



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO QUÍMICA

Victor Cordova de Sá Machado

Nova molécula alvo para imageamento celular: Ativação *in situ* utilizando
um sal de paládio

Florianópolis

2022

Victor Cordova de Sá Machado

Nova molécula alvo para imageamento celular: Ativação *in situ* utilizando um sal de paládio

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
Coorientador: MSc. Vinícius Viana Marto

Florianópolis
2022

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

Machado, Victor

Novas moléculas alvo para imageamento celular : Ativação
in situ utilizando um sal de paládio / Victor Machado ;
orientador, Josiel Domingos, coorientador, Vinícius Marto,
2022.

59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Físicas e Matemáticas, Graduação em Química, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Catálise metálica bio-ortogonal. 3.
Fluoróforo. 4. Sal de Paládio. I. Domingos, Josiel . II.
Marto, Vinícius. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Química. IV. Título.

Victor Cordova de Sá Machado

Nova molécula alvo para imageamento celular: Ativação *in situ* utilizando um sal de paládio

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso Química

Florianópolis, 14 de dezembro de 2022



Documento assinado digitalmente
Danielle Marranquiel Henriques
Data: 19/12/2022 23:03:54-0300
CPF: ***.803.900-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^a. Dr^a. Danielle Marranquiel Henriques
Coordennadora do Curso

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
Josiel Barbosa Domingos
Data: 19/12/2022 13:04:04-0300
CPF: ***.404.520-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Josiel Barbosa domingos
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Giovanni Finoto Caramori
Data: 19/12/2022 14:15:21-0300
CPF: ***.927.338-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Adriana Passarella Gerola
Data: 19/12/2022 15:01:56-0300
CPF: ***.536.269-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^a. Dr^a. Adriana Passarella Gerola
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, principalmente minha mãe, por sempre ter ficado ao meu lado em todos esses anos de estudo e agradeço também por nunca ter deixado de me motivar e sempre correr atrás do que eu acredito;

À minha namorada Steffany, por ser minha companheira durante todos esses anos, me apoiando e principalmente me ensinando como até mesmo nos momentos mais difíceis a organização supera tudo;

Ao meu coorientador Msc. Vinícius Viana Marto, por toda a paciência e ajuda na confecção deste trabalho;

À Msc. Thuany Mayara Ferreira, por toda a ajuda com os tratamentos de dados e ajuda com os equipamentos, além disso, agradeço por todo o conhecimento compartilhado comigo.

Ao professor Dr. Josiel Barbosa Domingos, por além de ser um grande pesquisador, ser também um professor inspirador.

Aos colegas de laboratório, por todos os momentos de discussão científica, que ajudaram fortemente em minha formação;

Aos colegas de graduação (Gustavo, Sabrina, Kevin e Christopher), por todos os almoços no RU e o tempo gasto na BU;

Ao departamento de química e seu corpo docente, por todo o conhecimento compartilhado comigo;

À CNPq, pelo apoio financeiro;

À UFSC, por ser uma universidade pública, gratuita e de qualidade.

RESUMO

A química bio-ortogonal ganhou notoriedade neste ano devido a 3 pesquisadores (Carolyn Bertozzi, Morten Meldal e K. Barry Sharpless) terem sido laureados com o Prêmio Nobel de química. Bertozzi definiu as reações bio-ortogonais como sendo reações rápidas e com reagentes que não devem afetar as funções celulares nativas. Neste contexto, a química bio-ortogonal é dividida em duas classes de reações, reações associativas e dissociativas, sendo que esta última tem se destacado na ativação de fármacos, biomoléculas ou fluoróforos. Esta ativação pode ocorrer utilizando-se um gatilho químico, normalmente um metal de transição, sendo o paládio o mais utilizado. Neste trabalho objetivou-se a síntese de um novo fluoróforo (7-hidroxycumarina-3-carboxilato de etila) e dois pró-fluoróforos (7-propargiloxicumarina-3-carboxilato de etila [7PropC] e 7-propargiloxy-4-metilcumarina [7PropM]), estudos fotofísicos e a ativação bio-ortogonal destes últimos com um sal de paládio (Na_2PdCl_4). A síntese alcançou rendimentos que variaram entre 37 e 91%. Como esperado, os dados fotofísicos indicaram que o grupo propargílico diminui a fluorescência e a absorção dos fluoróforos, além de ocasionar a diminuição do deslocamento de Stokes. Percebeu-se também que grupos retiradores de elétrons influenciam diretamente no rendimento quântico de fluorescência. Já os valores de conversão máxima de fluorescência (determinado pelas curvas cinéticas), mostram que há a recuperação da fluorescência após a reação, sendo possível então utilizar espécies de paládio na desproteção dos pró-fluoróforos estudados. Determinou-se por estudos cinéticos, constantes de velocidade de segunda ordem na ordem de $3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para ambos pró-fluoróforos, indicado compatibilidade dos seus usos em catálise bio-ortogonal, contudo o maior rendimento de formação de produto foi com o 7PropC, 83 % contra 49% com o 7PropM. Os resultados dos estudos termodinâmicos da reação de desproteção indicam que a entropia do estado de transição é negativa, demonstrando que a etapa lenta da reação deve ser o ataque nucleofílico da água no complexo intermediário paládio-tripla ligação propargílica. Para além, os resultados sugerem que as moléculas sintetizadas podem ser utilizadas no imageamento de celular e como moléculas modelo para estudo de desproteção bio-ortogonal utilizando paládio como catalisador metálico.

Palavras-chave: Catálise Metálica Bio-ortogonal, Fluoróforo, Sal de Paládio

ABSTRACT

Bio-orthogonal chemistry gained notoriety this year due to 3 researchers (Carolyn Bertozzi, Morten Meldal and K. Barry Sharpless) being awarded the Nobel Prize in Chemistry. Bertozzi defined bio-orthogonal reactions as fast reactions with reagents that should not affect native cellular functions. In this context, bio-orthogonal chemistry is divided into two classes of reactions, associative and dissociative reactions, the latter being highlighted in the activation of drugs, biomolecules or fluorophores. This activation can occur using a chemical trigger, usually a transition metal, with palladium being the most used one. The objective of this work was the synthesis of a new fluorophore (ethyl 7-hydroxycoumarin-3-carboxylate) and two pro-fluorophores (ethyl 7-propargyloxycoumarin-3-carboxylate [7PropC] and 7-propargyloxy-4-methylcoumarin [7PropM]), photophysical studies and the bio-orthogonal activation of the latter with a palladium salt (Na_2PdCl_4). The synthesis reached yields that varied between 37 and 91%. As expected, the photophysical data indicated that the propargyl group decreases the fluorescence and absorption of fluorophores, in addition to causing a decrease in the Stokes shift. It was also noticed that electron withdrawing groups directly influence the quantum yield of fluorescence. The maximum fluorescence conversion values (determined by the kinetic curves) show that there is a recovery of fluorescence after the reaction, making it possible to use palladium species in the deprotection of the studied pro-fluorophores. It was determined by kinetic studies, second order rate constants in the order of $3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for both pro-fluorophores, indicating compatibility of their uses in bio-orthogonal catalysis. However, the highest yield of product formation was with 7PropC, 83% against 49% with 7PropM. The results of thermodynamic studies of the deprotection reaction indicate that the entropy of the transition state is negative, demonstrating that the slow step of the reaction should be the nucleophilic attack of water on the palladium-propargyl triple bond intermediate complex. In addition, the results suggest that the synthesized molecules can be used in cell imaging and as model molecules to study bio-orthogonal deprotection using palladium as a metallic catalyst.

Keywords: Bio-orthogonal metallic catalysis, Fluorophore, Palladium salt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de fluoróforos utilizados em imageamento celular.....	21
Figura 2: Pró-fluoróforos e seus metais de ativação.....	22
Figura 3: Estrutura da 7-hidroxycumarina-3-carboxilato de etila (7HC).....	33
Figura 4: Espectros de RMN de ^1H de 7HC em DMSO- d_6 (400 MHz).....	34
Figura 5: Espectros de RMN de ^{13}C de 7HC em DMSO- d_6 (400 MHz).....	35
Figura 6: Estrutura da 7-propargiloxicumarina-3-carboxilato de etila (7PropC).....	35
Figura 7: Estrutura da 7-propargiloxi-4-metilcumarina (7PropM).....	36
Figura 8: a) Espectro de absorção da molécula 7HC. Concentração: 30 mM. b) Espectro de absorção da molécula 7PropC. Concentração: 30 mM. c) Comparação entre os espectros de absorção de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C).....	37
Figura 9: a) Espectro de absorção da molécula 7HM. Concentração: 100 μM . b) Espectro de absorção da molécula 7PropM. Concentração: 100 μM . c) Comparação entre os espectros de absorção de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C).....	38
Figura 10: a) Espectro de emissão e excitação da molécula 7HC. Concentração: 60 μM . b) Espectro de emissão e excitação da molécula 7PropC. Concentração: 60 μM . c) Comparação entre os espectros de emissão de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C).....	40
Figura 11: a) Espectro de emissão e excitação da molécula 7HM. Concentração: 100 μM . b) Espectro de emissão e excitação da molécula 7PropM. Concentração: 100 μM . c) Comparação entre os espectros de emissão de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C).....	41
Figura 12: Cinéticas espectrais de desproteção da 7PropC variando a concentração de Pd. Condições gerais: 7PropC: 30 μM , Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C. a) 0,10 eq. de NaPdCl_4 ; b) 0,25 eq. de NaPdCl_4 ; c) 0,50 eq de NaPdCl_4 ; d) 1,0 eq de NaPdCl_4	45
Figura 13: Cinéticas de desproteção da 7PropC variando a concentração de Pd no comprimento de onda de 400 nm. Condições gerais: 7PropC: 60 μM , Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C.....	46
Figura 14: Cinéticas espectrais de desproteção da 7PropM variando a concentração de Pd. Condições gerais: 7PropM: 100 μM , Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C. a) 0,10	

eq. de NaPdCl ₄ ; b) 0,25 eq. de NaPdCl ₄ ; c) 0,50 eq de NaPdCl ₄ ; d) 1,0 eq de NaPdCl ₄	47
Figura 15: Cinéticas de desproteção da 7PropM variando a concentração de Pd no comprimento de onda de 364 nm. Condições gerais: 7PropC: 60 μM, Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C.....	47
Figura 16: Gráfico de ln(k ₂) versus 1/T. Condições gerais: 60 mM, Tampão PSB, pH 7,4.....	49
Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H da molécula 7PropC.....	58
Figura 18. Espectro de RMN de ¹³ C da molécula 7PropC.....	59
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H da molécula 7PropM.....	59
Figura 20: Espectro de RMN de ¹³ C da molécula 7PropM.....	60
Figura 21: Curva de calibração espectral da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C).....	61
Figura 22: Curva de calibração da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C).....	61
Figura 23: Curva de calibração espectral da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C).....	61
Figura 24: Curva de calibração espectral da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C).....	62
Figura 25: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7HC.....	62
Figura 26: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7PropC.....	63
Figura 27: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7HM.....	63
Figura 28: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7PropM.....	64
Figura 29: Cinética de despropargilação da 7PropC em condição de segunda ordem, com curva não-linear.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de deslocamento de Stokes das moléculas estudadas.....	42
Tabela 2: Valores de rendimento quântico das moléculas estudadas.....	43
Tabela 3: Valores de k_2 e porcentagem de conversão.....	47

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Desproteção de um derivado da fluoresceína.....	18
Esquema 2: Reação de despropargilação da Pró-5FU.....	19
Esquema 3: Desproteção de compostos propargílicos.....	20
Esquema 4: Fotoliberação de cumarinas em meio biológico.....	23
Esquema 5: Rota sintética da molécula 7-hidroxycumarina-3-carboxilato de etila....	26
Esquema 6: Rota sintética da molécula 7PropC.....	27
Esquema 7: Esquema reacional da síntese do pró-fluoróforo 7PropM.....	28
Esquema 8: Ideia de mecanismo para a rota sintética de 7HC.....	58
Esquema 9: Ideia de mecanismo para a síntese dos pró-fluoróforos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Deoxiribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid*)

pH – Potencial hidrogeniônico

DNPPE – 2,4-Dinitropropargiloxi

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Pac – Paclitaxel

Doc – Doxorrubicina

5-FU – 5-fluorouracil

pKa – Negativo do log da constante de dissociação ácida

7HC – 7-hidroxycumarina-3-carboxilato de etila

7PropC – 7-propargiloxicumarina-3-carboxilato de etila

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

PBS - Tampão Fosfato Salino (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*)

$\lambda_{EmM\acute{a}x}$ – Comprimento de onda máximo de emissão

$\lambda_{ExM\acute{a}x}$ – Comprimento de onda máximo de excitação

DMSO – dimetilsulfóxido

HOMO - do inglês *highest occupied molecular orbital*

LUMO - do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*

k_2 – Constante de velocidade de segunda ordem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	17
2.1 Catálise metálica bio-ortogonal.....	17
2.2 Catalisadores de paládio em catálise bio-ortogonal: reações dissociativas.....	18
2.3 Clivagem do grupo propargil.....	19
2.4 Imageamento celular.....	20
2.5 Uso de cumarinas para imageamento celular.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos gerais.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Síntese do fluoróforo 7HC e dos pró-fluoróforos 7PropC e 7PropM.....	25
4.1.1 Síntese do fluoróforo 7HC.....	25
4.1.2 Síntese do pró-fluoróforo 7propC.....	26
4.1. Síntese do pró-fluoróforo 7propM.....	27
4.2 Preparação do tampão.....	28
4.3 Obtenção dos espectros de emissão e excitação.....	28
4.4 Espectrofotometria de absorção.....	29
4.5 Obtenção do rendimento quântico absoluto de fluorescência.....	29
4.6 Cinéticas de desproteção.....	30
4.6.1 Cinéticas espectrais.....	30
4.6.2 Variação da concentração do sal de Pd.....	30
4.6.3 Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	30
4.7 Precauções com reagentes perigosos e descarte dos resíduos.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Síntese.....	32
5.2 Caracterização estrutural.....	32
5.3 Estudos fotofísicos.....	37
5.3.1 Espectros de absorção e coeficiente de absortividade molar.....	37
5.3.2 Espectros de emissão e excitação e determinação do deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$).....	40

5.3.3 Determinação do rendimento quântico absoluto de fluorescência.....	43
5.4 Cinéticas da reação de despropargilação.....	44
5.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	45
5.4.2 Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	49
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICE A: IDEIAS DE MECANISMOS E ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA MOLÉCULA 7PROPC.....	58
APÊNDICE B: DADOS FOTOFÍSICOS.....	61
APÊNDICE C: DADOS CINÉTICOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Procedimentos de marcação celular são de extrema importância para a biologia química e biomedicina. O imageamento celular através do uso de compostos orgânicos, por exemplo, possibilita o acompanhamento de modificações realizadas nas estruturas que compõem a célula, como DNA ou RNA, distinguir entre os processos que ocorrem extra ou intracelularmente e até mesmo identificar células com receptores específicos, como células cancerígenas.

Para que possam ser utilizados em imageamento celular, os compostos devem apresentar uma série de parâmetros, como: ter baixo peso molecular, ser fluorescente, apresentar um alto rendimento quântico de fluorescência e um grande coeficiente de absorvidade molar. Dentre as moléculas que atendem a essas características temos as cumarinas e seus derivados.

Uma vez que as moléculas derivadas da cumarina atendem aos critérios estabelecidos para estudos de imageamento celular, esta foi escolhida como molécula base para a síntese de fluoróforos neste trabalho. Para além, os compostos sintetizados, e outros comerciais, serão modificados com grupos propargílicos para formar pró-fluoróforos com retenção de fluorescência que serão utilizados como substratos nas reações de clivagem. A desproteção da pró-cumarina no meio reacional pode ser acompanhada por espectroscopia de absorção usando um espectrofotômetro UV-vis e os resultados relacionados a ativação do fluoróforo *in situ*.

Uma das maneiras de ativar o fluoróforo reestabelecendo sua atividade é por meio da catálise metálica. Neste trabalho, o paládio foi escolhido como metal de transição para promover as clivagens, uma vez que seu uso em ativações bio-ortogonais é bem estabelecido na literatura. Vários trabalhos demonstram a eficiência de sais desse metal na desproteção de éteres propargílicos, apresentando uma alta reatividade frente ao substrato estudado. Além do mais, o paládio ainda é atóxico nas concentrações utilizadas, portanto, pode-se utilizá-lo em meio biológico sem que haja a diminuição da viabilidade celular.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

2.1 Catálise metálica bio-ortogonal

A maioria das reações químicas orgânicas tradicionais são pouco aplicáveis em sistemas vivos, pois nesses sistemas as transformações químicas devem ser controladas, devido à alta sensibilidade das estruturas biológicas a variações químicas ou físicas, além de ocorrerem em condições reacionais limitadas, como meio aquoso, pH neutro e temperatura moderada¹.

No entanto, aplicar reações que foram feitas apenas em condições laboratoriais em sistemas vivos é de grande interesse da biologia química, pois com isso torna-se possível o desenvolvimento de novas metodologias para a síntese de fármacos ou fluoróforos *in vivo*, possibilitando assim a observação de fenômenos químicos e modificações – no RNA e DNA, e na superfície de células – por meio do imageamento celular^{1,2}.

Neste contexto, a química bio-ortogonal nasceu com o objetivo de adaptar para o meio biológico reações realizadas em condições laboratoriais. Esse processo mostra-se cada vez mais satisfatório, visto que, atualmente há uma grande repercussão dessa área no meio científico. Prova disso, foi o recente destaque da química bio-ortogonal no Prêmio Nobel de química de 2022, onde os 3 pesquisadores laureados tinham como foco de seus trabalhos reações que ocorrem em condições biocompatíveis^{1,3,4}.

No entanto, para que as reações sejam consideradas bio-ortogonais, devem atender a alguns parâmetros tais como: alta quimiosseletividade, não afetarem as funções celulares/bioquímicas, processarem-se a temperaturas moderadas e as espécies envolvidas devem ser inertes a presença das biomoléculas⁵.

