



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

Juan Vítor Rangel dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PALÁDIO SUPORTADAS EM
ÓXIDO DE GRAFENO E ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO
FÓLICO: SISTEMAS NANOCATALÍTICOS PARA ATIVAÇÃO DE PRÓ-
FLUORÓFOROS EM AMBIENTES BIOLÓGICOS**

Florianópolis

2025

Juan Vítor Rangel dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PALÁDIO SUPORTADAS EM
ÓXIDO DE GRAFENO E ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO
FÓLICO: SISTEMAS NANOCATALÍTICOS PARA ATIVAÇÃO DE PRÓ-
FLUORÓFOROS EM AMBIENTES BIOLÓGICOS**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Graduação em Química do Centro de
Ciências Físicas e Matemáticas da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do título de
bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa
Domingos.

Coorientadora: MSc. Steffany Luczynski
Makara.

Florianópolis

2025

dos Santos, Juan Vitor Rangel

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PALÁDIO SUPORTADAS EM ÓXIDO DE GRAFENO E ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO FÓLICO: SISTEMAS NANOCATALÍTICOS PARA ATIVAÇÃO DE PRÓ-FLUORÓFOROS EM AMBIENTES BIOLÓGICOS / Juan Vitor Rangel dos Santos ; orientador, Josiel Barbosa Domingos, coorientadora, Steffany Luczynski Makara, 2025.

65 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

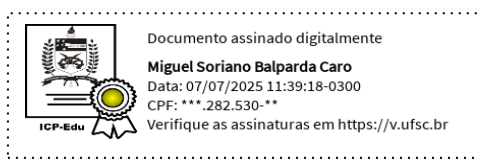
1. Química - Bacharelado. 2. Reações bio-ortogonais. 3. Nanopartículas de paládio. 4. Óxido de grafeno. 5. Ácido fólico. I. Domingos, Josiel Barbosa. II. Makara, Steffany Luczynski. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

Juan Vítor Rangel dos Santos

Desenvolvimento de nanopartículas de paládio suportadas em óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico: sistemas nanocatalíticos para ativação de pró-fluoróforos em ambientes biológicos

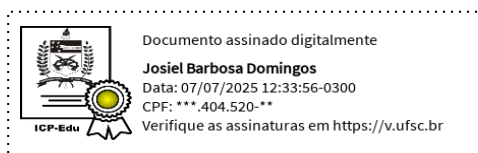
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação de Química.

Florianópolis, 24 de Junho de 2025.



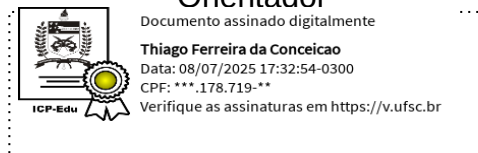
Coordenação do Curso

Banca examinadora



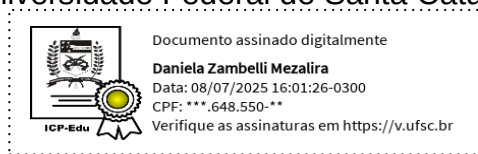
Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos.

Orientador



Prof. Dr. Thiago Ferreira da Conceição.

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.^a Dr.^a Daniela Zambelli Mezalira.

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2025.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Melri, e ao meu padrasto, Valério, por todo o amor, suporte e incentivo incondicional ao longo de minha trajetória acadêmica. Obrigado por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que eu mesmo duvidei.

À minha irmã e amiga, Jeniffer, por estar sempre ao meu lado, oferecendo apoio e acolhimento nos momentos em que mais precisei. Sua presença foi essencial durante toda essa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos, pela confiança, pela orientação dedicada e por compartilhar comigo seus conhecimentos ao longo do projeto. Agradeço também por me permitir integrar o grupo de pesquisa e desenvolver esse trabalho nessa área tão incrível que é a química bio-ortogonal.

À minha coorientadora, MSc. Steffany Luczynski Makara, pela paciência, disponibilidade e por toda a ajuda prática e intelectual durante o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições foram fundamentais para que este projeto ganhasse forma e profundidade.

Às minhas melhores amigas, Amanda e Pauline, que mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram próximas emocionalmente. Obrigado por cada palavra de apoio, por cada gesto de carinho e por torcerem por mim em todos os momentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Catálise Biomimética — Victor, Vinícius, Thuany, Cezar, Gean e Kevin — por todas as conversas, trocas de conhecimento e pela parceria no laboratório. À minha amiga Sabrina, por compartilhar comigo os surtos e as risadas nessa etapa final, obrigado por tornar tudo mais leve.

Aos meus amigos Eduardo e Eloísa, que me acompanham desde o primeiro semestre da graduação. A amizade de vocês foi uma das maiores conquistas dessa etapa, e sei que levarei comigo por toda a vida.

Ao Programa de Graduação em Química e ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, por oferecerem um ensino público, gratuito e de qualidade, e por proporcionarem a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

RESUMO

Nanocatalisadores baseados em paládio têm se destacado em reações bio-ortogonais, mas ainda enfrentam desafios quanto à seletividade e estabilidade em meios biológicos. Estratégias que promovam o direcionamento específico e a ancoragem eficiente do metal ao suporte são fundamentais para aplicações terapêuticas, como a ativação localizada de pró-fármacos. Neste contexto, este trabalho desenvolveu sistemas catalíticos baseados em nanopartículas de paládio nos estados Pd(0) e Pd(II), suportadas em óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA), com o objetivo de promover reações bio-ortogonais de desproteção de pró-fluoróforos em condições biológicas simuladas. As nanopartículas foram estabilizadas com poli(2-vinilpiridina) e caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de absorção atômica (AAS) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A atividade catalítica foi avaliada pela conversão do pró-fluoróforo aleno-4-metilumbeliferona (Alle-4-MU) em 4-metilumbeliferona (4-MU), através de estudos de cinética de reação utilizando espectrofotometria na região do UV-vis. Os sistemas com Pd(0) ajustaram-se ao modelo cinético de Langmuir-Hinshelwood. O catalisador funcionalizado apresentou constantes catalíticas de Langmuir de $k_L = 2,94 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e de associação de $K = 43828 \text{ L mol}^{-1}$, frente a $k_L = 2,63 \times 10^{-9} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $K = 18231 \text{ L mol}^{-1}$ para o sistema não funcionalizado. Ensaio com EDTA e tioureia confirmaram maior estabilidade dos sistemas funcionalizados. Os catalisadores de Pd(II) também apresentaram melhor desempenho com GO-FA. Os resultados demonstram que a funcionalização com ácido fólico aprimora significativamente o desempenho catalítico dos nanossistemas, tornando-os promissores para aplicações futuras em ativação localizada de pró-fármacos em ambientes biológicos complexos.

Palavras-chave: Reações bio-ortogonais; Paládio; Nanopartículas; Óxido de grafeno; Ácido fólico.

ABSTRACT

Palladium-based nanocatalysts have shown great potential in bioorthogonal reactions but still face challenges related to selectivity and stability in biological environments. Strategies that enable specific targeting and efficient metal anchoring to the support are essential for therapeutic applications such as the localized activation of prodrugs. In this context, this work developed catalytic systems based on palladium nanoparticles in the Pd(0) and Pd(II) oxidation states, supported on graphene oxide (GO) and graphene oxide functionalized with folic acid (GO-FA), aiming to promote bioorthogonal deprotection reactions of pro-fluorophores under simulated biological conditions. The nanoparticles were stabilized with poly(2-vinylpyridine) and characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), atomic absorption spectroscopy (AAS), and transmission electron microscopy (TEM). Catalytic activity was evaluated through the conversion of the pro-fluorophore allenyl-4-methylumbelliferone (Alle-4-MU) into 4-methylumbelliferone (4-MU), using UV-vis spectrophotometry. The Pd(0) systems followed the Langmuir–Hinshelwood model. The functionalized catalyst presented $k_L = 2.94 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $K = 43828 \text{ L mol}^{-1}$, compared to $k_L = 2.63 \times 10^{-9} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $K = 18231 \text{ L mol}^{-1}$ for the non-functionalized system. Assays with EDTA and thiourea confirmed the greater stability of the functionalized systems. The Pd(II) catalysts also showed improved performance with GO-FA. The results demonstrate that folic acid functionalization significantly enhances the catalytic performance of the nanomaterials, making them promising candidates for future applications in localized prodrug activation in complex biological environments.

Keywords: *Bioorthogonal reactions; Palladium; Nanoparticles; Graphene oxide; Folic acid.*

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação esquemática da reação de desproteção de moléculas com grupos de proteção alil e propargil com diferentes metais de transição.	18
Esquema 2. Representação da proposta mecanística para a reação de desproteção bio-ortogonal de grupos alílicos e propargílicos mediadas por paládio.	19
Esquema 3. Representação da proposta mecanística da reação de dealenilação mediada por catalisador de paládio.	20
Esquema 4. Representação esquemática da reação da proteção da 4-metilumbeliferona protegida com o grupo protetor propargil.	28
Esquema 5. Representação esquemática da reação da proteção da 4-metilumbeliferona protegida com o grupo protetor aleno.	29
Esquema 6. Representação esquemática da rota sintética do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química do óxido de grafeno.	23
Figura 2. Representação da estrutura química do ácido fólico.	24
Figura 3. Representação esquemática da internalização mediada por receptores de folato e liberação intracelular de nanomateriais funcionalizados com ácido fólico.	25
Figura 4. Representação da estrutura química do polímero P-2VP.	31
Figura 5. Espectro de NMR de ^1H para a Prop-4-MU em CDCl_3 (400 MHz, 25 °C).	36
Figura 6. Espectro de NMR de ^{13}C para a Prop-4-MU em CDCl_3 (100 MHz, 25 °C).	37
Figura 7. Espectro de NMR de ^1H para a Alle-4-MU em CDCl_3 (200 MHz, 25 °C).	38
Figura 8. Espectro de NMR de ^{13}C para a Alle-4-MU em CDCl_3 (50 MHz, 25 °C).	39
Figura 9. Espectros de ATR-FTIR dos materiais GO, GO-COOH e GO-FA.	40
Figura 10. Micrografias (a, b) e histogramas (c, d) das nanopartículas de Pd(0) estabilizadas com P-2VP, suportadas em óxido de grafeno (GO) [(a), (c)] e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA) [(b), (d)]. As escalas das micrografias correspondem a 100 nm para (a) e 50 nm para (b).	44
Figura 11. Espectros ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(0)-GO e Pd(0)-GO-FA.	45
Figura 12. Espectros ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(0)-GO e Pd(0)-GO-FA, P-2VP e GO na região de 1750-1000 cm^{-1} .	46
Figura 13. Micrografias (a, b) e histogramas (c, d) das nanopartículas de Pd(II) estabilizadas com P-2VP, suportadas em óxido de grafeno (GO) [(a), (c)] e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA) [(b), (d)]. As escalas das micrografias correspondem a 100 nm para (a) e (b).	48
Figura 14. Espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(II)-GO e Pd(II)-GO-FA.	49
Figura 15. Espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(II)-GO e Pd(II)-GO-FA, P-2VP e GO na região de 1750-1000 cm^{-1} .	50
Figura 16. Disposição da chapa de agitação sob o equipamento de UV-vis para a realização das cinéticas.	51
Figura 17. Espectros de absorção UV-Visível de 4-MU e Alle-4-UM. Condições gerais: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS/DMSO 95:5, pH 7,4, 37°C.	52
Figura 18. Curva de calibração de 4-MU em 364 nm. Condições gerais: PBS/DMSO	

95:5, pH 7,4, 37°C.

49

Figura 19. Curva cinética de saturação da reação de desproteção do pró-fluoróforo Alle-4-MU catalisada por Pd(0)-P-2VP@GO. Condições gerais: [Alle-4-MU] = 25-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [catalisador] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PBS/DMSO (95:5), 37 °C, pH 7,4, λ = 364 nm.

55

Figura 20. Curva cinética de saturação da reação de desproteção do pró-fluoróforo Alle-4-MU catalisada por Pd(0)-P-2VP@GO-FA. Condições gerais: [Alle-4-MU] 25-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [catalisador] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PBS/DMSO (95:5), 37 °C, pH 7,4, λ = 364 nm.

55

Figura 21. Representação da estrutura química do EDTA e da tioureia.

56

Figura 22. Cinéticas do catalisador Pd(0)-P-2VP@GO (A) e Pd(0)-P-2VP@GO-FA (B) com adição de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ e EDTA Condições gerais: [Alle-4-MU] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [aditivos] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 95% PBS/5% DMSO, 37 °C, pH = 7,4, λ = 364 nm.

57

Figura 23. Cinéticas do catalisador Pd(II)-P-2VP@GO (A) e Pd(II)-P-2VP@GO-FA (B) com adição de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ e EDTA Condições gerais: [Alle-4-MU] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [aditivos] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 95% PBS/5% DMSO, 37 °C, pH = 7,4, λ = 364 nm.

58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da análise CHN para GO e GO-FA.	42
Tabela 2. Concentração percentual de Pd(0) nas nanopartículas suportadas em GO e GO-FA.	43
Tabela 3. Concentração percentual de Pd(II) nas nanopartículas suportadas em GO e GO-FA.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

4-MU – 4-metilumbeliferona

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*)

Alle-4-MU – Aleno-4-metilumbeliferona

ATR – Refletância Total Atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*)

CHN – Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (do inglês, *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

FA – Ácido fólico (do inglês, *Folic acid*)

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GO – Óxido de grafeno (do inglês, *Graphene oxide*)

GO-FA – Óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico

MWCO – Peso molecular de corte (do inglês, *Molecular Weight Cut-Off*)

NHS – N-hidroxisuccinimida

P-2VP – Poli(2-vinilpiridina)

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*)

Prop-4-MU – Propargil-4-metilumbeliferona

NMR – Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*)

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*)

UV-vis – Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (do inglês, *Ultraviolet–Visible Spectroscopy*)

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão da Literatura.....	17
2.1 Reações bio-ortogonais.....	17
2.1.1 Reações de desproteção	17
2.2 Nanopartículas metálicas.....	21
2.2.1 Nanopartículas de paládio.....	21
2.3 Óxido de grafeno	22
2.3.1 Óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico	23
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. Metodologia.....	28
4.1 Materiais.....	28
4.2 Síntese do substrato propargil-4-metilumbeliferona	28
4.3 Síntese do substrato aleno-4-metilumbeliferona	29
4.4 Síntese do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico	29
4.5 Síntese das nanopartículas de paládio suportadas	30
4.5.1 Suporte de óxido de grafeno	30
4.5.2 Suporte de óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico	31
4.6 Estudo cinético com variação de substrato	32
4.7 Métodos.....	32
4.7.1 Espectrometria de absorção atômica	32
4.7.2 Ressonância magnética nuclear	32
4.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	32
4.7.4 Espectrofotometria no ultravioleta	33
4.7.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	33
4.7.6 Análise elementar (CHN)	33
4.8 Segurança no laboratório e tratamento de resíduos	34
5. Resultados e discussão	35
5.1 Síntese dos pró-fluoróforos.....	35
5.1.1 Síntese da Prop-4-MU	35
5.1.2 Síntese da Alle-4-MU.....	37

5.2 Síntese do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico	39
5.3 Síntese e caracterização das nanopartículas de Pd	42
5.3.1 <i>Nanopartículas de Pd(0)</i>	42
5.3.2 Nanopartículas de Pd(II)	47
5.4 Cinéticas de desproteção	50
5.4.1 Curva de calibração	52
5.4.2 Cinética de desproteção por nanopartículas de Pd(0)	53
5.4.3 Cinética de desproteção por nanopartículas de Pd(II)	57
6. Conclusão.....	60
7. Referências.....	61

1. Introdução

O câncer permanece entre uma das maiores causas de mortalidade mundial. Apesar dos avanços na medicina, o tratamento da doença ainda enfrenta muitos desafios, principalmente em relação à eficácia e segurança das terapias disponíveis. A quimioterapia, embora amplamente utilizada, está associada a uma série de efeitos colaterais decorrentes da falta de especificidade dos fármacos utilizados e da toxicidade para células saudáveis, como queda de cabelo, fadiga e enfraquecimento do sistema imunológico.

Nesse contexto, a química bio-ortogonal surge como uma alternativa promissora, permitindo que reações químicas ocorram dentro do organismo de maneira seletiva e controlada, sem interferir em outros processos biológicos. Esse controle possibilita a liberação de fármacos diretamente no ambiente tumoral, minimizando os efeitos colaterais associados ao tratamento convencional.

O uso de nanopartículas de paládio como catalisadores em reações bio-ortogonais já demonstrou grande potencial na ativação de pró-fármacos. No entanto, a eficácia dessa abordagem poderia, teoricamente, ser significativamente aumentada ao utilizar óxido de grafeno como suporte, pois entre outras propriedades, esse material permite interações π - π *stacking* com catalisadores e substratos ricos em elétrons π . Essas interações favorecem a estabilização das nanopartículas de paládio, aumentando sua dispersão e evitando a agregação. Ainda, permite um aumento da concentração local do substrato, o que contribui para uma maior eficiência catalítica. Esse material não só oferece um aumento da área superficial para tornar as reações mais eficientes, como também apresenta alta biocompatibilidade.

Além disso, a funcionalização do óxido de grafeno com ácido fólico pode direcionar as nanopartículas para células tumorais que expressam receptores de folato em excesso, proporcionando uma liberação mais controlada e específica do fármaco no ambiente desejado.

Este trabalho busca aprimorar o desempenho das nanopartículas de paládio em reações bio-ortogonais, investigando como diferentes tipos de suporte (óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico) podem impactar a eficiência dessas reações e, no futuro, melhorar a eficácia terapêutica dos tratamentos contra o câncer.

2. Revisão da Literatura

2.1 Reações bio-ortogonais

A química bio-ortogonal surgiu como uma abordagem inovadora em 2003, quando a pesquisadora Carolyn Bertozzi, ganhadora do prêmio Nobel da química de 2022, propôs o conceito para descrever reações químicas que ocorrem de forma seletiva em ambientes biológicos, sem interferir com os processos celulares nativos.¹ Desde então, essa técnica tem sido amplamente explorada, especialmente em aplicações biomédicas, devido à sua capacidade de realizar transformações químicas precisas dentro de sistemas vivos.

