



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Filipe Cardozo

**Estudos Das Reações De Desproteção De Pró-Fármacos
Derivados Da 5-Fluorouracila Catalisadas Por Paládio**

Florianópolis
2023

Filipe Cardozo

**Estudos Das Reações De Desproteção De Pró-Fármacos
Derivados Da 5-Fluorouracila Catalisadas Por Paládio**

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

Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Florianópolis
2023

Cardozo, Filipe

Estudos Das Reações De Desproteção De Pró-Fármacos Derivados
Da 5-Fluorouracila Catalisadas Por Paládio /Filipe Cardozo ;
orientador, Josie Barbosa Domingos, 2023.

86 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Química . 3. Química Bio-ortogonal. I. Barbosa
Domingos, Josie. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Filipe Cardozo

Estudos Das Reações De Desproteção De Pró-Fármacos Derivados Da 5-Fluorouracila Catalisadas Por Paládio

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 02 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Tiago Frizon
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Adriana Passarela Gerola
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar meus pais e meu irmão pelo amor e apoio incondicional durante toda minha vida. Agradeço minha companheira Giulia sem a qual este trabalho não teria sido possível.

A Universidade Federal de Santa Catarina e aos professores que colaboraram para o meu crescimento. Ao órgão de financiamento CNPq, pela bolsa de pesquisa de mestrado.

Por fim agradeço o Professor Josiel pela oportunidade e ensinamentos desde a elaboração do projeto até sua execução. Aos colegas do LacBio e a todos os colegas que de alguma forma contribuíram com meu amadurecimento intelectual e pessoal durante essa caminhada

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar novos pró-fármacos propargilados derivados do antitumoral 5-Fluorouracila (5FU), e acompanhar suas reações de despropargilação mediadas por paládio. Ao todo, foram sintetizados e caracterizados seis pró-fármacos, sendo três compostos já descritos e usados como padrões. Os três novos pró-fármacos propargilados diferem dos padrões pela presença de um grupo auto-imolativo, que pode alterar tanto a toxicidade, taxa de liberação do fármaco e também a reatividade frente ao metal. As reações foram avaliadas em condições fisiologicamente relevantes na presença de catalisadores homogêneos e heterogêneos de paládio (0) e paládio (II). O acompanhamento das reações foi realizado pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e por ressonância magnética nuclear de flúor. Os resultados mostraram que os novos pró-fármacos geraram a 5-FU, entretanto em baixo rendimento. Dados de citotoxicidade em cultura celular em linhagem de câncer de mama demonstraram que os pró-fármacos são estáveis e apresentam baixa toxicidade em relação ao fármaco. Nesse sentido, como perspectiva do trabalho, evidencia-se potencial para o desenvolvimento de novos catalisadores de paládio com suas atividades otimizadas frente a reação de despropargilação

Palavras-chave: Catálise bio-ortogonal. Catálise heterogênea. Catálise homogênea. 5-Fluorouracila. Catálise mediada por paládio.

ABSTRACT

The aim of this work was to synthesize and characterize novel 5-fluorouracil propargyl-masked prodrug and to follow their Pd-mediated depropargylation reactions. Six prodrugs were synthesized and characterized, with three of the compounds already described and used as standards. Furthermore, the three new propargylated prodrugs differ from the standards by the presence of a self-immolative linker which can alter toxicity, drug release rate and reactivity towards the metal. The reactions were evaluated under physiologically relevant conditions in the presence of homogeneous and heterogeneous palladium (0) and palladium (II) catalysts. The reactions were monitored by high performance liquid chromatography and fluorine nuclear magnetic resonance techniques. The results showed that all three new prodrugs generated 5FU, albeit in low yields. Cytotoxicity data in cell culture of breast cancer cell lines showed that the prodrugs are stable and have low toxicity in relation to the drug. Thus, as a perspective of the work, there is evidence of potential for the development of new palladium catalysts with their activities optimized against the depropargylation reaction.

Keywords: Bioorthogonal catalysis. Heterogeneous catalysis. Homogeneous catalysis. 5-fluorouracil. Pd-mediated catalysis

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Uracila (U) e 5-Fluorouracila (5FU)</i>	18
<i>Figura 2: Linha do tempo da evolução da Química Bio-ortogonal.</i>	21
<i>Figura 16: Pró-fármacos sintetizados para este estudo.</i>	51
<i>Figura 17: Espectro RMN ¹H 400 MHz da 5FU.</i>	52
<i>Figura 18: Espectro RMN ¹H 200 MHz pró-fármaco 1,3-diPro-5FU 3.</i>	53
<i>Figura 19: Espectro RMN ¹H 200 MHz 1-Pro-5FU 2.</i>	54
<i>Figura 20: Espectro RMN ¹H 200 MHz 3-Pro-5FU 10.</i>	55
<i>Figura 21: Espectro de RMN ¹H 200 MHz do 1,3-diBnzPro-5FU 7</i>	56
<i>Figura 22: Espectro RMN ¹³C 50 MHz do 1,3-diBnzPro-5FU 7</i>	57
<i>Figura 23: Espectro de massas TOF MS ES+ do pró fármaco 7</i>	58
<i>Figura 24: Espectro RMN ¹H 200 MHz pró-fármaco 6</i>	59
<i>Figura 25: Espectro RMN ¹³C 50 MHz pró-fármaco 6</i>	59
<i>Figura 26: Espectro de massas TOF MS ES+ do pró fármaco 6</i>	60
<i>Figura 27: Espectro RMN ¹H 400 MHz pró-fármaco 12</i>	61
<i>Figura 28: Espectro RMN ¹³C 101 MHz pró-fármaco 12</i>	62
<i>Figura 29: Espectro de massas TOF MS ES+ do pró fármaco 12</i>	62
<i>Figura 30: Cromatograma da reação de 3 com Na₂PdCl₄ após 24 h.</i>	65
<i>Figura 31: Intensidade dos picos de 2 (6,74 min) e 10 (6,91 min) na reação com A) Na₂PdCl₄ e B) Pd(dba)₂.</i>	65
<i>Figura 32: Cromatograma da reação de desproteção de 7 com Na₂PdCl₄ após 24 h. Além da formação da 5FU, observa-se a formação de 6 e 12.</i>	67
<i>Figura 33: Cromatograma da reação de desproteção de 3 com PdII@grafeno após 24 h. Além da formação da 5FU, observa-se a formação de 2 e 10.</i>	70
<i>Figura 34: Cromatograma da reação de desproteção de 7 com Pd/C após 24 h. Além da formação da 5FU, observa-se a formação de 6 e possivelmente 6c.</i>	71
<i>Figura 35: Cromatograma da reação de 6 com Pd/C após 24 h. Nota-se que além da 5FU, outros dois produtos foram formados na reação.</i>	72
<i>Figura 36: Sobreposição dos espectros de RMN ¹⁹F da 5FU e dos pró-fármacos 6, 7 e 12.</i>	73
<i>Figura 37: Sobreposição dos espectros de RMN ¹⁹F da reação de desproteção de 7.</i>	74
<i>Figura 38: Sobreposição dos espectros de RMN ¹⁹F da reação de desproteção de 6.</i>	74
<i>Figura 39: Sobreposição dos espectros de RMN ¹⁹F da reação de desproteção de 12.</i>	75

LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1: Conversão da 5FU em DHFU</i>	19
<i>Esquema 2: A) reação clássica de Staudinger entre uma fosfina e uma azida; B) Modificação da reação de Staudinger que produz um aduto covalente estável.</i>	21
<i>Esquema 3: Exemplos de reações bio-ortogonais de ligação e dissociação.</i>	22
<i>Esquema 4: Estratégia para modificação de oligossacarídeos usando alcenos terminais como grupos químicos reportadores.</i>	23
<i>Esquema 5: Reação click CuAAC.</i>	24
<i>Esquema 6: Síntese de fármaco in vivo através de reação CuAAC.</i>	25
<i>Esquema 7: Acoplamento Suzuki-Miyaura em meio aquoso.</i>	25
<i>Esquema 8: Acoplamento Suzuki-Miyaura intracelular.</i>	26
<i>Esquema 9: A) Acoplamento de Sonogashira bioconjugação proteica, e B) marcação seletiva de um resíduo proteico utilizando acoplamento de Sonogashira livre de cobre.</i>	27
<i>Esquema 10: Clivagem catalisada por metal de transição.</i>	28
<i>Esquema 11: Visão ampla da Química Bio-ortogonal</i>	28
<i>Esquema 12: Reação intracelular de clivagem bio-ortogonal catalisada por rutênio.</i>	29
<i>Esquema 13: Modelos de pró-fármacos ativados pela reação com Pd.</i>	30
<i>Esquema 14: Reativação de fluoróforo mediada por Pd.</i>	31
<i>Esquema 15: Mecanismo proposto para a reação de despropargilação promovida por (a) Pd(II) e (b) Pd(0).</i>	Erro! Indicador não definido.
<i>Esquema 16: Síntese pró-fármacos 1-Pro-5FU 2 e 1,3-diPro-5FU 3</i>	37
<i>Esquema 17: Síntese intermediário propargílico 4.</i>	37
<i>Esquema 18: Síntese intermediário brometo propargílico 5.</i>	38
<i>Esquema 19: Síntese pró-fármacos 1,3-Dibnzpro-5FU 7 e 1-Bnzpro-5FU 6.</i>	40
<i>Esquema 20: Síntese intermediário N-1-Boc-5FU 8.</i>	40
<i>Esquema 21: Síntese pró-fármaco 3-Pro-5FU 10.</i>	41
<i>Esquema 22: Síntese pró-fármaco 3-Bnzpro-5FU X7</i>	43
<i>Esquema 23: Formas de ressonância da 5FU desprotonada.</i>	50
<i>Esquema 24: Produtos da reação de clivagem mediada por Pd dos pró-fármacos 3, 2, e 10.</i>	64
<i>Esquema 25: Mecanismo auto-imolativo na reação de desproteção de 6.</i>	66
<i>Esquema 26: Produtos da reação de clivagem mediada por Pd dos pró-fármacos 7, 6 e 12.</i>	68

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Preparo da curva de calibração da 5FU na conversão Heterogênea (Pd II) dos pró-fármacos propargílicos.</i>	44
<i>Tabela 2: Preparo soluções dos substratos com catalisador Pd II</i>	44
<i>Tabela 3: Preparo da curva de calibração da 5FU na conversão Heterogênea (Pd0) dos pró-fármacos propargílicos.</i>	45
<i>Tabela 4: Preparo soluções dos substratos com catalisador Pd 0</i>	46
<i>Tabela 5: Curva de calibração para as reações de desproteção dos substratos 1,3-diPro-5FU 3, 1-Pro-5FU 2 e 3-Pro-5FU 10</i>	47
<i>Tabela 6: Condições reacionais para a desproteção dos substratos 1,3-diPro-5FU 3, 1-Pro-5FU 2 e 3-Pro-5FU 10</i>	48
<i>Tabela 7: Condições reacionais para a desproteção dos compostos 1,3-diBnzPro-5FU7, 1-BnzPro-5FU 6 e 3-BnzPro-5FU 12</i>	49
<i>Tabela 8: Condições reacionais do estudo da desproteção dos compostos 1,3-diBnzPro-5FU 7, 1-BnzPro-5FU 6 e 3-BnzPro-5FU 12 por 19F RMN</i>	49
<i>Tabela 9: Porcentagem de 5FU formada após 24 h de reação.</i>	63
<i>Tabela 10: Porcentagem de 5FU formada após 24 h de reação.</i>	67
<i>Tabela 11: : Porcentagem de 5FU formada após 24 h de reação.</i>	69
<i>Tabela 12: Porcentagem de 5FU formada após 24 h de reação.</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU	5-Fluorouracila
BOC ₂	Dicarbonato de di-terc-butila
D ₂ O	Água deuterada
DAD	Detecção por arranjo de diodo
DBU	1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene
DCM	Diclorometano
DMAP	4-Dimetilaminopiridine
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOAc	Acetato de etila
Hex	Hexano
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
PBS	Tampão Fosfato Salino
RMN	Ressonância magnética nuclear
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Time of flight

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ESQUEMAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
SUMÁRIO	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 5-FLUOROURACILA	18
2.2 QUÍMICA BIO-ORTOGONAL	20
2.2.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA	20
2.3 CATÁLISE BIO-ORTOGONAL	22
2.3.1 REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS DE LIGAÇÃO	23
2.3.2 REAÇÕES BIO-ORTOGONAIS DE CLIVAGEM.....	27
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS	33
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1 MATERIAIS	34
4.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	34
4.2.1 ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO, CARBONO E FLÚOR – RMN DE ^1H , ^{13}C , ^{19}F	34
4.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE – HPLC	35
4.3 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DERIVADOS DA 5-FU	36

4.3.1 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS 5-FLUORO-3-PROPARGILURACILA (2) (1-PRO-5FU) E 1,3-DIPROPARGIL-5-FLUOROURACIL (3) (1,3-DIPROP-5FU)	36
4.3.2 SÍNTESE DO [4-(PROP-2-IN-1-ILOXI)FENIL]METANOL (4) ⁷²	37
4.3.3 SÍNTESE DO 1-(BROMOMETIL)-4-(PROP-INO-1-ILOXI)BENZENO (5) ⁷³	37
4.3.4 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS 5-FLUORO-1,3-BIS[4-(PROP-2-IN-1-ILOXI)BENZIL]PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA (7) - 1,3-DIBNZPRO-5FU E 5-FLUORO-1-[4-(PROP-2-INO-1-ILOXI)BENZIL]PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA (6) - 1-BNZPRO-5FU	38
4.3.5 SÍNTESE DO TERT-BUTIL 5-FLUORO-2,4-DIOXO-3,4-DIIDROPYRIMIDINA-1(2H)-CARBOXILATO (8) - N-1-BOC-5FU ⁷⁴	40
4.3.6 SÍNTESE DO 5-FLUORO-3-(PROP-2-INO-1-YL)PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA (10) - 3-PRO-5FU ^{74,75}	40
4.3.7 SÍNTESE DO 5-FLUORO-3-[4-(PROP-2-INO-1-ILOXI)BENZIL]PIRIMIDINA-2,4(1H,3H)-DIONA (12) - 3-BNZPRO-5FU	42
4.4 ESTUDOS DE DESPROPARGILAÇÃO	43
4.4.1 CATÁLISE HETEROGÊNEA	43
4.4.2 CATÁLISE HOMOGÊNEA	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 50

5.1 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DERIVADOS DA 5-FU.....	50
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PRÓ-FÁRMACOS SINTETIZADOS	51
5.2.1 ESPECTROS DE RMN ¹ H DOS PRÓ-FÁRMACOS 1,3-DIPRO-5FU 3, 1-PRO-5FU 2 E 3-PRO-5FU 10	51
5.2.2 ESPECTROS DE RMN ¹ H E ¹³ C E ESPECTRO DE MASSAS (TOF MS ES+) DOS PRÓ-FÁRMACOS 1,3-DIBNZPRO-5FU 7, 1-BNZPRO-5FU 6 E 3-BNZPRO-5FU 12	55
5.3 ESTUDO DA REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DOS PRÓ-FÁRMACOS PROPARGILADOS DERIVADOS DA 5FU	63
5.3.1 REAÇÃO DE DESPROPARGILAÇÃO – CATÁLISE HOMOGÊNEA.	63
5.3.2 REAÇÃO DE DESPROPARGILAÇÃO – CATÁLISE HETEROGÊNEA	69
5.3.3 ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DE 6, 7, E 12 NA REAÇÃO COM Na ₂ PdCl ₄ POR RMN DE ¹⁹ F.....	72

6 CONCLUSÃO 76

1 INTRODUÇÃO

A atuação do químico orgânico tem impacto em várias áreas da ciência e da indústria. Do refinamento do petróleo, indústrias alimentícia e têxtil, a áreas tecnológicas e da saúde. Desta, talvez a síntese de fármacos seja um dos ramos mais desafiantes e interessantes da química. A habilidade de obter e transformar compostos em substâncias com atividade biológica é uma virtude imprescindível. Não obstante, simplificar e alterar a função dessas moléculas apresenta a mesma complexidade e significância.

No que diz respeito à saúde, o câncer é um problema global que afeta milhões de pessoas e impõe desafios enormes para os sistemas de saúde ao redor do mundo. É uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e acelerado de células anormais. Estimativas da Organização Mundial da Saúde apontam o câncer como primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países.¹ No Brasil, câncer de próstata, pulmão e mama estão entre as dez principais causas de morte entre homens e mulheres.¹ Para mulheres na faixa dos 35 e 39 anos, o câncer de mama é a principal causa de morte seguida pelo câncer do colo do útero, com 73.610 e 17.010 novos casos estimados para o ano de 2023, respectivamente.² Já para os homens, a maior incidência da doença está ligada ao câncer de pulmão, próstata e estômago. A projeção de novos casos de câncer de próstata para o triênio 2023-2025 nas regiões sul e sudeste é de 15.870 e 63.531, respectivamente.³

A quimioterapia é uma das principais ferramentas no tratamento e combate ao câncer. Porém, essa abordagem é limitada e apresenta desvantagens. A baixa absorção dos fármacos requer administração frequente e em grandes doses para manter uma concentração efetiva dos quimioterápicos no tumor. Esta alta dosagem pode provocar o desenvolvimento a resistência ao tratamento. Além disso, a falta de seletividade resulta em uma grave toxicidade sistêmica, e com isso o surgimento de muitos

efeitos adversos como cansaço, perda de apetite, náusea, queda de cabelo e problemas de pele. Juntas, essas limitações diminuem significativamente a taxa de sucesso do tratamento quimioterápico. Assim, a racionalização de novas estratégias que mitiguem ou acabem com esses problemas torna-se não só desejáveis como necessárias.

Nesse contexto, a química bio-ortogonal surge como excelente opção no desenvolvimento de alternativas que podem superar as limitações dos protocolos quimioterápicos tradicionais. Através do emprego da química bio-ortogonal, pode-se aumentar a especificidade, eficácia e, por consequência, a segurança de agentes antitumorais estabelecidos, pela reativação controlada de pró-fármacos e com isso, impactar profundamente as expectativas dos resultados oferecidos pela quimioterapia.

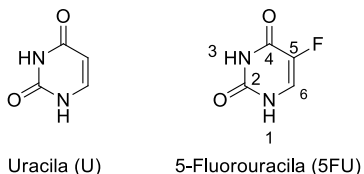
Nos últimos anos, as reações de desproteção mediadas por paládio têm recebido considerável atenção, devido especialmente às suas propriedades catalíticas amplamente reconhecidas. Essas propriedades tornam o paládio um metal de interesse promissor para aplicações na química bio-ortogonal. Neste sentido, este trabalho busca desenvolver novos pró-fármacos derivados do quimioterápico 5-fluoruracila (5-FU) e estudar a suas ativações por catalisadores de paládio

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 5-FLUOROURACILA

Câncer é uma doença devastadora que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, afeta os sistemas públicos de saúde e a sociedade como um todo. Ao longo dos anos, progressos substanciais no campo da pesquisa do câncer levaram ao desenvolvimento de várias abordagens terapêuticas. Entre elas, a 5-fluorouracila (5FU) (Fig. 1) ainda é utilizada de forma ampla na quimioterapia do câncer. Tem papel preponderante no tratamento do câncer colorretal, mama, vias aéreas e trato digestivo.

