



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

Gean Michel Dal Forno

**REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS DE CLIVAGEM DE LIGAÇÕES C-O E C-C  
MEDIADAS POR PALÁDIO: EXPANDINDO AS ESTRATÉGIAS DA BIOLOGIA  
QUÍMICA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER**

FLORIANÓPOLIS

2022

Gean Michel Dal Forno

**REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS DE CLIVAGEM DE LIGAÇÕES C-O E C-C  
MEDIADAS POR PALÁDIO: EXPANDINDO AS ESTRATÉGIAS DA BIOLOGIA  
QUÍMICA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER**

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

Florianópolis

2022

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

Dal Forno, Gean Michel

Reações bio-ortogonais de clivagem de ligações C-O e C-C  
mediadas por paládio: expandindo as estratégias da  
biologia química para o tratamento do câncer / Gean Michel  
Dal Forno ; orientador, Josiel Barbosa Domingos, 2022.  
175 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Clivagem bio-ortogonal . 3. Clivagem  
Carbono-Carbono. 4. Lapachona. 5. Ativação de pró-fármacos.  
I. Domingos, Josiel Barbosa. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.  
Título.

Gean Michel Dal Forno

**Reações bio-ortogonais de clivagem de ligações C-O e C-C mediadas por paládio:  
expandindo as estratégias da biologia química para o tratamento do câncer**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias

Relator

Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Orientador

Florianópolis, 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, pelo apoio incondicional.

Ao Professor Josiel, minha gratidão pelos conhecimentos transmitidos como pesquisador e orientador.

Aos meus amigos, pelos momentos inesquecíveis e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas atuais e passados de LaCBio.

À Eloah e ao Albert, pela disposição em discutir ideias e resultados.

Ao relator desta tese e aos professores que compõem a banca de avaliação, pela contribuição na correção e discussão deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSC.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de doutorado.

Lutar do lado errado é já perder a guerra.

Do lado certo a gente vence mesmo quando perde.

E quando vence, vence duas vezes.

*(volta da vitória – Don. L, 2021)*

## RESUMO

A clivagem de ligações químicas mediada por metais de transição é uma abordagem promissora para ativação de pró-fármacos quimioterápicos em condições biológicas. O presente trabalho visou contribuir para o desenvolvimento das reações de clivagem bio-ortogonais mediadas por paládio. Este estudo compreende a investigação cinética e mecanística das reações de clivagem C-O e C-C mediadas por paládio e o desenvolvimento de novos pró-fármacos para o tratamento do câncer. Inicialmente, foram determinadas as cinéticas de clivagem da *ligação* C-O de cumarinas protegidas na forma de éteres propargílicos ou alenílicos mediadas pela adição complexos de Pd(II). As reações foram conduzidas em condições biologicamente relevantes e sob monitoramento cinético pela técnica de espectroscopia de UV-visível. Foi observado que o grupo alenílico é mais reativo que o grupo propargílico, sendo o grupo alenil mais indicado para aplicações biológicas. Para reações mediadas pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi observado que a concentração de cloreto no meio reacional afeta a velocidade da clivagem. Considerando que a velocidade da reação de desalenilação aumenta com a diminuição da concentração de íons cloreto no meio, foi possível determinar que a espécie monomérica PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> é a mais ativa na reação, essa espécie está em equilíbrio com outras espécies contendo cloreto menos ativas. Extrapolando para condições biológicas, as reações de clivagem mediadas pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> devem acontecer seletivamente no espaço intracelular, visto que o mesmo possui uma concentração inferior de cloreto, comparado ao meio extracelular. Através dos estudos cinéticos, experimentos de oxirredução/envenenamento e espectrometria de massas com ionização por electrospray, foi possível propor que o mecanismo da reação de *O*-desalenilação é mediada principalmente pela espécie PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, onde a etapa determinante da velocidade seria a hidratação do grupo aleno. A partir destes estudos foi sintetizado um novo pró-fármaco alenílico do fármaco antineoplásico Doxorrubicina. Para o estudo das novas reações de clivagem C-C da orto-quinona β-Lapachona, foram sintetizadas novas α-hidroxicetonas contendo os grupos protetores propargílico e alílico. A β-Lapachona é um produto natural anticancerígeno encontrado no Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*), árvore abundante em solo brasileiro. As novas reações de clivagem C-C foram otimizadas em condições biologicamente relevantes, através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os resultados mostraram que o grupo propargílico é mais reativo frente à espécies de Pd(II). Também foi observado que a clivagem é mais efetiva por nanopartículas de iodeto de paládio(II). Através de cálculos computacionais foi possível propor um mecanismo mediado por Pd(II) para a nova reação de despropargilação, o qual segue através da hidratação da ligação tripla. A nova estratégia de ativação da β-Lapachona foi avaliada em linhagens de células de câncer de mama e leucemia mielogênica aguda. Apesar da literatura descrever apenas clivagens de ligações C-N e C-O, é a primeira vez que é descrita a quebra de ligações C-C de grupos propargil ou alil mediada por metais de transição em meio biológico. A nova metodologia de clivagem C-C expande a possibilidade de ativação da β-Lapachona de forma espacialmente controlada, diminuindo seus efeitos colaterais sistêmicos e ampliando sua aplicação no tratamento do câncer.

**Palavras-chave:** Clivagem bio-ortogonal. Desalenilação. Despropargilação. Clivagem Carbono-Carbono. β-Lapachona. Ativação de pró-fármacos.

## ABSTRACT

Cleavage of chemical bonds mediated by transition metals is a promising approach for activation of chemotherapeutic prodrugs under biological conditions. The present work aimed to contribute to the development of palladium-mediated dissociative bio-orthogonal cleavage reactions. This study comprises the kinetic and mechanistic investigation of palladium-mediated C-O and C-C cleavage reactions and the development of new prodrugs for the treatment of cancer. Initially, the cleavage kinetics of the C-O bond of protected coumarins in the form of propargyl or allenyl ethers mediated by the addition of Pd(II) complexes were determined. The reactions were carried out under biologically relevant conditions and under kinetic monitoring by the UV/visible spectroscopy technique. It was observed that the allenyl group is more reactive than the propargyl group, being the allenyl group more suitable for biological applications. For reactions mediated by the Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> complex, it was observed that the chloride concentration in the reaction medium affects the cleavage rate. Considering that the rate of the dealenylation reaction increases with the decrease of chloride ions concentration in the medium, it was possible to determine that the monomeric specie PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> is the more active in the reaction, this specie is in equilibrium with other less active species. Extrapolating to biological conditions, the cleavage reactions mediated by the Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> complex must happen selectively in the intracellular space, since it has a lower concentration of chloride, compared to the extracellular medium. Through kinetic studies, redox/poisoning experiments and electrospray ionization mass spectrometry, it was possible to propose that the mechanism of *O*-dealenylation reaction is mediated mainly by PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, where the rate-determining step would be the hydration of the allene group. From these studies a new allenyl prodrug of the anticancer drug Doxorubicin was synthesized. To study the new C-C cleavage reactions of the ortho-quinone β-Lapachone, new α-hydroxyketones containing the propargyl and allylic protecting groups were synthesized. β-Lapachone is an anticancer natural product found in Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*), a tree abundant in Brazilian soil. The new C-C cleavage reactions were optimized under physiologically relevant conditions, using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The results showed that the propargylic group is more reactive with Pd(II) species. It was also observed that cleavage is more effective by palladium (II) iodide nanoparticles. Through computational calculations it was possible to propose a mechanism mediated by Pd(II) for the new depropargylation reaction, which follows through hydration of the triple bond. The novel β-Lapachone activation strategy was evaluated in breast cancer and acute myelogenous leukemia cells lines. Although the literature describes cleavages of C-N and C-O bonds, it is the first time that the cleavage of C-C bonds of propargyl or allyl groups mediated by transition metals in a biological environment are described. The new C-C cleavage methodology expands the possibility of activating β-Lapachone in a spatially controlled manner, decreasing its systemic side effects and expanding its application in cancer treatment.

**Keywords:** Bioorthogonal cleavage. De-allenylation. Depropargylation. Carbon-Carbon cleavage, β-Lapachone, Activation of prodrugs.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Estruturas dos produtos naturais Lapachol e $\beta$ -Lapachona, encontrados no Ipê Roxo. ....  | 44 |
| Figura 2 – Exemplos de pró-fármacos da $\beta$ -Lapachona desenvolvidos até o momento.....  | 47 |
| Figura 3 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ a 200 MHz do Alle-C em $\text{CDCl}_3$ .....  | 70 |
| Figura 4 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ a 400 MHz do AOBC-DOX em $\text{CDCl}_3$ . ....   | 71 |
| Figura 5 – Ampliação dos sinais do espectro de RMN $^1\text{H}$ a 400 MHz do AOBC-DOX em $\text{CDCl}_3$ . ....   | 72 |
| Figura 6 - (a) Espectros de UV-vis para diferentes concentrações da 4-MU. (b) curva de calibração para 4-MU. (c e d) Espectros UV-vis sobrepostos das cumarinas protegidas e sua respectiva cumarina desprotegida.....  | 74 |
| Figura 7 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU, acompanhado por espectrofotometria de UV-vis em 364 nm.....  | 75 |
| Figura 8 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU, acompanhado por espectrofotometria de UV-vis em 364 nm.....  | 75 |
| Figura 9 - Ajuste de primeira ordem para a desproteção do substrato (a) Prop-4-MU e (b) Alle-4-MU.....  | 76 |
| Figura 10 - Perfil de cinética e decovulação do substrato Alle-4-MU. ....   | 77 |
| Figura 11 - Efeito do Ascobato de Sódio e EDTA no perfil cinético de desalenilação mediada por $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ .....   | 78 |
| Figura 12 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU .....  | 80 |
| Figura 13 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU .....  | 80 |
| Figura 14 - Efeito do tampão nos perfis cinéticos das reações mediadas por $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . ....  | 82 |
| Figura 15 - Efeito do tampão nos perfis cinéticos das reações mediadas por $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ .....   | 82 |
| Figura 16 - Perfis cinéticos de reação de despropargilação mediada por $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ com variação da concentração de $\text{NaCl}$ .....   | 83 |
| Figura 17 - Perfis cinéticos de reação de desalenilação mediada por $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ com variação da concentração de $\text{NaCl}$ .....  | 83 |
| Figura 18 - Espectro de UV-vis do complexo $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ após o equilíbrio (150 min).....  | 85 |
| Figura 19 - Estudo cinético do complexo $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em $\text{D}_2\text{O}$ (10% $\text{DMSO-}d_6$ ) monitorado por $^1\text{H}$ RMN (200 MHz). (a) Ausência de $\text{NaCl}$ , (b) $\text{NaCl}$ ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .... | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 20 - Efeito do Ascobato de Sódio e EDTA no perfil cinético de desalenilação mediada por Pd <sub>2</sub> Allyl <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....   | 87  |
| Figura 21 - A dependência da temperatura na constante de velocidade da reação da Alle-4-MU mediada por Pd <sub>2</sub> Allyl <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , na forma de gráfico de Eyring.....  | 88  |
| Figura 22 - A dependência da força iônica na constante de velocidade da reação de desalenilação da Alle-4-MU mediada por Pd <sub>2</sub> Allyl <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . ....  | 89  |
| Figura 23 - Perfis cinéticos de reação de desalenilação mediada por PdAllylCl(PPh <sub>2</sub> (4-AC-Ph)) nos tampões fosfato (TF) e em PBS. ....   | 90  |
| Figura 24 - Espectros experimental e calculado de ESI-MS(+) das espécies de AllylPd observadas em solução na reação de clivagem C-O do substrato Alle-4-MU pelo complexo Pd <sub>2</sub> Allyl <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> em água. .... | 92  |
| Figura 25 - Citotoxicidade do pró-fármaco AOBC-Dox em comparação com a DOX em cultura de celular (A549). (a) AOBC-Dox por 48 h. (b) Dox por 48 h. ....  | 95  |
| Figura 26 - Citotoxicidade do complexo Pd <sub>2</sub> Allyl <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> em cultura de celular (A549) por 48 h. ....   | 95  |
| Figura 27 – Reação de <i>O</i> -Desalenilação intracelular mediada pelo complexo PdAllyl(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>   | 96  |
| Figura 28 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 700 MHz da Prop-Lap em CDCl <sub>3</sub> . ....  | 100 |
| Figura 29 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} a 150 MHz da Prop-Lap em CDCl <sub>3</sub> , em vermelho DEPT-135.....   | 101 |
| Figura 30 – Cromatograma (LC-MS - m/z 243) e Curva de Calibração da β-Lap.....  | 104 |
| Figura 31 - Superfícies de energia potencial (PES) calculadas para a eliminação dos derivados Prop-Lap (verde), Alil-Lap (laranja) e Propil-Lap (cinza).....  | 108 |
| Figura 32 - Perfil energético (kcal mol <sup>-1</sup> ) calculado para a reação de despropargilação da Prop-Lap mediada por [PdCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup> .....  | 109 |
| Figura 33 - Superfícies de energia potencial (PES) calculadas para a eliminação dos intermediários A (azul), B (roxo), C (vermelho) e D (verde). ....   | 109 |
| Figura 34 - Geometrias para os reagentes ( <b>A</b> ), estados de transição ( <b>TS1,2</b> ), intermediários ( <b>B-D</b> ) e produtos ( <b>E,F</b> ) para a reação calculada.. ....  | 110 |
| Figura 35 - Citotoxicidade do pró-fármaco Prop-Lap em comparação com a β-Lap em cultura de celular, determinada pelo ensaio CellTiter-Blue®. (a) SKBR3 por 48 h. (b) MOLM13 por 48 h.....   | 112 |
| Figura 36 - Viabilidade das células SKBR3 e MOLM13 após o tratamento com o pró-fármaco Prop-Lap e Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> .. ....   | 113 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 37 - Viabilidade da célula SKBR3 após o tratamento com o pró-fármaco Prop-Lap e Pd(0)-NPs ou PdI <sub>2</sub> -NPs, após 72 horas.....                | 114 |
| Figura 38 - Viabilidade da célula MOLM13 após o tratamento com o pró-fármaco Prop-Lap e Pd(0)-NPs ou PdI <sub>2</sub> -NPs, após 48 horas.....               | 114 |
| Figura 39 – Cromotograma (LC-MS) dos canais específicos das espécies da reação de desproteção da POA-Lap mediado por Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> ..... | 117 |
| Figura 40 - Cromotograma (LC-MS – TIC(+)) da reação de desproteção da POA-Lap por complexos de Pd(II).....   | 117 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1 - Constantes de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a reação de desalenilação da Alle-4-MU catalisada por Pd <sub>2</sub> Allyl <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> em diferentes concentrações de cloreto..... | 84  |
| Tabela 2 - Distribuição percentual das espécies PdAllylXY em equilíbrio em tampão fosfato (pH 7,4), em diferentes concentrações de cloreto.....  | 86  |
| Tabela 3 – Otimização da reação de clivagem C-C mediada por Paládio em condições biorrelevantes.....   | 103 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2,4-DNPPE – 2,4-Dinitrofenol propargil éter
- 4-MU – 4-Metilumbeliferona
- 5FU – 5-Fluorouracila
- 5-LO – 5-lipoxigenase
- A549 – Linhagem de células humanas de adenocarcinoma pulmonar de pequenas células
- Alil – Grupo alila
- Alle – Grupo 1,2-alenil
- Alloc – Aliloxicarbonil
- Ally – Grupo alil
- ATP – Adenosina trifosfato
- Caco-2 – Linhagem de células humanas de adenocarcinoma colorretal
- CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio deuterado
- CHO – Linhagem de células ovário de hamster chinês
- DFT – Teoria do funcional da densidade
- DLS – Espalhamento dinâmico de luz
- DMF – N,N-dimetilformamida
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DOX – Fármaco antineoplásico Doxorrubicina
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- ESI-HRMS – Espectrometria de Massas de alta resolução com Ionização Eletrospray
- ESI-MS – Espectrometria de Massas com Ionização Eletrospray
- EXAFS – Espectroscopia de absorção de raios X da estrutura fina estendida
- GFP – *Green fluorescent protein*
- HCT116 – Linhagem de células humanas de câncer de cólon
- HEK293T – Linhagem de células humanas de rim embrionárias
- HeLa – Linhagem de células de câncer cervical de Henrietta Lacks
- HER2 – Proteína localizada na membrana das células cancerígenas
- HPLC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
- HRMS – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

HRTEM – Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

$k$  – Constante de velocidade

$k_2$  – Constante de velocidade de segunda ordem

$k_{obs}$  – Constante de velocidade observada

$\lambda_{max}$  – Comprimento de onda máximo

MMAE – Fármaco antineoplásico monometilauristatina E

MOLM13 – Linhagem de células humanas de leucemia mielogênica aguda

NAD(P)H – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NIH3T3 – Linhagem de células de fibroblastos embrionários de camundongo

NQO1 – Enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1

OmpC – Membrana externa de proteína C

PBS – Tampão fosfato-salino

Pd(0)-NPs – Nanopartículas de paládio com valência zero

Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Dímero de cloreto de alil paládio(II)

PdI<sub>2</sub>-NPs – Nanopartículas de iodeto de paládio(II)

pf. – Ponto de Fusão

Ph – Grupo fenila

pH – Potencial hidrogeniônico

PPh<sub>3</sub> – Trifenil fosfina

Pro-5FU – 5-Fluoro-1-propargiluracila

Proc – Propargiloxicarbonil

Prop – Grupo propargil

RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SKBR3 – Linhagem de células humanas de câncer de mama metastático NQO1+

*t*-BuOK – Terc-butóxido de potássio

THF – Tetrahidrofurano

TON – Número de *turnover*

U87 – Linhagem de células humanas de glioblastoma

UV-vis – Espectroscopia no Ultravioleta Visível

XANES – Espectroscopia de absorção de raios X próximo à borda

XAS – Espectroscopia de absorção de raios X

$\beta$ -Lap – Produto natural  $\beta$ -Lapachona

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>15</b> |
| 1.1          | Objetivos .....   | 17        |
| <b>1.1.1</b> | <b>Objetivo Geral</b> .....   | <b>17</b> |
| 1.1.1.1      | <i>Objetivos específicos</i> .....  | 17        |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>19</b> |
| 2.1          | QUÍMICA BIO-ORTOGONAL .....   | 19        |
| <b>2.1.1</b> | <b>Reações bio-ortogonais mediadas por metais de transição</b> .....                    | <b>20</b> |
| 2.1.1.1      | <i>Reações de desproteção mediadas por paládio em células vivas</i> .....               | 27        |
| 2.1.1.2      | <i>Reações de O-desalenição mediadas por paládio</i> .....                              | 35        |
| 2.1.1.3      | <i>Mecanismos para Reações de desproteção mediadas por paládio</i> .....                | 38        |
| <b>2.1.2</b> | <b><math>\beta</math>-Lapachona no tratamento do câncer</b> .....                       | <b>43</b> |
| <b>3</b>     | <b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....  | <b>51</b> |
| 3.1          | MATERIAS .....  | 51        |
| 3.2          | MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....   | 51        |
| <b>3.2.1</b> | <b>Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear</b> .....                            | <b>51</b> |
| <b>3.2.2</b> | <b>Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis)</b> .....                            | <b>52</b> |
| <b>3.2.3</b> | <b>Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-MS)</b>              | <b>53</b> |
| <b>3.2.4</b> | <b>Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS)</b> .....           | <b>53</b> |
| <b>3.2.5</b> | <b>Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)</b> .....                          | <b>53</b> |
| <b>3.2.6</b> | <b>Métodos Computacionais</b> .....   | <b>54</b> |
| <b>3.2.7</b> | <b>Cultura Celular</b> .....  | <b>55</b> |
| 3.3          | SÍNTESE DOS SUBSTRATOS (PRÓ-FLUORÓFOROS E PRÓ-FÁRMACOS) E DOS COMPLEXOS METÁLICOS ..... | 57        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Síntese da 7-(2-propinil)-oxi-4-metil-cumarina (Prop-4-MU)</b> .....                 | <b>57</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Síntese do 7-(1,2-alenil)-oxi-4-metil-cumarina (Alle-4-MU)</b> .....                 | <b>58</b> |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 3.3.3   | Síntese do 4-nitrofenil-(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil carbonato (Alle-C)  | 59  |
| 3.3.4   | Síntese do (4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil-oxi-carbonil-doxorrubicina (AOBC-DOX)  | 60  |
| 3.3.5   | Síntese do Lapachol  | 62  |
| 3.3.6   | Síntese da $\beta$ -Lapachona  | 62  |
| 3.3.7   | Síntese das novas $\alpha$ -hidroxicetonas da $\beta$ -Lapachona   | 63  |
| 3.3.8   | Síntese dos Complexos de Paládio   | 66  |
| 3.3.8.1 | Síntese do complexo $Pd_2Allyl_2Cl_2$  | 66  |
| 3.3.8.2 | Síntese dos complexos ( $\eta^3$ -alil)cloro(fosfina)paládio(II)   | 66  |
| 4       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>   | 68  |
| 4.1     | CLIVAGEM DE LIGAÇÕES C-O, REAÇÃO DE O-DESALENILAÇÃO MEDIADA POR PALÁDIO(II): ESTUDO MECANÍSTICO E EFEITO DO CLORETO NO MEIO REACIONAL            | 68  |
| 4.1.1   | Síntese e Caracterização dos substratos para as Reações de Clivagem C-O  | 68  |
| 4.1.2   | Estudos Cinéticos das Reação de Clivagem C-O   | 73  |
| 4.1.3   | ESI-MS da clivagem C-O do substrato Alle-4-MU pelo complexo $Pd_2Allyl_2Cl_2$  | 91  |
| 4.1.4   | Reação de Clivagem C-O Mediada pelo complexo $Pd_2Allyl_2Cl_2$ em Cultura Celular  | 93  |
| 4.1.5   | Conclusões e Perspectivas  | 96  |
| 4.2     | CLIVAGEM DE LIGAÇÕES C-C NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-FÁRMACOS DA $\beta$ -LAPACHONA MEDIADA POR PALÁDIO: UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER | 98  |
| 4.2.1   | Síntese e caracterização dos novos pró-fármacos da $\beta$ -Lapachona  | 98  |
| 4.2.2   | Otimização da reação de clivagem C-C dos pró-fármacos da $\beta$ -Lapachona mediada por Paládio  | 102 |
| 4.2.3   | ESI-MS(+) da clivagem C-C dos substratos Prop-Lap e Alil-Lap   | 106 |



|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.2.4 | Estudo Computacional do Mecanismo da Reação de Clivagem C-C Mediada por Paládio(II).....   | 107 |
| 4.2.5 | Reação de Clivagem C-C do Prop-Lap Mediada por Nanopartículas de Paládio(II) em Cultura Celular .....                                  | 110 |
| 4.2.6 | Desproteção do pró-fármaco POA-Lap: Resultados iniciais e perspectivas   | 115 |
| 4.2.7 | Conclusões e Perspectivas.....   | 119 |
| 5     | CONCLUSÃO.....   | 121 |
|       | REFERÊNCIAS.....   | 122 |
|       | ANEXO A – ESPECTROS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ .....  | 137 |
|       | ANEXO B – CONSTANTES DE SEGUNDA ORDEM PARA AS REAÇÕES DE CLIVAGEM C-O .....  | 150 |
|       | ANEXO C – ESPECTROS DE MASSAS (ESI-MS) DA REAÇÃO DE O-DESALENILAÇÃO MEDIADA PELO COMPLEXO $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ ..... | 154 |
|       | ANEXO D – ESPECTROS DE MASSAS (ESI-MS) DAS REAÇÕES DE CLIVAGEM C-C.....  | 157 |
|       | ANEXO E – DADOS NUMÉRICOS DOS CÁLCULOS TEÓRICOS DA CLIVAGEM C-C.....   | 162 |
|       | ANEXO F – ESTABILIDADE DO PROP-LAP NOS MEIOS DE CULTURA .....  | 171 |

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a catálise de reações orgânicas por metais gerou um grande impacto no desenvolvimento de novas tecnologias industriais e facilitou o avanço da ciência em diferentes áreas. Ao longo do tempo, estudos mecanísticos vem desvendando a natureza das transformações catalíticas metálicas. Várias espécies metálicas podem ser geradas em solução, e pelo menos uma delas deve exibir a atividade catalítica desejada.<sup>1</sup> Portanto, a compreensão da dinâmica das reações mediadas por metais é um dos principais fatores para o desenvolvimento racional de uma nova geração de catalisadores metálicos.

Diversos trabalhos têm demonstrando a aplicação de metais de transição na mediação de reações químicas em sistemas biológicos. Quando essas reações ocorrem sem afetar os processos bioquímicos, elas pertencem ao campo da química bio-ortogonal.<sup>2-4</sup> As reações bio-ortogonais mediadas por metais via mecanismo organometálico possuem elevado potencial na manipulação estrutural/funcional de biomoléculas e moléculas abióticas, com impacto mínimo nos processos bioquímicos celulares. Contudo, diversos desafios ainda são enfrentados na aplicação de catalisadores metálicos em ambiente celular, para que se permita em última instância, alcançar o objetivo do desenvolvimento de tratamentos clínicos em animais vivos e, conseqüentemente em humanos.<sup>5-7</sup>

Avanços recentes sugerem que metais de transição abióticos podem promover reações intracelulares através de mecanismos organometálicos. Nesse campo, catalisadores a base de paládio vêm ganhando atenção, principalmente devido às excelentes propriedades catalíticas bem conhecidas deste metal. Dentre as diversas reações bio-ortogonais, as reações dissociativas (clivagem/desproteção) catalisadas por paládio destacam-se como uma estratégia na ativação de pequenas moléculas e biomoléculas *in vitro* e *in vivo*.<sup>8</sup> A literatura demonstra que o paládio, na forma de complexos ou nanopartículas, pode induzir a clivagem de ligações C-O e C-N em substratos protegidos com grupos propargílicos, alílicos e alenílicos em meio biológico.<sup>2,9</sup> Entretanto, existem poucas menções na literatura sobre o efeito do meio ou propostas mecanísticas em condições biológicas para estas reações. Como, o efeito dos estados de valência do metal.

O entendimento da dinâmica destas reações é um dos principais esforços para o desenvolvimento de metodologias mais efetivas, ou seja, reações quimioespecíficas, com cinéticas rápidas e com grupos protetores e catalisadores estáveis e atóxicos em meio celular.<sup>10</sup>

Visto que as reações são projetadas para o meio biológico, um ambiente extremamente complexo, uma abordagem multidisciplinar é necessária, utilizando ferramentas da química e da biologia química, bem como instrumentos de última geração, uma tarefa nada trivial.<sup>7</sup> Normalmente, os estudos seguem um processo de aumento da complexidade. Inicia-se com o estudo de bancada em frasco reacional, passando para cultura celular, animais e, finalmente, em seres humanos.

Neste sentido, este trabalho busca avançar no conhecimento dos mecanismos envolvidos na quebra de ligações C-O e C-C de substratos propargílicos, alílicos e alenílicos mediadas por paládio, por meio de estudos sistemáticos cinéticos e espectroscópicos. Estes estudos são parte do desenvolvimento novas reações bio-ortogonais dissociativas, na ativação de pró-fármacos para o tratamento do câncer.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 **Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo principal contribuir para o desenvolvimento das reações de clivagem bio-ortogonais mediadas por paládio. Para isso, esta tese aborda dois aspectos complementares. Os estudos cinéticos e mecanísticos das reações de clivagem C-O e C-C mediadas por paládio e o desenvolvimento de novos pró-fármacos. Espera-se que com estudos sistemáticos possa-se compreender o ciclo catalítico das reações estudadas, visando o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para a ativação de pró-fármacos em células cancerosas.

O projeto é subdividido no estudo de dois sistemas, primeiramente as reações de clivagem C-O e posteriormente, o estudo das novas reações de clivagem C-C. Os objetivos específicos para os dois sistemas são semelhantes.

#### *1.1.1.1 Objetivos específicos*

- Sintetizar substratos e pró-fármacos ativáveis por paládio;
- Estudar as reações de clivagem dos substratos e pró-fármacos em condições biológicas;
- Propor mecanismos para as reações de clivagem C-O e C-C;
- Estudar a ativação dos novos pró-fármacos mediada por paládio em cultura celular;

Para alcançar os objetivos específicos, foram propostas as seguintes metas para cada sistema:

### **Clivagem de ligações C-O**

- Investigação da reatividade de complexos de paládio (II) frente à catálise da quebra da ligação C-O dos substratos Prop-4-MU e Alle-4-MU;
- Estudo do efeito da concentração de cloreto no meio reacional nas reações mediadas pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;
- Obtenção das constantes cinéticas e experimentos de envenenamento para os sistemas estudados;
- Caracterização do meio reacional por ESI-MS da clivagem C-O do substrato Alle-4-MU mediada pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;
- Propor um mecanismo para a reação de *O*-desalenição mediada pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- Desenvolver um novo pró-fármaco da Doxorubicina contendo o grupo protetor *O*-Alenil (AOBC-DOX);
- Estudo da ativação do novo pró-fármaco mediada pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em cultura celular.

### **Clivagem de ligações C-C**

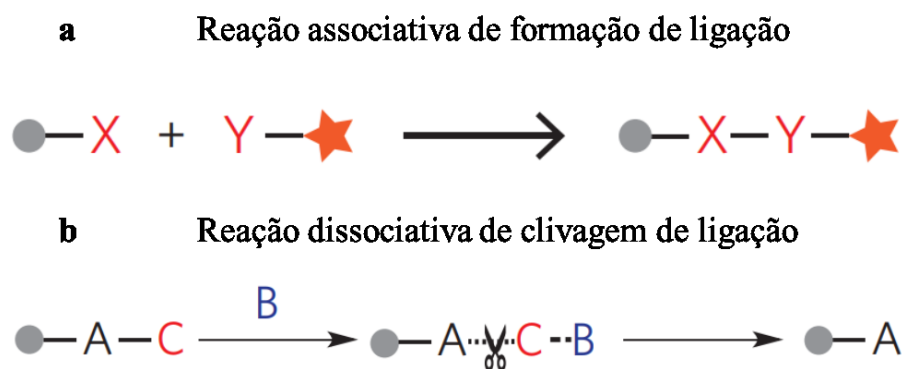
- Síntese e caracterização de novas  $\alpha$ -hidroxicetonas derivadas da  $\beta$ -Lapachona;
- Otimização da nova reação de clivagem C-C dos pró-fármacos da  $\beta$ -Lapachona mediada por paládio;
- Caracterização do meio reacional por ESI-MS da clivagem C-C dos substratos Prop-Lap e Alil-Lap;
- Propor um mecanismo para a reação de clivagem C-C mediada por paládio(II);
- Estudo da ativação do pró-fármaco Prop-Lap mediada por PdI<sub>2</sub>-NPs em cultura celular;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 QUÍMICA BIO-ORTOGONAL

O termo Química Bio-ortogonal foi proposto por Carolyn R. Bertozzi em 2003 e refere-se ao planejamento e realização de reações químicas em sistemas vivos sem interferência, e sem interferir, dos processos bioquímicos nativos.<sup>11</sup> Essas reações são ferramentas com elevado potencial para a investigação e manipulação de processos biológicos e ativação de moléculas abióticas em sistemas vivos de elevada complexidade. A química bio-ortogonal desenvolveu-se em seu início com reações associativas na formação de ligações, consistindo em reações entre dois pares atóxicos, estáveis e biocompatíveis, que reagem sob condições biológicas (Esquema 1a). Posteriormente, em uma direção oposta, as reações dissociativas na clivagem de ligações vem recebendo grande atenção. Essas reações consistem na remoção de um grupo protetor, através da presença de um gatilho (Esquema 1b), essas reações se destacam principalmente na ativação de pró-fármacos.<sup>12</sup>

Esquema 1 - Reações bio-ortogonais (a) associativas e (b) dissociativas.



Fonte: Adaptado com permissão de *Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry*.<sup>12</sup> Copyright (2016) Nature Publishing Group.

Para ser considerada bio-ortogonal, uma reação deve preencher os seguintes requisitos: seletividade, inércia biológica e química, altas taxas reacionais, engenharia acessível e biocompatibilidade. Atualmente diversas reações são projetadas para preencherem esses requisitos: cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e ciclo-octinos, cicloadição 1,3-dipolar entre nitronas e ciclo-octinos, formação de oxima/hidrazona a partir de aldeídos e cetonas, a ligação da tetrazina, acoplamento carbono-carbono e desproteções catalisada por metais, entre outras.<sup>13</sup>

Essas reações bio-ortogonais vem sendo avaliadas em sistemas vivos, entretanto, a maioria delas não cumprem todos esses critérios, frequentemente são limitadas por taxas de reação lentas, reatividade cruzada com biomoléculas, instabilidade às condições biológicas ou toxicidade. Desde a sua introdução, o repertório de reações bio-ortogonais tem expandido de forma constante. Novas reações permitirão diversas oportunidades de aplicações, particularmente quando a velocidade, a estabilidade e a toxicidade forem otimizadas. Finalmente, as aplicações *in vivo* se tornarão comuns, permitindo em última análise, o desenvolvimento de tratamentos clínicos altamente efetivos.<sup>14</sup> Em 2020, a primeira terapia baseada na química bio-ortogonal entrou em estudos clínicos de fase I, demonstrando a potencialidade e o rápido desenvolvimento das reações bio-ortogonais na ativação de pró-fármacos.<sup>15,16</sup>

### 2.1.1 Reações bio-ortogonais mediadas por metais de transição

As reações de formação de ligações carbono-carbono e carbono-heteroátomo catalisadas por metais de transição são atualmente ferramentas indispensáveis para químicos sintéticos na realização de reações químicas que antes eram consideradas impossíveis. Estas reações vêm sendo utilizadas e otimizadas para a obtenção de estruturas moleculares de elevada complexidade, introduzindo processos industriais com elevada economia atômica em diferentes áreas da cadeia econômica, incluindo a de produtos naturais, medicinais e de materiais.<sup>17</sup>

A exploração da atividade catalítica destes metais possibilita a realização de transformações químicas energeticamente desfavoráveis, uma vez que estes proporcionam caminhos reacionais com menores energias de ativação, quando comparadas ao caminho reacional da reação não catalisada. Entre as inúmeras transformações empregadas na química medicinal, reações de acoplamento cruzado catalisadas por complexos de Pd ocupam uma posição de destaque, sendo este responsável por aproximadamente 17% da totalidade de transformações empregadas na síntese de fármacos.<sup>18,19</sup>

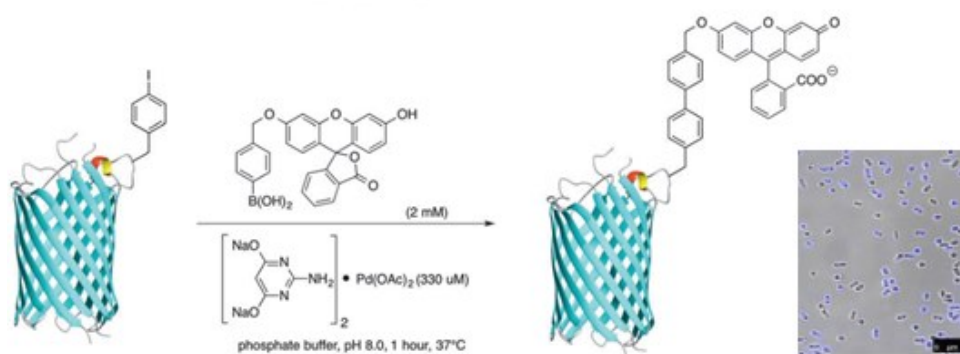
A catálise organometálica em água é um campo de pesquisa que, recentemente, ganhou força dentro do conceito de "química verde". Deste modo, nos últimos anos diversos trabalhos têm apresentado reações catalisadas por metais em água incluindo acoplamentos, isomerizações, ciclizações, cicloadições e hidrólises.<sup>5</sup> Dado que o solvente dos sistemas vivos é a água, não é difícil imaginar que algumas dessas transformações possam ser alcançadas em meios biocompatíveis. No entanto, a complexidade do meio biológico, devido à presença de

uma alta concentração de componentes celulares, como tióis ou amins, que podem envenenar ou degradar o catalisador metálico inibindo sua atividade catalítica, dificultam esse objetivo.<sup>6</sup>

Visto que diversos metais de transição não são normalmente encontrados na natureza, a maioria das reações mediadas por esses metais, não são naturalmente encontradas no ambiente biológico, como em bactérias ou células de mamíferos. Portanto, a aplicação desses metais em meio biológico é particularmente atrativa no desenvolvimento de sistemas catalíticos abióticos, capazes de desenvolver novas reações químicas no interior de células vivas, com o objetivo de desenvolver novas transformações relevantes em sistemas vivos.<sup>21</sup>

Os primeiros exemplos de sucesso do paládio mediando reações em sistemas biológicos foram com reações associativas de acoplamento carbono-carbono, as quais são amplamente desenvolvidas na área da síntese orgânica, conforme citado anteriormente.<sup>22, 23, 24, 25, 26</sup> Como exemplo, destaca-se o trabalho de 2012 de Spicer e colaboradores, na modificação da superfície celular através do acoplamento Suzuki-Miyaura. Neste trabalho, foi possível inserir um grupo fluorescente na proteína transmembrana modificada OmpC presente na superfície celular da bactéria *Escherichia coli*, com o objetivo de imageamento, resultando em bactérias azuis (Esquema 2).

Esquema 2 - Acoplamento Suzuki-Miyaura em bactérias.



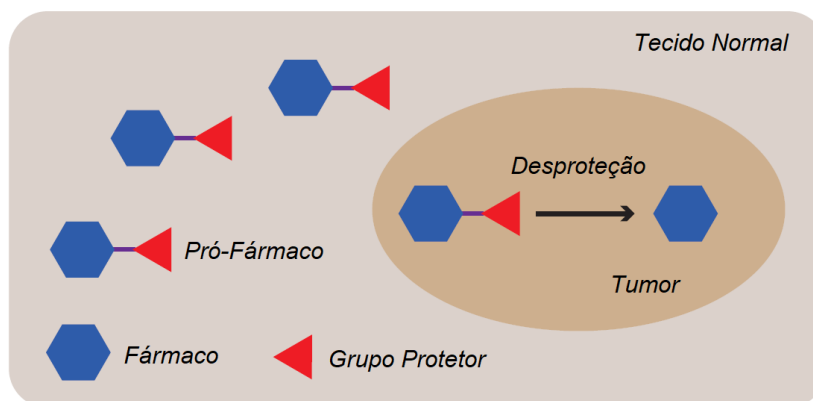
Fonte: Adaptado com permissão de *Palladium-Mediated Cell-Surface Labeling*.<sup>27</sup> Copyright (2012) American Chemical Society.

Embora as reações de formação de ligações (reações associativas) mostraram o potencial da aplicação de metais de transição em meio biológico, a clivagem de ligações por metais abióticos (reações dissociativas) vem ganhando grande destaque. Esse interesse está focado principalmente na possibilidade de ativação de fármacos protegidos (pró-fármacos), para liberação de uma molécula bioativa (fármaco) diretamente em seu local de ação (tumor),



reduzindo as interações não desejadas e, conseqüentemente, diminuindo os efeitos colaterais gerados pelo fármaco. Essa estratégia torna-se especialmente interessante se a proteção da molécula reduz significativamente a bioatividade do agente ativo (Esquema 3).<sup>28</sup>

Esquema 3 - Ativação bio-ortogonal seletiva de um pró-fármaco.



Fonte: Adaptado com permissão de *Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry*.<sup>12</sup> Copyright (2016) Nature Publishing Group.

A clivagem de ligações é prática recorrente na síntese orgânica, principalmente quando se faz necessária a proteção e a desproteção de grupos funcionais de moléculas complexas.<sup>29</sup> Quando a reação de desproteção é quimiospecífica, ou seja, não há reações com outros grupos ou demais constituintes do meio reacional, esta reação é dita seguir os princípios da ortogonalidade química.<sup>30</sup> Reações de desproteção bio-ortogonais podem ser classificadas em subgrupos dependendo da natureza do ativante, elas podem ser desencadeadas por luz, pH, enzimas, pequenas moléculas ou metais de transição.<sup>31</sup>

O primeiro exemplo demonstrando a aplicação de metais de transição em reações de desproteção no interior de células vivas foi descrito por Meggers e Streu em 2006, na clivagem de grupos alilcarbamatos mediada por complexos de rutênio(II). As reações foram aplicadas na liberação de moléculas fluorescentes (rodamina 110) no interior de células HeLa, onde foi possível observar, através de microscopia confocal, fluorescência no citoplasma das células devido a liberação do fluoróforo.<sup>32</sup>

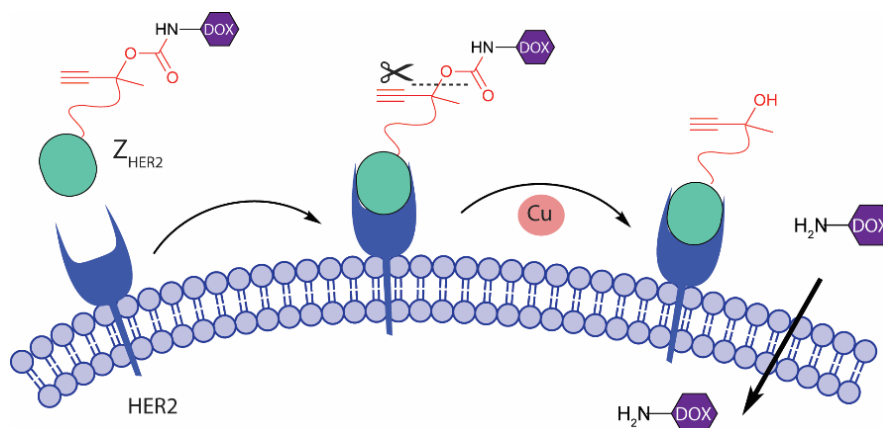
Seguindo este trabalho, Bradley e Unciti-Broceta, em 2011, desenvolveram pela primeira vez nanopartículas heterogêneas de Pd(0), suportadas em microesferas de poliestireno, capazes de atravessar as membranas celulares, atuando como catalisadores na desproteção de grupos alilcarbamatos ou no acoplamento cruzado Suzuki-Miyaura, em células HeLa.<sup>8</sup>

Posteriormente, Weiss e Unciti-Broceta utilizaram nanopartículas de Pd(0) suportadas em resina, na reação de despropargilação do pró-fármaco 5-fluoro-1-propargiluracila (Pro-5FU).<sup>33</sup>

Em 2017, Pérez-López e Unciti-Broceta expandiram o escopo das reações de despropargilação, pela utilização de nanopartículas suportadas de Au(0) como catalisadores na ativação de diversos fármacos em cultura celular e na ativação de moléculas fluorescentes (rodamina 110) em peixes zebra.<sup>34</sup>

Em 2013, Finn e colaboradores demonstram a desproteção do grupo propargil dissubstituído pelo complexo de Cu(I)-tris(3-hidroxi-propil-triazolilmetil)amina) em condições biorrelevantes (37 °C, em H<sub>2</sub>O). A substituição no grupo propargil acelera a reação, em contraste com os outros metais, indicando um mecanismo diferente mediado por cobre.<sup>35</sup> Recentemente, Chen e colaboradores aplicaram a despropargilação mediada por cobre(I) *in vivo* na liberação do fármaco DOX, o qual foi conjugado a um anticorpo direcionador para células HER2 positivas, utilizando um dos substituintes do grupo propargil para conjugar o anticorpo (Esquema 4).<sup>36</sup>

Esquema 4 - Desproteção do conjugado anticorpo-fármaco Dox-DMProc-ZHER2 mediada por cobre(I) em células HER2 positivas.



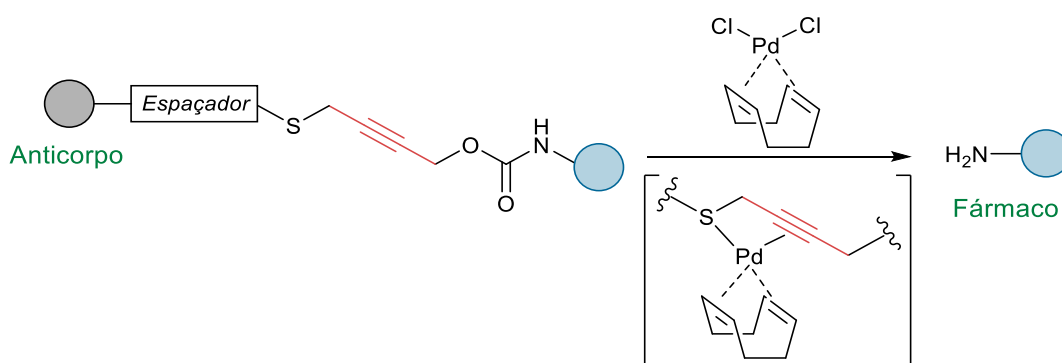
Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

O paládio é usado principalmente na clivagem de grupos protetores monofuncionais, entretanto, grupos bifuncionais mostram ter potencial em aplicações terapêuticas, principalmente no desenvolvimento de novos conjugados de anticorpo-fármaco (do inglês, *antibody-drug conjugates (ADCs)*). Os quais surgem como uma nova classe de biofármacos que combinam a especificidade dos anticorpos com a liberação tumor-seletiva de fármacos.<sup>37</sup>

Em 2018, Stenton e coautores desenvolveram o grupo bifuncional propargil carbamato tioéter que contém simultaneamente um anticorpo (para células HER2 positivas) e um pró-

fármaco (Esquema 5).<sup>38</sup> Entre diversos grupos avaliados, contendo S, N, O ou C entre o espaçador e o propargil, a presença do enxofre aumentou a eficiência da reação de clivagem. Observou-se um efeito direcionador devido a interação entre o átomo de enxofre e o paládio.

Esquema 5 - Desproteção do grupo bifuncional propargil carbamato tio éter mediada por paládio.

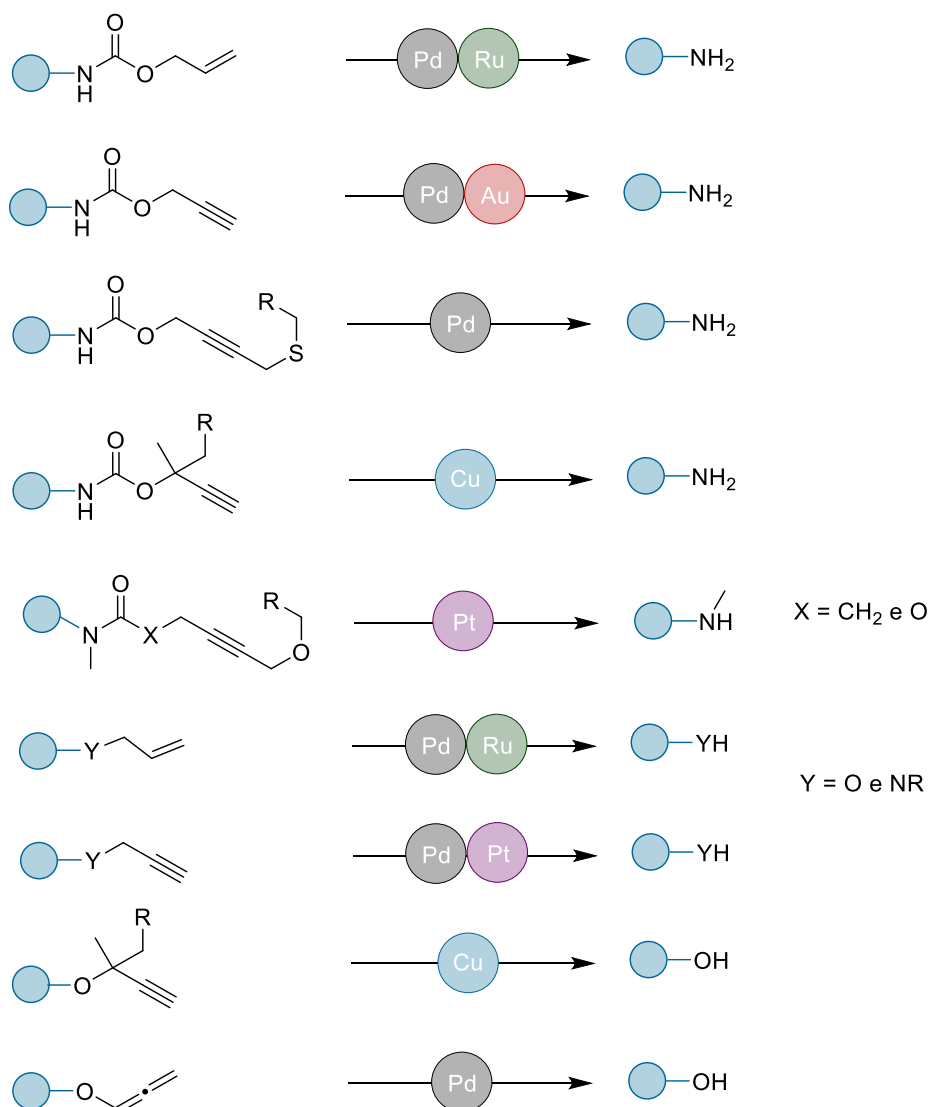


Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

Em 2020, o Bernardes Lab da Universidade de Cambridge, em colaboração com o nosso grupo de pesquisa (LaCBio), demonstrou pela primeira vez a desproteção de substratos contendo grupos propargílicos (X= O ou N) e pentinoílicos (X= CH<sub>2</sub>), por complexos de platina (K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> e Cisplatina). A estratégia foi aplicada na desproteção do pró-fármaco MMAE-am em células HeLa. Monometilauristatina E (MMAE) é um fármaco quimioterápico, este foi protegido na forma de uma pentinoil amida (am). Os autores também desenvolveram um ADC contendo o pró-fármaco MMAE-am, onde foi possível realizar a liberação extracelular do fármaco, mediada pelos complexos de platina, de forma direcionada às células tumorais. Além disso, a estratégia foi testada em embriões de peixes zebra, na ativação do Pro-5FU mediado por Cisplatina, sendo observado uma redução significativa de um tumor induzido, desde o terceiro dia de tratamento.<sup>39</sup>

A seguir são representados os pares grupo protetor/metal, desenvolvidos até o momento, para reações bio-ortogonais de desproteção mediadas por metais de transição. Diversos metais de transição vêm sendo aplicados, normalmente na desproteção de grupos alil ou propargil, em condições biológicas, na liberação de moléculas contendo os grupos amino ou álcool. Embora muito menos estudado, o grupo alenil mostra-se muito promissor neste arsenal de grupos protetores (Esquema 6).<sup>10,31</sup>

Esquema 6 - Grupos protetores monofuncionais e bifuncionais utilizados em reações bio-ortogonais de desproteção mediadas por metais de transição.



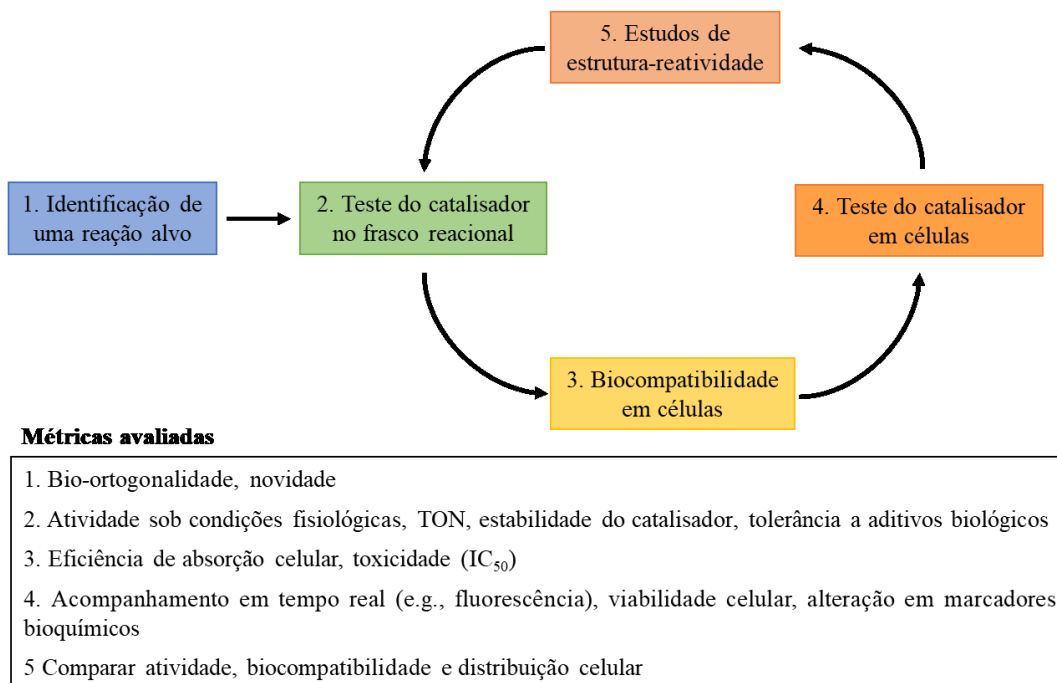
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao se projetar catalisadores metálicos bio-ortogonais para reações de desproteção, deve-se levar em consideração diversos fatores. Por exemplo, os ligantes (complexos) ou estabilizantes (nanopartículas) afetam o estado de oxidação do metal, a transferência de carga entre os ligantes e o metal e também as transições *d-d*. Essas propriedades afetam diretamente a interação com o substrato/produto e conseqüentemente a atividade catalítica. Além disso, os mecanismos reacionais envolvendo metais com diferentes estados de oxidação são normalmente bastante diferentes. Todas essas características precisam ser levadas em conta para cada par metal/grupo protetor.<sup>10</sup>

Embora catalisadores metálicos abióticos realizem novas reações em sistemas vivos, poucos deles foram integrados em sistemas complexos, como em modelos animais (roedores e peixes) de doenças humanas. A transposição da química organometálica desenvolvida em frasco reacional para aplicações biológicas é uma tarefa bastante desafiadora, necessitando de uma abordagem interdisciplinar utilizando instrumentação e ferramentas químicas e biológicas.<sup>7</sup>

Além disso, os ambientes vivos são bem mais heterogêneos que o meio aquoso estudado em frasco reacional, conseqüentemente o comportamento dos catalisadores nas células é normalmente diferente do observado em bancada, podendo variar dependendo de diversos de fatores: como o pH local, a presença de nucleófilos biológicos ou ainda em decorrência da viscosidade do meio. Assim, quaisquer propriedades catalíticas avaliadas em frascos reacionais devem ser comparadas com as observadas no interior de células vivas.<sup>7</sup> Normalmente o desenvolvimento de reações bio-ortogonais mediadas por catalisadores metálicos segue as sequencias descritas no Esquema 7.

Esquema 7 - Fluxo de trabalho na descoberta e avaliação de catalisadores metálicos biocompatíveis.



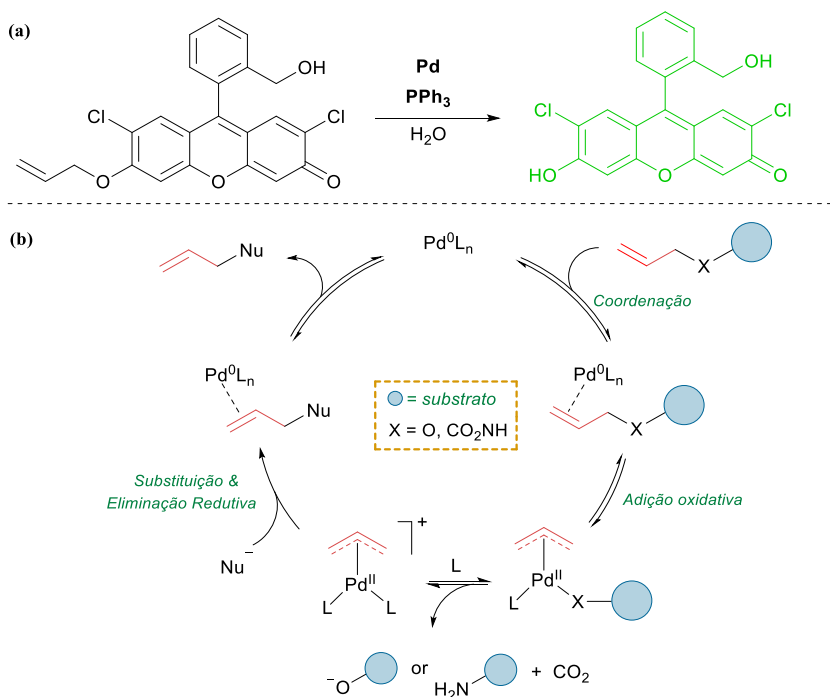
Fonte: Adaptado com permissão de *Tools and Methods for Investigating Synthetic Metal-Catalyzed Reactions in Living Cells*.<sup>7</sup> Copyright (2021) American Chemical Society.

Embora diversos trabalhos vêm mostrando o potencial da química organometálica mediando reações bio-ortogonais de desproteção em sistemas biológicos, diversos desafios ainda são encontrados. Destacam-se, por exemplo: (i) problemas de solubilidade, as moléculas protegidas precisam ser solúveis em meio aquoso; (ii) os catalisadores precisam ser solúveis em água e dependendo da aplicação, permeáveis à membrana celular; (iii) os catalisadores precisam ser estáveis em meio biológico; (iv) a realização de múltiplos *turnovers* pelo catalisador; (v) a reação precisa ser rápida, atualmente altas doses de catalisador são exigidas, o que limita a aplicação em certas condições.<sup>40</sup>

#### 2.1.1.1 Reações de desproteção mediadas por paládio em células vivas

Embora a reação de desproteção do grupo *O*-alil em meio aquoso catalisada por paládio seja conhecida desde a década de 1980,<sup>41</sup> uma reação que segue um mecanismo do tipo Tsuji-Trost, a primeira aplicação com motivação bioquímica foi relatada por Koide e coautores,<sup>42</sup> na detecção seletiva de traços de paládio em amostras contendo diferentes fármacos ou rochas. Os autores utilizaram uma sonda fluoresceína, a qual tem sua fluorescência extinta quando o grupo hidróxi é alquilado, porém recupera sua fluorescência quando o grupo é removido. A reação ocorre apenas na presença  $\text{PPh}_3$  que atua como agente redutor e ligante na reação (Esquema 8). Na ausência  $\text{PPh}_3$  não foi observada a reação para  $\text{PdCl}_2$ , enquanto que na presença de  $\text{PPh}_3$  observa-se conversão semelhante ao complexo  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , indicando que a reação procede via  $\text{Pd}(0)$  através do mecanismo descrito no Esquema 8b e estudado em condições biológicas por diferentes autores.<sup>43-47</sup>

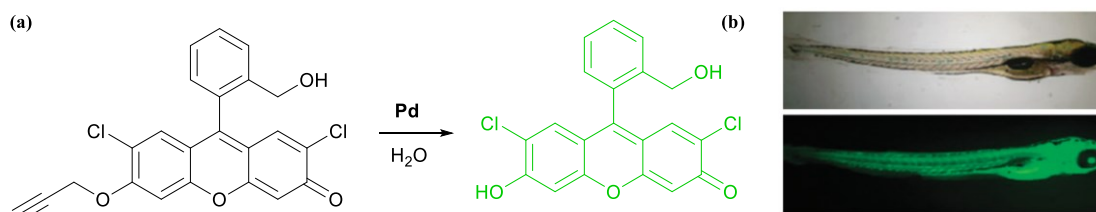
Esquema 8 – (a) Representação esquemática da detecção de espécies de paládio pela sonda *O*-alilfluoresceína. (b) Ciclo catalítico para a reação de *O*-desalilação catalisada por paládio de éteres alílicos e carbamatos.



Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

Em 2011, Ahnz e coautores desenvolveram um derivado *O*-propargilado da fluoresceína capaz de detectar espécies de paládio nos diferentes estados de oxidação: Pd(0), Pd(II) e Pd(IV), sem a adição de reagentes adicionais. Os compostos de Pd usados no estudo foram: Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PdCl<sub>2</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>6</sub>. A sonda foi usada para a monitoração de Pd em peixes zebra através da reação de despropargilação catalisada por PdCl<sub>2</sub>, demonstrando o potencial da reação de despropargilação em sistemas biológicos (Esquema 9).<sup>48</sup>

Esquema 9 - (a) Representação esquemática da detecção de espécies de paládio em sistemas vivos pela sonda *O*-propargil fluoresceína. (b) Peixe zebra de 5 dias incubado com a sonda (20 mM) e PdCl<sub>2</sub> (20 mM).



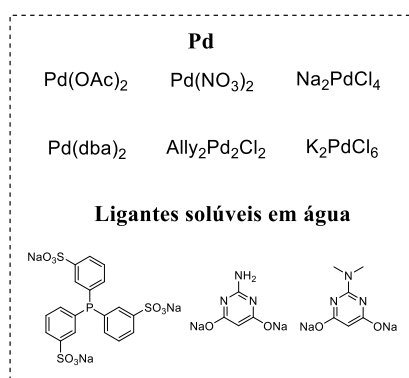
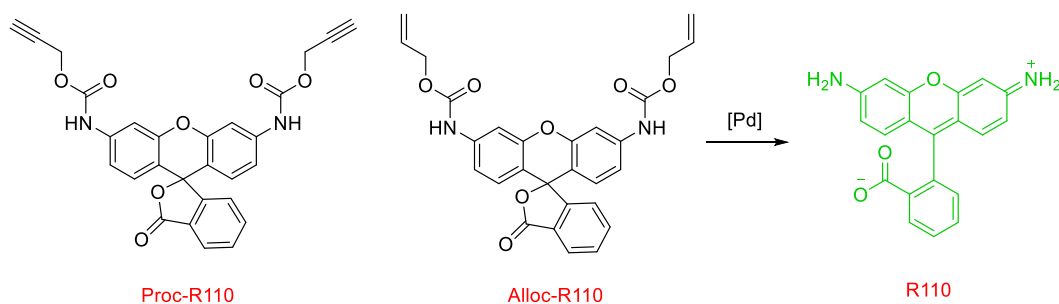
Fonte: Adaptado com permissão de *Fluorescent detection of palladium species with an O-propargylated fluorescein*.<sup>48</sup> Copyright (2010) Royal Society of Chemistry.

Seguindo esses estudos pioneiros que demonstram a aplicação de paládio na desproteção de grupos alil e propargil em meio aquoso, diversos grupos de pesquisa vem estudando a aplicabilidade e as limitações destas reações em meio biológico, na ativação de sondas fluorescentes, fármacos ou proteínas.

Em 2014, Chen e coautores demonstraram que diversos sais e compostos de paládio são capazes de remover grupos propargílicos e alílicos dos substratos Proc-R110 e Alloc-R110 (Esquema 10), em PBS e também em células HeLa.<sup>2</sup> Entre os substratos testados a clivagem do grupo propargil-oxi-carboxil (Proc) mostrou-se mais eficiente que o grupo alil-oxi-carbonil (Alloc). Os complexos Ally<sub>2</sub>Pd<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e Pd(dba)<sub>2</sub> não apresentaram toxicidade nas concentrações utilizadas (10 μmol L<sup>-1</sup>) e apresentaram melhor atividade catalítica na desproteção dos substratos protegidos R110. A reação foi aplicada na ativação do resíduo lisina (Proc-Lys) em enzimas intracelulares. O Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> apresentou melhores resultados em célula e também foi possível observar uma alta captação celular, onde o paládio acumulou-se preferencialmente no citosol da célula.