As reações bio-ortogonais destacam-se por sua capacidade única de acontecerem de maneira específica, rápida e eficiente em sistemas biológicos complexos, sem perturbar ou interferir nas vias metabólicas naturais.² Esse comportamento é possível graças à ortogonalidade, que assegura alta seletividade e compatibilidade com as condições do ambiente biológico.³

Nesse contexto, a química bio-ortogonal tem sido amplamente utilizada para modificar moléculas por meio de reações que envolvem a formação de ligações, no caso de reações associativas, ou a quebra de ligações, no caso de reações dissociativas.³ No caso das reações de desproteção (dissociativas), estas destacam-se pela quebra seletiva de ligações químicas específicas em moléculas bioativas ou compostos sintéticos, como pró-fármacos e pró-fluoróforos, que são ativados seletivamente em ambientes biológicos.

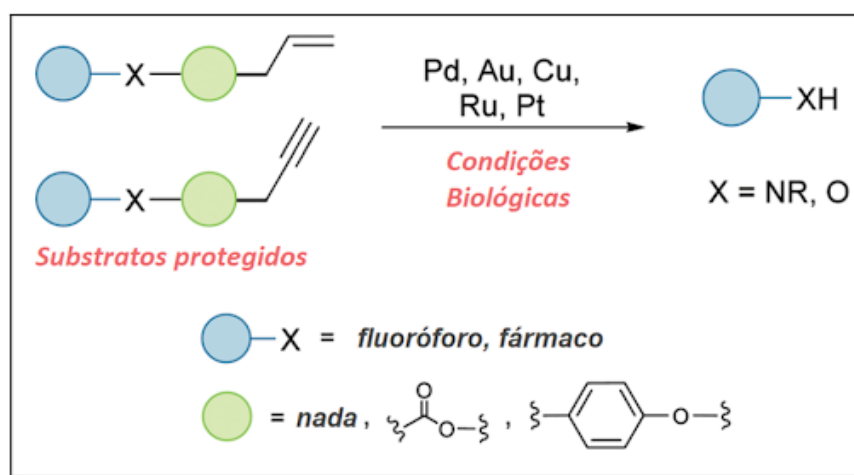
2.1.1 Reações de desproteção

O processo de proteção/desproteção de diferentes tipos de moléculas, como proteínas, fármacos e fluoróforos tem sido uma estratégia utilizada em aplicações bioquímicas. A proteção tem por objetivo levar à perda temporária da função de uma molécula de interesse após a adição de um grupo protetor à sua estrutura, permitindo restaurar a sua atividade/função após a remoção seletiva do grupo protetor, de maneira controlada através de gatilhos químicos.^{3,4}

No contexto do tratamento do câncer, as reações de desproteção têm grande importância, pois permitem reduzir o efeito citotóxico de fármacos e a fluorescência de fluoróforos, melhorando a eficácia terapêutica e ampliando as possibilidades para imageamento celular, respectivamente.³

Reações de desproteção utilizando grupos alil e propargil como grupos protetores desempenham um papel central em diversas aplicações de bioquímica, especialmente em sistemas que utilizam metais de transição como gatilhos químicos. Nessas reações, grupos funcionais como aminas e hidroxilas, comuns em biomoléculas e compostos orgânicos sintéticos, são protegidos com o grupo alil ou propargil para reduzir a função nativa destas moléculas. A desproteção desses grupos é demonstrada no esquema a seguir:

Esquema 1. Representação esquemática da reação de desproteção de moléculas com grupos de proteção alil e propargil com diferentes metais de transição.



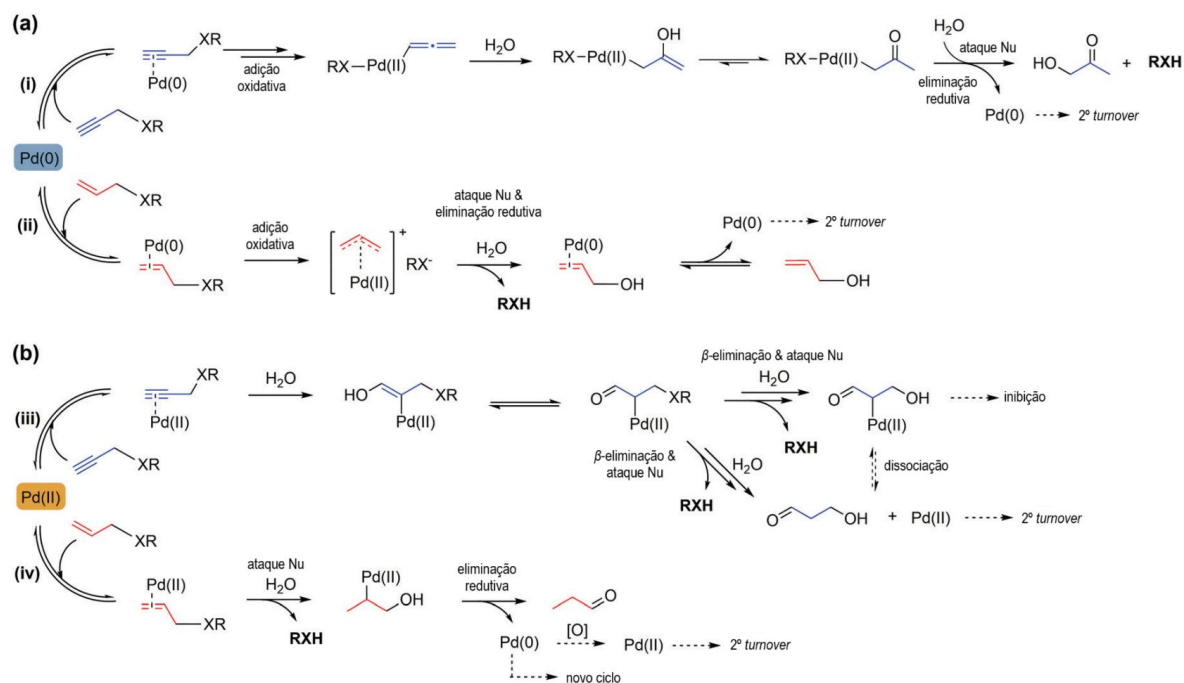
Fonte: Adaptado de Latocheski et al. (2020).³

No caso específico do paládio, sua capacidade catalítica tem sido explorada devido ao seu alto potencial para mediar reações de desproteção. Na desproteção dos grupos alil e propargil, tem sido estudado o efeito do paládio em diferentes estados de oxidação, principalmente Pd(0) e Pd(II). Reações de desproteção envolvendo grupos alil e propargil com Pd(0) ocorrem por meio de um mecanismo bem caracterizado, que envolve uma adição oxidativa, seguida de reação com água e, posteriormente, uma eliminação redutiva para regenerar a espécie catalítica ativa. Esse ciclo catalítico pode se repetir continuamente, promovendo sucessivas desproteções.³

Já as reações mediadas por Pd(II) apresentam algumas particularidades. Em alguns casos, a regeneração de Pd(II) pode ser inibida pela forte interação de subprodutos com o complexo metálico, bloqueando a associação de novos substratos. No entanto, a reação de desalilação, similar à oxidação de Wacker-Tsuji, gera Pd(0)

no primeiro ciclo, que pode ser reoxidado pelos componentes do meio para regenerar Pd(II) e continuar o processo catalítico.³

Esquema 2. Representação da proposta mecanística para a reação de desproteção bio-ortogonal de grupos alílicos e propargílicos mediadas por paládio.



Fonte: Adaptado de Latocheski et al. (2020).³

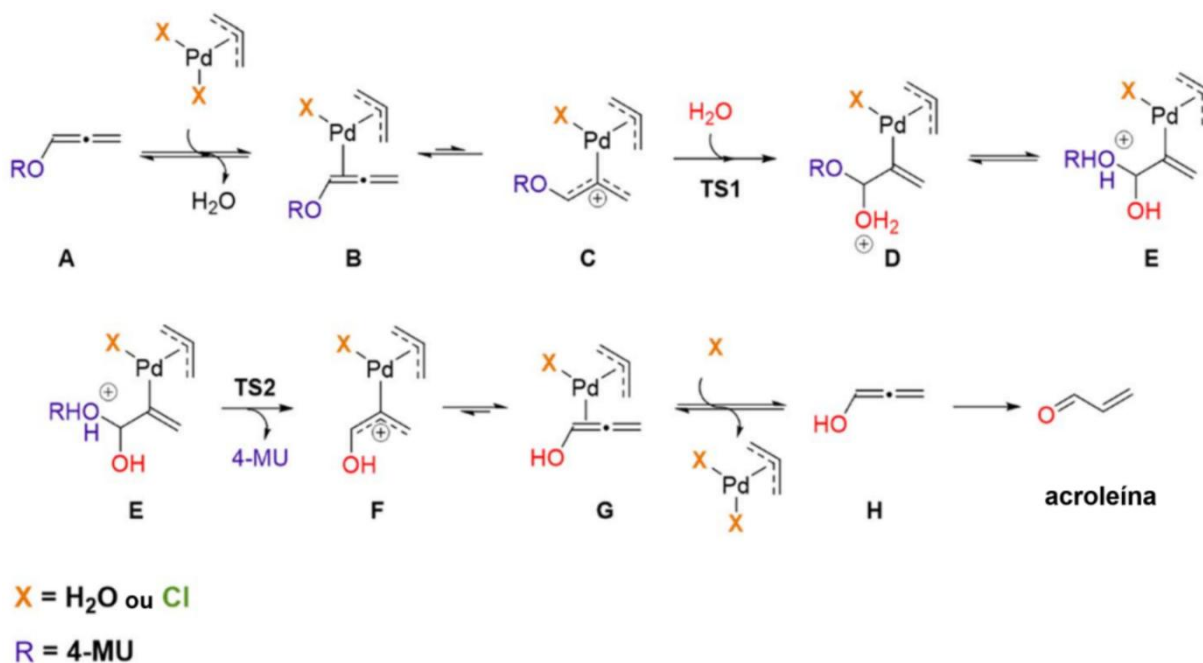
Outro grupo que tem se explorado recentemente para as reações de desproteção é o grupo aleno, que se destaca como um potente grupo de proteção bio-ortogonal e demonstra sensibilidade a uma ampla gama de metais de transição.⁵ No entanto, em comparação com os grupos alil e propargil, seu uso em reações de desproteção bio-ortogonais ainda é relativamente pouco explorado. Essa limitação provavelmente se deve à falta de compreensão mecanística e a uma análise mais aprofundada de sua reatividade. Nesse contexto, trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa têm focado em avaliar catalisadores de paládio e o impacto deliberado da concentração de íons cloreto na velocidade e rendimento da quebra da ligação C–O, utilizando análises cinéticas, energéticas e estruturais para aprofundar o entendimento sobre o comportamento do grupo.⁶ Ferreira et al. (2025) demonstraram, por exemplo, que a presença de cloreto no meio pode aumentar significativamente a eficiência catalítica de complexos de Pd(II), especialmente na desproteção de

derivados de aleno, indicando a importância do microambiente na modulação da reatividade em sistemas bio-ortogonais.⁷

De forma complementar, Dal forno et al. (2024) explorou o mecanismo de desalenilação mediada por um complexo de paládio.⁶ O mecanismo proposto mostrou que o passo inicial resulta na liberação de uma molécula de água, no entanto esse complexo apresenta baixa reatividade. Barreiras de ativação elevadas para ataques de água nos carbonos do aleno indicam que essas rotas são ineficazes.⁶

A coordenação σ do paládio ao carbono central do aleno, embora menos favorável termodinamicamente, gera uma configuração mais reativa. O ataque de água a este carbono leva à formação de um intermediário, que passa rapidamente por transferência intramolecular de prótons, resultando na liberação do substrato. O complexo π resultante é mais estável e, após uma troca de ligantes, o catalisador de paládio é regenerado, liberando hidroxi-aleno, que então tautomeriza para acroleína.⁶

Esquema 3. Representação da proposta mecanística da reação de dealenilação mediada por catalisador de paládio.



Fonte: Adaptado de Dal Forno et al. (2024).⁶

Apesar do potencial das reações de desproteção bio-ortogonais em liberar agentes terapêuticos de forma controlada, sua aplicação eficiente em sistemas biológicos exige catalisadores que operem com alta seletividade, estabilidade e compatibilidade em meio aquoso. Nesse contexto, destaca-se o uso de nanomateriais,

especialmente nanopartículas, como ferramentas promissoras para promover tais reações. Devido à sua alta área superficial e propriedades, as nanopartículas metálicas têm sido amplamente exploradas como catalisadores em ambientes complexos, como o meio intracelular.

2.2 Nanopartículas metálicas

Nanopartículas metálicas são estruturas compostas por átomos metálicos organizados na escala nanométrica que têm ganhado bastante interesse na academia devido às suas diversas aplicações, resultado de suas propriedades únicas associadas ao seu tamanho reduzido. Devido à alta quantidade de átomos metálicos em sua superfície, as nanopartículas são bastante reativas e apresentam vários sítios ativos, apresentando um alto potencial como catalisador.⁸

Contudo, a alta reatividade e o pequeno tamanho das nanopartículas metálicas também as tornam susceptíveis à agregação, que pode reduzir sua eficácia catalítica e estabilidade ao longo do tempo. Para contornar esse problema, as nanopartículas frequentemente são estabilizadas por meio de agentes como polímeros, surfactantes ou por suportes sólidos, como óxidos metálicos e grafeno oxidado. Esse material possibilita interações π - π *stacking* com as nanopartículas, favorecendo sua dispersão e estabilidade e permitindo um controle mais preciso das reações catalíticas em que são empregadas.⁹

Na catálise heterogênea, elas são frequentemente suportadas em materiais como sílica, carbono e matrizes carbônicas, como grafeno, o que não só aumenta sua estabilidade, mas também facilita sua recuperação e reutilização ao final das reações. Além disso, suportes como o óxido de grafeno oferecem uma plataforma estável e podem aumentar a biocompatibilidade e a funcionalidade das nanopartículas, especialmente em aplicações biomédicas, como na ativação de pró-fármacos e na medicina de precisão.¹⁰

2.2.1 Nanopartículas de paládio

O paládio se destaca na catálise devido à sua capacidade única de facilitar reações de formação de ligações carbono-carbono e carbono-heteroátomo, sendo amplamente utilizado em síntese orgânica e desenvolvimento de fármacos. Reações como Heck, Suzuki e Sonogashira têm recebido destaque por sua eficácia em gerar

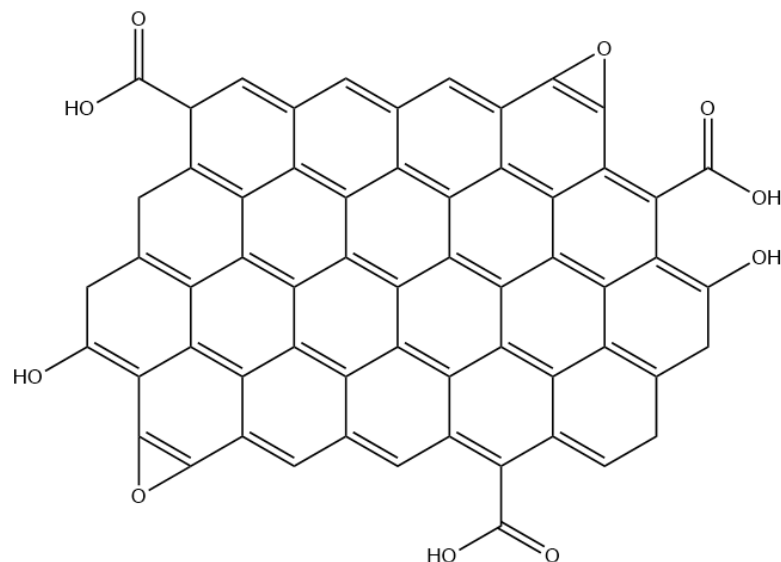
compostos complexos e bioativos, o que contribui diretamente para o avanço de pesquisas nas áreas farmacêutica e biomédica.^{11,12} Essas transformações catalisadas por paládio oferecem uma abordagem versátil e eficiente para a produção de substâncias com propriedades terapêuticas, promovendo o desenvolvimento de novos tratamentos.¹¹

Em aplicações terapêuticas direcionadas, as nanopartículas de paládio mostraram um grande potencial para permanecer estáveis e retidas em regiões específicas do corpo, como tecidos tumorais, onde podem atuar em tratamentos localizados. Estudos pré-clínicos, como o de Liu et al. (2020),¹³ evidenciam que as nanopartículas de paládio, após inseridas em tumores, mantêm-se concentradas na área alvo por um período prolongado, sem dispersão significativa. Essa propriedade torna as nanopartículas de paládio ideais para a ativação localizada de pró-fármacos, reduzindo os efeitos adversos em células saudáveis e aumentando a precisão do tratamento.¹³

2.3 Óxido de grafeno

O óxido de grafeno (GO, do inglês, *graphene oxide*) tem emergido como um dos materiais mais promissores para aplicações em nanomedicina e biotecnologia devido às suas propriedades únicas, que o tornam particularmente adequado como suporte para nanopartículas na catálise bio-ortogonal. Derivado da oxidação do grafeno puro, o GO é composto por uma estrutura bidimensional com grupos funcionais oxigenados, como hidroxilas, epóxidos e carboxilas, distribuídos em sua superfície (Figura 1). Essas funcionalidades tornam o GO altamente dispersível em soluções aquosas, promovendo sua solubilidade e estabilidade, além de facilitar a penetração celular devido a interações eletrônicas, características importantes para ambientes biológicos.¹⁴

Figura 1. Representação da estrutura química do óxido de grafeno.



Fonte: O autor (2025).