Tratando-se das metodologias utilizadas para ativação de moléculas, a química bio-ortogonal conta com duas vertentes: a associativa (formação de ligação) ou a dissociativa (clivagem de ligações), sendo que neste último caso, o avanço dos estudos de catalisadores metálicos em cinética química em meio aquoso, contribuiu para que eles fossem utilizados na ativação e modificações sintéticas em condições semelhantes as biológicas, iniciando-se assim catálise metálica bio-ortogonal^{6,7}.

As reações associativas foram os primeiros tipos de reações estudadas em química bio-ortogonal. Este tipo de reação faz uso de duas ou mais moléculas inativas (sem

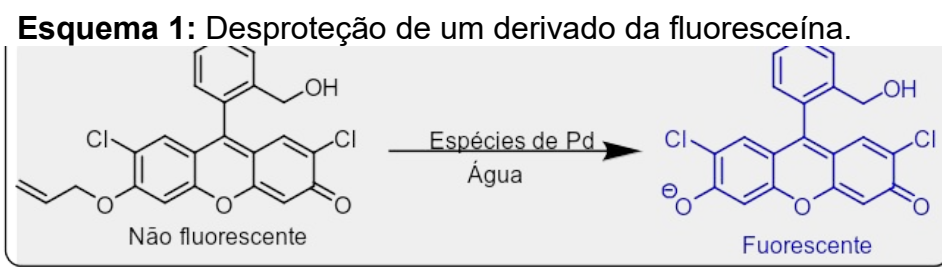
fluorescência ou não citotóxica, por exemplo) quando isoladas, de modo a formar um novo composto ativo (fluorescente ou citotóxico). Tal estratégia foi utilizada para a identificação de 60 proteínas idênticas no capsídeo do vírus do mosaico de caupi, o que permitiu o desenvolvimento de novos fármacos para a inibição desse vírus⁸.

Já as reações dissociativas ocorrem com o rompimento de uma ligação e podem ser aplicadas na ativação de pró-fluoróforos ou pró-fármacos *in vivo*. Para isso, um fluoróforo ou fármaco é protegido com grupos (propargil ou alil, por exemplo) que irão diminuir ou retirar sua atividade que será posteriormente restaurada na presença de um catalisador contendo metais de transição.

Dentre os vários metais que vem sendo utilizados na catálise metálica bio-ortogonal, o paládio (Pd) é um dos mais importantes e utilizados. Sua aplicação é relatada na literatura, com boa atividade catalítica, em reações associativas e dissociativas.

2.2 Catalisadores de paládio em catálise bio-ortogonal: reações dissociativas

A primeira reação com paládio em solução aquosa reportado na literatura foi feito por Koide *et al.* (2007)⁹, um marco inicial para a catálise metálica bio-ortogonal. Neste trabalho os autores propuseram a síntese de um sensor para espécies de paládio. A estrutura desse sensor continha um derivado de fluoresceína protegido com um grupo alílico (**Esquema 1**), (não fluorescente) que, quando na presença de espécies de Pd, sofreria a clivagem do grupo alil reestabelecendo sua fluorescência.

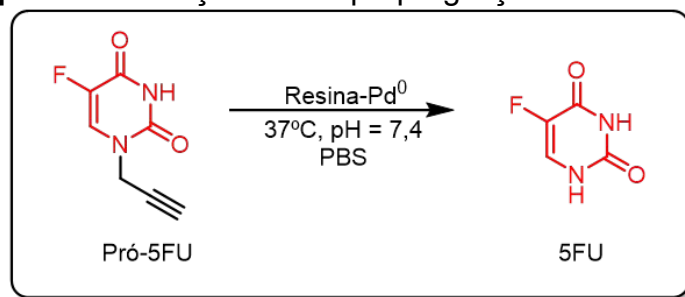


Fonte: Adaptado de Koide *et al.* (2007)⁹.

Já o primeiro uso de paládio em catálise metálica bio-ortogonal do tipo dissociativa foi reportado por Unciti-Broceta *et al.* (2014)¹⁰, onde uma nanopartícula de paládio suportada em uma resina feita de polietilenoglicol-poliestireno foi aplicada para a ativação do fármaco, 5-fluorouracil (**Esquema 2**), utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer,

em condições biológicas, isto é, temperatura de 37 °C, pH igual a 7,4 e um tampão com força iônica controlada. Os resultados experimentais demonstraram que a completa desproteção do fármaco ocorreu após 72 horas de reação.

Esquema 2: Reação de despropargilação da Pró-5FU

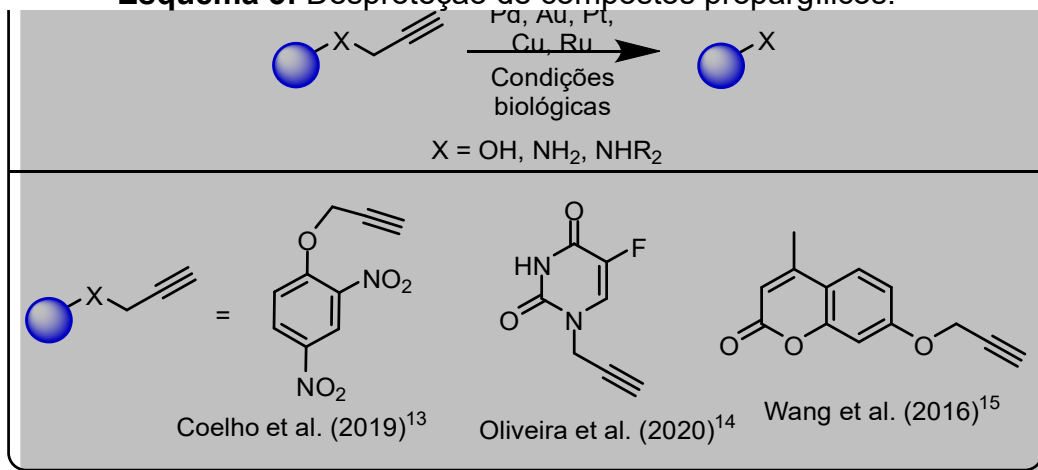


Fonte: Adaptado de Unciti-Broceta *et al* (2014)¹⁰.

Os autores ainda aplicaram esse sistema em embriões de peixe zebra, utilizando um pró-fluoróforo derivado da fluoresceína para acompanhar o acúmulo das nanopartículas nos embriões. Observou-se um grande acúmulo de nanopartículas de paládio no sistema gastrointestinal do embrião por meio da fluorescência reestabelecida devido a formação da fluoresceína desprotegida no meio.

2.3 Clivagem do grupo propargil

Diferentes grupos podem ser utilizados para proteger uma molécula culminando na diminuição ou extinção de sua atividade, sendo um dos principais exemplos o grupo propargil¹¹. Este grupo protetor destaca-se por algumas características fundamentais, como a sua alta afinidade com centros metálicos (principalmente Pd(II)), ser um grupo pouco volumoso, com uma alta densidade eletrônica e estável frente a água e outros nucleófilos presentes no meio celular. Para além, as reações de clivagem de grupo propargil ocorrem com cinética mais rápida que a de grupos alil, além de não formarem produtos secundários com toxicidade¹². O esquema 3, mostra alguns exemplos de ativação de moléculas por meio da clivagem do grupo propargil.

Esquema 3: Desproteção de compostos propargílicos.

Fonte: O autor

Diversos trabalhos têm feito uso desse grupo protetor aliando a isso a catálise metálica bio-ortogonal para a clivagem do mesmo. Nessa linha de pesquisa, destaca-se o trabalho do nosso grupo de pesquisa, onde se utilizou sais de paládio (II) que serviram de gatilho químico para a clivagem de grupo propargil do substrato 2,4-dinitrofenil propargílico éter (DNPPE), no qual os resultados mostram que a reação era bifásica com uma das fases rápidas e outra lenta¹³.

Sathyan *et al* (2022)¹², utilizou nanopartículas poliméricas à base de paládio (II) para catalisar reações de depargilação em meio celular. Para tal, os estudos foram realizados por meio das reações de desproteção pró-fármacos bem estabelecidos no tratamento contra o câncer paclitaxel (PAC), doxorrubicina (DOX) e 5-fluorouracil (5-FU), protegidos com grupo propargil, no meio de cultura celular DMEM, apresentando bons resultados para cinética de ativação dos fármacos.

2.4 Imageamento celular

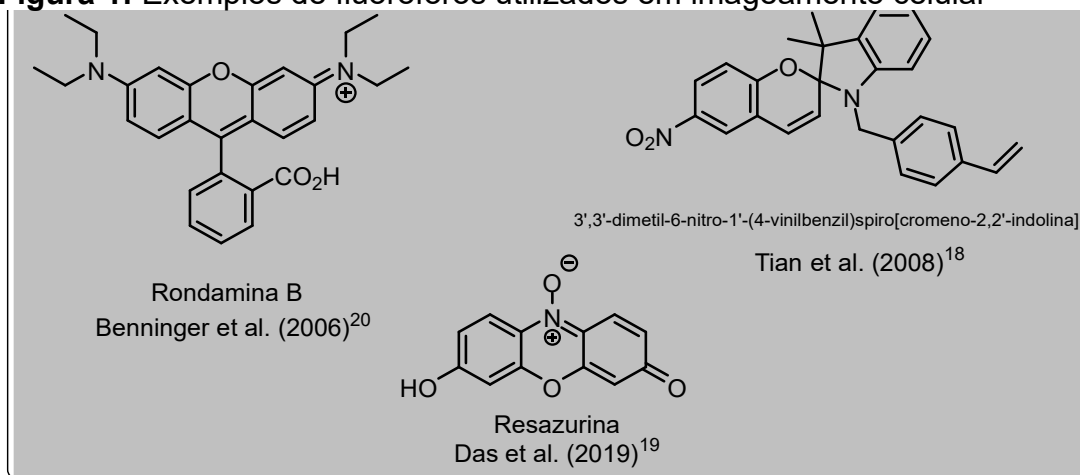
O uso de imageamento celular tornou possível a observação de moléculas, modificações sintéticas e até mesmo compreender fenômenos de agregação de estruturas, em ambientes biológicos. O mais comum no imageamento celular de estruturas biológicas é a utilização de fluoróforos (moléculas que passam por um processo de emissão ao serem excitadas por um certo comprimento de onda)¹⁶.

A utilização de fluoróforos para imageamento celular vem crescendo muito nos últimos anos. O primeiro fluoróforo utilizado em sistemas vivos foi sintetizado em 1942 por Coons *et al*¹⁷, em seu trabalho o autor adiciona fluoresceína-5-

isotiocianato em anticorpos e obtém assim anticorpos IgG anti pneumococos, sendo essa uma metodologia revolucionária para a época.

A escolha do fluoróforo para imageamento celular depende da estrutura que se quer observar e de parâmetros químicos (pK_a , solubilidade e estabilidade) e físicos (comprimento de onda de excitação, comprimento de onda de emissão, coeficiente de absorvidade molar, rendimento quântico de fluorescência e tempo de meia vida do estado excitado) do fluoróforo¹⁶, sendo que para fins de imageamento o fluoróforo deve ter um grande coeficiente de extinção e um alto rendimento quântico¹⁸. Outro importante ponto para a escolha do fluoróforo é sua seletividade, ou seja, ele não deve interagir com estruturas que não sejam as escolhidas inicialmente, evitando assim uma marcação em local não desejado¹⁹. A Figura 1, apresenta alguns fluoróforos utilizados em imageamento celular.

Figura 1: Exemplos de fluoróforos utilizados em imageamento celular



Fonte: O autor

A utilização de pró-fluoróforos em catálise bio-ortogonal é uma adição recente. Em 2019, por exemplo, Das *et al.*¹⁹ desenvolveu nanoenzimas compostas de nanopartículas de ouro estabilizadas em um polímero dibloco, contendo uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, e sobre essa foram adicionados complexos de rutênio, que foram utilizadas na desproteção de pró-fluoróforos, protegidos com o grupo alil, em meio intra e extracelular.

Diversas moléculas vêm sendo utilizadas com essa finalidade (**Figura 2**). Dentre essas, destaca-se o uso de cumarinas e seus derivados, uma vez que essas

moléculas atendem aos parâmetros estruturais e químicos desejados para a técnica de imageamento celular²¹.

Figura 2: Pró-fluoróforos e seus metais de ativação.

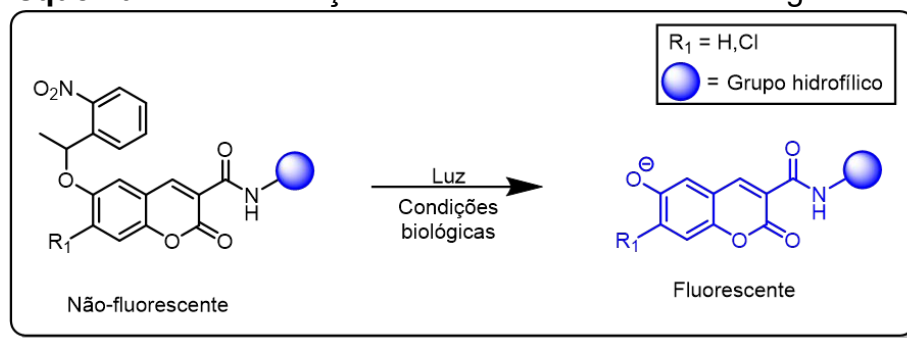


Fonte: O autor

2.5 Uso de cumarinas para imageamento celular

Cumarinas são compostos encontrados naturalmente e estão associados a estruturas com baixa toxicidade. Por apresentarem deslocamentos de Stokes próximo de outras moléculas que já são utilizadas para imageamento celular (como por exemplo a Fluoresceína)²³, altos rendimentos quânticos de emissão, serem estáveis termicamente e biocompatíveis, essa classe de moléculas tem sido alvo de aplicação em imageamento celular²¹, principalmente na visualização de células cancerígenas²⁴.

Estruturalmente, as cumarinas que mais são utilizadas em imageamento celular são as contendo grupos amidas devido a sua semelhança com peptídeos. Isso faz com que essas amido-cumarinas entrem dentro da célula com maior facilidade e assim se torna mais fácil a visualização de estruturas celulares²⁴. Dentro dessa abordagem, essas moléculas foram utilizadas como substratos em trabalho de fotocatalise. Em estudo publicado por Zhao *et al.*²⁵, amido-cumarinas substituídas com nitrofenol (não fluorescentes) foram utilizadas como substratos em desproteção bio-ortogonal por fotocatalise. Após uma irradiação com luz, as cumarinas livres são liberadas *in situ* com fluorescência reestabelecida. (**Esquema 4**).

Esquema 4: Fotoliberação de cumarinas em meio biológico

Fonte: Adaptado de Zhao *et al* (2003)²⁶.

Na catálise metálica bio-ortogonal, as cumarinas também são usadas como moléculas modelos para o estudo de reações de clivagem, sendo a capacidade dessas estruturas serem fluorescentes ponto chave dos estudos, colaborando para que cresça o número de trabalhos relacionados a síntese e estudos fotofísicos e cinéticos dessa classe de moléculas²².

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Esse trabalho tem como objetivo a síntese de fluoróforos e pró-fluoróforos baseados em cumarina, determinação das suas propriedades fotofísicas e a ativação in situ dos pró-fluoróforos sob condições biológicas, utilizando um sal de paládio como promotor.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o fluoróforo 7-hidroxycumarina-3-carboxilato de etila (7HC);
- Proteger a molécula 7HC com o grupo propargil, formando assim o pró-fluoróforo 7-propargilcumarina-3-carboxilato de etila (7propC);
- Proteger a 7-hidroxi-4-metilcumarina (7HM) com grupo propargil, sintetizando assim o pró-fluoróforo 7-propargiloxi-4-metilcumarina (7propM);
- Estudar parâmetros de fluorescência e absorção das moléculas sintetizadas;
- Estudar a atividade do sal de paládio (Na_2PdCl_4), na reação de despropargilação em condições biológicas, das moléculas 7propC e 7propM;
- Determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações de despropargilação em condições biológicas (em água, pH 7,4 à 37 °C).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o projeto foi desenvolvido no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio) no departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com orientação do professor Dr. Josiel Barbosa Domingos e coorientação do doutorando MSc. Vinícius Viana Marto.

Os reagentes e solventes que foram utilizados na síntese das moléculas foram adquiridos de fontes comerciais (Merck, Aldrich, Fluka Synth, etc.). Os equipamentos de apoio (bomba de vácuo, vidrarias, balanças, agitadores magnéticos e rotaevaporador) estavam disponíveis no LaCBio.

O sal de paládio utilizado (Na_2PdCl_4) como catalizador é disponível comercialmente, portanto, não é necessária sua síntese

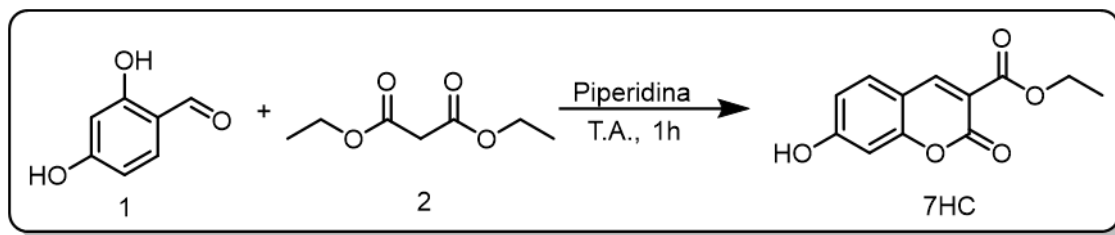
As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram feitas na Central de Análises que fica junto ao departamento de química da UFSC. Os espectros de fluorescência foram obtidos por meio do espectrofluorímetro Hitachi F-4500, com excitação por lâmpada de Xenônio de 125W presente no laboratório Polissol. As cinéticas de desproteção dos pró-fluoróforos foram acompanhadas com o auxílio de um espectrofotômetro SpectraMax® Plus 384 com capacidade de uma cubeta de quartzo ou microplacas de 96 ou 384 poços e de um espectrofotômetro de UV-vis Varian Cary 50 Bio com capacidade para até 18 cubetas de quartzo, ambos presentes no LaCBio.