Figura 1: Uracila (U) e 5-Fluorouracila (5FU)



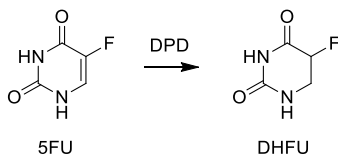
Fonte 1: o autor (2023).

A 5FU é um composto heterocíclico aromático com estrutura semelhante às moléculas de pirimidina do DNA e do RNA. É um análogo da uracila com um átomo de flúor na posição C-5 (Fig. 1). Foi sintetizada pela primeira vez na década de 1950 como um potencial agente antitumoral.⁴ Seu desenvolvimento inicial foi baseado em observações de que certos antimetabólitos inibiam a síntese de DNA e RNA. Os antimetabólitos são fármacos quimioterápicos com estruturas químicas próximas a dos metabólitos e que podem ser incorporadas ao DNA ou RNA alterando o metabolismo normal das células que por consequência impedem-nas de se replicarem.

Ao longo das últimas décadas, estudos sobre o mecanismo de ação da 5FU contribuíram com desenvolvimento de estratégias

que pudessem aumentar sua atividade antitumoral. Além de sua incorporação ao DNA e RNA, a citotoxicidade da 5FU é atribuída a sua inibição da enzima timidilato sintetase (TS), responsável pela conversão da uracila em timina, necessária no reparo e replicação do DNA.⁵ Contudo, os efeitos adversos causados pela administração da 5FU, resultado da baixa seletividade, limitam sua dosagem e podem impedir um tratamento quimioterápico ideal. A racionalização química no design de pró-fármacos pode oferecer maneiras de controlar e minimizar os efeitos indesejados da quimioterapia.⁶ Os pró-fármacos são compostos quimicamente modificados, com pouca ou nenhuma atividade farmacológica, que são convertidos, *in situ*, nas espécies farmacologicamente ativas. A regeneração da atividade pode ser atingida por vários mecanismos, entre os mais comuns estão processos químicos como reações de óxido-redução e reações enzimáticas.⁷ Além disso, a 5FU tem baixa biodisponibilidade devido sua rápida degradação a diidrofluorouracila (DHFU) pela enzima diidropirimidina desidrogenase (DPD)^{8,9} (Esq. 1). Uma estratégia para contornar esse problema é a saturação da enzima DPD pela administração de seu substrato natural, uracila, em combinação com um pró-fármaco da 5FU.¹⁰ A 5FU pode ser transformada em um pró-fármaco pela funcionalização isolada ou conjunta das posições N1, N3, C2 e C4 (Fig. 1). Outra alternativa se dá pelo bloqueio do sítio de glicolisação da 5FU evitando assim seu reconhecimento pela DPD.¹¹ Esta última baseia-se na ativação bio-ortogonal de um pró-fármaco derivado da 5FU pela reação com paládio.

Esquema 1: Conversão da 5FU em DHFU



Fonte 2: o autor (2023).

2.2 QUÍMICA BIO-ORTOGONAL

Ortogonalidade é um conceito fundamental em química e se refere à capacidade de diferentes processos ou reações químicas ocorrerem simultaneamente, de maneira seletiva, e sem que interfiram uma com as outras. As reações ortogonais desempenham um papel crucial na química sintética, permitindo aos químicos a construção de moléculas e materiais complexos de modo controlado e preciso, modificando grupos funcionais específicos e evitando reações secundárias indesejadas.^{12,13} Recentemente, avanços na área levaram ao desenvolvimento de novos conceitos e metodologias integrando as reações ortogonais com a química supramolecular, catálise e química bio-ortogonal.^{14,15}

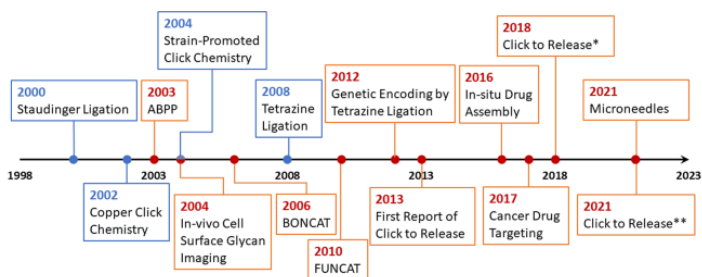
A química bio-ortogonal, um campo em rápida evolução na interface da química e da biologia, desenvolve e aplica reações químicas que podem ser realizadas em organismos vivos sem interferir com seus processos naturais. A descoberta dessas reações, que são ortogonais aos sistemas biológicos, revolucionou nossa capacidade de estudar e manipular sistemas biológicos com precisão sem precedentes. Essas reações podem ocorrer seletivamente na presença de moléculas biológicas e grupos funcionais, permitindo modificá-las sem interromper os processos celulares. Suas aplicações impactam áreas como o imageamento celular, administração de fármacos e terapia-alvo, permitindo o estudo e controle de sistemas biológicos a nível molecular.¹⁶⁻¹⁹

2.2.1 Perspectiva Histórica

A biologia química utiliza reações bio-ortogonais e quimiosseletivas para alterar espécies bioquímicas transformando-as em poderosas ferramentas que auxiliam no estudo de mecanismos biológicos e no desenvolvimento de novos fármacos. A reação de Staudinger talvez seja a pioneira desse ramo tão rico (Fig. 2). Em 1919, Meyer e Staudinger²⁰ descreveram a reação

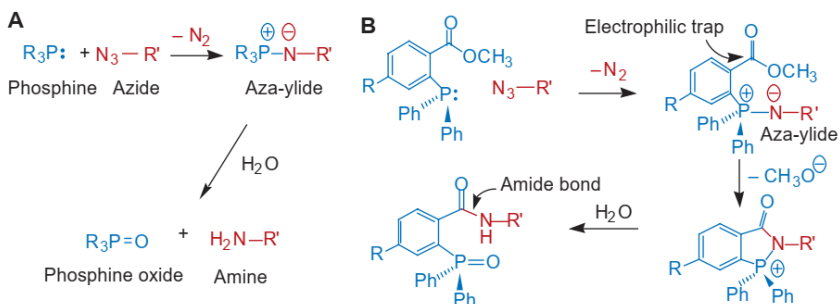
entre azidas e fosfinas na formação de aminas primárias (Esq. 2). Mais de oito décadas depois, em 2000, Bertozzi e Saxon²¹, através de modificações na reação de Staudinger propuseram uma metodologia seletiva para modificações químicas de superfícies celulares. Já em 2003, Bertozzi²² usou o termo bio-ortogonal pela primeira vez, propondo azidas como “alças” bio-ortogonais na modificação seletiva de glicoproteínas.

Figura 2: Linha do tempo da evolução da Química Bio-ortogonal.



Fonte 3: Referência 16

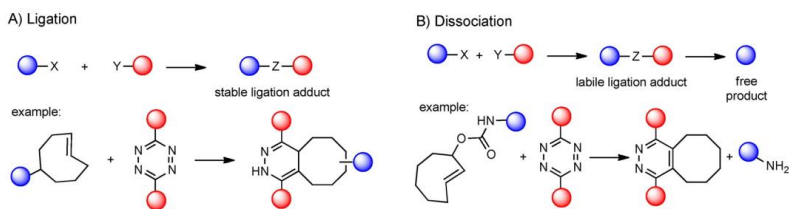
Esquema 2: A) reação clássica de Staudinger entre uma fosfina e uma azida; B) Modificação da reação de Staudinger que produz um aduto covalente estável.



Fonte 4: Referência 21

Desde seu surgimento até os dias atuais, o escopo da química bio-ortogonal cresceu exponencialmente (Fig. 2). O limite de suas aplicações ainda é desconhecido, contudo, os maiores avanços estão relacionados à marcação e imageamento de biomoléculas^{16,18,19} e a observação de seus processos biológicos e comportamento químico. Além do que, o desenvolvimento de terapias-alvo^{23,24}, que confere seletividade em tratamentos como a quimioterapia, aumentando sua efetividade e reduzindo seus efeitos adversos. Nesta, podemos destacar a ativação e liberação de biomoléculas e pequenas moléculas com atividade farmacológica (Esq. 3).²⁵

Esquema 3: Exemplos de reações bio-ortogonais de ligação e dissociação.



Fonte 5: Adaptada referência 25

2.3 CATÁLISE BIO-ORTOGONAL

Além de serem estáveis e compatíveis com as condições fisiológicas, as reações bio-ortogonais devem ocorrer seletivamente e com altos rendimentos. Devem envolver grupos funcionais que não ocorrem naturalmente em sistemas biológicos, formar produtos estáveis e acontecerem rapidamente, mesmo em concentrações baixas dos reagentes. Em geral, as transformações bio-ortogonais devem ter constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) maiores que $1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹⁶ O uso de catalisadores proporciona não só a possibilidade de se obter constantes de

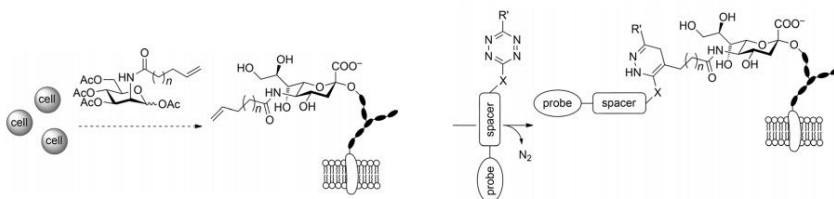
velocidade maiores, como também aumenta o escopo de substratos que podem participar de tais transformações. Nesse trabalho serão tratadas somente as reações bio-ortogonais catalisadas por metais de transição, com ênfase por aquelas catalisadas por paládio.

2.3.1 Reações Bio-ortogonais de Ligação

2.3.1.1 Reações de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC)

Tradicionalmente, destacaram-se as reações bio-ortogonais de ligação entre moléculas com sítios ativos formando novas ligações C-C ou C-N.^{26,27} Essas reações têm sido amplamente usadas na marcação de pequenas moléculas, proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos (Esq. 4).²⁸⁻³²

Esquema 4: Estratégia para modificação de oligossacarídeos usando alcenos terminais como grupos químicos reportadores.

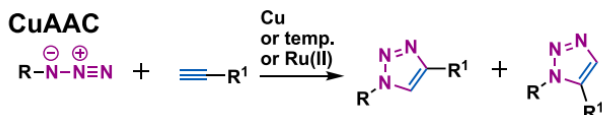


Fonte 6: Referência 31

Em 2002, foi reportada pela primeira vez a reação *click* de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC) (Esq. 5). Desde então, tem sido uma das reações *click* mais utilizadas devido ao seu tempo curto e grandes rendimentos em condições fisiológicas.^{33,34} As reações *click* referem-se a ligações químicas altamente eficientes, específicas e que ocorrem em condições brandas. São essenciais em vários ramos da química, como ciências

dos materiais e medicina química. Tem grande valor na síntese de moléculas complexas e desenvolvimento de fármacos.^{35,36}

Esquema 5: Reação click CuAAC.



Fonte 7: Referência 36

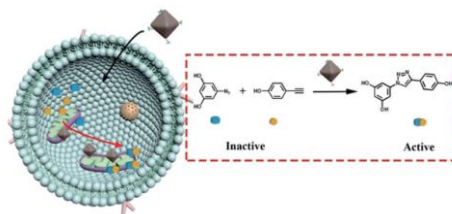
Em 2019, Qu e colaboradores³⁷ desenvolveram um catalisador heterogêneo de cobre em um *framework* metal-orgânico, que se acumula preferencialmente na mitocôndria das células, para síntese *in vivo* de um fármaco através de uma reação CuAAC (Esq. 6). Os testes em modelos animais demonstraram que o fármaco sintetizado *in vivo* apresentava aumento da eficiência terapêutica e diminuição dos efeitos adversos quando comparados com a administração convencional do fármaco. Contudo, as aplicações biomédicas das reações CuAAC exibem limitações associadas à citotoxicidade do cobre e sensibilidade a oxidação dos íons Cu^{I} .³⁸

2.3.1.2 Reações de acoplamento catalisadas por Paládio

A descoberta das reações de acoplamento C-C como Suzuki-Miyaura, Mizoro-Heck e Sonogashira adicionaram ferramentas versáteis aos métodos sintéticos orgânicos modernos e têm sido usadas na funcionalização de biomoléculas *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, as reações exibiam pouca eficiência e biocompatibilidade, sendo necessário o uso de grandes quantidades de catalisador, altas temperaturas e a presença de um co-solvente orgânico.³⁹⁻⁴² Desenvolvimentos posteriores levaram a descoberta de aditivos e sistemas catalíticos que permitiram as reações de

acoplamento C-C com amplo escopo de substratos e utilidade em sistemas biológicos.^{43,44}

Esquema 6: Síntese de fármaco *in vivo* através de reação CuAAC.

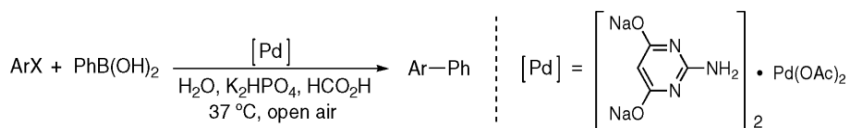


Fonte 8: Referência 37.

2.3.1.2.1 Suzuki-Miyaura cross-coupling

A reação de acoplamento Suzuki-Miyaura, entre haletos de arila e ácidos borônicos, tem sido o processo de acoplamento mais estudado nas últimas décadas, pois funciona em meio aquoso e condições brandas, tolera vários grupos funcionais, além da disponibilidade e baixo custo dos reagentes.⁴⁵ Assim, em 2009 Davis e colaboradores⁴⁶ conduziram essa reação em condições fisiológicas, demonstrando uma maneira eficiente de alcançar o acoplamento C-C em um substrato proteico em água (Esq. 7).

Esquema 7: Acoplamento Suzuki-Miyaura em meio aquoso.

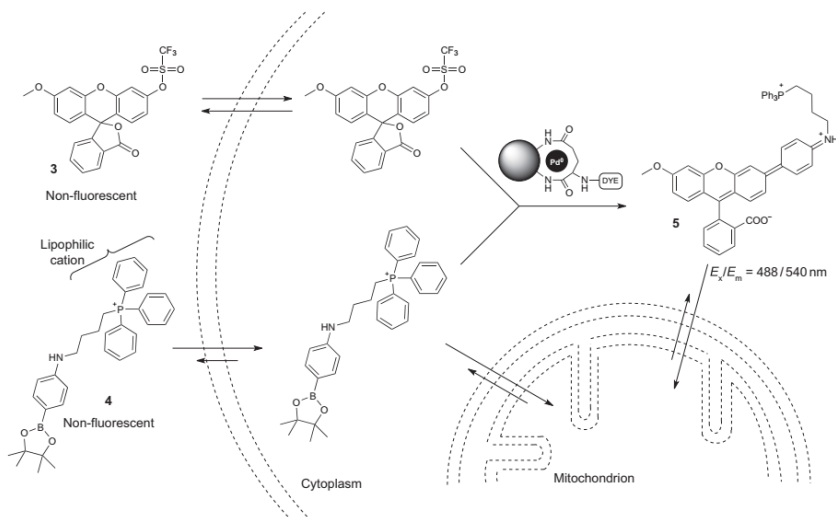


Fonte 9: Referência 46.

Já em 2011, Bradley, Unciti-Broceta e colaboradores, reportaram um acoplamento Suzuki-Miyaura intracelular usando nanopartículas de paládio confinadas em microesferas de

poliestireno (Esq. 8). Além do que, demonstraram ser possível conduzir a reação em diferentes meios como em PBS, extratos celulares ou DMF.⁴⁷

Esquema 8: Acoplamento Suzuki-Miyaura intracelular.



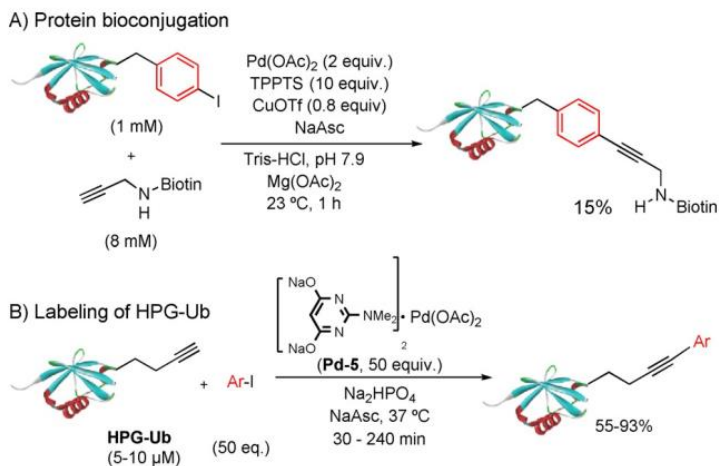
Fonte 10: Referência 47.

2.3.1.2.2 Reações de Acoplamento tipo Sonogashira

As reações de Sonogashira consistem em um acoplamento de uma alcino terminal com um haleto de arila na presença de sais de Cu^I e um catalisador de paládio. A primeira aplicação dessa reação na modificação de proteínas foi reportada por Tachibana e colaboradores⁴¹, contudo, as condições não eram biocompatíveis dada a presença de um sal de cobre (I), ascorbato de sódio e grande quantidade de paládio. Li e colaboradores⁴⁸ usaram um catalisador modificado e realizaram uma reação de acoplamento Sonogashira, livre de cobre, de um resíduo proteico contendo um alcino terminal, com uma variedade de iodetos de arila com bons rendimento (Esq.

9). Ademais, em 2014 Li demonstrou ser possível realizar a reação de acoplamento em superfícies de células vivas de mamíferos.⁴⁹

Esquema 9: A) Acoplamento de Sonogashira bioconjugação proteica, e B) marcação seletiva de um resíduo proteico utilizando acoplamento de Sonogashira livre de cobre.