Do ponto de vista de catálise bio-ortogonal, o GO também oferece uma área superficial elevada e diversos sítios de interação que favorecem a imobilização de nanopartículas metálicas, como as de paládio. Esses sítios de ancoragem facilitam a distribuição uniforme das nanopartículas na superfície do GO, o que pode aumentar a atividade catalítica e, conseqüentemente, a eficiência da reação de ativação bio-ortogonal.¹⁵ Além disso, o GO apresenta menor toxicidade em comparação com o grafeno puro, uma característica fundamental para aplicações médicas e terapêuticas que prezam por uma alta biocompatibilidade e segurança.¹⁶

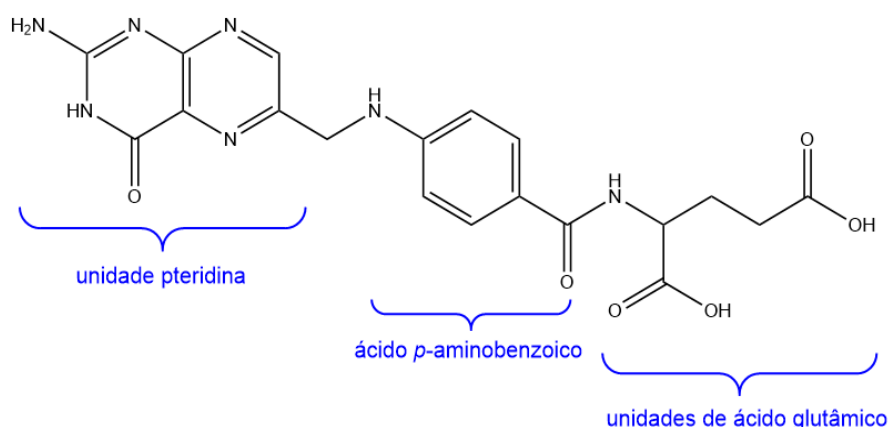
Com o intuito de aprimorar a especificidade do óxido de grafeno para aplicações biomédicas, diferentes estratégias de funcionalização têm sido exploradas. Dentre elas, destaca-se a modificação com moléculas capazes de atuar como agentes de direcionamento, promovendo maior seletividade em terapias alvo-específicas. Um exemplo amplamente estudado é a funcionalização com ácido fólico, cuja afinidade por receptores superexpressos em células tumorais o torna especialmente promissor para aplicações em sistemas de liberação controlada.

2.3.1 Óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico

O ácido fólico (FA, do inglês, *folic acid*), também conhecido como vitamina B9, é um composto essencial na biossíntese de ácidos nucleicos e no metabolismo de aminoácidos. Sua estrutura química, composta por um anel pteridina, ácido *p*-

aminobenzóico e ácido glutâmico (Figura 2), permite a interação com receptores específicos presentes na superfície celular, especialmente em células de rápida proliferação, como as cancerosas. Esse comportamento diferencial torna o ácido fólico um agente alvo importante em terapias que buscam aumentar a especificidade de tratamento em tecidos afetados por tumores.¹⁷

Figura 2. Representação da estrutura química do ácido fólico.



Fonte: O autor (2025).

A utilização do ácido fólico como agente de funcionalização em nanomateriais tem sido explorada devido à sua capacidade de direcionamento celular. O GO possui grupos funcionais oxigenados, como hidroxilas, epóxidos e carboxilas, que favorecem sua modificação química, permitindo a conjugação de moléculas bioativas, como o ácido fólico.¹⁸

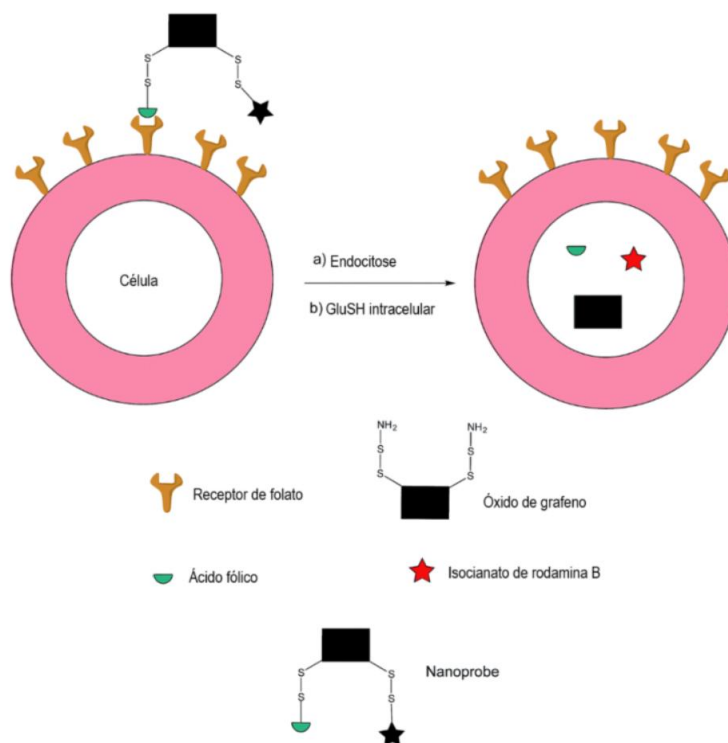
Além disso, a funcionalização com ácido fólico possui vantagens específicas para aplicação em terapias bio-ortogonais. Como as células tumorais frequentemente superexpressam receptores de folato na superfície, o uso de ácido fólico para funcionalizar o óxido de grafeno aumenta a especificidade do nanossistema para essas células-alvo. Isso possibilita uma entrega mais localizada de agentes terapêuticos ou pró-fármacos, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e melhorando a eficácia do tratamento.^{18,19}

Ademais, essa funcionalização facilita a internalização do sistema por mecanismos mediados pelo receptor, adaptando-se ao microambiente tumoral e permitindo o acesso direto ao ambiente intracelular. Esse processo específico de reconhecimento e fagocitose apresenta um grande potencial para aplicações bio-

ortogonais que exigem por apresentarem uma alta precisão nas reações internas das células tumorais, maximizando a eficácia e o controle da ação terapêutica.^{19,20}

Após o reconhecimento do ácido fólico pelos receptores superexpressos na superfície celular, o nanossistema funcionalizado é internalizado por endocitose e, em ambiente intracelular redutor, sofre degradação controlada, liberando o agente terapêutico ou marcador fluorescente. Esse mecanismo favorece uma liberação localizada e precisa, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando efeitos colaterais. A Figura 3 ilustra esse processo com base no trabalho de Fernández et al. (2018), no qual nanomateriais funcionalizados com ácido fólico são ativados por glutatona intracelular, promovendo a liberação de moléculas como o isotiocianato de rodamina B no ambiente celular tumoral.²¹

Figura 3. Representação esquemática da internalização mediada por receptores de folato e liberação intracelular de nanomateriais funcionalizados com ácido fólico.



Fonte: Adaptado de Fernández et al. (2018).²¹

Diante do exposto, surge a seguinte questão científica: seria possível aprimorar a eficiência e seletividade de reações bio-ortogonais de desproteção por meio do uso de nanopartículas de paládio suportadas em óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico? Parte-se da hipótese de que a funcionalização com ácido fólico

promoverá um direcionamento seletivo das nanopartículas às células tumorais, aumentando a concentração local do catalisador e, conseqüentemente, a velocidade de reação. Além disso, espera-se que o suporte de óxido de grafeno contribua para uma maior estabilidade e dispersão das nanopartículas, otimizando sua performance catalítica. Com isso, o presente trabalho busca desenvolver e caracterizar nanossistemas catalíticos inovadores, avaliando sua eficácia em ativar pró-fluoróforos em condições que simulam o ambiente biológico, com vistas à aplicação futura em terapias mais seguras e específicas no tratamento do câncer, na ativação de pró-fármacos antineoplásicos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema catalítico para desproteção de pró-fluoróforos, utilizando nanopartículas de paládio suportadas em óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico, visando aplicações em ambientes biológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de Pd(0) e Pd(II) suportadas em óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico;
- Sintetizar e caracterizar a molécula 4-metilumbeliferona protegida com o grupo aleno;
- Realizar estudos cinéticos das reações de desproteção mediadas por nanopartículas de paládio em condições similares às biológicas;
- Realizar estudos cinéticos das reações de desproteção na presença de aditivos;
- Demonstrar o potencial de funcionalização com ácido fólico para aumentar a seletividade e eficácia catalítica;
- Aplicar o modelo cinético de Langmuir-Hinshelwood para investigar processos de adsorção do substratos.

4. Metodologia

4.1 Materiais

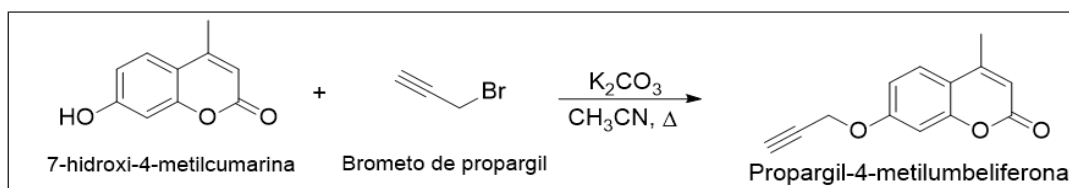
Os reagentes e materiais necessários para as etapas de síntese foram adquiridos de fornecedores comerciais, como a Sigma-Aldrich, Merck, Aldrich, entre outros. Os solventes utilizados passaram por um processo de purificação por destilação e foram armazenados em peneiras moleculares com diâmetro de 4 Å para garantir sua qualidade. A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação TKA Smart2Pure, assegurando a pureza necessária para as reações. Os demais materiais, como bomba de vácuo, vidrarias, chapas aquecedoras, agitadores magnéticos, balanças analíticas e rotaevaporador, foram disponibilizados pelo Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), do Departamento de Química da UFSC.

4.2 Síntese do substrato propargil-4-metilumbeliferona

O substrato propargil-4-metilumbeliferona (Prop-4-MU) foi utilizado como precursor para a síntese do substrato aleno-4-metilumbeliferona (Alle-4-MU), baseando-se em uma versão modificada de um procedimento relatado na literatura.⁶ O esquema reacional é apresentado no Esquema 4.

Em um balão de fundo redondo, foi adicionado K_2CO_3 (15,8 mmol) com 4-metilumbeliferona (1 mmol) em 12 mL de CH_3CN , sob agitação. Após a dissolução, acrescentou-se brometo de propargila (1,1 mmol, 80% em tolueno), e o sistema foi fechado com um septo de borracha. A mistura permaneceu em agitação a 60 °C por 12 horas. Após a reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a mistura foi diluída em água, seguida de extração com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi lavada, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado, sem purificação adicional.

Esquema 4. Representação esquemática da reação da proteção da 4-metilumbeliferona protegida com o grupo protetor propargil.



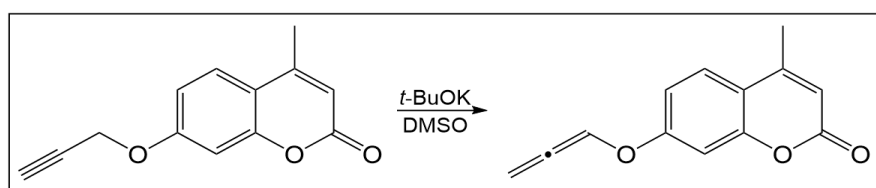
Fonte: Dal Forno et al (2024).⁶

4.3 Síntese do substrato aleno-4-metilumbeliferona

O substrato aleno-4-metilumbeliferona foi preparado adaptando procedimentos descritos na literatura (Esquema 5).⁶

Em um balão de fundo redondo seco em estufa, equipado com um septo de borracha e uma barra de agitação, adicionou-se Prop-4-MU. O sistema foi evacuado e preenchido com nitrogênio, e em seguida foram adicionados 10 mL dimetilsulfóxido (DMSO) 5 mL de terc-butoxido de potássio (*t*-BuOK) em atmosfera de nitrogênio. O balão foi selado e a mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura reacional bruta foi purificada por cromatografia em coluna, utilizando uma solução de 0 a 4% de acetato de etila em hexano como eluente.

Esquema 5. Representação esquemática da reação da proteção da 4-metilumbeliferona protegida com o grupo protetor aleno.



Fonte: Dal Forno et al (2024).⁶

4.4 Síntese do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico

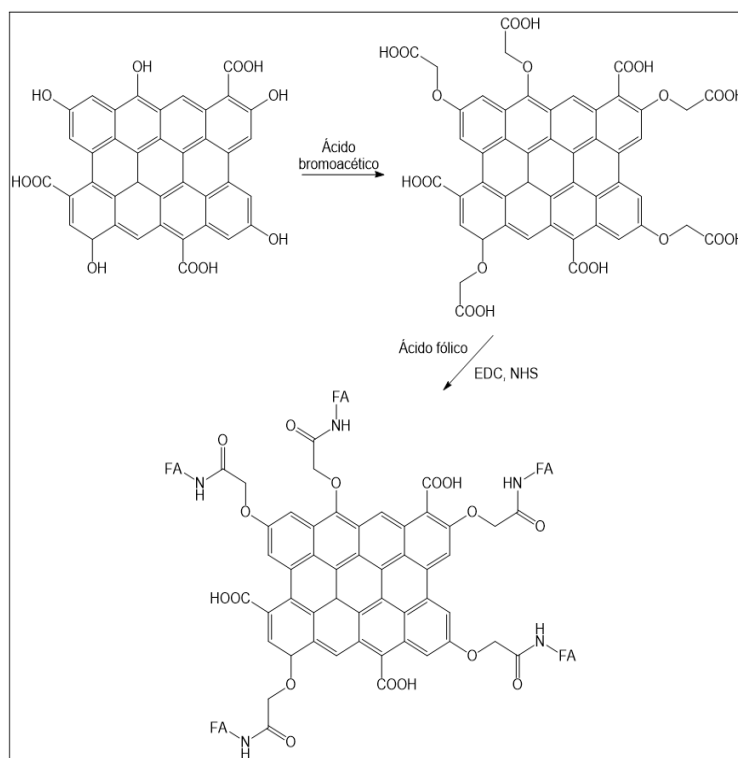
A síntese do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico se baseou no método proposto por Qin et al. (2019)¹⁷ e Ma et al. (2015)²² (Esquema 6).

Primeiramente foi feita a carboxilação do óxido de grafeno comercial, onde foram adicionados 8,4 g hidróxido de sódio (NaOH) e 17 g ácido bromoacético (BrCH_2COOH) a uma suspensão aquosa de 840 mL de óxido de grafeno (1 mg mL^{-1}). Em seguida, realizou-se a sonicação em banho ultrassônico por 3 horas, convertendo os grupos OH em COOH. A solução resultante permaneceu em agitação por 24 horas. Após o tempo, a solução resultante de óxido de grafeno-COOH foi então neutralizada com ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e purificada por sucessivas lavagens em metanol e água e filtrações, obtendo-se uma dispersão estável em água deionizada.

O ácido fólico foi conjugado ao óxido de grafeno por meio de uma reação entre os grupos COOH do óxido de grafeno e os grupos NH_2 das moléculas de FA. Para isso, *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC, do inglês *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*) ($0,280 \text{ mmol}$) e a *N*-hidroxisuccinimida (NHS)

(38,7 mmol) foram adicionados à suspensão de óxido de grafeno, e sonicou-se a mistura por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 10 mL de FA (12,36 mg mL⁻¹), e a mistura foi mantida sob agitação durante a noite. Os materiais não reagidos foram removidos por uma membrana de diálise de peso molecular de corte (MWCO, do inglês *Molecular Weight Cut-Off*) de 3500 contra solução de bicarbonato de sódio (pH 8,0) por 48 horas, seguida de diálise em água destilada por mais 24 horas. Após a diálise, a mistura foi filtrada com uma membrana de nylon com poros de 0,2 µm de diâmetro. O sólido filtrado foi mantido em um dessecador a vácuo.

Esquema 6. Representação esquemática da rota sintética do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico.



Fonte: Qin et al. (2019)¹⁷ e Ma et al. (2015).²²

4.5 Síntese das nanopartículas de paládio suportadas

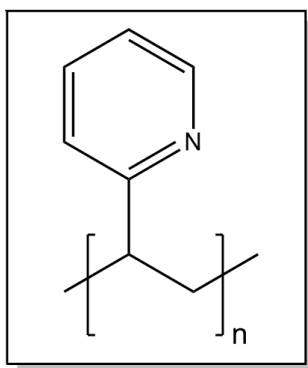
4.5.1 Suporte de óxido de grafeno

A síntese das nanopartículas suportadas em GO foi adaptada de um método previamente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa.¹⁸ Esse método foi adaptado para o uso de óxido de grafeno como suporte, uma vez que o procedimento original

empregava grafeno puro. Foi utilizado o polímero P-2VP como agente estabilizante (Figura 4).

Em dois balões de fundo redondo de 25 mL, foi adicionado 12 mL de água deionizada com o óxido de grafeno 10 mg mL^{-1} , dispersando-se o óxido de grafeno com o auxílio de um ultrassom. Em ambos os balões foram adicionados 3,6 mL de uma solução aquosa de poli-2(vinilpiridina) (P-2VP) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,8 mL de uma solução de acetato de paládio ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após aguardar 10 minutos, adicionou-se uma solução aquosa de iodeto de potássio (KI) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em um dos balões para a formação de nanopartículas de Pd(II) e, no outro, uma solução aquosa de borohidreto de sódio (NaBH_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para a formação de nanopartículas de Pd(0), deixando a reação ocorrer por 24 horas.

Figura 4. Representação da estrutura química do polímero P-2VP.



Fonte: O autor (2025).

Ao final do período, as soluções foram transferidas para tubos Falcon de centrifugação. Foram adicionados 10 mL de acetona e as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. Em seguida, realizou-se três lavagens com 5,0 mL de acetona, centrifugando cada tubo a 4000 rpm e descartando o sobrenadante após cada etapa.

4.5.2 Suporte de óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico

A síntese das nanopartículas suportadas em GO-FA foi realizada da mesma maneira que a síntese previamente feita com o suporte de grafeno, porém adaptando-se com o novo suporte.

