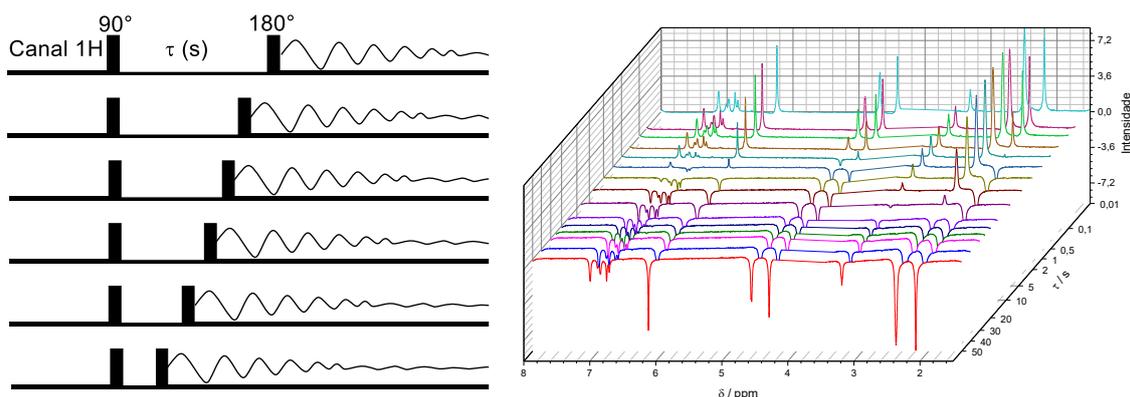
5.3.1.1 Estudos de espectroscopia de RMN de ^1H

O monitoramento cinético por RMN de ^1H das reações de O-despropargilação mediada por paládio foram realizadas utilizando o ácido *cis*-butenodíico (ou ácido maléico, AM) como padrão externo. O emprego de um padrão externo, dentro de um tubo capilar coaxial, permite que a integral e a intensidade de seu respectivo sinal sejam constantes durante o período reacional, e sua relação com as integrais das espécies formadas e consumidas em solução permite obter a concentração relativa das mesmas. Além disso, o emprego de uma mistura 20% v/v de D_2O e 80% v/v de $(\text{CD}_3)\text{SO}$ como solvente de reação também se fez necessário por motivos de solubilidade dos compostos nas concentrações empregadas.

Previamente ao monitoramento das reações por RMN de ^1H , obteve-se os valores de relaxação longitudinal (spin-rede, T_1) dos sinais referentes ao hidrogênio terminal do grupo éter propargil ($\equiv\text{C-H}$, $\delta \approx 3,2$ ppm) e do padrão externo ($=\text{CH-COOH}$, $\delta \approx 6,245$ ppm), para que as integrais medidas durante o período reacional sejam referentes a todos os hidrogênios em solução. Por meio do experimento de recuperação inversa (*Inversion-Recovery Experiment*), estima-se os valores de T_1 com base nas intensidades dos sinais em função do período de relaxamento (τ) entre o primeiro pulso e o segundo pulso (Figura 32). Desta maneira, pela Equação 13, obtêm-se os valores de T_1 , onde I_τ é a intensidade do sinal analisado após o período τ , I_0 é a intensidade do sinal quando τ é infinito, α é o estado de magnetização inicial

($2 \geq \alpha \geq 0$) anteriormente à recuperação inversa ocorrendo durante o tempo τ (WEI et al., 2021).

Figura 33 – Experimento de recuperação inversa. (A) Representação esquemática da sequência de pulso em diferentes períodos de τ . E (B) os espectros obtidos para **3a** em diferentes valores de τ , cortou-se a janela espectral entre 3,7 ppm e 4,2 ppm para melhor visualização dos sinais de interesse. Condições: [**3b**] = 20 mmol L⁻¹, [**AM**] = 5 mmol L⁻¹, 20% v/v de D₂O e 80% v/v de (CD₃)SO a 19 °C.

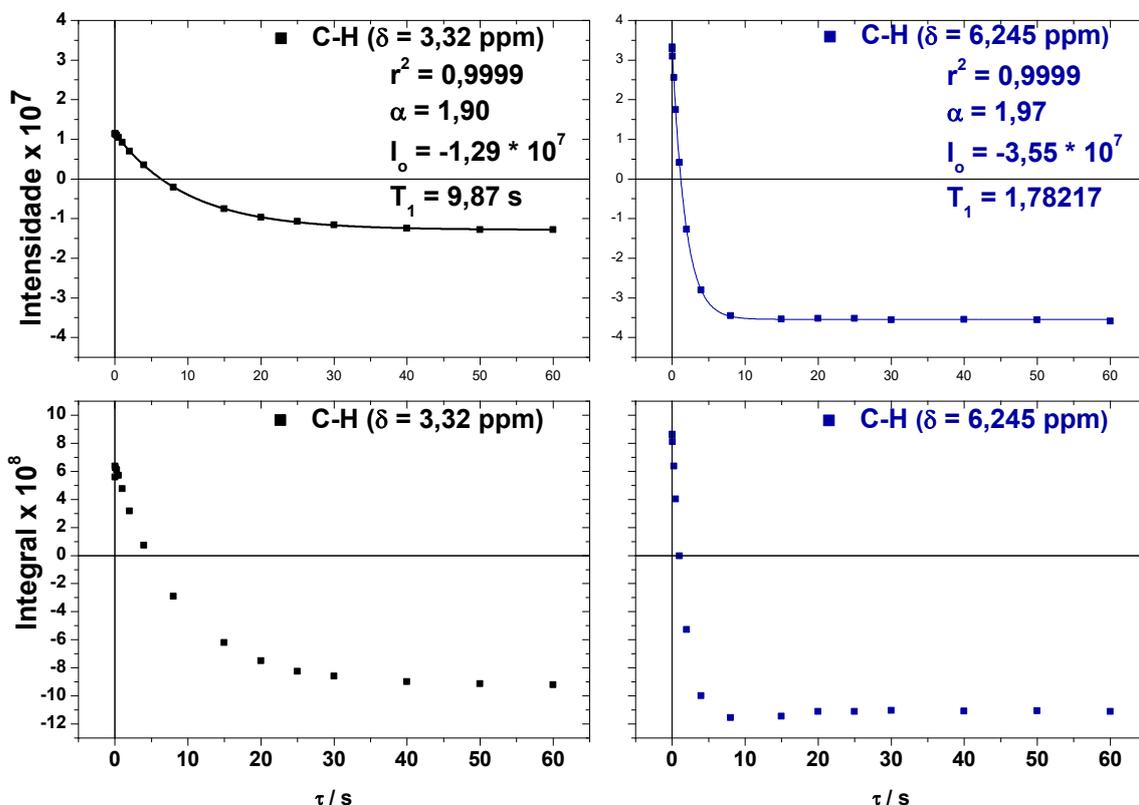


$$I_{\tau} = I_0 - (1 - \alpha * e^{-\frac{\tau}{T_1}})$$

Equação 13

Para os sinais de interesse, obteve-se os valores de T_1 de 9,87 s e de 1,78 s para os hidrogênios C-H ($\delta \approx 3,2$ ppm, Figura 33A) e =CH-COOH ($\delta \approx 6,2$ ppm, Figura 33B), respectivamente. Como discutido anteriormente, na atribuição dos sinais de ¹³C à estrutura dos *para*-fenóis **2** (Seção 5.1.1.3), o valor de T_1 de um sinal é dependente do ambiente molecular próximo ao átomo, e o principal processo que contribui ao processo de relaxação é a interação *dipolo-dipolo* (LAMPMAN; PAVIA; KRIZ, 2010). Como prova de conceito, na Figura 34B observa-se que se fossem analisados as integrais dos sinais em tempos menores de T_1 , ou que não fossem ao menos três vezes maior, o valor da integral e a concentração obtida a partir dela teriam dimensões menores que o valor real. Para fins quantitativos, o tempo de aquisições (d1) do FID foram três vezes ao valor de T_1 do hidrogênio respectivo ao grupo éter propargil (d1 = 30 s), e manteve-se o número de quatro varreduras (*scans*) para aumentar a razão sinal/ruído dos espectros (prevista pela Equação 14, onde S=Intensidade do sinal; R=Intensidade do ruído, f=coeficiente de proporcionalidade, n=número de scans).

Figura 34 – Obtenção dos valores de T_1 para os hidrogênios de interesse em função da intensidade dos sinais, ilustrados anteriormente na Figura 33.

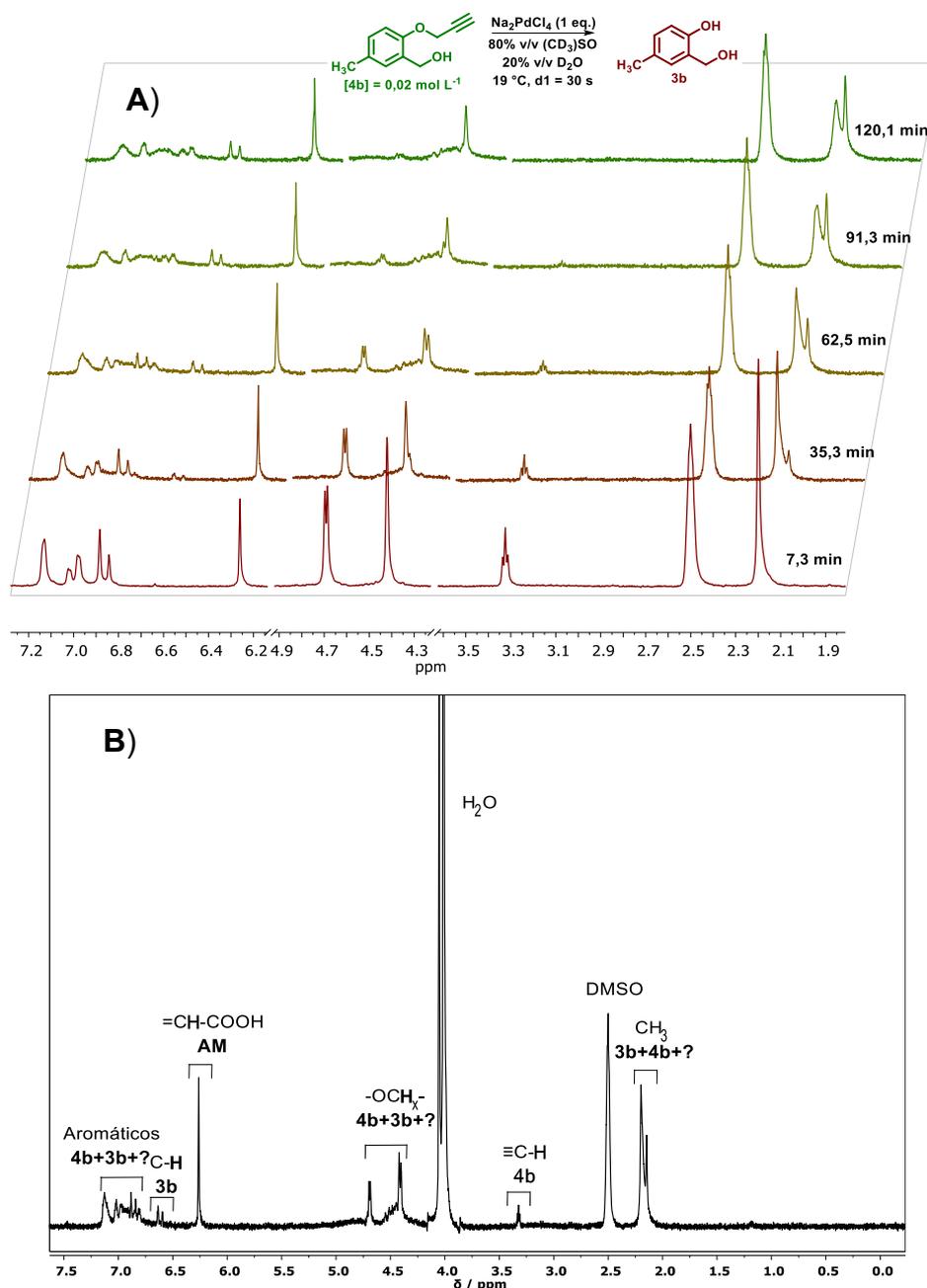


$$\frac{S}{N} = f\sqrt{n}$$

Equação 14

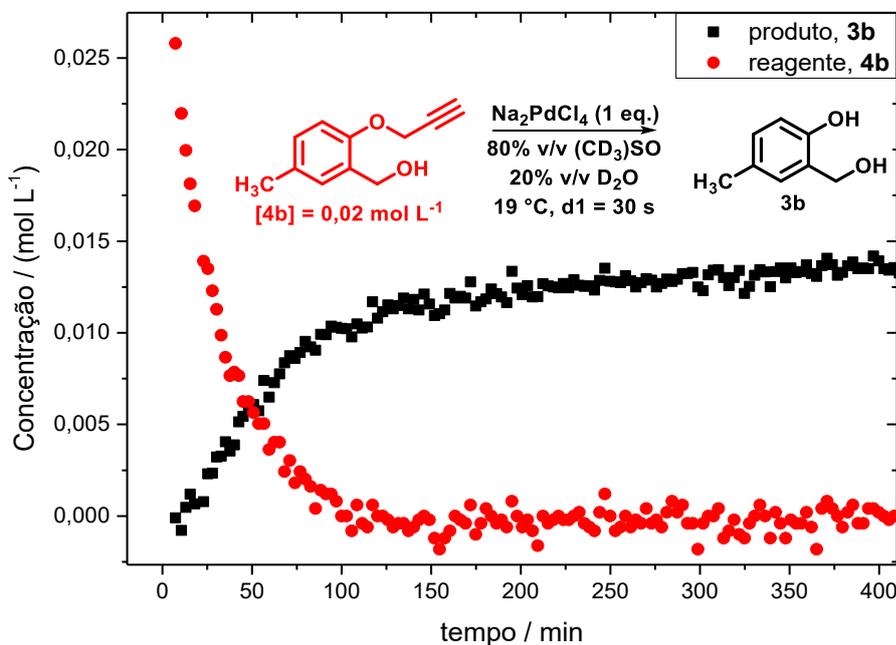
Na sequência realizou-se o monitoramento cinético das reações de O-despropargilação, com os diferentes substratos de substituintes aromáticos distintos, empregando d_1 igual a 30 s. A Figura 35A mostra os espectros de RMN de ^1H em função do tempo para a reação de O-despropargilação do substrato **4b**, e na Figura 34B a atribuição dos sinais dos compostos conhecidos (**4b** e **3b**) e de compostos não identificados que apareceram ou desapareceram no curso da reação em 62,5 minutos de reação. A formação de compostos não identificados ou intermediários, resumidos com a pontuação “?” na Figura 35B, foram observados principalmente na região das metilas ($-\text{CH}_3$) em 2,15 ppm (Figura 35A), que após 128 minutos de reação (espectro onde todo o reagente **4b** foi consumido pelo desaparecimento do sinal em 3,2 ppm), há dois sinais na mesma região de intensidades distintas, um referente ao produto **3b** e o segundo ao subproduto ou intermediários.

Figura 35 – Espectros de RMN de ^1H da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do composto **4b** e do catalisador Na_2PdCl_4 em (A) função do tempo de reação e (B) em 62,5 min. Condições reacionais: em 20% D_2O e 80% $(\text{CD}_3)\text{SO}$ à 19°C .



Os perfis de concentração relativa das espécies **4b** e **3b** em função do tempo estão representadas na Figura 36. Constata-se a formação de um subproduto por meio da diferença entre as concentrações relativas iniciais e finais de reagente ($[\text{R}]$) e de produto ($[\text{P}]$). Devido a sobreposição de sinais, observados na Figura 35, entre o subproduto com do produto, o acompanhamento cinético de formação do subproduto se tornou uma limitação da técnica de RMN de ^1H .

Figura 36 – Gráfico de concentração das espécies **4b** e **3b** na reação de 0,02 mol L⁻¹ do composto **4b** e do catalisador Na₂PdCl₄ em 20% D₂O e 80% (CD₃)SO a 19 °C.



Considerando que o mecanismo da reação de O-despropargilação envolve vários intermediários, alguns deles previamente caracterizados em trabalhos anteriores, a determinação da etapa determinante e a elaboração de uma lei de velocidade que leve em conta todas as etapas, exigiriam estudos cinéticos adicionais para validar e comprovar a lei de velocidade proposta. No entanto, para os objetivos do presente trabalho, optou-se pelo ajuste linear das leis de velocidade de primeira ordem (Equação 15) e segunda ordem (Equação 16), a fim de simplificar o mecanismo da reação, eliminando intermediários e equilíbrios.

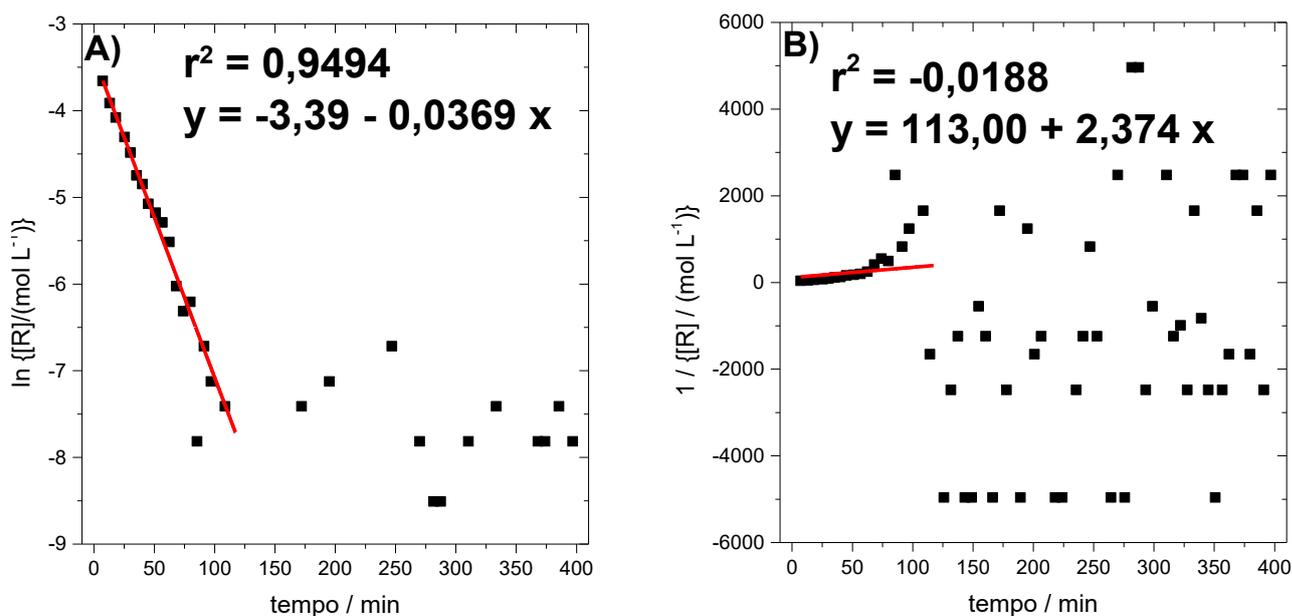
$$v = k[R]^1 \quad \rightarrow \quad \ln[R]_t = \ln[R]_o - kt \quad \rightarrow \quad [R]_t = [R]_o e^{-kt} \quad \text{Equação 15}$$

$$v = k[R]^2 \quad \rightarrow \quad \frac{1}{[R]_t} = \frac{1}{[R]_o} + kt \quad \rightarrow \quad [R]_t = \frac{[R]_o}{1 + [R]_o kt} \quad \text{Equação 16}$$

Conforme ilustrado na Figura 37, o ajuste linear de primeira ordem (Figura 37A e Apêndice B) apresentou um coeficiente de correlação (r^2) mais próximo de 1 do que o ajuste linear de segunda ordem (Figura 37B, Apêndice B). A linearização do perfil cinético com a lei de velocidade de primeira ordem, sugere que a etapa determinante das reações de O-despropargilação mediadas por paládio são unimoleculares. Esses resultados estão em concordância com o trabalho de Coelho e

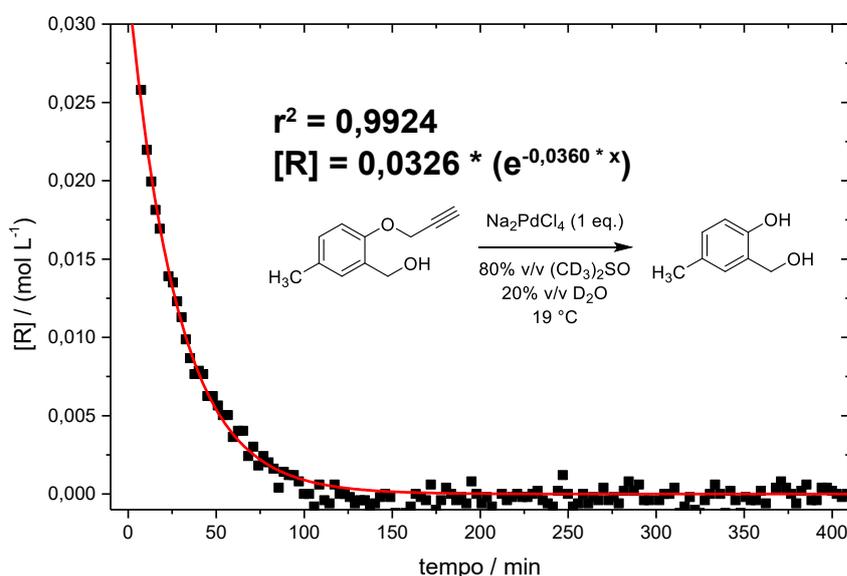
colaboradores (2019), que identificaram a eliminação β -O do paládio como a etapa determinante da reação, correspondente a uma etapa unimolecular.

Figura 37 – Linearização dos dados cinéticos experimentais normalizados para a reação de despropargilação do **3b** com as leis de velocidade (A) de primeira e (B) de segunda ordem.



A determinação dos valores das constantes observadas de velocidade de primeira ordem (k_{obs}) para as reações estudadas foi obtida por meio do ajuste não linear prevista na Equação 15. A preferência pelo uso do ajuste não linear na determinação das constantes deve-se à heterocedasticidade dos erros experimentais. Regressões lineares, como as utilizadas na Figura 37, assumem que esses erros sejam constantes em toda a faixa, o que pode levar a valores de k_{obs} diferentes dos valores reais (PERRIN, 2017). Dessa forma, o valor de k_{obs} que melhor se aproximou do perfil teórico em relação ao experimental para a reação de O-despropargilação do substrato **4b** está ilustrado na Figura 38, enquanto os valores para os demais substratos estão apresentados no Apêndice B. Os valores de k_{obs} e r^2 foram resumidos no Quadro 3.

Figura 38– Perfil cinético para a reação de 0,02 mol L⁻¹ de **4b** com 0,02 mol L⁻¹ de Na₂PdCl₄ em 80% v/v de (CD₃)SO e 20% v/v de D₂O e 19 °C.

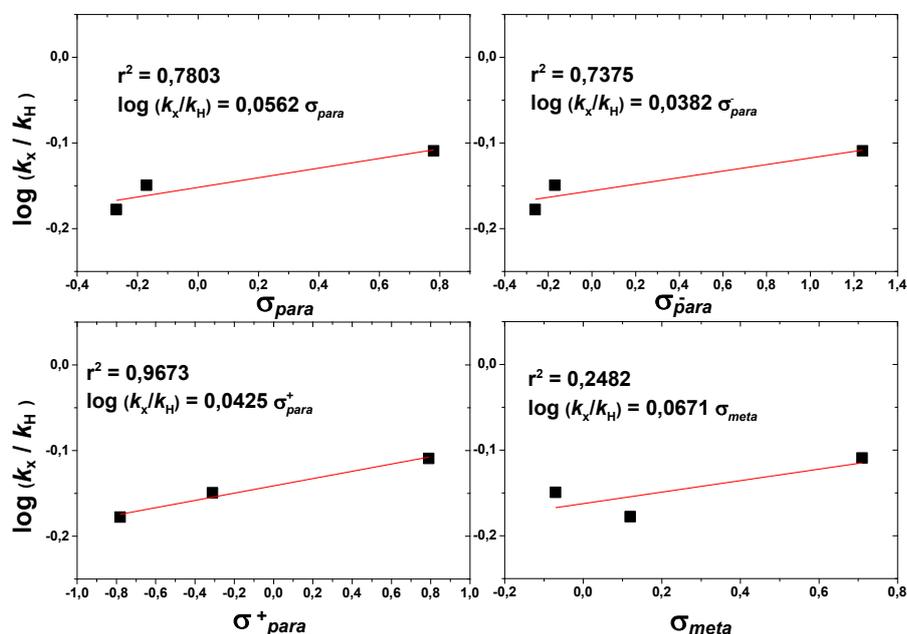


Quadro 3 – Constantes observadas de primeira ordem (k_{obs}) obtidas pelas regressões não lineares para a reação de O-despropargilação, referentes ao consumo do reagente, para diferentes substituintes aromáticos (R). Condições gerais: [4a-d] = 0,02 mol L⁻¹; [Na₂PdCl₄] = 0,02 mol L⁻¹, 20% v/v D₂O, 80% v/v (CD₃)SO e 19 °C.

Substrato	4b	4c	4a	4d
R =	Me	NO₂	OMe	H
k_{obs} (min ⁻¹)	0,0360	0,0395	0,0337	0,0508
r^2	0,9924	0,9687	0,9143	0,9895

A fim de avaliar os efeitos eletrônicos da reação, normalizou-se os valores de k_{obs} a partir do logaritmo da razão entre o valor de k_{obs} e $k_{\text{obs,H}}$ ($\log\left(\frac{k_{\text{obs,X}}}{k_{\text{obs,H}}}\right)$), plotando-os na equação de Hammett, aplicando diferentes constantes de substituintes (σ), conforme ilustrado na Figura 39. Observa-se uma reta cuja tendência para valores maiores no eixo das ordenadas com valores de σ , logo há um aumento na velocidade de reação com grupos retiradores de elétrons. Ainda, as constantes de reação (ρ), obtidas a partir das inclinações de cada reta, tiveram valores positivos menores que 1.

Figura 39 – Linearização dos gráficos $\log\left(\frac{k_{obs,X}}{k_{obs,H}}\right)$ versus σ da reação de O-despropargilação mediada por Pd.



Estes resultados indicam que o efeito eletrônico sob a reação é bastante pequeno, e que a reação apresenta alta robustez para diferentes substituintes aromáticos. E ainda, a tendência para valores maiores de k_{obs} para grupos retiradores de elétrons corroboram com o mecanismo proposto por Coelho e colaboradores (2019), onde a energia do estado de transição da etapa do ataque nucleofílico anti-Markovnikov da molécula de água (Figura 10), é favorecida com a inserção de grupos retirados de elétrons, que por sua vez aumenta a eletrofilicidade do grupo propargil e a velocidade de reação.