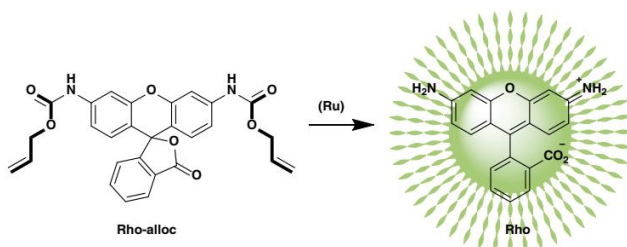
Fonte 11: Referência 50

2.3.2 Reações Bio-ortogonais de Clivagem

Outra categoria de reações bio-ortogonais consiste da quebra de ligações catalisadas por metais de transição⁵⁰ (Esq. 10) ou baseadas na estratégia *click-to-release*, sem o uso de metais como catalisadores⁵¹.

Entre o repertório da química bio-ortogonal, as reações de clivagem são mecanisticamente distintas das reações de acoplamento (Esq. 11). Valem-se de que, pequenas moléculas ou biomoléculas modificadas com grupos insaturados (duplas ou triplas), podem ser reativadas na presença de um metal de transição.⁵²

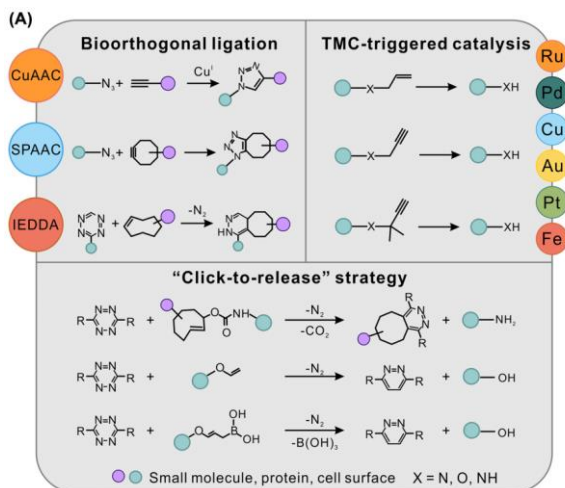
Esquema 10: Clivagem catalisada por metal de transição.



Fonte 12: Adaptada referência 50.

Quando comparadas com os métodos tradicionais de clivagem, ativadas por radiação luminosa ou por pequenas moléculas, a clivagem catalisada por metais de transição como rutênio (Ru), paládio (Pd), cobre (Cu) ou platina (Pt) apresentam maior seletividade e melhor penetração de células e tecidos.⁵³

Esquema 11: Visão ampla da Química Bio-ortogonal

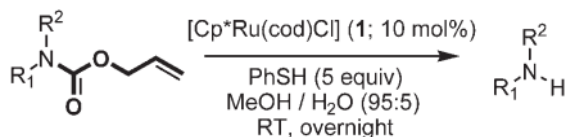


Fonte 13: Referência 54

Apesar da habilidade de compostos organometálicos em catalisar a liberação de pró-fármacos *in vivo*, sua aplicação apresenta desafios. A presença de água, ar e uma infinidade de substância como os tióis e amins, envenenam os catalisadores metálicos, especialmente em ambientes próticos e aeróbicos.⁵⁵

Em 2006, Streu e Meggers reportaram a primeira reação de clivagem catalisada por rutênio de uma amina protegida pelo grupo aliloxycarbonil (Alloc) dentro de uma célula viva (Esq. 12).⁵⁶ Posteriormente, Mascareñas e colaboradores demonstraram ser possível ativar intercaladores de DNA, pela clivagem bio-ortogonal do mesmo grupo protetor (Alloc), usando um complexo de rutênio dentro de células de mamíferos.⁵⁷ Contudo, em um trabalho publicado por Waymouth e Wender, dúvidas sobre as reações de dealilação ocorrem intracelularmente foram levantadas.⁵⁸ Porém, estudos posteriores confirmaram que complexos de rutênio devidamente planejados são capazes de realizar reações de dealilação em meio aquosos biologicamente relevantes e intracelularmente.^{50,59}

Esquema 12: Reação intracelular de clivagem bio-ortogonal catalisada por rutênio.



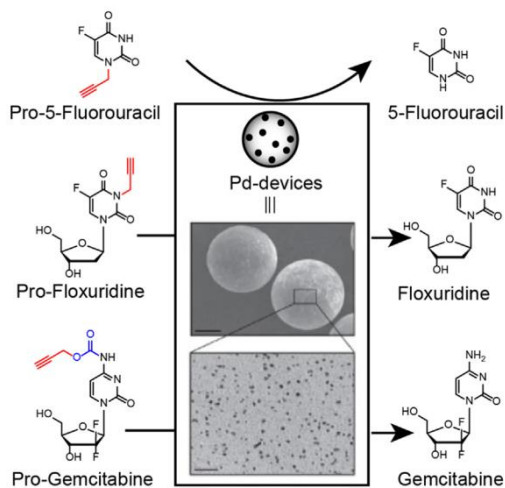
Fonte 14: Referência 56

2.3.2.1 Paládio nas reações de clivagem bio-ortogonal

Os grupos protetores alil e propargil são amplamente usados na síntese de peptídeos e podem ser clivados por catalisadores metálicos, notavelmente os de paládio (Pd).⁶⁰ Ambos grupos são demonstravelmente “*handles*” bio-ortogonais em

reações bio-ortogonais de ligação, além disso, espécies de Pd não participam de nenhuma reação biológica conhecida.⁶¹ Essas características tornam o Pd um excelente candidato para promover reações de dealilação e despropargilação *in vivo*. A despropargilação talvez seja a reação mais usada na desproteção mediada por Pd. Unciti-Broceta e colaboradores reportaram uma série de reações de despropargilação de pró-fármacos quimioterápicos, intra e extracelular, na presença de Pd (Esq. 13).^{52,62-64} As reações foram mediadas por resinas bio-compatíveis funcionalizadas com Pd(0) e resultaram na liberação do fármaco e reativação de suas atividades antitumorais. De modo similar, em 2018 foi reportado a ativação de um pró-fármaco derivado da doxorrubicina (Dox), onde um catalisador de Pd foi guiado com auxílio de ultrassom possibilitando a ativação localizada no tumor, minimizando efeitos adversos associados à administração da Dox.

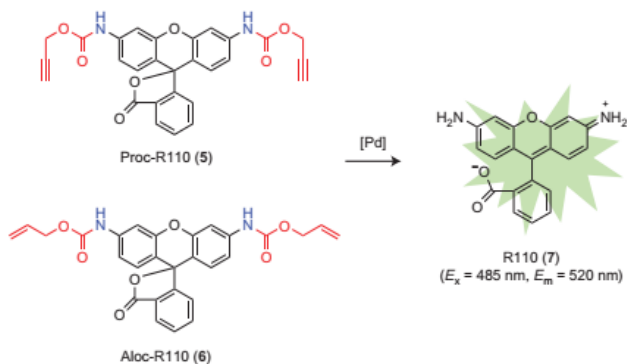
Esquema 13: Modelos de pró-fármacos ativados pela reação com Pd.



Fonte 15: Referência 65.

Em 2014, Chen e colaboradores, publicaram um trabalho relatando o uso de catalisadores discretos de Pd na despropargilação e dealilação na ativação de proteínas *in vivo*.⁶⁶ A efetividade das reações foi monitorada pela desproteção de um fluoróforo protegido pelo grupo propargil ou alil, que recuperava sua fluorescência ao reagir com Pd (Esq. 14). Entre os catalisadores estudados, Pd₂(allyl)₂Cl₂ e Pd(dba)₂ resultaram na desproteção mais efetiva para os dois grupos quando em quantidades equimolares de Pd e substrato (10 μmol/L) e em 5% DMSO/H₂O. Resultados similares foram obtidos para o grupo propargil em tampão PBS a 37 °C e 10 mol % de Pd, com redução drástica na conversão para o grupo alil. O trabalho de Chen representou um importante passo na direção da aplicabilidade de catalisadores de Pd no controle da atividade biológica de proteínas *in vivo*. Demonstrou também que entre as espécies de Pd, Pd(0) mostrou-se mais biocompatível que suas formas iônicas^{47,66}, e com maior reatividade com o grupo propargil quando comparada ao grupo alil.⁶²

Esquema 14: Reativação de fluoróforo mediada por Pd.



Fonte 16: Referência 66

Contudo, resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que a reação de desproteção de substratos propargílicos ocorrem cerca de 15 vezes mais rapidamente na presença de Pd(II) do que com Pd(0).⁶⁷ De fato, é possível observar que a reação possui uma fase rápida e outra fase lenta, uma vez que complexos de Pd(II) são conhecidos por formarem clusters e nanopartículas de Pd(0).^{68,69,70}

2.3.2.2 Paládio: Catálise Homogênea vs. Catálise Heterogênea

Apesar do potencial inerente do paládio na química bio-ortogonal, existe espaço para otimização e melhora nas suas aplicações *in vivo*. Em geral, para as reações *in vitro* paládio pode ser usado em quantidades catalíticas, enquanto que em células ou outros meios biológicos complexos, é necessário o uso equimolar ou excesso do mesmo, já que reações paralelas com biomoléculas podem desativar sua capacidade catalítica. A descoberta e desenvolvimento de novos ligantes, ou o uso de sistemas pré-catalíticos, os quais são prontamente ativados nas condições reacionais, desempenharão um papel crucial na química do paládio *in vivo*. Além disso, catalisadores heterogêneos de paládio podem potencialmente evitar a desativação por reações com biomoléculas. A escolha de protocolo depende do objetivo. A abordagem da catálise homogênea é mais conveniente na marcação de biomoléculas, já a catálise heterogênea é mais apropriada para ativação de fármacos quando a administração controlada é desejada. Todos esses aspectos devem ser confrontados na transição entre bancada e os estudos pré-clínicos, e o sucesso desse caminho dependerá da nossa capacidade em desenvolver métodos e estratégias para superá-los.⁷¹

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo contribuir para o desenvolvimento das reações de clivagem bio-ortogonais mediadas por paládio. Para isso, busca-se sintetizar e caracterizar pró-fármacos derivados do quimioterápico 5-Fluorouracila, assim como avaliar suas reatividades na presença de catalisadores de paládio, visando criar estratégias mais eficientes para ativar pró-fármacos em células cancerosas.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar seis pró-fármacos derivados da 5FU, dos quais três já são descritos e três são inéditos;
- Caracteriza por espectroscopia de ressonância nuclear magnética e espectrometria de massas de alta resolução;
- Testar e avaliar suas reatividades em condições fisiológicas na presença de diferentes catalisadores de paládio.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

A 5-Fluorouracila (5FU) utilizada na síntese dos pró-fármacos foi adquirida da Oakwood Chemical. O álcool 4-Hidroxibenzílico, Brometo de Propargila, DBU (1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene), NaH, Bicarbonato di-terc-butílico, Na_2PdCl_4 , $\text{Pd}(\text{dba})_2$, Pd/C, DMSO- d_6 e Clorofórmio- d foram comprados da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. O Carbonato de Potássio, Sulfato de Sódio Anidro, Acetonitrila foram comprados da Neon e usados sem purificação prévia. DMSO e DMF foram comprados da Vetec e usados sem purificação. Hexano, Acetato de Etila e Cloreto de Metileno foram comprados da Rauter, e o Hexano foi previamente destilado. Silica Gel (230-400 Mesh) foi comprada da Macherey-Nagel. As soluções aquosas de Tampão Fosfato Salino (PBS) foram feitas com água ultrapura e pastilhas da Sigma-Aldrich. A água utilizada em reações e demais experimentos foi deionizada através de um sistema de troca iônica pelo equipamento TKA Smart2Pure.

4.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Carbono e Flúor – RMN de ^1H , ^{13}C , ^{19}F

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{19}F dos substratos sintetizados e produtos da reação de desproteção foram obtidos em um espectrômetro VARIAN-FT-RMN 400 MHz e VARIAN-FT-RMN 200 MHz na central de análises do Departamento de Química da UFSC. Os deslocamentos de hidrogênio e carbono foram registrados em ppm e tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0$ ppm) como padrão interno. Para os espectros de flúor, usou-se como padrão

interno o 4-Fluorofenol ($\delta = -125$ ppm). Os solventes usados foram *d6*-DMSO, D₂O ou uma mistura dos dois.

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC

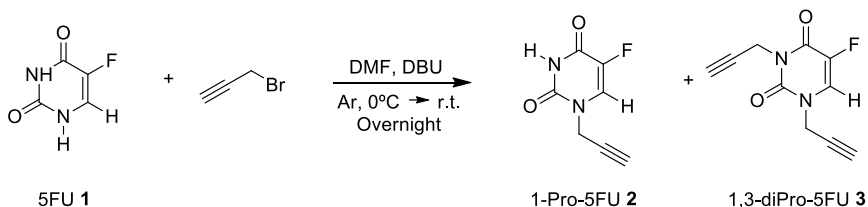
As reações de desproteção foram monitoradas em um cromatógrafo Shimatzu LCMS-2020, *dual pump* e detector de arranjo de diodos (DAD) na central de análises do Departamento de Química da UFSC. A coluna usada foi uma VARIAN C18 250 mm X 4.6 mm. A fase móvel foi composta de acetonitrila (HPLC), água ultrapura e ácido trifluoroacético 99% (TFA).

4.3 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DERIVADOS DA 5-FU

4.3.1 Síntese dos pró-fármacos 5-fluoro-3-propargiluracila (2) (1-Pro-5FU) e 1,3-dipropargil-5-fluorouracil (3) (1,3-diProp-5FU)

Em balão de fundo redondo à uma solução de 5-Fluorouracila (0,611 g, 4,69 mmol, 1 equiv.) em DMF (10 mL), foi adicionado DBU (13,3 mmol, 2,83 equiv.). A solução foi resfriada em banho de gelo (0 °C) e, sob atmosfera inerte, brometo de propargila (9,28 mmol, 1,98 equiv.) foi adicionado lentamente com auxílio de uma seringa sob agitação constante. A reação foi retirada o banho de gelo e a temperatura ambiente a reação continuou *overnight*. Após aproximadamente 16 horas, a reação foi concentrada sob pressão reduzida e purificada com sílica-gel em coluna cromatográfica (eluente: 3% MeOH/DCM). Rendimento: **1-Pro-5FU 2** (0,161 g, 0,96 mmol, 20,5%, Rf = 0,15 – 3% MeOH/DCM), produto foi isolado como um sólido branco. ¹H RMN (200 MHz, DMSO) δ 11.92 (s, 1H), 8.13 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 2.5 Hz, 3H), 3.45 (t, J = 2.5 Hz, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, DMSO) δ 157.76 (d, J = 25.82), 149.47, 140.22 (d, J = 229.32 Hz), 129.34 (d, J = 34.13 Hz), 78.55, 76.55, 37.42. ¹⁹F RMN (376 MHz, DMSO) (s, δ -167,06, 1F). **1,3-diPro-5FU 3** (0,263 g, 1,27 mmol, 27,2%, Rf = 0,70 – 3% MeOH/DCM), produto foi isolado como um sólido branco. ¹H RMN (200 MHz, DMSO) δ 8.28 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 4.55 (t, J = 2.1 Hz, 7H), 3.49 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 3.19 (t, J = 2.5 Hz, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, DMSO) δ 156.28 (d, J = 26.1 Hz), 148.89, 139.57 (d, J = 229.07 Hz), 128.73 (d, J = 34.1 Hz), 78.75, 78.26 (CH), 76.97, 73.99 (CH), 38.67 (CH₂), 31.14 (CH₂). ¹⁹F RMN (376 MHz, DMSO) δ -164,96, 1F.

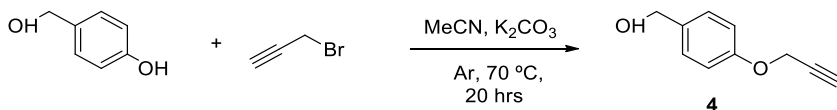
Esquema 15: Síntese dos pró-fármacos 1-Pro-5FU **2** e 1,3-diPro-5FU **3**



4.3.2 Síntese do [4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil]metanol (**4**)⁷²

Em um balão de fundo redondo álcool 4-hidroxibenzílico (0,745 g, 6,0 mmol, 1,0 equiv.) e K_2CO_3 (0,954 g, 6,9 mmol, 1,15 equiv.) foram dissolvidos em MeCN (25 mL). A reação foi agitada por 1 hora sob atmosfera inerte a temperatura ambiente. Brometo de propargila (7,2 mmol, 1,2 equiv.) foi dissolvido em MeCN (3 mL) e adicionado ao balão com auxílio de uma seringa. A reação foi agitada por 20 horas a 70 °C. Após, a reação foi retirada do aquecimento até atingir a temperatura ambiente. A reação foi filtrada em cama de celite e o filtrado concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado com sílica-gel em coluna cromatográfica (eluente: 0-50% EtOAc/Hex) Rendimento: (0,590 g, 2,62 mmol, 43,7%, Rf = 0,57 – 50:50 EtOAc/Hex) O produto foi isolado como um óleo amarelado.

Esquema 16: Síntese do intermediário propargílico **4**.

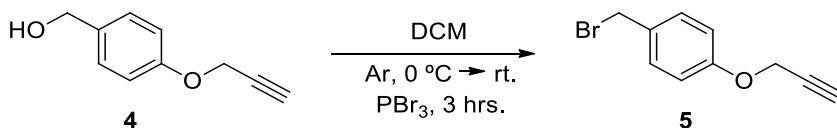


4.3.3 Síntese do 1-(bromometil)-4-(prop-ino-1-iloxi)benzeno (**5**)⁷³

Em um balão de fundo redondo o álcool benzílico intermediário **4** (1,0 g, 6,16 mmol, 1,0 equiv.) foi dissolvido em DCM (35 mL) seco em peneira molecular (3Å). A solução foi

resfriada em banho de gelo por 10 minutos. À solução resfriada foi adicionado lentamente PBr_3 (12,33 mmol, 2,0 equiv.) sob agitação vigorosa. A reação foi retirada do banho de gelo até atingir temperatura ambiente, e continuou sob agitação constante por 3 horas. Após 3 horas a reação foi novamente colocada em banho de gelo, e com auxílio de uma seringa sob agitação vigorosa, foi adicionado uma solução saturada de NaHCO_3 até que a formação de gás não fosse mais observada. O meio foi diluído com 10 mL de água gelada e extraída com DCM (3x30 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada em funil de vidro com algodão e concentrada sob pressão reduzida. A formação do produto foi identificada por CCD ($R_f = 0,88 - 40:60 \text{ EtAOc/Hex}$). O produto foi usado nas próximas etapas sem purificação.

Esquema 17: Síntese do intermediário brometo propargílico **5**.