4.6 Estudo cinético com variação de substrato

Primeiramente foi construída a construção da curva de calibração da 4-metilumbeliferona. Foram preparadas soluções padrão em PBS/DMSO (95:5) com concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As leituras foram obtidas no comprimento de onda de 364 nm, correspondente ao máximo de absorção da 4-MU nessas condições experimentais.

Para os sistemas contendo Pd(0), foi realizada uma análise com variação do substrato Alle-4-MU em sistemas contendo nanopartículas de paládio para determinar a constante de velocidade. Foi aplicado o modelo cinético de Langmuir-Hinshelwood para investigar a adsorção e dessorção dos substratos nas seguintes condições: PBS, 5% DMSO, pH 7,4 e 37 °C. As concentrações de substrato utilizadas nos ensaios foram de 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.7 Métodos

4.7.1 Espectrometria de absorção atômica

A concentração de paládio nas nanopartículas foi quantificada por espectrometria de absorção atômica, disponível na Central de Análises, após digestão das amostras em solução de 2% de água régia (HCl:HNO₃, 3:1) em água deionizada.

4.7.2 Ressonância magnética nuclear

A estrutura dos fluoróforos e pró-fluoróforos sintetizados foi determinada por ressonância magnética nuclear (NMR). As análises ocorreram no equipamento BRUKER 400 MHz, que opera com frequências de 400 MHz para espectros de ¹H e de 100 MHz para espectros de ¹³C, e no equipamento BRUKER 200 MHz, que opera com frequências de 200 MHz para espectros de ¹H e de 50 MHz para espectros de ¹³C.

4.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a determinação do tamanho das nanopartículas foi utilizado o equipamento de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, do inglês. *Transmission Electron Microscopy*) analisados no equipamento JEM-1400, disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). As amostras foram

preparadas dissolvendo-se as nanopartículas em DMSO e posteriormente depositando uma pequena gota da suspensão sobre grades de cobre recobertas com filme de carbono, específicas para análise em TEM.

4.7.4 Espectrofotometria no ultravioleta

Os estudos cinéticos de desproteção foram realizados utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta, através do Espectrofotômetro de UV-vis Varian Cary 60 Bio em cubetas de quartzo de caminho ótico de 1 cm, disponível no LaCBio. Houve a adaptação de uma chapa de agitação sob o equipamento e barras magnéticas em todas as cubetas para que as reações pudessem ser realizadas sob agitação de forma homogênea. Para isso, foram feitos testes para determinar as melhores posições da cubeta que garantissem uma melhor homogeneidade no estudo cinético.

4.7.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) para os quatro catalisadores, o óxido de grafeno modificado, o óxido de grafeno padrão, o ácido fólico e o polímero poli(2-vinilpiridina) (P-2VP) foram registrados utilizando o espectrofotômetro Perkin-Elmer Spectrum 100, instalado no LABINC. As análises foram realizadas no modo de refletância total atenuada (ATR, do inglês, *Attenuated Total Reflectance*), aplicando-se diretamente uma pequena quantidade de cada amostra (cerca de uma ponta de espátula) sobre o cristal do acessório ATR, sem necessidade de preparo prévio.

4.7.6 Análise elementar (CHN)

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) foi realizada na Central de Análises. Foram analisadas amostras sólidas do óxido de grafeno (GO) e do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA), previamente secas. Uma pequena quantidade de cada amostra (cerca de 2 mg) foi pesada e submetida à análise. O objetivo foi verificar a presença e o teor de nitrogênio como indicativo da incorporação do ácido fólico ao material, uma vez que esse elemento está ausente no óxido de grafeno puro e presente na estrutura do folato.

4.8 Segurança no laboratório e tratamento de resíduos

Durante os procedimentos, foram utilizados equipamentos de proteção individual, como jaleco, óculos de proteção e luvas. Todos os reagentes que apresentaram risco, seja explosivo, tóxico ou irritante, foram manuseados exclusivamente sob supervisão e dentro da capela.

As reações, descartes e demais atividades laboratoriais seguiram rigorosamente as normas de segurança descritas no manual básico do laboratório de química. O descarte dos resíduos foi organizado em categorias: resíduos halogenados, resíduos não halogenados, resíduos aquosos (com correção de pH antes do descarte) e resíduos sólidos. Após essa separação, os resíduos foram encaminhados para o descarte adequado pela empresa PROACTIVA MEIO AMBIENTE BRASIL LTDA, contratada pela UFSC.

5. Resultados e discussão

5.1 Síntese dos pró-fluoróforos

Nesta seção serão apresentados os resultados da síntese e caracterização dos pró-fluoróforos Prop-4-MU e Alle-4-MU.

5.1.1 Síntese da Prop-4-MU

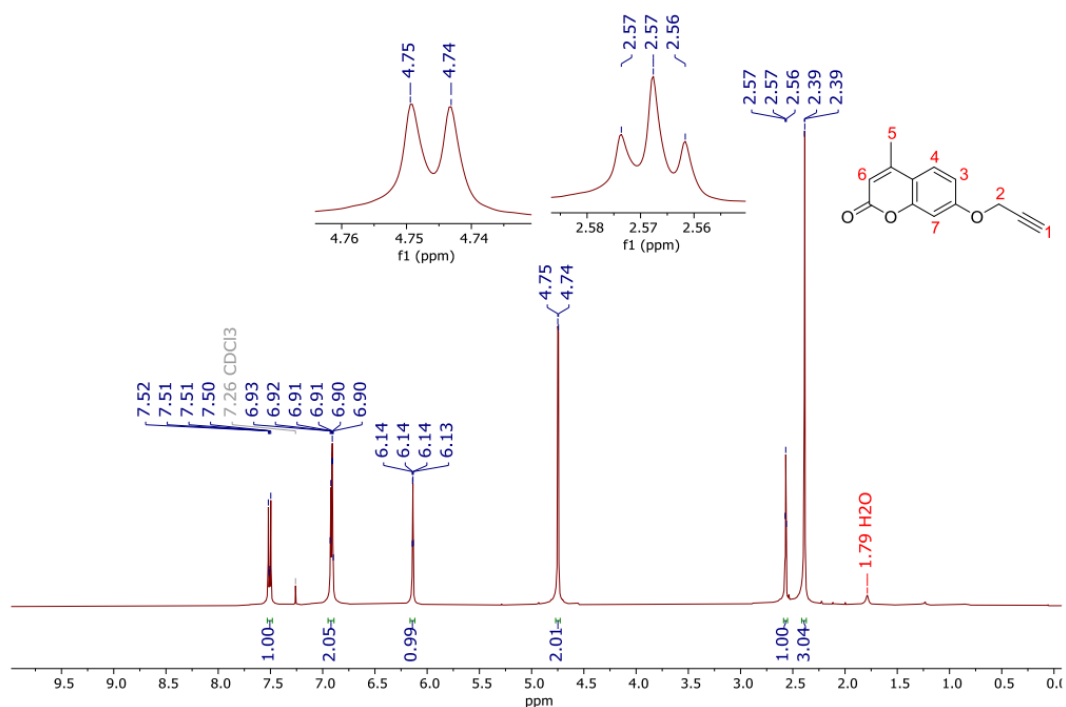
A síntese de proteção da 4-MU com o grupo propargílico seguiu um mecanismo típico de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) e o produto obtido foi utilizado como precursor para a síntese do Alle-4-MU. A conversão do grupo propargílico em alenílico é uma estratégia conhecida para gerar estruturas com maior reatividade em catálise bio-ortogonal, já que o sistema aleno é um bom substrato para reações de desproteção mediadas por paládio.

O produto obtido foi um sólido de coloração amarela clara, com ponto de fusão determinado entre 135 e 141 °C, em concordância com dados da literatura.⁶ O rendimento global da reação foi de 91%.

Para garantir a seletividade da reação e minimizar a formação de subprodutos, como o álcool propargílico, foram tomadas precauções rigorosas quanto à secagem dos reagentes e solventes, incluindo o uso de peneiras moleculares. Um excesso de carbonato de potássio (K_2CO_3) foi utilizado com o objetivo de promover a completa desprotonação da hidroxila fenólica da 4-MU.

A caracterização da Prop-4-MU foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR) e de carbono-13 (^{13}C NMR), ambas em $CDCl_3$. No espectro de ^1H NMR (400 MHz), apresentando na Figura 5, dois sinais destacam-se como evidência da introdução do grupo propargílico: um tripleto em 2,57 ppm, referente ao próton terminal da tripla ligação, com constante de acoplamento JJ de 2,4 Hz, e um duplete em 4,74 ppm, relativo aos hidrogênios do grupo CH_2 ligado ao oxigênio. O deslocamento deste último é influenciado pela retirada de densidade eletrônica causada pelo oxigênio, o que justifica sua posição em campo mais desblindado. Os demais sinais observados são compatíveis com a estrutura da 4-MU, como o duplete em 2,39 ppm (3H), o quarteto em 6,14 ppm (1H) e os multipletos entre 6,88–7,54 ppm, todos referentes ao sistema aromático e ao grupo metila da cumarina.

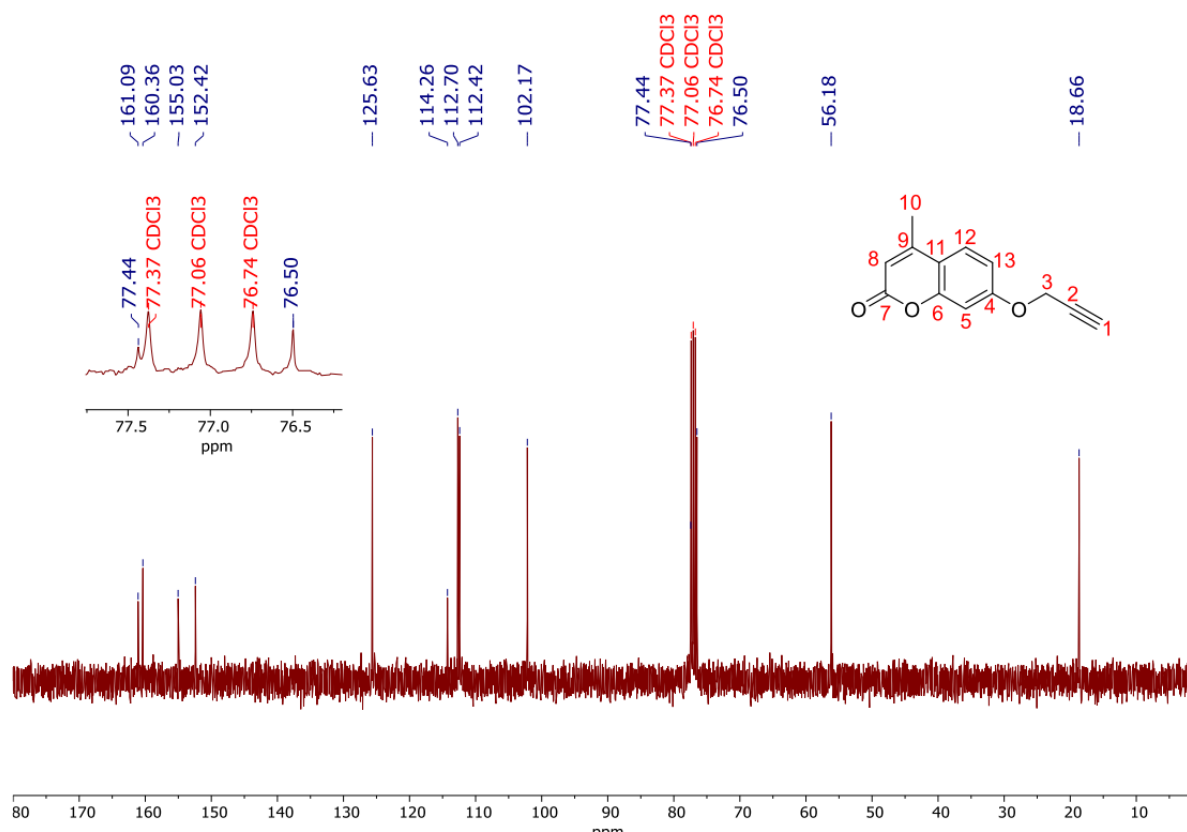
Figura 5. Espectro de NMR de ^1H para a Prop-4-MU em CDCl_3 (400 MHz. 25 °C).



Fonte: O autor (2025).

Na Figura 6 está apresentado o espectro de ^{13}C NMR (100 MHz). Foram identificados 13 sinais, número de carbonos esperado para o composto sintetizado. Três deles, em especial, indicam a presença do grupo propargílico: os sinais em 77,44 ppm (carbono terminal da tripla ligação), 76,50 ppm (carbono interno da tripla ligação) e 56,18 ppm (carbono do CH_2 ligado ao oxigênio). Esses sinais aparecem próximos à região do solvente CDCl_3 , mas são bem definidos. Os demais picos correspondem aos carbonos da estrutura da 4-MU, confirmando que a funcionalização não alterou a integridade do esqueleto cumarínico. Dessa forma, tanto os dados espectroscópicos quanto os parâmetros físico-químicos observados confirmam o sucesso na síntese do derivado propargílico da 4-MU.

Figura 6. Espectro de NMR de ^{13}C para a Prop-4-MU em CDCl_3 (100 MHz, 25 °C).



Fonte: O autor (2025).

5.1.2 Síntese da Alle-4-MU

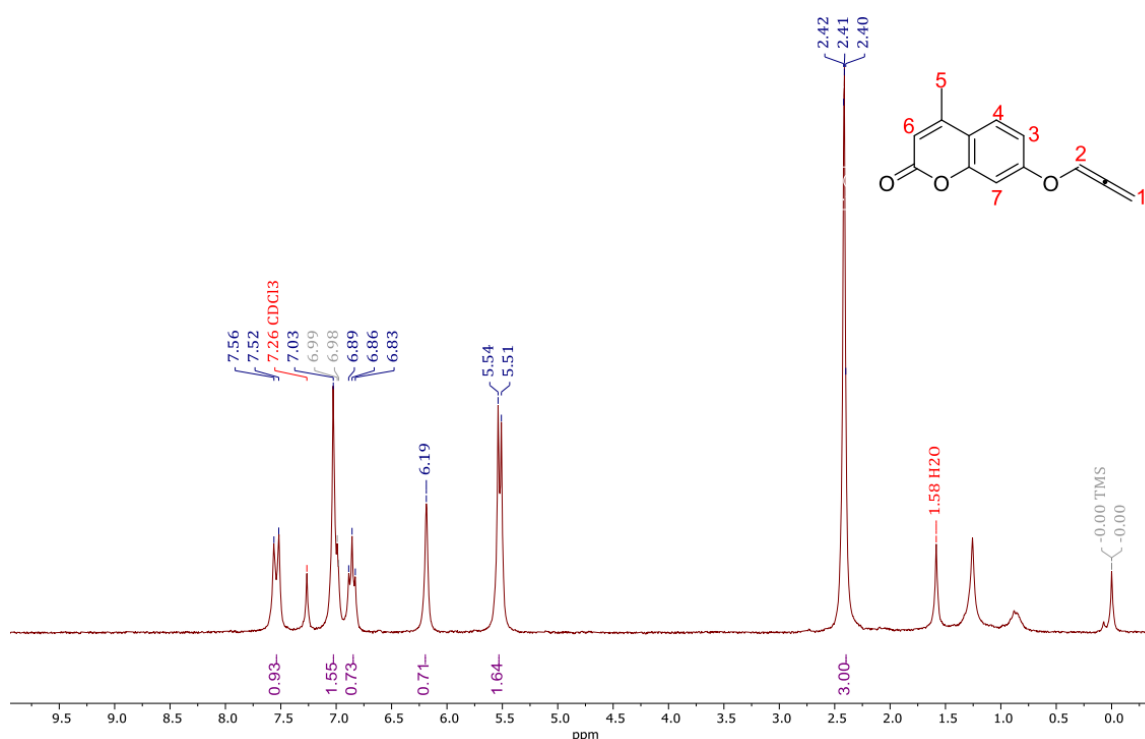
O composto aleno-4-metilumbeliferona (Alle-4-MU) foi obtido a partir de uma reação de isomerização do grupo propargílico da Prop-4-MU, utilizando *t*-BuOK como base forte em meio orgânico.

Após a purificação do produto, foi obtido um sólido branco de aspecto flocado, com ponto de fusão entre 101–104 °C. O rendimento final da síntese foi de 14,5%. Essas características estão de acordo com dados reportados na literatura,⁶ o que indica a provável formação do produto esperado.

A confirmação estrutural da Alle-4-MU também foi realizada por espectroscopia de NMR de ^1H e ^{13}C , utilizando CDCl_3 como solvente. O espectro de ^1H NMR (200 MHz), apresentado na Figura 7, evidenciou o desaparecimento dos sinais característicos do grupo propargílico da molécula precursora, localizados em aproximadamente 2,57 e 4,75 ppm, sendo um indício de que a isomerização ocorreu. Em contrapartida, surgiram novos sinais atribuíveis ao grupo aleno: um duplete em

5,54 ppm com integração de 2H, correspondente aos hidrogênios terminais do aleno (designados como H1), e um tripleto em 6,83 ppm com integração de 1H, referente ao hidrogênio interno do sistema alenílico (H2). A alta frequência desses sinais se deve à desblindagem eletrônica causada pela conjugação com o sistema insaturado e pelo efeito do átomo de oxigênio próximo ao aleno.

