



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

Kevin Loreira Rech

Análise Cinética da Reação de Clivagem da O-Propargilcumarina por um Complexo de Paládio em Condições Biológicas: Desenvolvimento de Novas Reações Bio-ortogonais para Imageamento Celular.

Florianópolis
Julho/2022

Kevin Loreira Rech

Análise Cinética da Reação de Clivagem da O-Propargilcumarina por um Complexo de Paládio em Condições Biológicas: Desenvolvimento de Novas Reações Bio-ortogonais para Imageamento Celular.

Trabalho 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: Ms. Thuany Mayara Ferreira

Florianópolis

Julho/2022

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

Rech, Kevin Loreira
Análise Cinética da Reação de Clivagem da O-Propargilcumarina por um Complexo de Paládio em Condições Biológicas : Desenvolvimento de Novas Reações Bio-ortogonais para Imageamento Celular. / Kevin Loreira Rech ; orientador, Josiel Barbosa Domingos, coorientadora, Thuany Mayara Ferreira, 2022.
61 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Estudo cinético. 3. Complexos de Paládio. 4. Clivagem Bio-ortogonal. I. Domingos, Josiel Barbosa. II. Ferreira, Thuany Mayara. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química. IV. Título.

Kevin Loreira Rech

Análise Cinética da Reação de Clivagem da O-Propargilcumarina por um Complexo de Paládio em Condições Biológicas: Desenvolvimento de Novas Reações Bio-ortogonais para Imageamento Celular.

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

Florianópolis, 25 de julho de 2022.

Prof^a. Dra. Danielle Marranquiel Henriques
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

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

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

Prof. Dr. Bruno Silveira de Souza
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e motivando.

Aos meus amigos, por todos os bons momentos.

À minha coorientadora Thuany Mayara Ferreira, pela paciência, por me acompanhar nesta jornada e por todo o conhecimento compartilhado comigo.

Ao professor Dr. Josiel Barbosa Domingos, por todo o aprendizado e apoio.

Ao departamento de química e seu corpo docente, por terem contribuído para minha formação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

Reações de dissociação bio-ortogonais mediadas por metais de transição são de elevada importância na ativação de compostos abióticos e biomoléculas dentro de sistemas vivos, embora ainda existam desafios com relação à biocompatibilidade destes metais. O atual trabalho tem por objetivo estudar as propriedades catalíticas de um complexo de paládio em reações de dissociação, utilizando-se um substrato pró-fluoróforo a base de cumarina protegida com o grupo propargil, sob condições biologicamente compatíveis. As cinéticas das reações foram acompanhadas pela técnica de espectroscopia no UV-vis. Observou-se que a concentração de íons cloretos, presente no ambiente celular, afeta a velocidade da reação e que o complexo de paládio é desativado após um ciclo reacional. Em condições equimolares de reagentes e de baixa concentração de cloreto, simulando o meio intracelular, foi possível obter conversões de até 100%. Embora apresente boa biocompatibilidade, os dados indicam que este complexo de Pd não se adequa às condições de bio-ortogonais para a reação de clivagem do grupo propargil.

Palavras-chave: Reações de clivagem. Paládio. Catálise. Bio-ortogonal.

ABSTRACT

Bio-orthogonal dissociation reactions mediated by transition metals are of high importance in the activation of abiotic compounds and biomolecules within living systems, although there are still challenges regarding the biocompatibility of these metals. The current work aims to study the catalytic properties of a palladium complex in dissociation reactions, using a profluorophore substrate based on coumarin protected with the propargyl group, under biologically compatible conditions. The reaction kinetics were followed using the UV-visible spectroscopy technique. It was observed that the concentration of chloride ions, present in the cellular environment, affects the reaction rate and the palladium complex suffer inhibition after one reaction cycle. In equimolar reagents conditions and at low chloride concentration, simulating the intracellular environment, it was possible to obtain conversions of up to 100%. Although it presents good biocompatibility, the data indicate that this Pd complex is not suitable for the conditions of bio-orthogonal cleavage reaction of the propargyl group.

Keywords: Cleavage reactions. Palladium. Catalysis. Bioorthogonal.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio e seus mecanismos.....	17
Esquema 2. Reação de clivagem de ligação tripla catalisada por paládio.....	18
Esquema 3. Ciclo catalítico geral para a reação de Tsuji-Trost.....	18
Esquema 4. Esquema geral para uma reação de marcação bio-ortogonal.	20
Esquema 5. Primeiras reações utilizadas no contexto da química bio-ortogonal.....	20
Esquema 6. Reação de dissociação bio-ortogonal catalisada por metais para a liberação de fármacos.....	21
Esquema 7. Representação de reações que envolvem catálise bio-ortogonal mediada por metais para reações de (a) dissociação e (b) associação.	22
Esquema 8. Representação da reação de catálise bio-ortogonal no estudo de proteínas membranares.	23
Esquema 9. Exemplos de reações de clivagem promovidas por metais de transição.	24
Esquema 10. Mecanismos propostos para as reações de desalilação e despropargilação, em água, mediadas por (a) Pd(0) e (b) Pd(II).....	26
Esquema 11. Representação das reações de despropargilação em condições biologicamente compatíveis, com diferentes complexos de paládio.....	27
Esquema 12. Representação da reação de desproteção e co-localização do complexo Pd ₉ em células HeLa.....	28
Esquema 13. Síntese da Prop-Cumarina.....	32
Esquema 14. Síntese do complexo PdAllylCl(PPh ₂ (4-AC-Ph)).....	33
Esquema 15. Representação do deslocamento do equilíbrio químico em um meio com alta concentração de íons cloreto.....	46
Esquema 16. Provável reação que ilustra a inibição do catalisador.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento no número de publicações e patentes sobre reações de acoplamento cruzado catalisadas por metais.....	16
Figura 2. Espectro de NMR de ^1H para a prop-cumarina em CDCl_3 (200 MHz).....	37
Figura 3. Espectros de infravermelho para (a) cumarina desprotegida, (b) propargil-cumarina e (c) comparação entre ambas.	38
Figura 4. Complexo $\text{PdAllylCl}(\text{PPh}_2(4\text{-AC-Ph}))$ sintetizado.	39
Figura 5. Espectros de (a) ^1H e (b) ^{13}C do complexo $\text{PdAllylCl}(\text{PPh}_2(4\text{-AC-Ph}))$ em CDCl_3 (200 MHz).....	40
Figura 6. Espectros de Uv-vis das cumarinas protegida e desprotegida em (a) tampão fosfato e (b) tampão PBS. Condições: 100 μM das cumarinas, pH 7,4, 5% DMSO e 37 $^\circ\text{C}$	41
Figura 7. Espectro de UV-vis reportado na literatura para a prop-cumarina.	42
Figura 8. Análise espectral de microplacas de diferentes composições.	43
Figura 9. Espectros de UV-vis para diferentes concentrações de O-cumarina em (a) tampão fosfato e (b) tampão PBS. Curvas de calibração para 364 nm em (c) tampão fosfato e (d) tampão PBS. Condições: pH 7,4, 5% de DMSO a 37 $^\circ\text{C}$	43
Figura 10. Perfis cinéticos para a conversão da prop-Cumarina. Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina, 1,0, 0,7, 0,5 e 0,15 equiv. de catalisador, em tampão PBS, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 $^\circ\text{C}$	45
Figura 11. Gráfico de $\log(V_0)$ vs. $\text{Log}([\text{Cat}])$ para a reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão PBS.	47
Figura 12. Determinação de k_2 em tampão PBS.	48
Figura 13. Perfis cinéticos para a reação de despropargilação da prop-cumarina. Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina, 1,0, 0,7, 0,5 e 0,15 equiv de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 $^\circ\text{C}$	49
Figura 14. Gráfico de $\log(V_0)$ vs. $\text{Log}([\text{Cat}])$ para a reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão fosfato.....	50
Figura 15. Determinação de k_2 em tampão fosfato.	51
Figura 16. Gráfico de $\log(V_0)$ vs. $\log([\text{prop-cumarina}])$ para a reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão fosfato.....	53

Figura 17. Envenenamento com CS ₂ . Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina e de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO a 37 °C.	54
Figura 18. Envenenamento com EDTA para (a) PdAllylCl(PPh ₂ (4-AC-Ph)) e (b) Na ₂ PdCl ₄ . Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina e de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 °C.....	55
Figura 19. Efeito do ascorbato de sódio para (a) PdAllylCl(PPh ₂ (4-AC-Ph)) e (b) Na ₂ PdCl ₄ . Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina e de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 °C.....	56
Figura 20. Dependência de <i>k</i> ₂ com a temperatura.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos das curvas das cinéticas da reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão PBS.	46
Tabela 2. Dados obtidos das curvas da cinética reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão fosfato.	51
Tabela 3. Valores de V_0 obtidos das cinéticas de despropargilação com a variação da concentração de substrato.	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

k_2 – Constante de velocidade de segunda ordem

NMR – Ressonância magnética nuclear

PBS – *Phosphate buffer saline*

$\text{Pd}_2\text{Allyl}_2\text{Cl}_2$ – Dímero de cloreto de alil paládio (II)

$\text{PdAllylCl}(\text{PPh}_2(4\text{-AC-Ph}))$ – Complexo contendo ligantes fosfina, alil e cloro

ppm – Parte por milhão

Prop- Grupo propargil

R_f – Fator de retenção

THF – Tetrahydrofurano

TOF – *Turnover frequency*

TON – *Turnover number*

UV-vis- Espectroscopia no ultravioleta-visível

V₀ – Velocidade inicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	A QUÍMICA DO PALÁDIO	16
2.2	QUÍMICA BIO-ORTOGONAL	19
2.2.1	Catálise bio-ortogonal mediada por metais de transição.....	21
2.2.2	Reações de dissociação bio-ortogonais mediadas por paládio	24
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
4.1	SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E DESCARTE DE RESÍDUOS	30
4.2	MATERIAIS.....	30
4.3	MÉTODOS	31
4.3.1	Ressonância magnética nuclear	31
4.3.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	31
4.3.3	Espectroscopia no UV-Vis.....	31
4.4	PREPARAÇÃO DOS TAMPÕES	31
4.5	SÍNTESE DO PRÓ-FLUORÓFORO.....	32
4.6	SÍNTESE DO COMPLEXO DE PALÁDIO	33
4.7	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA O-CUMARINA	34
4.8	CINÉTICA DE DESPROPARGILAÇÃO COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CATALISADOR.....	34
4.9	CINÉTICA DE DESPROPARGILAÇÃO COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO	34
4.10	EXPERIMENTOS DE ENVENENAMENTO E REDUÇÃO DO PALÁDIO	35

4.11	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE ARRHENIUS	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	SÍNTESE DA PROPARGIL-CUMARINA	36
5.2	SÍNTESE DO COMPLEXO DE PALÁDIO	38
5.3	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ABSORÇÃO DA O-CUMARINA	41
5.4	CINÉTICAS COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CATALISADOR	44
5.4.1	Tampão PBS (15 mM NaCl).....	44
5.4.2	Tampão Fosfato (140 mM NaCl)	49
5.5	CINÉTICA COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO..	52
5.6	EXPERIMENTOS DE ENVENENAMENTO E REDUÇÃO DO PALÁDIO	53
5.7	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ARRHENIUS	56
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A dificuldade de monitoramento da dinâmica de biomoléculas e da entrega mais eficiente de compostos abióticos em sistemas vivos, incentivou o desenvolvimento de uma nova gama de técnicas, hoje pertencentes à uma subárea da biologia química, a química bio-ortogonal. Atualmente, as principais aplicações da química bio-ortogonal concentram-se na ativação *in vivo* de pró-fármacos, pró-fluoróforos e biomoléculas protegidas. A liberação da forma ativa destas moléculas, no local de interesse e sob demanda, se dá através de reações de clivagem com o uso de um gatilho, por exemplo, pH, enzimas ou metais de transição.

Pró-fluoróforos são usados para imageamento celular, e dentre os mais utilizados encontram-se as *N*- e *O*-cumarinas protegidas no átomo de N ou O, respectivamente. Através da estratégia de desproteção (reação de dissociação/clivagem) destes substratos por metais de transição, *in vivo*, torna-se possível observar o local no ambiente celular onde acontece a liberação destas sondas fluorescentes, ou seja, onde está ocorrendo a reação, permitindo compreender a dinâmica do substrato no meio celular e, conseqüentemente, sua aplicação na marcação celular. Devido a suas propriedades ópticas, as cumarinas também são ótimos modelos de substrato para o estudo preliminar de reações de dissociação bio-ortogonal, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A reação de clivagem promovidas por metais de transição tem se mostrado uma estratégia muito eficiente na ativação de substratos abióticos e biomoléculas no ambiente biológico, porém ainda com desafios em relação à biocompatibilidade e solubilidade dos seus componentes, que proceda de forma rápida e quimioespecífica e sem afetar os processos bioquímicos ou induzir efeitos citotóxicos.

Neste contexto, este trabalho busca compreender uma nova reação bio-ortogonal na ativação de pró-fluoróforos, a reação de desproteção do substrato *O*-propargilcumarina, promovida pelo complexo de paládio PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)), em um meio reacional que busca reproduzir as condições biológicas intra e extracelular.

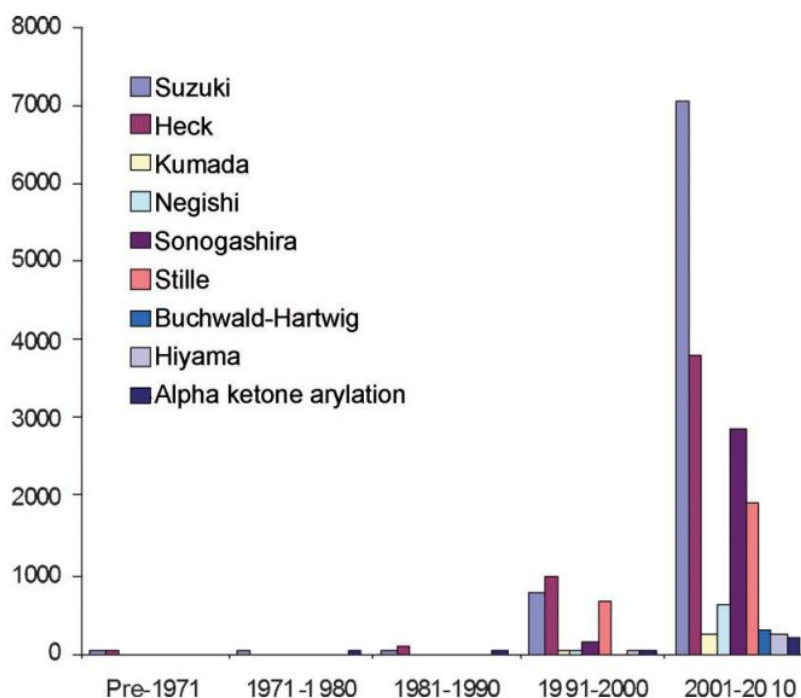
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A QUÍMICA DO PALÁDIO

O Nobel em química de 2010 representou um grande marco para a química sintética, neste evento os cientistas Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi e Akira Suzuki foram laureados com o prêmio pelas suas contribuições revolucionárias no campo de reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio, mudando completamente a forma com a qual moléculas são idealizadas e construídas e fornecendo métodos para a formação de ligações do tipo C-C que até o momento eram impossíveis.¹

Tal descoberta inspirou o desenvolvimento de uma ampla gama de reações de acoplamento cruzado como acoplamento carbono-heteroátomo, α -arilação e acoplamento cruzado descarboxilativo. A importância destas reações é tanta que até nos dias de hoje muitos pesquisadores dedicam esforços para estender, aplicar e descobrir novas variantes delas, a um ritmo cada vez mais acelerado conforme ilustrado na Figura 1.²

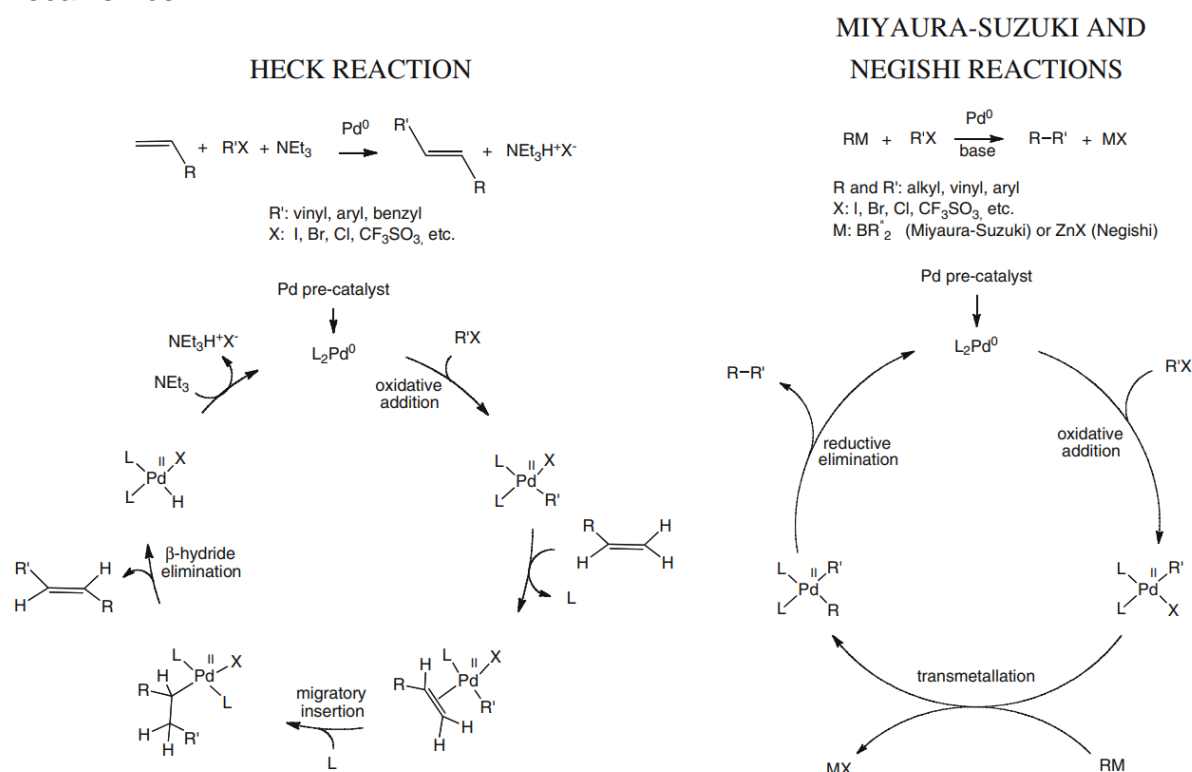
Figura 1. Crescimento no número de publicações e patentes sobre reações de acoplamento cruzado catalisadas por metais.