5.3.1.2 Estudos de espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Ainda em relação aos estudos sobre a reação O-despropargilação mediada por paládio dos éteres de propargila **4a-d**, prosseguiu-se para o monitoramento por UV-vis, com o intuito de acompanhar bandas de absorção de compostos nessa região. As vantagens dessa técnica em relação a espectroscopia de RMN de ^1H é a detecção de espécies na escala de micromolar ($\mu\text{mol L}^{-1}$), um maior controle de temperatura por meio de banhos termostatizados, e por ser um método mais barato, não havendo a necessidade do uso de solventes deuterados. Dito isso, a reação de O-

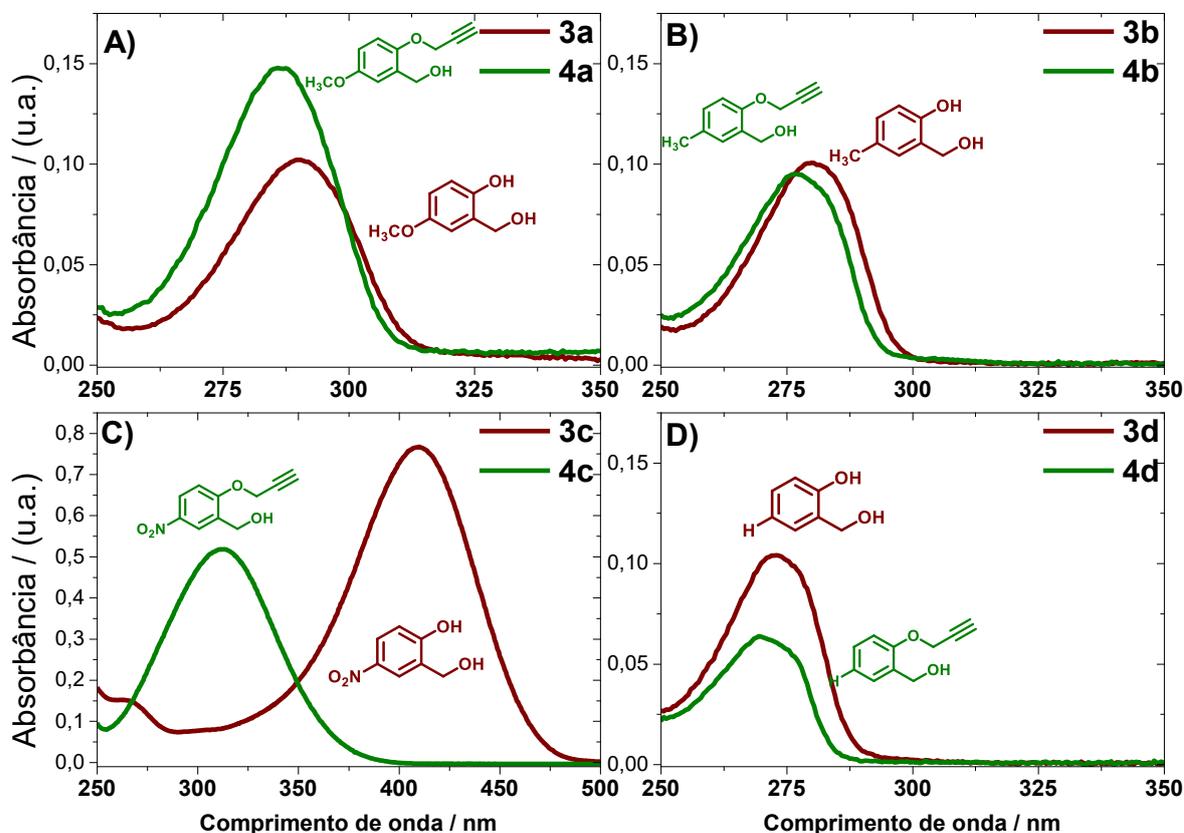
despropargilação por Na_2PdCl_4 foi monitorada para a reação esquematizada na Figura 40.

Figura 40 - Esquema geral da reação de O-despropargilação mediada por Na_2PdCl_4 a partir dos substratos **4a-d**.



Para os estudos cinéticos subsequentes, o perfil de absorvância dos substratos **4a-d** e produtos **3a-d** foram analisados na região do UV-vis sob condições biológicas, como pH igual a 7,4 e temperatura de 37 °C. Os espectros sobrepostos da Figura 41 indicam que somente é possível distinguir as bandas de absorção entre reagente e produto para o substituinte NO_2 , enquanto os demais possuem sobreposição de bandas de absorção.

Figura 41 – Espectros de absorção na região do UV-vis sobrepostos dos fenóis **3a-d** e dos éteres de propargila **4a-d** a 50 mmolL⁻¹ e em PBS (0,01 mol L⁻¹) com pH = 7,4 com 10% v/v DMSO. **A)** **3a** e **4a**. **B)** **3b** e **4b**. **C)** **3c** e **4c**. **D)** **3d** e **4d**.



Estas observações estão relacionadas aos valores de pK_a dos derivados fenólicos em solução (Seção 5.2). Enquanto o composto **3c** possui um valor de pK_a abaixo do pH da solução, a sua forma predominante em solução é a base conjugada (**3d**, RO^-), os demais derivados fenólicos **3a**, **3b** e **3d** possuem valores maiores de pK_a e a bandas de absorção dos ácidos (ROH) coincidem com os seus respectivos substratos. Assim, somente é possível acompanhar a formação de **3c**, a partir do substrato **4c** em função de diferentes concentrações de paládio, e de **4c** pela técnica espectroscópica de absorção na região do UV-vis.

Como a velocidade inicial da reação ($v_{inicial}$) depende do produto entre as concentrações das espécies ($[A]$ ou $[B]$) levadas as ordens de reação (x ou y) e a constante de velocidade da reação (k), se durante o experimento variarmos a concentração de uma única espécie, obtemos a Equação 17, onde k_{obs} é a constante observada é o produto entre k e a concentração da espécie que manteve-se constante.

$$v = k[\mathbf{B}]^y[\mathbf{A}]^x \rightarrow v_{inicial} = k_{obs}[\mathbf{A}]^x \text{ ou } v_{inicial} = k_{obs}[\mathbf{B}]^y \quad \text{Equação 17}$$

Se aplicarmos a função logarítmica aos dois lados da Equação 17 e rearranjarmos para uma função linear, obtemos a Equação 18. Assim, por meio de diferentes concentrações de Pd e **4c**, podemos obter informações mecánísticas em respeito à ordem da reação de O-despropargilação mediada por paládio.

$$\log v_{inicial} = \log(k_{obs}) + x \log([\mathbf{A}]) \text{ ou } \log v_{inicial} = \log(k_{obs}) + y \log([\mathbf{B}]) \quad \text{Equação 18}$$

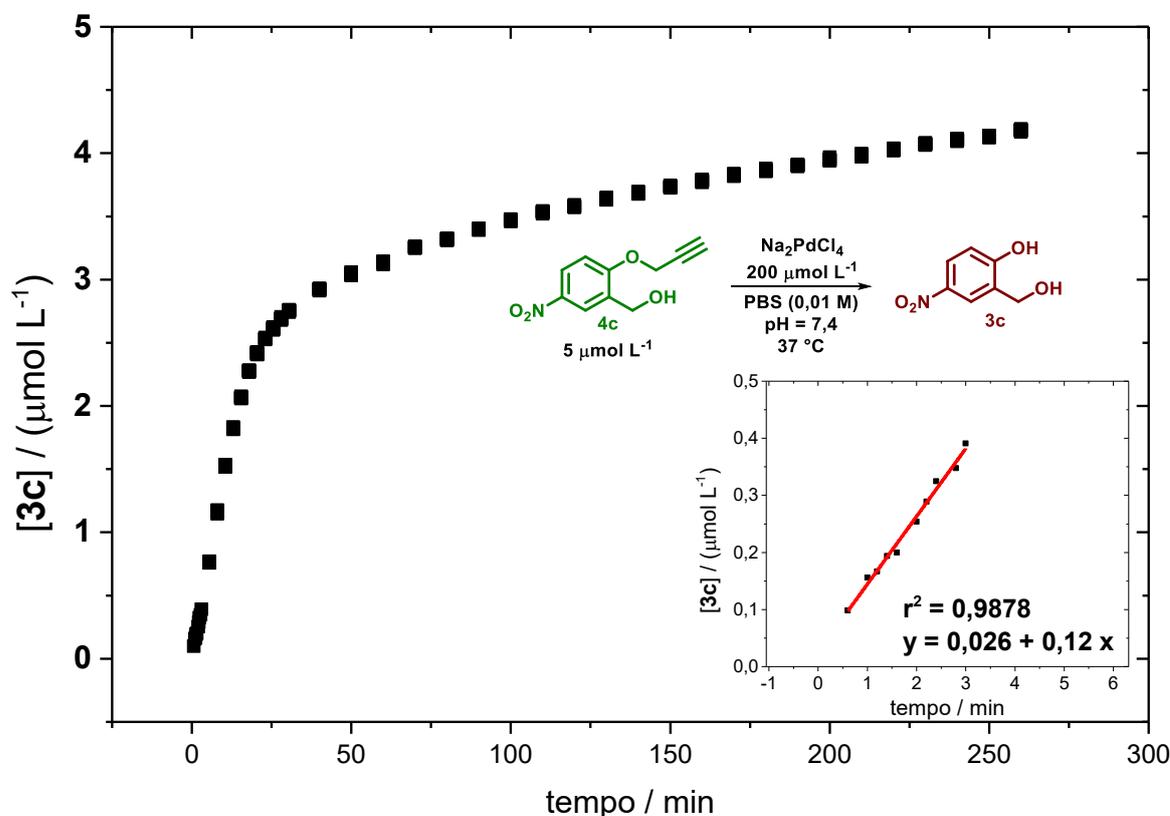
Obteve-se as velocidades iniciais ($v_{inicial}$) por meio do ajuste linear das curvas de perfil cinético até 10% de formação de produto (Equação 19 e Equação 20). Essa abordagem é possível devido, a concentração de produto ([P]) ser aproximadamente 0 e os valores de [A] e de [B] serem aproximadamente o valor da concentração inicial de cada espécie, isto é, [A]_o e [B]_o, respectivamente. Assim, aferiu-se os valores de $v_{inicial}$ pela inclinação da reta obtida, e construiu-se os gráficos previstos na Equação 18.

$$v = + \frac{d[\mathbf{P}]}{dt} = - \frac{d[\mathbf{A}]}{dt} = k[\mathbf{B}]^y[\mathbf{A}]^x \quad \text{Equação 19}$$

$$v_{inicial} = k[\mathbf{B}]_o^y[\mathbf{A}]_o^x \quad \text{Equação 20}$$

A partir da curva de calibração (Apêndice C) de **3c**, os experimentos de variação de substrato e de paládio foram realizados em pH 7,4 à 37 °C. Na Figura 42, temos a reação entre 5 μmol L⁻¹ de **4c** e 200 μmol L⁻¹ de Na₂PdCl₄, e os parâmetros de r² e de $v_{inicial}$ em destaque. As reações com diferentes concentrações de **4c** e de Na₂PdCl₄ encontram-se no Apêndice B, a compilação dos dados obtidos em todas as reações similares ao da Figura 42 encontram-se na Quadro 4.

Figura 42 – Perfil de concentração obtida com $[3c] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$, 10 % v/v DMSO, T = 37 °C.



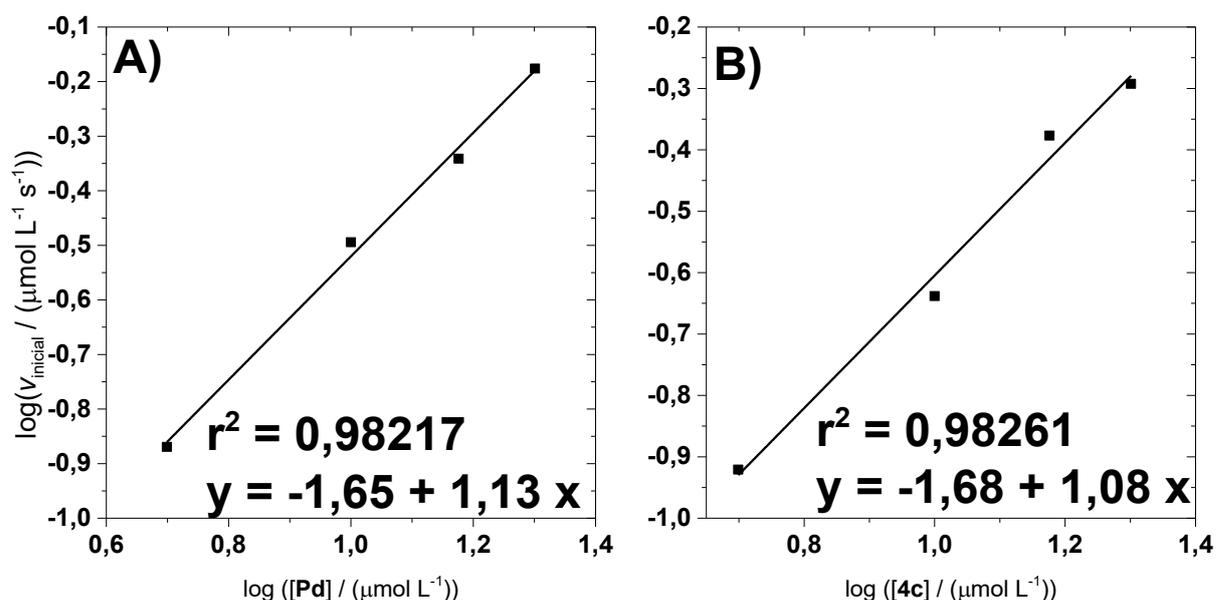
Quadro 4 – Velocidades iniciais obtidas para a reação de O-despropargilação de **4c** com Na_2PdCl_4 e constantes de velocidades (k) calculadas a partir da Equação 17. Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e 37 °C.

$[\text{Pd}] / (\mu\text{mol L}^{-1})$	5	10	15	20
$[\text{4c}] / (\mu\text{mol L}^{-1})$	200			
$v_{\text{inicial}} / \mu\text{mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,14	0,32	0,46	0,67
$[\text{Pd}] / (\mu\text{mol L}^{-1})$	200			
$[\text{4c}] / (\mu\text{mol L}^{-1})$	5	10	15	20
$v_{\text{inicial}} / \mu\text{mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,12	0,23	0,42	0,51

A partir dos dados apresentados na Quadro 4, aplicou-se o logaritmo às concentrações das espécies e as velocidades iniciais e construiu-se os gráficos

ilustrados na Figura 43. Por meio da Equação 18, obteve-se as ordens da reação iguais a 1,08 e 1,13 para os reagentes **4c** e **Pd**, respectivamente. Os resultados obtidos experimentalmente sugerem que a ordem total da reação seja igual a 2, sendo de primeira ordem em **[Pd]** e em **[4c]**.

Figura 43 – Interdependência do logaritmo da v_{inicial} com o logaritmo da concentração de (A) **Pd** e de (B) **4c**. Condições gerais: 0,01 mol L⁻¹ de PBS, pH = 7,4, 10 % v/v DMSO e 37 °C.



Além disso, é possível estimar a constante de velocidade da reação de segunda ordem (k , $v = k[\text{Pd}]^1[\text{4c}]^1$). Considerando as ordens de reação, calculou-se os valores de k , conforme as Equações 21 e 22, e obteve-se 110 M⁻¹ s⁻¹ e 104 M⁻¹ s⁻¹.

$$-1,65 = \log(k[\text{4c}]^1) \rightarrow 0,022 = k * 200 \rightarrow k = 1,83 \times 10^{-4} \text{ L s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ ou } 1,83 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Equação 21

$$-1,68 = \log(k[\text{Pd}]^1) \rightarrow 0,021 = k * 200 \rightarrow k = 1,75 \times 10^{-4} \text{ L s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ ou } 1,75 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Equação 22

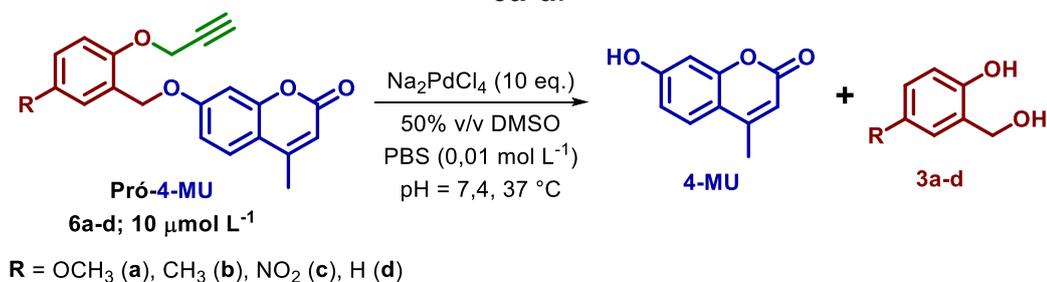
Segundo Bird e coautores (2021), valores de k de segunda ordem acima de 1 L mol⁻¹ s⁻¹ indicam que as reações são velozes suficientes para serem conduzidos em meio biológicos complexos e sob baixas concentrações. Assim, para a reação de O-despropargilação mediada por paládio do substrato **4c** o valor de k de segunda ordem

obtido foi de $1,79 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que corresponde a um maior àquele sugerido, satisfazendo a condição inicial para ser uma reação bio-ortogonal

5.3.2 Reação de liberação dos protótipos 6a-d

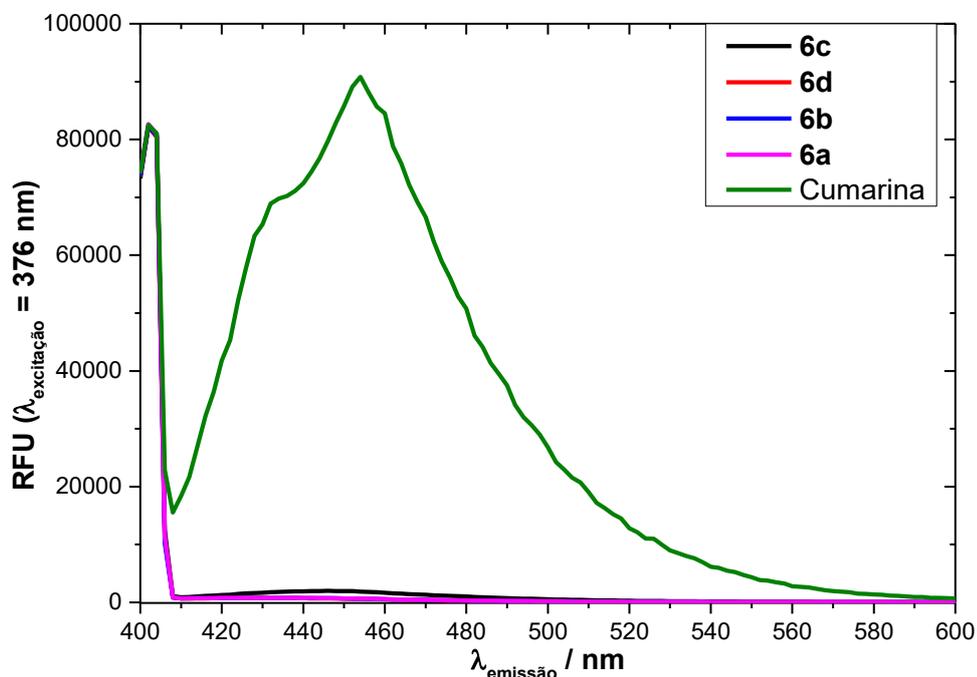
A fluorimetria é uma técnica espectroscópica de alta sensibilidade e seletividade, sendo muito útil para imageamento celular e acompanhamento de reações químicas. Algumas vantagens dessa técnica em relação a espectroscopia de absorção na região do UV-vis, é a detecção de espécies sob concentrações 100 vezes menores, e o menor número de espécies capazes de serem fluorescentes, tornando a técnica mais seletiva. No entanto, há algumas desvantagens da técnica, como a supressão de fluorescência de uma espécie por interações de outras moléculas em solução e por auto filtragem. Dito isso, o acompanhamento das reações de liberação da cumarina livre (produto da reação, **4-MU**, Figura 44), o perfil de concentração em função do tempo e os parâmetros cinéticos das reações foram obtidas por meio da fluorescência do produto da reação.

Figura 44 – Esquema geral da reação de liberação da **4-MU** a partir dos substratos **6a-d**.



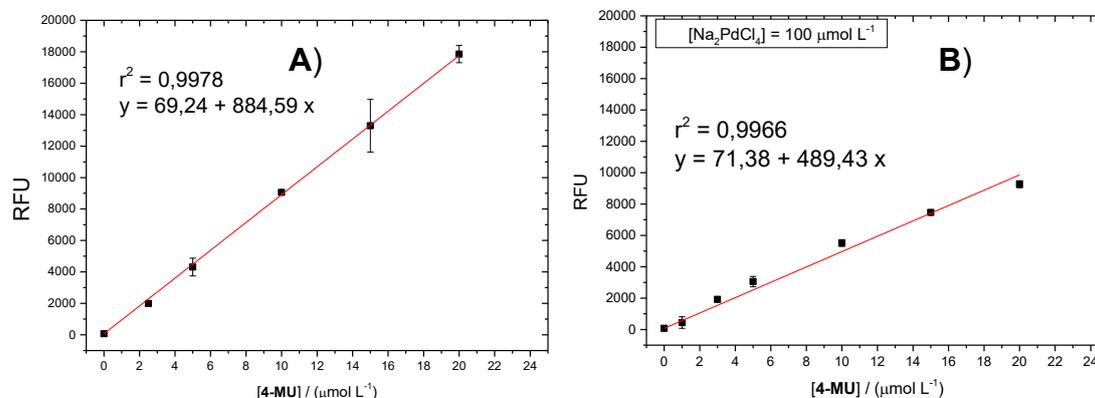
Antes do estudo cinético, os perfis de emissão em um comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{excitação}}$) das *O*-cumarinas foram obtidas, conforme ilustrado na Figura 45. Observou-se que os substratos da reação não apresentaram fluorescência quando o $\lambda_{\text{excitação}}$ foi fixado em 376 nm. Por outro lado, a **4-MU** livre apresentou uma banda de emissão forte em toda a faixa analisada, indicando não haver sobreposição de emissão de fluorescência dos reagentes com o produto. Logo, os acompanhamentos cinéticos das reações de liberação do produto **4-MU** foram realizados por meio do incremento da intensidade de fluorescência.

Figura 45 – Espectros sobrepostos de emissão de fluorescência dos compostos **6a-d** e da **4-MU**, $\lambda_{\text{excitação}} = 376 \text{ nm}$. Condições gerais: $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ das cumarinas, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.



A quantificação de produto em solução se deu a partir de uma curva de calibração previamente construída, utilizando a faixa de 0 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de **4-MU**, sem (Figura 46A) e com o Na_2PdCl_4 (Figura 46B). Nessa faixa de concentração há uma linearidade aceitável entre a intensidade de fluorescência (abreviado no gráfico como unidades de fluorescência relativo, RFU) de **4-MU**, enquanto para concentrações acima de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ perde-se a linearidade devido o processo de auto filtragem de **4-MU** (Apêndice C). Além disso, observou-se uma diminuição na inclinação da curva de calibração da **4-MU** com Na_2PdCl_4 (489,43) em comparação com Na_2PdCl_4 (884,59), sugerindo que há interações entre as espécies de paládio e de **4-MU** que suprimem a emissão de fluorescência do produto. Logo, para os fins de acompanhamento de formação de produto, foi empregada a curva de calibração obtida na Figura 46B, para todos os perfis de concentração de **4-MU** liberada em solução, devido a maior semelhança com as condições experimentais da reação química, expressa na Figura 44.

Figura 46 – Curvas de calibração utilizando concentrações entre 0 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de **4-MU** (A) sem Na_2PdCl_4 e (B) com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Na_2PdCl_4 . Condições gerais: 0,01 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.



Visando o estudo de uma reação de pseudo-primeira ordem, com o objetivo de simplificar a lei de velocidade, o uso de um grande excesso de Na_2PdCl_4 (10 equivalentes) permite que a lei de velocidade da Equação 14 seja resumida na Equação 23, onde $k_{\text{obs}} = k[\text{Na}_2\text{PdCl}_4]$, $[\text{Subst}]_t$ = concentração do substrato no tempo t , e $[\text{Subst}]_o$ = concentração inicial de substrato.

$$v = k[\text{Subst}][\text{Na}_2\text{PdCl}_4] \rightarrow v = k_{\text{obs}}[\text{Subst}] \rightarrow [\text{Subst}]_t = [\text{Subst}]_o e^{-k_{\text{obs}}t}$$

Equação 23

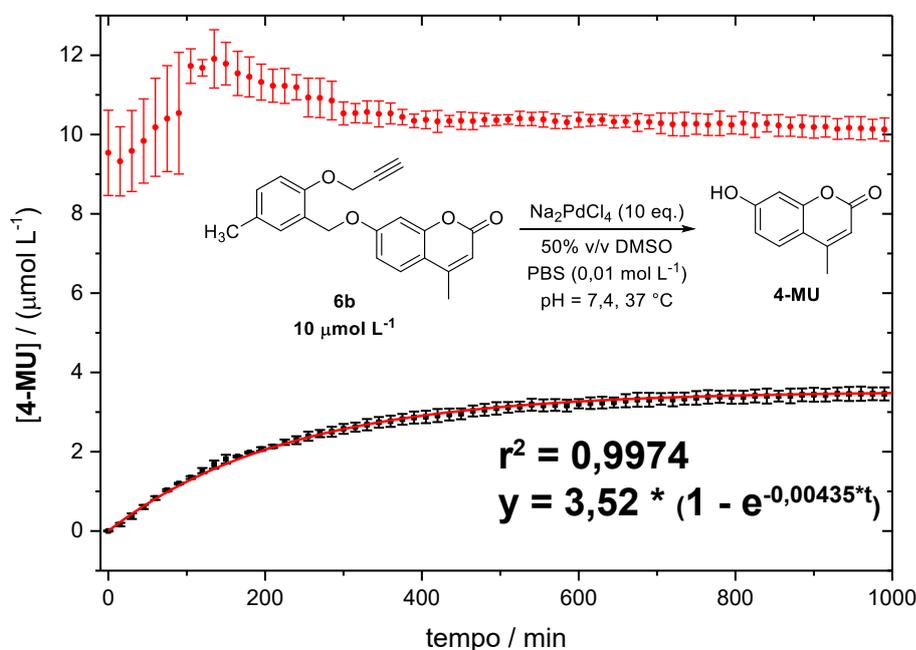
Como o acompanhamento da reação será via formação de **4-MU**, temos que $[\text{Subst}]_o = [\text{Subst}]_t + [\text{4-MU}]$ para uma reação com 100% de conversão à produto, substituindo na equação acima e reorganizando, conclui-se que:

$$[\text{4-MU}] = [\text{Subst}]_o * (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})$$

Equação 24

Por meio do ajuste não linear prevista pela Equação 24 das concentrações de **4-MU** em função do tempo, foram obtidos os valores de k_{obs} . A Figura 47 ilustra o perfil cinético obtido experimentalmente e os parâmetros de k_{obs} , r^2 e $[\text{Subst}]_o$ para o substrato **6b**, que melhor ajustou a curva cinética. Enquanto as outras reações com diferentes substituintes aromáticos encontram-se no Apêndice B, e a compilação dos dados obtidos em todas as reações similares ao da Figura 47 no Quadro 5.