4.1 Síntese do fluoróforo 7HC e dos pró-fluoróforos 7PropC e 7PropM

4.1.1 Síntese do fluoróforo 7HC

A molécula 7-hidroxycumarina-3-carboxilato de etila (7HC) foi sintetizada como proposto por Lee *et al* (2018)²⁶, onde 2,4-dihidroxibenzaldeído (**1**) reagiu com malonato de dietila (**2**) na presença de piperidina (**Esquema 5**).

Esquema 5: Rota sintética da molécula 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etila



Fonte: O autor

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1,38 g (10 mmol) de 2,4-dihidroxibenzaldeído e 1,85 mL de malonato de dietila (12 mmol), agitando até obter-se uma mistura reacional homogênea. Após isso, gotejou-se 1,19 mL de piperidina (12 mmol) e o sistema foi mantido sob agitação por 1 h. Finalizado o tempo, se adicionou porções de uma solução de HCl 10%, onde se obteve um precipitado amarelo, o qual foi coletado por filtração à vácuo e lavado com água gelada. Onde se obteve 1,45 g de um sólido amarelo (rendimento: 62%). **p.f.:** 167-170 °C (**p.f.lit.:** 170-174 °C)²⁷.

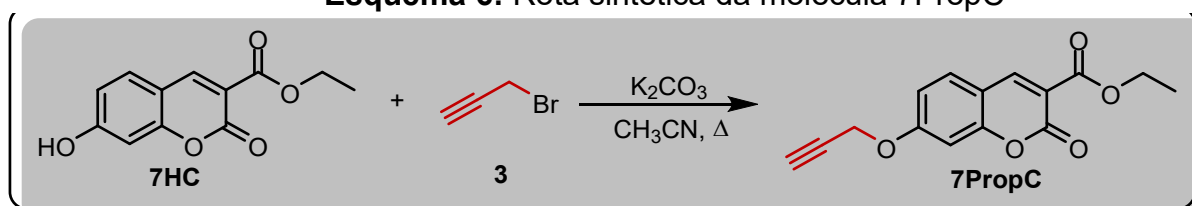
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,66 (s, 1H); 7,74 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 6,83 (dd, *J* = 8,6 e 2,3 Hz, 1H); 6,72 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); 4,25 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ/ppm: 164,11; 162,96; 157,12; 156,41; 149,43; 132,11; 114,02; 112,07; 110,42; 101,80; 60,81; 14,14.

4.1.2 Síntese do pró-fluoróforo 7propC

Fez-se a síntese baseando-se na proposta de Zak *et al* (2012)²⁸, onde se adicionou a 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etila (**7HC**) junto do brometo de propargila (**3**), na presença de carbonato de potássio e acetonitrila, como mostra o esquema 6.

Esquema 6: Rota sintética da molécula 7PropC



Fonte: O autor

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 4,42 g carbonato de potássio anidro (32 mmol) com 500 mg do 7HC (2 mmol) previamente preparado em CH_3CN (25 mL), sob atmosfera inerte. Após a solubilização do 7HC foi adicionado 0,18 mL do brometo de propargila (80% em tolueno) (2,4 mmol), mantendo o sistema sob agitação e aquecimento (60°C) por 12 h.

Finalizado o tempo, o solvente foi retirado com evaporador rotativo e o sólido remanescente dissolvido em CH_2Cl_2 e lavado com solução aquosa saturada de NH_4Cl . Sequencialmente, foi feita a extração utilizando CH_2Cl_2 (3x25 mL), sendo a solução orgânica coletada e seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente foi retirado com o evaporador rotativo e após uma purificação, utilizando coluna cromatográfica obteve-se 217 mg de um sólido amarelo pálido (rendimento: 37,3%). **p.f.:** 120-123 °C (**p.f.lit.:** 122-124 °C)²⁹.

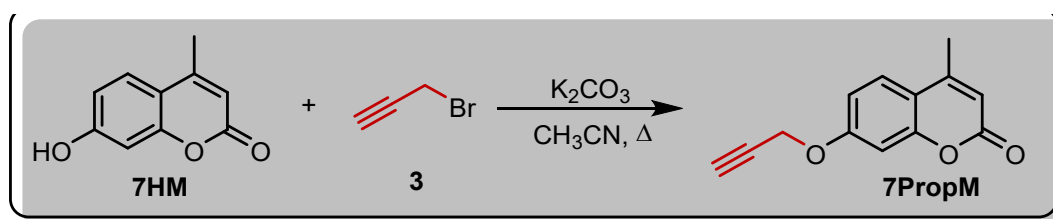
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 8,72 (s, 1H); 7,86 (d, J = 8,8 Hz, 1H); 7,08 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 7,04 (dd, J = 8,6 e 2,5 Hz, 1H), 4,98 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 4,27 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,70 (t, J = 2,4 Hz, 1H); 3,37 (s, 3H) 1,30 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 162,72; 162,46; 156,62; 156,15; 149,04; 131,67; 113,85; 113,64; 111,96; 101,31; 79,17; 78,24; 60,99; 56,39; 14;11.

4.1.3 Síntese do pró-fluoróforo 7propM

A síntese da molécula 7-propargiloxi-4-metilcumarina (**7PropM**), seguiu da mesma maneira que a descrita para a molécula 7-propargiloxi-cumarina-3-carboxilato de etila (**7PropC**), no entanto, usou-se a 7-hidroxi-4-metilcumarina (**7HM**) como material de partida, onde a molécula **7HM** encontra-se disponível comercialmente. O esquema 7, mostra o esquema sintético da molécula **7PropM**.

Esquema 7. Esquema reacional da síntese do pró-fluoróforo 7PropM



Fonte: Autor

Partiu-se de 176,2 mg do composto **7HM** (1 mmol), e após o processo de síntese e de purificação obteve-se 195,1 mg de um sólido amarelo pálido, onde o rendimento da síntese foi de 91%. **p.f.:** 135 – 141 °C (**p.f lit.:** 130 - 135)³⁰.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,54 – 7,47 (m, 1H); 6,95 – 6,68 (m, 2H), 6,14 (d, J = 1,3 Hz, 1H); 4,75 (d, J = 2,5 Hz, 2H); 2,57 (t, J = 2,4 Hz, 1H); 2,39 (d, J = 1,3 Hz, 3H)

RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 161,19; 160,46; 155,14; 125,73; 114,36; 112,80; 112,52; 102,28; 77,54; 76,60; 56,29; 18,76

4.2 Preparação do tampão

O tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) foi adquirido comercialmente na forma de pastilhas. Para o preparo da solução, uma pastilha foi dissolvida em 200 mL de água ultrapura fornecendo uma concentração de 10 mM de hidrogenofosfato dissódico, 2,7 mM de cloreto de potássio e 137 mM de cloreto de sódio. A solução permaneceu por dez minutos em banho de ultrassom para a remoção de todo dióxido de carbono possivelmente dissolvido, o pH foi ajustado para 7,4 e a solução foi mantida sobre refrigeração.

4.3 Obtenção dos espectros de emissão e excitação

Para as medidas de excitação e emissão utilizou-se um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, com excitação por lâmpada de Xenônio de 125W. Utilizou-se cubetas de quartzo com as quatro faces transparentes com caminho óptico de 10,00 mm x 10,00 mm. Para o espectro 3D, fez-se uma varredura espectral de 250 até 700 nm, onde se aplicou a mesma varredura para emissão e excitação.

Os espectros de emissão e excitação 2D foram obtidos utilizando-se uma abertura da fenda de 2,5 nm, tanto para a emissão quanto para a excitação, e uma voltagem de 700 V, o comprimento de onda selecionado, foi o máximo das bandas observado no espectro 3D. O solvente utilizado era composto de 95% de PBS e 5% de DMSO (Dimetil Sulfóxido), sendo a concentração final das moléculas, 7HC/7PropC em solução, 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração final das moléculas 7HM/7PropC foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.4 Espectrofotometria de absorção

Neste trabalho os dados cinéticos foram obtidos por meio de dois espectrofotômetros, sendo as cinéticas espectrais e as determinações dos coeficientes de absorvidade molar realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 10,00 mm x 10,00 mm, com varredura espectral entre 250 nm e 740 nm.

Já para as cinéticas se utilizou um espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 em microplacas com 96 poços, onde fez-se a cinética em 400 nm para a 7PropC/7HM e 364 nm para a 7PropM/7HM.

Por meio da curva de calibração contendo 5 pontos em duplicatas e, aplicando-se Lei de Lambert-Beer obteve-se o coeficiente de absorvidade molar para a molécula 7HC e a molécula 7HM. Através de curva determinou-se ainda o comprimento de onda ideal para a realização das cinéticas (λ_{ID}). Para acompanhamento de cinéticas no ponto, se fez uma curva de calibração no equipamento SpectraMax onde se variou a concentração dos fluoróforos e se correlacionou com a absorbância de cada concentração. As concentrações de 7HM utilizadas nessa curva de calibração foram 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo concentração de trabalho de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já para a molécula 7HM, utilizou-se concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e escolheu-se uma concentração de trabalho de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.5 Obtenção do rendimento quântico absoluto de fluorescência

Para a determinação do rendimento quântico absoluto das moléculas estudadas utilizou-se um espectrofotômetro de rendimento quântico absoluto da Hamamatsu Photonics modelo C9920-02G. A composição do solvente foi a mesma utilizada para a determinação dos espectros (95% PBS e 5% DMSO), não sendo determinada uma concentração exata, apenas manteve a absorbância menor que 0,1.

4.6 Cinéticas de desproteção

4.6.1 Cinéticas espectrais

Para as cinéticas espectrais de desproteção dos substratos propargílicos, utilizou-se concentrações de 10, 25, 50 e 100 mol% do sal de paládio em relação a cumarina protegida. O volume total de trabalho foi igual a 3 mL, onde 5% desse volume correspondia a DMSO e 95% ao tampão PBS. A concentração final de 7PropC foi de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, onde se fez uma varredura espectral de 250 até 800 nm e a concentração de 7PropM foi de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, a mesma varredura foi feita para a 7PropC. Fez-se a cinética por 24 horas, onde se mediu pontos de 5 em 5 minutos durante duas horas e após esse tempo, mediu-se os espectros a cada 30 minutos.

4.6.2 Variação da concentração do sal de Pd

Para a determinação da conversão de produto e a constante de segunda ordem (k_2) estudou-se a cinética de despropargilação variando-se a concentração do sal de paládio (Na_2PdCl_4) com relação a C_i do substrato. As variações nas concentrações de Na_2PdCl_4 usadas foram 10, 25, 50 e 100 mol%. O volume final de cada poço foi mantido em 300 μL , sendo que 5% desse volume de DMSO e 95% PBS. (7PropC: $60 \mu\text{mol L}^{-1}$; Na_2PdCl_4 : 6, 15, 30 e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, 7PropM: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, Na_2PdCl_4 : 10, 25, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.6.3 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

A determinação dos parâmetros termodinâmicos ocorreu variando-se a temperatura durante o processo da reação, onde as temperaturas utilizadas nesse estudo foram 27, 32, 37 e 42 °C. O experimento prosseguiu através de acompanhamento da cinética com concentrações iguais de sal de Pd e cumarina protegida. (7PropC/ Na_2PdCl_4 : $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 7PropM/ Na_2PdCl_4 : $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão PBS e pH 7,4, em cada uma das diferentes temperaturas supracitadas.

4.7 Precauções com reagentes perigosos e descarte dos resíduos

Durante todos os procedimentos a serem realizados, fez-se uso de equipamentos de proteção individual como, jaleco, óculos de proteção, luvas e vestimenta adequada. Todos os reagentes que têm algum tipo de periculosidade,

seja ele explosivo, tóxico ou irritante, foram utilizados apenas na presença de supervisão e ainda sempre se manuseou o reagente dentro da capela.

Todos as reações, descartes e procedimentos feitos no laboratório, seguiram as normas estabelecidas pelo manual de regras básicas de segurança para o laboratório de química³¹. O descarte dos resíduos seguiu a seguinte separação: resíduos halogenados, resíduos não halogenados, resíduos aquosos e resíduos sólidos, onde se fará a correção do pH para o descarte de resíduos aquosos. Após essa separação os resíduos foram destinados à empresa PROACTIVA MEIO AMBIENTE BRASIL LTDA, empresa essa contrata pela UFSC³², que fez o devido descarte dos resíduos.

E ainda, durante a estadia no laboratório se seguiu as normas de biossegurança estabelecidas pela normativa N°339/2021/GR de 17 de junho de 2021³³, onde os principais tópicos dessa normativa é o distanciamento de 2 metros entre cada pessoa, a higienização das mãos utilizando-se um gel etanólico 70% e, ainda, o uso de máscara em todo o tempo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE

A síntese da molécula 7HC ocorreu em duas etapas tendo como solvente os piperidina e malonato de dietila. A reação inicia-se pela reação de condensação de Knoevenagel entre o 2,4-diidroxibenzaldeído e o malonato de dietila seguida de uma ciclização intramolecular. Uma ideia para o mecanismo de reação (**Esquema 7**) se encontra no Apêndice A. Foi obtido um sólido amarelo pálido, com rendimento 62%. O produto apresentou faixa de fusão entre 167 e 170 °C, sendo esse valor condizente com o da literatura²⁸.

Neste trabalho, 7HC foi utilizada, sem purificação prévia, como precursor para síntese de 7PropC, obtendo-se um rendimento médio (37%). O material de partida 7HC, por meio de uma reação ácido-base com o K₂CO₃, é inicialmente desprotonado, gerando um ânion que atua como nucleófilo que, provavelmente, por meio de um mecanismo do tipo S_N2 com o substrato de haleto de propargila, origina o produto da reação, sendo esse um sólido amarelo intenso. A análise de ponto de fusão forneceu uma faixa de 120-123 °C valor esse que vai ao encontro dos dados da literatura³⁰. Uma ideia do mecanismo para a síntese de 7PropC (**Esquema 8**) encontra-se no Apêndice A.

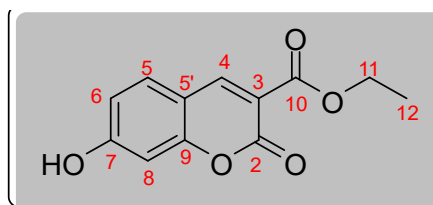
A proteção da 7HM seguiu o mesmo mecanismo idealizado para a 7HC, onde inicialmente há a desprotonação da 7HM, formando assim um ânion, que age como nucleófilo que após atacar ao brometo de propargila, como indicado no **Esquema 8** do Apêndice A, leva a formação do produto. Ao final da síntese, obteve-se um sólido branco, com ponto de fusão na faixa entre 135-141 °C, sendo esse valor condizente com o da literatura.

5.2 Caracterização estrutural

A caracterização e confirmação da estrutura foi feita por meio das análises dos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C. Devido às semelhanças estruturais apresentadas pelos compostos, se optou por discutir apenas os dados referentes a 7HC, sendo as particularidades de 7PropC e 7PropM pontuadas ao final. Os espectros de RMN do composto 7PropC e 7PropM encontram-se no Apêndice A (Figuras 18 - 19 para 7PropC e 19 – 20 para a 7PropM).

7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etila (7HC)

Figura 3: Estrutura da 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etila (7HC)

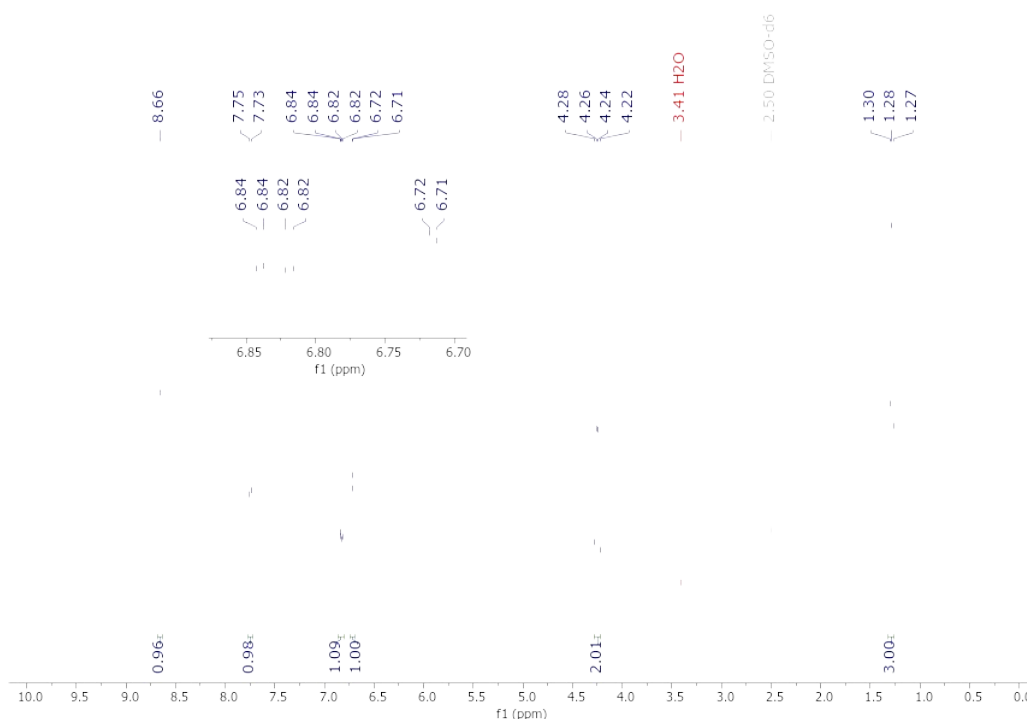


Fonte: O Autor

O espectro de RMN de ^1H 7HC (Figura 4) realizado em $\text{DMSO}-d_6$ apresentou um simpleto em 8,66 ppm, referente à H4. Este sinal aparece como o mais desblindado devido ao seu grupo vizinho ser um grupo retirador de elétrons, que faz com que haja uma menor densidade eletrônica sobre este hidrogênio. Já o duplete em 7,74 ppm, representa o hidrogênio H5, com constante de acoplamento de 8,7 Hz, sendo esse um valor típico de acoplamento *orto*³⁴. O duplo duplete em 6,83 ppm, que tem duas constantes de acoplamento, uma delas 8,6 Hz e outra 2,3 Hz, foi atribuído a H6. Esse hidrogênio está acoplado H4 (ambas apresentam valor de J próximo, 8,7 e 8,6). O duplete em 6,72 ppm foi atribuído ao H8, que se acopla com H6 ($J = 2,3$ Hz), sendo esse um valor típico de acoplamento *meta*³⁴.