Fonte: JOHANSSON SEECHURN, C. C. C. et al.² (2012)

Os mecanismos aceitos para estas reações de acoplamento cruzado estão descritos no Esquema 1 e envolvem em ambos os casos uma etapa de adição oxidativa, após isto os mecanismos diferem entre si. A primeira etapa da reação de Heck envolve a inserção de uma olefina na espécie Pd-R seguida de uma β -eliminação do fragmento R' olefinado. Para a reação de Miyaura-Suzuki ocorre um processo de transmetalção de um fragmento R a partir de um composto organometálico MR para o centro de paládio, seguida de um processo de redução eliminativa para produzir o produto de acoplamento cruzado R-R'. Em todos os casos o Pd⁰ é regenerado permitindo um próximo ciclo catalítico.³

Esquema 1. Reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio e seus mecanismos.

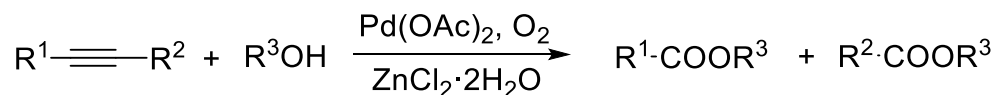


Fonte: ASTRUC, D.³ (2011)

O paládio também possui propriedades catalíticas em reações de dissociação ou clivagem de ligações do tipo carbono-carbono, embora sejam pouco conhecidas. Azhong Wang e Huanfeng Jiang demonstraram que ligações triplas

internas podem ser clivadas na presença de paládio para levar à formação de um éster, conforme o Esquema 2.⁴

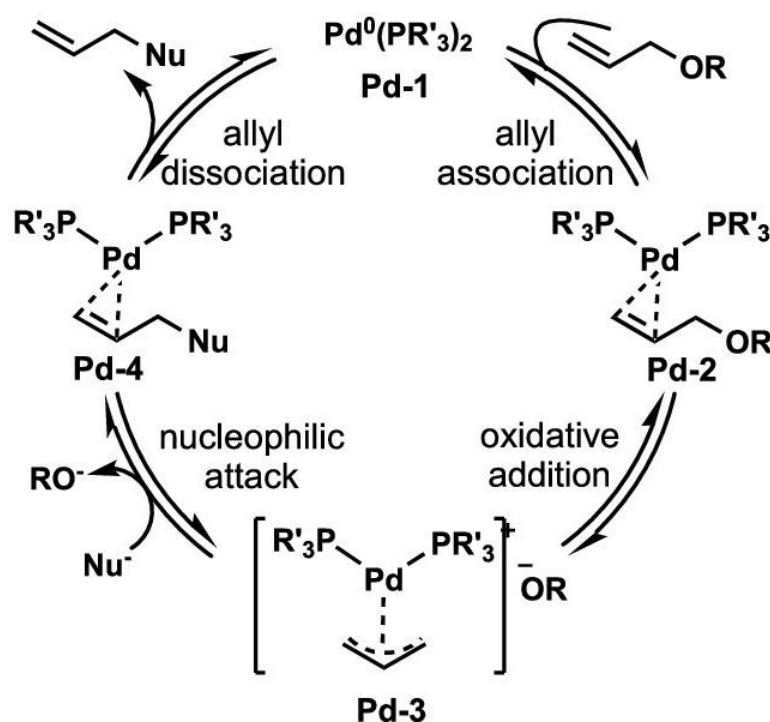
Esquema 2. Reação de clivagem de ligação tripla catalisada por paládio.



Fonte: WANG, A.; JIANG, H.⁴ (2008)

Clivagem de ligações do tipo carbono-heteroátomo também já foram reportadas. A reação de Tsuji-Trost é um exemplo clássico onde uma reação de substituição entre um nucleófilo e um substrato contendo um grupo de saída em uma posição alílica, é catalisada por paládio, conforme ilustrado no Esquema 3.⁵

Esquema 3. Ciclo catalítico geral para a reação de Tsuji-Trost.



Fonte: POHORILETS, I. et al.⁵ (2019)

A compatibilidade destas reações com meios aquosos possibilitou levar a química de organometálicos do frasco reacional para sistemas vivos, expandindo o estudo da dinâmica celular e aplicações biomédicas, pela formação ou liberação de espécies de interesse *in vivo*.⁶

Toda esta versatilidade do paládio deve-se as suas propriedades de estrutura eletrônica, que assim como os outros elementos da família do níquel, apresentam geometria preferencialmente quadrado planar, onde o eixo z encontra-se completamente desimpedido estericamente, um LUMO (dx^2-y^2) susceptível a entrada de elétrons e um HOMO (dxy) susceptível a doação de elétrons, podendo doar e receber densidade eletrônica, o que justifica a sua alta afinidade por grupos ricos em elétrons. Além disso, a sua solubilidade e estado de oxidação podem ser facilmente regulados apenas com a troca de ligantes.

2.2 QUÍMICA BIO-ORTOGONAL

A química bio-ortogonal teve seu começo no início dos anos 2000 com os trabalhos de Carolyn R. Bertozzi, devido a necessidade de se preencher uma lacuna existente dentro da área da bioquímica. Até o momento, encontravam-se grandes dificuldades no monitoramento da dinâmica espaço-temporal de biomoléculas alvo, como glicanos, lipídios e metabólitos, em células ou organismos modelo.⁷

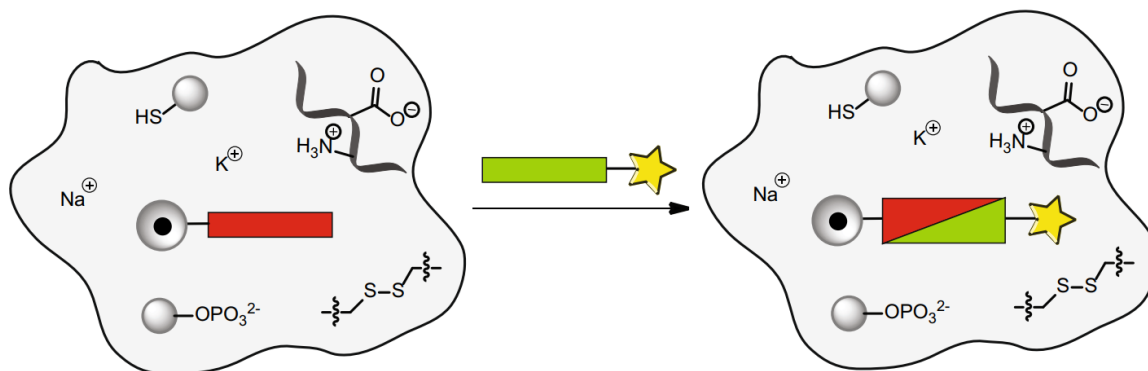
O termo química bio-ortogonal refere-se a gama de reações que podem acontecer em ambientes biológicos complexos de forma específicas, ou seja, não deve haver interferência nos processos bioquímicos, seus componentes devem ser pequenos, para que a perturbação na biomolécula a ser alterada seja mínima e reagirem de forma rápida, mesmo na presença do grande número de funcionalidades necessárias para sustentar a vida.⁸

As primeiras aplicações envolveram a rotulagem de proteínas com a adição de grupos marcadores fluorescentes, que permitiam as suas visualizações em tempo real em organismos vivos. A reação dividia-se em duas etapas, a primeira etapa envolve a modificação estrutural da proteína pela adição de um grupo funcional, que não afete a bioatividade natural da proteína e, em uma segunda etapa, a reação bio-ortogonal entre a proteína modificada e uma molécula contendo um marcador.

O Esquema 4 ilustra a reação de marcação, onde: o contorno sem uma forma geométrica definida representa a delimitação do ambiente intracelular; Na^+ e K^+ representam os cátions no interior da célula; o círculo com $-SH$, o círculo com $-OPO_3^{2-}$, uma ponte $S-S$ e a fita com $-NH^{3+}$ e $-COO^-$ representam grupos orgânicos presentes no ambiente celular; o retângulo vermelho representa o grupo funcional

adicionado na proteína (Representada pelo círculo branco com o círculo preto dentro) e o retângulo verde com um estrela amarela representa a molécula contendo um marcador.⁹

Esquema 4. Esquema geral para uma reação de marcação bio-ortogonal.

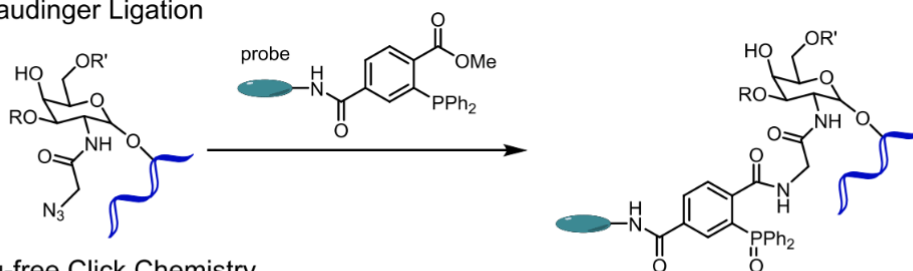


Fonte: CARELL, T.; VRABEL, M.¹⁰ (2016)

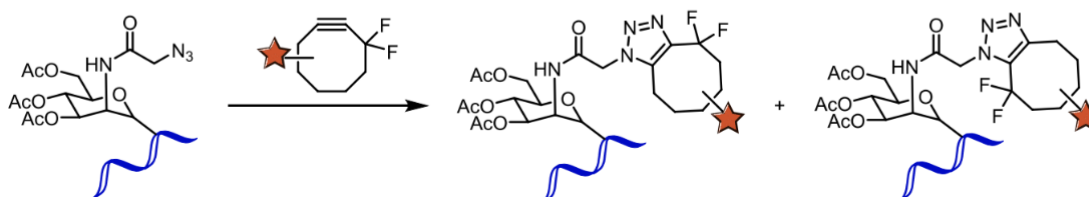
As principais metodologias para marcação de proteínas envolvem a reação de Staudinger, a qual produz grupos amidas a partir da reação entre grupos fosfina e azida, e as reações de cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e ciclo-octinos, conforme ilustrado no Esquema 5.

Esquema 5. Primeiras reações utilizadas no contexto da química bio-ortogonal.

1) Staudinger Ligation



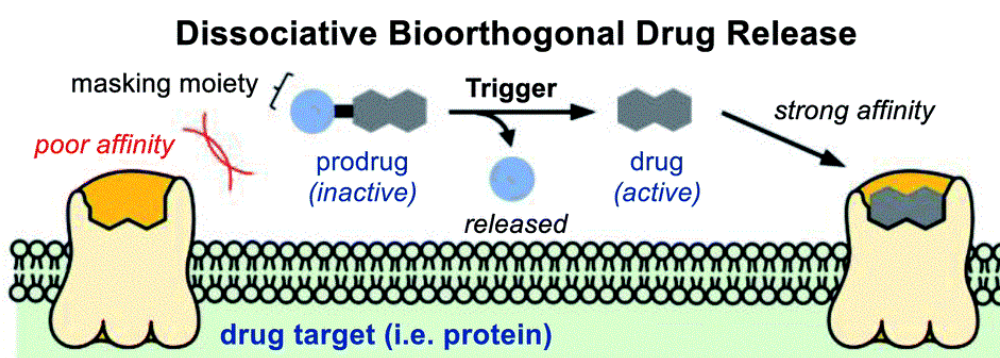
2) Cu-free Click Chemistry



Fonte: LOZHKIN, B.; WARD, T. R.¹¹ (2021)

Embora seja mais recente, as reações de clivagem de ligações são as que concentram maiores interesses dentro da química bio-ortogonal, principalmente após ter sido demonstrado a capacidade de metais de transição em catalisarem estas reações em meios biológicos. Este interesse surge principalmente na ativação de pró-fármacos, cuja clivagem do grupo protetor por um catalisador pode liberar o fármaco na sua forma ativa diretamente no seu alvo, conforme ilustrado no Esquema 6.¹²

Esquema 6. Reação de dissociação bio-ortogonal catalisada por metais para a liberação de fármacos.



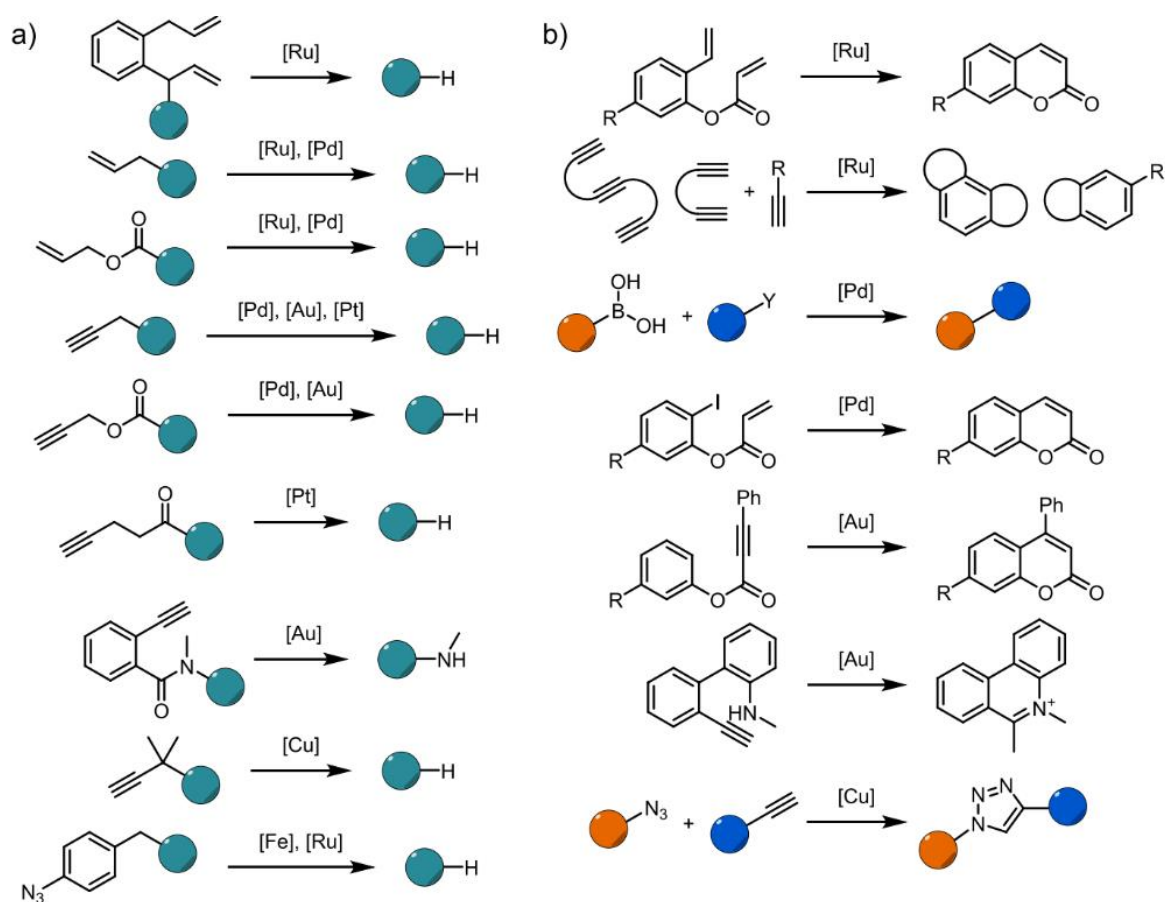
Fonte: CHEN, Z. et al.¹² (2020)

2.2.1 Catálise bio-ortogonal mediada por metais de transição

Metais de transição têm-se apresentado uma forma versátil de se realizar reações químicas *in vivo*, através da catálise da reação de clivagem de ligações. No entanto, a implementação eficaz da catálise bio-ortogonal permanece desafiadora, principalmente devido à biocompatibilidade dos metais, por procedimentos complicados para a administração dos catalisadores ou por possuírem baixa taxa de *turnover*. Esses complexos possuem várias aplicações em ambiente celular, tanto para a produção, quanto para a liberação de fluoróforos, fármacos e biomoléculas.^{11,13}

O Esquema 7 apresenta as principais reações bio-ortogonais mediadas por metais de transição, para a obtenção de produtos de desproteção e síntese de substratos.