Figura 47 – Perfil de concentração da (■) reação de liberação de **4-MU** em função do tempo, sendo [**6b**] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [Na_2PdCl_4] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e de (●) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de **4-MU** com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Na_2PdCl_4 . Condições gerais: 0,01 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.



Quadro 5 - Constantes observadas de primeira ordem (k_{obs}) obtidas pelas regressões não lineares para a reação liberação de **4-MU**, referentes à formação de produto, para diferentes substituintes aromáticos (R). Condições gerais: 0,01 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C, [**6a-d**] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [Na_2PdCl_4] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

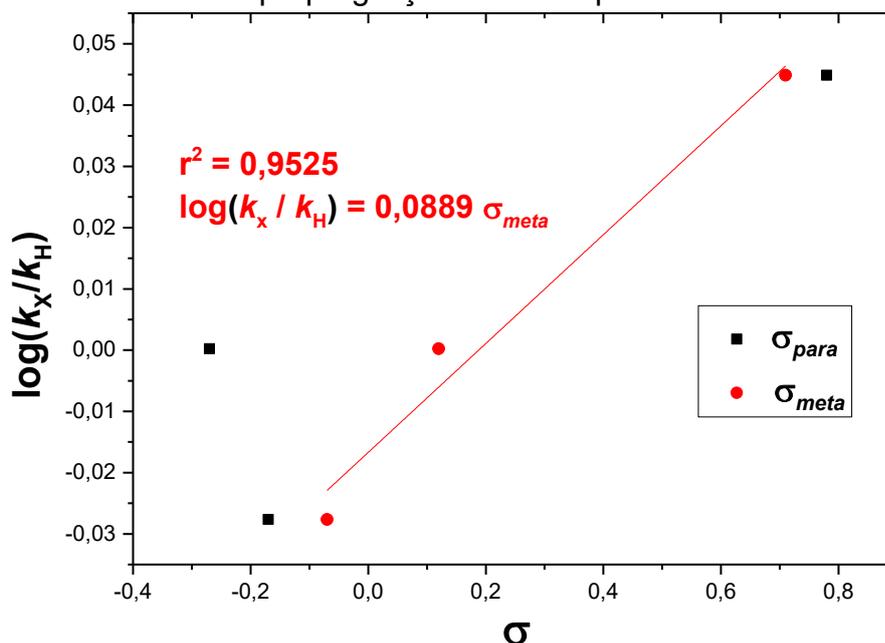
Substrato	6b	6c	6a	6d
R =	Me	NO₂	OMe	H
$k_{\text{obs}} / (\text{min}^{-1})$	0,00435	0,00579	0,00478	0,00476
r^2	0,9974	0,9966	0,9947	0,9951
$[\text{Subst}]_0 / (\mu\text{mol L}^{-1})$	3,52	4,96	5,48	9,15

Na Quadro 5 observa-se que somente a reação contendo o substrato **6d** teve a conversão total em produto, enquanto as demais reações tiveram valores próximos e abaixo de 50%. Esses resultados indicam que há acúmulos de intermediários formados em solução, a partir dos substituintes aromáticos diferentes do hidrogênio.

Para o entendimento dos efeitos eletrônicos nesta reação, os valores de k_{obs} apresentados na Quadro 5 foram normalizados em função de $k_{\text{obs,H}}$, e plotados na equação de Hammett, conforme ilustrado na Figura 48. Não observou-se linearidade

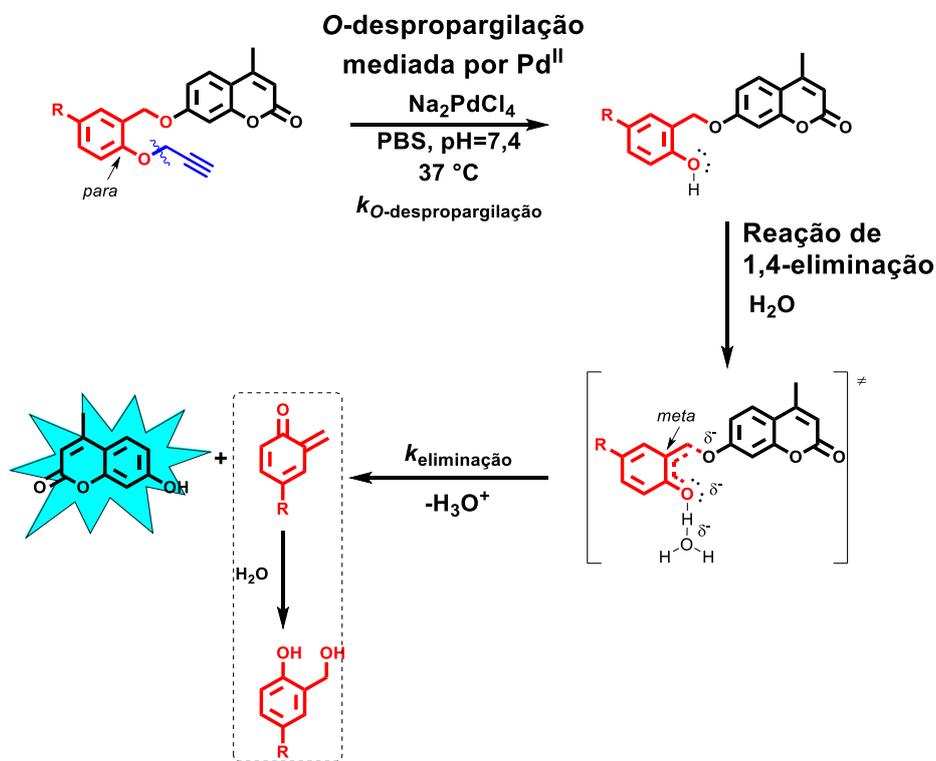
entre os valores normalizados e as constantes do substituinte na posição *para* (σ_{para}). Por outro lado, quando os valores de σ_{meta} , referentes as constantes do substituinte na posição *meta*, foram empregados, há uma correlação entre os valores normalizados ($r^2 = 0,9525$) com valor de inclinação (ou constante de reação) positiva ($\rho = 0,0889 > 0$).

Figura 48 – Linearização dos gráficos $\log\left(\frac{k_{obs,X}}{k_{obs,H}}\right)$ versus σ_{para} e σ_{meta} da reação de O-despropargilação mediada por Pd.



Uma relação linear com os valores de σ_{meta} sugerem que, entre os efeitos eletrônicos observáveis, o efeito indutivo é o predominante, e que sua influência é na posição *meta* em relação ao substituinte aromático. Na Figura 49 observa-se as estruturas e o mecanismo de reação sugerida. A partir dessa análise pode-se concluir que, a linearidade é observada para a posição *meta*, e a liberação de **4-MU** ocorre via quebra da ligação C-O na posição *meta* em relação aos substituintes aromáticos, essas observações corroboram com a hipótese de que a etapa determinante da reação é a de eliminação 1,4 do espaçador autoimolativos.

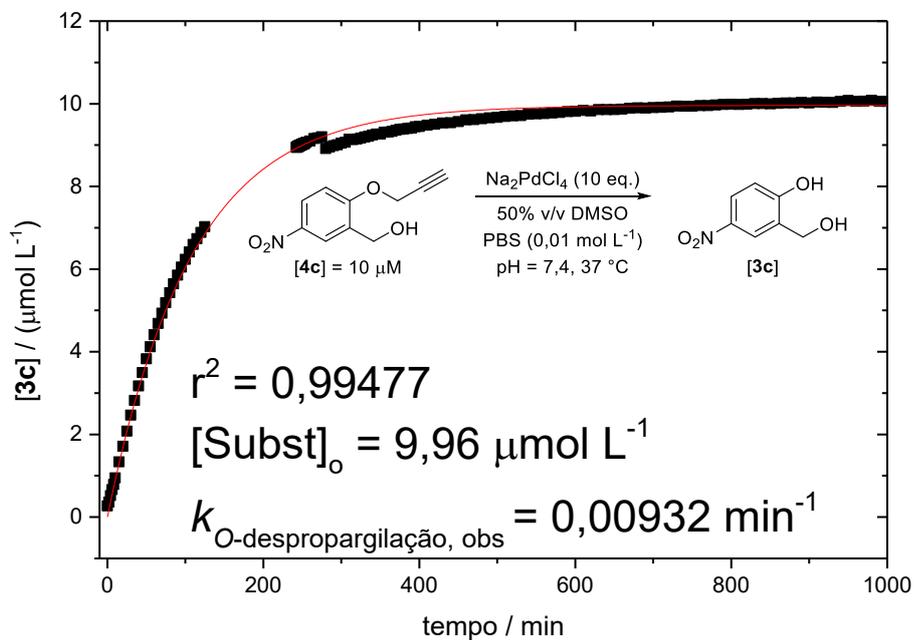
Figura 49 – Esquema geral da reação de liberação da **4-MU**, por meio das reações de *O*-despropargilação mediada por Pd^{II} e de eliminação 1,4



Dessa forma, se a etapa determinante é a reação de eliminação 1,4, então a constante da reação de *O*-despropargilação ($k_{O\text{-despropargilação}}$) é maior que a da etapa determinante ($k_{\text{eliminação}}$). Para testar essa hipótese, obteve-se o perfil de concentração da reação de *O*-despropargilação mediada por Pd^{II} (Figura 50)** para o substrato **4c** e nas mesmas condições da reação de liberação da **4-MU**. O fato do valor obtido de $k_{O\text{-despropargilação}}$ (0,00932 min⁻¹) ser maior que o da reação de liberação da **4-MU** com o mesmo substituinte aromático (Substrato **6c**, $k_{\text{obs}} = 0,00579$ min⁻¹) e a conversão à produto ser 100%, corrobora com a hipótese de que a reação de eliminação 1,4 é a etapa determinante e que existe a acumulação de intermediários na reação de eliminação 1,4.

** Curva de calibração de **3c** em 50% DMSO se encontra no Apêndice C.

Figura 50 - Perfil de concentração de **3c** da reação de O-despropargilação mediada por Pd^{II} em função do tempo, sendo **[3c]** = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e **[Na₂PdCl₄]** = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: 0,01 mol L⁻¹ PBS (pH = 7,4), 50 % v/v DMSO, T = 37 °C.



6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foram sintetizados com sucesso uma série de substratos contendo substituintes aromáticos distintos, utilizando diferentes reações previstas na literatura e foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e de ^{13}C . Esses substratos possibilitaram o estudo cinético das reações de *O*-despropargilação ou de liberação de espécies fluoróforo dos substratos **4a-d** e das Pró-**4-MU**, respectivamente.

Foram relatados com ineditismo os valores de pK_a de compostos fenólicos contendo substituintes nitro, metoxi e metil com o substituinte hidroximetil, por meio do acompanhamento da banda de absorção na região do UV-vis da base conjugada. Esses valores demonstraram a maior sensibilidade da reação de dissociação ácida e a maior estabilidade da base conjugada através de ligações de hidrogênio com o substituinte hidroximetil na posição *orto* em comparação com compostos fenólicos sem o substituinte, evidenciado pela inclinação da reta obtida por meio do plot de Hammett.

Para os substratos éter propargilbenzílicos **4a-d**, foram obtidos fortes indícios em relação ao mecanismo da reação, para o substrato contendo o substituinte nitro (**4c**). A ordem da reação, determinada experimentalmente, foi próxima a 2, o que sugere que uma molécula de **4c** esteja complexada a uma molécula de **Pd** na etapa determinante da reação.

Além disso, as pró-**4-MU** obtidas são substratos inéditos na literatura e foram utilizados para o estudo dos efeitos eletrônicos na reação de liberação da **4-MU**. Os estudos cinéticos por fluorescência dos substratos pró-**4-MU** e por RMN de ^1H dos substratos **4a-d** sugerem que a estabilização do grupo de saída de cada etapa aumenta a velocidade da reação. Em outras palavras, a carga parcial negativa formada no estado de transição é estabilizada por substituintes que retiram elétrons. No entanto, os valores obtidos de ρ foram inferiores que 1, indicando que as reações são robustas em relação ao efeito dos substituintes aromáticos no espaçador autoimolativos.

Por fim, essas descobertas ajudarão no projeto e controle da reatividade de novos substratos para a reação de *O*-despropargilação mediada por Pd. Esses substratos podem servir como modelos para o desenvolvimento de novos

catalisadores e/ou complexos de Pd. Portanto, a compreensão desses sistemas contribuirá para o avanço das reações bio-ortogonais.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. Nanomedicine as potential cancer therapy via targeting dysregulated transcription factors. **Seminars in Cancer Biology**, v. 89, p. 38–60, 1 fev. 2023.
- ALOUANE, A. et al. Light Activation for the Versatile and Accurate Kinetic Analysis of Disassembly of Self-Immolative Spacers. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 35, p. 11717–11724, 2013.
- ALOUANE, A. et al. Disassembly Kinetics of Quinone-Methide-Based Self-Immolative Spacers that Contain Aromatic Nitrogen Heterocycles. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 9, n. 5, p. 1334–1340, 2014.
- ALOUANE, A. et al. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure–Property Relationships, and Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 26, p. 7492–7509, 2015.
- ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**. 2005^a edição ed. Sausalito, CA: University Science Books, 2007.
- ARENZ, C.; GIANNIS, A. Synthesis of the First Selective Irreversible Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 1, p. 137–140, 2001.
- ASSOAH, B. et al. Lewis Base Catalyzed Intramolecular Reduction of Salicylaldehydes by Pinacol-Derived Chlorohydrosilane. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2018, n. 23, p. 2910–2917, 2018.
- BARANY, G.; MERRIFIELD, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 22, p. 7363–7365, 1 out. 1977.
- BEUTICK, S. E.; VERMEEREN, P.; HAMLIN, T. A. The 1,3-Dipolar Cycloaddition: From Conception to Quantum Chemical Design. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 17, n. 17, p. e202200553, 2022.
- BIRD, R. E. et al. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2457–2479, 15 dez. 2021.
- BRAGATO, M.; RUDORFF, G. F. VON; LILIENFELD, O. A. VON. Data enhanced Hammett-equation: reaction barriers in chemical space. **Chemical Science**, v. 11, n. 43, p. 11859–11868, 11 nov. 2020.
- CARDINEAU, B. et al. **Tightly bound ligands for hafnium nanoparticle EUV resists**. Extreme Ultraviolet (EUV) Lithography III. **Anais... Em: EXTREME ULTRAVIOLET (EUV) LITHOGRAPHY III**. SPIE, 22 mar. 2012. Disponível em: <<https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/8322/83220V/Tightly-bound-ligands-for-hafnium-nanoparticle-EUV-resists/10.1117/12.917014.full>>. Acesso em: 16 abr. 2023

CHANKESHWARA, S. V.; INDRIGO, E.; BRADLEY, M. Palladium-mediated chemistry in living cells. **Current Opinion in Chemical Biology**, In vivo chemistry • Mechanisms. v. 21, p. 128–135, 1 ago. 2014.

CHASTEEN, J. L. et al. Palladium responsive liposomes for triggered release of aqueous contents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 84, p. 129215, 15 mar. 2023.

CHEN, F. et al. Metal–Organic Frameworks as Versatile Platforms for Organometallic Chemistry. **Inorganics**, v. 9, n. 4, p. 27, abr. 2021.

CHINOY, Z. S.; FRISCOURT, F. Expanding the Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition Arsenal for a More Selective Bioorthogonal Labeling in Living Cells. **Israel Journal of Chemistry**, v. 63, n. 1–2, p. e202200055, 2023.

CHO, S. W. et al. Electronic Effects on the Depropargylation Process in the Reaction-based Fluorescent Detection of Palladium Species: Benzocoumarin-based Ratiometric Sensing Systems. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 42, n. 1, p. 135–139, 2021.

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, 6 jun. 2017.

COELHO, S. E. et al. Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 3792–3799, 3 maio 2019.

COLACOT, T. J.; LIPSHUTZ, B. H. Organometallics in Green Chemistry. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 964, p. 122313, 15 abr. 2022.

DAL FORNO, G. M. et al. Expanding Transition Metal-Mediated Bioorthogonal Decaging to Include C–C Bond Cleavage Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, p. jacs.3c01960, 3 maio 2023.

D'ALTERIO, M. C. et al. Mechanistic Aspects of the Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction. **Chemistry – A European Journal**, v. 27, n. 54, p. 13481–13493, 2021.

DAS, A. et al. New palladium(II) and platinum(II) complexes with an ONS donor azo-thioether pincer ligand: synthesis, characterization, protein binding study and in vitro cytotoxicity. **New Journal of Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4931–4943, 6 mar. 2023.

DEB, T.; TU, J.; FRANZINI, R. M. Mechanisms and Substituent Effects of Metal-Free Bioorthogonal Reactions. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 12, p. 6850–6914, 23 jun. 2021.

DENG, Y. et al. A Membrane-Embedded Macromolecular Catalyst with Substrate Selectivity in Live Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 145, n. 2, p. 1262–1272, 18 jan. 2023.

DENISOV, M. S. Synthesis of 2-Heteroylidene Triterpenoids: Complex Formation with Palladium and in vitro Cytotoxic Activity. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 37–42, 1 jan. 2023.

DESTITO, P. et al. Transition Metal-Promoted Reactions in Aqueous Media and Biological Settings. **Chemistry – A European Journal**, v. 27, n. 15, p. 4789–4816, 2021.

DONG, D.-Q. et al. Recent advances in palladium-catalyzed reactions in water. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 40, p. 100778, 1 abr. 2023.

DONG, X. et al. Stimulus-responsive self-assembled prodrugs in cancer therapy. **Chemical Science**, v. 13, n. 15, p. 4239–4269, 13 abr. 2022.

DOS SANTOS, R. V. et al. Thermoresponsive Starch Hydrogel Stabilized Pd Nanoparticles: Soft Catalyst for the Preparation of (\pm)- α -Methylbiphenylalanine in Water Aiming at Bioorthogonal Chemistries. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 3, p. 844–852, 1 mar. 2021.

EDUPUGANTI, V. V. S. R.; TYNDALL, J. D. A.; GAMBLE, A. B. Self-immolative Linkers in Prodrugs and Antibody Drug Conjugates in Cancer Treatment. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 479–497, [s.d.].

FUGARD, A. J. et al. Organocatalytic Synthesis of Fused Bicyclic 2,3-Dihydro-1,3,4-oxadiazoles through an Intramolecular Cascade Cyclization. **Organic Letters**, v. 17, n. 23, p. 5824–5827, 4 dez. 2015.

FULMER, G. R. et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. **Organometallics**, v. 29, n. 9, p. 2176–2179, 10 maio 2010.

GAVRIEL, A. G. et al. Recent advances in self-immolative linkers and their applications in polymeric reporting systems. **Polymer Chemistry**, v. 13, n. 22, p. 3188–3269, 7 jun. 2022.

GRAJALES, E. J.; ALARCÓN, E. A.; VILLA, A. L. Kinetics of depolymerization of paraformaldehyde obtained by thermogravimetric analysis. **Thermochimica Acta**, v. 609, p. 49–60, 10 jun. 2015.

GRIMBLAT, N. et al. A theoretical study of the Duff reaction: insights into its selectivity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 44, p. 10496–10501, 8 nov. 2016.

GUO, M. et al. Rim-Differentiated C5-Symmetric Tiara-Pillar[5]arenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 1, p. 74–77, 10 jan. 2018.

HANG, H. C. et al. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 14846–14851, 9 dez. 2003.

HOFSLÖEKKEN, N. U.; SKATTEBOEL, L. ChemInform Abstract: Convenient Method for the ortho-Formylation of Phenols. **ChemInform**, v. 30, n. 29, 1999.

HOOP, M. et al. Mobile Magnetic Nanocatalysts for Bioorthogonal Targeted Cancer Therapy. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 25, p. 1705920, jun. 2018.

HU, A. et al. A Consequence of Dispersity on the Self-Assembly of Amphiphilic Homopolymers Containing Main-Chain Azobenzene. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 223, n. 12, p. 2100202, 2022.

JI, X. et al. Click and release: bioorthogonal approaches to “on-demand” activation of prodrugs. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 4, p. 1077–1094, 18 fev. 2019.

JIN, W. et al. Structure-activity of chlormethine fluorescent prodrugs: Witnessing the development of trackable drug delivery. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 480, p. 214999, 1 abr. 2023.

KODAMA, K. et al. Site-Specific Functionalization of Proteins by Organopalladium Reactions. **ChemBioChem**, v. 8, n. 2, p. 232–238, 2007.

KUFLEITNER, M.; HAIBER, L. M.; WITTMANN, V. Metabolic glycoengineering – exploring glycosylation with bioorthogonal chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 52, n. 2, p. 510–535, 25 jan. 2023.

LAMPMAN, G. M.; PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S. **Introdução à Espectroscopia**. 1ª edição ed. [s.l.] Cengage CTP, 2010.

LATOCHESKI, E. et al. Mechanistic insights into transition metal-mediated bioorthogonal uncaging reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 21, p. 7710–7729, 2 nov. 2020.

LEARTE-AYMAMÍ, S. et al. Intracellular Reactions Promoted by Bis(histidine) Miniproteins Stapled Using Palladium(II) Complexes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 59, n. 23, p. 9149–9154, 2020.

LI, B. et al. A bioorthogonal nanosystem for imaging and in vivo tumor inhibition. **Biomaterials**, v. 138, p. 57–68, 1 set. 2017.

LI, H.-J. et al. Water-promoted ortho-selective monohydroxymethylation of phenols in the NaBO₂ system. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 3100–3107, 16 abr. 2014.

LI, N. et al. A Genetically Encoded Alkyne Directs Palladium-Mediated Protein Labeling on Live Mammalian Cell Surface. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 379–384, 20 fev. 2015.

LIN, J.; YANG, K.; NEW, E. J. Strategies for organelle targeting of fluorescent probes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 19, n. 43, p. 9339–9357, 10 nov. 2021.

LUO, J. et al. Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(ethylene glycol) resins and their use in solid-phase synthesis and supported TEMPO catalysis. **Chemical Communications**, n. 21, p. 2136–2138, 22 maio 2007.

MANCUSO, F. et al. Transition-Metal-Mediated versus Tetrazine-Triggered Bioorthogonal Release Reactions: Direct Comparison and Combinations Thereof. **ChemPlusChem**, v. 85, n. 8, p. 1669–1675, ago. 2020.

MARTÍNEZ, C. H. R.; DARDONVILLE, C. Rapid Determination of Ionization Constants (pKa) by UV Spectroscopy Using 96-Well Microtiter Plates. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 142–145, 10 jan. 2013.

MARTÍNEZ, R. et al. Core-Shell Palladium/MOF Platforms as Diffusion-Controlled Nanoreactors in Living Cells and Tissue Models. **Cell Reports Physical Science**, v. 1, n. 6, p. 100076, 24 jun. 2020.

MEGHANI, N. M.; AMIN, H. H.; LEE, B. J. Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 11, p. 1604–1619, 1 nov. 2017.

MEI, W.-J. et al. Organometallic compounds of ruthenium and their application in chemotherapy. Em: PATMORE, N. J.; ELLIOTT, P. I. P. (Eds.). **Organometallic Chemistry: Volume 43**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2020. v. 43p. 0.

MILLER, M. A. et al. Nano-palladium is a cellular catalyst for in vivo chemistry. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15906, 12 jul. 2017.

MURZIN, D. YU. Kinetics of Heterogeneous Single-Site Catalysis. **ChemCatChem**, v. 15, n. 1, p. e202201082, 9 jan. 2023.

Neutrophil-Membrane-Directed Bioorthogonal Synthesis of Inflammation-Targeting Chiral Drugs. **Chem**, v. 6, n. 8, p. 2060–2072, 6 ago. 2020.

NGUYEN, S. S.; PRESCHER, J. A. Developing bioorthogonal probes to span a spectrum of reactivities. **Nature Reviews Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 476–489, set. 2020.

NIENHAUS, G. U. The Green Fluorescent Protein: A Key Tool to Study Chemical Processes in Living Cells. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 47, p. 8992–8994, 2008.

OLIVEIRA, B. L.; GUO, Z.; BERNARDES, G. J. L. Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 16, p. 4895–4950, 14 ago. 2017.

ORTIZ-BLANCO, E. et al. Revisiting Duff reaction: New experimental insights. **Results in Chemistry**, v. 5, p. 100932, 1 jan. 2023.

PATTERSON, D. M.; NAZAROVA, L. A.; PRESCHER, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 3, p. 592–605, 21 mar. 2014.

PÉREZ-LÓPEZ, A. M. et al. Dual-Bioorthogonal Catalysis by a Palladium Peptide Complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, 23 fev. 2023.

PERRIN, C. L. Linear or Nonlinear Least-Squares Analysis of Kinetic Data? **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 6, p. 669–672, 13 jun. 2017.

Perspectives About Self-Immolative Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 11, p. 3262–3281, 1 nov. 2020.

PORTE, K. et al. Bioorthogonal Reactions in Animals. **ChemBioChem**, v. 22, n. 1, p. 100–113, 2021.

RASMUSSEN, S. C. Transmetalation: a fundamental organometallic reaction critical to synthesis and catalysis. **ChemTexts**, v. 7, n. 1, p. 1, 18 nov. 2020.

RATSCH, F. et al. Enantioselective Cleavage of Cyclobutanols Through Ir-Catalyzed C–C Bond Activation: Mechanistic and Synthetic Aspects. **Chemistry – A European Journal**, v. 27, n. 14, p. 4640–4652, 2021.

RAUTIO, J. et al. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 8, p. 559–587, ago. 2018.

REBELEIN, J. G.; WARD, T. R. In vivo catalyzed new-to-nature reactions. **Current Opinion in Biotechnology**, Chemical Biotechnology • Pharmaceutical Biotechnology. v. 53, p. 106–114, 1 out. 2018.

RIDEOUT, D. et al. Synergism through direct covalent bonding between agents: A strategy for rational design of chemotherapeutic combinations. **Biopolymers**, v. 29, n. 1, p. 247–262, 1990.

ROMERO, M. J.; SADLER, P. J. Chirality in Organometallic Anticancer Complexes. Em: **Bioorganometallic Chemistry**. [s.l.: s.n.]. p. 85–116.

RONG, M. et al. Rational Utilization of Black Phosphorus Nanosheets to Enhance Palladium-Mediated Bioorthogonal Catalytic Activity for Activation of Therapeutics. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 62, n. 19, p. e202216822, 2023.

RUBIO-RUIZ, B.; WEISS, J. T.; UNCITI-BROCETA, A. Efficient Palladium-Triggered Release of Vorinostat from a Bioorthogonal Precursor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 9974–9980, 10 nov. 2016.

SABATINO, V.; UNNIKRISSHANNAN, V. B.; BERNARDES, G. J. L. Transition metal mediated bioorthogonal release. **Chem Catalysis**, v. 2, n. 1, p. 39–51, 20 jan. 2022.

SAMANTARAY, M. K. et al. Surface organometallic chemistry: A sustainable approach in modern catalysis. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 945, p. 121864, 15 jul. 2021.

SANCHO-ALBERO, M. et al. Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis. **Nature Catalysis**, v. 2, n. 10, p. 864–872, out. 2019.