A confirmação da presença do grupo etil-carboxilato é dada pelos sinais em 4,25 ppm e 1,28 ppm, que representam, os hidrogênios H11 e H12, respectivamente, estando ambos acoplados com $J = 7,1$ Hz.

Logo, todos os prótons foram atribuídos e os seus deslocamentos químicos encontram-se de acordo com os valores reportados pela literatura. Para além, as integrações dos sinais estão condizentes com o número de prótons esperados para eles.

Figura 4: Espectros de RMN de ^1H de 7HC em DMSO- d_6 (400 MHz).

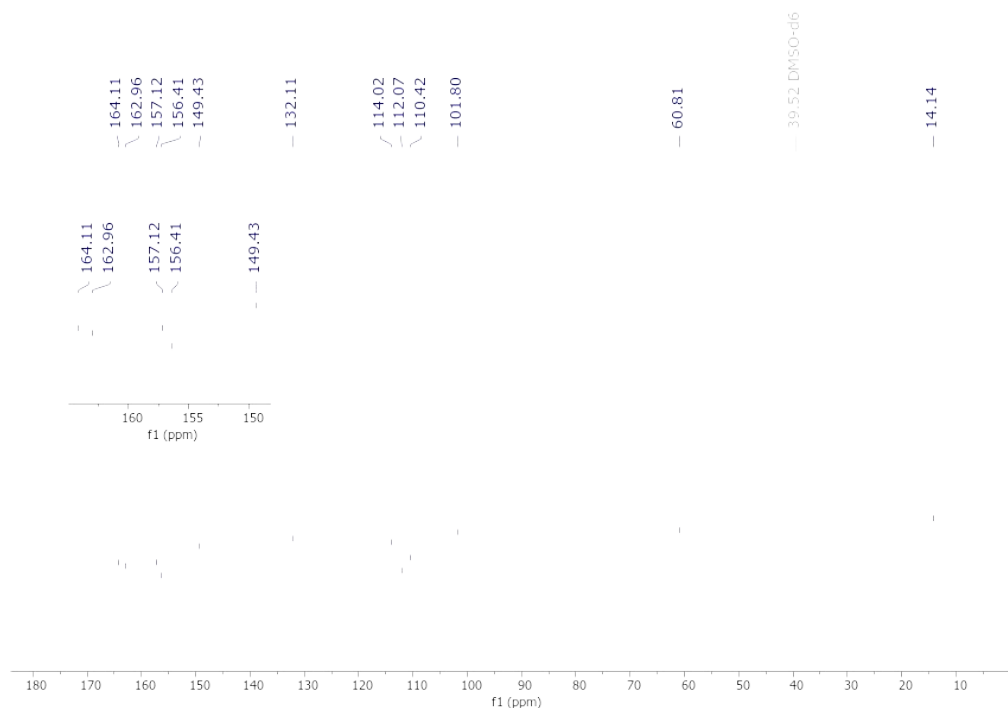
Fonte: O Autor

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5) empregando DMSO- d_6 como solvente, são observados 12 sinais, o que é condizente com o número de carbonos esperado para a molécula em questão. O sinal mais desblindado corresponde ao C10 que é uma carbonila. O sinal em 162,96 corresponde ao C7, que conta com o efeito de desblindagem do anel aromático e a ligação com a hidroxila que retira densidade eletrônica. Os sinais em 157,12 ppm e 156,52 ppm foram atribuídos aos C2 e C9, respectivamente. Atribuiu-se o sinal em 149,43 ppm, ao carbono C3. Este sinal aparece com um alto deslocamento devido ao carbono estar ligado a um grupo retirador de elétrons, que faz com que sua nuvem eletrônica seja deslocada para grupo carboxilato, fazendo com que haja uma maior exposição do núcleo do carbono, o deixando mais desblindado.

O sinal em 132,11 ppm relaciona-se ao C4. Aos carbonos C5', C5, C6 e C8, foram atribuídos os sinais em 110,42, 114,02, 112,07 e 101,80, respectivamente. Os sinais em 60,81 ppm e 14,14 ppm, foram atribuídos aos carbonos C11 e C12, respectivamente, do carboxilato.

Desse modo, todos os carbonos foram atribuídos e os valores de deslocamento estão de acordo com a literatura²⁷. Entretanto, algumas atribuições são passíveis de erro.

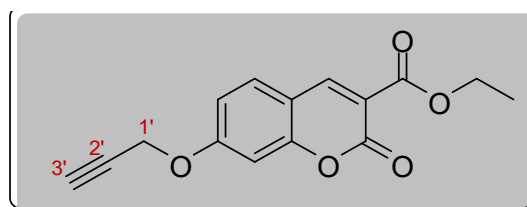
Figura 5: Espectros de RMN de ^{13}C de 7HC em DMSO-d₆ (400 MHz).



Fonte: O Autor.

7-propargiloxicumarina-3-carboxilato de etila (7PropC)

Figura 6: Estrutura da 7-propargiloxicumarina-3-carboxilato de etila (7PropC)



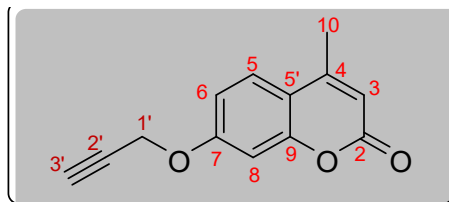
Fonte: Autor

O espectro ^1H de 7PropC (Apêndice A, Figura 17) é similar ao de 7HC, apresentando como diferença os sinais correspondentes ao grupo propargil, estando eles em 3,70 ppm e 4,98 ppm, e atribuídos ao hidrogênio terminal da tripla ($\text{H}3'$) e ao grupamento CH_2 ($\text{H}1'$), que se encontra entre o átomo de oxigênio e a tripla ligação. Ambos os sinais aparecem com multiplicidade diferente de um devido a um acoplamento a longa distância entre esses hidrogênios, comprovado pela constante de acoplamento (J) que apresenta mesmo valor (2,4 Hz) além de ser um valor de constante típico para acoplamentos a longa distância³⁴. Já o espectro de ^{13}C (Apêndice A, figura 18) da molécula 7PropC, apresenta 15 sinais, correspondente ao valor de carbonos da molécula esperada. Sendo os sinais 78,24 ppm e 79,14 ppm correspondentes aos carbonos da tripla ligação ($\text{C}3'$ e $\text{C}2'$, respectivamente), que

aparecem mais desblindados devido ao maior caráter s da tripla ligação, que faz com que os núcleos de carbono estejam menos blindados, e o sinal em 56,39 ppm atribuído ao carbono do CH_2 ($\text{C1}'$), entre a tripla e o oxigênio.

7-propargiloxi-4-metilcumarina (7PropM)

Figura 7: Estrutura da 7-propargiloxi-4-metilcumarina (7PropM)



O espectro de RMN de ^1H (Apêndice A, Figura 19) da 7PropM é muito semelhante ao espectro da molécula 7PropC, no entanto, não se observa o aparecimento do tripleto em 1,20 ppm e o quartupeto em 4,24 ppm, onde estes sinais representam os hidrogênios do grupamento etil-carboxilato. No entanto, no espectro de RMN de ^1H da molécula 7PropM observa-se o aparecimento de um duplete em 2,39 ppm, este sinal representa os hidrogênios da metila (H_{10}), o que confirma isso é valor obtido para a integral desse sinal, onde se obteve um valor próximo a 3.

Já a adição do grupo propargílico é confirmado pelos sinais em 2,57 ppm, onde este sinal aparece como um tripleto, sendo referente ao hidrogênio terminal da tripla ($\text{H}_{3'}$) e o outro sinal é o duplete em 4,75 ppm, que aparece como um duplete, sendo esse sinal representante dos hidrogênios do CH_2 , que está entre a tripla ligação e o oxigênio do anel aromático ($\text{H}_{1'}$). As constantes de acoplamento para ambos os sinais obtiveram valores muito próximos ($J = 2,5$ Hz para $\text{H}_{1'}$ e $J = 2,4$ Hz para $\text{H}_{3'}$), portanto, pode-se considerar que ambos os hidrogênios estão acoplando entre si³³, demonstrando assim o sucesso da síntese.

Já espectro de RMN de ^{13}C da molécula 7PropM (Apêndice A, Figura 20), apresenta 13 sinais, sendo esse valor esperado para o produto desejado. Os sinais em 56,18, 76,50 e 77,44 ppm, indicam a inserção do grupo propargílico na molécula, o sinal em 56,18 ppm representa o carbono do CH_2 ($\text{C1}'$), já os sinais em 76,50 e 77,44 ppm, se sobrepuseram ao sinal do solvente utilizado (CDCl_3), no entanto, ao aproximar o espectro se observa ambos os sinais, onde cada um deles representa os carbonos da tripla ligação ($\text{C2}'$ e $\text{C3}'$), estes sinais apresentam-se mais

desblindados devido ao maior caráter s da tripla ligação que pode, então, desblindar os carbonos.

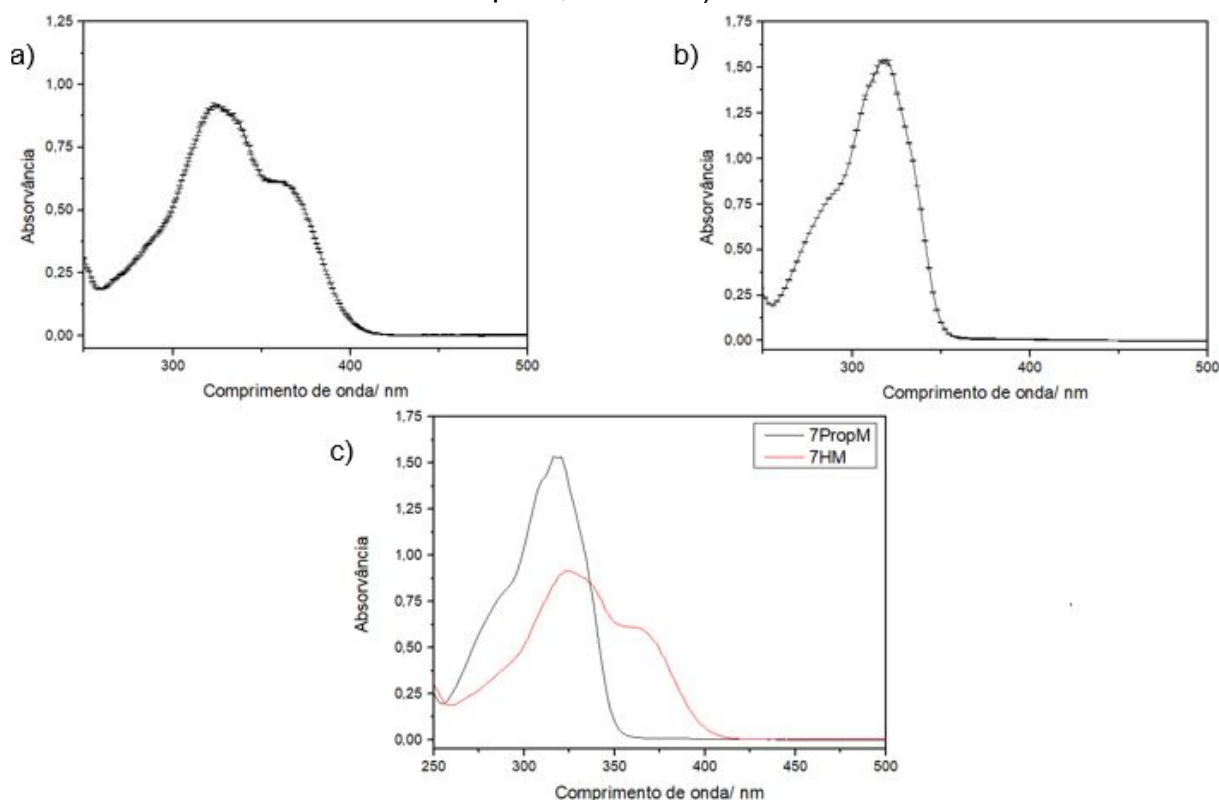
5.3 Estudos fotofísicos

Quando se objetiva estudar a capacidade de uma molécula atuar como substrato modelo para acompanhamento de cinéticas de desproteção bio-ortogonal e imageamento celular, é necessário entender algumas características fotofísicas da molécula em sua forma livre e protegida. Para além, com os estudos cinéticos podem ser realizados tanto por meio da cinética de fluorescência, quanto da de absorção, as duas propriedades foram estudadas. Para tal, realiza-se estudos de seus espectros de absorção no UV-vis, fluorescência e rendimento quântico de fluorescência.

5.3.1 Espectros de absorção e coeficiente de absortividade molar

O primeiro passo do estudo fotofísico foi conhecer a identidade espectral de absorção de cada molécula alvo. Para tal, foram obtidos os espectros (Figura 8a e 8b) de absorção dessas moléculas.

Figura 8: a) Espectro de absorção da molécula 7HC. Concentração: 30 mM. b) Espectro de absorção da molécula 7PropC. Concentração: 30 mM. c) Comparação entre os espectros de absorção de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C)

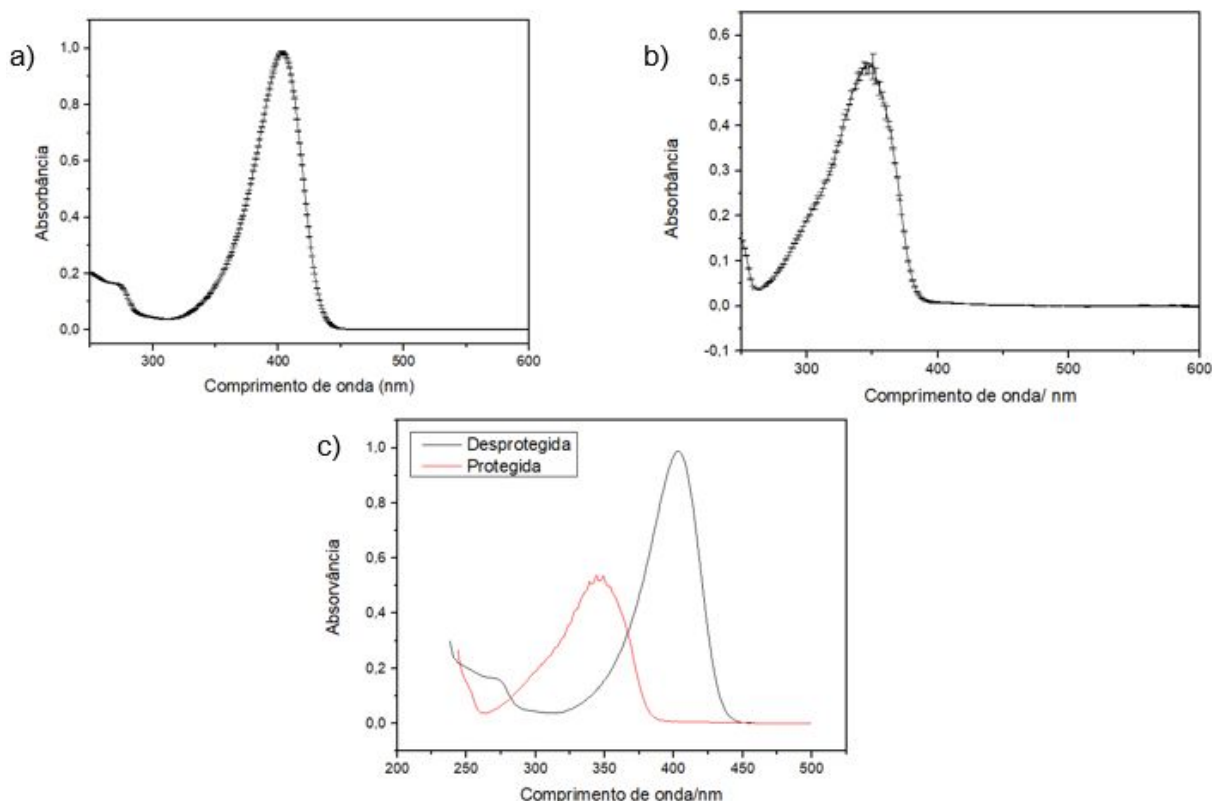


Fonte: O Autor

A partir da análise dos espectros, observa-se que 7HC apresenta uma banda, com máximo de absorção em 403 nm. A 7PropC também possui uma banda de absorção com máximo em 349 nm. Nota-se que houve um deslocamento hipsocrômico da banda de 7PropC em relação a 7HC. Ao sobrepor os espectros (Figura 8c) de ambas as moléculas, é possível notar uma região sem sobreposição de bandas, o que caracteriza um ponto chave para estudos cinéticos de desproteção, pois é necessário que a formação do produto livre possa ser observada sem a interferência da banda da espécie propargilada.

Análise análoga pode ser feita para as moléculas 7HM e 7PropM, onde é possível observar que a primeira molécula apresenta duas bandas com máximos de absorção em 324 nm e um ombro que possui máximo de 360 nm (Figura 9a), e a segunda molécula possui uma banda com máximo de absorção em 318 nm (Figura 9b). A sobreposição dos espectros de absorção (Figura 9c) de ambas as moléculas, também revelou uma região em que não haveria interferência espectral entre as duas moléculas.

Figura 9: a) Espectro de absorção da molécula 7HM. Concentração: 100 μ M. b) Espectro de absorção da molécula 7PropM. Concentração: 100 μ M. c) Comparação entre os espectros de absorção de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C)



Fonte: O autor.