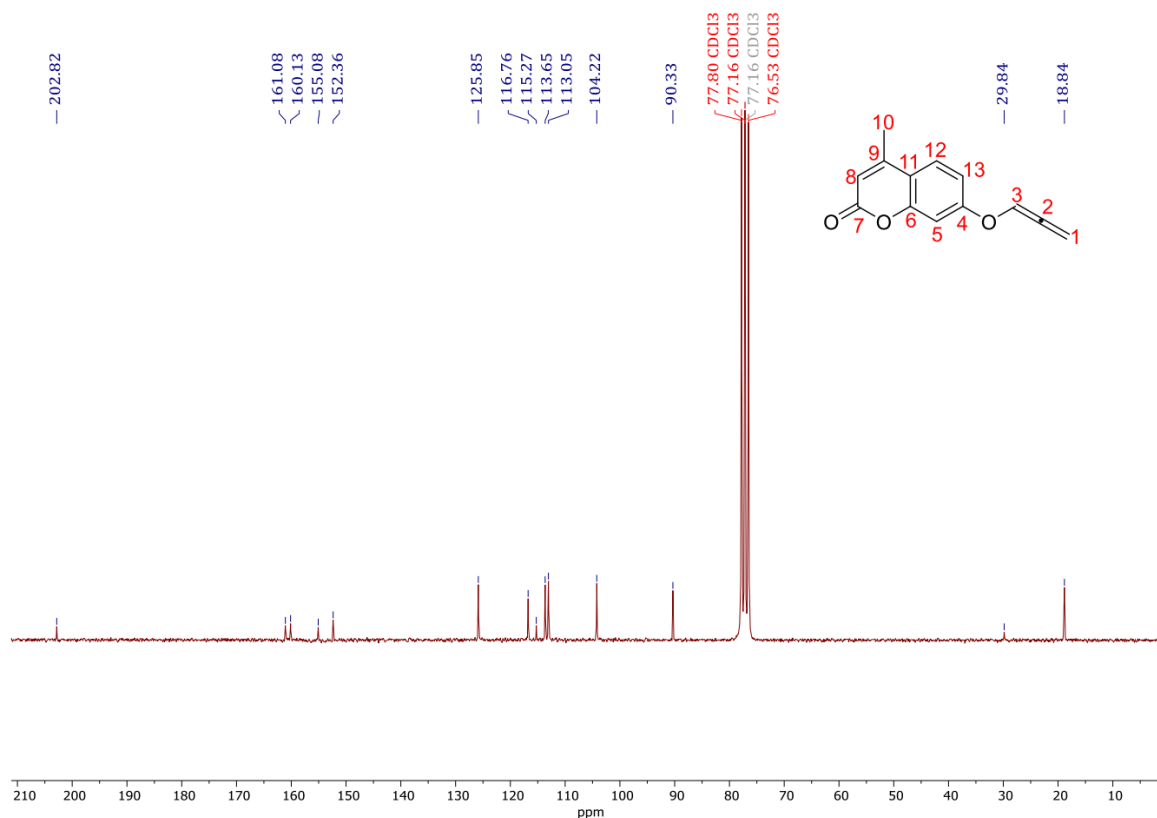
Figura 7. Espectro de NMR de ^1H para a Alle-4-MU em CDCl_3 (200 MHz, 25 °C).



Fonte: O autor (2025).

O espectro de ^{13}C NMR (50 MHz), apresentado na Figura 8, complementou a análise, apresentando 13 sinais distintos, compatíveis com os 13 átomos de carbono da estrutura. A transição do grupo propargílico para o aleno foi confirmada pelo desaparecimento dos sinais nas regiões de 77,44, 76,50 e 56,18 ppm (relacionados ao grupo propargílico), e pelo surgimento de novos sinais atribuídos ao sistema protegido com o grupo aleno: 202,82 ppm (carbono central C2, altamente desprotegido devido às ligações duplas adjacentes), 90,33 ppm (carbono terminal C1) e 116,76 ppm (carbono ligado ao oxigênio, C3). Os demais sinais foram atribuídos ao núcleo da molécula 4-MU.

Figura 8. Espectro de NMR de ^{13}C para a Alle-4-MU em CDCl_3 (50 MHz, 25 °C).



Fonte: O autor (2025).

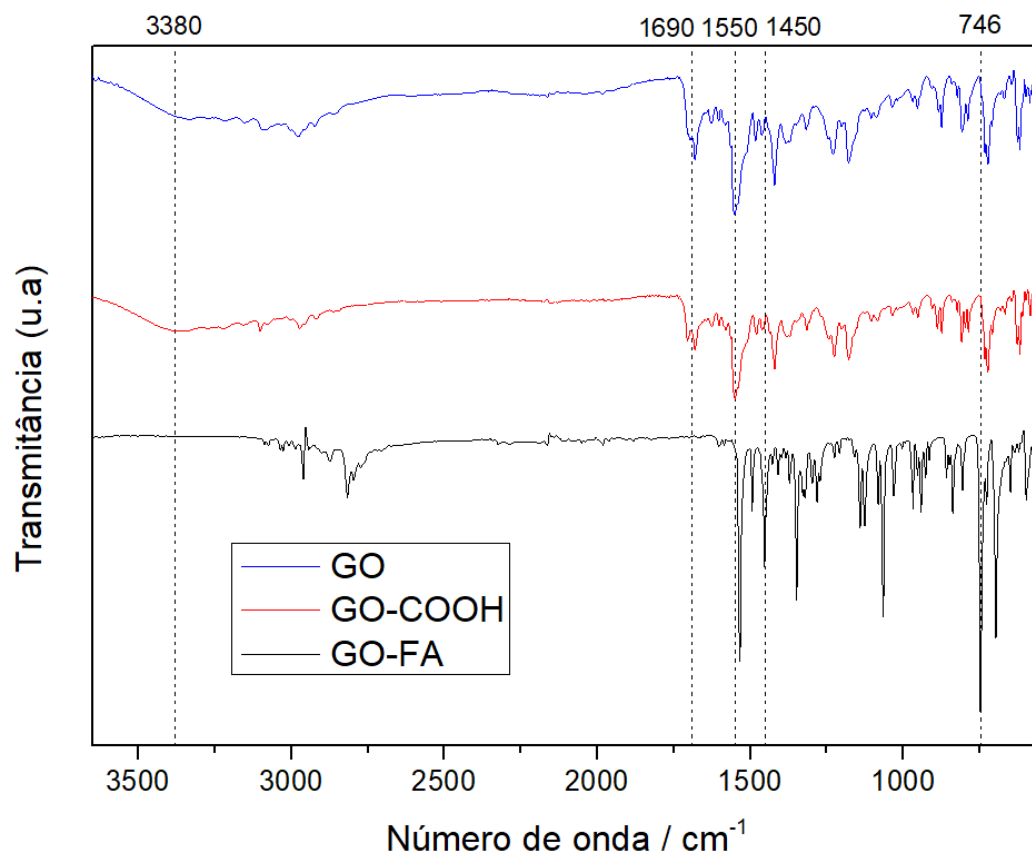
5.2 Síntese do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico

A funcionalização do óxido de grafeno com ácido fólico foi confirmada por meio da análise dos materiais obtidos após as duas etapas reacionais. Na primeira, observou-se a conversão de grupos hidroxila em grupos carboxila, evidenciando a carboxilação bem-sucedida do óxido de grafeno por meio da reação com hidróxido de sódio e ácido bromoacético. Essa modificação foi essencial para a posterior conjugação com o ácido fólico, uma vez que introduziu sítios de ligação apropriados.

Na segunda etapa a conjugação com o ácido fólico foi realizada através da ativação dos grupos carboxila com EDC/NHS, seguida pela reação com os grupos amina do ácido fólico. O EDC primeiro ativa os grupos carboxila do GO-COOH, formando um intermediário ativado. O NHS então transforma este intermediário em um éster mais estável (GO-COO-NHS), que finalmente reage com o grupo amina do ácido fólico, formando uma ligação amida estável (GO-CO-NH-FA).¹⁷

A confirmação da funcionalização foi obtida por ATR-FTIR, conforme mostrado na Figura 9. A análise comparativa dos espectros de GO, GO-COOH e GO-FA revela modificações características ao longo das etapas de síntese.

Figura 9. Espectros de ATR-FTIR dos materiais GO, GO-COOH e GO-FA.



Fonte: O autor (2025).

No espectro do GO, observam-se bandas características de grupos oxigenados provenientes da oxidação do grafeno, como a banda larga de estiramento do grupo hidroxila $\nu(-OH)$ em 3380 cm^{-1} , o $\nu(C=O)$ de grupos carboxila em 1690 cm^{-1} , e o $\nu(C-O)$ de epóxidos e álcoois entre 1000 e 1200 cm^{-1} . Uma banda intensa próxima de 1550 cm^{-1} corresponde ao estiramento do carbono sp^2 ($C=C$), indicativo da estrutura conjugada do esqueleto do grafeno. Essa banda permanece evidente nos três materiais e é uma das mais intensas, uma vez que o grafeno continua sendo a estrutura majoritária em todos os casos.¹⁸

No GO-COOH, dever-se-ia observar um aumento relativo na intensidade da banda de $\nu(C=O)$ em 1690 cm^{-1} , reflexo do aumento na densidade de grupos carboxila após a carboxilação do GO com ácido bromoacético. Entretanto, o que se observou

foi o contrário, sendo a banda da carbonila do GO maior, assim como todas as outras bandas. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato da amostra de GO estar mais concentrada. Além disso, há uma diminuição da largura da banda de $\nu(\text{-OH})$, o que indica que parte dos grupos hidroxila foram convertidos em carboxilas. A banda de $\nu(\text{C=C})$ do esqueleto sp^2 (1550 cm^{-1}) mantém sua intensidade, sugerindo que a funcionalização ocorreu principalmente nas bordas ou nos defeitos da estrutura, sem comprometer significativamente o núcleo conjugado do grafeno.

Já no GO-FA, observam-se alterações mais significativas. A banda de estiramento C=O , inicialmente centrada em 1690 cm^{-1} , apresenta um deslocamento para regiões mais baixas e uma diminuição de intensidade em comparação aos outros materiais. Esse comportamento é compatível com a conversão parcial de grupos carboxila em ligações amida, resultado da reação com os grupos amina do ácido fólico.²³ Além disso, observa-se uma banda adicional intensa na região de 1450 cm^{-1} , típica do estiramento C-N de amidas. Esses sinais confirmam a formação de ligações covalentes entre o GO-COOH e o ácido fólico. Apesar da modificação, a banda de estiramento C=C do carbono sp^2 (1580 cm^{-1}) continua presente e intensa, indicando que a estrutura basal do grafeno foi preservada.²³ Além disso, múltiplas bandas entre $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ se tornam mais evidentes, provavelmente associadas aos modos vibracionais dos anéis heterocíclicos do ácido fólico (pteridínico e benzênico), o que contribui para um espectro vibracional mais complexo neste material final.

Ademais, no espectro de FTIR do GO-FA, observa-se uma banda adicional na região de aproximadamente 750 cm^{-1} , ausente nos espectros do GO e do GO-COOH . Essa banda pode ser atribuída à deformação fora do plano $\delta(\text{C-H})$ de anéis aromáticos, característica comum em estruturas contendo anéis benzênicos ou heterocíclicos. No contexto do presente trabalho, essa vibração está provavelmente relacionada à presença dos anéis aromáticos do ácido fólico, especialmente das unidades pteridínica e p-aminobenzóica, que fazem parte de sua estrutura molecular. A presença dessa banda, portanto, reforça a evidência da funcionalização do óxido de grafeno com ácido fólico, uma vez que representa uma assinatura espectroscópica típica de grupos aromáticos complexos introduzidos por essa molécula bioativa.²⁴

A análise elementar (CHN) foi empregada como ferramenta complementar para investigar a incorporação do ácido fólico ao óxido de grafeno. A Tabela 1 apresenta

os valores de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos para o óxido de grafeno padrão e para o óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico.

Tabela 1. Resultados da análise CHN para GO e GO-FA.

Amostra	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
GO	91,15	0,25	0,91
GO-FA	87,74	0,84	2,56

Fonte: O autor (2025).

A comparação entre os dados para as duas amostras evidencia um aumento no teor de nitrogênio na amostra funcionalizada com ácido fólico (de 0,91% para 2,56%). Esse incremento está diretamente relacionado à presença de grupos amina na estrutura do ácido fólico, que se tornam parte do material final após a reação de conjugação mediada por EDC/NHS. Como o óxido de grafeno puro possui uma quantidade muito baixa de nitrogênio, esse aumento serve como um forte indicativo da funcionalização bem-sucedida. Além disso, observa-se uma leve redução no teor de carbono, o que pode ser atribuído à diluição da fração de carbono da matriz de GO devido à adição de grupos heteroatômicos oriundos do ácido fólico.

5.3 Síntese e caracterização das nanopartículas de Pd

Esta seção apresenta a discussão dos dados de caracterização das nanopartículas de paládio suportadas em óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA), tanto para Pd(0) quanto para Pd(II).

5.3.1 Nanopartículas de Pd(0)

A Tabela 2 apresenta as concentrações de paládio determinadas por espectrometria de absorção atômica (AAS) nas amostras suportadas em GO e GO-FA. Os resultados indicam uma incorporação eficiente do metal nas duas superfícies, com leve aumento da concentração de Pd na amostra funcionalizada com ácido fólico.

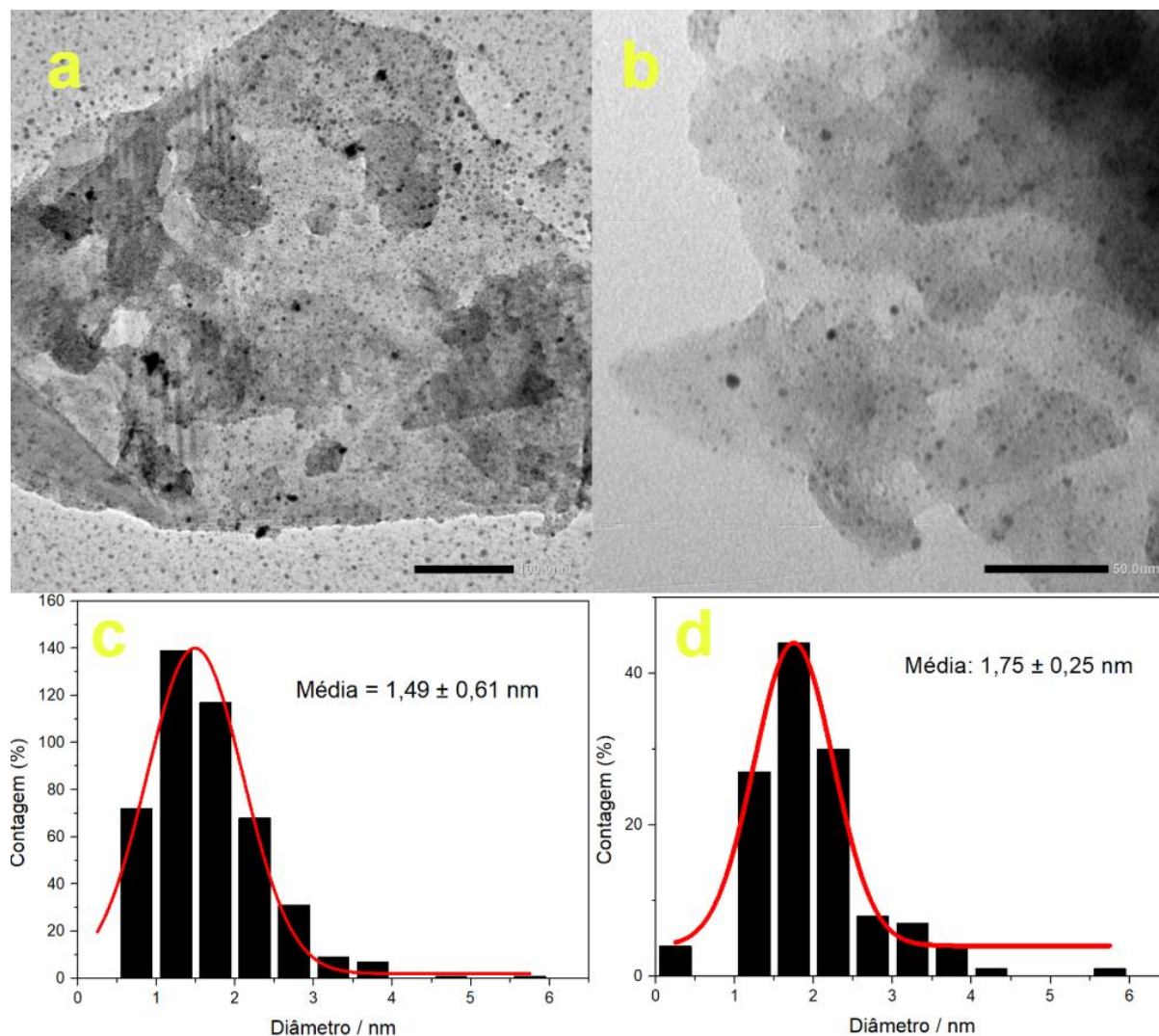
Tabela 2. Concentração percentual de Pd(0) nas nanopartículas suportadas em GO e GO-FA.

Concentração de Pd (%) em Pd(0)-P-2VP@GO	Concentração de Pd (%) em Pd(0)-P-2VP@GO-FA
6,53 ± 0,31	7,35 ± 0,45

Fonte: O autor (2025).

As imagens obtidas por TEM, apresentadas na Figura 10, evidenciam uma boa dispersão das nanopartículas sobre os dois tipos de suporte. Em Pd(0)-P-2VP@GO, as partículas aparecem bem distribuídas com diâmetro médio de $1,49 \pm 0,61$ nm, conforme mostrado no histograma de distribuição de tamanho. Já nas amostras com GO-FA, observa-se uma distribuição semelhante, mas com partículas ligeiramente maiores ($1,75 \pm 0,25$ nm), o que pode estar associado a diferenças na interação entre o suporte funcionalizado e o metal durante o processo de formação das nanopartículas. Em ambos os casos, não foram observados aglomerados significativos, indicando que o polímero P-2VP atuou de forma eficaz na estabilização das nanopartículas durante a síntese.