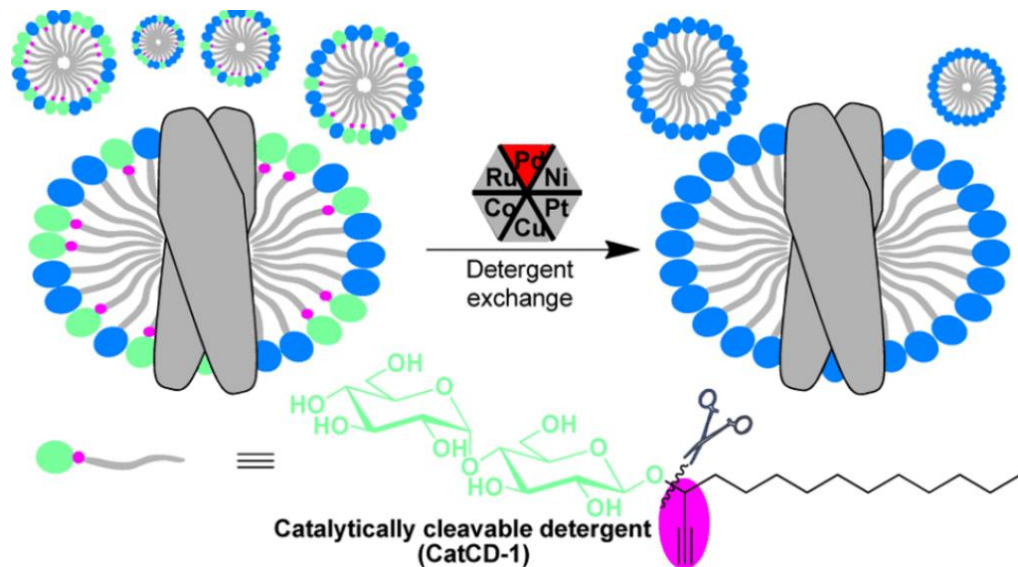
Esquema 7. Representação de reações que envolvem catálise bio-ortogonal mediada por metais para reações de (a) dissociação e (b) associação.



Fonte: LOZHKIN, B.; WARD, T. R.¹¹ (2021)

A catálise bio-ortogonal não se restringe apenas às reações de produção ou liberação de fármacos ou fluoróforos. Lu Liu (2021) e colaboradores reportaram o emprego da catálise bio-ortogonal para a otimização dos processos de troca de surfactante durante o estudo de proteínas membranares. O grupo protetor quando clivado, acarreta na quebra da estrutura com a separação das partes hidrofóbica e hidrofílica, levando à eliminação gradual destas estruturas da micela, conforme ilustrado no Esquema 8.¹⁴

Esquema 8. Representação da reação de catálise bio-ortogonal no estudo de proteínas membranares.



Fonte: LIU, L. et al.¹⁴ (2021)

Diferentes propriedades dos metais de transição, como número de elétrons na camada de valência e estado de oxidação, influenciam diretamente na força de ligação entre metal e ligantes nos catalisadores metálicos, conseqüentemente, afetando a interação com o substrato, os mecanismos de reação e suas atividades catalíticas. Portanto, o desenvolvimento de novos catalisadores metálicos bio-ortogonais devem levar em consideração todos esses fatores.¹⁵

Estudar catálise metálica em sistemas vivos é significativamente mais desafiador do que em solução. Ambientes vivos são heterogêneos, conseqüentemente o comportamento dos catalisadores nas células pode variar dependendo de diversos de fatores: como o pH local, a presença de nucleófilos ou ainda em decorrência da viscosidade do meio. Assim, quaisquer propriedades catalíticas avaliadas em frascos reacionais podem não ser necessariamente as mesmas no interior de células vivas.¹⁶

Embora diversos trabalhos vêm mostrando o potencial da química organometálica mediando reações bio-ortogonais de desproteção em sistemas biológicos, diversos desafios ainda são encontrados. Destacam-se, por exemplo: problemas de solubilidade, as moléculas protegidas precisam ser solúveis em meio aquoso, os catalisadores precisam ser solúveis em água e dependendo da aplicação, permeáveis à membrana celular, os catalisadores precisam ser estáveis

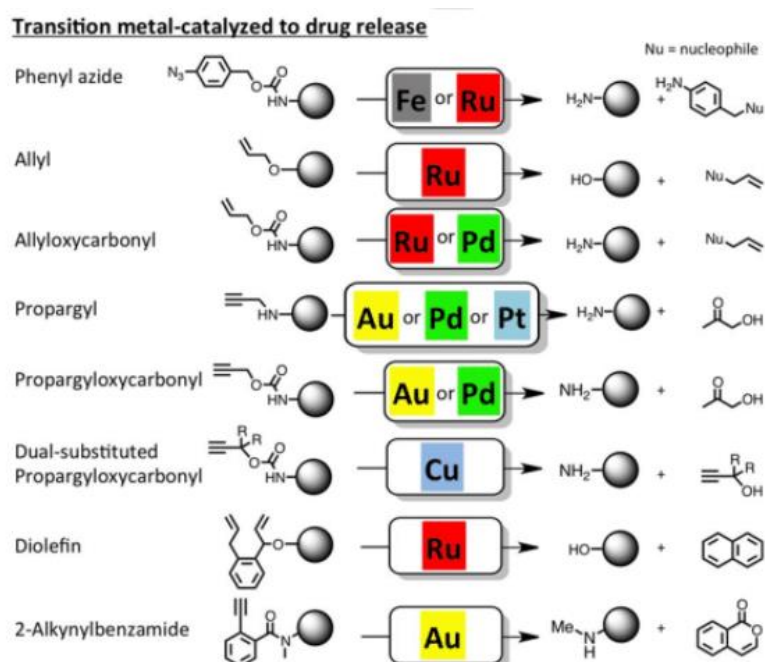
em meio biológico, a reação precisa ser rápida e o fato de que, atualmente, altas doses de metal são exigidas, devido à baixa taxa de *turnover*, o que limita a aplicação em certas condições.¹⁷

2.2.2 Reações de dissociação bio-ortogonais mediadas por paládio

Dentre os metais de transição utilizados nas reações de catálise bio-ortogonal, o paládio é um dos metais mais amplamente empregado. Particularmente devido a sua versatilidade, promovendo reações dissociativas e associativas, e alta atividade catalítica.

As reações de dissociação envolvem a clivagem de grupos ricos em elétrons, como aminas, éteres e carbamatos propargílicos ou alílicos. A bio-ortogonalidade do grupo carbamato propargílico ainda é um ponto de discussão, uma vez que estes podem ser clivados *in vivo* por enzimas digestivas. O Esquema 9 apresenta alguns exemplos de reações de clivagem (dissociação) promovidas por metais de transição..^{18,19}

Esquema 9. Exemplos de reações de clivagem promovidas por metais de transição.



Fonte: CHANG, T.-C. et al.²⁰ (2021)

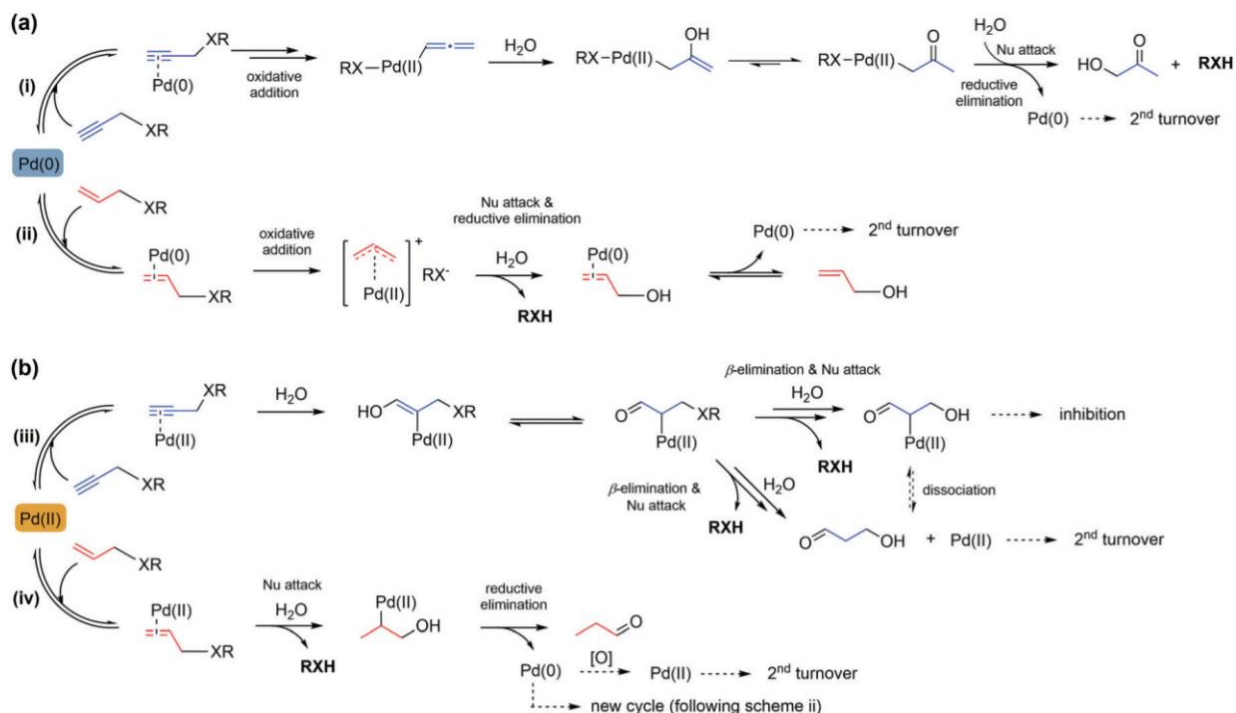
Como supracitado, o paládio é capaz de realizar essas reações que envolvem a clivagem da ligação C-O, C-N com os grupos protetores que possuem triplas e duplas ligações, como por exemplo, os grupos propargil e alil. Isto pode ser explicado devido à alta afinidade do paládio por estes grupos funcionais ricos em elétrons.

As reações de desalilação e despropargilação podem ser classificadas mecanisticamente, de acordo com o caminho que seguem após a associação do substrato com o catalisador, podendo ser um caminho por adição oxidativa com Pd(0) e o outro com uma etapa de hidratação com Pd(II).

A coordenação do substrato com o metal na primeira etapa está diretamente associada à natureza estrutural do catalisador (ligante mais metal) e desempenha um papel importante na modulação do grau de associação/dissociação de substratos, produtos e interferentes, influenciando o rendimento e a bio-ortogonalidade da reação. Além disso, os ligantes podem modular a solubilidade, a absorção celular e o direcionamento dos catalisadores metálicos.

Para os mecanismos de despropargilação e desalilação com Pd(0), ambos envolvem uma adição oxidativa seguida de um ataque nucleofílico por uma água e posterior reação de eliminação redutiva, para liberar o produto e regenerar o catalisador metálico. Por outro lado, as reações promovidas por Pd(II) envolvem, após a etapa de complexação, uma reação de ataque nucleofílico pela água para liberação do produto na reação de desalilação, ou um ataque da água seguido de uma β -eliminação para formação do produto, no caso da reação de despropargilação. Durante a despropargilação, a desativação do catalisador pode ser causada pela inibição devido à produção do 3-hidroxiopropanal, um subproduto de suposta elevada afinidade com o metal, conforme mostrado no Esquema 10.

Esquema 10. Mecanismos propostos para as reações de desalilação e despropargilação, em água, mediadas por (a) Pd(0) e (b) Pd(II).

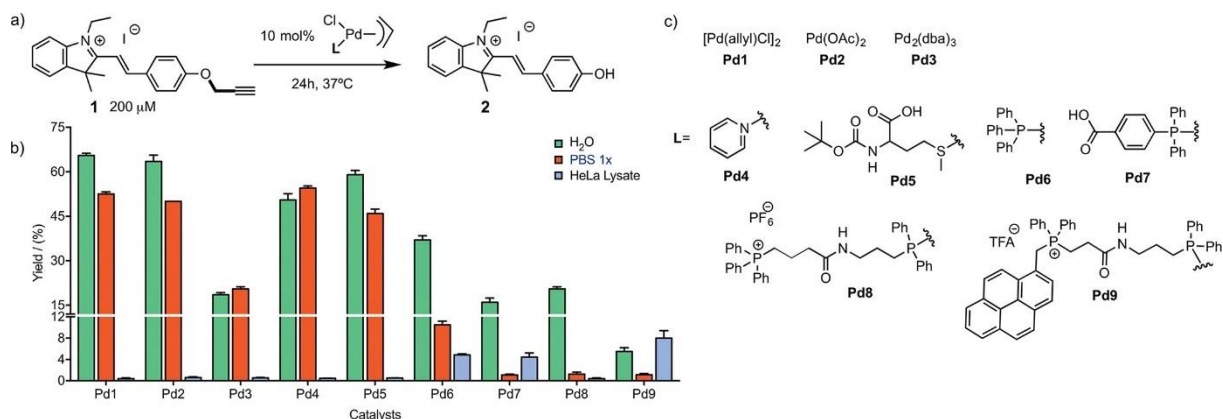


Fonte: LATOCHESKI, E. et al.¹⁵ (2020)

O esforço no desenvolvimento mais eficazes para essas reações tem aumentado nos últimos anos. Miguel Martínez-Calvo e colaboradores, por exemplo, demonstraram que a manipulação dos ligantes pode modular propriedades como solubilidade, estabilidade, reatividade e, eventualmente, favorecer o transporte celular e o direcionamento intracelular.¹⁷

Neste estudo, eles utilizaram uma sonda fluorescente para realizar o monitoramento da reação e observam que o emprego de ligantes fosfinas permite uma boa promoção das reações de clivagem em meio celulares, de grupos propargil e alil-carbamato. O Esquema 11 apresenta o estudo da atividade catalítica de complexos de paládio com os diferentes ligantes testados.

Esquema 11. Representação das reações de despropargilação em condições biologicamente compatíveis, com diferentes complexos de paládio.

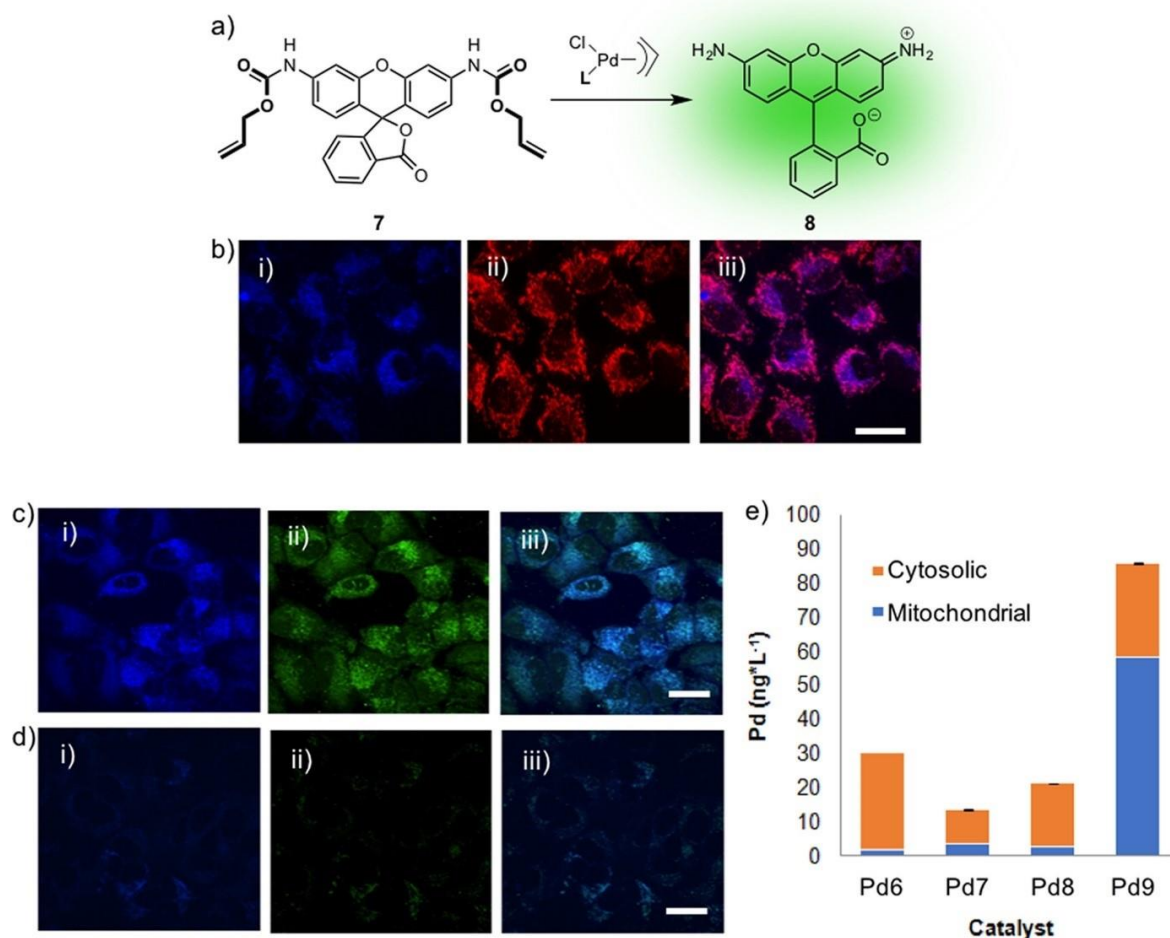


Fonte: MARTÍNEZ-CALVO, M. et al.¹⁷ (2018)

Observou-se que os complexos Pd6, Pd7 e Pd9 foram capazes de promover a reação de despropargilação em lisados de células HeLa. Embora os rendimentos tenham sido baixos, seu desempenho é melhor que o das outras fontes de paládio (Pd1–Pd5). Embora um ligante de fosfina não seja o melhor do ponto de vista da reatividade, os complexos de paládio correspondentes são mais estáveis e podem resistir melhor a meios hostis inerentes ao sistema celular.¹⁷

Neste mesmo artigo, os autores realizaram, através de co-localização de imagens de microscopia de fluorescência, em células Hela, o monitoramento do complexo PdL9 e do fluoróforo derivado da rodamina. (Esquema 12). Através da técnica de espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), conseguiram determinar a quantidade de paládio presente no citosol e na mitocôndria, mostrando que as modificações com ligantes fosfinas ajudaram no direcionamento do complexo, quando comparado aos ligantes sem fosfinas.