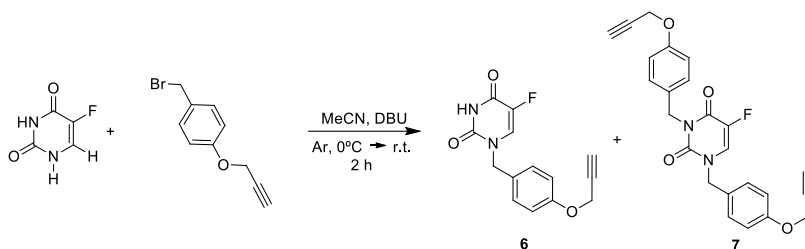


4.3.4 Síntese dos pró-fármacos 5-fluoro-1,3-bis[4-(prop-2-in-1-iloxi)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**7**) - 1,3-Dibnzpro-5FU e 5-fluoro-1-[4-(prop-2-ino-1-iloxi)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**6**) - 1-Bnzpro-5FU

Em um balão de fundo redondo 5FU (0,681 g, 5,24 mmol, 1,0 equiv.) e DBU (3,98 mmol, 0,76 equiv.) foram adicionados em MeCN (30 mL). A solução foi mantida sob agitação a temperatura ambiente até que nenhum sólido fosse observado. A solução foi colocada em banho de gelo sob agitação constante, após 10 minutos o brometo intermediário **5** foi dissolvido em MeCN (3 mL) e adicionado ao balão com auxílio de uma seringa. O sistema reacional foi retirado do banho de gelo e mantida sob agitação a temperatura ambiente até que o brometo **5** não fosse mais

observado por CCD. A reação foi concentrada sob pressão reduzida e os produtos purificados com sílica-gel em coluna cromatográfica (eluente: 20-80% EtAOc/Hex). Rendimento: **1,3-Dibnzpro-5FU 7** (0,396 g, 0,948 mmol, 18,1%), produto isolado como um sólido amarelado. **¹H RMN (200 MHz, DMSO)** δ 8.33 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.17 (m, 4H), 7.06 – 6.80 (m, 4H), 4.92 (s, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.77 (dd, J = 2.4 Hz, 4H), 3.55 (q, J = 2.4 Hz, 2H). **¹³C RMN (50 MHz, DMSO)** δ 157.15 (dd, J = 19.1 Hz), 150.12 (2C), 139.69 (d, J = 228.07 Hz), 129.76 (4C), 129.34 (2C), 129.36 (d, J = 36.2 Hz), 115.39 (2C), 115.12(2C), 79.65 (2C), 78.63 (2C), 55.82 (2C), 51.77, 44.19. **¹⁹F RMN (376 MHz, DMSO)** δ - 165.84, 1F. **TOF MS ES+ (m/z):** calc para C₂₄H₁₉FN₂O₄Na = 441.1227, encontrado = 441.1227. **Análise elementar** calc: C 68,89%, H 4,58%, N 6,70%, encontrado: C 67,56%, H 4,52%, N 5,53%. **1-Bnzpro-5FU 6** (0,414 g, 1,51 mmol, 28,8%, R_f = 0,46 (40:60/Hex:EtAOc), produto isolado como um sólido branco. **¹H RMN (200 MHz, DMSO)** δ 11.81 (s, 1H), 8.21 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.40 – 7.19 (m, 2H), 7.07 – 6.85 (m, 2H), 4.78 (d, 2H), 4.75 (s, 2H), 3.55 (t, 1H), **¹³C RMN (50 MHz, DMSO)** δ 158.06 (d, J = 25.0 Hz), 157.28, 150.04, 140,19 (d, J = 229.3 Hz), 130.03 (d, J = 33.2 Hz) , 129.97, 129.60 (2C), 115.40 (2C), 79.63, 78.67, 55.84, 50.51. **¹⁹F RMN (376 MHz, DMSO)** δ -167.74, 1F. **TOF MS ES+ (m/z):** calc para C₁₄H₁₁FN₂O₃ = 274.0754, encontrado = 274.2750. **Análise elementar** calc: C 61,31%, H 4,04%, N 10,21%, encontrado: C 60,62%, H 3,87%, N 9,66%.

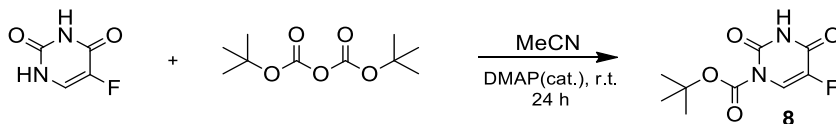
Esquema 18: Síntese dos pró-fármacos 1,3-Dibenzpro-5FU **7** e 1-Benzpro-5FU **6**.



4.3.5 Síntese do tert-butil 5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-diidropirimidina-1(2H)-carboxilato (**8**) - N-1-Boc-5FU⁷⁴

Em um balão de fundo redondo 5FU (1,28 g, 9,84 mmol, 1 equiv.) e DMAP (24 mg, 0,19 mmol, 0,02 equiv) foram dissolvidos em 30 mL de MeCN. Em seguida, BOC₂ (2,15 g, 9,84 mmol, 1 equiv) foi adicionado ao balão sob agitação constante. A reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. O solvente foi retirado sob pressão reduzida, e o produto obtido como um sólido branco foi utilizado nas próximas etapas sem purificação.

Esquema 19: Síntese intermediário N-1-Boc-5FU **8**.

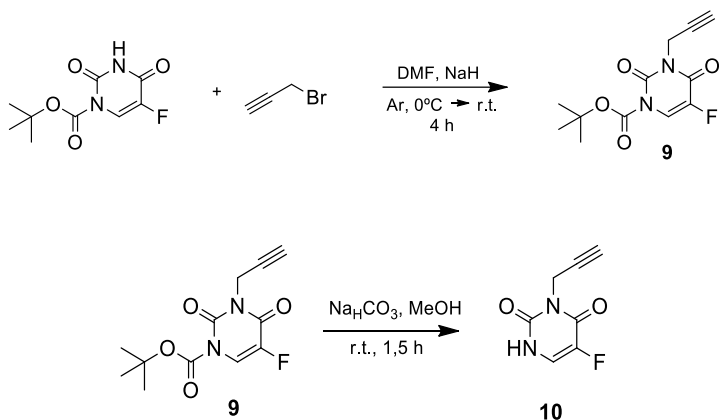


4.3.6 Síntese do 5-fluoro-3-(prop-2-ino-1-yl)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**10**) - 3-Pro-5FU^{74,75}

Em um balão de fundo redondo uma suspensão de 60% de NaH (210 mg, 5,21 mmol, 1,2 equiv.) foi adicionada a 25 mL de DMF em banho de gelo. N-1-Boc-5FU **8** foi adicionado ao balão e a reação foi agitada a 0 °C por 30 min. Após, brometo de propargila (620 mg, 5,21 mmol, 1,2 equiv) foi adicionado lentamente à reação.

O balão foi tampado, e a reação retirada do banho de gelo, e a temperatura ambiente ficou sob agitação por 4h. Ao fim da reação, o solvente foi retirado sob pressão reduzida e o produto usado na próxima etapa sem purificação. O produto alquilado **9** foi dissolvido em MeOH (15 mL), e sob agitação, uma solução saturada de NaHCO₃ (8 mL) foi adicionada ao balão. A reação foi mantida sob agitação constante e a temperatura ambiente por 1,5 h. Após, a reação foi concentrada sob pressão reduzida e extraída com DCM (3x25 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o solvente retirado sob pressão reduzida e o produto purificado com sílica-gel em coluna cromatográfica (eluente: 3% MeOH/DCM). **3-Pro-5FU 10** Rendimento: (167,2 mg, 0,995 mmol, 22,9 %, R_f = 0,19 – 3% MeOH/DCM) O produto foi isolado como um sólido branco. **¹H RMN (200 MHz, DMSO)** δ 11.27 (s, 1H), 7.91 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 4.49 (m, 2H), 3.15 (t, J = 2.5 Hz, 1H). **¹³C RMN (50 MHz, DMSO)** δ 156.94 (d, J = 26.25 Hz), 149.56, 139.69 (d, J = 227.57 Hz), 125.97 (d, J = 31.41 Hz), 79.06, 73.59, 30.20. **¹⁹F RMN (376 MHz, DMSO)** δ -167.71, 1F.

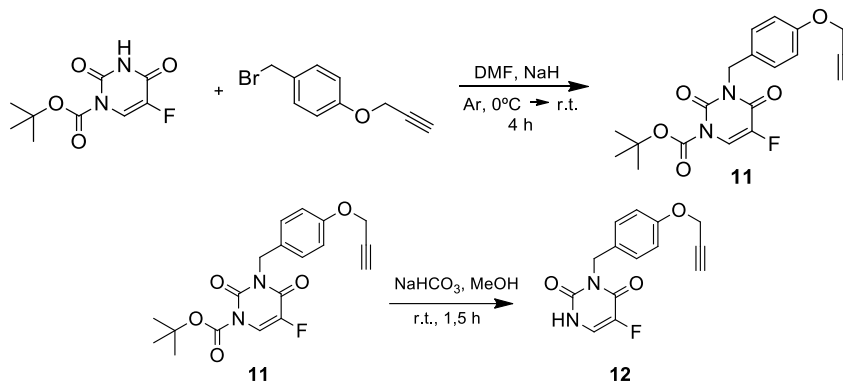
Esquema 20: Síntese do pró-fármaco 3-Pro-5FU **10**.



4.3.7 Síntese do 5-fluoro-3-[4-(prop-2-ino-1-iloxi)benzil]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**12**) - **3-BnzPro-5FU**

Em um balão de fundo redondo uma suspensão de 60% de NaH (154 mg, 3,83 mmol, 1,2 equiv.) foi adicionada a 15 mL de DMF em banho de gelo. N-1-Boc-5FU **8** (736,6 mg, 3,2 mmol, 1 equiv.) foi adicionado ao balão e a reação foi agitada a 0 °C por 30 min. Após, o brometo intermediário **5** (862 mg, 3,83 mmol, 1,2 equiv) foi adicionado à reação. O balão foi tampado, e a reação retirada do banho de gelo, e a temperatura ambiente ficou sob agitação por 4h. Ao fim da reação, o solvente foi retirado sob pressão reduzida e o produto usado na próxima etapa sem purificação. O produto alquilado **11** foi dissolvido em MeOH (9 mL), e sob agitação, uma solução saturada de NaHCO₃ (4,5 mL) foi adicionada ao balão. A reação foi mantida sob agitação constante e a temperatura ambiente por 1,5 h. Após, a reação foi concentrada sob pressão reduzida e extraída com DCM (3x25 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o solvente retirado sob pressão reduzida e o produto purificado com sílica-gel em coluna cromatográfica (eluente: 20-80% EtAOc/Hex). **3-BnzPro-5FU 12** Rendimento: (458,7 mg, 1,67 mmol, 52%, R_f = 0,44 60% EtAOc/Hex) O produto foi isolado como um sólido branco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 11.19 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.88 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.88 (s, 2H), 4.75 (d, 2H), 3.55 (t, J = 1.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, DMSO) δ 157.79 (d, J = 24.56 Hz), 156.94, 150.34, 139.88 (d, J = 228.67 Hz), 130.00, 129.76, 125.67 (d, J = 32.48 Hz), 115.14, 79.72, 78.64, 55.83, 43.33 ¹⁹F RMN (376 MHz, DMSO) δ -167.54, 1F. TOF MS ES+ (m/z): calc para C₁₄H₁₁FN₂O₃ = 274.0754, encontrado = 274.2750

Esquema 21: Síntese do pró-fármaco 3-Bnzpro-5FU X7



4.4 ESTUDOS DE DESPROPARGILAÇÃO

4.4.1 Catálise Heterogênea

4.4.1.1 Reação de Desproteção Catalisada por Paládio II Suportado em Grafeno (Pd II@Grafeno 4,6% wt)

As reações de desproteção foram analisadas por cromatografia líquida, com detector DAD $\lambda = 265$ nm, coluna Varian C18 250 mm x 4,6 mm, fase móvel (A) água (TFA/0,025% - pH 2,38) e (B) MeCN (A/B 70:30 isocrático, 20 min) A conversão foi calculada pela área dos picos da 5FU no cromatograma, relacionando-as com a curva de calibração previamente adquirida.

Uma solução estoque de 5FU foi preparada dissolvendo-se 3,52 mg em uma solução 10% DMSO em água com volume necessário para se obter a concentra de 2,0 mmol/L de 5FU. A curva foi preparada de modo que cada ponto tivesse concentração final de DMSO igual a 1,25 %.

Tabela 1: Volumes das soluções utilizados no preparo da curva de calibração da 5FU na conversão Heterogênea (Pd II) dos pró-fármacos propargílicos.

[5FU] μmol/L	Estoque (μL)	DMSO (μL)	PBS (μL)	Volume total (μL)
10	10	24,0	1965,0	2000
25	25	22,5	1952,5	2000
50	50	20,0	1930,0	2000
100	100	15,0	1885,0	2000
125	125	10,0	1840,0	2000

As reações foram realizadas a 37 °C sob agitação constante durante 24h. Os substratos foram preparados a partir de uma solução estoque (8,0 mmol/L), dissolvidos em PBS a fim se obter concentração final de 100 μmol/L e 1,25 % DMSO em água. O catalisador foi pesado separadamente para cada substrato, levando-se em conta a porcentagem de Pd por massa de catalisador (4,6 % wt de Pd II), de maneira a obter-se uma concentração equimolar de Pd II na solução final. As alíquotas foram coletadas no tempo 0h, 6h e 24h. Cada alíquota, com volume de 2 mL, foi filtrada em um filtro de seringa 0,45 μm, transferida para um eppendorf e armazenada sob refrigeração.

Tabela 2: Volume das soluções utilizadas nas reações de despropargilação.

	[Substrato] μmol/L	Catalisador (mg)	[Pd II] μmol/L	Volume total (μL)
3	100	4,06	195,0	9000
2	100	1,94	93,2	9000
10	100	2,09	100,4	9000
7	100	4,00	192,0	9000
6	100	2,08	99,9	9000
12	100	2,03	97,5	9000

4.1.1.2 Reação de Desproteção Catalisada por Paládio 0 em Carbono Ativado (Pd/C 10% wt)

As reações de desproteção foram analisadas por cromatografia líquida, com detector DAD $\lambda = 265$ nm, coluna Varian C18 250 mm x 4,6 mm, fase móvel (A) água (TFA/0,025% - pH 2,38) e (B) MeCN (A/B 70:30 isocrático, 20 min) A conversão foi calculada pela área dos picos da 5FU no cromatograma, relacionando-as com a curva de calibração previamente adquirida.

Uma solução estoque de 5FU foi preparada dissolvendo-se 3,52 mg em uma solução 10% DMSO em água com volume necessário para obter-se a concentra de 2,0 mmol/L de 5FU. A curva foi preparada de modo que cada ponto tivesse concentração final de DMSO igual a 1,25 %.

Tabela 3: Volumes das soluções utilizadas no preparo da curva de calibração da 5FU na conversão Heterogênea (Pd0) dos pró-fármacos propargílicos.

[5FU] $\mu\text{mol/L}$	Estoque (μL)	DMSO (μL)	PBS (μL)	Volume total (μL)
10	10	24,0	1966,0	2000
25	25	22,5	1952,5	2000
50	50	20,0	1930,0	2000
100	100	15,0	1885,0	2000
150	150	10,0	1840,0	2000
200	200	5	1795,0	2000
250	250	0	1750,0	2000

As reações foram realizadas a 37 °C sob agitação constante durante 24h. Os substratos foram preparados a partir de uma solução estoque (8,0 mmol/L, 50% DMSO em PBS), diluídos em PBS a fim obter-se concentração final de 200

$\mu\text{mol/L}$ e 1,25 % DMSO em água. O catalisador foi pesado separadamente para cada substrato, levando-se em conta a porcentagem de Pd por massa de catalisador (10 % wt de Pd 0), de maneira a obter-se uma concentração equimolar de Pd 0 na solução final. As alíquotas foram coletadas no tempo 0h, 6h e 24h. Cada alíquota, com volume de 2 mL, foi filtrada em um filtro de seringa 0,45 μm , transferida para um eppendorf e armazenada sob refrigeração.

Tabela 4: Volume das soluções utilizadas nas reações de desproteção com Pd 0.

	[Substrato] $\mu\text{mol/L}$	Catalisador (mg)	[Pd 0] $\mu\text{mol/L}$	Volume total (μL)
3	200	3,90	407,0	9000
2	200	1,92	200,0	9000
10	200	1,88	196,0	9000
7	200	3,89	406,0	9000
6	200	1,89	197,0	9000
12	200	1,98	206,0	9000

4.4.2 Catálise Homogênea

4.4.2.1 Reação de Desproteção dos Compostos 1,3-diPro-5FU **3**, 1-Pro-5FU **2** e 3-Pro-5FU **10**

As reações de desproteção foram analisadas por cromatografia líquida, com detector DAD $\lambda = 265 \text{ nm}$, coluna Varian C18 250 mm x 4,6 mm, fase móvel (A) água (TFA/0,025% - pH 2,38) e (B) MeCN (A/B 10:90 para 40:60 em 1 min, 40:60 isocrática por 5 min, 40:60 para 10:90 em 1 min, 10:90 isocrático por 13 min) A conversão foi calculada pela área dos picos da 5FU

no cromatograma, relacionando-as com a curva de calibração previamente adquirida.

A curva foi preparada a partir de solução estoque de 5FU 800 $\mu\text{mol/L}$ 12,5% DMSO em PBS, diluindo-se o volume necessário em MeCN para obter-se as concentrações dos pontos da curva em volume final de 4 mL.

Tabela 5: Curva de calibração para as reações de desproteção dos substratos 1,3-diPro-5FU **3**, 1-Pro-5FU **2** e 3-Pro-5FU **10**

[5FU] $\mu\text{mol/L}$	Estoque (μL)	MeCN (μL)	Volume Total (μL)
10	50	3950	4000
25	125	3875	4000
50	250	3750	4000
75	375	3625	4000
100	500	3500	4000
125	625	3375	4000

As reações foram realizadas a 37 °C durante 24h. Os substratos foram preparados a partir de uma solução estoque (8,0 mmol/L, em DMSO), diluídos em PBS a fim obter-se concentração final de 800 $\mu\text{mol/L}$ e 12,5 % DMSO em água. O catalisador foi adicionado separadamente partindo-se de uma solução estoque (8,0 mmol/L, em DMSO), de maneira a obter-se uma concentração de 25 mol % de Pd na solução final. As alíquotas foram coletadas no tempo 0h, 6h e 24h, diluindo-se 200 μL da reação em 1800 μL de MeCN. Cada alíquota, com volume de 2 mL, foi filtrada em um filtro de seringa 0,45 μm , transferida para um eppendorf e armazenada sob refrigeração.