SANG, D. et al. Anchimerically Assisted Cleavage of Aryl Methyl Ethers by Aluminum Chloride-Sodium Iodide in Acetonitrile. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 35, p. 10103–10107, 2018.

SANTRA, M. et al. Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein. **Chemical Communications**, v. 46, n. 22, p. 3964–3966, 14 jun. 2010.

SEOANE, A.; MASCAREÑAS, J. L. Exporting Homogeneous Transition Metal Catalysts to Biological Habitats. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2022, n. 32, p. e202200118, 26 ago. 2022.

SERRA, S. et al. A chemically encoded timer for dual molecular delivery at tailored ranges and concentrations. **Chemical Communications**, v. 54, n. 49, p. 6396–6399, 14 jun. 2018.

SHU, H. Y. et al. Transition Metal-mediated Uncaging Chemistry in Prodrug Design. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 24, p. 2205–2212, 2021.

SLETTEN, E. M.; 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.

SLETTEN, E. M.; BERTOZZI, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 9, p. 666–676, 20 set. 2011.

SMITH, M. B. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 7th ed. edição ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2013.

SONG, F.; GARNER, A. L.; 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. 12354–12355, 1 out. 2007.

STUMP, B. Click Bioconjugation: Modifying Proteins Using Click-Like Chemistry. **ChemBioChem**, v. 23, n. 16, p. e202200016, 17 ago. 2022.

TANNOURI, P. et al. A Photoresponsive Biomimetic Dry Adhesive Based on Doped PDMS Microstructures. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 15, p. 4330–4333, 12 ago. 2014.

TEVET, S. et al. Tuning the Reactivity of Micellar Nanoreactors by Precise Adjustments of the Amphiphile and Substrate Hydrophobicity. **Macromolecules**, v. 54, n. 24, p. 11419–11426, 28 dez. 2021.

The Nobel Prize in Chemistry 2022. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/>>. Acesso em: 11 maio. 2023.

TSUJI, J. The Basic Chemistry of Organopalladium Compounds. Em: **Palladium Reagents and Catalysts**. [s.l.: s.n.]. p. 1–26.

TU, J.; XU, M.; FRANZINI, R. M. Dissociative Bioorthogonal Reactions. **ChemBioChem**, v. 20, n. 13, p. 1615–1627, 2019.

UPADHYAY, A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 5, p. 655–661, 1 set. 2021.

VÍCHA, J. et al. Relativistic Heavy-Neighbor-Atom Effects on NMR Shifts: Concepts and Trends Across the Periodic Table. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 15, p. 7065–7103, 12 ago. 2020.

WANG, F. et al. Designed heterogeneous palladium catalysts for reversible light-controlled bioorthogonal catalysis in living cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 23 mar. 2018.

WANG, Q. et al. Recent Advancements on Self-Immolative System Based on Dynamic Covalent Bonds for Delivering Heterogeneous Payloads. **Advanced Healthcare Materials**, v. n/a, n. n/a, p. 2300138, 2023.

WANG, W. et al. In situ activation of therapeutics through bioorthogonal catalysis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, p. 113893, 1 set. 2021.

WEI, R. et al. Rapid Estimation of T_1 for Quantitative NMR. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 13, p. 9023–9029, 2 jul. 2021.

WEI, Y. et al. Tumor associated macrophages reprogrammed by targeted bifunctional bioorthogonal nanozymes for enhanced tumor immunotherapy. **Materials Today**, v. 56, p. 16–28, 1 jun. 2022.

WONG, C.-H.; ZIMMERMAN, S. C. Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. **Chemical Communications**, v. 49, n. 17, p. 1679–1695, 31 jan. 2013.

WU, C.-S.; CHENG, L. Recent Advances towards the Reversible Chemical Modification of Proteins. **ChemBioChem**, v. 24, n. 2, p. e202200468, 17 jan. 2023.

WU, D. et al. Metal-free bioorthogonal click chemistry in cancer theranostics. **Chemical Society Reviews**, v. 51, n. 4, p. 1336–1376, 21 fev. 2022.

XIAO, Y. et al. Self-immolative polymers in biomedicine. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 31, p. 6697–6709, 12 ago. 2020.

YADAV, V. K. **Steric and Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry**. Singapore: Springer, 2016.

YI, W. et al. Recent advances in developing active targeting and multi-functional drug delivery systems via bioorthogonal chemistry. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–25, 2 dez. 2022.

ZHANG, C.; HU, W.; MORKEN, J. P. α -Boryl Organometallic Reagents in Catalytic Asymmetric Synthesis. **ACS Catalysis**, v. 11, n. 16, p. 10660–10680, 20 ago. 2021.

ZHANG, L. et al. Immunogenic Cell Death Inducing Metal Complexes for Cancer Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 62, n. 21, p. e202300662, 2023.

ZHANG, M. et al. Highly practical and efficient preparation of aldehydes and ketones from aerobic oxidation of alcohols with an inorganic-ligand supported iodine catalyst. **Chemical Communications**, v. 54, n. 72, p. 10164–10167, 6 set. 2018.

ZHANG, Z.; FAN, K. Bioorthogonal nanozymes: an emerging strategy for disease therapy. **Nanoscale**, v. 15, n. 1, p. 41–62, 22 dez. 2022.

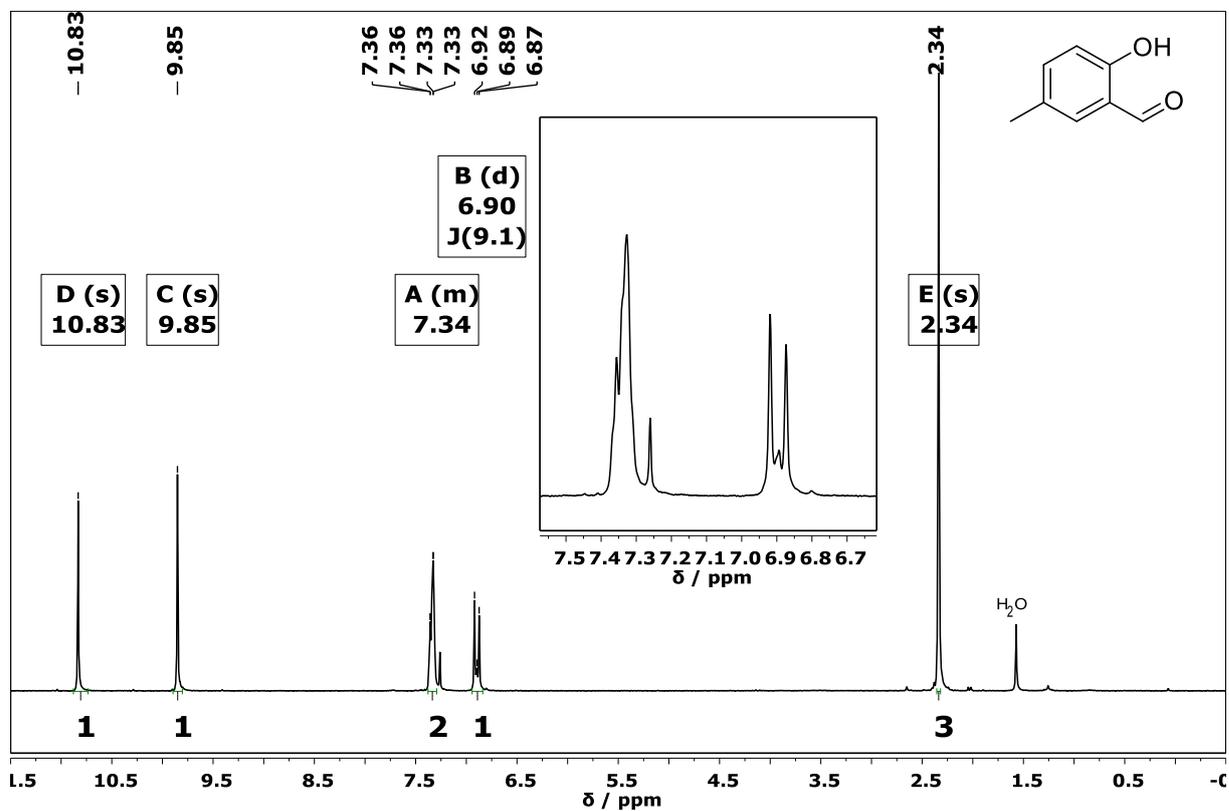
ZHAO, Y. et al. New Caged Coumarin Fluorophores with Extraordinary Uncaging Cross Sections Suitable for Biological Imaging Applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 14, p. 4653–4663, 1 abr. 2004.

ZHOU, Y. et al. A convenient method to reduce hydroxyl-substituted aromatic carboxylic acid with NaBH₄/Me₂SO₄/B(OMe)₃. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 20, p. 3260–3263, 12 maio 2008.

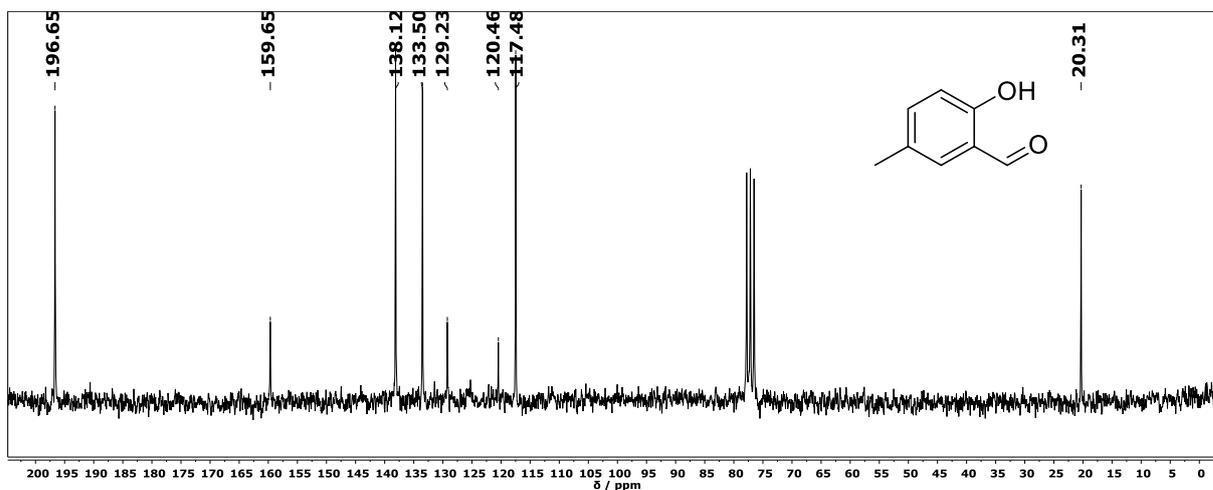
ZIANI-CHERIF, H.; IMACHI, K.; MATSUDA, T. Preparation of Aryldiazonium-, Aryldiazo-, and Arylazido-Derivatized Copolymers and Their Surface Photografting. **Macromolecules**, v. 32, n. 10, p. 3438–3447, 1 maio 1999.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ^1H E DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

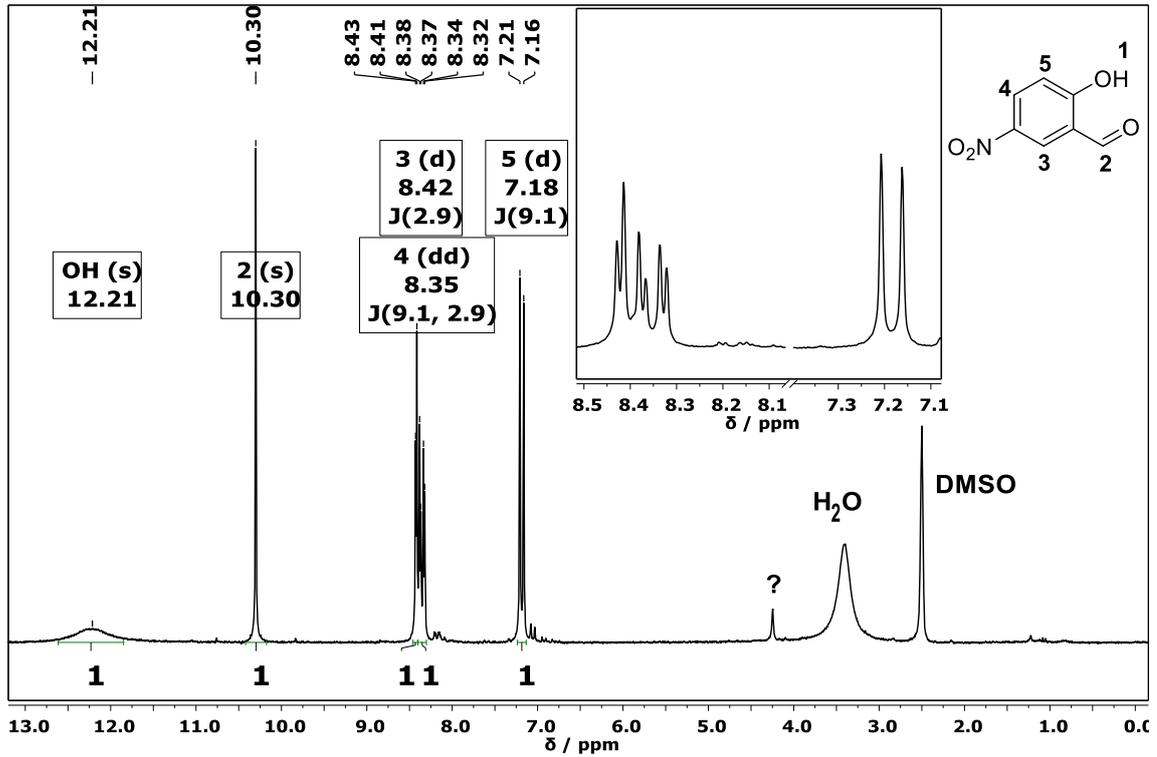
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-formil-1-hidroxi-4-metilbenzeno (**2b**) em CDCl_3 a 200 MHz.



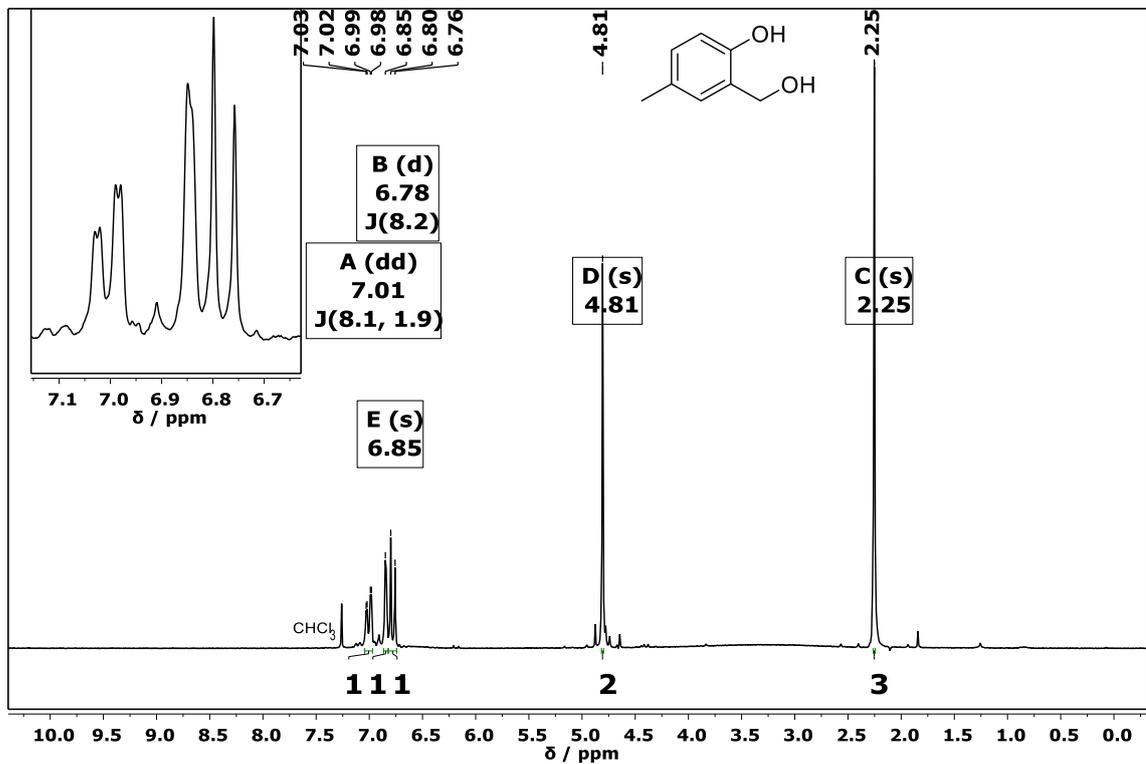
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-formil-1-hidroxi-4-metilbenzeno (**2b**) em CDCl_3 a 50 MHz.



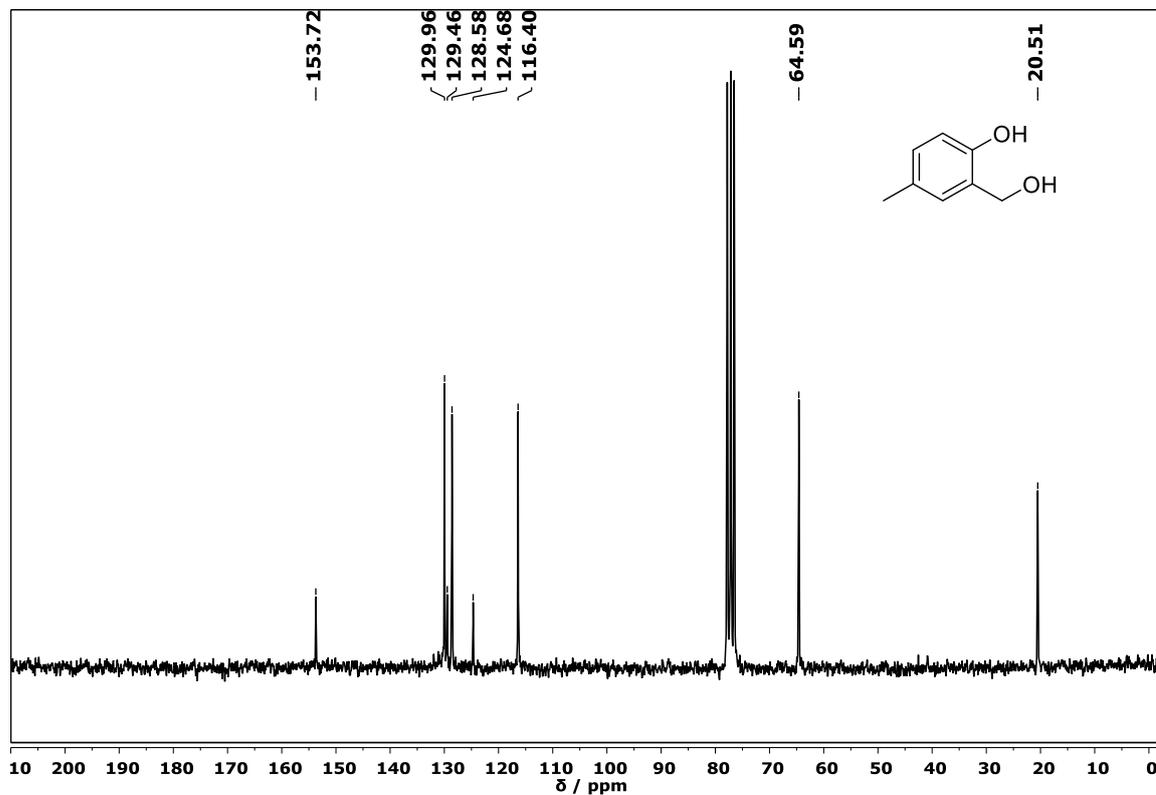
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-formil-1-hidroxi-4-nitrobenzeno (**2c**) em CDCl_3 a 200 MHz.



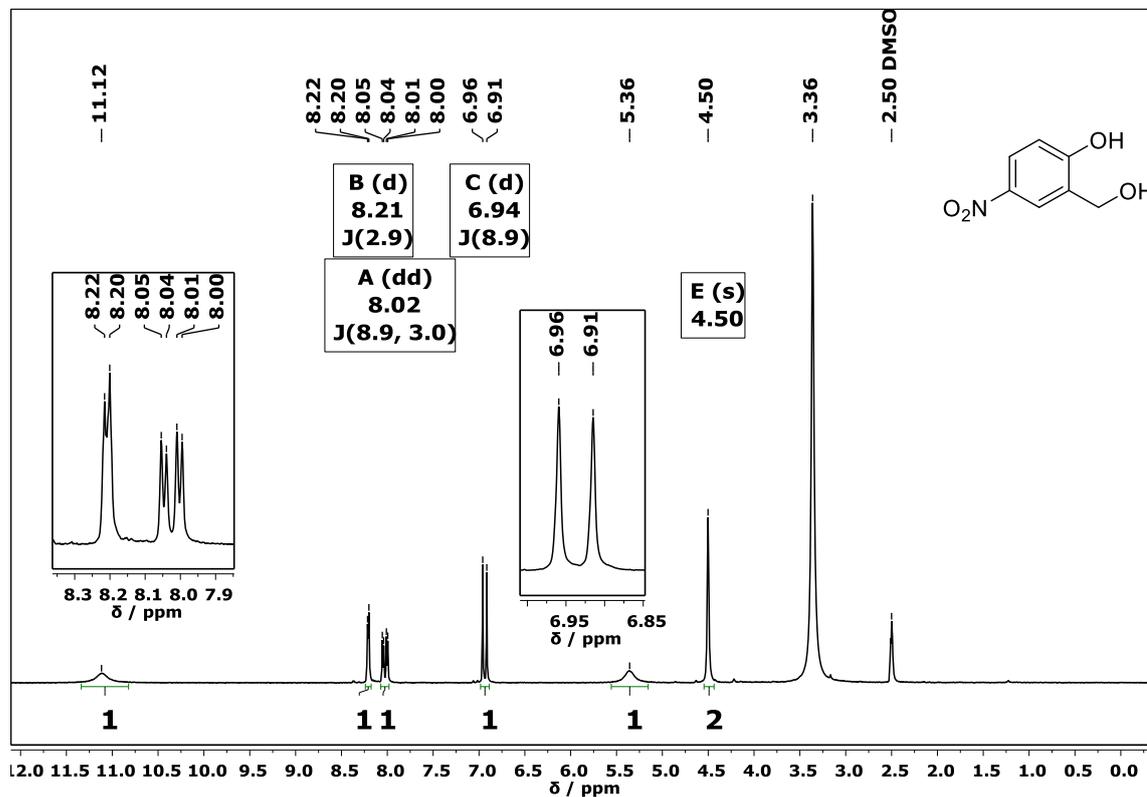
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-hidroxi-1-(hidroximetil)-4-metilbenzeno (**3b**) em CDCl_3 a 200 MHz.



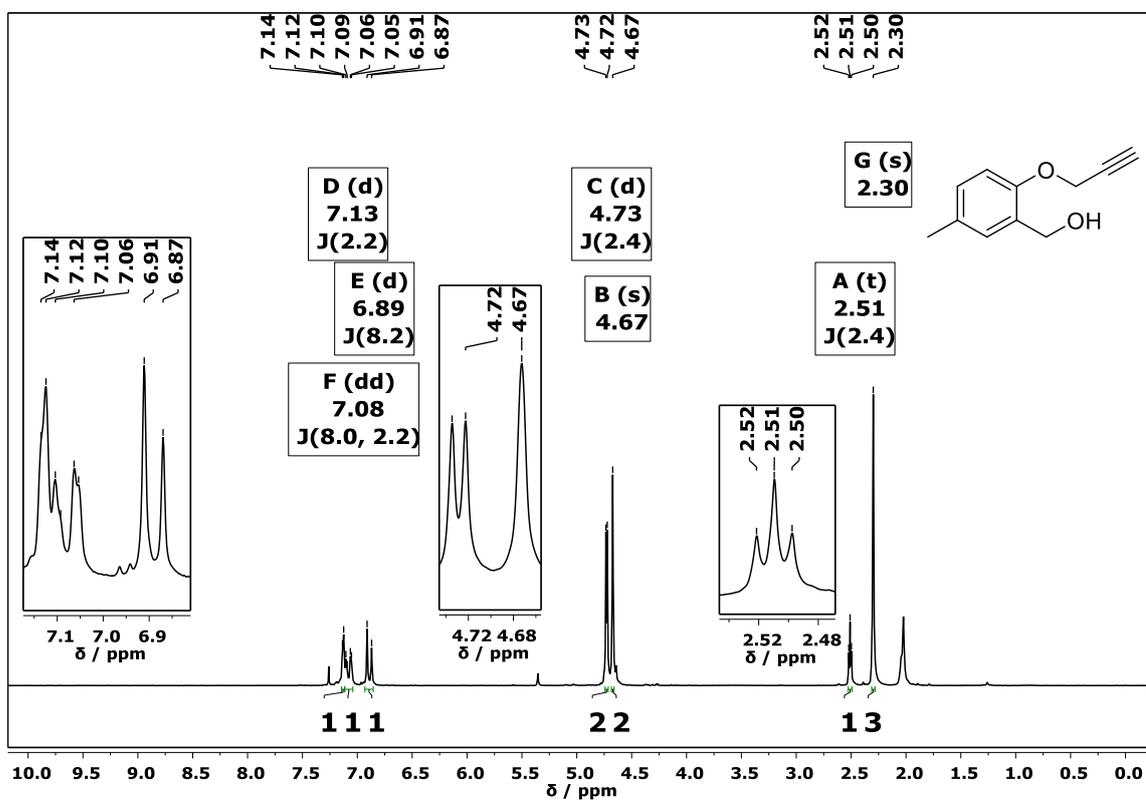
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-hidroxi-1-(hidroximetil)-4-metilbenzeno (**3b**) em CDCl_3 a 50 MHz.