Esquema 12. Representação da reação de desproteção e co-localização do complexo Pd9 em células HeLa.



Fonte: MARTÍNEZ-CALVO, M. et al.¹⁷ (2018)

Sendo assim, nota-se que ainda há uma grande necessidade de racionalizar a estrutura de novos catalisadores de paládio, e o entendimento daqueles já existentes, para tais reações de dissociação bio-ortogonais. Uma estratégia normalmente negligenciada, como o estudo do efeito da mudança estrutural do catalisador nas interações catalisador-substrato e catalisador-produto, além de como essas interações podem afetar o mecanismo e a velocidade da reação, apresentam uma lacuna científica para a compreensão e melhoria das propriedades físico-químicas destes catalisadores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo realizar o estudo cinético para determinar-se a viabilidade de aplicação de um catalisador de paládio contendo um ligando fosfina em reações de dissociação bio-ortogonais, ou seja, em meios reacionais que buscam mimetizar as condições biológicas de temperatura, pH e concentração de cloreto, utilizando-se a *O*-propargil-4-metilumbeliferona como substrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese do substrato *O*-propargil-4-metilumbeliferona;
- Síntese do complexo de paládio com o ligante fosfina e alil;
- Caracterização do substrato e do catalisador por técnicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear;
- Construir a curva de calibração em tampão fosfato e PBS;
- Realizar a cinética de despropargilação com variação da concentração de catalisador;
- Realizar a cinética de despropargilação com a variação de concentração do substrato;
- Determinar as conversões, constantes de velocidade, velocidade inicial, ordem de reação, TON e TOF₉₀;
- Realizar testes de envenenamento do catalisador;
- Determinar energia de ativação e fator pré-exponencial

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E DESCARTE DE RESÍDUOS

Todas as reações, procedimentos e descarte de resíduos químicos realizadas no Laboratório de Catálise Biomimética estavam de acordo com as normas estabelecidas pelo manual de regras básicas de segurança para laboratórios de química.^{22,23}

Todos os procedimentos realizados fizeram emprego de equipamentos de proteção individual tais como jaleco, luva e óculos de proteção além de vestimenta adequada. Reagentes e solventes com certo grau de periculosidade foram manuseados na capela sob supervisão.

Quanto aos resíduos, os solventes foram separados em halogenados, orgânicos e aquosos, onde os aquosos tiveram seu pH corrigido para o devido descarte. Resíduos sólidos foram separados conforme sua composição e periculosidade os quais foram destinados à empresa contratada pela UFSC (PROACTIVA MEIO AMBIENTE BRASIL LTDA) para o devido tratamento.²⁴

Durante toda a permanência no laboratório, foi seguido o guia de biossegurança estabelecido pela portaria normativa N°339/2021/GR, de 17 de junho de 2021, cujos principais pontos são o emprego de máscara, respeitar e manter a distância segura de dois metros entre pessoas e a higienização das mãos e do local de trabalho com álcool etílico 70%.²⁵

4.2 MATERIAIS

Todos os reagentes e materiais utilizados durante as etapas de síntese e cinéticas possuem qualidade p.a. e foram obtidos comercialmente. Os solventes foram purificados por destilação e armazenados em peneira molecular de 4 Å e a água ultrapura obtida a partir do sistema de purificação TKA Smart2Pure.

A purificação dos compostos sintetizados foi realizada empregando-se cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se como eluente diferentes composições de hexano e acetato de etila e o complexo sintetizado e as soluções de trabalho mantidas sob atmosfera inerte de gás nitrogênio e em baixa temperatura.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) foram obtidos na central de análises da UFSC no equipamento BRUKER 200MHz, que possui frequência de 200 MHz para espectros de ^1H e 50 MHz para espectros de ^{13}C . Os dados foram obtidos em clorofórmio deuterado e são descritos conforme seu deslocamento químico (δ) e sua multiplicidade.

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos também pela central de análises da UFSC no equipamento AGILENT TECHNOLOGIES – Cary 660 FTIR, empregando-se pastilha de KBr. Os dados foram obtidos num intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} e as bandas são identificadas em estiramento (ν) ou em deformações (δ).

4.3.3 Espectroscopia no UV-Vis

Os espectros de absorção e cinéticas de despropargilação foram realizadas empregando-se o espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384 Microplate Reader*, em microplacas de polipropileno contendo noventa e seis poços. A coleta de dados foi realizada em dois tampões com diferentes concentrações de cloreto, com pH ajustado para 7,4 e na temperatura de 37 °C.

4.4 PREPARAÇÃO DOS TAMPÕES

Visando mimetizar os meios extracelular e intracelular, cuja principal diferença está nas concentrações de íons cloreto, aproximadamente 140 mM e 15 mM respectivamente, dois tampões foram preparados.²⁶

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

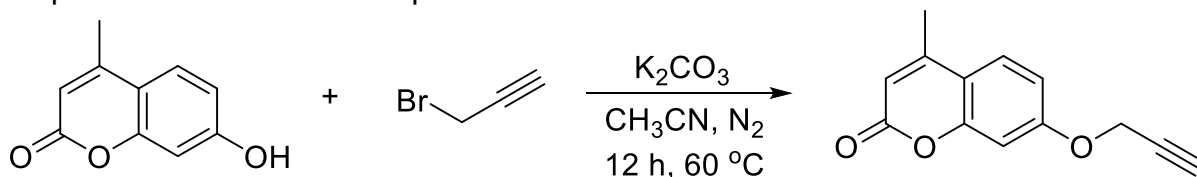
Outro tampão fosfato foi preparado para simular o meio intracelular, nele foi utilizado fosfato de sódio monobásico a uma concentração de 10 mM, cloreto de sódio a uma concentração de 15 mM e perclorato de sódio a uma concentração de 125 mM de modo a deixar ambos os tampões com a mesma força iônica. Optou-se pelo perclorato de sódio devido à sua baixa reatividade com paládio. A solução foi deixada em banho de ultrassom por dez minutos e teve seu pH ajustado para 7,4.

4.5 SÍNTESE DO PRÓ-FLUORÓFORO

Cumarinas são importantes por suas propriedades ópticas, sendo possível acompanhá-las tanto por técnicas de absorção quanto de emissão, por este motivo o substrato foi preparado a partir da reação de propargilação da 7-hidroxi-4-metilcumarina conforme um procedimento adaptado ao reportado na literatura.^{27,28}

Em um balão de fundo redondo de 100 mL previamente seco e contendo uma barra de agitação, adicionou-se 2,84 mmol da 7-hidroxi-4-metilcumarina juntamente com 16 equivalentes de carbonato de potássio e 35 mL de acetonitrila, após homogeneizar foi adicionado lentamente 3,00 mmol de brometo de propargila e a solução agitada por 12 horas a 60 °C sob atmosfera inerte de gás nitrogênio, conforme ilustrado no Esquema 13.

Esquema 13. Síntese da Prop-Cumarina.



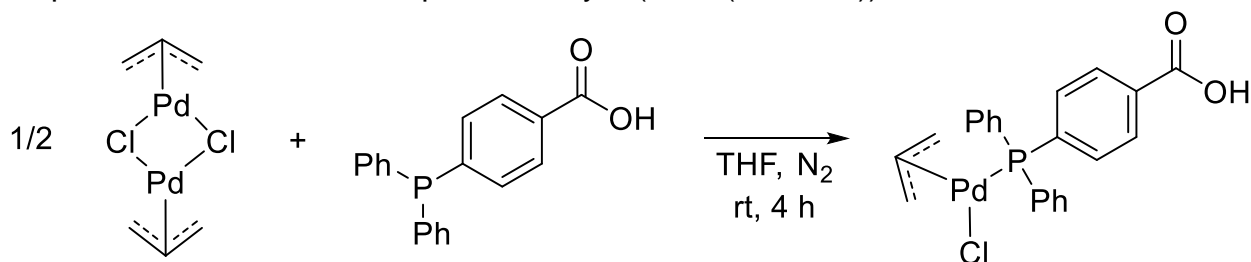
Fonte: Do autor. (2022)

Ao final, o excesso de acetonitrila foi evaporada sob pressão reduzida e em seguida adicionados 50 mL de diclorometano. A solução resultante foi lavada com água deionizada (2x20 mL), com solução de hidróxido de amônio (1x10 mL) e por fim com solução salina saturada (1x10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi lavado com hexano para a remoção de impurezas.

4.6 SÍNTESE DO COMPLEXO DE PALÁDIO

O complexo PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) foi preparado adaptando procedimentos descritos na literatura, a partir do dímero Pd₂Allyl₂Cl₂ e a respectiva fosfina, conforme ilustrado no Esquema 14.¹⁷

Esquema 14. Síntese do complexo PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)).



Fonte: Do autor. (2022)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL previamente seco e contendo uma barra de agitação magnética, adicionou-se 0,2 mmol do dímero Pd₂Allyl₂Cl₂ e 0,4 mmol da fosfina. O balão foi vedado com um septo de borracha, evacuado sob pressão reduzida e carregado com gás nitrogênio. Após isto, adicionou-se 10 mL de THF e a reação foi agitada durante quatro horas à temperatura ambiente. A reação foi concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma solução de 50% acetato de etila em hexano. O produto obtido foi armazenado em atmosfera inerte a -25 °C.

4.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA O-CUMARINA

Para a curva de calibração, preparou-se um total de sete soluções da cumarina desprotegia com concentrações de 0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μM , nas condições de pH 7,4, 37 °C e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), em ambos os tampões. Realizou-se a varredura espectral de 270 nm a 500 nm e todos os pontos foram feitos em triplicata.

Realizou-se também a varredura espectral para uma solução de 100 μM da prop-cumarina nas mesmas condições anteriores, para determinar-se o comprimento de onda de trabalho.

4.8 CINÉTICA DE DESPROPARGILAÇÃO COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CATALISADOR

As cinéticas foram realizadas para quatro concentrações de catalisador tanto no tampão PBS quanto no tampão fosfato. A concentração de substrato foi mantida fixa em 100 μM enquanto o catalisador variou entre 10, 50, 70 e 100 μM . O volume final foi mantido em 300 μL com 5% de DMSO, pH 7,4 e temperatura de 37 °C e todos os pontos foram feitos em triplicata. Acompanhou-se as cinéticas em 364 nm.

4.9 CINÉTICA DE DESPROPARGILAÇÃO COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

As cinéticas foram realizadas para seis concentrações de substrato no tampão fosfato. A concentração de catalisador foi fixada em 50 μM enquanto o substrato variou entre 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μM . O volume final foi mantido em 300 μL com 5% de DMSO, pH 7,4 e temperatura de 37 °C e todos os pontos foram feitos em triplicata. Acompanhou-se as cinéticas em 364 nm.

4.10 EXPERIMENTOS DE ENVENENAMENTO E REDUÇÃO DO PALÁDIO

Para os testes de envenenamento e efeito do estado de oxidação do complexo de Pd, foram utilizados os aditivos CS₂, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ascorbato de sódio. Realizou-se duas cinéticas de despropargilação da prop-cumarina para cada aditivo, onde a primeira continha o aditivo desde o início e a segunda teve a adição do aditivo após 30 minutos para o CS₂ e 20 minutos para o EDTA e ascorbato de sódio. Os mesmos experimentos foram realizados com o catalisador NaPdCl₄ para efeito comparativo.

Utilizou-se concentrações de 100 mM tanto para o substrato quanto para o catalisador. Para o CS₂ utilizou-se 6,0 equivalentes, para o EDTA 10,5 equivalentes e para o ascorbato de sódio 10 equivalentes. Mantiveram-se as condições de volume final igual à 300 µL com 5% de DMSO, pH 7,4 e temperatura de 37 °C. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

4.11 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE ARRHENIUS

As cinéticas foram realizadas com concentrações de 100 µM tanto para o substrato quanto para o catalisador nas temperaturas de 37, 32 e 27 °C com volume final igual à 300 µL com 5% de DMSO e pH 7,4. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

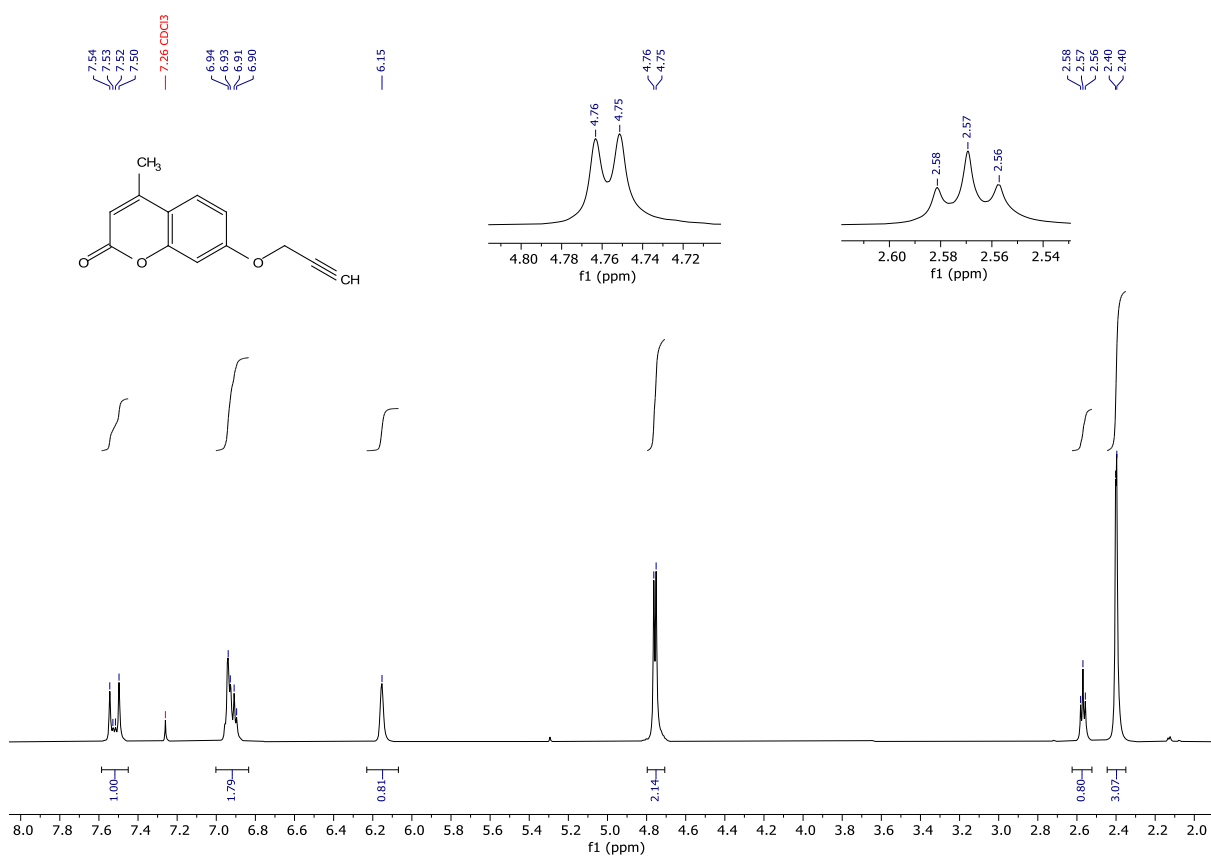
5.1 SÍNTESE DA PROPARGIL-CUMARINA

A propargilação envolve uma reação clássica de substituição nucleofílica do tipo S_N2 , por este motivo garantiu-se o emprego de materiais e reagentes o mais seco possível, para evitar a possível substituição por água levando à formação do álcool propargílico. Também fez-se uso de base em excesso para garantir a desprotonação do grupo OH.