Tabela 6: Condições reacionais para a desproteção dos substratos 1,3-diPro-5FU **3**, 1-Pro-5FU **2** e 3-Pro-5FU **10**

Substrato	[Substrato] μmol/L	[Catalisador] μmol/L	PBS (μL)	Volume total (μL)
3	800	200	4375	5000
2	800	200	4375	5000
10	800	200	4375	5000

4.4.2.2 Reação de Desproteção dos Compostos 1,3-diBnzPro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12**

As reações de desproteção foram analisadas por cromatografia líquida, com detector DAD $\lambda = 265$ nm, coluna Varian C18 250 mm x 4,6 mm, fase móvel (A) água (TFA/0,025% - pH 2,38) e (B) MeCN (A/B 70:30 isocrático 22 min) A conversão foi calculada pela área dos picos da 5FU no cromatograma, relacionando-as com a curva de calibração previamente adquirida.

A curva foi preparada a partir de solução estoque de 5FU 800 μmol/L 12,5% DMSO em PBS, diluindo-se o volume necessário em MeCN para obter-se as concentrações dos pontos da curva em volume final de 4 mL.

As reações foram realizadas a 37 °C durante 24h. Os substratos foram preparados a partir de uma solução estoque (8,0 mmol/L, em DMSO), diluídos em PBS a fim obter-se concentração final de 800 μmol/L e 12,5 % DMSO em água. O catalisador foi adicionado separadamente partindo-se de uma solução estoque (8,0 mmol/L, em DMSO), de maneira a obter-se uma concentração de 25 mol % de Pd na solução final. As alíquotas foram coletadas no tempo 0h, 6h e 24h, diluindo-se 200 μL da reação em 1800 μL de MeCN. Cada alíquota, com volume de 2 mL, foi filtrada em um filtro de seringa 0,45 μm, transferida para um eppendorf e armazenada sob refrigeração.

Tabela 7: Condições reacionais para a desproteção dos compostos 1,3-diBnzPro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12**

Substrato	[Substrato] μmol/L	[Catalisador] μmol/L	PBS (μL)	Volume total (μL)
7	800	200	4375	5000
6	800	200	4375	5000
12	800	200	4375	5000

4.4.2.3 Conversão dos compostos 1,3-diBnzPro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12** acompanhadas por ¹⁹F RMN

A reação de desproteção catalisada por paládio dos compostos 1,3-diBnzPro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12** foi monitorada por ressonância magnética nuclear de flúor usando o 4-Flúorfenol como padrão interno e Na₂PdCl₄ como catalisador. Para essas reações foram usados *d6*-DMSO e D₂O como solventes. O preparo das amostras foi feito pesando-se a massa necessária para obter-se uma concentração aproximada de 25 mmol/L para o substrato 1,3-diBnzPro-5FU **7**, e 50 mmol/L para os substratos 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12**. Além disso, o catalisador foi pesado individualmente para cada amostra para obter-se uma concentração aproximada de 25 mmol/L, equimolar para o substrato 1,3-diBnzPro-5FU **7** e 50 mol % para 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12**.

Tabela 8: Condições reacionais do estudo da desproteção dos compostos 1,3-diBnzPro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12** por ¹⁹F RMN

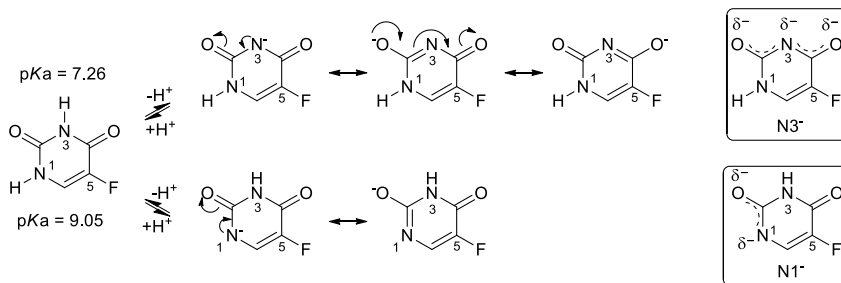
Substrato	[Substrato] mmol/L	[Catalisador] mmol/L	DMSO (μL)	D ₂ O (μL)	Volume total (μL)
7	23	22	400	100	500
6	50	25	300	75	375
12	50	25	300	75	375

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS DERIVADOS DA 5-FU

Para o estudo deste trabalho foram sintetizados seis pró-fármacos derivados da 5FU conforme procedimentos descritos na seção 4.3. A 5FU pode ser alquilada na posição N1 e/ou N3. Embora o pK_a da posição N1 seja menor que o da posição N3⁷⁵, a delocalização dos elétrons é maior em N1, logo, N1 é um nucleófilo menos reativo que N3. Por isso, em geral o produto da reação de alquilação da 5FU produz uma mistura de dois produtos, mono e dissustituídos. O produto monossustituído N3 não foi observado em nenhuma das sínteses realizadas neste trabalho. Para tal, duas etapas extras, descritas na seção 4.3.6 e 4.3.7, foram necessárias (Esq. 8 e 9.)

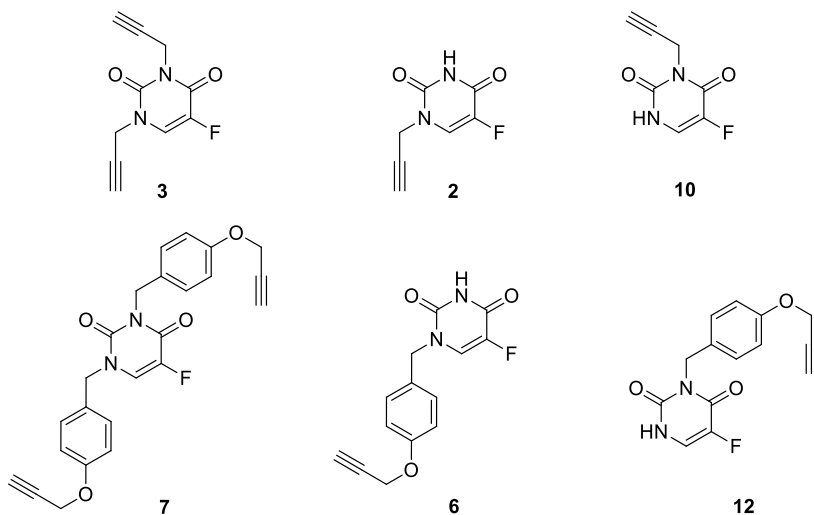
Esquema 22: Formas de ressonância da 5FU desprotonada.



Fonte 17: O autor (2023).

A seguir são apresentados os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁹F dos pró-fármacos sintetizados, assim como os espectros de massa dos compostos inéditos **6**, **7** e **12**. Além disso, os cromatogramas da reação de desproteção dos pró-fármacos **2**, **3**, **10**, **6**, **7**, e **12**, bem como espectros de RMN de ¹⁹F dos estudos de desproteção dos pró-fármacos **6**, **7**, e **12**.

Figura 3: Pró-fármacos sintetizados para este estudo.



Fonte 18: O autor (2023).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PRÓ-FÁRMACOS SINTETIZADOS

5.2.1 Espectros de RMN ¹H dos pró-fármacos 1,3-diPro-5FU **3**, 1-Pro-5FU **2** e 3-Pro-5FU **10**

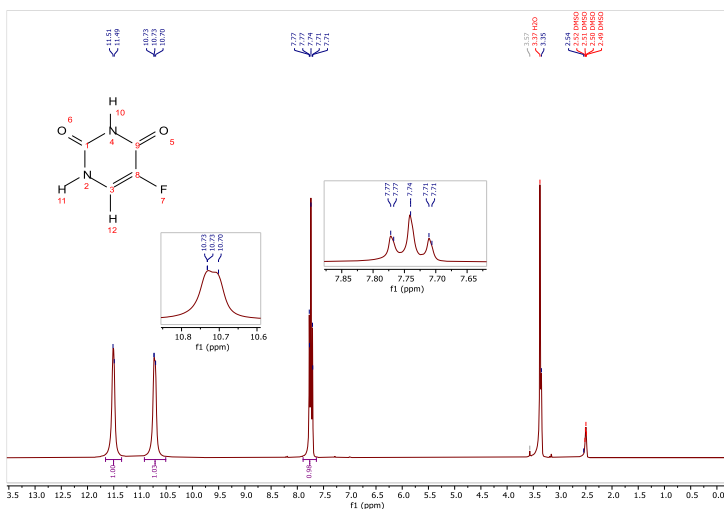
Os pró-fármacos **2**, **3** e **10**, já são descritos, assim como a 5FU, e serão apresentados aqui somente seus espectros de RMN ¹H. Todos os espectros foram adquiridos em *d6*-DMSO e apresentam o sinal do solvente (quinteto em δ 2.50 ppm) e água residual (singlete em δ 3.33 ppm). O espectro da 5FU será mostrado e analisado para fins de comparação.

5.2.1.1 Espectro de RMN ¹H 5FU

A molécula de 5FU contém apenas 3 hidrogênios (Fig. 17). O H11 δ 10.73 ppm (d, $J = 5.9$ Hz,) acopla com o H12 e aparece

como um duplete quando analisado em 400 MHz. Como o valor de J é pequeno, esse sinal aparece como um singleto quando analisado em 200 MHz. O sinal de H12 δ 7.74 ppm (t, $J = 6.1$) aparece como um tripleto, pois acopla com H11 além de acoplar com o átomo de F7. Esse sinal também muda quando analisado em 200 MHz, sendo nesse caso um duplete pelo acoplamento com F. Por fim, o sinal de H10 δ 11.50 ppm aparece com um singleto largo e não acopla com nenhum hidrogênio ou com o flúor.

Figura 4: Espectro RMN ^1H 400 MHz da 5FU.

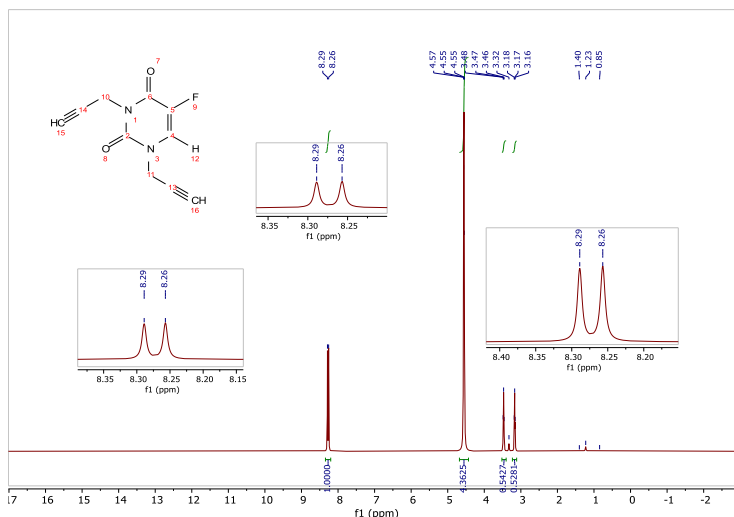


5.2.1.2 Espectro de RMN ^1H 1,3-diPro-5FU **3**

No espectro de RMN da 1,3-diPro-5FU **3** (Fig. 18), nota-se o desaparecimento dos sinais referentes aos H10 e H11 da 5FU. Ainda, observa-se o aparecimento de tripletos dos hidrogênios propargílicos H16 δ 3.49 ppm e H15 δ 3.19 ppm, além do sinal metilenos (CH₂) 10 e 11 δ 4.55 ppm que aparentam ser a sobreposição de dois dupletos. Por fim, tem-se o duplete do hidrogênio aromático H12 δ 8.28 ppm. São característicos do

grupo propargílico o tripleto do hidrogênio ligado ao alcino terminal e o duplete do metileno (CH₂). O hidrogênio ligado ao alcino terminal CH acopla com os dois hidrogênios do metileno (CH₂) dando origem ao tripleto observado. Por outro lado, os hidrogênios do metileno (CH₂) acoplam com o hidrogênio do alcino, e como esses hidrogênios são quimicamente indistinguíveis, observa-se um duplete. Em geral, pode-se usar esses sinais característicos para corroborar com a formação do produto em uma reação de propargilação.

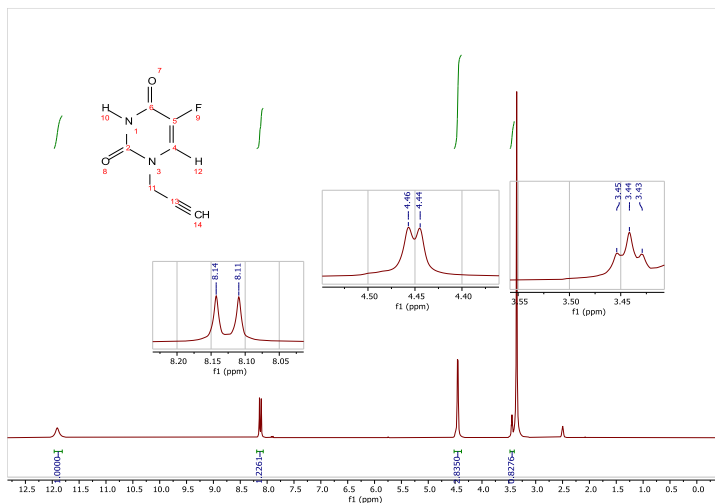
Figura 5: Espectro de RMN ¹H 200 MHz pró-fármaco 1,3-diPro-5FU **3**.



5.2.1.3 Espectro de RMN ¹H 1-Pro-5FU **2**

A Fig. 19 mostra o espectro de ¹H da 1-Pro-5FU **2**. Observa-se o singlete do H10 em δ 11.92 ppm além do duplete do hidrogênio aromático em δ 8.13 ppm. Em δ 4.45 o duplete do metileno (CH₂) 11, e o tripleto do hidrogênio H14 propargílico em δ 3.45 ppm.

Figura 6: Espectro de RMN ^1H 200 MHz 1-Pro-5FU **2**.

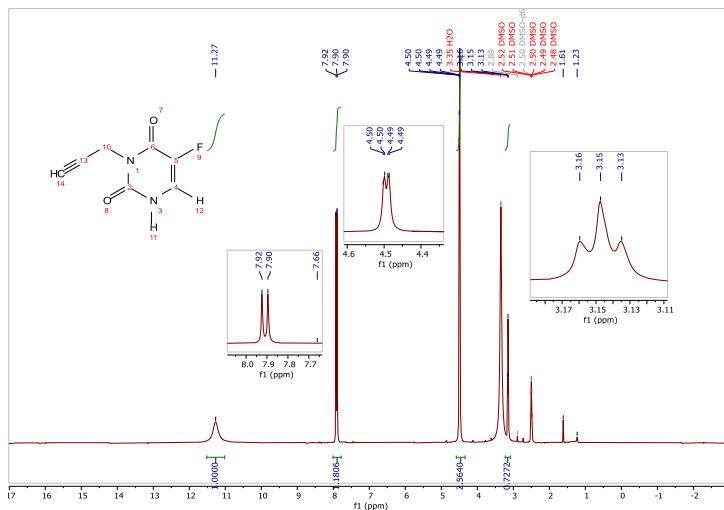


5.2.1.4 Espectro de RMN ^1H 3-Pro-5FU **10**

Na Fig. 20, observa-se um singlete em δ 11.27 ppm referente ao H11, um duplete em δ 7.91 ppm do hidrogênio aromático H12, um duplete do metileno 10 em δ 4.49, e por fim o triplete do hidrogênio propargílico H14 em δ 3.15 ppm. Nota-se que quase todos os sinais estão *upfield* quando comparados ao espectro do pró-fármaco 1-Pro-5FU **2**. Esses compostos são isômeros, possuem valores de Rf ligeiramente diferentes, e podem ser diferenciados pelo espectro de ^{13}C , ^1H e ^{19}F . Naturalmente, pode-se diferenciar o deslocamento do hidrogênio ligado ao nitrogênio aromático. Em **2**, esse nitrogênio encontra-se entre duas carbonilas, um ambiente químico muito mais rico em elétrons, deslocando o sinal do hidrogênio *downfield*. Já em **10**, o nitrogênio tem como vizinho somente um grupo carbonílico, assim o sinal do hidrogênio ligado a ele aparece deslocado *upfield*. Nesse caso, apesar de ambos os sinais estarem na região designada *downfield*, a notação foi usada somente para relacionar o deslocamento de um

em relação ao outro. Similarmente, pode-se usar esse raciocínio para diferenciar os isômeros **6** e **12** que serão apresentados a seguir.

Figura 7: Espectro RMN ^1H 200 MHz 3-Pro-5FU **10**.



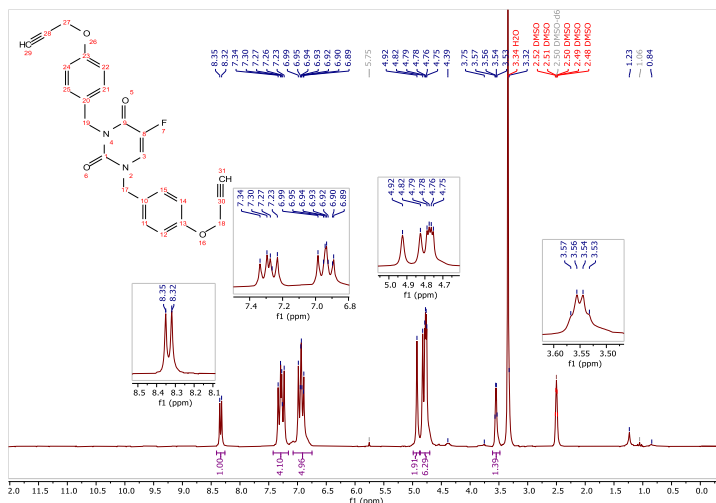
5.2.2 Espectros de RMN ^1H e ^{13}C e espectro de massas (TOF MS ES+) dos pró-fármacos 1,3-diBnzPro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12**

Os pró-fármacos apresentados nessa seção não têm síntese ou caracterização descritas na literatura, e, portanto, serão tratados como inéditos. Serão apresentados seus espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e espectros de massa (TOF MS ES+).

5.2.2.1 Caracterização do pró-fármaco 1,3-diBnzPro-5FU **7**

A fig. 21 apresenta o espectro de RMN de hidrogênio do pró-fármaco **7**. Assim como para o pró-fármaco dipropargilado **3**, não se observa os sinais atribuídos aos hidrogênios N1 e N3, mostrando que se tem um produto dissubstituído. Observa-se o duplete em δ 8.33 ppm referente ao hidrogênio aromático H3, com constante de acoplamento $J = 6.4$ Hz devido ao acoplamento com o núcleo de flúor 7. Tem-se um multipeto entre δ 7.40 - 7.17 ppm atribuídos aos 4 hidrogênios aromáticos (11, 15, 21 e 25). Outro multipeto em δ 7.06 - 6.80 ppm pertence aos hidrogênios aromáticos (12, 14, 22 e 24). Os dois singletos em δ 4.92 e δ 4.82 ppm referem-se aos 4 hidrogênios dos metilenos 17 e 19, respectivamente. O duplo duplete observado em δ 4.77 ppm pertence aos 4 hidrogênios dos metilenos 18 e 27. Por fim, observa-se um quarteto em δ 3.55 atribuídos aos 2 hidrogênios propargílicos 29 e 31.