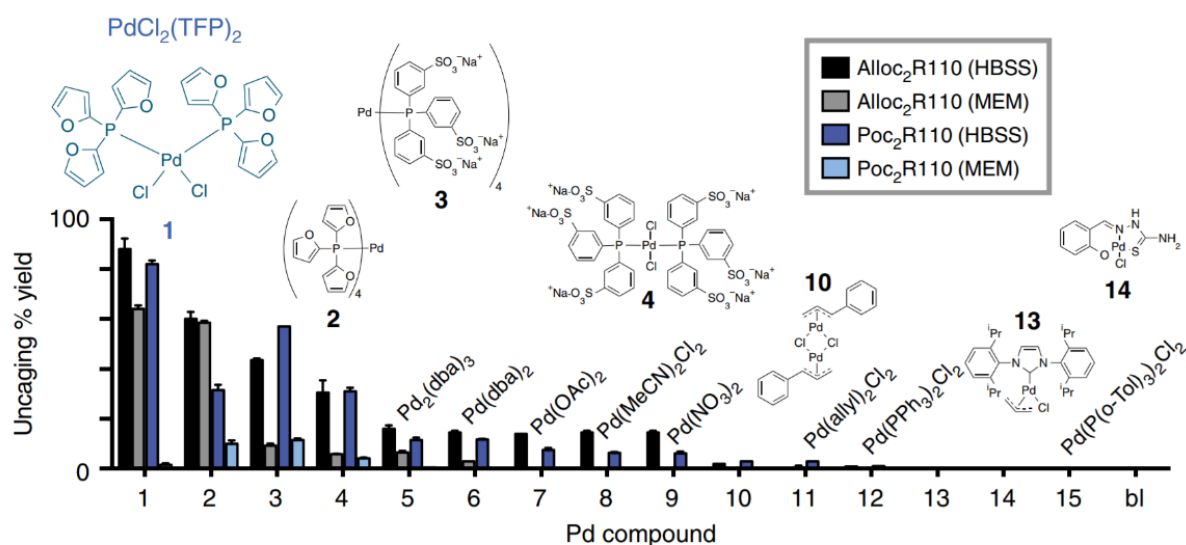
Esquema 10 – Ativação dos substratos Proc-R110 e Alloc-R110 por diferentes fontes de Pd.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em 2017, Weissleder e co-autores testaram uma série de complexos de Pd(0) e Pd(II) (2,0 equiv) na clivagem dos substratos Proc-R110 e Alloc-R110 (5  $\mu$ M) a 37 °C em dois meios utilizados em cultura celular, MEM (*minimum essential media*) e HBSS (*Hank's balanced salt solutions*). A eficiência dos complexos de paládio diminuiu drasticamente quando a reação é realizada nos meios biológicos, indicando a inativação dos compostos devido aos componentes presentes nos meios de cultura (Esquema 11).<sup>49</sup> O composto mais eficiente nas reações de desproteção foi o bis[tri(2-furil)fosfina]-dicloreto de paládio(II), entretanto sua baixa solubilidade e lipofilicidade o tornam ineficaz em aplicações *in vivo*, necessitando de formulações hidrossolúveis para viabilizar sua aplicação.

Esquema 11 - Complexos de Pd na clivagem dos substratos Proc-R110 e Alloc-R110 em MEM (*minimum essential media*) e HBSS (*Hank's balanced salt solutions*) a 37 °C por 12 h.

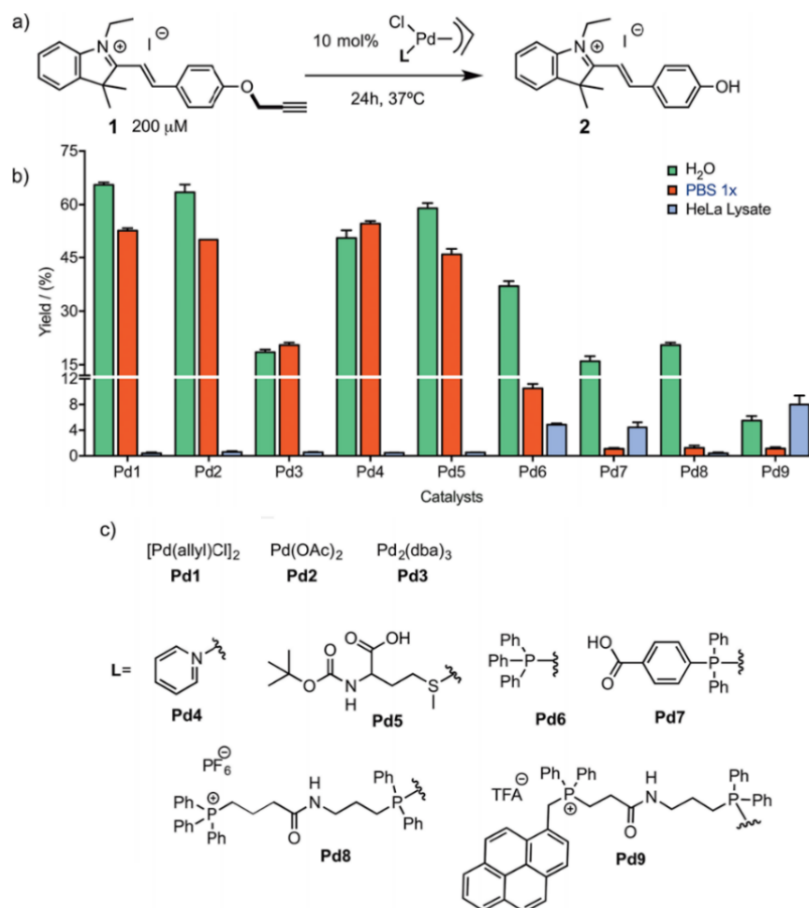


Fonte: Adaptado com permissão de *Nano-palladium is a cellular catalyst for in vivo chemistry*.<sup>49</sup> Copyright (2017), Springer, Nature <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Em 2018, Martínez-Calvo e coautores estudaram a despropargilação por diversos complexos de Pd(II) em H<sub>2</sub>O, tampão PBS e no lisado celular HeLa.<sup>40</sup> Buscando solucionar os problemas de estabilidade em meios biorrelevantes descritos no trabalho de Weissleder.<sup>49</sup> Na presença de 10 mol% dos catalisadores e na concentração de 200 μmol L<sup>-1</sup> do substrato a 37 °C por 24 horas (Esquema 12).

Os resultados confirmam que diversas fontes de Pd podem catalisar reações de despropargilação em água e PBS, entretanto, elas são muito menos eficientes em meios celulares complexos (lisado de células HeLa).<sup>40</sup> Quando a reação de despropargilação (30 min, 37 °C, 1 equivalente de Pd) foi testada em células Vero, cultivadas no meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), os compostos Pd1-Pd5 mostraram insignificante atividade, enquanto que espécies de Pd(II) substituídas com fosfinas (Pd6-Pd8) apresentaram boa eficiência. Através da quantidade de paládio presente nas células foi possível estimar TON de 10 e >5, para os complexos Pd7 e Pd8, respectivamente. Indicando que esses complexos podem operar de maneira catalítica no interior de células.<sup>40</sup>

Esquema 12 - Reação de despropargilação em H<sub>2</sub>O, tampão PBS e lisado celular mediada por diferentes complexos de Pd(II).



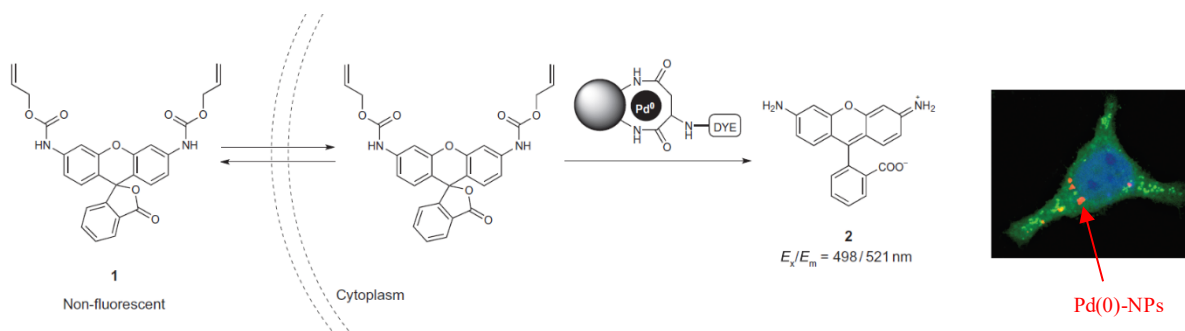
Fonte: Adaptado com permissão de Intracellular Deprotection Reactions Mediated by Palladium Complexes Equipped with Designed Phosphine.<sup>40</sup> Copyright (2018), American Chemical Society. ACS AuthorChoice License.

Complexos de paládio tornam-se muito atrativos para reações em ambiente celular devido à sua natureza bem definida e à possibilidade de manipulação dos ligantes para a otimização das propriedades de solubilidade, estabilidade e reatividade. Os complexos de paládio contendo fosfinas como ligantes, projetados por Martínez-Calvo e coautores, demonstram que é possível desenvolver complexos efetivos em meios celulares, onde a eficiência depende das características estruturais das fosfinas projetadas. Esses resultados exemplificam a viabilidade do *design* de complexos para promover reações em meio celular. Essas estruturas oferecem vantagens em relação a outras alternativas baseadas em nanoestruturas, em termos de simplicidade e procedimentos sintéticos, bem como no controle de propriedades como reatividade, rastreabilidade e captação celular.<sup>40</sup> Neste contexto, a compreensão da dinâmica das reações bio-ortogonais de desproteção é um dos principais

esforços para o desenvolvimento de novos substratos e catalisadores altamente efetivos em meio biológico.<sup>10</sup>

Embora complexos de paládio possam mediar reações de desproteção em condições biológicas, boa parte das aplicações *in vivo* descritas até o momento são baseadas em nanopartículas de paládio. Em 2011, Bradley e coautores foram os primeiros a utilizar nanopartículas de Pd(0) suportadas em uma resina de poliestireno para a clivagem da ligação C-O, na desproteção de grupos alloc, em linhagens celulares. As microesferas se mostraram biocompatíveis e com capacidade atravessar a membrana celular. A atividade intracelular foi investigada utilizando células HeLa através da reação de desproteção da Alloc-R110 (Esquema 13). Nos experimentos *in vitro* a atividade catalítica das microesferas de Pd(0) é claramente aumentada na presença de glutatona (5 mmol L<sup>-1</sup>), com TON de até 30 na presença de extrato celular ou glutatona, entretanto a conversão observada é relativamente baixa (até 22%) em todos os meios testados.<sup>8</sup>

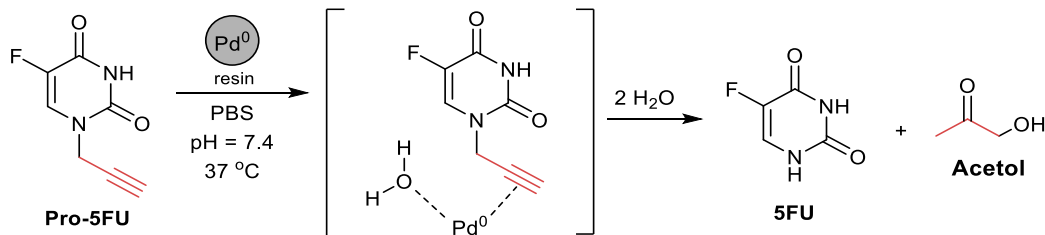
Esquema 13 - Representação esquemática da desproteção intracelular catalisada por Pd(0) do substrato Alloc-R110 gerando o composto fluorescente (rodamina 110).



Fonte: Adaptado com permissão de *Palladium-mediated intracellular chemistry*.<sup>8</sup> Copyright (2011) Nature Publishing Group.

Em 2014, Unciti-Broceta e coautores utilizam as mesmas nanopartículas de Pd(0) para ativação extracelular do pró-fármaco 5-fluoro-1-propargiluracila (Pro-5FU), o qual não possui atividade farmacológica ( $IC_{50}$  [Pro-5FU]/ $IC_{50}$ [5FU] > 500). Após a reação de clivagem do grupo protetor propargil o substrato recupera a sua atividade anticâncer (Esquema 14). Os autores observaram que quando a fármaco é protegido com o grupo alil (All-5FU) e exposto as mesmas condições, não há formação substancial do fármaco, indicando que o grupo propargílico é mais reativo.<sup>33</sup>

Esquema 14 – Ativação do Pro-5FU mediada por Pd-NPs para a liberação de 5FU e acetol em meio aquoso.



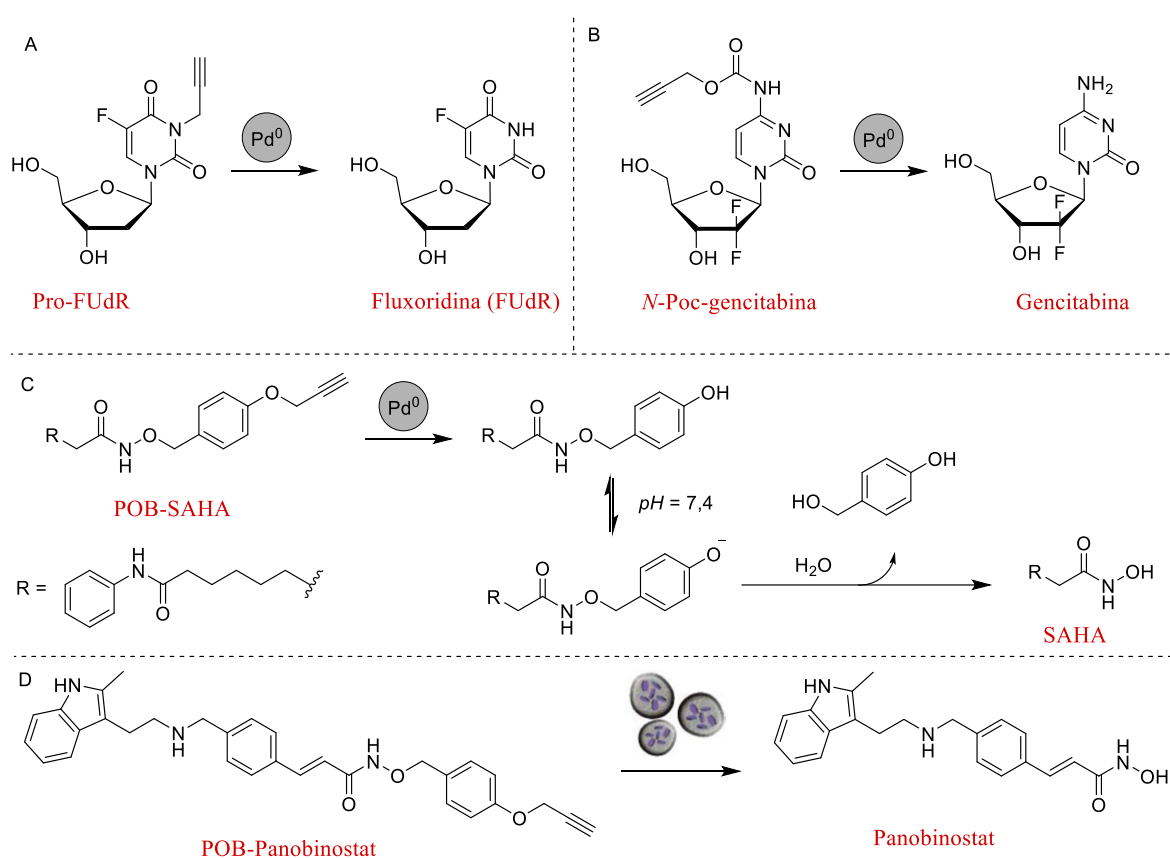
Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

Seguindo essa linha de pesquisa, Unciti-Broceta e coautores demonstram a possibilidade de desproteção do N3 do 5FU em combinação com as nanopartículas, através da ativação do pró-fármaco (Pro-FUdr) derivado do quimioterápico Floxuridina (Esquema 15A).<sup>50</sup> O grupo também desenvolveu compostos com o NH<sub>2</sub> do fármaco Gencitabina protegido com o grupo propargil-oxi-carboxil (Proc), os quais também se comportam como pró-fármacos e podem ser ativados pelas mesmas nanopartículas (Esquema 15B).<sup>51</sup>

Em um trabalho posterior, uma série de pró-fármacos do ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA, Vorinostat), protegidos com os grupos alil, propargil, 1-butin-3-il, benzil e *O*-4-propargil-oxi-benzil (POB) foram avaliados através da ativação pelas nanopartículas de Pd(0). O composto POB-SAHA apresentou os resultados mais significativos, visto sua baixa toxicidade e boa reatividade. A reação acontece em duas etapas, sendo que, inicialmente ocorre a despropargilação do éter fenólico mediada pelo Pd, seguido de uma 1,6-eliminação espontânea do grupo 4-hidroxibenzil, liberando o ácido hidroxâmico (SAHA) (Esquema 15C).<sup>52</sup>

Recentemente, o mesmo grupo de pesquisa expandiu essa metodologia de forma elegante, na ativação intracelular do fármaco Panobinostat (Esquema 15D) em células tumorais específicas, através da utilização de nano folhas de Pd(0) localizadas no interior de vesículas exossomas, provenientes de células pulmonares cancerosas (A549). As exossomas são vesículas lipídicas secretadas pelas células e captadas de forma seletiva pelas suas células progenitoras.<sup>53</sup> O catalisador bio-artificial (Pd(0)-EXO<sub>A549</sub>) foi aplicado na ativação do fármaco anticancerígeno Panobinostat nas células A549, entretanto, não observou-se citotoxicidade em células U87 (glioma), indicando tropismo preferencial para suas células progenitoras.<sup>53</sup>

Esquema 15 - Ativação de pró-fármacos propargílicos por nanopartículas de Pd(0) desenvolvidos por Unciti-Broceta e colaboradores.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

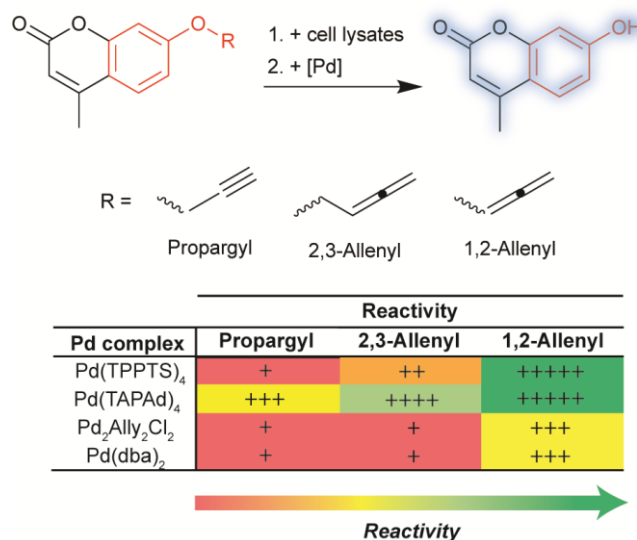
### 2.1.1.2 Reações de *O*-desalenição mediadas por paládio

O grupo protetor 1,2-alenil (propa-1,2-dien-1-il), embora menos estudado, apresenta características que o torna promissor como grupo protetor bio-ortogonal. A seguir serão descritos os trabalhos desenvolvidos até o momento, nas quais o grupo alenil é utilizado para proteger grupos fenólicos em condições biológicas. Após a desproteção utilizando Pd, é possível regenerar a atividade de proteínas ou fármacos.

Em 2016, Wang e coautores estudaram a ativação do resíduo tirosina em proteínas intracelulares por meio da desproteção do grupo *O*-alenil por reagentes de paládio. Inicialmente foi avaliada a estabilidade dos grupos 1,2-alenil, 2,3-alenil, alenoato e propargílico em meio celular, utilizando o aumento na fluorescência da 4-MU. O grupo alenoato mostrou-se instável devido a reação com o resíduo cisteína, os outros grupos mostraram-se estáveis nas mesmas condições.<sup>9</sup> Posteriormente, a remoção dos grupos foi avaliada utilizando-se diferentes catalisadores de paládio (Esquema 16). O grupo 1,2-alenil mostrou a maior taxa e maior

eficiência comparado com os outros grupos. Salienta-se que os testes para desproteção foram realizados com os substratos e reagentes de Pd na mesma concentração (100  $\mu\text{M}$ ) em tampão PBS (20 mM, pH = 7,8, 5% DMSO) à 37 °C por 5 minutos.

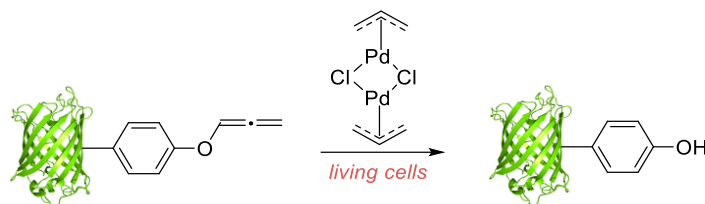
Esquema 16 - Reação modelo para ativação do resíduo Tirosina através da desproteção do grupo O-Alenil por reagentes de paládio.



Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

Os análogos da tirosina modificados com os grupos 1,2-alenil e propargil foram geneticamente incorporados em proteínas de células bacterianas e mamíferas. Inicialmente, a desproteção das proteínas modificadas foi avaliada *in vitro*. A proteína modificada GFP-N149 (20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi incubada com os reagentes de Pd (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão PBS (20 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH = 7,8, 5% DMSO) a 37 °C por 5 minutos. O grupo 1,2-alenil foi mais reativo para todos os catalisadores testados, quando comparado ao grupo propargil. Posteriormente, a reação foi testada *in vivo*, na desproteção da proteína GFP-Y40 expressa em células HEK293T. O catalisador Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mostrou maior eficiência (51% de conversão). A discrepância na reatividade *in vitro* e *in vivo* se deve a maior captação celular do Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em relação aos outros catalisadores testados. A reação foi aplicada na recuperação da atividade de enzimas em linhagens celulares, após a incubação com os reagentes de Pd a atividade foi eficientemente restaurada (Esquema 17).<sup>9</sup>

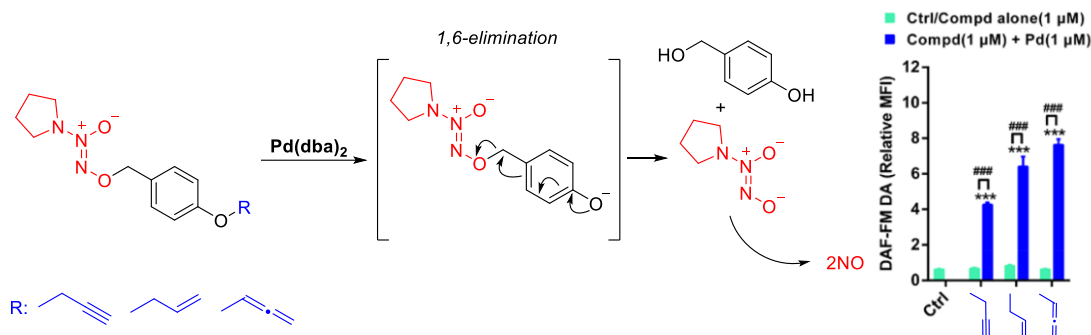
Esquema 17 – Representação da ativação de proteínas geneticamente modificadas com o grupo *O*-Alenil-Tirosina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em 2018, Tian Lv e coautores estudaram a liberação de óxido nítrico em células cancerígenas, por meio de reações de clivagem bio-ortogonais catalisadas por Pd. Na presença de  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), os derivados  $O^2$ -alquil diazeniodiolatos ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) liberam NO desencadeando um efeito inibitório no crescimento das células cancerígenas (HCT116) (Esquema 18).<sup>54</sup> Os dados de decomposição dos substratos e a cinética de liberação de NO, mostraram uma maior taxa de liberação para o *O*-alenil em comparação aos grupos *O*-alil e *O*-propargil, utilizando a mesma concentração dos substratos e  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  ( $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão PBS (pH = 7,4).

Esquema 18 - Liberação de NO em células cancerígenas, através de reações de clivagem bio-ortogonal catalisadas por Pd.



Fonte: Adaptado com permissão de Synthesis and Evaluation of  $O_2$ -Derived Diazeniumdiolates Activatable via Bioorthogonal Chemistry Reactions in Living Cells.<sup>54</sup> Copyright (2018) American Chemical Society.

Esses resultados demonstram a potencialidade do grupo protetor alenil nas reações de desproteção mediadas por paládio, visto sua maior reatividade. Contudo, um design racional de substratos/catalisadores passa pelo entendimento do mecanismo, ainda pouco compreendido, conforme o que será descrito na próxima seção. Devido as propriedades diferenciadas da ligação dos alenos, eles exibem maior reatividade em comparação com outros alcenos ou alcinos similares. Por um longo tempo os alenos foram considerados altamente instáveis, o que retardou o desenvolvimento de sua química. Contudo, nas últimas décadas tem-se demonstrado a sua aplicabilidade em diversas reações. Sua reatividade e seletividade pode ser moduladas



pela alteração dos efeitos estéricos e eletrônicos dos substituintes, além da natureza dos catalisadores envolvidos.<sup>55,56</sup>

### 2.1.1.3 *Mecanismos para Reações de desproteção mediadas por paládio*

A literatura apresenta diversos estudos em relação ao mecanismo da reação de desalilação catalisada por paládio em meio aquoso, uma reação que segue um mecanismo clássico do tipo Tsuji-Trost (Esquema 8). Os estudos mostram uma preferência para o Pd(0) e um efeito positivo na presença de diversos nucleófilos, entretanto, dificuldades são encontradas para aplicação desta reação em meio biológico, principalmente sua cinética lenta. O detalhamento do mecanismo desta reação está fora do escopo desta tese, o mesmo pode ser encontrado num artigo de revisão recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa.<sup>10</sup>

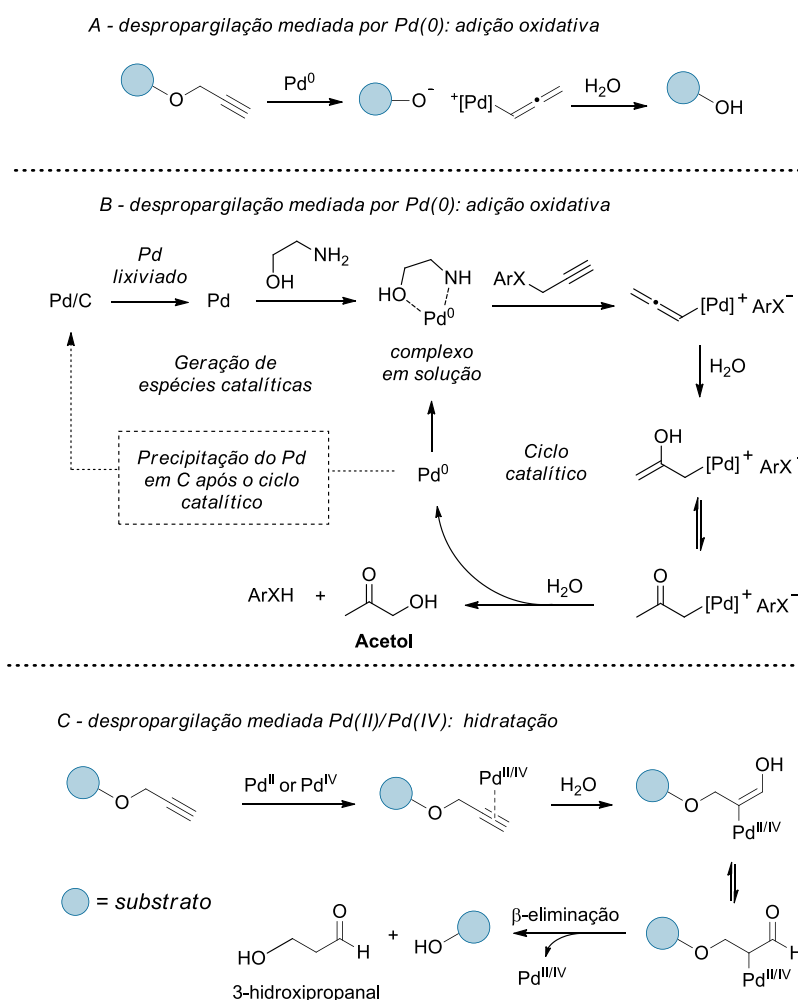
A reação de despropargilação em meio aquoso mediada por paládio foi descrita muito mais recentemente, a qual inspirou diversas aplicações para a desproteção de grupos amina e hidroxil em condições biorrelevantes. Em 2003, Manojit Pal e coautores estudaram a reação de despropargilação de aminas e éteres aromáticos em DMF-H<sub>2</sub>O (2:1) a 80 °C, na presença de trietilamina como base.<sup>57</sup> Neste trabalho os autores propõem que o pré-catalisador de Pd(II) ((PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>) se reduz no meio reacional a Pd(0), devido à presença de Et<sub>3</sub>N e aquecimento. Esta hipótese foi sustentada pelo fato de que a formação do produto não foi observada na ausência de base e aquecimento e é eficiente com o uso de um catalisador de Pd(0) ((PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pd). O mecanismo proposto ocorre através da formação de um intermediário alenilpaládio, por meio de uma adição oxidativa ao complexo de Pd(0) (Esquema 19A).

Em 2013, o mesmo grupo estudou a reação de despropargilação em água, sob atmosfera de nitrogênio, utilizando como catalisador Pd/C na presença de etanolamina a 80 °C. Um mecanismo semelhante foi proposto, a reação é mediada através da formação de espécies lixiviadas de Pd(0) complexadas com etanolamina, tendo como subproduto hidrolítico da reação a 1-hidroxiacetona, que não foi detectado pelos autores (Esquema 19B).<sup>58</sup> A detecção dos produtos hidrolíticos das reações de desproteção catalisada por Pd em água é uma dificuldade normalmente encontrada pelos autores para suportar os mecanismos propostos. A primeira vez em que foi possível detectar o subproduto da clivagem do grupo propargílico, foi em 2014 por Unciti-Broceta e coautores.<sup>59</sup> Através da técnica de ESI-MS foi observado um aduto de sódio

do acetol (1-hidroxiacetona) ( $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  96,8), suportando o mecanismo anteriormente proposto por Manojit Pal (Esquema 19B).

Em 2010, Ahn e colaboradores sugeriram um mecanismo distinto para despropargilação promovida por espécies de Pd(II) e Pd(IV). Nesse caso, o mecanismo segue um caminho de hidratação, após a coordenação com as espécies Pd(II/IV), seguido de uma  $\beta$ -eliminação, gerando como subproduto o 3-hidroxiopropanal. Entretanto, esse composto não foi identificado pelos autores.<sup>48</sup>

Esquema 19 - Propostas macanísticas iniciais para a reação de despropargilação promovida por Pd: (A e B) Mecanismos mediados por Pd(0). (C) Mecanismo mediado por Pd(II/IV).



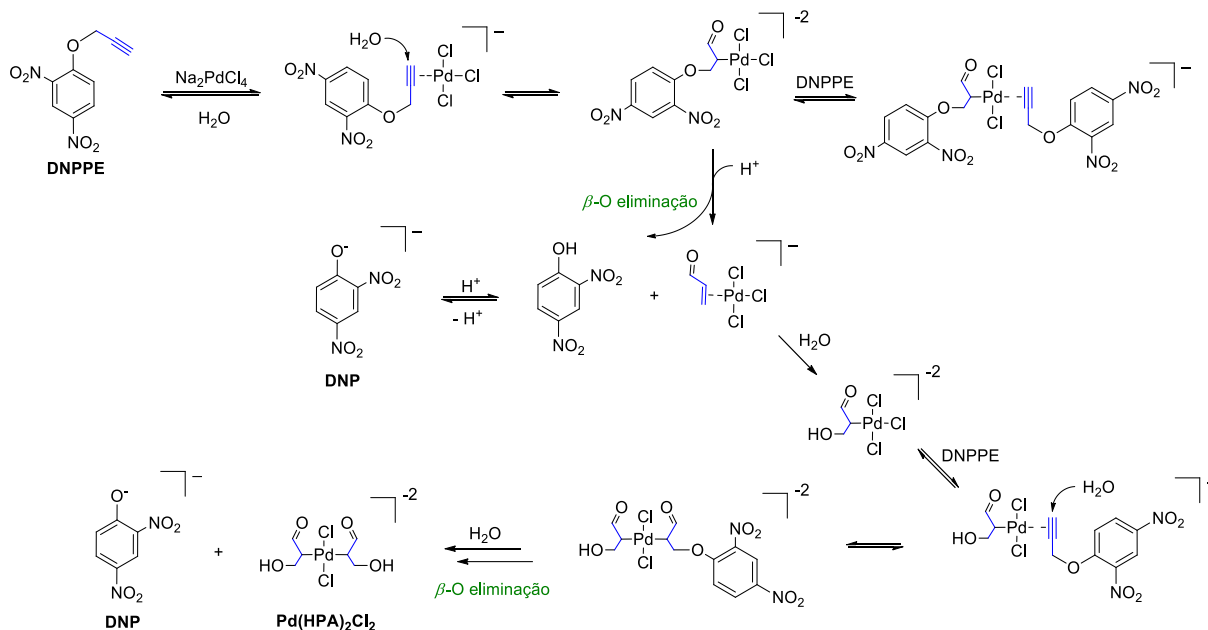
Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um extenso estudo cinético e mecanístico para a reação de despropargilação do éter dinitrofenil e propargil (DNPPE)

mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  (um sal de Pd(II)) em meio aquoso (tampão fosfato, pH 7,4) sem adição de bases ou ligantes.<sup>60</sup> Utilizou-se diversas técnicas experimentais como: espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), espectroscopia de absorção de raios X (XAS), microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e análises computacionais (DFT), para suportar o mecanismo proposto. Os dados obtidos demonstraram que a reação de despropargilação catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  obedece uma cinética bifásica, sendo composta por uma reação rápida (Rx1) e uma reação lenta (Rx2).

Na fase rápida (Rx1) observa-se apenas dois *turnovers* devido à desativação do catalisador, pois o metal é inibido pelo produto hidrolítico propargil, formando o complexo  $\text{Pd}(\text{HPA})_2\text{Cl}_2$  (Esquema 20). O mecanismo proposto da reação rápida inicia-se pela coordenação entre as espécies de Pd(II) com as moléculas de DNPPE, a qual é então submetida a uma hidratação *anti*-Markonikov, seguido da clivagem da ligação C-O por uma  $\beta$ -O eliminação, onde essa última é a etapa determinante. Foi demonstrado por DFT que os cloretos do  $\text{Pd}(\text{HPA})_2\text{Cl}_2$  são poucos lábeis impedindo a coordenação de novas moléculas de substrato e, conseqüentemente, limitando o número de *turnovers* pela reação rápida (Rx1).

A detecção de nanopartículas e experimentos de envenenamento ( $\text{CS}_2$  e Hg), indicaram que a fase lenta (Rx2) está relacionada principalmente à presença de nanopartículas de Pd(0) formadas após os dois *turnovers* e/ou a Pd(0) lixiviados das nanopartículas. As Pd(0)-NPs são formadas pela decomposição do complexo  $\text{Pd}(\text{HPA})_2\text{Cl}_2$  e foram identificadas por diferentes técnicas como: espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e tiveram seu estado de oxidação confirmado por XAS.

Esquema 20 - Mecanismo proposto para a fase rápida da reação de despropargilação mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ 

Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

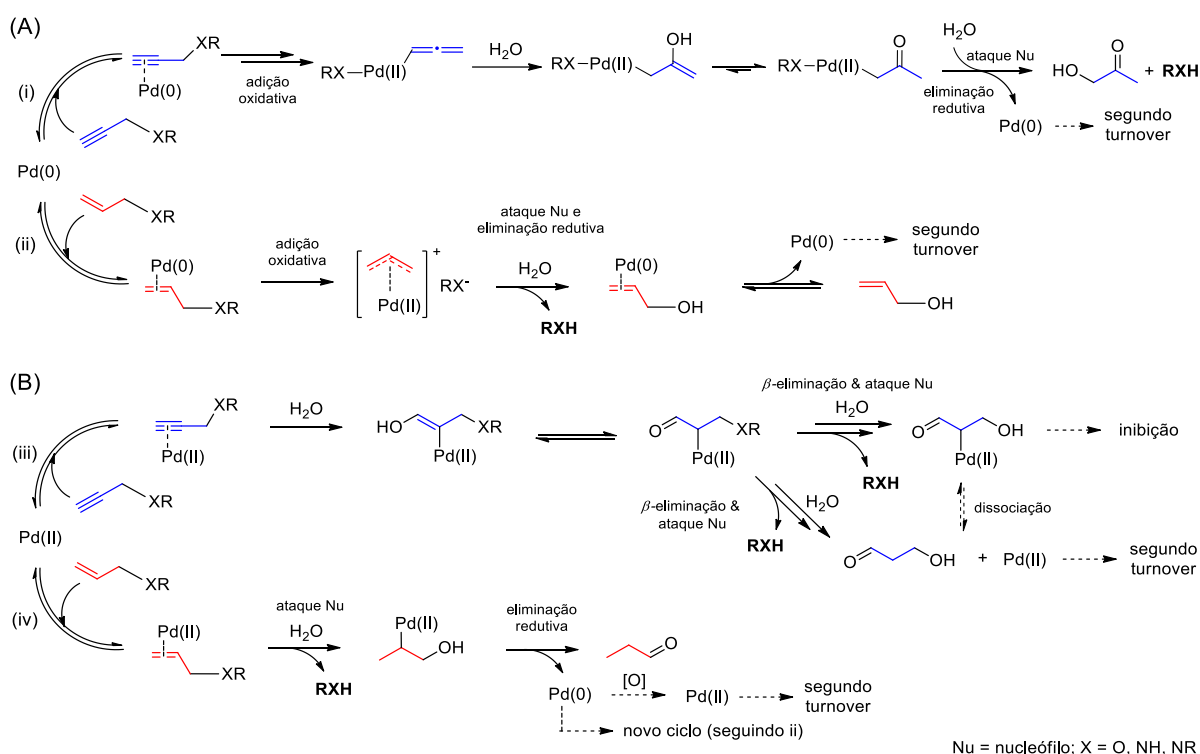
Este trabalho e os demais citados demonstram a complexidade no *design* de catalisadores de paládio para as reações de desproteção de grupos ricos em elétrons, uma vez que tanto Pd(II) quanto Pd(0) podem ser ativos. No entanto, a maioria desses estudos apoia que os catalisadores de Pd(II) com o grupo propargil, são de fato os pares mais reativos. Independente do estado de oxidação do paládio, as atividades dessas espécies serão governadas por quesitos eletrônicos, estéricos, geométricos e a estrutura do substrato.<sup>10</sup>

Em resumo, as reações promovidas por Pd(0) e Pd(II) podem ser classificadas mecanisticamente pelo caminho que elas seguem após a coordenação do substrato com o metal: (a) adição oxidativa com Pd(0) ou (b) hidratação com Pd(II). Em relação a coordenação do substrato com o metal, a natureza estrutural do paládio desempenha um papel extremamente importante, modulando o grau de associação/dissociação dos substratos/produzidos e interferentes, e influenciando diretamente na velocidade e rendimento da reação, e consequentemente na bio-ortogonalidade. Além disso, os ligantes podem modular a solubilidade, a captação celular e a capacidade de direcionamento dos complexos metálicos.

Para as reações de despropargilação (Esquema 21 A-i) e de desalilação (Esquema 21 A-ii) mediadas Pd(0) envolvem a adição oxidativa seguida de uma hidratação e uma subsequente reação de eliminação redutiva para regenerar as espécies ativas e continuar os próximos *turnovers* (Esquema 21A).

Por outro lado, as reações promovidas por Pd(II) apresentam caminhos mais complexos (Esquema 21B). Na reação de despropargilação (Esquema 21 B-iii) a regeneração do Pd(II) pode, em alguns casos, ser inibida devido a forte afinidade do subproduto com o complexo metálico, evitando a complexação do substrato.<sup>60</sup> Em contraste, a reação de desalilação (Esquema 21 B-iv) mediada por Pd(II), ocorre através de uma reação de oxidação de Wacker-Tsuji, gerando Pd(0) no primeiro *turnover*, que pode, por sua vez, iniciar um novo ciclo catalítico com outra molécula de substrato, como mostrado em (ii), ou pode ser oxidado por componentes do meio para regenerar Pd(II).

Esquema 21 - Mecanismos para os primeiros *turnovers* das reações de despropargilação and desalilação em água mediadas: (A) Pd(0) e (B) Pd(II).



Fonte: Adaptado com permissão de *Mechanistic insights into transition metal mediated bioorthogonal uncaging reactions*. Copyright (2020) Royal Society of Chemistry.<sup>10</sup>

A oxidação do Pd(0) a Pd(II) pode ser alcançada sem o uso de um co-catalisador se alguns ligantes específicos forem empregados.<sup>61</sup> Da mesma forma, os ligantes podem aumentar o potencial redox dos complexos de Pd(II) e o mesmo ser reduzido a Pd(0) no meio reacional (ou por eliminações redutivas), especialmente em um ambiente biológico redutor (devido à presença de redutores como glutatona e ascorbato de sódio), como em tumores sólidos, que por hipóxia apresentam um microambiente altamente redutor.<sup>62</sup> Nestes casos os mecanismos mediados por Pd(0) ((i) e (ii), Esquema 21) serão dominantes.

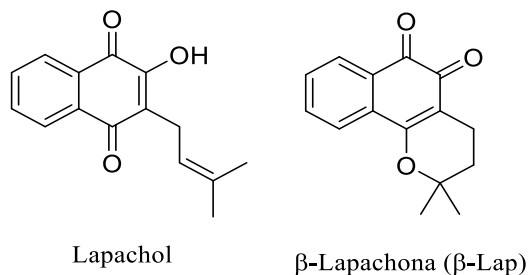
Conforme descrito na seção 2.1.1.2, o grupo alenil é um grupo funcional altamente reativo e apresenta alta sensibilidade para uma ampla gama de metais de transição. Embora muito promissor como grupo protetor bio-ortogonal, ele é muito menos estudado que os grupos propargil e alil. Em relação a esta reação de desalenilação mediada por paládio, não existem estudos cinéticos e mecanísticos para clivagem bio-ortogonal. Os mecanismos atualmente propostos baseiam-se nos mecanismos propostos para a reação de despropargilação.

Atualmente são propostos mecanismos distintos para a reação de desproteção do grupo 1,2-alenil, dependendo do estado de oxidação do catalisador de paládio. O mecanismo proposto para a reação de desproteção do grupo 1,2-alenil por espécies de Pd(0) inicia-se pela adição oxidativa a ligação *O*-alenil, o qual é então submetido a um ataque nucleofílico no carbono *sp* central por uma molécula de água, seguido de uma tautomerização para se obter o intermediário  $\alpha$ -Pd carbonila. Uma hidrólise subsequente libera o fenol e a 1-hidroxi-2-propanona, levando a regeneração do Pd(0).<sup>9</sup> O mecanismo proposto para o Pd(II) inicia-se pela coordenação entre o metal e a ligação insaturada, seguido de hidratação e formação de um intermediário do tipo Tsuji-Trost. Este intermediário sofre uma segunda etapa de hidratação, liberando os produtos da reação: fenol e 3-hidroxipropanal. Entretanto, ambos os mecanismos foram propostos sem nenhum estudo cinético ou qualquer outra análise mecanística sistemática.<sup>9</sup>

### 2.1.2 $\beta$ -Lapachona no tratamento do câncer

As naftoquinonas são produtos naturais que apresentam diversas atividades biológicas, sendo o componente ativo de diversas medicinas tradicionais utilizadas ao redor do planeta. Por exemplo, duas naftoquinonas bioativas são encontradas no Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*): Lapachol e  $\beta$ -Lapachona ( $\beta$ -Lap) (Figura 1). A  $\beta$ -Lapachona vem recebendo destaque devido à sua atividade anticancerígena, principalmente por grupos brasileiros.<sup>63-66</sup> Entretanto, a sua utilização no campo medicinal é ainda limitada. A  $\beta$ -Lapachona é um constituinte minoritário do cerne, mas pode ser obtida pela ciclização do Lapachol, o qual é extraído, em quantidade significativa da madeira do Ipê Roxo. Os Ipês são encontrados em diversas regiões do Brasil e são utilizados na medicina indígena e popular para o tratamento de diversas doenças.<sup>67,68</sup>

Figura 1 – Estruturas dos produtos naturais Lapachol e  $\beta$ -Lapachona, encontrados no Ipê Roxo.

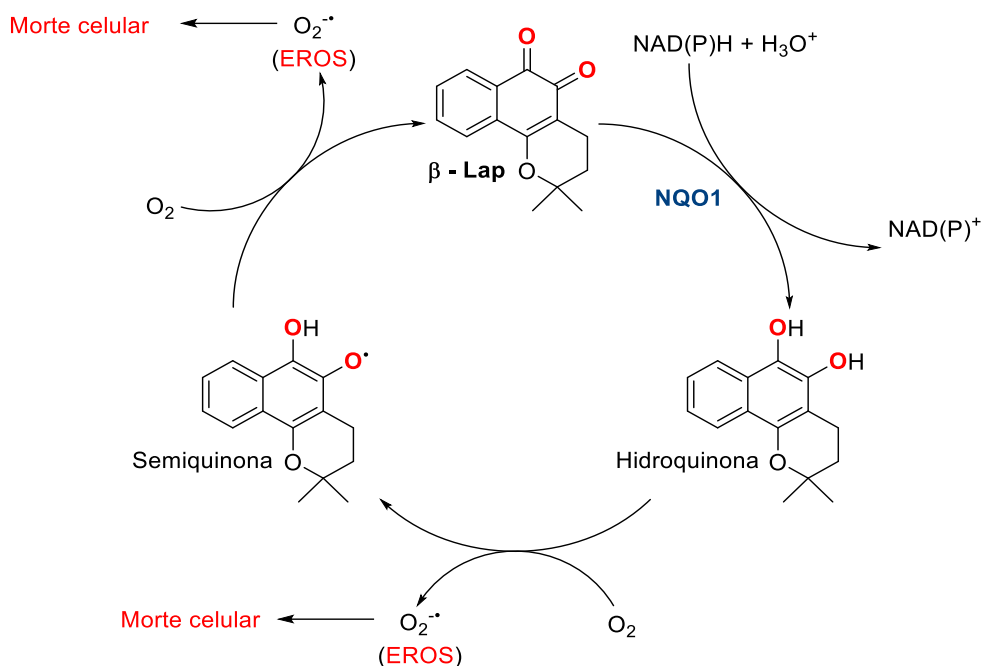


Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A  $\beta$ -Lapachona apresenta toxicidade contra diversos tipos de células cancerosas: leucemia,<sup>69</sup> mama,<sup>70</sup> pulmão,<sup>71</sup> pâncreas<sup>72</sup> e próstata.<sup>73</sup> Entretanto, sua utilização como um fármaco comercial está até o momento impossibilitada, devido aos efeitos colaterais associados ao seu mecanismo de ação, limitando a dosagem a um nível ineficaz.<sup>65</sup>

Diferente de outros fármacos, onde o mecanismo de ação é do tipo alvo-inibidor, a  $\beta$ -Lapachona e outras 1,2-naftoquinonas são moduladores metabólicos, e apresentam toxicidade principalmente devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células, por meio de um ciclo redox mediado por enzimas. Esse mecanismo pode ser considerado indesejado, devido a sua pouca seletividade, em comparação com um mecanismo alvo-inibidor, entretanto, possui potencial para explorar vulnerabilidades das células cancerosas e melhorar os tratamentos atualmente existentes.

Quinonas em geral são conhecidas devido seu ciclo redox, ou seja, elas podem ser reduzidas por processos celulares e se oxidam espontaneamente. Resumidamente, a  $\beta$ -Lapachona gera espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da catálise pela enzima NAD(P)H: quinona oxirredutase-1 (NQO1), que geralmente é acompanhado pelo consumo de NAD(P)H e ATP (Esquema 22). As EROs causam danos ao DNA e promovem a apoptose celular por estresse oxidativo. Por exemplo, um mol da  $\beta$ -Lapachona gera aproximadamente 120 mols de superóxido, consumindo 60 mols de NAD(P)H em 2 min.<sup>74</sup> A enzima NQO1, é superexpressada em diferentes tipos de células tumorais, em comparação com tecidos normais. Assim, a  $\beta$ -Lapachona apresenta potencial no tratamento de cânceres NQO1+, visto a sua toxicidade seletiva para as células que superexpressam a NQO1.<sup>75</sup>

Esquema 22 - Ciclo redox da  $\beta$ -Lapachona.

Fonte: Adaptado com permissão de *Machine intelligence decrypts  $\beta$ -lapachone as an allosteric 5-lipoxygenase inhibitor*.<sup>76</sup> Copyright (2018) Royal Society of Chemistry.

Em células cancerosas, maiores níveis de estresse oxidativo são comuns em comparação com células saudáveis. Assim, a célula se adapta, aumentando a sua capacidade antioxidante, por exemplo, aumentando os níveis de enzimas redutoras, como a NQO1. Logo, esse tipo de célula é especialmente vulnerável ao mecanismo de ação da  $\beta$ -Lapachona. Compostos que são moduladores metabólicos vêm recebendo atenção no tratamento de tumores agressivos resistentes à quimioterapia,<sup>77</sup> onde a geração de EROs tem se mostrado potencialmente efetiva no combate ao efeito de “resistência a múltiplas drogas” (RMD).<sup>78</sup> Outra característica atrativa apresentada pela  $\beta$ -Lapachona é o sinergismo com outros agentes quimioterápicos.<sup>79–82</sup> A  $\beta$ -Lap também é um candidato no tratamento da leucemia mielogênica aguda, visto que ela inibe fortemente a enzima 5-LO,<sup>76</sup> uma enzima que é um alvo para o tratamento de doença.<sup>83</sup>

A eficácia e a toxicidade da  $\beta$ -Lapachona foi avaliada em modelos animais. O complexo de inclusão da  $\beta$ -Lapachona com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, a fim de aumentar sua solubilidade, foi avaliado em ratos. A solubilidade da  $\beta$ -Lapachona em água é de apenas  $0,16 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $0,038 \text{ mg mL}^{-1}$ ), embora tenha sido possível observar uma diminuição dos tumores. Quando a dose foi aumentada, significativa toxicidade foi observada, levando a morte dos animais.<sup>72,84</sup>

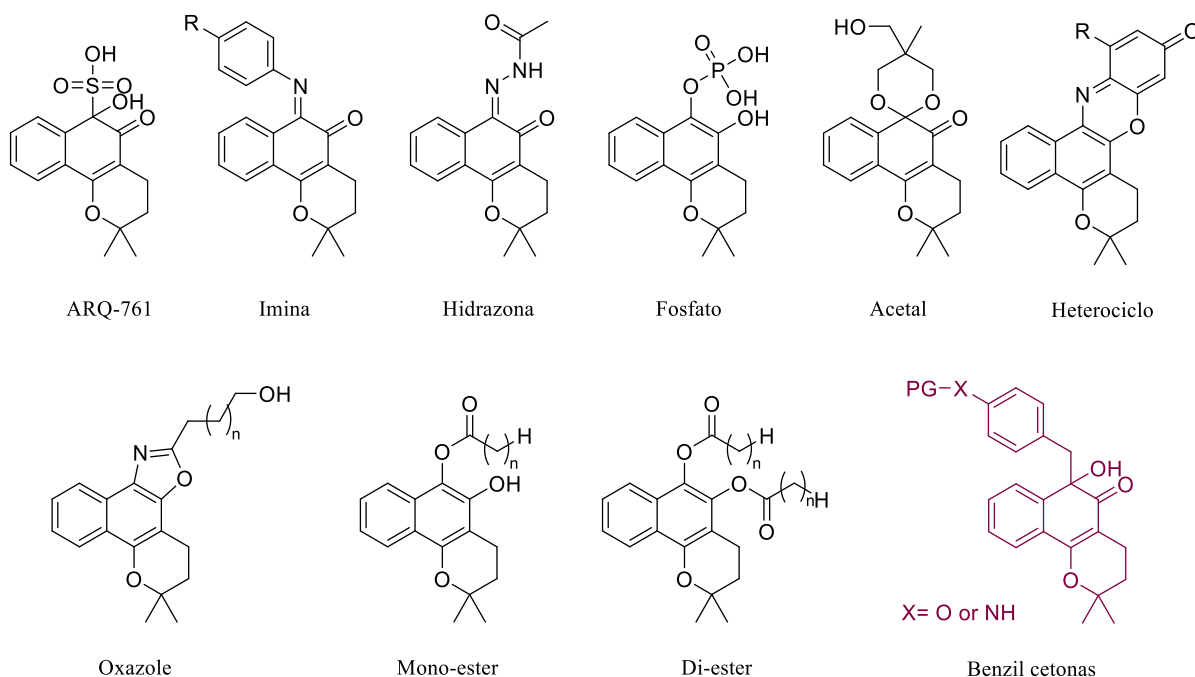


Alguns estudos em fase de ensaios clínicos no tratamento de câncer em humanos também foram realizados. A  $\beta$ -Lapachona complexada com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ARQ-501), foi avaliada em diversos estudos de fase I e II no tratamento de diferentes tipos de câncer pela empresa ArQule Inc. Embora uma atividade antitumoral tenha sido observada, efeitos colaterais graves como anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia foram observados.<sup>65</sup> Posteriormente, a empresa conduziu outros ensaios de fase I de um "pró-fármaco solúvel em água" da  $\beta$ -Lapachona (ARQ-761) (Figura 2), em alguns pacientes foi observado uma diminuição dos tumores, mas diversos efeitos colaterais foram observados: anemia, fadiga, hipóxia, náuseas e vômitos.<sup>85</sup> Uma patente foi depositada revelando a estrutura do pró-fármaco, na forma de um bissulfito. Entretanto o composto tem sua estabilidade questionada, visto que o mesmo é rapidamente convertido na  $\beta$ -Lapachona em todas as condições testadas pelos autores.<sup>86</sup>

Visto que os efeitos colaterais são gerados pelo mesmo mecanismo que ataca as células cancerosas, o ciclo redox, existe uma clara limitação na sua aplicação no tratamento em humanos, essa toxicidade dose-dependente limita sua janela terapêutica. Existe, portanto, a necessidade de estratégias melhores para manipular a sua atividade, ou seja, que esse mecanismo seja efetivo apenas nas células cancerosas. Para isso, vem sendo desenvolvidos diversos tipos de pró-fármacos.<sup>65</sup> Com as estratégias atuais, não é possível obter uma concentração efetiva no interior do tumor sem observar toxicidade para o paciente, assim, novas estratégias que direcionem a  $\beta$ -Lapachona podem viabilizar sua utilização como um fármaco.

Diversos pró-fármacos da  $\beta$ -Lap são descritos na literatura, eles se baseiam na desativação do ciclo redox, e conseqüentemente na diminuição de sua toxicidade pela utilização de grupos protetores conhecidos, como grupos liberadores por condições ácidas<sup>87</sup> ou enzimas esterases,<sup>88</sup> entretanto essas alternativas são limitadas pelas características das células alvo (Figura 2).

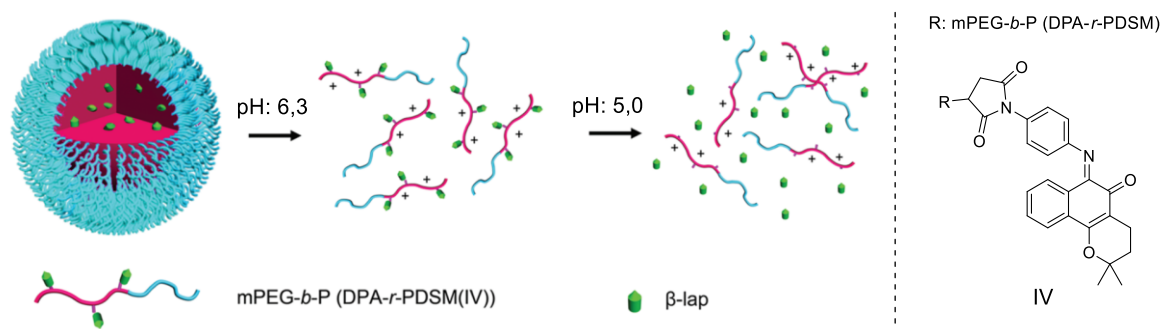
Figura 2 – Exemplos de pró-fármacos da  $\beta$ -Lapachona desenvolvidos até o momento.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Boothman e colaboradores desenvolveram uma série de pró-fármacos da  $\beta$ -Lap sensíveis ao pH: ariliminas,<sup>87,89</sup> acilhidrazonas e acetais.<sup>90</sup> Esses pró-fármacos foram projetados para serem ativados em condições ácidas, devido ao microambiente ácido de tumores sólidos,<sup>91</sup> com objetivo de promover a liberação seletiva da  $\beta$ -Lap. Os derivados de hidrazona e acetais mostraram-se muito estáveis, mesmo em pH 1,0. Já o composto substituído com uma arilimina contendo um grupo *p*-aminomaleimida apresentou sensibilidade a condições ácidas, mas estabilidade em pH neutro. A liberação da  $\beta$ -Lap foi de 2,8, 4,5 e 100% em pH 7,4, 6,5 e 5,0 em 8 h, respectivamente. Esse composto foi utilizado na construção de micelas poliméricas responsivas ao pH ácido das lisossomas (Esquema 23). Em pH abaixo de 6,3 as micelas se dissociam imediatamente, e em pH 5,0 o polímero libera  $\beta$ -Lap, a partir da hidrólise da imina.

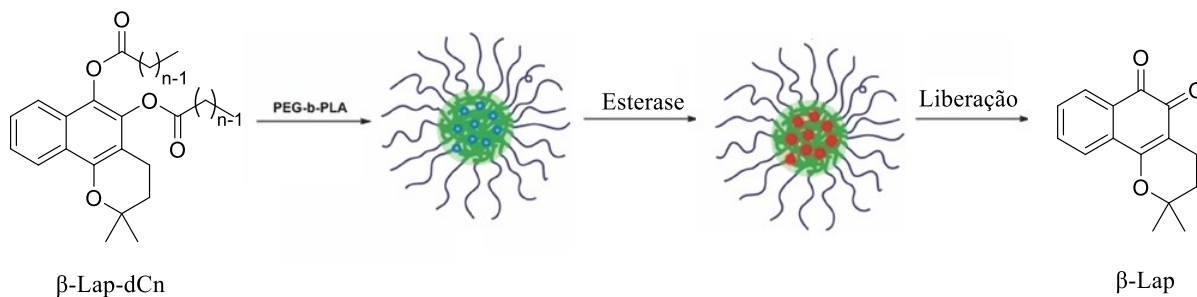
Esquema 23 – Polímero responsivo ao pH de duplo estágio para liberação lipossomal da  $\beta$ -Lap.



Fonte: Adaptado com permissão de *Lysosome-oriented, dual-stage pH-responsive polymeric micelles for  $\beta$ -lapachone delivery*.<sup>90</sup> Copyright (2016) Royal Society of Chemistry.

Pró-fármacos da  $\beta$ -Lap na forma de ésteres ativáveis por enzimas esterases foram desenvolvidos e formulados em micelas. Os pró-fármacos são derivados di-ésteres ( $\beta$ -Lap-dCn), os quais são aplicados na forma de micelas (PEG-b-PLA). Na presença de enzimas esterases, os pró-fármacos são hidrolisados no interior das micelas, liberando a  $\beta$ -Lap (Esquema 24).<sup>88</sup> Um estudo *in vivo* demonstrou que o pró-fármaco  $\beta$ -Lap-dC3 é significativamente mais eficaz que o  $\beta$ -Lap-dC6 em camundongos xenoinxertados com células A549 (câncer de pulmão).<sup>92</sup>

Esquema 24 – Pró-fármacos da  $\beta$ -Lap ativáveis por enzimas esterases.



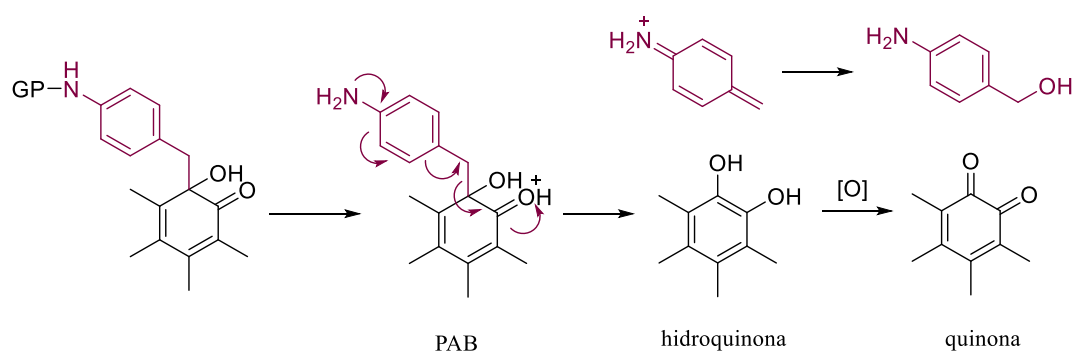
Fonte: Adaptado com permissão de *Prodrug Strategy to Achieve Lyophilizable, High Drug Loading Micelle Formulations Through Diester Derivatives of  $\beta$ -Lapachone*.<sup>88</sup> Copyright (2014) John Wiley and Son.

Recentemente o grupo do professor Dr. Gonçalo Bernardes desenvolveu uma nova alternativa para a ativação de orto-quinonas através de um mecanismo de clivagem C-C de um grupo autoimolativo através de uma reação do tipo eliminação-1,6.<sup>93</sup> A C-benzilação da  $\beta$ -Lap forma um derivado redox inativo, que pode ser protegido por diversos grupos protetores conhecidos (Esquema 25), após a remoção do grupo protetor (GP), um mecanismo de eliminação-1,6 do grupo autoimolativo libera o derivado hidroquinona, que prontamente se

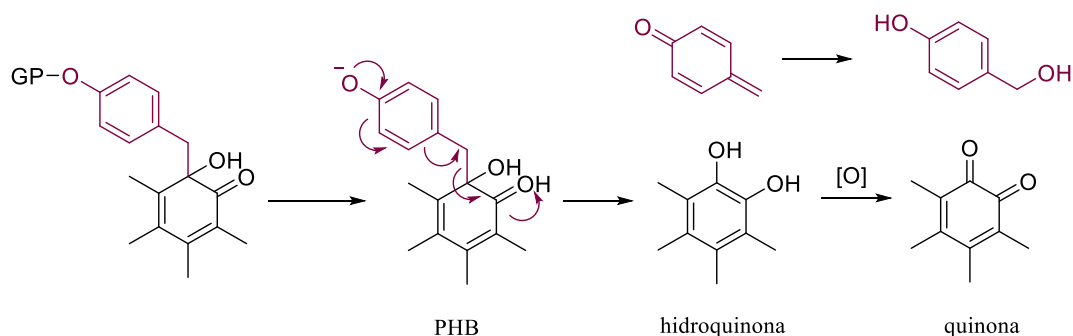
oxidada a quinona. Essa metodologia foi aplicada na desproteção de diversas *orto*-quinonas e a metodologia foi extensamente estudada na ativação da  $\beta$ -Lap, onde foi observada uma dependência do pH oposta na taxa de clivagem para os derivados *p*-amino e *p*-hidróxi. Para os derivados *p*-amino (PAB-Lap) (Esquema 25A), a taxa de desproteção é maior em pH ácido, enquanto que para os derivados *p*-hidróxi (PHB-Lap) (Esquema 25B), a desproteção ocorre em pH mais básico. Através de cálculos teóricos foram propostos os mecanismos descritos no Esquema 25.

Esquema 25 - Ativação de *orto*-quinonas através de um mecanismo de clivagem C-C de grupos auto-imolativos amino e hidróxi, através de uma eliminação-1,6.