Ao final da reação, obteve-se um total de 0,3 mmol do produto fornecendo um rendimento de 10,5%. O composto apresenta um aspecto físico sólido e de coloração amarelo pálido, com ponto de fusão de 141-144 °C. A caracterização foi realizada a partir das análises dos espectros de NMR e de FT-IR.

No espectro contido na Figura 2 é possível identificar os três hidrogênios aromáticos nos deslocamentos de 6,92 ppm e 7,52 ppm, o hidrogênio vizinho à carbonila em 6,15 ppm e a metila em 2,40 ppm. A adição do grupo propargil fica evidente pelos sinais em 2,57 ppm e 4,75 ppm, referentes aos grupos CH e CH₂ respectivamente. Ambos possuem constante de acoplamento J igual 2,4 Hz mostrando que os hidrogênios acoplam entre si, e de fato o acoplamento a distância é possível devido ao encurtamento da ligação causado pelas ligações π presentes na tripla, fazendo com que o grupo CH se apresente como um tripleto e o grupo CH₂ como dubleto.

Figura 2. Espectro de NMR de ^1H para a prop-cumarina em CDCl_3 (200 MHz).

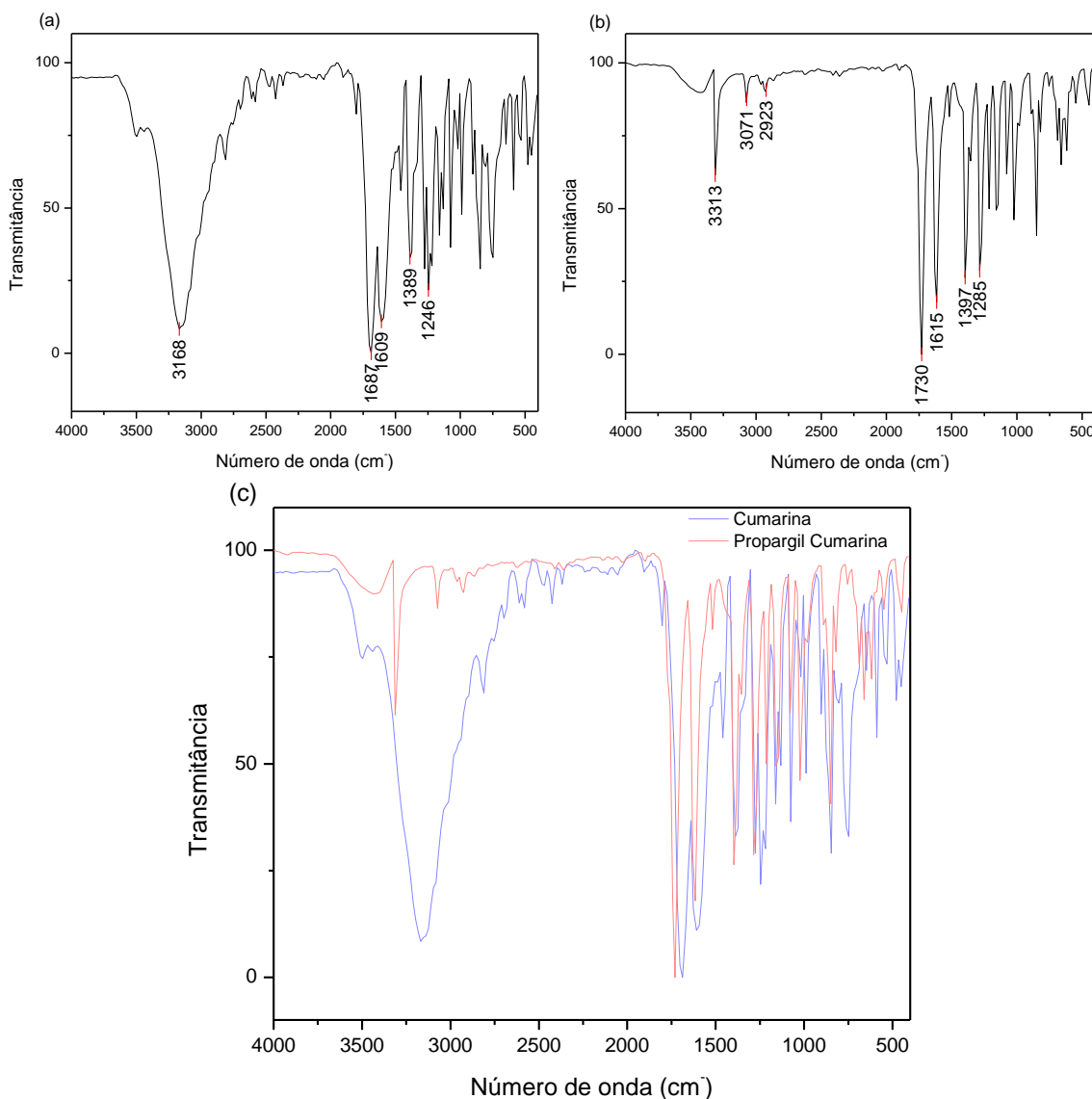


Fonte: Do autor. (2022).

A Figura 3 apresenta os espectros de infravermelho com transformada de Fourier para a 7-hidroxi-4-metilcumarina protegida e desprotegida respectivamente. O espectro (a) está de acordo com o reportado na literatura e apresenta uma banda alargada em 3168 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo O-H (ν (O-H)), em 1687 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo C=O (ν (C=O)), em 1609 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=C (ν (C=C)), em 1389 cm^{-1} referente à deformação angular do grupo metil C-H (δ (C-H)) e em 1246 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-O (ν (C-O)).²⁹

No espectro (b), continua-se observando as bandas ν (C=O) = 1730 cm^{-1} , ν (C=C) = 1615 cm^{-1} , δ (C-H) = 1397 cm^{-1} e ν (C-O) = 1285 cm^{-1} , porém observa-se o desaparecimento da banda larga referente ao grupo ν (O-H) e a presença de uma banda em 3313 cm^{-1} característica de estiramento do tipo $\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$ pertencente ao grupo propargil.

Figura 3. Espectros de infravermelho para (a) cumarina desprotegida, (b) propargil-cumarina e (c) comparação entre ambas.



Fonte: Do autor. (2022).

5.2 SÍNTESE DO COMPLEXO DE PALÁDIO

Como mostrado na Figura 4, o produto obtido possui aspecto físico sólido e de coloração amarelo claro. O produto mostrou-se instável, degradando-se ao passar longos períodos fora da geladeira e sem atmosfera inerte. Não foi possível determinar-se o ponto de fusão, pois na temperatura de 160-162 °C observou-se a formação de um composto preto, provavelmente produto da degradação do complexo, acelerada pela elevada temperatura.

Figura 4. Complexo PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) sintetizado.



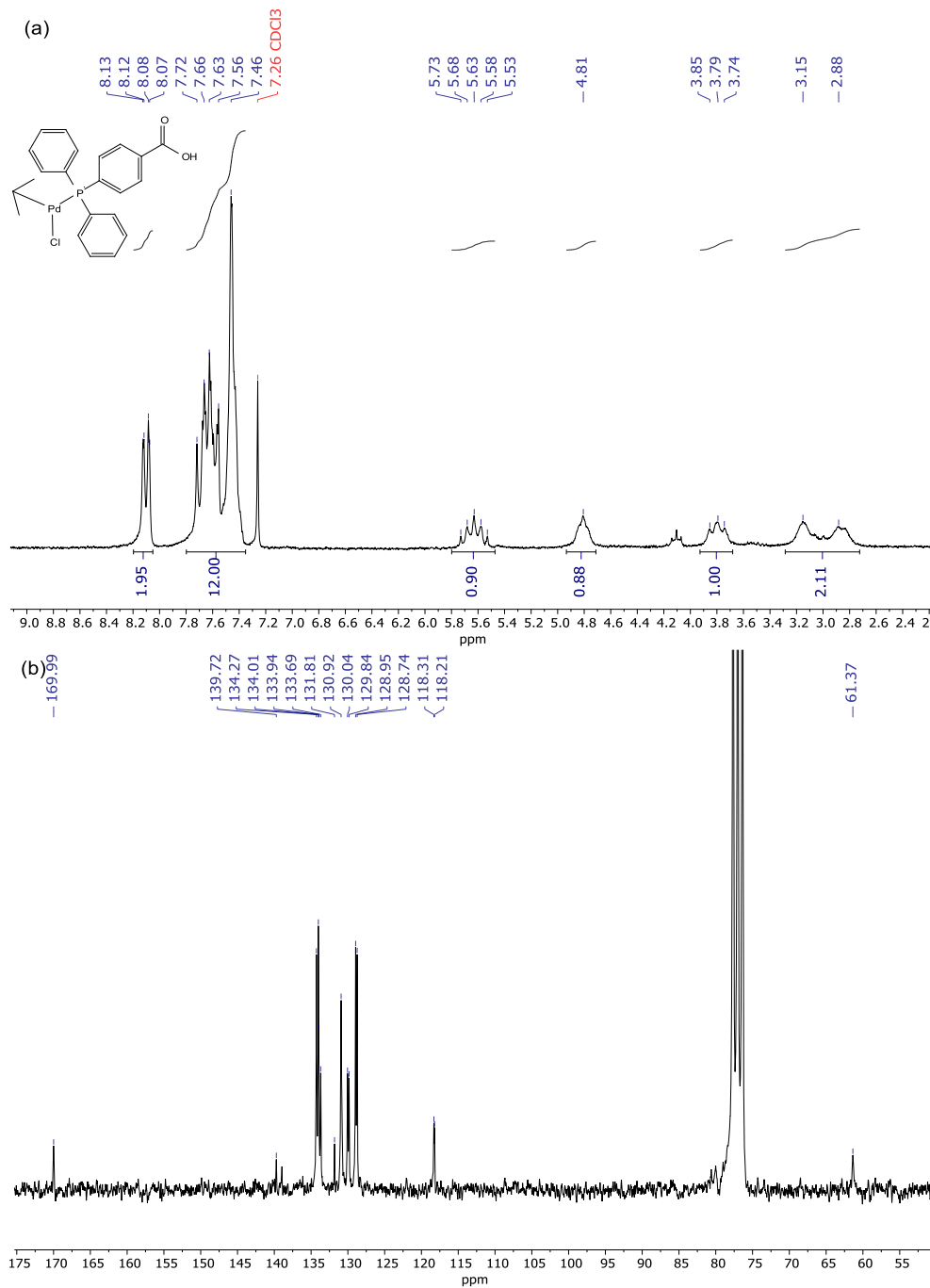
Fonte: Do autor. (2022).

A caracterização foi realizada a partir dos espectros de NMR de ¹H e ¹³C. Nas cinéticas utilizou-se o complexo previamente preparado pelo doutorando Gean Michel Dal Forno, os espectros contidos na Figura 5 são referentes à síntese por ele realizada.

No espectro (a) é possível observar os hidrogênios aromáticos contidos na fosfina nos deslocamentos de 7,46 a 7,72 ppm e sinais mais desblindados entre 8,07 e 8,13 ppm pertencentes aos hidrogênios vizinhos à carbonila. Em 2,8, 3,15, 3,79 e 4,81 ppm é possível observar os sinais dos grupos CH₂ do ligante η³-alil e em 5,63 ppm um quintuplete do grupo CH.

No espectro (b) os carbonos aromáticos apresentam-se no entorno de 130 ppm, enquanto o grupo ácido carboxílico, o mais desblindado, é observado em 169,99 ppm. O grupo η³-alil apresenta os sinais em 61,37 e 118,21 ppm dos grupos CH e CH₂ respectivamente.

Figura 5. Espectros de (a) ^1H e (b) ^{13}C do complexo PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) em CDCl₃ (200 MHz).

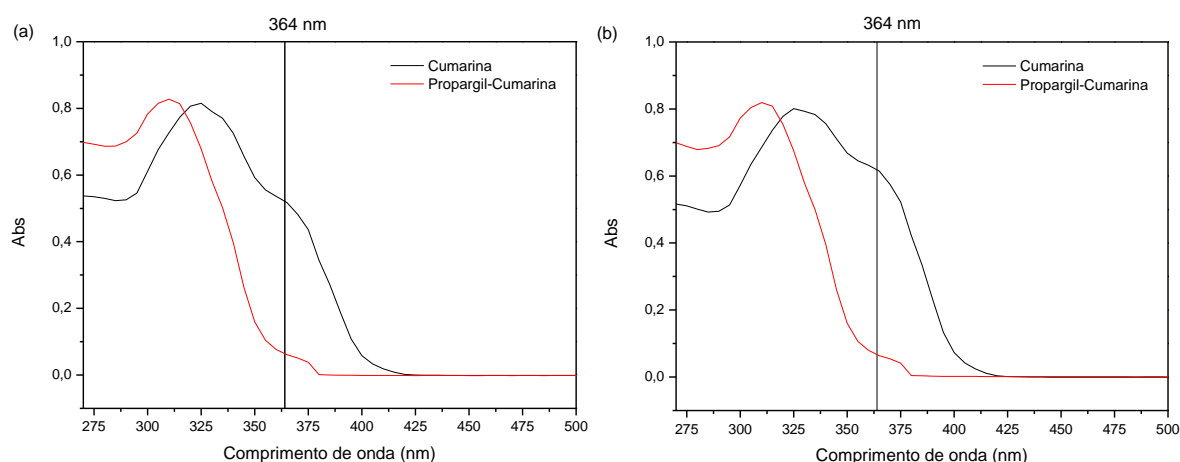


Fonte: Do autor. (2022).

5.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ABSORÇÃO DA O-CUMARINA

Inicialmente realizou-se uma varredura espectral tanto da prop-cumarina quanto da *O*-cumarina, para determinar-se o comprimento de onda de trabalho ideal, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Espectros de Uv-vis das cumarinas protegida e desprotegida em (a) tampão fosfato e (b) tampão PBS. Condições: 100 μ M das cumarinas, pH 7,4, 5% DMSO e 37 $^{\circ}$ C.

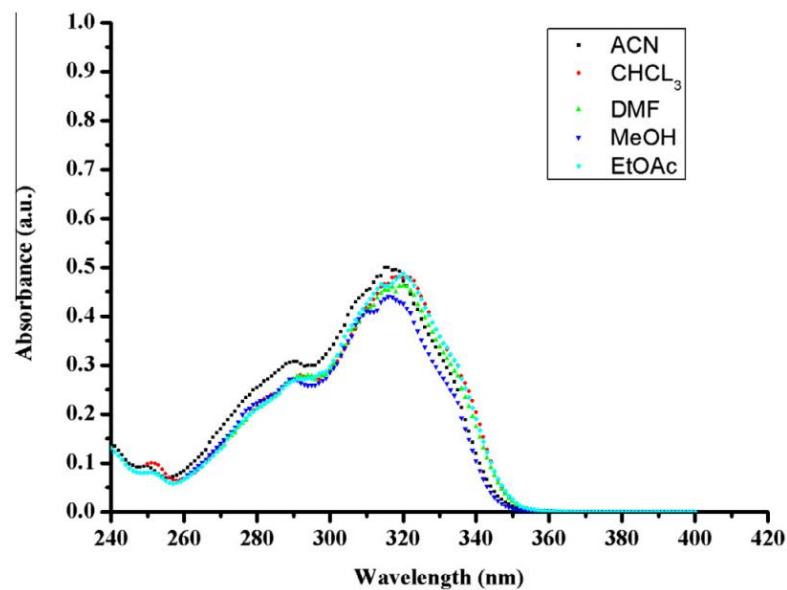


Fonte: Do autor. (2022).

O comprimento de onda usualmente empregado para o estudo cinético envolvendo estas moléculas é de 364 nm, por não apresentar sobreposição de bandas e linearidade com relação à concentração.

Entretanto, durante os experimentos observou-se que a prop-cumarina apresentava uma pequena banda entre 360 e 380 nm, a qual não existe em espectros reportados na literatura, como ilustra a Figura 7. A hipótese inicial era de que o substrato poderia ter se degradado, porém a cromatografia em camada delgada descartou esta hipótese ao mostrar apenas um sinal de mesmo R_f que a prop-cumarina.³⁰

Figura 7. Espectro de UV-vis reportado na literatura para a prop-cumarina.