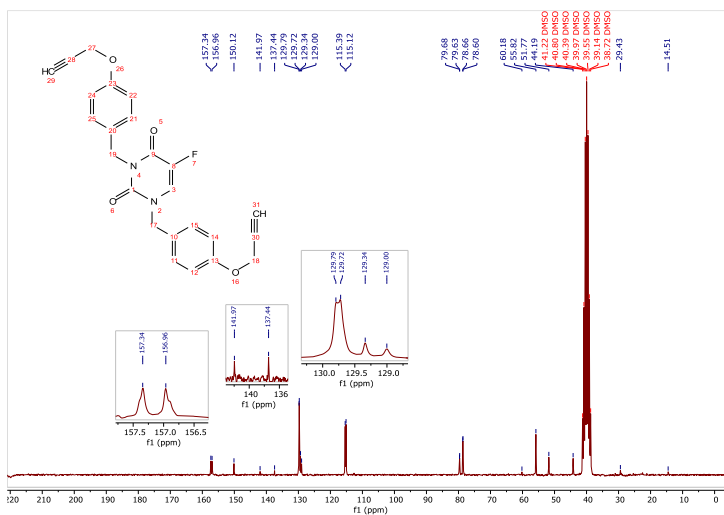
Figura 8: Espectro de RMN ^1H 200 MHz do 1,3-diBnzPro-5FU **7**



O espectro de carbono do pró-fármaco **7** (Fig. 22) mostra 3 dupletos causados pelo acoplamento carbono-flúor. Um em

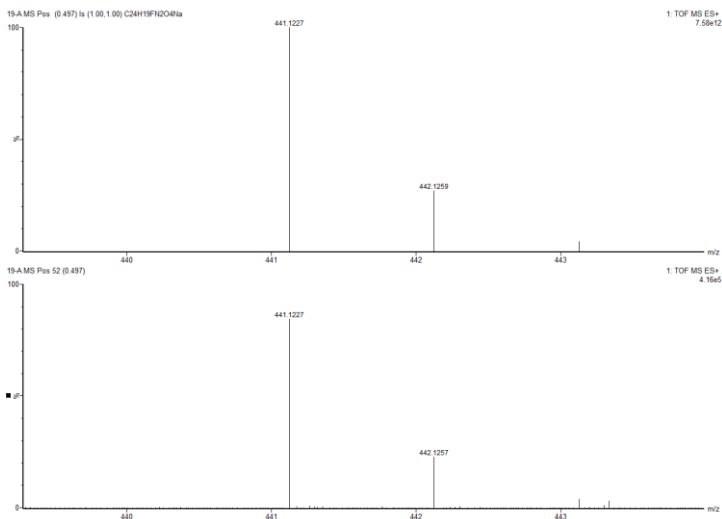
δ 157.15 ppm (d, $J = 19.1$ Hz, C9), outro em δ 139.69 ppm (d, $J = 228.07$ Hz, C8) e por fim δ 115.25 ppm (d, $J = 13.5$ Hz, C3). Todos os outros singletos foram atribuídos da seguinte forma: δ 150.12 (2C, C13 e C23), 129.76 (4C, 11, 15, 21 e 25), 115.39 (2C, C22 e C24), 115.12(2C, C14 e C12), 79.65 (2C, C28 e C30), 78.63 (2C, C29 e C31), 55.82 (2C, C18 e C27), 51.77 (1C, C17), 44.19 (1C, C19).

Figura 9: Espectro RMN ^{13}C 50 MHz do 1,3-diBnzPro-5FU 7



A Fig. 23 mostra o espectro de massas do pró-fármaco 7. Na parte superior, o espectro teórico calculado pelo software do equipamento, e em baixo o espectro experimental. Observa-se que os espectros teóricos e experimentais coincidem até o último algarismo significativo. Além disso o sinal se refere à molécula somada a um íon de sódio (Na, 22.9897 u).

Figura 10: Espectro de massas TOF MS ES⁺ do pró fármaco 7



5.2.2.2 Caracterização do pró-fármaco 1-BnzPro-5FU 6

O espectro adquirido para o pró-fármaco 6 encontra-se na Fig. 24. Observa-se os sinais atribuídos ao grupo propargil em δ 4.78 (d, 2H, H18), δ 3.55 (t, 1H, H20), respectivamente. O singlete do metileno 17 em δ 4.75 (s, 2H). O sinal dos hidrogênios aromáticos do grupo benzílico δ 7.40 – 7.19 (m, 2H) 11 e 15, e δ 7.07 – 6.85 (m, 2H) 12 e 14. Um duplete em δ 8.21 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H) H4, e por fim singlete em δ 11.81 (s, 1H) NH.

Assim como anteriormente, observa-se 3 dupletos no espectro de ¹³C do pró-fármaco 6 (Fig. 25). δ 158.06 (d, $J = 25.0$ Hz) C9, 157.28 C13, 150.04 C1, 140,19 (d, $J = 229.3$ Hz) C8, 130.03 (d, $J = 33.2$ Hz) C3, 129.97 C10, 129.60 (2C) C11 e C15, 115.40 (2C) C12 e C14, 79.63 C19, 78.67 C20, 55.84 C18, 50.51 C17.

Figura 11: Espectro RMN ^1H 200 MHz pró-fármaco 6

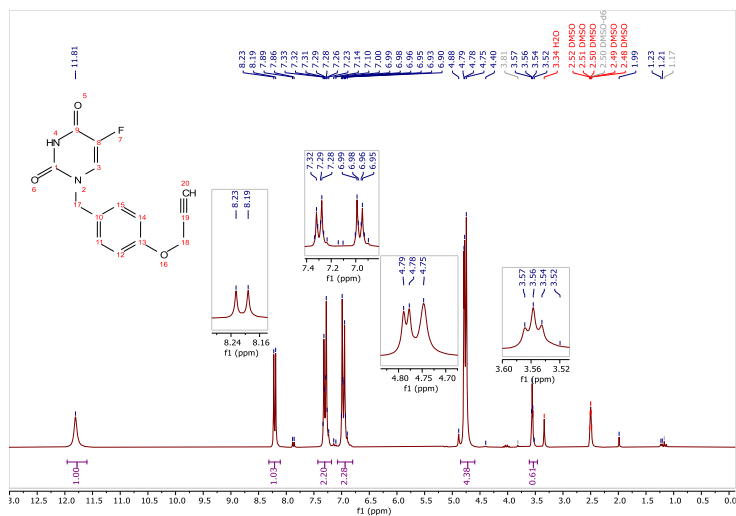
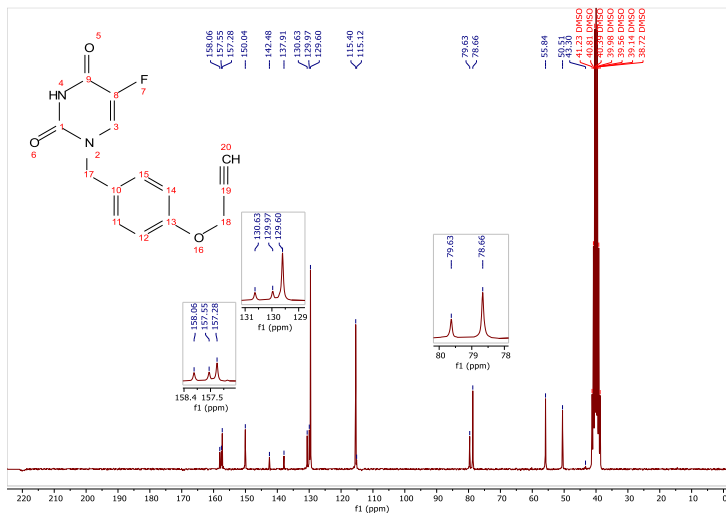


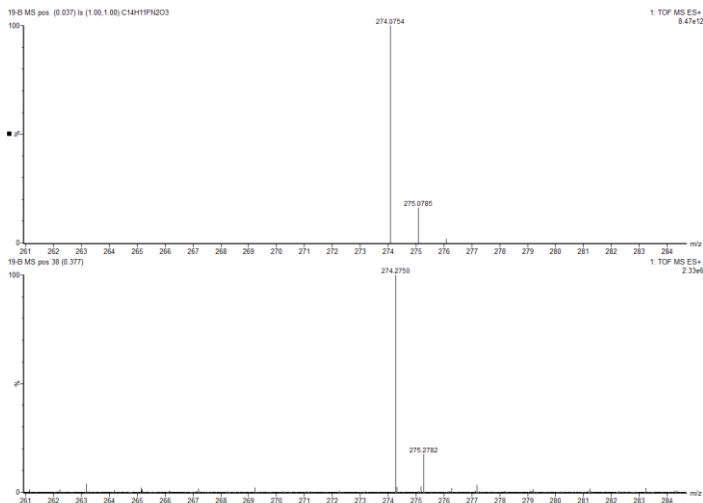
Figura 12: Espectro RMN ^{13}C 50 MHz pró-fármaco 6



A Fig. 26 mostra o espectro de massas do pró-fármaco 6. Na parte superior, o espectro teórico calculado pelo software do

equipamento, e em baixo o espectro experimental. Nesse caso se observa uma discrepância de 0,2 unidade de massa. Até o momento essa alteração não pode ser contabilizada, visto que nenhuma espécie química pode ser atribuída a essa variação.

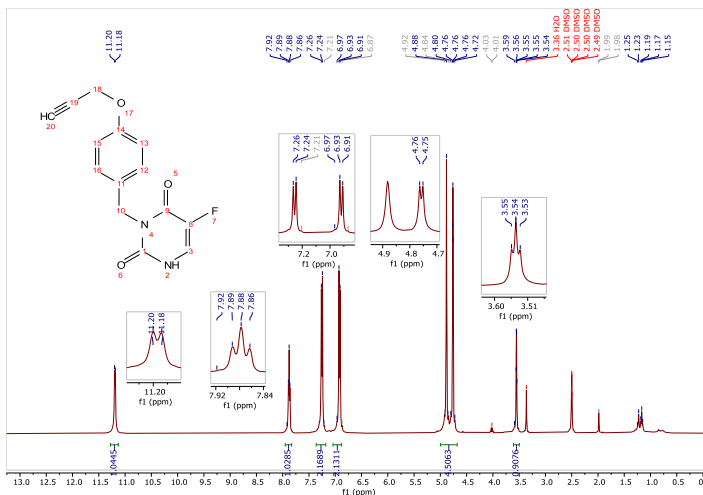
Figura 13: Espectro de massas TOF MS ES⁺ do pró fármaco **6**



5.2.2.3 Caracterização do pró-fármaco 3-BnzPro-5FU **12**

O espectro de hidrogênio para o pró-fármaco **12** foi adquirido em 400 MHz e encontra-se na Fig. 27. Observa-se os sinais atribuídos ao grupo propargil em δ 4.75 (d, 2H, H18), 3.54 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H) 20. O singlete do metileno 10 em δ 4.88 (s, 2H). O sinal dos hidrogênios aromáticos do grupo benzílico δ 7.26 – 7.24 (m, 2H) H12 e H16, e δ 6.93 – 6.91 (m, 2H) H13 e H15. Um triplete em δ 7.88 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H) H5, e por fim duleto em δ 11.19 (d, 1H, $J = 5.75$ Hz) NH.

Figura 14: Espectro RMN ^1H 400 MHz pró-fármaco **12**



O espectro de carbono para o pró-fármaco **12** foi adquirido em 100 MHz e encontra-se na Fig. 28. δ 157.78 (d, $J = 24.9$ Hz) C9, 156.94 C14, 150.34 C1, 139.79 (d, $J = 229.4$ Hz) C8, 130.00 C11, 129.76 C12 e C16, 125.65 (d, $J = 31.7$ Hz) C3, 115.14 (2C) C13 e C15, 79.72 C19, 78.64 C18, 55.83 C10, 43.33 C20.

A Fig. 29 mostra o espectro de massas do pró-fármaco **12**. Na parte superior, o espectro teórico calculado pelo software do equipamento, e em baixo o espectro experimental. Como no caso do pró-fármaco **6**, se observa uma discrepância de 0,2 unidade de massa. Até o momento essa alteração não pode ser contabilizada, visto que nenhuma espécie química pode ser atribuída a essa variação

Figura 15: Espectro RMN ¹³C 101 MHz pró-fármaco **12**

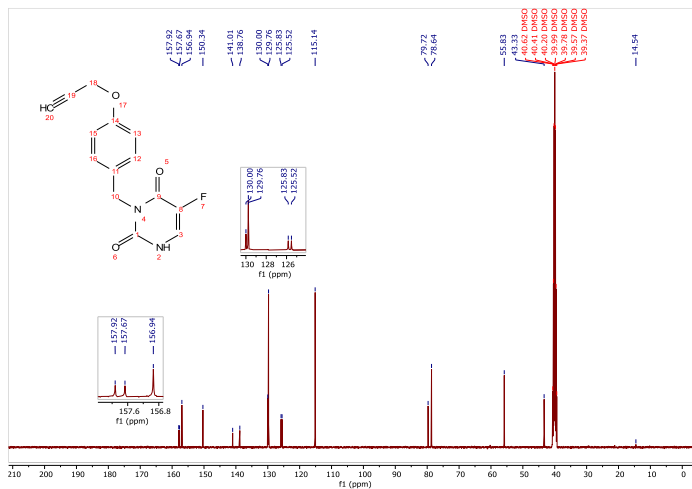
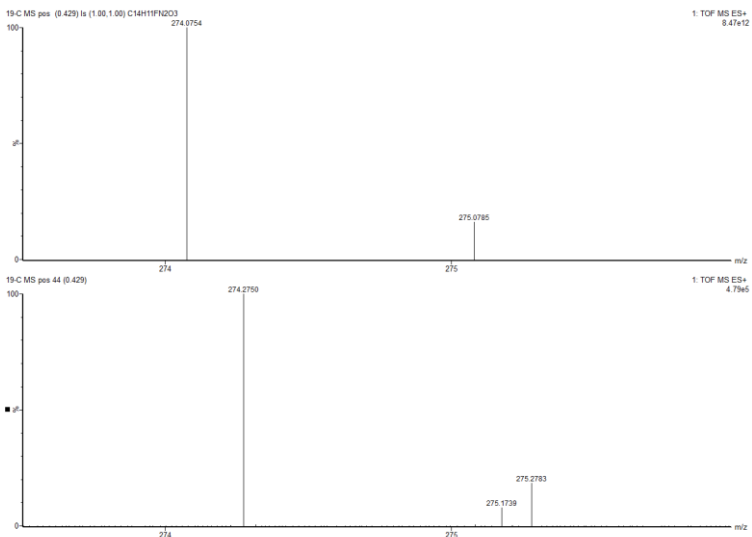


Figura 16: Espectro de massas TOF MS ES+ do pró fármaco **12**



5.3 ESTUDO DA REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DOS PRÓ-FÁRMACOS PROPARGILADOS DERIVADOS DA 5FU

5.3.1 Reação de despropargilação – Catálise homogênea.

As reações de desproteção discutidas a seguir foram realizadas em tampão PBS e DMSO (12,5%) a 37 °C, com concentrações iniciais de 800 µmol/L para os substratos e 200 µmol/L de catalisador (25 mol % de Pd). Para Pd₂(allyl)₂Cl₂, a concentração de Pd foi de 400 µmol/L (50 mol %), uma vez que se tem dois equivalentes de Pd para cada mol do sal. Nos casos dos pró-fármacos **3** e **7**, a concentração efetiva do grupo propargílico é de 1600 µmol/L, assim, considerou-se a metade de equivalentes de Pd para os casos mencionados acima. Vale ressaltar que para Na₂PdCl₄ e Pd₂(allyl)₂Cl₂ o paládio encontra-se no estado de oxidação Pd²⁺, enquanto que em Pd(dba)₂ tem-se Pd⁰.

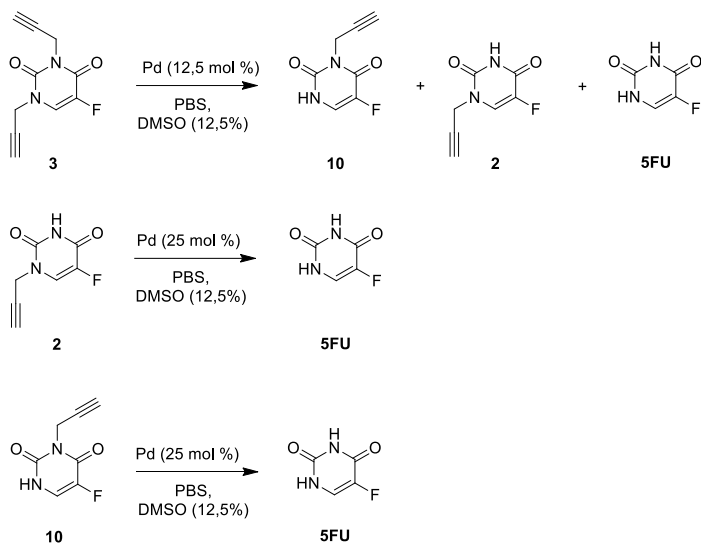
5.3.1.1 Resultados para conversão dos pró-fármacos **2**, **3** e **10**

O esquema 11 mostra os produtos esperados na reação de despropargilação dos pró-fármacos **2**, **3** e **10**. Enquanto **2** e **10** são convertidos imediatamente à **5FU**, **3** deve gerar **2** ou **10** antes que a conversão seja completada. Pode-se pressupor que, não só a conversão de **3** ocorre de forma mais lenta, mas que também a quantidade de 5FU formada seja menor que aquelas atingidas por **2** e **10**.

Tabela 9: Porcentagem de **5FU** formada após 24 h de reação.

Catalisador	Substratos		
	3	2	10
Na ₂ PdCl ₄	0,96	29,46	18,00
Pd ₂ (allyl) ₂ Cl ₂	2,62	12,34	4,07
Pd(dba) ₂	0,94	24,48	12,92

Esquema 23: Produtos da reação de clivagem mediada por Pd dos pró-fármacos **3**, **2**, e **10**.



Fonte 19: o autor (2023)

Os resultados da conversão dos substratos **2**, **3** e **10** estão apresentados na tabela 9. De fato, observa-se que a conversão de **3** em **5FU** é muito menos eficiente que aquelas de **2** e **10**. Além disso, a formação de **2** e **10** é evidenciada pelo surgimento dos sinais no cromatograma da reação em 6,763 e 6,932 min, respectivamente (Fig. 30). Esses resultados sugerem que, nessas condições, pode haver uma desativação ou do catalisador antes que a reação seja completada.