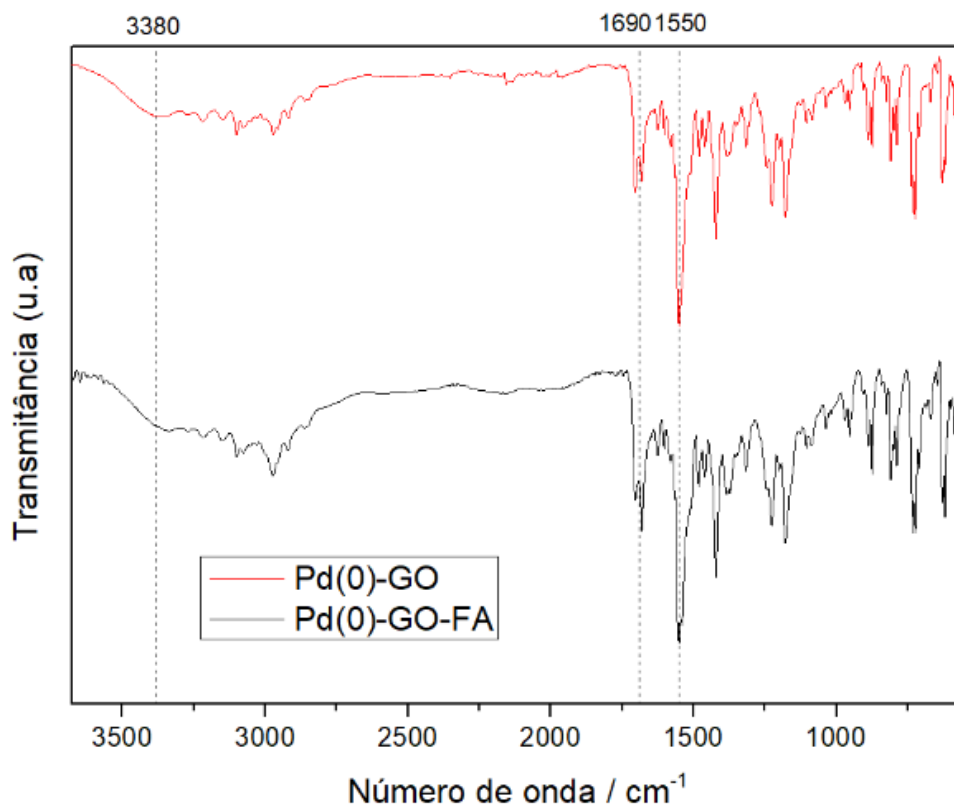
Figura 10. Micrografias (a, b) e histogramas (c, d) das nanopartículas de Pd(0) estabilizadas com P-2VP, suportadas em óxido de grafeno (GO) [(a), (c)] e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA) [(b), (d)]. As escalas das micrografias correspondem a 100 nm para (a) e 50 nm para (b).



Fonte: O autor (2025).

A Figura 11 apresenta os espectros de ATR-FTIR para as nanopartículas de Pd(0)-GO e Pd(0)-GO-FA. Ambos os espectros mantiveram as bandas características do óxido de grafeno, como a banda de estiramento O–H (3400 cm^{-1}), o estiramento C=O (1720 cm^{-1}), o estiramento de C=C do esqueleto sp^2 (1580 cm^{-1}) e bandas associadas a ligações C–O ($1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$).

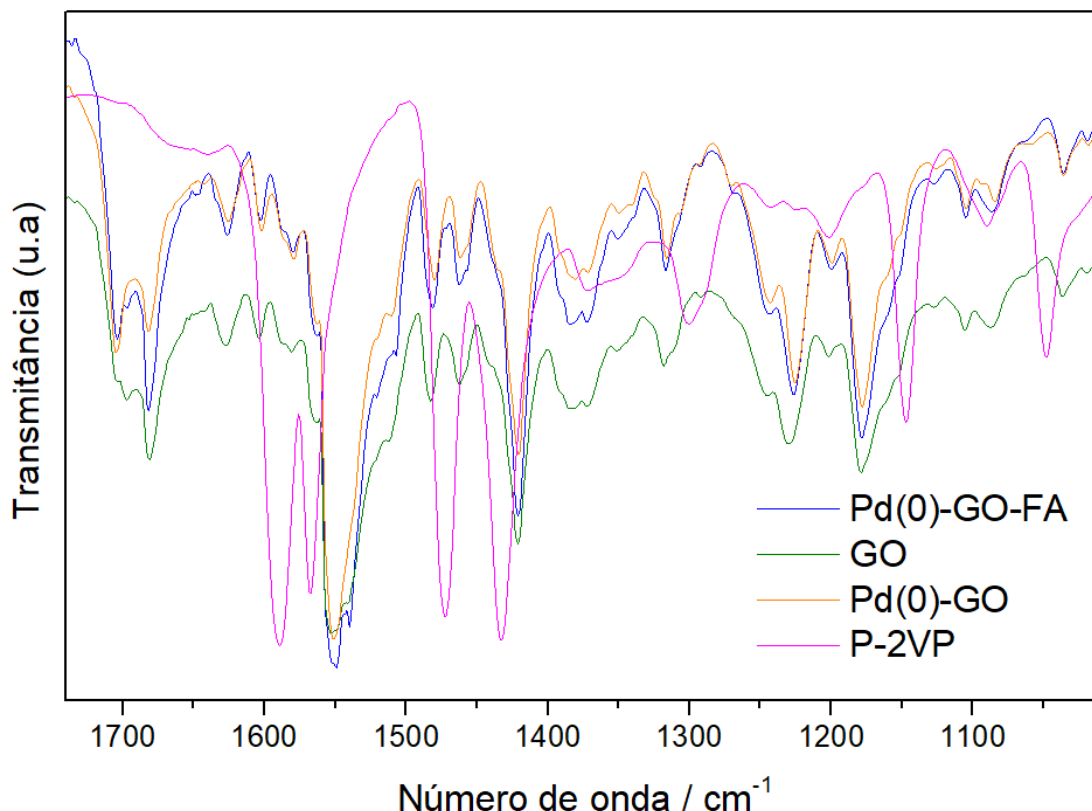
Figura 11. Espectros ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(0)-GO e Pd(0)-GO-FA.



Fonte: O autor (2025).

Para uma melhor observação das possíveis modificações promovidas pela adição do polímero P-2VP e do ácido fólico, foi realizada a comparação dos espectros de Pd(0)-GO e Pd(0)-GO-FA com os espectros de GO puro e P-2VP na região entre 1750 e 1000 cm^{-1} , apresentado na Figura 12. Essa região foi escolhida por concentrar as bandas mais relevantes associadas a grupos funcionais como carbonilas, aromáticos, ligações C-N e amidas.

Figura 12. Espectros ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(0)-GO e Pd(0)-GO-FA, P-2VP e GO na região de 1750-1000 cm^{-1} .



Fonte: O autor (2025).

Apesar da inclusão do espectro do polímero P-2VP, não foi possível identificar bandas claramente atribuíveis a ele nas amostras com Pd(0). As bandas características do P-2VP, observadas entre 1600 e 1400 cm^{-1} no espectro puro, se sobrepõem às bandas intensas e largas do GO, dificultando sua detecção. Esse efeito é esperado, considerando que o P-2VP está presente em baixa proporção e que o GO representa a maior parte da composição espectral dos materiais.

Da mesma forma, não foram observadas alterações evidentes relacionadas à presença do ácido fólico no espectro da amostra Pd(0)-GO-FA. As bandas esperadas para ligações amida, próximas de 1650–1550 cm^{-1} , podem ter sido encobertas pelas contribuições vibracionais do próprio suporte e do polímero estabilizante, ou estarem abaixo do limite de detecção do equipamento, uma vez que o folato representa uma fração mínima da massa total do material.

Embora os espectros de ATR-FTIR não tenham revelado modificações marcantes, a funcionalização com ácido fólico e a estabilização com P-2VP são

apoiadas por evidências indiretas, como a boa dispersão observada nas imagens de TEM e o incremento percentual de nitrogênio através do CHN.

5.3.2 Nanopartículas de Pd(II)

A Tabela 3 apresenta as concentrações de paládio determinadas por espectrometria de absorção atômica nas amostras suportadas em GO e GO-FA. Os valores obtidos demonstram que ambas as amostras apresentaram boa incorporação do metal, com leve redução no teor de Pd na amostra funcionalizada com ácido fólico.

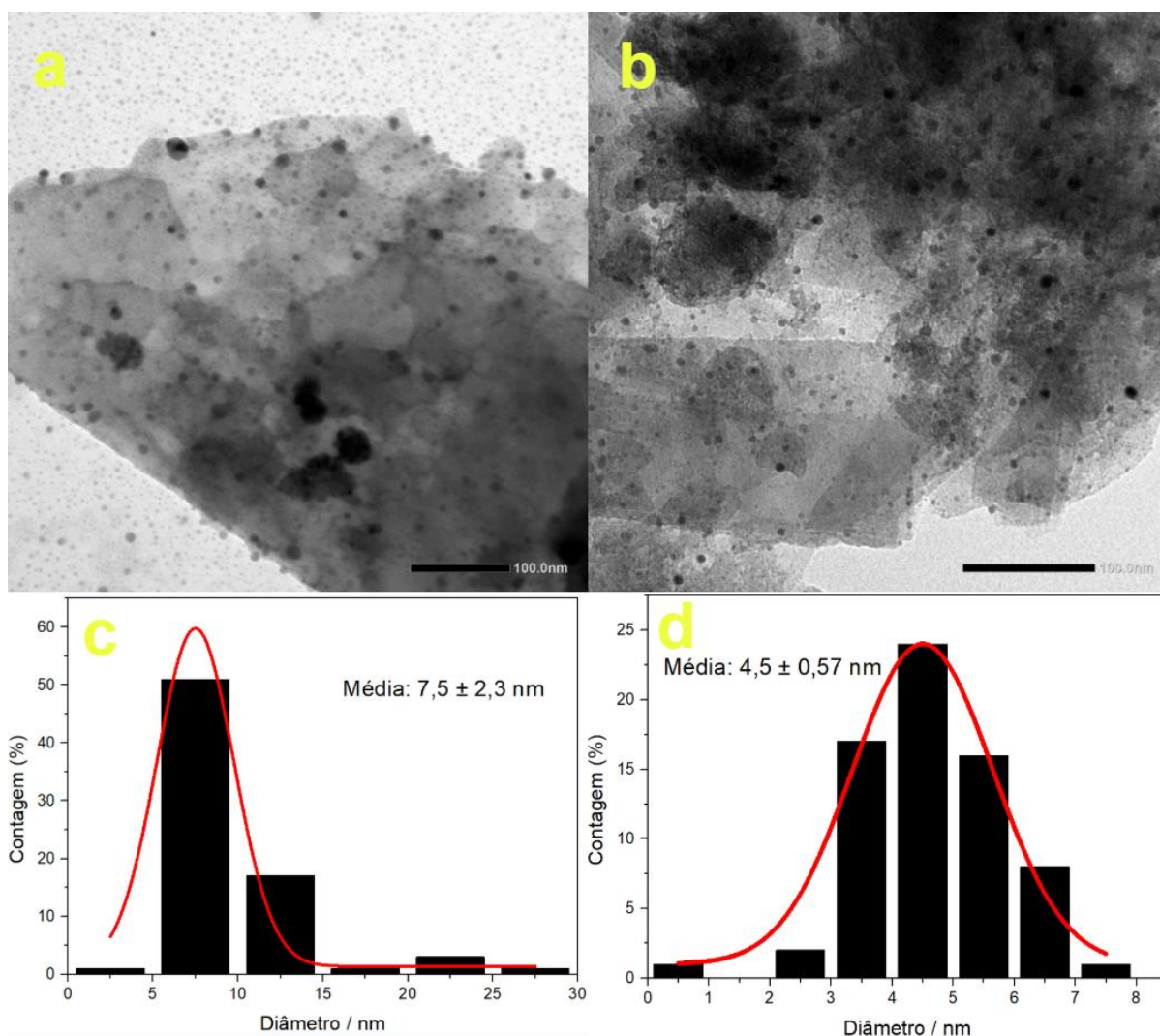
Tabela 3. Concentração percentual de Pd(II) nas nanopartículas suportadas em GO e GO-FA.

Concentração de Pd (%) em Pd(II)-P-2VP@GO	Concentração de Pd (%) em Pd(II)-P-2VP@GO-FA
6,47 ± 0,39	6,11 ± 0,22

Fonte: O autor (2025).

As imagens obtidas por TEM, apresentadas na Figura 13, mostram uma morfologia distinta entre os dois materiais. As nanopartículas de Pd(II)-P-2VP@GO apresentaram distribuição heterogênea, com presença de partículas maiores e aglomerados, e um diâmetro médio de $7,5 \pm 2,3$ nm. Por outro lado, a amostra Pd(II)-P-2VP@GO-FA exibiu partículas mais uniformes, com distribuição mais estreita e diâmetro médio de $4,5 \pm 0,6$ nm, sugerindo que a presença do ácido fólico contribuiu para um controle mais eficiente no crescimento das nanopartículas. Em ambas as amostras, a presença do polímero P-2VP parece ter auxiliado na dispersão e estabilização das partículas.

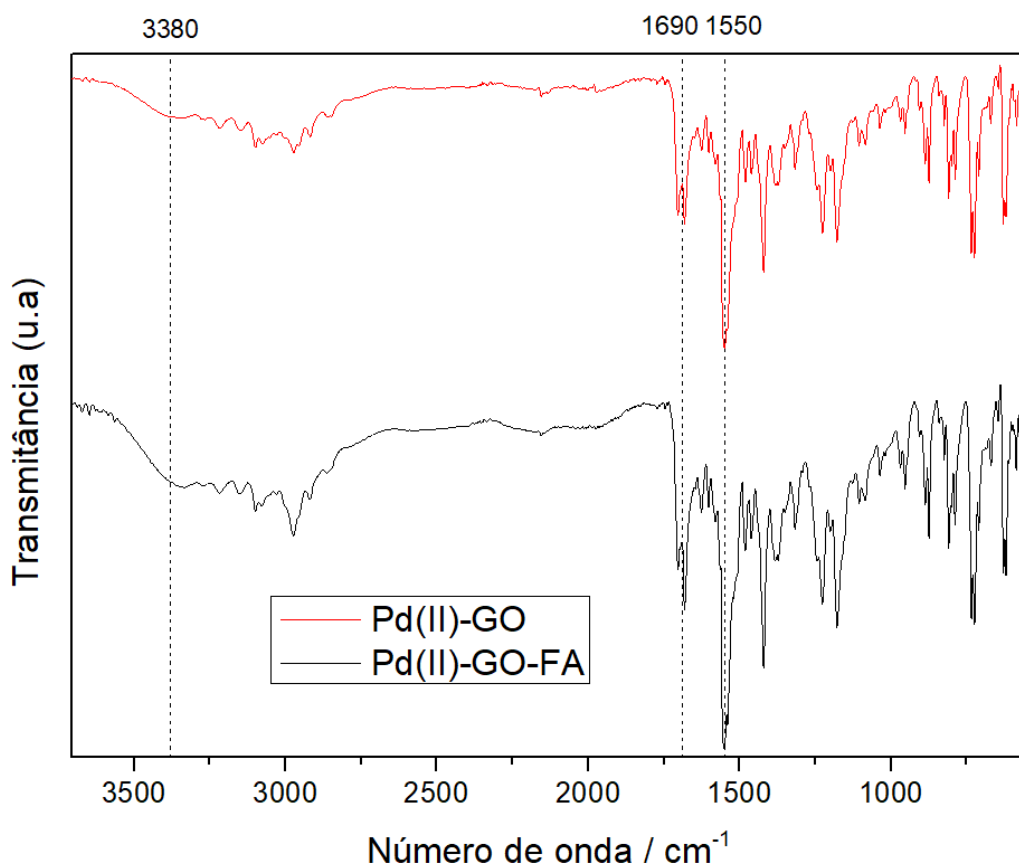
Figura 13. Micrografias (a, b) e histogramas (c, d) das nanopartículas de Pd(II) estabilizadas com P-2VP, suportadas em óxido de grafeno (GO) [(a), (c)] e óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA) [(b), (d)]. As escalas das micrografias correspondem a 100 nm para (a) e (b).



Fonte: O autor (2025).

A Figura 14 apresenta os espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(II)-GO e Pd(II)-GO-FA. Ambos os materiais preservaram as principais bandas do óxido de grafeno, incluindo a banda de estiramento O-H (3400 cm^{-1}), o estiramento C=O (1720 cm^{-1}), o estiramento C=C do esqueleto sp^2 (1580 cm^{-1}), e bandas associadas a ligações C-O ($1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$).

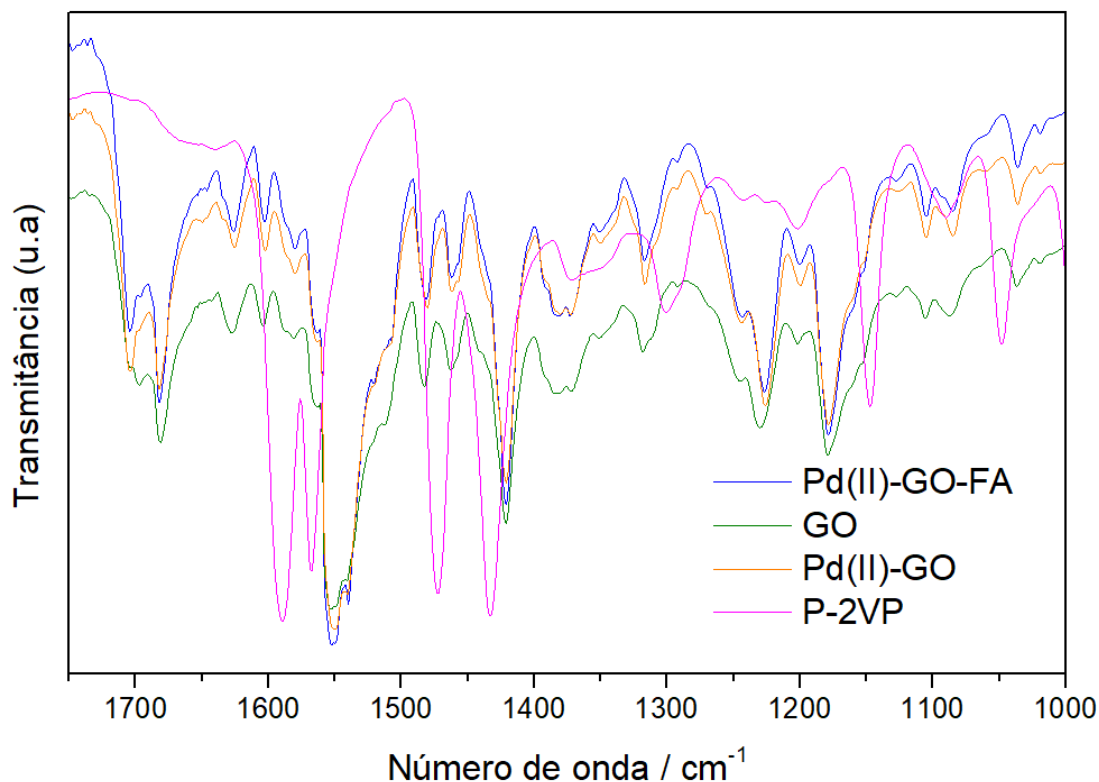
Figura 14. Espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(II)-GO e Pd(II)-GO-FA.