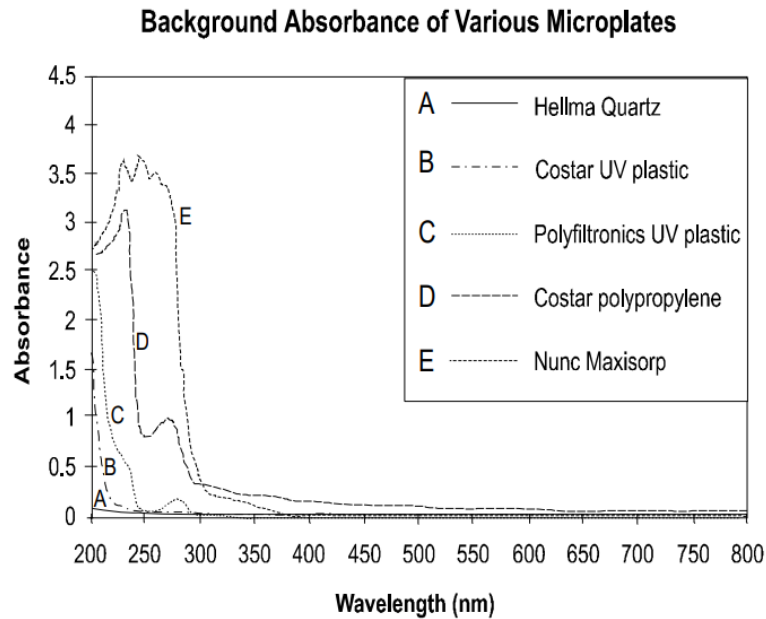


Fonte: YADAV, N. et al.³⁰ (2015).

A segunda hipótese era a possível interferência causada pela própria microplaca, uma vez que a microplaca utilizada é constituída de polipropileno, um polímero que não é completamente transparente para comprimentos de ondas perto do ultravioleta. De fato o espectro para o polipropileno apresenta o perfil da banda observada entre 360 e 380 nm, ilustrado na Figura 8, indicando que o equipamento não estava realizando o branco de forma adequada.³¹

Como o valor desta banda está associado à placa, ele irá se manter igual durante qualquer tipo de análise, podendo ser removido na etapa final de tratamento de dados, sem que haja o comprometimento dos dados coletados.

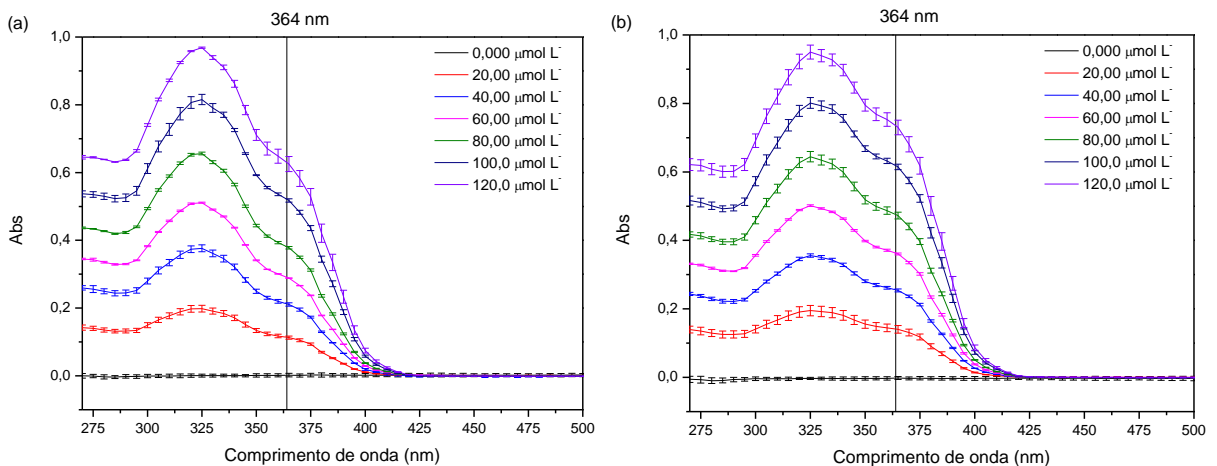
Figura 8. Análise espectral de microplacas de diferentes composições.

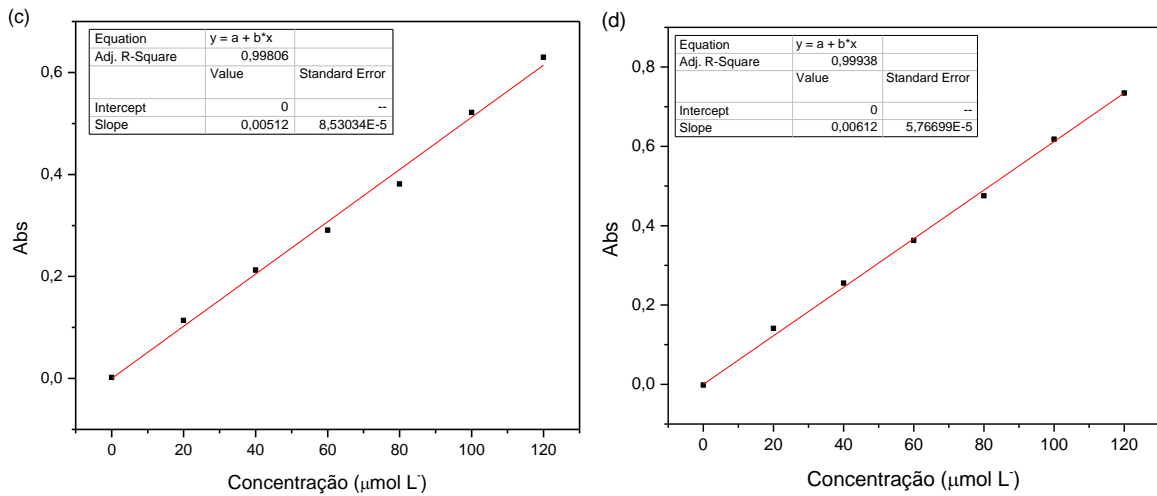


Fonte: BioTek Instruments.³¹ (2001).

Para a curva de calibração da O-cumarina realizou-se a varredura espectral em sete concentrações e realizou-se a regressão linear da absorbância coletada no comprimento de onda de 364 nm em função da concentração, conforme mostra a Figura 9.

Figura 9. Espectros de UV-vis para diferentes concentrações de O-cumarina em (a) tampão fosfato e (b) tampão PBS. Curvas de calibração para 364 nm em (c) tampão fosfato e (d) tampão PBS. Condições: pH 7,4, 5% de DMSO a 37 °C.





Fonte: Do autor. (2022).

Como o equipamento não faz emprego de cubetas, o caminho ótico não é bem definido e por este motivo a inclinação obtida na regressão representa um valor proporcional à absorvidade molar e não o valor dela em si. É conveniente introduzir uma nova variável denominada ε' que é dada pelo produto entre absorvidade molar e caminho ótico, de tal forma que a lei de Lambert-Beer possa ser reescrita conforme a equação (5.1).

$$A = \varepsilon l C = \varepsilon' C \quad (5.1)$$

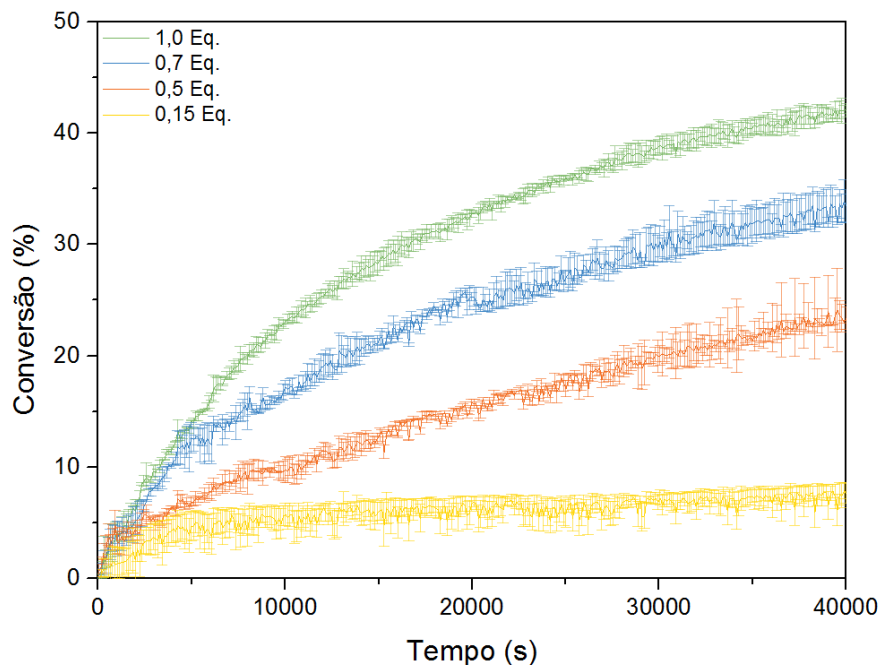
Sendo a inclinação obtida na curva de calibração igual ao ε' , é possível converter dados de absorvância em concentração, uma vez que a concentração pode ser escrita como $C = A/\varepsilon'$. Para o tampão fosfato, obteve-se um valor de ε' igual 5120 L mol⁻¹ enquanto para o tampão PBS este valor foi de 6120 L mol⁻¹.

5.4 CINÉTICAS COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CATALISADOR

5.4.1 Tampão PBS (15 mM NaCl)

Para o tampão PBS observou-se cinéticas lentas não atingindo a saturação mesmo após intervalos de doze horas de reação, obtendo-se conversões inferiores à 50%, conforme mostra a Figura 10.

Figura 10. Perfis cinéticos para a conversão da prop-Cumarina. Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina, 1,0, 0,7, 0,5 e 0,15 equiv. de catalisador, em tampão PBS, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 °C.

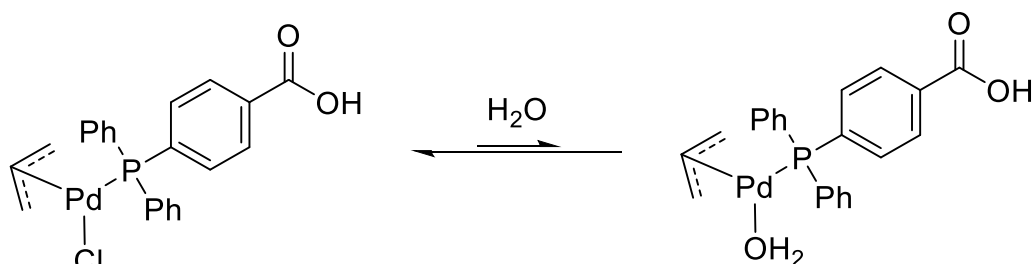


Fonte: Do autor. (2022).

Em todos os casos o valor de conversão foi aproximadamente a metade da concentração de catalisador utilizada, ou seja, cada mol de catalisador realizou meio ciclo catalítico, fato que pode ser observado pelos números de *turnover* (TON) próximos de 0,5 na Tabela 1. Isto indica que pode estar ocorrendo a inativação do catalisador antes mesmo que a reação ocorra, provavelmente devido ao excesso de íons cloreto.

Alguns complexos, como a cisplatina, só se tornam ativos após uma etapa de troca de ligantes por água, se for este o caso, o excesso de íons cloretos dificultaria o processo da troca de ligantes Cl^- por ligantes aquo, tornando a cinética mais lenta, como ilustra o esquema no Esquema 15.³²

Esquema 15. Representação do deslocamento do equilíbrio químico em um meio com alta concentração de íons cloreto.



Fonte: Do autor. (2022).

Tabela 1. Dados obtidos das curvas das cinéticas da reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão PBS.

Equivalentes	V_0 ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$)	TON	Conversão (%)
1	2,94E-03	0,46	46,7
0,7	2,12E-03	0,58	40,7
0,5	1,73E-03	0,63	31,4
0,15	4,43E-04	0,58	8,9

Fonte: Do autor. (2022).

A lei de velocidade geral para uma reação qualquer que possua duas componentes é dada pela equação (5.2).

$$V = k[A]^m[B]^n \quad (5.2)$$

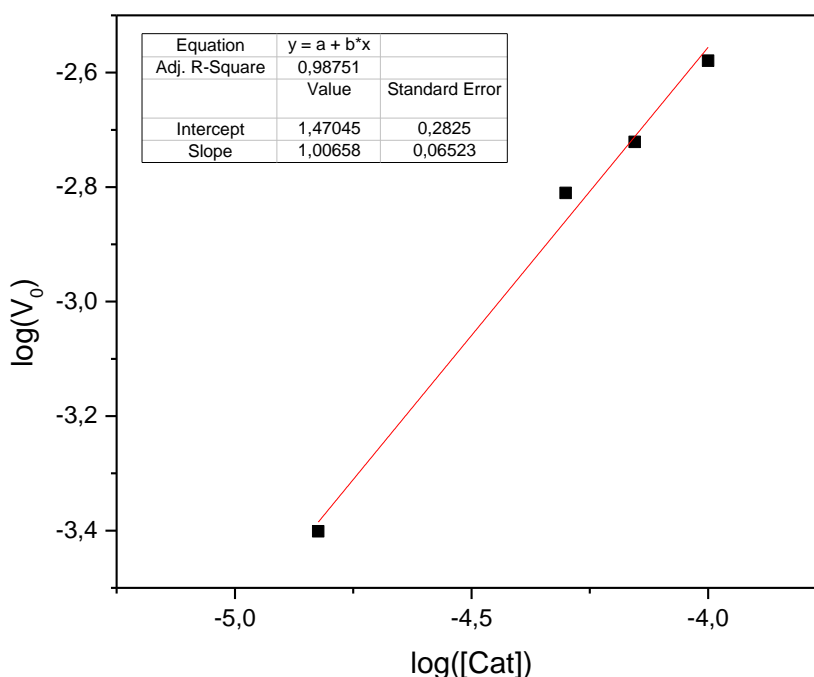
Onde k é a constante de velocidade e m e n são as ordens de reação de A e B, respectivamente. A ordem da reação em relação a uma das componentes pode ser obtida a partir do gráfico de log vs log, conforme a equação (5.3).

$$\log(v) = \log(k[A]^m) + n\log([B]) \quad (5.3)$$

Ao realizar a linearização, assume-se que $k_2[A]^m$ é constante em relação ao tempo, esta aproximação somente é válida em condições de pseudo primeira ordem. Neste caso, esta condição não é satisfeita o que impede o cálculo de k_2 a partir do valor de *intercept* obtido no gráfico, porém como a ordem da reação independe da concentração das componentes, ainda é possível determinar a ordem da reação.

O valor do coeficiente angular no gráfico da Figura 11 corresponde à ordem da reação em relação ao catalisador, sendo de aproximadamente 1,0, conforme esperado, uma vez que o mecanismo proposto sugere que para cada molécula de substrato é necessário um de catalisador.¹⁵

Figura 11. Gráfico de $\log(V_0)$ vs. $\log([Cat])$ para a reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão PBS.



Fonte: Do autor. (2022).

Considerando que a reação segue um modelo aproximadamente igual ao de segunda ordem, pode-se determinar a constante de velocidade na condição em que a concentração de catalisador é igual à de substrato, ou seja, na condição de 1 equivalente de catalisador, como ilustrado na figura equação (5.4)

$$v = k_2[A][B] = k_2[A]^2 \quad (5.4)$$

Integrando-se a equação (5.4), obtém-se as equações (5.5) e (5.6)

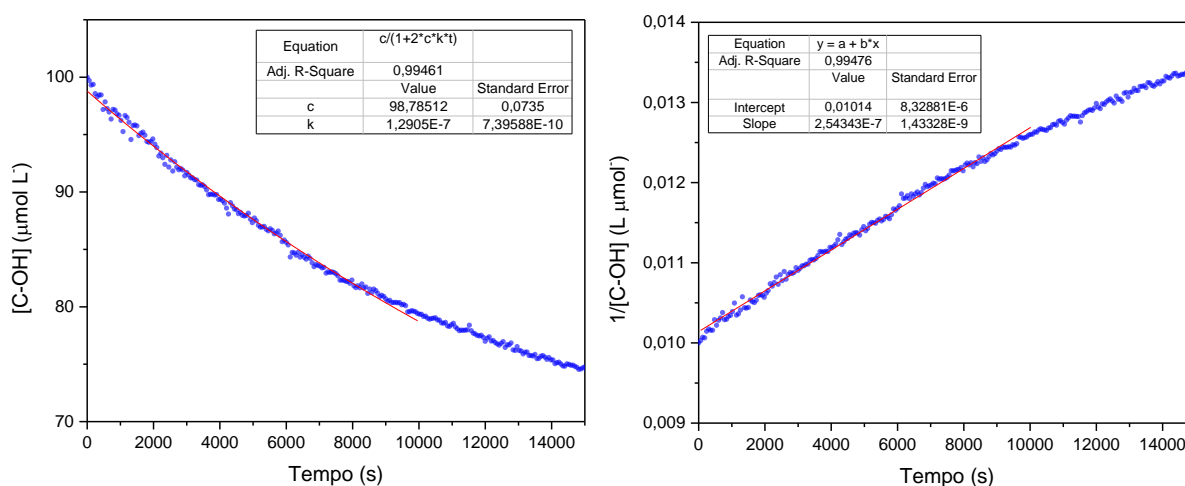
$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + 2[A]_0 k_2 t} \quad (5.5)$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + 2k_2t \quad (5.6)$$

É possível obter a constante de velocidade via regressão não linear (equação (5.5)) e linear (equação (5.6)). Os dados se ajustaram aos dois modelos somente até próximo de 10000 segundos, após isto observou-se desvio para ambos. A formação de precipitado pode estar associada a estes desvios, uma vez que ao final das cinéticas foi observado a turvação das soluções nos poços, o que pode afetar nos dados de absorvância coletados.