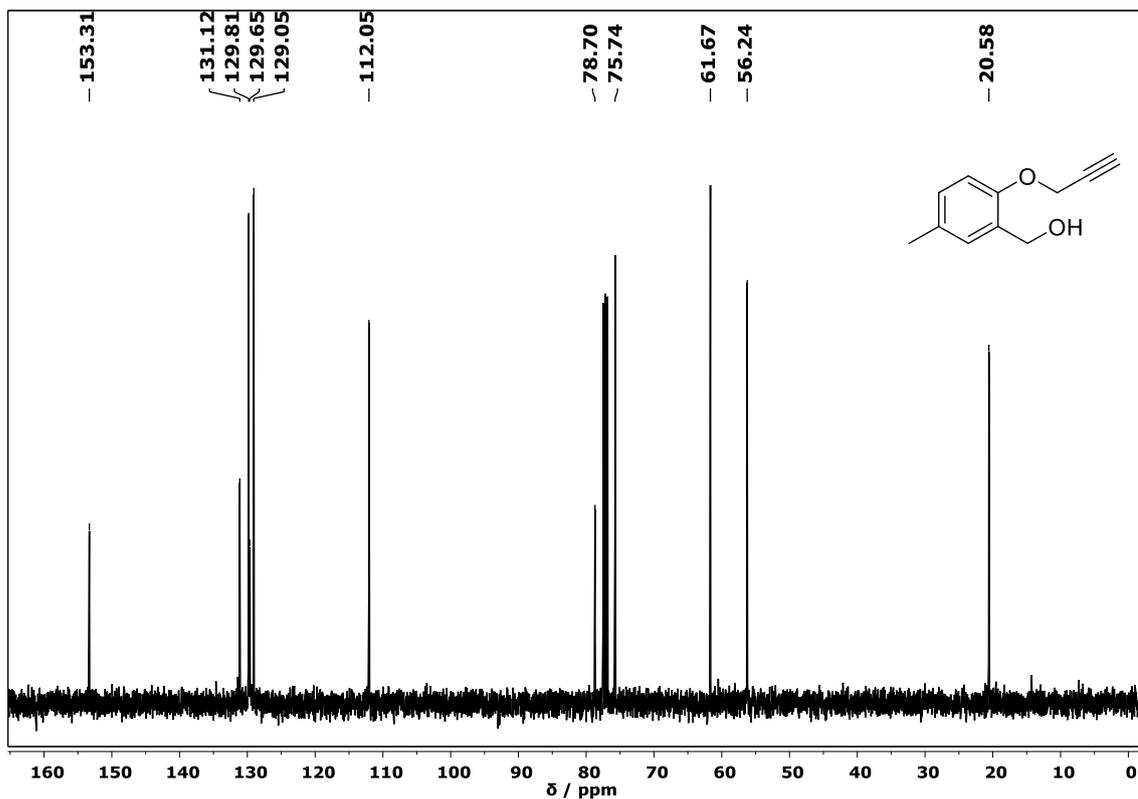
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-hidroxi-1-(hidroximetil)-4-nitrobenzeno (**3c**) em CDCl_3 a 50 MHz



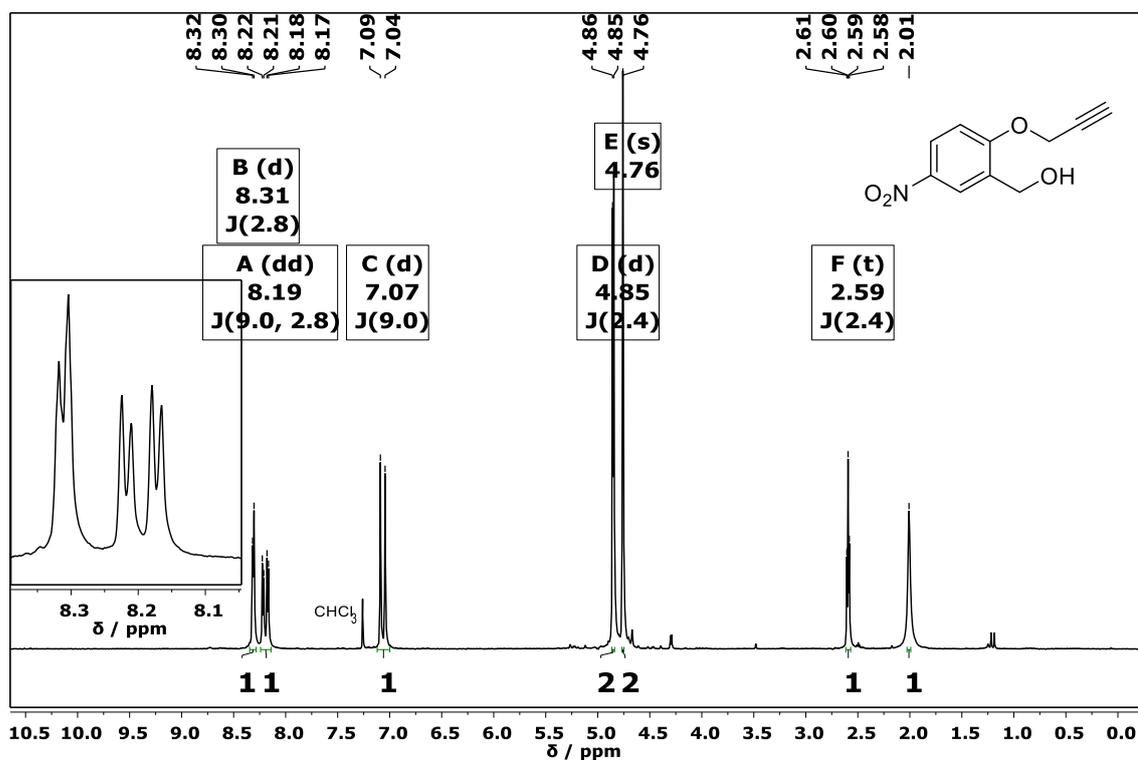
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-hidroximetil-5-metil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4b**) em CDCl_3 a 200 MHz.



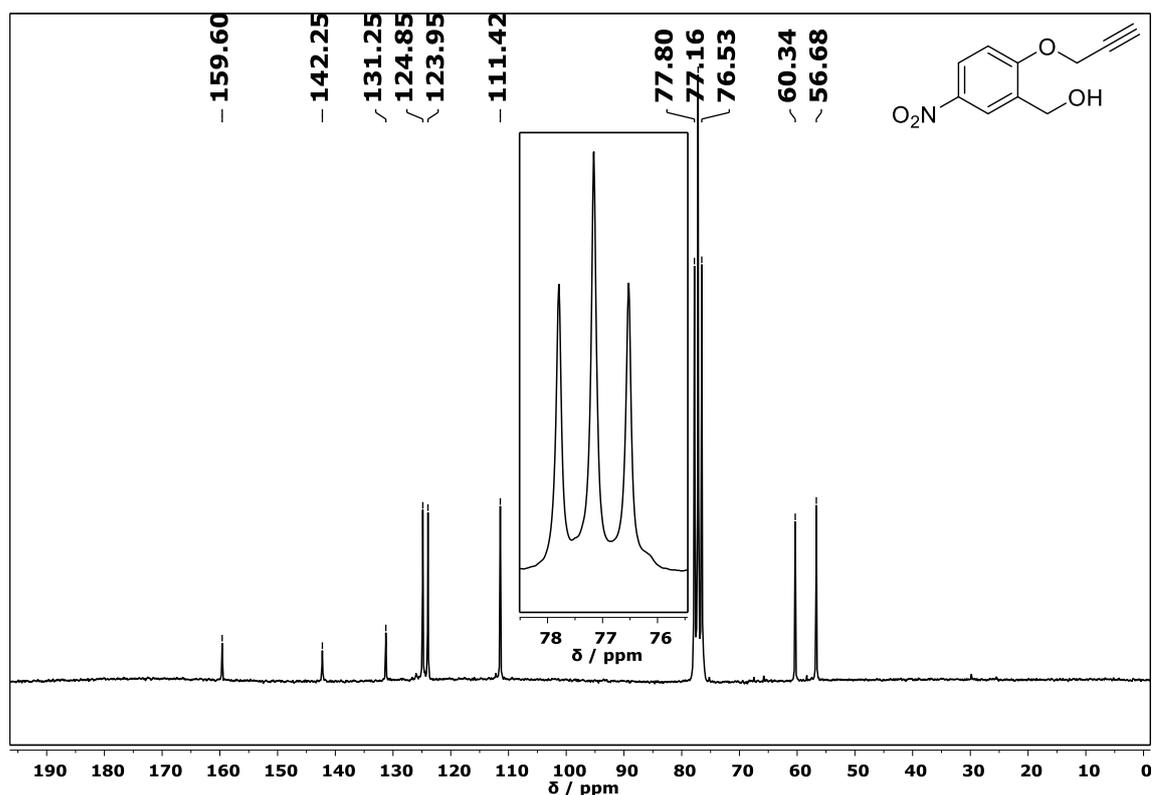
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-hidroximetil-4-metil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4b**) em CDCl_3 a 50 MHz.



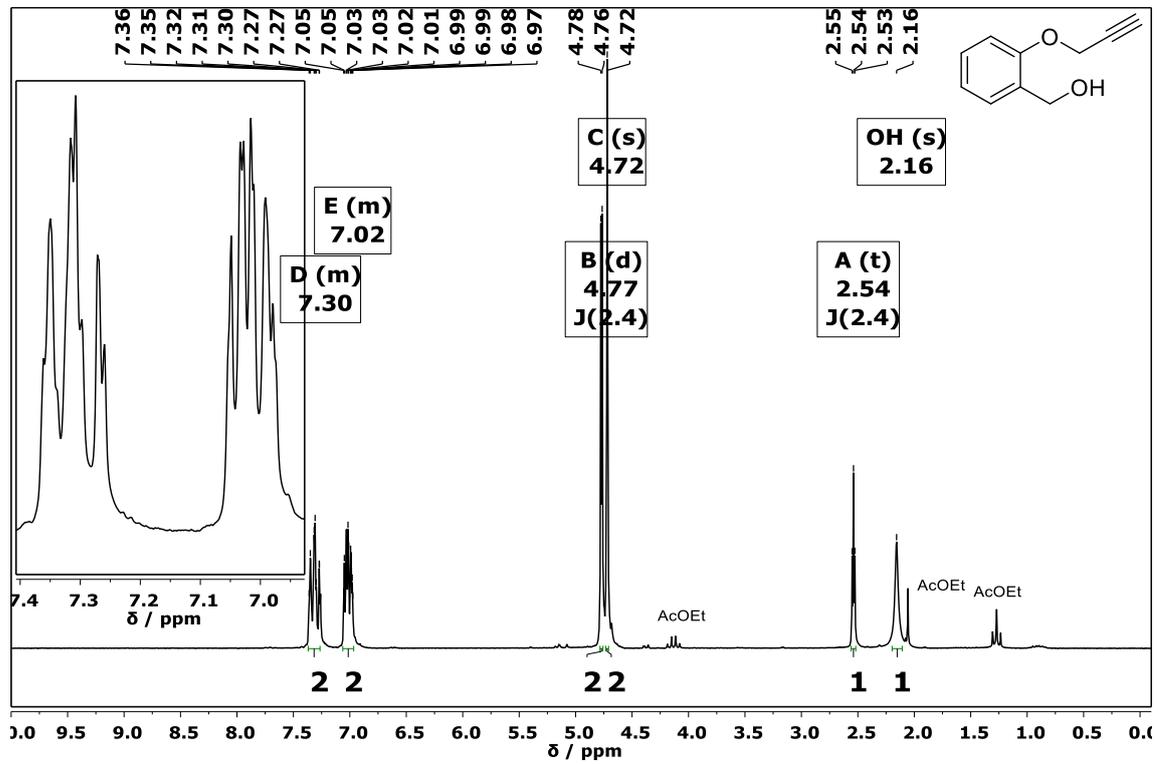
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-hidroximetil-4-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4c**) em CDCl_3 a 200 MHz.



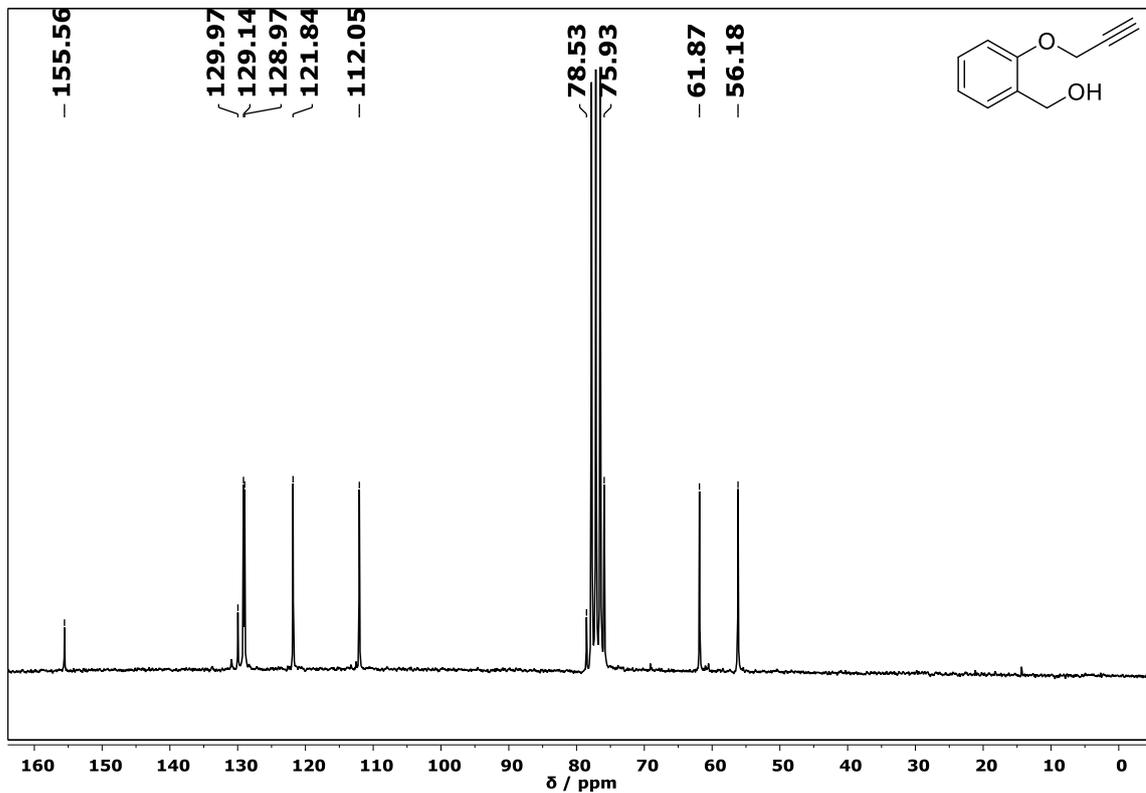
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-hidroximetil-5-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4c**) em CDCl_3 a 50 MHz.



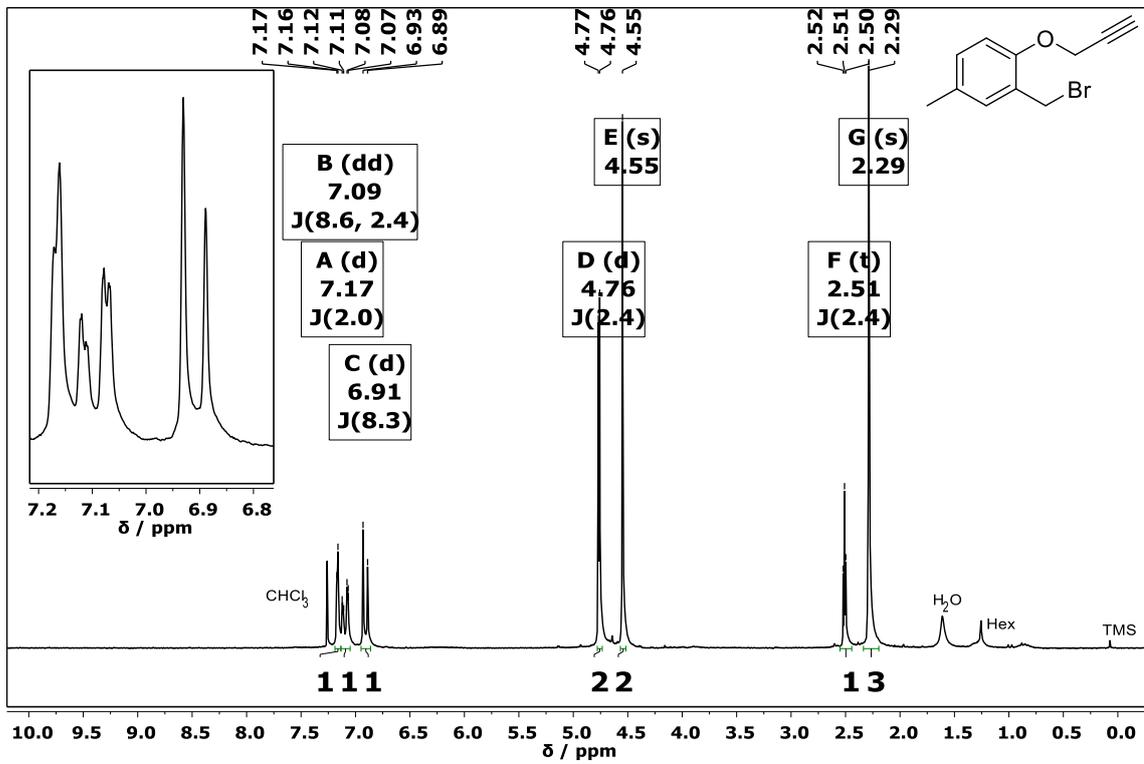
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-hidroximetil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4d**) em CDCl_3 a 200 MHz.



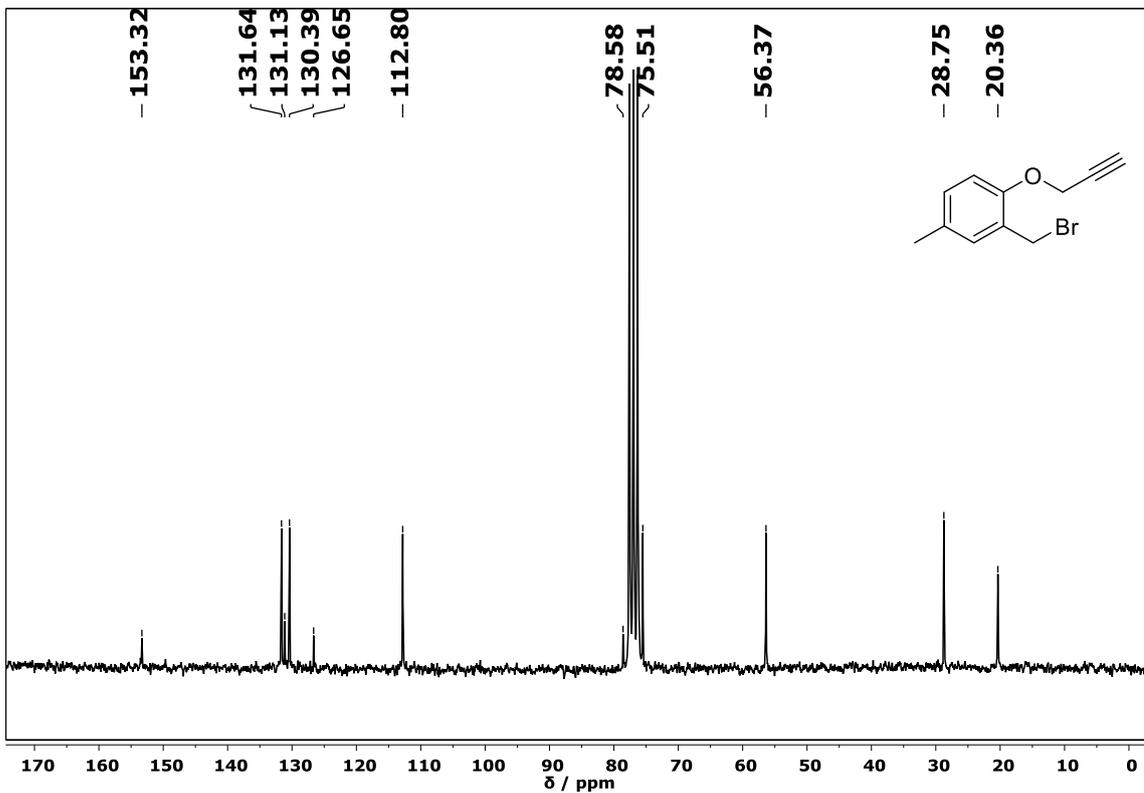
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-hidroximetil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4d**) em CDCl_3 a 50 MHz.



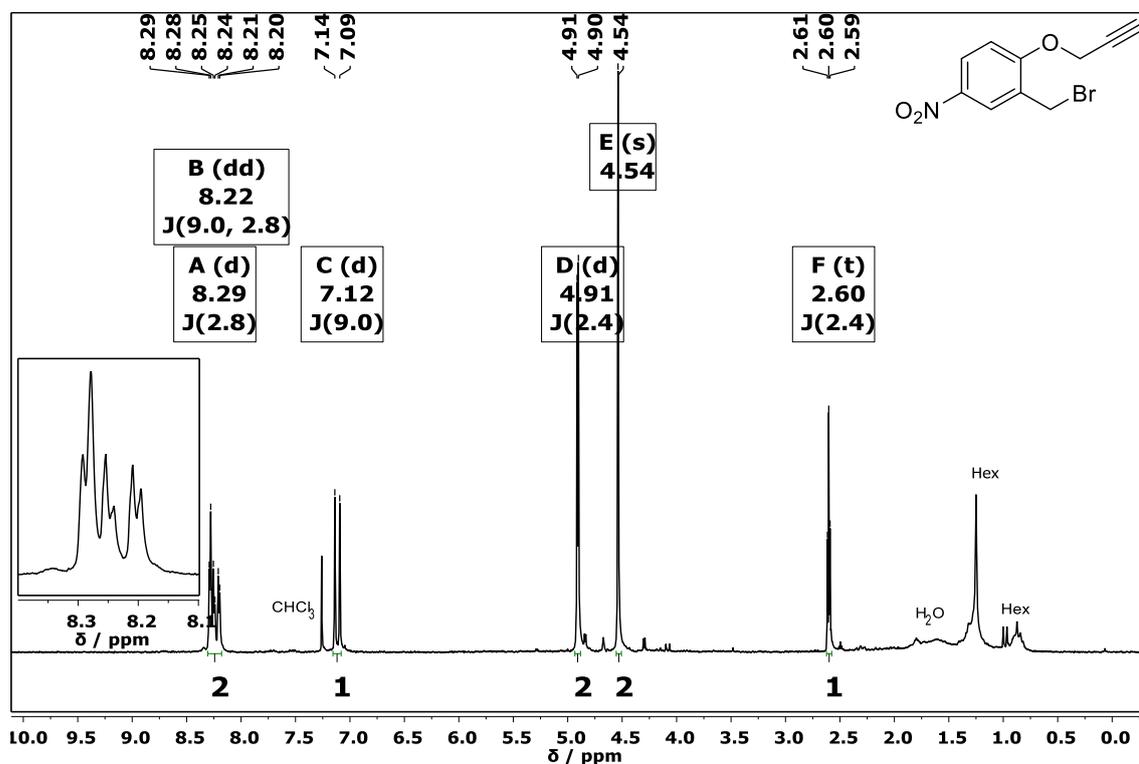
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-(bromometil)-5-metil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5b**) em CDCl_3 a 200 MHz.



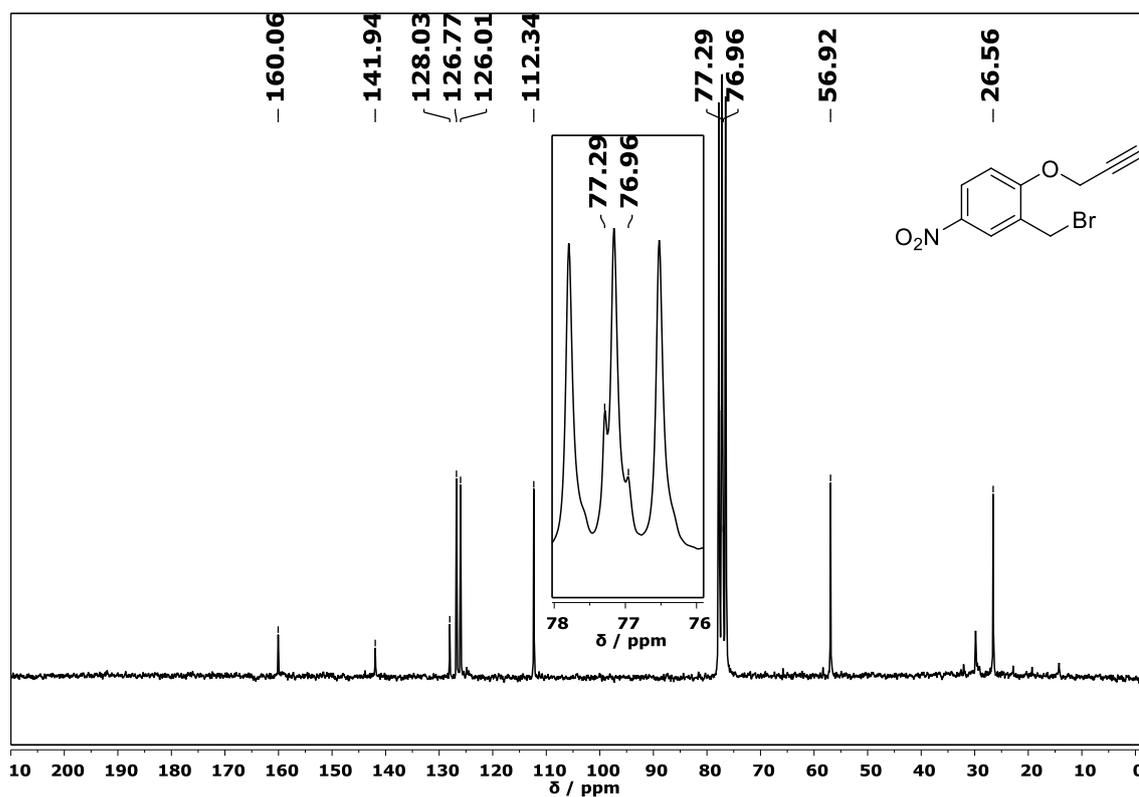
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-(bromometil)-5-metil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5b**) em CDCl_3 a 50 MHz.



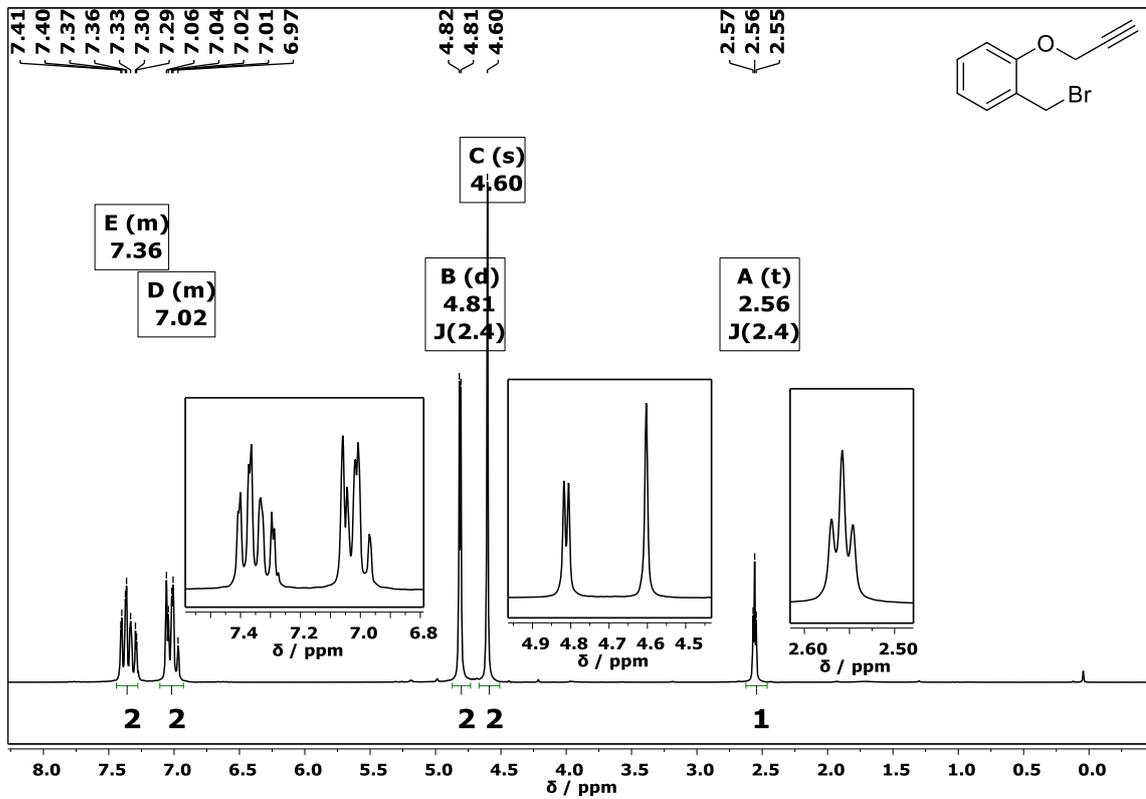
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-(bromometil)-5-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5c**) em CDCl_3 a 200 MHz.



