**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA**

BARBARA BERNARDIM DE SOUZA

**NOVAS METODOLOGIAS EM SÍNTESE ORGÂNICA EMPREGANDO
O REARRANJO DE WOLFF EM DIAZOCETONAS INSATURADAS**

TESE DE DOUTORADO

SÃO CARLOS

2017

BARBARA BERNARDIM DE SOUZA

**NOVAS METODOLOGIAS EM SÍNTESE ORGÂNICA EMPREGANDO
O REARRANJO DE WOLFF EM DIAZOCETONAS INSATURADAS**

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica
e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos
Bender Burtoloso

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
ACERVO RESERVADO NA BIBLIOTECA DO IQSC-USP

SÃO CARLOS

2017

Com amor e carinho.

Dedico este trabalho a minha mãe, Círlene Bernardim.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada a Deus que em verdes pastagens me fez repousar e me conduziu a águas tranquilas (Salmo 23). A luz que me guiou foi mais forte do que as dificuldades que me cercaram.

Ao meu orientador, Prof. Antonio Burtoloso. Obrigada por me receber em seu laboratório em fevereiro de 2011 para o mestrado, e em fevereiro de 2013, pelo aceite para o doutorado. Foram 6 anos de convivência diária cercada de excelentes e marcantes momentos, com muitas dicas, puxões de orelha, conselhos, alegrias e discussões saudáveis. Admiro muito o seu compromisso com a educação, a forma como conduz a ciência, com muita ética, profissionalismo e seriedade. Aprecio seu otimismo e a maneira como consegue ver o lado bom da vida. Palavras são poucas para agradecer a atenção e orientação que recebi. Levarei todo o aprendizado comigo para onde for.

Ao Prof. Gonçalo Bernardes, pela maravilhosa oportunidade de passar 1 ano em seu laboratório na Inglaterra. Tive um dos melhores anos da minha vida em Cambridge, sendo recebida com muito respeito e consideração. Sou extremamente grata pela chance que me foi dada. Admiro muito seu dinamismo, entusiasmo e energia com a ciência e com a vida.

A minha família, em especial minha mãe Cirlene Bernardim que sempre soube apoiar as minhas escolhas. Pela compreensão em todas as vezes que precisei estar ausente me dedicando ao doutorado. Por tudo, meu muito obrigada, eu não teria chegado até aqui sem o seu apoio! O mesmo agradecimento a minha avó querida Maria de Lurdes, a dona Nenê.

Aos colegas do laboratório “Warner Bruce Kover”: Gabriela, Rafael Mafra, João Victor, Edson, Rafael Gallo, Camila, Patrícia, Annes, Meire, Nikolas, Larissa, Lucas, Alexander, Juliana, Ives, Isac, Leonardo, Gustavo, Yuri, Daniel, Fernanda e Ketllyn; e os técnicos Marília e João Pedro. Agradeço muito pelos bons momentos, as discussões sobre química e os cafezinhos após o almoço! Vocês são incríveis e

sentirei muita saudade da nossa rotina no laboratório!!! Agradeço também à Edvania por todo o carinho e amizade.

Aos colegas de Cambridge (UK), GBernardes Lab: Maria J. Matos, Benjamin, Annabel, Shuang, Russel, Ester, Bruno, Jean, Omar, Núria, Lavinia, Paco, Pedro, Maria Maneiro e Claudia. Whiffen Lab, Phipps Group e ITC: Philip, Georgi, JSP, Szabo, Madalina, Holly, Fabio, Ricardo, Daniel, Claudio, Bruna, José, Lorène, Michael, Stephen, Juan, Elena, Victor, Maria Gonzales, Myeong, Jim, Andreas, Grazia, Francesco, Timo, Swapna, Kat, Gina e Giulia. Espero poder tomar um pint com vocês novamente! Muito obrigada por tornar o dia a dia no laboratório tão divertido! Agradeço em especial ao Philip Murray por ter ajudado a corrigir a minha tese sem mesmo falar português e à Maria J. Matos por toda amizade e companheirismo.

Aos colegas do Mattson Group (USA): Erica, Veronica, Andi, Tom, Josh, Allie, e Tyler e em especial a Prof. Anitta Mattson pela oportunidade e por me receber em seu grupo de pesquisa em Ohio.

Aos amigos da UNICENTRO: Bruna, João, Tiago, Daniele e Silvano. Obrigada por fazerem parte da minha vida desde que nos conhecemos na graduação, em 2007! Vocês são da minha família.

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise, em especial ao Prof. André Porto por todo o apoio e pelos potes de sorvetes e doces doados ao nosso grupo. Agradeço também os demais colegas do IQSC.

A todos os professores que participaram e incentivaram a minha formação acadêmica, em especial ao meu orientador de iniciação científica Mauro Chierici Lopes e ao responsável pelo meu interesse e ingresso na área de síntese orgânica, Kleber Thiago de Oliveira.

À Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do IQSC, da Universidade Federal de São Carlos, e da Universidade de Cambridge. Obrigada Sylvana e André por atender as análises de RMN.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto de Química de São Carlos, por todo apoio técnico e institucional. Agradeço ao pessoal da secretaria de pós-graduação, Andréia, Gislei, Gustavo, Daniela e Silvia, vocês são sensacionais!

Um agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (2012/22274-2), estágio BEPE (2015/07509-1) e pelo suporte financeiro aos projetos do grupo. Agradeço também pelo apoio técnico e pela aprovação da bolsa de pós-doutoramento (2016/18771-1).

Em geral, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

"We cannot expect in the immediate future that all women who seek it will achieve full equality of opportunity in science. But if women are to start moving towards that goal, we must believe in ourselves or no one else will believe in us; we must match our aspirations with the competence, courage and determination to succeed."

Rosalyn Yalow, Nobel Prize in Physiology or Medicine (1977)

"Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained."

Marie Curie, Nobel Prize in Chemistry (1911) and Physics (1903)

RESUMO

BERNARDIM DE SOUZA, Barbara. **Novas metodologias em síntese orgânica empregando o rearranjo de Wolff em diazocetonas insaturadas**, 2017. 445 páginas. Tese (Doutorado em Ciências com ênfase em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2017.

Entre os diferentes tipos de substratos diazocarbonílicos encontrados na literatura, as diazocetonas α,β -insaturadas têm mostrado promissoras aplicações como intermediários multifuncionais. Este trabalho de tese foi dividido em três capítulos e visou expandir as aplicações das diazocetonas α,β -insaturadas em química e bioquímica. No primeiro capítulo, quatro exemplos de diazocetonas insaturadas (**54-56**) foram apresentadas como plataformas para a síntese direta de amidas e ésteres β,γ -insaturados (17 exemplos, **61-77**) via Rearranjo de Wolff em 64-92% de rendimento. Quando diazocetonas derivadas de amino-aldeídos foram utilizadas, isósteros peptídicos foram obtidos como demonstrado na síntese rápida e eficiente do nitróxido JP4-039. No mesmo capítulo, um estudo aprofundado comprovando a eficiência de diferentes lâmpadas comerciais (CFL e LED) para promover o Rearranjo de Wolff é apresentado, representando uma alternativa sustentável. Neste estudo, cinco exemplos de diazocetonas insaturadas (**1, 86-88**) foram convertidas em 27 exemplos das respectivas amidas (**100-108**), ésteres e ácidos carboxílicos (**78-85** e **89-98**) com rendimentos entre 50 e 99%. O segundo capítulo é voltado a expansão da química das diazocetonas insaturadas para o estudo de reações de cicloadição [2+2] e [4+2]. Foi demonstrado o preparo de 13 exemplos (**141-153**) ésteres precursores para reações de cicloadições via rearranjo de Wolff na presença de álcoois alílicos e as tentativas que culminaram na síntese de um cicloaduto de Diels-Alder ($\pm$)**171**. O capítulo 3 foi dedicado ao emprego das diazocetonas α,β -insaturadas para a modificação química específica de proteínas. As diazocetonas foram aplicadas com sucesso para este fim, assim como inspiraram o desenvolvimento de um novo método promissor de bioconjugação seletiva para cisteínas.

Palavras-chave: Diazocetonas insaturadas. Rearranjo de Wolff. Cicloadições. Bioconjugação. Proteínas.

ABSTRACT

BERNARDM DE SOUZA, Barbara. New methodologies in organic synthesis using the Wolff rearrangement from unsaturated diazoketones. 445 pages. Thesis (Doutorado em ciências com ênfase em Química Orgânica e Biológica) – University of Sao Paulo – São Paulo. São Carlos, 2017.

Among the various types of diazocarbonyl substrates found in the literature, α,β -unsaturated diazoketones have shown a number of promising applications as multifunctional intermediates. This thesis is divided into three chapters, aimed at expanding the reactivity of such α,β -unsaturated diazoketones for synthetic chemistry and chemical biology applications. In the first chapter, unsaturated diazoketones (**54-56**) are presented as platforms for the direct synthesis of β,γ -unsaturated amides and esters (17 examples, **61-77**) via a Wolff rearrangement reaction (64-92% yield). When diazoketones derived from amino-aldehyde are substrates, peptidic isosters are obtained, as demonstrated in the efficient synthesis of the nitroxide drug, JP4-039. In the same chapter, a study demonstrating the efficiency of several commercial light sources (CFL and LED) to promote the Wolff rearrangement was described, representing a sustainable alternative to UV lamps for this interesting reaction. Four examples of unsaturated diazoketones (**1, 86-88**) were converted in 27 examples of amides (**100-108**), esters and carboxylic acids (**78-85** and **89-98**) with yields between 50 and 99%. The second chapter sought to expand the chemistry of unsaturated diazoketones for the study of intramolecular [2 + 2] and [4 + 2] cycloaddition reactions. The preparation of the precursor esters (13 examples, **141-153**) for cycloaddition reaction was demonstrated by the Wolff rearrangement in the presence of allylic alcohols, and the attempt then culminated in the synthesis of a Diels-Alder cycloadduct ($\pm$)**171**. Chapter 3 was devoted to the use of α,β -unsaturated diazoketones for the site-specific chemical modification of proteins. These have been successfully demonstrated for this purpose, as well as inspiring the development of a promising new method for selective bioconjugation of cysteines.

Keywords: Unsaturated diazoketones. Wolff rearrangement. Cycloaddition. Bioconjugation. Proteins.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Diversos métodos empregados no preparo de compostos diazocarbonílicos. a) acilação do diazometano; b) transferência de diazo; c-f) outras metodologias.....	26
Esquema 2 Formação de pirazolinas a partir de cloretos de ácidos α,β -insaturados e diazometano.	29
Esquema 3 Preparação de diazocetonas insaturadas por Wotiz e Buco.....	30
Esquema 4 Preparação de α' -diazocetonas α,β -insaturadas por Chapman e Rosenquist.	30
Esquema 5 Método de transferência de diazo desformilativa, descrito por Regitz e Gupta.	31
Esquema 6 Mecanismo de transferência de diazo desformilativa descrita por Regitz.	31
Esquema 7 Metodologia descrita por Danheiser a partir de metil-cetonas α,β -insaturadas.	32
Esquema 8 O método descrito por Aller para a síntese de diazocetonas, utilizando iminofosforanas.	32
Esquema 9 α' -Diazocetonas α,β -insaturadas como dienos em reações de Diels-Alder e síntese de cliclopentenonas.	33
Esquema 10 Reação de benzanelação e síntese total do produto natural Maesanina a partir de diazocetonas insaturadas.....	34
Esquema 11 Diazocetonas insaturadas aplicadas em reações de polimerização.	35
Esquema 12 Síntese de butirolactonas a partir de diazocetonas insaturadas.	35
Esquema 13 Diazocetonas insaturadas em reações multicomponentes.	36
Esquema 14 Adição de aza-Michael na diazocetona insaturada 25.....	37
Esquema 15 Adição de aza-Michael na diazocetona insaturada 28.....	38
Esquema 16 Reagentes de olefinação 31 e 32 de HWE desenvolvidos por Burtoloso.	39
Esquema 17 Preparação dos diazofosfonatos 31 e 32 por Burtoloso e colaboradores.....	40
Esquema 18 Síntese da preussina a partir da diazocetona insaturada 20.	44
Esquema 19 Descoberta do rearranjo por Ludwig Wolff.....	45
Esquema 20 Conversão de diazocetonas em cetenos e seus derivados via Rearranjo de Wolff.	46
Esquema 21 Mecanismo concertado e em etapas.	47
Esquema 22 Evidência de participação de oxirana.....	47
Esquema 23 Competição entre carbeno singlete e tripleto.....	49
Esquema 24 Reação de Homologação de Arndt-Eistert e contração de anéis.	50
Esquema 25 Homologação de Arndt-Eistert aplicada na síntese de produtos naturais.	51
Esquema 26 Objetivo 1 e 2: Metodologia para a síntese de amidas, ciclobutanos e cicloexenos.	53
Esquema 27 Conceito-chave: rearranjo de Wolff a partir de diazocetonas α,β -insaturadas permitindo a modificação local seletiva de proteínas.....	54
Esquema 28 Síntese em 6 etapas do composto JP4-039 por Wipf.	57
Esquema 29 Síntese de diazocetonas α,β -insaturadas a partir de aldeídos.	58
Esquema 30 Síntese das amidas β,γ -insaturadas a partir das diazocetonas α,β -insaturadas 55 e 56.	60
Esquema 31 Síntese do nitróxido JP4-039 em duas etapas a partir do (S)-N-Boc-Leucinal 60.....	64

Esquema 32 Dois exemplos mostrando aquecimento e excesso de catalisador ou de sais de prata.	65
Esquema 33 Lâmpadas CFL aplicadas no rearranjo de Wolff.	66
Esquema 34 Rearranjo de Wolff fotoquímico a partir da diazocetona 1 na presença de diferentes nucleófilos oxigenados.	69
Esquema 35 Disposição experimental do Rearranjo de Wolff usando lâmpadas de LED.	70
Esquema 36 Amidas obtidas usando lâmpada LED para promover o rearranjo de Wolff.	71
Esquema 37 Síntese do composto JP4-039 usando lâmpada LED e de alta pressão de mercúrio.	72
Esquema 38 Expansão da química das diazocetonas insaturadas para a síntese de ciclobutanos e cicloexenos substituídos.	75
Esquema 39 Exemplos de produtos naturais contendo ciclobutanos e cicloexanos.	75
Esquema 40 Cicloadição [2+2] intramolecular descrito por Padwa e Colaboradores.	77
Esquema 41 Diazocetonas insaturadas preparadas para o estudo de cicloadição [2+2] e [4+2].	78
Esquema 42 Diazocetona 53 obtida a partir da reação de HWE a partir do fenilglioal 121.	79
Esquema 43 Preparo do fenilglioal 121 a partir da oxidação da acetofenona 122 com SeO ₂ .	80
Esquema 44 Obtenção da diazocetona 53 via acilação do diazometano.	83
Esquema 45 Rotas alternativas para a obtenção da diazocetona 53 a partir dos aldeídos 127 e 128.	84
Esquema 46 Rota para a síntese do aldeído 127.	84
Esquema 47 Obtenção dos aldeídos 128 e 140.	85
Esquema 48 Ésteres insaturados 141-533 obtidos através do rearranjo de Wolff na presença dos álcoois 154-159.	86
Esquema 49 Obtenção dos álcoois 157 e 158.	86
Esquema 50 Obtenção do éster 150 a partir de 113 e 158.	87
Esquema 51 Reação de isomerização E/Z promovida por luz.	89
Esquema 52 Substratos explorados por Padwa em fotocicloadições [2+2].	93
Esquema 53 Tentativa de Rearranjo de Wolff a partir da diazocetona 53.	93
Esquema 54 Resumo das reações de cicloadições testadas.	94
Esquema 55 Substratos da série G-J a serem testados nas reações de Diels-Alder.	97
Esquema 56 Reação de Diels-Alder a partir de 150: produtos endo-171 e exo-171.	99
Esquema 57 Reação de Diels-Alder a partir do substrato 122.	104
Esquema 58 Compostos carbonilacrílicos como reagentes para modificação específica de proteínas.	107
Esquema 59 Métodos para bioconjugação de cisteínas.	110
Esquema 60 Reação do éster carbonilacrílico 174 com cisteína 173 e lisina 174.	111
Esquema 61 Adição de Michael nas posições α e β do reagente carbonilacrílico.	113
Esquema 62 Adição de N-Boc-Cis-OMe 173 nos reagentes carbonilacrílicos 178-180.	114
Esquema 63 Síntese dos tioéteres 184 e 185.	117
Esquema 64 Estabilidade do aduto de Michael 179 na presença de glutatona 186.	118
Esquema 65 Comprovação de seletividade através do reagente de Ellman's 187.	122
Esquema 66 Síntese dos reagentes carbonilacrílicos funcionalizados 194 e 195.	124

Esquema 67 Bioconjugação da Annexina V, C2Am e albumina com os reagentes 194 e 195.	124
Esquema 68 Diazo-lisozima empregada em reações de cicloadição 1,3-dipolar com ciclooctinos...	131
Esquema 69 Exemplos de diazocompostos aplicados na modificação de proteínas.	132
Esquema 70 Reações bioortogonais a partir de diazocompostos.	132
Esquema 71 Reação de adição de cisteína 173 na diazocetona 53.....	133
Esquema 72 Reação entre a diazocetona 1 e N-Boc-Cis-OMe 173 em acetonitrila.....	135
Esquema 73 Testes químicos de Ellman's com os conjugados de Annexina V-53.	136
Esquema 74 Condições testadas para a inserção de benzilamina na Annexina V-53.	138
Esquema 75 Tentativa de obtenção do aduto 196 via acilação do diazometano com ácido 201.	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Exemplos de transformações mediadas por compostos diazocarbonílicos.	27
Figura 2 Versatilidade das diazocetonas insaturadas.	28
Figura 3 Exemplos de diazocetonas α,β -insaturadas preparadas pela metodologia desenvolvida por Burtoloso e colaboradores empregando aldeídos e os diazofosfonatos 31 e 32.	41
Figura 4 Conversão de diazocetonas insaturadas em heterocíclios nitrogenados	43
Figura 5 Diazocetonas insaturadas como blocos de construção para a síntese de heterocíclicos de nitrogênio.	44
Figura 6 Estrutura de um carbeno singleto e tripleto.	48
Figura 7 Exemplos de produtos naturais sintetizados por contração de anel via Rearranjo de Wolff.	52
Figura 8 a) JP4-039 inspirado no agente protetor XJB-5-131 com base na estrutura molecular do antibiótico gramicidina S. b) isômero (E)-alceno	57
Figura 9 Espectro de RMN ^1H e expansão do espectro de IV obtido para a diazocetona 56 a partir do aldeído 60 (mistura de rotâmeros) em CDCl_3 , 500 MHz.	59
Figura 10 Espectro de RMN ^1H e expansão do espectro de IV obtido para o ester β,γ -insaturado 62 a partir da diazocetona 56 após rearranjo de wolff na presença de anilina.	61
Figura 11 Estudos de HPLC quiral. A: composto racêmico; B: composto quiral a partir de N-Boc-L-leucinal.	62
Figura 12 Síntese de várias amidas β,λ -insaturadas em duas etapas a partir de aldeídos.	63
Figura 13 Espectro de RMN ^1H e ^{13}C para a diazocetona 1 e o éster 56	68
Figura 14 Uso de diferentes nucleófilos de oxigênio e diferentes diazocetonas para o rearranjo de Wolff usando LED	70
Figura 15 Diferentes substratos propostos para a reação de Cicloadição [2+2] e [4+2].	76
Figura 16 Espectro de RMN ^1H , ^{13}C e IV da diazocetona 53.	82
Figura 17 Espectro de RMN ^1H para o isômero Z 123.	82
Figura 18 Espectro de RMN ^1H obtido para o ester β,γ -insaturado 145 a partir da diazocetona 1 após rearranjo de Wolff na presença do álcool 157.	88
Figura 19 Espectros de RMN dos produtos de isomerização E/Z.	90
Figura 20 Espectro de RMN ^1H do produto 146, de isomerização 167 e 167a antes e após fotólise.	92
Figura 21 Diagrama de energia para a a) reação de isomerização E/Z b) dimerização ou eletrociclicações.	96
Figura 22 Formação dos produtos endo-171 e exo-171.	99
Figura 23 Análise de GC-MS: endo/exo 171 (m/z 286) em uma proporção de 1:1	100
Figura 24 Atribuições da estrutura para o composto endo-171.	101
Figura 25 Espectro de ^1H e ^{13}C para o éster 150 e o produto de Diels-Alder 171.	102
Figura 26 Expansão região dos hidrogênios olefinicos do espectro de RMN ^1H do trieno 150.	102
Figura 27 Análise estereoquímica relativa dos produtos endo-171 e exo-171.	103
Figura 28 Adição conjugada de metil tiolato na maleimida e nos reagentes carbonilacrílicos.	112

Figura 29 Velocidade de reação relativa calculada e resultados experimentais da adição de SMe^- nos derivados carbonilacrílicos 174, 178-180.	113
Figura 30 Determinação experimental da constante de velocidade de segunda ordem.	115
Figura 31 Experimento de competição de adição entre 174, 179 e N-metilmaleimida em 173.	116
Figura 32 Comparação de estabilidade dos derivados 184 e 185.	118
Figura 33 Reação de bioconjugação entre a Annexina V e a amida 179.	120
Figura 34 Proteínas avaliadas para bioconjugação com 179.	121
Figura 35 Análise da estabilidade do conjugado albumina-179 e avaliação das propriedades de ligação da albumina modificada e não modificada com do receptor neonatal FcRn via SPR.	123
Figura 36 Análise SDS-PAGE do conjugado C2Am-194.	124
Figura 37 Imagens fluorescentes das células HEK293 apoptóticas e não apoptóticas (controle) após marcação com o conjugado Annexina V-194.	126
Figura 38 Bioconjugação quimiosseletiva e equimolar do Trastuzumab com 179 e 194. Espectro de massas para a cadeia leve do anticorpo antes e após conjugação.	127
Figura 39 Curvas BLI para o Trastuzumab-179, não modificado e as constantes K_D obtidas.	128
Figura 40 Percentagem de células reveladas (filtro FITC) após o tratamento das células com o Trastuzumab fluorescente e não fluorescente.	129
Figura 41 Espectro de RMN ^1H e de IV do aduto de Michael 196.	134
Figura 42 Espectro de RMN ^1H para a reação entre a diazocetona 1 e N-Boc-Cis-OMe 173.	135
Figura 43 Bioconjugação da Annexina V com a diazocetona 53.	136
Figura 44 Cromatograma obtido por análise HPLC para a diazocetona 56.	155
Figura 45 Cromatograma obtido por análise HPLC para a diazocetona 62.	161
Figura 46 Cromatograma obtido para a separação dos isômeros endo/exo 171 por HPLC.	221
Figura 47 Experimento de competição entre 174, 179 e maleimida.	229
Figura 48 Estabilidade por RMN ^1H do aduto de Michael 179 na presença de GSH 186.	231
Figura 49 Estabilidade por HRMS do aduto de Michael 179 na presença de GSH 186.	232
Figura 50 Comparação de estabilidade dos derivados cromogênicos 184 e 185.	235
Figura 51 Análise de LC-MS obtida para as reações de bioconjugação (exemplo albumina).	241
Figura 52 Análise LC-MS para a Annexina V-Cis316	242
Figura 53 Análise LC-MS para a C2Am.	243
Figura 54 Análise LC-MS para a albumina.	245
Figura 55 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e 174 após 27 h e 3 dias.	246
Figura 56 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e 178 após 27 h e 3 dias.	247
Figura 57 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e 179 após 27 h.	248
Figura 58 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e 174 após 27 h.	249
Figura 59 Análise LC-MS da reação entre Annexina V-Cis316 com o reagente de Ellman's 187.	250
Figura 60 Análise de LC-MS da reação entre Annexina V-CisEllman's 316 com 179.	251
Figura 61 Análise LC-MS da reação entre Annexina V-Cis-179 com o reagente de Ellman's 187.	252
Figura 62 Análise LC-MS da reação da C2Am-Cis-78 com 179.	253
Figura 63 Análise de MSMS para o conjugado C2Am-179.	255

Figura 64 Análise LC-MS da reação da albumina com 179.	256
Figura 65 Estabilidade do conjugado de albumina-179 em plasma humano.	257
Figura 66 Experimento de SPR mostrando a afinidade de ligação da albumina não modificada e albumina-179 com o receptor FcRn.	259
Figura 67 Reação da albumina com o fluorescente 194.	260
Figura 68 Reação da albumina com o reagente PEG-195.	261
Figura 69 Reação da C2Am com o fluorescente 194.	262
Figura 70 Reação da Annexina V com o fluorescente 194.	263
Figura 71 ESI-MS da cadeia pesada do trastuzumab (50594) após redução com 10 equiv. de TCEP.	265
Figura 72 ESI-MS da cadeia leve do Trastuzumab após a reação com 179 por 1 h em RT.	266
Figura 73 ESI-MS da cadeia pesada do Trastuzumab (50595) após a reação com 179 por 1 h em RT.	266
Figura 74 Determinação da atividade de ligação do anticorpo com o receptor HER2 por ELISA.	268
Figura 75 Determinação da constante de ligação (K_D) do anticorpo.	269
Figura 76 Análise SDS-PAGE do trastuzumab 194.	271
Figura 77 Análise SDS-PAGE do conjugado C2Am-194.	272
Figura 78 Análise SDS-PAGE do conjugado Annexina V-194.	273
Figura 79 Análise SDS-PAGE do conjugado albumina-194.	274
Figura 80 Bioconjugação da Annexina V-Cis316 com a diazocetona 53.	277
Figura 81 Reação do conjugado de Annexina V-CisEllman's-187 com a diazocetona 53.	278
Figura 82 Reação do conjugado Annexina V-Cis316-53 com o reagente de Ellman's 187.	279
Figura 83 Espectros de RMN ^1H para a adição de 173 na diazocetona 1 em CDCl_3	280
Figura 84 Espectros de RMN ^1H para a adição de 173 na diazocetona 1 em $\text{CDCl}_3/\text{NaP}_i$ (pH 8.0, 50 mM) deuterado.	281
Figura 85 Estruturas calculadas (menor energia) para os compostos 174, 178-180 e maleimida.	283

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Rearranjo de Wolff usando lâmpadas CFL e LED como fontes luminosas.	67
Tabela 2 Condições de HWE estudadas a partir do cinamaldeído 119.	78
Tabela 3 Estudo da reação de HWE a partir do fenilglioxal 89	80
Tabela 4 Isomerização de 141 e 146 em meio básico.	91
Tabela 5 Condições Diels-Alder térmicas a partir de 151 e 153.....	97
Tabela 6 Condições Diels-Alder estudadas a partir de 150.....	98
Tabela 7 Condições da reação de Diels-Alder catalisada por ácido de Lewis.	104
Tabela 8 Bioconjugação de cisteínas em proteínas com 174, 178-180.	119
Tabela 9 Condições testadas para a ciclopropanação da Annexina V-53.	138
Tabela 10 Energias, entropias e frequências das estruturas calculadas de menor energia. ^a	284

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

[α] – Rotação específica (deg.mL/g.dm)
ADC – *Antibody-drug-conjugate*
AcOH – Ácido acético
AcOEt – Acetato de etila
AIBN – 2,2'-azobis(isobutironitrila)
aq. – Aquoso
Atm – Atmosfera
ATR – *Attenuated total reflectance*
BLI – *Biolayer interferometry*
Bn – Benzil
BSA - Albumina de soro bovino
Cbz – Carbobenzil
Boc – *Tert*-butóxicarbonil
Bu – Butil
t-Bu – *Tert*-butil
cm⁻¹ – Número de onda
C2Am – *C2A domain of Synaptotagmin-I*
CCl₄ – Tetracloreto de carbono
CDI - 1,1'-Carbonildiimidazol
CFL - Compact fluorescent lamp
CG – Cromatografia gasosa
COSY – *Homonuclear correlation spectroscopy*
D – Densidade
d – Dubleto (RMN) ou *d* (deuterado)
DBU – 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DBN – 1,5-diazabicyclo(4.3.0)no-5-eno
DCC – *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida
dd – Duplo dubleto
ddd – Duplo duplo dubleto
DFT - *Density functional theory*
DIBAL – Hidreto de diisobutilalumínio

dhAA – Ácido dehidroascórbico
DIPEA – *N,N*-Diisopropiletilamina
DMAP – 4-(dimetilamino)piridina
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (meio de cultura celular)*
DMF – *N,N*-dimetilformamida
DMP – Periodinana de Dess-Martin
DMSO – Dimetil sulfóxido
DNA – Ácido deoxiribonucleico
dt – Duplo triplete
EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético
EI – Ionização por impacto de elétron
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
Equiv. - Equivalentes
Et – Etil
ET – Estado de transição
Et₂O – Éter dietílico
ESI – Ionização por electrospray
eV – Elétron volt
FBS - *Fetal Bovine Serum*
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
g – Grama(s)
GSH - Glutathione
h – Hora(s)
HEK293 – *Human Embryonic Kidney 293 cells*
Hz – Hertz
HPLC – *High-performance liquid chromatography*
HRMS – *High-resolution mass spectrometry*
HOMO - *Highest occupied molecular orbital*
HOBt – 1-Hidróxibenzotriazól
HPR – Enzima *Horseadish peroxidase*
HWE – Horner-Hadsworth-Emmons
Hz – Hertz
IBCF – Isobutil cloroformato
ICS – Intersystem crossing

IEF – *Integral equation formalism*
IgG - *Immunoglobulin G*
IV – Infavermelho
K – Quilo(s)
L – Litro(s)
LDA - Diisopropilamida de lítio
LED - Light-emitting diode
LUMO - *Lowest unoccupied molecular orbital*
J – Constante de acoplamento (em RMN)
MHz – Megahertz
M – mol.L⁻¹ (mol por litro)
m/z – razão massa/carga
M⁺ – *Parent molecular ion*
m-CPBA – ácido meta-cloroperbenzóico
Maj – Majoritário
Me – Metil
Min – Minoritário
m – Multiplete
Me –Metila
MHz – MegaHertz
NaP_i – Tampão de fosfato de sódio
NMO – *N*-metilmorfolina-*N*-óxido
NBS – *N*-Bromosuccinimida
nOe – Nuclear Overhauser effect
Nu – Nucleófilo
PBS – Tampão fosfato salino
PCC – Piridínio clorocromato
PCM – *Polarizable continuum model*
Ph – Fenil
ppm – Partes por milhão
PPTS – *p*-Toluenosulfonato piridina
i-Pr - Isopropil
Py – Piridina
P.F – Ponto de fusão

R_f – Fator de retenção

RMN de ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s – Singleto

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

sl – Singleto largo

SPR – *Surface Plasmon Resonance*

t – Tripleto

t.a – Temperatura ambiente

TBS – Terc-butildimetilsilil

TCEP – (tris(2-carboxietil)fosfina)

td – Tripleto de dubletos

THF – Tetraidrofurano

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TMS – Trimetilsilil ou tetrametilsilano

TOF – *Time of flight*

TLC – (analítica) *Thin Layer Chromatography*

TrisHCl – Tampão de hidrocloreto de Tris

Tween – Detergente de lavagem polissorbato

UV – Ultravioleta

δ – Deslocamento químico em ppm relativo ao solvente prótico

ν – Número de onda

Vis – Visível

A representação utilizada para a separação decimal nesta tese foi o ponto.

1,2	⇔	1.2
-----	---	-----

Sumário

1 Introdução	25
1.1 Preparo de α'-diazocetonas α,β-insaturadas	29
1.2 Aplicações das Diazocetonas α,β-insaturadas.....	33
1.3 Recentes avanços na síntese de α'-diazocetonas α,β-insaturadas.....	38
<i>1.3.1 Diazofosfonatos como novos reagentes de olefinação</i>	<i>39</i>
1.4 Diazocetonas α,β-insaturadas como blocos de construção em síntese	42
1.5 Rearranjo de Wolff.....	45
<i>1.5.1 Aspectos mecanísticos do Rearranjo de Wolff.....</i>	<i>46</i>
<i>1.5.2 Aplicações do rearranjo de Wolff.....</i>	<i>49</i>
2 Objetivos	53
3 Diazocetonas insaturadas como substratos para o rearranjo de Wolff	55
3.1 Agente bioprotetor JP4-039.....	56
<i>3.1.1 Síntese das amidas β,γ-insaturadas e do composto JP4-039</i>	<i>58</i>
3.2 Rearranjo de Wolff promovido por diferentes fontes luminosas	64
<i>3.2.1 Avaliando a fonte luminosa: síntese de amidas e ésteres</i>	<i>66</i>
3.3 Conclusões parciais.....	73
4 Diazocetonas insaturadas como precursoras de reações de cicloadições [2+2] e [4+2]	74
4.1 Preparo dos substratos para as cicloadições [2+2] e [4+2]	77
4.2 Cicloadições [2+2]	89
<i>4.2.1 Aspectos mecanísticos da fotoisomerização E/Z</i>	<i>94</i>

4.3 Cicloadições [4+2]	96
4.3 Conclusões parciais.....	105
5 Diazocetonas insaturadas como reagentes para modificação de proteínas	106
5.1 Modificação de proteínas	107
5.1.2 Estratégias para bioconjugação de proteínas	108
5.2 Reagentes carbonilacrílicos.....	109
5.2.1 Construção de modelos de aminoácidos	110
5.2.3 Otimização da reação de bioconjugação de proteínas	118
5.2.4 Bioconjugação de anticorpos com derivados carbonilacrílicos	126
5.3 Reagentes diazocarbonilacrílicos.....	130
5.3.1 Adição de tio-Michael no reagente diazocarbonilacrílico	133
5.3.2 Bioconjugação de proteínas com o reagente diazocarbonilacrílico 53	135
5.3.3 Reações bioortogonais mediadas por carbeno/carbenóide	137
5.4 Conclusões parciais.....	140
6 Experimental.....	141
6.1 Considerações gerais	141
6.2 Procedimento para o preparo do diazofosfonato 32	145
6.3 Procedimento geral para a reação de Horner-Wadsworth-Emmons.....	146
6.3.1 Procedimento usando NaOH/EtOH.....	146
6.3.2 Procedimento usando NaH/THF	150
6.3.3 Procedimento usando DIPEA/LiCl.....	156
6.4 Procedimento geral para o rearranjo de Wolff na presença de aminas (lâmpada de Xe).....	158
6.4.1 Síntese do nitróxido JP4-039	176
6.4.2 Procedimento para redução do JP4-039 com ácido ascórbico	177
6.4 Procedimento geral para Rearranjo de Wolff usando lâmpada de LED.....	182
6.6.1 Método A: Usando os álcoois como solvente.....	182
6.6.2 Método B: Usando acetato de etila como solvente	193
6.6.3 Método C: Usando álcoois alílicos em acetonitrila (LED ou Xenônio)	205
6.7 Reação de Diels-Alder a partir de 150	220
6.8 Síntese dos reagentes carbonilacrílicos.....	222
6.9 Procedimento geral para a adição de Michael.....	225
6.10 Estudos de seletividade.....	228
6.11 Experimento de competição entre 174 , 179 , N-metilmaleimida	229
6.12 Estudos de estabilidade	230
6.12.1 Estabilidade na presença de glutathione (GSH)	230
6.12.2 Análise de retro-Michael por UV-VIS.....	233
6.12.3 Procedimento para avaliação de estabilidade dos compostos 184 e 185	235
6.13 Síntese dos derivados fluorescentes 194 e PEG 195	236
6.13.1 Síntese do derivado fluorescente 194	236
6.13.2 Síntese do derivado PEG 195	239
6.14 Método geral para análise de LC-MS.....	240
6.15 Análise do produto de conjugação de proteínas usando LC-MS	241
6.16 Proteínas utilizadas: Annexina V, C2Am e albumina.....	242
6.16.1 Annexina V-Cis316.....	242
6.16.2 C2Am-Cis78	243
6.16.3 Albumina-Cis34	244

6.17 Procedimento para a bioconjugação com Annexina V-Cis316.....	246
6.18 Controles químicos	250
6.18.1 <i>Reação de Ellman's com Annexina V-Cis316</i>	250
6.18.2 <i>Reação da Annexina V-SS-Ellman's com 179</i>	251
6.18.3 <i>Reação do Conjugado Annexina-179 com o reagente de Ellman's</i>	252
6.19 Procedimento para bioconjugação de C2Am-Cis78	253
6.20 Análise de MS/MS do conjugado C2Am-179.....	254
6.21 Procedimento para bioconjugação da Albumina-Cis34	256
6.22 Estabilidade do conjugado albimina em plasma.....	257
6.23 Afinidade de ligação da albumina-179 com o receptor FcRn	258
6.23.1 <i>Resumo de Imobilização</i>	258
6.23.2 <i>Método de Imobilização.....</i>	258
6.23.3 <i>Método de análise de ligação em pH 5.5</i>	259
6.23.4 <i>Método para análise de cinética</i>	259
6.24 Reação de bioconjugação entre albumina e o composto fluorescente 194.....	260
6.25 Reação de bioconjugação entre albumina e o reagente PEG 195.....	261
6.26 Reação de bioconjugação entre C2Am e o reagente fluorescente 194	262
6.27 Bioconjugação da Annexina V-Cis316 com o reagente fluorescente 194.....	263
6.28 Procedimento para bioconjugação do Trastuzumab.....	264
6.28.1 <i>Redução de dissulfetos</i>	264
6.28.2 <i>Re-oxidação dos dissulfetos.....</i>	265
6.28.3 <i>Reação de bioconjugação com 179</i>	266
6.29 Citometria de fluxo	267
6.29.1 <i>Condições de cultura de célula</i>	267
6.29.2 <i>Determinação da especificidade do Trastuzumab-194</i>	267
6.30 Experimento de ELISA	268
6.31 Experimento de BLI.....	269
6.32 Gel NuPAGE® Bis-Tris.....	270
6.33 Estudos de Microscopia	275
6.33 Procedimento para o preparo do aduto 196.	276
6.34 Procedimento para bioconjugação da Annexina V com a diazocetona 53.....	277
6.36 Reação da Annexina V-88 com o reagente de Ellman's 187	279
6.37 Reações de adição de Michael acompanhadas por RMN ¹H.....	280
6.38 Cálculos DFT.....	282
7 Referências	291
8 Anexos	311

1 Introdução

Desde a síntese do diazoacetato de etila, primeira substância alifática contendo o grupo diazo em 1883 por Curtius,¹ mais de um século se passou e a química dos compostos diazocarbonílicos continua progredindo e avançando nas mais diversas áreas da química. Múltiplos são os relatos descritos na literatura no que diz respeito ao seu preparo, propriedades físicas e químicas, bem como em suas numerosas e variadas aplicações.ⁱ

Embora descobertos em 1883 por Curtius¹ e aplicados em 1912 por Ludwig Wolff^{2,3} no rearranjo que hoje leva seu nome, os compostos diazocarbonílicos passaram despercebidos até 1927, ano em que Arndt e Eistert⁴ desenvolveram o primeiro protocolo geral para o seu preparo envolvendo a acilação do diazometano com cloretos de acila. Com o desenvolvimento concomitante do uso de anidridos mistos como agentes acilantes, este protocolo se tornou a rota mais importante para síntese de α -diazocompostos terminais a partir de ácidos carboxílicos (Esquema 1, a). Alguns anos mais tarde, com a necessidade de sintetizar os derivados cíclicos (bem como alguns sistemas acíclicos não acessados pelo método tradicional), a técnica de transferência diazo foi então desenvolvida por Regitz.⁵ Esse método, que envolve o uso de compostos carbonílicos com relativa acidez na posição α (por exemplo, compostos 1,3-dicarbonilados e compostos carbonílicos/carboxílicos com grupos aril na posição α), uma base e uma sulfonil azida, leva a vantagem de ser brando e de evitar o uso de diazometano (Esquema 1, b). Outros métodos menos usuais (Esquema 1, c-f, respectivamente), embora não menos importantes, incluem a reação de Forster, diazotação de aminocetonas e aminoésteres, desidrogenação e decomposição de tosíl-hidrazonas (reação de Bamford-Stevens). Algumas variações destas metodologias surgiram ao longo dos anos envolvendo basicamente a modificação dos protocolos experimentais e a utilização de reagentes alternativos.

ⁱ Páginas 25 – 44: reproduzido em partes com permissão a partir de Burtoloso, A. C. B.; Dias, R. M. P.; Bernardim, B. α,β -Unsaturated Diazoketones as Useful Platforms in the Synthesis of Nitrogen Heterocycles. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48 (4), 921–934.

a Acilação do diazometano

b Transferência de diazo

c-f Outras metodologias

Esquema 1 Diversos métodos empregados no preparo de compostos diazocarbonílicos. a) acilação do diazometano; b) transferência de diazo; c-f) outras metodologias.

Após o desenvolvimento dos dois principais protocolos para a síntese de um composto diazocarbonílico (acilação do diazometano e transferência de diazo), o desenvolvimento da química foi rápida e um crescimento exponencial de novas metodologias e aplicações emergiu na literatura.⁶⁻¹² Conforme representado na Figura 1, inserção de ligações polares (O-H, N-H, P-H, S-H, Se-H) e não polares (C-H, Si-H) catalisadas por metais de transição, homologação de cadeia e contração de anel através do rearranjo de Wolff, ciclopropanações, formação de ilídeos e cicloadições são algumas de uma infinidade de transformações que os compostos diazocarbonílicos podem mediar (Figura 1).

Figura 1 Exemplos de transformações mediadas por compostos diazocarbonílicos.

Embora uma grande variedade estrutural possa ser alcançada atualmente a partir dos protocolos de transferência diazo e acilação de diazometano, uma lacuna ainda existe no que se refere aos casos mais peculiares, como por exemplo, as versáteis diazocetonas α,β -insaturadas. Este tipo de composto diazocarbonílico pode desempenhar um papel promissor como reagentes multifuncionais. Contendo uma ligação dupla, uma cetona e uma função diazo na mesma molécula, estes substratos podem atuar como importantes blocos de construção em síntese orgânica. Além de todas as reações pertinentes aos compostos carbonílicos (redução, adição nucleofílicas entre outras), a insaturação pode ser funcionalizada, por exemplo, através de reações de diidroxilação, aminodiidroxilação, epoxidação, adições de Michael e em reações de Diels-Alder (Figura 2). Neste caso, a função diazo pode ainda mediar todas as reações pertinentes aos compostos diazocarbonílicos previamente descritas na Figura 1 da presente introdução.

Figura 2 Versatilidade das diazocetonas insaturadas.

Considerando a grande variedade de transformações que os compostos diazocarbonílicos insaturados podem propiciar, métodos que forneçam estes substratos de forma eficiente e com vasta diversidade estrutural são de grande valia. Enquanto a literatura descreve milhares de exemplos envolvendo a síntese e aplicação de diazocetonas saturadas e aril-diazocetonas,^{6,8,13} apenas alguns estudos têm se dedicado aos seus derivados insaturados. Basicamente, este fato se deve à grande dificuldade em sua síntese. Por exemplo, ao menos que sejam utilizados cloretos de acila ou anidridos mistos insaturados substituídos na dupla ligação, a preparação de diazocetonas insaturadas pela clássica acilação do diazometano fornece rendimentos pouco satisfatórios. Neste caso, pirazolinas são formadas como produtos principais provenientes de uma cicloadição 1,3-dipolar entre o diazometano e a ligação dupla conjugada (Esquema 2).

Na seção que se segue, um breve histórico será apresentado ilustrando a evolução dos métodos para a preparação de diazocetonas α,β -insaturadas.

Esquema 2 Formação de pirazolinas a partir de cloretos de ácidos α,β -insaturados e diazometano.

1.1 Preparo de α' -diazocetonas α,β -insaturadas

A partir de 1936, ano em que Grundmann¹⁴ reportou a primeira tentativa de se preparar uma diazocetona α,β -insaturada a partir da reação entre diazometano e cloretos de ácidos α,β -insaturados, a química destas promissoras diazocetonas permaneceu durante muito tempo ligada essencialmente aos derivados pirazolínicos (Esquema 2). Embora a funcionalidade “diazocetona” tenha sido formada, a ligação dupla reage completamente com o diazometano utilizado. Contendo um cloreto de ácido e uma dupla ligação conjugada na mesma molécula, os derivados α,β -insaturados possuem dois sítios reativos frente diazoalcanos, levando à formação de misturas isoméricas de pirazolinas provenientes da reação de cicloadição [3+2]. Esta observação inspirou Wotiz e Bucu¹⁵, em 1955, para o desenvolvimento de um estudo mais aprofundado da mesma transformação utilizando cloretos de ácidos derivados do ácido cinâmico (*p*-H, *p*-OMe, *p*-NO₂) (Esquema 3). Novamente pirazolinas foram formadas como produtos principais. Entretanto, usando-se soluções bastante diluídas, um rendimento de 24% da diazocetona insaturada **1** (*p*-H) foi obtido. No caso do substrato (*p*-OMe), a diazocetona **2** não pôde ser formada. No mesmo ano, Moore¹⁶ avaliou a estabilidade e as características das pirazolinas derivadas de diazoacetatos e diazocetonas α,β -insaturadas, bem como a viabilidade de suas reações subsequentes na presença de HCl e benzoato de prata/MeOH para o Rearranjo de Wolff.

Esquema 3 Preparação de diazocetonas insaturadas por Wotiz e Buco.

Uma maneira interessante de se evitar a formação das pirazolinas foi descrita em 1976 por Chapman e Rosenquist.¹⁷ A ligação dupla, previamente “protegida”, foi formada posteriormente à formação da diazocetona. Neste trabalho, a acilação do diazometano na presença de cloretos de ácido contendo um átomo de bromo na posição β , seguida de eliminação na presença da base DBU, forneceu quatro exemplos de diazocetonas insaturadas em rendimentos variando entre 32 e 77% (Esquema 4).

Esquema 4 Preparação de α' -diazocetonas α,β -insaturadas por Chapman e Rosenquist.

No que diz respeito à formação de diazocetonas α,β -insaturadas via transferência de diazo, o primeiro trabalho relatado neste sentido foi publicado por Regitz¹⁸ e colaboradores em 1970 (Esquema 5). Neste trabalho, várias cetonas α,β -insaturadas foram ativadas na presença de formiato de etila **3** para fornecer compostos 1,3-dicarbonilados após uma condensação de Claisen (Esquema 5). Estes compostos 1,3-dicarbonilados foram convertidos nas respectivas diazocetonas após uma reação de transferência diazo e subsequente desformilação através da fragmentação de um intermediário triazolínico (Esquema 6). Cabe frisar, que esta transferência de diazo desformilativa, inicialmente descrita por Regitz em 1964 para diazocetonas saturadas,^{5,19,20} foi uma importante contribuição porque cetonas simples geralmente não reagem diretamente com sulfonil azidas. Quatro anos mais tarde, Gupta²¹ propôs a substituição do formiato de etila por oxalato de dietila na etapa de condensação de Claisen. Esta modificação permitiu uma melhora nos rendimentos

obtidos. Como por exemplo, a obtenção da diazocetona **1** (R = Ph) em 75% de rendimento.

Esquema 5 Método de transferência de diazo desformilativa, descrito por Regitz e Gupta.

Esquema 6 Mecanismo de transferência de diazo desformilativa descrita por Regitz.

Embora o método desenvolvido por Regitz e Gupta tenha representado um grande avanço no preparo das diazocetonas α,β -insaturadas, esta metodologia desformilativa não foi muito difundida na literatura devido principalmente às condições reacionais drásticas empregadas (Na, EtOH ou benzeno, temperatura ambiente, 12-48 horas), bem como pela baixa regioseletividade na formação dos enolatos antes da condensação de Claisen (neste caso, refere-se aos derivados saturados). Em 1990, muitas das limitações mencionadas acima foram solucionadas com o desenvolvimento da metodologia proposta por Danheiser.^{22,23} Este método, um tipo diferente de transferência de diazo destrifluoracetilativa, é eficiente tanto para sintetizar diazocetonas saturadas como insaturadas. Esta modificação do método do Regitz consiste em empregar condições cinéticas (LiHMDS, -78 °C, 30 minutos) para gerar enolatos de metil-cetonas e o uso trifluoroacetato de 2-trifluoroetila como o agente de acetilação (Esquema 7). Na verdade, esta transferência de diazo

destrifluoracetilativa foi descrita anteriormente por Doyle em um único exemplo,²⁴ embora usando LDA como base e não se estendendo para diazocetonas insaturadas. Com a modificação de Danheiser seis exemplos (**4a-f**, Esquema 7) foram preparados, provando ser um protocolo superior e mais geral para a preparação de α' -diazocetonas α,β -insaturadas.

Esquema 7 Metodologia descrita por Danheiser a partir de metil-cetonas α,β -insaturadas.

Outro método interessante para se alcançar diazocetonas sem a necessidade de utilização de diazometano ou azidas foi descrito por Aller²⁵ e colaboradores em 2000 (Esquema 8). O método consiste na acilação de uma cianoiminofosforana com cloretos de acila, que após hidrólise, leva a formação de cloretos de hidrazoílas. Estes cloretos, em seguida, são convertidos em diazocetonas após o tratamento com cloreto de tosilato catalítico. Embora um único exemplo para a síntese da diazocetona α,β -insaturada **1** ($\text{R} = \text{Ph}$, 75% de rendimento) foi descrito, o método é interessante e tem potencial para ser estendido a outras diazocetonas insaturadas.

Esquema 8 O método descrito por Aller para a síntese de diazocetonas, utilizando iminofosforanas.

1.2 Aplicações das Diazocetonas α,β -insaturadas

Conforme mencionado anteriormente, em contraste com as diversas aplicações sintéticas encontradas na literatura a partir de diazocetonas saturadas ou aril-diazocetonas, poucos são os exemplos envolvendo seus derivados insaturados.²⁶⁻⁴³ Os esquemas 9-15 ilustram de forma resumida e esquemática os principais exemplos onde essas diazocetonas são empregadas como plataformas em síntese. A primeira aplicação sintética de uma diazocetona insaturada como substrato foi descrita em 1981, quando Regitz aplicou a diazocetona **5** como dieno em reações de Diels-Alder (Esquema 9).²⁶ Embora a função diazocetona não tenha sido posteriormente modificada, este exemplo merece ser citado devido ao fato de ter sido o primeiro a fazer uma transformação a partir destes compostos multifuncionais. Wenkert²⁹ empregou diazocetonas α,β -insaturadas (β,β -dialquiladas), como por exemplo a substrato **8**, na preparação direta de ciclopentenonas. Empregando como catalisador o acetato de ródio, ciclopentenonas foram obtidas em 47-65% de rendimento após uma reação de inserção C-H (Esquema 9).

Esquema 9 α' -Diazocetonas α,β -insaturadas como dienos em reações de Diels-Alder e síntese de ciclopentenonas.

Danheiser empregou diazocetonas insaturadas para preparar vinilcetenos que, após captura por alcinos, levou a uma reação de benzanelação em cascata (Esquema 10).³¹ Esse método permitiu a preparação de vários anéis aromáticos com um alto grau de substituição, principalmente fenóis. Em uma publicação posterior, o problema associado com a instabilidade de alguns vinilcetenos foi contornado por uma silição na posição α do grupo diazo destas diazocetonas insaturadas, o que forneceu

vinilcetenos mais estáveis.³² Danheiser ainda aplicou uma anelação aromática similar como etapa chave para a síntese total da Maesanina **10** a partir da diazocetona insaturada **12** (Esquema 10).⁴⁴ Neste caso, a irradiação da diazocetona α,β -insaturada **12** produz o vinilceteno **13** que desencadeia uma série de transformações pericíclicas fotoquímicas em cascata, terminando com a síntese do fenol substituído **11**. A clivagem do grupo de proteção silil éter e a oxidação do fenol **11** utilizando O_2 levou a síntese do produto natural Maesanina **10** em uma única etapa (Esquema 10).

Esquema 10 Reação de benzanelação e síntese total do produto natural Maesanina a partir de diazocetonas insaturadas.

Diazocetonas insaturadas (substrato **16**, Esquema 11) também foram empregadas em reações de polimerização (síntese de metilenos polisubstituídos) na presença de catalisadores de Pd, onde a dupla ligação α à carbonila é crucial para o sucesso do processo. A possibilidade de polimerização com a unidade de um carbono

(ao invés de duas unidades na polimerização vinílica clássica) faz com que o método seja interessante (Esquema 11).³⁴

Esquema 11 Diazocetonas insaturadas aplicadas em reações de polimerização.

Brückner e colaboradores descreveram uma abordagem direta para a construção de lactonas após um rearranjo de Wolff, diidroxilação e lactonização.³⁵ (Esquema 12). É interessante mencionar que Brückner preparou as diazocetonas pelo método clássico de acilação de diazometano. Neste caso, obrigatoriamente, os haletos de ácidos α,β -insaturados empregados precisaram estar dissustituídos na dupla ligação a fim de se evitar a formação de pirazolinas. Mesmo assim, os rendimentos obtidos foram de moderados a bons.

Esquema 12 Síntese de butirolactonas a partir de diazocetonas insaturadas.

Tang empregou as diazocetonas insaturadas (substrato **18**, Esquema 13) para preparar ilídeos de fósforo que, na presença de alenos, levam à formação de ciclopentenonas (em uma sequência de olefinação de Wittig e ciclização de Nazarov).³⁸ Outro exemplo envolve uma interessante reação multicomponente e foi descrita por Hu na síntese de dióis.³⁹ A síntese envolve o uso de água, uma catálise dupla na presença de ródio e zinco, glicoxal **20** e o composto diazo **1** (Esquema 13). Basicamente esta reação multicomponente envolve a adição à carbonila do glicoxal **20**

pela diazocetona **1** catalisada por triflato de zinco, seguida de uma reação de inserção O-H catalisada por acetato de ródio. Mais tarde, uma reação similar pôde ser realizada na presença de iminas derivadas do glicoxal, levando a formação de amino-álcoois.⁴¹ Neste caso, uma combinação de acetato de ródio e a troca do triflato de zinco por ácidos fosfóricos quirais forneceu amino-álcoois com muito boas diastereo e enantiosseletividades (Esquema 13).

Esquema 13 Diazocetonas insaturadas em reações multicomponentes.

Seguindo o trabalho de Regitz,²⁶ que descreveu a primeira aplicação de uma diazocetona insaturada na preparação de um heterocíclico nitrogenado (Esquema 14), Danishefsky empregou estes compostos na preparação de diidropiridin-4-onas por uma reação de anelação aza-Robinson.²⁷ Neste trabalho, uma típica reação bem utilizada na química de enonas (a adição de aza-Michael) foi aplicada à diazocetona **25**, o tipo mais simples de uma α' -diazocetona α,β -insaturada (Esquema 14). Após a adição conjugada de tiolactamas (12 – 95% de rendimento, **26a-e**), seguida de uma reação entre a função tiocarbonil e um carbenóide de ródio e redução, diidropiridin-4-onas (**27a-e**) foram formadas em 65-73% de rendimento. Nos casos em que a adição de aza-Michael forneceu baixos rendimentos, utilizou-se um protocolo mais geral: adição de aza-Michael com acrilato de metila, hidrólise, formação de anidrido e acilação com diazometano.