A - Clivagem dos derivados *p*-aminobenzil em meio ácido



B - Clivagem dos derivados *p*-hidroxibenzil em meio básico



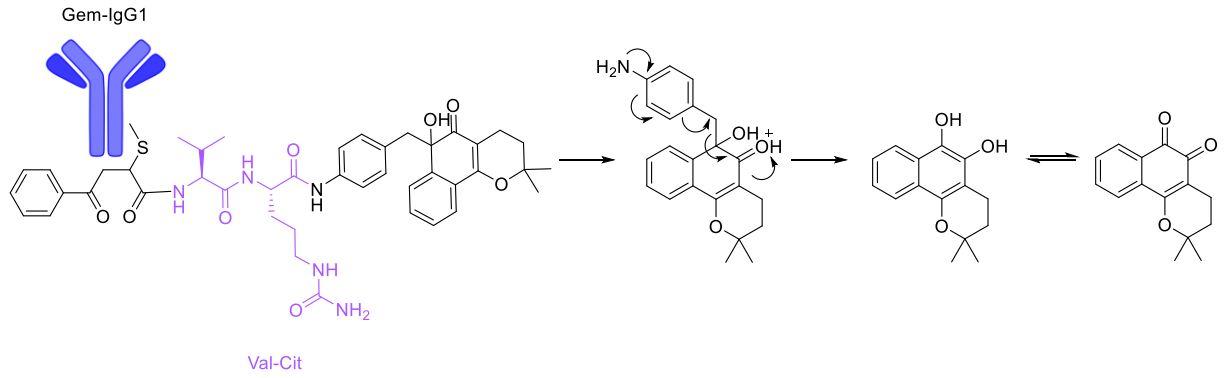
GP = grupo protetor

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Visto que os lisossomos das células cancerígenas possuem pH ácidos (3,8 - 4,7), o derivado PAB-Lap foi aplicado no desenvolvimento de um conjugado anticorpo fármaco (ADC) para o tratamento da leucemia. Para isso, foram desenvolvidos pró-fármacos contendo um dipeptídeo (Val-Cit) clivável pela enzima catepsina B, os quais foram conjugados com anticorpos Gem-IgG1 (Esquema 26). Os ADC homogêneos, específicos para CD33+, são

sistemicamente não tóxicos e condicionalmente estáveis. Sua eficácia foi testada *in vivo* em um modelo de roedores com xenoenxerto de leucemia mielóide aguda.<sup>93</sup>

Esquema 26 – Anticorpo conjugado com a  $\beta$ -Lap para o tratamento de leucemia mielogênica aguda.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

### 3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 MATERIAS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio) no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Os experimentos em cultura celular foram realizados em colaboração com o GBernardesLab (Universidade de Cambridge – Reino Unido) e o Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP).

Os reagentes utilizados para a síntese dos compostos em estudo apresentam qualidade técnica ou p.a., e/ou foram purificados segundo procedimentos usuais de laboratório. DMF, DMSO e THF foram purificados de acordo com procedimentos descritos na literatura e armazenados em peneira molecular ativada de 4Å. A água utilizada nos procedimentos foi submetida ao processo de purificação empregando purificador TKA Smart2Pure (resistividade de 18,2 mΩ cm), disponível no LaCBio. Para desaerar os sistemas reacionais e manter atmosfera inerte, empregou-se gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) comprimido de alta pureza (> 99,998%)

Cromatografia em camada delgada foi efetuada utilizando-se placas de sílica-gel GF<sub>254</sub> de 0,25 mm de espessura obtidas de fontes comerciais, utilizou-se como método de revelação luz ultravioleta. Purificações por coluna cromatográfica foram realizadas utilizando-se sílica-gel (230-400 mesh).

#### 3.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

##### 3.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas na Central de Análises localizada no Departamento de Química da UFSC. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, foram registrados em um espectrômetro VARIAN-FT-NMR 400 MHz (400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C) ou BRUKER 200 MHz (200 MHz para <sup>1</sup>H e 50 MHz para <sup>13</sup>C). Os espectros do Prop-Lap foram obtidos em um BRUKER AVANCE III HD 700 (700 MHz para <sup>1</sup>H e 175 MHz para <sup>13</sup>C) pela Dra. Eloah Latocheski no Departamento de Química da Universidade de Cambridge - UK.

Os dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em tubos de 5 mm, temperatura de 300 K, usando clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) ou ao pico residual não deuterado do solvente empregado para a realização das análises ( $\text{CHCl}_3 = ^1\text{H}$  7,26 ppm,  $^{13}\text{C}$  77,0 ppm). Todos os resultados são descritos da seguinte forma: Deslocamento químico ( $\delta$ ) (multiplicidade, constante de acoplamento, integração). Multiplicidade são descritas como: s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, dd = duplete de dupletos, dt = duplete de tripletos, tt = tripleto de tripletos, ddd = duplete de duplete de dupletos, m = multipleteo, b = banda alargada. Todas as constantes de acoplamento ( $J$ ) são descritas em Hertz (Hz).

### 3.2.2 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis)

Acompanhamento cinético das reações de clivagem C-O pelos sais e complexos de paládio foram realizadas no Espectrofotômetro de UV-vis Varian Cary 50 Bio com capacidade para até 18 cubetas de quartzo, acoplado a um banho termostatizado (Microquímica, modelo MQBTC99-20). A atividade catalítica dos complexos de Pd(II) na hidrólise das Prop-4-MU Alle-4-MU foi avaliada em meio aquoso tamponado 95/5 (v:v)  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  (pH 7,4) à 37 °C, pelo aparecimento da banda de absorção do fenolato ( $\epsilon = 7,410 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) em 364 nm. Em um experimento típico, 3040  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa tamponada com fosfato a pH 7,4 ([tampão] final =  $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), solução de DMSO dos complexos de Pd(II) (0,1 – 0,5 eq.) e um volume de DMSO para o volume final (3200  $\mu\text{L}$ ) foram adicionados a uma célula de comprimento de ótico de 1 cm. A reação é iniciada pela adição de 80  $\mu\text{L}$  de uma solução de substrato em DMSO ([substrato] final =  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Soluções estoque dos complexos de Pd(II) ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em DMSO foram preparadas no dia, enquanto que para os substratos as soluções foram usadas durante uma semana. PBS foi preparado dissolvendo comprimidos de PBS (Sigma-Aldrich) em água deionizada. A concentração total de íons no PBS é de  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  (tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $0,0027 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{NaCl}$   $0,137 \text{ mol L}^{-1}$ ). Para experimentos com variação na concentração de cloreto, o meio aquoso tamponado com fosfato foi preparado pela dissolução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  e a força iônica foi mantida constante pela adição de  $\text{NaClO}_4$ . O pH foi ajustado pela adição de uma solução de hidróxido de sódio ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

### 3.2.3 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-MS)

Os rendimentos das reações de clivagem C-C foram determinados em um cromatógrafo Shimadzu Prominence equipado com LCMS-2020 (temperatura da coluna 25°C, UV: 190-600 nm, MS-ESI) a um fluxo de 0,15 mL min<sup>-1</sup> usando um sistema isocrático de 70 % A + 30% B por 20 min (A = 0,1% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O, B = MeCN). A coluna utilizada foi uma Shim-pack XR-ODS (2,2 µm, 30 mm, 2 mm i.d.).

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

Os experimentos de ESI-MS foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural – LABIME da UFSC, pela técnica Dra. Vanessa Almeida de Oliveira. Os experimentos de ESI-MS foram obtidos em um espectrômetro de massa Amazon X Ion Trap (Bruker Daltonics). Alíquotas do meio reacional foram retiradas periodicamente, diluídas em água ou acetonitrila e eluídas em uma vazão de 5,0 µL min<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas nos modos positivo e negativo. Os parâmetros ESI utilizados foram os seguintes: Trap Drive 48,7, Capilar Exit 140,0 V, Dry Temp 180 °C, Nebulizer 10,15 psi, Dry Gas 4,00 l min<sup>-1</sup>, HV Capilar 4500 V, HV End Plate Offset -500 V. A faixa de aquisição de espectros de massa foi de 50-2800 m/z

### 3.2.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)

A análise de massas de alta resolução foi feita em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo ortogonal de tempo de voo (Xevo GS-2 QTof) com fonte de ionização *electrospray* (ESI) acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Acquity H-Class UPLC system, Waters Co., USA) equipado com um *autosampler*, gerenciador de solvente quaternário e forno de coluna. A separação foi feita utilizando uma coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH C 18 (150 x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) à 40 °C. O sistema de eluição gradiente foi composto de uma solução aquosa 0.1% ácido fórmico (pH 3.0) (A), ACN (B) em um fluxo de 0.3 mL min<sup>-1</sup>. As condições de eluição seguem como: 0 min 90% (A), 10% (B), 0-1 min 90% (A), 10% (B); 1-12 min 10% (A), 90% (B), 12-14 min 10% (A), 90% (B), 14-15 min 90% (A), 10% (B) e 5 min para reequilibrar a coluna. O volume de injeção foi de 2 µL.



Dados de MS e MS E (para duas funções *scan*) foram adquiridos em modo centróide e monitorados por um tempo de scan de 1 s, em uma faixa de massa de 50-1500 Da. A energia de colisão foi 6 eV em função 1, subindo de 20 para 35 eV na função 2. A exatidão de massa foi assegurada durante a aquisição utilizando correção por infusão de um padrão de referência externo (LockSpray™), em infusão constante de uma solução de leucina-encefalina (1 ng mL<sup>-1</sup>, a 20 µL min<sup>-1</sup>). O modo de ionização positivo utilizou uma voltagem de capilar de 3 kV, voltagem de cone amostral de 40 V, voltagem *offset* de 80 V, temperatura de dessolvatação de 300 °C, temperatura da fonte de 90°C, fluxo de gás no cone 100 L h<sup>-1</sup> e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L h<sup>-1</sup>. O processamento de dados foi feito utilizando o software Mass Lynx 4.1 (Waters Co., USA).

### 3.2.6 Métodos Computacionais

Os cálculos de DFT da seção 4.2.4 foram realizados por Dr. Claudio D. Navo sob a supervisão do Prof. Dr. Gonzalo Jiménez-Osés, colaboradores do *Centro de Investigación Cooperativa em Biociencias* (CIC bioGUNE), Derio - Espanha.

Otimizações geométricas e estados de transição (TS) foram realizados aplicando-se o Gaussian 16<sup>94</sup> usando o funcional híbrido M06-2X,<sup>95</sup> conjunto de bases 6-31+G(d,p) e potencial nuclear efetivo LanL2DZ<sup>96</sup> para átomos de paládio com grades de integração ultrafinas. Os efeitos do solvente em água foram considerados implicitamente através do modelo contínuo polarizável IEF-PCM.<sup>97</sup> A possibilidade de diferentes conformações foi considerada para todas as estruturas. Todos os pontos estacionários foram caracterizados por uma análise de frequência realizada no mesmo nível utilizado nas otimizações geométricas a partir das quais foram obtidas correções térmicas a 298,15 K.

Cálculos de ponto único foram realizados nessas geometrias usando o funcional híbrido ωB97x-D,<sup>98</sup> conjunto de bases 6-311+G(2d,p) e potencial nuclear efetivo LanL2DZ para átomos de paládio com grades de integração ultrafinas. A aproximação quase harmônica relatada por Truhlar e coautores, foi utilizada para substituir a aproximação do oscilador harmônico para o cálculo da contribuição vibracional para a entropia.<sup>99</sup> Frequências escalonadas não foram consideradas. Cálculos de coordenadas de reação intrínsecas ponderadas em massa (IRC) foram realizados usando o algoritmo de Hratchian e Schlegel<sup>100</sup> para garantir que os TSs realmente conectassem os reagentes e produtos apropriados. As energias livres de

Gibbs ( $\Delta G$ ) foram utilizadas para a discussão das estabilidades relativas das estruturas consideradas. O conformero de energia mais baixa para cada ponto estacionário calculado foi considerado na discussão. Coordenadas cartesianas, energias eletrônicas, entropias, entalpias, energias livres de Gibbs e frequências mais baixas das estruturas calculadas estão resumidas no Anexo E. As coordenadas cartesianas das estruturas de mais baixa energia calculadas com PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd) são mostradas no Anexo E.

### 3.2.7 Cultura Celular

Os experimentos em cultura celular da seção 4.1.4 foram realizados por Ma. Rafaela Brito Oliveira e Arthur Luiz Miranda Nicastro no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional na Universidade de Federal de São Paulo (UNIFESP), sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Portes Ureshino.

Os experimentos em cultura celular da seção 0 foram realizados pela Dra. Eloah Latocheski no Bernardes Lab no Departamento de Química da Universidade de Cambridge - UK, sob coorientação do Prof. Dr. Gonçalo Bernardes, durante seu estágio sanduíche, sob orientação do Prof. Dr. Josiel B. Domingos. As células foram incubadas em atmosfera umidificada de 90% de ar - 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As células SKBR3 foram cultivadas em McCoy's 5A (modificado), com GlutaMAX™ suplementado com 10% de FBS inativado por calor. As células SKBR3 (linhagem celular aderentes) foram passadas pela adição de Tripsina-EDTA (0,25%) (Gibco™) a cada 2-3 dias. As células MOLM13 (linha celular em suspensão) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco™) com 10% de FBS inativado por calor e foram mantidas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. As células foram cultivadas até 70% de confluência antes da semeadura em 200 µL a 5000 células/poço em uma placa de fundo plano transparente de 96 poços Corning Costar para linhagem celular SKBR3 e placa de fundo redondo para MOLM13. Os ensaios CellTiter-Blue® foram empregados para determinar a toxicidade e foram realizados após a substituição do meio por 100 µL de meio fresco seguido da adição de 20 µL de solução CellTiter-Blue® para cada poço e incubação por 6 h. Após esse período, a determinação fluorimétrica da viabilidade celular foi realizada de acordo com as orientações do fornecedor. A intensidade de fluorescência foi medida em  $\lambda_{ex}$ : 555 nm e  $\lambda_{em}$ : 585 nm. A fluorescência residual de CellTiter-Blue® no meio celular foi tratada como fundo e foi subtraída de cada poço. Para o cálculo da viabilidade celular, foi considerado a intensidade de

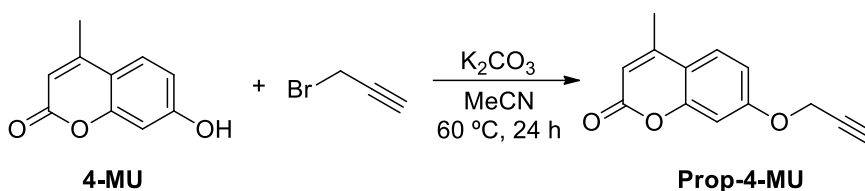
fluorescência resultante nos poços como uma porcentagem do controle, que consiste em 0,25% de DMSO e foi definido como 100% viável. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3 SÍNTESE DOS SUBSTRATOS (PRÓ-FLUORÓFOROS E PRÓ-FÁRMACOS) E DOS COMPLEXOS METÁLICOS

#### 3.3.1 Síntese da 7-(2-propinil)-oxi-4-metil-cumarina (Prop-4-MU)

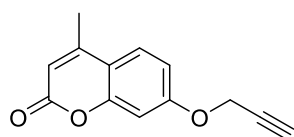
A inserção do grupo protetor propargil na 7-hidróxi-4-metil-cumarina foi realizado conforme ilustrado no Esquema 27, através da adaptação de procedimentos descritos na literatura.<sup>101</sup>

Esquema 27 - Síntese da 7-(2-propinil)-oxi-4-metil-cumarina (Prop-4-MU).



A um balão de 100 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado a 7-hidroxi-4-metil-cumarina (5,0 mmol, 0,881 g), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mmol, 7,0 g) e brometo de propargila (80% em tolueno, 5,5 mmol, 630 μL) em acetonitrila (40 mL). O sistema foi fechado com septo de borracha e aquecido a 60 °C, permanecendo sob agitação a esta temperatura por 24 h. Posteriormente o solvente foi removido em rotaevaporador sob pressão reduzida e a reação foi diluída com água (20 mL) e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL). A fase orgânica é lavada com solução de NH<sub>4</sub>Cl (20 mL), solução salina saturada (brine) (20 mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo obtendo-se a 7-(2-propinil)-oxi-4-metil-cumarina, utilizada sem a necessidade de purificação adicional.

#### 7-(2-propinil)-oxi-4-metilcumarina (Prop-4-MU)

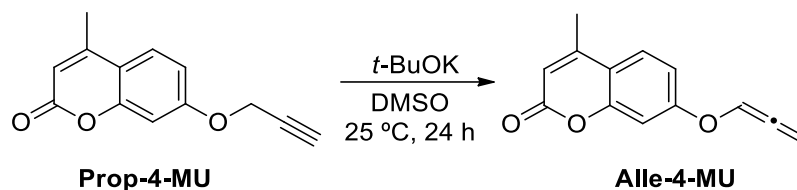


Aspecto físico: Sólido branco. Rendimento: 1,01 g – 94%. RMN:<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ = 7,53 (d, *J* = 9,5 Hz; 1H); 6,96 – 6,91 (m, 2H); 6,15 (s, 1H); 4,76 (d, *J* = 2,4 Hz; 2H); 2,59 (t, *J* = 2,4 Hz; 1H); 2,40 (d, *J* = 1,2 Hz; 3H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ = 161,1; 160,4; 155,1; 152,5; 125,7; 114,3; 112,7; 112,5; 102,3; 77,5; 76,6; 56,3; 18,7. Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.<sup>101</sup>

### 3.3.2 Síntese do 7-(1,2-alenil)-oxi-4-metil-cumarina (Alle-4-MU)

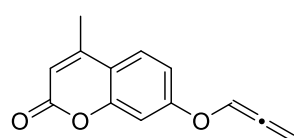
O grupo protetor 1,2-alenil foi obtido através da reação de isomerização da *O*-propargil-cumarina conforme ilustrado no Esquema 28, adaptando-se procedimentos descritos na literatura.<sup>102, 9</sup>

Esquema 28 - Síntese do 7-(1,2-alenil)-oxi-4-metilcumarina (Alle-4-MU).



A um balão de 25 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado a 7-propenil-oxi-4-metilcumarina (1,0 mmol, 0,214 g). O balão foi selado com septo de borracha, evacuado sob pressão reduzida (bomba de vácuo) e recarregado com nitrogênio (operação realizada 3 vezes através do septo de borracha). Em seguida, foram adicionados sucessivamente DMSO (1,5 mL) e o *t*-BuOK (0,5 mmol, 56,0 mg em 1,5 mL DMSO) sob atmosfera de nitrogênio. O balão foi selado e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente a reação foi diluída com água (40 mL) e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 20 mL). A fase orgânica é lavada com solução de NH<sub>4</sub>Cl (30 mL), solução salina saturada (brine) (30 mL), água (20 mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna, empregando solução de 0-4% de acetato de etila em hexano como eluente.

#### 7-(1,2-propadienil)-oxi-4-metilcumarina (Alle-4-MU)

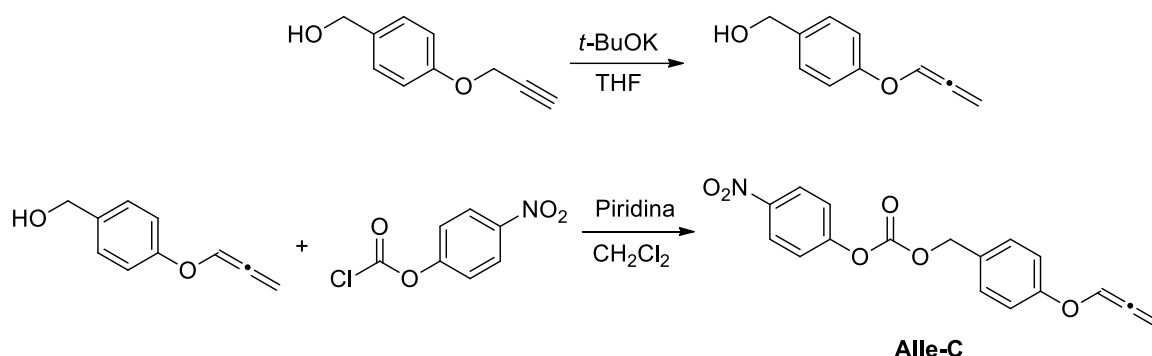


Aspecto físico: Sólido branco. Rendimento: 22 mg – 10%. RMN:<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) 7,54 (d, *J* = 9,5 Hz; 1H); 7,04 – 6,97 (m, 2H), 6,86 (t, *J* = 5,9 Hz; 1H); 6,19 (s, 1H); 5,52 (d, *J* = 5,9 Hz; 2H); 2,41 (s, 3H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ = 202,83; 161,09; 160,13; 155,07; 152,38; 125,85; 116,75; 115,26; 113,64; 113,02; 104,21; 90,31; 18,81. Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.<sup>9</sup>

### 3.3.3 Síntese do 4-nitrofenil-(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil carbonato (Alle-C)

O intermediário inédito 4-nitrofenil-(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil carbonato (Alle-C) foi preparado em duas etapas, através da adaptação de procedimentos descritos na literatura (Esquema 29).<sup>103,104</sup>

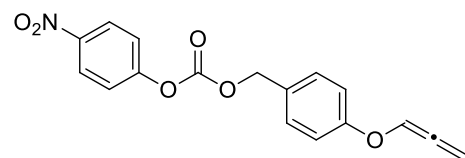
Esquema 29 - Síntese do 4-nitrofenil-(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil carbonato (Alle-C).



A um balão de 100 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado o álcool 4-propargil-oxi-benzílico (2,0 mmol, 0,324g). O balão foi selado com septo de borracha, evacuado sob pressão reduzida (bomba de vácuo) e recarregado com nitrogênio (operação realizada 3 vezes através do septo de borracha). Em seguida, foram adicionados sucessivamente THF (20 mL) e o *t*-BuOK (2,0 mmol, 0,224 g em 10 mL THF) sob atmosfera de nitrogênio a 0°C. Após 30 min a 0°C a reação foi deixada sob agitação a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente a reação foi diluída com água (40 mL) e extraída com acetato de etila (3x25 mL). A fase orgânica é lavada com solução salina saturada (brine) (30 mL), água (20 mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O material bruto (0,289 g) foi usado na etapa seguinte sem purificação adicional.

A um balão de 100 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado o álcool 4-propa-1,2-dien-1-il-oxi-benzílico. Em seguida, foram adicionados sucessivamente a 0°C: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 mL), piridina (0,16 mL, 2,0 mmol) e uma solução de 4-nitrofenilcloroformato (0,420 g, 2,0 mmol em 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco) foi adicionada gota a gota. O balão foi selado e a mistura foi agitada a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente a reação foi diluída com água (40 mL) e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x20 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna, empregando solução de 10% de acetato de etila em hexano como eluente.

## 4-nitrofenil-(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil carbonato (Alle-C)

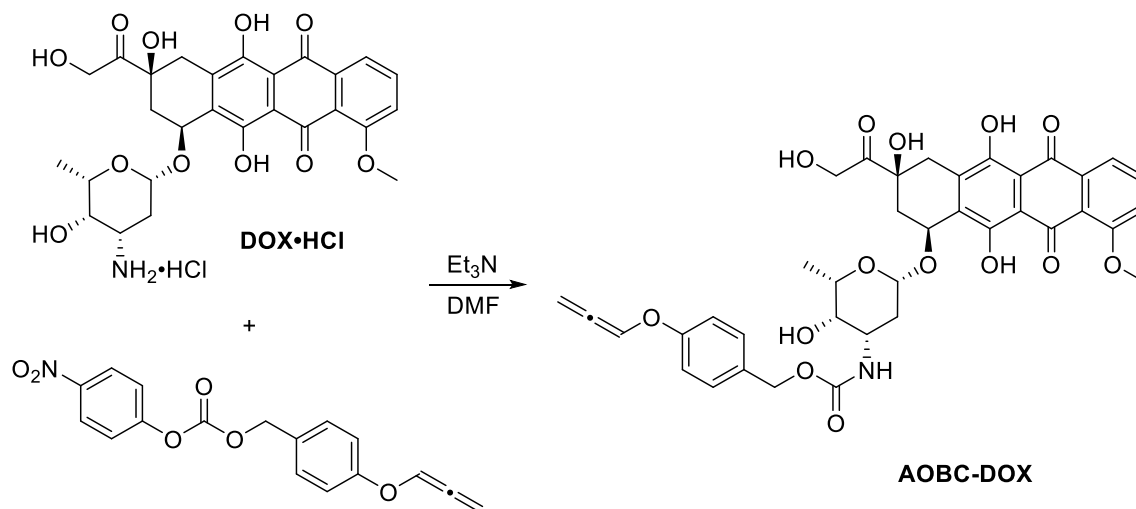


Aspecto físico: Cristal branco. Rendimento: 0,42 g – 62%. Ponto de fusão: 106-107 °C. RMN:<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  = 8,27 (d,  $J$  = 9,15 Hz; 2H); 7,43 – 6,81 (m, 4H); 7,10 (d,  $J$  = 8,6 Hz; 2H); 6,84 (t,  $J$  = 5,9 Hz; 1H); 5,47 (d,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); 5,25 (s, 2H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  = 202,7; 157,8; 155,5; 152,4; 145,4; 130,5; 128,4; 125,3; 121,7; 117,4; 116,9; 89,7; 70,6. Análise elementar: C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub> requer: C 62,39; H 4,00; N 4,28. Obtido: C 62,56; H 4,09; N 4,21.

### 3.3.4 Síntese do (4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil-oxi-carbonil-doxorrubicina (AOBC-DOX)

O novo pró-fármaco **AOBC-DOX** foi preparado através da reação de proteção do nitrogênio primário do fármaco Doxorrubicina conforme descrito no Esquema 30.

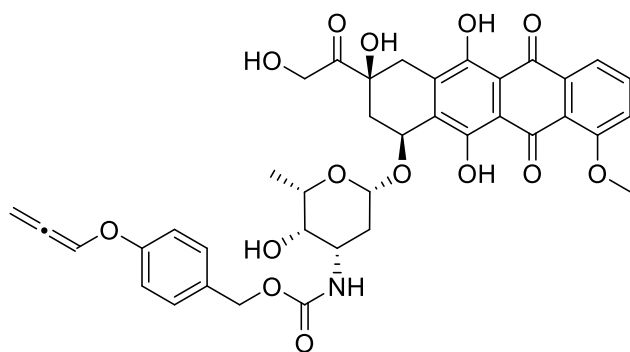
Esquema 30 - Síntese do (4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil-oxi-carbonil-doxorrubicina (**AOBC-DOX**).



A um tubo de ensaio de 5 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado Cloridrato da Doxorrubicina (0,057 mmol, 33 mg). O tubo foi selado com septo de borracha, evacuado sob pressão reduzida (bomba de vácuo) e recarregado com nitrogênio (operação realizada 3 vezes através do septo de borracha). Em seguida, foram adicionados sucessivamente DMF (1 mL), Et<sub>3</sub>N (20  $\mu$ L, 0,14 mmol) sob atmosfera de nitrogênio. Uma solução do 4-nitrofenil-(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil carbonato (0,092 mmol, 30 mg em 1 mL DMF) foi adicionada gota a gota. A mistura foi agitada

à temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente a reação foi diluída com água (40 mL) e extraída com acetato de etila (4x40 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna, empregando solução de 0 a 3% de metanol em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente.

(4-propa-1,2-dien-1-il)-oxi-benzil-oxi-carbonil-doxorrubicina (**AOBC-DOX**)



**AOBC-DOX**

Aspecto físico: sólido vermelho.

Rendimento: 35 mg – 82%. <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 14,00 (s, 1H); 13,28 (s, 1H); 8,06 (d, *J* = 7,6 Hz; 1H); 7,80 (t, *J* = 8,1 Hz; 1H); 7,40 (d, *J* = 8,2 Hz; 1H); 7,27 (s, 2H); 7,01 (d, *J* = 8,3 Hz; 2H), 6,80 (t, *J* = 5,9 Hz; 1H), 5,51 (d, *J* = 3,8 Hz; 1H); 5,44 (d, *J* = 5,9 Hz; 2H); 5,33–5,29 (m,

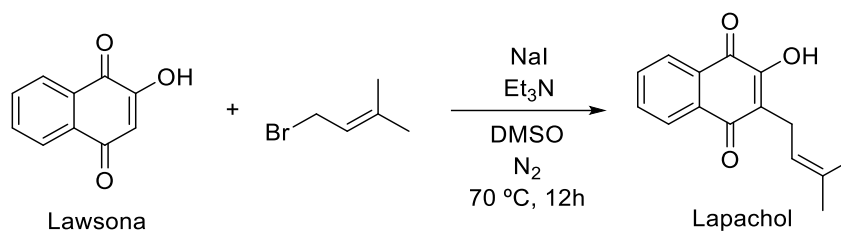
1H); 5,10 (d, *J* = 8,5 Hz; 1H); 4,98 (s, 2H); 4,77 (d, *J* = 4,8 Hz; 2H); 4,55 (s, 1H); 4,15–4,11 (m, 1H); 4,09 (s, 3H); 3,91–3,82 (m, 1H); 3,67 (s, 1H); 3,29 (dd, *J* = 18,6; 1,4 Hz; 1H); 3,07–2,99 (m, 2H); 2,34 (d, *J* = 14,6; 1H); 2,18 (dd, *J* = 14,7; 4,2 Hz; 1H); 1,89 (d, *J* = 4,4 Hz; 1H); 1,86 (d, *J* = 4,5 Hz; 1H); 1,76 (td, *J* = 13,3; 4,2 Hz; 1H); 1,29 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H, 6'); 1,25 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 213,9; 202,7; 187,24; 186,8; 178,0; 176,6; 161,1; 156,2; 155,7; 155,5; 135,83; 135,6; 133,6; 130,7; 129,9; 121,09; 119,9; 118,5; 117,7; 116,8; 111,7; 111,5; 100,7; 89,7; 69,6; 67,2; 66,4; 65,6; 56,7; 47,0; 35,7; 34,1; 30,2; 16,8. HRMS (ESI-TOF): C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>O<sub>14</sub>N<sub>1</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> requer 754,2112/ Obtido: 754,2115.



### 3.3.5 Síntese do Lapachol

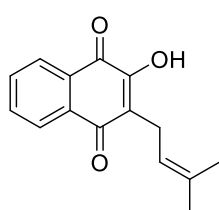
O Lapachol foi obtido a partir da Lawsona, comercialmente disponível, conforme ilustrado no Esquema 31, através de procedimento previamente descrito na literatura.<sup>105</sup>

Esquema 31 – Síntese Lapachol.



A um balão de 100 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado a Lawsona (16,0 mmol, 2,864 g) em DMSO (20 mL), o brometo de 3,3-dimetilalilil (20 mmol, 2,42 mL), a trietilamina (Et<sub>3</sub>N, 20 mmol, 2,4 mL) e o iodeto de sódio (NaI, 16 mmol, 2,4 g). A solução é mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora e a 70 °C por 12 horas em atmosfera de N<sub>2</sub>. Posteriormente a reação foi diluída com água (40 mL) e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5x20 mL). A fase orgânica é lavada com solução de bicarbonato de sódio (40 mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna, empregando solução de 10% de acetato de etila em hexano como eluente.

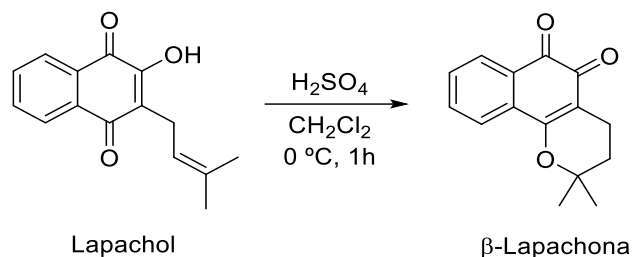
#### Lapachol



Aspecto físico: Sólido amarelo. Rendimento: 1,68 g – 43%. RMN:<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  = 8,14 – 8,04 (m, 2H); 7,78 – 7,63 (m, 2H); 7,36 (s, 1H); 5,21 (t,  $J$  = 7,5 Hz; 1H); 3,1 (d,  $J$  = 7,4 Hz; 2H); 1,79 (s, 3H); 1,69 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  = 184,5; 181,7; 152,7; 134,8; 133,8; 132,9; 132,8; 129,4; 126,7; 126,0; 123,5; 119,6; 25,7; 22,6; 17,8. Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.<sup>76</sup>

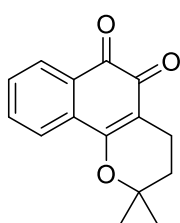
### 3.3.6 Síntese da $\beta$ -Lapachona

A  $\beta$ -Lapachona foi obtida a partir da ciclização do Lapachol em meio ácido conforme ilustrado no Esquema 32, através de procedimento descrito na literatura.<sup>106</sup>

Esquema 32 - Síntese do  $\beta$ -Lapachona.

A um balão de 100 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado o Lapachol (6,0 mmol, 1,5 g) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) e posteriormente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (30 mL) sob agitação em banho de gelo ( $0^\circ\text{C}$ ). A solução é mantida sob agitação em banho de gelo por 1 hora. Posteriormente a solução vermelha foi cuidadosamente diluída com água gelada (40 mL) e extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x50 mL). A fase orgânica é lavada com solução de bicarbonato de sódio (2x50 mL), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna, empregando solução de 5-20% de acetato de etila em hexano como eluente.

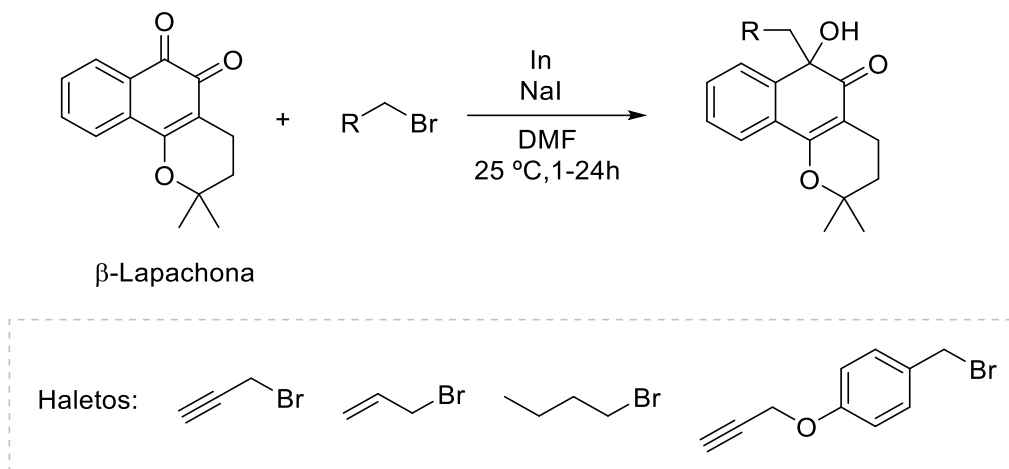
### $\beta$ -Lapachona



Aspecto físico: Sólido laranja. Rendimento: 0,64 g – 43%. Ponto de fusão:  $158\text{--}162^\circ\text{C}$ , Lit.<sup>76</sup>  $153\text{--}155^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ )  $\delta = 8,06$  (dd,  $J = 7,6; 1,2$  Hz; 1H);  $7,82$  (dd,  $J = 7,7; 1,4$  Hz; 1H);  $7,65$  (td,  $J = 7,6; 1,5$  Hz; 1H),  $7,50$  (td,  $J = 7,5; 1,4$  Hz; 1H);  $2,58$  (t,  $J = 6,6$  Hz; 2H);  $1,86$  (t,  $J = 6,7$  Hz; 2H);  $1,47$  (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ )  $\delta = 179,8; 178,5; 162,0; 134,7; 132,6; 130,6; 130,1; 128,5; 124,0; 112,7; 79,2; 31,6; 26,7; 16,1$ . HRMS (ESI-TOF):  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  requer 243,1021/ Obtido: 243,1051. Os dados estão de acordo com os descritos na literatura.<sup>76</sup>

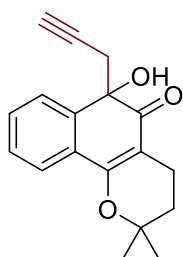
### 3.3.7 Síntese das novas $\alpha$ -hidroxicetonas da $\beta$ -Lapachona

Os pró-fármacos foram obtidos a partir da  $\beta$ -Lapachona através da formação de  $\alpha$ -hidroxicetonas mediada por índio. A reação ocorre entre 1,2-diona e diferentes brometos orgânicos, na presença de índio metálico e iodeto de sódio em DMF em temperatura ambiente (Esquema 33).<sup>107</sup> A seguir os dados referentes de aspecto físico, rendimento, ponto de fusão, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  e HRMS das novas moléculas sintetizadas são apresentados.

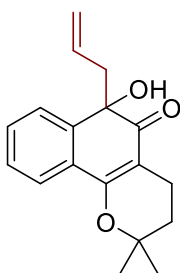
Esquema 33 - Síntese dos novos pró-fármacos da  $\beta$ -Lapachona ( $\alpha$ -hidroxicetonas).

A um tudo de ensaio de 5 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado a  $\beta$ -Lapachona (0,242 g, 1,0 mmol), iodeto de sódio (0,232 g, 1,5 mmol) e índio (0,120 g, 1,05 mmol), haleto (1,5 mmol) e o sistema foi fechado com um septo de borracha. Em seguida foi adicionado através do septo o DMF (3 mL). A reação foi ultrassonicada durante 1 min e agitada durante 30 min a 25 °C e finalizada com algumas gotas de HCl (5,0 mol L<sup>-1</sup>). A reação foi diluída com água (40 mL) e extraída com acetato de etila (3x 25 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de salina (25 mL) e água (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Os compostos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando 5-10% de acetato de etila em hexano como eluente, obtendo-se os compostos como sólidos incolores.

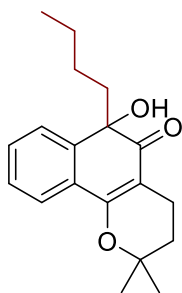
### Prop-Lap



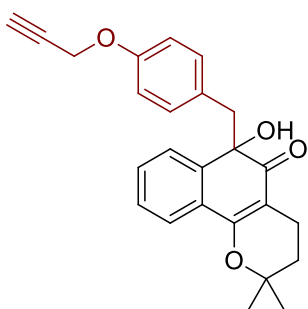
Aspecto físico: Sólido incolor. Rendimento: 0,141 g – 50%. Ponto de fusão: 119-120 °C. <sup>1</sup>H RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  = 7,72 (d,  $J$  = 7,8 Hz; 1H); 7,64 (d,  $J$  = 7,7 Hz; 1H); 7,39 (td,  $J$  = 7,6; 1,2 Hz; 1H); 7,30 (td,  $J$  = 7,7; 1,2 Hz; 1H); 4,06 (s, 1H); 2,61 – 2,57 (m, 3H); 2,34 – 2,29 (m, 1H); 1,91 (t,  $J$  = 2,7 Hz; 1H); 1,80 (dt,  $J$  = 13,4; 5,7 Hz; 1H); 1,72 – 1,67 (m, 1H); 1,40 (s, 3H); 1,35 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  = 199,4; 162,7; 140,9; 130,3; 127,9; 127,4; 125,5; 123,4; 106,4; 78,6; 78,4; 75,8; 72,6; 37,2; 32,0; 27,8; 25,8; 16,0. HRMS (ESI-TOF): C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> requer 283,1334/ Obtido: 283,1330.

**Alil-Lap**

Aspecto físico: Sólido incolor. Rendimento: 0,232 g – 81%. Ponto de fusão: 75-77 °C.  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 7,77 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H); 7,64 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H); 7,44 (td,  $J$  = 7,6, 1,2 Hz, 1H); 7,33 (td,  $J$  = 7,5, 1,2 Hz, 1H); 5,61 – 5,40 (m, 1H); 5,03 – 4,92 (m, 1H); 4,92 – 4,76 (m, 1H); 3,93 (s, 1H); 2,63 (dt,  $J$  = 17,5, 6,0 Hz, 1H); 2,50 (d,  $J$  = 7,4 Hz, 2H); 2,39 – 2,23 (m, 1H); 1,96 – 1,68 (m, 2H); 1,45 (s, 3H); 1,41 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 201,1; 162,0; 142,1; 132,0; 130,1; 127,5; 127,0; 125,5; 123,3; 118,8; 106,5; 78,1; 77,5; 51,6; 32,0; 27,6; 25,9; 15,9. HRMS (ESI-TOF):  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  requer: 285,1490/ Obtido: 285,1499.

**Butil-Lap**

Aspecto físico: Sólido incolor. Rendimento: 0,047 g – 16%. Ponto de fusão: 97-100 °C.  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 7,78 (d,  $J$  = 7,3 Hz; 1H); 7,63 (d,  $J$  = 7,5 Hz; 1H); 7,42 (td,  $J$  = 7,5; 1,3 Hz; 1H); 7,33 (td,  $J$  = 7,5; 1,3 Hz; 1H); 3,85 (s, 1H); 2,65 (dt,  $J$  = 17,4; 6,1 Hz; 1H); 2,42 – 2,24 (m, 1H); 1,95 – 1,70 (m, 4H); 1,44 (s, 3H); 1,42 (s, 3H); 1,23 – 1,02 (m, 4H); 0,78 (t,  $J$  = 6,7 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 202,2; 161,9; 143,1; 130,0; 127,3; 127,0; 125,5; 123,3; 106,3; 78,1; 47,0; 32,0; 27,5; 26,1; 26,0; 22,8; 16,1; 14,0. HRMS (ESI-TOF):  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  requer: 301,1803/ Obtido: 301,1802.

**POA-Lap**

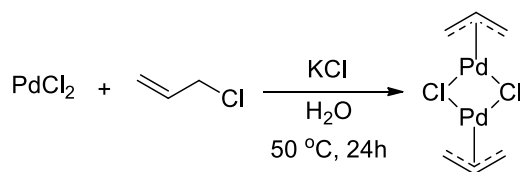
Aspecto físico: Sólido incolor. Rendimento: 0,118 g – 61%. Ponto de fusão: 124-126 °C.  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,66 (dd,  $J$  = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,59 (dd,  $J$  = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,44 (td,  $J$  = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,33 (td,  $J$  = 7,5, 1,5 Hz, 1H), 6,68 (d,  $J$  = 8,7 Hz, 2H), 6,52 (d,  $J$  = 8,7 Hz, 2H), 4,59 (d,  $J$  = 2,4 Hz, 2H), 3,94 (s, 1H), 3,02 (s, 2H), 2,63 – 2,50 (m, 1H), 2,48 (t,  $J$  = 2,4 Hz, 1H), 2,23 – 2,04 (m, 1H), 1,70 – 1,59 (m, 2H), 1,36 (s, 3H), 1,13 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 200,7; 162,2; 156,7; 141,7; 130,8; 130,1; 128,3; 127,6; 127,5; 125,8; 123,0; 114,1; 106,9; 78,81; 78,3; 78,0; 75,5; 55,9; 53,7; 31,8; 27,6; 25,90; 15,8. HRMS (ESI-TOF):  $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{O}_4$  (M + H) requer 389,1753/Obtido: 389,1771

### 3.3.8 Síntese dos Complexos de Paládio

#### 3.3.8.1 Síntese do complexo $Pd_2Allyl_2Cl_2$

O dímero do cloreto de alilpaládio foi obtido através da reação entre cloreto de alila e cloreto de paládio conforme ilustrado no Esquema 34, adaptando procedimentos descritos na literatura.<sup>108</sup>

Esquema 34 - Síntese do complexo  $Pd_2Allyl_2Cl_2$ .

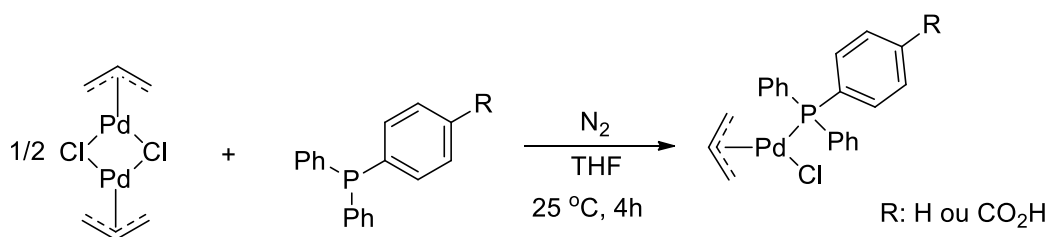


A um tudo de ensaio de 25 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado o cloreto de paládio (2,5 mmol, 0,430 g) e cloreto de potássio (7,5 mmol, 0,562 g) e água destilada (15 mL). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, foi adicionado o cloreto de alila (7,5 mmol, 0,62 ml) e a mistura reacional foi agitada à 50 °C, permanecendo sob agitação por 24 h. Posteriormente a reação foi extraída com  $CHCl_3$  (3x15 mL) e lavada com água (15 mL). A fase orgânica foi seca com  $Na_2SO_4$  anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi obtido como um sólido amarelo e armazenado sob atmosfera de  $N_2$  a temperatura de -25 °C.

#### 3.3.8.2 Síntese dos complexos ( $\eta^3$ -alil)cloro(fosfina)paládio(II)

Os complexos ( $\eta^3$ -alil)cloro(fosfina)paládio(II) foram obtidos através da reação entre o  $Pd_2Allyl_2Cl_2$  e a fosfina conforme ilustrado no Esquema 35, adaptando procedimentos descritos na literatura.<sup>40</sup>

Esquema 35 - Síntese dos complexos ( $\eta^3$ -alil)cloro(trifenilfosfina)paládio(II)



A um tudo de ensaio de 5 mL, previamente seco em estufa e equipado com barra de agitação magnética, foi adicionado o  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  (0,2 mmol, 0,0731 g, 1 eq) e a fosfina (0,4 mmol, 2 eq). O tudo de ensaio foi selado com septo de borracha, evacuado sob pressão reduzida (bomba de vácuo) e recarregado com nitrogênio (operação realizada 3 vezes através do septo de borracha). Em seguida, foi adicionado THF (10 mL) sob atmosfera de nitrogênio. O balão foi selado e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h. Posteriormente a reação foi concentrada a vácuo e os compostos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando 50% de acetato de etila em hexano como eluente, obtendo-se os compostos como sólidos amarelos claros. Os complexos foram armazenados sob atmosfera de  $\text{N}_2$  a temperatura de  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ .

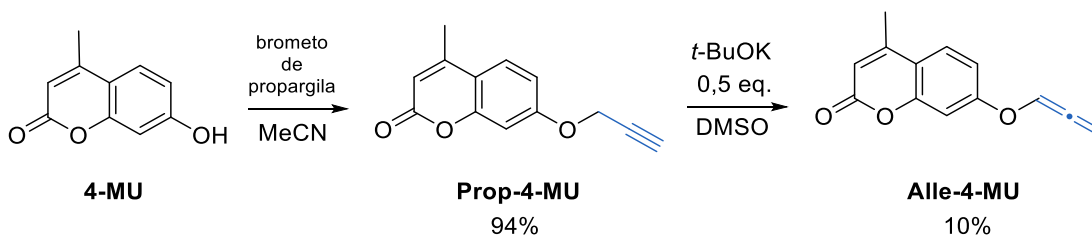
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CLIVAGEM DE LIGAÇÕES C-O, REAÇÃO DE *O*-DESALENILAÇÃO MEDIADA POR PALÁDIO(II): ESTUDO MECANÍSTICO E EFEITO DO CLORETO NO MEIO REACIONAL

#### 4.1.1 Síntese e Caracterização dos substratos para as Reações de Clivagem C-O

Para os estudos cinéticos das reações de clivagem C-O foram obtidos os éteres da 7-hidroxi-4-metil-cumarina (4-MU), os quais foram previamente descritos como substratos modelos em estudos de clivagem de ligações C-O.<sup>9</sup> A Prop-4-MU foi obtida em alto rendimento pela reação com o brometo de propargila, enquanto que a Alle-4-MU foi obtida pela isomerização do grupo propargil da Prop-4-MU mediada por *t*-BuOK (Esquema 36). Os compostos foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}.

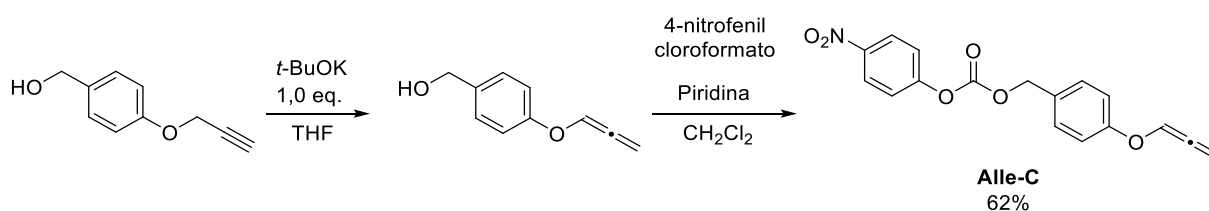
Esquema 36 – Síntese das cumarinas Prop-4-MU e Alle-4-UM.



Diversos alcóxialenos são obtidos a partir de éteres propargílicos por reações de isomerização promovidas por base, utilizando-se quantidades catalíticas de *t*-BuOK é possível obter os alcóxialenos em bons rendimentos.<sup>109</sup> Entretanto, a isomerização da Prop-4-MU levou à baixas quantidades da Alle-4-MU. Diversos testes foram realizados buscando melhorar o rendimento da reação de isomerização à Alle-4-MU, todos levaram a rendimentos baixos (<10%), pois aparentemente, o equilíbrio está deslocado para a molécula propargilada (Prop-4-MU). A quantidade obtida da Alle-4-MU foi considerada suficiente para prosseguir os testes cinéticos, visto que eles necessitam de pouca quantidade do material. Algumas observações técnicas sobre os procedimentos de isomerização: o uso de solventes secos é imprescindível para a obtenção dos produtos, além disso, a pureza do *t*-BuOK afeta a conversão.

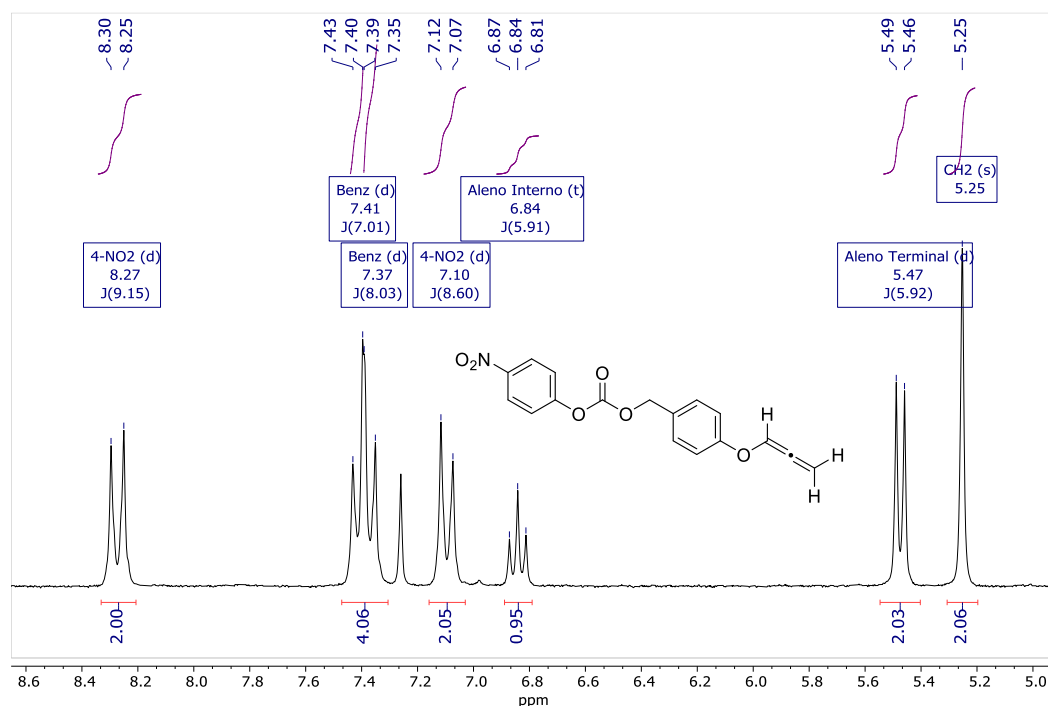
Conforme os dados da literatura<sup>9,54</sup> e os resultados iniciais das cinéticas de clivagem dos substratos Alle-4-MU e Prop-4-MU, onde observou-se que o grupo 1,2-alenil (Alle) é mais reativo que o grupo propargil frente aos catalisadores de paládio, também projetou-se uma nova molécula contendo o grupo 1,2-alenil (Esquema 37), para proteção de fármacos contendo grupos amino (Esquema 38).

Esquema 37 - Síntese em duas etapas do Alle-C



A síntese do carbonato inédito Alle-C é baseada na isomerização do álcool 4-propargil-oxi-benzílico. Após 24 horas foi observado por TLC o completo consumo do álcool 4-propargil-oxi-benzílico e a formação de um único produto, com fator de retenção menor, o 4-propa-1,2-dien-1-il-oxi-benzílico. Entretanto, ao tentar caracterizar esse produto, observou-se sua degradação. Assim, o mesmo foi usado diretamente na próxima etapa, a reação com o 4-nitrofenol. Desta forma, foi possível obter o Alle-C com rendimento satisfatório de 62%, após as duas etapas (Esquema 37). O composto foi identificado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , ponto de fusão e análise elementar. Como característica marcante no espectro de  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , observa-se o sistema de hidrogênios do grupo aleno, o hidrogênio interno em 6,84 ppm na forma de um tripleto ( $J = 5,9$  Hz) e os dois hidrogênios terminais em 5,47 na forma de um duplete ( $J = 5,9$  Hz) (Figura 3). No espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  os sinais para os três carbonos do grupo do grupo aleno são observados em 202,7, 117,4 e 89,7 ppm, como esperado.

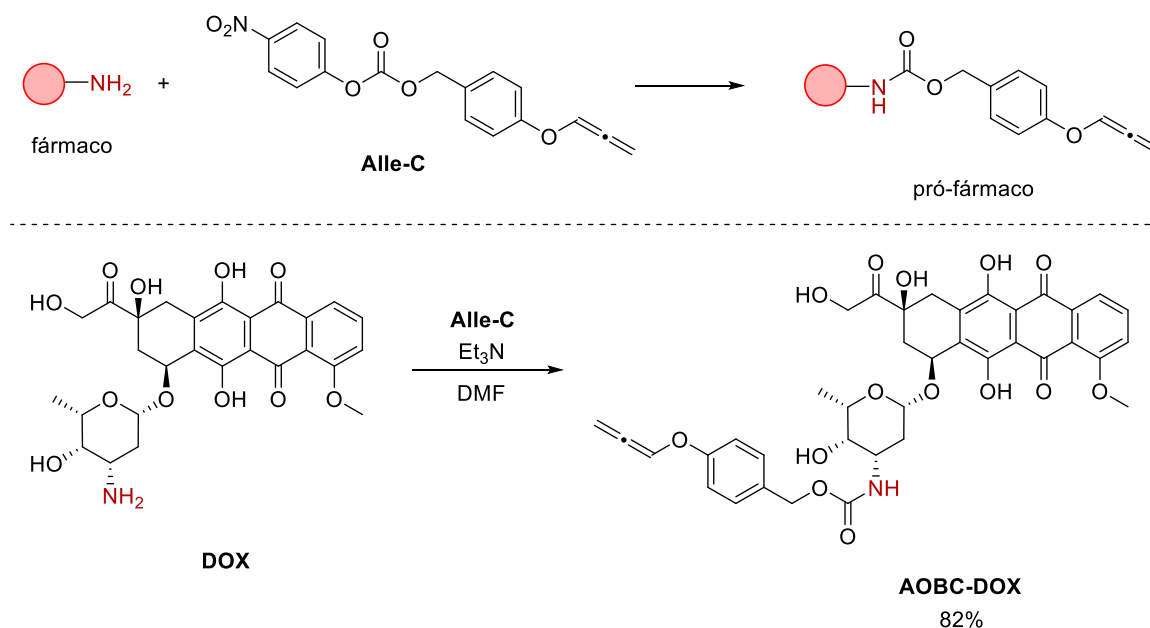


Figura 3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 200 MHz do Alle-C em  $\text{CDCl}_3$ 

Após a obtenção do Alle-C um novo pró-fármaco para o tratamento do câncer foi desenvolvido. Essa nova molécula foi preparada a partir do fármaco Doxorrubicina (DOX), o qual é um quimioterápico da classe das antraciclina. O Cloridrato de Doxorrubicina vem sendo usado no tratamento de diversos tipos de câncer: mama, pulmão, bexiga, tireoide, ovário, sarcomas ósseos e dos tecidos moles; linfomas de Hodgkin e não Hodgkin; neuroblastoma; tumor de Wilms; leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica. Os tratamentos baseados no DOX apresentam sérios efeitos colaterais, sendo que o mais perigoso é a sua cardiotoxicidade, que pode levar à insuficiência cardíaca, além do coração, cérebro, rim e fígado, que também são afetados.<sup>110</sup>

O DOX é considerado um fármaco modelo no estudo de reações bio-ortogonais de clivagem de ligação para o tratamento do câncer.<sup>31</sup> Seus pró-fármacos vem sendo estudados na ativação mediada por paládio em diversos estudos.<sup>111-114</sup> Assim, obteve-se o novo pró-fármaco AOBC-DOX (4-alenil-oxi-benzil-oxi-carbonil-doxorrubicina) (Esquema 38), através da reação entre o DOX-HCl e o Alle-C em DMF com trietilamina como base em um rendimento de 82%.

Esquema 38 – Estrutura do novo pró-fármaco AOBC-DOX sensível ao paládio para o tratamento do câncer.



O pró-fármaco inédito AOBC-DOX foi identificado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  e HRMS. Como característica marcante no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4 e Figura 5) para o composto AOBC-DOX, observa-se o sistema de hidrogênios do grupo aleno, o hidrogênio interno em 6,80 ppm na forma de um tripleto ( $J = 5,9$  Hz) e os dois hidrogênios terminais em 5,44 na forma de um duplete ( $J = 5,9$  Hz). O  $\text{CH}_2$  benzílico é observado na forma de um simpleto em 4,98 ppm e os hidrogênios do aromáticos do grupo benzil são observados na forma de dubletos ( $J = 8,3$  Hz) em 7,27 e 7,01 ppm (Figura 4). Os outros hidrogênios apresentam deslocamentos compatíveis com compostos semelhantes descritos.

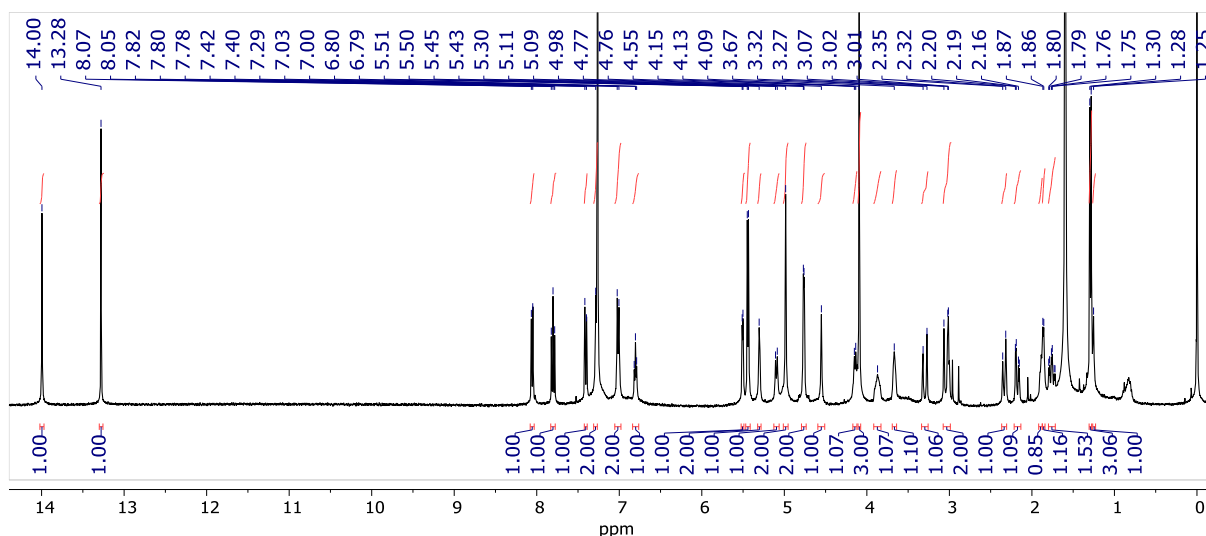
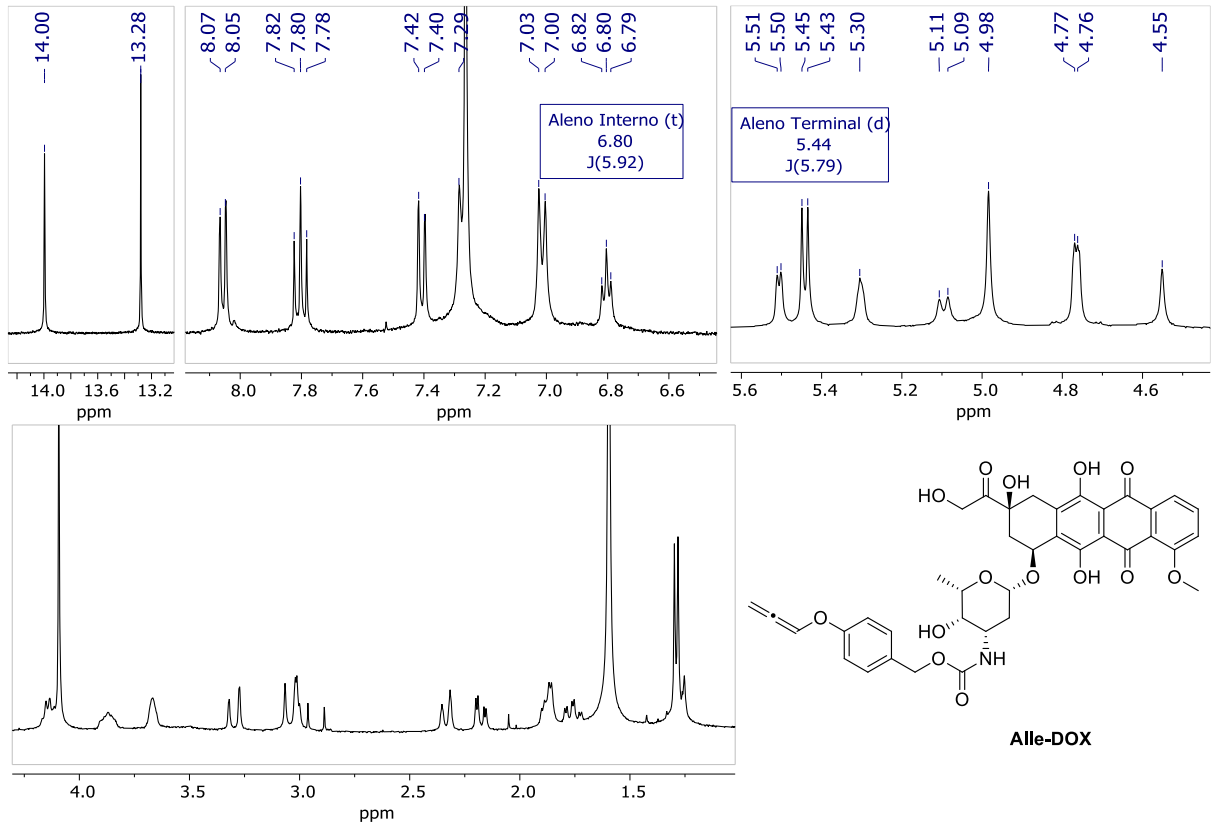
Figura 4 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz do AOBC-DOX em  $\text{CDCl}_3$ .