Para os substratos **2** e **10** a conversão é mais pronunciada, com exceção ao par **10-Pd₂(allyl)₂Cl₂** que apresenta conversão menor que 5%. De forma geral, o substrato **2** mostrou-se o mais eficiente no surgimento da **5FU** com todos os catalisadores estudados, com a maior conversão alcançada com o par **2-Na₂PdCl₄**. Outro aspecto dessas reações é que, apesar de serem

isômeros constitucionais, **2** e **10** exibem conversões consideravelmente distintas, sugerindo que efeitos estéricos e/ou eletrônicos estejam influenciando alguma etapa da reação de despropargilação. Esse efeito também é observado ao se analisar a intensidade dos sinais referentes a **2** e **10** no cromatograma, da reação de despropargilação de **3**. Nota-se que o consumo de **2** gerado na reação parece ser mais rápido que aquele de **10**.

Figura 17: Cromatograma da reação de **3** com Na_2PdCl_4 após 24 h.

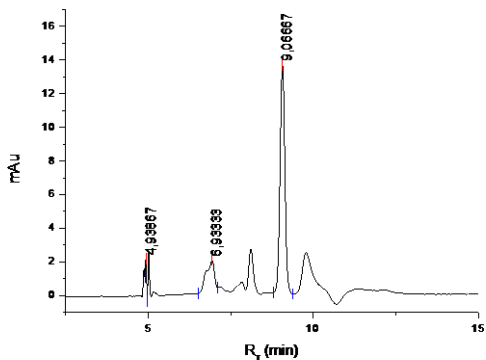
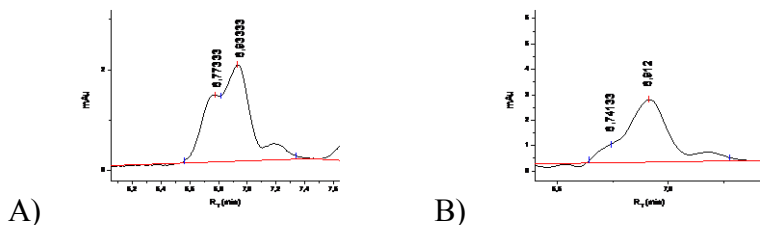


Figura 18: Intensidade dos picos de **2** (6,74 min) e **10** (6,91 min) na reação com A) Na_2PdCl_4 e B) $\text{Pd}(\text{dba})_2$.

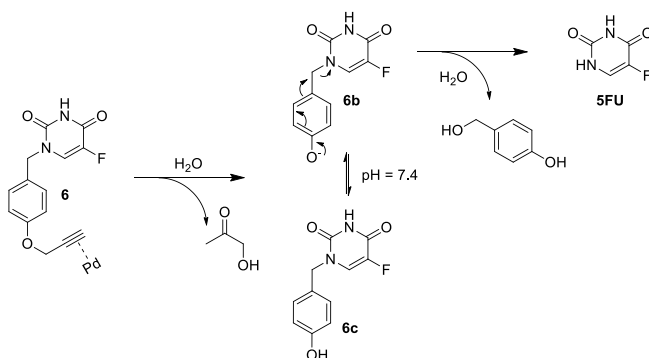


Por fim, apesar de ter duas vezes mais equivalentes de Pd que os outros dois catalisadores, Pd₂(allyl)₂Cl₂ mostrou-se menos eficiente na conversão de **2** e **10**. Os valores encontrados para **3** estão fora dos limites da curva de calibração e não podem ser interpretados conclusivamente. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de Pd₂(allyl)₂Cl₂ poder formar espécies inativas de Pd(I).⁷⁶

5.3.1.2 Resultado para conversão dos pró-fármacos **6**, **7** e **12**

Os pró-fármacos **6**, **7** e **12** foram protegidos com um grupo benzilpropargiloxi auto-imolativo. O mecanismo da reação auto-imolativa na liberação da **5FU** está ilustrado no esquema 12. A clivagem do grupo propargílico gera um intermediário benzoxi, que, em um movimento concertado de elétrons, libera a **5FU** e forma o álcool 4-Hidroxibenzóico. Além de a liberação da **5FU** depender do processo auto-imolativo, essa reação difere da discutida na seção anterior por se tratar de uma reação de O-despropargilação, enquanto que as mencionadas anteriormente tratam-se de reações de N-despropargilação.

Esquema 24: Mecanismo auto-imolativo na reação de desproteção de **6**.



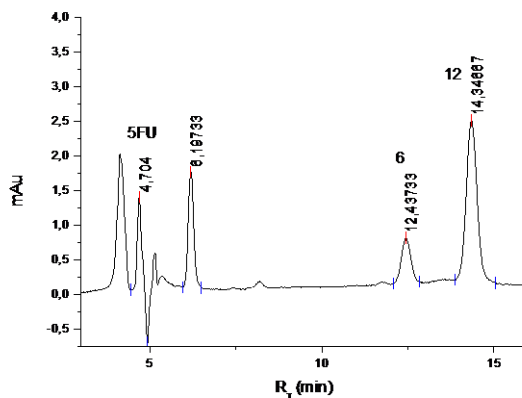
Fonte 20: o autor (2023)

Tabela 10: Porcentagem de **5FU** formada após 24 h de reação.

Catalisador	Substratos		
	7	6	12
Na ₂ PdCl ₄	2,66	2,78	2,56
Pd ₂ (allyl) ₂ Cl ₂	3,57	2,69	2,55
Pd(bda) ₂	2,89	0,22	2,84

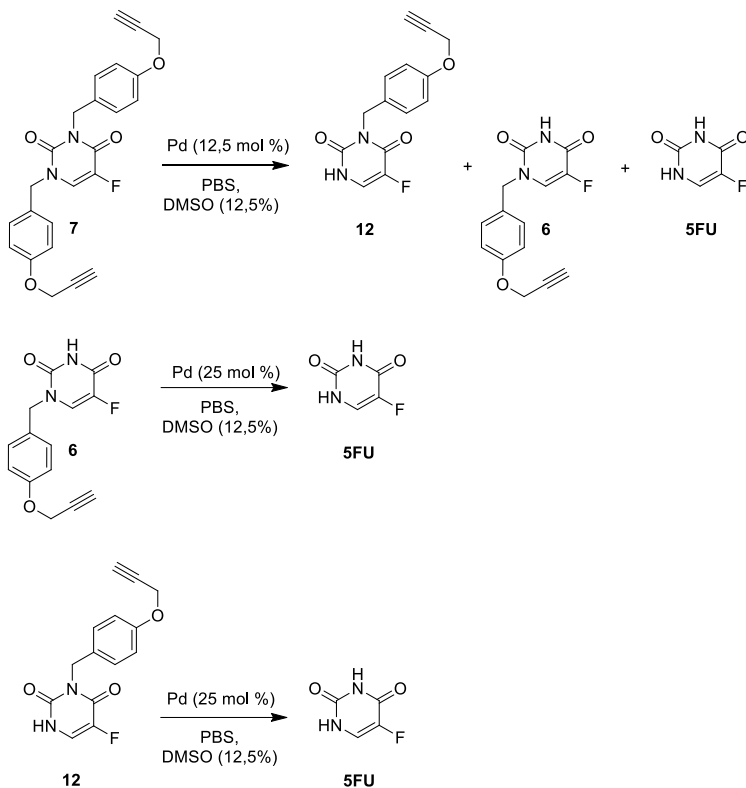
Na tabela 10 estão os resultados obtidos na reação de desproteção dos pró-fármacos **6**, **7** e **12** mediadas por sais de paládio. Nota-se que as conversões atingidas são inferiores àquelas produzidas na seção anterior. Apesar da reação de desproteção de **7** aparentemente produzir quantidades maiores de **5FU** do que o análogo **3**, esses resultados estão fora do limite da curva de calibração obtida, e por isso, não são conclusivas. Contudo, é possível concluir que há a formação de **6** e **12** além da **5FU** (Fig. 32).

Figura 19: Cromatograma da reação de desproteção de **7** com Na₂PdCl₄ após 24 h. Além da formação da **5FU**, observa-se a formação de **6** e **12**.



Ademais, é possível que o processo auto-imolativo seja muito lento e não ocorra, havendo a formação de intermediários similares ao composto **6c**. O pK_a desse fenol é aproximadamente 9.8, e com o pH do meio reacional ~ 7.4 , o equilíbrio ilustrado no esquema 12 está deslocado a favor da formação de **6c**. É possível que pico em $T_R = 6,19$ min (Fig. 32) seja causado por esse intermediário, mas, outros métodos seriam necessários para determinar sua identidade e corroborar com essa hipótese.

Esquema 25: Produtos da reação de clivagem mediada por Pd dos pró-fármacos **7**, **6** e **12**.



Fonte 21: o autor (2023)

5.3.2 Reação de despropargilação – Catálise heterogênea

As reações de desproteção discutidas a seguir foram realizadas em tampão PBS e DMSO (1,25%) a 37 °C, com concentrações equimolares de substrato e paládio (seção 4.4.1). Assim como na seção anterior, duas espécies de Pd foram comparadas, Pd²⁺ e Pd⁰. Como fonte de Pd⁰ foi usado um catalisador comercial de paládio suportado em carbono ativado. Já para os estudos com Pd²⁺, utilizou-se um catalisador de paládio suportado em grafeno que foi sintetizado e caracterizado pelo nosso grupo de trabalho, cuja síntese não será descrita neste trabalho.

5.3.2.1 Resultados para conversão dos pró-fármacos **2**, **3** e **10**

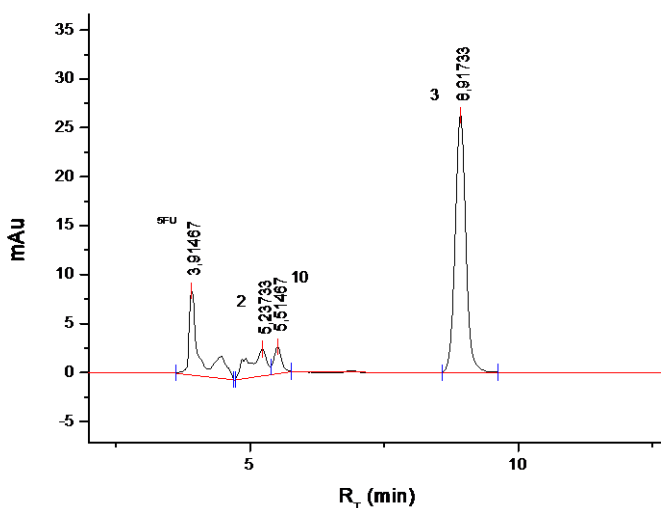
Os resultados da conversão dos pró-fármacos **2**, **3** e **10** estão apresentados na tabela 11. Mais uma vez, pode-se observar que a conversão do pró-fármaco di-propargilado **3** é inferior àquelas de seus homólogos mono-propargilados. Todavia, há uma discrepância nos resultados do pró-fármaco **10**. Na conversão homogênea, a maior conversão foi atingida com a espécie Pd⁰, enquanto que, na heterogênea, o melhor resultado foi obtido com Pd²⁺. Além disso, a maior conversão geral também foi alcançada pelo substrato **10**, diferente do resultado obtido na seção anterior, onde a maior conversão obtida se deu pelo substrato **2**. Porém, a reação de **3** produz **2** e **10** além da **5FU**, assim como na observado na seção 5.3.1.1 (Fig. 33).

Tabela 11: Porcentagem de **5FU** formada após 24 h de reação.

Catalisador	Substratos		
	3	2	10
PdII@Grafeno	4,67	22,82	30,34
Pd/C	3,03	21,14	7,46

Igualmente, observou-se que de maneira geral Pd²⁺ confere as melhores conversões à **5FU**, e que o substrato **2** apresenta reatividade similar entre as diferentes espécies de Pd, tanto na catálise homogênea como na heterogênea.

Figura 20: Cromatograma da reação de desproteção de **3** com PdII@grafeno após 24 h. Além da formação da **5FU**, observa-se a formação de **2** e **10**.



5.3.2.2 Resultados para conversão dos pró-fármacos **6**, **7** e **12**

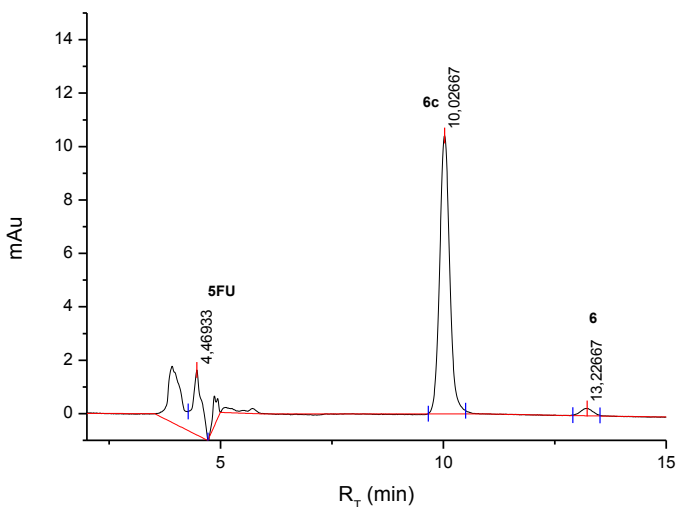
Assim como os resultados obtidos na seção 5.3.1.2, os resultados de conversão ficaram fora do limite da curva e calibração da **5FU** e não podem ser interpretados conclusivamente. Porém, podemos observar que, como nos estudos da catálise homogênea, há a formação do pró-fármacos **6** na desproteção de **7**, além do aparecimento de um sinal que pode estar ligado a formação

do fenol despropargilado **6c**. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Porcentagem de 5FU formada após 24 h de reação.

Catalisador	Substratos		
	7	6	12
PdII@Grafeno	3,27	2,84	3,22
Pd/C	3,06	3,90	3,57

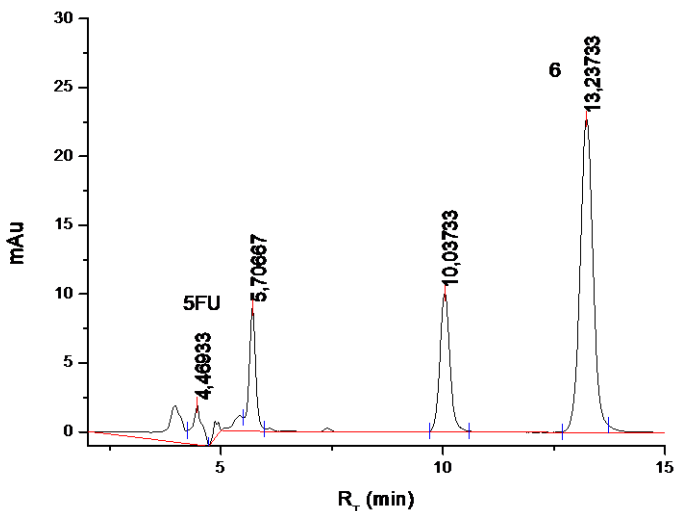
Figura 21: Cromatograma da reação de desproteção de **7** com Pd/C após 24 h. Além da formação da 5FU, observa-se a formação de **6** e possivelmente **6c**.



De maneira geral, pode-se concluir que o efeito do grupo auto-imolativo desfavoreceu a formação da **5FU**. Ademais, o produto da despropargilação não foi identificado, e em alguns casos, mais do que um produto foi formado. Em todos os casos,

porém, a formação da **5FU** foi irrisória, e não pode ser quantificada de forma conclusiva.

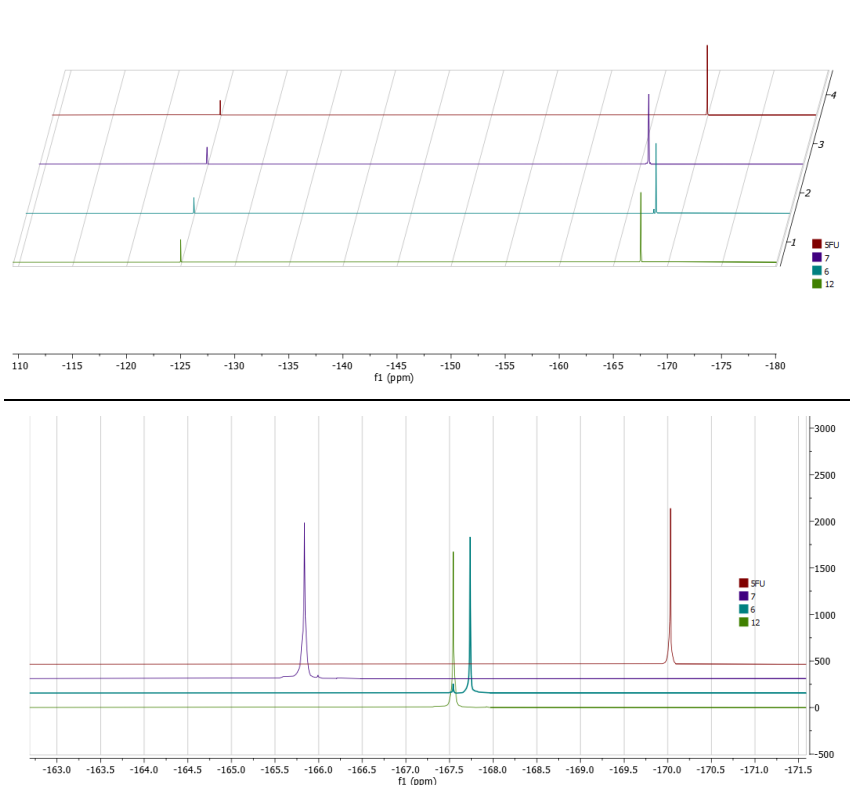
Figura 22: Cromatograma da reação de **6** com Pd/C após 24 h. Nota-se que além da **5FU**, outros dois produtos foram formados na reação.



5.3.3 Acompanhamento da reação de desproteção de **6**, **7**, e **12** na reação com Na_2PdCl_4 por RMN de ^{19}F

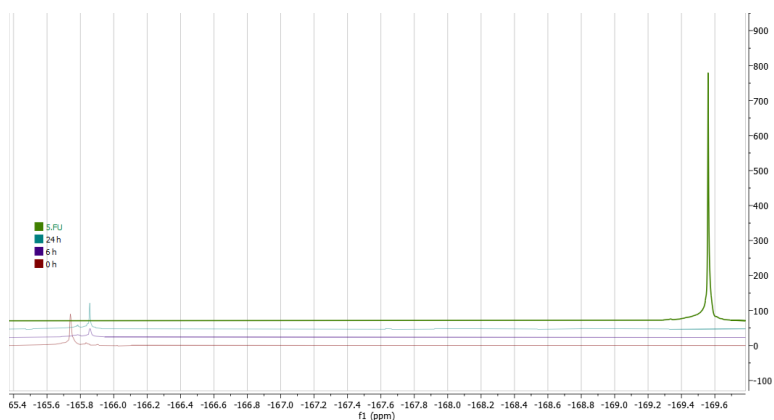
Visto a dificuldade de acompanhar as reações de despropargilação dos pró-fármacos derivados da **5FU**, foi feita uma tentativa de observar o progresso da reação por RMN de flúor. A tentativa foi baseada no fato de o núcleo de ^{19}F ser ativo e bastante sensível à técnica, além abundância quase quantitativa. Primeiro foram obtidos os espectros dos compostos isolados para determinar se seria possível diferenciá-los usando a técnica. O espectro dos três pró-fármacos e da **5FU** estão ilustrados na figura 36. O sinal em δ -125 ppm refere-se ao padrão interno 4-Fluoropenol.