Esquema 14 Adição de aza-Michael na diazocetona insaturada **25**.

Alguns anos mais tarde a síntese de aminas cíclicas através de rearranjos sigmatrópicos [2,3], empregando sais de amônio, foi descrita por Clark.²⁸ A química também envolveu uma adição de aza-Michael em uma diazocetona insaturada (substrato **28**, Esquema 15) nas etapas iniciais. No trabalho de Clark, a adição de alilaminas em uma diazocetona insaturada, seguida de formação de ilídeo e rearranjo sigmatrópico [2,3] forneceu pirrolidinonas 2,5-substituídas (**30a-b**). Embora direto, o método forneceu as pirrolidinonas com diastereosseletividades baixas ($\leq 2:1$). Apesar da stereoquímica relativa não ser determinada, a exposição prolongada dessas misturas em sílica gel enriqueceu um dos diastereoisômeros. Recentemente, Doyle também descreveu a síntese de uma pirrolidina 2,5-disubstituída

(diastereosseletividade de 2.5:1), empregando diazoacetato enonas⁴⁵ (adição de aza-Michael na presença de anilina e $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, seguida por uma inserção N-H intramolecular.

Esquema 15 Adição de aza-Michael na diazocetona insaturada **28**.

1.3 Recentes avanços na síntese de α' -diazocetonas α,β -insaturadas

Embora o estabelecimento do método de Danheiser permitiu o acesso a várias diazocetonas α,β -insaturadas que não eram preparadas eficientemente pelos métodos clássicos, algumas lacunas ainda demandavam a necessidade de avanços nos protocolos experimentais. Por exemplo, a síntese de diazocetonas insaturadas mais complexas, bem como os derivados com centros estereogênicos epimerizáveis nunca havia sido descrita. Outra limitação está relacionada com a geometria da ligação dupla nestes compostos, onde praticamente todos os métodos levam a apenas geometrias *E* (provenientes do substrato de partida). Por exemplo, a síntese de diazocetonas com geometria *Z* exige metil cetonas e/ou cloretos de acila com geometria *Z* na insaturação, os quais não são facilmente preparados ou comercialmente disponíveis. Além disso, a isomerização da dupla ligação para as diazocetonas *E*- α,β -insaturadas também poderia ser um problema em alguns dos protocolos existentes.

1.3.1 Diazofosfonatos como novos reagentes de olefinação

Visando as limitações descritas acima, em 2011⁴⁶ e 2013⁴⁷ nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo protocolo para a síntese de diazocetonas α,β -insaturadas. O método emprega aldeídos e um novo reagente de olefinação (diazofosfonatos **31** e **32**, Esquema 16) de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE). Estes reagentes, facilmente obtidos a partir a reação entre diazometano e os ácidos fosforilacéticos **33** e **34** correspondentes (Esquema 16), permitiram o acesso direto a várias diazocetonas α,β -insaturadas com configuração *E* da dupla ligação. Uma simples modificação do ácido fosforilacético inspirado no fosfonato de Ando foi realizada para se obter olefinas de configuração *Z* com excelente seletividade (Esquema 16). É importante mencionar, que no caso de aldeídos quirais, não se observou qualquer racemização do centro estereogênico a partir das condições desenvolvidas.

Esquema 16 Reagentes de olefinação **31** e **32** de HWE desenvolvidos por Burtoloso.

Os diazofosfonatos **31** e **32** são facilmente preparados entre 50 e 70% de rendimento a partir dos correspondentes ácidos fosforilacéticos **33** e **34** após reação com cloreto de oxalila e acilação do diazometano (Esquema 17). Embora comercialmente disponível, o ácido 2-(dietoxifosforil)acético **33** também pode ser preparado pela hidrólise básica a partir do reagente fosfonoacetato de trietila.⁴⁸ Por outro lado, o ácido 2-(difenoilfosforil)acético **34** (e qualquer outro derivado com grupos arilas) é preparado em duas etapas a partir do difenilfosfito, seguindo um procedimento adaptado de Ando (Esquema 17).⁴⁹⁻⁵² Cabe mencionar também que a síntese do diazofosfonato **36** também foi investigada. Este tipo de fosfonato, inspirado

no clássico reagente de Still-Gennari,⁵³ também é conhecido por fornecer duplas ligações com geometrias *Z* a partir da reação de HWE. O ácido bistrifluoroetilfosfonoacético **35** necessário à preparação do diazofosfonato **36** foi obtido por um protocolo descrito recentemente em nosso laboratório.⁵⁴ Entretanto, após inúmeras tentativas, não foi possível a obtenção deste fosfonato. Outro ponto importante a ser enfatizado é a estabilidade dos diazofosfonatos **31** (sólido amarelo) e **32** (óleo amarelo), podendo ser armazenados por meses sem que ocorra qualquer degradação.

Esquema 17 Preparação dos diazofosfonatos **31** e **32** por Burtoloso e colaboradores.

Após o desenvolvimento dos reagentes de olefinação **31** e **32**, várias α -diazocetonas α,β -insaturadas puderam ser preparadas por esta metodologia, incluindo diazocetonas complexas e enantiomericamente puras.⁵⁵ A Figura 3 reúne todas as diazocetonas insaturadas preparadas até o momento empregando estes novos reagentes de olefinação. É interessante mencionar que embora preparadas em escalas de até 1.0 grama, nada impede que o método seja estendido para escalas ainda maiores. Em suma, vale ressaltar que o método é direto e utiliza aldeídos, os quais possuem fácil preparo e ampla disponibilidade comercial.

Figura 3 Exemplos de diazocetonas α,β -insaturadas preparadas pela metodologia desenvolvida por Burtoloso e colaboradores empregando aldeídos e os diazofosfonatos **31** e **32**.

1.4 Diazocetonas α,β -insaturadas como blocos de construção em síntese

Uma das aplicações das diazocetonas desenvolvidas por Burtoloso e colaboradores foi a sua conversão em compostos heterociclos nitrogenados. Com o átomo de nitrogênio já incorporado no substrato diazocarbonílico (oriundo da reação de HWE entre amino-aldeídos e o diazofosfonato **31** e **32**, Figura 4),^{56,57} a síntese de diversos heterociclos pôde ser alcançada de forma direta. Neste sentido, uma diazocetona com geometria *E* ou *Z*, como representado na Figura 4, contem todos os átomos de carbonos necessários para a construção de anéis heterocíclos de seis membros. No caso da diazocetona com geometria *E*, uma etapa chave para esta transformação seria o rearranjo de Wolff fotoquímico na presença de metanol para levar a síntese do éster β,γ -insaturado bastante versátil (Figura 4). Este intermediário pôde ser funcionalizado, por exemplo, através de reações de dihidroxilação ou epoxidação seguida de abertura. A remoção do grupo de proteção seguida de uma ciclização intramolecular levou a preparação de piperidinas, indolizidinas e quinolizidinas quando aldeídos derivados de aminoácidos acíclicos, derivados de prolina e do ácido pipecólico foram empregados, respectivamente.⁵⁶⁻⁵⁸ No que se refere a diazocetona com geometria *Z* da dupla ligação, elas podem ciclizar sem a necessidade de prévia manipulação da ligação dupla, por exemplo, via inserção N-H intramolecular. Esta transformação levou ao esqueleto básico de dihidropiridi-3-onas em apenas duas etapas a partir de aldeídos. Este esqueleto, após redução da cetona seguida de reação de dihidroxilação da dupla ligação levou a síntese de piperidinas hidroxiladas de forma bastante rápida eficiente.^{47,59}

Figura 4 Conversão de diazocetonas insaturadas em heterocíclos nitrogenados

Uma outra estratégia explorada em nosso grupo de pesquisa foi o uso das diazocetonas insaturadas como substratos propícios às reações de Michael. A adição de aza-Michael, por exemplo, posiciona um grupo amino na posição β destas diazocetonas, o qual, por sua vez, pode reagir com o grupo diazo para formar heterocíclos de 5 membros (Esquema 18). Um trabalho concluído recentemente pelo nosso grupo de pesquisa envolve o rearranjo de Stevens para a construção de pirrolidinonas *cis*-2,5-disubstituídas e sua aplicação na síntese total altamente diastereosseletiva do alcalóide preussina em três etapas a partir do decanal (Esquema 18). Os substratos para avaliar o rearranjo de Stevens foram preparados pela adição de aza-Michael (reação entre diazocetonas insaturadas e aminas secundárias).⁶⁰

Como pode ser observado na Figura 5, vários são os exemplos de alcaloides e seus derivados indolizidínicos, piperidínicos, pirrolidínicos e quinolizidínicos preparados a partir das diazocetonas α,β -insaturadas sintetizadas pela metodologia descrita por Burtoloso e colaboradores.

Esquema 18 Síntese da preussina a partir da diazocetona insaturada 20.

Figura 5 Diazocetonas insaturadas como blocos de construção para a síntese de heterocíclicos de nitrogênio.

1.5 Rearranjo de Wolff

O rearranjo de Wolff foi nomeado após as descobertas de Ludwig Wolff ao tentar preparar a α -hidroxicetona **42** a partir α -diazocetona **41**.³ O aquecimento do composto diazocarbonílico **41** na presença de água levou a formação do éster **45**, que após hidrólise, forneceu o ácido carboxílico **43** (Esquema 19).

Esquema 19 Descoberta do rearranjo por Ludwig Wolff.

O rearranjo de Wolff consiste basicamente na conversão de diazocetonas em cetenos e seus derivados. O aquecimento de α -diazocetonas com sais de prata,⁶¹ ou sua exposição à luz⁶² leva à extrusão de nitrogênio e migração 1,2 do grupo α -carbonila, levando a formação de um intermediário ceteno (Esquema 20). De forma geral, esse mecanismo pode ocorrer de forma concertada, ou passando pela formação de um intermediário α -cetocarbeno.⁶² O ceteno é uma espécie extremamente reativa que pode ser capturada por nucleófilos, duplas ligações ou mesmo alquinos para formar ciclo-derivados ou derivados de ácido carboxílico. Na presença de água, álcoois ou aminas, pode-se gerar ácidos carboxílicos, ésteres ou amidas (Esquema 20). Algumas características gerais do Rearranjo de Wolff são: 1) a reação pode ser iniciada termicamente, fotoquimicamente, ou por catálise através de metal de transição; 2) condições térmicas podem degradar os substratos além de desencadear reações competitivas, como por exemplo, o deslocamento direto do grupo diazo sem que ocorra o rearranjo; 3) o uso de complexos de metal de transição não apenas reduz consideravelmente a temperatura necessária para a reação em comparação com o processo térmico, mas também altera a reatividade do intermediário α -cetocarbeno; 4) óxido de prata (I) ou benzoato prata (I) são os mais utilizados; 5) a reação realizada fotoquimicamente evita o uso de altas temperaturas;

6) a estereoquímica do material de partida permanece inalterada (retenção líquida de configuração); 7) diazocetonas β,γ -insaturadas sofrem o rearranjo de Wolff vinílico.⁶³

Esquema 20 Conversão de diazocetonas em cetenos e seus derivados via Rearranjo de Wolff.

1.5.1 Aspectos mecanísticos do Rearranjo de Wolff

Como resultado da grande aplicabilidade das diazocetonas frente ao rearranjo de Wolff, muito esforço tem sido realizado para compreender os aspectos mecanísticos desta transformação. Vários são os possíveis intermediários reacionais, a destacar os carbenos, cetenos e espécies atuando no estado excitado. Conforme ilustrado no Esquema 20, tanto o mecanismo concertado quanto o proposto em etapas, ainda que tópico de muita discussão, foram confirmados a partir de precursores diazocarbonílicos cíclicos e acíclicos.⁶⁴ Compostos diazocarbonílicos existem em um equilíbrio entre os conformêros *s-cis* e *s-trans*, sendo a sua distribuição afetada tanto por fatores estéricos ($R_2 \neq H$) quanto por interações eletrostáticas entre a carga negativa do oxigênio e o nitrogênio catiônico (Esquema 21).⁶² Quando a diazocetona possui conformação *s-Cis* (como nos casos cíclicos ou em equilíbrios favorecidos pela atração de cargas), o grupo de saída (N_2) e o grupo migrante (R_1) assumem uma configuração antiperiplanar que favorece o mecanismo concertado.

Neste caso, a extrusão de nitrogênio ocorre simultaneamente com o rearranjo 1,2-alquílico.⁶⁵ No que se refere as diazocetonas *s-trans*, a relação antiperiplanar entre o grupo de saída e o grupo migrante não é observada, sendo o mecanismo nestes casos preferencialmente em etapas. Alguns argumentos favorecem este mecanismo, como por exemplo, a observação de dependência entre as constantes de velocidade com a estabilidade do carbeno formado. Entretanto, a evidência mais persistente envolvendo este mecanismo surgiu com experimentos de ¹³C marcado. Diazocetonas marcadas no carbono carboxílico rearranjam para formar cetenos que possuem a marcação em ambos os átomos de carbono (Esquema 22).^{66,66,67}

Esquema 21 Mecanismo concertado e em etapas.

Esquema 22 Evidência de participação de oxirana.

Outro aspecto importante do mecanismo diz respeito a reatividade singlete vs tripleto do carbeno gerado. O carbeno é uma espécie divalente neutra contendo um átomo de carbono com seis elétrons na camada de valência. Os dois elétrons não ligantes podem estar emparelhados (singlete, $^1\sigma^2$) ou desemparelhados (tripleto, $^3\sigma^1p^1$) como ilustrado na Figura 6. Enquanto carbenos tripletos exibem reatividades do tipo radicalar, os carbenos singlete assumem tanto características nucleofílicas como eletrofílicas devido a presença de um par de elétrons e de um orbital vazio.

Figura 6 Estrutura de um carbeno singlete e tripleto.

Estudos prévios indicam o estado singlete como sendo majoritário no rearranjo de Wolff.^{62,68–72} Tomioka e colaboradores realizaram experimentos complementares a partir da fotoexposição do diazoacetato **46** (Esquema 23).^{71,72} Neste estudo, foi demonstrado que a fotólise direta de **46** produz um estado excitado singlete ($^1\mathbf{46}^*$) que passa por uma extrusão de nitrogênio para gerar o ceteno (**48**), o carbeno ($^1\mathbf{47}$), ou ainda um cruzamento intersistemas (*intersystem crossing* - ISC) para levar ao diazoester no estado tripleto ($^3\mathbf{46}^*$).⁷³ O ceteno e o carbeno singlete são então capturados por um álcool para levar a dois produtos (**49** e **50**, respectivamente). O produto de redução **51** é proveniente das espécies tripleto ($^3\mathbf{46}^*$) e ($^3\mathbf{47}$). O rendimento do produto **51** é aumentado quando uma fotólise tripleto-sensitizada é utilizada, e suprimido quando um finalizador de espécies tripleto **52** (piperilena) é utilizado previamente a fotólise direta. O produto de inserção **50** ainda é observado quando o diazoester **46** é tripleto-sensitizada, demonstrando a capacidade de interconversão do carbeno tripleto ($^3\mathbf{46}^*$) no carbeno singlete ($^1\mathbf{46}^*$).

Esquema 23 Competição entre carbeno singlete e tripleto.

1.5.2 Aplicações do rearranjo de Wolff

O rearranjo de Wolff é amplamente empregado em reações de homologação de Arndt-Eistert, contração de anel e de cicloadição (Esquema 24). É a etapa chave na reação de homologação de Arndt-Eistert, a qual leva o aumento de um carbono na cadeia de um ácido carboxílico. Essa homologação ocorre pela ativação de um ácido carboxílico (via cloreto de ácido ou anidrido misto), acilação do diazometano e decomposição da diazocetona formada (na presença de aquecimento, luz ou de sais de prata) para o ceteno reativo. Com o ataque de um nucleófilo, o rearranjo 1,2 leva ao derivado carboxílico com o aumento de um átomo de carbono na cadeia (Esquema 24).^{4,74} O rearranjo de Wolff é também aplicado em reações de contração de anéis a partir de diazocetonas cíclicas, primeiramente descrito em 1955 por Horner e Spietschka⁷⁵ (Esquema 24). Neste caso, devido a conformação *S-Cis*, esta transformação é realizada pela decomposição direta de α -diazocicloexanonas de forma concertada sem que ocorra a formação do carbeno (Esquema 24).

Esquema 24 Reação de Homologação de Arndt-Eistert e contração de anéis.

A homologação de Arndt-Eistert tem sido amplamente explorada na preparação de β -aminoácidos a partir de α -aminoácidos, possuindo importante aplicação principalmente na modificação e síntese total de produtos naturais.⁷⁶ Alguns exemplos incluem a síntese de macrolídeos tais como a Carbonolida B,⁷⁷ alguns alcalóides, como exemplificado pelo ácido (+)- α -Kainico,⁷⁸ terpenos e esteróides, tais como (Z)-4-oxo- β -ionona⁷⁹ e peptideos cíclicos como descrito na síntese da (+)-Jasplakinolida⁸⁰ (Esquema 25). Um exemplo recente da aplicação da homologação de Arndt-Eistert na síntese de um intermediário do produto natural (+)-Salvileucalina B é descrito por Sarah Reisman⁸¹ (Esquema 25).

Esquema 25 Homologação de Arndt-Eistert aplicada na síntese de produtos naturais.

A reação de contração de anéis reação possui especial eficácia na síntese de compostos cíclicos tensionados.⁸² Existem muitos exemplos em que o rearranjo de Wolff é utilizado para contrair ciclopentanonas a ciclobutanos^{70,83–85} e ciclobutanos para ciclopropanos.⁸⁶ O rearranjo é também comumente utilizado para formar sistemas bicíclicos. A Figura 7 ilustra alguns produtos naturais que foram sintetizados fazendo o uso de contração de anel via Rearranjo de Wolff com destaque para o anel construído com esta metodologia.

Figura 7 Exemplos de produtos naturais sintetizados por contração de anel via Rearranjo de Wolff.

2 Objetivos

Visando aumentar o escopo de aplicações das diazocetonas α,β -insaturadas utilizando o Rearranjo de Wolff como etapa chave, os objetivos desta tese de doutoramento são:

- 1) O estudo do rearranjo de Wolff com diazocetonas α,β insaturadas na presença de diversas aminas e posterior aplicação na síntese total do composto JP4-039 e análogos (rota B, Esquema 26).
- 2) A realização do rearranjo de Wolff com diazocetonas insaturadas na presença de álcoois mais complexos, como por exemplo os álcoois alílicos com o intuito de se estudar reações de cicloadição [2+2] e [4+2] intramoleculares (rota A, Esquema 26).

Esquema 26 Objetivo 1 e 2: Metodologia para a síntese de amidas, ciclobutanos e cicloexenos.

3) Expandir a química das diazocetonas insaturadas (**53**, Esquema 27) como aceptores de Michael em sistemas ainda mais complexos, como por exemplo, aplicadas na modificação seletiva de proteínas. O conceito-chave do objetivo é ilustrado no Esquema 27.

Esquema 27 Conceito-chave: rearranjo de Wolff a partir de diazocetonas α,β -insaturadas permitindo a modificação local seletiva de proteínas.

Capítulo I

3 Diazocetonas insaturadas como substratos para o rearranjo de Wolff

Neste capítulo, as diazocetonas α,β -insaturadas serão apresentadas como plataformas para a síntese direta de amidas e ésteres β,γ -insaturados. Quando diazocetonas derivadas de amino-aldeídos são utilizadas, isósteros peptídicos são obtidos como demonstrado na síntese rápida e eficiente do nitróxido JP4-039. Cabe ressaltar, que a síntese por nós descrita para este importante agente bioprotetor representa a rota mais curta relatada até o momento. Será também discutido um estudo comprovando a eficiência de diferentes lâmpadas comerciais (CFL e LED), em variadas potências, aplicadas no rearranjo de Wolff a partir de diazocetonas saturadas e insaturadas, representando uma alternativa sustentável ao rearranjo de Wolff fotoquímico e térmico.

3.1 Agente bioprotetor JP4-039

Durante muito tempo os raios-X têm sido utilizados como forma de diagnóstico e tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer.⁸⁷ Uma das utilidades da radiação é a radioterapia, a qual atua danificando o DNA de células cancerígenas, levando à sua morte. Embora as células normais também possam ser danificadas após exposição da irradiação ionizante (em menor escala), sabe-se que o microambiente modula o seu reparo sob condições que inibem a divisão celular. Um importante mecanismo de morte celular durante a radioterapia envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria após a sua radiação.⁸⁸ Neste contexto, moléculas que são capazes de se concentrar e realizar a remoção destas espécies reativas de oxigênio na mitocôndria podem ser de extrema importância como protetores contra radiação.^{89,90}

O composto JP4-039 (Figura 8), o qual foi inspirado pelo agente protetor XJB-5-13, que por sua vez teve sua estrutura proposta a partir dos farmacofóricos mínimos do antibiótico gramicidina S, é um nitróxido que tem demonstrado extrema eficácia na remoção de ROS tais como superóxidos e óxidos nítricos.⁹¹ Por exemplo, quando comparado no controle das células irradiadas, este nitróxido reforça a reparação e sobrevivência celular por uma ordem de 5-13 vezes.^{92,93} O JP4-039 também é conhecido como um isóstero do peptídeo⁹⁴ leucina-glicina (Figura 8). Considerando a característica de que os peptídeos são facilmente hidrolisados *in vivo* por peptidases, derivados *E*-alcenos (isósteros contendo um fragmento amina alílica) vêm demonstrando interessantes atividades quando utilizados na indústria química-biológica.^{94 ii}

ⁱⁱ Páginas 56 – 63: Reproduzido em partes a partir de Bernardim, B.; Burtoloso, A. C. B. A Two-Step Synthesis of the Bioprotective Agent JP4-039 from N-Boc-L-Leucinal. *Tetrahedron* **2014**, 70 (20), 3291–3296 com permissão da Elsevier.

Figura 8 a) JP4-039 inspirado no agente protetor XJB-5-131 com base na estrutura molecular do antibiótico gramacidina S. b) isótero (E)-alceno

Em relação ao seu preparo, apenas uma síntese é descrita na literatura.⁹⁵ Durante os últimos anos, o grupo de pesquisa do Prof. Peter Wipf vem demonstrando um grande envolvimento com a síntese e avaliação biológica de vários nitroxídeos eficazes na remoção de ROS, entre eles, o agente bioprotetor JP4-039.^{88,89,91–100} A abordagem sintética descrita por Wipf envolve a adição de uma sulfinimina quiral em uma reação de hidrozirconação-transmetalização *one-pot* como etapa chave. O composto JP4-039 é obtido em seis etapas a partir da imina quiral (Esquema 28).

Esquema 28 Síntese em 6 etapas do composto JP4-039 por Wipf.

3.1.1 Síntese das amidas β,γ -insaturadas e do composto JP4-039

Para o desenvolvimento da rota sintética proposta na etapa 1 dos objetivos, inicialmente foram preparadas quatro diazocetonas insaturadas estruturalmente diferentes a fim de avaliar o rearranjo de Wolff na presença de aminas como nucleófilos. Empregando a metodologia de olefinação descrita recentemente por nosso grupo de pesquisa,⁴⁶ as diazocetonas **1,54-56** foram sintetizadas com rendimentos entre 64 e 92% (Esquema 29). Estes quatro exemplos representam diazocetonas insaturadas contendo grupos alifáticos, aril, aminas acíclicas e cíclicas, respectivamente (Esquema 29). Ao contrário do butiraldeído e benzaldeído, os aminoaldeídos empregados neste estudo não são comercialmente disponíveis e foram facilmente preparados a partir dos respectivos aminoácidos *N*-protegidos (**57** e **59**, Esquema 29) após redução com borana e oxidação de Swern^{101,102} ou Parikh-Doering^{103,104} (**58** e **60**, Esquema 29). No caso da diazocetona **56**, estudos de HPLC quiral mostraram que não ocorreu qualquer racemização durante a etapa de olefinação de Horner-Wadsworth-Emmons.

Esquema 29 Síntese de diazocetonas α,β -insaturadas a partir de aldeídos.

Reagentes e condições a) diazofosfonato **32**, NaH, THF, 5 min., 0 °C. Depois, aldeído, THF -78 até -30 (**55**) -40 °C (**56**) 0 °C (**1** e **54**); b) BH₃.SMe₂, THF, 25 °C, 12h; c) Oxidação de Swern; d) Oxidação de Parikh-Doering. A reação de HWE foi realizada com 1.81 mmol dos aldeídos empregados.

Todas as diazocetonas **1,54-56** foram obtidas com total seletividade para a olefina de configuração *E* com constante de acoplamento de 15.3 Hz entre os hidrogênios do sistema α,β -insaturado. A formação e geometria das diazocetonas foram confirmadas pela técnica de RMN ^1H , ^{13}C e por infravermelho. Uma análise típica é ilustrada na Figura 9. A ausência do singlete **d** em 9.59 ppm referente ao aldeído do (*S*)-*N*-Boc-Leucinal **60**, a presença de dois núcleos olefínicos em δ 6.66 (**a**, dd, $J = 15.4, 5.9$ Hz, 1H) e 6.06 (**b**, d, $J = 15.4$ Hz, 1H), bem como o singlete em 5.31 ppm referente ao hidrogênio **c** da porção diazocarbonílica corroboram a estrutura. O alargamento dos sinais pode ser justificado pela presença de isômeros rotacionais (rotâmeros) provenientes do grupo de proteção Boc (espectro adquirido em 25 °C). As diazocetonas apresentam bandas características em 2100 cm^{-1} nos espectros de infravermelho respectivas ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}=\text{N}$ (Figura 9).

Figura 9 Espectro de RMN ^1H e expansão do espectro de IV obtido para a diazocetona **56** a partir do aldeído **60** (mistura de rotâmeros) em CDCl_3 , 500 MHz.

Após sintetizadas, as diazocetonas foram submetidas ao rearranjo de Wolff fotoquímico na presença de diferentes aminas como nucleófilos. Aminas primárias, secundárias e aromáticas foram avaliadas para este fim. Ainda que seja possível encontrar vários exemplos de rearranjos de Wolff (tanto térmicos como fotoquímicos) a partir de diazocetonas saturadas utilizando aminas como nucleófilos,^{105–110} nenhum exemplo é encontrado na literatura para seus derivados α,β -insaturados. Na verdade, fomos curiosos sobre o comportamento de tais diazocetonas, especialmente no caso do exemplo quiral **56**, na presença dessas bases devido à presença de um próton ácido na posição γ carbonila. Positivamente, a irradiação (lâmpada de arco de Xenônio Osram 150) de uma solução da diazocetona **55** em acetonitrila contendo um equivalente de benzilamina durante 20 min a 25 °C forneceu a amida β,γ -insaturada **61a** em 98% de rendimento sem a necessidade de purificação (Esquema 30). Um resultado semelhante foi obtido quando a diazocetona quiral **56** foi tratada com anilina.

Esquema 30 Síntese das amidas β,γ -insaturadas a partir das diazocetonas α,β -insaturadas **55** e **56**.

A caracterização do produto de Wolff **62** é apresentada da Figura 10. A análise do espectro de RMN ^1H corrobora a estrutura pelos sinais olefínicos em δ 5.79 (**a**, dt, $J = 14.8, 7.5$ Hz, 1H), 5.56 (**b**, dd, $J = 15.4, 7.0$ Hz, 1H), pela ausência do hidrogênio α -diazocarbonílico em 5.32 ppm e pela presença de um dubleto em 3.15 ppm (**d**, d, $J = 7.0$ Hz, 2H) referente aos hidrogênios α -carboxila ($-\text{CH}_2-$). Uma outra análise importante para a comprovação estrutural diz respeito ao espectro de infravermelho, agora com a ausência da banda intensa em 2100 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{N}=\text{N}$ do grupo diazo. Análises de RMN ^{13}C e de espectrometria de massas de alta resolução ratificam a estrutura e são apresentados na seção experimental.

Figura 10 Espectro de RMN ^1H e expansão do espectro de IV obtido para o ester β,γ -insaturado **62** a partir da diazocetona **56** após rearranjo de wolff na presença de anilina.

Os produtos racêmicos ($\pm$)-**61b** e **61b** foram analisados por HPLC mostrando que não houve qualquer epimerização durante a formação da diazocetona **56** e posteriormente do rearranjo de Wolff nas condições aplicadas (Figura 11).

<Peak Table>

Detector A 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	9,549	975301	20099	0,496			
2	11,609	195578036	2915194	99,504		V	
Total		196553337	2935292				

Figura 11 Estudos de HPLC quiral. A: composto racêmico; B: composto quiral a partir de *N*-Boc-*L*-leucinal.

O escopo desta transformação foi avaliado a partir das diazocetonas **1,54-56** irradiadas na presença de benzilamina, anilina, *p*-metóxi-anilina, dialilamina e ciclohexilamina para fornecer amidas β,γ -insaturadas **61-77** com rendimentos variando entre 50 e 98% (Figura 12). Ao contrário das reações fotoquímicas envolvendo as diazocetonas **54-56**, as reações realizadas a partir da diazocetona insaturada **1** forneceram misturas entre os produtos de isomerização *E* e *Z* da dupla ligação. Os rendimentos indicados na Figura 12 são referentes ao produto *E* isolado por cromatografia.

Figura 12 Síntese de várias amidas β,λ -insaturadas em duas etapas a partir de aldeídos.

Finalmente, para mostrar a aplicabilidade do presente método, a diazocetona **56** foi convertida no agente bioprotetor JP4-039 em 65% de rendimento após irradiação na presença de 4-amino-TEMPO (Esquema 31). Todos os dados espectroscópicos estão em completo acordo com os relatados na literatura por Wipf.⁹⁵ Para esta transformação, o aminoácido comercialmente disponível *N*-Boc-*L*-leucina **38a** foi primeiramente reduzido na presença do complexo de borana e dimetil sulfeto para gerar **38b**,¹¹⁰ seguido por oxidação com $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ para fornecer o *N*-Boc-*L*-Leucinal **38c**.^{103,104} A reação de olefinação entre **38c** com o ânion diazofosfonato de sódio **14** em -78 a -40 ° C forneceu a diazocetona **38** com 83% de rendimento ($> 99\%$ ee). Em seguida, o rearranjo de Wolff fotoquímico na presença do radical comercialmente disponível 4-amino-TEMPO forneceu o agente bioprotetor JP4-039 em 65% de rendimento).

Esquema 31 Síntese do nitróxido JP4-039 em duas etapas a partir do (S)-N-Boc-Leucinal **60**.

3.2 Rearranjo de Wolff promovido por diferentes fontes luminosas

Como apresentado na introdução da presente tese, o rearranjo de Wolff é uma transformação bastante útil em síntese orgânica. Inicialmente, Ludwig Wolff verificou que o aquecimento de soluções de diazocetonas a temperaturas acima de 100 °C,² ou uso de óxido prata(I) em meio básico,² eram formas apropriadas para o sucesso da transformação. Atualmente, a termólise é geralmente evitada, uma vez que não pode ser aplicada a substratos sensíveis e é geralmente acompanhada pela formação de muitos subprodutos indesejados. Como resultado, sais de prata (I)^{111–119} (particularmente benzoato de prata) e a fotólise^{31,120–128} têm sido os métodos comumente adotados como escolha. No caso de sais de prata, a principal desvantagem é o custo e necessidade de altas cargas de catalisador (20–50 mol%). Protocolos experimentais também podem exigir a adição lenta do catalisador juntamente com aquecimento para o total consumo do substrato. Em alguns casos, quantidades estequiométricas ou quantidades elevadas dos sais de prata devem ser empregues, tal como descrito nos trabalhos de Nicolaou¹²⁹ e Burtoloso⁵⁸ (Esquema 32, a e b, respectivamente).ⁱⁱⁱ

ⁱⁱⁱ Pages 64 – 72: reproduced in part from Bernardim, B.; Hardman-Baldwin, A. M.; Burtoloso, A. C. B. LED Lighting as a Simple, Inexpensive, and Sustainable Alternative for Wolff Rearrangements. *RSC Adv.* **2015**, 5 (18), 13311–13314 with permission from Royal Society of Chemistry.

Esquema 32 Dois exemplos mostrando aquecimento e excesso de catalisador ou de sais de prata.

Contrariamente às reações com catalisadores de prata, condições de fotólise costumam apresentar reações mais limpas, com pouco (muitas vezes nulos) subprodutos, além de permitir rendimentos elevados para os produtos do rearranjo de Wolff.⁶² No entanto, a principal limitação da fotólise é a utilização de lâmpadas especiais de xenônio de média e alta pressão assim como lâmpadas de vapor de mercúrio. Estas lâmpadas, além de possuírem alto custo, exigem alto consumo energético além de emitir grandes quantidades de calor, a qual reflete diretamente no rendimento no caso de substratos sensíveis a temperatura.

Uma alternativa sustentável para o rearranjo Wolff fotoquímico utilizando fontes de luz disponíveis no mercado ainda não foi investigado em detalhe. Embora dois exemplos^{121,126,130} individuais são descritos na literatura para o rearranjo Wolff empregando uma lâmpada compacta fluorescente (CFL) em sistemas de fluxo (Esquema 33), com o melhor de nosso conhecimento, nenhum estudo é descrito usando lâmpadas diodo emissor de luz (LED). Nos últimos anos, o uso de lâmpadas LED está aumentando exponencialmente como uma fonte de luz durável e de grande economia energética,¹³¹ quando comparadas as tradicionais lâmpadas fluorescentes compactas e incandescentes.

Esquema 33 Lâmpadas CFL aplicadas no rearranjo de Wolff.

Durante o curso dos estudos envolvendo a fotólise das diazocetonas, verificou-se uma lacuna de trabalhos aprofundados no que diz respeito ao rearranjo de Wolff em presença de outros tipos de lâmpadas (não somente as lâmpadas de xenônio e mercúrio). Decidiu-se, então, investigar as lâmpadas CFL e LED. Não só para demonstrar que estas fontes de luz são eficientes para promover este rearranjo, mas também que este método pode ser aplicado a vários substratos estruturalmente diferentes sob condições suaves com uma execução simples e prática no laboratório.

3.2.1 Avaliando a fonte luminosa: síntese de amidas e ésteres

O trabalho foi iniciado avaliando a capacidade de cinco diferentes lâmpadas brancas CFL e LED para realizar o rearranjo de Wolff. O preparo do éster metílico **78** foi obtido via Homologação de Arndt-Eistert a partir da diazocetona **1** (Tabela 1). Esta diazocetona foi escolhida como um substrato modelo para o estudo de otimização uma vez que é conhecida por proporcionar bons resultados quando as condições clássicas (usando sais de prata) para o rearranjo de Wolff são empregadas^{35,56} (entradas 1 e 2, Tabela 1). Além de permitir uma comparação justa entre os métodos, esta diazocetona também é o substrato modelo adotado para os estudos de cicloadição do presente projeto. Tal como representado na Tabela 1, lâmpadas CFL e LED de média potência são necessárias para o total consumo de **1** e para proporcionar rendimentos quantitativos do éster **78** após 24 h (Entradas 4 e 7, respectivamente). Também é importante notar que, enquanto as lâmpadas fluorescentes compactas levam a um aquecimento considerável da solução reacional,

isso não foi observado quando as lâmpadas LED foram empregadas. Este resultado é bastante importante ao utilizar substratos sensíveis.

Tabela 1 Rearranjo de Wolff usando lâmpadas CFL e LED como fontes luminosas.

Entrada	Condições	Temp. de Cor ^c	Tempo	78 (%) ^a	Temp. solução após 24h
1 ³⁵	20 mol% AgOBz, Et ₃ N, MeOH, 50 °C	-	1 h	63	-
2 ⁵⁶	Lâmpada de arco de Xe de alta pressão 300 W	6000 K	1 h	98	30°C
3 ^b	Lâmpada CFL branca 15 W	6500 K	4h	65	38°C
4 ^b	Lâmpada CFL branca 45 W	6500 K	4h	92	40°C
5 ^b	Lâmpada CFL branca 25 W	2700 K	4h	83	39°C
6 ^b	Lâmpada LED branca 5 W	2700 K	4h	10	27°C
7 ^b	Lâmpada LED branca 18 W	2700 K	4h	100	27°C
8 ^b	Sem lâmpada (branco)	-	24h	0	27°C

^a Rendimentos determinados por RMN quantitativo usando 1,2,4,5-tetrametilbenzeno como padrão interno;

^b 0.05 M em MeOH em 27 °C. A temperatura de cor expressa a aparência de cor da luz emitida pela fonte de luz. A unidade de medida da temperatura de cor é o Kelvin (K). Quanto mais alta a temperatura de cor, mais clara é a tonalidade de cor da luz. Ex.: uma lâmpada de temperatura de cor de 2.700 K tem tonalidade suave, já uma outra de 6.500 K tem tonalidade clara

O produto **78** foi caracterizado a partir das técnicas de RMN ¹H, ¹³C, bem como por infravermelho de acordo com a análise realizada na seção anterior (Figura 13). O desaparecimento do sinal do hidrogênio ligado ao grupo diazo, em 5.5 ppm indica o consumo da diazocetona. Os principais sinais para o éster **78** podem ser destacados de acordo com o espectro da Figura 13. O duplo dubleto em 3.26 ppm com constante de acoplamento de 7.1 e 1.4 Hz e integral para dois hidrogênios, é um sinal bastante evidente para a caracterização do produto de rearranjo de Wolff e representa os hidrogênios **d**. Outros sinais característicos da molécula são: singlete em 3.72 ppm, com integral para três hidrogênios, característico da metoxila incorporada no produto **c**, bem como o deslocamento e o desdobramento dos sinais olefínicos em 6.50 e 6.31 ppm, d e dt, respectivamente. Os hidrogênios olefínicos em 6.50 ppm (**a**) e 6.31 ppm (**b**) com constante de acoplamento de 15.9 Hz confirmam a geometria *E* da molécula. A ausência da banda em 2100 cm⁻¹ no espectro de infravermelho confirmou o

consumo da diazocetona **1** para a formação do produto **78**. Esta mesma análise foi realizada para todos os ésteres preparados na avaliação do escopo de substratos.

Figura 13 Espectro de RMN ¹H e ¹³C para a diazocetona **1** e o éster **56**

O escopo do substrato foi avaliado após determinar a lâmpada de LED branca de 18 W como a melhor fonte de luz para realizar os rearranjos de Wolff. Foi avaliada a reação entre a diazocetona **1** e vários nucleófilos hidroxilados. Isto incluiu exemplos impedidos como isopropil, *tert*-butil e álcoois mentil, bem como álcool alílico, álcool benzílico, fenol, e água. Como ilustrado no Esquema 34, a reação entre **1** com estes nucleófilos estruturalmente diferentes conduziu a rendimentos isolados dos ésteres **78-85** correspondentes entre 63-100%. Mesmo quando foram usados fenóis fracamente nucleofílicos e álcoois altamente impedidos como álcool *tert*-butilico, um rendimento de 63% foi obtido.

Esquema 34 Rearranjo de Wolff fotoquímico a partir da diazocetona **1** na presença de diferentes nucleófilos oxigenados.

Com exceção da água e dos exemplos sólidos, em que foi utilizada uma solução do nucleófilo em acetato de etila, as reações foram realizadas utilizando o próprio álcool como solvente e também nucleófilo. Os álcoois são descritos como sendo um dos solventes mais verdes,¹³² além de poderem ser facilmente recuperados a partir da reação, em alta pureza, via destilação. Durante o decurso desta avaliação, um outro estudo revelou que a concentração da solução de reação é crucial para um desempenho elevado da transformação. Por exemplo, um rendimento de 100% do éster **78** foi obtido quando foram utilizadas soluções da ordem de 0.025-0.05 M, ao passo que apenas 49% foi obtido em uma solução 0.5 M após 24 horas. Para os processos que empregam acetato de etila como o solvente, 10 equivalentes do álcool é necessário para garantir elevados rendimentos do produto.

Em seguida, investigou-se a utilidade sintética do presente método fotoquímico na presença de outras diazocetonas. Os substratos **86-88** foram preparados e irradiados com LED branca de 18 W na presença de vários álcoois. Para este estudo, aril-diazocetonas impedidas, diazocetonas quirais e derivadas de aminoácidos foram empregadas, fornecendo os correspondentes ésteres e ácidos **89-98** em 50-89% de rendimento isolado (Figura 14). É bem descrito que diazocetonas derivadas de α -amino ácidos são importantes precursores para a preparação de β -amino ácidos e ésteres através do rearranjo de Wolff. No é ilustrado a disposição experimental, mostrando a simplicidade e praticidade deste protocolo. Outro ponto que merece

atenção é que não houve qualquer alteração significativa no rendimento isolado observado com o aumento da escala da reação. Experimentos com 0.2 e 2.0 mmol da diazocetona **86** forneceram 81% e 78% de rendimento do composto **89**, respectivamente (Esquema 35).

Figura 14 Uso de diferentes nucleófilos de oxigênio e diferentes diazocetonas para o rearranjo de Wolff usando LED

Esquema 35 Disposição experimental do Rearranjo de Wolff usando lâmpadas de LED.

As mesmas condições reacionais foram então aplicadas nos substratos diazocarbonílicos **87**, **88** e **99** na presença de 10 equivalentes de diferentes aminas (Esquema 36). As amidas **100-108** foram facilmente preparadas em excelentes rendimentos variando entre 70 e 99%, sendo que exemplos de diazocetonas bastante impedidas foram utilizadas e ainda foi possível se obter as amidas com rendimentos moderados (exemplo **104**, 70% de rendimento). Por fim, a síntese do composto JP4-039 foi comparada utilizando ambas as fontes luminosas a partir da diazocetona **56**, com apenas 1 equivalente do nucleófilo 4-amino-TEMPO e o rendimento obtido foi similar (Esquema 37).

Esquema 36 Amidas obtidas usando lâmpada LED para promover o rearranjo de Wolff.

Esquema 37 Síntese do composto JP4-039 usando lâmpada LED e de alta pressão de mercúrio.

3.3 Conclusões parciais

Neste capítulo foi demonstrado o uso das diazocetonas α,β -insaturadas como interessantes blocos de construção para a síntese direta amidas e ésteres β,γ -insaturados via rearranjo de Wolff fotoquímico promovido por diferentes fontes luminosas. Quatro exemplos de diazocetonas **54-56** foram sintetizadas (rendimentos entre 64-92%) e convertidas em 17 exemplos de amidas β,γ -insaturadas **61-77** (50-98% de rendimento). Quando diazocetonas derivadas de amino-aldeídos foram empregadas, isómeros peptídicos foram obtidos conforme demonstrado na síntese rápida e eficiente do nitróxido JP4-039.¹³³ Cabe ressaltar, que a síntese aqui descrita representa a rota mais curta para o preparo deste composto bioprotetor. Demonstrou-se também o uso de simples lâmpadas de LED, disponíveis comercialmente, como uma alternativa prática e sustentável para a realização do rearranjo Wolff.¹³⁴ Este método é amplo no que diz respeito ao nucleófilo e a diazocetona proporcionando rendimentos moderados a excelentes dos produtos desejados. Cinco exemplos de diazocetonas saturadas e insaturadas **1**, **86-88** foram convertidas em 27 exemplos das respectivas amidas (**100-108**), ésteres e ácidos carboxílicos (**78-85** e **89-98**) com rendimentos entre 50 e 99%. Cabe ressaltar, que em muitos casos não há a necessidade de purificação por cromatografia. Além disso, este método pode ser aplicado a outros nucleófilos, como o procedimento experimental requer apenas a preparação de uma solução da diazocetona e nucleófilo. Este novo protocolo evita o uso de lâmpadas de Hg e Xe alta pressão, bem como os procedimentos experimentais tediosos que envolvem o uso dos caros sais de prata.

Capítulo II

4 Diazocetonas insaturadas como precursoras de reações de cicloadições [2+2] e [4+2]

Após estabelecer um método que permitiu um acesso rápido e eficiente a vários heterocíclicos nitrogenados e uma extensão para a síntese de isósteros peptídicos como o JP4-039, imaginou-se esses blocos de construção aplicados na síntese de cicloexenos e ciclobutanos substituídos. Por exemplo, ao considerar a dupla ligação estratégica na estrutura da diazocetona, visualiza-se, após o rearranjo de Wolff na presença de álcoois insaturados, um importante substrato para reações de cicloadição [2+2] e [4+2] intramoleculares (Esquema 38). O uso de luz para promover o rearranjo fotoquímico na presença de álcoois alílicos, poderia, em uma única etapa, servir também para promover fotocicloadições [2+2]. Os produtos do rearranjo de Wolff (Esquema 38), poderiam ciclizar de forma intramolecular sem a necessidade prévia de manipulação do substrato em uma única etapa. Isto permitiria a preparação de ciclobutanos altamente substituídos, esqueletos frequentemente encontrados em produtos naturais (Esquema 39). Ao se utilizar álcoois insaturados com duplas ligações conjugadas, o rearranjo de Wolff poderia também promover a síntese de

substratos para reações de Diels-Alder. Condições térmicas ou catálise com ácidos de Lewis poderiam levar a construção de cicloexenos substituídos, representando uma nova metodologia para acessar essa classe de esqueletos de forma rápida e eficiente (Esquema 38).

Esquema 38 Expansão da química das diazocetonas insaturadas para a síntese de ciclobutanos e cicloexenos substituídos.

Esquema 39 Exemplos de produtos naturais contendo ciclobutanos e cicloexanos.

Com o intuito de se obter um amplo escopo de precursores, diferentes substratos foram propostos a fim de se estudar as reações de cicloadição [2+2] e [4+2]. Compostos α,β -insaturados (olefinas conjugadas, deficientes eletronicamente) com alcenos ricos ou levemente ricos em elétrons e o cruzamento entre olefinas com grupos doadores e retiradores foram propostos (Figura 15). Por exemplo, os ésteres precursores (Figura 15, série A-J) poderiam ser sintetizados usando a metodologia clássica de HWE e rearranjo de Wolff a partir das diazocetonas instauradas

desenvolvidas no grupo do Prof. Antonio Burtoloso. Os substratos com substituintes retiradores de elétrons no anel aromático, como o grupo nitro e acetil (Figura 15, série B e C, respectivamente), poderiam atuar na conjugação da dupla ligação, diminuindo assim a energia do LUMO e permitindo a criação de um ambiente eletrônico distinto entre as duas olefinas. No caso dos ésteres α,β -insaturados da série D, sua síntese poderia ser realizada através de uma reação de isomerização da dupla ligação dos compostos da série A (Figura 15). Já o éster reativo da série E, poderia ser obtido a partir da clássica metodologia de HWE fazendo o uso do diazofosfonato **32** e um aldeído como o fenilgloxal, seguido de rearranjo de Wolff na presença de álcoois alílicos. O mesmo raciocínio vale para os precursores da Diels-Alder, trocando apenas a diazocetona (por exemplo, derivada do cinamaldeído – séries I e J, Figura 15) e do álcool insaturado utilizado no rearranjo de Wolff.

Figura 15 Diferentes substratos propostos para a reação de Cicloadição [2+2] e [4+2].

Um trabalho de fotocicloadição publicado por Padwa e colaboradores¹³⁵ serviu como precedente para o encorajamento da proposta de ciclização [2+2]. Dentre os diferentes precursores avaliados, um exemplo em particular **109** (Esquema 40) serviu como base para o início deste estudo. Padwa submeteu uma solução do ciclopropeno **109** em benzeno na presença do fotossensibilizador tioxantona sob a irradiação de uma lâmpada de arco de mercúrio de média pressão (450W, equipada com filtro de Urânio). Após 4 h de reação, o produto de cicloadição **110** foi isolado em 72% de rendimento (Esquema 40).

Esquema 40 Cicloadição [2+2] intramolecular descrito por Padwa e Colaboradores.

4.1 Preparo dos substratos para as cicloadições [2+2] e [4+2]

O trabalho foi iniciado pelo preparo das diazocetonas α,β -insaturadas **1,54**, **111-114** segundo um recente protocolo de olefinação desenvolvido por Burtoloso e colaboradores (Esquema 41). Nesta metodologia, 1 equivalente do diazofosfonato **32** é solubilizado em etanol e o aldeído puro adicionado. Uma solução 0.5 M de NaOH em uma mistura de etanol/água 1:1 é então gotejada durante o período de 1 h para fornecer as diazocetonas em rendimentos bons a moderados. Cabe ressaltar, que enquanto a metodologia original descrita no capítulo 1 (NaH/THF) requer 2 equivalentes de **32** para se obter rendimentos satisfatórios, este protocolo utiliza apenas 1 equivalente do diazofosfonato. Por exemplo, a diazocetona **111** obtida em 90% de rendimento utilizando NaH/THF, é sintetizada em 85% a partir da solução etílica de hidróxido de sódio. O baixo rendimento isolado para a diazocetona **112** está associado a uma reação de hidrólise do éster metílico. Além disso, ao menos que uma solução metanólica seja substituída ao etanol, o produto etílico esterificado de **112** é isolado. No caso da diazocetona **113**, derivada do cinamaldeído **119**, um rendimento de 30% foi obtido. Diferentes condições de HWE foram avaliadas, incluindo bases como NaH, DIPEA/LiCl, K₂CO₃, LiOH e Ba(OH)₂, e o rendimento obtido, entretanto, não passou de 33% (Tabela 2).

Esquema 41 Diazocetonas insaturadas preparadas para o estudo de cicloadição [2+2] e [4+2].

Tabela 2 Condições de HWE estudadas a partir do cinamaldeído **119**.

	119	32	Base	base	Solvente	T (°C)	(%) <i>E</i>
1	1.0	1.0	NaOH	1.1	EtOH/H ₂ O	t.a (0.5 h)	30%
2	1.0	2.0	NaH	2.2	THF	0 (1 h) – t.a (2 h)	- ^b
3	1.0	1.0	K ₂ CO ₃	1.1	H ₂ O	t.a (24 h)	30%
4 ^a	1.2	1.0	DIPEA	1.0	MeCN	0 (1 h) – t.a(24 h)	- ^b
5	1.0	1.0	LiOH	1.0	<i>i</i> -PrOH/H ₂ O	t.a (24 h)	30%
6	1.0	1.3	LiOH	1.5	<i>i</i> -PrOH/H ₂ O	t.a (24 h)	33%
7	2.0	1.0	NaH	1.0	THF	0 (1 h) – t.a(24 h)	- ^b

^a 1 equivalente de LiCl utilizado como aditivo ^b produto não foi identificado no bruto reacional.

Uma outra diazocetona explorada foi o exemplo **53** derivado do fenilglioxal **121** (Esquema 42). Além de ser um interessante substrato para as cicloadições [2+2], este substrato poderia abrir um leque de novas aplicações para as diazocetonas α,β-insaturadas, como ilustrado no Esquema 42. Além de possuir uma dupla ligação conjugada com a carbonila, a diazocetona **53** também possui excelente reatividade

frente adições de Michael. O aduto formado poderia servir como um rápido bloco de construção para a síntese de novos e importantes heterocíclicos de nitrogênio, a incluir 2 e 3-azetidionas ainda não exploradas no grupo do Prof. Antonio Burtoloso.

Esquema 42 Diazocetona **53** obtida a partir da reação de HWE a partir do fenilglioal **121**.

Previamente, o preparo e manuseio do reagente fenilglioal **121** se demonstrou bastante tedioso devido a sua alta instabilidade. Este composto, quando na forma anidra, é conhecido por hidratar-se facilmente com a umidade do ar para permanecer em sua forma mais estável $\text{121} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Esquema 43), além de espontaneamente sofrer reações de oligo e polimerização rapidamente.^{136–139} Seu preparo é conseguido utilizando dióxido de Selênio (SeO_2) como oxidante do reagente acetofenona **122** (Esquema 43).^{137,140} A maneira mais eficaz para seu armazenamento é na forma hidratada, a qual pode ser obtida fazendo um refluxo rápido do fenilglioal **121** anidro em água, o qual irá lentamente cristalizar como um sólido branco na solução. Esta metodologia, entretanto, fornece o glioal poli hidratado $\text{121} \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

Os testes de HWE pra se obter a diazocetona **53** foram realizados com o fenilglioal **121** adicionado de diferentes formas, a incluir: anidro, hidratado, recém destilado, e ainda, anidro armazenado em uma solução 1.18 M em tolueno¹⁴⁰ que foi preparada logo após sua destilação (Tabela 3).

Esquema 43 Preparo do fenilglioxal **121** a partir da oxidação da acetofenona **122** com SeO_2 .

Tabela 3 Estudo da reação de HWE a partir do fenilglioxal **89**

121	32	Base	base	Solvente	T (°C)	(%) E+Z	E/Z
1 ^a	1	NaOH	1	H ₂ O	t.a (0.5 h)	-	-
1 ^a	1	NaH	1.1	THF	-78 (1 h) até 0 (1 h)	27	2:1
1 ^a	2	NaH	2.2	THF	-78 (1 h) até 0 (1 h)	40	1:1
2 ^a	1	NaOH	1	H ₂ O	t.a (0.5h)	0	-
2 ^b	1	NaOH	1	H ₂ O	t.a (0.5h)	0	-
1 ^a	1	NaH	1.2	THF	0 até t.a (1h)	5	2:1
2 ^a	1	NaH	1	THF	-78 (1 h) até -20 (2 h)	15	2:1
1 ^a	1	EtONa	1	EtOH	0 até t.a (0.5 h)	0	-
1 ^a	1	Ba(OH) ₂	1.25	THF	0 até t.a (24 h)	47	7:2
1 ^a	1	DIPEA ^c	1	MeCN	0 até t.a (24 h)	36	3:1
1 ^a	2	Ba(OH) ₂	2	MeCN	0 até t.a(24 h)	55	2:1
1 ^a	1	<i>t</i> -BuOK	1	THF	0 até t.a (1 h)	35	-
1.5 ^a	1	Ba(OH) ₂	0.8	THF	0 até t.a(24 h)	11	-
1.2 ^b	1	DIPEA ^c	1	MeCN	0 até t.a(24 h)	25	-
1.2 ^b	1	DBU ^c	1	MeCN	0 até t.a(24 h)	33	-
1 ^e	1	NaH	1	THF	-78 (1 h) até -20 (2 h)	13	1:1
1.2 ^e	1	DIPEA ^c	1	MeCN	0 (24 h)	78	3:1
2 ^e	1	DIPEA ^c	1	MeCN	0 (72 h)	54	1:1
1 ^{f ou g}	2	LiHMDS	2	THF	-78 (1 h) até -20	6	-

^a fenilglioxal anidro, purificado em coluna *flash* e destilado, armazenado concentrado em freezer ^b fenilglioxal hidratado (x.H₂O) ^c aditivo LiCl (1 equivalente) ^d adição de peneira molecular 3A ^e Destilado e diluído em tolueno no mesmo dia (1.18 M), armazenado em freezer (-20 °C) ^f monohidrato disponível comercialmente (121.1H₂O) seco por 1 h utilizando peneira molecular 4 A ^g monohidrato disponível comercialmente (121.1H₂O) seco sob remoção azeotrópica de água com sistema (Dean-Stark).