Realizando-se as regressões, foram obtidos valores para a constante de velocidade de segunda ordem (k_2) de $0,129 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a forma não linear e $0,127 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a forma linear, conforme ilustrado na Figura 12. Determinação de k_2 em tampão PBS.. Este valor de constante de velocidade é considerado baixo para aplicações bio-ortogonais, onde normalmente considera-se adequados valores acima de $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mostrando que este catalisador não seria muito eficiente para realizar a reação no meio extracelular, i.e., em alta concentração de cloreto.

Figura 12. Determinação de k_2 em tampão PBS.



Fonte: Do autor. (2022).

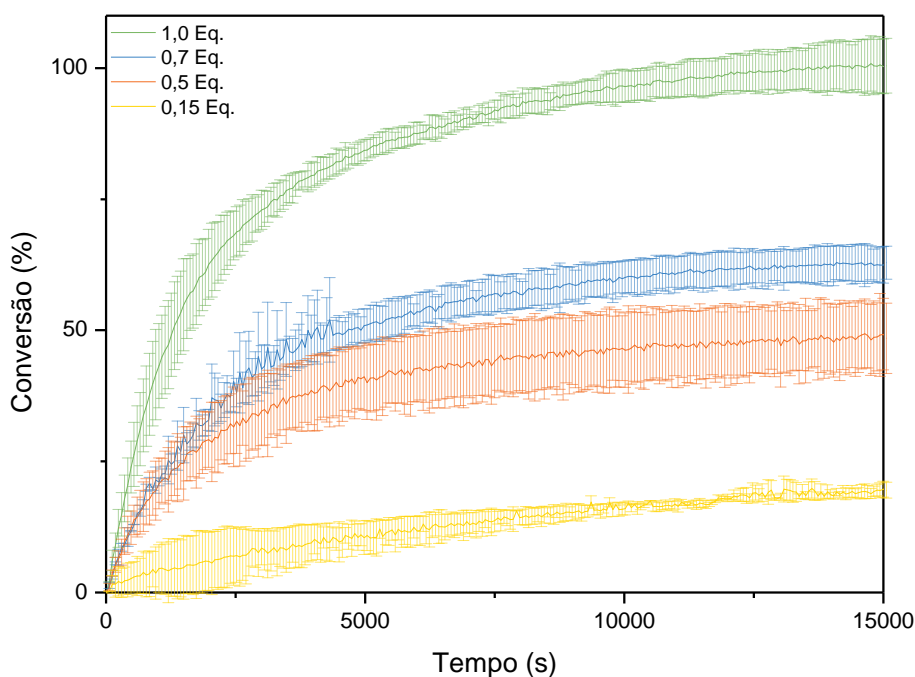
Para a condição de 1 equiv, obteve-se uma frequência de *turnover* a 90% de conversão (TOF90) de $1,16 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, este valor reflete o número de conversões que ocorreram por segundo até o instante em que 90% da reação se completou.

5.4.2 Tampão Fosfato (140 mM NaCl)

A reação em tampão fosfato com 15 mM de cloreto apresentou uma cinética muito mais rápida, tendo-se praticamente a reação completa em torno de 2 horas, corroborando para a hipótese de que a forma ativa do catalisador é aquela que possui o ligante aquo ao invés do cloreto. A baixa concentração de íons cloreto neste caso deslocaria o equilíbrio representado no Esquema 15 para a direita.

Os dados contidos na Figura 13 e na Tabela 2 mostram que as conversões são praticamente iguais à concentração de catalisador empregada, portanto cada molécula de complexo de Pd está participando de um único ciclo reacional, mostrando que na verdade este se comporta como um reagente e não catalisador.

Figura 13. Perfis cinéticos para a reação de despropargilação da prop-cumarina. Condições reacionais: 100 μ M de prop-cumarina, 1,0, 0,7, 0,5 e 0,15 equiv de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 °C.

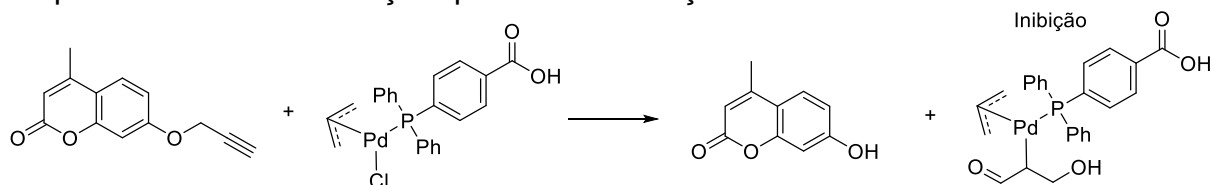


Fonte: Do autor. (2022).

O Esquema 10 mostra que o mecanismo de desproteção de grupos propargil por paládio (II) envolvem a formação do 3-hidroxiopropanal, que ao final do ciclo catalítico pode continuar coordenado ao metal levando a uma forma não ativa. O Esquema 16 ilustra a provável transformação do complexo, que após seu primeiro

ciclo, não possui mais posições contendo cloretos para que ocorra a substituição por água e conseqüentemente realizar um segundo ciclo reacional.

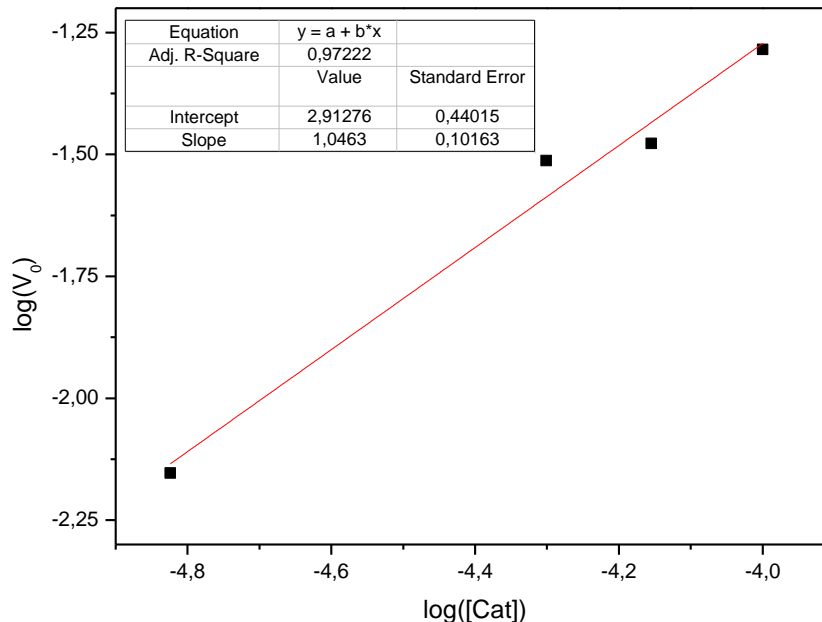
Esquema 16. Provável reação que ilustra a inibição do catalisador.



Fonte: Do autor. (2022).

Utilizando-se novamente a equação (5.3), a ordem da reação em relação ao catalisador foi determinada em aproximadamente 1,0, de forma semelhante ao tampão PBS e dentro do esperado. O valor foi obtido a partir da inclinação do gráfico de log vs log, contido na Figura 14.

Figura 14. Gráfico de $\log(V_0)$ vs. $\log([Cat])$ para a reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão fosfato.

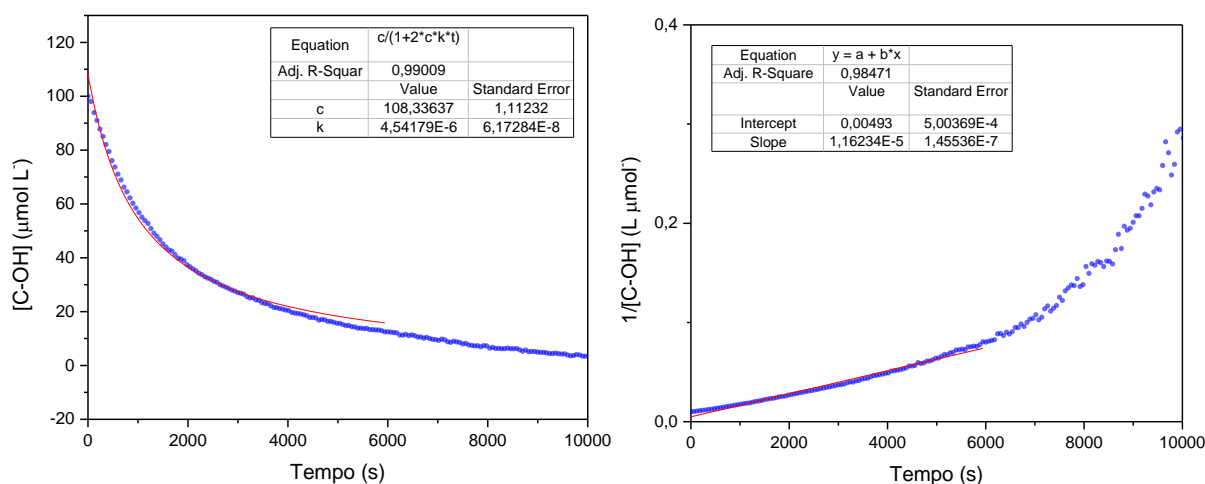


Fonte: Do autor. (2022).

As constantes de velocidade de segunda ordem foram obtidas novamente pelos métodos de regressão não linear e linear, empregando-se as equações (5.5) e (5.6), conforme ilustrado na Figura 15. Os dados apresentaram-se coerentes ao modelo proposto até o tempo de 6000 segundos, após isto foi observado desvios.

Novamente, ao final das cinéticas observou-se turvação das soluções nos poços, indicando precipitação, o que pode estar acarretando os desvios observados. O método não linear forneceu um k_2 de $4,54 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ enquanto o método linear forneceu um valor de $5,81 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ambos são coerentes, embora o método não linear seja mais confiável devido a menor propagação de erros.³³

Figura 15. Determinação de k_2 em tampão fosfato.



Fonte: Do autor. (2022).

Conforme mostrado na Tabela 2, os valores de TOF90 obtidos no tampão fosfato foram cerca de dez vezes maiores do que em relação ao tampão PBS, denotando novamente a maior velocidade de conversão em tampão fosfato com baixa concentração de íons cloreto.

Tabela 2. Dados obtidos das curvas da cinética reação de despropargilação da propumarina em tampão fosfato.

Equivalentes	V_0 ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	TON	TOF90 (s^{-1})	Conversão (%)
1	5,19E-02	1,00	1,44E-04	100
0,7	3,33E-02	0,90	1,23E-04	62,8
0,5	3,07E-02	0,98	1,33E-04	48,9
0,15	7,02E-03	1,28	1,09E-04	19,2

Fonte: Do autor. (2022).

5.5 CINÉTICA COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Seguindo os estudos cinéticos da reação de despropargilação, acompanhou-se as cinéticas variando desta vez a concentração de prop-cumarina, para determinar-se a ordem da reação em relação ao substrato em tampão fosfato com 15 mM de cloreto. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos nos experimentos cinéticos.

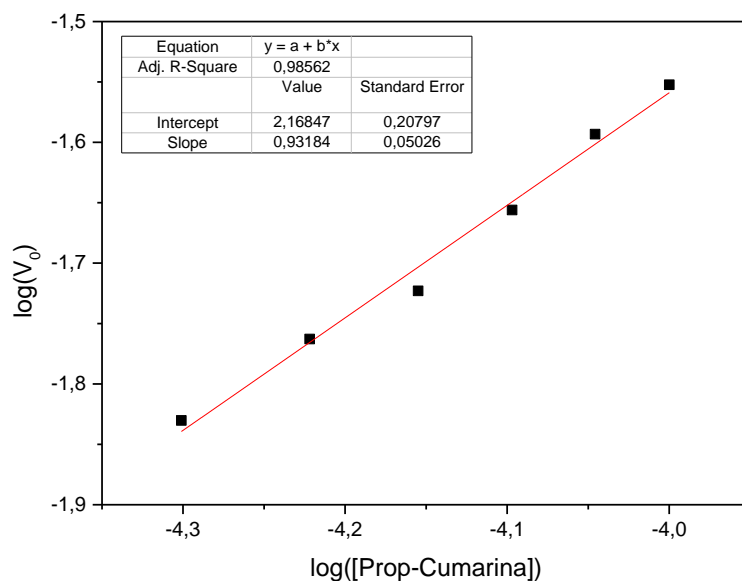
Tabela 3. Valores de V_0 obtidos das cinéticas de despropargilação com a variação da concentração de substrato.

Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	V_0 (Abs s^{-1})
50	8,10E-05
60	9,46E-05
70	1,04E-04
80	1,21E-04
90	1,40E-04
100	1,54E-04

Fonte: Do autor. (2022).

Utilizando-se novamente a equação (5.4), determinou-se em 0,93 a ordem da reação com relação ao substrato, conforme mostra a Figura 16, considerando-se ainda o desvio, pode-se afirmar que a ordem é aproximadamente 1.

Figura 16. Gráfico de $\log(V_0)$ vs. $\log([\text{prop-cumarina}])$ para a reação de despropargilação da prop-cumarina em tampão fosfato.

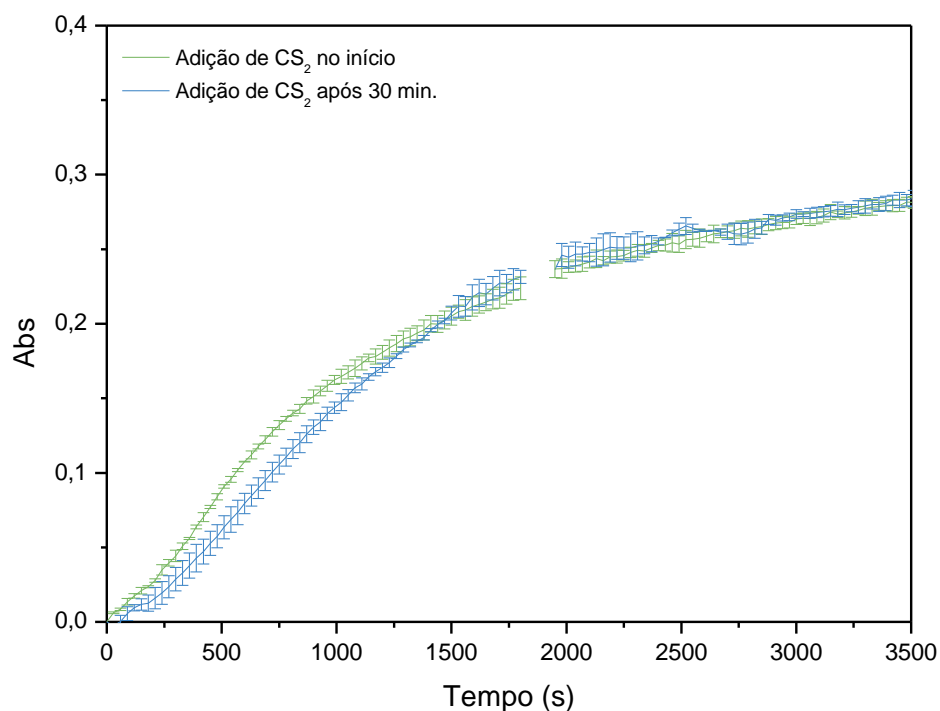


Fonte: Do autor. (2022).

5.6 EXPERIMENTOS DE ENVENENAMENTO E REDUÇÃO DO PALÁDIO

Para estudar o efeito do estado de oxidação do catalisador na cinética de clivagem da ligação C-O da cumarina, foram realizados experimentos de envenenamento. Primeiramente fez-se o emprego de dissulfeto de carbono, uma espécie que possui alta afinidade por paládio zero e assim utilizada para diferenciar a espécie ativa entre Pd(II) e Pd(0), quando adicionada na reação. Como não se observou mudanças nos perfis cinéticos de reação com a adição de CS_2 (Figura 17), conclui-se que a forma ativa do complexo é de fato Pd(II), caso contrário, observar-se-ia a inibição da reação após a adição de CS_2 .