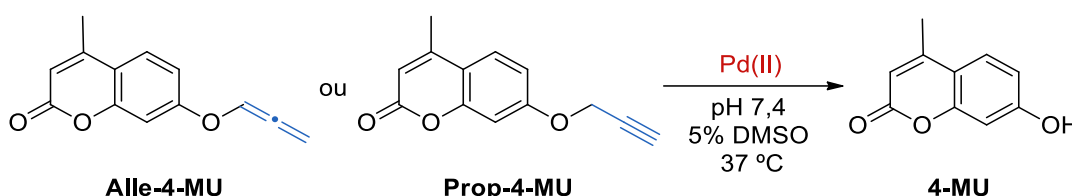
Figura 5 – Ampliação dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz do AOBC-DOX em  $\text{CDCl}_3$ .



#### 4.1.2 Estudos Cinéticos das Reação de Clivagem C-O

Os estudos cinéticos da clivagem de ligações C-O foi realizado para a reação modelo das 4-metilumbeliferona (4-MU) protegidas os grupos 1,2-alenil (Alle-4-MU) e propargil (Prop-4-MU) em meio aquoso (5% de DMSO) com pH 7,4, temperatura de 37 °C, na presença dos complexos de Pd(II): um sal simples ( $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ ) e o dímero  $\pi$ -Alil ( $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ ) (Esquema 39).

Esquema 39 - Esquema da reação de clivagem da ligação C-O das cumarinas protegidas.

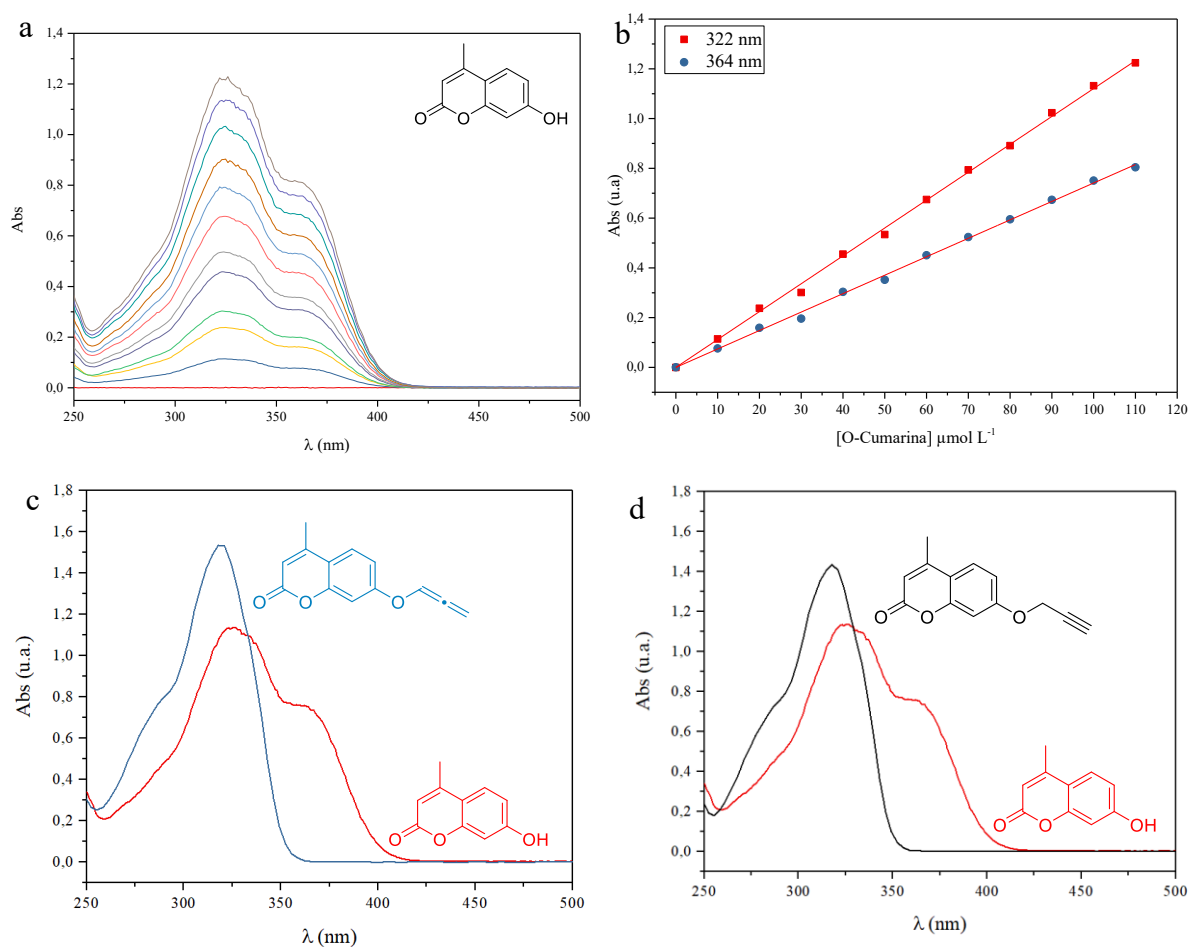


O acompanhamento do progresso das reações foi realizado por espectroscopia de UV-vis, em cubetas de quartzo de 4 mL. Inicialmente, foi realizada a varredura do espectro eletrônico e a curva de calibração da 4-MU nas condições inicialmente propostas para o estudo cinético (5% de DMSO, PBS (pH 7,4), 37 °C). Os gráficos obtidos encontram-se nas Figura 6a-b. O espectro exibe dois  $\lambda_{\text{max}}$  em 322 nm e em 364 nm, com coeficientes de absorvidade molar iguais a  $11210 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $7410 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Os espectros da Alle-4-MU e da Prop-4-MU foram sobrepostos com a 4-MU e são exibidos nas Figura 6c-d. É possível observar que na região do segundo  $\lambda_{\text{max}}$  da *O*-cumarina, 364 nm, o espectro do produto não sofre interferência pela absorção dos reagentes. Dessa forma, faz-se possível o acompanhamento da cinética da reação de desproteção por meio do espectro de absorção no UV-vis do produto no comprimento de onda de 364 nm.

Para todos os experimentos, foram usadas quantidades subestequiométricas dos complexos de paládio, o que é crucial para futuras aplicações biológicas. No entanto, a maioria dos estudos de reações de desproteção desenvolvidos até o momento, não usam quantidades subestequiométricas dos complexos metálicos, tornando difícil a compreensão do mecanismo catalítico. Nos testes iniciais avaliou-se a reatividade dos substratos Prop-4-MU (Figura 7) Alle-4-MU (Figura 8) na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , frente a diferentes concentrações (0, 10, 25 e  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) do sal comercial  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ .

Figura 6 - (a) Espectros de UV-vis para diferentes concentrações da 4-MU. (b) curva de calibração para 4-MU. (c e d) Espectros UV-vis sobrepostos das cumarinas protegidas e sua respectiva cumarina desprotegida. Condições: 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  das cumarinas, tampão PBS (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a 37  $^{\circ}\text{C}$ .



O ajuste exponencial das curvas cinéticas para uma reação de primeira ordem (Eq. 1), permitiu a determinação das constantes de velocidade macroscópicas observadas e o rendimento de cada fase para a reação de clivagem C-O para ambos os substratos.

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{inf}} - (\text{Abs}_{\text{inf}} - \text{Abs}_0)e^{-kt} \quad (\text{Eq. 1})$$

Como pode ser observado nos perfis cinéticos (Figura 7 e Figura 8), a reação com o substrato Alle-4-MU apresenta uma meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 1,8 minutos, enquanto que o substrato Prop-4-MU apresenta  $t_{1/2}$  de 19 minutos, com 0,5 equivalentes de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , mostrando a maior reatividade do grupo 1,2-alenil. Em todas as condições foram observados até dois *turnovers* para a formação do produto, quando as reações são mediadas por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ .

Figura 7 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU, acompanhado por espectrofotometria de UV-vis em 364 nm. Condições reacionais: 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Prop-4-MU, 0, 10, 25 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , tampão PBS (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a 37  $^\circ\text{C}$ .

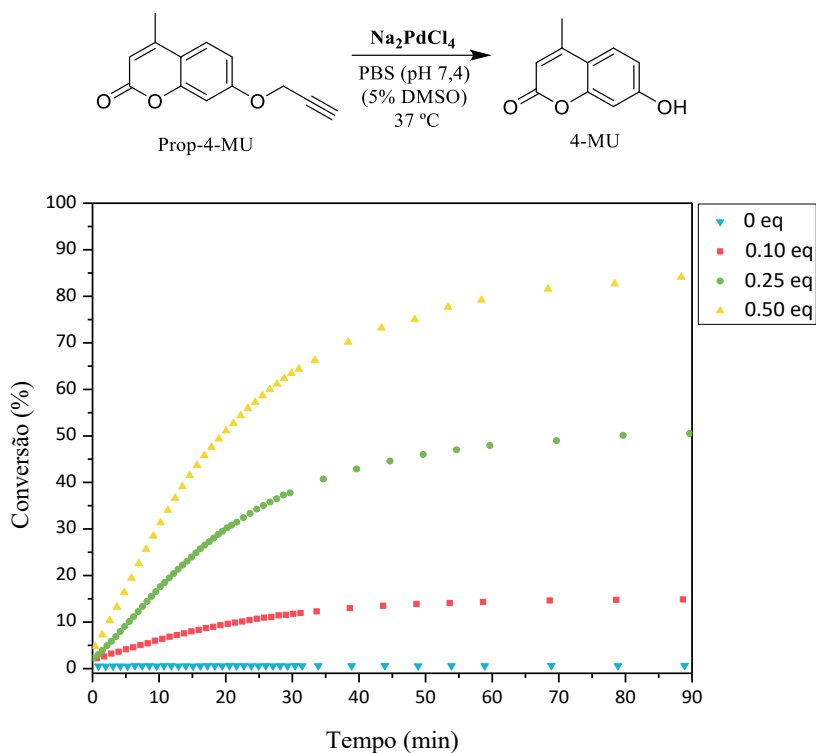
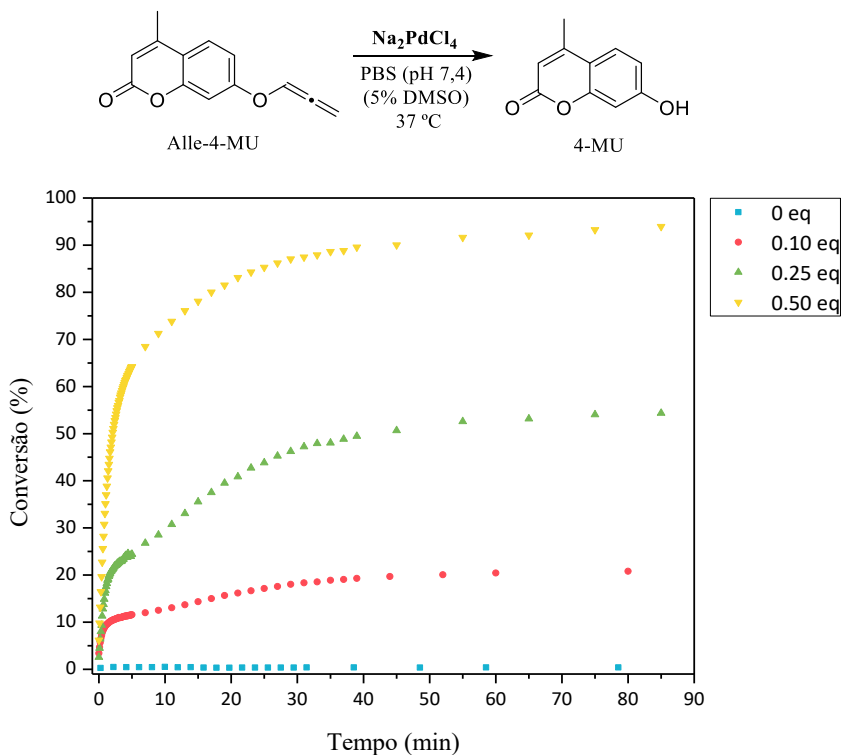
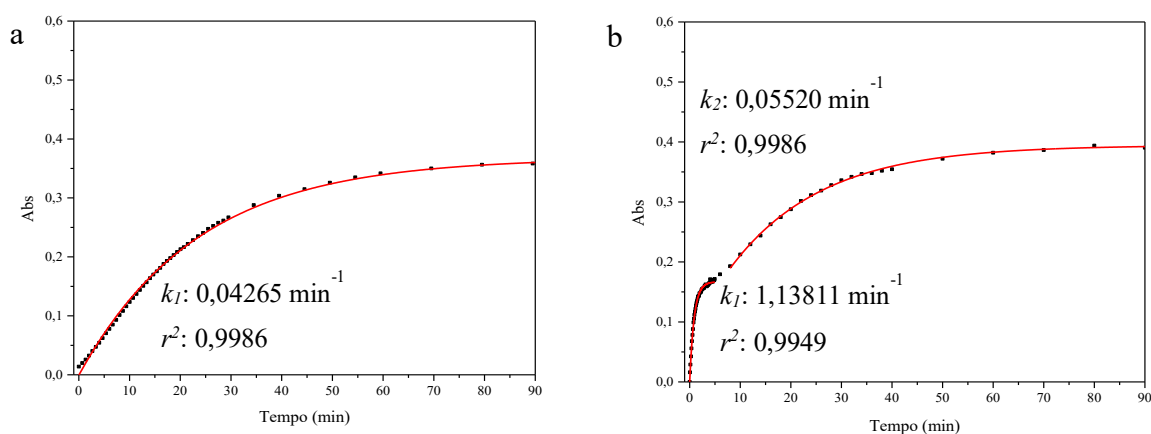


Figura 8 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU, acompanhado por espectrofotometria de UV-vis em 364 nm. Condições reacionais: 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Alle-4-MU, 0, 10, 25 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , tampão PBS (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a 37  $^\circ\text{C}$ .



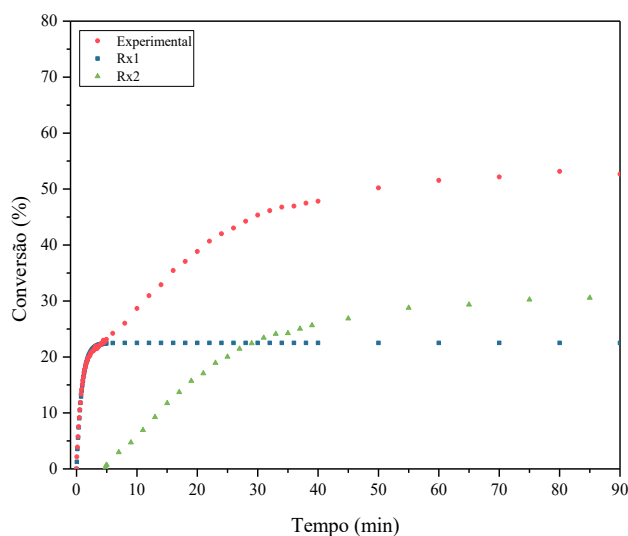
O ajuste não linear do perfil cinético da reação da Prop-4-MU com 0,25 eq. de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , corresponde a uma cinética de primeira ordem, de onde se obteve a constante de velocidade  $k_{\text{obs}}$  ( $0,04265 \text{ min}^{-1}$ ), conforme mostrado na Figura 9a. Enquanto que o Alle-4-MU segue uma cinética bifásica, isto é, duas reações paralelas que produzem o produto com diferentes constantes de velocidade. Neste caso, obteve-se duas constantes cinéticas,  $k_{\text{obs1}}$  ( $1,13811 \text{ min}^{-1}$ ) e  $k_{\text{obs2}}$  ( $0,05520 \text{ min}^{-1}$ ), conforme mostrado na Figura 9b. Este ajuste do perfil cinético permitiu a deconvolução da curva em duas exponenciais (Figura 10), onde a primeira reação é cerca de 20 vezes mais rápida que a segunda.

Figura 9 - Ajuste de primeira ordem para a desproteção do substrato (a) Prop-4-MU e (b) Alle-4-MU. Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Prop-4-MU ou Alle-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , tampão PBS ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Além disso, uma importante observação na reação de desalenilação é que a fase rápida (Rx1) é responsável pela conversão de 24% do substrato em produto, isto é, um *turnover*, enquanto a fase lenta (Rx2) converte em torno de 30% do substrato em produto, ou seja, 1,2 *turnovers* (Figura 10). Já para reação de despropargilação, a única fase observada leva a conversão de 48%, ou seja, aproximadamente dois *turnovers*. Embora ambos os substratos resultem em conversões semelhantes, a velocidade a qual a clivagem é observada é bem distinta, o  $k_{\text{obs}}$  (Rx1) para a reação de desalenilação é 27 vezes maior que para a despropargilação.

Figura 10 - Perfil de cinética e decovulação do substrato Alle-4-MU. Condições reacionais: 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Alle-4-MU, 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , tampão PBS (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.



Um perfil cinético semelhante foi observado por Coelho e coautores para a reação de *O*-despropargilação catalisada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , onde foi postulado que a primeira fase do perfil cinético corresponde a uma reação rápida, mediada pelo complexo metálico, que termina após dois *turnovers*, devido à inibição do complexo de paládio pelo produto da reação.<sup>60</sup> Enquanto que a segunda fase é uma reação lenta, gerando o mesmo produto, catalisada por nanopartículas de Pd(0) formadas durante a primeira fase.

Para as reações de *O*-despropargilação e *O*-desalenição da 4-MU, não observou-se a formação de Pd(0)-NPs. Entretanto, para a reação de *O*-desalenição o complexo metálico está de alguma forma mudando, após o primeiro *turnover* (Rx1), levando a uma forma menos ativa (Rx2). Provavelmente, as temperaturas mais altas utilizadas (48 °C) no trabalho de Coelho, levam com que após dois *turnovers* o catalisador continue ativo, devido a formação das nanopartículas. Os resultados aqui obtidos em temperaturas mais compatíveis com o ambiente biológico (37 °C), mostram uma total desativação do  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  após aproximadamente dois *turnovers*, não sendo observado o mecanismo mediado por nanopartículas.

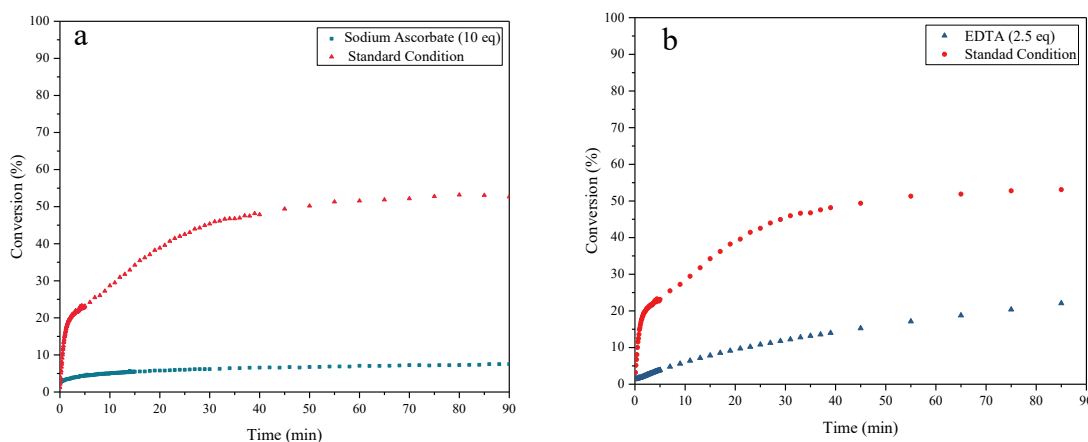
As constantes de segunda ordem (em condições de pseudo-primeira ordem) foram determinadas, onde obteve-se as constantes de velocidade  $k_2$  de 104,07  $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$  para a Alle-4-MU e 3,37  $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$  para a Prop-4-UM (Anexo B). Claramente a reação de desalenição é muito mais rápida que a reação de despropargilação. O valor obtido para reação de desalenição entra na faixa das reações bio-ortogonais mais rápidas desenvolvidas até o momento (reações *click*), mostrando o potencial deste grupo protetor no meio biológico,



permitindo que a reação aconteça em baixas concentrações, semelhantes às concentrações das proteínas intracelulares.<sup>115</sup>

Para investigar o efeito do estado de oxidação do Pd [Pd(II) vs. Pd(0)] na velocidade da reação de desproteção do Alle-4-MU com 0,25 eq. de Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, foram realizados experimentos de oxirredução e desativação (envenenamento) do catalisador. Para tanto, adicionou-se ascorbato de sódio (AS, 10 eq) ao meio reacional, um agente redutor comum de paládio para a preparação de Pd(0)-NPs. O substrato foi adicionado após 10 min, mas quase nenhuma reação foi observada, mostrando que as espécies de Pd(0) formadas pela redução do metal não são ativas na reação de desalenilação (Figura 11a). A adição de EDTA (2,5 eq) diminui a velocidade de reação (EDTA forma um complexo estável com Pd(II)), indicando que a espécie ativa é Pd(II) (Figura 11b). Resultados semelhantes foram observados para o substrato Prop-4-MU em ambos os experimentos.

Figura 11 - Efeito do Ascorbato de Sódio e EDTA no perfil cinético de desalenilação mediada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições reacionais: 100 μmol L<sup>-1</sup> Alle-4-MU, 25 μmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, PBS (0,01 mmol L<sup>-1</sup>), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C. (a) Efeito do Ascorbato de Sódio (SA, 10 eq) (b) Efeito do EDTA (2,5 eq)).



Os resultados aqui descritos, juntamente com os estudos mecanísticos da reação de desproteção por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub><sup>60</sup> e a reatividade dos alcóxialenos apresentados em outras reações com Pd(II),<sup>109</sup> alinham-se a um mecanismo de hidratação que envolve a coordenação da porção 1,2-alenil ao Pd(II), seguida por ataque de moléculas de água, antes da quebra da ligação C-O, que acaba após dois *turnovers*, devido à inibição do PdCl<sub>4</sub> pelo produto hidrolítico. Embora o Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> seja um bom candidato para os estudos mecanísticos, devido à sua simplicidade estrutural, o mesmo não é viável para aplicações biológicas devido à sua toxicidade e baixa atividade em meio celular.<sup>40,116</sup> Portanto, avaliamos o efeito da estrutura de um complexo de Pd(II) alílico (Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), utilizado previamente em diversos experimentos

em meios celulares, sobre as cinéticas e rendimentos das reações de clivagem dos substratos protegidos da 4-MU.

Chen e colaboradores identificaram que o dímero de cloreto de alil paládio(II) ( $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ ) foi bastante eficiente em experimentos da reação de despropargilação em células HeLa, tendo também biocompatibilidade satisfatória. O  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  exibiu não toxicidade em seis linhagens celulares (HeLa, CHO, HEK293T, NIH3T3, Caco-2 e A549) na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e não gerou EROS no interior das células HeLa. Também demonstraram que  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  tem alta eficiência de captação celular e se acumula preferencialmente no citosol.<sup>117</sup> Em outro trabalho, eles correlacionam a captação celular com a maior atividade dentro das células, em comparação com os outros complexos de paládio, testados na desalenilação da tirosina presente na proteína GFP em células HEK293T.<sup>9</sup>

Neste trabalho de tese, avaliou-se inicialmente a atividade do  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  nas mesmas condições testadas para o sal  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  (PBS ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A reação de despropargilação (Figura 12) continua a ser mais lenta e menos produtiva do que a reação de desalenilação (Figura 13), entretanto a reação de desalenilação é muito mais lenta que para o  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Um período de indução foi observado nas cinéticas utilizando o dímero como catalisador, enquanto para o  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  a reação é rápida instantaneamente, indicando que a espécie mais ativa não é encontrada no início da cinética de reação para o  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  nessas condições.

Embora o PBS exiba a mesma pressão osmótica que as células dos mamíferos, a composição iônica extra- e intracelular (citosol) é bastante diferente. Enquanto no meio extracelular, a concentração de cloreto está na faixa entre  $100\text{-}140 \text{ mmol L}^{-1}$ , o espaço intracelular tem uma concentração muito inferior de cloreto, variando de  $4\text{-}30 \text{ mmol L}^{-1}$ .<sup>118</sup> Levando em consideração essa característica intrínseca das células e a eficiência já demonstrada do  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em experimentos intracelulares, hipotetizou-se que a espécie mais ativa contém um monômero  $\pi$ -alil-paládio catiônico ligado a moléculas de solvente, que é formada intracelularmente.

Figura 12 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU. Condições reacionais: 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Prop-4-MU, 10, 25 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ , tampão PBS (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.

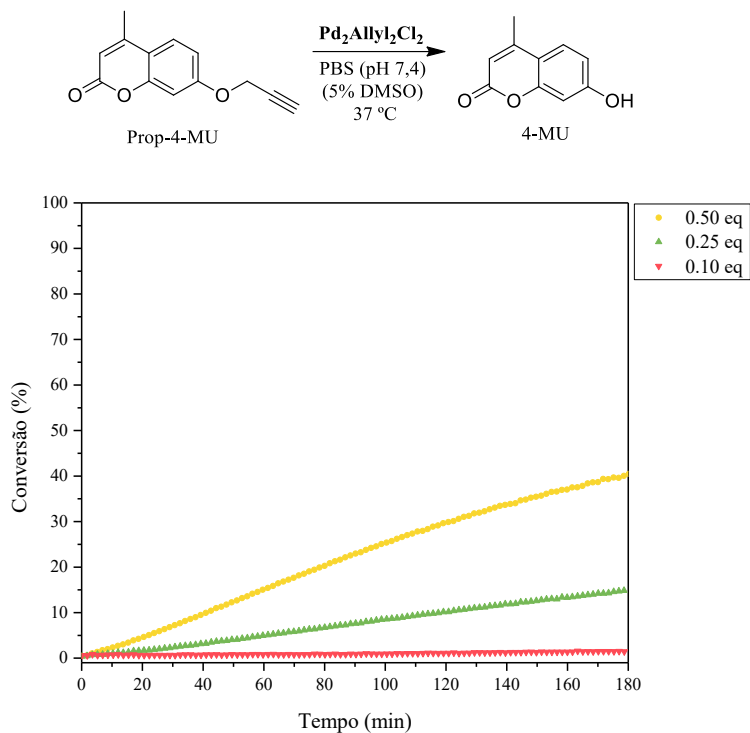
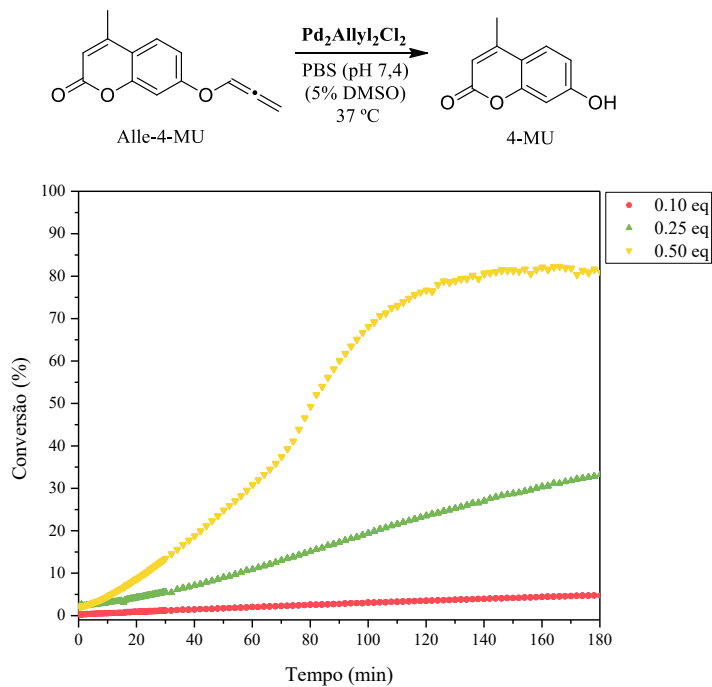


Figura 13 - Perfis cinéticos do aparecimento da 4-MU. Condições reacionais: 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Alle-4-MU, 10, 25 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ , tampão PBS (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.



Portanto, avaliou-se o efeito da composição do tampão, comparando a cinética das reações de clivagem para ambos os substratos em PBS ( $[Cl^-] = 140 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e em tampão fosfato ( $[Cl^-] = 0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sem o controle de força iônica (pH 7,4). Na presença do sal  $Na_2PdCl_4$ , pouco efeito foi observado, mas o perfil cinético antes bifásico para Alle-4-MU em PBS, tornou-se monofásico em tampão fosfato (Figura 14). No entanto, um grande efeito foi observado na cinética das reações catalisadas por  $Pd_2Allyl_2Cl_2$ . No tampão fosfato, na ausência de cloreto, ambas as reações se tornaram rápidas e produtivas, principalmente para o substrato Alle-4-MU (Figura 15).

Um dos principais requisitos para uma reação bio-ortogonal é uma cinética rápida, idealmente com constantes de velocidade de segunda ordem maiores que  $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>119</sup> A reação de clivagem do Alle-4-MU catalisada por  $Pd_2Allyl_2Cl_2$  em tampão fosfato apresenta uma impressionante constante de velocidade de segunda ordem de  $88,9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , com 84% de conversão ao produto (Figura 15 e Anexo B). Essa constante é comparável a outras reações bio-ortogonais rápidas, como as reações de cicloadição (SPAAC, SPANC, *photoclick* 1,3-dipolar, CuAAC e IEDDA).<sup>115</sup>

Em PBS, ambas as reações são muito mais lentas, mostrando que a concentração de cloreto desempenha um papel importante na atividade do complexo  $Pd_2Allyl_2Cl_2$ , então a seguir explorou-se mais sistematicamente o efeito da concentração de cloreto. Os íons cloreto foram introduzidos na forma de NaCl, e mesmo uma pequena variação na concentração de cloreto afeta drasticamente as velocidades das reações de desproteção catalisadas pelo complexo  $Pd_2Allyl_2Cl_2$  (Figura 16 e Figura 17). Mantendo a tendência, o substrato Alle-4-MU continua mostrando maior atividade que o substrato Prop-4-MU. Além disso, o perfil bifásico das cinéticas com o Alle-4-UM vai se convertendo a monofásico, à medida que a concentração do íon cloreto é diminuída, como se a primeira parte da reação estivesse sendo acelerada com esta diminuição na concentração do cloreto (Figura 17).

Figura 14 - Efeito do tampão nos perfis cinéticos das reações mediadas por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Prop-4-MU ou Alle-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , tampão PBS ou fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37^\circ\text{C}$ .

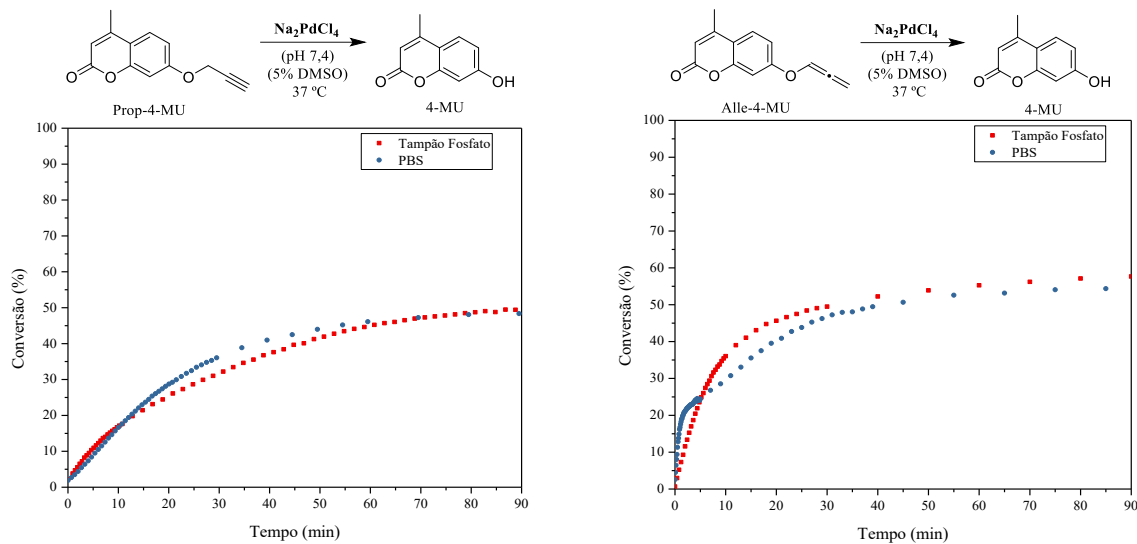


Figura 15 - Efeito do tampão nos perfis cinéticos das reações mediadas por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ . Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Prop-4-MU ou Alle-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{AllylPdCl}$ , tampão PBS ou fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37^\circ\text{C}$ .

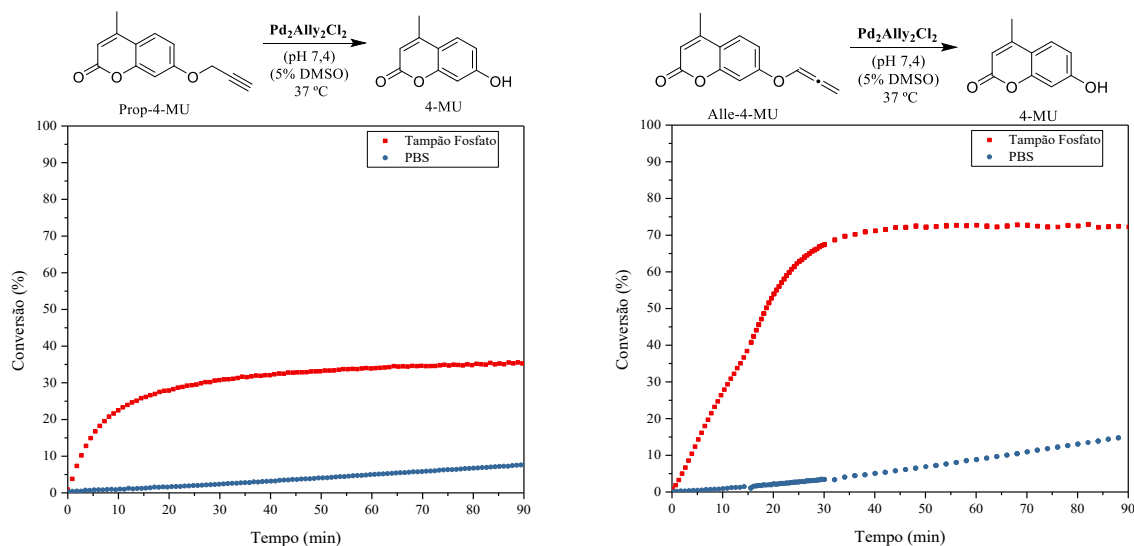


Figura 16 - Perfis cinéticos de reação de despropargilação mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  com variação da concentração de NaCl. Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Prop-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PdAllyCl, tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37^\circ\text{C}$ . NaCl: 0, 5, 15, 30, 90, 140  $\text{mmol L}^{-1}$ . I:  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ ).

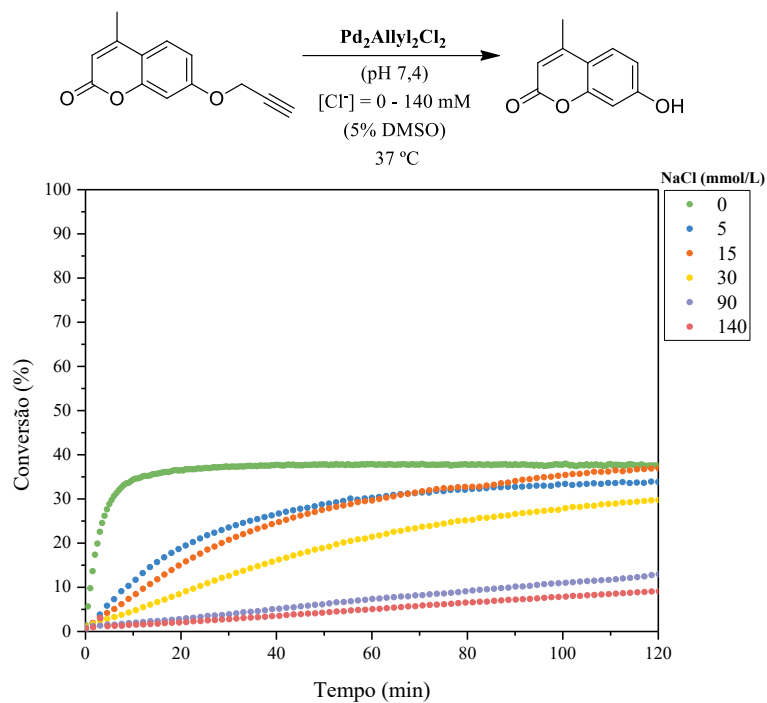
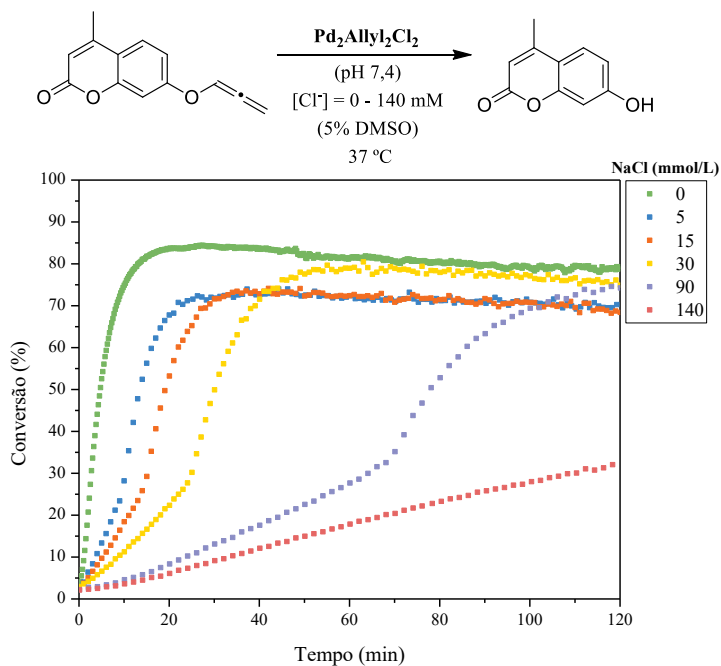


Figura 17 - Perfis cinéticos de reação de desalenilação mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  com variação da concentração de NaCl. Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Alle-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PdAllyCl, tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37^\circ\text{C}$ . NaCl: 0, 5, 15, 30, 90, 140  $\text{mmol L}^{-1}$ . I:  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ ).



As constantes de velocidade de segunda ordem para a reação de Alle-4-MU foram determinadas também nas concentrações de 15 e 140 mmol L<sup>-1</sup> (Tabela 1, Anexo B), simulando as concentrações nos espaços intra- e extracelulares, respectivamente. Na maior concentração do íon cloreto,  $k_2$  é cerca de 10 vezes menor, mostrando que a reação de desalenilação catalisada por Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> é muito mais propensa a ocorrer no espaço intracelular.

Tabela 1 - Constantes de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a reação de desalenilação da Alle-4-MU catalisada por Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em diferentes concentrações de cloreto<sup>[a]</sup>

| Item | [NaCl]<br>(mmol L <sup>-1</sup> ) | $k_2$<br>(L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Conversão<br>(%) <sup>[b]</sup> |
|------|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| 1    | 0                                 | 88,9  | 84                              |
| 2    | 15                                | 19,8  | 71                              |
| 3    | 140                               | 2,0   | 52                              |

<sup>[a]</sup> Condições reacionais: Tampão fosfato (0,01 mmol L<sup>-1</sup>), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C. *I*: 140 mmol L<sup>-1</sup> (NaClO<sub>4</sub>). <sup>[b]</sup> Conversão máxima a 4-MU em 180 min de reação com 0,25 equiv de Pd.

Estudos de espectroscopia e potenciometria de soluções aquosas do Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, demonstraram que há equilíbrios entre as espécies monoméricas (PdAllylXY, X ou Y = Cl, H<sub>2</sub>O, OH) que são dependentes da [Cl] e do pH.<sup>120</sup> Em pH neutro e alta concentração de íons cloreto (PBS), a solução contém predominantemente a forma PdAllyCl<sub>2</sub> e na ausência de cloreto a principal espécie é a PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>. De fato, observou-se um pequeno deslocamento hipsocrômico no comprimento de onda máximo no espectro UV-vis do Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, alterando a concentração de cloreto de 0 para 140 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato (Figura 18), indicando a troca dos ligantes (H<sub>2</sub>O e Cl) nessas condições.

Em termos de estabilidade do ligante  $\pi$ -alil no complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nas condições das cinéticas, observou-se através da técnica de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz) em D<sub>2</sub>O, que não há modificação do grupo alil (Figura 19a). O espectro apresentou apenas os sinais dos prótons  $\eta^3$ -alílico (5.95 ppm (m, 1H), 4.49 ppm (d,  $J = 6,7$ , 2H) 3.51 ppm (d,  $J = 12,4$ , 2H)), que não se alteraram ao longo de 140 min de análise cinética, mostrando que o complexo não sofre alterações, por exemplo, por hidratação. Na presença de cloreto de sódio (140 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 19b), a única mudança nos sinais foi uma diminuição nas constantes de acoplamento, provavelmente devido à mudança na carga eletrônica da solução. Esses resultados indicam que a diferença na reatividade não está relacionada com mudanças no grupo Alil do complexo.

Figura 18 - Espectro de UV-vis do complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  após o equilíbrio (150 min). Condições:  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{PdAllylCl}$ , tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $I$ :  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )) ou PBS, pH: 7,4, 5% DMSO a  $37^\circ\text{C}$ .

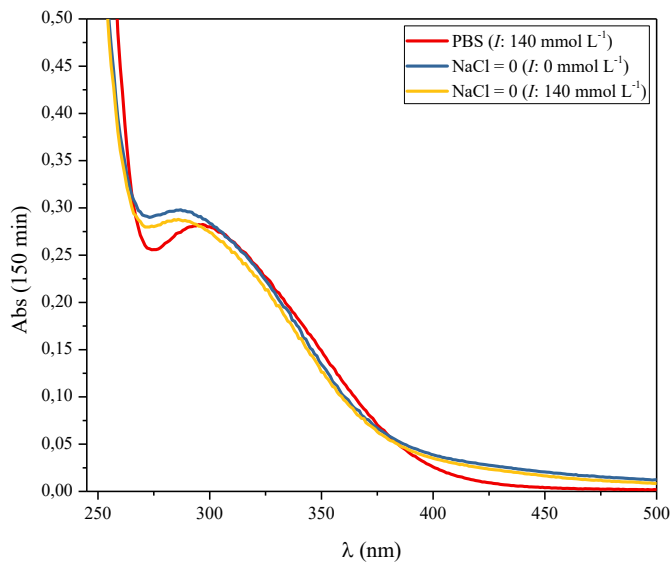
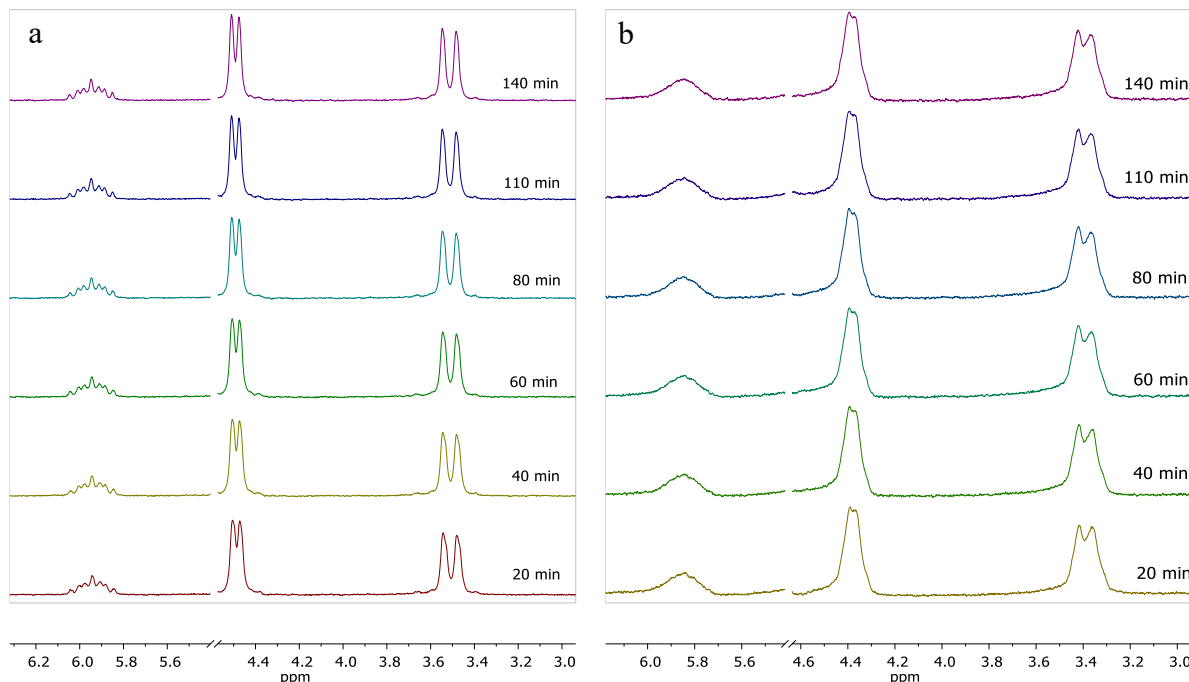


Figura 19 - Estudo cinético do complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em  $\text{D}_2\text{O}$  (10%  $\text{DMSO-}d_6$ ) monitorado por  $^1\text{H}$  RMN (200 MHz). (a) Ausência de  $\text{NaCl}$ , (b)  $\text{NaCl}$  ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



Todas essas evidências sobre a natureza das espécies catalíticas de paládio do complexo  $\pi$ -alil estão resumidas no Esquema 40, onde o  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  é encontrado em três espécies monoméricas: o dicloreto, o monoaquá e o diaqua, e todas elas podem estar envolvidas



nas reações de clivagem. Levando em consideração a concentração de cloreto utilizada nas cinéticas e as constantes de equilíbrio  $K_1$  ( $2,5 \times 10^{-2}$ ) e  $K_2$  ( $5,0 \times 10^{-3}$ ), relatadas na literatura para condições semelhantes ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I = 100\text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )),<sup>120</sup> foi possível calcular a porcentagem das três espécies em solução (Tabela 2).

Esquema 40 - Espécies PdAlly em equilíbrio em solução aquosa.

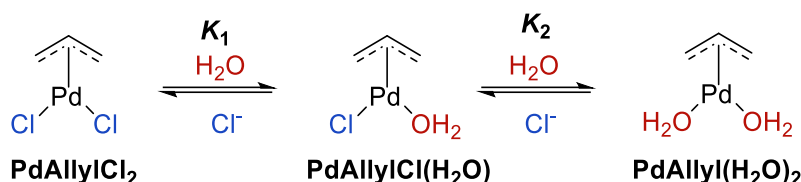


Tabela 2 - Distribuição percentual das espécies PdAllyXY em equilíbrio em tampão fosfato (pH 7,4), em diferentes concentrações de cloreto<sup>[a]</sup>

| Item | [Cl <sup>-</sup> ]<br>(mmol L <sup>-1</sup> ) | PdAllyCl <sub>2</sub><br>(%) | PdAllyCl(H <sub>2</sub> O)<br>(%) | PdAlly(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub><br>(%) |
|------|---|------------------------------|-----------------------------------|--|
| 1    | 0   | 0                            | 0,5                               | 99,5   |
| 2    | 5   | 9,0                          | 45,2                              | 45,8   |
| 3    | 15  | 31,0                         | 51,6                              | 17,4   |
| 4    | 30  | 50,4                         | 42                                | 7,6  |
| 5    | 90  | 77,2                         | 21,5                              | 1,3  |
| 6    | 140   | 84,4                         | 15,1                              | 0,5  |

<sup>[a]</sup> As constantes de equilíbrio utilizadas para os cálculos:  $K_1 = 2,5 \times 10^{-2}$ ,  $K_2 = 5,0 \times 10^{-3}$  ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I = 100\text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )).<sup>120</sup>

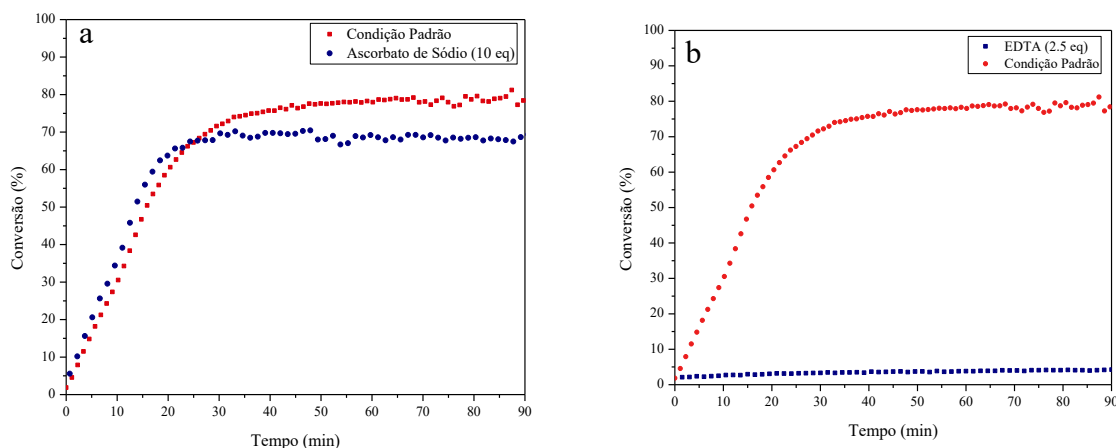
A partir dos resultados apresentados anteriormente e os dados da Tabela 2, é possível inferir que a velocidade da reação de desalenilação está aumentando com a diminuição da concentração de cloreto, devido ao aumento da concentração da espécie mais ativa PdAlly(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>. Na condição simulando a concentração extracelular de cloreto ( $140\text{ mmol L}^{-1}$ ) a porcentagem de PdAlly(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> é de apenas 0,5%, onde a constante de reação de desalenilação é  $2,0\text{ L mol}^{-1}\text{ s}^{-1}$ , enquanto que na condição intracelular ( $15\text{ mmol L}^{-1}$ ) a porcentagem é de 17,4% e a constante é  $19,8\text{ L mol}^{-1}\text{ s}^{-1}$ .

Esta tendência mostra que a reatividade dos pares bio-ortogonais (Alle-4-MU e Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) é diretamente influenciada pela concentração da forma diaqua do complexo metálico no meio reacional. Extrapolando para as condições em sistemas biológicos, é razoável

supor que essa reação apresenta maior eficácia no espaço intracelular, e não no espaço extracelular. Essa característica é provavelmente um dos motivos dos bons resultados em cultura celular, em comparação a outros complexos de paládio. Esse tipo de efeito é observado para o fármaco/catalisador Cisplatina ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ), uma vez dentro da célula, forma espécies aqua mais ativas ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  e  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ).<sup>39,121</sup>

Para confirmar a natureza de Pd(II) das espécies catalíticas do complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ , os experimentos de oxirredução com ascorbato de sódio (AS) e desativação com EDTA, foram realizados nas mesmas condições descritas para o  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Enquanto o AS prontamente reduz o  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , formando espécies inativas, o mesmo não é observado para o complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ , pois a solução não muda de cor, nem o espectro UV-vis do complexo é alterado pela presença de AS, indicando que o mesmo não foi reduzido, o perfil cinético da reação de desproteção praticamente não altera (Figura 20a), confirmando que complexo não é reduzido por AS. Entretanto, a adição de EDTA inibe totalmente a reação, devido a formação de complexos estáveis com as espécies de Pd(II), cuja formação inibe a coordenação e catálise com o substrato Alle-4-MU (Figura 20b).

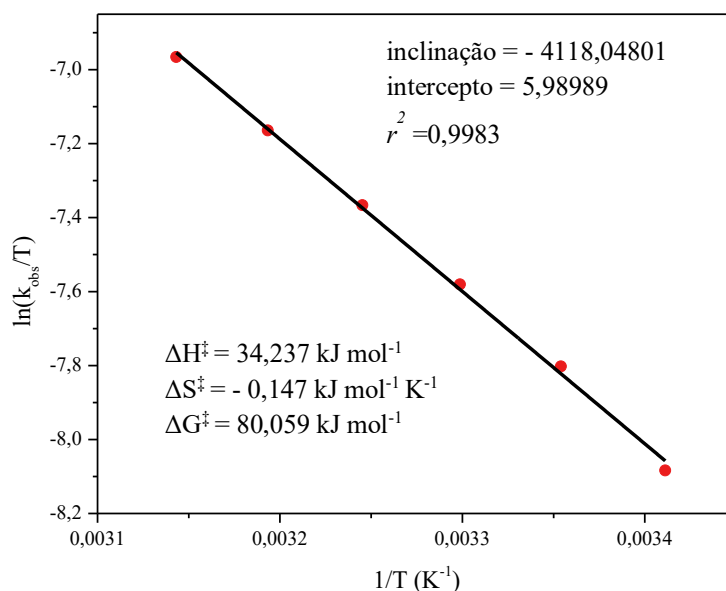
Figura 20 - Efeito do Ascorbato de Sódio e EDTA no perfil cinético de desalenilação mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ . Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  Alle-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AllylPdCl, tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . (a) Efeito do Ascorbato de Sódio (SA, 10 eq) (b) Efeito do EDTA (2,5 eq).



Além de confirmar a presença de espécies de Pd(II), esse experimento demonstra a estabilidade do complexo frente a agentes redutores, normalmente encontrados no meio biológico, diferentemente do sal  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ , que é rapidamente reduzido a Pd(0).<sup>122</sup> Assim, continuou-se os estudos mecanísticos apenas para o par Alle-4-MU e  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ , visto que  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  é mais sensível ao ambiente redutor presente no interior da célula.

De forma complementar, foram avaliados o efeito da temperatura e da força iônica na velocidade da reação entre o par Alle-4-UM e  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ . O efeito da temperatura foi determinado através do gráfico de Eyring (Figura 21), onde se avalia a variação da constante de velocidade da reação ( $\ln(k_{\text{obs}}/T)$ ) com a temperatura ( $1/T$ ). Assim, foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos de ativação da reação de desalenilação, a entalpia de ativação ( $\Delta H^\ddagger = 34,24 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) e a entropia de ativação ( $\Delta S^\ddagger = -0,15 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) parecem estar relacionadas com a formação de uma ligação simples, possivelmente a etapa de hidratação, conforme será discutido na próxima seção.<sup>123</sup>

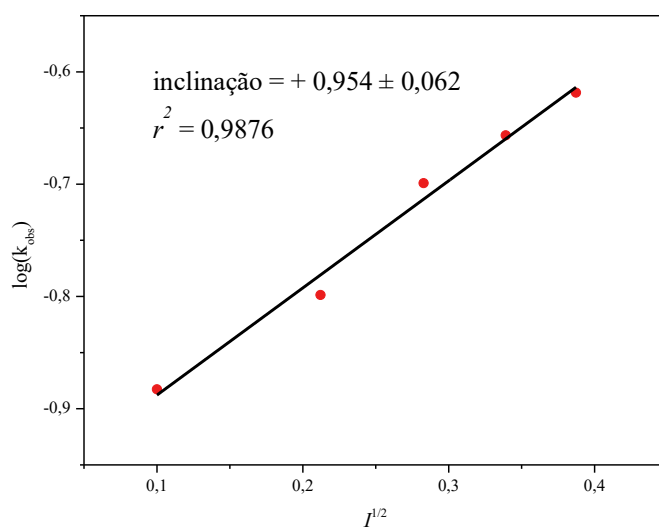
Figura 21 - A dependência da temperatura na constante de velocidade da reação da Alle-4-MU mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ , na forma de gráfico de Eyring. Condições reacionais:  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  Alle-4-MU,  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{AllylPdCl}$ , tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $I = 140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37^\circ\text{C}$ .



As velocidades das reações químicas podem ser afetadas pela presença de íons não reativos em solução. Esse efeito é importante quando a reação avaliada ocorre entre espécies iônicas, o efeito é conhecido como efeito salino. Pela teoria de Bronsted, um gráfico de  $\log(k_{\text{obs}})$  versus  $I^{1/2}$  deve ser linear e a velocidade da reação deve aumentar, com o aumento da força iônica, se os reagentes no estado de transição possuem cargas de mesmo sinal (inclinação positiva). A velocidade da reação deve diminuir (inclinação negativa), com o aumento da força iônica, se os íons reagentes possuem cargas opostas. Esse comportamento é conhecido como efeito primário e é originado devido a atividades dos reagentes no estado de transição.<sup>124</sup> Pela Figura 22 é possível observar que a reação de desalenilação é mais rápida com o aumento da

força iônica (inclinação positiva), pela adição de NaOCl<sub>4</sub>, indicando que os reagentes possuem cargas opostas no estado de transição. Ainda, a inclinação da reta corresponde ao produto da carga do complexo ativado, o valor obtido de aproximadamente 1 indica que o complexo ativado possui carga unitária. A teoria assume muitas simplificações para uma conclusão definitiva. Entretanto, o experimento demonstra que a reação é mais rápida no meio biológico, o qual possui força iônica maior que da água pura, devido a presença de diversos sais, mostrando novamente que a composição do meio afeta a velocidade da reação.

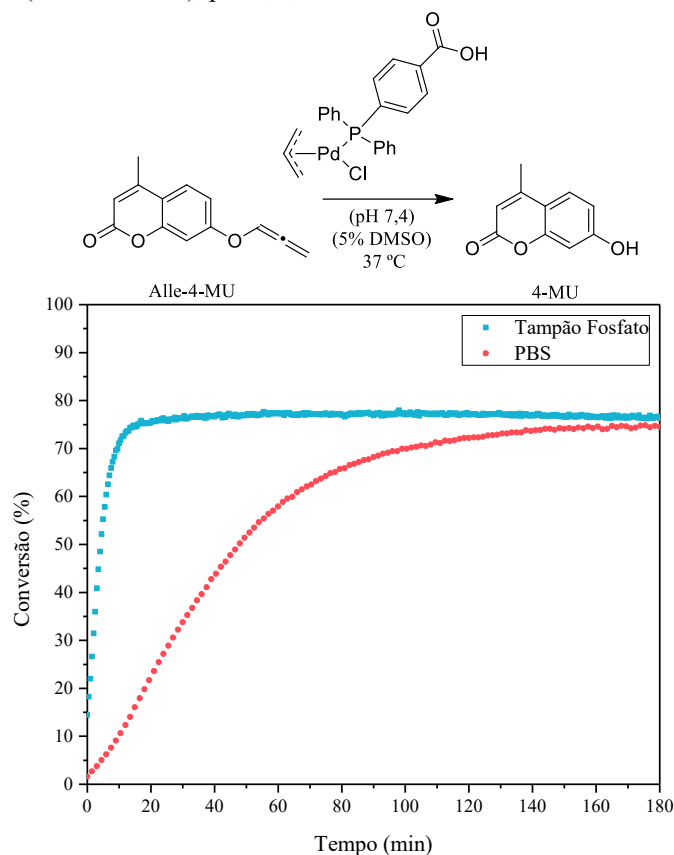
Figura 22 - A dependência da força iônica na constante de velocidade da reação de desalenilação da Alle-4-MU mediada por Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Condições reacionais: 100 μmol L<sup>-1</sup> Alle-4-MU, 25 μmol L<sup>-1</sup> de AllylPdCl, tampão fosfato (0,01 mmol L<sup>-1</sup>), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.



Após demonstrar o efeito do cloreto na atividade do complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, experimentos preliminares foram realizados com outros dois complexos de PdAllyl(II) substituídos com fosfinas, os quais apresentaram efetividade em experimentos em meios celulares.<sup>40</sup> Por exemplo, o complexo PdAllylCl(PPh<sub>3</sub>) apresentou baixa solubilidade nas condições testadas, por isso não foi possível obter os parâmetros cinéticos. Já com um complexo mais solúvel, tendo a fosfina substituída com um grupo ácido carboxílico, foi possível realizar experimentos para avaliar o efeito do cloreto na velocidade da reação. Como pode ser observado na Figura 23, a concentração de cloreto tem um efeito negativo, porém menor que para o complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pois provavelmente o substituinte fosfina afeta o equilíbrio das espécies em solução ou altera a diferença da atividade catalítica das mesmas. As constantes de velocidade de segunda ordem para a reação de desproteção do Alle-4-MU mediada pelo complexo PdAllylCl(PPh<sub>2</sub>(4-AC-Ph)) foram determinadas nas concentrações de 0, 15 e 140

mmol L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, sendo elas: 98,06 L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, 19,8 L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> e 15,10 L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. A constante  $k_2$  é apenas 1,3 vezes maior na concentração simulando o ambiente intracelular em relação com o ambiente extracelular, enquanto que para o complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> esse valor é cerca de 10 vezes maior. Esses resultados demonstram que é possível otimizar a atividade dos complexos PdAllyl pela manipulação da estrutura de seus ligantes.

Figura 23 - Perfis cinéticos de reação de desalenilação mediada por PdAllylCl(PPh<sub>2</sub>(4-AC-Ph)) nos tampões fosfato (TF) e em PBS. Condições reacionais: 100 μmol L<sup>-1</sup> de Alle-4-MU, 25 μmol L<sup>-1</sup> de PdAllylCl(PPh<sub>2</sub>(4-AC-Ph)), tampão fosfato (0,01 mmol L<sup>-1</sup>), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C. I: 140 mmol L<sup>-1</sup> (NaClO<sub>4</sub>).