Diferentes metodologias de HWE foram avaliadas para a formação da diazocetona **53**. O método inicialmente descrito pelo grupo do Prof. Antonio Burtoloso (NaH como base) forneceu o produto desejado com baixos rendimentos (entradas 2, 3, 6, 7 e 15). Cabe ressaltar, que a partir do diazofosfonato **32**, todos os aldeídos empregados na reação de HWE forneceram os produtos de olefinação com 100% de seletividade para a olefina *E*. Neste caso, partindo de **121**, foi observada a formação de misturas com proporções variadas dos isômeros *E/Z*. Na Tabela 3 é destacado que o melhor resultado foi encontrado utilizando-se DIPEA como base e cloreto de lítio (LiCl) como aditivo, quando o fenilglioal **121** foi empregado a partir de uma solução 1.18 M em tolueno. Neste caso, o rendimento total foi de 78% e a razão *E/Z* 3:1 (entrada 16, Tabela 3). Este rendimento, entretanto, demonstrou-se extremamente dependente da escala utilizada, sendo obtido em uma única tentativa e não foi reproduzível posteriormente, variando entre 30 e 50%. Este resultado pode estar associado com a instabilidade do aldeído utilizado. A caracterização do produto **53** foi realizada pela técnica de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 16). A constante de acoplamento de 15 Hz entre os hidrogênios olefínicos confirmam a geometria *E* da dupla ligação, e 11 Hz para a geometria *Z* do isômero *cis* **123** isolado, Figura 17. A banda característica em 2106 cm^{-1} nos espectros na região do infravermelho respectivas ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}=\text{N}$ pode ser observada na Figura 16.

Figura 16 Espectro de RMN ¹H, ¹³C e IV da diazocetona **53**.

Figura 17 Espectro de RMN ¹H para o isômero Z **123**.

Juntamente com os experimentos de HWE, uma segunda tentativa para se obter **53**, ainda que pouco provável de ocorrer satisfatoriamente, foi realizada utilizando o método clássico para formação de diazocetonas (acilação do diazometano na presença de cloretos de acila e anidridos mistos).^{6,8,13,15,21} Esta metodologia funciona muito bem para compostos saturados, ou com duplas ligações bastante impedidas/substituídas. No caso das diazocetonas α,β-insaturadas, esta metodologia falha uma vez que o diazometano reage paralelamente através de uma reação de

cicloadição 1,3-dipolar com a dupla ligação, levando a formação de diazopirazolinas assim como anteriormente discutidas na presente introdução.¹⁴¹ O ácido **125**, obtido através da reação entre benzeno e o anidrido maleico **124** via acilação de Friedel-Crafts, foi submetido à ativação com cloreto de oxalí ou tionila (ambas as condições foram testadas) para fornecer o intermediário cloreto de ácido **126**. A acilação com diazometano em presença de trietilamina como base forneceu um produto majoritário via análise por TLC e nenhum indício do produto desejado **53** (Esquema 44). O resíduo bruto foi enviado para RMN ^1H , não sendo possível confirmar a pirazolina (várias misturas isoméricas podem estar presentes e dificultaram a análise).

Esquema 44 Obtenção da diazocetona **53** via acilação do diazometano.

Enquanto o fenilglioal leva a síntese da diazocetona **53** de forma direta em apenas uma etapa, outras rotas alternativas foram investigadas sob condições compatíveis com a funcionalidade diazo. Por exemplo, a etapa de olefinação poderia ser realizada com os aldeídos protegidos **127** e **128** e o diazofosfonato **32** (Esquema 45). No caso da reação de HWE com o aldeído protegido **127**, a diazocetona *O,O*-acetalfenilsulfona **129** poderia ser clivada em condições básicas utilizando DBU para levar a **53**.¹⁴² Por outro lado, o grupo de proteção TBS na diazocetona **130** poderia ser removido usando TBAF para fornecer o álcool **131**. A diazocetona **53** seria formada após oxidação de Dess-Martin Periodinona (DMP). É importante mencionar que tanto a desproteção com TBAF¹⁴³ como a oxidação com DMP¹⁴⁴ foram previamente empregados com sucesso em substratos contendo a funcionalidade diazo.

Esquema 45 Rotas alternativas para a obtenção da diazocetona **53** a partir dos aldeídos **127** e **128**.

Para o preparo do aldeído **127**, uma reação de diidroxilação mediada por tetróxido de ósmio a partir da vinsulfona comercialmente disponível **132** forneceu o diol **133** com 70% de rendimento (Esquema 46). Em contraste, os ensaios de proteção da 2-hidroxiacetofenona comercial **135** com **133** mostraram-se tediosos. A preparação da 2-hidroxiacetofenona protegida **134** sob várias condições (com remoção de água via Dean-Stark) utilizando PPTS, HCl e pTsOH como fontes ácidas falhou.

Esquema 46 Rota para a síntese do aldeído **127**.

Os Aldeídos **128** e **140** foram obtidos após a proteção do (S)-etil mandelato **136** e (S)-etil lactato **137** com TBS e redução direta do éster **138** e **139** utilizando DIBAL-H em rendimentos quantitativos (Esquema 47).¹⁴⁵ O aldeído **128** foi reagido com o diazofosfonato **32** sob condições de olefinação utilizando NaOH/EtOH. As primeiras tentativas proporcionaram a diazocetona-TBS **130** com 17% de rendimento. A condição clássica de HWE usando NaH/THF não foi avaliada. Infelizmente, o álcool **131** não foi obtido após tratamento com TBAF/THF proporcionando uma mistura complexa de decomposição após o *work-up* (Esquema 47). Embora ambas as rotas sintéticas se demonstraram promissoras, os rendimentos obtidos a partir da reação

direta entre o fenilgloxal **121** anidro e diazofosfonato **32** mostraram-se suficientes para manter o desenvolvimento do projeto.

Esquema 47 Obtenção dos aldeídos **128** e **140**.

Desta forma, após preparar as diazocetonas, os ésteres β,γ-insaturados **141-153** foram obtidos pelo rearranjo de Wolff. O procedimento geral é realizado a partir da fotólise de uma solução 0.02 M da diazocetona em acetonitrila na presença de 1-10 equivalentes dos álcoois alílicos **154-158** (Esquema 48). Com exceção dos álcoois **157** e **158** (Esquema 49), os outros exemplos são disponíveis comercialmente. Seu preparo é obtido a partir do metil crotonato **160** e do éster **163** (obtido pela esterificação do ácido sórbico **162**). A reação de Wohl-Ziegler^{146,147} a partir de **160** e **163** na presença de NBS e um iniciador radicalar (AIBN, peróxido de benzoíla ou UV) fornece os brometos alílicos **161** e **164** em 56 e 50% de rendimento, respectivamente. Os álcoois alílicos são então preparados após reação na presença de Ag₂O e H₂O. No caso do brometo **164**, esta mesma transformação pode ser realizada com NaHCO₃ (Esquema 49).

Cabe destacar, que a fonte luminosa para realizar o rearranjo de Wolff pode ser tanto uma lâmpada de arco de Xenônio de 260 W quanto uma lâmpada comercial de LED de 18 W (assim como descrito no capítulo 1). Os rendimentos obtidos são similares, e o tempo reacional varia entre 15 minutos até 4 h (no caso da lâmpada de Xenônio) e 24 h para a lâmpada de LED.

Esquema 48 Ésteres insaturados **141-533** obtidos através do rearranjo de Wolff na presença dos álcoois **154-159**.

Esquema 49 Obtenção dos álcoois **157** e **158**.

O rearranjo de Wolff a partir de uma solução da diazocetona **113** para obtenção de **150** se demonstrou um pouco mais complicado que o usual (Esquema 50). O melhor resultado encontrado foi utilizando 0.9 equiv. do álcool alílico conjugado em xileno como solvente. A lâmpada empregada foi de LED branco de 18 W resultando em 77% de rendimento do produto **150** desejado após 24 h de reação. Este rendimento, entretanto, não foi reprodutível, possuindo uma diminuição significativa quando a escala reacional foi aumentada. O rendimento obtido ao utilizar 10 mg da diazocetona **113** (0.050 mmol) foi de 77%, 60% foi isolado quando 30 mg de **113** (0.144 mmol) foi empregada, por fim, 40% de rendimento ao solubilizar 111 mg de **113** (0.577 mmol) nas mesmas concentrações (Esquema 50). Variou-se também o número de equivalentes do álcool alílico conjugado (0.8 e 10 equivalentes) e os solventes (MeCN, acetona, éter etílico, dicloro, tolueno e xileno) em baixas concentrações (0.02 – 0.004 M). O tempo reacional foi acompanhado pelo consumo do material de partida por TLC, e variou entre 24 e 30h para a lâmpada de LED branco (18 W) e 1 – 4 h para a lâmpara de Xe (260 W). Um teste de rearranjo de Wolff foi realizado a partir da diazocetona **113** em água (Esquema 50). Neste caso, foi possível observar uma mistura de ácidos com diferentes geometrias *E/Z* provenientes da isomerização do substrato. No caso do substrato **53**, não foi possível isolar o produto de Wolff esperado utilizando metanol ou o álcool, tendo a reação resultado em uma mistura complexa de produtos que não pôde ser elucidada.

Esquema 50 Obtenção do éster **150** a partir de **113** e **158**.

A caracterização dos produtos de Wolff foi realizada de forma similar ao apresentado no capítulo 1. O espectro de RMN ^1H para o substrato **145** é apresentado na Figura 18, corroborando a estrutura pelos sinais olefínicos em δ 6.69 (**a**, dt, $J = 15.8, 4.7$ Hz, 1H), 6.05 (**d**, dt, $J = 15.8, 1.9$ Hz, 1H), 4.79 (**e**, dd, $J = 4.7, 2.0$ Hz, 2H) e 3.75 (**f**, s, 3H), sinais correspondentes ao incorporamento do álcool alílico **127** na estrutura. A ausência do hidrogênio α -diazocarbonílico em 5.32 ppm e a presença de um dubleto em 3.32 (**g**, dd, $J = 7.1, 1.5$ Hz, 2H) referente ao metileno α -carboxila (-CH₂-) também corroboram a estrutura. Análises de RMN ^{13}C , FTIR e de espectrometria de massas de alta resolução ratificam a estrutura e são apresentados na seção experimental.

Figura 18 Espectro de RMN ^1H obtido para o ester β,γ -insaturado **145** a partir da diazocetona **1** após rearranjo de Wolff na presença do álcool **157**.

4.2 Cicloadições [2+2]

Devido a semelhança estrutural com o substrato estudado por Padwa (Esquema 51), o primeiro precursor escolhido para avaliação das fotocicloadições [2+2] foi o éster **143**. O composto puro e isolado foi exposto nas mesmas condições reacionais descritas por Padwa e colaboradores, incluindo concentração, fotossensibilizador e tempo. Uma diferença, entretanto, se refere a fonte luminosa. Padwa utilizou uma lâmpada de média pressão de arco de Mercúrio de 450W, removendo comprimentos de onda abaixo de 330 nm pelo uso de um filtro de Urânio. Neste experimento, utilizou-se uma lâmpada de alta pressão de arco de Xenônio operando em 260 W disponível em laboratório.

A caracterização do produto formado a partir da irradiação de **143** foi realizada pela técnica de RMN ^1H indicando a formação de dois produtos majoritários correspondentes a um par de isômeros (Esquema 51). A mistura gerada corresponde a uma proporção 1:1 de isômeros com geometria *E* **113** e *Z* **165** da dupla ligação (em ambas insaturações presentes na estrutura, como observado no espectro de RMN ^1H da Figura 19).

Esquema 51 Reação de isomerização *E/Z* promovida por luz.

Figura 19 Espectros de RMN dos produtos de isomerização *E/Z*.

Em todos os casos em que o anel aromático está conjugado com a dupla ligação, os produtos isolados após irradiação foram caracterizados como sendo misturas *E/Z* em diferentes proporções, sempre tendendo a 1:1. Em nenhum caso foi possível detectar a formação do ciclobutano. Alguns derivados sem a conjugação com anel aromático, exemplos **146**, **147** e **148** foram submetidos as mesmas condições reacionais. Nas entradas estudadas, houve a degradação do material de partida e a formação de uma mistura complexa no caso do substrato **147** (análise de RMN ^1H do bruto reacional apresentou-se bastante complexa, com sinais de hidrogênios olefínicos semelhantes ao material de partida). Novamente, para os substratos **146** e **148**, a única reação observada consiste na isomerização *E/Z*. Os alcenos simples absorvem a luz na região de 180 nm e, na ausência de sensibilizadores, sofrem principalmente isomerização *E/Z*. Contudo, os alcenos conjugados (principalmente as enonas que absorvem a comprimentos de onda maiores), costumam formar compostos de cicloadição mais rapidamente.

Decidiu-se então investigar os ésteres α,β -insaturados da série D (Figura 15) os quais poderiam ser obtidos através de uma reação de isomerização da dupla ligação dos compostos da série A obtendo-se assim uma enona. Alguns testes de isomerização em meio básico foram avaliados a partir de **141** e **146**, como resumidos na Tabela 4. O produto de isomerização a partir de **141** não foi isolado nas condições avaliadas. A dupla ligação é sempre preferencial no sentido da conjugação com o anel aromático. Quando o substrato alquílico **146** foi aquecido (Tabela 4) em condições de refluxo utilizando 1 equivalente de DBU em tolueno, o produto isomerizado **167** foi isolado em 65% de rendimento após 48 h de reação.

Tabela 4 Isomerização de **141** e **146** em meio básico.

Composto	Base	Eq. base	Solvente	T (°C)	tempo	(%)
141	DBU	0.1	CH ₂ Cl ₂	t.a	48h	MR ^a
141	DBU	0.1	THF	50 °C	48h	MR ^a
141	DBU	0.5	CH ₂ Cl ₂	t.a	48h	MR ^a
141	DBU	0.5	Tolueno	refluxo	24h	-
141	NaH	1.0	THF	-20 °C – t.a	30 min	MR ^a
146	DBU	1.0	CH ₂ Cl ₂	t.a	48h	MR ^a
146	DBU	1.0	THF	50 °C	48h	MR ^a
146	DBU	1.0	Tolueno	refluxo	48h	65% ^b

^a material de partida recuperado após o término da reação. ^b rendimento para **167**.

A enona **167** foi então solubilizada em benzeno em uma concentração 0.0035 M e submetida as mesmas condições fotoquímicas de cicloadição [2+2], na presença e também na ausência do fotossensibilizador tioxantona. O material de partida não foi totalmente consumido e houve a formação de vários produtos de degradação. Entretanto, o bruto reacional foi enviado para análise de RMN ¹H sendo possível detectar os sinais do produto de isomerização *cis* **167b** juntamente com **167**. Novamente, ocorreu isomerização *cis/trans* como pode ser observado no espectro de RMN ¹H da Figura 20 (cabe ressaltar, que a separação entre **146** e **167** foi bastante

trabalhosa devido a semelhança de R_f). No caso de **167** e **167a**, não houve diferença de R_f nos diferentes eluentes testados.

De fato, Padwa observou um comportamento similar de isomerização quando utilizou um análogo de cadeia menor **170** (Esquema 52).¹³⁵ Mesmo contendo o ciclopropeno reativo e a enona, apenas isômeros *E/Z* foram obtidos após irradiar o éster **170**. Padwa justifica este resultado com questões de geometria, fazendo com que neste sistema a energia se mantenha localizada na porção cinamato. A irradiação prolongada conduz apenas à isomerização *cis-trans* em torno da ligação dupla.

Figura 20 Espectro de RMN ^1H do produto **146**, de isomerização **167** e **167a** antes e após fotólise.

Esquema 52 Substratos explorados por Padwa em fotocicloadições [2+2].

Os esforços foram então voltados para os ésteres da série E. Interessantemente, o rearranjo de Wolff a partir da diazocetona **53** se mostrou muito mais complexo do que geralmente é observado. O produto de rearranjo não pode ser obtido usando de 1-10 equivalentes do nucleófilo álcool alílico em solução de acetonitrila, nem mesmo quando o próprio álcool alílico foi utilizado como solvente (Esquema 54). Este fato pode estar relacionado com a fotossensibilidade do produto formado resultando em reações indesejadas após a formação do éster com tempos de irradiação prolongados. Uma reação teste foi realizada a partir da diazocetona **53** e de metanol como nucleófilo. De forma similar, houve uma grande degradação do material de partida sem que seja possível o isolamento de um produto majoritário.

Esquema 53 Tentativa de Rearranjo de Wolff a partir da diazocetona **53**.

Outros ésteres das séries B, C e F foram avaliados em diferentes condições, variando a presença ou não de fotossensibilizador, concentração, fonte luminosa, o único resultado obtido foi a isomerização em torno da dupla ligação (em ambos alcenos). O Esquema 54 ilustra um resumo dos dados coletados. Um último éster **149**

sintetizado (série K), com a presença de um segundo metileno ($-\text{CH}_2$) na cadeia que poderia facilitar a ciclização por permitir um maior grau de liberdade na geometria da molécula foi estudado. Entretanto, o mesmo resultado de isomerização foi observado.

Esquema 54 Resumo das reações de cicloadições testadas.

4.2.1 Aspectos mecanísticos da fotoisomerização E/Z

Um exemplo de isomerização fotoquímica *cis-trans* é mostrado no diagrama da Figura 21. A absorção de luz visível ou ultravioleta por uma molécula leva a estados excitados com energia suficiente para quebrar ou reorganizar a maioria das ligações covalentes. Uma reação fotoquímica ocorre quando o relaxamento de um estado excitado conduz a um isômero do substrato inicial ou quando sofre uma adição intermolecular de outra molécula (ou ainda intramolecular). Os estados excitados podem ser classificados como singlete ($\uparrow\downarrow$) ou tripleto ($\uparrow\uparrow$), com base no seu momento angular de spin eletrônico. No caso dos alcenos simples, existe uma grande diferença energética entre o estado singlete $(\pi, \pi^*)^1$ e o correspondente estado tripleto $(\pi, \pi^*)^3$, fazendo com que um cruzamento entre sistemas seja ineficiente. Esta grande

diferença em energia somada as características de spin eletrônico levam a diferentes tipos de reações ao se irradiar diretamente um alceno (singleto $\rightarrow$ singleto) e ao fazer o uso de fotosensibilizadores (S_i) que induzem o estado tripleto ($S_{\uparrow\uparrow} + M_{\uparrow\downarrow} \rightarrow S_{\uparrow\downarrow} + M_{\uparrow\uparrow}$). Enquanto ligações duplas isoladas requerem 180 nm de energia para promover a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, a conjugação com substituintes fenil, dienos ou polienos reduz a energia necessária para cerca de 300 nm.¹⁴⁸

Quando um alceno absorve um fóton, ambos isômeros *cis* e *trans* sofrem excitação $\pi \rightarrow \pi^*$ levando a um estado excitado (S_1^c e S_1^t) que retem a geometria do material de partida (Figura 21). No estado fundamental (S_0^c e S_0^t), a barreira energética de rotação em torno da ligação dupla produzida pela ligação π é de aproximadamente 60 kcal/mol (para o estilbeno, por exemplo). Nos estados excitados S_1^c e S_1^t , entretanto, esta barreira energética rotacional é inexistente uma vez que não existe uma ligação π real (linha pink no diagrama da Figura 21). Esses estados então podem relaxar rapidamente a um estado de energia inferior (S_1) que não possui qualquer informação de estereoquímica. Após este ponto, a conversão interna deste estado S_1 conduz a região do estado de transição do estado fundamental S_0 (ET no diagrama), que decai igualmente para os estados fundamentais dos isômeros *cis* e *trans*. Acompanhando o estado de energia S_1^c (próximo a $\theta = 0^\circ$) é possível observar que aproximadamente 70% (no caso do estilbeno) das moléculas neste estado relaxam para o estado S_1 (Figura 21). Os 30% restantes podem passar por um rearranjo eletrocíclico levando a subprodutos, esta etapa ocorre de forma bastante lenta. Outra reação comumente observada é a dimerização dos alcenos via cicloadição [2+2]. Cabe ressaltar, que isomerizações E/Z podem ser realizadas tanto com irradiação direta tanto com o uso de fotossensibilizadores levando a diferentes proporções dos isômeros desejados.

Figura 21 Diagrama de energia para a a) reação de isomerização E/Z b) dimerização ou eletrociclizações.

O que os resultados indicam é que a presença do ciclopropeno no substrato estudado por Padwa pode estar favorecendo a reação de duas formas: elevada reatividade do ciclopropeno e impossibilidade de isomerização, tornando este substrato bastante particular. A energia do ciclopropeno (54.1 kcal/mol) atribuída em grande parte à deformação angular é aliviada ao perder a hibridização sp^2 para formar as ligações sp^3 do ciclobutano.¹⁴⁹ Nos substratos estudados da série A-G, questões de geometria podem estar fazendo com que a irradiação prolongada conduza apenas à isomerização *cis-trans* em torno da ligação dupla.

4.3 Cicloadições [4+2]

No que diz respeito as reações de Diels-Alder, como mencionado anteriormente, idealizou-se as séries G-J como precursores principais a serem investigados (Esquema 55). A primeira série de substratos avaliados foi a G. Uma solução do substrato **153** em benzeno foi agitada em temperatura ambiente por 48 h, recuperando-se o material de partida após este período (Tabela 5). A solução foi então aquecida no ponto de ebulição do solvente benzeno, tolueno e xileno por 48 h, recuperando-se >99% do material de partida no caso com benzeno. Com tolueno e xileno houve degradação do material de partida. Já no caso do substrato **151**, as mesmas condições reacionais de aquecimento levaram a uma mistura complexa de degradação (Tabela 6).

Esquema 55 Substratos da série G-J a serem testados nas reações de Diels-Alder.

Tabela 5 Condições Diels-Alder térmicas a partir de **151** e **153**.

Composto	Solvente ^b	T (°C)	Tempo	(%)
151^a	benzeno	ambiente	48 h	MR ^a
151^a	benzeno	refluxo	48 h	MR ^a
151^a	tolueno	refluxo	48 h	degradação
151^a	xileno	refluxo	12 h	degradação
153^a	benzeno	ambiente	48 h	MR ^a
153	benzeno	refluxo	12 h	degradação

^a material de partida recuperado ^b concentração de 0.023 M ^c formação de vários produtos sem que tenha sido detectado o produto de interesse no bruto reacional.

O substrato **150** da série J (Tabela 6) foi estudado nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Inicialmente, uma solução do éster **150** em tolueno forneceu apenas a recuperação do material de partida (Tabela 6). A solução foi aquecida na temperatura de refluxo do tolueno e xileno, mas o material de partida permaneceu intacto. Nem mesmo o aquecimento em 165 °C no solvente tolueno utilizando um tubo selado foi suficiente. A reação começou a evoluir em temperaturas a cima de 200 °C, fornecendo o produto de Diels-Alder **171** em 70% de rendimento ao se utilizar uma concentração de 0.023M do éster em xileno sob aquecimento de 250 °C em tubo selado após 48h (entrada 6, Tabela 6). Cabe a ressaltar, que o rendimento considerando o éster **150** não reagido, foi de 80% (Esquema 56). A Figura 22 ilustra a formação dos produtos racêmicos endo-**171** e exo-**171** a partir de **150**.

Tabela 6 Condições Diels-Alder estudadas a partir de **150**.

Entrada	Solvente ^e	T (°C)	Tempo	(%)
1	benzeno	ambiente	48 h	MR ^a
2	benzeno	refluxo	48 h	MR ^a
3	tolueno	refluxo	48 h	MR ^a
4 ^b	tolueno	165	48 h	MR ^a
5 ^b	xileno	200	48 h	20% ^c
6 ^b	xileno	250	48 h	70% ^d
7	acetonitrila	refluxo	2 h	MR ^a

^a material de partida recuperado ^b reação em tubo selado, temperatura do banho medida pelo termômetro ^c rendimento aproximadamente, determinado por RMN ¹H ^d rendimento isolado 70% (80% considerando o éster **150** recuperado) ^e concentração de 0.023 M.

Esquema 56 Reação de Diels-Alder a partir de **150**: produtos *endo*-171 e *exo*-171.

Figura 22. Formação dos produtos *endo*-171 e *exo*-171.

O espectro de RMN ^1H do produto isolado por cromatografia *flash* em coluna de sílica revelou uma mistura de dois isômeros. Vários sistemas de eluentes foram testados em TLC em uma tentativa de separação sem sucesso. O cromatograma obtido pela análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas chromatography mass spectrometry* – GC-MS) revelou uma proporção *endo/exo* (m/z 286) de 1:1 para **171** (Figura 23). Esta proporção foi também confirmada por análise de HPLC em coluna C18.

Figura 23 Análise de GC-MS: endo/exo 171 (m/z 286) em uma proporção de 1:1

A estrutura do produto **171** foi determinada através da análise conjunta dos espectros de RMN de uma e duas dimensões tais como, ^1H , ^{13}C , COSY ^1H - ^1H e HSQC ^1H - ^{13}C . A atribuição obtida (Figura 24) e o espectro de RMN ^1H e ^{13}C para produto **171** isolado por HPLC em sistema purificação em escala preparativa é comparado ao espectro de RMN ^1H do éster β,λ -insaturado **150** na Figura 25. A separação dos isômeros endo/exo foi realizada por HPLC em uma coluna C18 utilizando um gradiente linear de MeCN/H₂O 50% em um fluxo de 1 mL.min⁻¹.

A primeira evidência encontrada é a ausência dos hidrogênios do trieno **150** na região entre 6.95 e 5.89 ppm (Figura 26) e a presença de dois novos sinais olefínicos em 5.82 e 5.75 ppm referentes ao H₆ e H₅ ($J_{\text{cis}} = 9.9 \text{ Hz}$), respectivamente. A presença de sinais diastereotópicos em 2.38/2.92 ppm (α -carbonila H₄ e H_{4'}) e 4.65/3.91 ppm (carbinólicos H₁ e H_{1'}), bem como os hidrogênios em 2.47 e 2.22 ppm referentes aos H_{4a} e H_{8a} na fusão dos anéis de 6 membros corroboram a estrutura. A estereoquímica relativa do produto **171** foi atribuída a partir da análise do espectro de RMN de ^1H com base nos valores das constantes de acoplamento entre H₇ (3.96 ppm) e H₈ (2.87 ppm) dos compostos isolados.

Figura 24 Atribuições da estrutura para o composto endo-**171**.

Figura 25 Espectro de ^1H e ^{13}C para o éster **150** e o produto de Diels-Alder **171**.

Figura 26 Expansão região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN ^1H do trieno **150**.

O isômero *endo*-**171** apresenta uma conformação do tipo cadeira onde os substituintes fenila e COOMe ocupam posição axial e equatorial, respectivamente (Figura 27). Observou-se que o hidrogênio H₇ apresenta uma constante de acoplamento de 6.6 Hz com hidrogênio H₈, o que sugere um acoplamento do tipo equatorial-axial. Além disto, não foi possível detectar interação entre o H_{8a}-H_{4a} a partir experimentos de nOe seletivo (irradiando em $\sigma_{H_{8a}}$ 2.22 ppm). No caso do produto *exo*-**171**, ambos substituintes fenila e COOMe ocupam posição equatorial, enquanto que os hidrogênios H₇ e H₈ possuem uma constante de acoplamento de 10.3 Hz que sugere um acoplamento *trans*-diaxial. Dados da literatura a partir de substratos similares corroboram com a elucidação realizada.^{150–152} A partir destas informações, pode-se concluir de maneira inequívoca a estereoquímica dos produtos isolados.

Figura 27 Análise estereoquímica relativa dos produtos *endo*-**171** e *exo*-**171**.

Visando melhores seletividades entre os isômeros *endo*/*exo*, avaliou-se a reação utilizando ácidos de Lewis como catalisadores. Algumas condições foram testadas incluindo ácidos como AlCl₃, BF₃·OEt₂, SnCl₄, NbCl₅ e BCl₃ disponíveis no laboratório no momento do estudo. As entradas investigadas estão resumidas na Tabela 7. As condições avaliadas foram baseadas em procedimentos descritos na literatura para substratos similares. Por exemplo, na presença de SnCl₄, a reação foi mantida em temperatura ambiente por 24 h, recuperando-se o material de partida ao final do período reacional (Tabela 7, entrada 5). Em uma segunda tentativa, a reação foi iniciada em temperatura ambiente e aquecida a 50 °C (em um tubo selado).

Novamente, não houve consumo do material de partida após 12 h de agitação, tendo sido recuperado (entrada 6). O mesmo tipo de comportamento foi observado na presença de BF_3OEt_2 e de AlCl_3 (entradas 1,2, 3 e 4). O material de partida foi convertido em produtos ao se utilizar NbCl_5 e BCl_3 , entretanto, não foi possível detectar o cicloaduto **171** na mistura do bruto reacional (entradas 7 e 8). Um último substrato **153** foi estudado. Entretanto o material de partida permaneceu intacto após 48 h de reação em 280 °C (Esquema 57).

Tabela 7 Condições da reação de Diels-Alder catalisada por ácido de Lewis.

Entrada ^b	Ácido de Lewis	Equiv.	Temperatura	Tempo	(%) 136
1	AlCl_3	0.1	0 °C – t.a ^d	12 h	MR ^c
2	AlCl_3	0.3	0 °C – t.a ^d	12 h	MR ^c
3	$\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$	1.5	t.a	48 h	MR ^c
4 ^a	$\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$	1.5	50 °C	24 h	MR ^c
5	SnCl_4	1.0	0 °C – t.a ^d	24 h	MR ^c
6	SnCl_4	1.0	t.a – 50 °C	12 h	MR ^c
7	NbCl_5	0.4	0 °C – t.a ^d	12 h	- ^c
8	BCl_3	0.2	0 °C – t.a ^d	12 h	- ^c

^a reação em tubo selado, temperatura do banho medida pelo termômetro ^b 20 mg (0.068 mmol) de **150** foram solubilizados em 1.4 mL de CH_2Cl_2 na temperatura indicada previamente à adição do ácido de Lewis. ^c produto **171** não foi identificado no bruto reacional (antes e após *work-up*, por análise de TLC). ^d temperatura de 0 °C no momento da adição do ácido de Lewis para atingir temperatura ambiente naturalmente.

Esquema 57 Reação de Diels-Alder a partir do substrato **122**.

4.3 Conclusões parciais

Este capítulo dedicou-se ao estudo de reações de cicloadições [2+2] e [4+2] a partir de ésteres β,γ -insaturados provenientes de diazocetonas α,β -insaturadas. A etapa de rearranjo de Wolff fotoquímico forneceu 13 substratos insaturados **141-153**, entre eles, 9 substratos para o estudo de cicloadição [2+2] e 4 para Diels-Alder. Os ésteres β,γ -insaturados **141-153** foram sintetizados a partir de 6 exemplos de diazocetonas e de 5 diferentes álcoois alílicos em 40-85% de rendimento. A reação ocorre de forma similar a descrita no capítulo 1, sendo possível utilizar lâmpadas de LED (18 W) e de Xenônio (300 W) em tempos variando entre 15 minutos (Xe) e 24 h (LED). Cabe ressaltar, que 5 novos exemplos de diazocetonas insaturadas (**53**, **112**, **113**, **114** e **130**) foram sintetizadas a partir de aldeídos como fenilgloxal, cinamaldeído e um aldeído protegido com TBS-**128**. Estas diazocetonas, especialmente **53**, **113** e **130**, podem abrir um leque de novas aplicações a serem exploradas. Os ésteres insaturados **141-149** foram submetidos em diferentes condições fotoquímicas de [2+2] na presença e ausência do fotossensibilizador tioxantona fornecendo misturas de isômeros com geometrias *E/Z* em proporção 1:1. Embora os produtos de cicloadição [2+2] não puderam ser obtidos, desenvolveu-se uma série de novas diazocetonas e de ésteres insaturados que podem vir a ser explorados futuramente pelo grupo de pesquisa do Prof. Antonio Burtoloso. Enquanto os substratos **151**, **152** e **153** permaneceram intactos em condições térmicas de Diels-Alder (110-280 °C), o trieno **150** forneceu o produto de Diels-Alder ($\pm$)**171** em 70% de rendimento quando aquecido em tolueno a uma temperatura de 250 °C em tubo selado. Experimentos de GC-MS, HPLC e RMN ^1H mostraram uma seletividade 1:1 dos produtos endo/exo. Os isômeros foram separados por HPLC em sistema preparativo. Melhores seletividades *endo/exo* foram exploradas fazendo o uso de diferentes ácidos de Lewis tais como AlCl_3 , $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, SnCl_4 , NbCl_5 e BCl_3 . Na maioria dos casos, o material de partida foi recuperado. Este resultado indica que condições de temperatura associadas ao uso de ácidos de Lewis mais fortes podem vir a converter o éster no cicloaduto de interesse.

CAPÍTULO III

5 Diazocetonas insaturadas como reagentes para modificação de proteínas

Este capítulo destina-se ao emprego das diazocetonas α,β -insaturadas em sistemas mais complexos, por exemplo, como reagentes para a modificação específica de proteínas. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Gonçalo Bernardes da Universidade de Cambridge, Reino Unido, como parte de um projeto BEPE/FAPESP. Compostos diazocarbonílicos insaturados foram empregados como aceptores de Michael pelo grupo do Prof. Antonio Burtoloso durante a síntese total do produto natural Preussina.⁶⁰ Dentre os exemplos estudados no grupo, uma diazocetona em particular, **53**, demonstrou-se extremamente reativa para adições de Michael (Esquema 58). Dessa forma, imaginou-se estes compostos como reagentes específicos para a ligação quimiosseletiva de cisteínas (Cis) ou lisinas (Lis) livres em proteínas nativas via adições 1,4. A inserção da funcionalidade diazocetona na superfície de uma proteína traria uma gama de transformações bioortogonais a serem exploradas. Após a instalação da diazocetona, reações mediadas por carbeno/carbenóides tais como rearranjo de Wolff, ciclopropanações e reações de inserção poderiam ser estudadas.

Este capítulo foi dividido em duas seções, introduzindo a importância de se modificar proteínas de forma quimiosseletiva, os métodos desenvolvidos até o momento, e os resultados obtidos para a otimização reacional utilizando reagentes carbonilacrílicos mais simples. Para compreender o sistema e provar a sua seletividade, amidas e ésteres α,β -insaturados foram propostos como modelos de um estudo aprofundado, incluindo cinética reacional, testes de estabilidade e aplicação na construção de proteínas e anticorpos funcionais (Esquema 58). Após definir as melhores condições para modificar as proteínas nativas e anticorpos utilizando reagentes carbonilacrílicos simples, a segunda seção é então voltada para o emprego e funcionalização dos seus derivados diazocarbonilacrílicos.

Esquema 58 Compostos carbonilacrílicos como reagentes para modificação específica de proteínas.

5.1 Modificação de proteínas

Ao longo de bilhões de anos de evolução, a natureza desenvolveu uma complexa máquina para anexar diversos grupos funcionais as proteínas - um processo chamado de modificações pós-translacionais (PTM).¹⁵³ Estas proteínas modificadas desempenham funcionalidades químicas em importantes processos celulares, incluindo tráfego vesicular, diferenciação, migração e sinalização.^{153,154} Por exemplo, a ligação de carboidratos em proteínas, um processo conhecido como glicosilação, pode melhorar a solubilidade e modular interações ligante-receptor.¹⁵⁴ Através da adição reversível de grupos fosfatos a serinas, treoninas ou resíduos de tirosinas, as enzimas podem permutar entre os estados ativos e inativos. De um modo semelhante,

a formação de complexos entre duas ou mais proteínas podem ser controladas.¹⁵⁴ Coletivamente, estes exemplos destacam como, através da introdução de pequenas modificações, a natureza muitas vezes redesenha a estrutura e função das proteínas para modular a diversidade biológica.^{153,154}

Com inspiração na natureza, a comunidade científica tem desenvolvido ferramentas para modificar covalentemente proteínas em laboratório, instalando seletivamente diferentes alterações com variadas aplicações.¹⁵³ Por exemplo, a circulação de meia-vida de uma proteína pode ser aumentada pela adição de unidades polietilenoglicol (PEG). A marcação de proteínas com compostos fluorescentes em células vivas permite a medida de parâmetros fisiológicos opticamente. Através da conjugação de anticorpos à fármacos citotóxicos, terapias anticâncer inovadoras com maior eficiência e redução de toxicidade podem ser obtidas.^{153,155–157} Acima de tudo, a modificação química de proteínas surgiu como uma ferramenta para a compreensão dos sistemas naturais, para a o preparo de conjugados terapêuticos com desempenhos melhorados, assim como a criação de novas proteínas com propriedades ou funções desejadas.^{158–166}

5.1.2 Estratégias para bioconjugação de proteínas

Apesar do progresso na área da química de bioconjugação, a comunidade científica ainda enfrenta muitos desafios, não apenas impasses sintéticos, mas também dificuldades envolvendo seletividade e estabilidade dos conjugados obtidos.^{iv} A quimiosseletividade e a suavidade do processo são quesitos essenciais para instalar precisamente modificações em locais pré-determinados, sem perturbar a estrutura, função e atividade das proteínas.^{160,167,168} Reatividade, acessibilidade e abundância de uma determinada cadeia lateral de aminoácidos são aspectos-chave necessários para conseguir a modificação seletiva de um certo resíduo sobre todos os outros. As primeiras metodologias descritas exibem pouca seletividade, oferecendo amostras heterogêneas com baixo controle sobre a posição de modificação.¹⁶⁷

Entre todos os aminoácidos proteinogênicos disponíveis na superfície das proteínas, a cisteína continua a ser o resíduo de escolha devido à sua baixa

^{iv} Pages 108 – 129: reproduced in part from Bernardim, B. *et al.* Stoichiometric and irreversible cysteine-selective protein modification using carbonylacrylic reagents. *Nature Communications*. (7) **2016**, 13128, doi: 10.1038/ncomms13128 with permission from Nature Publishing Group.

abundância e a alta nucleofilicidade da cadeia sulfidril. ¹⁶⁹ Na verdade, a maioria dos conjugados de proteínas utilizados em testes clínicos, como por exemplo os conjugados de anticorpo-droga (*Antibody Drug Conjugates* - ADCs), são preparados utilizando métodos de bioconjugação de cisteínas. ^{156,157} Vários reagentes de alquilação e aceptores de Michael têm sido e continuam a ser relatados para bioconjugação de cisteínas. ^{169,170}

5.2 Reagentes carbonilacrílicos

Apesar do grande desenvolvimento na área de bioconjugação de cisteínas, as maleimidas ainda são os reagentes mais utilizados. Este fato se deve principalmente à rápida cinética reacional, solubilidade em condições aquosas, reagentes facilmente sintetizados e o fato de que não requerer extensa engenharia genética da proteína alvo. Por exemplo, o ADC Brentuximab Vedotin, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de câncer, é preparado por conjugação de um fármaco-maleimida em resíduos de cisteína de um anticorpo. ¹⁷¹ No entanto, é bem documentado que os conjugados formados passam por rápidas reações de troca com tióis biológicos presentes no plasma *via* reações de retro-Michael, conduzindo à liberação das maleimidas e causando toxicidade (Esquema 59, a). ^{172,173} Um outro problema associado ao uso das maleimidas é a hidrólise natural da tio-succinimida em pH's fisiológicos, levando a formação de misturas heterogêneas de bioconjugados que prejudicam a ação farmacológica. No caso específico das maleimidas, as estratégias adotadas têm sido direcionadas ao aceleração da velocidade de hidrólise da tio-succinimida formada a fim de gerar um derivado de cadeia aberta totalmente estável (Esquema 59, b). Isto foi demonstrado tanto por engenharia genética da sequência de aminoácido adjacente a cisteína ¹⁷² ou por introdução química de um grupo amino sobre a estrutura maleimida (Esquema 59, b). ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Estas abordagens conduzem a conjugados que são mais estáveis *in vivo*, mas requerem extensa engenharia, uso de reagentes que resultam numa conjugação mais lenta, e que em muitas vezes fornecem misturas heterogêneas de conjugados hidrolisados vs conjugados não-hidrolisados. A substituição da olefina endocíclica por uma dupla ligação exocíclica também foi mostrado com fins de redução da reação de retro-Michael. ¹⁷⁷ No entanto, a cinética mais lenta da reação de maleimidas exocíclicas com

cisteínas requer um maior excesso de reagentes para alcançar conversões úteis em nível proteico.

Numa tentativa de proporcionar um método de bioconjugação de cisteínas que forneça compostos estáveis e resistentes a reações de retro-Michael, exploraram-se modelos carbonilacrílicos simples visando alta reatividade e seletividade em condições aquosas e um pH quase neutro (Esquema 59, c).

Esquema 59 Métodos para bioconjugação de cisteínas.

5.2.1 Construção de modelos de aminoácidos

O estudo foi iniciado pela reação do éster metílico do aminoácido cisteína protegido com Boc **173** com o reagente 3-benzoilacrilato **174** disponível comercialmente. Notavelmente, a reação ocorreu de forma completa (rendimento de 99%), utilizando quantidades estequiométricas de **174** em menos de dois minutos à temperatura ambiente (Esquema 60). A reação pode ser realizada tanto em meio orgânico puro (MeCN ou DMF) quanto em meio aquoso (30% de DMF em tampão de fosfato de sódio - NaP_i, pH 8.0, 50 mM), obtendo-se rendimentos equivalentes. Em um experimento de competição entre lisina e cisteína realizados sob as mesmas condições reacionais, apenas o aduto de enxofre é formado, permanecendo a lisina

intacta (Esquema 60, b). Cabe ressaltar, que nas mesmas condições, o éster metílico do aminoácido Lisina protegido com Boc **177** é consumido após 1 hora (Esquema 60, c). Estes resultados indicam elevada quimiosseletividade do reagente carbonilacrílico **174** para adições de Michael em cisteínas.

Esquema 60 Reação do éster carbonilacrílico **174** com cisteína **173** e lisina **174**.

Considerando a simplicidade estrutural do éster **174**, projetou-se uma série de variantes com a ajuda de cálculos mecânicos quânticos (QM), equilibrando reatividade e funcionalidade em ambas as extremidades da dupla ligação.^v Ésteres, cetonas e amidas **178-180** foram consideradas com o objetivo de encontrar um reagente altamente reativo que pode ser utilizado para conjugação rápida, seletiva e irreversível de proteínas (Figura 28). Um modelo abreviado para Cis (⁻SMe) foi usado nos cálculos como um nucleófilo sulfidríla. A reatividade de diferentes reagentes carbonilacrílicos foi avaliada a partir da variação de energia (ΔE) entre o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) do nucleófilo SMe⁻ e o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) do aceptor de Michael.¹⁷⁸ Esta análise previu olefinas 1,2-*trans* di-

^v Cálculos realizados pelo Prof. Dr. Gonzalo Jiménez-Osés do Departamento de Química da Universidad de La Rioja, Centro de Investigación en Síntesis Química, Spain.

substituídas equipadas com uma metil cetona e um éster (**178**, $\Delta E = 4.5$ eV), ou uma fenilcetona e uma amida (**179**, $\Delta E = 4.4$ eV) com reatividade comparável a de **174** ($\Delta E = 4.2$ eV) e a da maleimida ($\Delta E = 4.3$ eV). Uma outra informação importante extraída dos cálculos diz respeito a regioseletividade da adição de Michael, considerando ambos carbonos da dupla ligação atuando na funcionalização 1,4. Além de previsível por estabilidade do intermediário formado (Esquema 61), exemplos de adição de Michael a partir de ésteres similares corroboram a entrada do nucleófilo na posição β' da olefina com 100% de seletividade (Esquema 61).^{179–186}

Figura 28 Adição conjugada de metil tiolato na maleimida e nos reagentes carbonilacrílicos.

Esquema 61 Adição de Michael nas posições α e β do reagente carbonilacrílico.

Outro refinamento dos cálculos através do estado de transição confirmou que **174**, **178** e **179** estão dentro da mesma janela de reatividade quando comparada com a maleimida de referência (Figura 29). De nota, enquanto que uma amida é tolerada em um dos lados da ligação dupla, oferecendo grandes vantagens sintéticas para bioconjugação, a presença de amidas em ambas as extremidades da olefina, tal como em **180**, ($\Delta E = 5.1$ eV), reduz a sua reatividade calculada em até 7 ordens de grandeza devido à sua incapacidade para estabilizar a carga negativa acumulada na carbonilacrilamida após a adição de tiolato. Os resultados experimentais corroboram as previsões, com derivados os carbonilacrílicos **178-180** levando a formação completa dos produtos **181-183** (Figura 29).

Figura 29 Velocidade de reação relativa calculada e resultados experimentais da adição de SMe^- nos derivados carbonilacrílicos **174**, **178-180**.

Esquema 62 Adição de *N*-Boc-Cis-OMe **173** nos reagentes carbonilacrílicos **178-180**.

A cinética reacional foi avaliada utilizando a técnica de espectroscopia UV-VIS. Os espectros de UV dos compostos **174** (absorbância máxima 269) e **179** (absorbância máxima 275), em conjunto com os espectros dos correspondentes adutos de Michael **175** e **182** foram obtidos a temperatura ambiente em uma solução 0.075 mM em 30% MeCN/tampão de fosfato de sódio (pH = 8.0, 50 mM) (Figura 30).^{vi} Após a adição da cisteína **173**, a reação foi acompanhada pelo desaparecimento da absorbância máxima de ambos os compostos a cada 0.1 minutos (Figura 30). A determinação experimental da constante de velocidade de segunda ordem para o composto **174** (painel da esquerda) e **179** (painel da direita) foi realizada a partir da reta ($1/C - 1/C_0$) em função do tempo (K_2 (**174**) = $40,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e K_2 (**179**) = $10,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Figura 30. O espectro de UV dos compostos **174** e **179**, juntamente com os espectros dos adutos correspondentes **175** e **182** obtidos após a reação com **173**, a variação da concentração do composto **174** com o tempo e a determinação experimental da constante cinética de segunda ordem para a adição de **173** ao composto **174** é apresentada na Figura 30.

^{vi} Experimento realizado com o auxílio do Prof. Dr. Francisco Corzana do Departamento de Química da Universidad de La Rioja, Centro de Investigación en Síntesis Química, Spain.

Figura 30 Determinação experimental da constante de velocidade de segunda ordem.

Um experimento de competição foi realizado pela técnica de RMN ^1H para corroborar as constantes determinadas. Neste ensaio, 1 equivalente da cisteína **173** foi adicionada a uma solução 30% de CD_3CN / tampão de fosfato de sódio deuterado (pH 8.0, 50 mM) contendo uma mistura dos aceptores de Michael **174**, **179** e *N*-metilmaleimida em uma proporção inicial de 1:1:1. Após 10 minutos, um espectro de RMN ^1H foi obtido mostrando uma distribuição de produtos final de 1:0.22:0.58. A *N*-metilmaleimida reagiu primeiramente (integral 0.22), seguido do derivado éster **174**

(integral 0.58) e por último a amida **179** (integral 1). Este resultado indica uma taxa de reação comparáveis entre **174**, **179** e o derivado maleimida (Figura 31).

Figura 31 Experimento de competição de adição entre **174**, **179** e *N*-metilmaleimida em **173**.

Em seguida, a estabilidade do tioéter **184** obtido por meio dos carbonilacrilatos **179** foi comparada com os **185** obtidos usando maleimidas **186** convencionais (Figura 35). Os adutos de Michael **184** e **185** foram preparados a partir da reação entre a amida **179** e da *N*-benzil maleimida **186** com 4-nitrotiofenol em 95 e 80% de rendimento, respectivamente (Esquema 63).

Esquema 63 Síntese dos tioéteres **184** e **185**.

Utilizando um ensaio de UV-VIS, a cinética de degradação dos adutos cromogênicos **184** e **185** foi acompanhada. Demonstrou-se que em pH 7.4, o derivado **184** é completamente estável quando comparado com **185** (Figura 32). A absorbância do composto **184** é constante ao longo do tempo analisado, indicando que não há liberação de 4-nitrofenolato em solução ($\lambda = 410$ nm). Por outro lado, para o composto **185**, observou-se um aumento na absorbância ao longo do tempo. É importante notar que, embora ambos os compostos absorvam em 410 nm, a tendência constante do derivado **184** contrasta com a liberação observada no caso do composto **185**. O espectro do tiol **184** ($A_{0h} = 0.45$ nM, $A_{5h} = 0.45$ nM) e do **185** ($A_{0h} = 0.23$ nM, $A_{5h} = 0.35$ nM) ao longo de 5 horas é apresentado na Figura 32. Além disso, a incubação de **182** com a nucleófilos biológicos naturais, como a glutatona **186** (GSH), não demonstrou qualquer clivagem C-S ao longo de uma semana de incubação em pH fisiológico (avaliado por RMN ¹H e espectrometria de massas, figuras em anexo na seção experimental).

Figura 32 Comparação de estabilidade dos derivados **184** e **185**.

Esquema 64 Estabilidade do aduto de Michael **179** na presença de glutathione **186**.

5.2.3 Otimização da reação de bioconjugação de proteínas

Com uma nova classe de reagentes aceptores de Michael irreversíveis, seletivos e com cinéticas rápidas, o trabalho foi então voltado para a sua aplicação em bioconjugação de proteínas. Os derivados **174**, **178-180**, foram inicialmente avaliados com a Annexina V, uma proteína utilizada para identificação e quantificação de células apoptóticas que contém uma cisteína livre na posição 316 (Tabela 8).¹⁸⁷ Usando 25 equivalentes de **174**, **178-180** em NaPi (pH 8.0, 50 mM) durante 27 horas a 25 °C, encontrou-se por análise de massas (LC-MS), que apenas **179** forneceu uma conversão moderada para o aduto tioéter correspondente. Ambos os ésteres **174** e **178** passaram por hidrólise parcial sob as condições testadas, enquanto que **180** não reagiu (dados e espectros apresentados na seção experimental). Com base nestes resultados, decidiu-se otimizar as condições reacionais usando a amida **179** e verificou-se que, para Annexina V, a conversão completa para o produto (> 95%) pode

ser obtida utilizando-se 50 equivalentes de **179** após 1 hora de reação em 37 °C, como confirmado pela análise de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (Figura 33). O teor total da proteína no cromatograma antes e após a reação de conjugação é analisado por espectrometria de massas e a concentração de proteína é analisada após purificação do conjugado por ensaio de Bradford. Estas análises, em conjunto, confirmam a conversão completa para formação de um único produto com rendimento >95%. Um exemplo desta análise é apresentado na seção experimental. Em condições idênticas (pH 8.0 e 50 equivalentes), a reação da Annexina V com uma maleimida proporciona menos do que 50% do conjugado esperado com modificações adicionais na lisina.

Tabela 8 Bioconjugação de cisteínas em proteínas com **174**, **178-180**.

Proteína (10 μ M)	Reagente	Equivalentes	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conversão (%)
Annexina V	174	25	25	27	30 ^b
Annexina V	178	25	25	27	30 ^b
Annexina V	179	25	25	27	60
Annexina V	180	25	25	27	0
Annexina V	179	50	37	1	>95
C2Am	179	25	25	1	>95
Albumina	179	1	25	2	>95

^a Condições gerais de bioconjugação: Proteína (10 μ M) em Tris-HCl (pH 8,0, 20 mM), derivado carbonilacrílico **174**, **178-180** (1-50 equivalentes) dissolvido em DMF (1-10%). Reação em ependorfe durante o tempo indicado. ^b A hidrólise do éster foi observada por LC-MS. O espectro é apresentado na parte experimental.

Figura 33 Reação de bioconjugação entre a Annexina V e a amida **179**.

Após estabelecer as condições reacionais com a Annexina V, o escopo do método foi então avaliado com as proteínas C2Am e albumina (Figura 34). A C2Am é uma proteína que assim como a Annexina V possui aplicação na identificação e quantificação de células apoptóticas.¹⁸⁸ A albumina-Recombumina (Albumedix Ltd) é utilizada na entrega seletiva de fármacos (*drug-delivery*).¹⁸⁹ Ambas as proteínas possuem uma cisteína livre na superfície (na posição 95 e 34, C2Am e Recbomumina, respectivamente) e foram convertidas nos respectivos tio éteres correspondentes ao reagir com **179** (Figura 34). Interessantemente, no caso da albumina, a reação ocorreu em temperatura ambiente com apenas 1 equivalente de **179**, quantidade suficiente para que ocorra uma completa conversão (<95%). Este resultado demonstra a eficiência do presente método. Enquanto um leve excesso é necessário para a conversão da Annexina V (50 equivalentes) e da C2Am (25 equivalentes), quantidades estequiométricas de **179** podem levar ao conjugado dependendo da disponibilidade da cisteína na superfície da proteína. A análise do produto conjugado é realizada por LC-MS de forma similar ao apresentado para a Annexina V.

Figura 34 Proteínas avaliadas para bioconjugação com **179**.

Apesar da alta seletividade encontrada nos modelos de aminoácidos para a cisteína, decidiu-se realizar análises complementares para comprovar a reação específica nos derivados biconjugados. O mapeamento dos peptídeos por MSMS após digestão da proteína com tripsina comprovou a reação específica na cisteína. O espectro MS/MS do íon duplamente carregado (m/z 526.75) do peptídeo VPYCELGGK contendo a modificação da C2Am-**179** no resíduo cisteína é apresentado na seção experimental. O C-terminal y dos fragmentos (y6-y8) são consistentes com a massa da modificação. Além disso, testes envolvendo o bloqueio prévio da cisteína e posterior reação com a amida **179** corroboram essa seletividade (Esquema 65). A reação da Annexina V com 500 equivalentes do reagente *cis*-seletivo de Ellman's **187** forneceu o conjugado de Ellman's em rendimento superior a 95%. A adição de 50 equivalentes da amida **179** nas mesmas condições reacionais otimizadas (pH 8.0, 37 °C, 1 h) levou apenas a recuperação do material de partida sem qualquer evidência de adição de **179** no conjugado de Ellman's. Uma segunda reação foi realizada a partir do conjugado de Annexina V bloqueado com o composto **179** (Esquema 65). A análise de LC-MS após a adição de 500 equivalentes do reagente de Ellman's **187** mostrou o conjugado carbonilacrílico intacto. Estes resultados, somados a análise de MSMS (espectro apresentado na parte experimental), confirmam a alta seletividade do reagente **179** em pH 8.0 para cisteínas.

Esquema 65 Comprovação de seletividade através do reagente de Ellman's 187.