Fonte: O autor (2025).

Assim como feito para as nanopartículas de Pd(0), foi feita uma comparação entre os espectros de Pd(II)-GO e Pd(II)-GO-FA com os espectros do GO puro e do polímero P-2VP na região entre 1750 e 1000 cm^{-1} , onde se concentram bandas atribuídas a grupos carbonila, aromáticos, amidas e ligações C–N. Os espectros estão apresentados na Figura 15.

Figura 15. Espectros de ATR-FTIR das nanopartículas de Pd(II)-GO e Pd(II)-GO-FA, P-2VP e GO na região de 1750-1000 cm^{-1} .



Fonte: O autor (2025).

Os espectros obtidos foram similares aos das nanopartículas de Pd(0), não sendo possível identificar com clareza bandas específicas atribuídas ao P-2VP nas amostras de Pd(II). As bandas características do polímero (1600–1400 cm^{-1}) estão fortemente sobrepostas às bandas do GO, dificultando a detecção direta. Como dito anteriormente, a presença do P-2VP, no entanto, é apoiada pelas evidências morfológicas observadas nas imagens de TEM, como a boa dispersão das partículas. Da mesma forma, as bandas associadas à formação de ligações amida (esperadas entre 1650–1550 cm^{-1}) também não foram claramente observadas na amostra funcionalizada com ácido fólico. Isso pode ser explicado pela sobreposição de sinais, baixa proporção do folato no material ou sensibilidade limitada do modo ATR para esse tipo de detecção.

5.4 Cinéticas de desproteção

Nesta seção serão apresentados os estudos cinéticos de desproteção do pró-fluoróforo modelo Alle-4-MU, realizados utilizando espectrofotometria no ultravioleta (UV-vis), sob condições que mimetizam o ambiente biológico (PBS 95%/ DMSO 5%,

37 °C, pH 7,4). As reações foram conduzidas com agitação homogênea, com o auxílio de uma chapa de aquecimento sob o equipamento UV-vis, padronizando a posição da chapa e das cubetas fechadas para garantir reprodutibilidade e melhor controle cinético. A chapa foi disposta conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16. Disposição da chapa de agitação sob o equipamento de UV-vis para a realização das cinéticas.



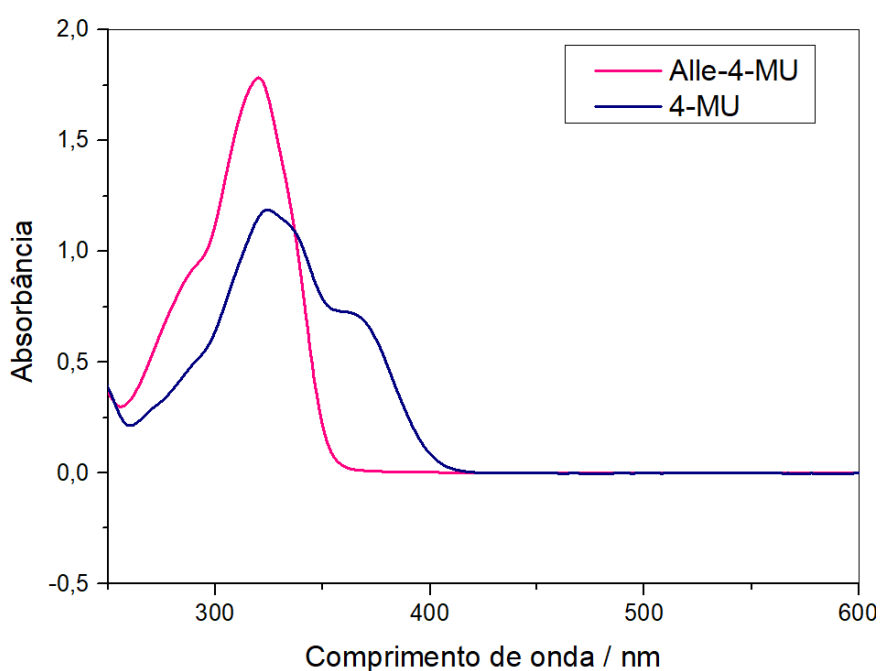
Fonte: O autor (2025).

Foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de determinar as posições mais adequadas para a realização das cinéticas de desproteção. Para isso, foram utilizadas 12 cubetas dispostas em diferentes posições no carrossel do equipamento, permitindo a comparação das condições de agitação entre os compartimentos. Durante os experimentos, observou-se uma instabilidade na linha de base das leituras espectrofotométricas. Como medida corretiva, adotou-se o procedimento de subtração da linha de base, utilizando a absorbância registrada em 500 nm como referência para correção das leituras em 364 nm.

5.4.1 Curva de calibração

Para quantificar a conversão da molécula 4-metilumbeliferona protegida (Alle-4-MU) em sua forma desprotegida (4-MU) durante os experimentos cinéticos, foi necessário estabelecer uma relação linear entre a concentração de 4-MU e sua absorbância no comprimento de onda de 364 nm. Esse comprimento foi selecionado com base na varredura espectral, apresentado na Figura 17, que mostrou uma banda característica de absorção para a 4-MU, enquanto a forma protegida (Alle-4-MU) não apresentou absorção nessa região.

Figura 17. Espectros de absorção UV-Visível de 4-MU e Alle-4-MU (Condições gerais: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS/DMSO 95:5, pH 7,4, 37°C).



Fonte: O autor (2025).

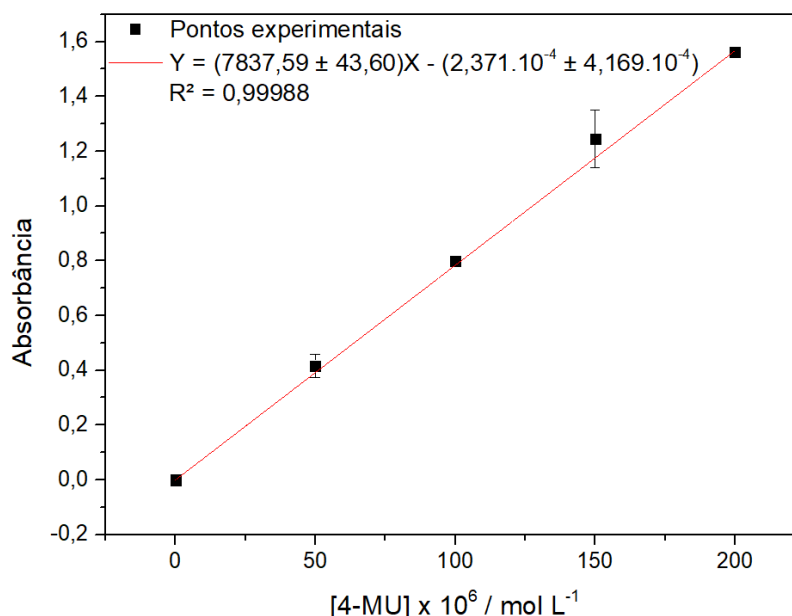
Os dados obtidos foram plotados em um gráfico de absorbância (A) versus concentração (C), conforme apresentado na Figura 16, gerando uma curva de calibração linear. A relação entre a absorbância e concentração é dada pela equação de Lambert Beer (Equação 1).

$$A = \varepsilon b C \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: A é a absorbância, ε é o coeficiente de absorvidade molar, b é o caminho ótico da cubeta (1 cm) e C é a concentração da solução.

A partir do coeficiente angular da reta, foi possível determinar o coeficiente de absortividade molar da 4-MU em 364 nm, sendo este de $7837,59 \pm 43,60 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esse valor foi posteriormente utilizado para calcular a concentração de 4-MU formada durante os experimentos cinéticos, permitindo a determinação da taxa de desproteção em função do tempo. A curva de calibração é apresentada na Figura 18.

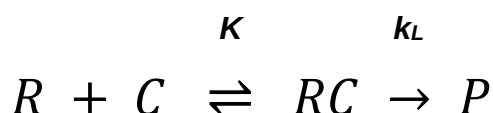
Figura 18. Curva de calibração de 4-MU em 364 nm (Condições gerais: PBS/DMSO 95:5, pH 7,4, 37°C).



Fonte: O autor (2025).

5.4.2 Cinética de desproteção por nanopartículas de Pd(0)

O processo catalítico promovido por nanopartículas metálicas, especialmente em sistemas heterogêneos, pode ser descrito pelo mecanismo simplificado abaixo:



Em que R é o substrato (Alle-4-MU), C é o catalisador, RC representa o complexo adsorvido na superfície catalítica, e P é o produto (nesse caso, a 4-MU). Esse modelo pressupõe que a adsorção do substrato na superfície da nanopartícula precede a transformação química e a liberação do produto.

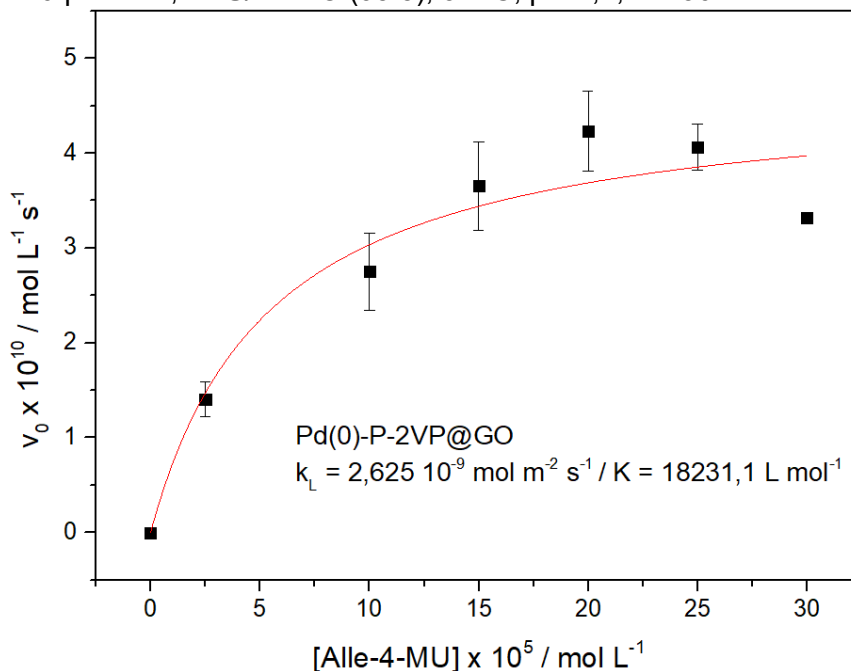
Com base nesse modelo, as curvas de saturação obtidas com as nanopartículas de Pd(0) foram ajustadas segundo a equação do modelo de Langmuir-Hinshelwood (Equação 2), com dependência da concentração do substrato:

$$v_0 = \frac{k_L \cdot S \cdot K \cdot [R]}{1 + K \cdot [R]} \quad \text{Equação (2)}$$

Nessa equação, v_0 representa a velocidade inicial da reação, $[R]$ é a concentração do substrato (Alle-4-MU), K é a constante de adsorção do substrato na superfície do catalisador, k_L é a constante de velocidade da etapa de transformação do substrato adsorvido em produto, e S é a área superficial total disponível do catalisador por unidade de volume, estimada a partir do raio médio das nanopartículas, concentração do catalisador e volume do meio reacional. O modelo descreve sistemas em que a velocidade da reação depende tanto da afinidade do substrato pela superfície catalítica quanto da eficiência da etapa química subsequente.

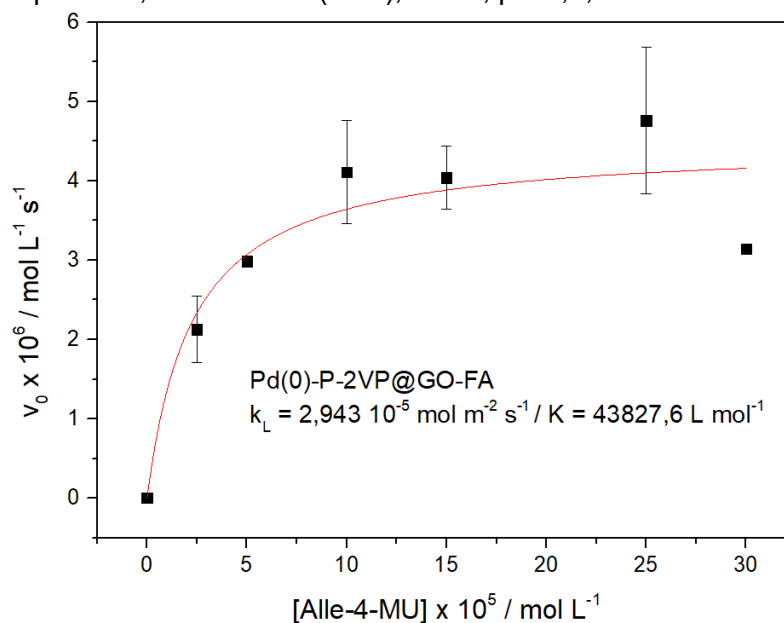
Na Figura 19, observa-se o perfil cinético da desproteção catalisada pelas nanopartículas de Pd(0) suportadas em óxido de grafeno. Já a Figura 20 mostra a mesma reação catalisada por nanopartículas de Pd(0) suportadas em GO funcionalizado com ácido fólico (GO-FA). Ambas as curvas exibem comportamento típico de saturação, coerente com o modelo de Langmuir-Hinshelwood, no qual a adsorção do substrato limita a velocidade da reação em altas concentrações.

Figura 19. Curva cinética de saturação da reação de desproteção do pró-fluoróforo Alle-4-MU catalisada por Pd(0)-P-2VP@GO. Condições gerais: [Alle-4-MU] = 25-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [catalisador] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PBS/DMSO (95:5), 37 °C, pH 7,4, λ = 364 nm.



Fonte: O autor (2025).

Figura 20. Curva cinética de saturação da reação de desproteção do pró-fluoróforo Alle-4-MU catalisada por Pd(0)-P-2VP@GO-FA. Condições gerais: [Alle-4-MU] 25-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [catalisador] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PBS/DMSO (95:5), 37 °C, pH 7,4, λ = 364 nm.



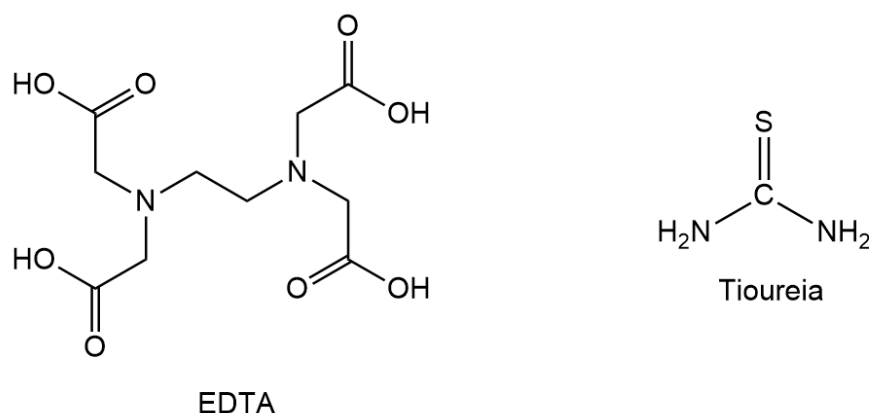
Fonte: O autor (2025).

A funcionalização com ácido fólico promoveu um aumento expressivo nos parâmetros cinéticos. Para o catalisador Pd(0)-P-2VP@GO (Figura 18), os valores ajustados foram $k_L = 2,625 \times 10^{-9} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $K = 18231,1 \text{ L mol}^{-1}$. Já para o catalisador

Pd(0)-P-2VP@GO-FA (Figura 19), os valores foram $k_L = 2,943 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $K = 43827,6 \text{ L mol}^{-1}$. Observa-se, portanto, um aumento de aproximadamente 10.000 vezes na constante de velocidade da reação (k_L) e um incremento de mais do que o dobro na constante de adsorção (K), com a introdução do ácido fólico. Tais melhorias sugerem maior afinidade do substrato com a superfície funcionalizada, possivelmente devido a interações específicas como empilhamento π - π entre os anéis aromáticos do ácido fólico e do pró-fluoróforo, além de interações eletrostáticas favorecidas pela presença de grupos ionizáveis na estrutura do folato (como carboxilatos e aminas), que podem estabelecer atração com grupos polares ou carregados do substrato em meio aquoso. Esses resultados evidenciam o potencial da funcionalização com folato para aprimorar a seletividade e a eficiência catalítica de sistemas baseados em Pd(0), especialmente em contextos biomédicos onde a ativação localizada de pró-fármacos é desejável.