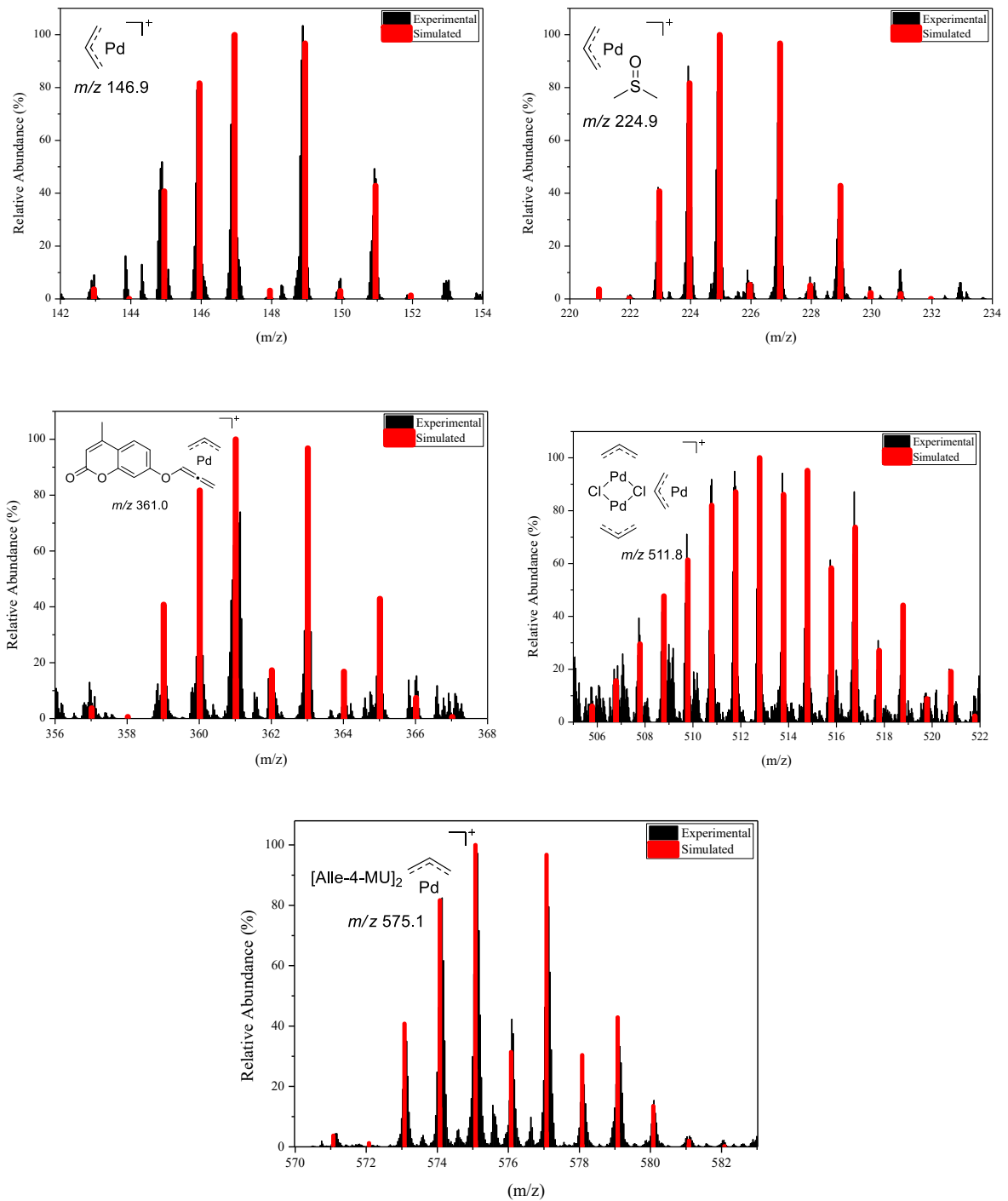
Esses estudos cinéticos demonstram a complexidade do *design* de catalisadores de paládio para as reações de desproteção, uma vez que diversos fatores afetam as suas dinâmicas, como o demonstrado efeito da concentração de cloreto. Entretanto, a partir de estudos sistemáticos de estrutura/reactividade é possível desenvolver catalisadores bio-ortogonais mais efetivos. O par *O*-Alenil e Pd(II)AllyL(H<sub>2</sub>O) possui grande potencial para a utilização em meio celular devido a cinética rápida. Além disso, é possível desenvolver ligantes (L = H<sub>2</sub>O, Cl, fosfina, etc...) que apresentem características desejadas, por exemplo, agentes direcionadores para células ou organelas específicas.<sup>40,116</sup>

#### 4.1.3 ESI-MS da clivagem C-O do substrato Alle-4-MU pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Com objetivo de obter uma descrição mais detalhada da natureza das espécies em solução envolvidas na reação de clivagem C-O da Alle-4-MU pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) foi utilizada para monitorar a reação, nos modos positivo e negativo. ESI-MS é uma técnica que pode ser usada para a identificação de íons em solução e em misturas de reação complexas.<sup>60</sup> Para isso, a reação de desproteção da Alle-4-MU (100 μmol L<sup>-1</sup>) foi realizada na presença de 0,25 equiv do PdAllylCl em água a 37 °C. Três alíquotas foram coletadas do frasco reacional em diferentes tempos reacionais: em 0 (logo após a mistura dos reagentes), 15 e 30 min de reação (Anexo C).

No modo positivo (ESI-MS(+)), no início da reação (0 min), a principal espécie observada é um cluster de duas moléculas de substrato e um íon sódio [(Alle-4-MU)<sub>2</sub>Na]<sup>+</sup> (m/z 451,1), que desaparece nas próximas alíquotas. Várias espécies de π-AllylPd foram detectadas, sendo as principais: [AllylPd]<sup>+</sup> (m/z 146,9), [AllylPd-DMSO]<sup>+</sup> (m/z 224,9), [AllylPd-(Alle-4-MU)]<sup>+</sup> (m/z 361,0) e [AllylPd-(Alle-4-MU)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z 575,1) (Figura 24). No modo negativo (ESI-MS(-)), a principal espécie observada corresponde ao produto desprotonado [4-MU]<sup>-</sup> (m/z 174,7). A presença de várias espécies em solução se deve a diversos fatores como a troca por solvente ou ligantes, as interações íon-molécula e interações íon-íon. Além disso, essas análises demonstram a estabilidade da espécie [π-AllylPd]<sup>+</sup> e sua capacidade de se coordenar com o substrato (Alle-4-MU). As espécies identificadas por ESI-MS, juntamente com os resultados dos estudos cinéticos e oxiredução/envenenamento, indicam que o mecanismo mais efetivo envolve inicialmente a coordenação do substrato na espécie PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>.

Figura 24 - Espectros experimental e calculado de ESI-MS(+) das espécies de AllylPd observadas em solução na reação de clivagem C-O do substrato Alle-4-MU pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em água.



#### 4.1.4 Reação de Clivagem C-O Mediada pelo complexo Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em Cultura Celular

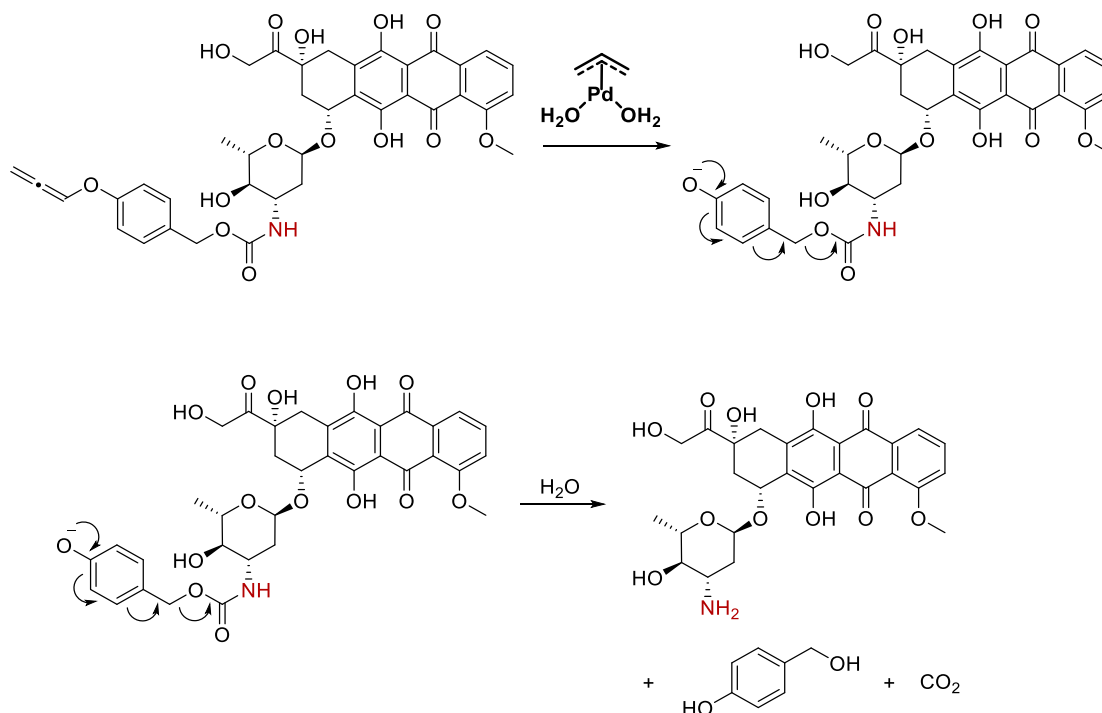
Após demonstrar que o par bio-ortogonal 1,2-alenil e Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> possui uma cinética de clivagem rápida, dentro da faixa suscetível para ocorrer em concentrações biológicas, que a reação deve ocorrer preferencialmente no espaço intracelular, visto que a formação da espécie mais ativa é dependente da concentração de cloreto e que esse complexo tem a tendência de se acumular no interior das células, conforme apresentado por outros autores,<sup>9</sup> decidiu-se desenvolver um novo pró-fármaco baseado no fármaco Doxorrubicina, a AOBC-DOX, conforme descrito na seção 4.1.1.

Após a síntese do AOBC-DOX, estudos em cultura celular estão sendo realizados para avaliar a capacidade de o par bio-ortogonal entregar o fármaco DOX intracelularmente e matar as células cancerosas. Para isso, a linhagem de células humanas de adenocarcinoma pulmonar de células não pequenas (A549) foi escolhida como cultura modelo. Os experimentos em cultura celular foram realizados por Ma. Rafaela Brito Oliveira e Arthur Luiz Miranda Nicastro no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional na Universidade de Federal de São Paulo - UNIFESP, sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Portes Ureshino.

O AOBC-DOX apresenta vantagens em comparação com outros pró-fármacos sensíveis ao paládio descritos anteriormente. Principalmente a reatividade superior do grupo *O*-alenil, em comparação ao grupo *O*-propargil.<sup>125</sup> Além disso, a presença do grupo auto-imolativo benzil, aumenta a estabilidade metabólica do grupo carbamato e também diminui a toxicidade do pró-fármaco, devido ao efeito estérico. Conforme descrito para os derivados propargilados,<sup>125</sup> a desproteção do AOBC-DOX ocorre por meio de um mecanismo em duas etapas, iniciado pela reação rápida de *O*-desalenilação catalisada pelo complexo PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, seguido por uma reação espontânea rápida de 1,6-eliminação do grupo hidroxibenzil, gerando o fármaco DOX, além dos subprodutos atóxicos CO<sub>2</sub> e álcool 4-hidroxibenzílico (Esquema 41).



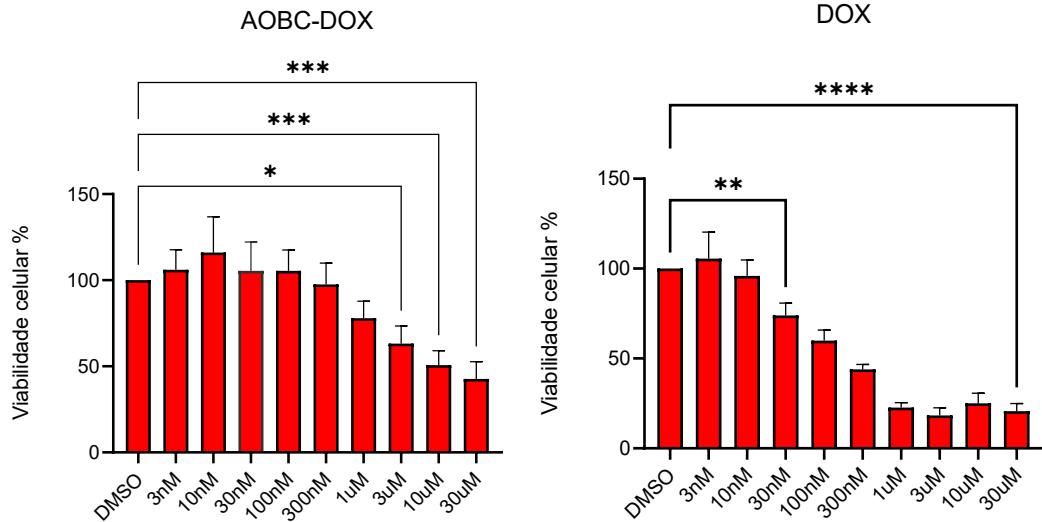
Esquema 41 - Ativação do pró-fármaco AOBC-Dox mediada por paládio.



Para verificar o potencial do AOBC-Dox como um pró-fármaco, ou seja, apresentar baixa citotoxicidade em relação ao agente ativo (DOX). Foram determinadas as toxicidades do AOBC-Dox e do Dox através de estudos dose-resposta na linhagem A549. Os compostos foram incubados por 48h com concentrações crescentes e a viabilidade celular foi determinada através da metodologia MTT. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados a partir das curvas semilog de dose-resposta de 9 pontos. No ensaio colorimétrico MTT, a viabilidade é diretamente proporcional à capacidade das células viáveis em reduzir o sal MTT na formazana. Devido à perda da capacidade metabólica, células não viáveis são incapazes de realizar essa reação.

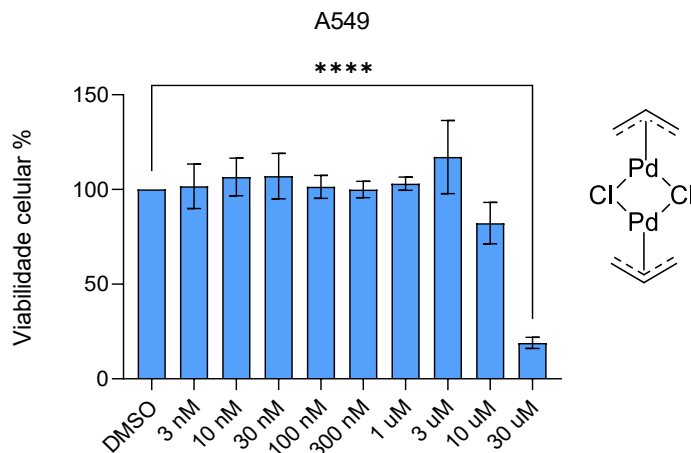
A Figura 25 mostra o efeito da concentração dos compostos na viabilidade celular, uma redução drástica na citotoxicidade foi observada, indicando que o AOBC-Dox se comporta como um pró-fármaco do Dox. O valor de  $\text{IC}_{50}$  do AOBC-Dox ( $1,54 \mu\text{M}$ ), em relação ao Dox ( $0,035 \mu\text{M}$ ), exibiu um aumento de 44 vezes, demonstrando a eficiência da proteção com o grupo 4-alenil-oxi-benzil-oxi-carbonil (AOBC) na diminuição da citotoxicidade do pró-fármaco. Isso significa que há uma ampla faixa de concentração na qual o AOBC-Dox não apresenta toxicidade, enquanto após a clivagem o DOX tem sua toxicidade recuperada.

Figura 25 - Citotoxicidade do pró-fármaco AOBC-Dox em comparação com a DOX em cultura de celular (A549), determinada pelo ensaio MTT. (a) AOBC-Dox por 48 h. (b) Dox por 48 h. Cada experimento foi realizado em triplicata. Experimento realizado por Ma. Rafaela Brito Oliveira e Arthur Luiz Miranda Nicastro no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional na Universidade de Federal de São Paulo – UNIFESP.



Confirmando os dados da literatura,<sup>9,117</sup> o complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  apresentou biocompatibilidade satisfatória na cultura celular ( $\text{IC}_{50} = 11,95 \mu\text{M}$ ), considerando a concentração de paládio esse valor duplica ( $\text{IC}_{50} = 23,90 \mu\text{M}$ ), assim, existe um extensa faixa onde o complexo é ativo na reação de *O*-desalenição sem apresentar toxicidade para a célula (Figura 26). No momento de escrita desta tese, estão sendo realizados experimentos para avaliar a desproteção do pró-fármaco AOBC-Dox pelo complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  nas células cancerosas.

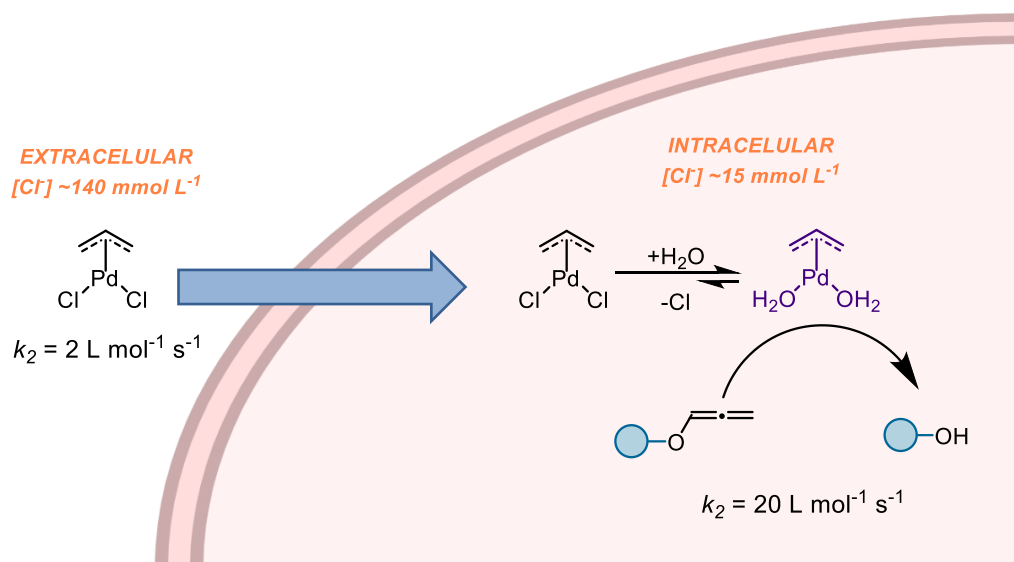
Figura 26 - Citotoxicidade do complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em cultura de celular (A549) por 48 h, determinada pelo ensaio MTT. Barras de erro representam  $\pm$  d.p. ( $n = 3$ ). Cada experimento foi realizado em triplicata. Significância estatística:  $****P \leq 0,0001$ . Experimento realizado por Ma. Rafaela Brito Oliveira e Arthur Luiz Miranda Nicastro no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacionl na Universidade de Federal de São Paulo – UNIFESP.



#### 4.1.5 Conclusões e Perspectivas

No estudo cinético das clivagens de ligação C-O de cumarinas protegidas com os grupos *O*-propargil e *O*-alenil mediadas pela adição complexos de Pd(II), foi possível observar que a clivagem do é mais rápida, foram determinadas constantes de segunda ordem de até  $104,07 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para esse grupo, mostrando seu potencial no meio biológico, devido a maior sensibilidade do grupo frente ao paládio. O estudo das reações mediadas pelo complexo biocompatível  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  demonstrou que o aumento da concentração de cloreto no meio reacional afeta negativamente a velocidade de ambas as clivagens, essa tendência reacional decorre da formação de equilíbrios químicos entre diferentes espécies monoméricas, dependentes da concentração de cloreto. Foi possível determinar que a espécie mais ativa é a  $\text{PdAllyl}(\text{H}_2\text{O})_2$ . Essa observação tem impacto significativo para aplicações em células, visto que o meio intracelular possui uma concentração muito inferior de cloreto, assim, as reações mediadas pelo complexo  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  devem acontecer seletivamente no espaço intracelular (Figura 27).

Figura 27 – Reação de *O*-Desalenilação intracelular mediada pelo complexo  $\text{PdAllyl}(\text{H}_2\text{O})_2$

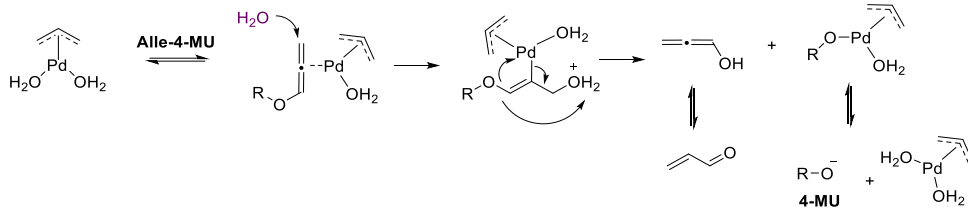


Baseado nos resultados apresentados e propostas mecanísticas da literatura com sistemas semelhantes, propõe-se que o mecanismo da reação de *O*-desalenilação mediada pela espécie  $\text{PdAllyl}(\text{H}_2\text{O})_2$  deve inicialmente envolver a coordenação do Pd(II) com o grupo aleno. A coordenação ativa a hidratação da porção insaturada, entretanto, não foi possível distinguir a posição da adição da água, uma adição no carbono terminal (tipo anti-Markovnikov, Esquema 42A) ou no carbono interno (tipo Markovnikov, Esquema 42B). Ambas as hidratações formam

intermediários passíveis de clivagem da ligação C-O, gerando os mesmos produtos. Atualmente, estão sendo realizados estudos computacionais para comparar as energias dos dois possíveis mecanismos.

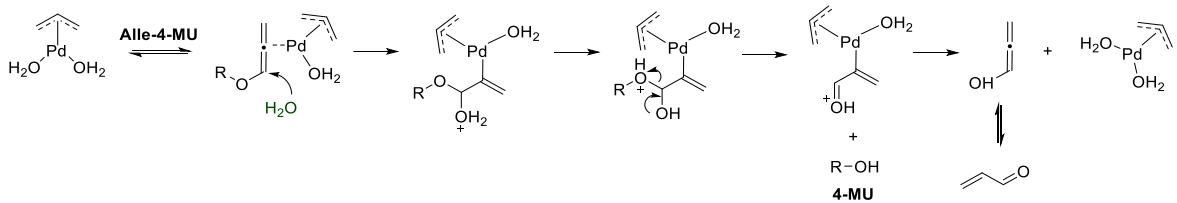
Esquema 42 - Propostas mecanísticas da reação de quebra da ligação C-O do substrato Alle-4-MU catalisada pela espécie PdAllyl(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>.

A *anti-Markovnikov*



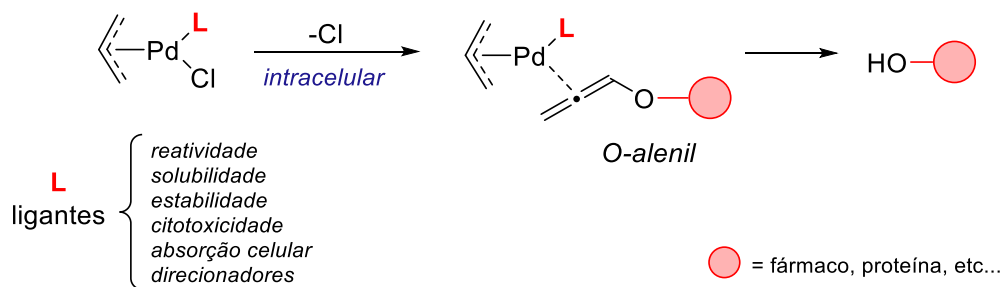
B

*Markovnikov*



Os complexos Pd(II)AllylCl são até o momento a melhor escolha para a otimização de diversas propriedades importantes para o desenvolvimento das reações de clivagem no espaço biológico. Por esse motivo, atualmente estão sendo desenvolvidos no LaCBio novos ligantes que apresentem as características listadas no Esquema 43, que juntamente com o grupo *O*-alenil irão gerar diversas oportunidades no desenvolvimento de sistemas catalíticos intracelulares, na ativação de moléculas contendo grupos hidroxilas.

Esquema 43 - Otimização de complexos Pd(II)AllylCl para reações de desproteção bio-ortogonais



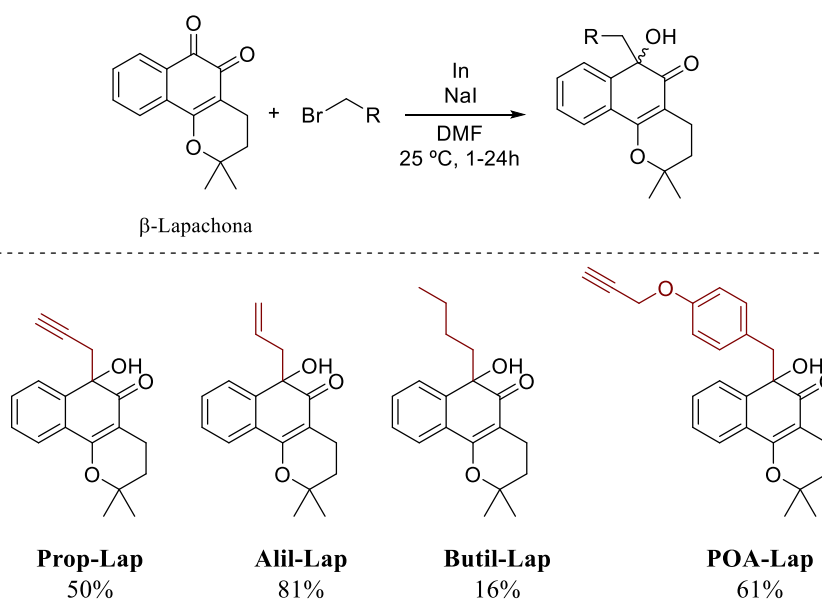
## 4.2 CLIVAGEM DE LIGAÇÕES C-C NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-FÁRMACOS DA $\beta$ -LAPACHONA MEDIADA POR PALÁDIO: UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

### 4.2.1 Síntese e caracterização dos novos pró-fármacos da $\beta$ -Lapachona

Embora o Lapachol possa ser isolado em quantidades significativas da madeira do Ipê Roxo, por questões da dificuldade de obtenção da madeira, o mesmo foi obtido sinteticamente. Inicialmente, o Lapachol foi obtido através da alquilação da Lawsona. E posteriormente a  $\beta$ -Lapachona ( $\beta$ -Lap) foi obtida pela ciclização do Lapachol, através de metodologias previamente descritas na literatura, em rendimentos razoáveis (40-50%). Os novos derivados da  $\beta$ -Lap foram obtidos na forma de  $\alpha$ -hidroxicetonas, através da alquilação seletiva da carbonila por reagentes de organoíndio formados *in situ*, conforme os procedimentos descritos na seção 3.3.

A síntese dos derivados da  $\beta$ -Lap é baseada na reação descrita anteriormente de formação  $\alpha$ -hidroxicetonas a partir da alquilação redutiva de 1,2-dionas mediada por índio metálico.<sup>107</sup> A reação ocorre entre a  $\beta$ -Lap e diferentes brometos na presença de índio metálico e iodeto de sódio em dimetilformamida a temperatura ambiente, em uma reação do tipo Barbier. A reação mostrou-se seletiva na formação das  $\alpha$ -hidroxicetonas em rendimentos considerados satisfatórios (Esquema 44).

Esquema 44 - Síntese dos novos derivados da  $\beta$ -Lapachona

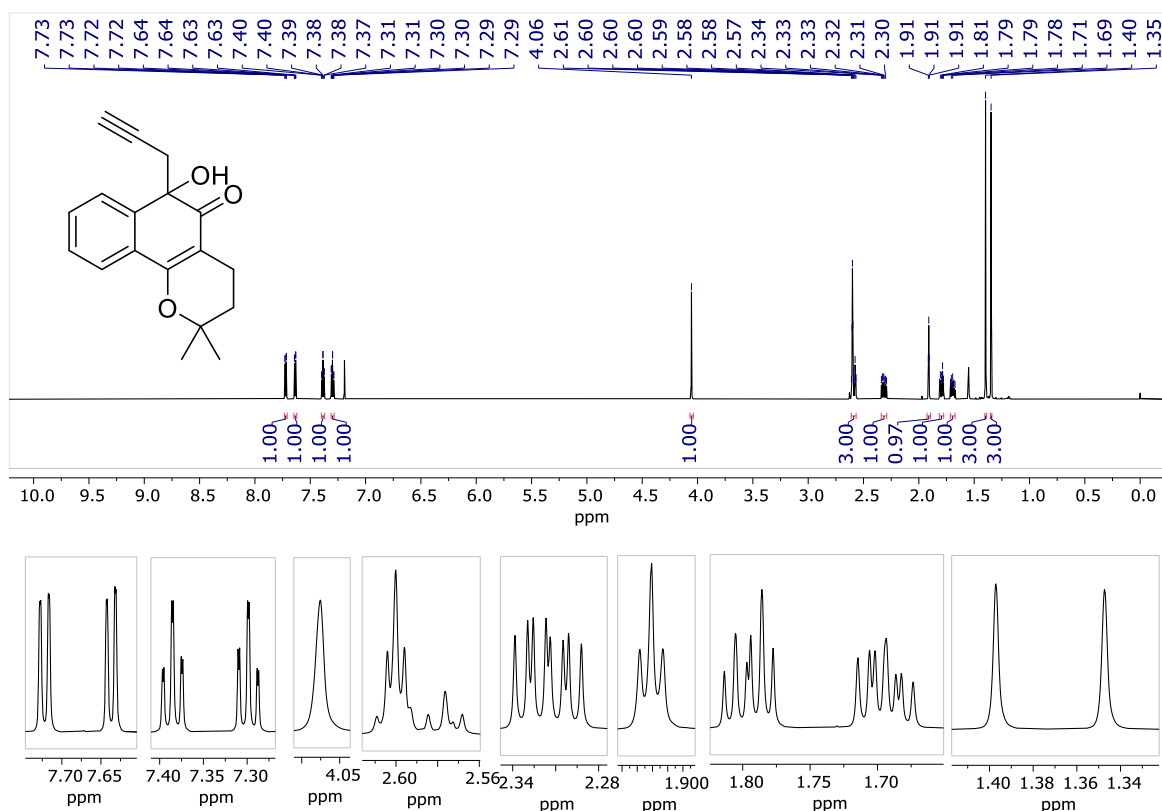


Os novos compostos foram obtidos na forma de misturas racêmicas, visto que existe a formação de um centro quiral na reação de obtenção dos mesmos. Os novos compostos podem ser utilizados desta forma, visto que ambos enantiômeros devem ter a mesma velocidade de liberação do agente ativo ( $\beta$ -Lap). Tendo evidências que os enantiômeros possuem diferentes propriedades biológicas, é possível que processos de síntese assimétrica ou purificação quiral levem a obtenção dos compostos com excesso enantiomérico ou enantiomericamente puros.

Os grupos protetores propargil (Prop-Lap) e alil (Alil-Lap) foram selecionados para o estudo da nova reação de clivagem C-C, esses grupos insaturados são os mais utilizados para clivagem de ligações C-O e C-N por metais de transição, em condições biocompatíveis.<sup>10</sup> Conforme observado pelos autores do artigo original,<sup>107</sup> na reação de formação do Prop-Lap, foi observado como um subproduto o composto Alenil-Lap. Entretanto, o rendimento observado foi menor que 2%, e não foi possível isolar e caracterizar o composto em pureza razoável. Otimizações da síntese do Alenil-Lap estão em andamento no LaCBio, visto que é um pró-fármaco potencialmente mais reativo que o Prop-Lap.

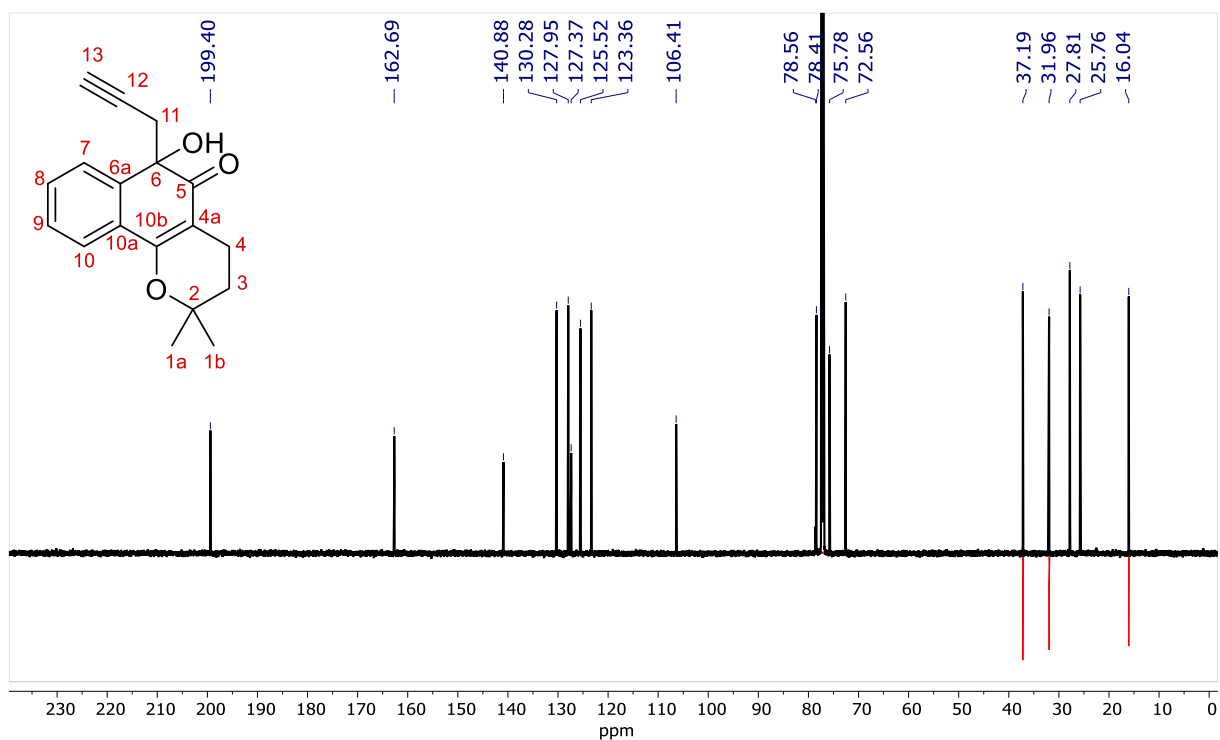
Como as novas moléculas possuem outros grupos funcionais (carbonila e álcool) que podem interagir com o metal, foi preparado um composto contendo um grupamento alquílico saturado (Butil-Lap), não reativo frente ao paládio. Esse composto ajuda a esclarecer que a liberação da  $\beta$ -Lap ocorre devido a interação entre o catalisador metálico e os grupamentos insaturados, e não por outra funcionalidade da  $\beta$ -Lap. O composto Butil-Lap foi obtido em baixo rendimento (16%), mesmo após 24 horas de reação, visto que os haletos de alquila são muito menos reativos neste tipo de reação.

Os novos compostos foram identificados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , ponto de fusão e HRMS. Os espectros de RMN foram registrados em  $\text{CDCl}_3$ , utilizando TMS como referência interna. A título de exemplo, optou-se por abordar os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  para o composto Prop-Lap. A Figura 28 exibe o espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 700 MHz em  $\text{CDCl}_3$ . A partir da análise da multiplicidade de sinais, integração e dados previamente descritos na literatura, alguns hidrogênios podem ser atribuídos sem a necessidade de técnicas espectroscópicas bidimensionais. Por exemplo, entre 7,72 e 7,30 ppm observa-se os 4 hidrogênios aromáticos, em 4,06 observa-se o simpleto referente ao OH, as duas metilas são observadas em 1,40 e 1,35 ppm. O hidrogênio terminal do grupo propargil é observado na forma de um tripleto ( $J = 2,7$  Hz) em 1,91 ppm. Os seis hidrogênios  $\text{CH}_2$  apresentam multiplicidades mais complexas, sendo suas atribuições menos óbvias.

Figura 28 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 700 MHz da Prop-Lap em  $\text{CDCl}_3$ .

Na Figura 29 é exibido o espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  a 150 MHz para o Prop-Lap. Os sinais foram atribuídos com base em cálculos de deslocamento químico, dados da literatura, comparação com os materiais de partida e DEPT 135. Por exemplo, em 199,4 ppm é possível identificar o sinal correspondente a carbonila (C5). Os sinais referentes aos 4 carbonos hidrogenados aromáticos são observados em 130,3 (C8); 127,9 (C9); 125,5 (C7); 123,4 (C10) ppm. Os outros dois carbonos aromáticos são observados em 140,9 (C6a) e 127,4 (C10a). O carbono desblindado da dupla ligação vizinho ao oxigênio é observado em 162,7 (C10b), enquanto o outro carbono da dupla é observado em 106,4 (C4a) ppm. Os carbonos quaternários são observados em 78,4 (C2) e 75,8 (C6), enquanto os carbonos da ligação tripla são observados em 78,6 (C12) e 72,6 (C13). Além disso os carbonos relativos aos carbonos alquílicos dos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  são facilmente identificáveis em 37,2 (C11), 32,0 (C3), 27,8 (C1a/C1b), 25,8 (C1a/C1b), 16,0 (C4) ppm.

Figura 29 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  a 150 MHz da Prop-Lap em  $\text{CDCl}_3$ , em vermelho DEPT-135.



Além da Prop-Lap, sintetizou-se outro pró-fármaco baseado na  $\beta$ -Lap contendo o grupo *O*-propargil-oxi-benzílico (POA-Lap, propargil-oxi-aril-Lap). Para o POA-Lap a reação de clivagem deve ocorrer em duas etapas. Inicialmente, uma etapa de *O*-despropargilação, mediada por paládio, seguido de uma reação de autoimolação do grupamento benzílico, via uma 1,6-eliminação, gerando a  $\beta$ -Lap. A isomerização deste composto para um derivado *O*-Alenil, mais reativo, foi testada em condições semelhantes às descritas no capítulo 4.1. Entretanto, não foi possível identificar a formação do composto pretendido, futuras otimizações podem levar a esse composto. O POA-Lap foi identificado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , ponto de fusão e HRMS.

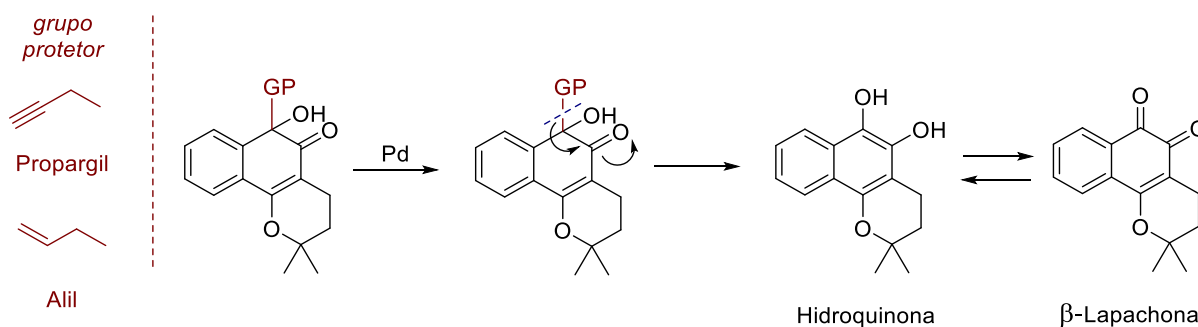
A segunda etapa foi descrita anteriormente por Dunsmore para derivados *para*-hidroxibenzil da  $\beta$ -Lap. Entretanto no pró-fármaco anteriormente descrito o grupo protetor é diferente, sendo um açúcar clivável por enzimas. O novo composto descrito pode ser um método alternativo para o tratamento do câncer, ativável através das reações de ativação bio-ortogonais mediadas por metais de transição.



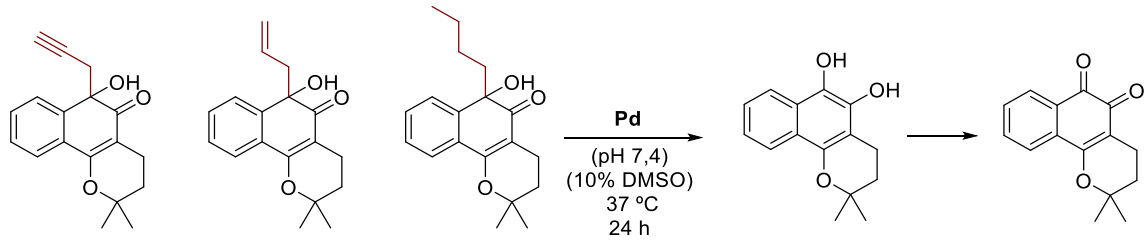
#### 4.2.2 Otimização da reação de clivagem C-C dos pró-fármacos da $\beta$ -Lapachona mediada por Paládio

Conforme o trabalho desenvolvido no grupo do professor Dr. Gonçalo Bernardes, na ativação de derivados *para*-amino (PAB-Lap) e *para*-hidroxi (PHB-Lap) benzil  $\alpha$ -hidroxicetonas da  $\beta$ -Lapachona,<sup>93</sup> descrito na seção 2.1.2, avaliamos a hipótese de uma nova metodologia, baseada na clivagem mediada por paládio. A hipótese consiste na inserção de grupos protetores que possibilitem o movimento de elétrons para quebrar a ligação C-C e consequentemente produzir a  $\beta$ -Lap, sem a presença de um grupo autoimolativo. Assim, um mecanismo catalisado por paládio, ou ainda por outros metais de transição, poderia ser usado como um gatilho para transferir elétrons de um grupo rico em elétrons (*i.e.*, propargil e alil), clivar a ligação C-C, regenerar a hidroquinona e finalmente gerar a quinona ( $\beta$ -Lap) (Esquema 45), através da oxidação espontânea da hidroquinona, pelo oxigênio do ar.

Esquema 45 – Esquema geral para a clivagem C-C dos novos derivadas da  $\beta$ -Lapachona.



A nova reação de clivagem C-C mediada por paládio, foi avaliada em condições biologicamente relevantes (pH: 7,4, 37 °C, 24h). Para isso, as reações foram realizadas incubando 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos substratos em PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4, 10% DMSO) por 24h a 37°C com as diferentes fontes de paládio,  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  e nanopartículas de Pd(0) ou Pd(II) (Tabela 3).

Tabela 3 – Otimização da reação de clivagem C-C mediada por Paládio em condições biorrelevantes.<sup>a</sup>


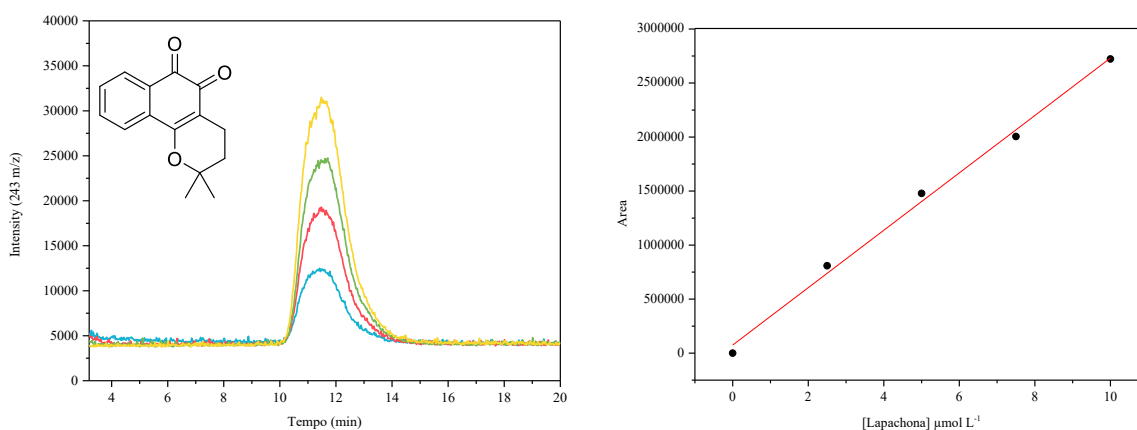
|                   | Prop-Lap                          | Alil-Lap       | Butil-Lap |                  |                             | $\beta$ -Lapachona |
|-------------------|-----------------------------------|----------------|-----------|------------------|-----------------------------|--------------------|
| Item <sup>a</sup> | Fonte de Paládio                  | Grupo Protetor | Eq. de Pd | Meio             | Rendimento (%) <sup>b</sup> |                    |
| 1                 | -                                 | Propargil      | -         | PBS              | 0                           |                    |
| 2                 | -                                 | Alil           | -         | PBS              | 0                           |                    |
| 3                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Butil          | 5         | PBS              | 0                           |                    |
| 4                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Propargil      | 1         | PBS              | 21                          |                    |
| 5                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Alil           | 1         | PBS              | 13                          |                    |
| 6                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Propargil      | 0,5       | PBS              | 8                           |                    |
| 7                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Alil           | 0,5       | PBS              | 1                           |                    |
| 8                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Propargil      | 1         | TF               | 23                          |                    |
| 9                 | Na <sub>2</sub> PdCl <sub>4</sub> | Propargil      | 1         | H <sub>2</sub> O | 56                          |                    |
| 10                | PdI <sub>2</sub> -NPs             | Propargil      | 1         | PBS              | 66                          |                    |
| 11                | PdI <sub>2</sub> -NPs             | Alil           | 1         | PBS              | 31                          |                    |
| 12                | PdI <sub>2</sub> -NPs             | Propargil      | 1         | TF               | 56                          |                    |
| 13                | Pd(0)-NPs                         | Propargil      | 1         | PBS              | 4                           |                    |
| 14                | Pd(0)-NPs                         | Alil           | 1         | PBS              | 0                           |                    |
| 15                | PdI <sub>2</sub>                  | Propargil      | 1         | PBS              | 0                           |                    |
| 16                | PdI <sub>2</sub> + PVP*           | Propargil      | 1         | PBS              | 0                           |                    |
| 17                | PdI <sub>2</sub> -NPs + EDTA**    | Propargil      | 1         | PBS              | 8                           |                    |
| 18                | PdI <sub>2</sub> -NPs             | Propargil      | 0,5       | PBS              | 32                          |                    |

<sup>a</sup> Testes conduzidos 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos substratos. <sup>b</sup> Rendimento determinado por LC-MS.

\* [PVP] = 105  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . \*\* 10 eq de EDTA.

As reações foram monitoradas por LC-MS com a observação da formação da  $\beta$ -Lapachona ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  243, 11,5 min). Para determinar os rendimentos, uma curva de calibração foi construída usando quantidades conhecidas da  $\beta$ -Lap (Figura 30), a reação foi diluída 5 vezes em acetonitrila antes da injeção (200  $\mu$ L da reação diluído para 1000  $\mu$ L com MeCN).

Figura 30 – Cromatograma (LC-MS -  $m/z$  243) e Curva de Calibração da  $\beta$ -Lap



Inicialmente foi avaliada a estabilidade dos novos substratos em meio aquoso, na ausência de qualquer tipo de gatilho. Como esperado, a formação espontânea de  $\beta$ -Lap não foi observada (Tabela 1, Itens 1 e 2). Isso contrasta com outros grupos protetores, como por exemplo, carbonato e carbamato, que podem ser clivados espontaneamente sob condições biológicas. As soluções estoque (4 mmol L<sup>-1</sup>, DMSO) das  $\alpha$ -hidroxicetonas são estáveis por vários meses em bancada, demonstrando a eficiência da proteção.

Quando os compostos Prop-Lap e Alil-Lap foram incubados com o sal simples Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (Tabela 3, Itens 4 a 7), foi observada a formação da  $\beta$ -Lap, demonstrando que nossa hipótese é factível. Quando o composto Butil-Lap, sem o grupo insaturado reativo, foi incubado com um grande excesso do sal de paládio (5,0 eq) (Tabela 1, Item 3), não foi observada a formação da  $\beta$ -Lap, indicando que a reação ocorre entre o grupo insaturado e o sal metálico, conforme observado para outras reações de clivagem C-O e C-N.<sup>10</sup>

Até onde sabemos, essa é a primeira vez que é demonstrada a clivagem de grupos propargílicos e alílicos através da clivagem de ligações C-C mediada por paládio. Quando a reação foi realizada em água (Tabela 3, Item 8) o rendimento observado foi superior a reação em meio tamponado (Tabela 3, Itens 4 e 8), essa diferença pode estar relacionada com a

diminuição da atividade do  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  devido aos componentes dos tampões, provavelmente os íons fosfato.

Embora complexos de paládio possam mediar reações de desproteção sob condições biológicas, a maioria das aplicações *in vivo* descritas até o momento são baseadas em nanopartículas de paládio,<sup>21,126</sup> devido principalmente à baixa toxicidade e a capacidade de produzir dispositivos implantáveis das nanopartículas, para ativar pró-fármacos em locais específicos (*i.e.*, em um tumor), sem afetar outros tecidos ou órgãos.<sup>125,126</sup> Desta forma, visando aplicações biológicas, selecionamos nanopartículas coloidais de iodeto de paládio(II) ( $\text{PdI}_2$ -NPs) e paládio(0) ( $\text{Pd}(0)$ -NPs), com tamanho semelhante (2 nm), como catalisadores bio-ortogonais. As  $\text{PdI}_2$ -NPs vem sendo estudadas no LaCBio como catalisadores eficientes em acoplamentos C-C em água,<sup>127</sup> e na desproteção de pró-fármacos em células vivas.<sup>128</sup>

As  $\text{PdI}_2$ -NPs apresentaram os melhores rendimentos para ambos os substratos, comparando os diferentes grupos protetores, a Prop-Lap é mais reativa que a Alil-Lap, levando a rendimentos de 66% e 31%, respectivamente (Tabela 3, Itens 10 e 11). As  $\text{Pd}(0)$ -NPs mostraram baixa eficiência na clivagem da ligação C-C para ambos os substratos (<4%). Em comparação com as  $\text{PdI}_2$ -NPs, o sal comercial  $\text{PdI}_2$  foi avaliado na ausência e presença de PVP (agente estabilizador das nanopartículas), e não apresentou atividade na reação (Tabela 3, Itens 16 e 17). Indicando que a forma nanoparticulada é essencial para a atividade das  $\text{PdI}_2$ -NPs.

Embora tenham sido utilizadas concentrações altas das nanopartículas para obter-se rendimentos satisfatórios da clivagem dos substratos, otimizações nas estruturas dos substratos podem aumentar a reatividade. Além disso, o comportamento dos catalisadores no interior de células pode variar dependendo de vários de fatores, por exemplo, a concentração local das nanopartículas em tumores.<sup>7</sup>

Buscando informações acerca das espécies de paládio ativas na reação, foi adicionado ao meio reacional EDTA (10 eq), o EDTA é um agente quelante que forma um complexo estável com  $\text{Pd}(II)$ , e cuja formação inibe a coordenação e clivagem do substrato, o rendimento observado da desproteção foi de apenas 8% (Tabela 3, Item 17), suportando a participação de espécies de  $\text{Pd}(II)$  na reação de despropargilação.<sup>60</sup>

### 4.2.3 ESI-MS(+) da clivagem C-C dos substratos Prop-Lap e Alil-Lap

Dando continuidade ao objetivo de se obter uma descrição mais detalhada da natureza das novas reações de quebra da ligação C-C dos substratos Prop-Lap e Alil-Lap, espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) foi utilizada para monitorar a reação e possivelmente detectar intermediários chave das reações. Assim, estudamos a clivagem do Prop-Lap e Alil-Lap ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) à  $37^\circ\text{C}$  mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  (0,5 eq) em água no modo positivo (ESI-MS(+)). ESI-MS é uma técnica que pode ser usada para a identificação de íons em solução em misturas complexas.<sup>60</sup>

Quatro alíquotas foram coletadas do frasco reacional em diferentes tempos reacionais: em 0 (logo após a mistura dos reagentes), 15, 30 e 90 min (Anexos D). Mesmo no início da reação, vários *clusters* da  $\beta$ -Lap foram detectados para a reação com o Prop-Lap mostrando que a despropargilação é relativamente rápida. O substrato Prop-Lap praticamente desaparece após 10 min. A reação com o substrato Alil-Lap parece ser mais lenta, o substrato é observado em intensidade razoável após 90 min. Esta observação indica que a reação de despropargilação é mais rápida que a desalilação por complexos de Pd(II). E a mesma tendência foi observada nos rendimentos obtidos na seção anterior. Essa tendência de reatividade é descrita para esses grupos protetores na quebra de ligações C-N e C-O, onde o grupo propargílico é mais reativo a espécies de Pd(II) que o grupo alil, indicando que para o substrato Prop-Lap a desproteção ocorre através de um mecanismo semelhante.

Não foi possível caracterizar nenhum intermediário contendo átomos de paládio. Indicando que após a complexação do metal com os grupos ricos em elétrons, a reação prossegue rapidamente. Essas observações estão de acordo com os cálculos teóricos realizados na próxima seção. Embora, tenha sido possível observar, em baixa intensidade, algumas espécies contendo o padrão isotópico do paládio, não foi possível relacionar com nenhum intermediário provável ou subproduto da reação de clivagem.

#### 4.2.4 Estudo Computacional do Mecanismo da Reação de Clivagem C-C Mediada por Paládio(II)

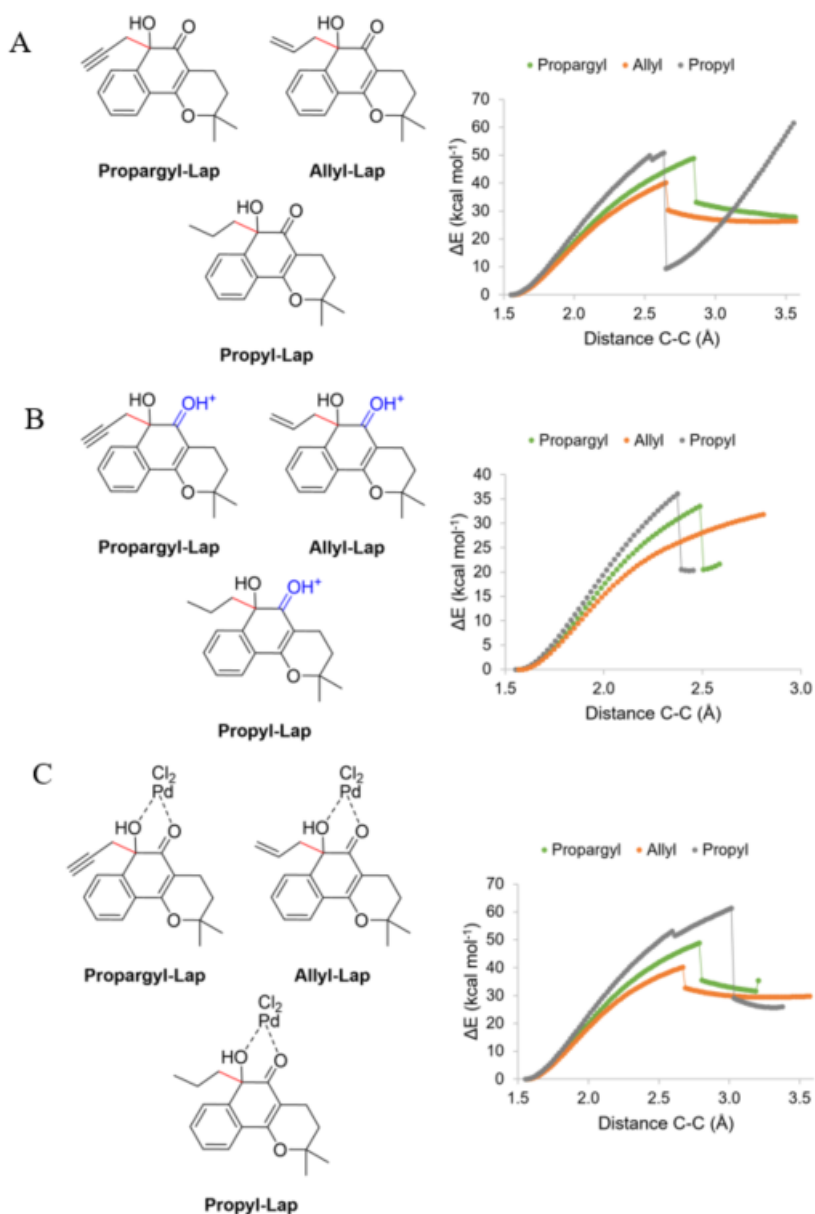
Esta seção descreve os cálculos computacionais realizados para determinar a estabilidade e o mecanismo de desproteção dos novos pró-fármacos da  $\beta$ -Lap mediado por Pd(II). Os cálculos foram realizados por Dr. Claudio D. Navo sob a supervisão do Prof. Dr. Gonzalo Jiménez-Osés, colaboradores do CIC bioGUNE, na Espanha.

Inicialmente, a estabilidade das três classes de compostos Prop-Lap (alcino), Alil-Lap (alceno) e Propil-Lap (alcano) foi estudada. Foi avaliada a possibilidade da quebra direta da ligação C-C, na ausência de paládio, analisando a energia potencial ao longo da ligação (Figura 31A, vermelho), através do nível de cálculo PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd), com o objetivo de localizar possíveis estados de transição para a fragmentação. Nenhum estado de transição foi detectado para qualquer um dos três sistemas analisados. Em alguns casos, os saltos observados a longas distâncias ( $d > 2,5 \text{ \AA}$ ), correspondem a um deslocamento artificial dos grupos protetores para a carbonila adjacente.

Perfis semelhantes foram obtidos para outras espécies possivelmente encontradas em solução. Espécies protonadas (Figura 31B, azul) ou quando o complexo de paládio (II) atua como um ácido de Lewis, coordenando em ambos os átomos de oxigênio (Figura 31C). Essas observações indicam que uma reação diferente, promovida por Pd(II), leva a clivagem da ligação C-C e a liberação da  $\beta$ -Lap.

Visto que a reação de despropargilação do substrato Prop-Lap apresentou os melhores resultados, prosseguiu-se os cálculos teóricos para a desproteção deste derivado. O mecanismo é semelhante ao proposto para a reação de despropargilação de éteres propargílicos mediada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>.<sup>60</sup> O mecanismo proposto (Figura 32) envolve um ataque *anti*-Markovnikov de uma molécula de água na posição terminal da fração propargílica complexada com PdCl<sub>3</sub> (A), a qual é a etapa determinante da velocidade da reação (TS1,  $\Delta G^\ddagger = 23,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), para gerar o intermediário protonado (B). Um dos átomos de hidrogênio da molécula de água é concomitantemente transferido para a carbonila da  $\beta$ -Lap. O intermediário B, contendo um grupo carbonila protonado e um enol neutro, poderia sofrer eliminação semelhante ao PAB-Lap. Entretanto, nenhum estados de transição foi detectado (Esquema 37), como resultado da menor “nucleofilicidade” do grupo enol em comparação com o grupo anilina do PAB-Lap.<sup>93</sup>

Figura 31 - Superfícies de energia potencial (PES) calculadas para a eliminação dos derivados Prop-Lap (verde), Alil-Lap (laranja) e Propil-Lap (cinza). Todas as varreduras foram iniciadas a partir do conformêro de menor energia. Esta figura foi produzida por Dr. Claudio D. Navo.



Da mesma forma, para o enol intermediário **C**, formado pela desprotonação do **B**, não apresentou um estado de transição, como esperado, devido à baixa “nucleofilicidade” e “eletrofilicidade” dos grupos enol e carbonila neutros, respectivamente. O enol **C** é novamente desprotonado para produzir enolato **D** promovendo a rápida reação de eliminação-1,4 liberando a  $\beta$ -Lap, após a protonação e oxidação (Figura 32). A carga negativa no átomo de oxigênio é

necessária para que ocorra a eliminação-1,4, assemelhando-se a algumas reações calculadas anteriormente para a clivagem C-C do PAB-Lap (a espécie  $\text{NH}^-$  é muito reativa à 1,6-eliminação).<sup>93</sup> Apenas o intermediário **D** apresentou um máximo correspondente à reação de eliminação (Esquema 37), o **TS2** é de apenas  $\Delta G^\ddagger = 9,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ . A Figura 34 apresenta a geometria para todas as estruturas calculadas, as quebras e formações de ligações nos estados de transição são mostradas como linhas verdes pontilhadas.

Figura 32 - Perfil energético ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) calculado para a reação de despropargilação da Prop-Lap mediada por  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ . Esta figura foi produzida por Dr. Claudio D. Navo.

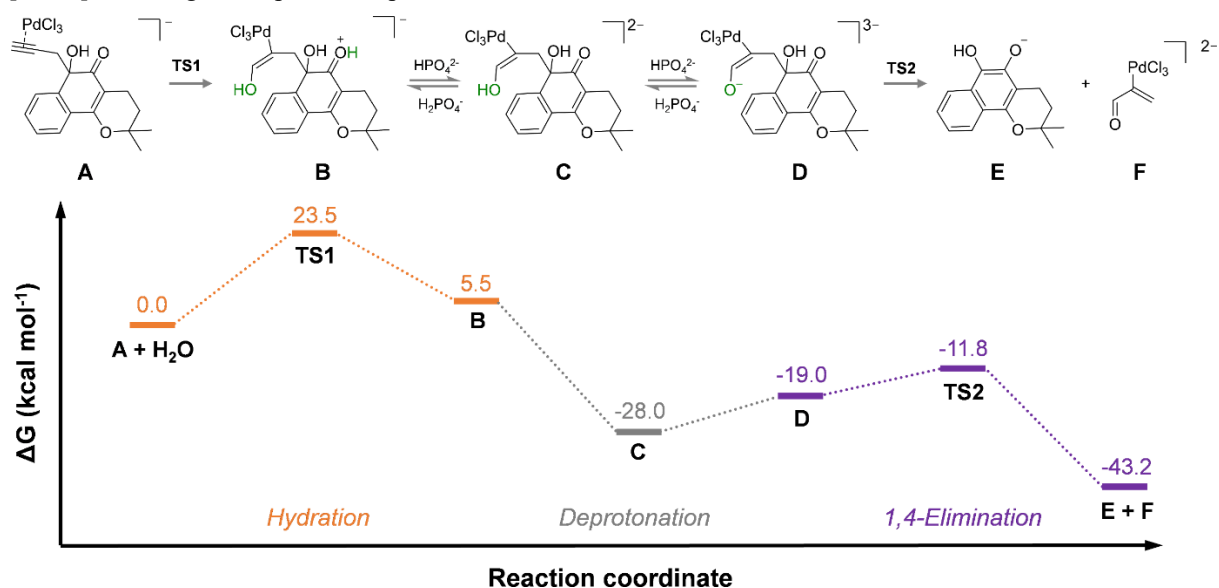


Figura 33 - Superfícies de energia potencial (PES) calculadas para a eliminação dos intermediários **A** (azul), **B** (roxo), **C** (vermelho) e **D** (verde). Todas as varreduras foram iniciadas a partir do conformero de menor energia. Esta figura foi produzida por Dr. Claudio D. Navo.

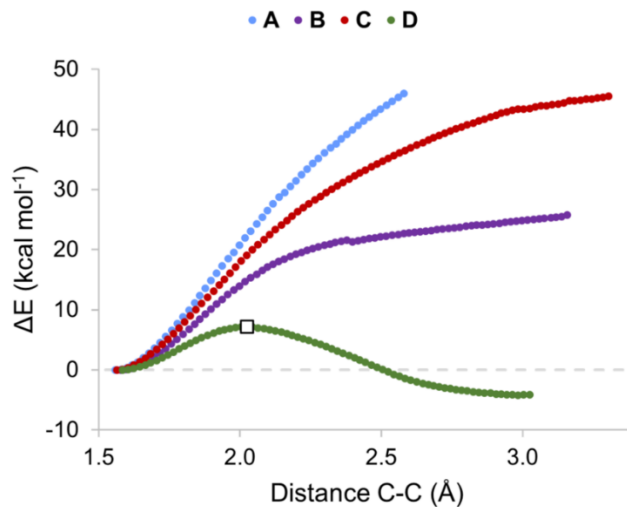
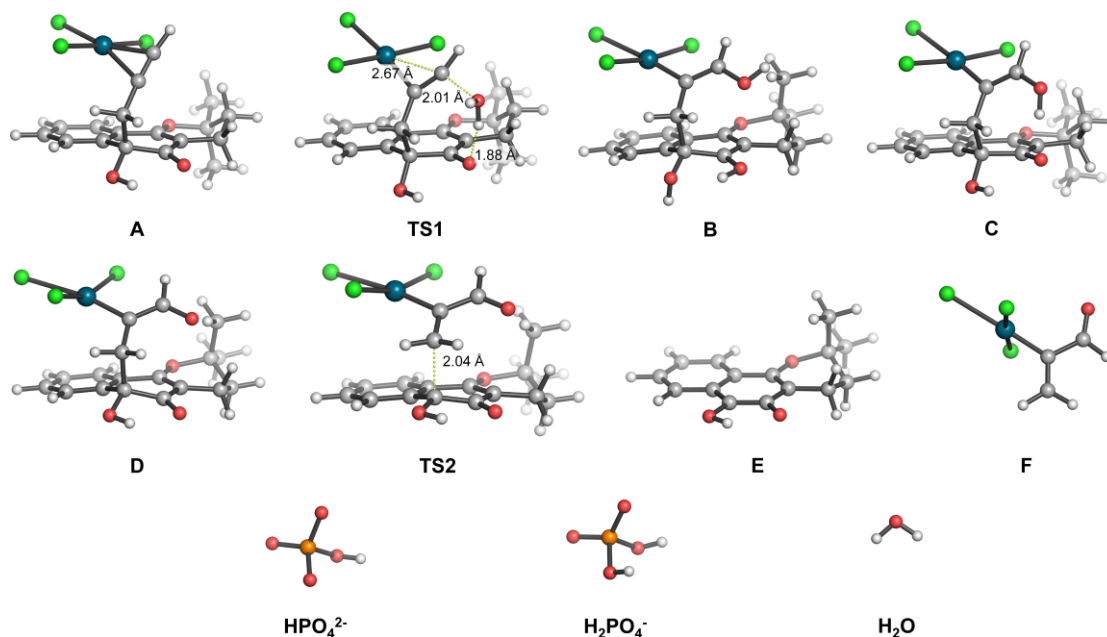




Figura 34 - Geometrias para os reagentes (A), estados de transição (TS1,2), intermediários (B-D) e produtos (E,F) para a reação calculada. As distâncias interatômicas são dadas em angstroms. Esta figura foi produzida por Dr. Claudio D. Navo.