Um outro fator importante para demonstrar a potencialidade do método é a estabilidade dos biconjugados obtidos. O conjugado de albumina-179 foi encubado na presença de plasma humano e do tiol biológico GSH 186 (glutathiona) em 37 $^{\circ}$ C por 48 h (Figura 35). Ambas as condições são conhecidas por fornecer misturas heterogêneas de conjugados hidrolisados/não hidrolisados e de retro-Michael quando acoplados a maleimidas. Análises de LC-MS comprovaram a estabilidade de albumina-179 sem detecção de produtos de degradação (espectro adicionado na seção experimental). Finalmente, estudos de ressonância plasmônica de superfície (*Surface plasmon resonance* - SPR)^{vii} confirmaram que o conjugado de albumina-179 manteve sua capacidade de se ligar ao receptor Fc neonatal (FcRn).¹⁹⁰ A constante de dissociação (K_d) encontrada para a albumina (16.13 μ M) e para a albumina-179 (14.11 μ M) indica completa a afinidade da proteína modificada pelo ligante sem a perda de suas propriedades e de sua funcionalidade (Figura 35).

^{vii} Experimento de SPR com o receptor Fc neonatal foi realizado pela Ms. Elizabeth Perkins da Albumedix Ltd, Castle Boulevard, Nottingham, UK.

Figura 35 Análise da estabilidade do conjugado albumina-179 e avaliação das propriedades de ligação da albumina modificada e não modificada com do receptor neonatal FcRn via SPR.

Após encontrar um método geral para bioconjugação de **179** e explorar suas estabilidades e constantes cinéticas, decidiu-se modificar a estrutura do reagente carbonilacrílico a fim de incorporar diferentes grupos funcionais com variadas aplicações. Muitos dos reagentes de bioconjugação (fluoróforos, polietileno glicol – PEG e fármacos) são encontrados comercialmente contendo um grupo amino livre que pode ser facilmente acoplado com ácidos carboxílicos. Por exemplo, os reagentes carbonilacrílicos **194** contendo um fluoróforo nitrobenzofurazano ($\lambda_{\text{ex}} \approx 465$ nm e $\lambda_{\text{em}} \approx 539$ nm) e o derivativo PEG **195** foram sintetizados a partir do ácido carboxílico **191** na presença de HOBt/EDCI em 65 e 45% de rendimento, respectivamente (Esquema 66). O cloridrato **190** foi sintetizado a partir do reagente comercial 4-cloro-7-nitrobenzofurazano **188** após reação com *N*-Boc-etilenodiamina **189** e desproteção em meio ácido. O cloridrato **190** foi então tratado em meio básico para fornecer a amina **192** utilizada para fazer o acoplamento com o ácido **191**.

Os reagentes carbonilacrílicos **194** e **195** foram incubados na presença da Annexina V, C2Am e albumina nas mesmas condições otimizadas (pH 8.0, 1-50 equivalentes, t.a – 37 °C) levando as proteínas funcionalizadas com conversão superior a 95% após 1-2 h de reação (Esquema 67). Análises de gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) comprovaram a fluorescência dos conjugados sintetizados. A Figura 36 ilustra um exemplo de gel obtido com a proteína C2Am modificada (linhas 3, 5 e 7) e não modificada (linhas 2, 4 e 6) fazendo o uso de diferentes reveladores (fluorescente, Ruby e Coomassie Blue). As figuras dos géis das proteínas Annexina V e albumina são anexados na seção experimental.

Esquema 66 Síntese dos reagentes carbonílicrlicos funcionalizados **194** e **195**.

Esquema 67 Bioconjugação da Annexina V, C2Am e albumina com os reagentes **194** e **195**.

Figura 36 Análise SDS-PAGE do conjugado C2Am-194.

A utilidade das proteínas funcionalizadas foi avaliada pela atividade do conjugado fluorescente Annexina V-**194** em identificar e marcar células apoptóticas. A ligação da Annexina V com as células em processo de morte celular ocorre na presença do receptor fosfatidilserina que é exposto na membrana celular em processo de apoptose. Muitas das estratégias de marcação fluorescente de proteínas a partir de maleimidas são ineficientes, uma vez que o anexo sintético ligado a proteína é perdido via reações de retro-Michael.^{177,191}

As imagens fluorescentes obtidas pela leitura de microscopia das células apoptóticas e não apoptóticas após marcação com o conjugado Annexina V-**194** são apresentadas na Figura 37.^{viii} Um experimento controle foi realizado incubando-se a Annexina V-**194** com as células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) não apoptóticas (Figura 37, a). A análise de microscopia revela células de coloração azul com o uso do corante Hoechst, não sendo reveladas com o filtro fluorescente. Posteriormente, o mesmo conjugado foi adicionado ao meio após indução de apoptose celular com o fármaco actinomicina D (Figura 37, b). Neste caso, as células apoptóticas revelam em verde com o filtro FITC (isotiocianato de fluoresceína FITC com comprimentos de onda de excitação e emissão de aproximadamente 495 nm/521 nm). A Figura 37 atesta a capacidade da Annexina V-**194** quimicamente modificada de se ligar especificadamente ao receptor exposto na superfície celular durante a apoptose. Este resultado foi ainda confirmado após a pré-incubação das células apoptóticas com um excesso de Annexina V não modificada (25x). Com a maior parte dos receptores bloqueados, a posterior adição do conjugado Annexina V-**194** leva a leitura de um decréscimo significativo na intensidade de fluorescência (Figura 37, d).

Os resultados obtidos até o momento evidenciam a potencialidade do presente método. A reação fornece bioconjugados de proteínas estáveis, homogêneos e funcionais, retendo sua característica e propriedade biológica após a modificação.

^{viii} O cultivo das células HEK293 e a indução de apoptose foi realizada em colaboração com o Dr. Bruno Oliveira da Universidade de Cambridge, UK.

Figura 37 Imagens fluorescentes das células HEK293 apoptóticas e não apoptóticas (controle) após marcação com o conjugado Annexina V-194.

5.2.4 Bioconjugação de anticorpos com derivados carbonilacrílicos

Para expandir ainda mais a gama de aplicações, decidiu-se investigar a aplicação da metodologia desenvolvida para a modificação seletiva e funcional de anticorpos. Como substrato utilizou-se o Trastuzumab LC-V205C, um anticorpo amplamente usado para tratamento de câncer de mama.¹⁹² Previamente a conjugação com o reagente carbonilacrílico, o anticorpo foi tratado com o agente redutor TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) em temperatura ambiente para redução das pontes de dissulfeto. Uma re-oxidação para reformar as pontes internas de dissulfeto foi realizada usando o ácido dehidroascórbico. Para a bioconjugação, as mesmas condições otimizadas foram aplicadas (pH 8.0, temperatura ambiente). Interessantemente, a reação foi completa com apenas 1 equivalente de **179** e de **194** com conversão superior a 95%. A análise de espectrometria de massas mostrou apenas uma modificação da cadeia leve do anticorpo, enquanto que a cadeia pesada permaneceu não modificada. Este resultado indica uma completa re-oxidação das pontes internas de dissulfeto com a modificação ocorrendo apenas na cisteína livre. Enquanto maleimidas fornecem uma mistura de conjugados modificados (80-90%) e não modificados (10-20%),^{172,174,193,194} este método forneceu um conjugado puro e quimicamente definido.

Figura 38 Bioconjugação quimioseletiva e equimolar do Trastuzumab com 179 e 194. Espectro de massas para a cadeia leve do anticorpo antes e após conjugação.

A capacidade de interação antígeno-anticorpo (Trastuzumab-HER2) foi verificada pela técnica de interferometria de biocamada (*bio-layer interferometry* - BLI) e pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA).^{ix} O teste de ELISA é realizado em placas de poliestireno de 96 poços podendo detectar e quantificar substâncias tais como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios. De forma geral, os antígenos da amostra são ligados a superfície da placa de poliestireno. Em seguida, é aplicado um anticorpo específico sobre a superfície para que o mesmo possa ligar-se ao antígeno. Este anticorpo está ligado a uma enzima e, na etapa final, é adicionada uma substância contendo o substrato da enzima. A reação subsequente produz um sinal detectável via alteração de cor no substrato. A absorbância ou fluorescência dos poços de placas é então medida para determinar a presença e a quantidade de antígeno/anticorpo.

^{ix} Ensaio de BLI e ELISA realizado em conjunto com a Dr. Nuria Martínez-Sáez da Universidade de Cambridge, UK.

A interferometria bio biológica (BLI) é uma tecnologia para a medição de interações biomoleculares que analisa o padrão de interferência da luz branca refletida a partir de duas superfícies. Geralmente, uma camada de proteína imobilizada na ponta do biosensor e uma camada de referência interna. Qualquer alteração no número de moléculas ligadas à ponta do biosensor provoca uma alteração no padrão de interferência que pode ser medido em tempo real, proporcionando a capacidade de monitorar a especificidade de ligação com precisão.

Os resultados obtidos por ELISA e BLI mostram que o Trastuzumab-**179** não perdeu sua capacidade de ligação com o antígeno HER2 após a modificação. Enquanto o anticorpo não modificado possui uma constante de dissociação (K_D) de 14 ± 1.4 nM, o Trastuzumab-**179** possui um K_D de 11 ± 2.3 nM, apresentando total funcionalidade e atividade após as modificações realizadas. As constantes obtidas para o anticorpo modificado e não modificado podem ser observadas nos gráficos extraídos do experimento de BLI da Figura 39. Os gráficos referentes ao ensaio de ELISA estão anexados na seção experimental.

Figura 39 Curvas BLI para o Trastuzumab-**179**, não modificado e as constantes K_D obtidas.

A especificidade anticorpo-antígeno para o conjugado modificado com o fluoróforo **194** foi ainda avaliada por citometria de fluxo.^x Nesta análise, utilizou-se as células SKBR3 e HepG2. Em oposição a super expressão do antígeno her2/c-erb-2 proveniente das células SKBR3, as células HepG2 expressam baixos níveis destes alvos. Estas duas linhas celulares foram incubadas com o anticorpo fluorescente-**194**

^x Experimento de citometria de fluxo realizado pela Ms. Inês S. Albuquerque do Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal.

para quantificar a percentagem da população que foi revelada *via* citometria de fluxo em diferentes concentrações (10, 50 e 150 nM). Os resultados mostram que após o tratamento com o anticorpo modificado a 150 nM por 1 h, >90% das células SKBR3 são reveladas (filtro FITC), enquanto que somente ~20% das células HepG2 são positivas para este marcador (Figura 40). Estes resultados estão de acordo com o que foi anteriormente publicado no que diz respeito à marcação de anticorpos anti-her2.¹⁹² Em concentrações mais elevadas, ambas as linhas celulares apresentaram níveis de coloração elevados, indicando ligação inespecífica do anticorpo. Em concentrações inferiores a 10 nM, não houve coloração observável. Estes resultados mostram claramente que o Trastuzumab-**194** retém sua especificidade her2/cerb-2 em concentrações semelhantes às descritas na literatura anteriormente.

Em conjunto, todos estes resultados mostram que este novo método de bioconjugação fornece bioconjugados estáveis, funcionais e homogêneos utilizando quantidades equimolares dos reagentes carbonílacrílicos em apenas uma etapa. Neste momento, após a prova de conceito e de reatividade, os esforços foram voltados ao estudo dos derivados diazocarbonílacrílicos.

Figura 40 Percentagem de células reveladas (filtro FITC) após o tratamento das células com o Trastuzumab fluorescente e não fluorescente.

5.3 Reagentes diazocarbonilacrílicos

A modificação química de proteínas pode ser conseguida a partir de aminoácidos naturais (por exemplo, Cys) ou via um aminoácido não natural contendo um grupo funcional de reatividade única. Azidas, alcinos, cetonas, alcenos e tetrazinas são exemplos de grupos que podem ser incorporados na superfície. Dependendo da aplicação, uma limitação das cadeias naturais é a modificação de proteínas purificadas, uma vez que muitas outras biomoléculas podem apresentar a mesma funcionalidade no caso de uma mistura complexa. Por outro lado, utilizando-se aminoácidos não naturais, reações seletivas a estes grupos funcionais permitem a modificação seletiva de proteínas individuais em misturas complexas, incluindo organismos vivos.^{195–197} Normalmente, grupos bioortogonais são incorporados em uma proteína seguido de modificações quimiosseletivas.¹⁹⁸ Esta abordagem é muitas vezes designada como “marcar e modificar”, do inglês *tag-and-modify*.¹⁹⁹

Como apresentado na introdução, o grupo diazo tem uma reatividade característica capaz de promover uma gama de aplicações em síntese orgânica. Este fato, somado a alta quimiosseletividade os revela potenciais e valiosos reagentes para química biológica. Enquanto diazoalcanos possuem baixa utilidade em bioquímica devido a sua pronunciada toxicidade, compostos diazo estabilizados pela deslocalização dos elétrons no carbono α para outro grupo funcional possuem compatibilidade e aplicabilidade em sistemas vivos.²⁰⁰ A presença de grupos diazo em produtos naturais como Kinamicina D, lomaiviticina A/B e a sua pronunciada atividade antitumoral destaca sua participação em um contexto biológico.²⁰¹ Raines e colaboradores publicaram em 2016 uma revisão destacando a importância do uso compostos diazo em biologia química.²⁰²

Apesar de extremamente versáteis, poucos exemplos de reações bioortogonais a partir de conjugados diazocarbonílicos são encontrados na literatura. Ésteres de *N*-hidroxissuccinimida (NHS) contendo um grupo α -diazocarbonílico foram utilizados como reagentes de conjugação de biomoléculas de complexidade variável.^{203–206} Um exemplo de transformação a partir de uma diazo-proteína empregada em reações de cicloadição 1,3-dipolar com alcinos é apresentado no Esquema 68.²⁰⁶

Esquema 68 Diazo-lisozima empregada em reações de cicloadição 1,3-dipolar com ciclooctinos.

No que se refere às reações catalisadas por metais, questões de solubilidade e estabilidade associadas aos catalisadores metálicos em solução aquosa podem resultar reações de inserção com água e com muitos dos grupos funcionais presentes nas superfícies das proteínas. Ajustando-se os parâmetros reacionais, a seletividade entre essas vias poderia ser alcançada. Apesar de muitas melhorias nas reações catalisadas por metais de transição em meios aquosos ou bifásicos,^{207–217} abordagens de bioconjugação usando grupos diazo permanecem marginalmente exploradas. Chi-Ming Che e colaboradores relataram reações de inserção e ciclopropanação intermolecular usando um catalisador de metaloporfirina solúvel em água (Esquema 69).²¹⁸ Outro exemplo foi reportado por Francis e Antos usando $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ para a modificação de triptofano. (Esquema 69).^{219–221} É importante notar que nesses casos, o composto diazocarbonílico atua como reagente para proteínas nativas ou pré-funcionalizadas. Reações mediadas por carbenos/carbenóides em proteínas contendo a funcionalidade diazo na superfície não são descritas na literatura e representariam um avanço inestimável em biologia química.

Esquema 69 Exemplos de diazocompostos aplicados na modificação de proteínas.

A reação entre uma diazocetona como o exemplo **53**, poderia levar a uma proteína contendo a funcionalidade diazo após adição de Michael seletiva para cisteínas. Reações mediadas por carbeno/carbenóide via cicloadições, rearranjo de Wolff ou ciclopropanações na presença de fluoróforos, fármacos ou açúcares poderia fornecer uma contribuição importante no desenvolvimento de reações bioortogonais com diferentes aplicações em química biologia. Após o estabelecimento de modelos carbonilacrílicos como reagentes diretos, irreversíveis e Cis-seletivos, a atenção foi então voltada para o estudo de seus derivados diazocarbonilacrílicos.

Esquema 70 Reações bioortogonais a partir de diazocompostos.

5.3.1 Adição de tio-Michael no reagente diazocarbonilacrílico

A adição de quantidades estequiométricas do aminoácido *N*-Boc-Cis-OMe **173** em uma solução da diazocetona **53** em acetonitrila forneceu o adulto de Michael **196** em um rendimento de 90% após 10 minutos de reação. O mesmo resultado foi obtido em meio aquoso a partir de uma solução de DMF a 30% em tampão de fosfato de sódio (NaP_i, pH 8.0, 50 mM) em temperatura ambiente (Esquema 71). Para evitar uma possível degradação da funcionalidade diazo, o tampão de TrisHCl (pH 8.0, 20 mM) previamente utilizado foi substituído por NaP_i (pH 8.0, 50 mM).

Esquema 71 Reação de adição de cisteína **173** na diazocetona **53**.

O produto **196** foi confirmado pela análise de RMN ¹H e de ¹³C. O espectro obtido é apresentado na Figura 41. A ausência dos sinais olefínicos em 7.89 e 7.01 pm confirmam a adição da cisteína **173**. A presença do singlete **c** característico do grupo de proteção Boc em 1.45 ppm (9 H) e a metoxila **b** em 3.77 ppm (3 H) corroboram a estrutura. Outro sinal importante é o singlete em 5.79 ppm (1 H) referente ao hidrogênio α-carboxila ligado ao grupo diazo. Análise de espectroscopia confirma a diazocetona pela banda em 2100 cm⁻¹. O espectro de RMN ¹³C apresenta sinais duplicados que podem ser resultado de uma mistura de diastereoisômeros ou de rotâmeros (sinais alargados são também observados no espectro de RMN ¹H). Cabe ressaltar, que no caso da adição da cisteína **173** nos reagentes carbonílacrílicos **174,178-180**, observou-se a formação de **175, 181-183** como uma mistura de diastereoisômeros que foi confirmada por experimentos de RMN de ¹H e ¹³C em alta temperatura (DMSO-*d* a 90 – 100 °C). Análises adicionais (por exemplo por HPLC) para determinar a proporção diastereoisomérica não foram realizadas.

Figura 41 Espectro de RMN ^1H e de IV do aduto de Michael **196**.

A reação de Michael foi também explorada a partir da diazocetona α,β insaturada **1** derivada do benzaldeído. A adição da cisteína **173** em uma solução da diazocetona **1** em acetonitrila forneceu apenas a recuperação dos materiais de partida. A reação foi acompanhada por RMN ^1H a cada 1 h em um período de 12 h (espectro adicionado nos anexos). Ao adicionar 50 mol% de trietilamina, a reação evoluiu ao longo de 6 h até chegar em uma proporção 1:1.5 (material de partida:produto). A alíquota analisada ao final de 12 h revelou que o produto passou por uma reação de retro Michael, chegando em uma proporção final de 1:0.8 (Figura 42). A reação realizada em meio aquoso (NaP_i pH 8.0, 50 mM) ocorreu de forma bastante lenta, com uma conversão de apenas 5% ao final de 12 h (espectro adicionado nos anexos). Quando o pH reacional foi aumentado para 9.0, a reação chegou a 10% de conversão. Com estes resultados em mãos, decidiu-se focar no comportamento da diazocetona **53** como reagente para modificação seletiva de proteínas.

Esquema 72 Reação entre a diazocetona **1** e *N*-Boc-Cis-OMe **173** em acetonitrila.

Figura 42 Espectro de RMN ^1H para a reação entre a diazocetona **1** e *N*-Boc-Cis-OMe **173**.

5.3.2 Bioconjugação de proteínas com o reagente diazocarbonilacrílico **53**

O reagente diazocarbonilacrílico **53** foi avaliado para a modificação da Annexina V. Em condições idênticas as aplicadas anteriormente utilizando-se **179**, a conversão completa (> 95%) pôde ser obtida com 50 equivalentes de **53** após 1 hora de reação em 37 °C, como confirmado por análise de espectrometria de massa por cromatografia líquida (Figura 43). Os testes químicos que envolveram o bloqueio da cisteína utilizando o reagente de Ellman's **187** previamente a reação com **53** mostraram uma completa seletividade para cisteínas. Os resultados estão em total concordância com os anteriores obtidos (Esquema 73). Todos os espectros de massas para cada transformação estão anexados na seção de anexos.

Figura 43 Bioconjugação da Annexina V com a diazocetona **53**.

Esquema 73 Testes químicos de Ellman's com os conjugados de Annexina V-**53**.

5.3.3 Reações bioortogonais mediadas por carbeno/carbenóide

Após bioconjugação da Annexina V com o reagente diazocarbonilacrílico **53**, avaliou-se em seguida a sua aplicação em reações bioortogonais mediadas por carbeno/carbenóide. Realizou-se o rearranjo de Wolff catalisado por luz a partir do conjugado de Annexina V utilizando 1000 equivalentes de benzilamina **32** e uma lâmpada de absorção em 350 nm durante 0.5 - 1 h. A análise de LC-MS mostrou decomposição total da proteína.

A primeira tentativa metal-catalisada foi baseada em um catalisador biocompatível de ferro(III) – FeTPPCI - capaz de realizar reações de ciclopropanação eficientemente a partir de diazoacetato de etila na presença do microorganismo *E. coli*.²¹⁷ O conjugado de Annexina V-**53** foi incubado com 0.1 - 20 equivalentes do catalisador FeTPPCI na presença de 1-1000 equivalentes de 4-vinilanol **198** em 37 °C durante 0.5 - 24 h (Tabela 9). A análise de massas sugere que o catalisador consegue deslocar eficientemente o grupo diazo pelo aparecimento de um pico de massa -28 (-N₂). Entretanto, estes resultados indicam que o carbenóide de Fe pode estar reagindo com alguma cadeia de aminoácidos lateral (exemplo Lis) antes de ser atacado pela olefina. Realizou-se a mesma reação na presença de 0.1 - 1000 equivalentes de benzilamina **199** (Esquema 74), apresentando espectros de massas com aspectos semelhantes. Estes resultados devem ser investigados profundamente com análises de MSMS e reações controle na ausência de olefina ou amina. Modelos de aminoácidos contendo a funcionalidade diazo poderiam fornecer dados para a melhor compreensão do sistema. Devido as questões de escala anteriormente mencionadas para o preparo da diazocetona **53**, decidiu-se investigar uma rota alternativa para a obtenção do composto **196**. Este aduto serviria como base para a otimização reacional em termos de catalisador, quantidade de nucleófilo necessária e tempo.

Tabela 9 Condições testadas para a ciclopropanação da Annexina V-53.

Annexina V (10 μ M)	198	FeTPPCI	Tempo (h)	Conversão (%)
1	1	0.1	3	-
1	5	0.1	0.5	-
1	5	0.1	24	-
1	10	1	1	-
1	50	20	0.5	-
1	500	1	1	-
1	1000	1	1	-

Esquema 74 Condições testadas para a inserção de benzilamina na Annexina V-53.

A reação de 1 equivalente do éster metílico Boc-Cis **173** com 1 equivalente do ácido *trans*-benzoilacrílico **191** em temperatura ambiente forneceu o aduto **200** com um rendimento quantitativo após 12 h de agitação vigorosa (Esquema 75). Foram avaliados diversos métodos de ativação de ácidos carboxílicos previamente a adição de diazometano no aduto **200**, incluindo IBCF/NMM, TsCl, TBTU/DIPEA, CDI e o método clássico com cloreto de oxalila. Análises FTIR e RMN ^1H das amostras brutas mostraram que o aduto **201** não foi obtido a partir das condições estudadas,

apresentando distribuições de produtos constituídas de éster metílico proveniente da esterificação direta do ácido carboxílico **200** com diazometano, assim como por subprodutos de decomposição.

Esquema 75 Tentativa de obtenção do aduto **196** via acilação do diazometano com ácido **201**.

A falha na obtenção de **196** em quantidades significativas de trabalho prejudicou o andamento da otimização da reação. Uma alternativa nesta rota seria a substituição do grupo de proteção da cisteína Boc por Cbz. Embora as reações mediadas por carbenos/carbenóides não puderam ser avaliadas em modelos de aminoácidos, a funcionalidade diazocetona foi instalada na superfície da proteína com sucesso em conversão superior a 95%. A exposição deste conjugado a um catalisador de ferro levou a extrusão de nitrogênio, mostrando uma efetiva formação do intermediário reativo. Este resultado abre um leque de novas aplicações a serem exploradas, não somente ciclopropanações ou inserções, mas incluindo todas as reações pertinentes a funcionalidade diazo que sejam compatíveis com as biomoléculas.

5.4 Conclusões parciais

Em resumo, um novo método de bioconjugação seletivo para cisteínas a partir de reagentes carbonilacrílicos foi desenvolvido.²²² A reação ocorre em um elevado grau de seletividade fazendo o uso de quantidades estequiométricas de reagentes sinteticamente acessíveis. Três exemplos de proteínas (Annexina V, C2Am e albumina) foram convertidas em conjugados homogêneos em conversões superiores a 95%. As proteínas modificadas apresentaram-se totalmente estáveis quando expostas a GSH e plasma sanguíneo, retendo a sua função biológica, como evidenciado pela detecção de células apoptóticas. A reatividade superior e a seletividade dos reagentes carbonilacrílicos permitiram o acesso a um anticorpo modificado totalmente homogêneo. O Trastuzumab foi reagido com quantidades equimolares de **179** e **194** após redução e oxidação das pontes de dissulfeto, fornecendo um conjugado totalmente funcional como evidenciado pela sua perfeita capacidade de interação anticorpo-antígeno. O método foi ainda estendido com sucesso para o reagente diazocarbonilacrílico **53**. A reação ocorre em condições aquosas e diazo compatíveis com um elevado grau de seletividade para cisteínas. Diazocetonas mais simples, como o exemplo **1** derivado de benzaldeído passaram por retro-Michael nas condições estudadas (pH 8.0 – 9.0). A proteína Annexina V foi modificada com conversão superior a 95% usando 50 equivalentes da diazocetona **53** em pH 8.0 (NaP_i 50 mM). Após a purificação da proteína, reações bioortogonais mediadas por carbeno/carbenoide foram investigadas. Análises de massas evidenciaram a perda de m/z 28 (-N₂) quando a Annexina V contendo a diazocetona foi submetida a um catalisador de Fe(III) na presença de 1-1000 equivalentes de benzilamina ou vinilanol. Este resultado se mostra promissor, indicando o sucesso na formação do carbenóide de ferro e o ataque instantâneo de um aminoácido vizinho da superfície da proteína (exemplo lisina) imediatamente após a sua formação. Como perspectivas nesta proposta, uma investigação profunda das reações de inserção, rearranjo de Wolff e ciclopropanação em modelos de aminoácidos (como por exemplo, o aduto **196**) poderia fornecer dados importantes para a compreensão do sistema. O uso das proteínas albumina e C2Am poderiam ser uma alternativa a Annexina como substratos a serem avaliados. Estes resultados abrem um leque de oportunidades na área de reações bioortogonais para futuras aplicações em biologia química.

Parte experimental

6 Experimental

Todas as reações não aquosas foram realizadas sob uma atmosfera de argônio utilizando vidro seco em estufa (150 °C), salvo quando indicado. Uma vez removida da estufa, a vidraria foi resfriada sob vácuo e posteriormente a atmosfera trocada por argônio.

6.1 Considerações gerais

Solventes e reagentes

Todos os solventes foram secos e destilados antes da sua utilização por meio de procedimentos padrões. Os reagentes foram comprados na mais alta qualidade comercial, sendo utilizados sem purificação adicional; a menos que indicado de outra forma.

Aquecimento e resfriamento

Os balões reacionais foram aquecidos utilizando blocos controlados termostaticamente, banhos de areia ou de óleo. As temperaturas de reação são indicativas do ponto de referência do termostato ou termômetro, a menos que aquecida a refluxo, onde a temperatura indica a temperatura de refluxo do solvente. As reações indicadas como sendo realizadas a 0 °C referem-se a um banho de resfriamento externo de gelo/água, periodicamente substituído. As reações indicadas como sendo realizadas a -20 °C referem-se a um banho de arrefecimento externo de gelo/cloreto de sódio/água, periodicamente substituído. As reações indicadas como sendo realizadas a -78 °C referem-se a um arrefecimento externo com gelo seco/acetona ou gelo seco/etanol (aproximadamente -78 °C), mantido por adição de mais gelo seco.

Cromatografia

A cromatografia em coluna *flash* foi realizada utilizando sílica gel 60 Å (0.040-0.063 µm) da SigmaAldrich ou Merck Millipore. As reações foram monitoradas por Cromatografia em Camada Fina (placa CCD, Fluka, matriz sílica gel, suporte de alumínio, com indicador fluorescente 254 nm e espessura de 200 µm), ou em placas de vidro Merck Silica gel 60 F254 de 1 mm. A visualização pode ser tanto por radiação ultravioleta (254 nm) ou coloração com uma solução preparada por procedimentos conhecidos. A cromatografia em camada fina preparativa foi realizada utilizando placas de vidro preparadas em laboratório ou Analtech Uniplate Silica Gel GF UV254 200 x 200 mm. O éter de petróleo ou hexano foi destilado e recolhido entre 40-60 °C, salvo indicação em contrário. Salvo quando especificado, todos os rendimentos referem-se a produtos isolados após purificação. As misturas de solventes empregadas nas análises por CCD e em purificações por cromatografia *flash* são apresentadas como volume/volume e em percentagens

Ressonância Magnética Nuclear

Para as análises de RMN, foram utilizados equipamentos 400, 500 ou 600 MHz - Agilent RMN Spectrometer, 400 e 500 MHz (IQSC-USP) ou Bruker 400 MHz DPX-400, Bruker 500 MHz AVIII HD, Bruker Avance DRX-600 MHz (University of Cambridge). Os deslocamentos químicos (δ) são referenciados em relação ao padrão interno TMS, tetrametilsilano (0.00 ppm). Os espectros foram registrados nos solventes indicados (DMSO- d_6 , $CDCl_3$, CD_3CN , MeOD ou D_2O). As constantes de acoplamento (J) são reportadas em Hz. As multiplicidades são apresentadas como: s, singletto, d, dubletto, t, tripletto, q, quarteto, m, multipletto; dd, duplo dupletto; sl; singletto largo. Os espectros de RMN ^{13}C foram registrados usando equipamentos de 100 ou 125 MHz. Os dados foram tratados utilizando o software MestreNova 10.0.

Espectroscopia no infravermelho

As análises de infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro com transformada de Fourier FTIR, BOMEN HARTMANN & BRAUN modelo MB-102 e um Bruker, modelo Alpha, equipado com cristal de seleneto de zinco (IQSC-USP). Em Cambridge, o equipamento utilizado foi um Perkin-Elmer Spectrum One FTIR ATR. As amostras foram depositadas puras ou como películas finas por deposição de uma solução e deixando o solvente evaporar. Os espectros foram analisados no próprio software do fabricante e as figuras obtidas exportadas como PDF.

Espectrometria de massas

Os espectros de massa de alta resolução (HRMS) foram registrados em um Orbitrap FT-EM, QqTOF/EM - Microtof - modelo QII e Waters Xevo G2-S QTOF. No departamento de Química da Universidade de Cambridge, as análises foram realizadas em um Waters Micromass LCT Premier (TOF MS ES+) e Waters Xevo G2-S QTOF (ESI+). Os valores obtidos estão todos dentro de 5.0 ppm da massa calculada. Para a análise por uPLC - qTOF utilizou-se uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 100 mm), em um fluxo: 0.5 mL/min utilizando um gradiente de MeCN (+0.1% HCO_2H) em H_2O (+0.1% HCO_2H), começando com 10% até 50% de MeCN (+0.1% HCO_2H) em 6 min; e de 50% até 98% de MeCN (+0.1% HCO_2H) em 3

min, totalizando 9 min. A detecção foi feita por MSE centroid durante 10 min em um intervalo de m/z 100–600. O modo de detecção: ESI (+) com um scan time de 0.2 s e rampa de energia de colisão de 20-30 V.

Reações fotoquímicas

As reações fotoquímicas foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico (3 mL). Células de quartzo de 10 mL e 15 mL foram também empregadas. Utilizou-se luz ultravioleta gerada por uma lâmpada de arco de Xenônio 300 W (operando em 260 W), Osram 150 alojada em uma fonte Oriel Modelo 8500 Universal utilizando uma lente e quartzo como foco. A lâmpada de LED comercial branca é Philips Mestre LEDspot PAR 38 MV (18 W, 2700K, 50-60Hz typ, 90mA), nestes casos, o próprio balão ou frascos de vidro (pyrex) foram utilizados. Os espectros de emissão das lâmpadas são apresentados nos anexos.

Reações de bioconjugação de proteínas

Para as reações de bioconjugação de proteínas, utilizou-se tubos de plástico eppendorf de 0.5 e 1.5 mL. As reações foram aquecidas em um agitador mecânico em uma rotação de 700 rpm (PHMT - Grant Bio). A temperatura foi termostatizada em 37 °C ou temperatura ambiente, conforme indicado.

6.2 Procedimento para o preparo do diazofosfonato **32**

A um balão previamente seco foi adicionado o ácido 2-(dietóxfosforil)-acético (6.0 g, 0.031 mol, 1 equiv.), seguido da adição de tolueno seco (3 x 15.0 mL) para remoção azeotrópica de umidade. Em seguida, clorofórmio seco (78.0 mL) foi adicionado e o sistema resfriado a 0 °C. Cloreto de oxalila recém destilado (8.0 mL, 0.093 mol, 3 equiv.) foi então adicionado gota a gota ao frasco reacional e a solução foi agitada em refluxo durante duas horas. Após este período, os solventes foram removidos em rota evaporador e o resíduo resultante foi dissolvido em THF seco (31.0 mL) (Cuidado: O cloreto de ácido formado a partir do (dietilfosfono)ácido é muito instável e deve ser manuseado com cuidado durante estas operações para evitar a sua hidrólise). A solução de cloreto de ácido é canulada a uma solução 0.4 M, recém preparada, de diazometano etéreo (150.0 mL, 1.9 equiv.). A reação é agitada em 0 °C por 15 min. Após este período, o solvente é removido em evaporador rotativo e o resíduo purificado por cromatografia *flash* (5% de MeOH/Et₂O) para fornecer o diazofosfonato **32** (4.20 g, 0.019 mol, 62%) como um óleo amarelo.

Fosfonato de dietil-(3-diazo-2-oxopropil) (32)	
R_f	0.27 (10% MeOH/AcOEt) ou 0.25 (5% MeOH/Et ₂ O);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 5.60 (s, 1H, N ₂ CH), 4.23 – 4.10 (m, 4H, OCH ₂), 2.95 (d, <i>J</i> = 21.8 Hz, 2H, PCH ₂), 1.34 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H, CH ₃);
¹³C RMN	(50 MHz, CDCl ₃) δ 184.5, 62.8 (d, ² <i>J</i> _{C,P} = 6,2 Hz), 56.6, 41.5, 38.9 (d, ¹ <i>J</i> _{C,P} = 128 Hz), 16.2 (d, ³ <i>J</i> _{C,P} = 6,0 Hz);
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2108, 1633, 1359, 1249, 1045, 972;

6.3 Procedimento geral para a reação de Horner-Wadsworth-Emmons

6.3.1 Procedimento usando NaOH/EtOH

(E)-1-diazo-4-fenilbut-3-en-2-ona (1)

A uma solução de dietil (3-diazo-2-oxopropil) fosfonato (400 mg, 1.81 mmol, 1 equiv.) em EtOH (5 mL) à temperatura ambiente foi adicionado 185 μ L de benzaldeído (1.81 mmol, 1 equiv.), seguido da adição de 3.6 mL de uma solução de NaOH 0.5 M (H₂O: EtOH 1:1) durante o período de 1 hora (via *syringe-pump*). Após este tempo, a mistura foi agitada na mesma temperatura por mais 30 min e, em seguida, terminada pela adição de solução saturada de NaCl (20 mL), extração com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) e secagem com MgSO₄. Purificação por cromatografia em coluna *flash* (5-10% de AcOEt/hexano) proporcionou a diazocetona insaturada **1** (281.3 mg, 1.45 mmol, 80%) como um sólido estável amarelo:

(E)-1-diazo-4-fenilbut-3-en-2-ona (1)	
R_f	0.30 (25% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.59 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 7.55 – 7.52 (m, 2H), 7.40 - 7.36 (m, 3H), 6.60 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 184.2, 140.7, 134.4, 130.3, 128.9, 128.2, 123.6, 56.2;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3070, 2098, 1636, 1584, 1450, 1373, 1149, 973, 759;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₀ H ₈ N ₂ NaO [M + Na] ⁺ 195.05288, encontrado 195.0628;
P.F	58 – 62°C;

Benzoato de metil (*E*)-4-(4-diazo-3-oxobut-1-en-1-il) (112)

Benzoato metil (<i>E</i>)-4-(4-diazo-3-oxobut-1-en-1-il) (112)	
(112)	0.54 mmol, 130 mg, 40% como um sólido amarelo;
R_f	0.10 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 8.01 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.61 – 7.50 (m, 3H), 6.64 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 3.90 (s, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 183.8, 166.5, 139.4, 138.8, 131.5, 130.2, 128.2, 126.6, 56.8, 52.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3096, 2952, 2927, 2100, 1720, 1639, 1566, 1434, 1280, 1196, 1152, 1103, 754;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃ ⁺ [M + H] ⁺ 231.0764, encontrado 231.0776;

(3E,5E)-1-diazo-6-fenilhexa-3,5-dien-2-ona (113) **(3E,5E)-1-diazo-6-fenilhexa-3,5-dien-2-ona (113)**

(113)	0.54 mmol, 105 mg, 30% como um sólido amarelo;
R_f	0.17 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.47 – 7.43 (m, 2H), 7.40 – 7.21 (m, 4H), 6.94 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz, 1H), 6.84 (dd, <i>J</i> = 15.5, 10.8 Hz, 1H), 6.16 (d, <i>J</i> = 15.0 Hz, 1H), 5.37 (s, 1H);
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 184.4, 141.4, 140.8, 136.2, 129.2, 128.9, 127.3, 126.4, 125.6, 56.1;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3074, 2956, 2922, 2852, 2100, 1630, 1576, 1457, 1374, 1145, 1080, 987, 750, 694;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ⁺ [M + H] ⁺ 199.0866, encontrado 199.0873;

(E)-5-(benzilóxi)-1-diazopent-3-en-2-ona (114)*Preparo do 2-(benzilóxi)acetaldeído*

Uma solução de etileno glicol (9.0 mL, 0.161 mol, 5 equiv.) em THF seco (32 mL) sob atmosfera de argônio foi adicionada via cânula a uma suspensão de NaH (60% em óleo mineral, 1.41 g, 0.035 mol, 1.1 equiv.) em THF seco (32 mL). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 1 h, tempo que, todo o sólido foi dissolvido e uma camada oleosa de coloração amarela foi formada. A reação foi tratada com NaI (0.48 g, 0.0032 mol, 0.1 equiv.) e cloreto de benzila (4.08 g, 0.032 mol, 1 equiv.). A mistura foi aquecida em refluxo por 12 h e então deixada resfriar a temperatura ambiente. H₂O e Et₂O foram adicionados e as camadas separadas. Após a extração com Et₂O (2 x 30 mL) e lavagem com H₂O, a solução aquosa foi seca com Na₂SO₄ e filtrada. A cromatografia em sílica (Et₂O/Hexano) 1:1 forneceu um líquido incolor em 85% de rendimento: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.38 – 7.27 (m, 5H), 4.57 (s, 2H), 3.77 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.61 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H). Parte do álcool protegido (1.23 g, 0.0081 mol, 1 equiv.) foi então oxidado em temperatura ambiente com PCC (3.25 g, 0.016 mol, 2 equiv.) na presença de Celite (3.25 g) em CH₂Cl₂ (10 mL). Após 3 h de agitação vigorosa, a mistura foi diluída com Et₂O (80 mL) e agitada por um período adicional de 2.5 h. Após, a mistura foi filtrada em Celite e evaporada em vácuo para fornecer o aldeído em 90% de rendimento: *R_f* 0.23 (AcOEt/Hex 20%); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9.73 (t, *J* = 0.9 Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 5H), 4.64 (s, 2H), 4.10 (d, *J* = 0.8 Hz, 2H). O aldeído foi utilizado diretamente na próxima etapa utilizando o protocolo geral com NaOH. **114**: 53% de rendimento após purificação em cromatografia *flash*, *R_f* 0,29 (AcOEt/Hex 20%); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 7.29 (m, 5H), 6.86 (dt, *J* = 15.5, 4.1 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.20 (dd, *J* = 4.2, 2.1 Hz, 2H).

6.3.2 Procedimento usando NaH/THF

(E)-1-diazo-3-en-2-ona (54)

Em uma suspensão de NaH (60% em óleo mineral, 80.0 mg, 2.0 mmol, 2.2 equiv.) em THF seco (6.0 mL) sob atmosfera de argônio e temperatura de 0 °C, adicionou-se uma solução 0.15 M em THF seco de dietil (3-diazo-2-oxopropil) fosfonato **32** (400.0 mg, 1.8 mmol, 2.0 equiv.). A solução foi agitada durante 5 min na mesma temperatura e o sistema foi então resfriado a –78 °C e, em seguida, uma solução de 0.1 M em THF seco de butiraldeído (65.5 mg, 0.91 mmol, 1.0 equiv.) foi adicionado gota a gota. Após 1 h, a temperatura foi deixada elevar-se naturalmente a –30 °C, quando uma solução aquosa saturada de NH₄Cl (25 mL) foi adicionada a mistura reacional. Em seguida, a camada aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 20 mL), e as camadas orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄, filtrada e evaporada em evaporador rotativo. A purificação por coluna de cromatografia *flash* (30% AcOEt/hexano) forneceu a diazocetona **54** (82.0 mg, 0.59 mmol, 64%) como um óleo amarelo estável (método com NaOH fornece um rendimento de 50%):

(E)-1-diazo-3-en-2-ona (54)

R_f	0.30 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 6.80 (dt, <i>J</i> = 15.4, 7.0 Hz, 1H), 5.98 (d, <i>J</i> = 15.5 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 2.17 (dq, <i>J</i> = 7.2, 1.5 Hz, 2H), 1.48 (sext, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 0.93 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 185.0, 145.3, 127.5, 55.1, 34.4, 21.5, 13.8;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2962, 2933, 2100, 1656, 1606, 1367, 975;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₇ H ₁₀ N ₂ NaO [M + Na] ⁺ 161.0685, encontrado 161.0686;

(±) Carboxilato de (*E*)-benzil-2-(4-diazo-3-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (55)

Preparo do (±)-*N*-Cbz-Pipecolinal **58**

O aldeído *N*-Cbz-*DL*-prolinal utilizado na etapa de Horner-Wadsworth-Emmons foi preparado a partir do (±)ácido pipecólico protegido com Cbz **57** após redução com $\text{BH}_3\text{SMe}_2/\text{THF}$ (97%)²²³ e oxidação de Swern (90%)¹⁰¹ conforme procedimento descrito e os dados espectroscópicos estão de acordo com os reportados.^{102,224} A reação de olefinação com o diazofostonato **32** foi finalizada em $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

58: R_f 0.23 (40% AcOEt/Hexano).

58: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9.61 (s, 1H), 7.43 – 7.27 (m, 5H), 5.22 – 5.11 (m, 2H), 4.79 – 4.64 (m, 1H), 4.27 – 3.98 (m, 1H), 3.09 – 2.81 (m, 1H), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 1.78 – 1.61 (m, 3H), 1.53 – 1.34 (m, 1H), 1.35 – 1.14 (m, 1H).

(±) Carboxilato de (*E*)-benzil-2-(4-diazo-3-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (55)

(±) Carboxilato de (<i>E</i>)-benzil-2-(4-diazo-3-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (55)	
(55)	1.46 mmol, 456 mg, 92% como um óleo amarelo estável;
R_f	0.33 (50% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.47 – 7.30 (m, 5H), 6.78 (dd, <i>J</i> = 15.6, 4.3 Hz, 1H), 5.91 (d, <i>J</i> = 14.9 Hz, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.16 (d, <i>J</i> = 12.3 Hz, 1H), 5.12 (d, <i>J</i> = 12.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.07 (d, <i>J</i> = 12.8 Hz, 1H), 2.88 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz, 1H), 1.89 – 1.60 (m, 4H), 1.52 – 1.36 (m, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 183.8, 155.6, 142.8, 136.6, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 67.3, 56.0, 52.0, 40.4, 29.1, 25.2, 19.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3076, 3029, 2933, 2852, 2100, 1693, 1654, 1606, 1415, 1359, 1170;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₇ H ₁₉ N ₃ NaO ₃ [M + Na] ⁺ 336.13186, encontrado 336.13092;

Carbamato de (S,E)-tert-butil(8-diazo-2-metil-7-oxooct-5-en-4-il) (56)

Preparo do (S)-N-Boc-Leucinal **60**

Obs.: Para fazer a redução do (S)-N-Boc-Leucina com borana, diluir o ácido em tolueno (10 mL) e remover o solvente em *vácuo* por 3 vezes. Sem este procedimento, a reação fornece rendimentos baixos (20-30%). O N-Boc-L-Leucinal **60** foi preparado a partir do álcool correspondente N-Boc-L-Leucinol através da reação de oxidação de Parikh-Doering ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$, CH_2Cl_2 , DMSO, Et_3N)¹⁰⁴ e imediatamente utilizado na reação de olefinação. Todos os dados espectroscópicos estão de acordo com os descritos na literatura. **Cuidado!** A extração do aldeído deve ser cuidadosamente realizada em banho de gelo, resfriando todas as vidrarias, como por exemplo, o erlenmeyer, o funil de extração e o balão no qual o solvente será evaporado. Não aumentar a temperatura do banho do rota-evaporador durante a concentração do produto (acrescentar gelo no banho). Além destes cuidados, a reação de HWE foi finalizada em $-40\text{ }^\circ\text{C}$ para evitar a racemização. Nestas condições, não foi possível verificar qualquer alteração na integridade do centro quiral.

60: R_f 0.3 (30% AcOEt/Hexano).

60: ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 9.59 (s, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.25 (s, 1H), 1.83 – 1.71 (m, 1H), 1.70 – 1.61 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.38 (ddd, $J = 14.0, 9.3, 5.6\text{ Hz}$, 1H), 0.97 (dd, $J = 6.6, 3.0\text{ Hz}$, 6H).

Carbamato de (S,E)-tert-butil(8-diazo-2-metil-7-oxooct-5-en-4-il) (56)

Carbamato de (S,E)-tert-butil(8-diazo-2-metil-7-oxooct-5-en-4-il) (56)	
(56)	0.88 mmol, 247 mg, 83% como um sólido amarelo;
R_f	0.38 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 6.66 (dd, <i>J</i> = 15.3, 5.8 Hz, 1H), 6.06 (d, <i>J</i> = 15.3 Hz, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.30 (s, 1H), 1.74 – 1.55 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.38 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H), 0.92 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 6H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 184.4, 155.2, 144.7, 126.2, 79.9, 55.9, 50.1, 44.1, 31.1, 29.8, 28.5, 24.9, 22.8, 22.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3365, 3105, 2968, 2929, 2914, 2100, 1680, 1660, 1614, 1521, 1367, 1330, 1284, 1238, 1172, 1157, 1105, 1004, 760;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₄ H ₂₃ N ₃ NaO ₃ [M + Na] ⁺ 304.16316, encontrado 304.1646;
P.F	94 – 96 °C;
[α]_D²³	–34.1 (c 0.66, CHCl ₃);
HPLC	Coluna CHIRALPAK® AD-H (tamanho de partícula: 5 µm; dimensão: 4.6 mm x 250 mm), 98:2 (hexano:isopropanol), 1.5mL/min, λ 254 nm.

Figura 44 Cromatograma obtido por análise HPLC para a diazoacetona **56**.

6.3.3 Procedimento usando DIPEA/LiCl

Preparo fenilglioxal **121**

Em um balão de 250 mL foram adicionados SeO₂ (9.0 g, 0.08 mmol, 1 equiv.) como um sólido, EtOH (50 ml) e H₂O (4 mL). A mistura foi aquecida a 50-55 °C e agitada até que todo o sólido escuro de SeO₂ fosse dissolvido. Após, um condensador de refluxo foi fixado e acetofenona **122** (9.6 mL, 0.08 mL, 1 equiv.) adicionada gota a gota a reação. Durante a adição da acetofenona, a reação passa de incolor para amarelo pardo, chegando em laranja, vermelho, bordô e por fim marrom escuro de acordo com adição. Após 2 h de refluxo, a solução se tornou mais clara com formação de um precipitado. A solução foi refluxada por mais 4 h até que o precipitado de selênio foi decantado e então filtrado. A filtração pode ser realizada em papel filtro, entretanto, recomenda-se o uso de Celite para evitar a contaminação da solução amarela com partículas de selênio. O solvente foi removido em vácuo e então destilado em pressão reduzida para fornecer o fenilglioxal **121** anidro como um óleo amarelo intenso em 80% de rendimento. O bruto reacional pode também ser colunado em coluna (R_f 0.25 AcOEt/Hex 40%). Para armazenagem, utilizar um refluxo em água para levar a formação de **121**·xH₂O. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os descritos na literatura.^{225,226}

(E)-5-diazo-1-fenilpent-2-ena-1,4-diona (53)

Em uma suspensão resfriada a 0 °C e em atmosfera de argônio de LiCl (19 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv.) previamente seco em estufa (e em alto vácuo) em acetonitrila seca (3.8 mL) foi adicionado lentamente uma solução 0.1 M de diazofosfonato **32** em MeCN (100 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv.). Após, 80 µL de DIPEA (0.45 mmol, 1 equiv.) foi adicionado lentamente. A solução passou de amarelo pardo para alaranjado claro. Após 5 minutos agitado na mesma temperatura, uma solução 0.1 M do fenilgloxal em MeCN (73.0 mg, 0.54 mmol, 1.2 equiv.) foi adicionada gota a gota na mistura reacional. A reação foi agitada em 0 °C por 24h (na geladeira) e em seguida finalizada pela adição de 2 mL de NH₄Cl. O resíduo foi extraído com CH₂Cl₂ (2 x 15 mL) e seco com MgSO₄. A purificação em coluna cromatográfica usando 5-50% de AcOEt/Hexano forneceu a diazocetona **53** com 60% de rendimento. (*E*+*Z* = 78%).

(E)-5-diazo-1-fenilpent-2-ena-1,4-diona (53)	
R_f	0.50 (40% AcOEt/hexano).;
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.05 – 8.01 (m, 2H), 7.90 (d, <i>J</i> = 15.2 Hz, 1H), 7.66 – 7.61 (m, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 2H), 7.03 (d, <i>J</i> = 14.9 Hz, 1H), 5.58 (s, 1H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 189.6, 182.8, 136.9, 136.8, 133.8, 132.0, 128.9, 128.8, 58.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3088, 2959, 2926, 2855, 2156, 2108, 1690, 1666, 1624, 1599, 1449, 1379, 1360, 1290, 1217, 1146, 1007, 976, 712;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₁ H ₉ N ₂ O ₂ ⁺ [M + H] ⁺ 201.0659 encontrado 201.0599;

6.4 Procedimento geral para o rearranjo de Wolff na presença de aminas (lâmpada de Xe)

(*E*)-*N*-fenilhept-3-enamida (**63**)

A uma solução de diazocetona **54** (29.7 mg, 0.215 mmol) em acetonitrila seca (10.0 mL) foi adicionada 20 μL (1.0 equiv.) de anilina e então irradiada com uma lâmpada Osram 150 de Xenônio em forma de arco. A solução foi agitada durante 20 min a temperatura ambiente e em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo. Purificação em cromatografia *flash* (30% AcOEt/hexano) forneceu a amida **63** como um sólido branco (33.2 mg, 0.163 mmol, 76%):

(*E*)-*N*-fenilhept-3-enamida (**63**).

(63)	76% como um sólido branco;
R_f	0.42 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	500 MHz, CDCl ₃) δ 7.50 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 7.10 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.78 – 5.70 (m, 1H), 5.67 – 5.58 (m, 1H), 3.11 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.10 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 1.46 (sext, J = 7.4 Hz, 2H), 0.94 (t, J = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 169.4, 137.8, 137.4, 129.0, 124.3, 122.5, 119.6, 41.7, 34.6, 22.3, 13.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3300, 3197, 3138, 3026, 2958, 2927, 1658, 1600, 1546, 1498, 1442, 1327, 1251, 1176, 1112, 1080, 1031, 970, 754, 692;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₃ H ₁₇ NNaO [M + Na] ⁺ 226.1202, encontrado 226.1202;
P.F	33 – 35 °C;

Carboxilato de (*E*)- benzil 2-(4-(benzilamino)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (61)

Carboxilato de (<i>E</i>)- benzil 2-(4-(benzilamino)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (61)	
(61)	Não foi necessária purificação, 98% como um óleo incolor;
R_f	0.28 (50% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.40 – 7.19 (m, 10H), 5.95 (s, 1H), 5.66 – 5.57 (m, 2H), 5.09 – 5.02 (m, 2H), 4.84 (s, 1H), 4.40 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 3.99 (d, <i>J</i> = 13.1 Hz, 1H), 3.06 – 2.98 (m, 2H), 2.86 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 1.76 – 1.65 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, 2H), 1.50 – 1.36 (m, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 170.4, 155.7, 138.1, 136.8, 133.7, 128.7, 128.4, 127.9, 127.7, 127.7, 127.5, 124.4, 67.0, 52.2, 43.6, 40.3, 40.1, 29.0, 25.3, 19.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3510, 3307, 3064, 3032, 2937, 2858, 1693, 1654, 1540, 1423, 1263, 1170, 1091, 1029, 972, 916, 744, 698;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₄ H ₂₈ N ₂ NaO ₃ [M + Na] ⁺ 415.1992, encontrado 415.1990;

*escala de 0.215 mmol para todos os exemplos seguintes.

Carbamato de (*S,E*)-tert-butil (2-metil-8-oxo-8-(fenilamino)oct-5-en-4-il) (62).

Carbamato de (<i>S,E</i>)-tert-butil (2-metil-8-oxo-8-(fenilamino)oct-5-en-4-il) (62)	
(62)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 70% como um óleo incolor;
R_f	0.43 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 8.09 (s, 1H), 7.67 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 2H), 7.08 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 5.79 (dt, <i>J</i> = 15.0, 7.5 Hz, 1H), 5.56 (dd, <i>J</i> = 15.4, 7.0 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.15 – 4.01 (m, 1H), 3.15 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.69 (sep, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H), 1.48 – 1.34 (m, 11H), 0.94 (dd, <i>J</i> = 6.6, 1.2 Hz, 6H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 169.2, 155.6, 138.2, 129.0, 128.8, 124.1, 123.1, 120.1, 79.6, 51.7, 40.9, 28.41, 28.3, 24.6, 22.5;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3319, 2956, 2929, 2870, 1670, 1697, 1600, 1541, 1498, 1442, 1367, 1311, 1249, 1249, 1172, 1026, 972, 750;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₃ [M + H] ⁺ 347.23292, encontrado 347.23260;
[α]_D²³	+18.8 (c 0.1, CHCl ₃);
HPLC	Coluna: CHIRALPAK® AD-H (tamanho da partícula: 5 μm; dimensão: 4.6 mm x 250 mm), 95:5 (hexano:isopropanol), 1,5 mL/min, λ 254 nm.

Figura 45 Cromatograma obtido por análise HPLC para a diazocetona **62**.