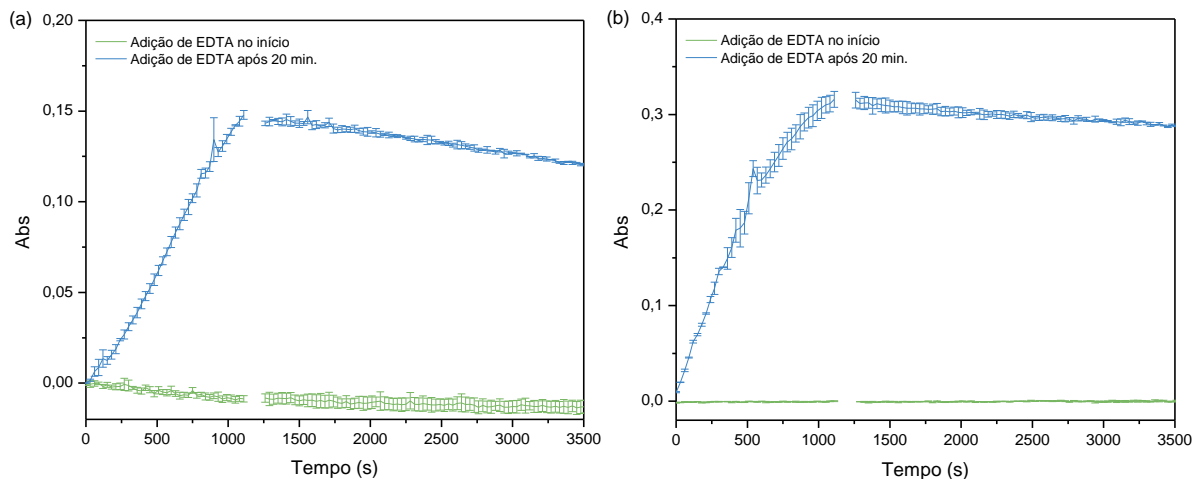
Figura 17. Envenenamento com CS₂. Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina e de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO a 37 °C.



Fonte: Do autor. (2022).

Realizou-se também o experimento de envenenamento com EDTA, que diferentemente do CS₂, é capaz de complexar-se com Pd(II). Para efeito comparativo, realizou-se também o experimento com o sal de tetracloropaladato, um sal de Pd(II) cujas propriedades em reações bio-ortogonais já são bem descritas. Observa-se na Figura 18 que a adição de EDTA inibe completamente a atividade de ambos os catalisadores de Pd, confirmando a natureza do estado de oxidação do catalisador como sendo 2+.

Figura 18. Envenenamento com EDTA para (a) PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) e (b) Na₂PdCl₄. Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina e de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 °C.

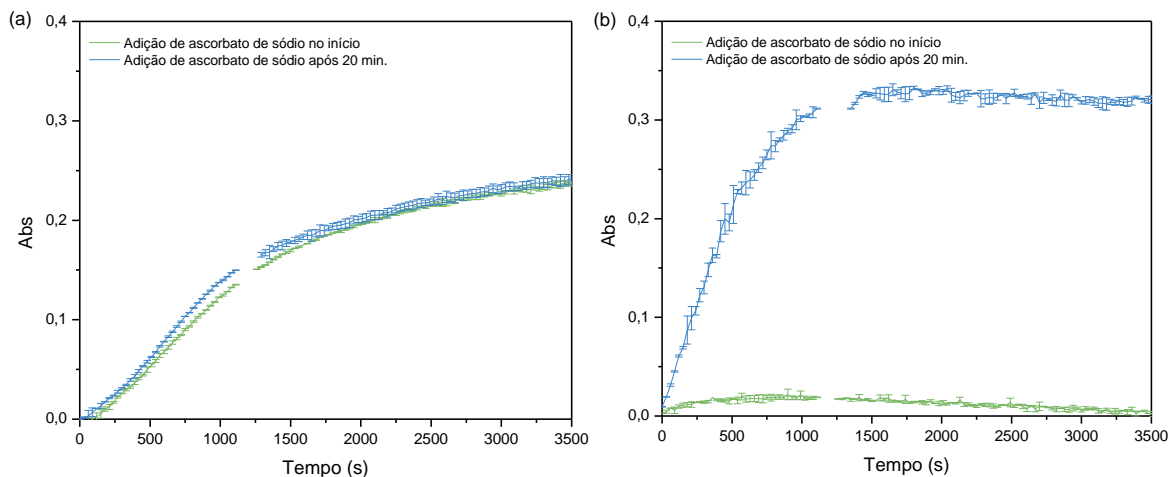


Fonte: Do autor. (2022).

O íon ascorbato possui elevada abundância no meio celular, participando de várias reações bioquímicas e sendo importante por suas propriedades redutoras. Uma das dificuldades na utilização do tetracloropaladato em sistemas vivos é devido ao fato dele ser facilmente reduzido quando está na presença de ascorbato, levando à formação de Pd(0), inativo ou de baixa atividade em muitas reações de clivagem bio-ortogonal, em especial a reação de despropargilação. A Figura 19 ilustra esse comportamento, a adição de ascorbato de sódio inibe completamente a reação para o Na₂PdCl₄, pela formação de Pd(0), inativo para esta reação. Para o PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) não se observa mudança no perfil cinético, isto porque o ascorbato não é um agente redutor forte o suficiente para reduzir o Pd(II) neste complexo. Tal observação já foi feita para outros complexos de paládio(II), como o para o dímero Allyl₂Pd₂Cl₂.

Estes resultados demonstram que o Pd(II) é a espécie ativa na reação de despropargilação, enquanto o Pd(0) se mostra praticamente sem nenhuma atividade catalítica. Embora a cinética do PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) tenha se mostrada mais lenta que a do Na₂PdCl₄, a sua estabilidade frente ao ascorbato o torna um melhor candidato para estudos em células vivas.

Figura 19. Efeito do ascorbato de sódio para (a) PdAllylCl(PPh₂(4-AC-Ph)) e (b) Na₂PdCl₄. Condições reacionais: 100 μM de prop-cumarina e de catalisador, em tampão fosfato, pH 7,4, 5% de DMSO à 37 °C.



Fonte: Do autor. (2022).

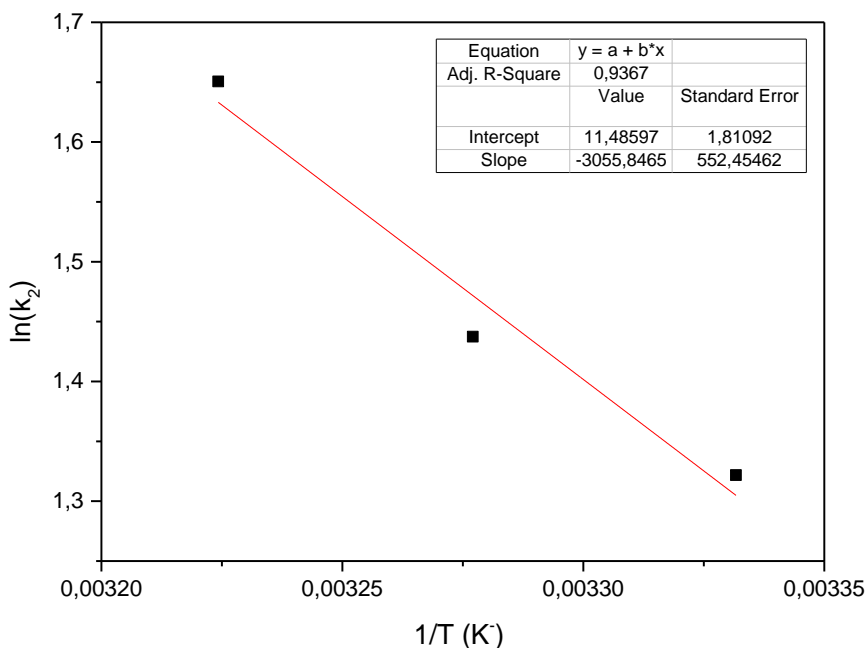
5.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ARRHENIUS

Os parâmetros cinéticos de ativação para a reação de despropargilação da prop-cumarina, em tampão fosfato, foram obtidos a partir do estudo do efeito da temperatura na constante de velocidade k_2 . A equação de Arrhenius (Equação (5.7)) demonstra que existe uma relação linear entre o logaritmo natural da constante de velocidade e o inverso da temperatura, e a energia de ativação e o fator pré-exponencial podem ser obtidos a partir dos coeficientes angular e linear, respectivamente.

$$\ln(k_2) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (5.7)$$

A partir da Figura 20, obtém-se que a energia de ativação (E_a) equivale a 25,4 kJ mol⁻¹ e o fator pré-exponencial (A) de 9,73x10⁴ L mol⁻¹ s⁻¹.

Figura 20. Dependência de k_2 com a temperatura.



Fonte: Do autor. (2022).

A partir da equação de Eyring é possível relacionar os valores de $\log(A)$ com a entropia de ativação. Nas condições padrões o valor de $\log(A)$ inferior a 13,2 é referente a entropia de ativação negativa enquanto valores superiores são referentes à valores positivos de entropia de ativação.³⁴

O valor de $\log(A)$ igual a 4,98 apresentado por esta reação, significa que a entropia de ativação é negativa, portanto, há uma redução na entropia durante o processo de formação do complexo ativado, indicando um provável aumento no número de coordenação do complexo de paládio.

6 CONCLUSÃO

A redução na velocidade devido à alta concentração de íons cloreto é um forte indício que uma das principais etapas da reação envolve um equilíbrio de troca de ligantes entre água e cloreto. O melhor desempenho em tampão fosfato com 15 mM de cloreto mostra que em aplicações biológicas a reação iria acontecer preferencialmente em meios intracelulares.

As ordens de reação próximas de 1 tanto para substrato quanto para o catalisador são coerentes com o mecanismo já reportado e a inibição após um único ciclo catalítico faz com que seja necessário o emprego de concentrações muito elevadas de catalisador para obter conversões satisfatórias, comportando-se mais como um reagente do que catalisador propriamente dito. Vale destacar que o uso de altas concentrações de metais de transição nestas reações é comum e poucos são os exemplos de catalisadores que fazem múltiplos *turnovers*.

A biocompatibilidade deste catalisador já foi reportada, sendo ele solúvel em meio aquoso, dificilmente reduzido pelas componentes do meio biológico e atóxico quando em concentrações inferiores a 50 μM , além da capacidade de se acumular em organelas como a mitocôndria, porém além de biocompatibilidade, uma reação deve proceder de forma rápida com um k_2 preferencialmente maior que $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para ser considerada efetiva para aplicações bio-ortogonais.^{17,35}

Devido a cinética lenta e ao emprego de elevadas concentrações, o catalisador estudado não se mostrou adequado para reações de dissociação bio-ortogonais envolvendo grupos propargil, mas isso não o descarta completamente uma vez que os dados obtidos são referentes a um único grupo de proteção e deve-se levar em consideração novamente que o meio biológico é extremamente heterogêneo e dinâmico, logo os resultados obtidos em bancada podem não ser exatamente os mesmos que *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 1 **The Nobel Prize in Chemistry 2010**. NobelPrize.org. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2010/summary/>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- 2 JOHANSSON SEECHURN, C. C. C. et al. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling: A Historical Contextual Perspective to the 2010 Nobel Prize. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 21, p. 5062–5085, 2012.
- 3 ASTRUC, D. The 2010 Chemistry Nobel Prize to R.F. Heck, E. Negishi, and A. Suzuki for palladium-catalyzed cross-coupling reactions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 5, p. 1811–1814, 1 fev. 2011.
- 4 WANG, A.; JIANG, H. Palladium-Catalyzed Cleavage Reaction of Carbon–Carbon Triple Bond with Molecular Oxygen Promoted by Lewis Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 15, p. 5030–5031, 1 abr. 2008.
- 5 POHORILETS, I. et al. Kinetics and Inverse Temperature Dependence of a Tsuji–Trost Reaction in Aqueous Buffer. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 12, p. 11720–11733, 6 dez. 2019.
- 6 PAL, M.; PARASURAMAN, K.; YELESWARAPU, K. R. Palladium-Catalyzed Cleavage of O/N-Propargyl Protecting Groups in Aqueous Media under a Copper-Free Condition. **Organic Letters**, v. 5, n. 3, p. 349–352, 1 fev. 2003.
- 7 SLETTEN, E. M.; BERTOZZI, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 9, p. 666–676, 20 set. 2011.
- 8 IDIAGO-LÓPEZ, J. et al. Nanoparticles and bioorthogonal chemistry joining forces for improved biomedical applications. **Nanoscale Advances**, v. 3, n. 5, p. 1261–1292, 2021.
- 9 HANG, H. C. et al. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 14846–14851, 9 dez. 2003.
- 10 CARELL, T.; VRABEL, M. Bioorthogonal Chemistry—Introduction and Overview. **Topics in Current Chemistry**, v. 374, n. 1, p. 1–21, 1 fev. 2016. Company: SpringerDistributor: SpringerInstitution: SpringerLabel: Springernumber: 1publisher: Springer International Publishing.
- 11 LOZHKIN, B.; WARD, T. R. Bioorthogonal strategies for the in vivo synthesis or release of drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 116310, 1 set. 2021.

- 12 VONG, K. et al. Bioorthogonal release of anticancer drugs via gold-triggered 2-alkynylbenzamide cyclization. **Chemical Science**, v. 11, n. 40, p. 10928–10933, 21 out. 2020.
- 13 CHEN, Z. et al. Bioorthogonal catalytic patch. **Nature Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 933–941, ago. 2021.
- 14 LIU, L. et al. Catalytically Cleavable Detergent for Membrane Protein Studies. **ACS Omega**, v. 6, n. 32, p. 21087–21093, 17 ago. 2021.
- 15 LATOCHESKI, E. et al. Mechanistic insights into transition metal-mediated bioorthogonal uncaging reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 21, p. 7710–7729, 2 nov. 2020.
- 16 NGUYEN, D. P.; NGUYEN, H. T. H.; DO, L. H. Tools and Methods for Investigating Synthetic Metal-Catalyzed Reactions in Living Cells. **ACS Catalysis**, v. 11, n. 9, p. 5148–5165, 7 maio 2021.
- 17 MARTÍNEZ-CALVO, M. et al. Intracellular Deprotection Reactions Mediated by Palladium Complexes Equipped with Designed Phosphine Ligands. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 7, p. 6055–6061, 6 jul. 2018.
- 18 OLIVEIRA, B. L. et al. Platinum-Triggered Bond-Cleavage of Pentynoyl Amide and N-Propargyl Handles for Drug-Activation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 142, n. 24, p. 10869–10880, 17 jun. 2020.
- 19 COELHO, S. E. et al. Mechanism of Palladium(II)-Mediated Uncaging Reactions of Propargylic Substrates. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 3792–3799, 3 maio 2019.
- 20 CHANG, T.-C. et al. Prodrug Activation by Gold Artificial Metalloenzyme-Catalyzed Synthesis of Phenanthridinium Derivatives via Hydroamination. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 22, p. 12446–12454, 2021.
- 21 WANG, W. et al. In situ activation of therapeutics through bioorthogonal catalysis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, p. 113893, set. 2021.
- 22 **LaCBio**. Laboratório de catálise biomimética. Disponível em: <<https://lacbio.ufsc.br/index.php>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- 23 DEBACHER, N. A.; SPINELLI, A.; NASCIMENTO, M. DA GRAÇA. Manual de regras básicas de segurança para laboratórios de química. **Laboratório de química básica**, p. 30, 2008.
- 24 SETIC-UFSC. **Contrato de Manejo dos Resíduos Químicos da UFSC**. Disponível em: <<https://gestaoderesiduos.ufsc.br/contrato-de-manejo-dos-residuos-quimicos-da-ufsc/>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- 25 SETIC-UFSC. **Guia de biossegurança**. Disponível em: <<https://coronavirus.ufsc.br/guia-de-biosseguranca/>>. Acesso em: 7 jul. 2022.

- 26 **RMP: Theory.** Disponível em: <https://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/rmp/theory_RMP_n.htm>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- 27 ANDRES, J.; BORBAS, K. E. Expanding the Versatility of Dipicolinate-Based Luminescent Lanthanide Complexes: A Fast Method for Antenna Testing. **Inorganic Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 8174–8176, 8 set. 2015.
- 28 RULL-BARRULL, J. et al. Harnessing the Dual Properties of Thiol-Grafted Cellulose Paper for Click Reactions: A Powerful Reducing Agent and Adsorbent for Cu. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 43, p. 13549–13552, 2016.
- 29 **Hymecromone.** National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C90335&Type=IR-SPEC&Index=0#IR-SPEC>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- 30 YADAV, N. et al. Fluorescent probe 7-(prop-2-yn-1-yloxy)-2H-chromen-2-one: Experimental and DFT based approach to photophysical properties. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 148, p. 311–317, 5 set. 2015.
- 31 HELD, P. **The Importance of using the Appropriate Microplate for Absorbance Measurements in the Ultraviolet Region of the Spectrum.** Disponível em: <<https://www.biotek.com/resources/technical-notes/the-importance-of-using-the-appropriate-microplate-for-absorbance-measurements-in-the-ultraviolet-region-of-the-spectrum/>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- 32 ROCHA, C. R. R. et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. **Clinics**, v. 73, 6 set. 2018.
- 33 PERRIN, C. L. Linear or Nonlinear Least-Squares Analysis of Kinetic Data? **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 6, p. 669–672, 13 jun. 2017.
- 34 SANJEEV, R.; A. PADMAVATHI, D.; JAGANNADHAM, V. The ‘*Yard Stick*’ to Interpret the Entropy of Activation in Chemical Kinetics: A Physical-Organic Chemistry Exercise. **World Journal of Chemical Education**, v. 6, n. 1, p. 78–81, 30 jan. 2018.
- 35 OLIVEIRA, B. L.; GUO, Z.; BERNARDES, G. J. L. Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 16, p. 4895–4950, 14 ago. 2017.