Provavelmente a menor reatividade do Alil-Lap frente a espécies de Pd(II), decorre da maior energia da etapa de hidratação, em relação ao derivado propargílico. O mesmo ocorre com o derivado alquílico, que não pode nem ser hidratado, e conseqüentemente eliminado. No entanto, Allyl-Lap pode reagir com a espécie Pd(0) (adicionado como catalisador ou formado sob as condições de reação (reação de Wacker)), de maneira semelhante à reação de desproteção bem conhecida de de alil éter/carbamato (uma reação do tipo Tsuji-Trost).<sup>10</sup>

#### 4.2.5 Reação de Clivagem C-C do Prop-Lap Mediada por Nanopartículas de Paládio(II) em Cultura Celular

O objetivo da presente seção é a ativação bio-ortogonal do Prop-Lap por nanopartículas de paládio(II) PdI<sub>2</sub>-NPs, via clivagem de ligação C-C, em células cancerosas. Visto a maior reatividade observada para o Prop-Lap, este composto foi selecionado para os testes com células vivas. Para isso, selecionou-se linhagens de células humanas de câncer onde a  $\beta$ -Lap é promissora no tratamento. As células de câncer de mama metastático NQO1+ (SKBR3) e de leucemia mielogênica aguda (MOLM13) foram escolhidas como culturas modelo.

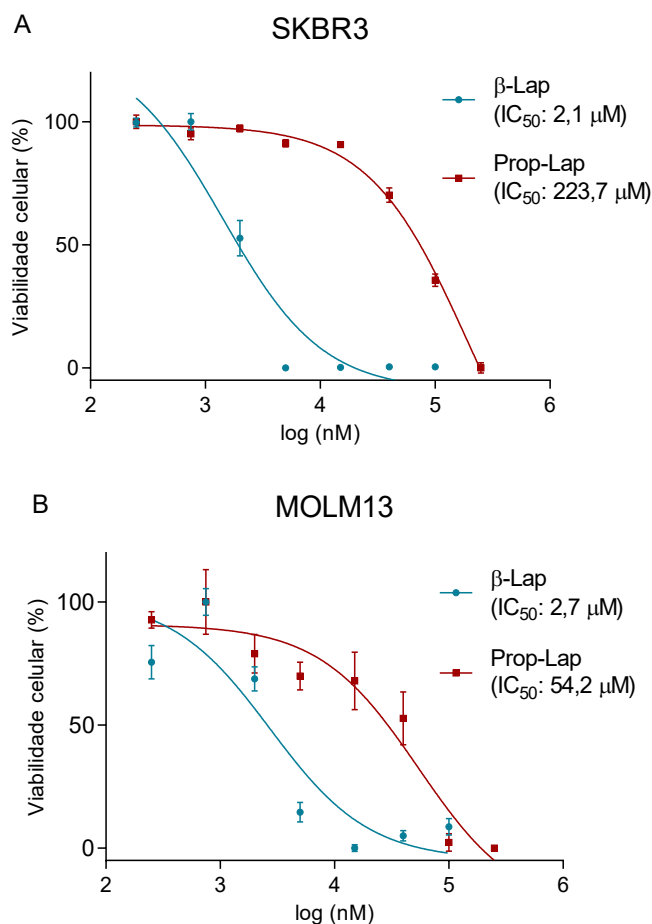
Os experimentos foram realizados pela Dra. Eloah Latocheski no Bernardes Lab na Universidade de Cambridge - UK, sob co-orientação do Prof. Dr. Gonçalo Bernardes, durante

seu estágio sanduíche. Para verificar o potencial do Prop-Lap como um pró-fármaco, ou seja, apresentar baixa toxicidade em relação ao agente ativo ( $\beta$ -Lap), foram determinadas as toxicidades do Prop-Lap e da  $\beta$ -Lap através de estudos dose-resposta nas linhagens SKBR3 e MOLM13. Os compostos foram incubados por 48h com concentrações crescentes e a viabilidade celular foi determinada através da metodologia CellTiter-Blue®. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir das curvas semilog de dose-resposta de 8 pontos.

No ensaio CellTiter-Blue®, a viabilidade é diretamente proporcional à capacidade das células vivas em converter o corante resazurina (não fluorescente) na resorfurina (fluorescente). Devido à perda da capacidade metabólica, células não viáveis são incapazes de realizar essa reação. A intensidade de fluorescência resultante foi normalizada para as células cultivadas com 0,25% de DMSO, as quais foram consideradas 100% viáveis.

A Figura 35 mostra o efeito da concentração dos compostos na viabilidade celular. Uma redução drástica na citotoxicidade foi observada em ambas as culturas de células cancerosas, indicando que o Prop-Lap se comporta como um pró-fármaco da  $\beta$ -Lap devido a inativação do ciclo redox em meio celular. Os valores de IC<sub>50</sub> do Prop-Lap, em relação a  $\beta$ -Lap, exibiram um aumento de 107 vezes (Figura 35A) e 20 vezes (Figura 35B) para as linhagens SKBR3 e MOLM13, respectivamente, demonstrando a eficiência da proteção com o grupo propargílico na diminuição da toxicidade do pró-fármaco. Isso significa que há uma ampla faixa de concentração na qual o Prop-Lap não apresenta toxicidade, enquanto após a clivagem C-C a  $\beta$ -Lap tem sua toxicidade recuperada. A partir dessas informações, foram realizados testes de desproteção nas linhagens SKBR3 e MOLM13.

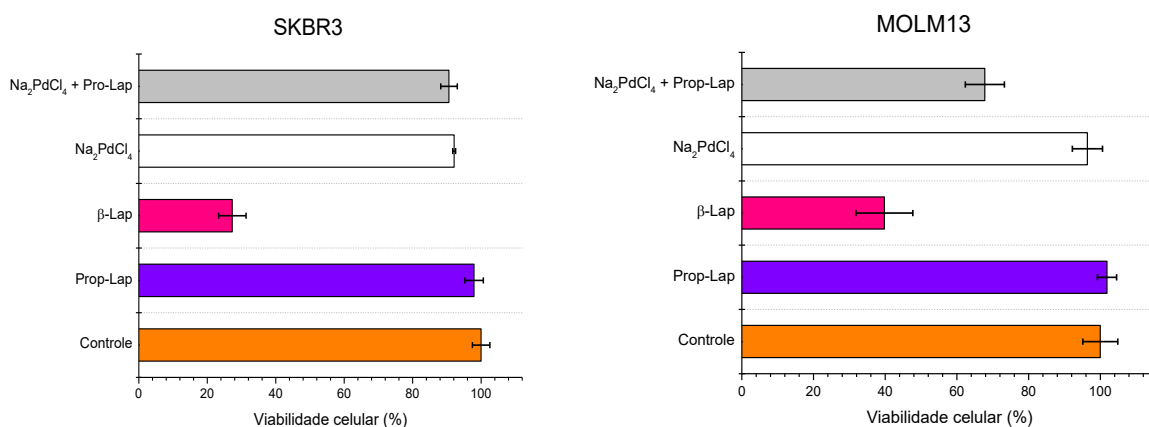
Figura 35 - Citotoxicidade do pró-fármaco Prop-Lap em comparação com a  $\beta$ -Lap em cultura de celular, determinada pelo ensaio CellTiter-Blue®. (a) SKBR3 por 48 h. (b) MOLM13 por 48 h. Cada experimento foi realizado em triplicata. Experimento realizado pela Dra. Eloah Latocheski no Bernardes Lab na Universidade de Cambridge - UK.



Também se demonstrou a estabilidade do Prop-Lap nos meios de crescimento usados nas culturas celulares, os meios RPMI (MOLM13) e McCoy (SKBR3). Após 24 horas, a formação de  $\beta$ -Lap não foi detectada por HPLC, confirmando a estabilidade do pró-fármaco nos meios de cultura celular (Anexo F). Após demonstrar que a  $\alpha$ -hidroxicetona Prop-Lap se comporta como pró-fármaco da  $\beta$ -Lap e que pode ser desprotegida em condições biologicamente relevantes (pH e temperatura fisiológicas), ensaios para a desproteção nas linhagens celulares cancerosas foram realizados. Inicialmente, avaliou-se a capacidade do sal simples  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em desproteger o Prop-Lap nas culturas celulares SKBR3 e MOLM13, após tratamento por 48h e 72h, respectivamente. Resultados modestos foram observados em MOLM13, enquanto na SKBR3, não se observou diferença na toxicidade. Indicando que o  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  é pouco ativo no meio biológico na reação de despropargilação (Figura 36). Provavelmente, o  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  é rapidamente desativado no meio biológico complexo, devido a

interação com outras espécies presentes no meio celular, formando espécies de Pd inativas na reação de despropargilação.<sup>40</sup>

Figura 36 - Viabilidade das células SKBR3 e MOLM13 após o tratamento com o pró-fármaco Prop-Lap e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio CellTiter-Blue®. Os experimentos foram realizados em triplicata. Experimento realizado pela Dra. Eloah Latocheski no Bernardes Lab na Universidade de Cambridge - UK.



Desta forma, as nanopartículas de paládio (II) ( $\text{PdI}_2$ -NPs) foram avaliadas na reação de clivagem C-C do Prop-Lap como catalisadores bio-ortogonais. As  $\text{PdI}_2$ -NPs possuem equilíbrio entre atividade (espécies de Pd(II) ativas na despropargilação do Prop-Lap), estabilidade ao meio biológico (devido a presença do polímero estabilizante, PVP) e toxicidade, permitindo uso em ambiente celular.<sup>128</sup> Além disso, nanopartículas de metais de transição são capazes de se acumular no interior das células, permitindo que a clivagem ocorra de forma espacialmente controlada.<sup>128</sup> As nanopartículas de paládio(0) ( $\text{Pd}(0)$ -NPs) também foram avaliadas, com o objetivo de avaliar uma possível diferença na atividade das nanopartículas devido ao meio biológico, mesmo que elas tenham apresentado pouca atividade na reação em frasco reacional.

A toxicidade devido a geração *in situ* da  $\beta$ -Lap na cultura celular SKBR3 foi determinada incubando as células contendo 0,1% de DMSO com:  $\text{PdI}_2$ -NPs,  $\text{Pd}(0)$ -NPs, Prop-Lap (controles negativos),  $\beta$ -Lap (controle positivo) e Prop-Lap + NPs (reação) (Figura 37). As células tratadas apenas com DMSO são consideradas com viabilidade 100%. As células SKBR3 foram incubadas por 72 h com 6,25  $\mu\text{M}$  Prop-Lap e 25  $\mu\text{M}$  Pd-NPs.

Quando o Prop-Lap foi incubado na presença das  $\text{PdI}_2$ -NPs, foi possível observar uma significativa diminuição da viabilidade celular devido a liberação da  $\beta$ -Lap, enquanto que as nanopartículas de paládio zero ( $\text{Pd}(0)$ -NPs) mostram pouca toxicidade devido a liberação da  $\beta$ -Lap, devido à baixa atividade das  $\text{Pd}(0)$ -NPs na reação, conforme descrito anteriormente. As

células MOLM13 foram incubadas por 48 h com 2  $\mu$ M Prop-Lap e 3  $\mu$ M Pd-NPs. Novamente, foi possível observar toxicidade na reação de desproteção do Prop-Lap quando incubadas com PdI<sub>2</sub>-NPs.

Figura 37 - Viabilidade da célula SKBR3 após o tratamento com o pró-fármaco Prop-Lap e Pd(0)-NPs ou PdI<sub>2</sub>-NPs, após 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio CellTiter-Blue®. Barras de erro representam  $\pm$  d.p. (n = 3). Cada experimento foi realizado em triplicata. Significância estatística: \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ . Experimento realizado pela Dra. Eloah Latocheski no Bernardes Lab na Universidade de Cambridge - UK.

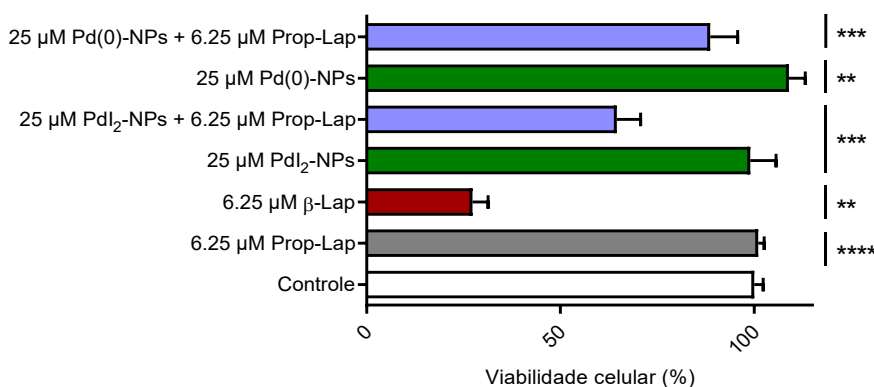
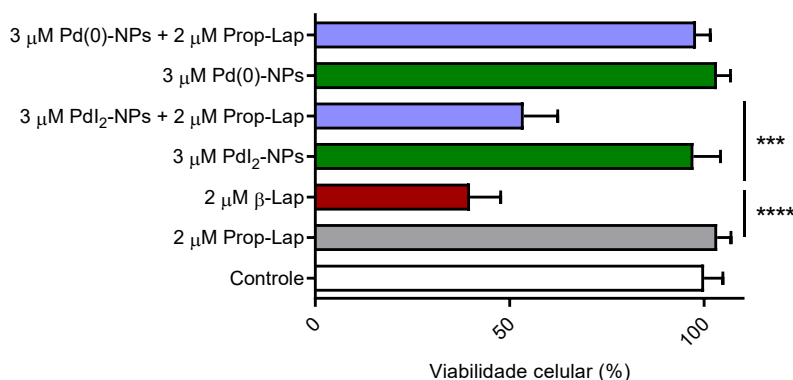


Figura 38 - Viabilidade da célula MOLM13 após o tratamento com o pró-fármaco Prop-Lap e Pd(0)-NPs ou PdI<sub>2</sub>-NPs, após 48 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio CellTiter-Blue®. Barras de erro representam  $\pm$  d.p. (n = 3). Cada experimento foi realizado em triplicata. Significância estatística: \*\*\* $P \leq 0,001$  e \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ . Os experimentos com Pd(0)-NPs representam n = 1. Experimento realizado pela Dra. Eloah Latocheski no Bernardes Lab na Universidade de Cambridge - UK.



O protocolo usando na cultura SKBR3 foi projetado para direcionar clivagem intracelular, enquanto para a MOLM13, o protocolo não incluiu a troca do meio extracelular, antes da adição do pró-fármaco. Nas células SKBR3, as Pd-NPs foram incubadas por 24 h, o meio de cultura foi trocado, e em seguida houve a adição do Prop-Lap. Enquanto na MOLM13

o pró-fármaco e as nanopartículas foram adicionados no mesmo momento, assim a reação pode acontecer intra- ou extracelularmente, pois não houve a troca do meio de crescimento.

É a primeira vez que é demonstrada a clivagem de pró-fármacos através da clivagem de ligações C-C mediada por paládio em células vivas. Embora a adição da PdI<sub>2</sub>-NPs não tenha restaurado a toxicidade ao nível observado para a β-Lap, os resultados demonstram que a reação bio-ortogonal de clivagem C-C mediada por paládio é possível em cultura celular e permite a liberação de quantidades suficientes da β-Lap para induzir a morte celular, fornecendo um método terapêutico alternativo para o tratamento do câncer.

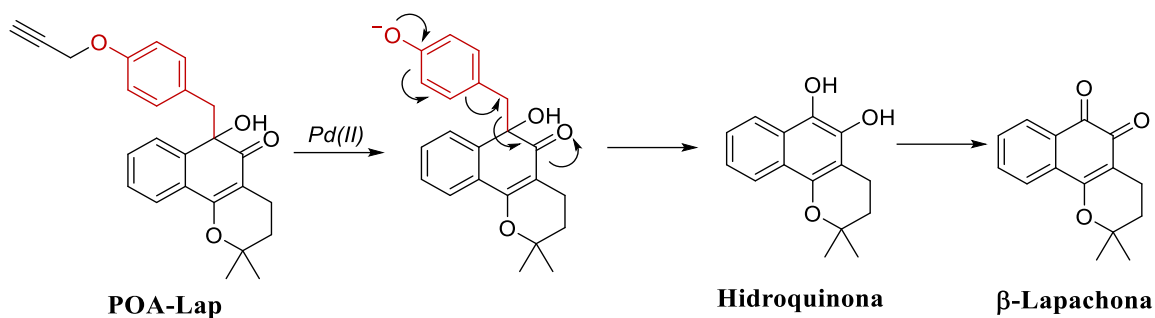
Assim, a nova metodologia desenvolvida expande a possibilidade de ativação de fármacos de forma espacialmente controlada. A possibilidade de o agente terapêutico ativo (β-Lap) seja produzido apenas onde for necessário (através da clivagem mediada pelas nanopartículas), como em tecidos cancerosos, minimiza a exposição sistêmica geral do paciente ao agente ativo, e conseqüentemente, aumenta a janela terapêutica e diminui os efeitos colaterais sistêmicos observados para a β-Lap, sendo a toxicidade fora do alvo a principal limitação para a utilização da β-Lap como um fármaco.

#### 4.2.6 Desproteção do pró-fármaco POA-Lap: Resultados iniciais e perspectivas

Conforme descrito nas seções 2.1.2 e 4.2.1, a clivagem da ligação C-C de derivados *p*-amino (PAB-Lap) e *p*-hidróxi benzil (PHB-Lap) α-hidroxicetonas da β-Lap, surgiu recentemente como uma alternativa para a ativação controlada da β-Lap.<sup>93</sup> A clivagem do derivado *para*-amino benzil aparenta ser muito lenta em pH biológico, sendo mais rápida em pH ácido, enquanto que a clivagem do *para*-hidroxi é mais suscetível em pH neutro. Entretanto, a reação aparenta ser muito lenta para aplicações *in vivo* ( $k_{obs}$ :  $6,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  em pH: 7,4). Essa estratégia requer otimização da velocidade da etapa de autoimolação, para se tornar aplicável na ativação da β-Lap para o tratamento do câncer.

Visando o desenvolvimento de novos pró-fármacos mais eficientes, foi avaliada a atividade de complexos de Pd(II) na liberação da β-Lap a partir do POA-Lap. A desproteção ocorre por meio de um mecanismo em duas etapas. Inicia-se por uma etapa de *O*-despropargilação, mediada por paládio, seguido da reação de autoimolação do grupamento benzílico, via 1,6-eliminação, gerando a β-Lap e o subproduto atóxico álcool 4-hidroxibenzílico (Esquema 46).

Esquema 46 - Ativação do pró-fármaco POA-Lap mediada por complexos de paládio.



A reação foi avaliada em condições biologicamente relevantes (pH: 7,4, 37 °C, 24h). Para isso, as reações foram realizadas incubando 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do POA-Lap em PBS (pH 7,4, 10% DMSO) por 24h a 37°C com os complexos  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  e  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  (1 eq. de Pd(II)). As reações foram monitoradas por LC-MS com a observação do POA-Lap ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , m/z 389, 12,6 min), do intermediário *para*-hidroxi benzil ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , m/z 361, 4,0 min) e da  $\beta$ -Lapachona ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , m/z 243, 4,7 min) (Figura 39). A reação foi diluída 5 vezes em acetonitrila antes da injeção (200  $\mu\text{L}$  da reação diluído para 1000  $\mu\text{L}$  com MeCN).

Figura 39 – Cromatograma (LC-MS) dos canais específicos das espécies da reação de desproteção da POA-Lap mediado por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições reacionais:  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  do POA-Lap e  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em PBS, pH 7,4, 10% DMSO, por 24h a  $37^\circ\text{C}$ .

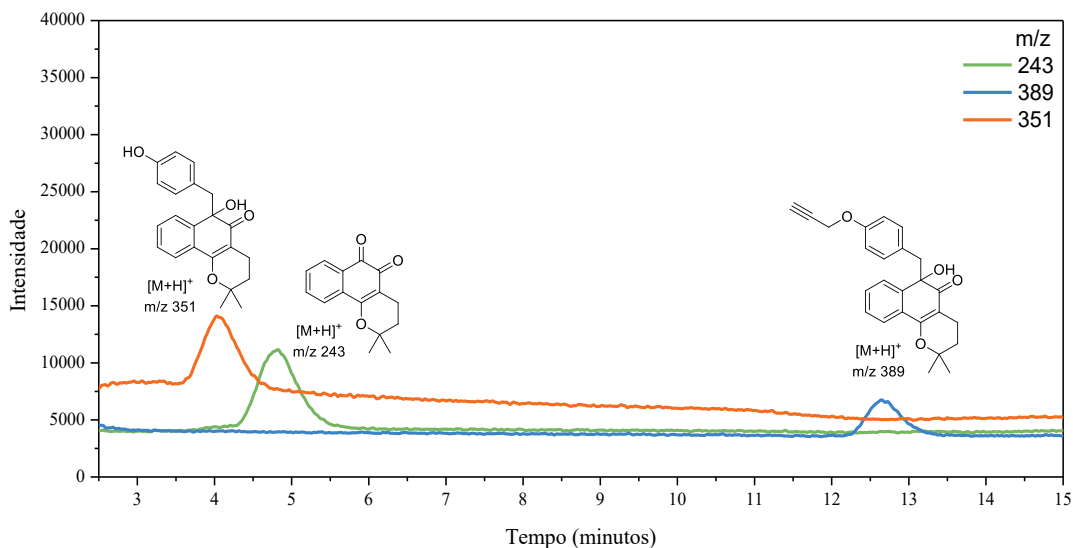
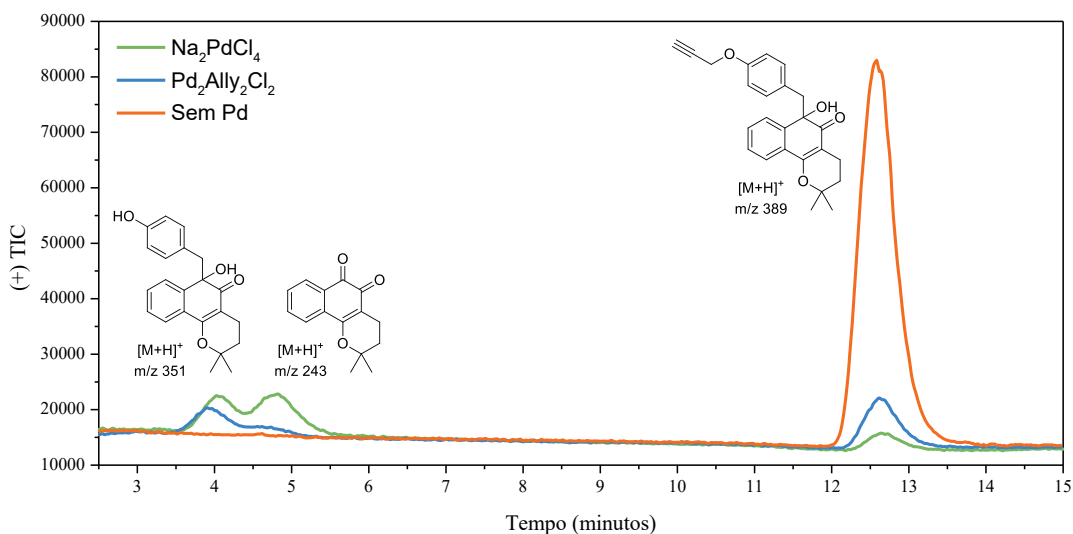


Figura 40 - Cromatograma (LC-MS – TIC(+)) da reação de desproteção da POA-Lap por complexos de Pd(II). Condições reacionais:  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  do POA-Lap e Pd(II) em PBS, pH 7,4, 10% DMSO, por 24h a  $37^\circ\text{C}$ .



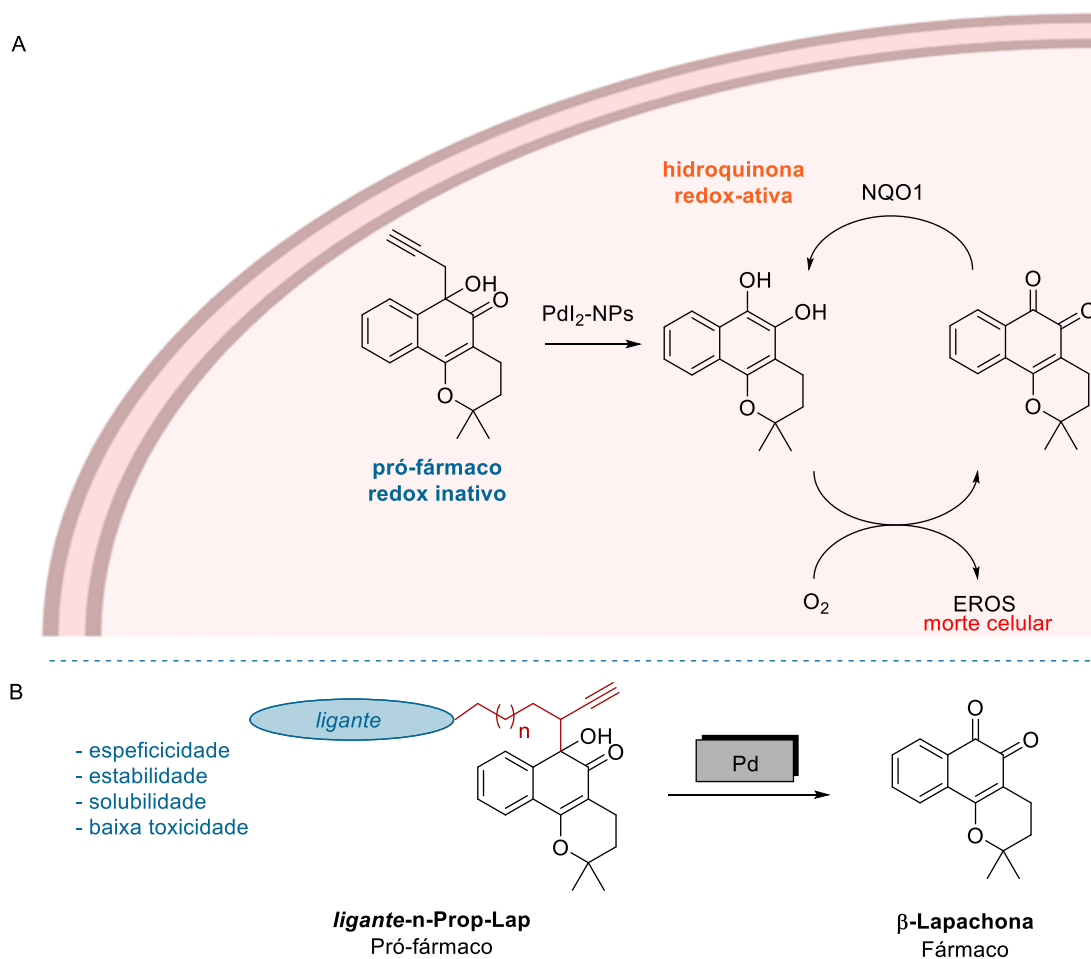
Conforme esperado, na ausência de paládio, é apenas observado o substrato no meio reacional (Figura 40). Quando o composto POA-Lap foi incubado com os sais de paládio (II), foi observada a formação da  $\beta$ -Lap, além do intermediário *para*-hidroxi benzil. Esses resultados iniciais demonstram que é possível ativar o pró-fármaco em condições biológicas, entretanto, conforme descrito anteriormente, a etapa de autoimolação do grupo *p*-hidróxi é lenta. Como pode ser observado pelo acúmulo do intermediário *para*-hidroxi benzil, mesmo após 24h de reação.



Com o objetivo de desenvolver pró-fármacos mais reativos, atualmente encontra-se em estudo no LaCBio a síntese e a avaliação de outras estruturas, possivelmente mais reativas. Este trabalho é desenvolvido por Albert Leder St. John, no seu mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos e minha coorientação. Para isso, estão sendo avaliados o efeito da inserção de grupos retiradores e doadores de elétrons no anel benzílico,<sup>130</sup> com o intuito de entender os efeitos eletrônicos na etapa de autoimolação e aumentar a velocidade de liberação da  $\beta$ -Lap.

#### 4.2.7 Conclusões e Perspectivas

O estudo das novas reações de clivagem C-C iniciou-se com a síntese e caracterização de novas moléculas derivadas da  $\beta$ -Lapachona, compostos que possuem potencial como pró-fármacos, essas  $\alpha$ -hidroxicetonas não devem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) em ambiente celular. Estes derivados não apresentam o ciclo redox descrito para a  $\beta$ -Lap, o qual é o principal responsável pela sua toxicidade em células cancerosas ou normais. Em uma segunda etapa, uma nova reação bio-ortogonal de clivagem C-C foi otimizada em condições biologicamente relevantes, onde observou-se que o grupo propargila (PropLap) é mais reativo que o grupo alila (Alil-Lap). Também foi possível observar que a clivagem é mais efetiva por nanopartículas de iodeto de paládio (II) ( $\text{PdI}_2$ -NPs). Essa é a primeira vez que é demonstrada a clivagem de grupos propargílicos e alílicos através da quebra de ligações C-C por metais de transição, a literatura cita apenas clivagens de ligações C-N ou C-O. Através de cálculos computacionais, foi possível propor um mecanismo mediado por Pd(II) para a nova reação de despropargilação do substrato Prop-Lap. A nova estratégia de ativação do Prop-Lap foi avaliada em duas linhagens celulares humanas (MOLM13 e SKBR3), onde a  $\beta$ -Lap é um candidato como um possível tratamento alternativo, mas tem sua aplicação limitada devido aos seus efeitos colaterais sistemáticos. Uma redução drástica na citotoxicidade, em comparação à  $\beta$ -Lap, foi observada em ambas as células cancerosas indicando que o pró-fármaco apresenta baixa toxicidade e é estável no meio celular. Quando o Prop-Lap foi incubado na presença de nanopartículas de paládio ( $\text{PdI}_2$ -NPs), foi possível observar a diminuição da viabilidade celular devido à quebra da ligação C-C e liberação intracelular da  $\beta$ -Lap (Esquema 47A). Estão sendo realizados experimentos de ativação do novo pró-fármaco Prop-Lap pelas Pd-NPs em modelos vivos (embriões de peixe-zebra), com o objetivo de avaliar a viabilidade do novo sistema como um método terapêutico alternativo para o tratamento do câncer. Parte destes resultados foram recentemente depositados na forma de uma patente no INPI (Número do Processo: BR1020220052085), além de um manuscrito que está em fase final de preparação.

Esquema 47 - Reação intracelular de clivagem C-C do Prop-Lap mediada por PdI<sub>2</sub>-NPs.

Atualmente, uma segunda geração dos pró-fármacos da  $\beta$ -Lap vem sendo propostos e desenvolvidos no LaCBio (Esquema 47B). A hipótese consiste que a  $\beta$ -Lap pode ser entregue diretamente nas células tumorais, através do desenvolvimento de pró-fármacos conjugados da  $\beta$ -Lapachona com agentes direcionadores, uma molécula (ligante) que possui afinidade por células cancerígenas. Ainda, a ativação controlada destes pró-fármacos se dará com a utilização de nanodispositivos catalíticos implantáveis baseados em paládio. Em contato com estes nanodispositivos, os pró-fármacos irão liberar a  $\beta$ -Lapachona de forma específica, através das reações bio-ortogonais rápidas descritas nessa tese, sem perturbar os processos bioquímicos inerentes do ambiente biológico. O desenvolvimento de tal sistema terapêutico pode rapidamente contribuir para o direcionamento da utilização de conjugados pró-fármaco ativados sob demanda, especificamente nas células-alvo tumorais.

## 5 CONCLUSÃO

Através das reações de clivagem C-O e C-C foi possível demonstrar a importância de estudos sistemáticos para o desenvolvimento de novas reações bio-ortogonais de clivagem mediadas por metais de transição. Esses estudos devem ocorrer de forma a aumentar a complexidade do sistema, iniciando-se em meios aquosos tamponados, passando para reações em culturas celulares e finalmente chegando em modelos animais. Através do estudo passo a passo é possível compreender as vantagens e limitações de cada sistema estudado.

Por exemplo, através do estudo cinético da clivagem C-O do par bio-ortogonal *O*-alenil/Pd<sub>2</sub>Ally<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em meios tamponados de diferentes composições, foi possível determinar constantes de segunda ordem de 2,0 até 88,9 L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, apenas pela variação da concentração de cloreto. Através desses estudos cinéticos foi possível obter informações a cerca do mecanismo molecular da reação de desalenilação, o qual é mediado por espécies de Pd(II), uma etapa fundamental para o desenvolvimento de novos catalisadores.

Com a avaliação das novas reações de clivagem C-C da  $\beta$ -Lap em condições biológicas (meio tamponado, pH: 7,4; 37 °C), foi possível obter rendimentos de até 66% para a desproteção do derivado propargilado, demonstrando pela primeira vez a clivagem de ligações C-C mediada por metais de transição em condições brandas. Utilizando cálculos computacionais foi possível propor um mecanismo para a reação, o qual envolve a eliminação-1,4 de um intermediário formado pela hidratação da ligação tripla, mediada pelo Pd(II).

A próxima etapa deste estudo, envolveu a avaliação da bio-ortogonalidade das reações em culturas celulares. Em ambas as reações de clivagem C-O e C-C, foi possível demonstrar que tanto os compostos protegidos (pró-fármacos), quanto os catalisadores (Pd, complexos ou NPs) são atóxicos quando comparados aos fármacos (DOX e  $\beta$ -Lap). Notavelmente, a principal limitação desses sistemas é a necessidade de concentrações mais altas do metal em meio biológico, em comparação com os meios tamponados. Embora ainda existam muitos obstáculos técnicos e científicos a serem superados, os resultados alcançados nesta tese apresentam um caminho para que esse esforço leve ao desenvolvimento de uma nova estratégia inovadora, em que importantes problemas de saúde pública possam ser solucionados através das reações bio-ortogonais de desproteção catalisadas por metais de transição.

## REFERÊNCIAS

- (1) Eremin, D. B.; Ananikov, V. P. Understanding Active Species in Catalytic Transformations: From Molecular Catalysis to Nanoparticles, Leaching, “Cocktails” of Catalysts and Dynamic Systems. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *346*, 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.12.021>.
- (2) Li, J.; Yu, J.; Zhao, J.; Wang, J.; Zheng, S.; Lin, S.; Chen, L.; Yang, M.; Jia, S.; Zhang, X.; Chen, P. R. Palladium-Triggered Deprotection Chemistry for Protein Activation in Living Cells. *Nature Chem* **2014**, *6* (4), 352–361. <https://doi.org/10.1038/nchem.1887>.
- (3) Tonga, G. Y.; Jeong, Y.; Duncan, B.; Mizuhara, T.; Mout, R.; Das, R.; Kim, S. T.; Yeh, Y.-C.; Yan, B.; Hou, S.; Rotello, V. M. Supramolecular Regulation of Bioorthogonal Catalysis in Cells Using Nanoparticle-Embedded Transition Metal Catalysts. *Nature Chem* **2015**, *7* (7), 597–603. <https://doi.org/10.1038/nchem.2284>.
- (4) Jbara, M.; Maity, S. K.; Brik, A. Palladium in the Chemical Synthesis and Modification of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (36), 10644–10655. <https://doi.org/10.1002/anie.201702370>.
- (5) Martínez-Calvo, M.; Mascareñas, J. L. Organometallic Catalysis in Biological Media and Living Settings. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *359*, 57–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.011>.
- (6) Völker, T.; Dempwolff, F.; Graumann, P. L.; Meggers, E. Progress towards Bioorthogonal Catalysis with Organometallic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (39), 10536–10540. <https://doi.org/10.1002/anie.201404547>.
- (7) Nguyen, D. P.; Nguyen, H. T. H.; Do, L. H. Tools and Methods for Investigating Synthetic Metal-Catalyzed Reactions in Living Cells. *ACS Catal.* **2021**, *11* (9), 5148–5165. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c00438>.
- (8) Yusop, R. M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M. V.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. Palladium-Mediated Intracellular Chemistry. *Nature Chem* **2011**, *3* (3), 239–243. <https://doi.org/10.1038/nchem.981>.
- (9) Wang, J.; Zheng, S.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Lin, Z.; Li, J.; Zhang, G.; Wang, X.; Li, J.; Chen, P. R. Palladium-Triggered Chemical Rescue of Intracellular Proteins via Genetically Encoded Allene-Caged Tyrosine. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (46), 15118–15121. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b08933>.

- (10) Latocheski, E.; Dal Forno, G. M.; Ferreira, T. M.; Oliveira, B. L.; Bernardes, G. J. L.; Domingos, J. B. Mechanistic Insights into Transition Metal-Mediated Bioorthogonal Uncaging Reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (21), 7710–7729. <https://doi.org/10.1039/D0CS00630K>.
- (11) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>.
- (12) Li, J.; Chen, P. R. Development and Application of Bond Cleavage Reactions in Bioorthogonal Chemistry. *Nat Chem Biol* **2016**, *12* (3), 129–137. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2024>.
- (13) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.
- (14) Devaraj, N. K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (8), 952–959. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00251>.
- (15) *Click chemistry sees first use in humans*. CHEMICAL & ENGINEERING NEWS. <https://cen.acs.org/pharmaceuticals/Click-chemistry-sees-first-use/98/web/2020/10>.
- (16) Srinivasan, S.; Yee, N. A.; Wu, K.; Zakharian, M.; Mahmoodi, A.; Royzen, M.; Mejía Oneto, J. M. SQ3370 Activates Cytotoxic Drug via Click Chemistry at Tumor and Elicits Sustained Responses in Injected and Non-Injected Lesions. *Adv. Therap.* **2021**, *4* (3), 2000243. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000243>.
- (17) Jana, R.; Pathak, T. P.; Sigman, M. S. Advances in Transition Metal (Pd,Ni,Fe)-Catalyzed Cross-Coupling Reactions Using Alkyl-Organometallics as Reaction Partners. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 1417–1492. <https://doi.org/10.1021/cr100327p>.
- (18) Cooper, T. W. J.; Campbell, I. B.; Macdonald, S. J. F. Factors Determining the Selection of Organic Reactions by Medicinal Chemists and the Use of These Reactions in Arrays (Small Focused Libraries). *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (44), 8082–8091. <https://doi.org/10.1002/anie.201002238>.
- (19) Roughley, S. D.; Jordan, A. M. The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (10), 3451–3479. <https://doi.org/10.1021/jm200187y>.
- (20) Unciti-Broceta, A. Rise of the Nanobots. *Nature Chem* **2015**, *7* (7), 538–539. <https://doi.org/10.1038/nchem.2291>.

- (21) Soldevila-Barreda, J. J.; Metzler-Nolte, N. Intracellular Catalysis with Selected Metal Complexes and Metallic Nanoparticles: Advances toward the Development of Catalytic Metallodrugs. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 829–869. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00493>.
- (22) Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. A Convenient Catalyst for Aqueous and Protein Suzuki–Miyaura Cross-Coupling. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (45), 16346–16347. <https://doi.org/10.1021/ja907150m>.
- (23) Li, N.; Lim, R. K. V.; Edwardraja, S.; Lin, Q. Copper-Free Sonogashira Cross-Coupling for Functionalization of Alkyne-Encoded Proteins in Aqueous Medium and in Bacterial Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (39), 15316–15319. <https://doi.org/10.1021/ja2066913>.
- (24) Spicer, C. D.; Davis, B. G. Palladium-Mediated Site-Selective Suzuki–Miyaura Protein Modification at Genetically Encoded Aryl Halides. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (6), 1698. <https://doi.org/10.1039/c0cc04970k>.
- (25) Dumas, A.; Spicer, C. D.; Gao, Z.; Takehana, T.; Lin, Y. A.; Yasukohchi, T.; Davis, B. G. Self-Liganded Suzuki–Miyaura Coupling for Site-Selective Protein PEGylation. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (14), 3916–3921. <https://doi.org/10.1002/anie.201208626>.
- (26) Indrigo, E.; Clavadetscher, J.; Chankeshwara, S. V.; Lilienkampf, A.; Bradley, M. Palladium-Mediated in Situ Synthesis of an Anticancer Agent. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (99), 14212–14214. <https://doi.org/10.1039/C6CC08666G>.
- (27) Spicer, C. D.; Triemer, T.; Davis, B. G. Palladium-Mediated Cell-Surface Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (2), 800–803. <https://doi.org/10.1021/ja209352s>.
- (28) Vong, K.; Yamamoto, T.; Chang, T.; Tanaka, K. Bioorthogonal Release of Anticancer Drugs via Gold-Triggered 2-Alkynylbenzamide Cyclization. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (40), 10928–10933. <https://doi.org/10.1039/D0SC04329J>.
- (29) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504. <https://doi.org/10.1021/cr800323s>.
- (30) Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Bioorthogonal Reaction Pairs Enable Simultaneous, Selective, Multi-Target Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (4), 920–922. <https://doi.org/10.1002/anie.201104389>.

- (31) Wang, J.; Wang, X.; Fan, X.; Chen, P. R. Unleashing the Power of Bond Cleavage Chemistry in Living Systems. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7* (6), 929–943. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00124>.
- (32) Streu, C.; Meggers, E. Ruthenium-Induced Allylcarbamate Cleavage in Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (34), 5645–5648. <https://doi.org/10.1002/anie.200601752>.
- (33) Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Macleod, K. G.; Rybski, W.; Fraser, C.; Torres-Sánchez, C.; Patton, E. E.; Bradley, M.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. Extracellular Palladium-Catalysed Dealkylation of 5-Fluoro-1-Propargyl-Uracil as a Bioorthogonally Activated Prodrug Approach. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 3277. <https://doi.org/10.1038/ncomms4277>.
- (34) Pérez-López, A. M.; Rubio-Ruiz, B.; Sebastián, V.; Hamilton, L.; Adam, C.; Bray, T. L.; Irusta, S.; Brennan, P. M.; Lloyd-Jones, G. C.; Sieger, D.; Santamaría, J.; Unciti-Broceta, A. Gold-Triggered Uncaging Chemistry in Living Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (41), 12548–12552. <https://doi.org/10.1002/anie.201705609>.
- (35) Kislukhin, A. A.; Hong, V. P.; Breitenkamp, K. E.; Finn, M. G. Relative Performance of Alkynes in Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (4), 684–689. <https://doi.org/10.1021/bc300672b>.
- (36) Wang, X.; Liu, Y.; Fan, X.; Wang, J.; Ngai, W. S. C.; Zhang, H.; Li, J.; Zhang, G.; Lin, J.; Chen, P. R. Copper-Triggered Bioorthogonal Cleavage Reactions for Reversible Protein and Cell Surface Modifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (43), 17133–17141. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b05833>.
- (37) Davies, S.; Stenton, B. J.; Bernardes, G. J. L. Bioorthogonal Decaging Reactions for Targeted Drug Activation. *chimia (aarau)* **2018**, *72* (11), 771–776. <https://doi.org/10.2533/chimia.2018.771>.
- (38) Stenton, B. J.; Oliveira, B. L.; Matos, M. J.; Sinatra, L.; Bernardes, G. J. L. A Thioether-Directed Palladium-Cleavable Linker for Targeted Bioorthogonal Drug Decaging. *Chemical Science* **2018**, *9* (17), 4185–4189. <https://doi.org/10.1039/C8SC00256H>.
- (39) Oliveira, B. L.; Stenton, B. J.; Unnikrishnan, V. B.; de Almeida, C. R.; Conde, J.; Negrão, M.; Schneider, F. S. S.; Cordeiro, C.; Ferreira, M. G.; Caramori, G. F.; Domingos, J. B.; Fior, R.; Bernardes, G. J. L. Platinum-Triggered Bond-Cleavage of Pentynoyl Amide and



- N-Propargyl Handles for Drug-Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (24), 10869–10880. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01622>.
- (40) Martínez-Calvo, M.; Couceiro, J. R.; Destito, P.; Rodríguez, J.; Mosquera, J.; Mascareñas, J. L. Intracellular Deprotection Reactions Mediated by Palladium Complexes Equipped with Designed Phosphine Ligands. *ACS Catal.* **2018**, *8* (7), 6055–6061. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01606>.
- (41) Dixneuf, P.; Cadierno, V. *Metal-Catalyzed Reactions in Water*; John Wiley & Sons, 2013.
- (42) Song, F.; Garner, A. L.; Koide, K. A Highly Sensitive Fluorescent Sensor for Palladium Based on the Allylic Oxidative Insertion Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (41), 12354–12355. <https://doi.org/10.1021/ja073910q>.
- (43) Trost, B. M.; Van Vranken, D. L. Asymmetric Transition Metal-Catalyzed Allylic Alkylations. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (1), 395–422. <https://doi.org/10.1021/cr9409804>.
- (44) Tsuji, J. *Organic Synthesis with Palladium Compounds*; Springer Science & Business Media, 2012.
- (45) Garner, A. L.; Song, F.; Koide, K. Enhancement of a Catalysis-Based Fluorometric Detection Method for Palladium through Rational Fine-Tuning of the Palladium Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (14), 5163–5171. <https://doi.org/10.1021/ja808385a>.
- (46) Mitoraj, M. P.; Michalak, A.  $\sigma$ -Donor and  $\pi$ -Acceptor Properties of Phosphorus Ligands: An Insight from the Natural Orbitals for Chemical Valence. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (2), 578–582. <https://doi.org/10.1021/ic901736n>.
- (47) Pohorilets, I.; Tracey, M. P.; LeClaire, M. J.; Moore, E. M.; Lu, G.; Liu, P.; Koide, K. Kinetics and Inverse Temperature Dependence of a Tsuji–Trost Reaction in Aqueous Buffer. *ACS Catal.* **2019**, *9* (12), 11720–11733. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03011>.
- (48) Santra, M.; Ko, S.-K.; Shin, I.; Ahn, K. H. Fluorescent Detection of Palladium Species with an O-Propargylated Fluorescein. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (22), 3964–3966. <https://doi.org/10.1039/C001922D>.
- (49) Miller, M. A.; Askevold, B.; Mikula, H.; Kohler, R. H.; Pirovich, D.; Weissleder, R. Nano-Palladium Is a Cellular Catalyst for in Vivo Chemistry. *Nature Communications* **2017**, *8* (1), 15906. <https://doi.org/10.1038/ncomms15906>.

- (50) Weiss, J. T.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. Palladium-Mediated Dealkylation of N-Propargyl-Floxuridine as a Bioorthogonal Oxygen-Independent Prodrug Strategy. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 9329. <https://doi.org/10.1038/srep09329>.
- (51) Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Fraser, C.; Rybski, W.; Torres-Sánchez, C.; Bradley, M.; Patton, E. E.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (12), 5395–5404. <https://doi.org/10.1021/jm500531z>.
- (52) Rubio-Ruiz, B.; Weiss, J. T.; Unciti-Broceta, A. Efficient Palladium-Triggered Release of Vorinostat from a Bioorthogonal Precursor. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (21), 9974–9980. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01426>.
- (53) Sancho-Albero, M.; Rubio-Ruiz, B.; Pérez-López, A. M.; Sebastián, V.; Martín-Duque, P.; Arruebo, M.; Santamaría, J.; Unciti-Broceta, A. Cancer-Derived Exosomes Loaded with Ultrathin Palladium Nanosheets for Targeted Bioorthogonal Catalysis. *Nat Catal* **2019**. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0333-4>.
- (54) Lv, T.; Wu, J.; Kang, F.; Wang, T.; Wan, B.; Lu, J.-J.; Zhang, Y.; Huang, Z. Synthesis and Evaluation of  $O^2$ -Derived Diazeniumdiolates Activatable via Bioorthogonal Chemistry Reactions in Living Cells. *Organic Letters* **2018**, *20* (8), 2164–2167. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00423>.
- (55) Norbert Krause, A. S. K. H. *Modern Allene Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2004; Vol. 1 e 2.
- (56) Ma, S. Some Typical Advances in the Synthetic Applications of Allenes. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (7), 2829–2872. <https://doi.org/10.1021/cr020024j>.
- (57) Pal, M.; Parasuraman, K.; Yeleswarapu, K. R. Palladium-Catalyzed Cleavage of O/N-Propargyl Protecting Groups in Aqueous Media under a Copper-Free Condition<sup>1</sup>. *Org. Lett.* **2003**, *5* (3), 349–352. <https://doi.org/10.1021/ol027382t>.
- (58) Rambabu, D.; Bhavani, S.; Swamy, N. K.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. Pd/C-Mediated Depropargylation of Propargyl Ethers/Amines in Water. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (9), 1169–1173. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.12.093>.
- (59) Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Macleod, K. G.; Rybski, W.; Fraser, C.; Torres-Sánchez, C.; Patton, E. E.; Bradley, M.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. Extracellular Palladium-Catalysed Dealkylation of 5-Fluoro-1-Propargyl-Uracil as a Bioorthogonally Activated

- Prodrug Approach. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 3277. <https://doi.org/10.1038/ncomms4277>.
- (60) Coelho, S. E.; Schneider, F. S. S.; de Oliveira, D. C.; Tripodi, G. L.; Eberlin, M. N.; Caramori, G. F.; de Souza, B.; Domingos, J. B. Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates. *ACS Catalysis* **2019**, 3792–3799. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00210>.
- (61) Jin, L.; Lei, A. Mechanistic Aspects of Oxidation of Palladium with O<sub>2</sub>. *Science China Chemistry* **2012**, *55* (10), 2027–2035. <https://doi.org/10.1007/s11426-012-4719-2>.
- (62) Zhang, P.; Sadler, P. J. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, *2017* (12), 1541–1548. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600908>.
- (63) Jardim, G.; Lima, D.; Valença, W.; Lima, D.; Cavalcanti, B.; Pessoa, C.; Rafique, J.; Braga, A.; Jacob, C.; da Silva Júnior, E.; da Cruz, E. Synthesis of Selenium-Quinone Hybrid Compounds with Potential Antitumor Activity via Rh-Catalyzed C-H Bond Activation and Click Reactions. *Molecules* **2017**, *23* (1), 83. <https://doi.org/10.3390/molecules23010083>.
- (64) da Silva Júnior, E. N.; Jardim, G. A. M.; Jacob, C.; Dhawa, U.; Ackermann, L.; de Castro, S. L. Synthesis of Quinones with Highlighted Biological Applications: A Critical Update on the Strategies towards Bioactive Compounds with Emphasis on Lapachones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *179*, 863–915. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.056>.
- (65) Gong, Q.; Hu, J.; Wang, P.; Li, X.; Zhang, X. A Comprehensive Review on  $\beta$ -Lapachone: Mechanisms, Structural Modifications, and Therapeutic Potentials. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *210*, 112962. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112962>.
- (66) Dantas-Pereira, L.; Cunha-Junior, E. F.; Andrade-Neto, V. V.; Bower, J. F.; Jardim, G. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Torres-Santos, E. C.; Menna-Barreto, R. F. S. Naphthoquinones and Derivatives for Chemotherapy: Perspectives and Limitations of Their Anti-Trypanosomatids Activities. *CPD* **2021**, *27* (15), 1807–1824. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201109111802>.
- (67) Gómez Castellanos, J. R.; Prieto, J. M.; Heinrich, M. Red Lapacho (Tabebuia Impetiginosa)—A Global Ethnopharmacological Commodity? *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, *121* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.004>.

- (68) Ferreira, S. B.; Gonzaga, D. T. G.; Santos, W. C.; Araújo, K. G. de L.; Ferreira, V. F.  $\beta$ -Lapachone: Medicinal chemistry significance and structural modifications. *Revista Virtual de Química* **2010**, *2* (2). <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100013>.
- (69) Planchon, S. M.; Wuerzberger, S.; Frydman, B.; Witiak, D. T.; Church, D. R.; Wilding, G.; Boothman, D. A.  $\beta$ -Lapachone-Mediated Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) and Human Prostate Cancer Cells: A P53- Independent Response. *Cancer Res.* **1995**, *55* (17), 3706-3711.
- (70) Yang, Y.; Zhou, X.; Xu, M.; Piao, J.; Zhang, Y.; Lin, Z.; Chen, L.  $\beta$ -Lapachone Suppresses Tumour Progression by Inhibiting Epithelial-to-Mesenchymal Transition in NQO1-Positive Breast Cancers. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 2681. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02937-0>.
- (71) Blanco, E.; Bey, E. A.; Khemtong, C.; Yang, S.-G.; Setti-Guthi, J.; Chen, H.; Kessinger, C. W.; Carnevale, K. A.; Bornmann, W. G.; Boothman, D. A.; Gao, J.  $\beta$ -Lapachone Micellar Nanotherapeutics for Non-Small Cell Lung Cancer Therapy. *Cancer Res* **2010**, *70* (10), 3896–3904. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3995>.
- (72) Ough, M.; Lewis, A.; Bey, E. A.; Gao, J.; Ritchie, J. M.; Bornmann, W.; Boothman, D. A.; Oberley, L. W.; Cullen, J. J. Efficacy of Beta-Lapachone in Pancreatic Cancer Treatment: Exploiting the Novel, Therapeutic Target NQO1. *Cancer Biology & Therapy* **2005**, *4* (1), 102–109. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.1.1382>.
- (73) Dong, Y.; Chin, S.-F.; Blanco, E.; Bey, E. A.; Kabbani, W.; Xie, X.-J.; Bornmann, W. G.; Boothman, D. A.; Gao, J. Intratumoral Delivery of  $\beta$ -Lapachone via Polymer Implants for Prostate Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (1), 131–139. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1691>.
- (74) Pink, J. J.; Planchon, S. M.; Tagliarino, C.; Varnes, M. E.; Siegel, D.; Boothman, D. A. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Activity Is the Principal Determinant of  $\beta$ -Lapachone Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (8), 5416–5424. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5416>.
- (75) Bey, E. A.; Bentle, M. S.; Reinicke, K. E.; Dong, Y.; Yang, C.-R.; Girard, L.; Minna, J. D.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Boothman, D. A. An NQO1- and PARP-1-Mediated Cell Death Pathway Induced in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by  $\beta$ -Lapachone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104* (28), 11832–11837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702176104>.

- (76) Rodrigues, T.; Werner, M.; Roth, J.; da Cruz, E. H. G.; Marques, M. C.; Akkapeddi, P.; Lobo, S. A.; Koeberle, A.; Corzana, F.; da Silva Júnior, E. N.; Werz, O.; Bernardes, G. J. L. Machine Intelligence Decrypts  $\beta$ -Lapachone as an Allosteric 5-Lipoxygenase Inhibitor. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (34), 6899–6903. <https://doi.org/10.1039/C8SC02634C>.
- (77) Wondrak, G. T. Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **2009**, *11* (12), 3013–3069. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2541>.
- (78) Cui, Q.; Wang, J.-Q.; Assaraf, Y. G.; Ren, L.; Gupta, P.; Wei, L.; Ashby, C. R.; Yang, D.-H.; Chen, Z.-S. Modulating ROS to Overcome Multidrug Resistance in Cancer. *Drug Resistance Updates* **2018**, *41*, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.11.001>.
- (79) Li, C. J.; Li, Y.-Z.; Pinto, A. V.; Pardee, A. B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**, *96* (23), 13369-13374. doi:10.1073/pnas.96.23.13369
- (80) D'Anneo, A., Augello, G., Santulli, A., Giuliano, M., di Fiore, R., Messina, C., Tesoriere, G. and Vento, R. Paclitaxel and beta-lapachone synergistically induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by downregulating the levels of phospho-Akt. **2010**, *J. Cell. Physiol.*, *222*, 433-443. <https://doi.org/10.1002/jcp.21983>
- (81) Zhang, L.; Chen, Z.; Yang, K.; Liu, C.; Gao, J.; Qian, F.  $\beta$ -Lapachone and Paclitaxel Combination Micelles with Improved Drug Encapsulation and Therapeutic Synergy as Novel Nanotherapeutics for NQO1-Targeted Cancer Therapy. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12* (11), 3999–4010. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00448>.
- (82) Huang, X.; Motea, E. A.; Moore, Z. R.; Yao, J.; Dong, Y.; Chakrabarti, G.; Kilgore, J. A.; Silvers, M. A.; Patidar, P. L.; Cholka, A.; Fattah, F.; Cha, Y.; Anderson, G. G.; Kusko, R.; Peyton, M.; Yan, J.; Xie, X.-J.; Sarode, V.; Williams, N. S.; Minna, J. D.; Beg, M.; Gerber, D. E.; Bey, E. A.; Boothman, D. A. Leveraging an NQO1 Bioactivatable Drug for Tumor-Selective Use of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Cancer Cell* **2016**, *30* (6), 940–952. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.006>.
- (83) Roos, J.; Oancea, C.; Heinssmann, M.; Khan, D.; Held, H.; Kahnt, A. S.; Capelo, R.; la Buscató, E.; Proschak, E.; Puccetti, E.; Steinhilber, D.; Fleming, I.; Maier, T. J.; Ruthardt, M. 5-Lipoxygenase Is a Candidate Target for Therapeutic Management of

- Stem Cell–like Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res* **2014**, *74* (18), 5244–5255. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3012>.
- (84) Nasongkla, N.; Wiedmann, A. F.; Bruening, A.; Beman, M.; Ray, D.; Bornmann, W. G.; Boothman, D. A.; Gao, J. Enhancement of Solubility and Bioavailability of  $\beta$ -Lapachone Using Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Pharmaceutical Research* **2003**, *20*, 1626–1633.
- (85) Gerber, D. E.; Beg, M. S.; Fattah, F.; Frankel, A. E.; Fatunde, O.; Arriaga, Y.; Dowell, J. E.; Bisen, A.; Leff, R. D.; Meek, C. C.; Putnam, W. C.; Kallem, R. R.; Subramaniyan, I.; Dong, Y.; Bolluyt, J.; Sarode, V.; Luo, X.; Xie, Y.; Schwartz, B.; Boothman, D. A. Phase 1 Study of ARQ 761, a  $\beta$ -Lapachone Analogue That Promotes NQO1-Mediated Programmed Cancer Cell Necrosis. *Br J Cancer* **2018**, *119* (8), 928–936. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0278-4>.
- (86) Bartis, J.; Volckova, E.; Tandon, M.; Lowe, D.; Redmon, M. HYDROXY SULFONATE OF QUINONE COMPOUNDS AND THEIR USES. WO 2008134088, 2008.
- (87) Reinicke, K. E.; Bey, E. A.; Bentle, M. S.; Pink, J. J.; Ingalls, S. T.; Hoppel, C. L.; Misico, R. I.; Arzac, G. M.; Burton, G.; Bornmann, W. G.; Sutton, D.; Gao, J.; Boothman, D. A. Development of  $\beta$ -Lapachone Prodrugs For Therapy Against Human Cancer Cells with Elevated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Levels. *Clin Cancer Res* **2005**, *10*.
- (88) Ma, X.; Huang, X.; Huang, G.; Li, L.; Wang, Y.; Luo, X.; Boothman, D. A.; Gao, J. Prodrug Strategy to Achieve Lyophilizable, High Drug Loading Micelle Formulations Through Diester Derivatives of  $\beta$ -Lapachone. *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, *3* (8), 1210–1216. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300590>.
- (89) Di Chenna, P. H.; Benedetti-Doctorovich, V.; Baggio, R. F.; Garland, M. T.; Burton, G. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono(Arylimino) Derivatives of  $\beta$ -Lapachone. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (15), 2486–2489. <https://doi.org/10.1021/jm010050u>.
- (90) Zhou, Y.; Dong, Y.; Huang, G.; Wang, Y.; Huang, X.; Zhang, F.; Boothman, D. A.; Gao, J.; Liang, W. Lysosome-Oriented, Dual-Stage PH-Responsive Polymeric Micelles for  $\beta$ -Lapachone Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (46), 7429–7440. <https://doi.org/10.1039/C6TB02049F>.

- (91) Cho, H.; Cho, Y.-Y.; Shim, M. S.; Lee, J. Y.; Lee, H. S.; Kang, H. C. Mitochondria-Targeted Drug Delivery in Cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2020**, *1866* (8), 165808. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165808>.
- (92) Ma, X.; Huang, X.; Moore, Z.; Huang, G.; Kilgore, J. A.; Wang, Y.; Hammer, S.; Williams, N. S.; Boothman, D. A.; Gao, J. Esterase-Activatable  $\beta$ -Lapachone Prodrug Micelles for NQO1-Targeted Lung Cancer Therapy. *Journal of Controlled Release* **2015**, *200*, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.027>.
- (93) Dunsmore, L.; Navo, C. D.; Becher, J.; de Montes, E. G.; Guerreiro, A.; Hoyt, E.; Brown, L.; Zelenay, V.; Mikutis, S.; Cooper, J.; Barbieri, I.; Lawrinowitz, S.; Siouve, E.; Martin, E.; Ruivo, P. R.; Rodrigues, T.; da Cruz, F. P.; Werz, O.; Vassiliou, G.; Ravn, P.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. Controlled Masking and Targeted Release of Redox-Cycling Ortho-Quinones via a C–C Bond-Cleaving 1,6-Elimination. *Nat. Chem.* **2022**. <https://doi.org/10.1038/s41557-022-00964-7>.
- (94) Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- (95) 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. **2008**, *Theoretical Chemistry Accounts*, *120*, 215–241. <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>.