(E)-N-(4-metóxfenil)hept-3-enamida (64)

(E)-N-(4-metóxfenil)hept-3-enamida (64)	
(64)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 50% como um sólido branco;
R_f	0.45 (30% EtOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.41 – 7.38 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 6.87 – 6.83 (m, 2H), 5.77 – 5.58 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.09 (dd, <i>J</i> = 7.0, 0.7 Hz, 2H), 2.09 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 1.45 (sext, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 0.94 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 169.2, 156.4, 137.3, 130.9, 122.6, 121.6, 114.1, 55.5, 41.4, 34.64, 22.3, 13.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3311, 2954, 2926, 1654, 1600, 1541, 1514, 1465, 1409, 1247, 1172, 1029, 964, 825;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₄ H ₁₉ NNaO ₂ [M + Na] ⁺ , 256.13082 encontrado 256.13080;
P.F	71 – 77 °C;

(E)-N-benzilhept-3-enamida (65)

(E)-N-benzilhept-3-enamida (65)	
(65)	Não foi necessária purificação, 90% de rendimento como um sólido branco;
R_f	0.13 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 – 7.23 (m, 5H), 5.95 (s, 1H), 5.67 – 5.48 (m, 2H), 4.43 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 2.99 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 2.05 (q, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.38 (sext, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 0.87 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 171.4, 138.4, 136.7, 128.8, 127.8, 127.6, 122.7, 43.7, 40.7, 34.7, 22.4, 13.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3294, 3084, 3064, 3032, 2956, 2926, 2872, 1639, 1546, 1454, 1415, 1369, 1238, 1080, 1028, 964, 694;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₄ H ₂₀ NNaO [M + Na] ⁺ 240.1359, encontrado 240.1360
P.F	38 – 41 °C;

(E)-N-ciclohexilhept-3-enamida (66)

(E)-N-ciclohexilhept-3-enamida (66)	
(66)	Não foi necessária purificação, 95% de rendimento como um sólido amarelo claro;
R_f	0.15 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 5.64 – 5.56 (m, 1H), 5.54 – 5.45 (m, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 1H), 2.90 (dd, <i>J</i> = 7.0, 0.8 Hz, 2H), 2.03 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 2H), 1.59 (dq, <i>J</i> = 7.4, 3.6 Hz, 1H), 1.45 – 1.30 (m, 4H), 1.20 – 1.05 (m, 3H), 0.90 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 170.3, 136.3, 123.0, 48.0, 40.7, 34.6, 33.1, 25.5, 24.8, 22.3, 13.6;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3296, 3070, 2956, 2929, 2854, 1637, 1546, 1446, 1409, 1247, 1078, 970, 891;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₃ H ₂₄ NO [M + H] ⁺ 210.1852, encontrado 210.1859;
P.F	57 – 63 °C;

(E)-N,N-dialilhept-3-enamida (67) **(E)-N,N-dialilhept-3-enamida (67)**

(67)	Não foi necessária purificação, 93% de rendimento como um óleo incolor;
R_f	0.30 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 5.80 – 5.70 (m, 2H), 5.61 – 5.48 (m, 2H), 5.23 – 5.08 (m, 4H), 3.97 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.87 (dt, <i>J</i> = 4.8, 1.6 Hz, 2H), 3.07 (dd, <i>J</i> = 6.1, 1.0 Hz, 2H), 2.04 – 1.98 (m, 2H), 1.38 (sext, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 0.88 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.6, 133.8, 133.3, 133.0, 123.1, 117.2, 116.7, 49.2, 47.8, 37.5, 34.6, 22.3, 13.6;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3082, 2958, 2927, 2872, 1653, 1463, 1411, 1284, 1249, 1217, 1193, 1136, 1116, 993, 968, 921;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₃ H ₂₁ NNaO [M + Na] ⁺ 230.1515, encontrado 230.1519;

Carboxilato de (*E*)-benzil2-(4-oxo-4-(fenilamino)but-1-en-1-il)piperidina-1 (68)

Carboxilato de (<i>E</i>)-benzil2-(4-oxo-4-(fenilamino)but-1-en-1-il)piperidina-1 (68)	
(68)	Não foi necessária purificação, 83% como um óleo amarelo claro;
R_f	0.38 (50% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.52 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.37 – 7.27 (m, 8H), 7.10 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 5.79 – 5.62 (m, 2H), 5.13 (d, <i>J</i> = 4.3 Hz, 2H), 4.89 – 4.83 (m, 1H), 4.03 (d, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H), 3.15 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.99 (t, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.69 – 1.61 (m, 2H), 1.54 – 1.40 (m, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 168.8, 155.9, 137.8, 136.7, 134.7, 128.9, 128.5, 128.0, 127.8, 124.3, 124.0, 119.7, 67.1, 52.7, 41.2, 29.7, 29.1, 25.2, 19.5;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3506, 3311, 3062, 3034, 2926, 2854, 1693, 1674, 1600, 1544, 1498, 1442, 1425, 1344, 1261, 1172, 1091, 1029, 972, 906, 756, 696;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₃ H ₂₇ N ₂ O ₃ [M + H] ⁺ 379.2016, encontrado 379.2022;

Carboxilato de (*E*)- benzil 2-(4-(diallilamino)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (69)

Carboxilato de (<i>E</i>)- benzil 2-(4-(diallilamino)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (69)	
(69)	Não foi necessária purificação, 98% como um óleo incolor;
R_f	0.38 (50% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 – 7.27 (m, 5H), 5.82 – 5.63 (m, 3H), 5.56 – 5.47 (m, 1H), 5.24 – 5.08 (m, 6H), 4.89 (s, 1H), 4.08 – 3.95 (m, 3H), 3.87 – 3.82 (m, 2H), 3.11 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.92 (td, <i>J</i> = 13.0, 2.4 Hz, 1H), 1.82 – 1.34 (m, 6H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 171.2 155.8, 137.1, 133.3, 132.9, 131.5, 128.6, 128.0, 127.9, 125.3, 117.4, 116.9, 67.1, 52.2, 49.4, 48.0, 40.3, 37.3, 29.1, 25.7, 19.6;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3032, 2937, 2860, 1697, 1651, 1498, 1419, 1352, 1261, 1170, 1091, 1041, 993, 972, 923, 765, 744, 698;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₃ H ₃₁ N ₂ O ₃ [M + H] ⁺ 383.2329, encontrado 383.2336;

Carboxilato de (*E*)-benzil 2-(4-(ciclohexilamino)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (70)

Carboxilato de (<i>E</i>)-benzil 2-(4-(ciclohexilamino)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina-1 (70)	
(70)	Não foi necessária purificação, 98% como um óleo amarelo claro;
R_f	0.28 (50% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.38 – 7.27 (m, 5H), 5.65 – 5.54 (m, 2H), 5.48 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.88 – 4.83 (m, 1H), 4.03 (d, <i>J</i> = 13.0 Hz, 1H), 3.78 – 3.68 (m, 1H), 2.94 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 1.91 – 1.82 (m, 2H), 1.79 – 1.55 (m, 8H), 1.55 – 1.29 (m, 4H), 1.20 – 1.01 (m, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 169.6, 155.7, 136.8, 133.5, 128.4, 127.9, 127.7, 124.8, 67.0, 52.2, 48.1, 40.3, 33.0, 32.9, 29.1, 25.5, 25.3, 24.8, 19.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3305, 3064, 3034, 2933, 2854, 1699, 1651, 1543, 1448, 1423, 1352, 1336, 1261, 1170, 1091, 1041, 974, 734, 698;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₃ H ₃₃ N ₂ O ₃ [M + H] ⁺ 385.2485, encontrado 385.2483;

(E)-N-(4-metóxfenil)-4-fenilbut-3-enamida (71)

(E)-N-(4-metóxfenil)-4-fenilbut-3-enamida (71)	
(71)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 50% como um sólido branco;
R_f	0.38 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.43 – 7.38 (m, 4H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 6.87 – 6.83 (m, 2H), 6.65 – 6.60 (m, 1H), 6.38 (dt, <i>J</i> = 15.8, 7.3 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.31 (dd, <i>J</i> = 7.3, 1.2 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 168.6, 156.5, 136.4, 135.3, 130.7, 127.9, 126.4, 121.9, 121.9, 116.4, 114.0, 55.4, 41.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3288, 3197, 3140, 3082, 2931, 1654, 1606, 1558, 1512, 1411, 1298, 1247, 1170, 1033, 964, 829;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₇ H ₁₇ NNaO ₂ [M + Na] ⁺ 290.11515, encontrado 290.11545;
P.F	128 – 131 °C;

(E)-N,4-difenilbut-3-enamida (72)

(E)-N,4-difenilbut-3-enamida (72)	
(72)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 64% como um sólido branco;
R_f	0.42 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.51 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 7.41 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H), 7.38 – 7.27 (m, 5H), 7.12 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 6.63 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.38 (dt, <i>J</i> = 15.7, 7.3 Hz, 1H), 3.33 (dd, <i>J</i> = 7.3, 0.8 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 168.8, 137.6, 136.4, 135.4, 129.0, 128.8, 128.0, 126.4, 124.5, 121.8, 119.9, 41.9;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3290, 3261, 3197, 3140, 3082, 3057, 3026, 2953, 2922, 2850, 1660, 1647, 1598, 1550, 1496, 1442, 1330, 1307, 1249, 966, 754, 690;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₆ H ₁₅ NNaO [M + Na] ⁺ 260.1046, encontrado 260.1052;
P.F	87 – 91 °C;

(E)-N-benzil-4-fenilbut-3-enamida (73) **(E)-N-benzil-4-fenilbut-3-enamida (73)**

(73)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 64% como um sólido branco;
R_f	0.23 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.39 – 7.22 (m, 10H), 6.54 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 6.31 (dt, <i>J</i> = 15.8, 7.3 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.46 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 3.21 (dd, <i>J</i> = 7.3, 1.2 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 170.5, 138.1, 136.5, 134.8, 128.7, 128.6, 127.8, 127.8, 127.5, 126.3, 122.2, 43.7, 40.8;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3238, 3055, 3035, 2954, 2922, 2875, 2850, 1633, 1548, 1411, 1238, 981, 968, 756, 698;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₇ H ₁₈ NO [M + H] ⁺ 252.1383, encontrado 252.1391;
P.F	125 – 129 °C

(E)-N-ciclohexil-4-fenilbut-3-enamida (74)

(E)-N-ciclohexil-4-fenilbut-3-enamida (74)	
(74)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 66% como um sólido branco;
R_f	0.33 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 6.53 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.29 (dt, J = 15.8, 7.3 Hz, 1H), 5.47 (s, 1H), 3.83 – 3.73 (m, 1H), 3.13 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 2H), 1.95 – 1.86 (m, 2H), 1.73 – 1.64 (m, 2H), 1.61 (ddd, J = 12.9, 6.2, 3.6 Hz, 1H), 1.43 – 1.30 (m, 2H), 1.19 – 1.04 (m, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 169.6, 136.7, 134.5, 128.6, 127.7, 126.3, 122.7, 77.3, 77.0, 76.7, 48.3, 41.1, 33.1, 25.5, 24.8;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3286, 3062, 3030, 2931, 2852, 1635, 1546, 1446, 1346, 1247, 960, 891, 690;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₆ H ₂₁ NNaO [M + Na] ⁺ 266.1515, encontrado 266.1515;
P.F	89 – 96 °C;

(E)-N,N-dialil-4-fenilbut-3-enamida (75)

(E)-N,N-dialil-4-fenilbut-3-enamida (75)	
(75)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 63% como um óleo incolor;
R_f	0.38 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.39 – 7.34 (m, 2H), 7.33 – 7.27 (m, 2H), 7.24 – 7.19 (m, 1H), 6.46 (d, <i>J</i> = 16.1 Hz, 1H), 6.38 (dt, <i>J</i> = 16.0, 6.3 Hz, 1H), 5.85 – 5.73 (m, 2H), 5.27 – 5.11 (m, 4H), 4.01 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.93 (dt, <i>J</i> = 4.7, 1.6 Hz, 2H), 3.30 (dd, <i>J</i> = 6.3, 0.9 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.0, 137.0, 133.2, 132.9, 132.6, 128.5, 127.4, 126.2, 123.4, 117.4, 116.8, 49.3, 48.0, 37.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3082, 3059, 3024, 2980, 2954, 2926, 2854, 1654, 1463, 1448, 1413, 1217, 1193, 1132, 991, 966, 925, 742, 694;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₆ H ₂₀ NO [M + H] ⁺ 242.1539, encontrado 242.1551;

Carbamato de *tert*-butil (*S,E*)-(8-(benzilamino)-2-metil-8-oxooct-5-en-4-il) (76) Carbamato de *tert*-butil (*S,E*)-(8-(benzilamino)-2-metil-8-oxooct-5-en-4-il) (76)

(76)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 70% como um óleo incolor;
R_f	0.30 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.33 – 7.21 (m, 5H), 6.66 (s, 1H), 5.74 – 5.67 (m, 1H), 5.45 (dd, <i>J</i> = 15.4, 7.0 Hz, 1H), 4.52 – 4.34 (m, 3H), 4.01 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 3.02 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.62 (dq, <i>J</i> = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 1.35 (s, 9H), 1.34 – 1.28 (m, 2H), 0.89 (dd, <i>J</i> = 6.6, 5.1 Hz, 6H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 170.8, 155.4, 138.5, 137.1, 128.5, 127.6, 127.2, 123.8, 79.4, 51.4, 43.8, 43.5, 39.9, 28.3, 24.6, 22.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3342, 3032, 2981, 2954, 2929, 1678, 1637, 1525, 1367, 1294, 1170, 975;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₁ H ₃₂ N ₂ NaO ₃ [M + Na] ⁺ 383.2305, encontrado 383.2302;
[α]_D²⁰	+17.3 (c 0.1, CH ₃ Cl);

Carbamato de *tert*-butil (*S,E*)-(8-(ciclohexilamino)-2-metil-8-oxooct-5-en-4-il) (77)

Carbamato de <i>tert</i> -butil (<i>S,E</i>)-(8-(ciclohexilamino)-2-metil-8-oxooct-5-en-4-il) (77)	
(77)	Purificação por cromatografia <i>flash</i> (30% AcOEt/hexano), 96% como um óleo incolor;
R_f	0.25 (30% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 5.93 (s, 1H), 5.72 – 5.59 (m, 1H), 5.44 (ddt, <i>J</i> = 15.4, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.07 – 3.98 (m, 1H), 3.73 (dddd, <i>J</i> = 14.8, 11.0, 8.1, 4.0 Hz, 1H), 2.93 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 1.91 – 1.82 (m, 2H), 1.74 – 1.55 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.40 – 1.26 (m, 4H), 1.21 – 1.05 (m, 3H), 0.91 (dd, <i>J</i> = 6.6, 2.1 Hz, 6H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 169.8, 155.3, 136.9, 123.5, 79.3, 51.7, 48.3, 44.0, 40.0, 33.0, 32.9, 29.7, 28.4, 25.5, 24.9, 24.9, 24.6, 22.5;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3329, 3300, 2949, 2954, 2856, 1683, 1635, 1541, 1365, 1251, 1178, 972;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₀ H ₃₇ N ₂ O ₃ [M + H] ⁺ 353.2798, encontrado 353.2720;
[α]_D²⁰	+11,4 (c 0.1, CH ₃ Cl);
HPLC	Coluna: CHIRALPAK® AD-H (tamanho da partícula: 5μm; dimensão: 4.6 mm x 250 mm), 95:5 (hexano:isopropanol), 1,5mL/min, λ 254 nm.

6.4.1 Síntese do nitróxido JP4-039

(S,E)-N-(2,2,6,6-Tetrametil-1-oxo-piperidin-4-il)-5- (tert-butóxicarbonilamino)-7-metiloct-3-enamida (JP4-039)

(S,E)-N-(2,2,6,6-Tetrametil-1-oxo-piperidin-4-il)-5- (tert-butóxicarbonilamino)-7-metiloct-3-enamida (JP4-039)

(JP4-039)	O nucleófilo 4-amino-TEMPO foi adicionado como um sólido. Purificação por cromatografia <i>flash</i> (60% AcOEt/hexano), 65% como um sólido cor de pêssego;
R_f	0.28 (60% AcOEt/hexano);
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3321, 2972, 2956, 2931, 2870, 1685, 1670, 1645, 1525, 1458, 1390, 1317, 1300, 1244, 1175, 1043, 972;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₃ H ₄₂ N ₃ NaO ₄ [M + Na] ⁺ 447.3068, encontrado 447.3071;
[α]_D²⁰	+35.3 (c 0.1, CH ₂ Cl ₂);
P.F	51 – 60 °C;

6.4.2 Procedimento para redução do JP4-039 com ácido ascórbico

Carbamato de *tert*-butil (S,E)-(8-((1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-metil-8-oxooct-5-en-4-il)

Para a análise de RMN, uma amostra do nitróxido **JP4-039** (20.0 mg, 0.047 mmol) foi dissolvido em MeOH seco (0.5 mL) e ácido *L*-ascórbico (8.3 mg, 0.047 mmol) foi adicionado. A descoloração completa da solução ocorreu dentro de poucos segundos. Após agitação à temperatura ambiente durante 10 min, o solvente foi removido sob vácuo. O resíduo resultante foi dissolvido em AcOEt e lavado com água. A fase aquosa foi extraída duas vezes com AcOEt, e as camadas orgânicas combinadas foram secas (Na₂SO₄), filtrou-se e concentrou-se em vácuo para se obter 16.1 mg (80%) da correspondente hidróxiamina como uma espuma branca:

Carbamato de <i>tert</i>-butil (S,E)-(8-((1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-metil-8-oxooct-5-en-4-il)	
¹H RMN	(500 MHz, CD ₃ OD) δ 6.60 (s, 1H), 5.69 – 5.61 (m, 1H), 5.50 (dd, <i>J</i> = 15.3, 6.0 Hz, 1H), 4.16 – 3.95 (m, 2H), 2.88 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 1.72 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.9 Hz, 2H), 1.66 – 1.54 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.43 – 1.26 (m, 4H), 1.17 (s, 6H), 1.15 (s, 6H), 0.91 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 6H);
¹³C RMN	(125 MHz, CD ₃ OD) δ 173.3, 157.9, 136.6, 124.3, 79.9, 59.9, 51.7, 45.9, 45.2, 42.2, 40.7, 32.7, 28.8, 25.9, 23.1, 22.6, 20.3.

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.^{95,133}

6.5 Preparo das Diazocetonas para rearranjo de Wolff usando LED

1-Diazo-3-fenilpropan-2-ona (86)

Uma solução de ácido fenil acético (6.90 mg, 5 mmol, 1 equiv.) em 5 mL de benzeno seco e 5 ml de cloreto de tionila (69 mmol, 13 equiv.) foi submetida a refluxo durante 1 h. Após este período, a, solução incolor foi evaporada sob vácuo. O cloreto de ácido resultante foi dissolvido em 8 mL de éter e em seguida adicionado gota a gota sob agitação a 30-40 mL de uma solução etérea de diazometano (0.4 M) em 0-5 °C. A solução amarela foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 1 h e, em seguida, purgada com argônio durante 30 min. A evaporação do solvente seguida de purificação em sílica gel (25% AcOEt / hexano) proporcionou a diazocetona **86** (480 mg, 3 mmol) como um óleo amarelo estável:

1-Diazo-3-fenilpropan-2-ona (86)	
R_f	0.30 (25% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 3.61 (s, 2H), 5.12 (s, 1H), 7.19-7.37 (m, 5H);
¹³C RMN	(62.5 MHz, CDCl ₃) δ 48.0, 54.8, 127.2, 128.8, 129.3, 134.5, 192.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3315, 3084, 2956, 2926, 2870, 2117, 1712, 1654, 1626, 1420, 1116, 970;

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.²²⁷

α -Diazoacetofenona (87)

A uma solução a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ de diazometano etéreo (178 mL, 0.4 M) e trietilamina (5.0 mL, 35.6 mmol, 1 equiv.) foi adicionado cloreto de benzoíla (4.13 mL, 35.6 mmol, 1 equiv.) gota a gota com agitação durante um período de 30 min. Após este tempo, a solução foi deixada aquecer até $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida na mesma temperatura durante 4 h. Concentração sob pressão reduzida seguida de purificação em cromatografia *flash* forneceu a diazocetona **87** (4.44 g, 30.4 mmol) com 85% de rendimento como um sólido amarelo estável:

α-Diazoacetofenona (87)	
R_f	0.30 (25% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 5.91 (s, 1H), 7.44 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.50 – 5.56 (m, 1H), 7.75 (dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 186.3, 136.6, 132.6, 128.6, 126.6, 54.1;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3088, 2108, 1728, 1622, 1575, 1448, 1367, 1228, 1145, 702;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₁ H ₃₂ N ₂ NaO ₃ [M + Na] ⁺ 383.2305, encontrado 383.2302;
P.F	48 – 50°C;

Carbamato de (S)-benzil (1-diazo-5-metil-2-oxohexan-3-il) (88)²²⁸

Cbz-*L*-leucina (1 g, 3.76 mmol, 1 equiv.) foi dissolvida em THF seco (20 mL) e a solução resultante foi resfriada a 0 °C. À solução foram adicionados *N*-metilmorfolina (NMM, 435 mL, 3.95 mmol, 1.05 equiv.) e cloroformato de isobutila (515 µL, 3.95 mmol, 1.05 equiv.), sucessivamente. A mistura foi agitada durante 15 min e em seguida, adicionada gota a gota a uma solução resfriada a 0 °C de CH₂N₂ a 0.4 M em Et₂O (70 mL). A solução amarela foi deixada aquecer até à temperatura ambiente. A mistura reacional foi agitada por mais 2 h e, em seguida, concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (20-30% de AcOEt/hexano) para se obter a diazocetona **88** (0.93g, 3.20 mmol, 85% de rendimento) como um sólido amarelo;

Carbamato de (S)-benzil (1-diazo-5-metil-2-oxohexan-3-il) (88)	
R_f	0.20 (25% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.38 – 7.28 (m, 5H), 5.43 (s, 1H), 5.34 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 5.11 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 5.08 (d, <i>J</i> = 12.4 Hz, 1H), 4.26 (s, 1H), 1.75 – 1.63 (m, 1H), 1.57 (ddd, <i>J</i> = 13.3, 8.4, 5.2 Hz, 1H), 1.50 – 1.41 (ddd, <i>J</i> = 13.3, 8.4, 5.2 Hz, 1H), 0.94 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 3H), 0.93 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 194.0, 156.0, 136.2, 128.5, 128.2, 128.0, 67.0, 56.3, 53.8, 41.5, 24.7, 23.0, 21.8;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3315, 3084, 2956, 2117, 1712, 1597, 1541, 1381, 1247, 1022, 761;
P.F	71–72 °C;

1-diazo-3,3-dimetilbutan-2-ona (99)

Em uma solução de diazometano 0.4 M em éter (100 mL, 40 mmol, 4 equiv.) resfriada em 0 °C foi adicionada uma solução 10 M de cloreto de pivaloíla (1.23 mL, 10 mmol, 1 equiv.) em éter (1 mL) gota a gota. A solução foi agitada na mesma temperatura por 1 h e posteriormente por um período adicional 24 h em temperatura ambiente. Então o solvente removido em rota evaporador para fornecer o bruto da diazocetona **99** como um líquido amarelo que foi utilizado nas etapas seguintes sem necessidade de purificação (pureza >99% determinada por RMN ^1H).

1-diazo-3,3-dimetilbutan-2-ona (99)	
^1H RMN	500 MHz, CDCl_3) δ 5.41 (s, 1H), 1.12 (s, 9H);
^{13}C RMN	(126 MHz, CDCl_3) δ 201.3, 51.9, 42.6, 27.1.;
FTIR	(puro, cm^{-1}) 3090, 2968, 2098, 1623, 1477, 1341, 1150, 1007, 897, 806, 704 ;

- Os dados estão de acordo com os reportados na literatura.²²⁹

6.4 Procedimento geral para Rearranjo de Wolff usando lâmpada de LED

6.6.1 Método A: Usando os álcoois como solvente

Em um frasco de 4 mL, as diazocetonas **1**, **86-88** (0.174 mmol) foram dissolvidas em 3.5 ml do álcool desejado. O frasco foi fechado com uma tampa e uma agulha adicionada (para ventilar o gás nitrogênio formado durante a reação). Em seguida, a solução amarela da diazocetona foi irradiada com uma lâmpada LEDspot PAR branca de 18 W durante 24 h sob agitação magnética e à temperatura ambiente (evolução de gás nitrogênio observada, a solução tende a tornar-se incolor com o consumo da diazocetona). Depois disso, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. Purificação por cromatografia em coluna *flash* forneceu os seguintes ésteres e ácidos:

(E)-metil 4-fenilbut-3-enoato (78)

(E)-metil 4-fenilbut-3-enoato (78)

(78)	Usando MeOH seco, 91% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt / hexano), como um óleo incolor. Rendimento de 100% por RMN ^1H quantitativo padrão de TMB;
R_f	0.38 (10% AcOEt/hexano);
^1H RMN	(500 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 6.50 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.31 (ddd, J = 15.9, 10.7, 5.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.26 (dd, J = 7.1, 1.5 Hz, 2H);
^{13}C RMN	(125 MHz, CDCl_3) δ 172.0, 136.8, 133.5, 128.5, 127.5, 126.3, 121.6, 51.90, 38.2;

(E)-alil 4-fenilbut-3-enoato (79) **(E)-alil 4-fenilbut-3-enoato (79)**

(79)	Usando álcool alílico, 85% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.48 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.0 Hz, 2H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 6.51 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.31 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 5.94 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1H), 5.34 (dd, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.25 (ddd, <i>J</i> = 10.4, 2.6, 1.3 Hz, 1H), 4.63 (dt, <i>J</i> = 5.8, 1.4 Hz, 2H), 3.28 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.2, 136.8, 133.5, 132.0, 128.5, 127.5, 126.3, 121.6, 118.4, 65.4, 38.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3084, 3028, 2951, 2926, 2855, 1738, 1651, 1497, 1450, 1371, 1285, 1240, 1155, 988;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₃ H ₁₆ O ₂ [M+H] ⁺ 203.10666, encontrado 203.10692;

(E)-isopropil 4-fenilbut-3-enoato (81)

(E)-isopropil 4-fenilbut-3-enoato (81)

(81)	Usando <i>i</i> -PrOH seco, 80% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.50 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.38 (dd, <i>J</i> = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 6.49 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.31 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 5.05 (hept, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 3.21 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.5 Hz, 2H), 1.26 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 6H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.1, 136.9, 133.2, 128.5, 127.4, 126.2, 122.0, 68.1, 38.8, 21.8;

(E)-tert-butil 4-fenilbut-3-enoato (84) **(E)-tert-butil 4-fenilbut-3-enoato (84)**

(82)	Usando <i>t</i> -BuOH seco, 63% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt / hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.55 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.30 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 6.47 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.29 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 3.16 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 170.9, 137.1, 132.9, 128.5, 127.4, 126.2, 122.5, 80.8, 39.7, 28.1;

Acetato de metil-2-fenila (89)²³⁰

Acetato de metil-2-fenila (89)

(89) 81% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna *flash* (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor: R_f 0.40 (10% AcOEt/hexano);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32 (m, 5H), 3.71 (s, 3H), 3.62 (s, 2H);

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.²³⁰

Acetato de alil-2-fenila (90)

Acetato de alil-2-fenila (90)	
(90)	75% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.50 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.36 – 7.23 (m, 5H), 5.90 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.5, 5.7 Hz, 1H), 5.27 (dd, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.21 (dd, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.59 (dt, <i>J</i> = 5.7, 1.4 Hz, 2H), 3.65 (s, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 171.2, 133.9, 132.0, 129.2, 128.6, 127.1, 118.2, 65.4, 41.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3088, 3065, 3032, 2943, 1740, 1497, 1454, 1364, 1244, 1150, 991;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₁ H ₁₂ O ₂ [M+Na] ⁺ 199.07295, encontrado 199.07320;

Acetato de isopropil-2-fenila (91) **Acetato de isopropil-2-fenila (91)**

(91)	63% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.50 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.34 – 7.23 (m, 5H), 5.01 (hept, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 1.22 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 6H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.1, 134.3, 129.2, 128.5, 126.9, 68.2, 41.7, 21.8;

3-fenilpropanoato de alila (94) **3-fenilpropanoato de alila (94)**

(94)	89% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.50 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.31 – 7.27 (m, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 3H), 5.90 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1H), 5.29 (dd, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.22 (dd, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.58 (dt, <i>J</i> = 5.7, 1.4 Hz, 2H), 2.97 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 2.67 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 172.5, 140.4, 132.1, 128.5, 128.3, 126.2, 118.2, 65.1, 35.8, 30.9;

3-fenilpropanoato de isopropila (95) **3-fenilpropanoato de isopropila (95)**

(95)	70% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.50 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.23 – 7.14 (m, 3H), 5.00 (hept, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 2.94 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 2.59 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 1.20 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 6H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 172.4, 140.6, 128.4, 128.3, 126.2, 67.7, 36.2, 31.0, 21.8;

3- fenilpropanoato de *tert*-butila (96) **3- fenilpropanoato de *tert*-butila (96)**

(96)	66% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.63 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.30 – 7.25 (m, 2H), 7.21 – 7.16 (m, 3H), 2.91 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 2.54 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 172.5, 140.8, 128.4, 128.3, 126.1, 80.3, 37.1, 31.1, 28.0;

Hexanoato de (S)-alil-3-(((benziloxi)carbonil)amino)-5-metila (97)

Hexanoato de (S)-alil-3-(((benziloxi)carbonil)amino)-5-metila (97)	
(97)	62% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.23 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.38 – 7.28 (m, 5H), 5.89 (ddt, <i>J</i> = 16.3, 10.7, 5.8 Hz, 1H), 5.30 (dd, <i>J</i> = 17.2, 1.4 Hz, 1H), 5.23 (dd, <i>J</i> = 10.4, 1.2 Hz, 1H), 5.18 – 5.12 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.57 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 2H), 4.12 – 4.03 (m, 1H), 2.56 (qd, <i>J</i> = 15.8, 5.3 Hz, 2H), 1.72 – 1.58 (m, 1H), 1.50 (ddd, <i>J</i> = 14.6, 7.5, 4.3 Hz, 1H), 1.36 – 1.26 (m, 1H), 0.93 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 3H), 0.91 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.2, 155.7, 136.6, 131.9, 128.5, 128.0, 128.0, 118.5, 66.6, 65.2, 46.3, 43.5, 39.4, 24.9, 22.9, 22.1;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3339, 3034, 2957, 2870, 1825, 1732, 1717, 1531, 1456, 1306, 1263, 1233, 1179, 1115, 1001;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₈ H ₂₆ O ₄ N [M+H] ⁺ 320.18563, encontrado 320.18604;
[α]_D²³	-13.3 (c 1.19 CHCl ₃);

(S)-isopropil 3 - (((benziloxi)carbonil)amino)- 5 –methilhexanoato (98)

(S)-isopropil 3 - (((benziloxi)carbonil)amino)- 5 –methilhexanoato (98)	
(98)	50% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um óleo incolor;
R_f	0.23 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.39 – 7.28 (m, 5H), 5.20 – 5.12 (m, 1H), 5.10 (d, <i>J</i> = 12.7 Hz, 1H), 5.07 (d, <i>J</i> = 12.7 Hz, 1H), 5.00 (hept, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 4.10 – 4.02 (m, 1H), 2.49 (qd, <i>J</i> = 15.5, 5.3 Hz, 2H), 1.70 – 1.59 (m, 1H), 1.51 – 1.43 (m, 1H), 1.35 – 1.24 (m, 1H), 1.22 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 3H), 1.21 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 3H), 0.93 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 3H), 0.91 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 171.1, 155.7, 136.6, 128.5, 128.0, 128.0, 82.3, 68.0, 66.5, 46.4, 43.7, 39.8, 24.9, 22.9, 21.8, 21.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3021, 2399, 1729, 1719, 1514, 1418, 1217;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₈ H ₂₈ O ₄ N [M+H] ⁺ 322.20128, encontrado 322.20239;
[α]_D²³	-13.5 (c 0.45 CHCl ₃);

6.6.2 Método B: Usando acetato de etila como solvente

Em um frasco de 4 mL, as diazocetonas **1,86-88** (0.174 mmol) foram dissolvidas em 3.5 mL de AcOEt seco (acetonitrila também pode ser utilizada como solvente) seguido pela adição de 10 equivalentes do álcool ou amina desejado. A solução resultante foi irradiada com uma lâmpada LEDspot PAR branca de 18 W por 24 h sob agitação magnética à temperatura ambiente (evolução de gás nitrogênio observada). Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo. A purificação (quando indicada) por cromatografia em coluna *flash* forneceu os seguintes ésteres/ácidos/amidas:

(E)-fenil 4-fenilbut-3-enoato (80)

(E)-fenil 4-fenilbut-3-enoato (80)	
(80)	63% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano), como um sólido branco;
R_f	0.43 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.42 – 7.29 (m, 6H), 7.28 – 7.19 (m, 2H), 7.14 – 7.05 (m, 2H), 6.60 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.39 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 3.49 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 167.0, 150.7, 136.7, 134.0, 129.4, 128.6, 127.7, 126.3, 125.9, 121.5, 121.0, 38.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3061, 3028, 1755, 1593, 1493, 1362, 966, 937;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₆ H ₁₅ O ₂ [M+H] ⁺ 239.10666, encontrado 239.10663;

(E)-1-fenoxi-5-fenilpent-4-en-2-ona (82) **(E)-1-fenoxi-5-fenilpent-4-en-2-ona (82)**

(80)	69% de rendimento como um óleo incolor após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano);
R_f	0.48 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.39 – 7.29 (m, 9H), 7.27 – 7.20 (m, 1H), 6.51 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.32 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.31 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.4, 136.8, 135.8, 133.6, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 127.5, 126.3, 121.5, 66.6, 38.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3082, 3061, 3032, 2955, 2928, 1736, 1497, 1452, 1379, 1238, 1153, 966;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₇ H ₁₆ O ₂ [M+Na] ⁺ 275.10425, encontrado 275.10446;

Ácido (*E*)-4-fenilbut-3-enóico (83)

Ácido (*E*)-4-fenilbut-3-enóico (83)

(83)	Rendimento quantitativo, sólido branco estável, não é necessária qualquer purificação;
R_f	0.10 (10% AcOEt/Hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.36 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.30 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 6.51 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.27 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 3.29 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 177.6, 136.6, 134.0, 128.5, 127.7, 126.3, 120.8, 38.0;

(+/-)-(E)-2-isopropil-5-metilciclohexil 4-fenilbut-3-enoato (85)

(+/-)-(E)-2-isopropil-5-metilciclohexil 4-fenilbut-3-enoato (85)	
(85)	65% de rendimento como um óleo incolor após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano);
R_f	0.63 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.0 Hz, 2H), 7.31 (dd, <i>J</i> = 8.2, 7.0 Hz, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 6.50 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.30 (dt, <i>J</i> = 15.8, 7.1 Hz, 1H), 4.72 (td, <i>J</i> = 10.9, 4.4 Hz, 1H), 3.23 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 2.04 – 1.98 (m, 1H), 1.89 (dtd, <i>J</i> = 14.0, 7.0, 2.7 Hz, 1H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.55 – 1.44 (m, 1H), 1.44 – 1.36 (m, 1H), 1.14 – 0.95 (m, 3H), 0.90 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 6H), 0.77 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 171.1, 137.0, 133.2, 128.6, 128.5, 127.5, 122.1, 74.6, 47.0, 40.9, 38.8, 34.3, 31.4, 26.3, 23.5, 22.0, 20.7, 16.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3061, 3028, 2955, 2926, 2870, 1732, 1454, 1369, 1252, 1169, 1150, 984;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₀ H ₂₈ O ₂ [M+Na] ⁺ 323.19815, encontrado 323.19772;

2-fenilacetato de fenila (91) **2-fenilacetato de fenila (91)**

(91)	62% de rendimento como um óleo incolor após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (5-10% de AcOEt/hexano);
R_f	0.48 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.42 – 7.29 (m, 7H), 7.24 – 7.20 (m, 1H), 7.09 – 7.05 (m, 2H), 3.87 (s, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 167.0, 150.7, 133.5, 129.4, 129.3, 128.7, 127.3, 125.8, 121.4, 41.4;

ácido 2-fenilacético (93) **ácido 2-fenilacético (93)**

(93)	78% de rendimento como um óleo incolor após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (20-40% de AcOEt/hexano);
R_f	0.15 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 – 7.25 (m, 5H), 3.66 (s, 2H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 177.7, 133.2, 129.4, 128.6, 127.3, 41.0;

N-alil-2-fenilacetamida (100) **N-alil-2-fenilacetamida (100)**

(100)	93% de rendimento, como um óleo incolor; não é necessária a purificação em coluna;
R_f	0.15 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.34 – 7.26 (m, 5H), 5.79 – 5.73 (m, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.10 – 5.03 (m, 2H), 3.87 (dt, <i>J</i> = 5.8, 1.6 Hz, 2H), 3.60 (s, 2H);
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3282, 2956, 2922, 2853, 1730, 1641, 1542, 1495, 1437, 1261, 1074, 918, 722

- Os dados estão em acordo com os descritos na literatura.²³¹

N-ciclohexil-2-fenilacetamida (101) **N-ciclohexil-2-fenilacetamida (101)**

(101)	96% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (20-50% de AcOEt/hexano), como um sólido branco;
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.31 – 7.25 (m, 5H), 5.56 (bs, 1H), 3.80 – 3.69 (m, 1H), 3.55 (s, 2H), 1.86 – 1.80 (m, 2H), 1.66 – 1.56 (m, 3H), 1.32 – 1.21 (m, 2H), 1.11 – 0.98 (m, 3H);

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.²³²

N-benzil-2-fenilacetamida (102) **N-benzil-2-fenilacetamida (102)**

(102)	99% de rendimento como um sólido branco após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (20-50% de AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.32 – 7.18 (m, 8H), 7.16 – 7.11 (m, 2H), 4.34 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 3.53 (s, 2H);

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.²³³

N-butil-2-fenilacetamida (103) **N-butil-2-fenilacetamida (103)**

(103)	95% de rendimento como um sólido branco. Não é necessária a purificação em coluna;
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.40 – 7.35 (m, 2H), 7.33 – 7.25 (m, 3H), 5.49 (s, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.22 (td, <i>J</i> = 7.3, 5.8 Hz, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.33– 1.22 (m, 2H), 0.90 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H);
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3289, 3085, 2956, 2928, 2859, 1639, 1552, 1494, 1079;

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.²³⁴

N-alil-3,3-dimetilbutanamida (104) **N-alil-3,3-dimetilbutanamida (104)**

(104)	93% de rendimento como um óleo incolor. Não é necessária a purificação em coluna.
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 5.86 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.2, 5.7 Hz, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.25 – 5.17 (m, 1H), 5.18 – 5.11 (m, 1H), 3.90 (tt, <i>J</i> = 5.8, 1.5 Hz, 2H), 2.09 (s, 2H), 1.07 (s, 9H);

3,3-dimetil-N-fenilbutanamida (105) **3,3-dimetil-N-fenilbutanamida (105)**

(105)	63% de rendimento como um sólido branco após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (20-50% de AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.35 – 7.28 (m, 3H), 7.13 – 7.04 (m, 2H), 2.20 (s, 2H), 1.12 (s, 9H);

- Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.²³⁵

Carbamato de benzil (S)-(1-(alilamino)-5-metil-1-oxohexan-3-il) (106)

Carbamato de benzil (S)-(1-(alilamino)-5-metil-1-oxohexan-3-il) (106)	
(106)	99% de rendimento como um sólido branco. Não é necessária purificação em coluna <i>flash</i> .
R_f	0.20 (40% AcOEt/Hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.41 – 7.29 (m, 5H), 6.14 (s, 1H), 5.81 (ddt, <i>J</i> = 17.1, 10.2, 5.6 Hz, 1H), 5.59 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 5.21 – 5.07 (m, 4H), 4.06 – 3.95 (m, 1H), 3.92 – 3.77 (m, 2H), 2.53 – 2.37 (m, 2H), 1.73 – 1.61 (m, 1H), 1.62 – 1.51 (m, 1H), 1.38 – 1.29 (m, 1H), 0.94 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 6H);
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₈ H ₂₇ N ₂ O ₃ ⁺ [M+H] ⁺ 319.2016, encontrado 319,2028;
FTIR	(puro) cm ⁻¹ : 3305, 2956, 2922, 2853, 1732, 1691, 1641, 1544, 1436, 1378, 1273, 1115, 1063, 912;

Carbamato de benzil (S)-(5-metil-1-oxo-1-(fenilamino)hexan-3-il)) (107)

Carbamato de benzil (S)-(5-metil-1-oxo-1-(fenilamino)hexan-3-il)) (107)	
(107)	70% de rendimento como um sólido branco após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (20-70% de AcOEt/hexano);
R_f	0.45 (40% AcOEt/Hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.80 (s, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.39 – 7.28 (m, 7H), 7.12 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.11 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 2H), 4.28 – 4.18 (m, 1H), 4.13 – 4.03 (m, 2H), 2.64 (dt, <i>J</i> = 15.5, 8.8 Hz, 2H), 1.75 – 1.67 (m, 1H), 0.91 (s, 6H);
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₁ H ₂₇ N ₂ O ₃ ⁺ [M+H] ⁺ 355.2016, encontrado 355.2007;
FTIR	(puro) cm ⁻¹ : 3312, 2956, 2922, 2853, 1691, 1662, 1600, 1545, 1463, 1378, 1271, 1117, 1065, 750;

Carbamato de benzil (S)-(1-(butilamino)-5-metil-1-oxohexan-3-il) (108)

Carbamato de benzil (S)-(1-(butilamino)-5-metil-1-oxohexan-3-il) (108)	
(108)	98% de rendimento como um sólido branco após purificação por cromatografia em coluna <i>flash</i> (20-70% de AcOEt/hexano);
R_f	0.20 (40% AcOEt/Hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.46 – 7.32 (m, 5H), 6.04 (s, 1H), 5.62 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 5.20 – 5.05 (m, 2H), 4.01 (td, <i>J</i> = 9.1, 4.9 Hz, 1H), 3.31 – 3.13 (m, 2H), 2.53 – 2.35 (m, 1H), 1.78 – 1.27 (m, 8H), 1.04 – 0.92 (m, 10H);
HRMS	(ESI) Calculado para C ₁₉ H ₃₁ N ₂ O ₃ ⁺ [M+H] ⁺ 335.2329, encontrado 335,2331;
FTIR	(puro) cm ⁻¹ : 3310, 2957, 2922, 2853, 1698, 1644, 1540, 1463, 1377, 1266, 1284, 1119, 1071, 888, 733;

6.6.3 Método C: Usando álcoois alílicos em acetonitrila (LED ou Xenônio)

1-10 equivalentes dos álcoois alílicos **154-159** foram adicionados a uma solução 0.022 M das diazocetonas **1,54, 111-114** em MeCN em temperatura ambiente. A solução resultante foi irradiada com uma lâmpada LEDspot PAR branca de 18 W ou de arco de Xe (260 W) pelo tempo indicado sob agitação magnética à temperatura ambiente (evolução de gás nitrogênio observada). Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. A purificação (quando indicada) por cromatografia em coluna *flash* forneceu os seguintes ésteres alílicos:

Obs.: O número de equivalentes, tempo e a lâmpada utilizada são indicados na descrição de cada composto, de acordo com o melhor rendimento obtido. Cabe ressaltar, que a reação pode ser realizada em ambas as lâmpadas, variando apenas o rendimento obtido e o tempo. Geralmente, a lâmpada de LED oferece reações mais limpas e rendimentos maiores, com reações completas em torno de 24 h. A lâmpada de Xenônio, entretanto, possui tempos de reação menores (30 min – 4 h).

Esclarecimento: Desde que a lâmpada seja desligada imediatamente após o total consumo da diazocetona, o isômero Z durante a etapa de rearranjo de Wolff é formado apenas em quantidades traços (<5%). A caracterização do isômero Z que é indicado na descrição de cada composto é referente ao produto de irradiação do éster puro em condições de fotocicloadição [2+2]. A razão E/Z obtida, neste caso, é de 1:1.

but-3-enoato de alil (*E*)-4-(4-nitrofenila) (**142**)

but-3-enoato de alil (<i>E</i>)-4-(4-nitrofenila) (142)	
Obs.:	Álcool alílico 156 puro 0.022 M, lâmpada de Xe (260 W), 4 h
(142)	44% de rendimento como um sólido amarelo pardo. Purificação em coluna <i>flash</i> usando gradiente de 5-20% AcOEt/Hexano.
R_f	<i>Isômero E</i> 0.34 (10% AcOEt/Hexano);
R_f	<i>Isômero Z</i> 0.36 (10% AcOEt/Hexano)
¹H RMN	<i>Isômero E</i> (500 MHz, CDCl ₃) δ 8.18 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 6.59 (d, <i>J</i> = 16.1 Hz, 1H), 6.52 (dt, <i>J</i> = 15.9, 6.6 Hz, 1H), 5.95 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1H), 5.35 (dq, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.27 (dq, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.65 (dt, <i>J</i> = 5.8, 1.4 Hz, 2H), 3.35 (dd, <i>J</i> = 6.7, 1.0 Hz, 1H).
¹³C RMN	<i>Isômero E</i> (126 MHz, CDCl ₃) δ 170.6, 147.1, 143.3, 132.0, 131.8, 127.0, 126.9, 124.1, 118.8, 65.8, 38.4;
¹H RMN	<i>Isômero Z</i> (500 MHz, CDCl ₃) δ 8.21 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.43 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 6.69 (dt, <i>J</i> = 11.7, 1.9 Hz, 1H), 6.10 (dt, <i>J</i> = 11.6, 7.5 Hz, 1H), 5.92 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1H), 5.33 (dq, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.26 (dq, <i>J</i> = 10.4, 1.2 Hz, 1H), 4.63 (dt, <i>J</i> = 5.8, 1.4 Hz, 2H), 3.35 (dd, <i>J</i> = 7.6, 1.8 Hz, 2H);
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3057, 2926, 2852, 1734, 1597, 1343, 1265, 1159, 987, 858, 732, 702;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₃ H ₁₃ NNaO ₄ ⁺ [M+Na] ⁺ 270.0737, encontrado 270.0706;

(E)-4-fenilbut-3-enoato cinâmico (143) **(E)-4-fenilbut-3-enoato cinâmico (143)**

Obs.:	2 equiv. do álcool cinâmico 154 , lâmpada de Xe (260 W); 1 h
(143)	73% de rendimento como um sólido branco após purificação em coluna <i>flash</i> usando gradiente 5-20% de AcOEt/Hexano. A coluna pode ser realizada também em éter/éter petróleo 7-10% para uma melhor separação dos isômeros.
R_f	<u>Isômero E</u> 0.30 (5% AcOEt/hexano);
R_f	<u>Isômero Z</u> 0.35 (5% AcOEt/hexano);
¹H RMN	<p><u>Isômero E</u> (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.36 (m, 4H), 7.35 – 7.27 (m, 5H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 6.67 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.52 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.31 (dt, <i>J</i> = 15.9, 6.8 Hz, 2H), 4.78 (dd, <i>J</i> = 6.5, 1.3 Hz, 2H), 3.30 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H);</p> <p><u>Isômero Z</u> (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.33 (m, 4H), 7.31 – 7.28 (m, 3H), 7.25 – 7.22 (m, 2H), 6.68 (ddt, <i>J</i> = 17.7, 11.5, 1.9 Hz, 2H), 5.91 (dt, <i>J</i> = 11.5, 7.3 Hz, 1H), 5.83 (dt, <i>J</i> = 11.7, 6.7 Hz, 1H), 4.90 (dd, <i>J</i> = 6.7, 1.7 Hz, 2H), 3.39 (dd, <i>J</i> = 7.3, 1.9 Hz, 2H).</p>
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 171.5, 136.9, 136.3, 134.5, 133.7, 128.7, 128.7, 128.2, 127.7, 126.8, 126.4, 123.1, 121.7, 65.5, 38.6;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3059, 3027, 2922, 2850, 1730, 1674, 1495, 1448, 1295, 1239, 1148, 962, 741, 689;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>) Calculado C ₁₉ H ₁₈ NaNO ₂ ⁺ [M+Na] ⁺ 301.1199 encontrado 301.1215;

benzoato de metil (*E*)-4-(4-(aliloxi)-4-oxobut-1-en-1-il) (144)

benzoato de metil (<i>E</i>)-4-(4-(aliloxi)-4-oxobut-1-en-1-il) (144)	
Obs.:	10 equiv. do álcool alílico 156 , lâmpada de Xe (260 W), 2 h e 20 min;
(144)	65% de rendimento como um sólido branco após purificação em coluna <i>flash</i> usando gradiente 5-10% de AcOEt/Hexano;
R_f	<i>Isômero E</i> 0.25 (5% AcOEt/hexano);
R_f	<i>Isômero Z</i> 0.31 (5% AcOEt/hexano);
¹H RMN	<i>Isômero E</i> (500 MHz, CDCl ₃) δ 7.97 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 6.54 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.43 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.0 Hz, 1H), 5.93 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1H), 5.33 (dq, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.25 (dq, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.63 (dt, <i>J</i> = 5.8, 1.4 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.31 (dd, <i>J</i> = 7.0, 1.3 Hz, 2H);
¹H RMN	<i>Isômero Z</i> (500 MHz, CDCl ₃) δ 8.06 – 7.98 (m, 2H), 7.39 – 7.32 (m, 2H), 6.68 (dt, <i>J</i> = 11.6, 1.9 Hz, 1H), 6.02 (dt, <i>J</i> = 11.6, 7.4 Hz, 1H), 5.94 (ddt, <i>J</i> = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1H), 5.34 (dq, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.27 (dq, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.64 (dt, <i>J</i> = 5.8, 1.4 Hz, 2H), 3.38 (dd, <i>J</i> = 7.4, 1.9 Hz, 2H).
¹³C RMN	<i>Isômero E</i> (126 MHz, CDCl ₃) δ 171.0, 167.0, 141.4, 132.8, 132.1, 130.0, 129.2, 126.3, 124.6, 118.7, 65.7, 52.2, 38.5;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2952, 1716, 1607, 1435, 1275, 1155, 1108, 970, 761;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₅ H ₁₇ O ₄ ⁺ [M+H] ⁺ 261.1121 encontrado 261.1120;

but-2-enoato de metil (*E*)-4-(((*E*)-4-fenilbut-3-enoil)oxi) (145)

but-2-enoato de metil (<i>E</i>)-4-(((<i>E</i>)-4-fenilbut-3-enoil)oxi) (145)	
Obs.:	2 equiv. do álcool alílico 157 , lâmpada de Xe (260 W), 1 h e 30 min;
(145)	50% de rendimento após purificação em cromatografia <i>flash</i> usando gradiente de 10-20% AcOEt/hexano. Os isômeros <i>E/Z</i> após a irradiação não puderam ser separados em coluna.
R_f	0.23 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.39 – 7.36 (m, 2H), 7.34 – 7.29 (m, 2H), 7.26 – 7.22 (m, 1H), 6.96 (dt, <i>J</i> = 15.8, 4.7 Hz, 1H), 6.52 (dt, <i>J</i> = 15.9, 1.5 Hz, 1H), 6.30 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.2 Hz, 1H), 6.05 (dt, <i>J</i> = 15.8, 1.9 Hz, 1H), 4.79 (dd, <i>J</i> = 4.7, 2.0 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.32 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.5 Hz, 2H);
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 171.0, 166.3, 141.3, 136.8, 134.1, 128.7, 127.8, 126.5, 122.2, 121.2, 63.0, 51.9, 38.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3027, 2951, 2923, 2850, 1722, 1666, 1436, 1310, 1274, 1148, 964, 40, 692;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado C ₁₅ H ₁₆ NaO ₄ ⁺ [M + Na] ⁺ 283.0941, encontrado 283.0957;

alil (*E*)-hept-3-enoato (**146**)

alil (<i>E</i>)-hept-3-enoato (146)	
Obs.:	5 equiv. do álcool alílico 157 , lâmpada de Xe (260 W), 1 h
(146)	70% de rendimento como um óleo incolor após purificação em AcOEt/Hexano 5-20%. Não foi possível separar os isômeros <i>E/Z</i> por coluna após a irradiação. Cuidado! Produto volátil;
R_f	0.57 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 5.91 (ddt, <i>J</i> = 17.1, 10.4, 5.7 Hz, 1H), 5.61 – 5.47 (m, 2H), 5.35 – 5.27 (m, 1H), 5.23 (dq, <i>J</i> = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.58 (dt, <i>J</i> = 5.7, 1.4 Hz, 2H), 3.05 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 2.06 – 1.95 (m, 2H), 1.39 (h, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 0.89 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 172.0, 134.9, 132.3, 121.7, 118.3, 65.3, 38.2, 34.7, 22.4, 13.7;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>) Calculado para C ₁₀ H ₁₆ NaO ₂ ⁺ [M+Na] ⁺ 191.1043 encontrado 191.1004;

Carboxilato de benzil (*E*)-2-(4-(aliloxi)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina (147)

carboxilato de benzil (<i>E</i>)-2-(4-(aliloxi)-4-oxobut-1-en-1-il)piperidina (147)	
Obs.:	10 equiv. do álcool alílico 156 , lâmpada de Xe (260 W), 30 min;
(147)	50% de rendimento como um óleo incolor após purificação em AcOEt/Hexano 10-50%. Não foi possível separar os isômeros <i>E/Z</i> por coluna após a irradiação;
R_f	0.25 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.39 – 7.27 (m, 5H), 5.91 (ddt, <i>J</i> = 17.1, 10.4, 5.7 Hz, 1H), 5.76 – 5.52 (m, 2H), 5.31 (dq, <i>J</i> = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.23 (ddd, <i>J</i> = 10.4, 2.6, 1.3 Hz, 1H), 5.14 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 2H), 4.90 (s, 1H), 4.59 (dt, <i>J</i> = 5.7, 1.4 Hz, 2H), 4.03 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 1H), 3.13 – 3.07 (m, 2H), 2.91 (td, <i>J</i> = 13.0, 2.8 Hz, 1H), 1.82 – 1.59 (m, 3H), 1.56 – 1.33 (m, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃) δ 171.4, 155.8, 137.1, 132.6, 132.2, 128.6, 128.0, 127.9, 123.7, 118.5, 67.2, 65.4, 52.1, 40.3, 37.9, 29.2, 25.7, 19.5;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2953, 2858, 1735, 1692, 1418, 1320, 1255, 1158, 1070, 983, 918, 750;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₂₀ H ₂₅ NNaO ₄ ⁺ [M+Na] ⁺ 366.1676 encontrado 366.1674;

pent-3-enoato de (*E*)-4-metóxi-4-oxobut-2-en-1-il (*E*)-5-(benzilóxi) (148)

pent-3-enoato de (<i>E</i>)-4-metóxi-4-oxobut-2-en-1-il (<i>E</i>)-5-(benzilóxi) (148)	
Obs.:	3 equiv. do álcool alílico 157 , lâmpada de Xe (260 W), 2 h e 30 min,
(148)	53% de rendimento como um óleo incolor após purificação em 10-20% AcOEt/Hexano. Não foi possível separar os isômeros <i>E/Z</i> por coluna após a irradiação.
R_f	0.14 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.37 – 7.31 (m, 4H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 6.94 (dt, <i>J</i> = 15.8, 4.7 Hz, 1H), 6.03 (dt, <i>J</i> = 15.8, 2.0 Hz, 1H), 5.86 (dtt, <i>J</i> = 16.0, 6.6, 1.2 Hz, 1H), 5.77 (dtt, <i>J</i> = 15.4, 5.8, 1.2 Hz, 1H), 4.76 (dd, <i>J</i> = 4.7, 2.0 Hz, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.03 (dd, <i>J</i> = 5.7, 1.2 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.17 (dd, <i>J</i> = 6.8, 1.1 Hz, 2H);
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 170.9, 166.3, 141.4, 138.2, 131.1, 128.5, 127.9, 127.8, 124.9, 122.1, 72.3, 70.2, 62.9, 51.9, 37.6;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2952, 2925, 2852, 1721, 1666, 1436, 1310, 1275, 1154, 1098, 966, 736, 697;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>) Calculado para C ₁₇ H ₂₀ NaO ₅ ⁺ [M+Na] ⁺ 327.1203 encontrado 327.1197;