A partir dos espectros de absorção ainda é possível obter o valor do coeficiente de absortividade molar. A determinação de tal fator é crucial para entendimento dos tipos de transições eletrônicas que estão ocorrendo, além de ser um ponto chave para entendimento do comportamento da absorbância.

Para se determinar o valor de coeficiente de absortividade molar (ϵ), usa-se a lei de Lambert-Beer. De acordo essa Lei, a concentração (C) é proporcional a absorbância (Abs), de modo que a igualdade entre C e Abs pode ser alcançada multiplicando C pelo caminho ótico (b) e uma constante, mais especificamente, o coeficiente de absortividade molar, como demonstrado na equação 1.

$$| \propto | C \therefore | \epsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

De posse desse conceito, a determinação de ϵ , pode ser feita utilizando-se uma técnica em que o caminho ótico do aparato de medida é definido. A título deste trabalho, a determinação do coeficiente de absortividade molar foi feita por meio de dados obtidos em um espectrofotômetro de cubetas de caminho ótico de 1 cm. Inicialmente, determinou-se o ϵ , da molécula 7HC, a partir de uma curva de

calibração (Curva de calibração espectral: Apêndice B, Figura 21), onde as concentrações finais em cada cubeta foram 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em uma varredura espectral 250 nm a 600 nm.

Escolheu-se então o valor de 400 nm, para se fazer a curva, visto que, nesse ponto é o máximo da banda de absorção (Curva em 400 nm: Apêndice B, Figura 22). Para moléculas das classes das cumarinas, por exemplo, as transições mais comuns são as $\pi \rightarrow \pi^*$, que geralmente são muito intensas, apresentando ϵ com valores maiores que $1,0 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³⁵. Onde no caso da cumarina estudada, o valor de ϵ foi de $3,2 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo então de fato uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

Já para a molécula 7HM, determinou-se o ϵ , a partir de uma curva de calibração espectral (Apêndice B, Figura 23), onde se escolheu o ponto de análise em 364 nm (Apêndice B, Figura 24), as concentrações escolhidas para confeccionar a curva foram 40, 60, 80, 100 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para esse derivado de cumarina, obteve-se um valor de ϵ de aproximadamente $7,0 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, no entanto, utilizou-se o comprimento de onda de 364 nm (Comprimento de onda onde não há sobreposição de bandas da 7HM e 7PropM), portanto, nesse comprimento de onda, pode-se assumir que está acontecendo uma transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$, que tem valores de ϵ na ordem de $5,0 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³⁵.

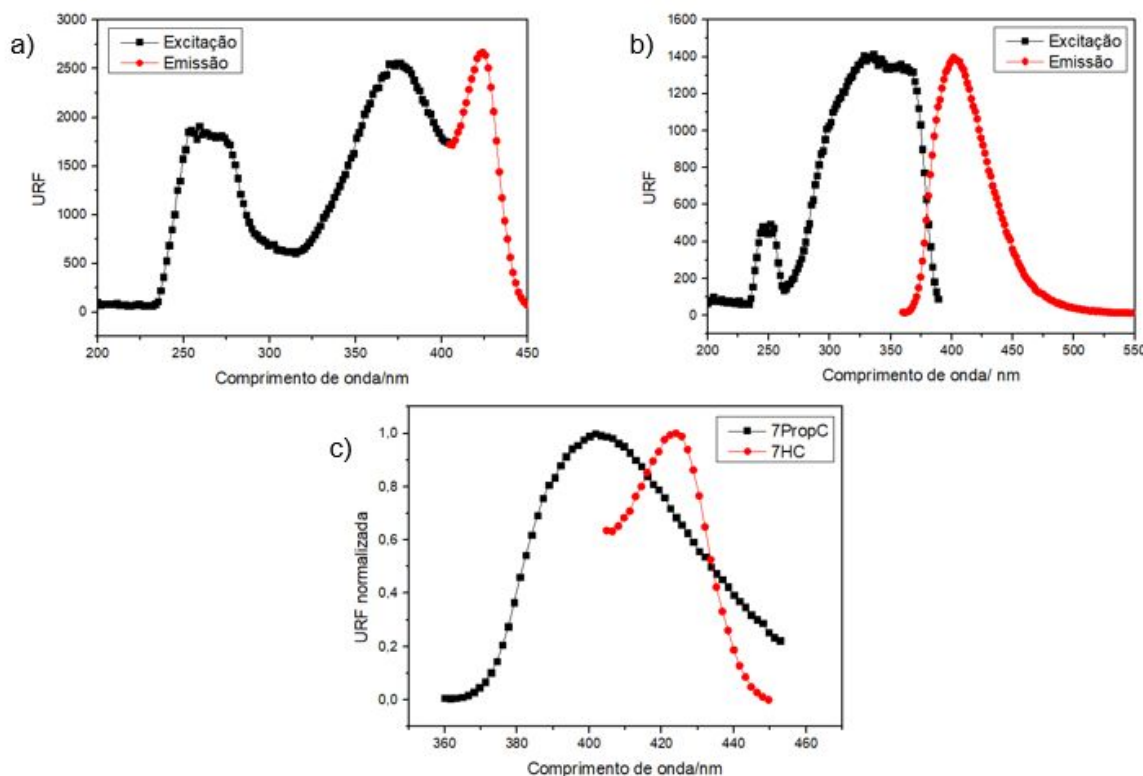
5.3.2 Espectros de emissão e excitação e determinação do deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$)

O segundo passo foi entender a identidade espectral de fluorescência dessas moléculas por meio das análises dos espectros de excitação e emissão. Conhecer esse perfil espectral é de suma importância haja vista que a marcação de biomoléculas e organelas é observada por essa propriedade.

Os espectros de excitação e emissão das moléculas 7HC e 7PropC foram obtidos em 2D (Figuras 10a e 10b) e 3D (Figuras 25 e 26 do Apêndice B). Por serem moléculas novas sem dados prévios estudados por nosso grupo de pesquisa, os resultados dos espectros 3D foram cruciais para determinação dos comprimentos de onda máximo de emissão (λ_{Em}^{Max}) e excitação (λ_{Ex}^{Max}).

Nota-se tanto nos resultados em 2D quanto em 3D de 7HC o máximo de emissão em 430 nm e excitação em 370 nm. A molécula 7PropC apresentou λ_{Em}^{Max} em 400 nm e λ_{Ex}^{Max} em 360 nm.

Figura 10: a) Espectro de emissão e excitação da molécula 7HC. Concentração: 60 μ M. b) Espectro de emissão e excitação da molécula 7PropC. Concentração: 60 μ M. c) Comparação entre os espectros de emissão de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C)



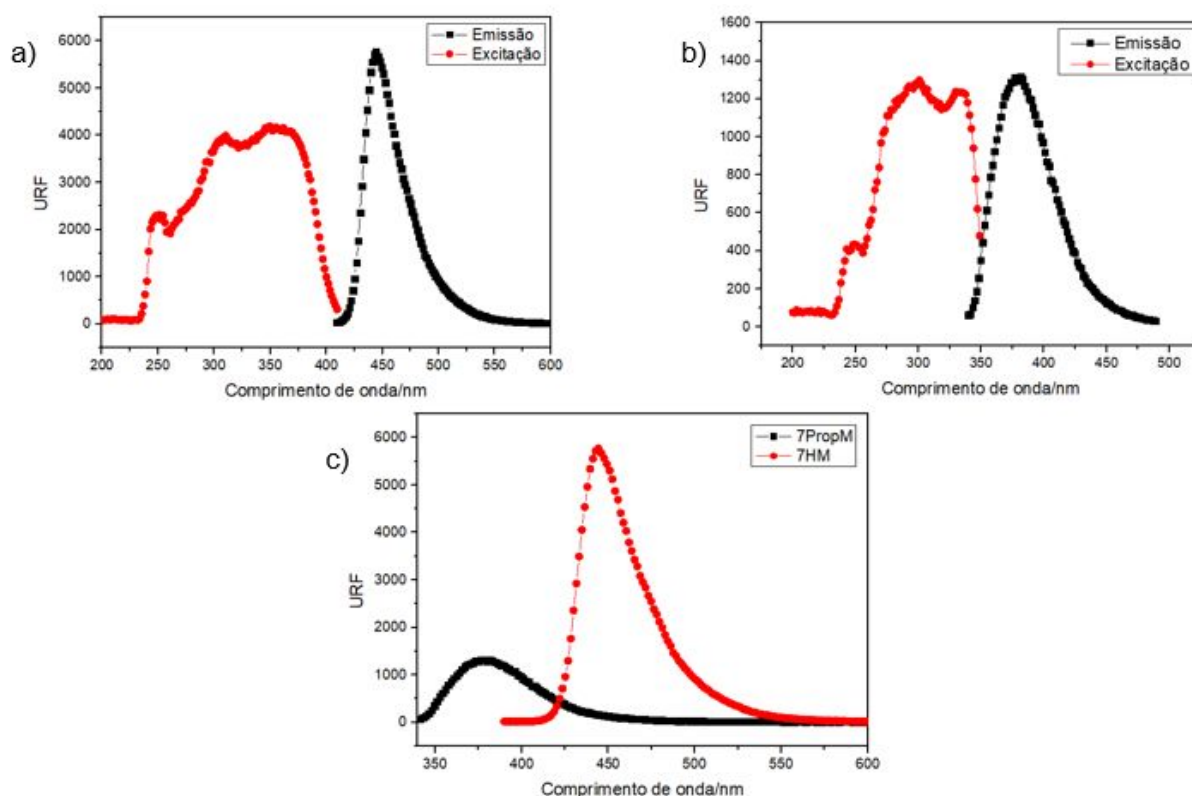
Fonte: O Autor

De posse dos dois gráficos, pode-se comparar a emissão de ambas as moléculas (Figura 10c), no entanto, por terem rendimentos quânticos (Φ) diferentes, é necessário normalizar os gráficos. Percebe-se que a inserção do grupo propargílico no fluoróforo 7HC, causa um deslocamento batocrômico da banda de emissão. Tais resultados sugerem que a inserção do grupo propargílico diminui a distância energética entre HOMO e LUMO da molécula quando está no estado excitado.

Estudo análogo dos espectros de emissão e excitação foi realizado para as moléculas 7HM e 7PropM, onde os espectros 3D são apresentados no Apêndice B (Figuras 27 e 28, respectivamente). A primeira apresentou máximos de emissão e

excitação em 444 nm e 360 nm, respectivamente. Já 7PropM possui λ_{Em}^{Max} em 380 nm e λ_{Ex}^{Max} em 330 nm.

Figura 11: a) Espectro de emissão e excitação da molécula 7HM. Concentração: 100 μ M. b) Espectro de emissão e excitação da molécula 7PropM. Concentração: 100 μ M. c) Comparação entre os espectros de emissão de ambas as moléculas (Condições: Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C)



Fonte: O Autor

A sobreposição do espectro de emissão do fluoróforo (7HM) e o pró-fluoróforo (7PropM) (Figura 11c) mostrou um deslocamento batocrômico da espécie livre em relação a protegida. Outra observação importante é a diferença nas intensidades de emissão para ambas as moléculas. Uma vez que as concentrações utilizadas para a realização desses espectros são iguais, é possível inferir que o composto propargilado é menos fluorescente que a forma livre, de modo que, essas espécies cumprem o requisito para serem utilizadas como compostos modelos para marcação celular baseada em desproteção bio-ortogonal.

De posse dos dados espectrais de emissão e excitação é possível calcular o deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$). Ele é uma medida da dispersão de energia no momento da emissão quando a molécula que passou para o estado excitado (S_2),

decai para um outro estado excitado de menor energia (S_1) e, somente após essa conversão interna, ocorre o decaimento para o estado fundamental (S_0)³⁶.

Para se calcular o deslocamento de Stokes deve-se apenas subtrair a energia do máximo de excitação e a energia do máximo de emissão. Os deslocamentos de Stokes para as moléculas 7HC, 7PropC, 7HM e 7PropM foram calculados e organizados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de deslocamento de Stokes das moléculas estudadas

Molécula	λ_{Exc} (nm)	λ_{Ems} (nm)	ν_{Exc} (cm ⁻¹)	ν_{Ems} (cm ⁻¹)	Δ_s (cm ⁻¹)
7HC	370	430	27.027	23.256	3.771
7PropC	360	400	27.778	25.000	2.778
7HM	360	444	27.778	22.522	5.626
7PropM	330	380	30.303	26.316	3.987

Fonte: Autor

Os fluoróforos apresentam um maior deslocamento de Stokes em relação aos pró-fluoróforos. Estes dados sugerem que a adição do grupo propargílico faz com que haja uma menor perda de energia entre os estados excitados, contribuindo na estabilização destes, muito provavelmente pela ação retiradora de elétrons do éter propargílico que faz com que haja uma menor dispersão de energia na conversão interna.

Outra importante observação é que o deslocamento de Stokes para a molécula 7HC foi muito menor que o deslocamento para a molécula 7HM, e o mesmo ocorre com os pró-fluoróforos, o que pode estar associado a presença de um grupo retirador de elétrons na primeira molécula, este efeito é observado por Costa *et al.* (2006)³⁷, onde o autor sintetiza uma série de compostos, com diferentes efeitos retiradores e doadores de elétrons. Quando adicionado grupos retiradores nas moléculas, há uma diminuição substancial do deslocamento de Stokes. Pode-se supor que com a adição do grupo retirador de elétrons, há uma menor perda de energia do estado excitado para o meio.

Esses deslocamentos de Stokes mostram que, as moléculas podem ser utilizadas para imageamento celular, visto que, quanto maior o deslocamento de Stokes mais fácil é de analisar a fluorescência, e assim pode-se analisar mais facilmente em meio celular³⁷. Onde o deslocamento de Stokes encontrado para o fluoróforo (7HC) é semelhante ao de moléculas já utilizadas em imageamento celular²³, no entanto, a molécula 7HM apresentou maior deslocamento sendo então uma melhor candidata para aplicações biológicas.

5.3.3 Determinação do rendimento quântico absoluto de fluorescência

A análise prosseguiu fazendo estudo do rendimento quântico de fluorescência das moléculas. Esse parâmetro representa a eficiência da fluorescência frente às outras formas de desativação do estado excitado.

Determinou-se o rendimento quântico de fluorescência (Φ) das moléculas no solvente utilizado para as cinéticas (95% de PBS e 5% de DMSO). Para garantir confiabilidade nos resultados, foram realizadas 5 medidas para cada amostra, sendo que os valores de absorbância foram próximos, mas sem exceder, 0,1. Fez-se a determinação do Φ , para as moléculas 7HC, 7HM e 7PropC. O rendimento quântico da molécula 7PropM não foi determinado, devido a uma limitação do equipamento utilizado.

Os valores de Φ medidos para 7HC, 7HM e 7PropC são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de rendimento quântico das moléculas estudadas

Molécula	Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_4	Φ_5	Φ_m	Desvio
7HC	0,839	0,842	0,841	0,844	0,842	0,842	$1,82 \cdot 10^{-3}$
7PropC	0,370	0,369	0,371	0,370	0,374	0,371	$1,92 \cdot 10^{-3}$
7HM	0,889	0,892	0,890	0,891	0,889	0,890	$1,30 \cdot 10^{-3}$

A partir dos dados da Tabela 2 é possível notar uma diferença nos valores de rendimento quântico entre 7HC e 7PropC, sendo os valores observados para a molécula desprotegida maiores do que os da molécula propargila. Tais resultados vão ao encontro do que é esperado para pró-fluoróforos, ou seja, uma diminuição ou extinção da fluorescência^{38,39}. Esses valores corroboram para o uso desta molécula como modelo para estudos de desproteção bio-ortogonal promovida por metal.

Outra observação interessante é a diminuição do rendimento quântico de fluorescência da molécula 7HC em relação a 7HM. Tal decréscimo pode estar associado a presença de um grupo retirador de densidade eletrônica em 7HC, fato esse observado por You *et al.* (2022)³⁹, que sintetizou um derivado de cumarina ligado a um grupamento azida, a qual apresentou diminuição de fluorescência em relação a cumarina de partida. Lakowicz e DiCesare (2001)⁴⁰, observaram esse mesmo comportamento em estilbenos ligados a grupamentos retiradores de elétrons.

5.4 Cinéticas da reação de despropargilação

A partir dos conhecimentos dos dados fotofísicos, foi possível estabelecer que a molécula apresenta as características esperadas para estudos de desproteção e imageamento celular. Diante disso, o trabalho prosseguiu através dos estudos cinéticos da reação de despropargilação do pro-fluoróforo, promovida por NaPdCl₄. Estes experimentos são importantes para determinação dos parâmetros cinéticos (k_2 , energia de ativação (E_a) e conversões a produto) que irão comprovar a velocidade e o comportamento do substrato durante a reação.