- (96) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for K to Au Including the Outermost Core Orbitals. **1985**, *J. Chem. Phys.* **82**, 299-310. <https://doi.org/10.1063/1.448975>.
- (97) Scalmani, G.; Frisch, M. J. Continuous Surface Charge Polarizable Continuum Models of Solvation. I. General Formalism. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *132* (11), 114110. <https://doi.org/10.1063/1.3359469>.
- (98) Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom–Atom Dispersion Corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (44), 6615. <https://doi.org/10.1039/b810189b>.
- (99) 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. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (49), 14556–14562. <https://doi.org/10.1021/jp205508z>.
- (100) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Following Reaction Pathways Using a Damped Classical Trajectory Algorithm. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (1), 165–169. <https://doi.org/10.1021/jp012125b>.
- (101) Rull-Barrull, J.; d'Halluin, M.; Le Grogne, E.; Felpin, F.-X. Harnessing the Dual Properties of Thiol-Grafted Cellulose Paper for Click Reactions: A Powerful Reducing Agent and Adsorbent for Cu. *Angew. Chem.* **2016**, *128* (43), 13747–13750. <https://doi.org/10.1002/ange.201606760>.
- (102) Bousfield, T. W.; Kimber, M. C. A Simple One-Pot Preparation of N-Allenyl Amides, Ureas, Carbamates and Sulfonamides Using a DMSO/TBuOK Protocol. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (2), 350–352. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.11.093>.
- (103) Kona, C. N.; Ramana, C. V. Gold(I)-Catalysed [1,3] O→C Rearrangement of Allenyl Ethers. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (17), 2152–2154. <https://doi.org/10.1039/C3CC49629E>.
- (104) Staderini, M.; Gambardella, A.; Lilienkampf, A.; Bradley, M. A Tetrazine-Labile Vinyl Ether Benzyloxycarbonyl Protecting Group (VeZ): An Orthogonal Tool for Solid-Phase Peptide Chemistry. *Org. Lett.* **2018**, *20* (11), 3170–3173. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00898>.
- (105) Calil, F. A.; David, J. S.; Chiappetta, E. R. C.; Fumagalli, F.; Mello, R. B.; Leite, F. H. A.; Castilho, M. S.; Emery, F. S.; Nonato, M. C. Ligand-Based Design, Synthesis and Biochemical Evaluation of Potent and Selective Inhibitors of *Schistosoma Mansoni*

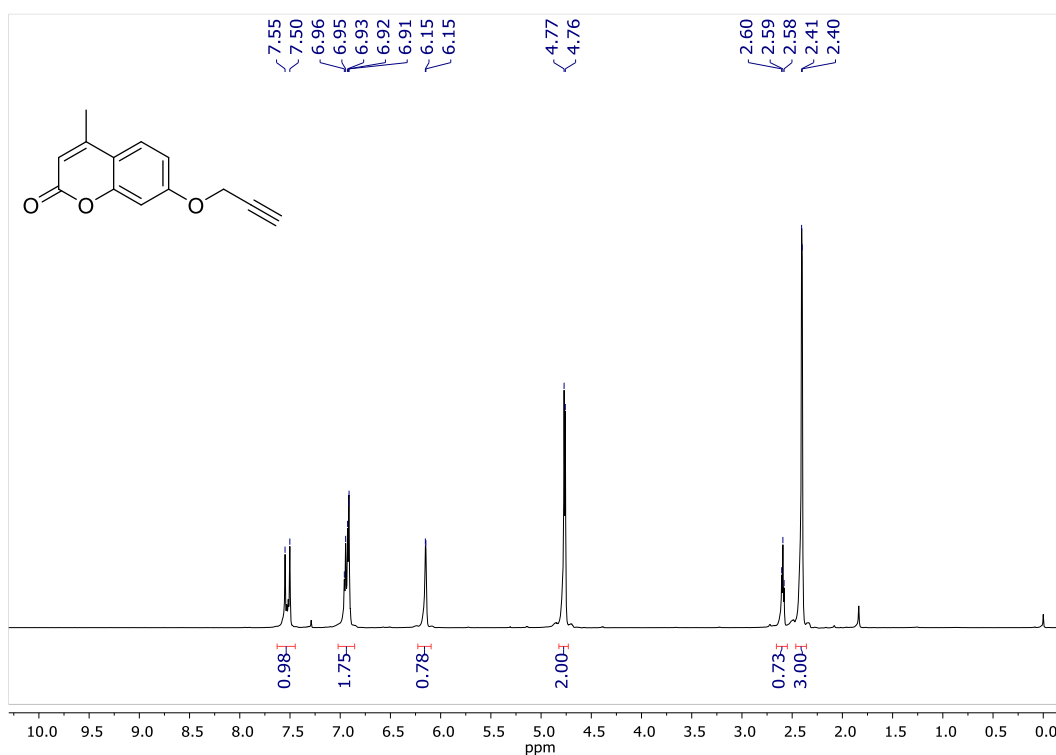


- Dihydroorotate Dehydrogenase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *167*, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.018>.
- (106) Inagaki, R.; Ninomiya, M.; Tanaka, K.; Koketsu, M. Synthesis, Characterization, and Antileukemic Properties of Naphthoquinone Derivatives of Lawsone. *ChemMedChem* **2015**, *10* (8), 1413–1423. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500189>.
- (107) Nair, V.; Jayan, C. N.; Ros, S. Novel Reactions of Indium Reagents with 1,2-Diones: A Facile Synthesis of  $\alpha$ -Hydroxy Ketones. **2001**, *7*.
- (108) Steinhoff, P.; Paul, M.; Schroers, J. P.; Tauchert, M. E. Highly Efficient Palladium-Catalysed Carbon Dioxide Hydrosilylation Employing PMP Ligands. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (3), 1017–1022. <https://doi.org/10.1039/C8DT03777A>.
- (109) Zimmer, R.; Reissig, H.-U. Alkoxyallenes as Building Blocks for Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (9), 2888–2903. <https://doi.org/10.1039/C3CS60429B>.
- (110) Carvalho, C.; Santos, R.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P.; Santos, M.; Moreira, P. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *CMC* **2009**, *16* (25), 3267–3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>.
- (111) Wang, X.; Liu, Y.; Fan, X.; Wang, J.; Ngai, W. S. C.; Zhang, H.; Li, J.; Zhang, G.; Lin, J.; Chen, P. R. Copper-Triggered Bioorthogonal Cleavage Reactions for Reversible Protein and Cell Surface Modifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (43), 17133–17141. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b05833>.
- (112) Stenton, B. J.; Oliveira, B. L.; Matos, M. J.; Sinatra, L.; Bernardes, G. J. L. A Thioether-Directed Palladium-Cleavable Linker for Targeted Bioorthogonal Drug Decaging. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (17), 4185–4189. <https://doi.org/10.1039/C8SC00256H>.
- (113) Miller, M. A.; Mikula, H.; Luthria, G.; Li, R.; Kronister, S.; Prytyskach, M.; Kohler, R. H.; Mitchison, T.; Weissleder, R. Modular Nanoparticulate Prodrug Design Enables Efficient Treatment of Solid Tumors Using Bioorthogonal Activation. *ACS Nano* **2018**, *12* (12), 12814–12826. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07954>.
- (114) Das, R.; Landis, R. F.; Tonga, G. Y.; Cao-Milán, R.; Luther, D. C.; Rotello, V. M. Control of Intra- versus Extracellular Bioorthogonal Catalysis Using Surface-Engineered Nanozymes. *ACS Nano* **2019**, *13* (1), 229–235. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05370>.

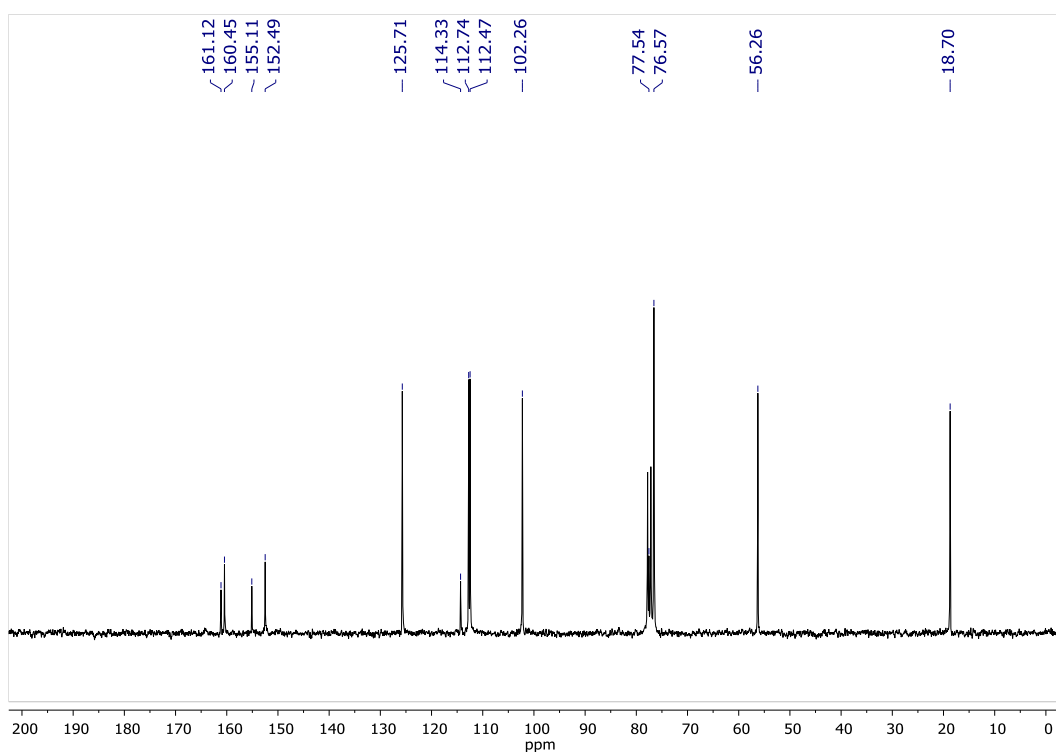
- (115) L. Oliveira, B.; Guo, Z.; L. Bernardes, G. J. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology. *Chemical Society Reviews* **2017**, *46* (16), 4895–4950. <https://doi.org/10.1039/C7CS00184C>.
- (116) Bai, Y.; Chen, J.; Zimmerman, S. C. Designed Transition Metal Catalysts for Intracellular Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (5), 1811–1821. <https://doi.org/10.1039/C7CS00447H>.
- (117) Li, J.; Yu, J.; Zhao, J.; Wang, J.; Zheng, S.; Lin, S.; Chen, L.; Yang, M.; Jia, S.; Zhang, X.; Chen, P. R. Palladium-Triggered Deprotection Chemistry for Protein Activation in Living Cells. *Nature Chem* **2014**, *6* (4), 352–361. <https://doi.org/10.1038/nchem.1887>.
- (118) Melkikh, A. V.; Sutormina, M. I. Model of Active Transport of Ions in Cardiac Cell. *Journal of Theoretical Biology* **2008**, *252* (2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.02.006>.
- (119) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676. <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
- (120) Katsman, L. A.; Vargaftik, M. N.; Belov, A. P.; Syrkin, Ya. K. State of  $\pi$ -Allylpalladium Chloride in Aqueous Solutions. *Russ Chem Bull* **1971**, *20* (5), 1005–1007. <https://doi.org/10.1007/BF00862214>.
- (121) Wang, D.; Lippard, S. J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4* (4), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>.
- (122) Konč, J.; Sabatino, V.; Jiménez-Moreno, E.; Latocheski, E.; Pérez, L. R.; Day, J.; Domingos, J. B.; Bernardes, G. J. L. Controlled In-Cell Generation of Active Palladium(0) Species for Bioorthogonal Decaging. *Angewandte Chemie Intl Edit* **2022**, *61* (8). <https://doi.org/10.1002/anie.202113519>.
- (123) Eyring, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. *The Journal of Chemical Physics* **1935**, *3* (2), 107–115. <https://doi.org/10.1063/1.1749604>.
- (124) Bronsted, J. N.; Teeter, C. E. On Kinetic Salt Effect. *J. Phys. Chem.* **1924**, *28* (6), 579–587. <https://doi.org/10.1021/j150240a003>.
- (125) L. Bray, T.; Salji, M.; Brombin, A.; M. Pérez-López, A.; Rubio-Ruiz, B.; A. Galbraith, L. C.; Elizabeth Patton, E.; Y. Leung, H.; Unciti-Broceta, A. Bright Insights into Palladium-Triggered Local Chemotherapy. *Chemical Science* **2018**, *9* (37), 7354–7361. <https://doi.org/10.1039/C8SC02291G>.

- (126) Chen, Z.; Li, H.; Bian, Y.; Wang, Z.; Chen, G.; Zhang, X.; Miao, Y.; Wen, D.; Wang, J.; Wan, G.; Zeng, Y.; Abdou, P.; Fang, J.; Li, S.; Sun, C.-J.; Gu, Z. Bioorthogonal Catalytic Patch. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16* (8), 933–941. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00910-7>.
- (127) Latocheski, E.; Marques, M. V.; Albuquerque, B. L.; Schuh, T. J.; Signori, A. M.; Oliveira, D. C.; Pal, T.; Domingos, J. B. On the Formation of Palladium (II) Iodide Nanoparticles: An In Situ SAXS/XAS Study and Catalytic Evaluation on an Aryl Alkenylation Reaction in Water Medium. *ChemCatChem* **2018**, cctc.201801817. <https://doi.org/10.1002/cctc.201801817>.
- (128) Eloah Latocheski. Influence of the Oxidation State of Palladium Nanoparticles on Carbon Coupling and Bioorthogonal Uncaging Reactions. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.
- (129) Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>.
- (130) Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (26), 7492–7509. <https://doi.org/10.1002/anie.201500088>.

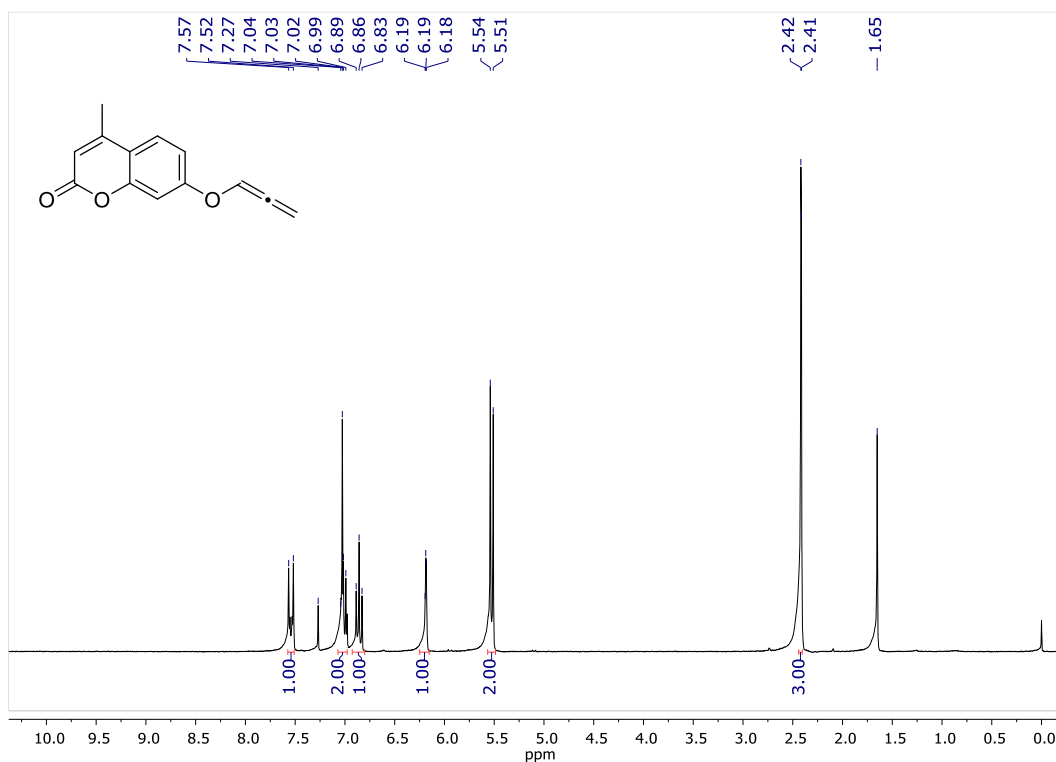
**ANEXO A – ESPECTROS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$**



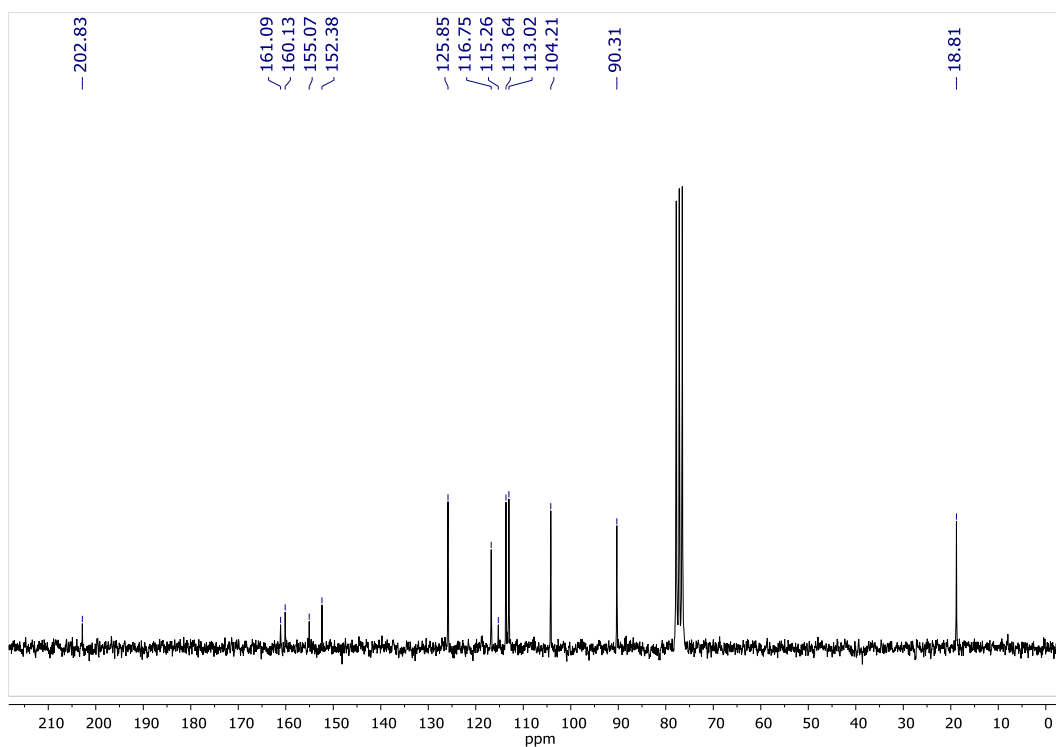
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **Prop-4-MU** em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz



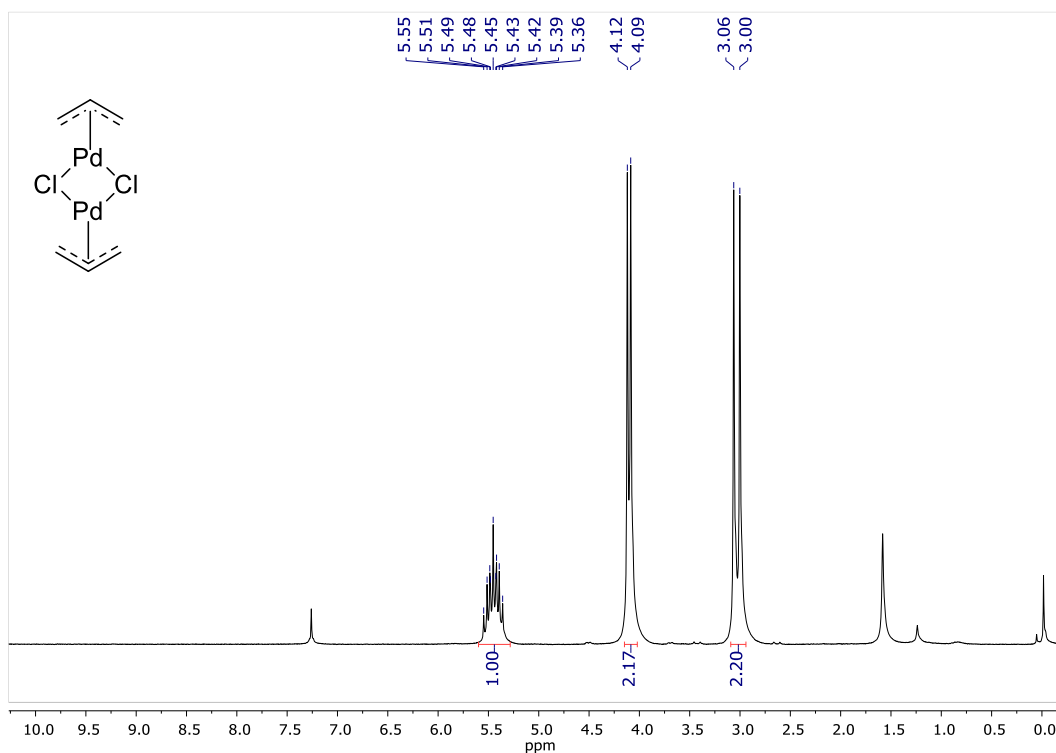
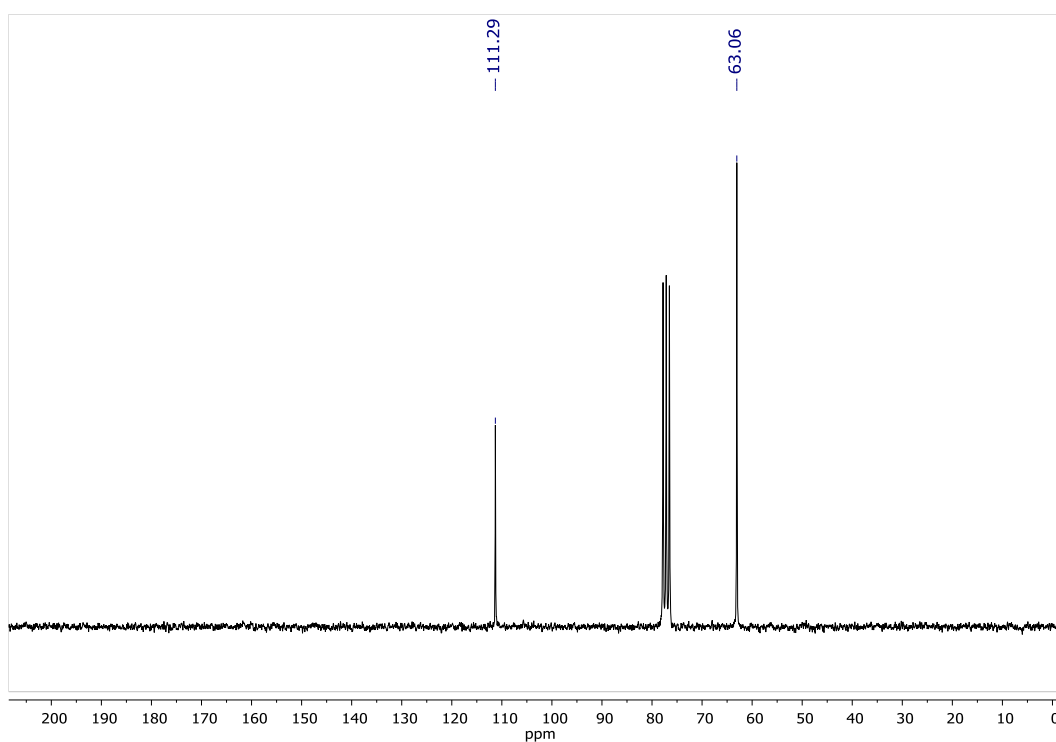
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **Prop-4-MU** em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz

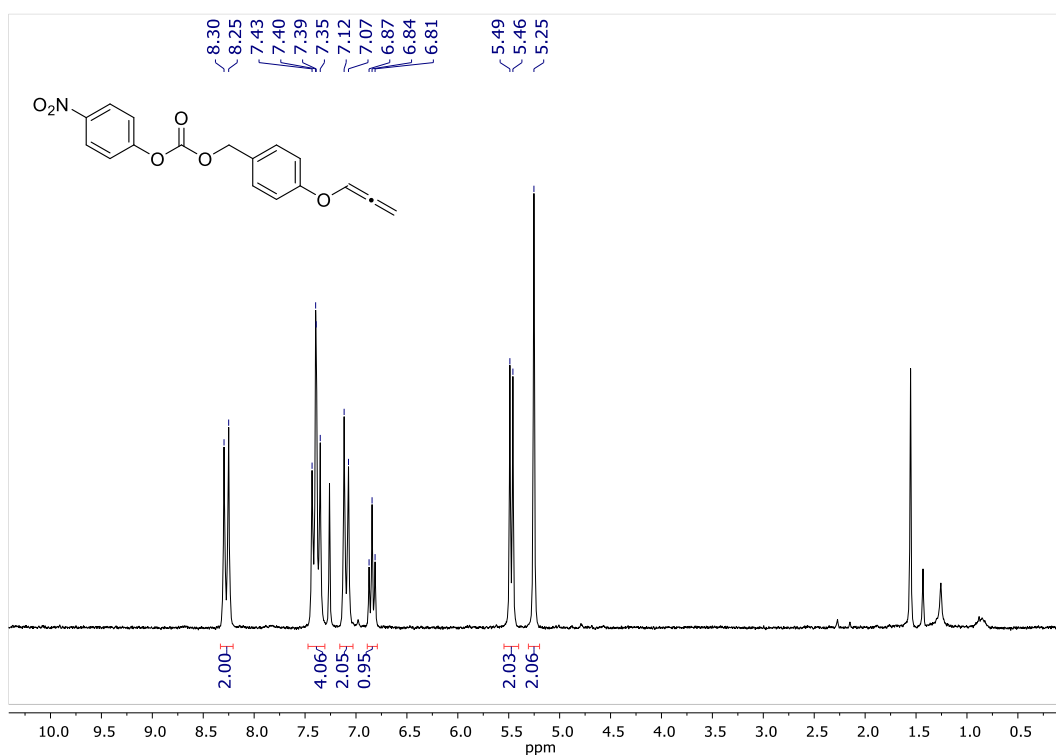


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **Alle-4-MU** em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz

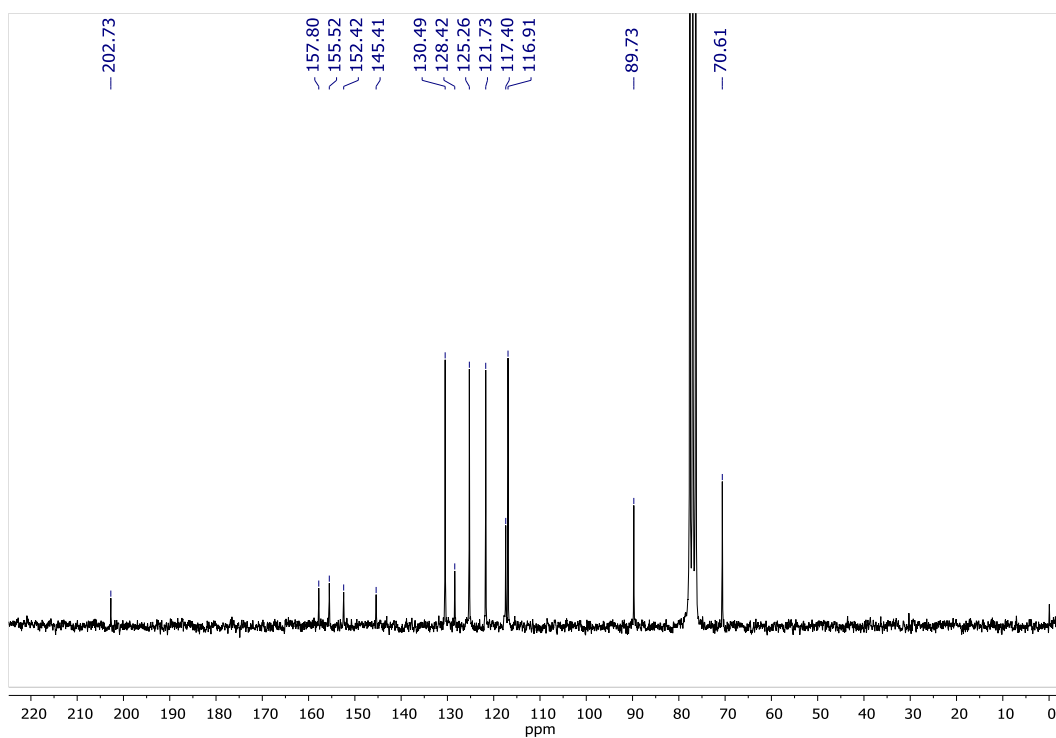


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **Alle-4-MU** em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHzEspectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz

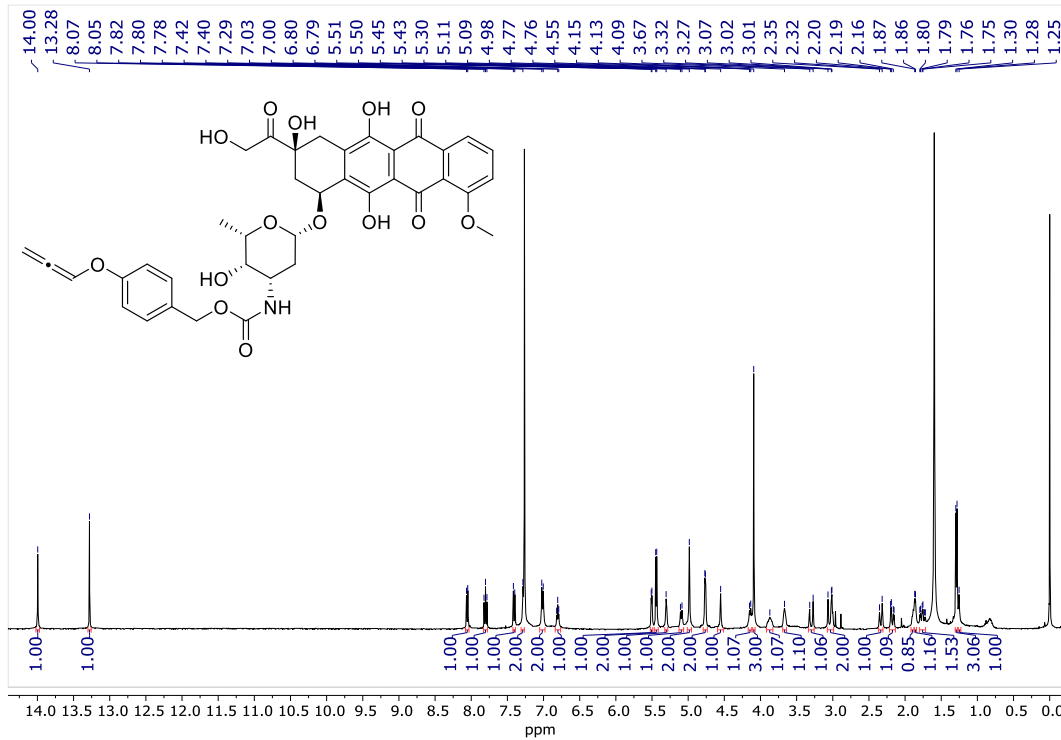


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto Alle-C em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz

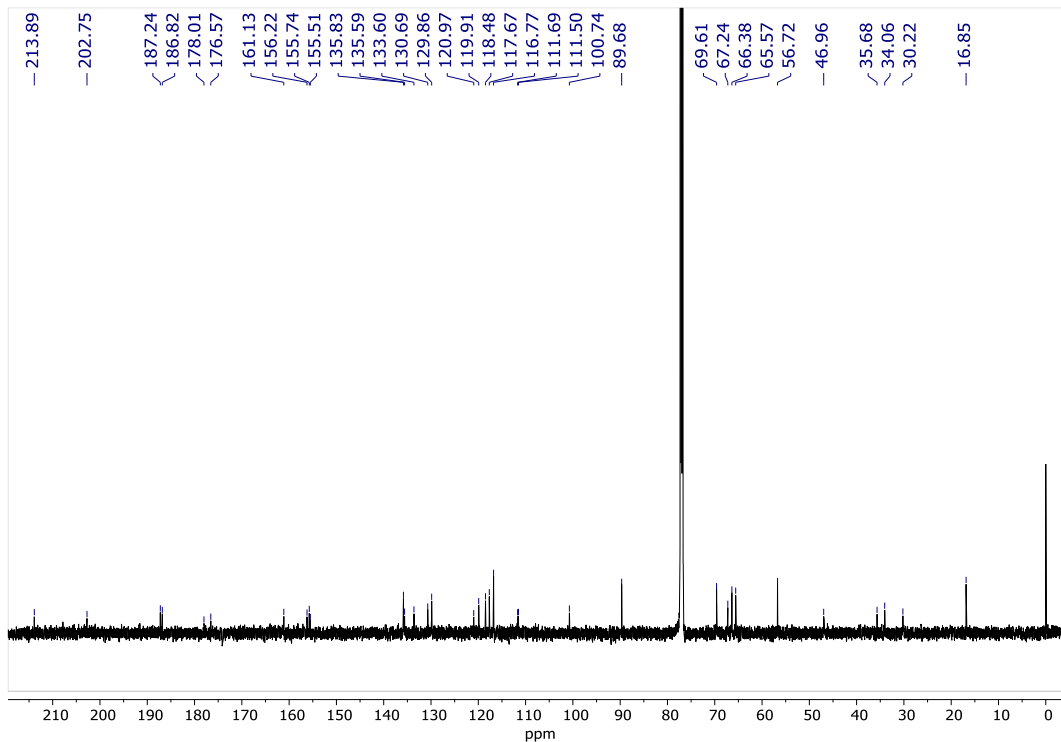


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto Alle-C em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz

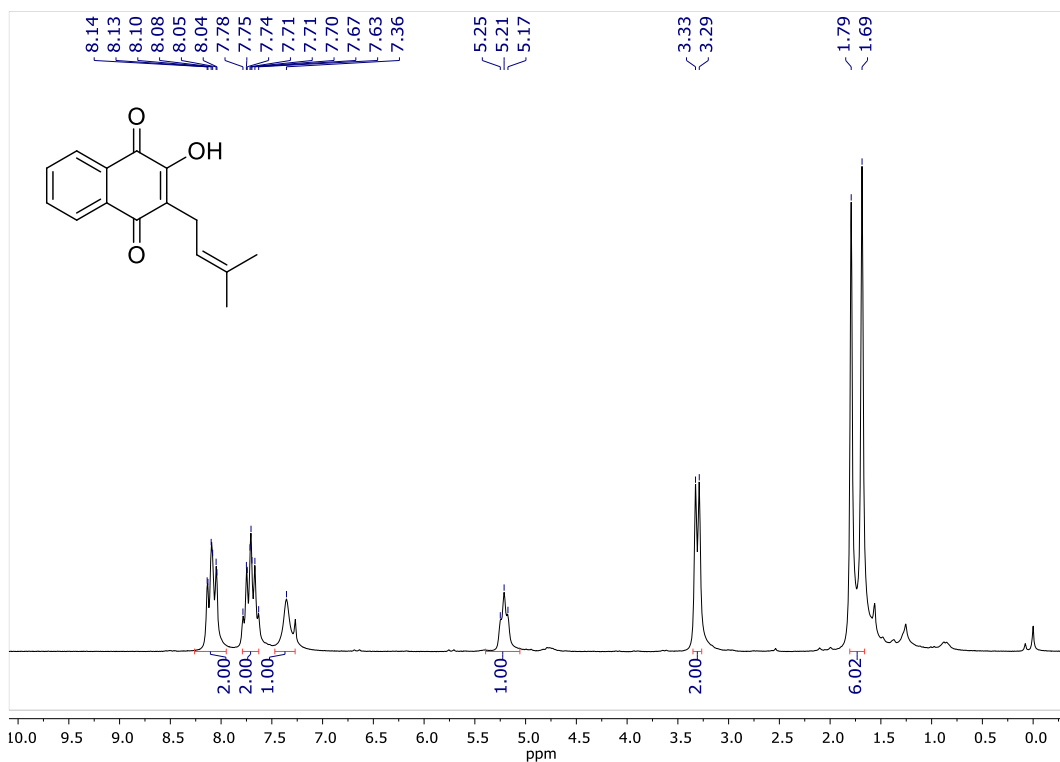




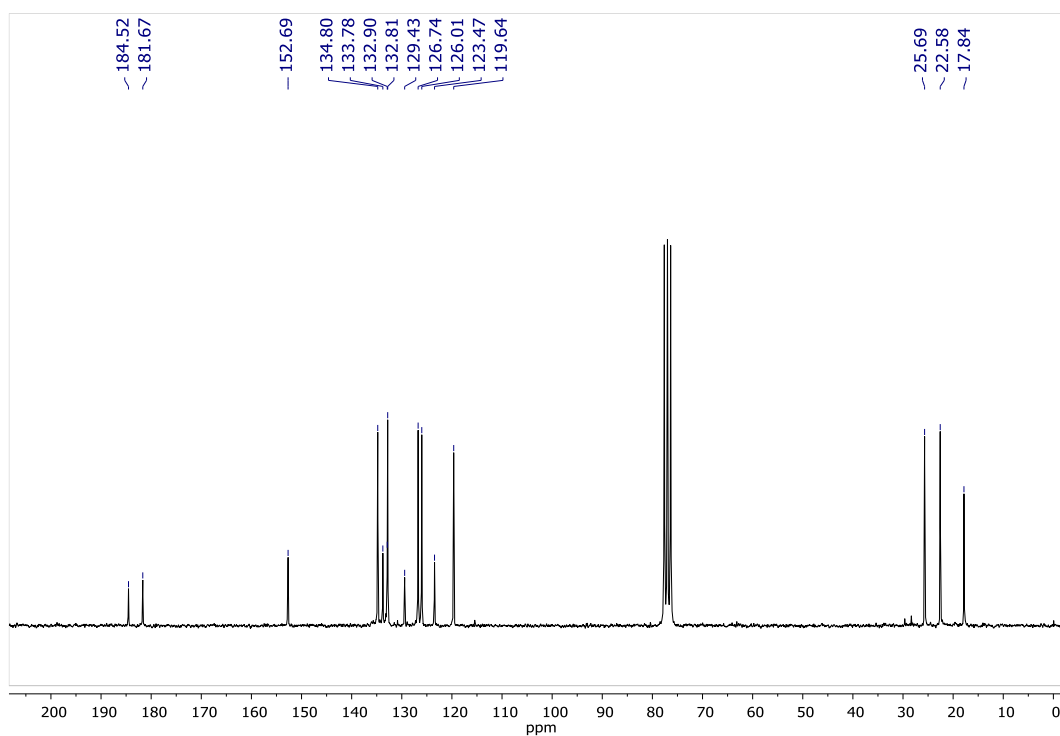
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto Alle-DOX em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz



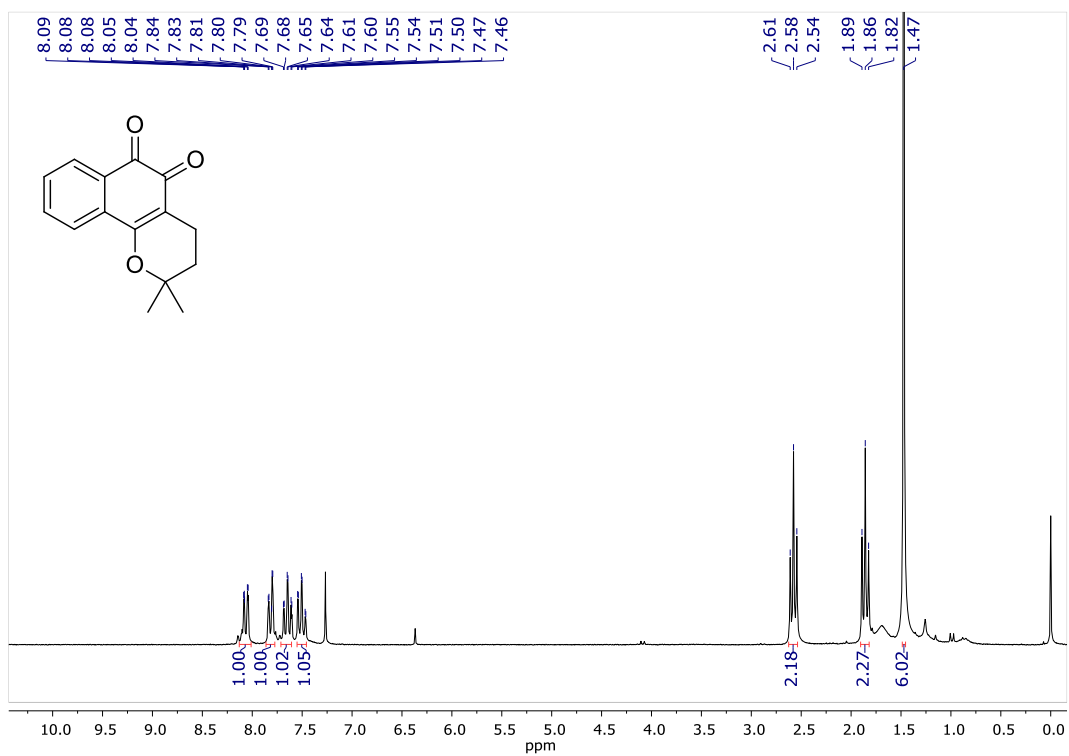
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto Alle-DOX em  $\text{CDCl}_3$  a 150 MHz



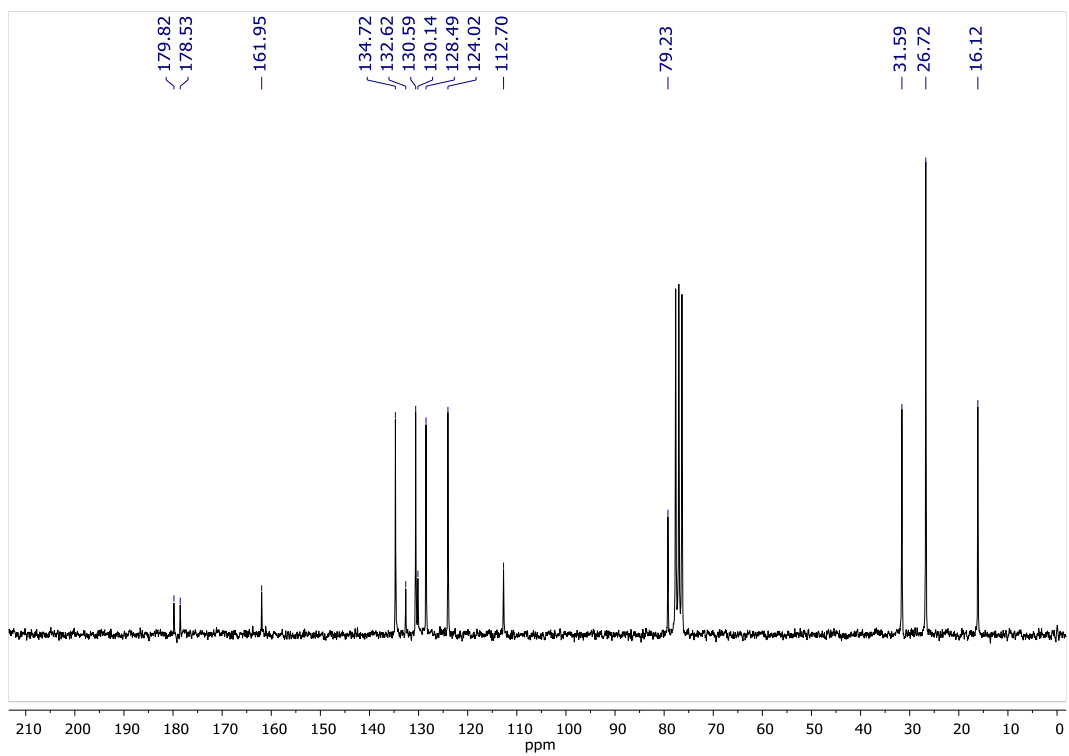
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **Lapachol** em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz



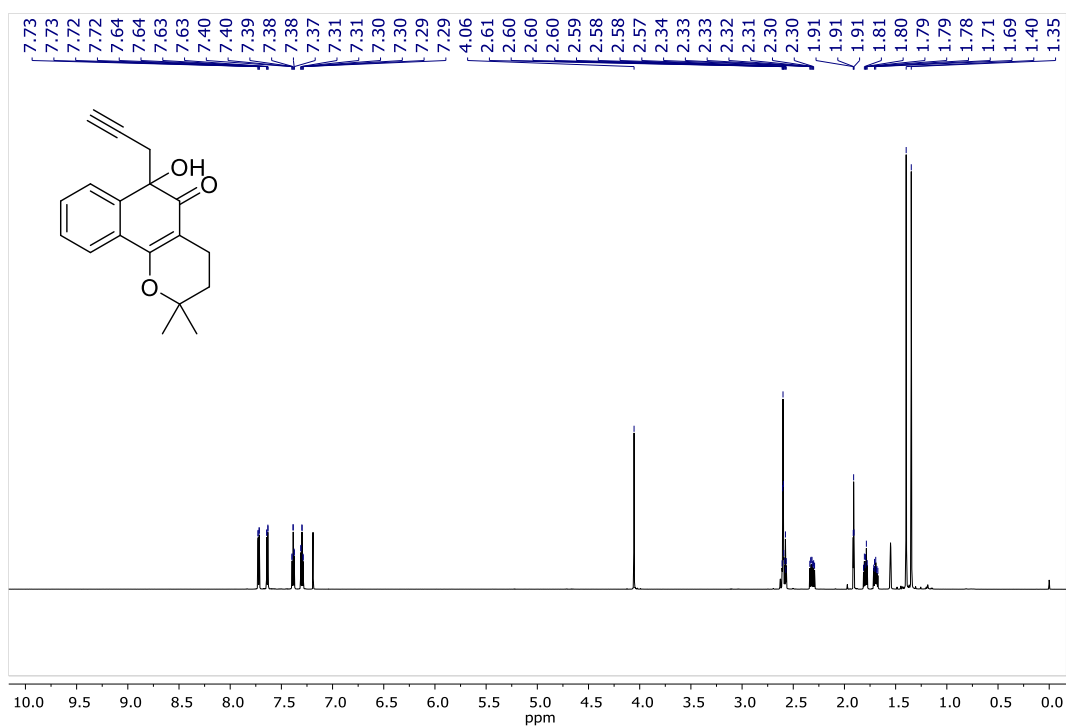
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **Lapachol** em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz



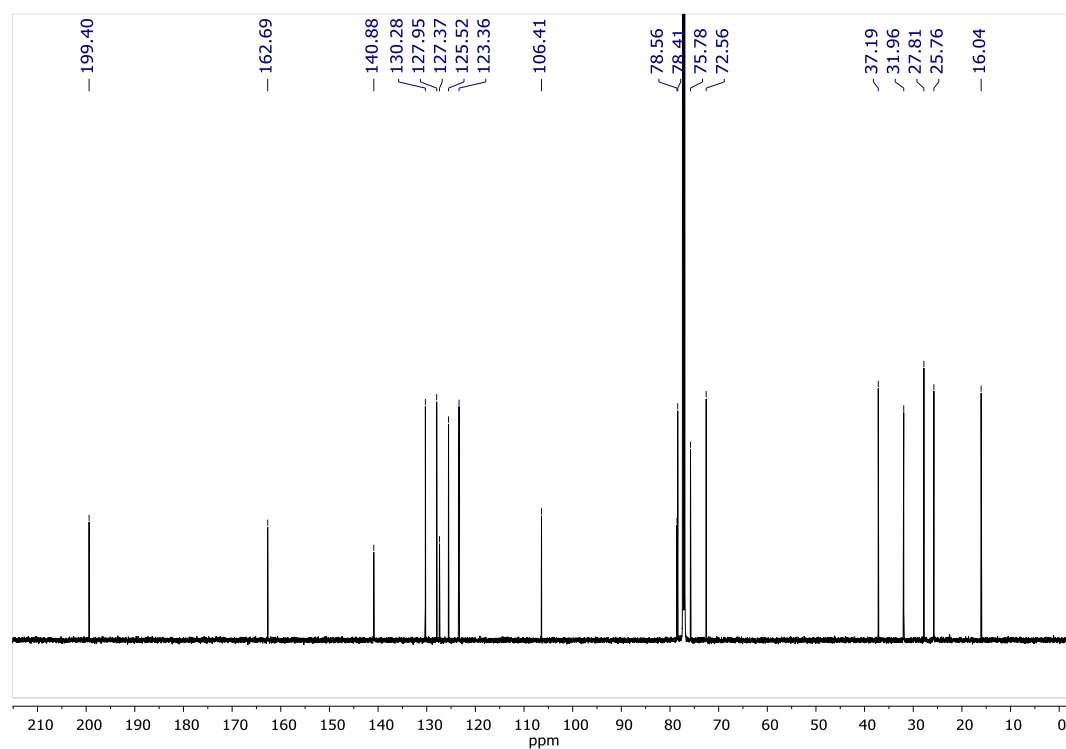
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto  $\beta$ -Lapachona em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz



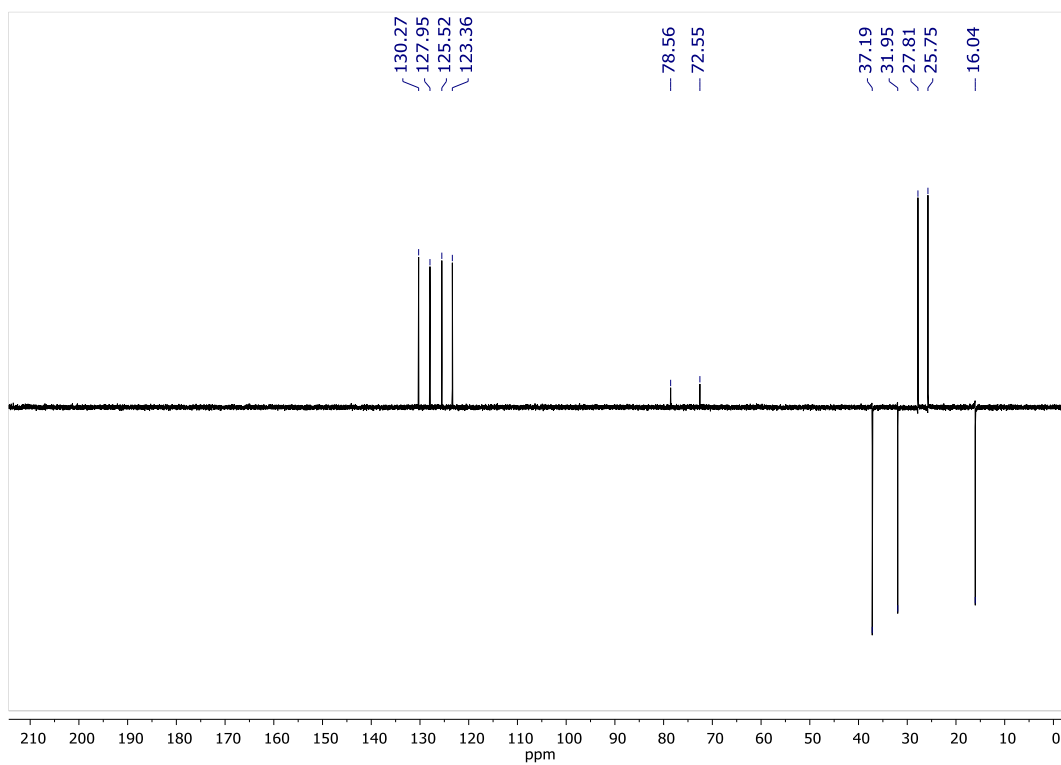
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto  $\beta$ -Lapachona em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz



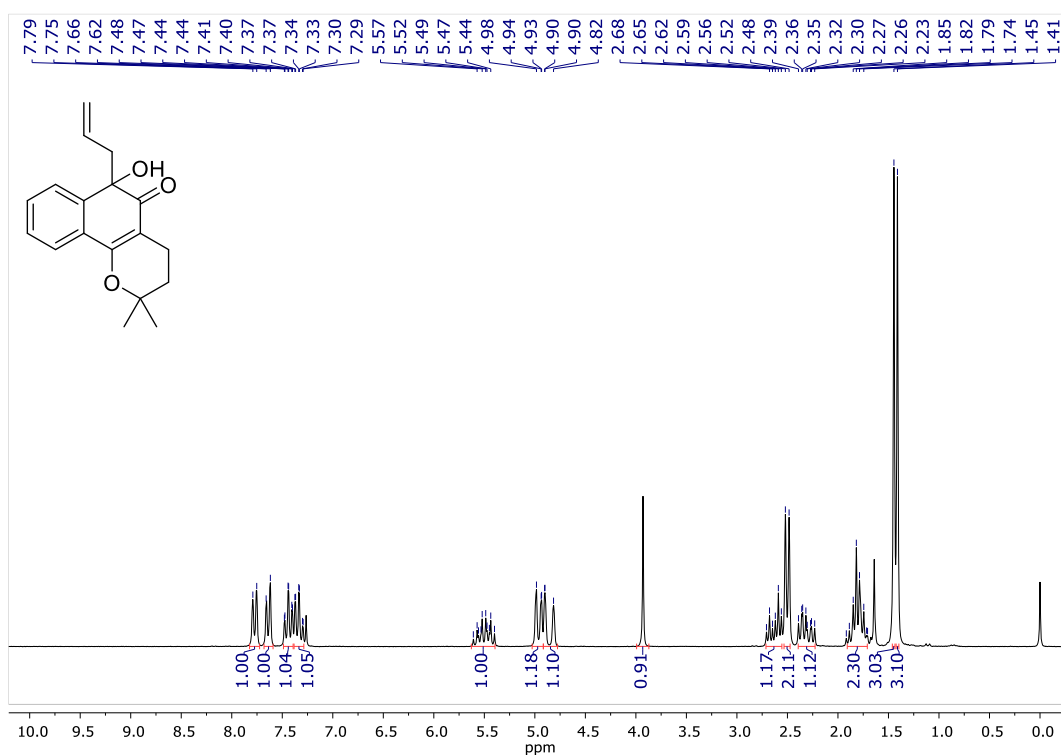
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **Prop-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 700 MHz



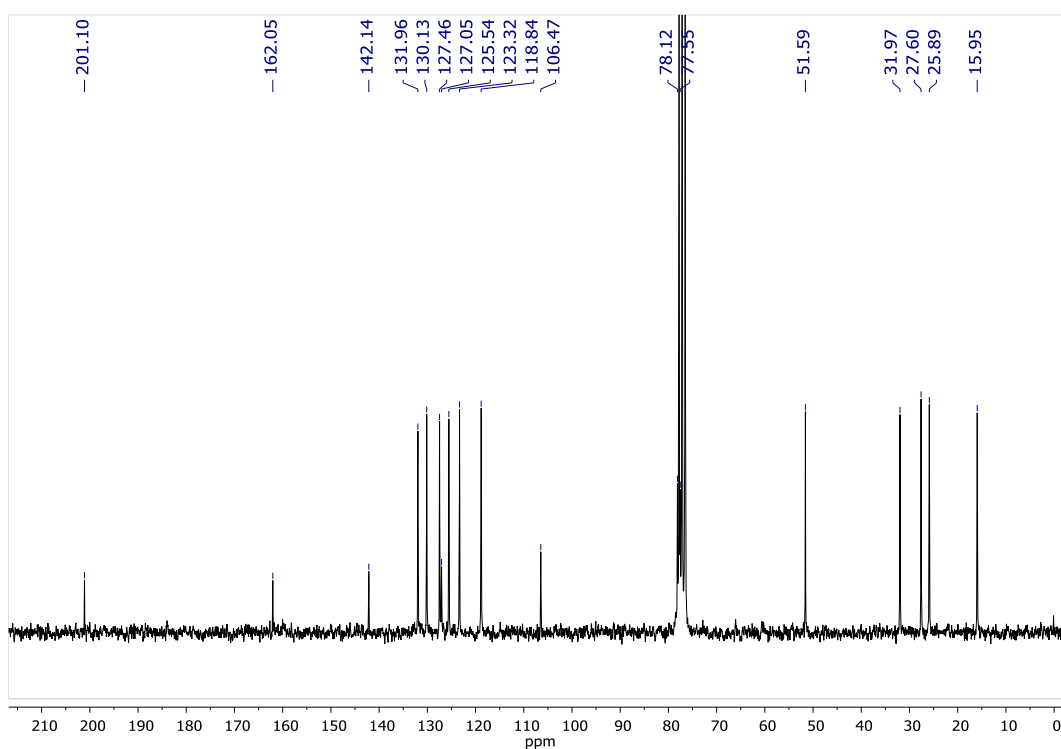
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **Prop-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 175 MHz



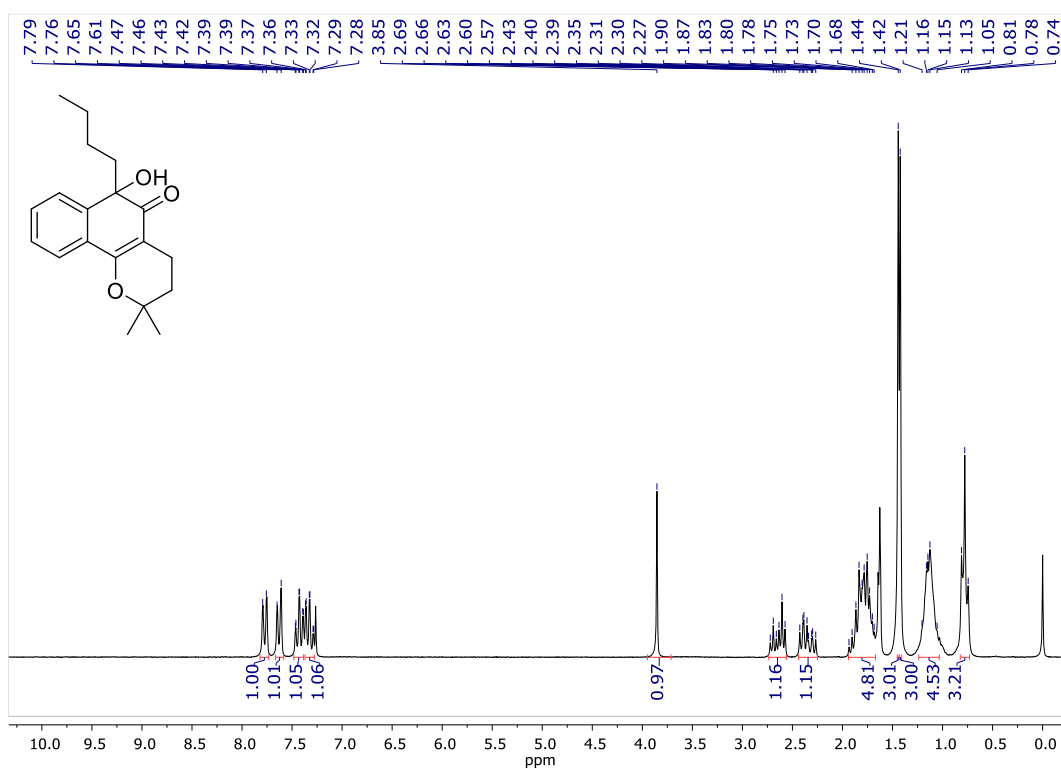
Espectro de RMN DEPT-135 do composto **Prop-Lap** em CDCl<sub>3</sub> a 175 MHz



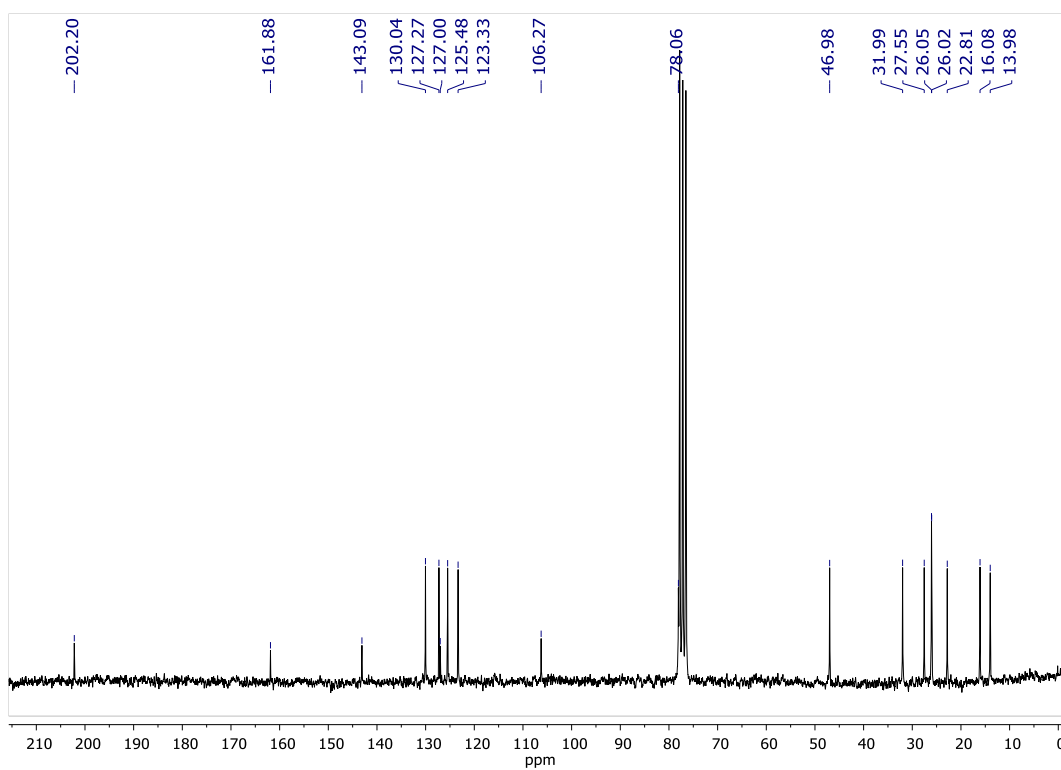
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **Alil-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz



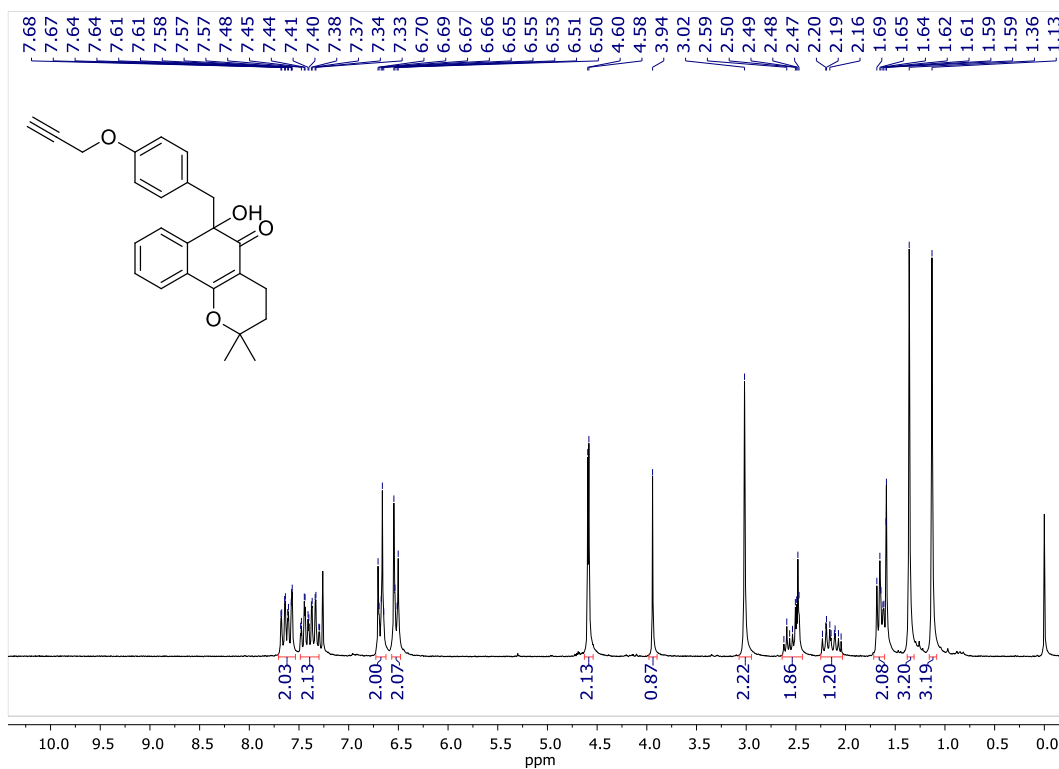
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **Alil-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz



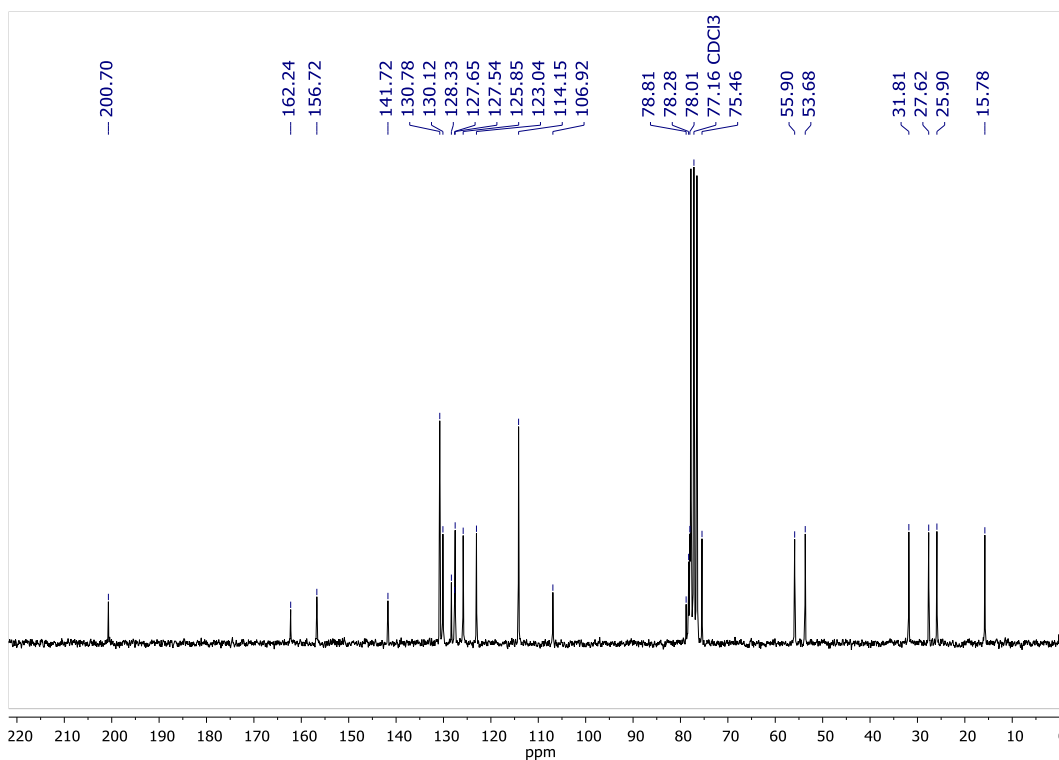
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **Butil-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **Butil-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz



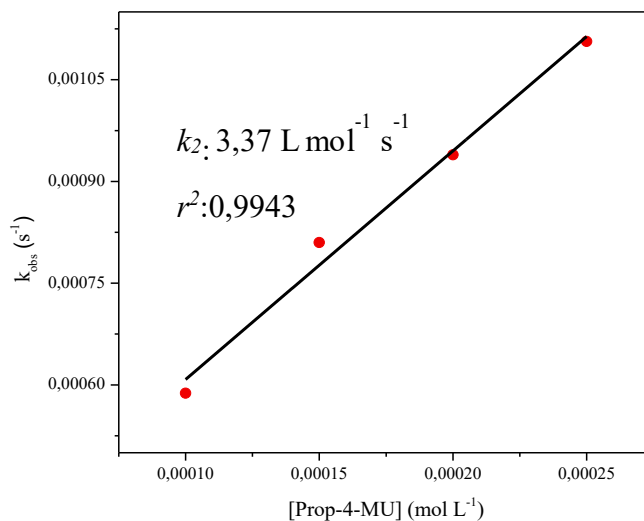
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **POA-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz



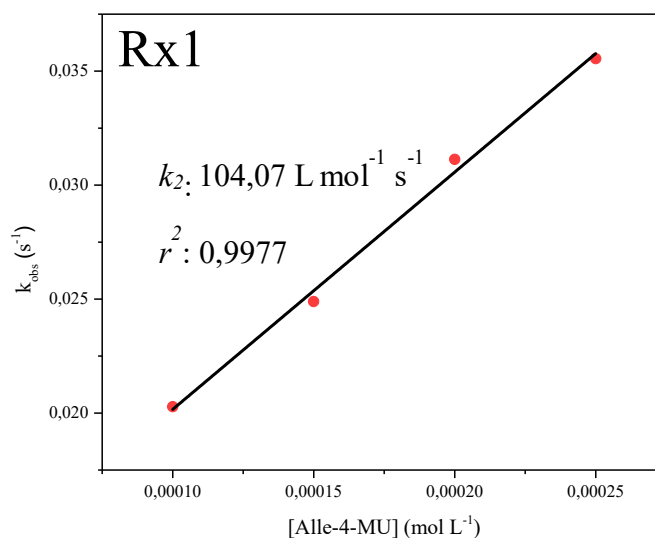
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do composto **POA-Lap** em  $\text{CDCl}_3$  a 50 MHz



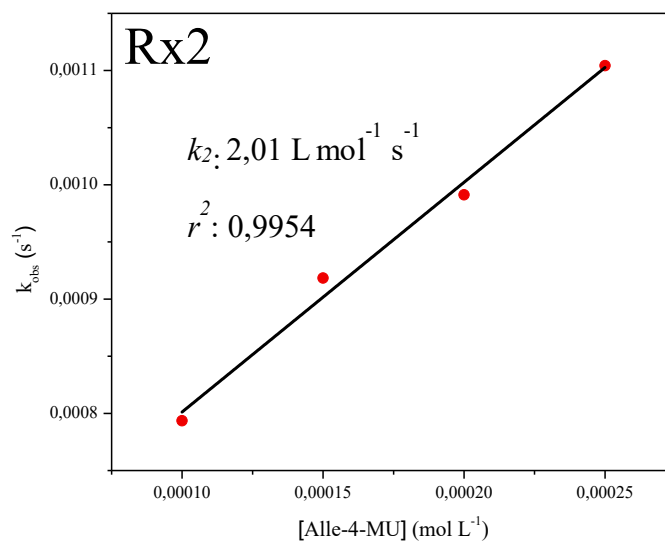
**ANEXO B – CONSTANTES DE SEGUNDA ORDEM PARA AS REAÇÕES DE  
CLIVAGEM C-O**



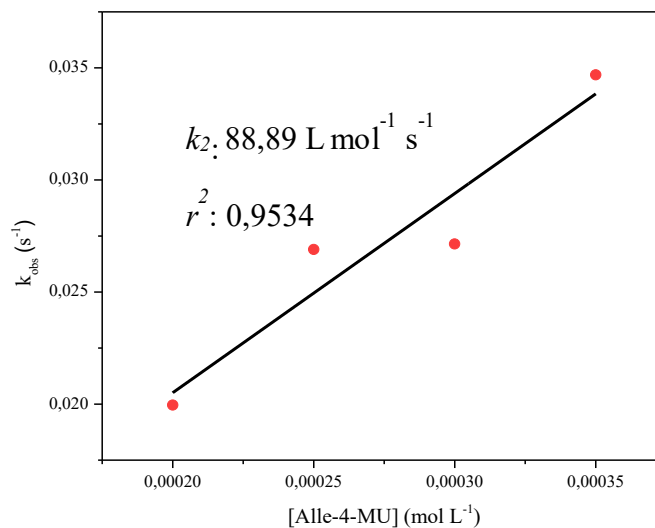
Constante de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a reação de despropargilação da Prop-4-MU mediada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições reacionais: [Prop-4-MU] = 100-250 μmol L<sup>-1</sup>, [Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>] = 10 μmol L<sup>-1</sup>, PBS, pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.