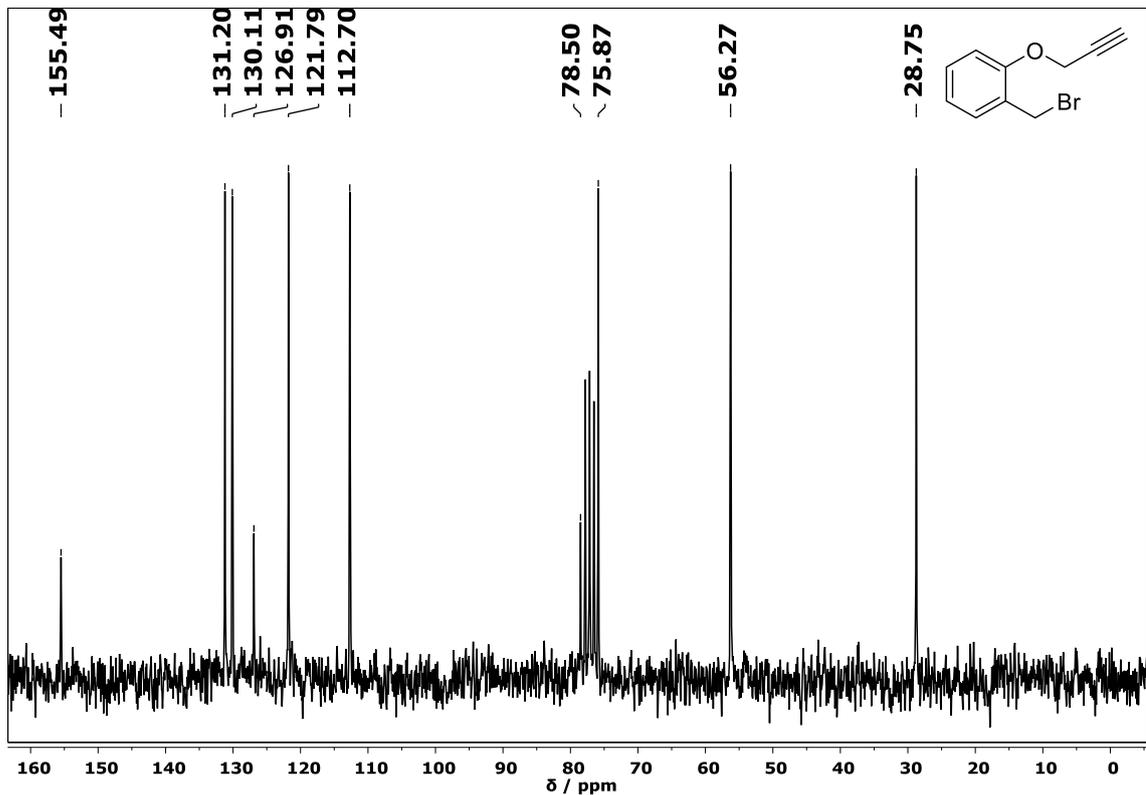
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-(bromometil)-5-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5c**) em CDCl_3 a 50 MHz.



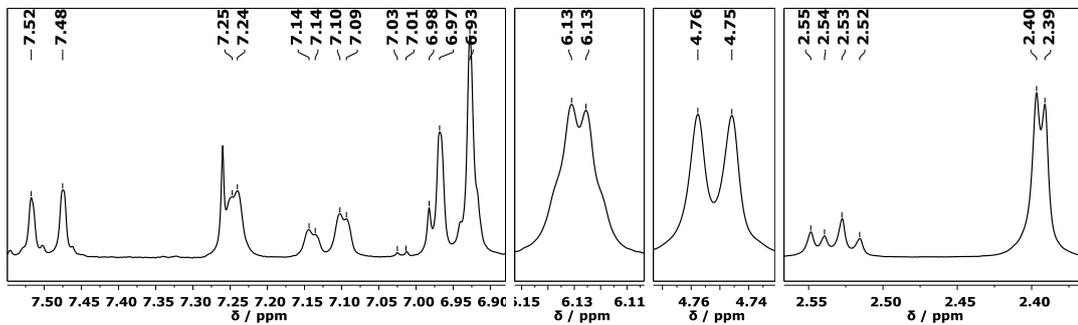
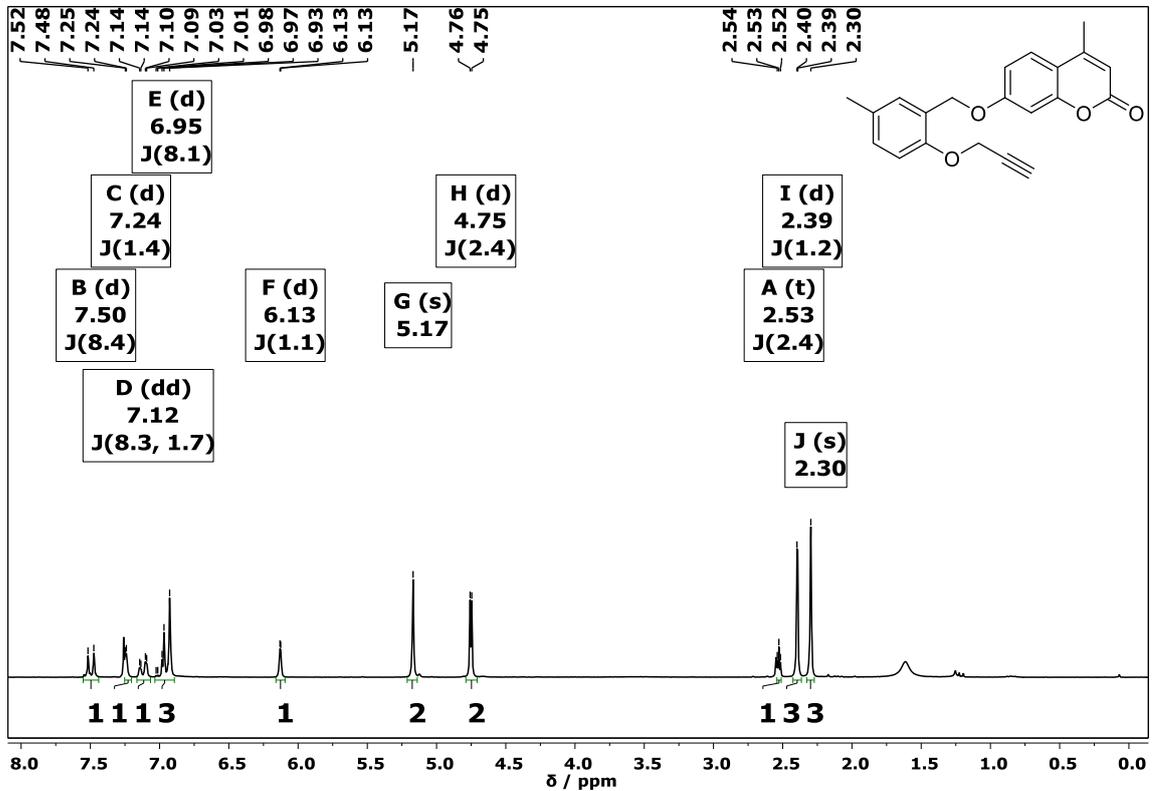
Espectro de RMN de ^1H do composto 2-(bromometil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5d**) em CDCl_3 a 200 MHz.



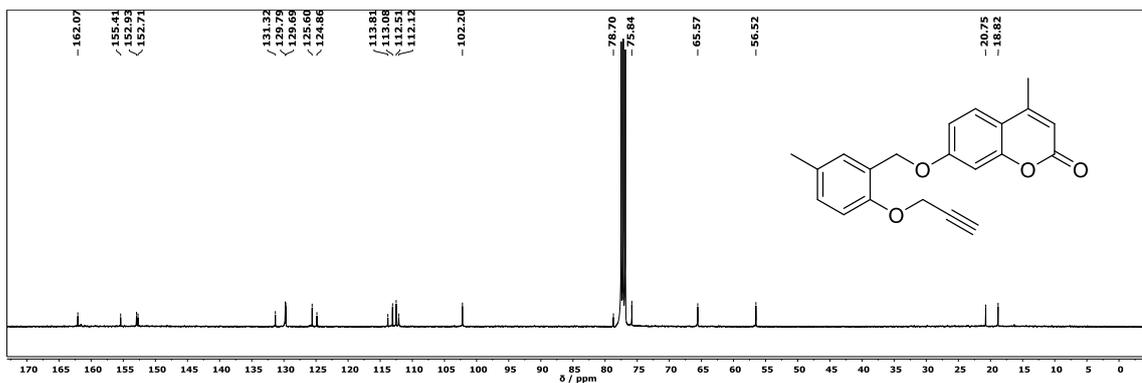
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 2-(bromometil)-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**5d**) em CDCl_3 a 50 MHz.



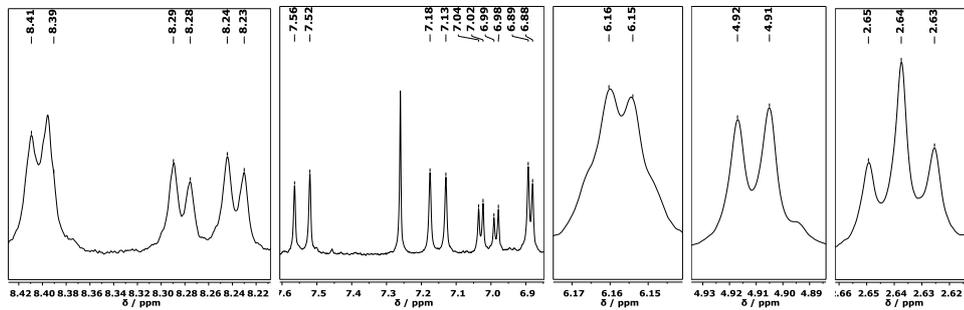
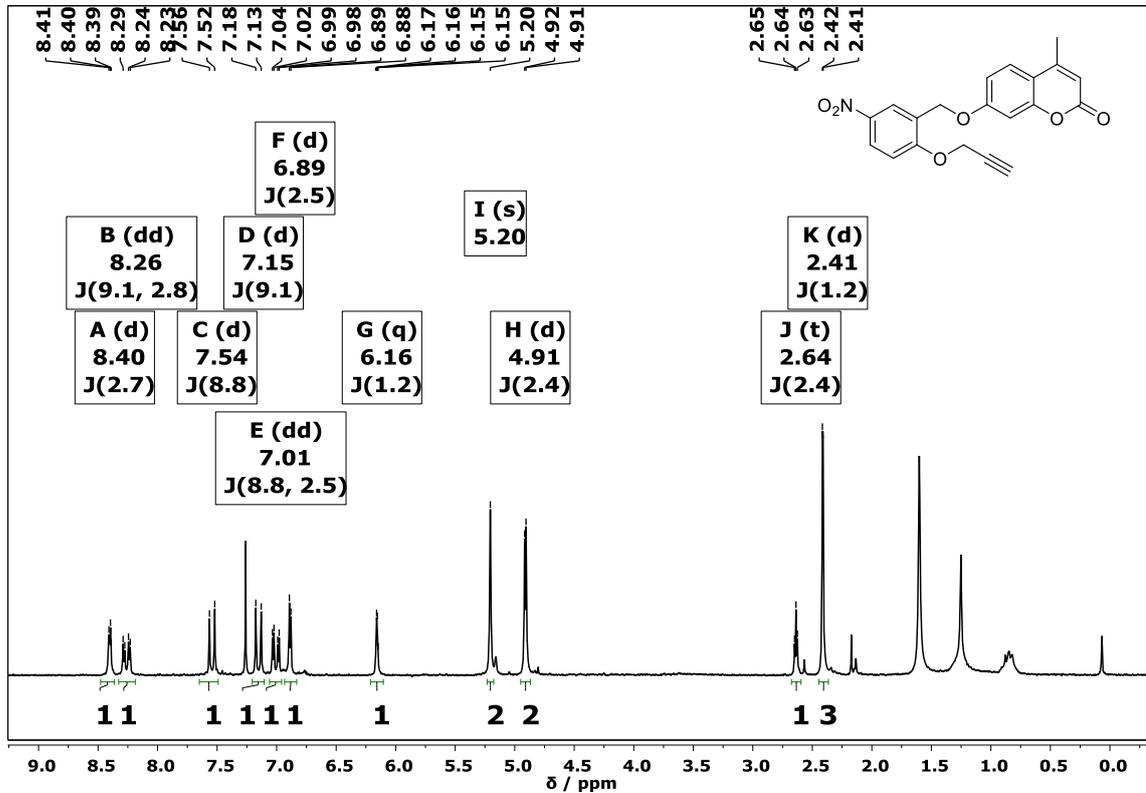
Espectro de RMN de ^1H do composto 4-metil-7-[[5-metil-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2*H*-cromen-2-ona (**6b**) em CDCl_3 a 200 MHz.



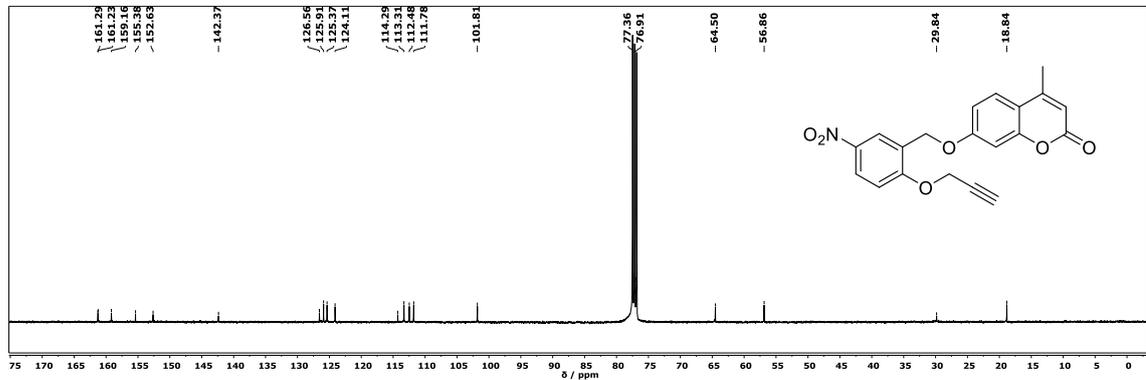
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 4-metil-7-[[5-metil-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2*H*-cromen-2-ona (**6b**) em CDCl_3 a 100 MHz.



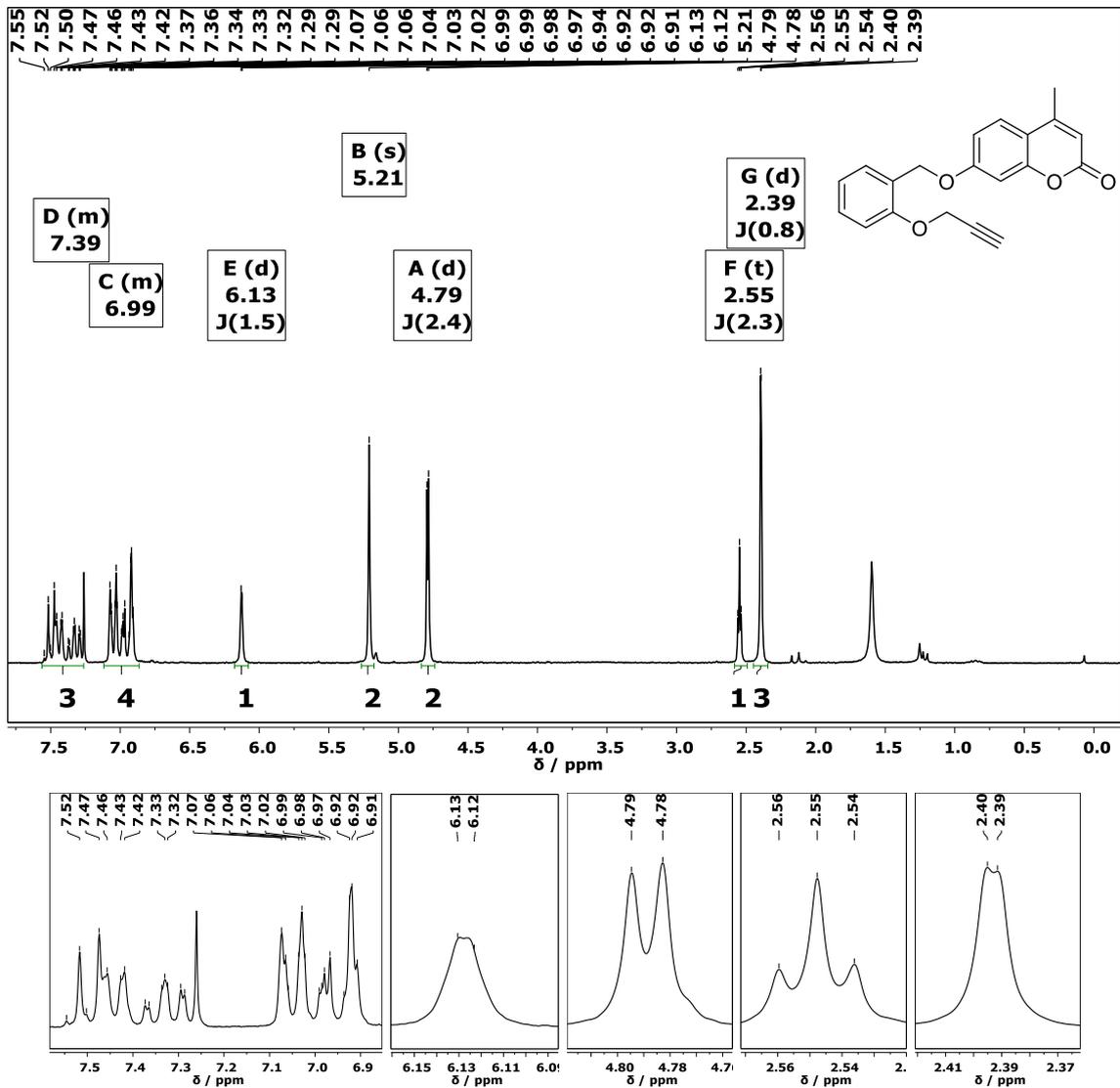
Espectro de RMN de ^1H do composto 4-metil-7-[[5-nitro-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6c**) em CDCl_3 a 100 MHz.



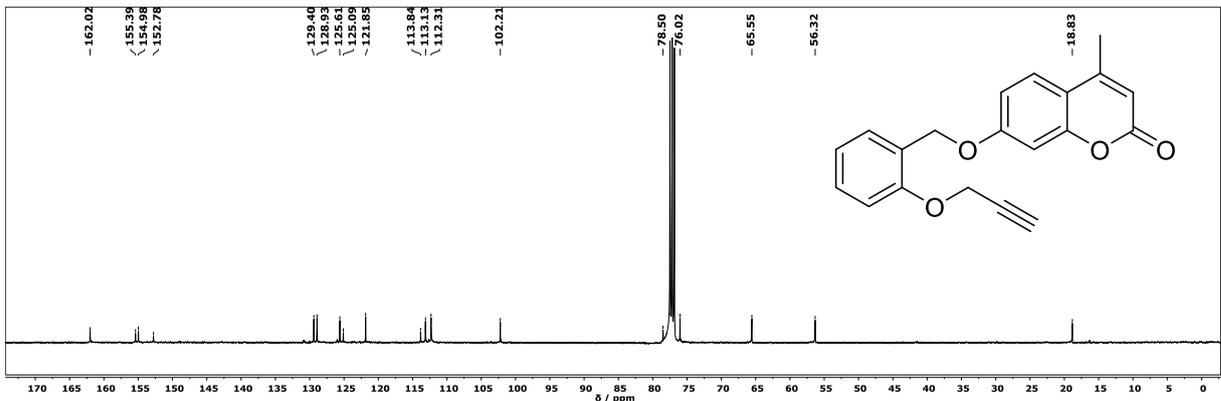
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 4-metil-7-[[5-nitro-2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6c**) em CDCl_3 a 100 MHz.



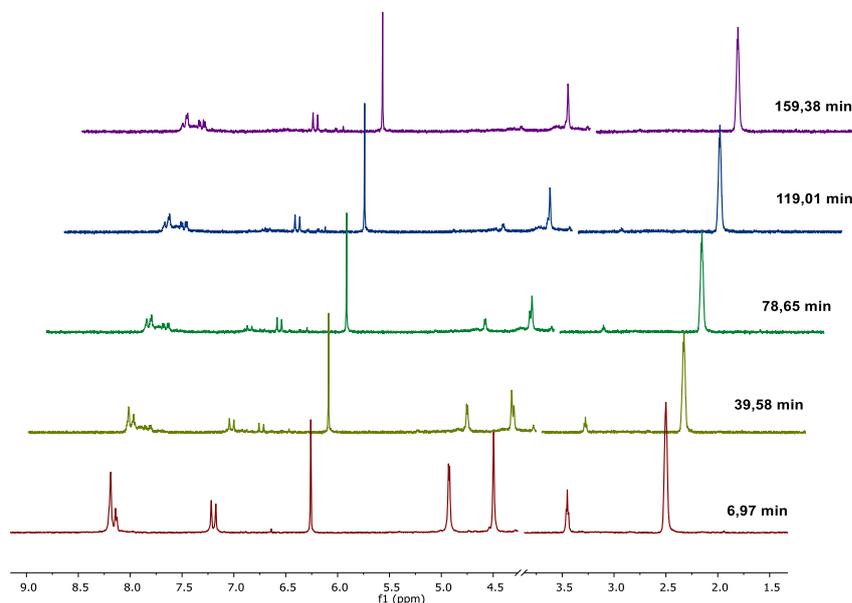
Espectro de RMN de ^1H do composto 4-metil-7-[[2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6d**) em CDCl_3 a 200 MHz.



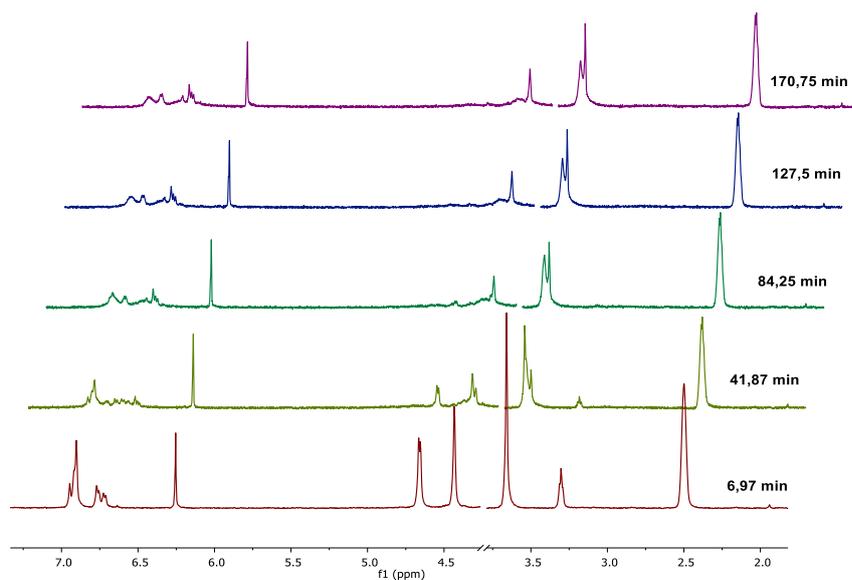
Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto 4-metil-7-[[2-(prop-2-il-1-oxi)benzil]oxi]-2H-cromen-2-ona (**6d**) em CDCl_3 a 100 MHz.



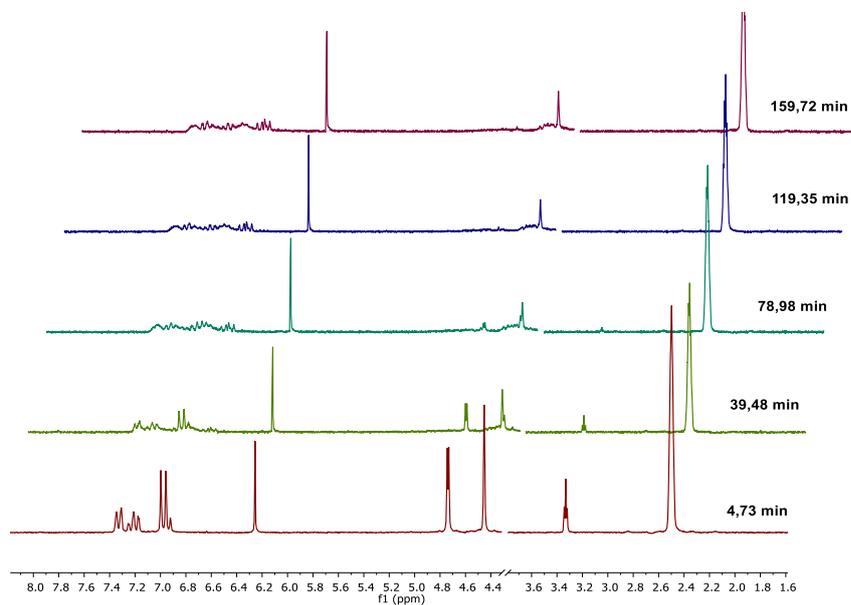
Espectros de RMN de ^1H da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do compostos 2-hidroximetil-4-nitro-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4c**) e do catalisador Na_2PdCl_4 em função do tempo de reação, em 20 % D_2O e 80 % $(\text{CD}_3)\text{SO}$ a 19°C .



Espectros de RMN de ^1H da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do compostos 2-hidroximetil-4-metoxi-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4a**) e do catalisador Na_2PdCl_4 em função do tempo de reação, em 20 % D_2O e 80 % $(\text{CD}_3)\text{SO}$ a 19°C .



Espectros de RMN de ^1H da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do compostos 2-hidroximetil-1-(prop-2-il-1-oxi)benzeno (**4d**) e do catalisador Na_2PdCl_4 em função do tempo de reação, em 20 % D_2O e 80 % $(\text{CD}_3)\text{SO}$ a 19°C .



APÊNDICE B – CURVAS DE PEFIL CINÉTICO E QUADROS

Gráfico de concentração da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do composto **4c** em função do tempo, sendo $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$. E a linearização de primeira e de segunda da curva cinética em função do tempo Condições gerais: 20% $\text{D}_2\text{O}/80\%$ $(\text{CD}_3)\text{SO}$ e 19°C .