2-(vinilóxi)etil (*E*)-4-fenilbut-3-enoato (149) **2-(vinilóxi)etil (*E*)-4-fenilbut-3-enoato (149)**

Obs.:	5 equiv. do álcool alílico 159 , lâmpada de LED, 24 h;
(149)	50% de rendimento como um óleo incolor após purificação em 10-20% AcOEt/Hexano. Não foi possível separar os isômeros <i>E/Z</i> por coluna após a irradiação.
R_f	0.37 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.40 – 7.36 (m, 2H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 6.49 (dd, <i>J</i> = 14.3, 6.9 Hz, 2H), 6.31 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 4.40 – 4.33 (m, 2H), 4.22 (dd, <i>J</i> = 14.3, 2.3 Hz, 1H), 4.06 (dd, <i>J</i> = 6.8, 2.3 Hz, 1H), 3.96 – 3.87 (m, 2H), 3.30 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.5 Hz, 2H).;
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 171.6, 151.5, 136.9, 133.7, 128.6, 127.7, 126.4, 121.5, 87.3, 65.8, 63.1, 38.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3028, 2955, 2928, 1733, 1619, 1452, 1321, 1252, 1159, 1101, 965, 824, 748, 695;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>) Calculado para C ₁₄ H ₁₇ NO ₃ ⁺ [M+H] ⁺ 233.1172 encontrado 233.1164;

(E)-4-metóxi-4-oxobut-2-en-1-il (3E,5E)-6-fenilhexa-3,5-dienoato (150)

(E)-4-metóxi-4-oxobut-2-en-1-il (3E,5E)-6-fenilhexa-3,5-dienoato (150)	
Obs.:	2 equiv. do álcool alílico 157 , lâmpada de Xe (260 W), 2 h e 30 min, 35% 1.1 equiv. do álcool alílico 157 , lâmpada de Xe (260 W), 3 h, 30% 1.1 equiv. do álcool alílico 157 , lâmpada de LED (18 W), 24 h, 77% O rendimento de 77% não foi reproduzido posteriormente, variando entre 40-60% nas mesmas condições;
(150)	30-77% de rendimento como um sólido branco após purificação em coluna <i>flash</i> usando 20-40% de AcOEt/Hexano.
R_f	0.31 (20% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.25 – 7.19 (m, 1H), 6.95 (dt, <i>J</i> = 15.8, 4.7 Hz, 1H), 6.78 (ddd, <i>J</i> = 15.7, 10.4, 0.8 Hz, 1H), 6.53 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 6.33 (dd, <i>J</i> = 15.2, 10.4 Hz, 1H), 6.05 (dt, <i>J</i> = 15.8, 2.0 Hz, 1H), 5.89 (dt, <i>J</i> = 15.1, 7.3 Hz, 1H), 4.78 (dd, <i>J</i> = 4.7, 2.0 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.25 (dd, <i>J</i> = 7.3, 1.4 Hz, 2H);
¹³C RMN	(101 MHz, CDCl ₃) δ 170.9, 166.3, 141.3, 137.2, 134.6, 132.6, 128.7, 128.3, 127.7, 126.5, 124.9, 122.2, 63.0, 51.9, 38.1;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2952, 2925, 2853, 1720, 1667, 1449, 1276, 1018, 968, 753, 698;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₇ H ₁₉ O ₄ ⁺ [M+H] ⁺ 287.1278, encontrado 287.1287;

but-3-enoato de (2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-il (E)-4-(4-nitrofenil) (151)

but-3-enoato de (2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-il (E)-4-(4-nitrofenil) (151)	
Obs.:	10 equiv. do álcool alílico 155 , lâmpada de LED (18 W), 24 h
(151)	40% de rendimento como um sólido amarelo pardo após purificação em coluna <i>flash</i> de 10-20% de AcOEt/Hexano;
R_f	0.40 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 8.17 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 7.50 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.61 – 6.45 (m, 2H), 6.33 – 6.22 (m, 1H), 6.11 – 6.00 (m, 1H), 5.83 – 5.70 (m, 1H), 5.64 (dtq, <i>J</i> = 15.0, 6.8, 0.7 Hz, 1H), 4.63 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 3.31 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 1.77 (d, <i>J</i> = 6.1 Hz, 3H);
¹³C RMN	(101 MHz, CDCl ₃) δ 170.8, 143.3, 135.6, 131.9, 131.7, 130.4, 129.5, 127.0, 127.0, 124.1, 123.3, 65.7, 38.5, 18.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2923, 2852, 1731, 1658, 1598, 1514, 1340, 1154, 1108, 989, 969, 858, 803, 744;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₆ H ₁₈ NO ₄ ⁺ [M+H] ⁺ 288.1230, encontrado 288.1205;

hexa-2,4-dienoato de metil (2*E*,4*E*)-6-(((*E*)-4-fenilbut-3-enoil)oxi) (152)

hexa-2,4-dienoato de metil (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(((<i>E</i>)-4-fenilbut-3-enoil)oxi) (152)	
Obs.:	2 equiv. do álcool alílico 158 , lâmpada de Xe (260 W), 1 h e 20 min,
(152)	52% de rendimento como um sólido branco após a purificação em coluna <i>flash</i> usando 10-20% de AcOEt/Hexano;
R_f	0.20 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.40 – 7.35 (m, 2H), 7.34 – 7.19 (m, 4H), 6.51 (dt, <i>J</i> = 15.8, 1.5 Hz, 1H), 6.44 – 6.35 (m, 1H), 6.30 (dt, <i>J</i> = 15.9, 7.1 Hz, 1H), 6.14 (dt, <i>J</i> = 15.4, 5.9, 0.8 Hz, 1H), 5.90 (dt, <i>J</i> = 15.4, 0.7 Hz, 1H), 4.72 (dd, <i>J</i> = 5.9, 1.5 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.29 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.5 Hz, 2H);
¹³C RMN	(101 MHz, CDCl ₃) δ 171.1, 167.2, 143.3, 136.8, 135.3, 133.9, 130.8, 128.7, 127.8, 126.4, 122.3, 121.4, 64.1, 51.7, 38.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3027, 2950, 1717, 1650, 1620, 1435, 1267, 1236, 1140, 999, 966;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₇ H ₁₈ NaO ₄ ⁺ [M+Na] ⁺ 309.1097, encontrado 309.1086;

(2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-il (E)-4-fenilbut-3-enoato (153)

(2E,4E)-hexa-2,4-dien-1-il (E)-4-fenilbut-3-enoato (153)	
Obs.:	10 equiv. do álcool alílico 155 , lâmpada de LED (18 W), 24 h
(153)	65% de rendimento como um sólido branco após purificação em coluna usando gradiente de 5-10% de AcOEt/Hexano;
R_f	0.57 (10% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.29 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 6.48 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 6.33 – 6.21 (m, 2H), 6.04 (ddd, <i>J</i> = 15.3, 10.7, 1.7 Hz, 1H), 5.73 (dq, <i>J</i> = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 5.62 (dtd, <i>J</i> = 15.2, 6.7, 0.6 Hz, 1H), 4.60 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 3.24 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.4 Hz, 2H), 1.74 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H);
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 171.3, 136.8, 135.1, 133.5, 131.4, 130.4, 128.5, 127.5, 126.3, 123.5, 121.7, 65.3, 38.5, 18.1;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3006, 2925, 2853, 1733, 1661, 1448, 1241, 1151, 988, 965, 745, 692;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₆ H ₁₉ O ₂ ⁺ [M+H] ⁺ 243.1380, encontrado 243.1370;

Preparo álcoois alílicos **157** e **158**

Em uma suspensão de metil crotonato **160** em refluxo (8.5 g, 85 mmol, 1 equiv.) em 40 mL de CCl₄ foi adicionado NBS (16 g, 89 mmol, 1.05 equiv.) e peróxido de benzoíla em porções (10 mg, 0.041 mmol, 0.004 equiv.). Uma lâmpada CFL de 13 W foi equipada ao sistema e a solução irradiada sob refluxo por 9 h. Durante este tempo, peróxido de benzoíla foi adicionado (em pó) a mistura de 3 em 3 h (3 porções de 10 mg). A solução foi agitada durante a noite e então resfriada a temperatura ambiente. Após, H₂O foi adicionada (20 mL) e a solução extraída com hexano (2 x 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ e concentrada em vácuo para fornecer o brometo alílico como um líquido incolor. A purificação pode ser feita por cromatografia *flash* (6:1 hexano/AcOEt) ou por destilação em vácuo coletando as frações entre 95-98 °C (20 Torr) para fornecer **161** como um óleo incolor (9.5 g, 56% de rendimento): **Cuidado!** O produto possui um forte odor com características lacrimejantes.

161: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.02 (dt, *J* = 15.4, 7.4 Hz, 1H), 6.04 (dt, *J* = 15.4, 1.3 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H).

164: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (ddd, *J* = 15.4, 10.9, 0.7 Hz, 1H), 6.39 (ddd, *J* = 15.0, 11.0, 0.9 Hz, 1H), 6.24 (dddd, *J* = 15.0, 7.7, 7.3, 0.7 Hz, 1H), 5.94 (dd, *J* = 15.4, 0.8 Hz, 1H), 4.03 (dd, *J* = 7.7, 0.9 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H).

Método com Ag₂O

O bromocrotonado **161** (500 mg, 2.79 mmol, 1 equiv.) foi adicionado em uma mistura de Ag₂O (324 mg, 1.39 mmol, 0.5 equiv.) em 6 mL de H₂O a temperatura ambiente. A mistura foi agitada vigorosamente por 12 h e então aquecida em 60 °C por um período adicional de 6 h. Após a filtração (pode ser feita tanto em Celite quanto em papel filtro), a água foi removida em sistema de vácuo e então o bruto purificado em coluna *flash* (40% AcOEt/Hexano). O álcool alílico **157** foi obtido como um líquido incolor em 32% de rendimento (104.6 mg).

157: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (dt, *J* = 15.7, 4.0 Hz, 1H), 6.11 (dt, *J* = 15.7, 2.1 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 4.0, 2.1 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H).

Método com NaHCO₃

Uma mistura de acetona (6 mL), solução aquosa saturada de NaHCO₃ (4 mL) e o brometo alílico **164** (0.5 g, 2.45 mmol, 1 equiv.) foi refluxada por 5 h. Após este período, HCl 5% foi adicionado e a acetona removida em vácuo. Um resíduo de 2 camadas foi obtido. A fase aquosa foi extraída com AcOEt (6 x 10 mL) e a fase orgânica dissolvida em AcOEt (50 mL). As fases orgânicas combinadas foram concentradas para fornecer 155 mg do álcool alílico **158** como um sólido branco em 50% de rendimento.

158: ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.30 (dd, *J* = 15.3, 11.1 Hz, 1H), 6.42 (ddtd, *J* = 15.2, 11.0, 1.7, 0.7 Hz, 1H), 6.22 (dtt, *J* = 15.4, 5.0, 0.7 Hz, 1H), 5.89 (dt, *J* = 15.4, 0.8 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 5.0, 1.7 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H).

6.7 Reação de Diels-Alder a partir de **150**

Uma solução do éster **150** (20 mg, 0.07 mmol) em xileno (3 mL) foi adicionada em um tubo selado e então argônio foi passado pelo sistema durante 30 minutos. A mistura foi aquecida em 230-250 °C (temperatura medida pelo banho de óleo) por 48 h. Ao final deste período, o solvente é removido em vácuo para fornecer o resíduo bruto. A purificação por cromatografia *flash* (50-70% AcOEt/Hexano) forneceu ($\pm$)**171** como uma mistura endo/exo em proporção 1:1 (14.0 mg, 0.049 mmol, 70% de rendimento). 3.8 mg de **150** não reagido foi recuperado. A separação dos isômeros foi realizada por HPLC em sistema preparativo utilizando uma coluna C18.

<i>Endo-(171)</i>	
R_f	0.34 (40% AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.33 – 7.27 (m, 3H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 5.82 (ddd, J = 9.9, 4.5, 2.4 Hz, 1H), 5.75 (dt, J = 10.0, 1.7 Hz, 1H), 4.65 (ddd, J = 10.6, 4.7, 0.7 Hz, 1H), 3.96 (ddd, J = 6.6, 4.4, 2.2 Hz, 1H), 3.92 (t, J = 11.4, 10.9, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.93 (dd, J = 17.3, 4.2 Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 11.8, 6.5 Hz, 1H), 2.51 – 2.43 (m, 1H), 2.38 (dd, J = 17.2, 13.7 Hz, 1H), 2.23 (dd, J = 11.3, 4.7 Hz, 1H);
¹³C RMN	(126 MHz, CDCl ₃) δ 171.3, 169.5, 138.5, 129.1, 129.0, 128.4, 128.0, 127.8, 73.0, 58.5, 51.4, 46.9, 43.6, 36.7, 34.8, 32.0, 18.4;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3027, 2952, 2920, 1732, 1492, 1454, 1435, 1289, 1262, 1200, 1033, 759, 703;
HRMS	ESI ⁺ (m/z) Calculado para C ₁₇ H ₁₉ O ₄ ⁺ [M+H] ⁺ 287.1278, encontrado 287.1279;
HPLC	Coluna: Shim-Pack® VP-ODS (tamanho da partícula: 4.6 μ m; tamanho de poro: 12 nm, dimensão: 4.6 mm x 250 mm), 50:50 (MeCN:H ₂ O), 1.0 mL/min, λ 220 e 254 nm.

Figura 46 Cromatograma obtido para a separação dos isômeros endo/exo **171** por HPLC.

6.8 Síntese dos reagentes carbonilacrílicos

(*E*)-etil 4-oxopent-2-enoato (**174**)²³⁶

Em uma solução de 1-(trifenilfosforanilidena)-2- propanona (2.10 g, 6.59 mmol, 1.0 equiv.) e glicolato de etila (0.75 mL, 7.92 mmol, 1.2 equiv.) em CH_2Cl_2 (22 mL) foi adicionado MnO_2 (5.75 g, 65.9 mmol, 10.0 equiv.) e vigorosamente agitado em temperatura ambiente (25 °C) por 30 h. A mistura foi filtrada em Celite e o filtrado concentrado usando rota evaporador. O resíduo foi diluído com Et_2O (10 mL) gelado, filtrado em Celite e lavado com Et_2O (5 mL). O filtrado foi concentrado em vácuo e purificado por cromatografia *flash* (5 - 20% AcOEt em hexano) para fornecer o éster **174** (618 mg, 4.35 mmol, 66% rendimento) como um óleo amarelo claro.

(<i>E</i>)-etil 4-oxopent-2-enoato (174)	
R_f	0.40 (1:9 AcOEt /hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl_3) δ 6.98 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.23 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl_3) δ 197.8, 165.6, 140.1, 131.8, 61.6, 28.3, 14.3;
FTIR	(puro, cm^{-1}) 2986, 1721, 1701, 1683, 1641, 1467, 1424, 1365, 1290, 1223, 1181, 1155, 1096, 1029, 978, 947, 869;
HRMS	ESI^+ (m/z): Calculado para $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 143.0703, encontrado 143.0698;

(E)-N-etil-4-oxo-4-fenilbut-2-enamida (179) ²³⁷

Sob atmosfera de argônio, 1.12 g do ácido 3-benzoilacrílico (6.4 mmol) foi dissolvido em dimetóxietano (13 mL) e a solução resfriada a -10 °C. Isobutilbloreformato (1.18 mL, 7.7 mmol) foi adicionado a solução seguido de *N*-metilmorfolina (0.85 mL, 7.7 mmol). Após, uma solução 2 M de etilamina em THF (8.0 mL, 16.0 mmol) foi adicionada e a mistura agitada na mesma temperatura por 15 min e em temperatura ambiente por um período adicional de 1 h. 10 mL de H₂O foi então adicionado ao balão reacional e a mistura extraída com CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com 10 mL de solução aquosa saturada de NaOH e 10 mL de H₂O e secas usando Na₂SO₄. Após evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (10 - 80% AcOEt em hexano) para fornecer a amida pura **179** (1.04 g, 5.10 mmol, 80% rendimento) como um sólido amarelo claro.

(E)-N-etil-4-oxo-4-fenilbut-2-enamida (179)

R_f	0.47 (4:1 AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 8.05 – 8.01 (m, 2H), 7.97 (d, <i>J</i> = 15.0 Hz, 1H), 7.64 – 7.57 (m, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 6.95 (d, <i>J</i> = 15.0 Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.45 (qd, <i>J</i> = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.23 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H);
¹³C RMN	(100 MHz, CD ₃ CN) δ 191.1, 164.5, 138.0, 136.9, 134.5, 133.1, 129.8, 129.6, 35.2, 14.7;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3258, 1637, 1593, 1559, 1447, 1357, 1324, 1289, 1196, 1009, 977;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₁₂ H ₁₄ NO ₂ ⁺ [<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺ 204,1019, encontrado 204.0995;

***N*¹,*N*⁴-dietilfumaramida (180)**

Ácido fumárico (1 g, 8.61 mmol), *N*-*N*-diisopropil etil amina (3.3 mL, 19.0 mmol, 2.2 equiv.) e TBTU (5.5 g, 17.0 mmol, 2 equiv.) foram dissolvidos em DMF (17 mL). Uma solução 2 M de etilamina em THF (9.5 mL, 19.0 mmol, 2.2 equiv.) foi adicionada e a mistura reacional agitada em temperatura ambiente durante a noite (12 h). A reação foi diluída com água e extraída com CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ e concentradas em vácuo. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (1 - 10% MeOH em CH₂Cl₂) para fornecer a fumaramida **180** (885 mg, 5,2 mmol, 60% rendimento) como um sólido branco.

***N*¹,*N*⁴-dietilfumaramida (180)**

R_f	0.29 (2:98 MeOH/CH ₂ Cl ₂);
¹H RMN	(400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6.74 (s, 2H), 3.14 (q, <i>J</i> = 7.3 Hz, 4H), 1.02 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 6H);
¹³C RMN	100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 164.6, 133.1, 34.4, 14.9;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3282.00, 3068.18, 2977.87, 2936.84, 2887.13, 1622.83, 1480.55, 1405.59, 1367.81, 1317.23, 1198.65, 1144.83, 1103.32, 1043.17, 1013.02, 992.01, 981.76, 923.03, 910.08;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₈ H ₁₅ N ₂ O ₂ ⁺ [M + H] ⁺ 171.1128, encontrado 171.1205;

6.9 Procedimento geral para a adição de Michael

O tratamento dos derivados carbonilacrílicos com éster metílico de *N*-(tert-Butóxicarbonil)-*L*-cisteína **173** em uma solução de MeCN/NaP_i (tampão de fosfato de sódio, pH 8.0, 50 mM) em temperatura ambiente por 2 minutos forneceu os adutos de cisteína:

A uma solução de **173** (23.2 mg, 0.098 mmol, 1 equiv.) em 2 mL de uma solução de NaP_i (pH 8.0, 50 mM) contendo 30% de MeCN foi adicionada uma solução de **174** (20.0 mg, 0.098 mmol, 1 equiv.) em MeCN (0.5 mL) a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por TLC usando UV e ninhidrina como reveladores. Após 2 minutos, a reação foi concentrada em vácuo para fornecer o produto **175** como um óleo incolor em 99% de rendimento (42.5 mg, 0.097 mmol).

(175)	
R_f	0.11 (1:1 AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 °C) δ 7.97 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.65 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.53 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 4.32 – 4.21 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 2H), 3.91 – 3.84 (m, 1H), 3.68 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 3H), 3.67 – 3.59 (m, 1H), 3.46 – 3.29 (m, 1H), 3.19 – 3.08 (m, 1H), 3.06 – 2.98 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.22 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 °C, diastereoisômero majoritário) δ 196.4, 170.7, 170.5, 154.5, 135.8, 132.8, 128.1, 127.3, 78.2, 60.2, 60.2, 53.7, 53.2, 51.3, 41.6, 40.9, 40.6, 40.3, 32.5, 32.2, 27.6, 13.2;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2981, 1712, 1684, 1597, 1581, 1501, 1449, 1392, 1366, 1246, 1212, 1096, 1052, 1020, 1002, 988, 916, 857, 756;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₂₁ H ₃₀ NO ₇ S ⁺ [M + H] ⁺ 440.1737, encontrado 440.1737;

A uma solução do éster metílico de *N*-(tert-Butóxicarbonil)-*L*-cisteína **173** (16.5 mg, 0.070 mmol, 1 equiv.) em 1.4 mL de uma solução de NaP_i (pH 8.0, 50 mM) contendo 30% de MeCN foi adicionada uma solução de **178** (10.0 mg, 0.078 mmol, 1 equiv.) em MeCN (0.2 mL) a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por TLC usando UV e ninhidrina como reveladores. Após 2 minutos, a reação foi concentrada em vácuo para fornecer o produto **181** como um óleo incolor em 95% de rendimento (28.0 mg, 0.074 mmol).

(181)	
R_f	0.40 (1:1 AcOEt /hexano);
¹H RMN	(500 MHz, 90°C, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6.86 (s, 1H), 4.31 – 4.16 (m, 1H), 4.18 – 4.04 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.09 – 3.03 (m, 2H), 2.98 – 2.78 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.22 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 90 °C, diastereoisômero majoritário) δ 204.3, 204.3, 170.7, 170.7, 78.3, 60.3, 51.4, 44.6, 44.3, 41.1, 40.4, 32.4, 32.1, 28.9, 27.7, 13.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2979, 1712, 1508, 1437, 1392, 1365, 1319, 1233, 1095, 1044, 1018, 860, 779;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₁₆ H ₂₈ NO ₇ S ⁺ [M + H] ⁺ 378.1581, encontrado 378.1585;

A uma solução do éster metílico de *N*-(tert-Butóxicarbonil)-*L*-cisteína **173** (23.2 mg, 0.098 mmol, 1 equiv.) em 2 mL de uma solução de NaP_i (pH 8.0, 50 mM) contendo 30% de MeCN foi adicionada uma solução de **179** (20.0 mg, 0.098 mmol, 1 equiv.) em MeCN (0.5 mL) a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por TLC usando UV e ninhidrina como reveladores. Após 2 minutos, a reação foi concentrada em vácuo para fornecer o produto **182** como um óleo incolor em 95% de rendimento (42.5 mg, 0.097 mmol).

(182)

R_f	0.63 (4:1 AcOEt/hexano);
¹H RMN	500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 °C) δ 7.94 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.63 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 4.27 – 4.18 (m, 1H), 3.88 – 3.79 (m, 1H), 3.72 – 3.67 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.27 (dt, <i>J</i> = 17.4, 4.9 Hz, 1H), 3.16 – 3.10 (m, 2H), 3.10 – 3.04 (m, 1H), 2.95 – 2.91 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.06 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 °C, diastereoisômero majoritário) δ 196.7, 170.7, 169.4, 154.5, 136.3, 132.5, 128.0, 127.3, 78.2, 53.5, 51.2, 42.3, 40.8, 33.3, 31.8, 27.6, 13.8;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 2978, 1683, 1597, 1519, 1449, 1413, 1392, 1366, 1351, 1248, 1217, 1052, 1019, 988, 912, 858;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₂₁ H ₃₁ N ₂ O ₆ S ⁺ [M + H] ⁺ 439.1897, encontrado 439.1899;

6.10 Estudos de seletividade

Uma mistura equimolar de N-Boc-Cisteína-OMe **173** (57,6 mg, 0.245 mmol, 1 equiv.) e N-Boc-Lisina-OMe **177** (63.7 mg, 0.245 mmol, 1 equiv.) em MeCN (0.05 M) ou em uma solução 30% de MeCN/NaP_i (50 mM) em pH 8 (0.05 M) foi tratada com **174** (50.0 mg, 0.245 mmol, 1 equiv.) para fornecer somente o aduto de cisteína **175** seletivamente em 99% de rendimento isolado. A lisina permaneceu sem reagir (a). O tratamento do composto **174** com uma solução do éster metílico de N-(tert-Butóxicarbonil)-L-cisteína **173** em NaP_i (pH 8.0, 50 mM) em temperatura forneceu o aduto de cisteína **175** em 99% de rendimento após 2 min de reação (b). Em contraste, o tratamento de **174** com N-Boc-Lisina-OMe **177** nas mesmas condições reacionais requereu 1 h para o consumo total dos reagentes (c).

6.11 Experimento de competição entre 174, 179, N-metilmaleimida

Uma mistura equimolar dos compostos **174**, **179**, N-metilmaleimida em uma solução deuterada de 30% CD₃CN/NaP_i (pH 8.0, 50 mM) foi adicionada em um tubo de RMN e realizada a análise de RMN de ¹H em 20 °C utilizando um equipamento de 400 MHz. O espectro confirmou a razão 1:1:1 da mistura. Após, 1 equiv. de **173** foi adicionada ao tubo reacional e um segundo espectro medido, mostrando uma razão final de 1:0.22:0.58 que corrobora as constantes cinéticas calculadas (Figura 47).

Figura 47 Experimento de competição entre **174**, **179** e maleimida.

6.12 Estudos de estabilidade

6.12.1 Estabilidade na presença de glutatona (GSH)

A reação foi realizada pelo tratamento de glutatona reduzida (GSH), (21 mg, 0.068 mmol, 1.5 equiv.) com o composto **182** (20mg, 0.046 mmol, 1 equiv.) em 2 mL de uma solução deuterada de tampão NaPi (50 mM) em pH fisiológico (7.4) contendo 40% de CD₃CN em temperatura ambiente. Após 100 e 200 h, uma alíquota de 0.5 mL foi coletada e analisada por RMN de ¹H (Figura 48) e por espectrometria de massas de alta resolução (Figura 49) de alta resolução (HRMS ESI⁺ (*m/z*): calculado para o aduto GSH+**182** C₂₂H₃₁N₄O₈S⁺ [M + H]⁺ 511.1857 ou C₂₂H₃₀N₄O₈SN⁺ [M + Na]⁺ 533.1677).

Figura 48 Estabilidade por RMN ^1H do aduto de Michael **179** na presença de GSH **186**.

Figura 49 Estabilidade por HRMS do aduto de Michael **179** na presença de GSH **186**.

6.12.2 Análise de retro-Michael por UV-VIS

Preparo dos tióis cromogênicos para análise de retro-Michael**N-etil-2-((4-nitrofenil)tio)-4-oxo-4-fenilbutanamida (184)**

Uma solução de **179** (100.0 mg, 0.45 mmol, 1 equiv.), 4-nitrotiofenol (108.0 mg, 0.45 mmol, 1 equiv.) e trietilamina catalítica (7 μ L, 0.049 mmol) em acetonitrila anidra (10 mL) foi agitada em temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio. Após 2 h, a reação foi concentrada em vácuo e o resíduo purificado por cromatografia *flash* (3:7, AcOEt/hexano) para fornecer o composto **184** (112 mg, 0.32 mmol, 70%) como um sólido branco.

N-etil-2-((4-nitrofenil)tio)-4-oxo-4-fenilbutanamida (184)	
R_f	0.43 (3:7 AcOEt/hexano);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.20 – 8.13 (m, 2H), 7.97 – 7.91 (m, 2H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 4H), 6.57 (s, 1H), 4.45 (dd, J = 6.7, 5.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 18.0, 6.7 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 18.1, 5.5 Hz, 1H), 3.37 – 3.24 (m, 2H), 1.11 (t, J = 7.3 Hz, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 196.8, 169.3, 146.5, 144.2, 136.1, 134.0, 128.9, 128.9, 128.3, 124.4, 46.1, 41.2, 35.3, 14.8;
FTIR	(puro, cm ⁻¹) 3271, 3097, 2985, 2903, 1682, 1637, 1595, 1577, 1517, 1481, 1446, 1401, 1366, 1341, 1279, 1264, 1223, 1189, 1165, 1148, 1114, 1082, 1010, 989.76;
HRMS	ESI ⁺ (m/z): calculado para C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₄ S ⁺ [M + H] ⁺ 359.1060, encontrado 359.1072;

1-benzil-3-((4-nitrofenil)tio)pirrolidina-2,5-diona (185)

Uma solução de *N*-benzilmaleimida (150.0 mg, 0.80 mmol, 1 equiv.), 4-nitrotiofenol (124.0 mg, 0.80 mmol, 1 equiv.) e trietilamina catalítica (11 μ L, 0.08 mmol) em acetonitrila anidra (10 mL) foi agitada em temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio. Após 2 h, a reação foi concentrada em vácuo e o resíduo purificado por cromatografia *flash* (3:7, AcOEt/hexano) para fornecer o composto **185** (178 mg, 0.52 mmol, 65%) como um óleo incolor.

1-benzil-3-((4-nitrofenil)tio)pirrolidina-2,5-diona (185)	
R_f	0.37 (3:7 AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃) δ 8.08 – 7.97 (m, 2H), 7.58 – 7.47 (m, 2H), 7.37 – 7.25 (m, 5H), 4.65 (s, 2H), 4.21 (dd, <i>J</i> = 9.4, 4.3 Hz, 1H), 3.27 (dd, <i>J</i> = 18.8, 9.4 Hz, 1H), 2.67 (dd, <i>J</i> = 18.8, 4.4 Hz, 1H);
¹³C RMN	(101 MHz, CDCl ₃) δ 174.6, 173.3, 147.1, 141.2, 135.0, 131.1, 129.1, 128.8, 128.3, 124.1, 43.0, 42.5, 35.8

- Os dados estão de acordo com os reportados na literatura.¹⁷⁷

6.12.3 Procedimento para avaliação de estabilidade dos compostos **184** e **185**

Em uma solução de tampão (165 μL) de NaP_i (pH 7.4, 10 mM) em uma cubeta de quartzo foi adicionada uma solução do composto **184** (33 μL de uma solução 0.45 mM em acetonitrila) e a mistura vigorosamente agitada. A absorbância em 410 nm correspondente ao ânion 4-nitrotiofenolato foi acompanhada a temperatura ambiente durante um período de 5 h. O mesmo procedimento foi seguido para o composto **185**. Cabe ressaltar, que embora ambos os compostos possuam uma absorbância inicial em 410 nm, **184** - $A_{0h} = 0.45$ nm, $A_{5h} = 0.45$ nm e **185** - $A_{0h} = 0.23$ nm, $A_{5h} = 0.35$ nm, o comportamento de **185** claramente indica um aumento na absorbância ao longo do tempo em contraste com a estabilidade de **184** (Figura 50).

Figura 50 Comparação de estabilidade dos derivados cromogênicos **184** e **185**.

6.13 Síntese dos derivados fluorescentes 194 e PEG 195

6.13.1 Síntese do derivado fluorescente 194

Carbamato de *tert*-butil (2-((7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-il)amino)etil) ²³⁸

Em atmosfera de argônio, 4-cloro-7-nitrobenzofurazano – NBDCI **188** (199 mg, 1.0 mmol, 1 equiv.) foi dissolvido em DMF anidro (6 mL). Após a adição de trietilamina (138 μ L, 1.0 mmol, 1 equiv.) e *N*-Boc-1,2-diaminoetano (174 μ L, 1.2 mmol, 1.2 equiv.), a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 3 h. A reação foi acompanhada por TLC (1:1, AcOEt/hexano, usando UV e KMnO_4 como reveladores) e finalizada pela adição de uma solução aquosa saturada de cloreto de amônio (30 mL). A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 40 mL) e a fase orgânica lavada com água (50 mL), solução saturada de NaCl (50 mL) e posteriormente seca com sulfato de magnésio. Após a remoção de solventes em pressão reduzida, o intermediário protegido com Boc **189** foi obtido como óleo marrom escuro (275 mg, 0.85 mmol, 85% de rendimento):

189 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.48 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.01 (br s, 1H), 6.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.09 (br s, 1H), 3.59 (br s, 4H), 1.46 (s, 9H); HRMS ESI^+ (m/z): calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_5^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 324.1302, encontrado 324.1302.

***N*¹-(7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-il)etano-1,2-diamina** ²³⁸ Em atmosfera de argônio, o intermediário **189** (262 mg, 0.81 mmol, 1 equiv.) foi dissolvido em uma solução 4.0 M de HCl em dioxana (6 mL). A solução foi protegida da luz (usando folha de alumínio) e agitada durante a noite (12h). Após confirmar a completa reação por TLC (9:1, CH₂Cl₂/MeOH, usando UV e KMnO₄ como reveladores), a solução foi evaporada em pressão reduzida e um sólido marrom escuro de **190** foi obtido e utilizado na próxima etapa (185.4 mg, 0.71 mmol, 88% de rendimento).

190: ¹H RMN (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 8.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.89 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H); HRMS ESI⁺ (*m/z*): calculado para C₈H₁₀N₅O₃⁺ [M + H]⁺ 224.0778, encontrado 224.0784.

Em atmosfera de argônio, o ácido 3-benzoilacrílico **191** (108.0 mg, 0.61 mmol, 1 equiv.) foi dissolvido em DMF anidro e então trietilamina (170 μ L, 1.22 mmol, 2.0 equiv.) foi adicionada gota-a-gota. Esta solução foi resfriada com banho de gelo e então adicionado sequencialmente hidrato de 1-hidróxibenzotriazol (111.5 mg, 0.73 mmol, 1.2 equiv.), hidrocloreto de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (140.0 mg, 0.73 mmol, 1.2 equiv.) e **192** (149.5 mg, 0.61 mmol, 1 equiv.). O balão foi excluído da luz (envolvido com papel de alumínio) e então a reação foi prolongada por 3 h em temperatura ambiente. Após análise por TLC (95:5, CH₂Cl₂/MeOH, usando UV e KMnO₄ como reveladores), a reação foi vertida em uma solução aquosa de HCl (0.5 M, 40 mL) e extraída com CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de Na₂CO₃ (2 x 40 mL) e de NaCl (2 x 40 mL) e secas com sulfato de magnésio. A remoção dos voláteis em vácuo forneceu o composto **194** como um sólido amarelo escuro/marrom (151.0 mg, 0.40 mmol, 65%). O produto foi obtido com excelente pureza por análise de ¹H RMN. Diversas tentativas de purificação usando cromatografia (sílica, sílica lavada com trietilamina e alumina) ou recristalização levaram a degradação.

<i>(E)</i> - <i>N</i> -(2-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)amino)etil)-4-oxo-4-fenilbut-2-enamida (194)	
R_f	0.71 (95:5 CH ₂ Cl ₂ /MeOH);
¹H RMN	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.80 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 8.52 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.98 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 7.74 (d, <i>J</i> = 15.3 Hz, 1H), 7.69 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 6.91 (d, <i>J</i> = 15.3 Hz, 1H), 6.47 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 3.63 (bs, 2H), 3.56 – 3.47 (m, 2H);
¹³C RMN	(125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 189.8, 164.1, 145.4, 144.6, 137.9, 136.5, 136.1, 133.8, 132.1, 129.0, 128.6, 128.2, 99.3, 45.7, 29.0;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₁₈ H ₁₆ N ₅ O ₅ ⁺ [M + H] ⁺ 382,1146, encontrado 382.1133;

6.13.2 Síntese do derivado PEG **195**

Em atmosfera de argônio, o ácido 3-benzoílacrílico **191** (50.0 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) foi dissolvido em DMF anidro e então trietilamina (78 μ L, 0.56 mmol, 2.0 equiv.) foi adicionada. Esta solução foi resfriada com banho de gelo e então adicionado sequencialmente hidrato de 1-hidróxibenzotriazol (46.0 mg, 0.34 mmol, 1.2 equiv.), hidrocloreto de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (65.0 mg, 0.34 mmol, 1.2 equiv.) e uma solução 0.3 M de 2-(2-(2-Metóxi)etóxi) etilamina **193** (45.0 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.). O balão foi excluído da luz (envolvido com papel alumínio) e então a reação foi prolongada por 3 h em temperatura ambiente. Após análise por TLC (95:5, CH₂Cl₂/MeOH, usando UV e KMnO₄ como reveladores), a reação foi vertida em uma solução aquosa de HCl (0.5 M, 20 mL) e extraída com CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de Na₂CO₃ (2 x 30 mL) e de NaCl (2 x 30 mL) e secas com sulfato de magnésio. A remoção dos voláteis em vácuo forneceu o composto **195** como um óleo marrom (38.0 mg, 0.12 mmol, 43% de rendimento) após purificação por cromatografia *flash* (95:5, CH₂Cl₂/MeOH).

(*E*)-*N*-(2-(2-(2-metóxi)etóxi)etil)-4-oxo-4-fenilbut-2-enamida **195**

R_f	0.40 (5% MeOH:CH ₂ Cl ₂);
¹H RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.04 – 8.00 (m, 2H), 7.95 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.57 (m, 1H), 7.49 (dd, <i>J</i> = 8.3, 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, <i>J</i> = 15.0 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 3.68 – 3.61 (m, 8H), 3.63 – 3.54 (m, 4H), 3.38 (s, 3H);
¹³C RMN	(125 MHz, CDCl ₃) δ 189.8, 164.1, 137.0, 135.5, 133.6, 133.0, 128.8, 128.8, 71.9, 70.5, 70.4, 70.2, 69.5, 59.0, 39.7;
HRMS	ESI ⁺ (<i>m/z</i>): Calculado para C ₁₇ H ₂₃ NO ₅ Na ⁺ [<i>M</i> + Na] ⁺ 344.1468, encontrado 344.1455;

6.14 Método geral para análise de LC-MS

A cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) foi realizada em um espectrômetro Xevo G2-S-TOF acoplado a um sistema UPLC Acquity usando uma coluna Acquity UPLC BEH300 C4 (1.7 μm , 2.1 $\times$ 50 mm). Os solventes (A, água com 0.1% de ácido fórmico e B, 71% de acetonitrila, 29% de água e 0.075% de ácido fórmico) foram utilizados como fase móvel em uma taxa de fluxo de 0.2 mL/min. O gradiente foi programado como se segue: 72% A até 100% B após 25 min e então 100% de B por 2 minutos. Após, 72% de A foi utilizado por 18 minutos. A fonte de *electrospray* foi operada com uma voltagem de capilaridade de 2.0 kV e uma voltagem de cone de 40 V. Nitrogênio foi utilizado como gás de desolvatação em um fluxo de 850 L/h. O espectro total de massa foi reconstruído a partir da série de íons utilizando um algoritmo MaxEnt pré-instalado no *software* MassLynx (v. 4.1 da Waters). Para obter a série de íons acima mencionada, os picos majoritários do cromatograma foram selecionados para integração e posterior análise.

6.15 Análise do produto de conjugação de proteínas usando LC-MS

Uma análise típica de uma reação de conjugação por LC-MS é descrita na Figura 51 para a proteína albumina. O cromatograma dos íons totais, série de íons combinadas e o espectro deconvoluído são apresentados para a reação entre a albumina com 1 equivalente do composto (*E*)-*N*-etil-4-oxo-4-fenilbut-2-enamida **179**. Análises idênticas foram realizadas para todas as reações de conjugação. Um espectro de LC-MS foi coletado para todas as proteínas antes das reações com os compostos carbonilacrílicos.

Figura 51 Análise de LC-MS obtida para as reações de bioconjugação (exemplo albumina).

6.16 Proteínas utilizadas: Annexina V, C2Am e albumina

6.16.1 Annexina V-Cis316

Sequência:

AQVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLLTSRSNAQRQEISAAFK
TLFGRDLLDDLKSELTGKFEKLIVALMKPSRLYDAYELKHALKGAGTNEKVLTEIIASR
TPEELRAIKQVYEEYEGSSLEDDVVGDTSGYYQRMLVLLQANRDPDAGIDEAQVE
QDAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYM TISGFQIEETIDRETSG
NLEQLLLAVVKSIRSIPAYLAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRK
NFATSLYSMIKGDTS GDYKKALLLLCGEDD

Peso molecular = 35805 Da

Figura 52 Análise LC-MS para a Annexina V-Cis316

6.16.2 C2Am-Cis78

Sequência:

GSPGISGGGGGILDSMVEKLGKLGKLYSLDYDFQNNQLLVGIIQAAELPALDMGGTSD
 PYVKVFLLPDKKKKFETKVRKTLNPFVNEQFTFKVPYCELGGKTLVMAVYDFDRF
 SKHDIIGFEKVPMTN DFGHVTEEWRLQSAEK

Peso Molecular = 16222 Da

Figura 53 Análise LC-MS para a C2Am.

6.16.3 Albumina-Cis34

Sequencia:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADE
SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCA
EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Peso molecular = 66472; com 17 dissulfetos internos = 66439 Da

Figura 54 Análise LC-MS para a albumina.

6.17 Procedimento para a bioconjugação com Annexina V-Cis316

Em um ependorfe contendo 23.17 μ L de TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado uma alíquota de 14.40 μ L de uma solução estoque da Annexina V (27.80 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após, uma solução 4.11 mM de **174** (2.42 μ L, 25 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 27 h em temperatura ambiente. Após, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão de 50% foi observada (massa calculada, 36010, massa observada, 36009).

Figura 55 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e **174** após 27 h e 3 dias.

Em um ependorfe contendo 23.17 μ L de TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado uma alíquota de 14.40 μ L de uma solução estoque da Annexina V (27.80 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após, uma solução 5.34 mM de **178** (1.87 μ L, 25 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 27 h em temperatura ambiente. Após, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão de 30% foi observada (massa calculada, 35948, massa observada, 35947).

Figura 56 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e **178** após 27 h e 3 dias.

Em um ependorfe contendo 20.26 μ L de TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado uma alíquota de 14.40 μ L de uma solução estoque da Annexina V (27.80 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após, uma solução 3.74 mM de **179** (5.34 μ L, 50 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 1 h em 37 °C. Após, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão completa ao produto esperado foi observada (massa calculada, 36009, massa observada, 36006).

Figura 57 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e **179** após 27 h.

Em um ependorfe contendo 21.73 μ L de TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado uma alíquota de 14.40 μ L de uma solução estoque da Annexina V (27.80 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após, uma solução 2.58 mM de **180** (3.87 μ L, 25 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 27 h em temperatura ambiente. Após, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e apenas proteína de partida foi observada (massa calculada, 35805).

Figura 58 Análise LC-MS da reação entre a Annexina V e **174** após 27 h.

6.18 Controles químicos

6.18.1 Reação de Ellman's com Annexina V-Cis316

Uma alíquota de 14.4 μ L da Annexina V-Cis316 (27.8 μ M, 400 nmol) em TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi transferida em um tubo ependorfe de 0.5 mL. Uma alíquota de 4 μ L do reagente de Ellman's **187** (50.5 mM, 200 μ mol, 500 equiv.) foi adicionada em temperatura ambiente e a mistura resultante agitada em vortex por 30 segundos. Após 4 h de agitação adicional em 37 $^{\circ}$ C, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão completa ao produto esperado foi observada (massa calculada, 36003, massa observada 36002). As moléculas de baixo peso molecular foram removidas da reação através de uma filtração em coluna *Zeba Spin Desalting* previamente equilibrada com TrisHCl (20 mM, pH 8.0). A amostra foi eluída via centrifugação (2 min, 1000 xg). A amostra foi utilizada na próxima etapa.

Figura 59 Análise LC-MS da reação entre Annexina V-Cis316 com o reagente de Ellman's **187**.

6.18.2 Reação da Annexina V-SS-Ellman's com **179**

A uma alíquota de 26 μ L de Annexina V-CisEllman's 316 (10 μ M, 260 nmol) em TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi transferida para um tubo ependorfe de 0.5 mL. Uma alíquota de 4 μ L do composto **179** (3.72 mM, 50 equiv.) foi adicionada em temperatura ambiente e a mistura resultante agitada em vortex por 30 segundos. Após 1 h de agitação adicional em 37 $^{\circ}$ C, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e não foi possível verificar reação. A amostra de proteína foi armazenada em -20 $^{\circ}$ C.

Figura 60 Análise de LC-MS da reação entre Annexina V-CisEllman's 316 com **179**.

6.18.3 Reação do Conjugado Annexina-**179** com o reagente de Ellman's

Uma alíquota de 13.5 μ L do conjugado de Annexina V-**179** (10 μ M, 135 nmol) em TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi transferido para um tubo ependorfe de 0.5 mL. Uma alíquota de 1.5 μ L do reagente de Ellman's **187** (50.5 mM, 500 equiv.) foi adicionado em temperatura ambiente e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após 1 h de agitação adicional em 37 $^{\circ}$ C, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e nenhuma alteração no espectro foi observada.

Figura 61 Análise LC-MS da reação entre Annexina V-Cis-**179** com o reagente de Ellman's **187**.

6.19 Procedimento para bioconjugação de C2Am-Cis78

Em uma alíquota de 3.24 μ L de uma solução estoque da proteína C₂Am (61.64 μ M, 200 nmol) foi adicionada em um ependorfe contendo 15 μ L de TrisHCl 20 mM em pH 8.0. TCEP (2.0 mmol, 10 equiv., 0.5 μ L de uma solução 40 mM) foi então adicionado e a reação agitada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, 25 equivalentes de uma solução de **179** em DMF (1.34 μ L de uma solução estoque 3.74 mM) foi adicionado e a reação agitada por mais 1 h em temperatura ambiente. Ao final, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão completa ao produto esperado foi observada (massa calculada, 16425; massa observada, 16435).

Figura 62 Análise LC-MS da reação da C2Am-Cis-78 com **179**.

6.20 Análise de MS/MS do conjugado C2Am-179

A solução de proteína foi reduzida, alquilada e digerida com tripsina durante a noite. Após a digestão, a solução foi pipetada em um vial e colocada em um amostrador automático de uma bomba de LC. Todos os experimentos de LC-MS/MS foram realizados em um sistema nanoUPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) e um espectrômetro de massas QExactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). A separação dos peptídeos foi realizada utilizando cromatografia de fase-reversa em um fluxo de 300 nL/min e uma coluna de fase-reversa nano Easy-spray (Thermo Scientific PepMap C18, tamanho de partícula de 2 μm , tamanho de poro de 100Å, 75 μm i.d. x 50 cm de comprimento). Os peptídeos foram injetados em uma pré-coluna (Thermo Scientific PepMap 100 C18, tamanho de partícula de 5 μm , tamanho de poro de 100Å, 300nm i.d. x 5 mm de comprimento) de um amostrador automático Ultimate 3000 contendo 0.1% de ácido fórmico por 3 minutos em um fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após este período, a válvula da coluna foi girada para permitir a eluição dos peptídeos a partir da pré-coluna para a coluna analítica utilizando o solvente A (água + 0.1 % de ácido fórmico) e o solvente B (80% de acetonitrila, 20% de água e 0.1% de ácido fórmico) como fase móvel. O gradiente linear empregado foi de 2-40% de B em 30 minutos. O eluente LC foi desolvatado espectrômetro (Easy-spray, Thermo Fisher Scientific Inc.). Todos os valores de m/z dos íons eluentes foram medidos em um analisador de massas do tipo Orbitrap, em uma resolução de 70000. Os dados adquiridos a partir de varredura (Top 20 íons) foram automaticamente isolados e fragmentados através de dissociação por alta energia de colisão (HCD) no analisador de massas do tipo quadrupolo. Os fragmentos resultantes foram medidos no analisador Orbitrap, com resolução de 17500. Íons peptídicos comestados de carga 2+ e acima foram selecionados para fragmentação. Após a corrida, a data foi processada usando Protein Discoverer (version 1.4., ThermoFisher). Todos os MS/MS foram convertidos para arquivos mgf e os mesmos submetidos para a busca usando algoritmo Mascot (Matrix Science, London UK). Uma database contendo a sequencia da proteína C₂Am foi utilizada. Uma tolerância de 5 ppm (MS) e 0.1 Da (MS/MS) foi utilizada. A identificação dos peptídeos foi realizada com uma probabilidade maior de que 95%.

Figura 63 Análise de MSMS para o conjugado C2Am-179.

6.21 Procedimento para bioconjugação da Albumina-Cis34

Em um ependorfe contendo 13.40 μ L de TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado 26.6 μ L de uma solução de Albumina (15.05 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após, uma solução 3.74 mM de **179** (0.10 μ L, 1 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 2 h em temperatura ambiente. Ao final, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão total ao produto esperado foi observada (massa calculada, 66644; massa observada, 66641).

Figura 64 Análise LC-MS da reação da albumina com **179**.

6.22 Estabilidade do conjugado albimina em plasma

Uma alíquota de 20 μL do conjugado albumina com **179** (10 μM) em TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi tratada com 2 μL de plasma humano reconstituído (Sigma Aldrich) em temperatura ambiente e a mistura resultante agitada em *vortex* por 30 segundos. A mistura resultante foi então agitada em 37 °C durante a noite. Após 1 e 24 h, uma alíquota de 5 μL de cada reação foi analisada por LC-MS (alíquota de 5 μL diluída com 5 μL de uma solução tampão TrisHCl 20 mM em pH 8.0). Não foi detectada degradação do aduto. Um resultado similar foi encontrado quando o conjugado albumina foi incubado na presença de GSH (10 mM).

Figura 65 Estabilidade do conjugado de albumina-**179** em plasma humano.

6.23 Afinidade de ligação da albumina-179 com o receptor FcRn

6.23.1 Resumo de Imobilização

Instrumento:	Biacore 3000
Chip:	CM5
Tampão de corrida:	HBS-EP (GE Healthcare)
Ligante:	shFcRn (BSP biotina) 760 µg/mL diluído para 10 µg/mL
Tampão de diluição:	tampão de Acetato de Sódio em pH 4.5 (GE Healthcare)
Método de acoplamento:	EDC/NHS (acoplamento de amina)
Tampão de lavagem:	1 M Etanolamina (GE Healthcare)
Caminho de fluxo:	FC2
Nível de ligante:	1362RU

6.23.2 Método de Imobilização

A imobilização foi realizada utilizando um kit para acoplamento de aminas utilizando as instruções do fabricante (GE Healthcare). A proteína foi covalentemente ligada a superfície de um chip CM5 ativado com *N*-Hidróxisuccinimida/*N*-etil-*N'*-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (NHS/EDC diluído em 1:1), em uma taxa de fluxo de 5 µL/min. A superfície de célula de referência foi ativada com NHS:EDC e desativada com etanolamina para controle negativo de ligação. A superfície do chip foi estabilizada pela passagem de um fluxo constante de tampão de corrida (5 µL/min) - HBS-EP (0.01 M HEPES, 3 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.005% surfactante P20) em pH 7.4 (GE Healthcare) e temperatura de 25 °C por ~2 horas ou durante a noite.

6.23.3 Método de análise de ligação em pH 5.5

A albumina foi diluída para 10 μM (em tampão de corrida – 67 mM fosfato, 0.15 M NaCl, 0.005% Tween 20 pH 5.5) e passada pelo receptor imobilizado shFcRn, em um fluxo contínuo (30 $\mu\text{L}/\text{min}$) por 1 minuto com intervalos de 2.5 minutos após a lavagem (com a solução de tampão de lavagem). A regeneração utilizando a solução de tampão HBS-EP em pH 7.4 por 12 segundos reestabeleceu a linha de base entre as injeções. Os sensogramas para os dados de ligação foram obtidos utilizando um *software* BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB).

6.23.4 Método para análise de cinética

As albuminas foram diluídas (1:1) e fluídas no receptor shFcRn imobilizado para obter os dados cinéticos e confirmar os valores de K_D . A taxa de fluxo foi de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o tempo de injeção foi de 60 s com um *delay* de 60 s antes da lavagem. Os parâmetros cinéticos foram extrapolados usando BIAevaluation 1:1 Langmuir model (BIAcore AB).

Figura 66 Experimento de SPR mostrando a afinidade de ligação da albumina não modificada e albumina-179 com o receptor FcRn.

6.24 Reação de bioconjugação entre albumina e o composto fluorescente 194

Em um ependorfe contendo 49.43 μ L de tampão TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado uma alíquota de 0.33 μ L de uma solução estoque de albumina (1505 μ M, 500 nmol) e a mistura resultante foi agitada em *vortex* por 30 segundos. Após, uma solução 4.19 mM do composto **194** (0.12 μ L, 1 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 2 h em temperatura ambiente. Ao final, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão completa ao produto esperado foi observado (massa calculada, 66822; massa observada, 66821).

Figura 67 Reação da albumina com o fluorescente 194.

6.25 Reação de bioconjugação entre albumina e o reagente PEG 195

Em um ependorfe contendo 13.18 μ L de tampão TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado 26.57 μ L de uma solução estoque de albumina (15.05 μ L, 400 nmol) e a mistura resultante agitada em vortex por 30 segundos. Após, 2.74 μ L de uma solução estoque em DMF do composto **195** (0.13 μ L, 1 equiv.) foi adicionada e a mistura reacional agitada por 2 h em temperatura ambiente. No final, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão total ao produto esperado foi observada (massa calculada, 66762; massa observada, 66760).

Figura 68 Reação da albumina com o reagente PEG-195.

6.26 Reação de bioconjugação entre C2Am e o reagente fluorescente 194

Uma alíquota de 6.49 μL de uma solução estoque de C₂Am (61.64 μM, 400 nmol) foi adicionada a um ependorfe contendo 26.10 μL de tampão TrisHCl (20 mM, pH 8.0). TCEP (20.0 mmol, 50 equiv., 5 μL de uma solução 40 mM) foi adicionada e a reação agitada em vortex por 1 h em temperatura ambiente. Após, 25 equivalentes de uma solução de **194** em DMF (2.88 μL de uma solução estoque de 4.19 mM) foi adicionada e a reação agitada por 1 h em temperatura ambiente. No final, uma alíquota de 10 μL foi analisada por LC-MS e uma conversão total ao produto esperado foi observada (massa calculada, 16603; massa observada, 16603).