5.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos

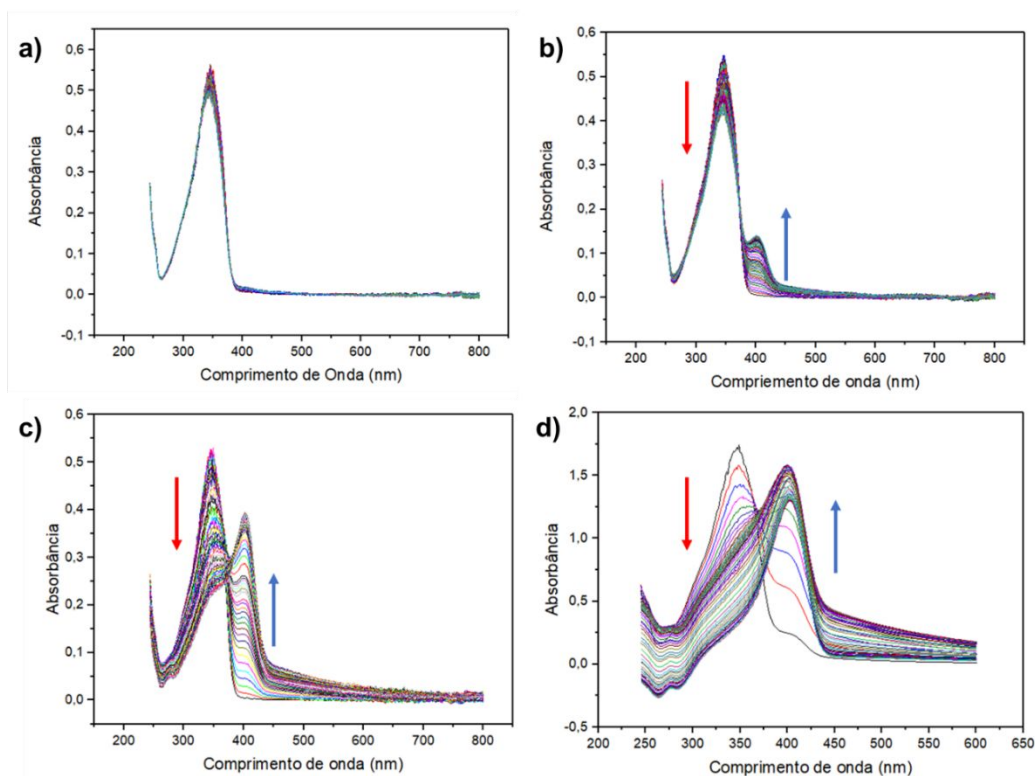
Para atestar a eficiência das moléculas 7propM e 7ProC como possíveis substratos para estudos cinéticos de despropargilação, é necessário conhecer seus parâmetros cinéticos, k_2 e porcentagem de conversão. Para tal, foram realizados experimentos variando as concentrações de sal de Pd.

A primeira etapa do estudo cinético consistiu na análise do padrão espectral (Figura 13) de desproteção variando-se as concentrações de catalisador em 0,10, 0,25, 0,50 e 1,0 equivalentes. A partir desses dados é possível notar que as

desproteções de fato ocorrem devido a presença da banda em 403 nm, correspondente a 7HC. É importante notar que apenas no caso da concentração de Pd em 0,1 equivalente a banda de formação do produto não é observável.

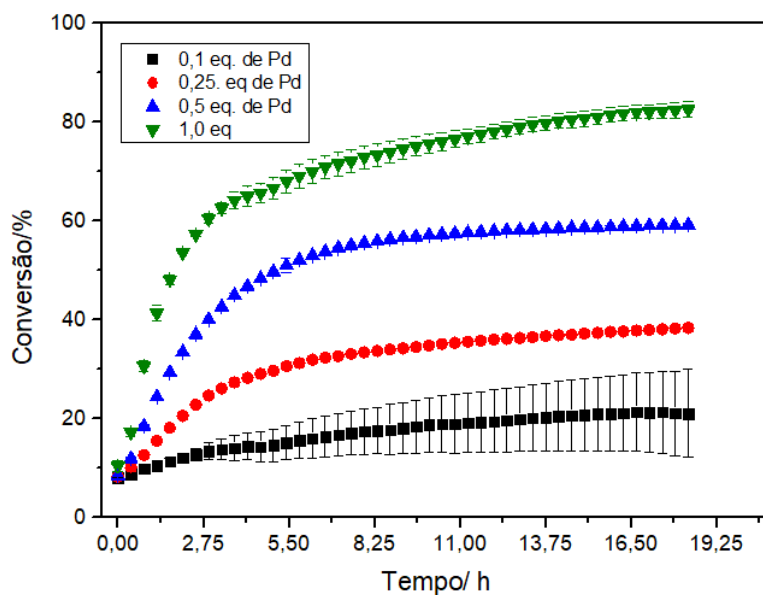
Em seguida, se acompanhou a formação do produto utilizando-se espectroscopia de UV-vis (Figuras 13) para determinação da porcentagem conversão e k_2 . O comprimento de onda de trabalho foi 400 nm, uma vez que a curva de calibração se mostrou linear neste ponto. Nota-se que houve saturação após 5,5 h aproximadamente, em todas as concentrações do sal de paládio.

Figura 12: Cinéticas espectrais de desproteção da 7PropC variando a concentração de Pd. Condições gerais: 7PropC: 30 μ M, Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C. **a)** 0,10 eq. de Na_2PdCl_4 ; **b)** 0,25 eq. de Na_2PdCl_4 ; **c)** 0,50 eq. de Na_2PdCl_4 ; **d)** 1,0 eq. de Na_2PdCl_4 .



Fonte: O Autor

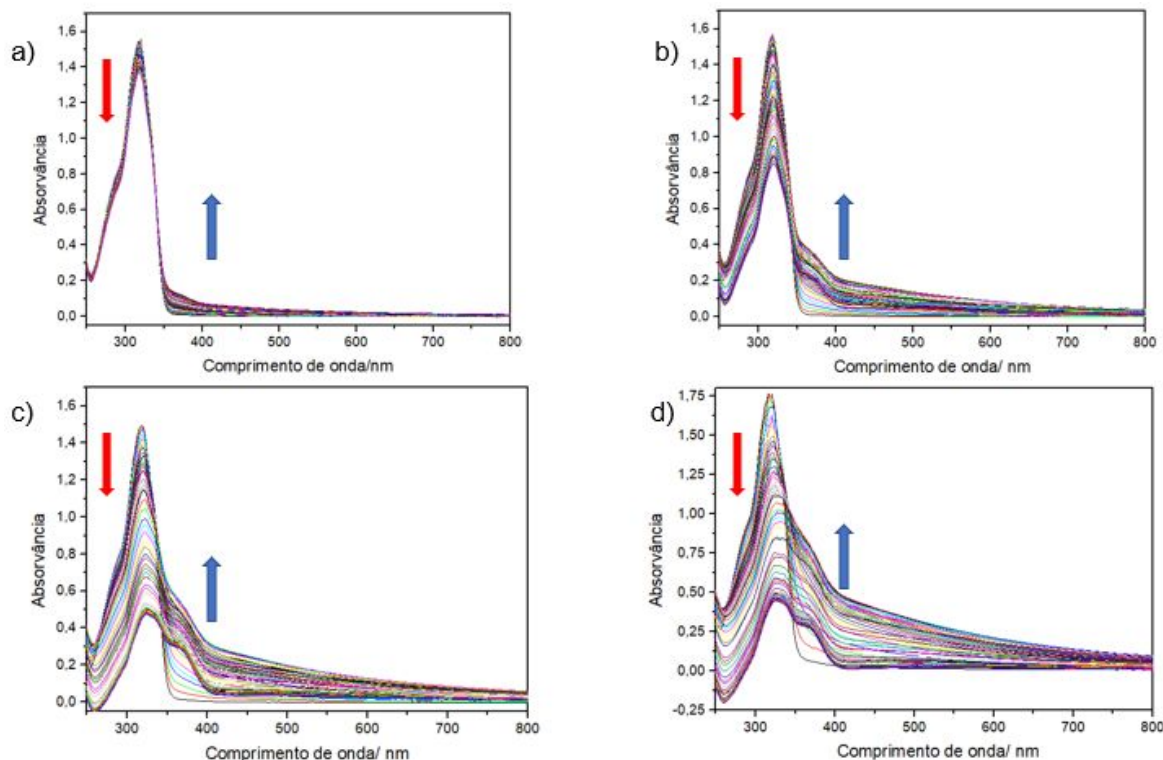
Figura 13: Cinéticas de desproteção da 7PropC variando a concentração de Pd no comprimento de onda de 400 nm. Condições gerais: 7PropC: 60 μ M, Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C.



Fonte: O Autor

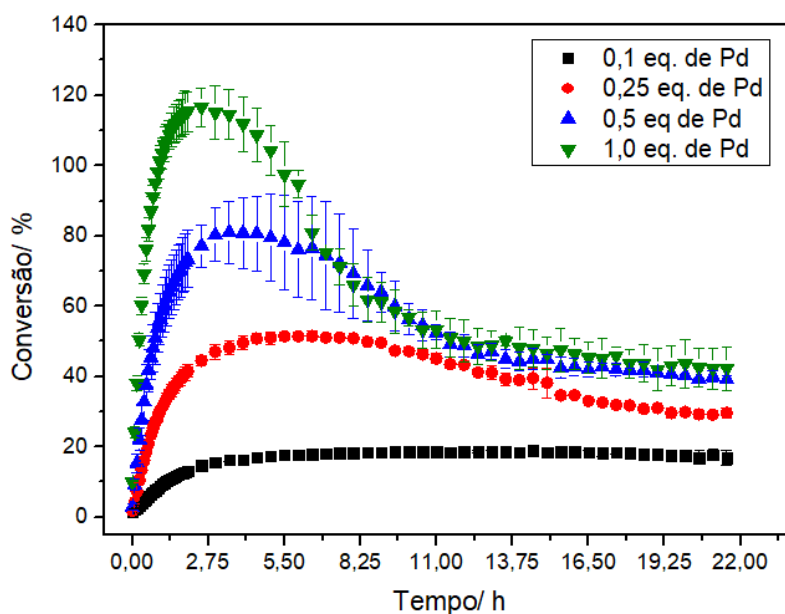
Fez-se o mesmo estudo para a molécula 7PropM, onde a cinética espectral variando a concentração de paládio é mostrada na figura 14. Onde se observa o aparecimento de uma banda em 364 nm, portanto, pode-se considerar que o substrato 7PropC é desprotegido por espécies de paládio sob condições biológicas. Para a avaliação da conversão e determinação da constante de velocidade de segunda ordem, utilizou-se o comprimento de onda de 364 nm, pois neste comprimento de onda não há sobreposição entre as moléculas 7PropC e 7PropM, onde as corridas cinéticas no ponto são demonstradas na figura 15.

Figura 14: Cinéticas espectrais de desproteção da 7PropM variando a concentração de Pd. Condições gerais: 7PropM: 100 mM, Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C. **a)** 0,10 eq. de Na_2PdCl_4 ; **b)** 0,25 eq. de Na_2PdCl_4 ; **c)** 0,50 eq. de Na_2PdCl_4 ; **d)** 1,0 eq. de Na_2PdCl_4 .



Fonte: O Autor

Figura 15: Cinéticas de desproteção da 7PropM variando a concentração de Pd no comprimento de onda de 364 nm. Condições gerais: 7PropC: 60 μM , Tampão PSB, pH 7,4 e 37 °C.



Fonte: O autor

Observa-se na figura 15, que durante o processo da reação houve uma grande precipitação das espécies, isso pode ser observado devido a diminuição da absorção da estrutura em 364 nm, visto que, o branco é feito considerando-se a concentração de paládio, portanto, se há uma brusca diminuição da absorbância, pode-se então relacionar com a precipitação do sal escolhido, de modo que esse processo interfere diretamente nas medidas espectrais, no entanto, pode-se observar para a cinética contendo 0,1 equivalentes de paládio que houve uma saturação em 2,75 horas, e ainda, essa curva é a única que não mostrou precipitação aparente.

Para a cinética com a molécula 7PropM não se poderá calcular a constante de velocidade de segunda ordem, tendo em vista, que a precipitação foi mais pronunciada quando se usou a condição de segunda ordem, no entanto, no LaCBio já se fizeram um teste nas mesmas condições aplicadas nesse trabalho, no entanto, com uma concentração menor da 7PropM e, conseqüentemente, menor concentração de Pd, onde nesse caso se obteve um valor de constante de $3,40 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A tabela 3, traz os valores de k_2 , obtidos para a 7PropC, onde a curva não-linear é mostrada na figura 27 no Apêndice C.

Tabela 3: Valores de k_2 e porcentagem de conversão

Molécula	$k_2 \text{ (L mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	Conversão (%)
7PropC	3,66	83
7PropM	3,40	49

Fonte: O Autor

A partir dos dados da tabela, nota-se que os valores de k_2 para 7PropC é um valor próximo ao observado para o substrato 7PropM já utilizado em estudos anteriores no LaCBio. Além disso, as taxas de conversão do novo substrato foram semelhantes ao que se observou para a 7PropM. Deste modo, ambos resultados atestam a possibilidade de utilização de 7ProC como modelo para estudos cinéticos de despropargilação. No entanto, para aplicações bio-ortogonais, a constante de segunda ordem deve ter idealmente um valor maior que $1 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ², isso ocorre para se garantir que haja uma alta conversão da molécula em poucos instantes. E isso é observado para ambos os substratos, portanto, esse é um indicativo que se

pode utilizar as moléculas sintetizadas nesse trabalho para o imageamento de células, onde ocorrerá a liberação do fluoróforo por espécies de paládio.

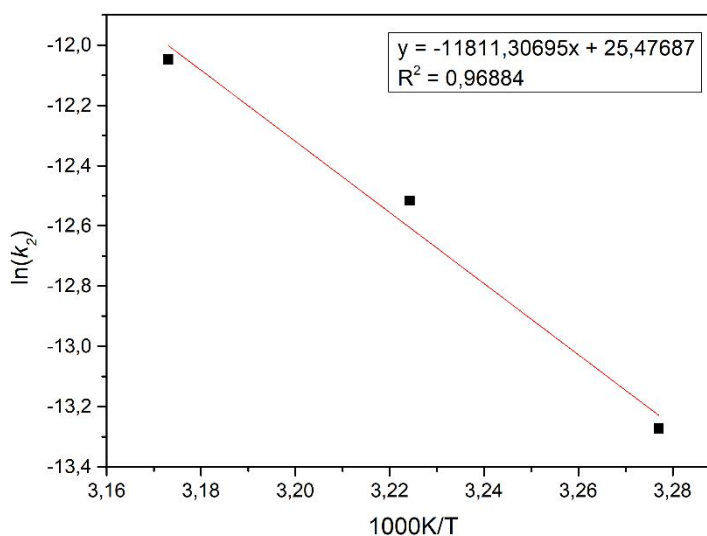
5.4.2 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros de ativação da despropargilação da 7PropC foram determinados a partir do estudo da temperatura sobre a constante de velocidade (k_2), no entanto, os parâmetros de ativação da 7PropM não pode ser determinado, pois como já dito quando está molécula está em condição de segunda ordem há precipitação que afeta nas medidas de absorção. A equação de Arrhenius (equação 2), demonstra que existe uma relação linear entre o logaritmo natural da constante de velocidade e o inverso da temperatura, onde a energia de ativação pode ser obtida através de um gráfico de $\ln(k_2)$ *versus* $1/T$, e assim o coeficiente angular dessa curva será o negativo da energia de ativação. Já o fator pré-exponencial de Arrhenius será o coeficiente linear dessa reta.

$$\ln(k_2) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (2)$$

Na Figura 16a é apresentado o gráfico de $\ln(k_2)$ *versus* $1/T$, e assim determinou-se que a energia de ativação (E_a) para a despropargilação da 7PropC é 98,2 kJ mol⁻¹ e o fator pré-exponencial dessa reação é 1,16.10¹¹ L mol⁻¹ s⁻¹.

Figura 16: Gráfico de $\ln(k_2)$ *versus* $1/T$. Condições gerais: 60 mM, Tampão PSB, pH 7,4



Fonte: Autor

$$A = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (3)$$

Utilizando a equação 3, que é uma parte da equação de Eyring-Polanyi, pode-se relacionar o valor de fator pré-exponencial com a entropia de ativação do sistema, onde ao se isolar a entropia de ativação se obtém a equação 4.

$$\Delta S^\ddagger = R \cdot \ln \left(\frac{A \cdot h}{k_b \cdot T} \right) \quad (4)$$

Então utilizando-se a equação 4, encontra-se que a entropia de ativação para a despropargilação da molécula 7PropC é $-33,4 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, demonstrando assim que possivelmente o estado de transição é o ataque nucleofílico da água, ou ainda, o processo de complexação do sal de paládio com a tripla ligação.

6 CONCLUSÃO

A síntese do fluoróforo 7HC e dos pró-fluoróforos 7PropC e 7PropM, foram um sucesso, onde a pureza do produto foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C , foi apresentado apenas os sinais referentes aos produtos desejados, além das sínteses terem atingido valores de rendimentos adequados (62% para o 7HC, 37% para a 7PropC e 91% para a 7PropM).

Os estudos fotofísicos demonstraram que as moléculas utilizadas podem ser utilizadas para imageamento celular e ainda as moléculas também podem servir como moléculas modelos no estudo da desproteção de grupos propargílicos, essa conclusão se chega a partir dos dados de absortividade molar, onde o 7HC possui um alto coeficiente de absortividade molar ($3,2 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), demonstrando que em baixas concentrações desse fluoróforo há um aumento considerado da

absorbância, já a 7HM apresentou um coeficiente de absorvidade molar menor ($7,0 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), deve-se considerar que os estudos não foram feitos no máximo de absorção da molécula.

Outro parâmetro que demonstra a utilidade das estruturas sintetizadas no imageamento celular é o rendimento quântico, onde esse parâmetro foi maior para a molécula 7HC do que em comparação a seu pró-fluoróforo, indicando que o grupo propargílico é um grupo inibidor de fluorescência, comparando os fluoróforos percebe-se que o grupo retirador de elétrons de fato contribui negativamente para o rendimento quântico, pois a molécula 7HM apresentou um Φ maior que a 7HC. O alto rendimento quântico das moléculas 7HC e 7HM, indica que se pode utilizar esse fluoróforo em técnicas de fluorescência. Outra propriedade fotofísica determinada foi o deslocamento de Stokes, que mostrou que os fluoróforos possuem um maior deslocamento sendo mais facilmente detectado por técnicas de fluorescência.

Já os parâmetros cinéticos, demonstram que as moléculas 7PropC e 7PropM podem ser desprotegidas em condições biológicas, onde houve a liberação da 7HC e 7HM em qualquer concentração de paládio.