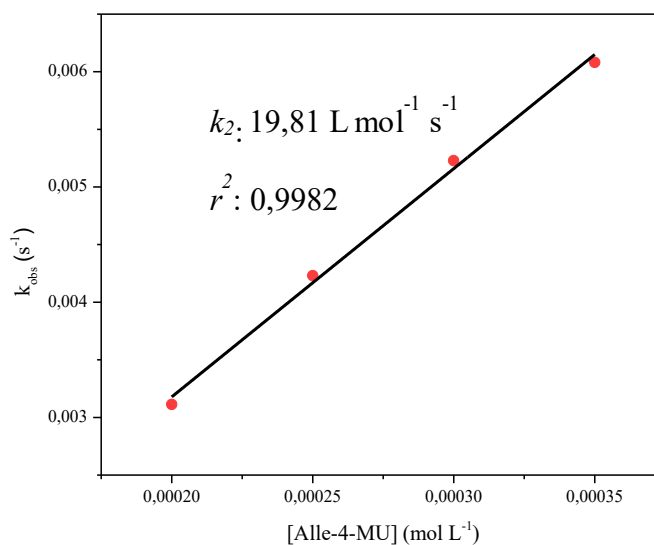
Constante de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a primeira fase (Rx1) da reação de desalilação da Alle-4-MU mediada por Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Condições reacionais: [Alle-4-MU] = 100-250 μmol L<sup>-1</sup>, [Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>] = 10 μmol L<sup>-1</sup>, PBS, pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.



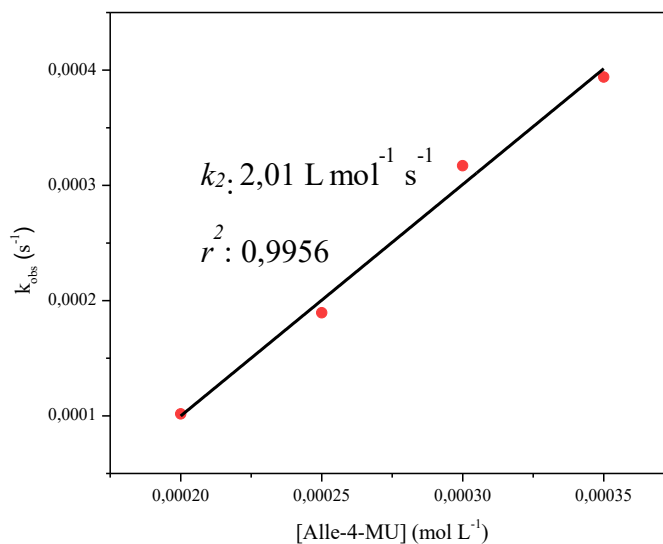
Constante de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a segunda fase (Rx2) da reação de desalilação da Alle-4-MU mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$ . Condições reacionais:  $[\text{Alle-4-MU}] = 100\text{-}250 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , PBS, pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.



Constante de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a reação de desalilação da Alle-4-MU mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em tampão fosfato. Condições reacionais:  $[\text{Alle-4-MU}] = 200\text{-}350 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{PdAllyC}] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão fosfato (0,01 mmol L<sup>-1</sup>,  $I = 140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )), pH: 7,4, 5% DMSO a 37 °C.

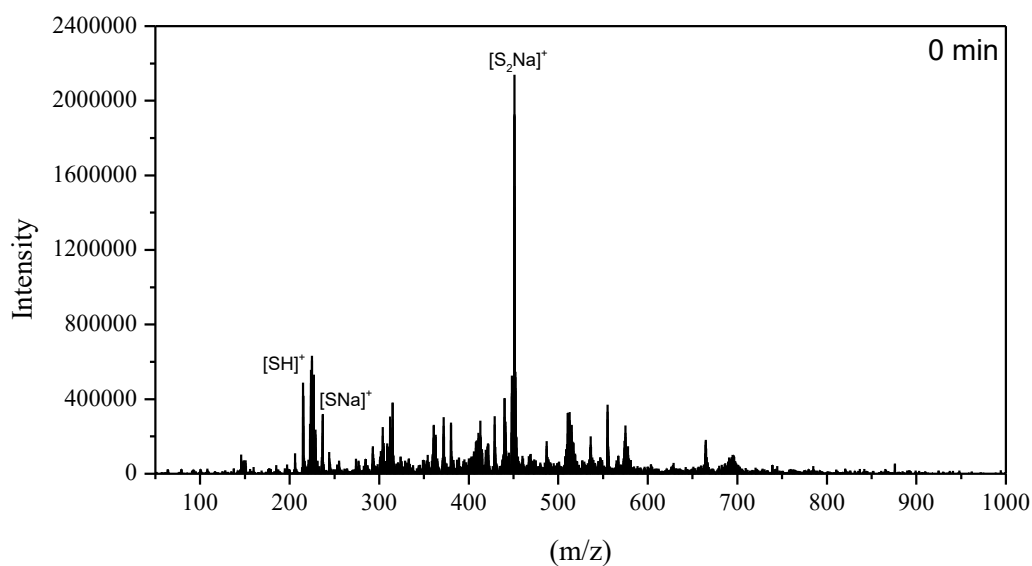


Constante de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a reação de desalilação da Alle-4-MU mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em tampão fosfato com  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl. Condições reacionais:  $[\text{Alle-4-MU}] = 200\text{-}350 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{PdAllyC}] = 25 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $I = 140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

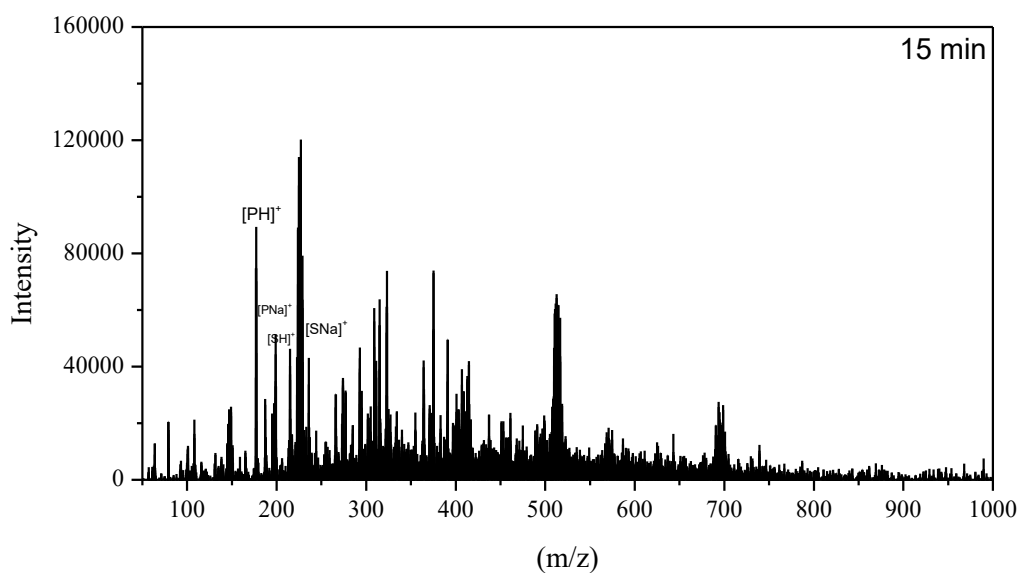


Constante de segunda ordem em condições de pseudo-primeira ordem para a reação de desalilação da Alle-4-MU mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em tampão fosfato com  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl. Condições reacionais:  $[\text{Alle-4-MU}] = 200\text{-}350 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{PdAllyC}] = 25 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão fosfato ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $I = 140 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{NaClO}_4$ )), pH: 7,4, 5% DMSO a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

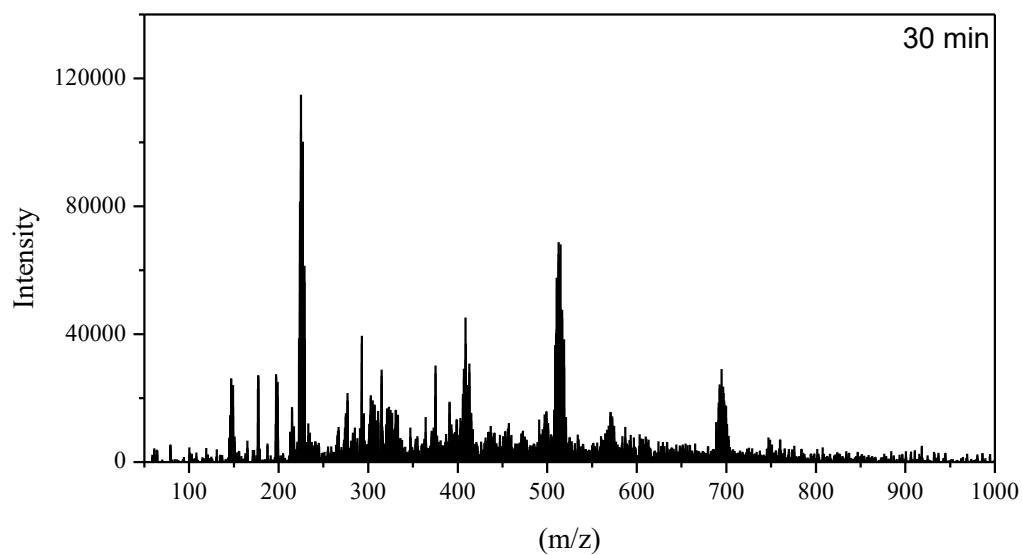
**ANEXO C – ESPECTROS DE MASSAS (ESI-MS) DA REAÇÃO DE *O*-  
DESALENILAÇÃO MEDIADA PELO COMPLEXO Pd<sub>2</sub>Allyl<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**



ESI-MS(+) do meio reacional após o início da desalenilação da Alle-4-MU mediada por  $Pd_2Allyl_2Cl_2$  em água. S: Alle-4-MU. Condições de reacionais:  $[Alle-4-MU] = 100 \mu mol L^{-1}$ ,  $[PdAllyC] = 25 \mu mol L^{-1}$  a  $37^\circ C$ . (150  $\mu L$  da reação diluída em 150  $\mu L$  de  $H_2O(MS)$ ).



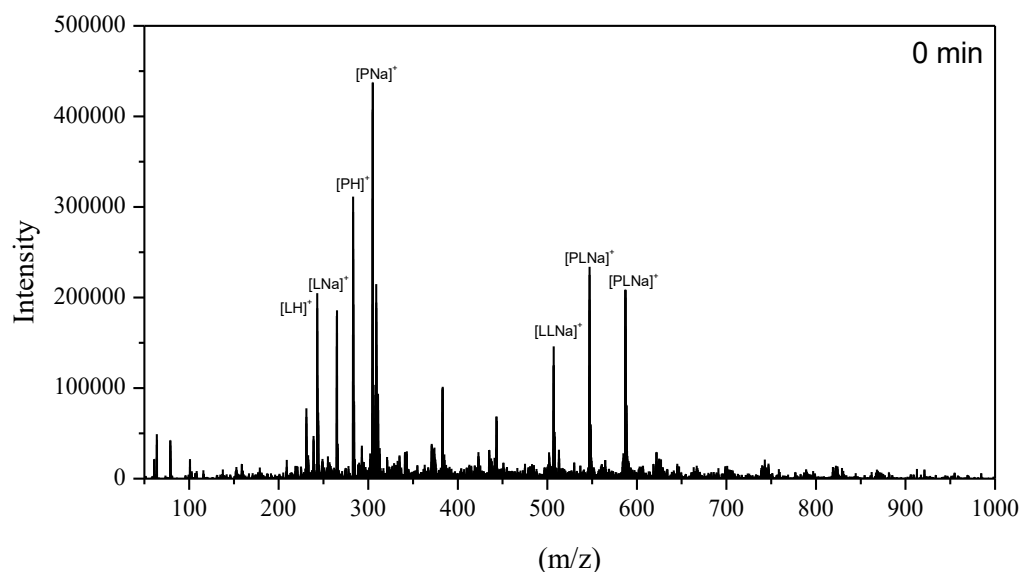
ESI-MS(+) do meio reacional após 15 minutos da desalenilação da Alle-4-MU mediada por  $Pd_2Allyl_2Cl_2$  em água. S: Alle-4-MU P: 4-MU. Condições de reacionais:  $[Alle-4-MU] = 100 \mu mol L^{-1}$ ,  $[PdAllyC] = 25 \mu mol L^{-1}$  a  $37^\circ C$ . (150  $\mu L$  da reação diluída em 150  $\mu L$  de  $H_2O(MS)$ ).



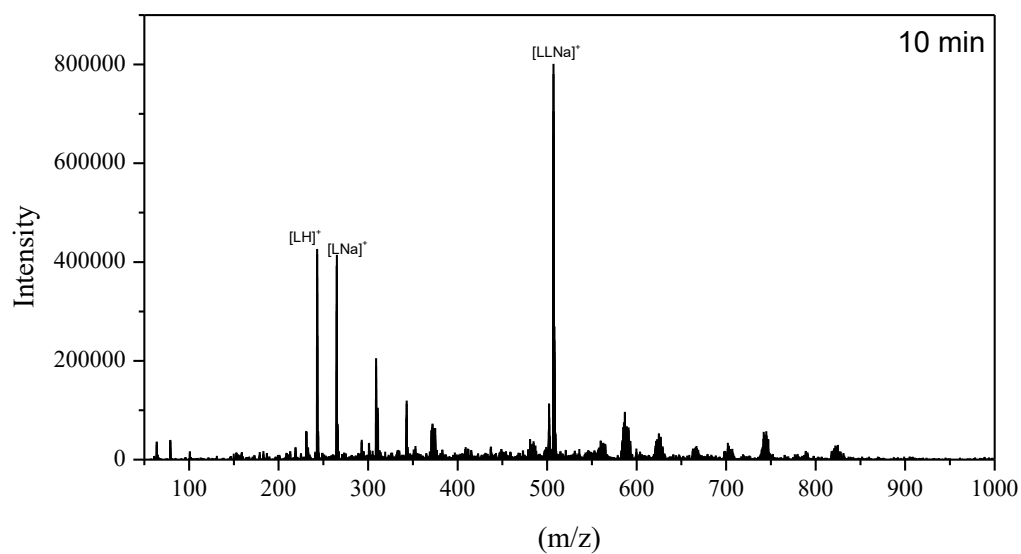
ESI-MS(+) do meio reacional após 30 minutos da desalenilação da Alle-4-MU mediada por  $\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$  em água. S: Alle-4-MU P: 4-MU. Condições de reacionais:  $[\text{Alle-4-MU}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{PdAllyC}] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}(\text{MS})$ ).

**ANEXO D – ESPECTROS DE MASSAS (ESI-MS) DAS REAÇÕES DE CLIVAGEM  
C-C**

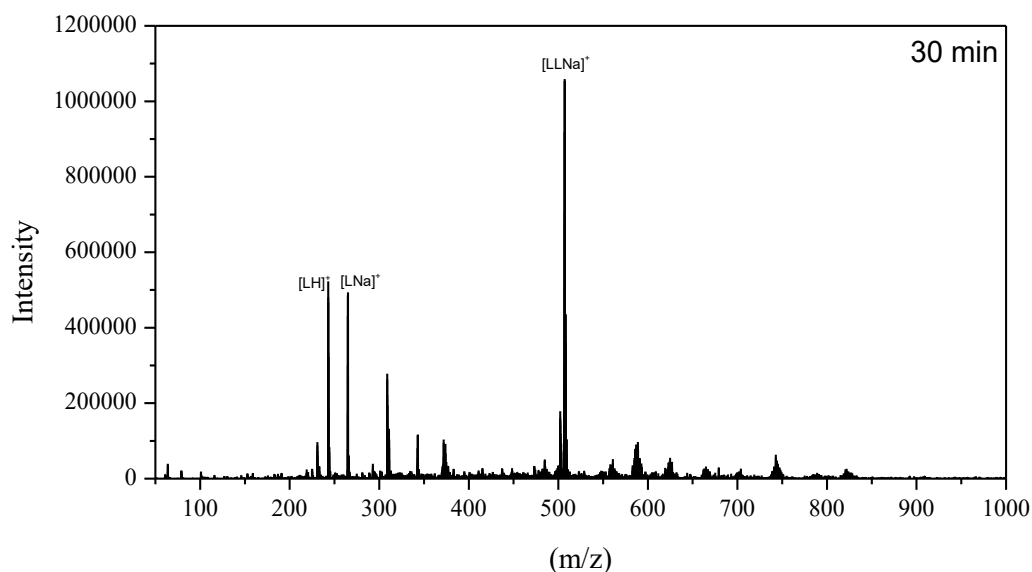




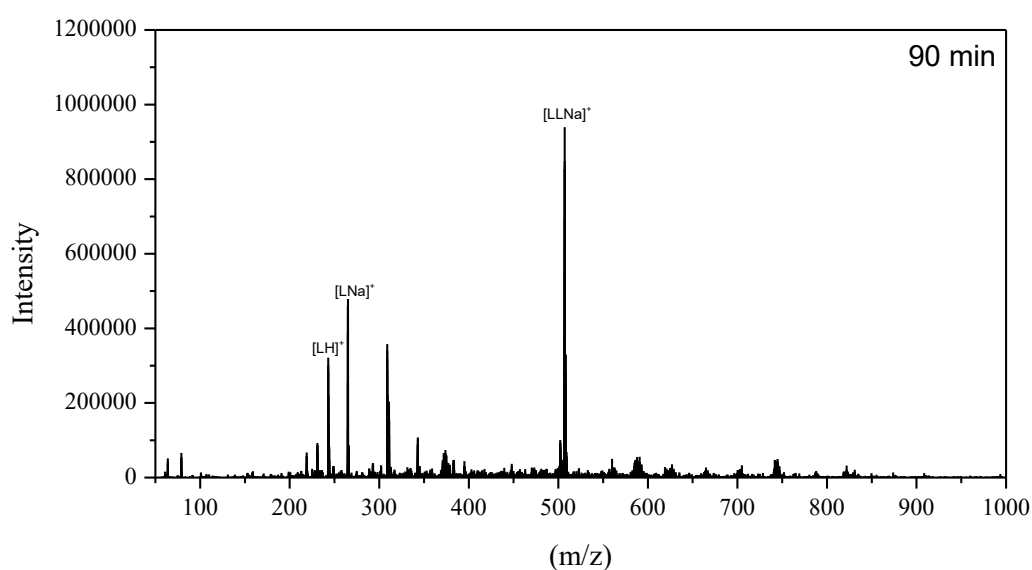
ESI-MS(+) do meio reacional após o início da despropargilação do Prop-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Prop-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Prop-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ (MS)).



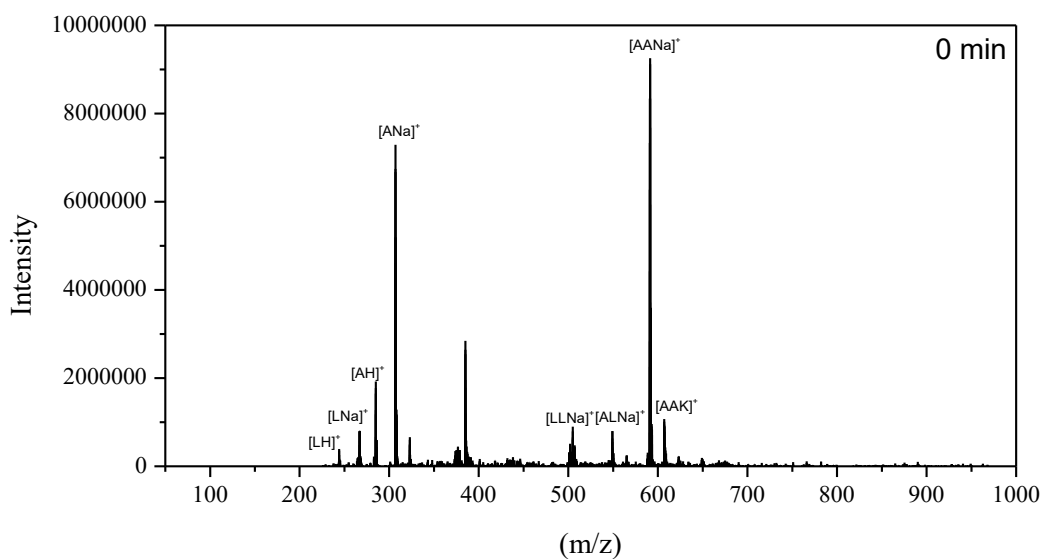
ESI-MS(+) do meio reacional após o 10 minutos da despropargilação do Prop-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Prop-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Prop-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ (MS)).



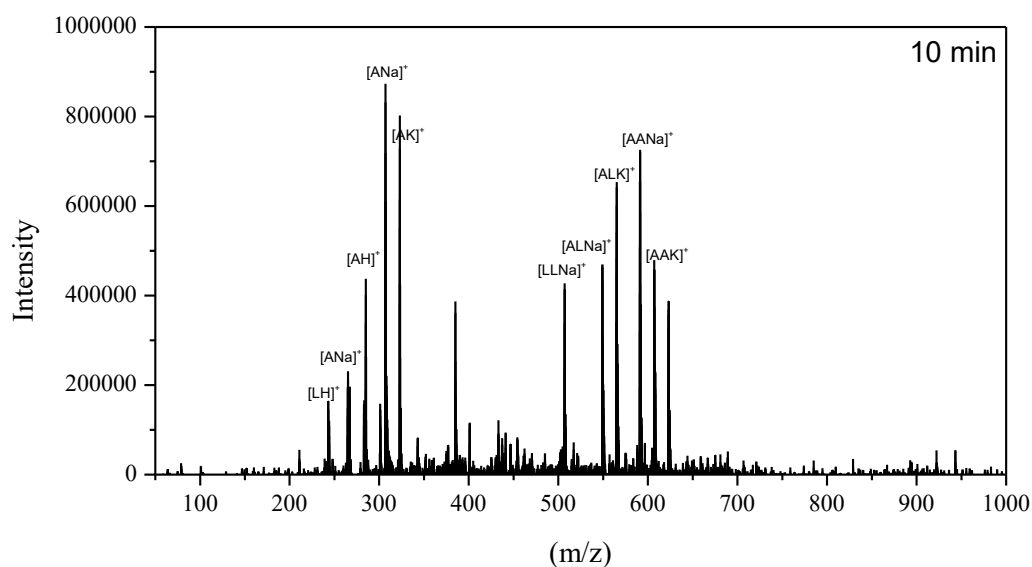
ESI-MS(+) do meio reacional após 30 minutos da despropargilação do Prop-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Prop-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Prop-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ (MS)).



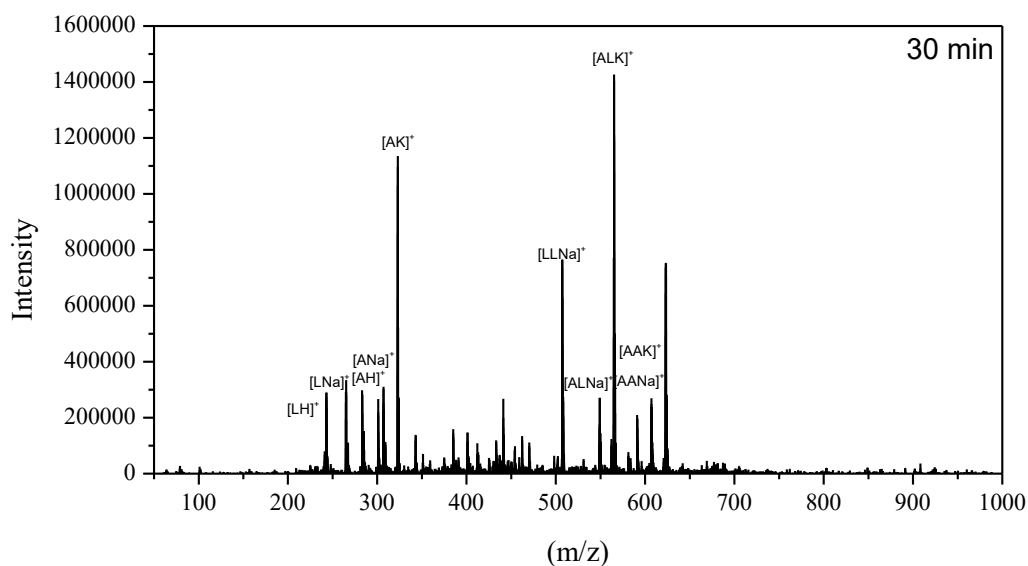
ESI-MS(+) do meio reacional após 90 minutos da despropargilação do Prop-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Prop-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Prop-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ (MS)).



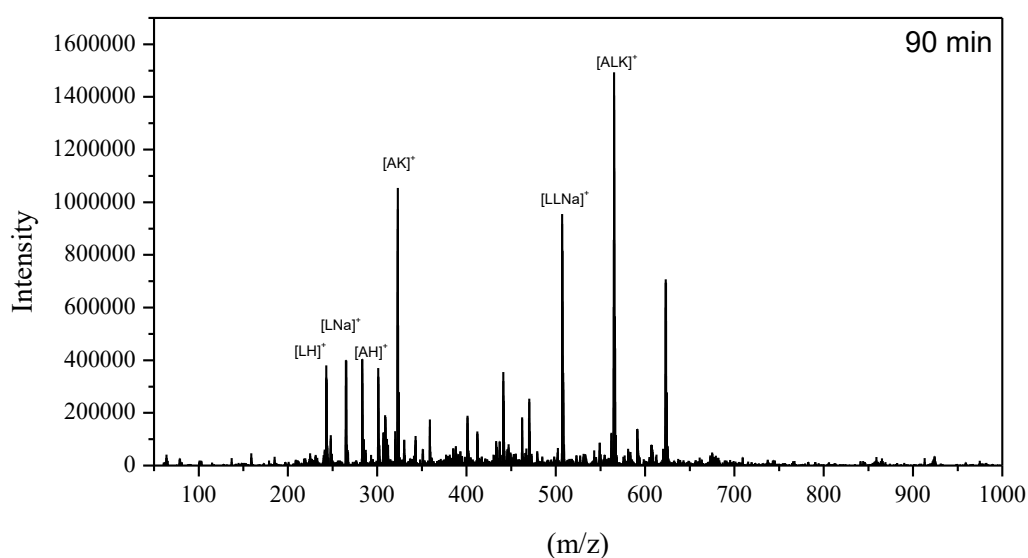
ESI-MS(+) do meio reacional após o início da desalilação do Alil-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. A: Alil-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Alil-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}(\text{MS})$ ).



ESI-MS(+) do meio reacional após 10 minutos da desalilação do Alil-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Alil-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Alil-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}(\text{MS})$ ).



ESI-MS(+) do meio reacional após 30 minutos da desalilação do Alil-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Alil-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Alil-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}(\text{MS})$ ).



ESI-MS(+) do meio reacional após 90 minutos da desalilação do Alil-Lap mediada por  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  em água. P: Alil-Lap. L:  $\beta$ -Lapachona. Condições de reacionais:  $[\text{Alil-Lap}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Na}_2\text{PdCl}_4] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . (150  $\mu\text{L}$  da reação diluída em 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}(\text{MS})$ ).

**ANEXO E – DADOS NUMÉRICOS DOS CÁLCULOS TEÓRICOS DA CLIVAGEM  
C-C**

Energies, entropies, and lowest frequencies of the lowest energy structures calculated with PCM(H<sub>2</sub>O)/ $\omega$ B97x-D/6-311+G(2d,p)+LanL2DZ(Pd)/PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd).<sup>a</sup>

| Structure                                   | E <sub>elec</sub><br>(Hartree) <sup>b</sup> | E <sub>elec</sub> +ZPE<br>(Hartree) <sup>c</sup> | H<br>(Hartree) <sup>d</sup> | S (cal<br>mol <sup>-1</sup><br>K <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup> | G<br>(Hartree) <sup>f</sup> | Lowest<br>freq.<br>(cm <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup> | # imag.<br>freq. |
|---|---|--|-----------------------------|---|-----------------------------|---|------------------|
| H <sub>2</sub> O                            | -76.4409847                                 | -76.4194817                                      | -76.4157017                 | 45.1  | -76.4371277                 | 1601.9  | 0                |
| H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> | -643.764476                                 | -643.727171                                      | -643.720612                 | 74.6  | -643.756034                 | 153.7   | 0                |
| HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>              | -643.276662                                 | -643.251186                                      | -643.245144                 | 72.9  | -643.279776                 | 126.4   | 0                |
| A   | -2431.21058                                 | -2430.8857                                       | -2430.85854                 | 176.9   | -2430.93789                 | 22.9  | 0                |
| TS1   | -2507.63498                                 | -2507.28409                                      | -2507.25533                 | 182.8   | -2507.33763                 | -428.5  | 1                |
| B   | -2507.6687                                  | -2507.31276                                      | -2507.28464                 | 178.0   | -2507.36625                 | 37.5  | 0                |
| C   | -2507.23239                                 | -2506.89   | -2506.86183                 | 180.8   | -2506.94341                 | 27.3  | 0                |
| D   | -2506.72803                                 | -2506.39927                                      | -2506.37147                 | 177.8   | -2506.45281                 | 32.0  | 0                |
| TS2   | -2506.71429                                 | -2506.38772                                      | -2506.35996                 | 178.0   | -2506.44129                 | -450.8  | 1                |
| E   | -806.432731                                 | -806.163154                                      | -806.147233                 | 119.2   | -806.203186                 | 62.2  | 0                |
| F   | -1700.30349                                 | -1700.24903                                      | -1700.23657                 | 111.1   | -1700.28816                 | 52.5  | 0                |

<sup>a</sup> 1 Hartree = 627.51 kcal mol<sup>-1</sup>. Thermal corrections at 298.15 K.

<sup>b</sup> Calculated with PCM(H<sub>2</sub>O)/ $\omega$ B97x-D/6-311+G(2d,p)+LanL2DZ(Pd).

<sup>c</sup> Calculated as E<sub>elec</sub>[PCM(H<sub>2</sub>O)/ $\omega$ B97x-D/6-311+G(2d,p)+LanL2DZ(Pd)] + ZPE[PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd)], where ZPE is the zero-point energy obtained at the geometry optimization level.

<sup>d</sup> Calculated as E<sub>elec</sub>[PCM(H<sub>2</sub>O)/ $\omega$ B97x-D/6-311+G(2d,p)+LanL2DZ(Pd)] + H<sub>corr</sub>[PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd)], where H<sub>corr</sub> is the thermal correction to enthalpy obtained at the geometry optimization level.

<sup>b</sup> Calculated at the geometry optimization level PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd).

<sup>f</sup> Calculated as E<sub>elec</sub>[PCM(H<sub>2</sub>O)/ $\omega$ B97x-D/6-311+G(2d,p)+LanL2DZ(Pd)] + G<sub>corr-QH</sub>[PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)+LanL2DZ(Pd)], where G<sub>corr-QH</sub> is the thermal correction to Gibbs free energy obtained at the geometry optimization level using quasiharmonic approximations to entropy.

Cartesian coordinates of the lowest energy structures calculated with PCM(H<sub>2</sub>O)/M06-2X/6-31+G(d,p)/LanL2DZ(Pd).

**H<sub>2</sub>O**

|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| O | 0.000000  | -0.000000 | 0.117026  |
| H | 0.000000  | 0.765701  | -0.468104 |
| H | -0.000000 | -0.765701 | -0.468104 |

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>**

|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| P | 0.001448  | 0.095271  | 0.123336  |
| O | 1.276997  | -0.386691 | -0.792497 |
| H | 1.500262  | -1.311632 | -0.624678 |
| O | -1.287537 | -0.343121 | -0.795785 |
| H | -1.545211 | -1.258462 | -0.624753 |
| O | -0.014353 | -0.721547 | 1.388129  |
| O | 0.027797  | 1.593988  | 0.125076  |

**HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>**

|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| P | -0.135175 | -0.031722 | 0.000849  |
| O | 1.459428  | 0.544615  | -0.018120 |
| H | 2.067297  | -0.204651 | -0.002802 |
| O | -0.268237 | -0.886836 | -1.269736 |
| O | -0.251516 | -0.842913 | 1.301615  |
| O | -0.944634 | 1.270196  | -0.015000 |

**A**

|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| C | -1.337427 | 0.763570  | 3.153259  |
| C | -1.018842 | 1.697700  | 2.170403  |
| C | 0.056108  | 1.476982  | 1.309727  |
| C | 0.816449  | 0.308166  | 1.434198  |
| C | 0.492271  | -0.630477 | 2.421346  |
| C | -0.580005 | -0.402828 | 3.276773  |
| C | 0.362200  | 2.483761  | 0.228617  |
| C | 1.958965  | 0.080419  | 0.528458  |
| C | 2.358861  | 0.983249  | -0.420292 |
| C | 1.700978  | 2.260373  | -0.487707 |
| C | 3.489950  | 0.685571  | -1.363349 |
| H | 4.399642  | 1.225334  | -1.072892 |
| C | 3.725423  | -0.821492 | -1.385975 |
| C | 3.808296  | -1.387758 | 0.030383  |
| H | -2.174870 | 0.944035  | 3.819483  |
| H | -1.603906 | 2.607451  | 2.070892  |
| H | 1.082646  | -1.535313 | 2.505434  |
| H | -0.829063 | -1.136414 | 4.036531  |
| H | 2.892671  | -1.315241 | -1.901119 |
| O | 2.129699  | 3.207053  | -1.151866 |
| O | 0.353981  | 3.778712  | 0.793280  |
| H | 0.839573  | 4.348928  | 0.174417  |
| C | -0.741203 | 2.462713  | -0.870527 |
| H | -1.708631 | 2.650038  | -0.394512 |
| H | -0.527980 | 3.289013  | -1.559220 |
| O | 2.576704  | -1.075242 | 0.747835  |
| H | 4.647240  | -1.071907 | -1.918940 |
| H | 3.224958  | 1.047969  | -2.361929 |
| C | 4.959114  | -0.790165 | 0.835007  |

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| H  | 4.998317  | -1.246717 | 1.827483  |
| H  | 5.907010  | -0.980469 | 0.323203  |
| H  | 4.840599  | 0.290033  | 0.956448  |
| C  | 3.865196  | -2.906137 | 0.017696  |
| H  | 3.850128  | -3.296156 | 1.039209  |
| H  | 3.009507  | -3.311584 | -0.529530 |
| H  | 4.786922  | -3.236865 | -0.468713 |
| C  | -0.830885 | 1.243683  | -1.676472 |
| C  | -0.894386 | 0.339546  | -2.495536 |
| H  | -0.847666 | -0.362086 | -3.303838 |
| Cl | -0.149879 | -2.229409 | -0.914714 |
| Cl | -3.123408 | -2.214852 | 0.689877  |
| Pd | -1.958384 | -0.690096 | -0.708823 |
| Cl | -3.804999 | 0.824787  | -0.597902 |

**TS1**

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| C  | -1.338743 | -1.027057 | 3.298746  |
| C  | -1.084074 | 0.259674  | 2.830890  |
| C  | -0.028051 | 0.495695  | 1.951295  |
| C  | 0.792933  | -0.566662 | 1.556399  |
| C  | 0.533495  | -1.860987 | 2.024840  |
| C  | -0.533688 | -2.090347 | 2.886117  |
| C  | 0.180453  | 1.884216  | 1.398164  |
| C  | 1.931141  | -0.311991 | 0.655649  |
| C  | 2.235062  | 0.927609  | 0.149489  |
| C  | 1.436947  | 2.047773  | 0.532161  |
| C  | 3.346659  | 1.121837  | -0.844011 |
| H  | 4.208280  | 1.612998  | -0.375296 |
| C  | 3.734683  | -0.229006 | -1.437773 |
| C  | 3.896311  | -1.286051 | -0.348244 |
| H  | -2.167335 | -1.201119 | 3.977552  |
| H  | -1.713246 | 1.087625  | 3.144255  |
| H  | 1.168751  | -2.678699 | 1.704833  |
| H  | -0.736215 | -3.096455 | 3.238231  |
| H  | 2.948682  | -0.566778 | -2.122619 |
| O  | 1.680240  | 3.206365  | 0.148517  |
| O  | 0.256812  | 2.788500  | 2.486579  |
| H  | 0.555711  | 3.638731  | 2.127060  |
| C  | -1.022676 | 2.300537  | 0.508988  |
| H  | -1.941201 | 2.166551  | 1.083261  |
| H  | -0.900145 | 3.365077  | 0.280938  |
| O  | 2.642492  | -1.399165 | 0.394834  |
| H  | 4.669699  | -0.159267 | -2.001086 |
| H  | 3.001398  | 1.798278  | -1.633190 |
| C  | 4.984478  | -0.932948 | 0.661272  |
| H  | 5.078657  | -1.728899 | 1.404583  |
| H  | 5.942152  | -0.819177 | 0.145247  |
| H  | 4.757760  | 0.001660  | 1.181641  |
| C  | 4.111871  | -2.668221 | -0.940483 |
| H  | 4.144193  | -3.421513 | -0.148585 |
| H  | 3.302903  | -2.915607 | -1.633444 |
| H  | 5.060559  | -2.691274 | -1.483374 |
| C  | -0.754110 | 1.730794  | -1.968226 |
| Cl | 0.023387  | -1.322668 | -1.939006 |
| Cl | -2.890524 | -2.644497 | -0.646445 |



|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| Pd | -1.917266 | -0.401826 | -0.848271 |
| Cl | -3.914747 | 0.576666  | 0.098924  |
| H  | -0.616622 | 1.459893  | -2.996492 |
| O  | 0.217887  | 3.465959  | -2.248904 |
| H  | -0.397077 | 4.213177  | -2.264950 |
| C  | -1.098877 | 1.535527  | -0.768216 |
| H  | 0.797035  | 3.581620  | -1.467669 |

**B**

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| C  | -1.509740 | -0.020792 | 3.202351  |
| C  | -1.118543 | 1.095469  | 2.466123  |
| C  | 0.025031  | 1.035918  | 1.673043  |
| C  | 0.767810  | -0.149802 | 1.608921  |
| C  | 0.366820  | -1.272261 | 2.344604  |
| C  | -0.769077 | -1.204705 | 3.139711  |
| C  | 0.388392  | 2.188764  | 0.779954  |
| C  | 1.968843  | -0.194607 | 0.772042  |
| C  | 2.521312  | 0.948419  | 0.162482  |
| C  | 1.804699  | 2.115656  | 0.279929  |
| C  | 3.874105  | 0.914964  | -0.495628 |
| H  | 4.440260  | 1.803070  | -0.202645 |
| C  | 4.615999  | -0.351716 | -0.080672 |
| C  | 3.710099  | -1.574653 | -0.175409 |
| H  | -2.399708 | 0.029348  | 3.821201  |
| H  | -1.703154 | 2.009955  | 2.497805  |
| H  | 0.941703  | -2.188271 | 2.275244  |
| H  | -1.084231 | -2.073621 | 3.707110  |
| H  | 5.491108  | -0.515653 | -0.714938 |
| O  | 2.330604  | 3.242919  | -0.139206 |
| O  | 0.177021  | 3.461538  | 1.365953  |
| H  | 0.537721  | 3.474893  | 2.265015  |
| C  | -0.551337 | 2.181858  | -0.481355 |
| H  | -1.527004 | 2.465886  | -0.081185 |
| H  | -0.201573 | 2.989859  | -1.137479 |
| O  | 2.549163  | -1.356508 | 0.711858  |
| H  | 4.967309  | -0.260392 | 0.953413  |
| H  | 3.748715  | 0.964143  | -1.583581 |
| C  | 4.372867  | -2.819697 | 0.383648  |
| H  | 3.668015  | -3.654961 | 0.389701  |
| H  | 5.225802  | -3.086948 | -0.245293 |
| H  | 4.728807  | -2.643875 | 1.402049  |
| C  | 3.156885  | -1.802778 | -1.576242 |
| H  | 2.533444  | -2.698828 | -1.594031 |
| H  | 2.538683  | -0.961349 | -1.902363 |
| H  | 3.989922  | -1.923891 | -2.274606 |
| C  | 0.188769  | 0.651772  | -2.262377 |
| Cl | -0.416460 | -2.268203 | -0.953974 |
| Cl | -3.816051 | -2.084349 | 0.214689  |
| Pd | -2.012398 | -0.416965 | -0.693999 |
| Cl | -3.743805 | 1.372051  | -0.855135 |
| H  | 0.169817  | -0.263356 | -2.845454 |
| O  | 1.158223  | 1.567718  | -2.612320 |
| H  | 1.584848  | 1.293585  | -3.432559 |
| C  | -0.636789 | 0.888527  | -1.238481 |
| H  | 1.740238  | 3.981946  | 0.105517  |

**C**

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| C  | -1.250180 | -1.290696 | 3.166026  |
| C  | -1.060354 | 0.025996  | 2.754232  |
| C  | -0.010001 | 0.357557  | 1.897720  |
| C  | 0.873027  | -0.642143 | 1.474060  |
| C  | 0.678448  | -1.967532 | 1.884573  |
| C  | -0.383788 | -2.291297 | 2.720950  |
| C  | 0.132317  | 1.780724  | 1.414424  |
| C  | 2.009482  | -0.289599 | 0.605042  |
| C  | 2.262503  | 0.982848  | 0.168336  |
| C  | 1.389042  | 2.044890  | 0.575237  |
| C  | 3.374527  | 1.278190  | -0.799293 |
| H  | 4.207723  | 1.786334  | -0.297874 |
| C  | 3.832909  | -0.022751 | -1.451370 |
| C  | 4.032209  | -1.121073 | -0.409468 |
| H  | -2.075752 | -1.537023 | 3.826163  |
| H  | -1.738252 | 0.805018  | 3.090427  |
| H  | 1.362030  | -2.735290 | 1.541267  |
| H  | -0.534700 | -3.320758 | 3.029152  |
| H  | 3.069522  | -0.364653 | -2.159789 |
| O  | 1.583065  | 3.225742  | 0.245059  |
| O  | 0.182712  | 2.621188  | 2.562992  |
| H  | 0.393188  | 3.512430  | 2.244254  |
| C  | -1.079452 | 2.189533  | 0.541376  |
| H  | -1.985329 | 2.007235  | 1.124993  |
| H  | -1.000844 | 3.276571  | 0.394955  |
| O  | 2.777211  | -1.333393 | 0.303225  |
| H  | 4.768812  | 0.116323  | -2.000548 |
| H  | 3.003066  | 1.975527  | -1.557554 |
| C  | 5.087974  | -0.760679 | 0.632027  |
| H  | 5.216412  | -1.586594 | 1.336656  |
| H  | 6.044756  | -0.568975 | 0.137640  |
| H  | 4.803297  | 0.132820  | 1.194448  |
| C  | 4.328750  | -2.460574 | -1.062431 |
| H  | 4.389206  | -3.247953 | -0.305963 |
| H  | 3.542421  | -2.716193 | -1.778403 |
| H  | 5.284480  | -2.410195 | -1.591031 |
| C  | -0.773144 | 2.068206  | -1.935116 |
| Cl | 0.028377  | -1.177591 | -2.049901 |
| Cl | -2.931227 | -2.751387 | -0.678665 |
| Pd | -1.926540 | -0.321934 | -0.804535 |
| Cl | -4.030957 | 0.611857  | 0.154880  |
| H  | -0.869035 | 1.578430  | -2.898927 |
| O  | -0.204802 | 3.320788  | -2.063707 |
| H  | 0.260141  | 3.558560  | -1.244645 |
| C  | -1.169448 | 1.495697  | -0.793742 |

**D**

|   |           |           |          |
|---|-----------|-----------|----------|
| C | -1.341686 | 0.187083  | 3.263677 |
| C | -0.991675 | 1.249940  | 2.431470 |
| C | 0.131835  | 1.161165  | 1.610395 |
| C | 0.904390  | -0.008497 | 1.616843 |
| C | 0.545118  | -1.077272 | 2.446819 |
| C | -0.575528 | -0.980177 | 3.265920 |

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| C  | 0.444594  | 2.239528  | 0.617506  |
| C  | 2.108335  | -0.074309 | 0.768983  |
| C  | 2.625461  | 1.005734  | 0.115817  |
| C  | 1.891090  | 2.246384  | 0.153713  |
| C  | 3.957331  | 0.955033  | -0.574171 |
| H  | 4.527554  | 1.855121  | -0.324214 |
| C  | 4.714874  | -0.297706 | -0.143268 |
| C  | 3.792952  | -1.516884 | -0.156196 |
| H  | -2.217703 | 0.264512  | 3.900364  |
| H  | -1.592044 | 2.154564  | 2.410255  |
| H  | 1.143229  | -1.981636 | 2.436996  |
| H  | -0.852697 | -1.813384 | 3.903892  |
| H  | 5.569292  | -0.490863 | -0.799276 |
| O  | 2.365539  | 3.326279  | -0.223066 |
| O  | 0.135832  | 3.513593  | 1.157458  |
| H  | 0.727280  | 4.132882  | 0.698252  |
| C  | -0.467555 | 2.033500  | -0.664615 |
| H  | -1.449464 | 2.363805  | -0.314999 |
| H  | -0.102816 | 2.773217  | -1.394800 |
| O  | 2.697148  | -1.281718 | 0.774160  |
| H  | 5.100808  | -0.172309 | 0.875928  |
| H  | 3.794184  | 0.971114  | -1.659209 |
| C  | 4.491840  | -2.754093 | 0.381825  |
| H  | 3.789287  | -3.590199 | 0.441847  |
| H  | 5.310881  | -3.035128 | -0.285918 |
| H  | 4.900723  | -2.563390 | 1.378211  |
| C  | 3.192871  | -1.765111 | -1.537345 |
| H  | 2.568503  | -2.663229 | -1.516159 |
| H  | 2.580728  | -0.916807 | -1.862235 |
| H  | 3.999290  | -1.916117 | -2.262568 |
| C  | 0.314268  | 0.297538  | -2.297214 |
| Cl | -0.827545 | -2.623206 | -0.903195 |
| Cl | -4.073268 | -1.743464 | 0.652325  |
| Pd | -2.050071 | -0.415946 | -0.667817 |
| Cl | -3.736897 | 1.456636  | -1.149746 |
| H  | 0.142477  | -0.703389 | -2.732411 |
| O  | 1.311018  | 0.989029  | -2.748200 |
| C  | -0.550434 | 0.691122  | -1.307949 |

**TS2**

|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| C | -1.448756 | 0.918314  | 3.113537  |
| C | -0.935332 | 1.857024  | 2.234471  |
| C | 0.204335  | 1.562242  | 1.459174  |
| C | 0.813992  | 0.290952  | 1.581582  |
| C | 0.277722  | -0.650651 | 2.481794  |
| C | -0.838946 | -0.343623 | 3.240854  |
| C | 0.699022  | 2.459457  | 0.452368  |
| C | 2.016303  | 0.018681  | 0.812984  |
| C | 2.620784  | 0.963595  | 0.023098  |
| C | 2.011714  | 2.262837  | -0.116616 |
| C | 3.949650  | 0.705842  | -0.627573 |
| H | 4.569438  | 1.603979  | -0.544161 |
| C | 4.632166  | -0.485139 | 0.038688  |
| C | 3.654371  | -1.648686 | 0.205705  |
| H | -2.327618 | 1.156423  | 3.705772  |

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| H  | -1.407374 | 2.828694  | 2.123465  |
| H  | 0.750283  | -1.623491 | 2.566459  |
| H  | -1.249262 | -1.078554 | 3.926351  |
| H  | 5.495372  | -0.826092 | -0.541935 |
| O  | 2.548248  | 3.221273  | -0.747190 |
| O  | 0.300772  | 3.784438  | 0.519629  |
| H  | 0.956655  | 4.253650  | -0.028274 |
| C  | -0.396652 | 1.863142  | -1.156140 |
| H  | -1.235079 | 2.400176  | -0.725549 |
| H  | 0.217939  | 2.448585  | -1.845178 |
| O  | 2.539505  | -1.217741 | 1.025499  |
| H  | 4.994545  | -0.198190 | 1.033875  |
| H  | 3.803525  | 0.527195  | -1.701104 |
| C  | 4.283861  | -2.793312 | 0.984559  |
| H  | 3.546519  | -3.581948 | 1.161250  |
| H  | 5.116893  | -3.216817 | 0.416350  |
| H  | 4.660108  | -2.440093 | 1.949102  |
| C  | 3.109593  | -2.129861 | -1.136612 |
| H  | 2.438248  | -2.979363 | -0.983062 |
| H  | 2.552773  | -1.336043 | -1.643496 |
| H  | 3.937881  | -2.444439 | -1.780010 |
| C  | 0.331836  | -0.095954 | -2.408772 |
| Cl | -0.839190 | -2.713537 | -0.778411 |
| Cl | -3.962116 | -1.771013 | 0.795594  |
| Pd | -2.030152 | -0.507353 | -0.635008 |
| Cl | -3.657980 | 1.385762  | -0.976875 |
| H  | 0.118120  | -1.139988 | -2.690189 |
| O  | 1.319438  | 0.473342  | -2.938068 |
| C  | -0.553635 | 0.507384  | -1.475346 |

**E**

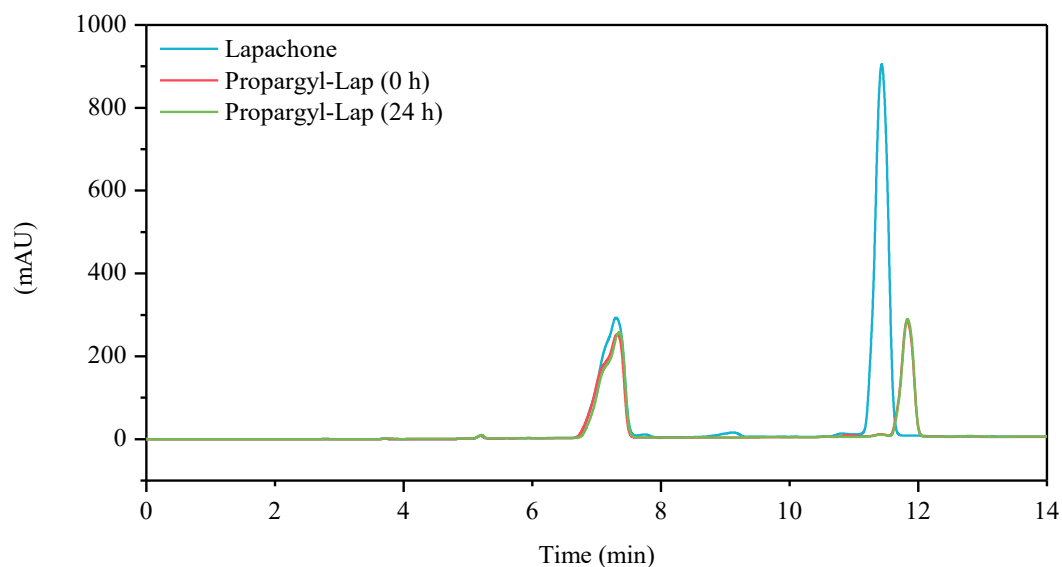
|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| C | 3.437041  | -2.046770 | 0.025363  |
| C | 3.321354  | -0.677457 | 0.048633  |
| C | 2.040298  | -0.046944 | -0.003898 |
| C | 0.874893  | -0.881157 | -0.084516 |
| C | 1.032651  | -2.289719 | -0.101978 |
| C | 2.281862  | -2.869090 | -0.049008 |
| C | 1.879272  | 1.343706  | 0.027091  |
| C | -0.402818 | -0.250981 | -0.145942 |
| C | -0.540268 | 1.122776  | -0.128215 |
| C | 0.622003  | 1.971302  | -0.023705 |
| C | -1.894378 | 1.771549  | -0.222333 |
| H | -1.841875 | 2.613370  | -0.920734 |
| C | -2.949465 | 0.763140  | -0.668158 |
| C | -2.779715 | -0.570730 | 0.062256  |
| H | 4.420954  | -2.505940 | 0.065412  |
| H | 4.205566  | -0.049920 | 0.107595  |
| H | 0.142482  | -2.908457 | -0.158021 |
| H | 2.385145  | -3.949581 | -0.062929 |
| H | -3.960830 | 1.145888  | -0.495698 |
| O | 0.551487  | 3.264281  | 0.015530  |
| O | 2.976391  | 2.176527  | 0.115650  |
| H | 2.572277  | 3.065175  | 0.119545  |
| H | -2.166953 | 2.210909  | 0.747553  |
| H | -2.848848 | 0.568893  | -1.743181 |

|   |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|
| O | -1.476757 | -1.106428 | -0.245804 |
| C | -2.904500 | -0.418004 | 1.578628  |
| H | -3.872355 | 0.023667  | 1.835442  |
| H | -2.828987 | -1.398068 | 2.058561  |
| H | -2.114411 | 0.223448  | 1.978408  |
| C | -3.763527 | -1.607863 | -0.457368 |
| H | -3.577567 | -2.577333 | 0.014234  |
| H | -4.788202 | -1.300569 | -0.229283 |
| H | -3.663580 | -1.719065 | -1.541014 |

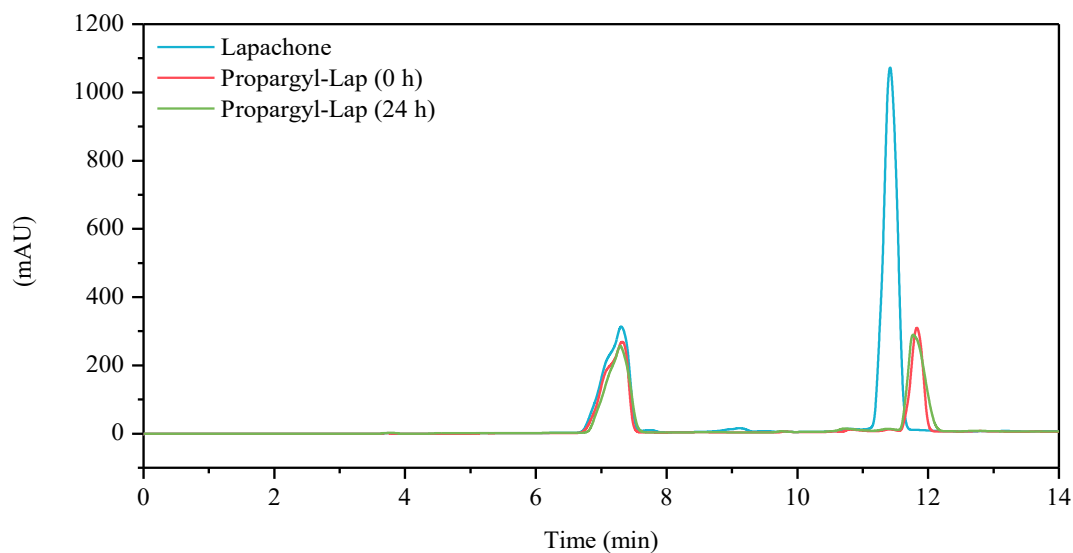
**F**

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| C  | 2.221590  | -0.001074 | -1.650376 |
| H  | 1.632238  | -0.000790 | -2.562831 |
| H  | 3.306331  | -0.001764 | -1.765878 |
| C  | 2.566771  | -0.001250 | 0.732478  |
| Cl | -0.138714 | 2.459097  | -0.066129 |
| Cl | -2.841744 | 0.000733  | 0.249818  |
| Pd | -0.260174 | 0.000228  | -0.113788 |
| Cl | -0.141404 | -2.458625 | -0.066208 |
| H  | 3.647604  | -0.001874 | 0.479523  |
| O  | 2.218254  | -0.001047 | 1.899787  |
| C  | 1.662881  | -0.000708 | -0.434106 |

**ANEXO F – ESTABILIDADE DO PROP-LAP NOS MEIOS DE CULTURA**



Estabilidade do Prop-Lap no meio de cultura McCoy's (SKBR3): A estabilidade foi determinada incubando o Prop-Lap ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  no meio McCoy's por 24 h. A reação foi monitorada por LC-DAD usando padrões do Prop-Lap (11,8 min) e  $\beta$ -Lapachona (11,4 min). Acetofenona foi usada como padrão interno (7,2 min).



Estabilidade do Prop-Lap no meio de cultura RPMI (MOLM13): A estabilidade foi determinada incubando o Prop-Lap ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  no meio RPMI por 24 h. A reação foi monitorada por LC-DAD usando padrões do Prop-Lap (11,8 min) e  $\beta$ -Lapachona (11,4 min). Acetofenona foi usada como padrão interno (7,2 min).