Figura 69 Reação da C2Am com o fluorescente **194**.

6.27 Bioconjugação da Annexina V-Cis316 com o reagente fluorescente 194

Em um ependorfe contendo 29.84 μ L de tampão TrisHCl (20 mM, pH 8.0) foi adicionado 14.40 μ L de uma solução estoque de Annexina V (27.8 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em vortex por 30 segundos. Após, uma solução 4.19 mM de **194** (4.76 μ L, 50 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 1 h em 37 $^{\circ}$ C. No final, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão total ao produto esperado foi observada (massa calculada, 36187; massa observada, 36185).

Figura 70 Reação da Annexina V com o fluorescente **194**.

6.28 Procedimento para bioconjugação do Trastuzumab

6.28.1 Redução de dissulfetos

A redução e oxidação do Trastuzumab foi realizada seguindo um procedimento da literatura.¹⁹³ As pontes dissulfeto do Trastuzumab (15.33 μ L, 1 equiv., 400 nmol) foram reduzidas em condições brandas pela adição do agente redutor TCEP (1 μ L, 4000 μ M) em 23.46 μ L de solução de tampão TrisHCl (20 mM, pH 8.0) em temperatura ambiente por 1.5 h. Os compostos de pesos moleculares menores foram removidos por uma filtração utilizando uma coluna Zeba Spin desalting equilibrada TrisHCl (20 mM, pH 8.0) e eluída via centrifugação (2 min, 1500xg). A amostra foi analisada por LC-MS (massa calculada, 23441; massa observada 23443).

Figura 71 ESI-MS da cadeia pesada do trastuzumab (50594) após redução com 10 equiv. de TCEP.

6.28.2 Re-oxidação dos dissulfetos

Para reformar as pontes de dissulfeto internas, o Trastuzumab reduzido foi incubado com um excesso molar de 10x de dhAA (Sigma-Aldrich) por 4 h em temperatura ambiente. Após, uma alíquota de 5 μ L da mistura reacional foi analisada por LC-MS (alíquota de 5 μ L diluída com 5 μ L de uma solução de tampão de TrisHCl (20 mM, pH 8.0)).

6.28.3 Reação de bioconjugação com **179**

Em um ependorfe contendo 19.51 μL do Trastuzumab reoxidado foi adicionado uma alíquota de 0.48 μL de uma solução estoque em DMF de **179**. A mistura reacional foi agitada em vortex por 1 h em temperatura ambiente. No final, uma alíquota de 10 μL foi analisada por LC-MS e a completa conversão para o produto esperado foi observada (massa calculada, 23646; massa observada, 23646).

Figura 72 ESI-MS da cadeia leve do Trastuzumab após a reação com **179** por 1 h em RT.

Figura 73 ESI-MS da cadeia pesada do Trastuzumab (50595) após a reação com **179** por 1 h em RT.

6.29 Citometria de fluxo

6.29.1 Condições de cultura de célula

As células SKBR3 (ATCC® HTB-30™) e HepG2 (ATCC® HB-8065™) foram crescidas em um incubador umidificado em 37 °C sob 5% de CO₂ e divididas antes de atingir confluência utilizando TrypLE™ Express. Ambas as linhas celulares foram crescidas em DMEM média suplementado com 10% de FBS, 2 mM GlutaMAX™, 10 mM HEPES, 1% NEAA, 1 mM piruvato de sódio, 100 unidades/mL de penicillina e 100 µg/mL streptomina. Todos os reagentes foram comprados de Gibco (Life Technologies, USA)

6.29.2 Determinação da especificidade do Trastuzumab-**194**

As células SKBR3 e HepG2 foram distribuídas em placas de 24 poços a uma concentração de 50000 células/poço e 30000 células/poço, respectivamente, e cultivadas durante 48 h. As células foram separadas das placas e recolhidas em tubos de poliestireno de fundo redondo para citometria de fluxo. O meio de cultura foi removido e as células foram ressuspensas em meio suplementado com Trastuzumab ou Trastuzumab-**194** (a 5, 10, 50, 150, 300 e 500 nM) e incubadas à temperatura ambiente, no escuro. Após 1 h, as suspensões celulares foram centrifugadas a 400 g durante 4 minutos, o meio foi removido e as células foram ressuspensas em 300 µl de uma solução de PBS suplementada com FBS a 10%. As células foram mantidas no escuro até à análise. A aquisição foi realizada em um citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences, EUA) instalado com um laser de 488 nm e uma combinação de um filtro de 505 nm de 530/30 nm (combinação usada para detecção de FITC).

6.30 Experimento de ELISA

A afinidade de ligação do anticorpo com o receptor HER2 foi determinada por ELISA, utilizando um kit de Trastuzumab (Herceptin™) ELISA Kit-96 poços fornecido por Generon. Os anticorpos foram pré-revestidos em micropoços. Diferentes concentrações de Trastuzumab-**179** e Trastuzumab não modificado no tampão de amostra fornecido pelo kit foram pipetadas para dentro dos micropoços (20 nM, 0.06 nM, 0.12 nM, 0.25 nM, 0.50 nM, 1.00 nM e 2.0 nM) e foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram removidas e os poços lavados com a solução de lavagem três vezes. Em seguida, uma HRP (horseradish peroxidase) conjugada com IgG foi pipetada e incubada com as amostras. Depois de remover as soluções e de lavar novamente os micropoços com a solução de lavagem três vezes, adicionou-se a solução de TMB aos micropoços e a cor desenvolveu-se proporcionalmente à quantidade de Trastuzumab na amostra. O desenvolvimento da cor foi parado após 30 min. A absorbância foi medida a 450 nm. A absorbância foi corrigida subtraindo a média dos controles negativos.

Figura 74 Determinação da atividade de ligação do anticorpo com o receptor HER2 por ELISA.

6.31 Experimento de BLI

Biotinilação dos anticorpos. O Trastuzumab modificado e não modificado foi conjugado com biotina (ThermoFisher Scientific) previamente ao experimento de BLI utilizando os biosensores estreptavidina (AS). Uma solução de Biotina-(PEG)₄-NHS (20 µL, 200 µM) em PBS foi adicionada no correspondente anticorpo (20 µL, 20 µM em PBS) e reagido em temperatura ambiente por 30 min. O bruto da reação foi lavado com tampão PBS por 3 vezes para remover o excesso de NHS-(PEG)₄-Biotina.

Bio-layer interferometry (BLI). Os ensaios de BLI foram realizados em um instrumento Octet Red (fortéBIO). A imobilização do ligante, reação de ligação, regeneração e as lavagens foram realizadas em microplacas de polipropileno de 96 poços. O Trastuzumab não modificado e com **179** (20 nM) foram imobilizados com os biosensores estreptavidina em PBS na presença de 0.1% BSA e 0.02% Tween em 30 °C. Os ensaios de ligação foram realizados em 26 °C, 1000 rpm em PBS com 0.1% BSA e 0.02% Tween, com 600 s de associação e 2200 s de dissociação, utilizando diferentes concentrações do receptor HER2 para obter a curva de associação. Glicina em pH 2.0 foi utilizada como tampão de regeneração.

Figura 75 Determinação da constante de ligação (K_D) do anticorpo.

6.32 Gel NuPAGE® Bis-Tris

Uma solução contendo a proteína/anticorpo (5.0 µL em TrisHCl 20 mM, pH 8.0) foi adicionada a um tubo de plástico eppendorf. Tampão NuPAGE® LDS (4X, 2.5 µL), o agente redutor NuPAGE® (10X, 1 µL) e H₂O (1.5 µL) foram então transferidos. A solução foi aquecida em 70 °C por 10 min. A solução aquecida foi adicionada ao mini gel NuPAGE® Bis-Tris (10 cm x 10 cm) com uma concentração de poliacrilamida em um gradiente de 4–12%. O sistema tampão aplicado foi de 1X SDS (tampão de corrida NuPAGE® MES SDS, 20X, pH 7.3, 50 mL para 950 mL de água deionizada). Para as amostras reduzidas, 500 µL do antioxidante NuPAGE® foi adicionado para cada 200 mL de tampão de corrida SDS 1X. Após 35 min, as intensidades de fluorescência foram analisadas. O gel foi revelado com 0.5% de Ruby e agitado durante a noite em temperatura ambiente. Após a lavagem do gel, azul de coomassie (0.5%) foi adicionado e o gel foi lido 2 h após agitar em temperatura ambiente.

Figura 76 Análise SDS-PAGE do trastuzumab 194.

Figura 77 Análise SDS-PAGE do conjugado C2Am-194.

Figura 78 Análise SDS-PAGE do conjugado Annexina V-194.

Fluorescente

Ruby

Coomassie

Figura 79 Análise SDS-PAGE do conjugado albumina-194.

6.33 Estudos de Microscopia

As células HEK293 foram mantidas em 37 °C em uma atmosfera umidificada (5% CO₂) com DMEM alta glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino desativado (HI-FBS, Gibco) e 1X antibiótico-antimicótico (Gibco). Quando as células atingiram a densidade apropriada (70 - 80% confluentes), o meio foi removido e as células colhidas com 0.25% Tripsina-EDTA. Em seguida, aplicou-se 200 µL da suspensão com as células (~50 000 células) em cima de lamelas de vidro de 12 mm pré-revestidas com poli *D*-Lisina (Corning™ BioCoat™) colocadas dentro de uma placa de 24 poços. Após 1 h de incubação para permitir a adesão das células, 200 µL do meio foi adicionado nos poços. As células cresceram por um período adicional de 7 h em 37 °C antes da indução de apoptose pelo tratamento do meio com actinomicina D (2 µM) por 12 h. Células de mesma densidade não tratadas com o agente apoptótico foram incluídas como controle. Após a indução, o meio foi removido e as células foram lavadas com D-PBS (Gibco). Em seguida, foram incubadas na presença de Annexina V-**194** em 37 °C por 20 minutos, em uma concentração de 0.2 µM em 10 mM de HEPES pH 7.4 suplementado com 140 mM de NaCl e 2.5 mM de CaCl₂. Ao mesmo tempo, os estudos de bloqueio prévio dos receptores foram realizados pré-incubando as células apoptóticas com um excesso de 25x da Annexina V não fluorescente (5 µM, 37 °C por 20 min) antes da incubação com o conjugado **194** por um período adicional de 20 min em 37 °C. Para revelar o núcleo fluorescente do DNA, o corante Hoechst 33342 (0.8 µg/mL, Sigma Aldrich, 15 min em 37 °C) foi utilizado. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS 2 vezes. Finalmente, as células foram fixadas com uma solução de PBS contendo 4% (m/v) de formaldeído por um período de 15 min em temperatura ambiente. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando um microscópio (Olympus IX-71) conectado com uma câmera digital F-view (Soft Imaging System). As imagens foram obtidas com os filtros FITC e Hoechst e analisadas utilizando um *software* Cell-F. A aquisição foi realizada e forma idêntica nos experimentos controle e de bloqueio prévio dos receptores.

6.33 Procedimento para o preparo do aduto 196.

Em uma solução de *N*-(tert-Butoxicarbonil)-*L*-cisteína metil éster **173** (4.7 mg, 0.020 mmol, 1 equiv.) em 0.4 mL de tampão de fosfato de sódio NaP_i (pH 8.0, 50 mM) contendo 30% of MeCN foi adicionada uma solução de etil (*E*)-5-diazo-1-phenilpent-2-eno-1,4-diona **53** (4.0 mg, 0.020 mmol, 1 equiv.) em MeCN (0.1 mL) temperatura ambiente. A reação foi monitorada por TLC. Após 10 min, a mistura reacional foi concentrada em vácuo para fornecer **196** em 90% de rendimento.

(196)	
R_f	0.40 (4:6 AcOEt/hexano);
¹H RMN	(400 MHz, CDCl ₃ δ 7.96 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 5.69 (s, 1H), 5.38 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 4.64 – 4.42 (m, 1H), 3.97 – 3.80 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.35 – 3.21 (m, 1H), 3.19 – 2.90 (m, 2H), 1.44 (s, 9H);
¹³C RMN	(100 MHz, CDCl ₃ diastereoisômero majoritário) δ 196.9, 191.1, 171.1, 155.1, 136.1, 133.6, 128.7, 128.2, 80.4, 55.3, 53.5, 52.8, 40.9, 32.9, 29.7, 28.3;
FTIR	(puro, cm ⁻¹): 3368, 2921, 2105, 1710, 1684, 1634, 1597, 1509, 1366, 1347, 1216, 1900, 1065, 985, 759;
HRMS	(ESI) Calculado para C ₂₀ H ₂₅ N ₃ NaO ₆ S ⁺ [M + Na] ⁺ 458.1356, encontrado 458.1368;

6.34 Procedimento para bioconjugação da Annexina V com a diazocetona **53**

Em um ependorfe contendo 18.3 μ L de NaPi (50 mM, pH 8.0) foi adicionado uma alíquota de 11.70 μ L de uma solução estoque da Annexina V (34.30 μ M, 400 nmol) e a mistura resultante foi agitada em *vortex* por 30 segundos. Após, uma solução 3.74 mM de **53** (10.0 μ L, 50 equiv.) em DMF foi adicionada e a reação agitada por 1 h em 37 °C. Após, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e uma conversão completa ao produto esperado foi observada (massa calculada, 36009, massa observada, 36005).

Figura 80 Bioconjugação da Annexina V-Cis316 com a diazocetona **53**.

6.35 Reação do conjugado Ellman's-Annexina V com a diazocetona **53**.

Uma alíquota de 22.5 μ L da Annexina V-Cys316-Ellman's (10 μ M, 260 nmol) foi transferida para um tubo eppendorf de 0.5 mL. Uma alíquota de 7.5 μ L de **53** (2.00 mM, 50 equiv.) foi adicionada em temperatura ambiente e a mistura reacional agitada em vortex por 30 segundos. Após 1 h de agitação adicional em 37 $^{\circ}$ C, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS. Não foi detectada mudança no espectro.

Figura 81 Reação do conjugado de Annexina V-CisEllman's-**187** com a diazocetona **53**.

6.36 Reação da Annexina V-88 com o reagente de Ellman's 187

Uma alíquota de 13.5 μ L do conjugado de Annexina V-Cis316-53 (10 μ M, 135 nmol) foi transferida para um tubo eppendorf de 0.5 mL. Uma alíquota de 1.5 μ L do reagente de Ellman's **187** (50.5 mM, 500 equiv.) foi adicionada em temperatura ambiente e a mistura reacional resultante agitada em vortex por 30 segundos. Após um período adicional de agitação de 1 h em 37 °C, uma alíquota de 10 μ L foi analisada por LC-MS e nenhuma alteração no espectro foi observada.

Figura 82 Reação do conjugado Annexina V-Cis316-53 com o reagente de Ellman's **187**.

6.37 Reações de adição de Michael acompanhadas por RMN ^1H

Uma solução da diazocetona **1** (5.0 mg, 0.029 mmol) em CD_3CN (0.7 mL) foi reagida com 1 equivalente de *N*-Boc-Cis-OMe **173** (6.8 mg, 0.029 mmol) em temperatura ambiente. Um espectro de RMN ^1H foi coletado imediatamente no tempo zero da reação, e posteriormente de hora em hora, por um período de 12 h. Não houve evolução da reação nas condições estudadas.

Figura 83 Espectros de RMN ^1H para a adição de **173** na diazocetona **1** em CDCl_3 .

Uma solução da diazocetona **1** (5.0 mg, 0.029 mmol) em 0.7 mL de uma solução 40% de CD₃CN/NaPi deuterado (o tampão foi preparado com D₂O) foi reagida com 1 equivalente de *N*-Boc-Cis-OMe **173** (6.8 mg, 0.029 mmol) em temperatura ambiente. Um espectro de RMN ¹H foi coletado imediatamente no tempo zero da reação, e posteriormente de hora em hora, por um período de 12 h. O espectro abaixo é apresentado de 4 em 4 h. Uma pequena evolução de aproximadamente 5% foi observada.

Figura 84 Espectros de RMN ¹H para a adição de **173** na diazocetona **1** em CDCl₃/NaPi (pH 8.0, 50 mM) deuterado.

6.38 Cálculos DFT

A otimização de geometria foi realizada com o programa Gaussian 09²³⁹ utilizando um funcional²⁴⁰ de troca e correlação híbrido M06-2X com uma função de base de Pople 6-31+G(d,p). Efeitos de solvatação na água foram considerados implicitamente através do modelo²⁴¹ IEF-PCM (integral equation formalism (IEF) - Polarizable continuum model (PCM)). A possibilidade de diferentes conformações foi levada em consideração em todas as estruturas. Análises de frequências vibracionais foram realizadas no mesmo nível de teoria usado das otimizações de geometria e a natureza dos estados estacionários foram determinadas caso a caso de acordo com um número apropriado de dos autovalores da matriz hessiana. As frequências não foram escalonadas. A aproximação quase harmônica (do inglês quase-harmonic approximation) de Trular et al. foi utilizada em substituição ao modelo do oscilador harmônico para o cálculo da contribuição vibracional na entalpia e entropia.²⁴² Cálculos de coordenadas intrínseca de reação (do inglês intrinsic reaction coordinate (IRC)) foram realizadas usando o modelo de Gonzalez e Schlegel^{243,244} com o intuito de assegurar que os estados de transição conectavam de fato os produtos e reagentes de modo apropriado. Energia livre de Gibbs (ΔG) foi usada para a discussão das estabilidades relativas nas estruturas consideradas. Coordenadas Cartesianas, energias eletrônicas, entropias, entalpias, energia livre de Gibbs e o menores valores calculados de frequências estão disponíveis abaixo.

Figura 85 Estruturas calculadas (menor energia) para os compostos 174, 178-180 e maleimida.

Tabela 10 Energias, entropias e frequências das estruturas calculadas de menor energia.^a

Structure	E _{elec} (Hartree)	E _{elec} + ZPE (Hartree)	H (Hartree)	S (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	G (Hartree)	Lowest freq. (cm ⁻¹)	# of imag freq.
SMe	-438.170102	-438.133138	-438.129146	55.9	-438.155704	715.7	0
174	-689.921193	-689.704406	-689.689190	124.3	-689.744753	18.1	0
174_ts1	-1128.091365	-1127.837276	-1127.818703	140.0	-1127.881430	-198.3	1
174_ts2	-1128.093158	-1127.838752	-1127.820004	142.2	-1127.883221	-145.7	1
174_add1	-1128.099366	-1127.844285	-1127.825531	141.0	-1127.888551	24.1	0
174_add2	-1128.107322	-1127.851674	-1127.832928	142.7	-1127.895792	16.7	0
178	-498.250002	-498.087303	-498.075024	106.8	-498.124167	32.4	0
178_ts1	-936.419358	-936.219327	-936.203575	124.9	-936.260796	-182.5	1
178_ts2	-936.418891	-936.218965	-936.202903	128.9	-936.260603	-153.5	1
178_add1	-936.424737	-936.224261	-936.208139	128.7	-936.265570	20.0	0
178_add2	-936.431932	-936.230198	-936.214487	125.3	-936.271072	20.7	0
179	-670.066070	-669.836809	-669.821279	125.7	-669.877250	20.0	0
179_ts1	-1108.227319	-1107.960783	-1107.941959	140.7	-1108.005321	-240.3	1
179_ts2	-1108.235140	-1107.968112	-1107.949171	142.7	-1108.012519	-167.0	1
179_add1	-1108.233825	-1107.966019	-1107.947134	141.2	-1108.010285	22.9	0
179_add2	-1108.252214	-1107.984125	-1107.965099	143.9	-1108.028293	21.3	0
180	-573.049126	-572.827511	-572.812215	126.1	-572.867153	10.8	0
180_ts1	-1011.205160	-1010.946393	-1010.927636	141.9	-1010.990759	-243.0	1
180_ts2	-1011.205160	-1010.946395	-1010.927636	141.9	-1010.990761	-243.0	1
180_add1	-1011.211783	-1010.951652	-1010.932967	141.1	-1010.995617	25.2	0
180_add2	-1011.211721	-1010.951579	-1010.932929	140.4	-1010.995520	26.1	0

^aValores de energia calculados PCM_{water}/M06-2X/6-31+G(d,p) level. 1 Hartree = 627.51 kcal mol⁻¹. Correções em 298.15 K.

Coordenadas cartesianas**Structure 174**

C	1.079713	0.894107	-0.075052
C	-0.116645	0.011037	-0.251271
H	0.008814	-1.007925	-0.604077
C	-1.340121	0.473302	0.011181
H	-1.501480	1.485914	0.367635
C	-2.532726	-0.397569	-0.178831
O	-3.655758	0.248530	0.133705
C	-4.885546	-0.493230	-0.013120
H	-4.970269	-0.813488	-1.054957
H	-4.826600	-1.383298	0.618845
C	-6.016214	0.422931	0.395651
H	-6.045920	1.309661	-0.241955
H	-6.966452	-0.106976	0.296403
H	-5.902525	0.738314	1.435523
O	-2.497023	-1.546994	-0.568302
C	2.431199	0.266844	-0.004215
C	2.605653	-1.101198	0.238282
C	3.553096	1.091958	-0.161334
C	3.889966	-1.635638	0.324526
H	1.751416	-1.754117	0.382444
C	4.832510	0.554208	-0.088632
H	3.403511	2.150771	-0.345766
C	5.001650	-0.811380	0.155731
H	4.020726	-2.694228	0.522394
H	5.698419	1.194371	-0.221383
H	6.000754	-1.231305	0.214950
O	0.942080	2.105974	-0.001347

Estrutura 174_ts1

C	0.884411	-0.813302	0.741885
C	-0.272241	-0.082960	0.137701
H	-0.118434	0.330923	-0.855902
C	-1.571289	-0.510212	0.439831
H	-1.761723	-1.137484	1.301413
C	-2.662697	-0.023464	-0.326511
O	-3.870369	-0.531460	0.082571
C	-5.019997	-0.107849	-0.651916
H	-5.100169	0.982990	-0.605097
H	-4.903848	-0.388976	-1.703801
C	-6.228774	-0.777642	-0.031607
H	-6.336032	-0.487427	1.016974
H	-7.134386	-0.480175	-0.566687
H	-6.137891	-1.865863	-0.084364
O	-2.614408	0.767763	-1.279282
O	0.756524	-1.497703	1.750875
S	0.390582	1.814202	1.128984
C	1.512462	2.528032	-0.117533
H	1.550643	3.611758	0.016393
H	2.523065	2.121252	-0.028216
H	1.139472	2.321466	-1.126211
C	2.229609	-0.699275	0.083620
C	2.373252	-0.536486	-1.297657
C	3.371223	-0.787898	0.888378
C	3.645223	-0.463869	-1.866335
H	1.500434	-0.482698	-1.940656
C	4.639435	-0.691945	0.324231
H	3.247620	-0.917834	1.959245
C	4.778111	-0.531478	-1.056955
H	3.748892	-0.350050	-2.940655
H	5.519817	-0.742090	0.957093
H	5.766891	-0.461743	-1.499369

Estrutura 174_ts2

C	-1.521881	0.448869	-0.534581
C	-0.444623	-0.313734	0.054246
H	-0.654269	-1.076498	0.794826
C	0.855908	-0.007664	-0.244848
C	1.949867	-0.895367	0.226656
O	3.054493	-0.752408	-0.519450
C	4.216591	-1.475482	-0.081893
H	4.469294	-1.137521	0.928999
H	3.976751	-2.541289	-0.037296

C	5.326230	-1.186076	-1.068456
H	5.540263	-0.114868	-1.106801
H	6.235114	-1.710633	-0.763919
H	5.049984	-1.524872	-2.070122
O	1.859536	-1.702175	1.134356
O	-1.325270	1.441773	-1.253037
H	1.081545	0.638079	-1.086548
S	1.931460	1.808081	1.182106
C	3.271227	2.266915	0.027718
H	4.176968	1.685405	0.217575
H	2.963178	2.077312	-1.006427
H	3.511409	3.329372	0.120391
C	-2.940170	0.031566	-0.249913
C	-3.959816	0.973717	-0.432390
C	-3.275567	-1.261915	0.168921
C	-5.288137	0.636644	-0.187430
H	-3.691525	1.971550	-0.764409
C	-4.606849	-1.604271	0.401957
H	-2.504135	-2.014933	0.293437
C	-5.614741	-0.655202	0.230059
H	-6.069222	1.378456	-0.321826
H	-4.856731	-2.612915	0.715543
H	-6.650293	-0.921470	0.417656

Estrutura 174_add1

C	1.380760	0.648206	0.626944
C	0.220194	1.285009	-0.120369
H	0.228686	0.953551	-1.162180
C	-1.035106	0.806696	0.521736
H	-1.176507	0.954270	1.586505
C	-1.988028	0.128025	-0.225749
O	-3.093651	-0.271396	0.520838
C	-4.118056	-0.961737	-0.185434
H	-4.496693	-0.334596	-1.000177
H	-3.712240	-1.875308	-0.634051
C	-5.217516	-1.285332	0.807101
H	-5.625642	-0.369935	1.244537
H	-6.029163	-1.820288	0.306424
H	-4.835944	-1.915346	1.615413
O	-1.951915	-0.161933	-1.448558
O	1.956770	1.210247	1.547243
S	0.315065	3.121656	-0.142326
C	1.952604	3.372680	-0.891265
H	2.073517	4.441383	-1.076226
H	2.740625	3.032564	-0.216787
H	2.022739	2.839953	-1.842964
C	1.776374	-0.752510	0.239218
C	1.054588	-1.516044	-0.689507
C	2.929779	-1.290104	0.823047
C	1.488410	-2.798718	-1.020328
H	0.142105	-1.128274	-1.136847
C	3.363642	-2.569407	0.485266
H	3.479863	-0.689665	1.540439
C	2.641962	-3.326902	-0.438344
H	0.921908	-3.389080	-1.733792
H	4.261980	-2.974996	0.939965
H	2.976472	-4.325251	-0.703124

Estrutura 174_add2			
C	-1.192729	-0.324172	0.664679
C	-0.186168	-0.344336	-0.283906
H	-0.386262	-0.161203	-1.333598
C	1.205124	-0.719061	0.103878
C	2.178490	0.262996	-0.515953
O	2.558336	1.193922	0.369533
C	3.398403	2.251938	-0.131774
H	4.306533	1.807563	-0.548213
H	2.866134	2.765348	-0.937560
C	3.700044	3.176188	1.026653
H	4.222567	2.640446	1.822992
H	4.337382	3.995266	0.684704
H	2.778922	3.600752	1.433302
O	2.549903	0.264807	-1.672438
O	-1.050459	-0.617417	1.902987
H	1.292404	-0.667974	1.191949
S	1.591661	-2.444216	-0.410353
C	3.318965	-2.572750	0.142128
H	3.957597	-1.888371	-0.421645
H	3.397034	-2.359325	1.210663
H	3.650610	-3.596182	-0.040128
C	-2.590336	0.050728	0.210094
C	-3.678845	-0.383345	0.976480
C	-2.849420	0.823802	-0.930699
C	-4.988325	-0.079025	0.605284
H	-3.475670	-0.964635	1.870224
C	-4.156504	1.136157	-1.302008
H	-2.023931	1.203451	-1.525127
C	-5.233414	0.681950	-0.538194
H	-5.818222	-0.433826	1.209779
H	-4.334521	1.743163	-2.184935
H	-6.251104	0.926056	-0.827388

Estrutura 178			
C	2.964902	0.056396	-0.000075
C	1.599268	-0.544088	-0.000051
H	1.562600	-1.631046	-0.000054
C	0.470007	0.167817	-0.000054
H	0.453266	1.253277	-0.000051
C	-0.850753	-0.522852	0.000011
O	-1.852513	0.355994	0.000447
C	-3.188234	-0.192305	0.000727
H	-3.300176	-0.822324	-0.885602
H	-3.300673	-0.820422	0.888367
C	-4.152929	0.971259	-0.000784
H	-4.012419	1.589775	-0.890393
H	-5.177690	0.592536	-0.000649
H	-4.012892	1.591669	0.887576
O	-1.003408	-1.726902	-0.000154
O	3.930976	-0.688969	-0.000335
C	3.115208	1.554904	0.000245
H	2.634181	1.985243	-0.882917
H	2.634092	1.984780	0.883588
H	4.174455	1.808735	0.000355

Estrutura 178_ts1			
C	2.032456	1.193717	-0.385746
C	0.887252	0.242802	-0.418171
C	-0.386700	0.633068	-0.006403
H	-0.543857	1.489458	0.638511
C	-1.512798	-0.179206	-0.334587
O	-2.688900	0.334559	0.140469
C	-3.873176	-0.410958	-0.152659
H	-3.985904	-0.499709	-1.237935
H	-3.775713	-1.421165	0.257517
C	-5.040746	0.328392	0.466759
H	-5.126994	1.334918	0.048979
H	-5.970208	-0.210326	0.265147
H	-4.916295	0.409569	1.549806
O	-1.507387	-1.236763	-0.974247
O	2.901216	1.152287	-1.252680
C	2.052649	2.263597	0.680887
H	1.463571	3.116124	0.323417
H	1.617206	1.914672	1.618136
H	3.078930	2.595734	0.842696
H	0.950244	-0.485389	-1.224466
S	2.056808	-1.106070	1.040449
C	3.218588	-1.836484	-0.155648
H	3.749250	-1.041554	-0.689831
H	3.951749	-2.453428	0.369130
H	2.694515	-2.462000	-0.883227

Estrutura 178_ts2			
C	3.020778	-0.303935	0.437303
C	1.813540	-0.745298	-0.216760
H	1.885772	-1.424272	-1.060117
C	0.588046	-0.258001	0.167878
C	-0.652056	-0.877541	-0.367638
O	-1.702028	-0.652778	0.436105
C	-2.979595	-1.101864	-0.044203
H	-3.184029	-0.599509	-0.995790
H	-2.932264	-2.178590	-0.228297
C	-4.006337	-0.752970	1.010577
H	-4.027829	0.325482	1.187543
H	-4.997737	-1.069766	0.677807
H	-3.779178	-1.258653	1.952449
O	-0.722909	-1.553338	-1.378186
O	3.031906	0.541845	1.347200
C	4.335736	-0.890484	-0.039360
H	5.004126	-1.035905	0.812052
H	4.201553	-1.833672	-0.572546
H	4.811911	-0.176594	-0.720701
H	0.492926	0.267388	1.112534
S	-0.125446	1.868637	-0.918827
C	-1.363709	2.404789	0.312284
H	-2.356584	2.015027	0.074400
H	-1.090303	2.040878	1.308720
H	-1.415401	3.495991	0.351738

Estrutura 178_add1			
C	1.796938	1.265556	-0.233621
C	1.099096	-0.030394	0.140007
H	0.977496	-0.061286	1.228428
C	-0.254245	0.014525	-0.478299
H	-0.344730	0.170362	-1.547495
C	-1.390858	-0.132495	0.306189
O	-2.574255	-0.064948	-0.429420
C	-3.785337	-0.188079	0.306013
H	-3.810534	-1.151372	0.827650
H	-3.842957	0.599385	1.065856
C	-4.931404	-0.075138	-0.680272
H	-4.874723	-0.867503	-1.431860
H	-5.887318	-0.163856	-0.156757
H	-4.906950	0.890621	-1.192764
O	-1.467611	-0.308763	1.547677
O	2.517974	1.384897	-1.211373
C	1.509655	2.436954	0.677653
H	0.515123	2.362099	1.121720
H	2.247019	2.415468	1.489075
H	1.617444	3.376959	0.134420
S	2.038925	-1.530977	-0.360567
C	3.627017	-1.227881	0.472292
H	4.245123	-2.118734	0.349001
H	4.137849	-0.371787	0.027295
H	3.470306	-1.052513	1.539648

Estrutura 178_add2			
C	-2.313140	-1.208738	-0.157813
C	-1.417053	-0.456316	0.580326
H	-1.432818	-0.478859	1.665723
C	-0.429190	0.438734	-0.092839
C	0.943685	0.199690	0.500125
O	1.650109	-0.662494	-0.244617
C	2.927889	-1.067907	0.282368
H	3.548019	-0.177426	0.417041
H	2.769423	-1.527300	1.262257
C	3.537079	-2.037813	-0.705363
H	3.677871	-1.561467	-1.678738
H	4.511331	-2.370182	-0.338701
H	2.897237	-2.914600	-0.831740
O	1.365801	0.668661	1.538427
O	-2.394432	-1.233142	-1.436949
C	-3.296004	-2.091504	0.602223
H	-3.169183	-3.132905	0.287025
H	-3.170393	-2.031977	1.686675
H	-4.320570	-1.799160	0.347768
H	-0.402720	0.189245	-1.156831
S	-0.918838	2.205979	0.060337
C	0.475398	3.014901	-0.780882
H	1.402950	2.865743	-0.223063
H	0.586682	2.629266	-1.796996
H	0.259773	4.083483	-0.829569

Estrutura 179			
C	1.099401	0.895235	-0.050887
C	-0.096578	0.015216	-0.218416
H	0.025206	-1.013130	-0.543495
C	-1.322935	0.485358	0.015993
H	-1.462504	1.513015	0.344230
C	-2.522577	-0.390100	-0.167600
C	-4.964992	-0.519128	-0.026896
H	-5.059219	-0.877153	-1.057553
H	-4.938236	-1.401582	0.621130
C	-6.127474	0.388927	0.340727
H	-6.164732	1.262407	-0.316553
H	-7.069129	-0.153904	0.238885
H	-6.042974	0.733376	1.375457
O	-2.433602	-1.561621	-0.542968
C	2.452414	0.266052	0.003492
C	2.629687	-1.099728	0.256050
C	3.572870	1.087430	-0.180471
C	3.914670	-1.635307	0.325933
H	1.776834	-1.749488	0.420940
C	4.852884	0.548608	-0.124593
H	3.421603	2.144683	-0.372438
C	5.024646	-0.814674	0.130206
H	4.047246	-2.692129	0.532149
H	5.717167	1.186299	-0.278574
H	6.024078	-1.235498	0.176529
O	0.969718	2.108659	0.029060
N	-3.702486	0.197005	0.105305
H	-3.718948	1.160440	0.412193

Estrutura 179_ts1			
C	-1.069484	0.717264	-0.935574
C	0.316289	0.312193	-0.532842
C	0.615204	-1.074551	-0.413799
H	-0.173586	-1.807088	-0.296212
C	1.955102	-1.552485	-0.337138
C	4.319105	-0.990861	0.073163
H	4.373870	-1.526701	1.032269
H	4.644882	-1.693653	-0.697845
C	5.231725	0.227373	0.101983
H	4.908975	0.939888	0.868778
H	6.258790	-0.068397	0.330185
H	5.225065	0.739869	-0.864426
O	2.283922	-2.766990	-0.378435
O	-1.227634	1.584675	-1.787735
H	1.035608	0.902989	-1.104300
S	0.487109	1.533676	1.214107
C	0.885946	3.088467	0.357617
H	0.064970	3.380206	-0.303201
H	1.039463	3.875728	1.098137
H	1.800341	2.983358	-0.234170
C	-2.267174	0.051159	-0.320553
C	-2.219707	-0.600988	0.917880
C	-3.476864	0.104301	-1.022180
C	-3.368469	-1.187443	1.444242
H	-1.289852	-0.636132	1.475746
C	-4.622413	-0.492196	-0.501169
H	-3.504258	0.613664	-1.980218
C	-4.569506	-1.137971	0.734808
H	-3.326606	-1.682280	2.409244
H	-5.553970	-0.453584	-1.056724
H	-5.461929	-1.600002	1.145505
N	2.954193	-0.585268	-0.223951
H	2.656315	0.263138	0.249909

Estrutura 179_ts2			
C	-1.513839	0.445222	-0.522101
C	-0.432474	-0.283436	0.092374
H	-0.635063	-1.038609	0.842372
C	0.870825	0.034419	-0.196650
C	1.966742	-0.868591	0.275418
C	4.306775	-1.528495	-0.041071
H	4.648967	-1.116886	0.917830
H	4.056825	-2.579307	0.129883
C	5.391132	-1.396788	-1.099075
H	5.651767	-0.346899	-1.266298
H	6.293816	-1.920299	-0.777351
H	5.062601	-1.828256	-2.048747
O	1.834882	-1.637322	1.232643
O	-1.331717	1.429734	-1.259149
H	1.071901	0.661779	-1.061388
S	1.844213	1.930688	1.156200
C	3.149278	2.421306	-0.023784
H	4.063784	1.838552	0.121548
H	2.809704	2.280316	-1.057853
H	3.397587	3.479303	0.093817
C	-2.928437	0.003414	-0.249232
C	-3.965501	0.917371	-0.472243
C	-3.244032	-1.286576	0.195379
C	-5.290609	0.557070	-0.242484
H	-3.713134	1.912224	-0.825035
C	-4.571459	-1.652444	0.414509
H	-2.458917	-2.019250	0.351329
C	-5.596854	-0.730851	0.201436
H	-6.085072	1.277722	-0.409863
H	-4.804657	-2.658466	0.748866
H	-6.629609	-1.015551	0.377091
N	3.099801	-0.833174	-0.464067
H	3.188893	-0.114166	-1.169744

Estrutura 179_add1			
C	1.390421	0.654868	0.628154
C	0.224253	1.275418	-0.120211
H	0.228058	0.939868	-1.160704
C	-1.020683	0.777141	0.527252
H	-1.133823	0.909676	1.599713
C	-1.957939	0.045512	-0.204530
C	-4.315113	-0.670866	-0.174286
H	-4.730256	0.305855	-0.473953
H	-4.131487	-1.232079	-1.092260
C	-5.315775	-1.405563	0.707151
H	-5.499458	-0.856373	1.636854
H	-6.272953	-1.518549	0.190901
H	-4.941828	-2.400079	0.967794
O	-1.897441	-0.197142	-1.450371
O	1.956830	1.222177	1.552551
S	0.292855	3.112899	-0.145848
C	1.928321	3.386646	-0.891728
H	2.036414	4.457171	-1.074274
H	2.719217	3.054880	-0.216374
H	2.007093	2.856649	-1.844280
C	1.805650	-0.740069	0.239437
C	1.087051	-1.517787	-0.680233
C	2.976264	-1.255224	0.809178
C	1.541579	-2.792171	-1.015614
H	0.162289	-1.145954	-1.117148
C	3.430494	-2.526263	0.466417
H	3.523795	-0.643886	1.519335
C	2.712295	-3.298030	-0.447992
H	0.977710	-3.393788	-1.721832
H	4.342282	-2.914069	0.909805
H	3.062823	-4.289803	-0.716834
N	-3.040320	-0.520024	0.516874
H	-3.149334	-0.097677	1.433297

Estrutura 179_add2			
C	-1.411328	-0.758335	0.451206
C	-0.226091	-0.149340	0.083022
H	-0.217361	0.779557	-0.477063
C	1.081246	-0.805931	0.370782
C	2.095318	0.215872	0.876639
C	3.699247	1.983070	0.310913
H	3.178271	2.759825	0.881390
H	4.463105	1.556722	0.970574
C	4.334978	2.570295	-0.939387
H	3.576725	3.010923	-1.593329
H	5.045420	3.353244	-0.666281
H	4.873997	1.801474	-1.501060
O	2.254808	0.400467	2.088701
O	-1.510698	-1.896891	1.031026
H	0.945295	-1.544546	1.165310
S	1.680360	-1.724619	-1.121083
C	3.228417	-2.432043	-0.479941
H	3.028494	-3.050050	0.398246
H	3.659428	-3.056441	-1.264125
H	3.939137	-1.642330	-0.222753
C	-2.708473	-0.042208	0.128088
C	-3.877420	-0.802430	0.000512
C	-2.801593	1.347608	-0.033575
C	-5.098655	-0.201434	-0.303570
H	-3.807728	-1.875782	0.145336
C	-4.021461	1.953845	-0.330989
H	-1.918069	1.965769	0.094135
C	-5.175970	1.181472	-0.472261
H	-5.991291	-0.811859	-0.406662
H	-4.072774	3.032930	-0.443611
H	-6.125955	1.653983	-0.702826
N	2.750210	0.939723	-0.049007
H	2.623909	0.691167	-1.023346

Estrutura 180			
C	-1.860855	-0.480712	-0.001292
C	-0.590764	0.307304	-0.000943
H	-0.636935	1.393823	0.000610
C	0.590759	-0.307270	-0.002505
H	0.636910	-1.393794	-0.003997
C	1.860849	0.480732	-0.002157
C	4.307986	0.364446	-0.003629
H	4.397556	1.001552	-0.889951
H	4.390850	1.016076	0.872571
C	5.391517	-0.701806	0.009042
H	5.320189	-1.342776	-0.874416
H	6.376341	-0.230733	0.008684
H	5.313474	-1.328166	0.902312
O	1.875148	1.714716	-0.001221
O	-1.875155	-1.714660	-0.003279
N	2.988847	-0.254726	-0.002453
H	2.924191	-1.263962	-0.005859
H	-2.924203	1.263951	0.002480
N	-2.988838	0.254705	0.000702
C	-4.307966	-0.364505	0.000833
H	-4.395140	-1.007069	-0.881699
H	-4.393204	-1.010711	0.880892
C	-5.391524	0.701788	0.004218
H	-5.317833	1.337311	-0.882951
H	-6.376342	0.230705	0.004327
H	-5.315868	1.333626	0.893848

Estrutura 180_ts1			
C	1.579449	-0.196323	0.915134
C	0.305914	0.513514	0.542114
C	-0.788249	-0.276245	0.165928
H	-0.632130	-1.239445	-0.311467
C	-2.121546	0.247322	0.263430
C	-4.530104	-0.274100	0.112959
H	-4.709597	-0.313622	1.197371
H	-4.739782	0.750269	-0.205525
C	-5.448766	-1.252569	-0.604815
H	-5.249074	-2.282276	-0.290546
H	-6.493757	-1.029279	-0.376939
H	-5.310026	-1.191271	-1.688066
O	-2.406993	1.381853	0.713387
O	2.052010	-0.098776	2.053585
H	0.091062	1.336907	1.217142
S	1.100059	1.853383	-1.101752
C	2.658261	2.398791	-0.321885
H	3.363470	1.565957	-0.232692
H	3.124612	3.182452	-0.923319
H	2.467221	2.801354	0.677505
C	3.389327	-1.683786	0.197026
C	3.714207	-2.580379	-0.987745
H	4.197161	-0.959321	0.365071
H	2.925733	-3.322534	-1.140928
N	-3.140429	-0.569198	-0.193235
H	-2.907974	-1.544016	-0.332080
N	2.134414	-0.982806	-0.030453
H	1.837026	-0.813442	-0.984712
H	3.290828	-2.272746	1.113314
H	3.820577	-1.993614	-1.905403
H	4.654704	-3.107437	-0.813532

Estrutura 180_ts2			
C	2.121496	0.247281	0.263537
C	0.788195	-0.276294	0.166164
H	0.632043	-1.239547	-0.311116
C	-0.305965	0.513560	0.542155
C	-1.579540	-0.196190	0.915186
C	-3.389392	-1.683741	0.197045
H	-3.290811	-2.272766	1.113283
H	-4.197285	-0.959361	0.365161
C	-3.714225	-2.580267	-0.987792
H	-2.925709	-3.322367	-1.141033
H	-4.654693	-3.107391	-0.813620
H	-3.820626	-1.993439	-1.905406
O	-2.052057	-0.098671	2.053665
O	2.406960	1.381892	0.713273
H	-0.091193	1.337093	1.217052
S	-1.099989	1.852975	-1.101988
C	-2.657797	2.399111	-0.321894
H	-2.466361	2.801895	0.677333
H	-3.124064	3.182750	-0.923419
H	-3.363216	1.566513	-0.232273
C	4.530060	-0.274235	0.113096
C	5.448702	-1.252458	-0.605039
H	4.739592	0.750225	-0.205179
H	6.493699	-1.029268	-0.377092
N	-2.134558	-0.982618	-0.030428
H	-1.837162	-0.813270	-0.984684
N	3.140364	-0.569352	-0.192981
H	2.907876	-1.544187	-0.331663
H	4.709716	-0.313998	1.197475
H	5.249001	-2.282276	-0.291137
H	5.309947	-1.190774	-1.688265

Estrutura 180_add1			
C	1.491360	-0.309105	0.842074
C	0.397112	0.630928	0.347774
C	-0.771831	-0.130340	-0.153907
H	-0.603640	-0.950458	-0.846902
C	-2.068265	0.292937	0.140338
C	-4.384956	-0.538882	0.237391
H	-4.241351	-1.087571	1.183443
H	-4.729114	0.462681	0.502165
C	-5.427671	-1.249582	-0.614480
H	-5.091337	-2.254540	-0.891584
H	-6.368570	-1.351155	-0.066831
H	-5.620104	-0.689854	-1.534583
O	-2.383691	1.258320	0.903809
O	1.588275	-0.600700	2.040299
H	0.093863	1.242558	1.201371
S	1.040878	1.820339	-0.942050
C	2.436355	2.577812	-0.052432
H	3.207960	1.834199	0.164561
H	2.861876	3.354620	-0.689846
H	2.091387	3.032380	0.879228
N	-3.132835	-0.402537	-0.497311
C	-2.824129	-1.288896	-0.884006
H	3.348965	-1.797957	0.246225
H	2.899133	-2.668322	0.735990
H	4.030782	-1.337749	0.970721
C	4.101722	-2.216531	-1.007094
H	4.569875	-1.352645	-1.488543
H	4.887736	-2.930221	-0.751741
H	3.428547	-2.692275	-1.726253
N	2.298175	-0.849284	-0.090305
H	2.222251	-0.502060	-1.039280

Estrutura 180_add2			
C	2.055596	0.129108	0.360794
C	0.763736	-0.214175	-0.035451
C	0.589512	-1.080368	-0.667752
H	-0.395769	0.609194	0.385709
C	-1.550915	-0.271031	0.850075
C	-3.432968	-1.707464	0.205542
H	-3.038339	-2.577744	0.740958
H	-4.131900	-1.203156	0.882793
C	-4.138900	-2.136902	-1.071051
H	-3.449570	-2.657486	-1.742235
H	-4.962074	-2.814375	-0.834861
H	-4.550902	-1.271860	-1.599388
O	-1.715932	-0.525064	2.049535
O	2.380587	1.149697	1.044995
H	-0.110194	1.234042	1.236106
C	-0.920322	1.781144	-0.968979
S	-2.325812	2.623121	-0.176529
H	-2.009944	3.092005	0.758379
H	-2.683586	3.396670	-0.857993
H	-3.139274	1.919832	0.021009
N	-2.334142	-0.805626	-0.105424
H	-2.198750	-0.491287	-1.059195
H	2.806042	-1.415986	-0.721477
C	4.410054	-0.196128	-0.283654
H	4.364465	0.513812	-1.126728
H	4.726722	0.372885	0.592456
C	5.416931	-1.295406	-0.593106
H	5.106071	-1.879569	-1.466021
H	6.399694	-0.867844	-0.809621
H	5.514957	-1.978580	0.255745
N	3.100324	-0.769839	0.004178

Estrutura maleimida

C	-0.666400	1.268488	-0.000161
C	0.666336	1.268481	0.000155
C	1.144111	-0.157311	0.000023
C	-1.144125	-0.157279	-0.000081
H	-0.000153	-1.954748	-0.000190
H	1.353107	2.103957	0.000218
N	-0.000016	-0.942973	-0.000095
O	-2.284949	-0.561691	0.000159
O	2.285048	-0.561640	0.000010
H	-1.353172	2.103976	-0.000335

Estrutura maleimida_ts

C	-0.149348	-0.179377	1.149359
C	-1.332339	-0.856683	0.937447
C	-2.015889	-0.244899	-0.178317
C	-0.162914	1.041975	0.275370
H	-1.550360	1.559457	-1.239208
H	-1.684478	-1.753504	1.425263
N	-1.242833	0.872881	-0.564489
O	0.566752	2.021903	0.319685
O	-3.069578	-0.542820	-0.742031
H	0.473578	-0.207335	2.031604
S	1.608118	-1.102023	-0.258390
C	2.986082	0.084468	-0.415220
H	3.747236	-0.076055	0.351958
H	3.455813	-0.010237	-1.397900
H	2.597218	1.104308	-0.319115

Estrutura maleimida_add

C	0.346249	0.087045	0.974072
C	-0.766590	-0.899055	0.937692
C	-1.754526	-0.472559	0.075196
C	-0.156330	1.237814	0.085026
H	-1.895200	1.383194	-1.063647
H	-0.779361	-1.837368	1.473618
N	-1.326793	0.823522	-0.441905
O	0.406825	2.310883	-0.120487
O	-2.861750	-0.933000	-0.310136
H	0.615768	0.485695	1.958527
S	1.987994	-0.499611	0.319520
C	1.493700	-0.917727	-1.373862
H	0.557994	-1.482951	-1.342806
H	1.366659	-0.017467	-1.979715
H	2.278171	-1.538159	-1.808719

7 Referências

- 1 CURTIUS, T. Ueber die einwirkung von salpetriger säure auf salzsauren glycocolläther. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 16, n. 2, p. 2230–2231, 1883.
- 2 WOLFF, L.; KRÜCHE, R. Über diazoanhydride (1,2,3-oxydiazole oder diazoxyde) und diazoketone. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 394, n. 1, p. 23–59, 1912.
- 3 WOLFF, L. Ueber diazoanhydride. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 325, n. 2, p. 129–195, 1902.
- 4 ARNDT, F.; EISTERT, B.; PARTALE, W. Diazo-methan und o-nitroverbindungen, II.: N-oxy-isatin aus o-nitro-benzoylchlorid. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 60, n. 6, p. 1364–1370, 1927.
- 5 REGITZ, M. New methods of preparative organic chemistry. Transfer of diazo groups. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 6, n. 9, p. 733–749, 1967.
- 6 YE, T.; MCKERVEY, M.A. Organic synthesis with α -diazo carbonyl compounds. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1091–1160, 1994.
- 7 REGITZ, M.; MAAS, G. **Diazo compounds: properties and synthesis**. Orlando, Florida: Academic Press, 1987. 608 p.
- 8 DOYLE, M.P.; MCKERVEY, M.A.; YE, T. **Modern catalytic methods for organic synthesis with diazo compounds: from cyclopropanes to ylides**. New York: Wiley-Interscience, 1998. 652 p.
- 9 SINGH, G.S. Reactions of organic nitrogen compounds with carbenoids and diarylketenes from diazoalkanes and diazocarbonyls. **Current Organic Synthesis**, v. 2, n. 3, p. 377–391, 2005.
- 10 FERREIRA, V.F. Synthesis of heterocyclic compounds by carbenoid transfer reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 177–193, 2007.
- 11 ZHANG, Z.; WANG, J. Recent studies on the reactions of α -diazocarbonyl compounds. **Tetrahedron**, v. 64, n. 28, p. 6577–6605, 2008.
- 12 GILLINGHAM, D.; FEI, N. Catalytic X–H insertion reactions based on carbenoids. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 4918–4931, 2013.
- 13 MAAS, G. New syntheses of diazo compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 44, p. 8186–8195, 2009.
- 14 GRUNDMANN, C. Ein neues verfahren zur überführung von carbonsäuren in aldehyde. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 524, n. 1, p. 31–48, 1936.
- 15 WOTIZ, J.H.; BUCO, S.N. The arnt-eistert synthesis of unsaturated acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 210–214, 1955.
- 16 MOORE, J.A. The reactions of alpha,beta-unsaturated acid chlorides with diazomethane. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 1607–1612, 1955.

- 17 ROSENQUIST, N.R.; CHAPMAN, O.L. A general method for the synthesis of reactive α,β -unsaturated diazomethyl ketones: allenyl diazomethyl ketone and vinyl diazomethyl ketone. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 41, n. 20, p. 3326–3327, 1976.
- 18 REGITZ, M.; MENZ, F.; LIEDHEGENER, A. Reaktionen CH-aktiver verbindungen mit aziden, XXVIII 1) synthese α,β -ungesättigter diazoketone durch entformylierende diazogruppen-übertragung. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 739, n. 1, p. 174–184, 1970.
- 19 REGITZ, M.; HECK, G. Synthesen und einige Umsetzungen des 2-Diazo- und des 2-Hydroxy-indandions-(1.3). **Chemische Berichte**, v. 97, n. 5, p. 1482–1501, 1964.
- 20 REGITZ, M. Reaktionen aktiver methylenverbindungen mit aziden, i. eine neue synthese für α -diazo- β -dicarbonylverbindungen aus benzolsulfonylaziden und β -diketonen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 676, n. 1, p. 101–109, 1964.
- 21 HARMON, R.E.; SOOD, V.K.; GUPTA, S.K. A new synthesis of α,β -unsaturated diazo-ketones: an improved synthesis of 4-diazo-3-oxo-1-phenyl-1-butene (diazomethyl styryl ketone). **Synthesis**, v. 1974, n. 08, p. 577–578, 1974.
- 22 DANHEISER, R.L.; MILLER, R.F.; BRISBOIS, R.G.; PARK, S.Z. An improved method for the synthesis of α -diazo ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 1959–1964, 1990.
- 23 DANHEISER, R.L.; MILLER, R.F.; BRISBOIS, R.G. Detrifluoroacetylativ diazo group transfer: (e)-1-diazo-4-phenyl-3-buten-2-one. **Organic Syntheses**, v. 73, p. 134, 1996.
- 24 DOYLE, M.P.; DOROW, R.L.; TERPSTRA, J.W.; RODENHOUSE, R.A. Synthesis and catalytic reactions of chiral N-(diazooacetyl)oxazolidones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 1663–1666, 1985.
- 25 ALLER, E.; MOLINA, P.; LORENZO, Á. N-Isocyanotriphenyliminophosphorane; a convenient reagent for the conversion of acyl chlorides into α -diazoketones. **Synlett**, v. 4, p. 526–528, 2000.
- 26 BETHÄUSER, W.; REGITZ, M.; THEIS, W. Über die reaktivität von 4-phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion mit diazoverbindungen. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 27, p. 2535–2538, 1981.
- 27 FANG, F.G.; PRATO, M.; KIM, G.; DANISHEFSKY, S.J. The aza-robinson annulation: An application to the synthesis of iso-A58365A. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 28, p. 3625–3628, 1989.
- 28 CLARK, J.S.; HODGSON, P.B.; GOLDSMITH, M.D.; STREET, L.J. Rearrangement of ammonium ylides produced by intramolecular reaction of catalytically generated metal carbenoids. Part 1. Synthesis of cyclic amines. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 24, p. 3312–3324, 2001.
- 29 CECCHERELLI, P.; CURINI, M.; MARCOTULLIO, M.C.; ROSATI, O.; WENKERT, E. A new, general cyclopentenone synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 311–315, 1990.