Portanto, as moléculas 7HM e 7HC se apresentaram fluoróforos adequados para o imageamento celular e como molécula modelo, devido a suas propriedades fotofísicas pronunciadas, e ainda, a constante de velocidade de segunda ordem indicam que a liberação da molécula 7HC por espécies de paládio pode de fato ser considerado uma reação bio-ortogonal, já para a molécula 7HM são necessários mais estudos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Prescher, Jennifer A., Danielle H. Dube, e Carolyn R. Bertozzi. Chemical Remodelling of Cell Surfaces in Living Animals. **Nature**, 430, n. 7002, 873–877, 2004.
- ² Bird, Robert E., Steven A. Lemmel, Xiang Yu, e Qiongqiong Angela Zhou. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. **Bioconjugate Chemistry** 32, n. 12, 2457–2479, 2021.
- ³ Kofoed, Christian, Stephan Riesenber, Jaroslava Šmolíková, Morten Meldal, e Sanne Schoffelen. Semisynthesis of an Active Enzyme by Quantitative Click Ligation. **Bioconjugate Chemistry** 30, n. 4, 1169–1174, 2019.
- ⁴ Lewis, Warren G., Luke G. Green, Flavio Grynszpan, Zoran Radić, Paul R. Carlier, Palmer Taylor, M. G. Finn, e K. Barry Sharpless. Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. **Angewandte Chemie International Edition** 41, nº 6, 1053–1057, 2006.
- ⁵ TORRES-SÁNCHEZ, Carmen, Ana M. Pérez-López, Mohammad N. Alqahtani, Asier Unciti-Broceta e Belén Rubio-Ruiz. Design and manufacture of functional catalyst-carrier structures for the bioorthogonal activation of anticancer agents. **New Journal of Chemistry**, 43, n. 3, 1449–1458, 2019.
- ⁶ Latocheski, Eloah, Gean M. Dal Forno, Thuany M. Ferreira, Bruno L. Oliveira, Gonçalo J. L. Bernardes, e Josiel B. Domingos. Mechanistic Insights into Transition Metal-Mediated Bioorthogonal Uncaging Reactions. **Chemical Society Reviews**, 49, n. 21, 7710–7729, 2020.
- ⁷ Liu, Ying, e Yugang Bai. Design and Engineering of Metal Catalysts for Bio-Orthogonal Catalysis in Living Systems. **ACS Applied Bio Materials**, 3, n. 8, 4717–4146, 2020.
- ⁸ Li, Li, e Zhiyuan Zhang. Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. **Molecules** 21, n. 10, 1393, 2016.
- ⁹ SONG, Fengling; GARNER, Amanda L.; KOIDE, Kazunori. A Highly Sensitive Fluorescent Sensor for Palladium Based on the Allylic Oxidative Insertion Mechanism. **Journal Of The American Chemical Society**, 129, n. 41, p. 12354-12355, 2007.

- ¹⁰ Weiss, Jason T., John C. Dawson, Kenneth G. Macleod, Witold Rybski, Craig Fraser, Carmen Torres-Sánchez, E. Elizabeth Patton, Mark Bradley, Neil O. Carragher, e Asier Unciti-Broceta. Extracellular Palladium-Catalysed Dealkylation of 5-Fluoro-1-Propargyl-Uracil as a Bioorthogonally Activated Prodrug Approach. **Nature Communications**, 5, n. 1, 3277-3286, 2014.
- ¹¹ Tu, Julian, Minghao Xu, e Raphael M. Franzini. Dissociative Bioorthogonal Reactions. **ChemBioChem** 20, n. 13, 1615–1627, 2019.
- ¹² Sathyan, Anjana, Stephen Croke, Ana M. Pérez-López, Bas F. M. de Waal, Asier Unciti-Broceta, e Anja R. A. Palmans. Developing Pd(II) Based Amphiphilic Polymeric Nanoparticles for pro-Drug Activation in Complex Media. **Molecular Systems Design & Engineering**, 7, n. 12, 1736–48, 2022.
- ¹³ Coelho, Sara E., Felipe S. S. Schneider, Daniela C. de Oliveira, Guilherme L. Tripodi, Marcos N. Eberlin, Giovanni F. Caramori, Bernardo de Souza, e Josiel B. Domingos. Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates. **ACS Catalysis** 9, n. 5, 3792–3799, 2019.
- ¹⁴ Oliveira, Bruno L., Benjamin J. Stenton, V. B. Unnikrishnan, Cátia Rebelo de Almeida, João Conde, Magda Negrão, Felipe S. S. Schneider, et al. Platinum-Triggered Bond-Cleavage of Pentynoyl Amide and *N*-Propargyl Handles for Drug-Activation. **Journal of the American Chemical Society** 142, n. 24, 10869–10880, 2020.
- ¹⁵ Wang, Xin, Yanjun Liu, Xinyuan Fan, Jie Wang, William Shu Ching Ngai, Heng Zhang, Jiaofeng Li, Gong Zhang, Jian Lin, e Peng R. Chen. Copper-Triggered Bioorthogonal Cleavage Reactions for Reversible Protein and Cell Surface Modifications. **Journal of the American Chemical Society** 141, n. 43, 17133–17141, 2019.
- ¹⁶ Martynov, V. I., A. A. Pakhomov, N. V. Popova, I. E. Deyev, e A. G. Petrenko. Synthetic Fluorophores for Visualizing Biomolecules in Living Systems. **Acta Naturae** 8, n. 4, 33–46, 2016.
- ¹⁷ Coons A. H., H. J. Creech, R. N. Jones e G. Berliner. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. **The Journal Immunology** 45, 159-170, 1942.
- ¹⁸ Tian, Zhiyuan, Wuwei Wu, Wei Wan, e Alexander D. Q. Li. Single-Chromophore-Based Photoswitchable Nanoparticles Enable Dual-Alternating-Color Fluorescence

for Unambiguous Live Cell Imaging. **Journal of the American Chemical Society** 131, n. 12, 4245–4252, 2009.

¹⁹ Das, Riddha, Ryan F. Landis, Gulen Yesilbag Tonga, Roberto Cao-Milán, David C. Luther, e Vincent M. Rotello. Control of Intra- versus Extracellular Bioorthogonal Catalysis Using Surface-Engineered Nanozymes. **ACS Nano** 13, nº1, 229–235, 2019.

²⁰ Benninger, Richard K. P., Yasemin Koç, Oliver Hofmann, Jose Requejo-Isidro, Mark A. A. Neil, Paul M. W. French, e Andrew J. deMello. Quantitative 3D Mapping of Fluidic Temperatures within Microchannel Networks Using Fluorescence Lifetime Imaging. **Analytical Chemistry** 78, n. 7, 2272–2278, 2006.

²¹ B, Manjunatha, Yadav D. Bodke, Nagaraja O, Lohith T. N, Nagaraju G, e Sridhar Ma. Coumarin-Benzothiazole Based Azo Dyes: Synthesis, Characterization, Computational, Photophysical and Biological Studies. **Journal of Molecular Structure** 1246, 131170, 2021.

²² Morris, Jason C., John C. McMurtrie, Steven E. Bottle, e Kathryn E. Fairfull-Smith. Generation of Profluorescent Isoindoline Nitroxides Using Click Chemistry. **The Journal of Organic Chemistry** 76, n. 12, 4964–4972, 2011.

²³ Gao, Zheng, Yongcao Hao, Meiling Zheng, e Yi Chen. A Fluorescent Dye with Large Stokes Shift and High Stability: Synthesis and Application to Live Cell Imaging. **RSC Advances** 7, n. 13, 7604 – 7609, 2017.

²⁴ Küpeli Akkol, Esra, Yasin Genç, Büşra Karpuz, Eduardo Sobarzo-Sánchez, e Raffaele Capasso. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. **Cancers** 12, n. 7, 2020.

²⁵ Zhao, YuRui, Quan Zheng, Kenneth Dakin, Ke Xu, Manuel L. Martinez, e Wen-Hong Li. New Caged Coumarin Fluorophores with Extraordinary Uncaging Cross Sections Suitable for Biological Imaging Applications. **Journal of the American Chemical Society** 126, n. 14, 4653–4663, 2004.

²⁶ Lee, Ji Ha, Ka Young Kim, Hanyong Jin, Yeong Eun Baek, Yeonweon Choi, Sung Ho Jung, Shim Sung Lee, Jeehyeon Bae, e Jong Hwa Jung. Self-Assembled Coumarin Nanoparticle in Aqueous Solution as Selective Mitochondrial-Targeting Drug Delivery System. **ACS Applied Materials & Interfaces** 10, nº 4, 3380–3391, 2018.

²⁷ **CHEMSCR**. Ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate. Disponível em: <chemsrc.com/en/cas/6093-71-6_246438.html>. Acesso em: 12 nov. 2022.

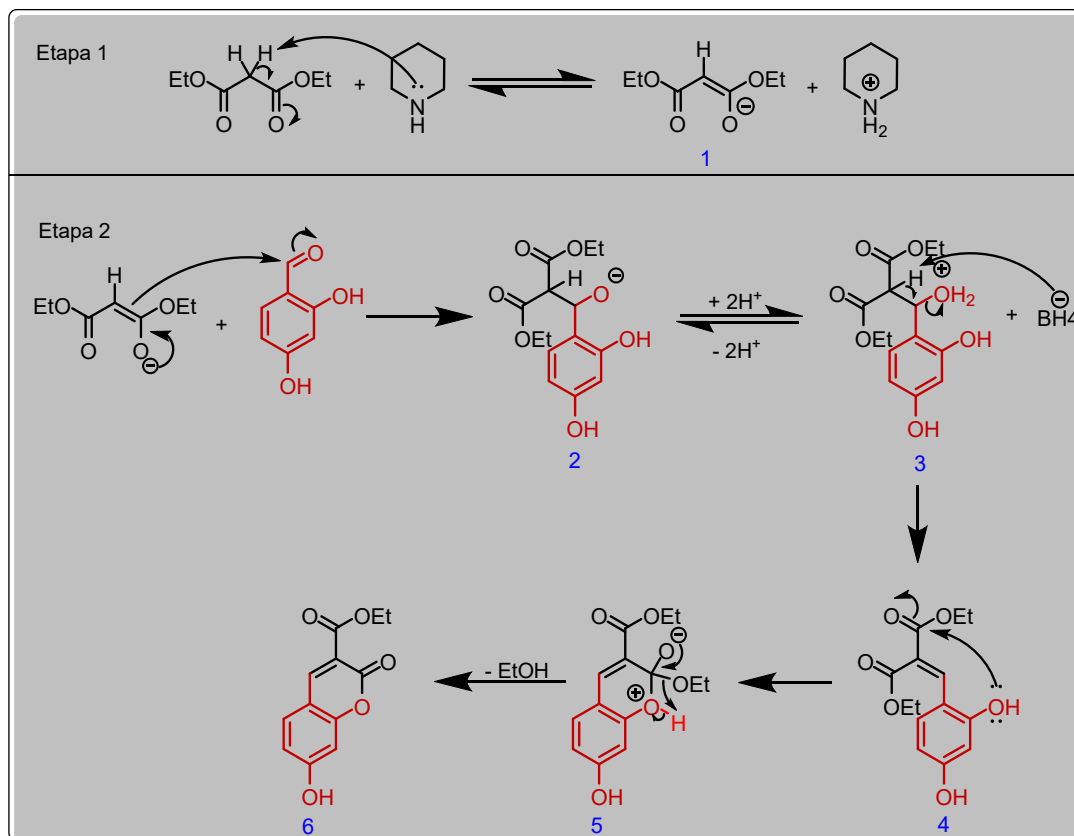
- ²⁸ Zak, Jaroslav, David Ron, Elena Riva, Heather P. Harding, Benedict C. S. Cross, e Ian R. Baxendale. Establishing a Flow Process to Coumarin-8-Carbaldehydes as Important Synthetic Scaffolds. **Chemistry – A European Journal** 18, n. 32, 9901–9910, 2012.
- ²⁹ Tian, Ye, Zhen Liang, Hang Xu, Yanhua Mou, e Chun Guo. Design, Synthesis and Cytotoxicity of Novel Dihydroartemisinin-Coumarin Hybrids via Click Chemistry. **Molecules** 21, n. 6, 758, 2016.
- ³⁰ Kosiova, Ivana, Sona Kovackova, e Pavol Kois. Synthesis of Coumarin–Nucleoside Conjugates via Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Tetrahedron* 63, n. 2, 312–320, 2007.
- ³¹ DEBACHER, N. A.; SPINELLI, A.; NASCIMENTO, M. d. G. Manual de regras básicas de segurança para laboratórios de química. p. 30. Disponível em: https://qmcbasica.paginas.ufsc.br/files/2019/03/Manual_Seguranca_UFSC.pdf.
- ³² CGA/UFSC. Contrato de Manejo dos Resíduos Químicos da UFSC. Disponível em: <https://gestaoderesiduos.ufsc.br/contrato-de-manejo-dos-residuos-quimicos-da-ufsc/>.
- ³³ UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Guia de Biossegurança. Disponível em: <https://coronavirus.ufsc.br/guia-de-biosseguranca/>.
- ³⁴ PAVIA, Donald L.. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: parte 3: acoplamento spin-spin. In: PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R.. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. Washington: Cengage Learning, 2010. p. 219-310
- ³⁵ PAVIA, Donald L.. Espectroscopia no Ultra-Violeta In: PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R.. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. Washington: Cengage Learning, 2010. p. 365-398
- ³⁶ LAKOWICZ, Joseph R.. Introduction to Fluorescence. In: LAKOWICZ, Joseph R.. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006. p. 1-25.
- ³⁷ Costa, Susana P.G., Rosa M.F. Batista, Ana M. R. C. Sousa, e M. Manuela M. Raposo. New Fluorescent Heterocyclic Materials: Synthesis, Solvatochromic and Fluorescence Properties. **Materials Science Forum** 514–516, 147–151, 2006.
- ³⁸ Pavoni, J. F., W. F. P. Neves-Junior, M. A. Spiropulos, e D. B. de Araújo. “Uma montagem experimental para a medida de fluorescência”. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 36, 2014.

³⁹ You, Yawen, Hao Liu, Jiawei Zhu, Yibo Wang, Fang Pu, Jinsong Ren, e Xiaogang Qu. "A DNzyme-Augmented Bioorthogonal Catalysis System for Synergistic Cancer Therapy". *Chemical Science* 13, n. 26, 7829–7836, 2022.

⁴⁰ DiCesare, Nicolas, e Joseph R. Lakowicz. Spectral Properties of Fluorophores Combining the Boronic Acid Group with Electron Donor or Withdrawing Groups. Implication in the Development of Fluorescence Probes for Saccharides. **The journal of physical chemistry. A** 105, n. 28, 6834–40, 2001.

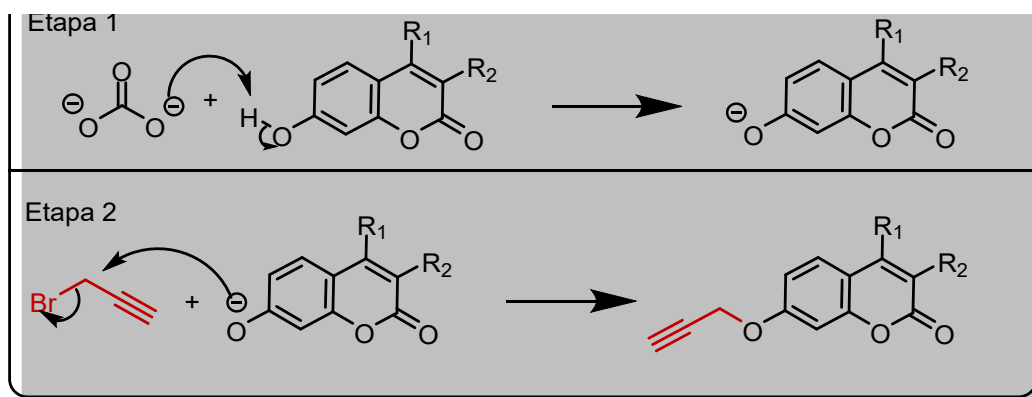
APÊNDICE A: IDEIAS DE MECANISMOS E ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DAS MOLÉCULAS SINTETIZADAS

Esquema 8: Ideia de mecanismo para a rota sintética de 7HC



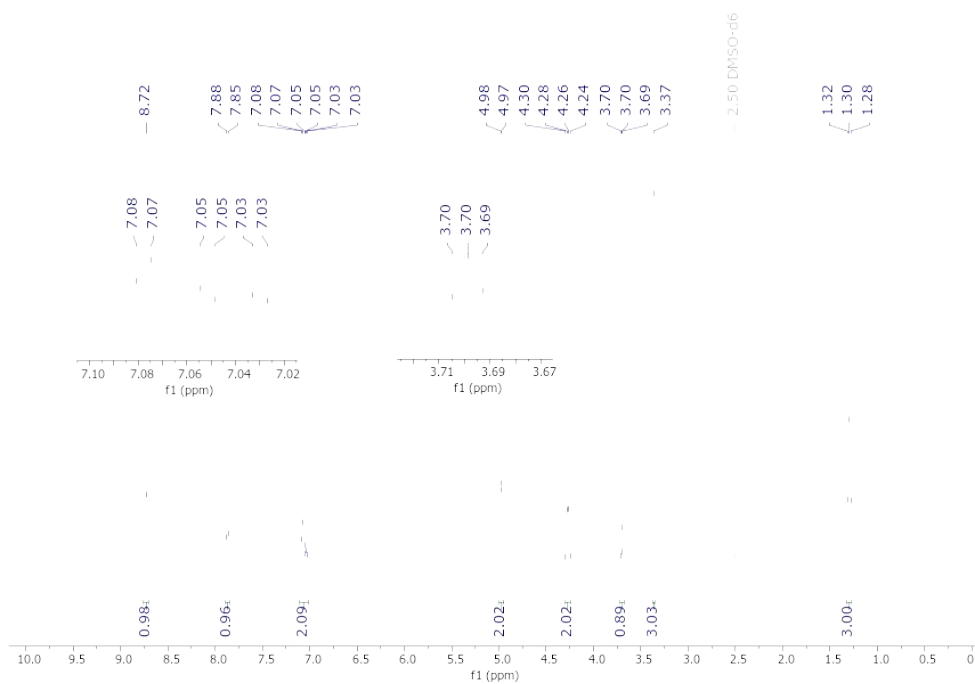
Fonte: Autor

Esquema 9: Ideia de mecanismo para a síntese dos pró-fluoróforos.