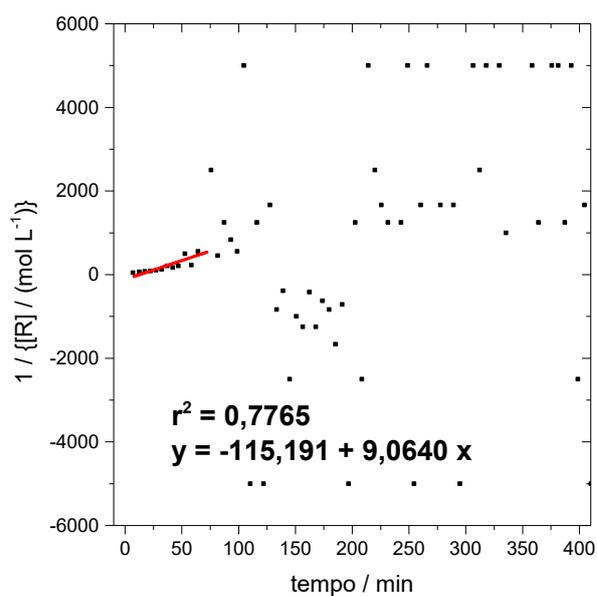
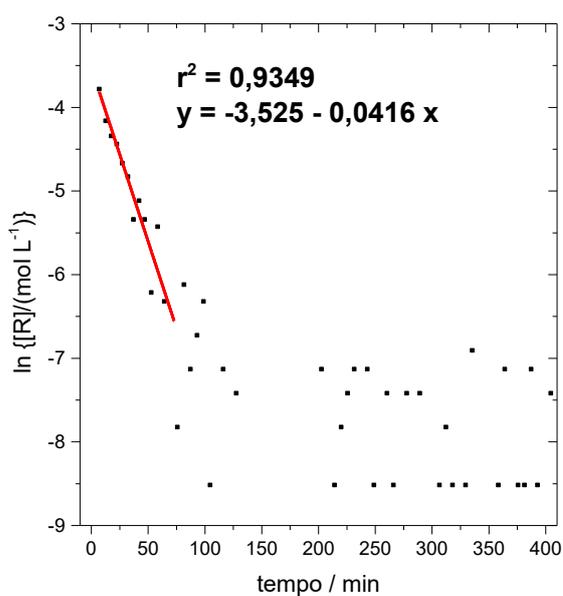
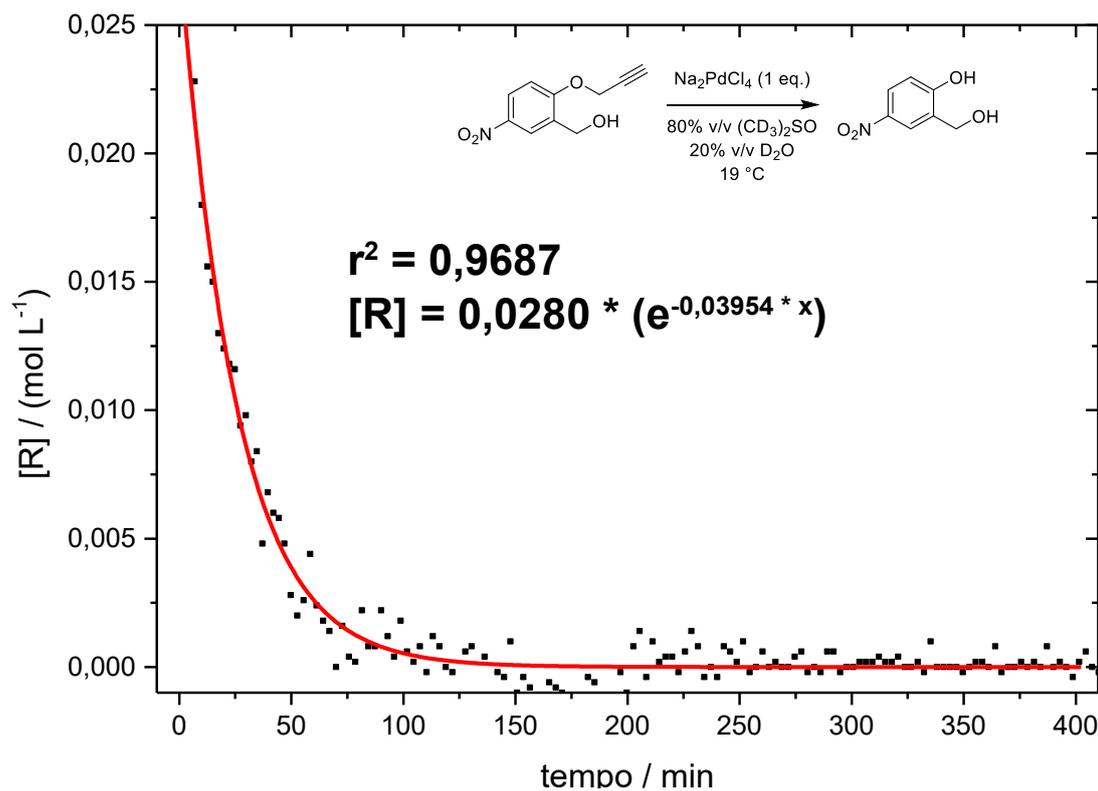


Gráfico de concentração da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do composto **4a** em função do tempo, sendo $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$. E a linearização de primeira e de segunda da curva cinética em função do tempo Condições gerais: 20% $\text{D}_2\text{O}/80\%$ $(\text{CD}_3)\text{SO}$ e 19°C .

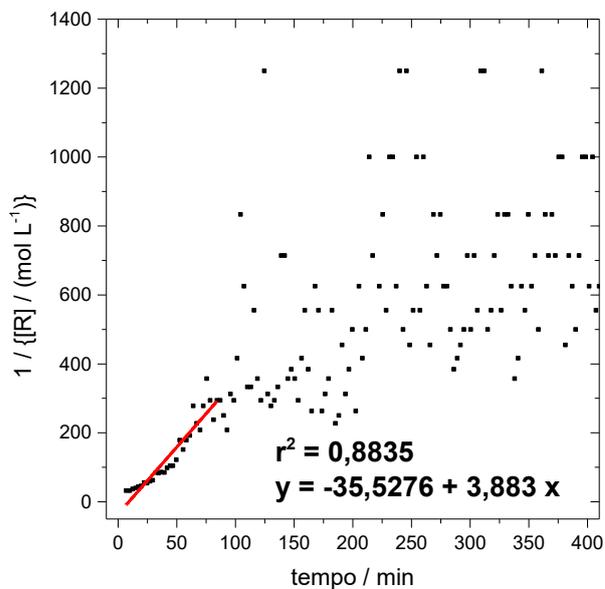
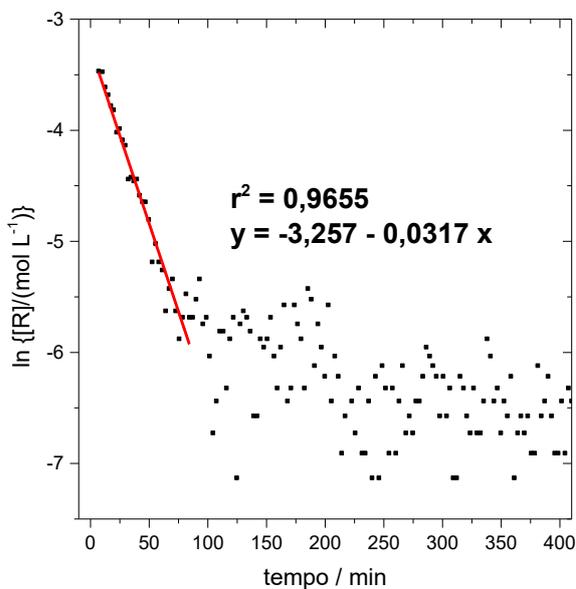
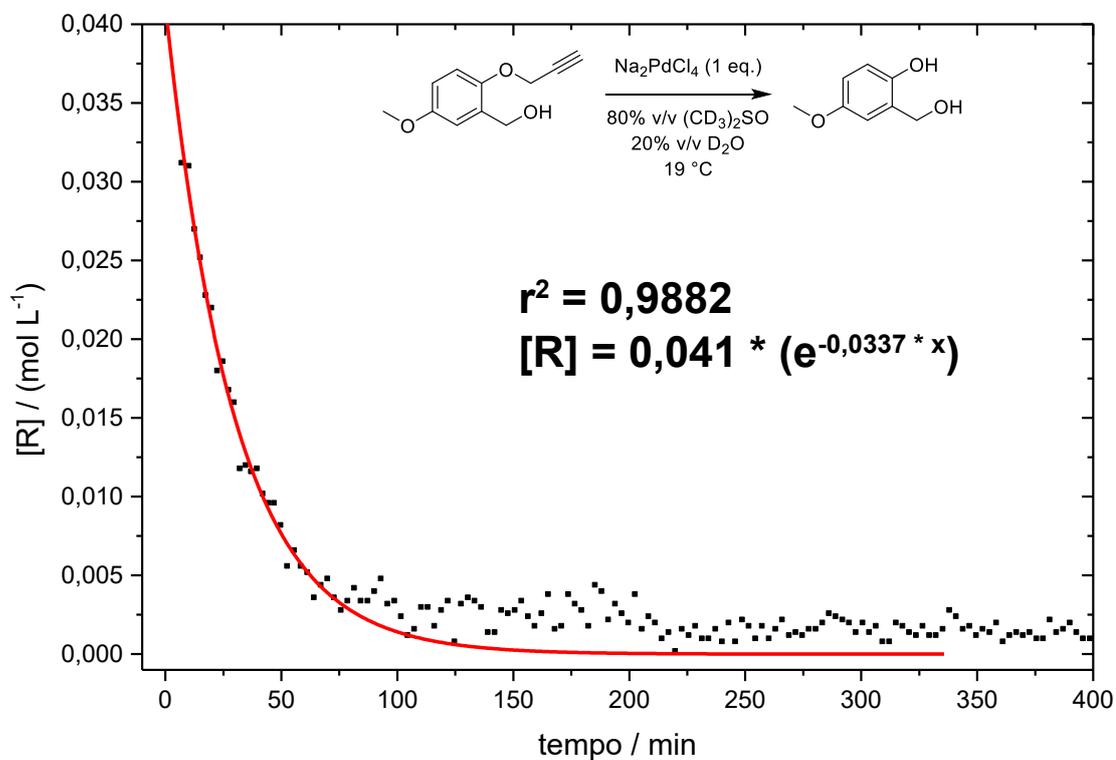
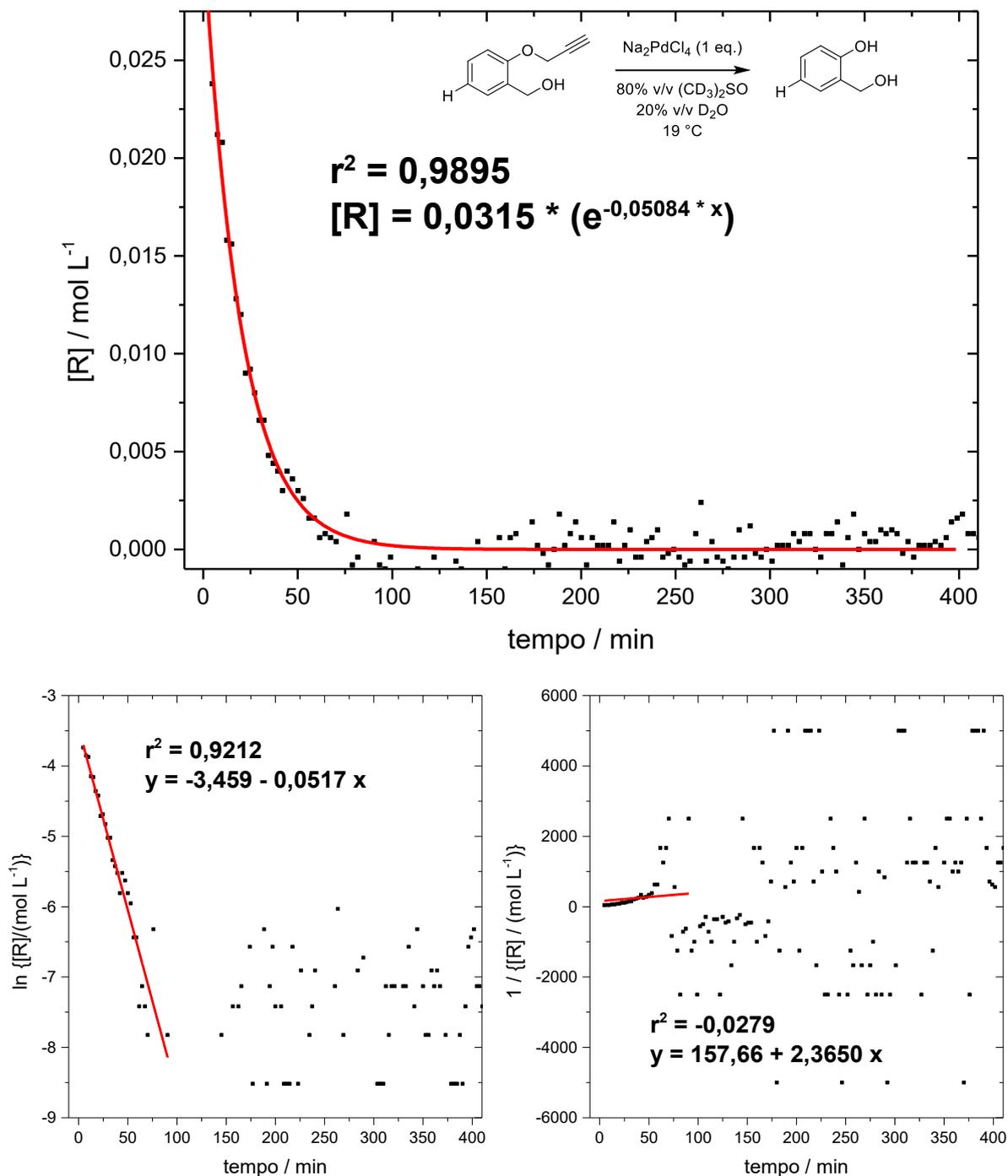
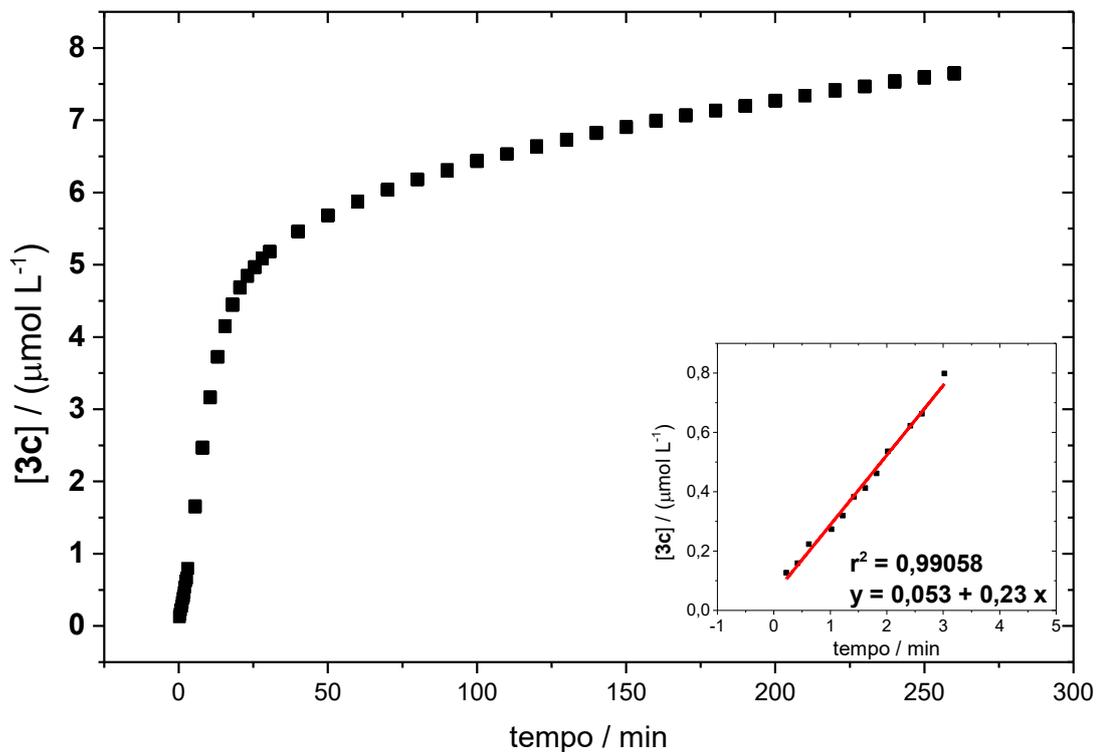


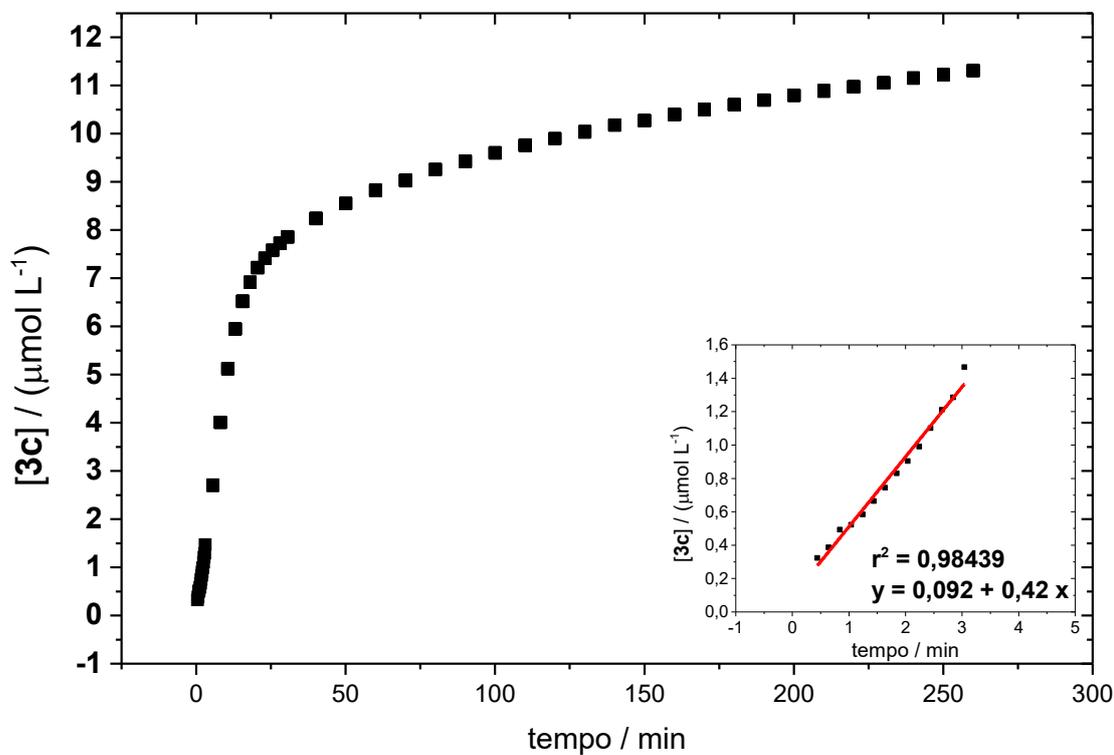
Gráfico de concentração da mistura reacional de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ do composto **4d** em função do tempo, sendo $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$. E a linearização de primeira e de segunda da curva cinética em função do tempo Condições gerais: 20% $\text{D}_2\text{O}/80\%$ $(\text{CD}_3)\text{SO}$ e 19°C .



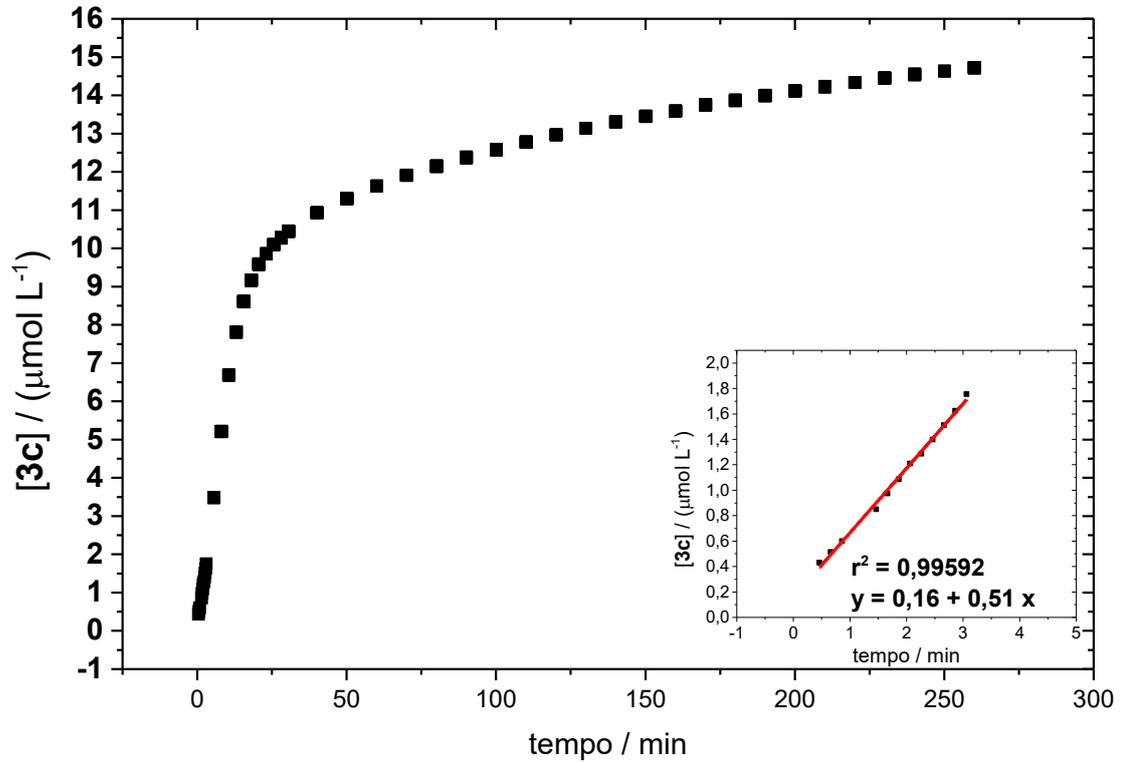
Perfil de concentração obtida com $[4c] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$.
Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e 37°C .



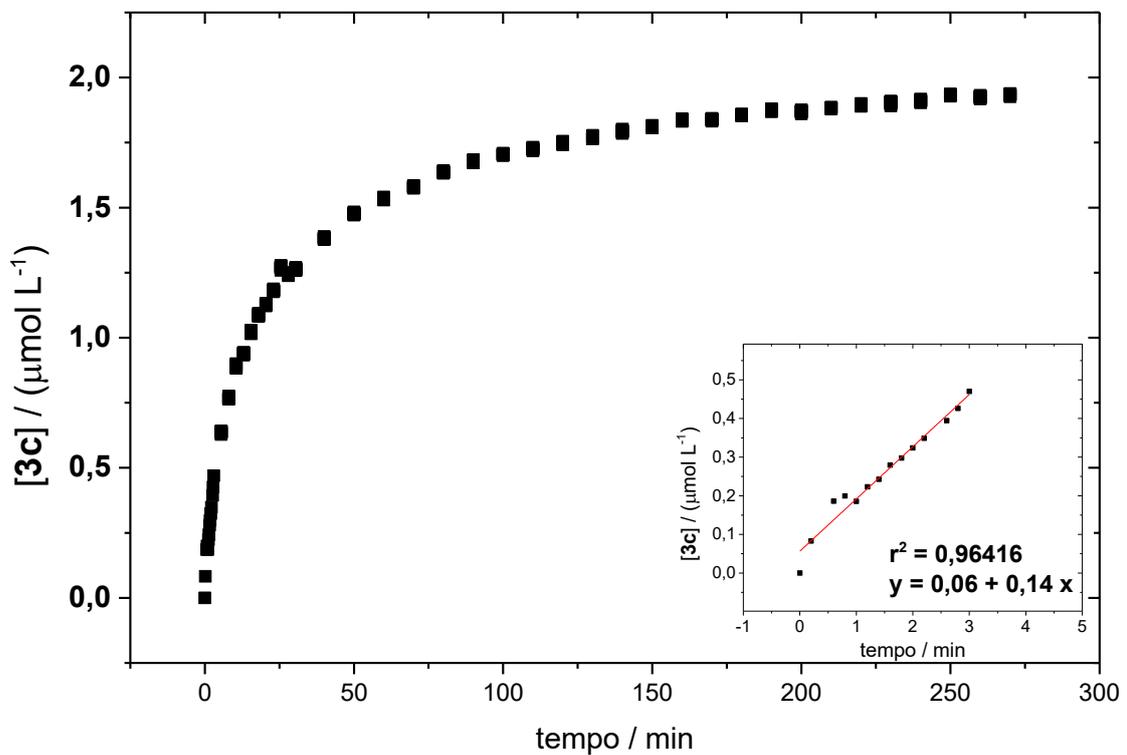
Perfil de concentração obtida com $[4c] = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$.
Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e 37°C .



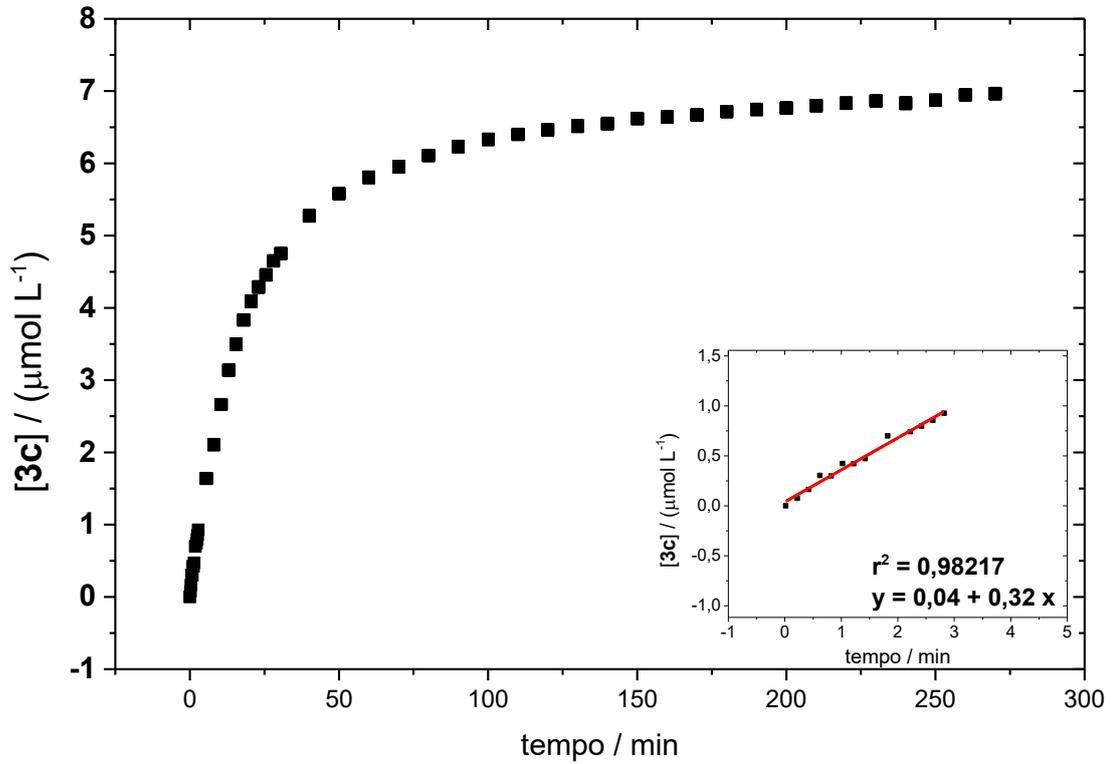
Perfil de concentração obtida com $[4c] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$.
 Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e 37°C .