Para aprofundar a compreensão sobre o estado de oxidação ativo das nanopartículas de paládio durante as reações de desproteção, foram conduzidos experimentos adicionais na presença de aditivos com afinidades específicas por diferentes espécies de paládio. Os aditivos selecionados foram o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por ser um bom agente complexante com espécies de Pd(II),²⁶ e tioureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$), tendo maior afinidade com espécies de Pd(0).²⁷

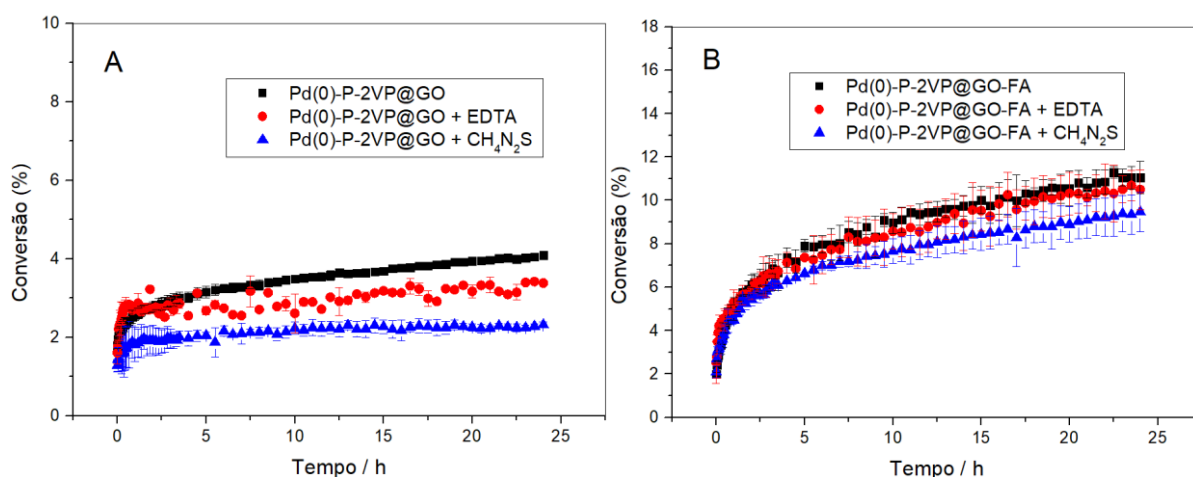
Figura 21. Representação da estrutura química do EDTA e da tioureia.



Fonte: O autor (2025).

Os perfis cinéticos obtidos para os sistemas catalíticos na presença desses aditivos estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Cinéticas do catalisador Pd(0)-P-2VP@GO (A) e Pd(0)-P-2VP@GO-FA (B) com adição de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ e EDTA. Condições gerais: $[\text{Alle-4-MU}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{aditivos}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 95% PBS/5% DMSO, 37°C , $\text{pH} = 7,4$, $\lambda = 364 \text{ nm}$.



Fonte: O autor (2025).

Na reação catalisada pelo material suportado com GO, observou-se uma redução na conversão na presença de ambos os aditivos, EDTA e tiourea. No entanto, para o EDTA, esse comportamento não deve ser interpretado como um envenenamento, visto que o erro associado a esta cinética pode estar relacionado às limitações da técnica UV-vis para esse tipo de sistema. Por outro lado, ao se analisar o comportamento do sistema funcionalizado com ácido fólico, observa-se uma resistência maior à ação dos aditivos, especialmente da tiourea, o que indica que as modificações promovidas pela funcionalização foram eficazes em evitar inativações indesejadas.

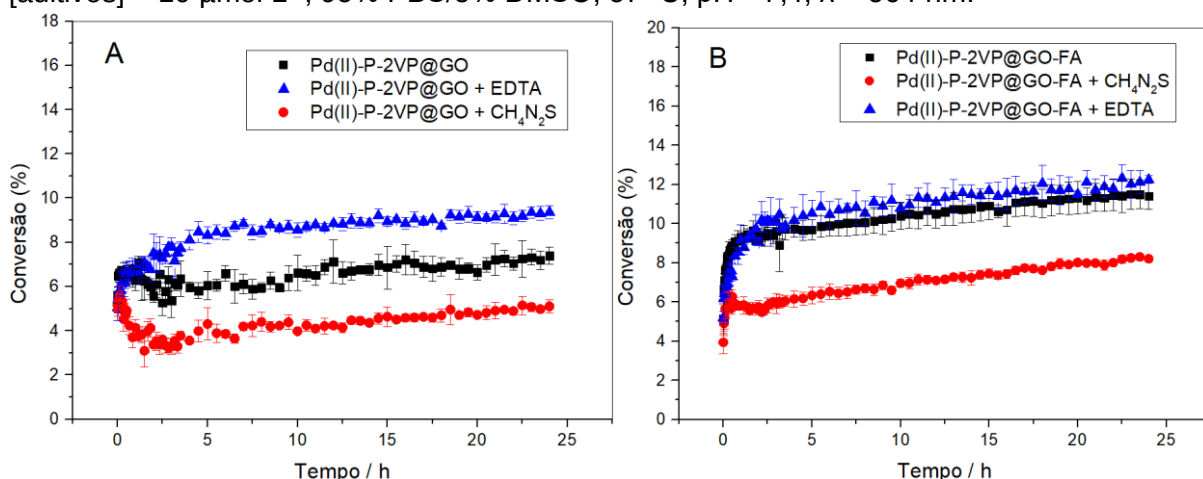
Esse desempenho reforça que o ácido fólico exerce um papel estabilizador e organizacional na superfície do catalisador, possivelmente reduzindo a acessibilidade dos complexantes aos centros ativos e promovendo uma interação mais seletiva com o substrato. Além disso, o sistema funcionalizado apresentou conversões maiores do que o sistema sem folato, mesmo na presença dos agentes complexantes, demonstrando maior eficácia catalítica.

5.4.3 Cinética de desproteção por nanopartículas de Pd(II)

Devido à alta velocidade das reações de desproteção catalisadas pelas nanopartículas de Pd(II), assim como às limitações da técnica utilizada, não foi possível obter velocidades iniciais confiáveis para a construção das curvas de saturação baseadas no modelo de Langmuir-Hinshelwood. As conversões ocorreram

de forma extremamente rápida logo nos primeiros segundos da reação, mesmo sob baixas concentrações de substrato, inviabilizando o ajuste cinético adequado. Ainda assim, para investigar o estado cataliticamente ativo e o perfil dos sistemas, foram conduzidas reações na presença dos aditivos EDTA e tioureia, cujos perfis cinéticos estão apresentados na Figura 23.

Figura 23. Cinéticas do catalisador Pd(II)-P-2VP@GO (A) e Pd(II)-P-2VP@GO-FA (B) com adição de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ e EDTA. Condições gerais: $[\text{Alle-4-MU}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{aditivos}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 95% PBS/5% DMSO, 37 °C, pH = 7,4, $\lambda = 364 \text{ nm}$.



Fonte: O autor (2025).

Para o sistema suportado com óxido de grafeno, observou-se um leve aumento na conversão na presença do EDTA. No entanto, esse incremento não deve ser interpretado como um ganho real de desempenho catalítico, mas sim como uma possível variação experimental, dentro da margem de erro do equipamento utilizado, que, como dito anteriormente, não é o mais adequado para reações rápidas e heterogêneas. Na prática, observou-se uma ligeira desaceleração da conversão em presença do EDTA, o que pode ser indicativo da complexação de espécies lixiviadas de Pd(II) que estariam atuando em solução, comprometendo sua disponibilidade no sistema heterogêneo. A adição de tioureia, por sua vez, causou uma redução mais pronunciada na conversão, embora sem inibir completamente a reação.

No sistema funcionalizado com ácido fólico, observou-se que o EDTA não comprometeu a conversão, demonstrando que o material apresenta maior estabilidade e uma possível menor propensão à lixiviação de espécies de Pd(II) para o meio reacional. Essa resistência à ação do EDTA reforça a eficácia da modificação com ácido fólico, indicando que o metal permanece mais firmemente ancorado ao suporte funcionalizado.

A tioureia, embora tenha causado alguma inibição, também não foi capaz de eliminar completamente a atividade catalítica, indicando que os sítios ativos protegidos pela funcionalização continuam operantes. De modo geral, o sistema funcionalizado com ácido fólico apresentou as maiores conversões em todas as condições testadas, demonstrando que a funcionalização com ácido fólico aumentou significativamente a eficácia e a robustez catalítica do sistema, tornando-o promissor para aplicações em ambientes mais complexos.

6. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a avaliação de sistemas catalíticos baseados em nanopartículas de paládio suportadas em óxido de grafeno (GO) e em óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (GO-FA), visando aplicações em reações bio-ortogonais, com potencial para ativação localizada de pró-fármacos em ambiente biológico. A síntese do GO-FA foi confirmada através das técnicas de CHN e ATR-FTIR. As nanopartículas foram obtidas com sucesso nos estados de oxidação Pd(0) e Pd(II), apresentando tamanhos nanométricos bem distribuídos e boa dispersão nos suportes, conforme evidenciado por TEM.

As reações de desproteção do pró-fluoróforo modelo aleno-4-metilumbeliferona demonstraram que os sistemas catalíticos são ativos em meio biológico simulado. As curvas cinéticas das nanopartículas de Pd(0) mostraram comportamento compatível com o modelo de Langmuir-Hinshelwood, e os parâmetros obtidos indicaram melhora expressiva na constante de velocidade e na constante de adsorção quando o suporte foi funcionalizado com ácido fólico, com um aumento de aproximadamente quatro ordens de grandeza na constante de velocidade (k_L) e o dobro do valor na constante de adsorção (K) em comparação ao sistema não funcionalizado. Esses resultados sugerem maior afinidade do substrato pelo catalisador funcionalizado, possivelmente devido a interações específicas promovidas pelo folato.

Nos sistemas com GO-FA, a funcionalização com ácido fólico se mostrou eficaz ao conferir maior estabilidade catalítica frente aos aditivos, além de manter conversões superiores em comparação aos sistemas sem funcionalização. Para os catalisadores de Pd(II), embora não tenha sido possível aplicar o modelo cinético de Langmuir-Hinshelwood, os resultados demonstraram atividade catalítica, sendo novamente observada maior eficácia e resistência à inativação nos sistemas funcionalizados com ácido fólico.

Dessa forma, os resultados obtidos confirmam que a funcionalização do suporte com ácido fólico não apenas permite o direcionamento seletivo, como também contribui significativamente para a estabilidade e o desempenho catalítico do sistema. Tais características tornam os nanocatalisadores desenvolvidos promissores para

aplicações futuras em estratégias terapêuticas de alta seletividade, como a ativação localizada de pró-fármacos em células tumorais por reações bio-ortogonais.

Contudo, uma etapa futura importante para a otimização da eficiência catalítica será a investigação das causas da baixa conversão observada, o que poderá envolver tanto a modificação do estabilizante das nanopartículas quanto ajustes na estrutura e funcionalização do suporte. Também será fundamental empregar técnicas analíticas mais sensíveis e apropriadas para os estudos cinéticos realizados, como a espectroscopia de fluorescência utilizando fluorímetro, a fim de obter resultados mais precisos e confiáveis.

7. Referências

- ¹PRESCHER, Jennifer A.; DUBE, Danielle H.; BERTOZZI, Carolyn R. "Chemical Remodelling of Cell Surfaces in Living Animals". **Nature** 430, nº 7002 (agosto de 2004): 873–77. <https://doi.org/10.1038/nature02791>.
- ²SAXON, Eliana; BERTOZZI, Carolyn R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. **Science**, [S. l.], v. 287, n. 5460, p. 2007-2010, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
- ³LATOCESKI, Eloah; DAL FORNO, Gean M.; FERREIRA, Thuany M.; OLIVEIRA, Bruno L.; BERNARDES, Gonalo J. L.; DOMINGOS, Josiel B. "Mechanistic Insights into Transition Metal-Mediated Bioorthogonal Uncaging Reactions". **Chemical Society Reviews** 49, nº 21 (2020): 7710–29. <https://doi.org/10.1039/D0CS00630K>.
- ⁴LI, Jianming; CHEN, Peng R. "Development and Application of Bond Cleavage Reactions in Bioorthogonal Chemistry." **Nature Chemical Biology** 12, no. 3 (2016): 129–137. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2024>.
- ⁵ALCAIDE, Benito; ALMENDROS, Pedro. Progress in Allene Chemistry. *Chemical Society Reviews*, v. 43, p. 2886–2887, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4CS90020K>.
- ⁶DAL FORNO, Gean M.; LATOCESKI, Eloah; NAVO, Claudio D.; ALBUQUERQUE, Brunno L.; ST JOHN, Albert L.; AVENIER, Frédéric; JIMÉNEZ-OSÉS, Gonzalo; DOMINGOS, Josiel B. "Interplay of Chloride Levels and Palladium(II)-Catalyzed O-Deallenylation Bioorthogonal Uncaging Reactions." **Chemical Science** 15 (2024): 4458. <https://doi.org/10.1039/D3SC06408E>.
- ⁷FERREIRA, Thuany M., Navo, Claudio D., Agnes, Jonathan P., Cardozo, Filipe, Oliveira, Daniela C., Zannotto-Filho, Alfeu, Jiménez-Osés, Gonzalo & Domingos, Josiel B. (2024). Mechanistic Insights into Chloride-Dependent Uncaging Reaction of Propargyl and Allene-Protected Substrates by Pd-Complexes. **Chemistry – A European Journal**, 31(8), e202403987. <https://doi.org/10.1002/chem.202403987>.
- ⁸JOHNSON, B. F. G. Nanoparticles in Catalysis. **Topics in Catalysis**, v. 24, n. 1-4, p. 147–159, 2003. <https://doi.org/10.1023/B:TOCA.0000003086.83434.b6>.

⁹CAROLIN, Femina C.; KAMALESH, T. Advances in stabilization of metallic nanoparticles with biosurfactants — a review on current trends. **Heliyon**, v. 10, 2024, e29773.

¹⁰BIAJOLI, André F. P.; SCHWALM, Cristiane S.; LIMBERGER, Jones; CLAUDINO, Thiago S.; MONTEIRO, Adriano L. Recent progress in the use of Pd-catalyzed C-C cross-coupling reactions in the synthesis of pharmaceutical compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 2186-2214, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140255>.

¹¹MARTÍNEZ-CALVO, Miguel; COUCEIRO, José R.; DESTITO, Paolo; RODRÍGUEZ, Jéssica; MOSQUERA, Jesús; MASCAREÑAS, José L. "Intracellular Deprotection Reactions Mediated by Palladium Complexes Equipped with Designed Phosphine Ligands". **ACS Catalysis** 8, n o 7 (6 de julho de 2018): 6055–61. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.8b01606>.

¹²COELHO, Sara; SCHNEIDER, Felipe Silveira de Souza; DE OLIVEIRA, Daniela C.; TRIPODI, Guilherme; EBERLIN, Marcos Nogueira; CARAMORI, Giovanni F.; DE SOUZA, Bernardo; DOMINGOS, Josiel B. On the mechanism of palladium(II)-mediated uncaging reactions of propargylic substrates. **ACS Catalysis**, 2019. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00210>.

¹³LIU, Yongchun; LI, Jingchao; CHEN, Mei; *et al.* Palladium-based nanomaterials for cancer imaging and therapy. **Theranostics**, v. 10, n. 22, p. 10057–10074, 2020. [DOI: 10.7150/thno.45990](https://doi.org/10.7150/thno.45990).

¹⁴DREYER, D. R. et al. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 228-240, 2010. <https://doi.org/10.1039/B917103G>.

¹⁵SAHOO, N. G.; KARKI, N.; TIWARI, H.; TEWARI, C.; RANA, A.; PANDEY, N.; BASAK, S. Functionalized Graphene Oxide as a Vehicle for Targeted Drug Delivery and Bioimaging Applications. **Journal of Materials Chemistry B**, 2020. <https://doi.org/10.1039/d0tb01149e>.

¹⁶SEABRA, A. B.; PAULA, A. J.; LIMA, R.; ALVES, O. L.; DURÁN, N. Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide. **Chemistry Research and Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 159-168, 2014. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx400385x>.

- ¹⁷EBRAHIMNEJAD, Pedram; TALEGHANI, Arezoo Sodagar; ASARE-ADDO, Kofi; NOKHODCHI, Ali. An updated review of folate-functionalized nanocarriers: A promising ligand in cancer. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 2, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.11.011>.
- ¹⁸QIN, X.C.; GUO, Z.Y.; LIU, Z.M.; ZHANG, W.; WAN, M.M.; YANG, B.W. Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemo-photothermal therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 156-162, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.12.005>.
- ¹⁹GASPAR, Vítor M.; COSTA, Elisabete C.; QUEIROZ, João A.; PICHON, Chantal; SOUSA, Fani; CORREIA, Ilídio J. Folate-targeted multifunctional amino acid-chitosan nanoparticles for improved cancer therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 2, p. 562-577, 2015. DOI: [10.1007/s11095-014-1486-0](https://doi.org/10.1007/s11095-014-1486-0).
- ²⁰ZHAO, X.; LIU, P. Biocompatible graphene oxide as a folate receptor-targeting drug delivery system for the controlled release of anti-cancer drugs. **RSC Advances**, v. 4, p. 24232–24239, 2014. DOI: [10.1039/C4RA02466D](https://doi.org/10.1039/C4RA02466D).
- ²¹FERNÁNDEZ, Aránzazu; PÉREZ, Eva M.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, Ramón. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. **Chemical Science**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 790–810, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7SC04004K>.
- ²²MA, Fuqiu et al. Preparation of carboxylated graphene oxide for enhanced adsorption of U(VI). **Journal of Solid State Chemistry**, [S. l.], v. 277, p. 9-16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2019.05.042>.
- ²³DE SOUSA, T. F. et al. Folic acid-functionalized graphene oxide nanocarrier: synthetic approaches, characterization, drug encapsulation and cytotoxicity. **Journal of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 20, n. 9, p. 1–19, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4354-2>.
- ²⁴SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BYRNE, D. A. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 8. ed. **Hoboken: Wiley**, 2014.
- ²⁵KRAGTEN, J. The Stability Constant of Pd-EDTA. **Talanta**, 25 (4), 239–240, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(78\)80015-0](https://doi.org/10.1016/0039-9140(78)80015-0).

²⁶DAROS, J. T. et al. Catalysis-Based Fluorometric Method for Semiquantifying Trace Palladium in Sulfur-Containing Compounds and Ibuprofen. **The Journal of Organic Chemistry**, 89, 8005–8010, 2024. [DOI: 10.1021/acs.joc.4c00651](https://doi.org/10.1021/acs.joc.4c00651).