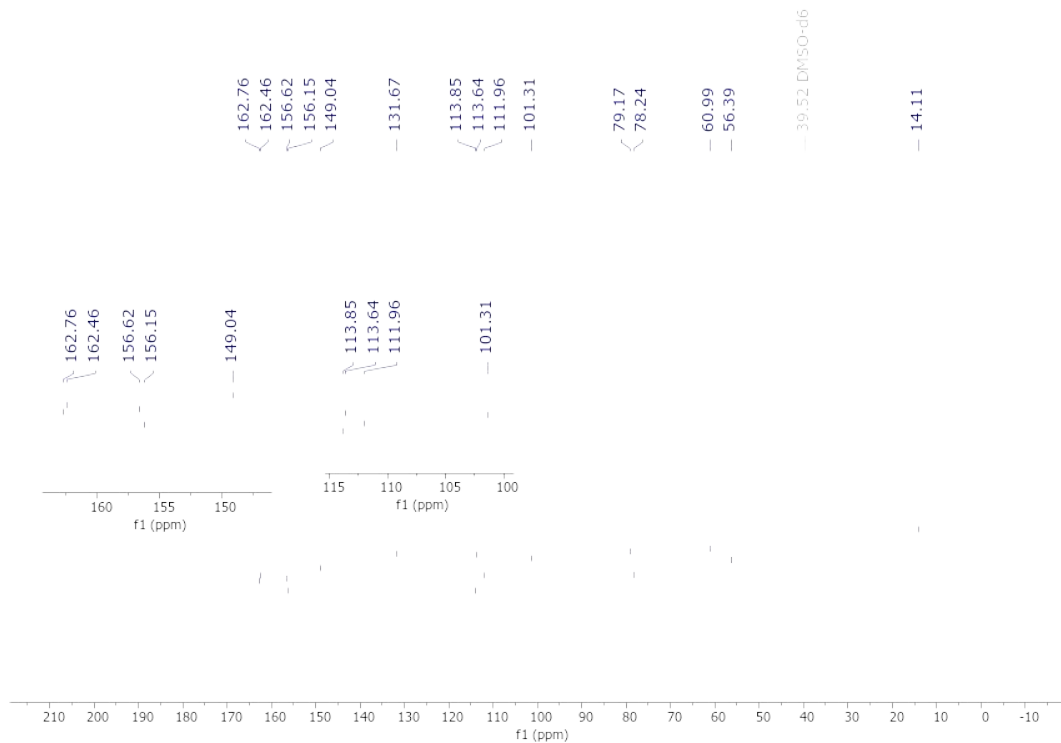
Fonte: Autor

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H da molécula 7PropC.



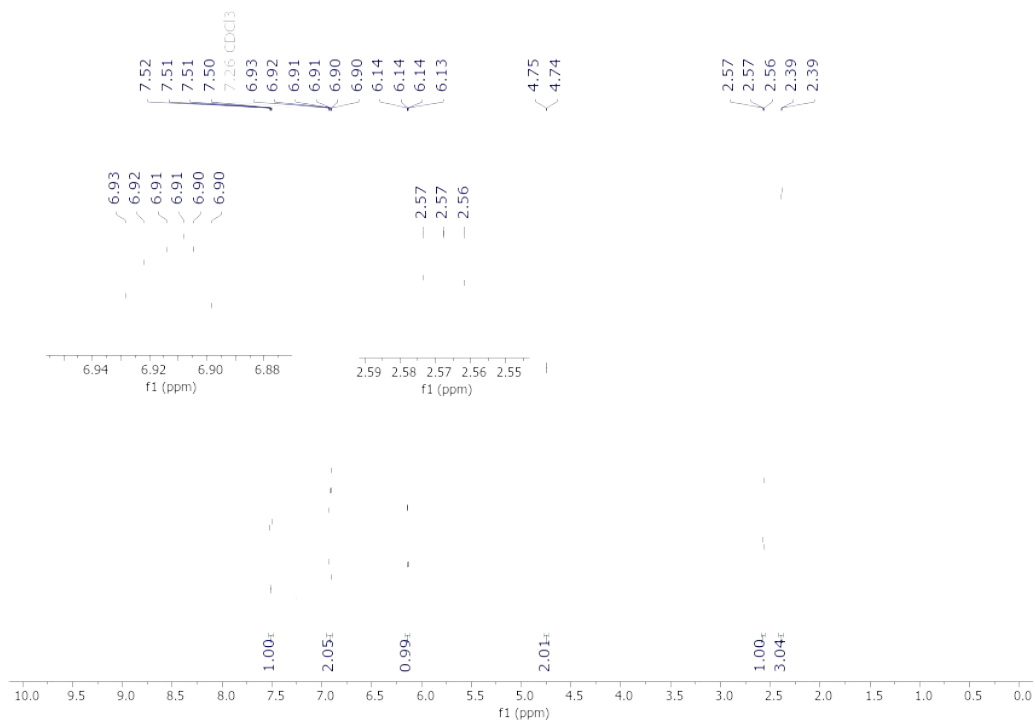
Fonte: Autor

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 7PropC



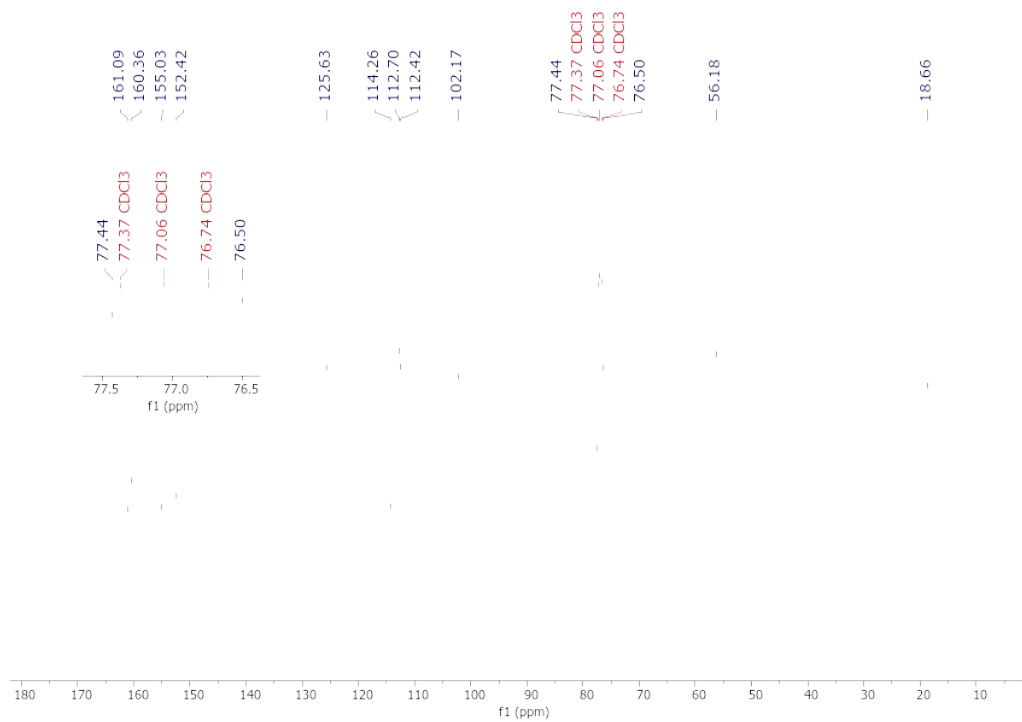
Fonte: Autor

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da molécula 7PropM.



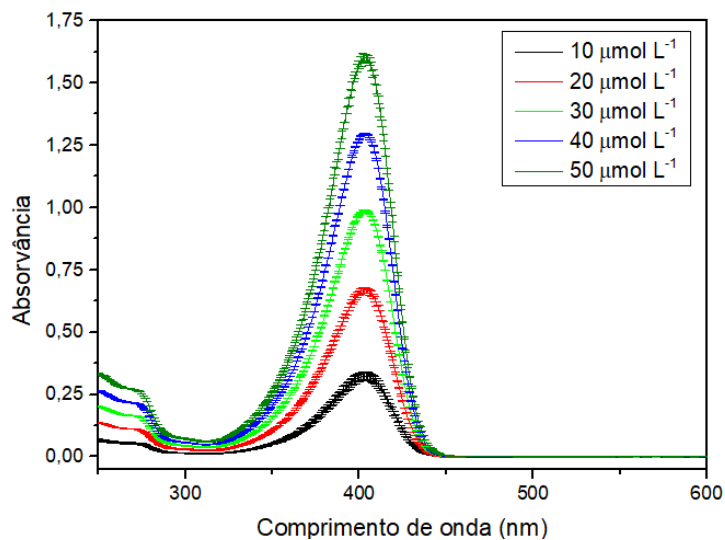
Fonte: Autor

Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 7PropM



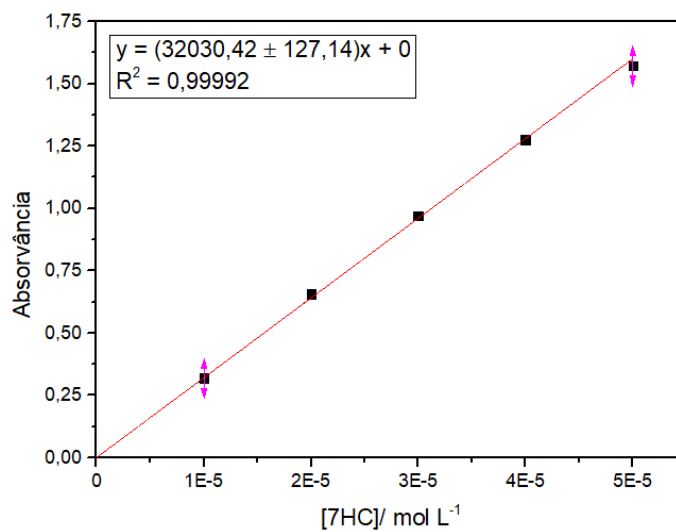
APÊNDICE B: DADOS FOTOFÍSICOS

Figura 21: Curva de calibração espectral da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C)



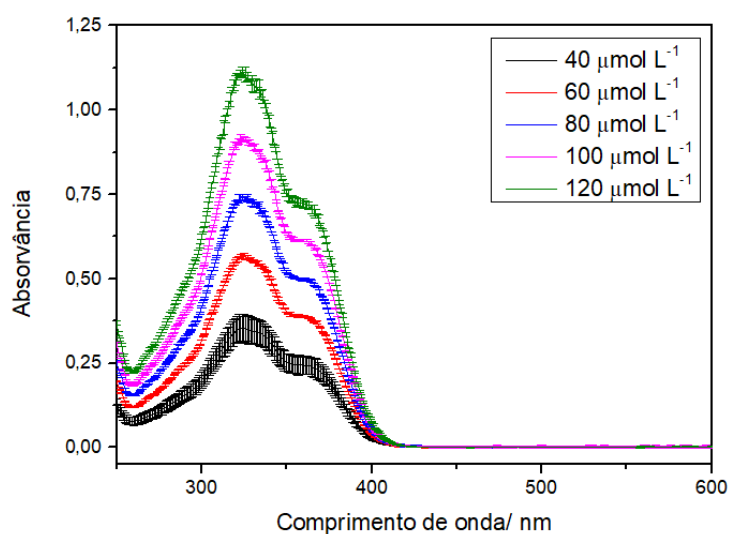
Fonte: Autor

Figura 22: Curva de calibração da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C)



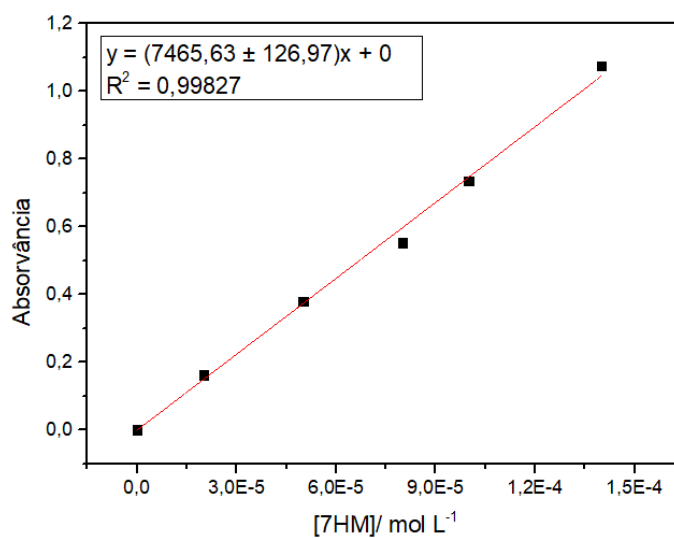
Fonte: Autor

Figura 23: Curva de calibração espectral da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C)



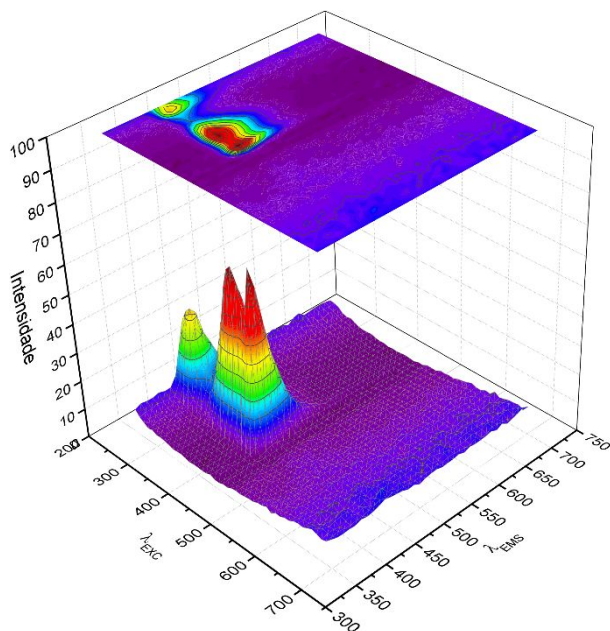
Fonte: Autor

Figura 24: Curva de calibração espectral da molécula 7HC. (Condições gerais: pH = 7,4, PBS, 37 °C)



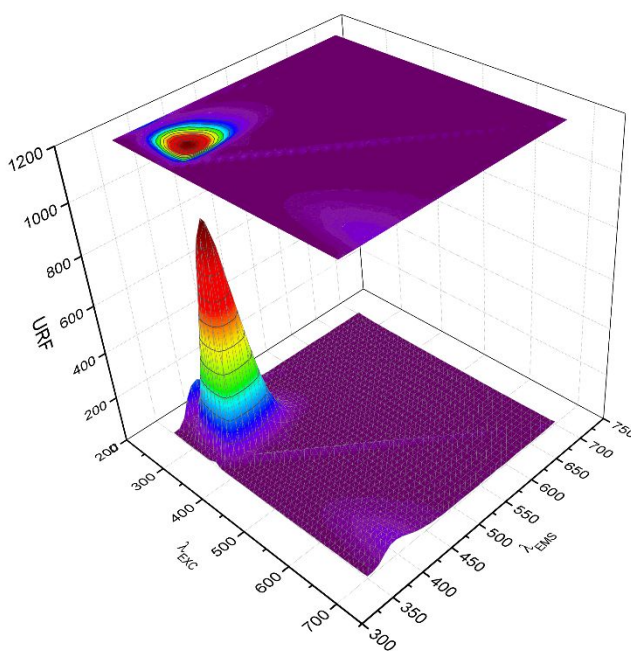
Fonte: O autor

Figura 25: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7HC



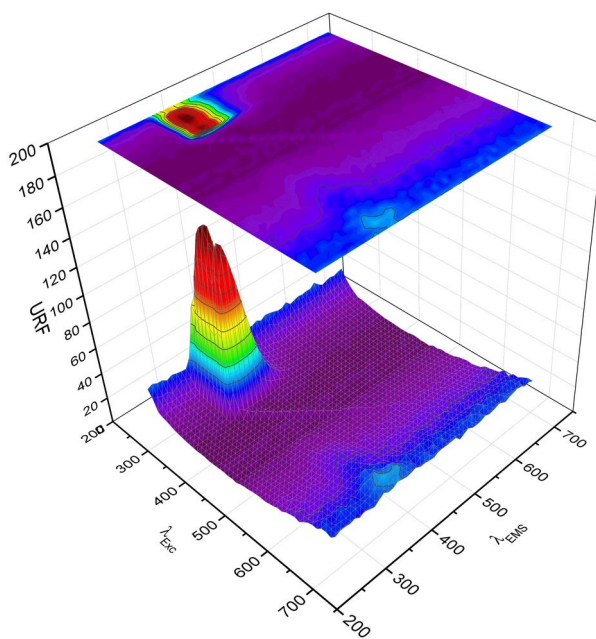
Fonte: Autor

Figura 26: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7PropC



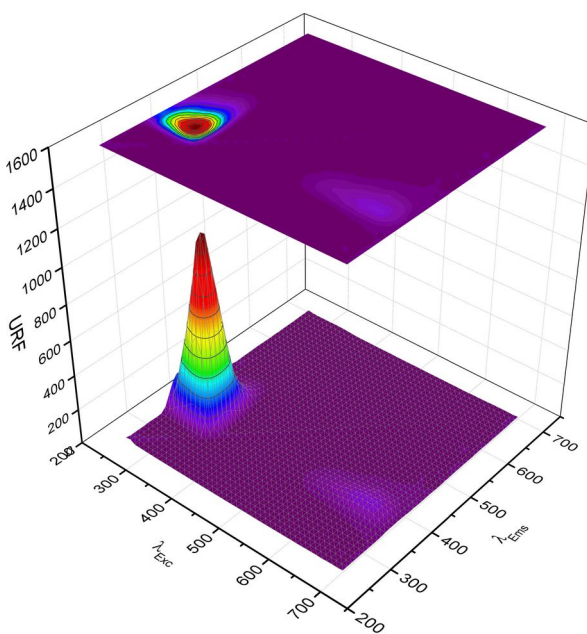
Fonte: Autor

Figura 27: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7HM.



Fonte: Autor

Figura 28: Espectro 3D de excitação e emissão da molécula 7PropM.



Fonte: Autor

APÊNDICE C: DADOS CINÉTICOS

Figura 29: Cinética de despropargilação da 7PropC em condição de segunda ordem, com curva não-linear.