- 30 FRANCK-NEUMANN, M.; GEOFFROY, P.; WINLING, A. Tricarbonyl iron complexes bearing a free diazo group. II diene and trimethylenemethane diazoketone complexes as precursors of highly reactive ketocarbenes and diazonium cations. **Tetrahedron letters**, v. 36, n. 45, p. 8213–8216, 1995.
- 31 DANHEISER, R.L.; BRISBOIS, R.G.; KOWALCZYK, J.J.; MILLER, R.F. An annulation method for the synthesis of highly substituted polycyclic aromatic and heteroaromatic compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 8, p. 3093–3100, 1990.
- 32 LOEBACH, J.L.; BENNETT, D.M.; DANHEISER, R.L. (Trialkylsilyl)vinylketenes: synthesis and application as diene components in Diels–Alder cycloadditions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 8380–8389, 1998.
- 33 CAINELLI, G.; GIACOMINI, D.; GALLETTI, P.; QUINTAVALLA, A. Synthesis of novel 4-(2-oxoethylidene)azetidin-2-ones by a Lewis acid mediated reaction of acyldiazo compounds. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2003, n. 9, p. 1765–1774, 2003.
- 34 IHARA, E.; FUJIOKA, M.; HAIDA, N.; ITOH, T.; INOUE, K. First synthesis of poly(acylmethylene)s via palladium-mediated polymerization of diazoketones. **Macromolecules**, v. 38, n. 6, p. 2101–2108, 2005.
- 35 KAPFERER, T.; BRÜCKNER, R. Asymmetric dihydroxylation of β,γ -unsaturated carboxylic esters with trisubstituted C=C bonds – enantioselective syntheses of trisubstituted γ -butyrolactones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 9, p. 2119–2133, 2006.
- 36 DENG, Y.; LEE, Y.R.; NEWMAN, C.A.; WULFF, W.D. Aziridinyll vinyl ketones from the asymmetric catalytic aziridination reaction. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2007, n. 13, p. 2068–2071, 2007.
- 37 SOSA, J.R.; TUDJARIAN, A.A.; MINEHAN, T.G. Synthesis of alkynyl ethers and low-temperature sigmatropic rearrangement of allyl and benzyl alkynyl ethers. **Organic Letters**, v. 10, n. 21, p. 5091–5094, 2008.
- 38 CAO, P.; SUN, X.-L.; ZHU, B.-H.; SHEN, Q.; XIE, Z.; TANG, Y. Multistep one-pot wittig/nazarov reaction for construction of cyclopentenone with diazo compounds and acid chlorides. **Organic Letters**, v. 11, n. 14, p. 3048–3051, 2009.
- 39 ZHANG, X.; GUO, X.; YANG, L.P.; HU, W.H. Rh(II) and Zn(II) co-catalyzed multi-component reaction for the synthesis of vicinal diols. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, n. 11, p. 1299–1302, 2009.
- 40 WANG, C.-D.; LIU, R.-S. Silver-catalyzed [3+2]-cycloaddition of benzyne with diazocarbonyl species via a postulated (1H-indazol-1-yl)silver intermediate. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 45, p. 8948–8952, 2012.
- 41 QIAN, Y.; JING, C.; LIU, S.; HU, W. A highly enantioselective four-component reaction for the efficient construction of chiral β -hydroxy- α -amino acid derivatives. **Chemical Communications**, v. 49, n. 26, p. 2700, 2013.

- 42 WANG, P.; LIAO, S.; WANG, S.R.; GAO, R.-D.; TANG, Y. Reaction of trisubstituted alkenes with iron porphyrin carbenes: facile synthesis of tetrasubstituted dienes and cyclopentadienes. **Chemical Communications**, v. 49, n. 67, p. 7436–7438, 2013.
- 43 XU, X.; XU, X.; ZAVALIJ, P.Y.; DOYLE, M.P. Dirhodium(ii)-catalyzed formal [3+2+1]-annulation of azomethine imines with two molecules of a diazo ketone. **Chemical Communications**, v. 49, n. 27, p. 2762–2764, 2013.
- 44 DANHEISER, R.L.; CHA, D.D. Total synthesis of the host defense stimulant maesanin. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 11, p. 1527–1530, 1990.
- 45 SHANAHAN, C.S.; TRUONG, P.; MASON, S.M.; LESZCZYNSKI, J.S.; DOYLE, M.P. Diazoacetoacetate enones for the synthesis of diverse natural product-like scaffolds. **Organic Letters**, v. 15, n. 14, p. 3642–3645, 2013.
- 46 PINHO, V.D.; BURTOLOSO, A.C.B. Preparation of α,β -unsaturated diazoketones employing a Horner–Wadsworth–Emmons reagent. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 289–292, 2011.
- 47 ROSSET, I.G.; BURTOLOSO, A.C.B. Preparation of Z- α,β -unsaturated diazoketones from aldehydes. Application in the construction of substituted dihydropyridin-3-ones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 18, p. 9464–9470, 2013.
- 48 TEICHERT, A.; JANTOS, K.; HARMS, K.; STUDER, A. One-pot homolytic aromatic substitutions/hwe olefinations under microwave conditions for the formation of a small oxindole library. **Organic Letters**, v. 6, n. 20, p. 3477–3480, 2004.
- 49 ANDO, K. Practical synthesis of Z-unsaturated esters by using a new Horner–Emmons reagent, ethyl diphenylphosphonoacetate. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 23, p. 4105–4108, 1995.
- 50 ANDO, K. Highly selective synthesis of z-unsaturated esters by using new horner–emmons reagents, ethyl (diarylphosphono)acetates. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1934–1939, 1997.
- 51 ANDO, K. Z-Selective horner–wadsworth–emmons reaction of α -substituted ethyl (diarylphosphono)acetates with aldehydes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 8411–8416, 1998.
- 52 ANDO, K. Convenient preparations of (diphenylphosphono)acetic acid esters and the comparison of the z-selectivities of their horner–wadsworth–emmons reaction with aldehydes depending on the ester moiety. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 22, p. 8406–8408, 1999.
- 53 STILL, W.C.; GENNARI, C. Direct synthesis of Z-unsaturated esters. A useful modification of the horner–emmons olefination. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 41, p. 4405–4408, 1983.
- 54 DA SILVA PRADO, V.; BURTOLOSO, A. An improved procedure for the preparation of [bis(2,2,2-trifluoroethyl)phosphono]acetic acid. **Synthesis**, v. 2010, n. 02, p. 361–363, 2010.

- 55 BURTOLOSO, A.C.B.; DIAS, R.M.P.; BERNARDIM, B. α,β -Unsaturated diazoketones as useful platforms in the synthesis of nitrogen heterocycles. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 4, p. 921–934, 2015.
- 56 BERNARDIM, B.; PINHO, V.D.; BURTOLOSO, A.C.B. α,β -unsaturated diazoketones as platforms in the asymmetric synthesis of hydroxylated alkaloids. Total synthesis of 1-deoxy-8,8a-diepicastanospermine and 1,6-dideoxyepicastanospermine and formal synthesis of Pumiliotoxin 251D. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 21, p. 9926–9931, 2012.
- 57 BERNARDIM, B.; LORDELLO, L.; BURTOLOSO, A.C.B. α,β -Unsaturated diazoketones as versatile building blocks for the synthesis of hydroxylated piperidines, indolizidines and quinolizidines. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 17, p. 2099–2103, 2013.
- 58 PINHO, V.D.; BURTOLOSO, A.C.B. Total synthesis of (–)-indolizidine 167B via an unusual Wolff rearrangement from an α,β -unsaturated diazoketone. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 7, p. 876–878, 2012.
- 59 KAWAMURA, M.Y.; TALERO, A.G.; SANTIAGO, J.V.; GARAMBEL-VILCA, E.; ROSSET, I.G.; BURTOLOSO, A.C.B. Six-step syntheses of (–)-1-deoxyaltronojirimycin and (+)-1-deoxymannonojirimycin from N-Z-O-TBDPS-L-serinal. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 81, n. 21, p. 10569–10575, 2016.
- 60 ROSSET, I.G.; DIAS, R.M.P.; PINHO, V.D.; BURTOLOSO, A.C.B. Three-step synthesis of ($\pm$)-preussin from decanal. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 14, p. 6748–6753, 2014.
- 61 NEWMAN, M.S.; BEAL, P.F. An improved Wolff rearrangement in homogeneous medium. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 5163–5165, 1950.
- 62 KIRMSE, W. 100 years of the Wolff rearrangement. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2002, n. 14, p. 2193–2256, 2002.
- 63 KURTI, L.; CZAKO, B. **Strategic applications of named reactions in organic synthesis**. New York: Academic Press, 2005. 864 p.
- 64 BURDZINSKI, G.; PLATZ, M.S. Ultrafast time-resolved studies of the photochemistry of diazo carbonyl compounds. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 308–314, 2010.
- 65 KAPLAN, F.; MELOY, G.K. The structure of diazoketones. A study of hindered internal rotation^{1,2}. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 5, p. 950–956, 1966.
- 66 ZELLER, K.-; BLOCHER, A.; HAISS, P. Oxirene participation in the photochemical Wolff rearrangement. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 291–308, 2004.
- 67 MEIER, H.; ZELLER, K.-P. Die Wolff-umlagerung von α -diazocarbonylverbindungen. **Angewandte Chemie**, v. 87, n. 2, p. 52–63, 1975.
- 68 PADWA, A.; LAYTON, R. The photochemical decomposition of α -diazacetophenone in hydroxylic solvents. **Tetrahedron Letters**, v. 6, n. 26, p. 2167–2170, 1965.

- 69 JONES, M.; ANDO, W. Formation of cyclopropanes via the photosensitized decomposition of aliphatic .alpha.-diazo ketones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 8, p. 2200–2201, 1968.
- 70 CANDEIAS, N.R.; TRINDADE, A.F.; GOIS, P.M.P.; AFONSO, C.A.M. The Wolff rearrangement. In: KNOCH, P.; MOLANDER, G. A. (Ed.). **Comprehensive Organic Synthesis II**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. v.1, p. 944–991.
- 71 TOMIOKA, H.; OKUNO, H.; IZAWA, Y. Mechanism of the photochemical Wolff rearrangement. The role of conformation in the photolysis of .alpha.-diazo carbonyl compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 45, n. 26, p. 5278–5283, 1980.
- 72 TOMIOKA, H.; OKUNO, H.; KONDO, S.; IZAWA, Y. Direct evidence for ketocarbene-ketocarbene interconversion. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 23, p. 7123–7125, 1980.
- 73 ABDEL-WAHAB, A.-M.A.; AHMED, S.A.; DUERR, H. Carbene formation by extrusion of nitrogen. In: HORSPOOL, W.M.; LENCI, F. (Ed.). **CRC handbook of organic photochemistry and photobiology**. 2 ed. Boca Raton: CRC, 2003. v.1. p.1 - 37
- 74 BACHMANN, W.E.; STRUVE, W.S. The Arndt-Eistert synthesis. In: **ORGANIC reactions**. New York: John Wiley, 2011. v.1, p. 38-62
- 75 HORNER, L.; SPIETSCHKA, E. Über lichtreaktionen VI: addukte aus azoverbindungen und ketenen. **Chemische Berichte**, v. 89, n. 12, p. 2765–2768, 1956.
- 76 DARKINS, P.; MCCARTHY, N.; ANTHONY, M.; MCKERVEY; O'DONNELL, K.; YE, T.; WALKER, B. First synthesis of enantiomerically pure N-protected β -amino- α -keto esters from α -amino acids and dipeptides. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 5, n. 2, p. 195–198, 1994.
- 77 TILEKAR, J.N.; PATIL, N.T.; DHAVAL, D.D. Synthesis of C1-C6 segment of carbonolide B: Wolff rearrangement of sugar α -diazo ketones. **Synthesis**, v. 2000, n. 03, p. 395–398, 2000.
- 78 COOPER, J.; KNIGHT, D.W.; GALLAGHER, P.T. Total synthesis of (–)- α -kainic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Trans. 1**, n. 5, p. 553–559, 1992.
- 79 WENKERT, E.; DECORZANT, R.; NÄF, F. A novel access to ionone-type compounds: (E)-4-oxo- β -ionone and (E)-4-oxo- β -ionone via metal-catalyzed intramolecular reactions of α -diazo ketones with furans. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, n. 4, p. 756–766, 1989.
- 80 GRIECO, P.A.; HON, Y.S.; PEREZ-MEDRANO, A. Convergent, enantiospecific total synthesis of the novel cyclodepsipeptide (+)-jasplakinolide (jaspamide). **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 5, p. 1630–1631, 1988.
- 81 LEVIN, S.; NANI, R.R.; REISMAN, S.E. Enantioselective total synthesis of (+)-Salvileucalin B. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 4, p. 774–776, 2011.
- 82 WIBERG, K.B.; SNOONIAN, J.R.; LAHTI, P.M. Ring contraction of a two-carbon bridged spiropentane. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 46, p. 8285–8288, 1996.

- 83 RAO, V.B.; WOLFF, S.; AGOSTA, W.C. Synthesis of methyl 1-methyltetracyclo[4.3.1.0³,10.0⁸,10]decane-7-carboxylate, a derivative of[4.4.4.5]fenestrane. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 5, p. 293–294, 1984.
- 84 RAO, V.B.; GEORGE, C.F.; WOLFF, S.; AGOSTA, W.C. Synthetic and structural studies in the [4.4.4.5]fenestrane series. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 20, p. 5732–5739, 1985.
- 85 LOWE, G.; RIDLEY, D.D. Synthesis of β -lactams by photolytic Wolff rearrangement. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 10, p. 328–329, 1973.
- 86 UEDA, K.; TODA, F. Wolff rearrangement of 2-diazo-3,4-bis(diphenylmethylene)cyclobutnone into 1,2-bis (diphenylmethylene) cyclopropmes. **Chemistry Letters**, v. 4, n. 7, p. 779–780, 1975.
- 87 BASKAR, R. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.
- 88 HOYE, A.T.; DAVOREN, J.E.; WIPF, P.; FINK, M.P.; KAGAN, V.E. Targeting mitochondria. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 87–97, 2008.
- 89 KANAI, A.; ZABBAROVA, I.; AMOSCATO, A.; EPPERLY, M.; XIAO, J.; WIPF, P. Mitochondrial targeting of radioprotectants using peptidyl conjugates. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 307–309, 2007.
- 90 BALABAN, R.S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 2005.
- 91 FRANTZ, M.-C.; SKODA, E.M.; SACHER, J.R.; EPPERLY, M.W.; GOFF, J.P.; GREENBERGER, J.S.; WIPF, P. Synthesis of analogs of the radiation mitigator JP4-039 and visualization of BODIPY derivatives in mitochondria. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 25, p. 4147–4153, 2013.
- 92 JIANG, J.; KURNIKOV, I.; BELIKOVA, N.A.; XIAO, J.; ZHAO, Q.; AMOSCATO, A.A.; BRASLAU, R.; STUDER, A.; FINK, M.P.; GREENBERGER, J.S.; WIPF, P.; KAGAN, V.E. Structural requirements for optimized delivery, inhibition of oxidative stress, and antiapoptotic activity of targeted nitroxides. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1050–1060, 2007.
- 93 KAGAN, V.E.; WIPF, P.; STOYANOVSKY, D.; GREENBERGER, J.S.; BORISENKO, G.; BELIKOVA, N.A.; YANAMALA, N.; SAMHAN ARIAS, A.K.; TUNGEKAR, M.A.; JIANG, J.; TYURINA, Y.Y.; JI, J.; KLEIN-SEETHARAMAN, J.; PITT, B.R.; SHVEDOVA, A.A.; BAYIR, H. Mitochondrial targeting of electron scavenging antioxidants: regulation of selective oxidation vs random chain reactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 14, p. 1375–1385, 2009.
- 94 SKODA, E.M.; DAVIS, G.C.; WIPF, P. Allylic amines as key building blocks in the synthesis of (E)-alkene peptide isosteres. **Organic Process Research & Development**, v. 16, n. 1, p. 26–34, 2012.

- 95 FRANTZ, M.-C.; PIERCE, J.G.; PIERCE, J.M.; KANGYING, L.; QINGWEI, W.; JOHNSON, M.; WIPF, P. Large-Scale asymmetric synthesis of the bioprotective agent JP4-039 and analogs. **Organic Letters**, v. 13, n. 9, p. 2318–2321, 2011.
- 96 BERHANE, H.; EPPERLY, M.; DIXON, T.M.; CAO, S.; SHIELDS, D.; WIPF, P.; LI, S.; GAO, X.; GUINAN, E.; GREENBERGER, J.S. Oral delivery of mitochondrial targeted GS-nitroxide JP4-039 protects fanconi Anemia (FA) D2 ^{-/-} mice from irradiation mucositis. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 84, n. 3, Supplement, p. S677–S678, 2012.
- 97 BERNARD, M.E.; KIM, H.; BERHANE, H.; EPPERLY, M.W.; FRANICOLA, D.; ZHANG, X.; HOUGHTON, F.; SHIELDS, D.; WANG, H.; BAKKENIST, C.J.; FRANTZ, M.-C.; FORBECK, E.M.; GOFF, J.P.; WIPF, P.; GREENBERGER, J.S. GS-nitroxide (JP4-039)-mediated radioprotection of human fanconi anemia cell lines. **Radiation Research**, v. 176, n. 5, p. 603–612, 2011.
- 98 JIANG, J.; BELIKOVA, N.A.; HOYE, A.T.; ZHAO, Q.; EPPERLY, M.W.; GREENBERGER, J.S.; WIPF, P.; KAGAN, V.E. A mitochondria-targeted nitroxide/hemigramicidin S conjugate protects mouse embryonic cells against gamma irradiation. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 70, n. 3, p. 816–825, 2008.
- 99 RWIGEMA, J.-C.M.; BECK, B.; WANG, W.; DOEMLING, A.; EPPERLY, M.W.; SHIELDS, D.; GOFF, J.P.; FRANICOLA, D.; DIXON, T.; FRANTZ, M.-C.; WIPF, P.; TYURINA, Y.; KAGAN, V.E.; WANG, H.; GREENBERGER, J.S. Two strategies for the development of mitochondrion-targeted small molecule radiation damage mitigators. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 80, n. 3, p. 860–868, 2011.
- 100 WIPF, P.; XIAO, J.; JIANG, J.; BELIKOVA, N.A.; TYURIN, V.A.; FINK, M.P.; KAGAN, V.E. Mitochondrial targeting of selective electron scavengers: synthesis and biological analysis of hemigramicidin–TEMPO conjugates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 36, p. 12460–12461, 2005.
- 101 OMURA, K.; SWERN, D. Oxidation of alcohols by “activated” dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study. **Tetrahedron**, v. 34, n. 11, p. 1651–1660, 1978.
- 102 MINATO, D.; NAGASUE, Y.; DEMIZU, Y.; ONOMURA, O. Efficient kinetic resolution of racemic amino aldehydes by oxidation with N-iodosuccinimide. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 49, p. 9458–9461, 2008.
- 103 YANG, X.; ZOU, X.; FU, Y.; MOU, K.; FU, G.; MA, C.; XU, P. Synthesis of β -secretase inhibitors containing a hydroxyethylene dipeptide isostere. **Synthetic Communications**, v. 37, n. 1, p. 9–24, 2007.
- 104 PARIKH, J.R.; DOERING, W. V. E. Sulfur trioxide in the oxidation of alcohols by dimethyl sulfoxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 21, p. 5505–5507, 1967.
- 105 SEIKALY, H.R.; TIDWELL, T.T. Addition reactions of ketenes. **Tetrahedron**, v. 42, n. 10, p. 2587–2613, 1986.

- 106 ANDRAOS, J.; KRESGE, A.J. The mechanism of the reaction of diphenylketene with bases in aqueous solution: nucleophilic attack versus general base catalysis of ketene hydration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 14, p. 5643–5646, 1992.
- 107 SEKI, H.; GEORG, G.I. Three-component synthesis of cyclic enaminones via ketene cyclization. **Organic Letters**, v. 13, n. 9, p. 2147–2149, 2011.
- 108 PRESSET, M.; COQUEREL, Y.; RODRIGUEZ, J. Microwave-assisted Wolff rearrangement of cyclic 2-diazo-1,3-diketones: an eco-compatible route to α -carbonylated cycloalkanones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 1, p. 415–418, 2009.
- 109 LUCAS, N.C. DE; NETTO-FERREIRA, J.C.; ANDRAOS, J.; SCAIANO, J.C. Nucleophilicity toward ketenes: rate constants for addition of amines to aryl ketenes in acetonitrile solution. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 15, p. 5016–5021, 2001.
- 110 SHI, B.-F.; MAUGEL, N.; ZHANG, Y.-H.; YU, J.-Q. PdII-catalyzed enantioselective activation of C(sp²)-H and C(sp³)-H bonds using monoprotected amino acids as chiral ligands. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 26, p. 4882–4886, 2008.
- 111 KOCH, K.; PODLECH, J. Exceptionally simple homologation of protected α - to β -amino acids in the presence of silica gel. **Synthetic Communications**, v. 35, n. 21, p. 2789–2794, 2005.
- 112 FENG, J.M.; CHEN, S.P.; TANG, L.J.; ZHANG, J.T.; WANG, X.J.; HUANG, S.P. Study on synthesis of (S)-methyl 3-(((benzyloxy)carbonyl) amino)-7-hydroxyheptanoate. **Advanced Materials Research**, v. 781-784, p. 1187–1189, 2013.
- 113 WEIBEL, J.-M., BLANC, A., PALE, P. Sigmatropic rearrangements and related processes promoted by silver. In: HARMATA, M.; WENDER, P.A. (Ed.) **Silver in organic chemistry**. New York: John Wiley, 2010. p. 83–116.
- 114 THOMPSON, J.L.; DAVIES, H.M.L. Enhancement of cyclopropanation chemistry in the silver-catalyzed reactions of aryldiazoacetates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 19, p. 6090–6091, 2007.
- 115 SUDRIK, S.G.; CHAKI, N.K.; CHAVAN, V.B.; CHAVAN, S.P.; CHAVAN, S.P.; SONAWANE, H.R.; VIJAYAMOHANAN, K. Silver nanocluster redox-couple-promoted nonclassical electron transfer: an efficient electrochemical Wolff rearrangement of α -diazoketones. **Chemistry – A European Journal**, v. 12, n. 3, p. 859–864, 2006.
- 116 SUDRIK, S.G.; SHARMA, J.; CHAVAN, V.B.; CHAKI, N.K.; SONAWANE, H.R.; VIJAYAMOHANAN, K.P. Wolff rearrangement of α -diazoketones using in situ generated silver nanoclusters as electron mediators. **Organic Letters**, v. 8, n. 6, p. 1089–1092, 2006.
- 117 MA, B.; CHEN, F.-L.; XU, X.-Y.; ZHANG, Y.-N.; HU, L.-H. α -diazo β -Keto ester as precursor to aromatic C-H insertion and Wolff rearrangement with different directing groups. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 356, n. 2-3, p. 416–420, 2014.

- 118 LOVELY, C.J. Silver carbenoids. In: HARMATA, M.; WENDER, P.A. (Ed.). **Silver in organic chemistry**. New York: John Wiley, 2010. p. 229–257.
- 119 ROSATI, R.L.; KAPILI, L.V.; MORRISSEY, P.; RETSEMA, J.A. Cephalosporins to carbapenems: 1-oxygenated carbapenems and carbapenams. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 291–297, 1990.
- 120 MASCITTI, V.; COREY, E.J. Total synthesis of (±)-pentacycloanammoxic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 48, p. 15664–15665, 2004.
- 121 PINHO, V.D.; GUTMANN, B.; KAPPE, C.O. Continuous flow synthesis of β -amino acids from α -amino acids via Arndt–Eistert homologation. **RSC Advances**, v. 4, n. 70, p. 37419–37422, 2014.
- 122 BOERNER, L.J.K.; DYE, D.F.; KÖPKE, T.; ZALESKI, J.M. Expansion and contraction: Shaping the porphyrin boundary via diradical reactivity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 599–620, 2013.
- 123 CHIANG, Y.; KRESGE, A.J.; POPIK, V.V. Scavenging of intermediates formed in photolysis of α -diazocarbonyl compounds and hydroxycyclopropanones. Implication on the mechanism of the photo-Wolff reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 25, p. 5930–5932, 1999.
- 124 ALLEN, A.D.; CHENG, B.; FENWICK, M.H.; GIVEHCHI, B.; HENRY-RIYAD, H.; NIKOLAEV, V.A.; SHIKHOVA, E.A.; TAHMASSEBI, D.; TIDWELL, T.T.; WANG, S. Ketene reactions with the aminoxyl radical TEMPO: preparative, kinetic, and theoretical studies. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 2611–2617, 2001.
- 125 ZIMMERMAN, H.E.; WANG, P. An unusual abnormal Wolff rearrangement. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 81, n. 6, p. 517–524, 2003.
- 126 VASKE, Y.S.M.; MAHONEY, M.E.; KONOPELSKI, J.P.; ROGOW, D.L.; MCDONALD, W.J. Enantiomerically pure trans- β -lactams from α -amino acids via compact fluorescent light (CFL) continuous-flow photolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 32, p. 11379–11385, 2010.
- 127 NIKOLAEV, V.A.; GALKINA, O.S.; SIELER, J.; RODINA, L.L. Surprising secondary photochemical reactions observed on conventional photolysis of diazotetrahydrofuranones. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 20, p. 2713–2716, 2010.
- 128 WILLUMSTAD, T.P.; HAZE, O.; MAK, X.Y.; LAM, T.Y.; WANG, Y.-P.; DANHEISER, R.L. Batch and flow photochemical benzannulations based on the reaction of ynamides and diazo ketones. Application to the synthesis of polycyclic aromatic and heteroaromatic compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 22, p. 11450–11469, 2013.
- 129 NICOLAOU, K.C.; BARAN, P.S.; ZHONG, Y.-L.; CHOI, H.-S.; YOON, W.H.; HE, Y.; FONG, K.C. Total synthesis of the CP molecules CP-263,114 and CP-225,917— Part 1: synthesis of key intermediates and intelligence gathering. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 11, p. 1669–1675, 1999.
- 130 KNOWLES, J.P.; ELLIOTT, L.D.; BOOKER-MILBURN, K.I. Flow photochemistry: Old light through new windows. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 2025–2052, 2012.

- 131 EVANS, D.L. High-luminance LEDs replace incandescent lamps in new applications. In: SCHUBERT, E.F. **Light-emitting diodes: research, manufacturing, and applications**. San Jose, CA: SPIE. Digital, Library, 1997. v.3002, p. 142–153.
- 132 PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 4546–4551, 2014.
- 133 BERNARDIM, B.; BURTOLOSO, A.C.B. A two-step synthesis of the bioprotective agent JP4-039 from N-Boc-L-leucinal. **Tetrahedron**, v. 70, n. 20, p. 3291–3296, 2014.
- 134 BERNARDIM, B.; HARDMAN-BALDWIN, A.M.; BURTOLOSO, A.C.B. LED lighting as a simple, inexpensive, and sustainable alternative for Wolff rearrangements. **RSC Advances**, v. 5, n. 18, p. 13311–13314, 2015.
- 135 PADWA, A.; KENNEDY, G.D.; WANNAMAKER, M.W. Cycloaddition reactions of strained ring systems. Photosensitized [2 + 2] cycloadditions of 2-(acyloxy)-substituted cyclopropenes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 5334–5341, 1985.
- 136 FUSON, R.C.; GRAY, H.; GOUZA, J.J. Acyloins from t-Butylglyoxal. **Journal of the American Chemical Society**, v. 61, n. 8, p. 1937–1940, 1939.
- 137 ISHIHARA, K.; YANO, T.; FUSHIMI, M. Asymmetric intramolecular Cannizzaro reaction of anhydrous phenylglyoxal. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 129, n. 10, p. 994–997, 2008.
- 138 MARUYAMA, K.; MURAKAMI, Y.; YODA, K.; MASHINO, T.; NISHINAGA, A. Catalysis by cobalt Schiff's base complexes in highly selective conversion of arylglyoxals to α -aryl- α -hydroxyacetic esters. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 21, p. 1617–1618, 1992.
- 139 YOUNG, R.M.; DAVIES-COLEMAN, M.T. Microwave-assisted selenium dioxide oxidation of aryl methyl ketones to aryl glyoxals. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 31, p. 4036–4038, 2011.
- 140 WANG, P.; TAO, W.-J.; SUN, X.-L.; LIAO, S.; TANG, Y. A highly efficient and enantioselective intramolecular cannizzaro reaction under TOX/Cu(II) catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 45, p. 16849–16852, 2013.
- 141 HUISGEN, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 403–419, 1976.
- 142 CHANDRASEKHAR, S.; SARKAR, S. Methylene-phenylsulfone appended acetals and ketals: New class of carbonyl protective groups cleavable by DBU. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 16, p. 2401–2404, 1998.
- 143 SARABIA GARCÍA, F.; PEDRAZA CEBRIÁN, G.M.; HERAS LÓPEZ, A.; LÓPEZ HERRERA, F.J. Reactions of monosaccharide derivatives with diazocarbonyl compounds. Reactivity and synthetic applications. **Tetrahedron**, v. 54, n. 24, p. 6867–6896, 1998.
- 144 ŠVENDA, J.; HILL, N.; MYERS, A.G. A multiply convergent platform for the synthesis of trioxacarcins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, p. 6709–6714, 2011.

- 145 JOLY, G.D.; JACOBSEN, E.N. Catalyst-controlled diastereoselective hetero-Diels–Alder reactions. **Organic Letters**, v. 4, n. 10, p. 1795–1798, 2002.
- 146 WOHL, A. Bromierung ungesättigter Verbindungen mit N-Brom-acetamid, ein Beitrag zur Lehre vom Verlauf chemischer Vorgänge. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 52, n. 1, p. 51–63, 1919.
- 147 ZIEGLER, K.; SCHENCK, G.; KROCKOW, E.W.; SIEBERT, A.; WENZ, A.; WEBER, H. Die synthese des cantharidins. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 551, n. 1, p. 1–79, 1942.
- 148 KLESSINGER, M.; MICHL, J. **Excited states and photochemistry of organic molecules**. New York: Wiley-VCH, 1995. 537 p.
- 149 BACH, R.D.; DMITRENKO, O. Strain energy of small ring hydrocarbons. Influence of C-h bond dissociation energies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 13, p. 4444–4452, 2004.
- 150 SCALABRINO, G.; SUN, X.-W.; MANN, J.; BARON, A. A convergent approach to the marine natural product eleutherobin: synthesis of key intermediates and attempts to produce the basic skeleton. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 318–327, 2003.
- 151 MA, K.; LIAO, D.; YANG, S.; LI, X.; LEI, X. Studies towards the synthesis of the functionalized C3–C14 decalin framework of alchivemycin A. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 3, n. 2, p. 251–258, 2016.
- 152 RAMANATHAN, M.; TAN, C.-J.; CHANG, W.-J.; TSAI, H.-H.G.; HOU, D.-R. Synthesis of the decalin core of codinaeopsin via an intramolecular Diels–Alder reaction. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 3846–3854, 2013.
- 153 KRALL, N.; CRUZ, F.P. DA; BOUTUREIRA, O.; BERNARDES, G.J.L. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 103–113, 2016.
- 154 WALSH, C.T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G.J. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 2005.
- 155 AGARWAL, P.; BERTOZZI, C.R. Site-specific antibody–drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 176–192, 2015.
- 156 CHARI, R.V.J.; MILLER, M.L.; WIDDISON, W.C. Antibody–drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 15, p. 3796–3827, 2014.
- 157 CHUDASAMA, V.; MARUANI, A.; CADDICK, S. Recent advances in the construction of antibody–drug conjugates. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 114–119, 2016.
- 158 HACKENBERGER, C.P.R.; SCHWARZER, D. Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 52, p. 10030–10074, 2008.

- 159 KENT, S.B.H. Total chemical synthesis of proteins. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 338–351, 2009.
- 160 SPICER, C.D.; DAVIS, B.G. Selective chemical protein modification. **Nature Communications**, v. 5, p. 4740, 2014.
- 161 SCHMALTZ, R.M.; HANSON, S.R.; WONG, C.-H. Enzymes in the synthesis of glycoconjugates. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4259–4307, 2011.
- 162 TASDELEN, M.A.; YAGCI, Y. Light-induced click reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 23, p. 5930–5938, 2013.
- 163 LANG, K.; CHIN, J.W. Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 9, p. 4764–4806, 2014.
- 164 VILLALONGA, M.L.; DíEZ, P.; SÁNCHEZ, A.; GAMELLA, M.; PINGARRÓN, J.M.; VILLALONGA, R. Neoglycoenzymes. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 9, p. 4868–4917, 2014.
- 165 WALLAT, J.D.; ROSE, K.A.; POKORSKI, J.K. Proteins as substrates for controlled radical polymerization. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1545–1558, 2014.
- 166 BOUTUREIRA, O.; BERNARDES, G.J.L. Advances in chemical protein modification. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 5, p. 2174–2195, 2015.
- 167 STEPHANOPOULOS, N.; FRANCIS, M.B. Choosing an effective protein bioconjugation strategy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 876–884, 2011.
- 168 BOUTUREIRA, O.; BERNARDES, G.J.L. Advances in chemical protein modification. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 5, p. 2174–2195, 2015.
- 169 CHALKER, J.M.; BERNARDES, G.J.L.; LIN, Y.A.; DAVIS, B.G. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 4, n. 5, p. 630–640, 2009.
- 170 TODA, N.; ASANO, S.; BARBAS, C.F. Rapid, stable, chemoselective labeling of thiols with julia–kocieński-like reagents: a serum-stable alternative to maleimide-based protein conjugation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 48, p. 12592–12596, 2013.
- 171 SENTER, P.D.; SIEVERS, E.L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 631–637, 2012.
- 172 SHEN, B.-Q.; XU, K.; LIU, L.; RAAB, H.; BHAKTA, S.; KENRICK, M.; PARSONS-REPONTE, K.L.; TIEN, J.; YU, S.-F.; MAI, E.; LI, D.; TIBBITTS, J.; BAUDYS, J.; SAAD, O.M.; SCALES, S.J.; MCDONALD, P.J.; HASS, P.E.; EIGENBROT, C.; NGUYEN, T.; SOLIS, W.A.; FUJI, R.N.; FLAGELLA, K.M.; PATEL, D.; SPENCER, S.D.; KHAWLI, L.A.; EBENS, A.; WONG, W.L.; VANDLEN, R.; KAUR, S.; SLIWKOWSKI, M.X.; SCHELLER, R.H.; POLAKIS, P.; JUNUTULA, J.R. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 184–189, 2012.

- 173 BALDWIN, A.D.; KILICK, K.L. Tunable degradation of maleimide–thiol adducts in reducing environments. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 1946–1953, 2011.
- 174 LYON, R.P.; SETTER, J.R.; BOVEE, T.D.; DORONINA, S.O.; HUNTER, J.H.; ANDERSON, M.E.; BALASUBRAMANIAN, C.L.; DUNIHO, S.M.; LEISKE, C.I.; LI, F.; SENTER, P.D. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody–drug conjugates. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 1059–1062, 2014.
- 175 FONTAINE, S.D.; REID, R.; ROBINSON, L.; ASHLEY, G.W.; SANTI, D.V. Long-term stabilization of maleimide–thiol conjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 145–152, 2015.
- 176 TUMEY, L.N.; CHARATI, M.; HE, T.; SOUSA, E.; MA, D.; HAN, X.; CLARK, T.; CASAVANT, J.; LOGANZO, F.; BARLETTA, F.; LUCAS, J.; GRAZIANI, E.I. Mild method for succinimide hydrolysis on adcs: impact on adc potency, stability, exposure, and efficacy. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1871–1880, 2014.
- 177 KALIA, D.; MALEKAR, P.V.; PARTHASARATHY, M. Exocyclic olefinic maleimides: synthesis and application for stable and thiol-selective bioconjugation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, p. 1432–1435, 2015.
- 178 FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; SHINGU, H. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. **The Journal of Chemical Physics**, v. 20, n. 4, p. 722–725, 1952.
- 179 LV, X.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; WANG, X. Facile and efficient conjugate additions of β -dicarbonyl compounds and nitroalkanes to 4-aryl-4-oxobut-2-enoates. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, n. 7, p. 947–954, 2011.
- 180 DAS, U.; CHEN, Y.-R.; TSAI, Y.-L.; LIN, W. Organocatalytic enantioselective direct vinylogous michael addition of γ -substituted butenolides to 3-aryl acrylates and 1,2-diarylethylenes. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 24, p. 7713–7717, 2013.
- 181 JI, J.; LIN, L.; ZHOU, L.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LIU, X.; FENG, X. N,N'-dioxide–scandium(III)-catalyzed asymmetric michael addition of β,γ -unsaturated butenolides to α,β -unsaturated γ -keto esters. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 355, n. 14-15, p. 2764–2768, 2013.
- 182 KANG, Q.; ZHANG, Y. N-Heterocyclic carbene-catalyzed aza-Michael addition. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 19, p. 6715–6720, 2011.
- 183 LU, H.-H.; WANG, X.-F.; YAO, C.-J.; ZHANG, J.-M.; WU, H.; XIAO, W.-J. Highly enantioselective organocatalytic Michael addition of nitroalkanes to 4-oxo-enoates. **Chemical Communications**, n. 28, p. 4251–4253, 2009.
- 184 SHEN, J.; NGUYEN, T.T.; GOH, Y.-P.; YE, W.; FU, X.; XU, J.; TAN, C.-H. Chiral bicyclic Guanidine-Catalyzed Enantioselective Reactions of Anthrones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 42, p. 13692–13693, 2006.
- 185 WANG, Z.; YAO, Q.; KANG, T.; FENG, J.; LIU, X.; LIN, L.; FENG, X. Highly diastereo- and enantioselective Michael addition of 3-substituted benzofuran-2(3H)-ones to 4-oxo-enoates catalyzed by lanthanide(III) complexes. **Chemical Communications**, v. 50, n. 38, p. 4918–4920, 2014.

- 186 ZHAO, S.; LIN, J.-B.; ZHAO, Y.-Y.; LIANG, Y.-M.; XU, P.-F. Hydrogen-bond-directed formal [5 + 1] annulations of oxindoles with ester-linked bisenones: facile access to chiral spirooxindole δ -lactones. **Organic Letters**, v. 16, n. 6, p. 1802–1805, 2014.
- 187 LOGUE, S.E.; ELGENDY, M.; MARTIN, S.J. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. **Nature Protocols**, v. 4, n. 9, p. 1383–1395, 2009.
- 188 ALAM, I.S.; NEVES, A.A.; WITNEY, T.H.; BOREN, J.; BRINDLE, K.M. Comparison of the C2A domain of synaptotagmin-i and annexin-v as probes for detecting cell death. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 884–891, 2010.
- 189 KRATZ, F.; ELSADEK, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 429–445, 2012.
- 190 ANDERSEN, J.T.; DALHUS, B.; VIUFF, D.; RAVN, B.T.; GUNNARSEN, K.S.; PLUMRIDGE, A.; BUNTING, K.; ANTUNES, F.; WILLIAMSON, R.; ATHWAL, S.; ALLAN, E.; EVANS, L.; BJØRÅS, M.; KJÆRULFF, S.; SLEEP, D.; SANDLIE, I.; CAMERON, J. Extending serum half-life of albumin by engineering neonatal Fc receptor (FcRn) binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19, p. 13492–13502, 2014.
- 191 ISHII, Y.; LEHRER, S.S. Effects of the state of the succinimido-ring on the fluorescence and structural properties of pyrene maleimide-labeled alpha alpha-tropomyosin. **Biophysical Journal**, v. 50, n. 1, p. 75–80, 1986.
- 192 MERLIN, J.-L.; BARBERI-HEYOB, M.; BACHMANN, N. In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin®) combined with paclitaxel (Taxol®) or docetaxel (Taxotere®) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. **Annals of Oncology**, v. 13, n. 11, p. 1743–1748, 2002.
- 193 JUNUTULA, J.R.; RAAB, H.; CLARK, S.; BHAKTA, S.; LEIPOLD, D.D.; WEIR, S.; CHEN, Y.; SIMPSON, M.; TSAI, S.P.; DENNIS, M.S.; LU, Y.; MENG, Y.G.; NG, C.; YANG, J.; LEE, C.C.; DUENAS, E.; GORRELL, J.; KATTA, V.; KIM, A.; MCDORMAN, K.; FLAGELLA, K.; VENOOK, R.; ROSS, S.; SPENCER, S.D.; LEE WONG, W.; LOWMAN, H.B.; VANDLEN, R.; SLIWKOWSKI, M.X.; SCHELLER, R.H.; POLAKIS, P.; MALLET, W. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 925–932, 2008.
- 194 LYON, R.P.; BOVEE, T.D.; DORONINA, S.O.; BURKE, P.J.; HUNTER, J.H.; NEFF-LAFORD, H.D.; JONAS, M.; ANDERSON, M.E.; SETTER, J.R.; SENTER, P.D. Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 733–735, 2015.
- 195 PATTERSON, D.M.; NAZAROVA, L.A.; PRESCHER, J.A. Finding the right (bioorthogonal) chemistry. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 3, p. 592–605, 2014.
- 196 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.
- 197 CHEN, X.; WU, Y.-W. Selective chemical labeling of proteins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 5417–5439, 2016.

- 198 LIM, R.K.V.; LIN, Q. Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions. **Chemical Communications**, v. 46, n. 10, p. 1589–1600, 2010.
- 199 CHALKER, J.M.; BERNARDES, G.J.L.; DAVIS, B.G. A “Tag-and-modify” approach to site-selective protein modification. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 9, p. 730–741, 2011.
- 200 MCGRATH, N.A.; ANDERSEN, K.A.; DAVIS, A.K.F.; LOMAX, J.E.; RAINES, R.T. Diazo compounds for the bioreversible esterification of proteins. **Chemical Science**, v. 6, n. 1, p. 752–755, 2014.
- 201 HE, H.; DING, W.-D.; BERNAN, V.S.; RICHARDSON, A.D.; IRELAND, C.M.; GREENSTEIN, M.; ELLESTAD, G.A.; CARTER, G.T. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from micromonospora lomaivitiensis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 22, p. 5362–5363, 2001.
- 202 MIX, K.A.; ARONOFF, M.R.; RAINES, R.T. Diazo compounds: versatile tools for chemical biology. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 12, p. 3233–3244, 2016.
- 203 FRISCOURT, F.; FAHRNI, C.J.; BOONS, G.-J. Fluorogenic strain-promoted alkyne–diazo cycloadditions. **Chemistry – A European Journal**, v. 21, n. 40, p. 13996–14001, 2015.
- 204 ZHOU, W.; HSIEH, P.-H.; XU, Y.; O’LEARY, T.R.; HUANG, X.; LIU, J. Design and synthesis of active heparan sulfate-based probes. **Chemical Communications**, v. 51, n. 55, p. 11019–11021, 2015.
- 205 ANDERSEN, K.A.; ARONOFF, M.R.; MCGRATH, N.A.; RAINES, R.T. Diazo groups endure metabolism and enable chemoselectivity in cellulo. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 7, p. 2412–2415, 2015.
- 206 JOSA-CULLERÉ, L.; WAINMAN, Y.A.; BRINDLE, K.M.; LEEPER, F.J. Diazo group as a new chemical reporter for bioorthogonal labelling of biomolecules. **RSC Advances**, v. 4, n. 94, p. 52241–52244, 2014.
- 207 IWASA, S.; TAKEZAWA, F.; TUCHIYA, Y.; NISHIYAMA, H. Asymmetric cyclopropanation in protic media conducted by chiral bis(hydroxymethyl-dihydrooxazolyl)pyridine–ruthenium catalysts. **Chemical Communications**, n. 1, p. 59–60, 2001.
- 208 WURZ, R.P.; CHARETTE, A.B. Transition metal-catalyzed cyclopropanation of alkenes in water: catalyst efficiency and in situ generation of the diazo reagent. **Organic Letters**, v. 4, n. 25, p. 4531–4533, 2002.
- 209 IWASA, S.; TSUSHIMA, S.; NISHIYAMA, K.; TSUCHIYA, Y.; TAKEZAWA, F.; NISHIYAMA, H. Catalytic asymmetric cyclopropanation of alkenes with diazoesters in protic and biphasic media. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 7, p. 855–865, 2003.
- 210 CANDEIAS, N.R.; GOIS, P.M.P.; AFONSO, C.A.M. Rh(II) catalysed intramolecular C–H insertion of diazo substrates in water: a simple and efficient approach to catalyst reuse. **Chemical Communications**, n. 3, p. 391–393, 2005.

- 211 CANDEIAS, N.R.; GOIS, P.M.P.; AFONSO, C.A.M. Rh(II)-catalyzed intramolecular c-h insertion of diazo substrates in water: scope and limitations. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 15, p. 5489–5497, 2006.
- 212 ESTEVAN, F.; LLORET, J.; SANAÚ, M.; ÚBEDA, M.A. Enantio- and diastereocontrol in intermolecular cyclopropanation reaction of styrene catalyzed by dirhodium(II) complexes with bulky ortho-metalated aryl phosphines: catalysis in water as solvent. study of a (+)-nonlinear effect. **Organometallics**, v. 25, n. 21, p. 4977–4984, 2006.
- 213 LIAO, M.; WANG, J. Highly efficient [2,3]-sigmatropic rearrangement of sulfur ylide derived from Rh(II) carbene and sulfides in water. **Green Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 184–188, 2007.
- 214 AVIV, I.; GROSS, Z. Iron(III) corroles and porphyrins as superior catalysts for the reactions of diazoacetates with nitrogen- or sulfur-containing nucleophilic substrates: synthetic uses and mechanistic insights. **Chemistry – A European Journal**, v. 14, n. 13, p. 3995–4005, 2008.
- 215 NICOLAS, I.; MAUX, P.L.; SIMONNEAUX, G. Synthesis of chiral water-soluble metalloporphyrins (Fe, Ru,): new catalysts for asymmetric carbene transfer in water. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 40, p. 5793–5795, 2008.
- 216 BORDEAUX, M.; TYAGI, V.; FASAN, R. Highly diastereoselective and enantioselective olefin cyclopropanation using engineered myoglobin-based catalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 6, p. 1744–1748, 2015.
- 217 WALLACE, S.; BALSUS, E.P. Interfacing microbial styrene production with a biocompatible cyclopropanation reaction. **Angewandte Chemie**, v. 127, n. 24, p. 7212–7215, 2015.
- 218 HO, C.-M.; ZHANG, J.-L.; ZHOU, C.-Y.; CHAN, O.-Y.; YAN, J.J.; ZHANG, F.-Y.; HUANG, J.-S.; CHE, C.-M. A water-soluble ruthenium glycosylated porphyrin catalyst for carbenoid transfer reactions in aqueous media with applications in bioconjugation reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 6, p. 1886–1894, 2010.
- 219 ANTOS, J.M.; FRANCIS, M.B. Selective tryptophan modification with rhodium carbenoids in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 33, p. 10256–10257, 2004.
- 220 ANTOS, J.M.; FRANCIS, M.B. Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 253–262, 2006.
- 221 ANTOS, J.M.; MCFARLAND, J.M.; IAVARONE, A.T.; FRANCIS, M.B. Chemoselective tryptophan labeling with rhodium carbenoids at mild pH. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 17, p. 6301–6308, 2009.

- 222 BERNARDIM, B.; CAL, P.M.S.D.; MATOS, M.J.; OLIVEIRA, B.L.; MARTÍNEZ-SÁEZ, N.; ALBUQUERQUE, I.S.; PERKINS, E.; CORZANA, F.; BURTOLOSO, A.C.B.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; BERNARDES, G.J.L. Stoichiometric and irreversible cysteine-selective protein modification using carbonylacrylic reagents. **Nature Communications**, v. 7, p. 13128, 2016.
- 223 FOOTE, M. K. **Quinazoline Derivatives**. GB n. US2010/0168143A1, 01 jul. 2010.
- 224 BERNARDIM DE SOUZA, Barbara. **Síntese de indolizidinas e quinolizidinas diidroxiladas a partir de diazocetonas alfa,beta-insaturadas**. 2013. 238 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 225 ZHOU, Q.-Q.; YUAN, X.; XIAO, Y.-C.; DONG, L.; CHEN, Y.-C. Aminocatalytic asymmetric Diels–Alder reaction of phosphorus dienophiles and 2,4-dienals. **Tetrahedron**, v. 69, n. 48, p. 10369–10374, 2013.
- 226 BHELLA, S.S.; ELANGO, M.; ISHAR, M.P.S. Design, synthesis and conformational analysis of turn inducer cyclopropane scaffolds: microwave assisted amidation of unactivated esters on catalytic solid support to obtain γ -turn mimic scaffolds. **Tetrahedron**, v. 65, n. 1, p. 240–246, 2009.
- 227 GANGJEE, A.; YANG, J.; IHNAT, M.A.; KAMAT, S. Antiangiogenic and antitumor agents: Design, synthesis, and evaluation of novel 2-amino-4-(3-bromoanilino)-6-benzylsubstituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as inhibitors of receptor tyrosine kinases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 5155–5170, 2003.
- 228 ZHENG, Y.; XU, J. Synthesis of enantiopure free and N-benzyloxycarbonyl-protected 3-substituted homotaurines from naturally occurring amino acids. **Tetrahedron**, v. 70, n. 34, p. 5197–5206, 2014.
- 229 KIM, K.S.; KIMBALL, S.D.; MISRA, R.N.; RAWLINS, D.B.; HUNT, J.T.; XIAO, H.-Y.; LU, S.; QIAN, L.; HAN, W.-C.; SHAN, W.; MITT, T.; CAI, Z.-W.; POSS, M.A.; ZHU, H.; SACK, J.S.; TOKARSKI, J.S.; CHANG, C.Y.; PAVLETICH, N.; KAMATH, A.; HUMPHREYS, W.G.; MARATHE, P.; BURSUKER, I.; KELLAR, K.A.; ROONGTA, U.; BATORSKY, R.; MULHERON, J.G.; BOL, D.; FAIRCHILD, C.R.; LEE, F.Y.; WEBSTER, K.R. Discovery of aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2: synthesis, x-ray crystallographic analysis, and biological activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 18, p. 3905–3927, 2002.
- 230 YAMAMOTO, N.; OBORA, Y.; ISHII, Y. Iridium-catalyzed oxidative methyl esterification of primary alcohols and diols with methanol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2937–2941, 2011.
- 231 LI, J.; LEAR, M.J.; HAYASHI, Y. Sterically demanding oxidative amidation of α -substituted malononitriles with amines using O_2 . **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 31, p. 9060–9064, 2016.
- 232 XIE, P.; XIA, C.; HUANG, H. Palladium-catalyzed oxidative aminocarbonylation: a new entry to amides via C–H activation. **Organic Letters**, v. 15, n. 13, p. 3370–3373, 2013.

- 233 NIELSEN, D.U.; NEUMANN, K.; TAANING, R.H.; LINDHARDT, A.T.; MODVIG, A.; SKRYDSTRUP, T. Palladium-catalyzed double carbonylation using near stoichiometric carbon monoxide: expedient access to substituted $^{13}\text{C}_2$ -labeled phenethylamines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 14, p. 6155–6165, 2012.
- 234 LI, J.; SUBRAMANIAM, K.; SMITH, D.; QIAO, J.X.; LI, J.J.; QIAN-CUTRONE, J.; KADOW, J.F.; VITE, G.D.; CHEN, B.-C. AlMe_3 -promoted formation of amides from acids and amines. **Organic Letters**, v. 14, n. 1, p. 214–217, 2012.
- 235 ZHANG, Z.; LIU, Y.; LING, L.; LI, Y.; DONG, Y.; GONG, M.; ZHAO, X.; ZHANG, Y.; WANG, J. Pd-Catalyzed carbonylation of diazo compounds at atmospheric pressure: a catalytic approach to ketenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 12, p. 4330–4341, 2011.
- 236 ABBASOV, M.E.; HUDSON, B.M.; TANTILLO, D.J.; ROMO, D. Acylammonium salts as dienophiles in diels–alder/lactonization organocascades. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 12, p. 4492–4495, 2014.
- 237 DIWISCHEK, Florian. **Development of synthesis pathways and characterization of cerulenin analogues as inhibitors of the fatty acid biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis* and of efflux pump resistant *Candida albicans***. 2008. 225 f. Doctoral Thesis - Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Germany, 2008.
- 238 OOHASHI, T.; KAKUTA, H. **Lysine Oligomer Derivative and Cartilage Tissue Marker Made Thereof**. JP n. EP2826785A1, 21 jan. 2015 .
- 239 FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; CHEESEMAN, J.R.; SCALMANI, G.; CARICATO, M.; HRATCHIAN, H.P.; LI, X.; BARONE, V.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J.A.; PETERSSON, G.A.; SCUSERIA, G.E.; SCHLEGEL, H.B.; NAKATSUJI, H.; IZMAYLOV, A.F.; MARTIN, R.L.; SONNENBERG, J.L.; PERALTA, J.E.; HEYD, J.J.; BROTHERS, E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; ROBB, M.A.; MENNUCCI, B.; KUDIN, K.N.; STAROVEROV, V.N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RENDELL, A.; GOMPERTS, R.; ZAKRZEWSKI, V.G.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H. **Gaussian 09**. Wallingford: Gaussian, 2009. Programa de computador.
- 240 ZHAO, Y.; TRUHLAR, D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, n. 1-3, p. 215–241, 2007.
- 241 SCALMANI, G.; FRISCH, M.J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 11, p. 114110, 2010.
- 242 RIBEIRO, R.F.; MARENICH, A.V.; CRAMER, C.J.; TRUHLAR, D.G. Use of solution-phase vibrational frequencies in continuum models for the free energy of solvation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 49, p. 14556–14562, 2011.
- 243 GONZALEZ, C.; SCHLEGEL, H.B. An improved algorithm for reaction path following. **The Journal of Chemical Physics**, v. 90, n. 4, p. 2154–2161, 1989.
- 244 GONZALEZ, C.; SCHLEGEL, H.B. Reaction path following in mass-weighted internal coordinates. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 94, n. 14, p. 5523–5527, 1990.

Anexos

São anexos os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e os espectros de FTIR referente aos compostos apresentados nesta tese.

8 Anexos

Espectro de distribuição lâmpada de LED

Fonte: dados fornecidos pelo fabricante no arquivo de especificação detalhada do produto.
 Website: <http://www.lighting.philips.com/main/prof/led-lamps-and-systems/led-lamps/master-ledspot-par>
 Mais detalhes: http://www.p4c.philips.com/cgi-bin/zip.pl?p=ZFI&locale=en_AA&d=adam&ids=ADAM-20160215152019698&filename=ZFI-files.zip
 © 2017 Philips Lighting Holding B.V.

Espectro de distribuição lâmpada de Xenônio

Fonte: dados fornecidos pelo fabricante no arquivo de especificação detalhada do produto.
 Website: <http://www.ushio.com/files/specifications/xenon-short-arc-uxl.pdf>
 Mais detalhes: https://www.ushio.co.jp/documents/en/products/light_source/UXL302_O_E.pdf
 © 2006 USHIO America, Inc.