Figura 23: Sobreposição dos espectros de RMN ^{19}F da **5FU** e dos pró-fármacos **6**, **7** e **12**.



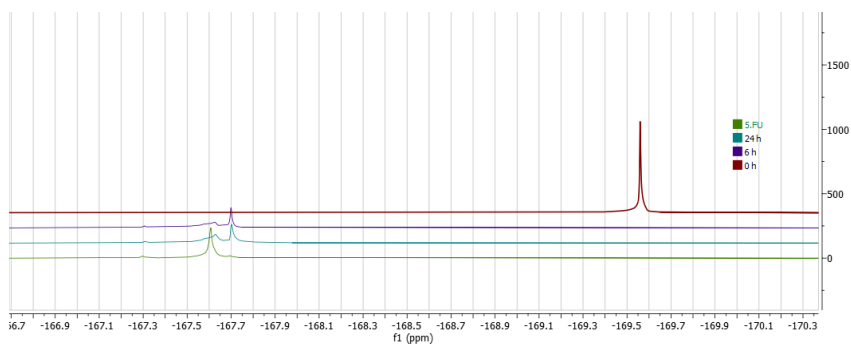
Um dos empecilhos da técnica é a necessidade de usar concentrações relativamente altas dos substratos, sendo necessário mudar as condições da reação para superar o problema de solubilidade dos pró-fármacos benzilropargiloxi. Para tal, as reações foram realizadas em 80% de *d6*-DMSO em D_2O , sem o uso de tampão PBS. Portanto, a variação e o pH inicial do meio reacional são desconhecidas. A seguir, serão apresentados os espectros sobrepostos do acompanhamento das reações no tempo 0 h, 6 h e 24 h, juntamente com o espectro da **5FU** para comparação.

Figura 24: Sobreposição dos espectros de RMN ^{19}F da reação de desproteção de **7**.



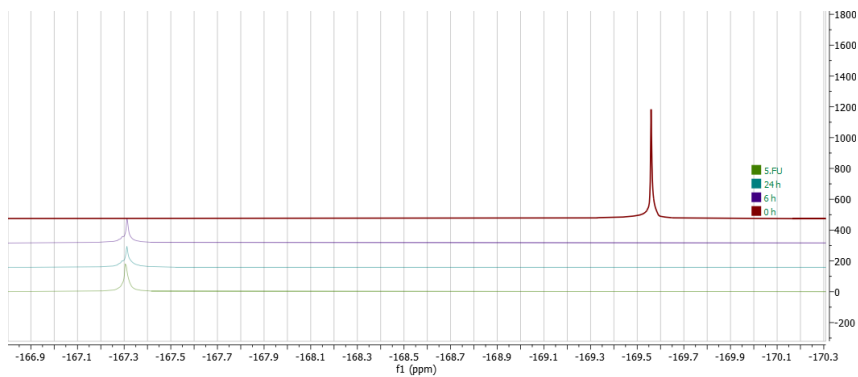
Não foi possível observar a formação da **5FU** nessas condições (Fig. 37). Pode-se notar, porém, que, há variação no espectro da reação, contudo, sem surgimento do sinal da **5FU**. Somado ao resultado das seções anteriores, essa é mais uma evidência de que somente a reação de despropargilação ocorre, ao passo que o processo auto-imolativo limita a formação da **5FU**. O mesmo ocorre para **6** (Fig. 38)

Figura 25: Sobreposição dos espectros de RMN ^{19}F da reação de desproteção de **6**.



No caso do pró-fármaco **12**, não foi possível identificar nem mesmo a reação de despropargilação, com os espectros de acompanhamento da reação permanecendo inalterados durante as 24 h em que foram acompanhados.

Figura 26: Sobreposição dos espectros de RMN 19F da reação de desproteção de **12**.



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados três pró-fármacos inéditos contendo um grupo auto-imolativo, 1,3-Dibnzpro-5FU **7**, 1-BnzPro-5FU **6** e 3-BnzPro-5FU **12**.

Foram realizados estudos da reação de depropargilação e conversão destes pró-fármacos na presença dos catalisadores homogêneos Na_2PdCl_4 , $\text{Pd}_2(\text{allyl})_2\text{Cl}_2$ e $\text{Pd}(\text{dba})_2$, assim como dois catalisadores heterogêneos, Pd/C e Pd@grafeno. Da mesma forma, foram acompanhadas as conversões dos pró-fármacos 1,3-diProp-5FU **3**, 1-Pro-5FU **2** e 3-Pro-5FU **10** como modelos e a caráter comparativo.

As reações e conversões foram acompanhadas por HPLC-DAD e RMN ^{19}F . Os resultados obtidos ficaram abaixo dos valores da curva de calibração feita para a 5FU e, portanto, não puderam ser quantificados de maneira conclusiva. Contudo, as evidências nos permitem supor que a reação de despropargilação acontece e que, o que limita a conversão do pró-fármaco é o processo auto-imolativo.

Por fim, conclui-se que estes pró-fármacos contendo um grupo auto-imolativo não apresentam conversões que justifiquem o seu uso na liberação bio-ortogonal do quimioterápico 5-fluorouracila.

REFERÊNCIAS

1. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>, acessado em 07/06/2023 - Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva, World Health Organization; 2020. (2020).
2. https://antigo.inca.gov.br/publicacoes?keys=&field_tipo_de_arquivo_value%5B%5D=pdf&field_tipo_de_arquivo_value%5B%5D=doc&field_ano_value=All&field_assuntos_tid%5B%5D=760&field_tipo_de_publicacao_tid%5B%5D=1243&sort_by=field_ano_value&sort_order=DESC, acessado em 07/06/2023.
3. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>, acessado em 07/06/2023.
4. Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D. & Griesbach, L. Fluorinated Pirimidinas, A New Class of Tumor-Inhibitory Compounds. *Nat. Publ. Group* **179**, 663–666 (1957).
5. Noordhuis, P. *et al.* 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann. Oncol.* **15**, 1025–1032 (2004).
6. Ferguson, M. J., Ahmed, F. Y. & Cassidy, J. The role of pro-drug therapy in the treatment of cancer. *Drug Resist. Updat.* **4**, 225–232 (2001).
7. Markovic, M., Ben-Shabat, S. & Dahan, A. Prodrugs for Improved Drug Delivery: Lessons Learned from Recently Developed and Marketed Products. *Pharmaceutics* **12**, 1031 (2020).
8. Verma, H., Narendra, G., Raju, B., Singh, P. K. & Silakari, O. Diidropirimidina Dehydrogenase-Mediated Resistance to 5-Fluorouracil: Mechanistic Investigation and Solution. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **5**, 1017–1033 (2022).

9. Diasio, R. B. & Harris, B. E. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* **16**, 215–237 (1989).
10. Adjei, A. A. A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer: New agents in colorectal cancer. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **48**, 265–277 (1999).
11. Adam, C. *et al.* A 5-FU Precursor Designed to Evade Anabolic and Catabolic Drug Pathways and Activated by Pd Chemistry *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Med. Chem.* **65**, 552–561 (2022).
12. Barany, G. & Merrifield, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 7363–7365 (1977).
13. Wong, C.-H. & Zimmerman, S. C. Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. *Chem. Commun.* **49**, 1679 (2013).
14. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 6974–6998 (2009).
15. Patterson, D. M. & Prescher, J. A. Orthogonal bioorthogonal chemistries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **28**, 141–149 (2015).
16. Bird, R. E., Lemmel, S. A., Yu, X. & Zhou, Q. A. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjug. Chem.* **32**, 2457–2479 (2021).
17. Zhang, Z. & Fan, K. Bioorthogonal nanozymes: an emerging strategy for disease therapy. *Nanoscale* **15**, 41–62 (2023).
18. Lang, K. & Chin, J. W. Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins. *ACS Chem. Biol.* **9**, 16–20 (2014).
19. Kenry & Liu, B. Bio-orthogonal Click Chemistry for In Vivo Bioimaging. *Trends Chem.* **1**, 763–778 (2019).

20. Staudinger, H. & Meyer, J. Ueber neue organische Phosphorverbindungen II. Phosphazine. *Helv. Chim. Acta* **2**, 619–635 (1919).
21. Saxon, E. & Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **287**, 2007–2010 (2000).
22. Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L. & Bertozzi, C. R. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 14846–14851 (2003).
23. Lin, L., Jiang, L., Ren, E. & Liu, G. Bioorthogonal chemistry based on-demand drug delivery system in cancer therapy. *Front. Chem. Sci. Eng.* **17**, 483–489 (2023).
24. Tu, Y. *et al.* Intercellular delivery of bioorthogonal chemical receptors for enhanced tumor targeting and penetration. *Biomaterials* **259**, 120298 (2020).
25. Tu, J., Xu, M. & Franzini, R. M. Dissociative Bioorthogonal Reactions. *ChemBioChem* **20**, 1615–1627 (2019).
26. Niu, J. *et al.* Antibody Mimics as Bio-orthogonal Catalysts for Highly Selective Bacterial Recognition and Antimicrobial Therapy. *ACS Nano* **15**, 15841–15849 (2021).
27. Jewett, J. C. & Bertozzi, C. R. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1272 (2010).
28. Ye, D. *et al.* Bioorthogonal cyclization-mediated in situ self-assembly of small-molecule probes for imaging caspase activity in vivo. *Nat. Chem.* **6**, 519–526 (2014).
29. Baalman, M. *et al.* A Bioorthogonal Click Chemistry Toolbox for Targeted Synthesis of Branched and Well-Defined Protein–Protein Conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 12885–12893 (2020).

30. Hang, H. C., Wilson, J. P. & Charron, G. Bioorthogonal Chemical Reporters for Analyzing Protein Lipidation and Lipid Trafficking.
31. Niederwieser, A. *et al.* Two-Color Glycan Labeling of Live Cells by a Combination of Diels-Alder and Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 4265–4268 (2013).
32. Šečkutė, J., Yang, J. & Devaraj, N. K. Rapid oligonucleotide-templated fluorogenic tetrazine ligations. *Nucleic Acids Res.* **41**, e148–e148 (2013).
33. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
34. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596–2599 (2002).
35. Devaraj, N. K. & Finn, M. G. Introduction: Click Chemistry. *Chem. Rev.* **121**, 6697–6698 (2021).
36. Zhang, X. *et al.* Click Chemistry in Natural Product Modification. *Front. Chem.* **9**, 774977 (2021).
37. Wang, F. *et al.* A Biocompatible Heterogeneous MOF–Cu Catalyst for In Vivo Drug Synthesis in Targeted Subcellular Organelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 6987–6992 (2019).
38. Abel, G. R., Calabrese, Z. A., Ayco, J., Hein, J. E. & Ye, T. Measuring and Suppressing the Oxidative Damage to DNA During Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **27**, 698–704 (2016).
39. Ojida, A., Tsutsumi, H., Kasagi, N. & Hamachi, I. Suzuki coupling for protein modification. *Tetrahedron Lett.* **46**, 3301–3305 (2005).

40. Kodama, K. *et al.* Regioselective Carbon-Carbon Bond Formation in Proteins with Palladium Catalysis; New Protein Chemistry by Organometallic Chemistry. *ChemBioChem* **7**, 134–139 (2006).
41. Kodama, K. *et al.* Site-Specific Functionalization of Proteins by Organopalladium Reactions. *ChemBioChem* **8**, 232–238 (2007).
42. Brustad, E. *et al.* A Genetically Encoded Boronate-Containing Amino Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 8220–8223 (2008).
43. Isenegger, P. G. & Davis, B. G. Concepts of Catalysis in Site-Selective Protein Modifications. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 8005–8013 (2019).
44. Jbara, M., Maity, S. K. & Brik, A. Palladium in the Chemical Synthesis and Modification of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 10644–10655 (2017).
45. Polshettiwar, V., Decottignies, A., Len, C. & Fihri, A. Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions in Aqueous Media: Green and Sustainable Syntheses of Biaryls. *ChemSusChem* **3**, 502–522 (2010).
46. Chalker, J. M., Wood, C. S. C. & Davis, B. G. A Convenient Catalyst for Aqueous and Protein Suzuki–Miyaura Cross-Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16346–16347 (2009).
47. Yusop, R. M., Unciti-Broceta, A., Johansson, E. M. V., Sánchez-Martín, R. M. & Bradley, M. Palladium-mediated intracellular chemistry. *Nat. Chem.* **3**, 239–243 (2011).
48. Li, N., Lim, R. K. V., Edwardraja, S. & Lin, Q. Copper-Free Sonogashira Cross-Coupling for Functionalization of Alkyno-Encoded Proteins in Aqueous Medium and in Bacterial Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15316–15319 (2011).

49. Li, N., Ramil, C. P., Lim, R. K. V. & Lin, Q. A Genetically Encoded Alkinoe Directs Palladium-Mediated Protein Labeling on Live Mammalian Cell Surface. *ACS Chem. Biol.* **10**, 379–384 (2015).
50. Tomás-Gamasa, M., Martínez-Calvo, M., Couceiro, J. R. & Mascareñas, J. L. Transition metal catalysis in the mitochondria of living cells. *Nat. Commun.* **7**, 12538 (2016).
51. Versteegen, R. M., Rossin, R., ten Hoeve, W., Janssen, H. M. & Robillard, M. S. Click to Release: Instantaneous Doxorubicin Elimination upon Tetrazine Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 14112–14116 (2013).
52. Weiss, J. T. *et al.* Extracellular palladium-catalysed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally activated prodrug approach. *Nat. Commun.* **5**, 3277 (2014).
53. Völker, T. & Meggers, E. Transition-metal-mediated uncaging in living human cells — an emerging alternative to photolabile protecting groups. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **25**, 48–54 (2015).
54. Liang, T., Chen, Z., Li, H. & Gu, Z. Bioorthogonal catalysis for biomedical applications. *Trends Chem.* **4**, 157–168 (2022).
55. Martínez-Calvo, M. & Mascareñas, J. L. Organometallic catalysis in biological media and living settings. *Coord. Chem. Rev.* **359**, 57–79 (2018).
56. Streu, C. & Meggers, E. Ruthenium-Induced Allylcarbamate Cleavage in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 5645–5648 (2006).
57. Sánchez, M. I., Penas, C., Vázquez, M. E. & Mascareñas, J. L. Metal-catalyzed uncaging of DNA-binding agents in living cells. *Chem Sci* **5**, 1901–1907 (2014).

58. Hsu, H.-T., Trantow, B. M., Waymouth, R. M. & Wender, P. A. Bioorthogonal Catalysis: A General Method To Evaluate Metal-Catalyzed Reactions in Real Time in Living Systems Using a Cellular Luciferase Reporter System. *Bioconjug. Chem.* **27**, 376–382 (2016).
59. Völker, T. & Meggers, E. Chemical Activation in Blood Serum and Human Cell Culture: Improved Ruthenium Complex for Catalytic Uncaging of Alloc-Protected Amines. *ChemBioChem* **18**, 1083–1086 (2017).
60. Isidro-Llobet, A., Álvarez, M. & Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **109**, 2455–2504 (2009).
61. Patterson, D. M., Nazarova, L. A. & Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **9**, 592–605 (2014).
62. Weiss, J. T. *et al.* Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. *J. Med. Chem.* **57**, 5395–5404 (2014).
63. 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.* **5**, 9329 (2015).
64. Rubio-Ruiz, B., Weiss, J. T. & Unciti-Broceta, A. Efficient Palladium-Triggered Release of Vorinostat from a Bioorthogonal Precursor. *J. Med. Chem.* **59**, 9974–9980 (2016).
65. Wang, W. *et al.* In situ activation of therapeutics through bioorthogonal catalysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **176**, 113893 (2021).
66. Li, J. *et al.* Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. *Nat. Chem.* **6**, 352–361 (2014).
67. Coelho, S. E. *et al.* Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates. *ACS Catal.* **9**, 3792–3799 (2019).

68. Wei, C. S. *et al.* The Impact of Palladium(II) Reduction Pathways on the Structure and Activity of Palladium(0) Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 5822–5826 (2013).
69. De Vries, A. H. M., Mulders, J. M. C. A., Mommers, J. H. M., Henderickx, H. J. W. & De Vries, J. G. Homeopathic Ligand-Free Palladium as a Catalyst in the Heck Reaction. A Comparison with a Palladacycle. *Org. Lett.* **5**, 3285–3288 (2003).
70. DeAngelis, A. J., Gildner, P. G., Chow, R. & Colacot, T. J. Generating Active “L-Pd(0)” via Neutral or Cationic π -Allylpalladium Complexes Featuring Biaryl/Bipyrazolylphosphines: Synthesis, Mechanistic, and Structure–Activity Studies in Challenging Cross-Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **80**, 6794–6813 (2015).
71. Chankeshwara, S. V., Indrigo, E. & Bradley, M. Palladium-mediated chemistry in living cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **21**, 128–135 (2014).
72. Luo, J., Pardin, C., Lubell, W. D. & Zhu, X. X. Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(ethylene glycol) resins and their use in solid-phase synthesis and supported TEMPO catalysis. *Chem. Commun.* 2136 (2007) doi:10.1039/b700215g.
73. Lin, V. S. *et al.* Structure Dependent Determination of Organophosphate Targets in Mammalian Tissues Using Activity-Based Protein Profiling. *Chem. Res. Toxicol.* **33**, 414–425 (2020).
74. Jaime-Figueroa, S., Zamilpa, A., Guzmán, A. & Morgans, D. *N*-3-ALKYLATION OF URACIL AND DERIVATIVES VIA *N*-1-BOC PROTECTION. *Synth. Commun.* **31**, 3739–3746 (2001).
75. Zhang, S., Xia, H., Sun, J. & Zhou, W. A practical synthesis of *N*-allyl/propargyl-substituted 5-fluorouracils. *Arkivoc* **2022**, 168–175 (2023).

76. Zhou, T. & Ma, S. [Pd(NHC)(m-Cl)Cl]₂: Versatile and Highly Reactive Complexes for Cross-Coupling Reactions that Avoid Formation of Inactive Pd(I) Off-Cycle Products. *OPEN ACCESS*.