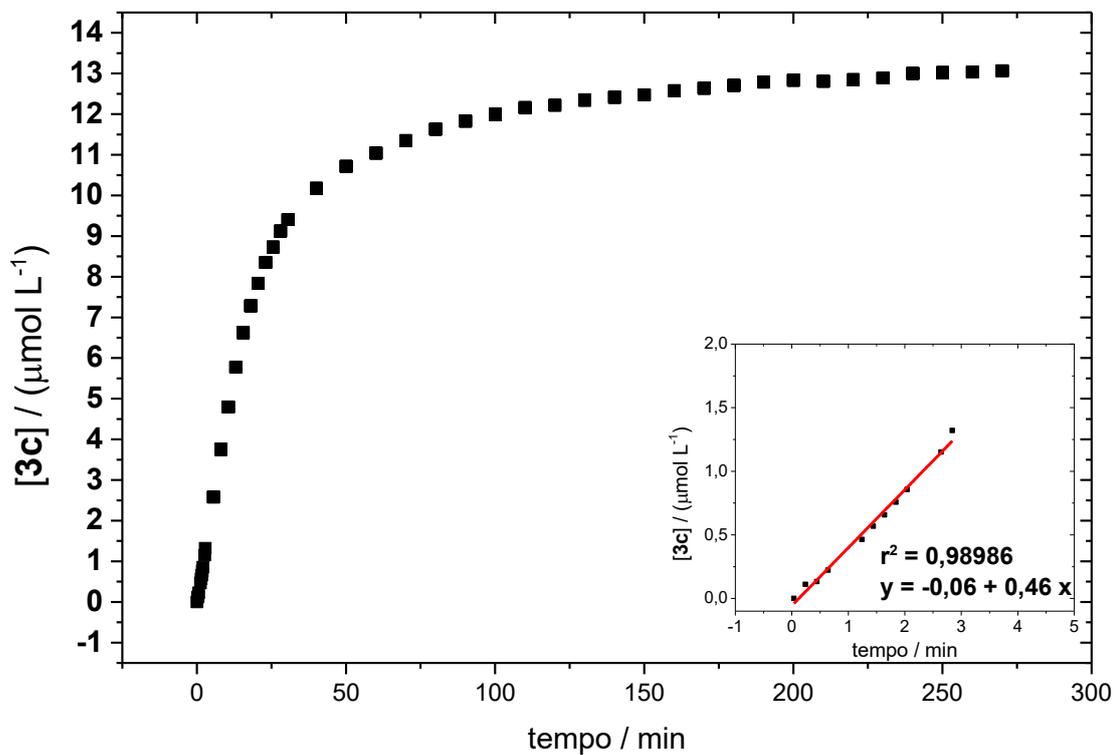
Perfil de concentração obtida com $[4c] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$.
 Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e 37°C .



Perfil de concentração obtida com $[4c] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$.
 Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e $37 \text{ }^\circ\text{C}$.



Perfil de concentração obtida com $[4c] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 15 \mu\text{mol L}^{-1}$.
 Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e $37 \text{ }^\circ\text{C}$.



Perfil de concentração obtida com $[4c] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$.
Condições gerais: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH = 7,4), 10 % v/v DMSO e $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

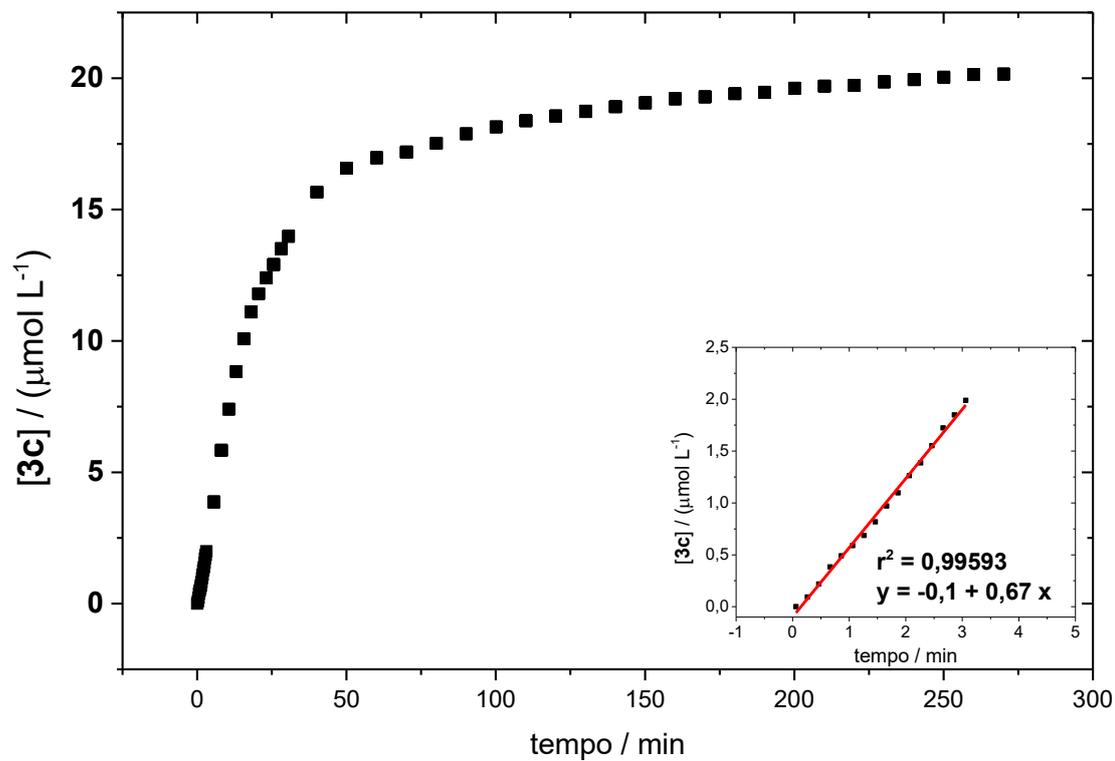


Gráfico de concentração do produto **4-MU** em função do tempo, sendo **[6a]** = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4]$ = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: 50% v/v DMSO, 0,01 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4), T = 37 °C.

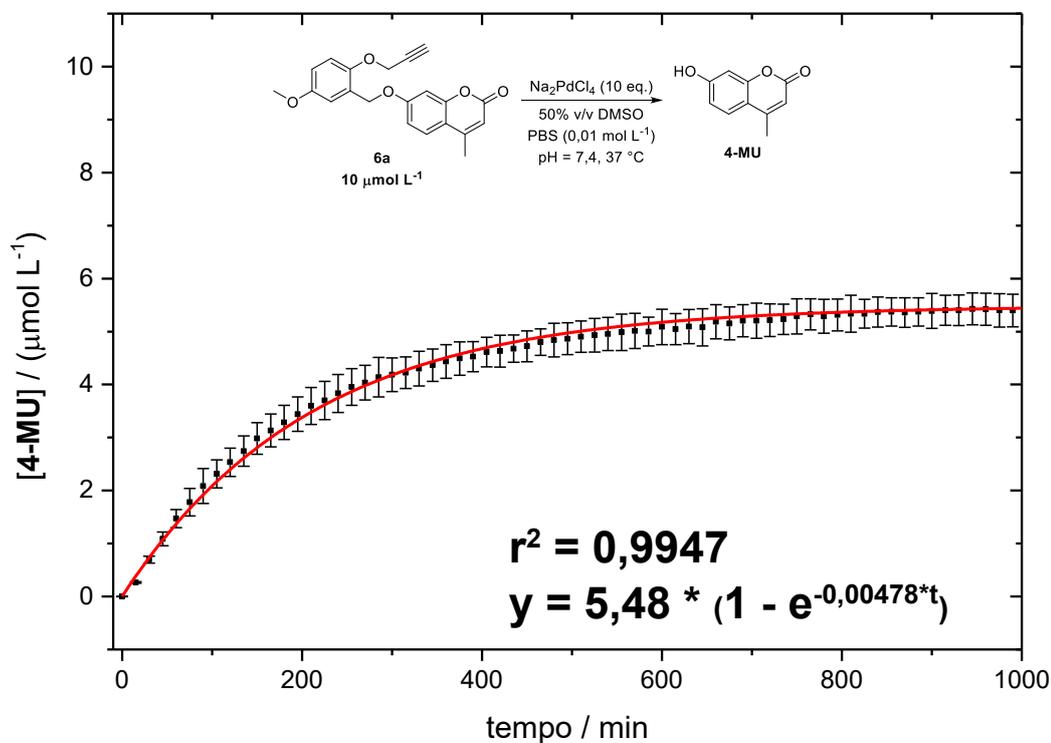


Gráfico de concentração do produto **4-MU** em função do tempo, sendo **[6c]** = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4]$ = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: 50% v/v DMSO, 0,01 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4), T = 37 °C.

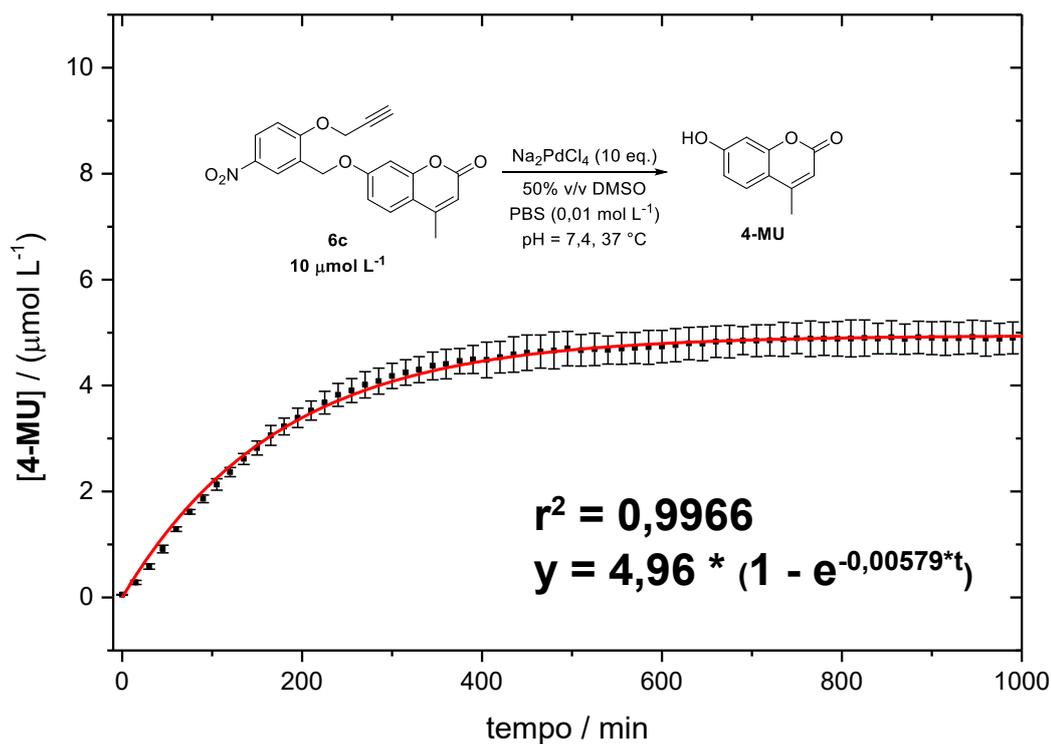
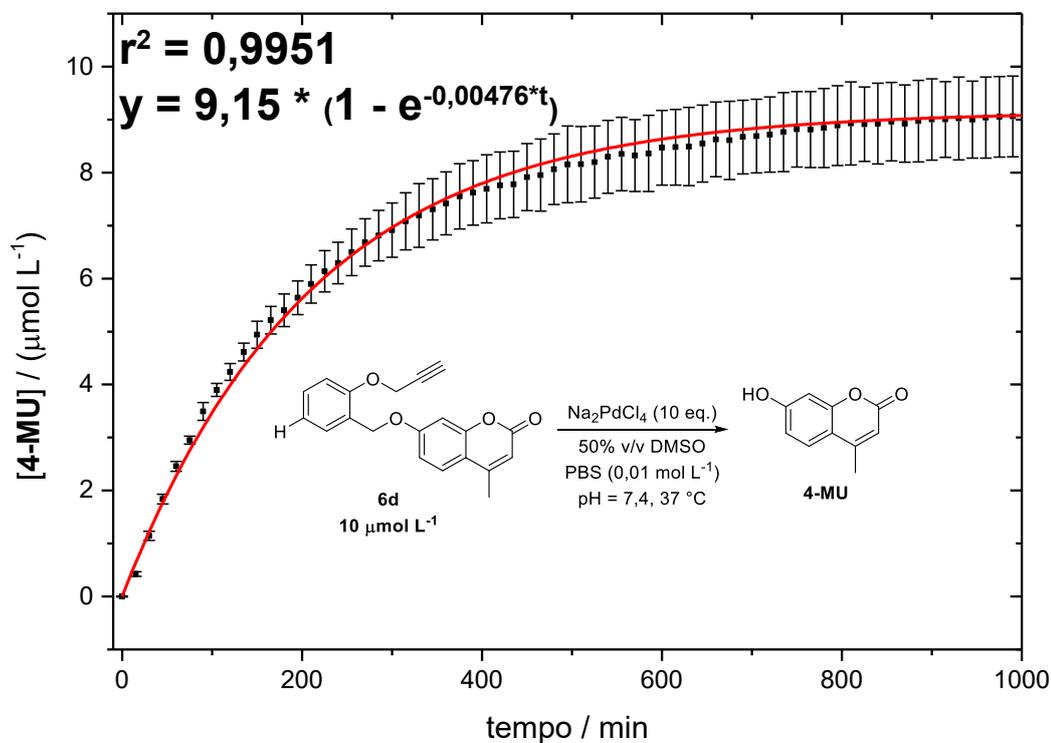
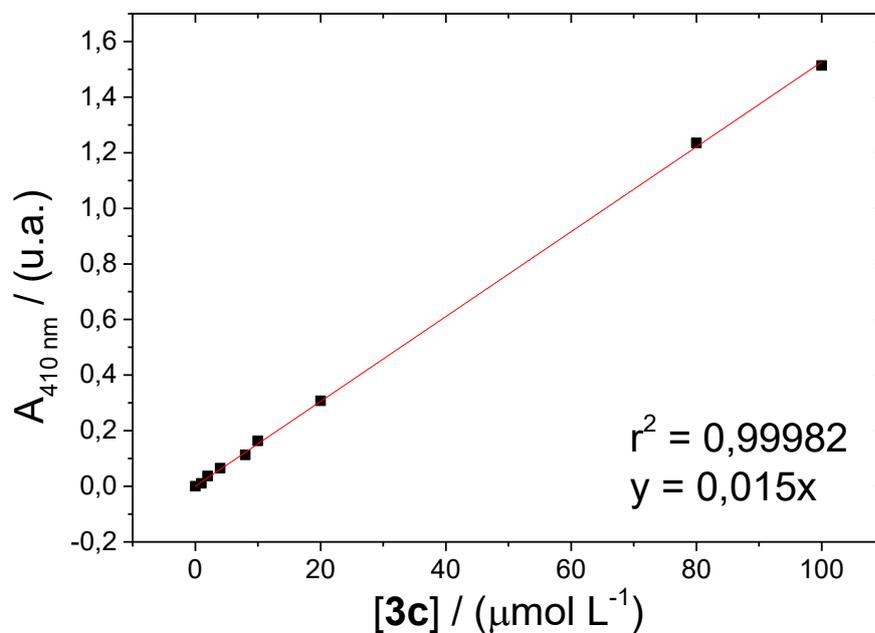
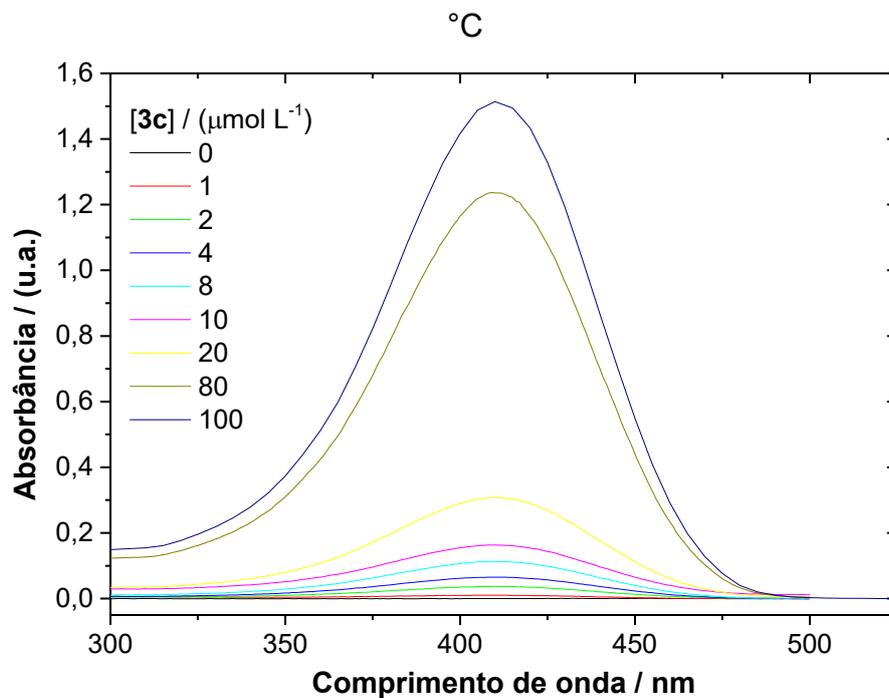


Gráfico de concentração do produto **4-MU** em função do tempo, sendo **[6d]** = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4]$ = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições gerais: 50% v/v DMSO, 0,01 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4), T = 37 °C.

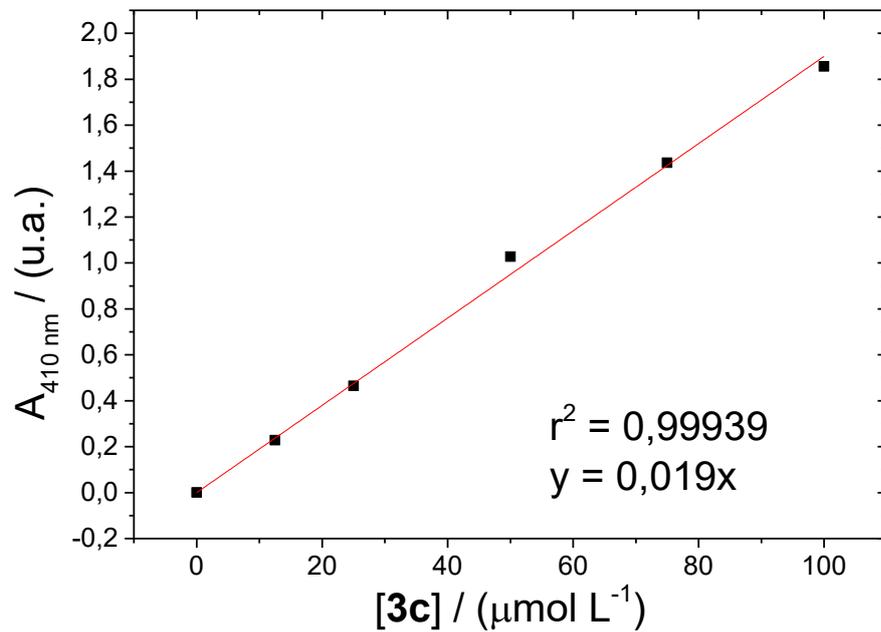
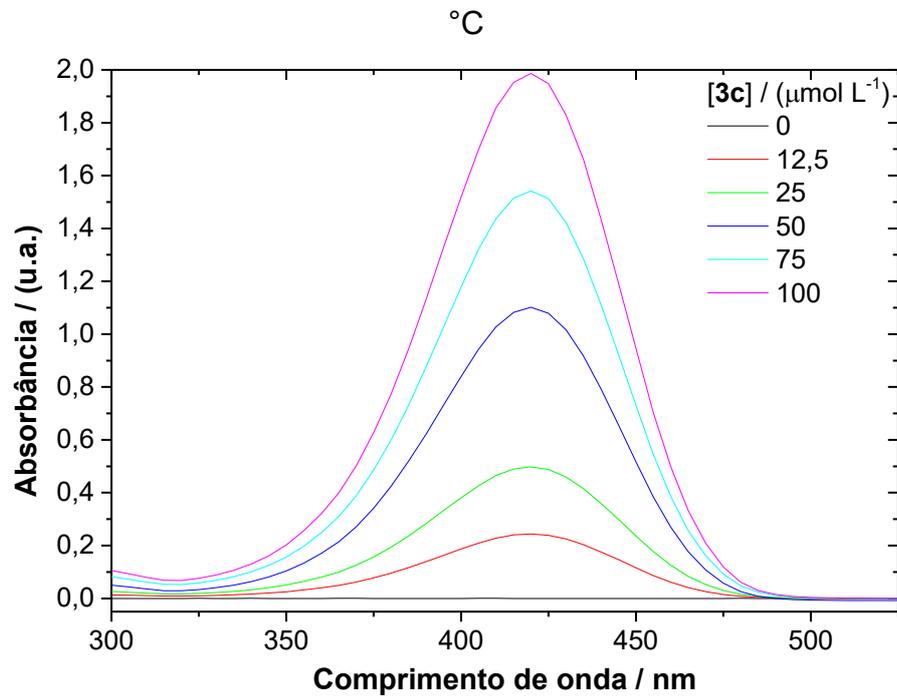


APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Varredura espectral do **3c** e a dependência linear entre a absorbância e a concentração de **3c**. Condições gerais: PBS (0,01 mol L⁻¹), 10% v/v DMSO, T = 37

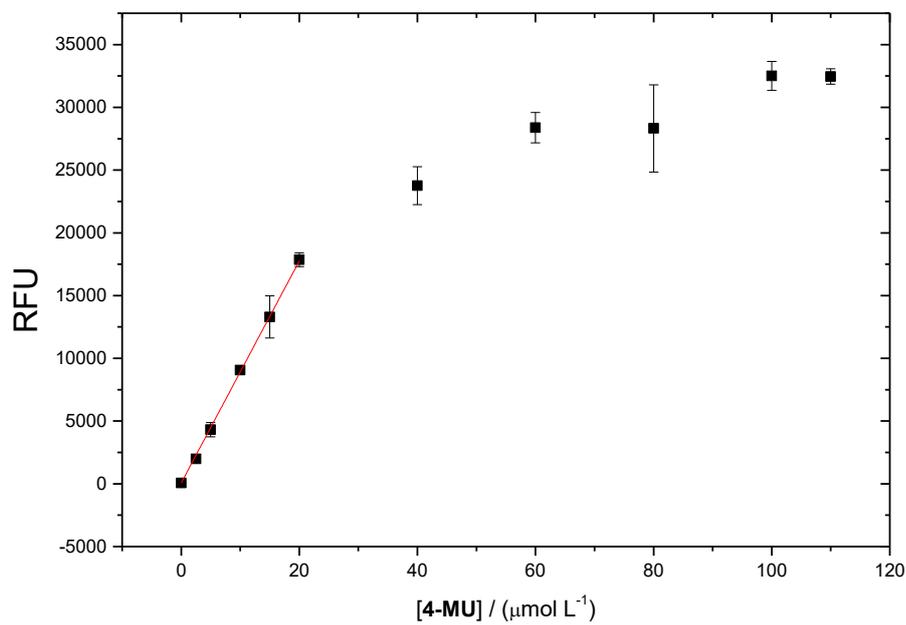


Varredura espectral do **3c** e a dependência linear entre a absorbância e a concentração de **3c**. Condições gerais: PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), 50% v/v DMSO, $T = 37$



Perfil de fluorescência da **4-MU** na faixa de concentração entre 0 e 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Condições gerais: 50% v/v DMSO, 37 °C, PBS (0,01 mol L⁻¹)



ANEXO A – DIREITO AUTORAIS

 **Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates**
Author: Sara E. Coelho, Felipe S. S. Schneider, Daniela C. de Oliveira, et al
Publication: ACS Catalysis
Publisher: American Chemical Society
Date: May 1, 2019
Copyright © 2019, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

 **A Highly Sensitive Fluorescent Sensor for Palladium Based on the Allylic Oxidative Insertion Mechanism**
Author: Fengling Song, Amanda L. Garner, Kazunori Koide
Publication: Journal of the American Chemical Society
Publisher: American Chemical Society
Date: Oct 1, 2007
Copyright © 2007, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Order Date	14-Jun-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1365603-1	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
ISSN	1364-548X	Portion	Image/photo/illustration

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical communications	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Article Title	Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein.	Publication Type	e-Journal
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	Start Page	3964
Date	01/01/1996	End Page	3966
Language	English	Issue	22
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland	Volume	46

REQUEST DETAILS

Portion Type	Image/photo/illustration	Distribution	Worldwide
Number of Images / Photos / Illustrations	2	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Not-for-profit entity	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	ANÁLISE DAS REAÇÕES EM TANDEM NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-FLUORÓFOROS DA 4-METILUMBELIFERONA MEDIADAS POR PALÁDIO(II): UMA PERSPECTIVA DOS EFEITOS ELETRÔNICOS	Institution Name	Universidade Federal de Santa Catarina
Instructor Name	Josiel Barbosa Domingos	Expected Presentation Date	2023-07-06

ADDITIONAL DETAILS

Order Reference Number	N/A	The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Albert Leder St. John
------------------------	-----	---	-----------------------

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Scheme 1, Figure 4	Title of the Article/Chapter the Portion Is From	Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein.
Editor of Portion(s)	Santra, Mithun; Ko, Sung-Kyun; Shin, Injae; AhnAhn K. H. dedicates this paper to the late Professor Chi Sun Hahn in admiration of his contributions to organic chemistry of Korea., Kyo Han	Author of Portion(s)	Santra, Mithun; Ko, Sung-Kyun; Shin, Injae; AhnAhn K. H. dedicates this paper to the late Professor Chi Sun Hahn in admiration of his contributions to organic chemistry of Korea., Kyo Han
Volume / Edition	46	Issue, if Republishing an Article From a Serial	22
Page or Page Range of Portion	3964-3966	Publication Date of Portion	2010-06-14