



**UnB**

Instituto de Química

Programa de Pós Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SISTEMA DE SÍNTESE INTRACELULAR DE MARCADORES  
SELETIVOS DERIVADOS DA ESTRUTURA 2,1,3-  
BENZOTIAZOLA VIA CATÁLISE HOMOGÊNEA POR  
COMPLEXO DE PALÁDIO

THIAGO OLIVEIRA CARVALHO

ORIENTADOR: BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO

COORIENTADOR: JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA

Brasília, DF

2017

Universidade de Brasília  
Programa de Pós Graduação em Química  
Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica

Sistema de Síntese Intracelular de Marcadores Seletivos Derivados da  
Estrutura 2,1,3-benzotiadiazola via Catálise Homogênea por  
Complexo de Paládio

THIAGO OLIVEIRA CARVALHO

Orientador: Brenno Amaro da Silveira Neto

Coorientador: José Raimundo Corrêa

BRASÍLIA

2017

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Thiago Oliveira Carvalho**, matrícula nº **15/0104103**, intitulada ***“Reações Intracelulares Mediadas por Espécies Ionofílicas de Paládio na Síntese de Marcadores Seletivos”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 9 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto  
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues  
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Talita de Almeida Fernandes  
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia  
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 9 de fevereiro de 2017.

Este trabalho é dedicado ao Alexandre Gustavo Soares do Prado. Gostaria que o desenvolvimento deste tenha sido suficiente para gerar algum orgulho ou satisfação para sua alma. A lembrança é diária. Saudades. Descanse em paz.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos primeiramente aos meus pais, Lourdes e Silvino, pelo amor, dedicação, educação, carinho e parceria inabaláveis. Agradeço por toda paciência que tiveram comigo, por todos ensinamentos e vida que me proporcionaram. “No supermercado de carrinho, crescer cercado de carinho”. “Agradecer o privilégio de estudar em um bom colégio. Orgulho de poder dar um mergulho para espantar o tédio. Divertido de verdade, a vida que eu quis ter tido, eu tive de verdade.”

Agradeço meus orientadores. Tive a honra de ter alguns, todos diferenciados como seres humanos e cientistas. Brenno e José Raimundo, vocês são pessoas admiráveis. Alexandre Gustavo Soares do Prado, muito obrigado. Sinto saudades.

Agradeço minha irmã Michelle, meus familiares de Sacramento e Fortaleza, são muitos os que estão no meu coração.

Agradecimento à Thatha pelo amor e pela ajuda com as ilustrações.

Muitos amigos foram importantes em vários momentos relacionados a esse trabalho. Viva Vida (especialmente meus irmãos Cássio e Nado), amizade verdadeira. Minhas amizades sinceras feitas em Alfenas: Arthur Suricato, Diogo Bugiu, Bia, Roper... Que saudades da rua Alfredo Thieres. Pântano de Manga e os amigos verdadeiros que fiz depois de adulto. Qualidade de vida eram os domingos no Pântano. Meus amigos de chá da tarde, há mais de 15 anos estudei no Santa Dorotéia e conheci amigos pro resto da vida. Jardins Suspensos, parceria da pesada!

Agradecimento também ao João Megaton e Edgar. Valeu, Fábio, pela herança e ideias trocadas. Valeu Antônio, estamos juntos. *The only good system is the sound system.*

Meus amigos de química Saulo Sheila, Pedro PP, Gabriel mendigo, cientistas do LaQuiMeT Alberto, Betinho, Gisele, Haline, Thyago. Aos cientistas Marcelo Cabra, Heibbe, Leo Paterno. Bruna Guido, muito obrigado pela paciência e experimentos na Biologia. Só quem faz ciência entende na totalidade as dificuldades. Mas avante sempre!

## SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1) Conceitos Fundamentais sobre Técnicas de Microscopia e Luminescência .....	3
2.2) Uso de Pequenas Moléculas Fluorescentes na Química Biológica .....	5
2.3) Reações Intracelulares - Dos Primeiros Relatos à Química Bioortogonal.....	9
2.4) Reações Intracelulares – Novas estratégias .....	11
2.4.1) Reações Intracelulares Mediadas por Paládio .....	16
2.5) A Partir da 2,1,3-benzotiadiazola: do Laboratório à Célula .....	18
3) MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1) Síntese do Catalisador Ionofílico de Paládio .....	29
4.2.1) Ensaio Celulares – Testes de Citotoxicidade .....	34
4.2.2) Síntese Intracelular e Imageamento – Sistema de Partida + 1-naftilamina .....	36
4.3) Caracterização do Derivado Inédito BTD-Naft Sintetizado em Laboratório .....	52
4.4) Síntese Intracelular de Outros Derivados BTD .....	55
5) CONCLUSÕES .....	61
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** A natureza da fluorescência e fosforescência está no modo como ocorre a transição eletrônica do estado excitado para o fundamental. a) absorção de energia levando o elétron a um estado excitado de maior ou menor energia, b) conversão interna para o estado  $S_1$ , c) emissão por fluorescência, d) decaimento não radiativo para o estado fundamental, e) cruzamento intersistema para o estado  $T_1$ , f) emissão por fosforescência e g) decaimento não radiativo para o estado fundamental. (adaptado da referência 50).....4
- Esquema 2.** Imagem original do pioneiro trabalho de Rideout, em 1986. O primeiro registro de reação bioortogonal, embora o conceito tenha sido criado apenas no início do século XXI.....10
- Esquema 3.** A reação de Staudinger Clássica. A azida atua como um fraco eletrófilo, tendo afinidade por nucleófilos como fosfinas. Observa-se que a fosfina atua como nucleófilo atacando a azida no nitrogênio terminal eletrofílico. O estado de transição mostra a contribuição estérea para a formação do termodinamicamente estável  $N_2$ . O intermediário instável é hidrolisado, formando oxido de fosfina e amina primária.....12
- Esquema 4.** Staudinger Ligation: a versão bioortogonal. O Ataque nucleofílico inicial da azida é a etapa determinante da velocidade. A azida reage com o éster intramolecular por meio de ciclização, formando um anel de cinco membros que passa por hidrólise formando uma ligação peptídica estável.<sup>43</sup> .....13
- Esquema 5.** A fosfina pró luminescente ligada à cumarina (A) sofre oxidação durante a ocorrência da ligação e Staudinger dando origem a produto luminescente (B). ..... 13
- Esquema 6.** Cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e alquinos, classe de reações com muitos relatos na literatura de aplicações biológicas e medicinais, incluindo métodos bioortogonais. .... 15
- Esquema 7.** Uma reação bioortogonal desejada: Primeiro ocorre a internalização de uma ou mais espécies químicas responsáveis pela reação, mas que não possuem atividade fluorescente considerável, denominando-se pró-luminescente. Apenas após a reação intracelular entre a espécie A e B é que ocorre a reação com a formação de um produto com fluorescência e, preferencialmente, seletividade desejada..... 16

<b>Esquema 8.</b> Weiss <i>et al.</i> utilizaram pró-fármacos inativos de gencitabina (à esquerda) que podem ser ativadas de forma bioortogonal para a geração do fármaco ativo (à direita) com capacidade quimioterápica para células de câncer de pâncreas. ....	18
<b>Esquema 9.</b> Síntese do catalisador ionofílico de paládio por meio da reação entre do acetato de paládio e o líquido iônico 1-N-metil-3-N-carboximetilimidazólio (MAI). Condições da reação: 110 °C por 18 horas. ....	30
<b>Esquema 10.</b> Reação bioortogonal realizada entre Br-BTD e 1-naftilamina. A reação de acoplamento cruzado formou um derivado BTD batizado de BTD-Naft. ....	42
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo catalítico proposto para a reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig, realizando pela primeira vez em ambiente celular. L= MAI complexado ao paládio. ....	44
<b>Esquema 12.</b> À esquerda o produto do sistema de partida com a 2-aminopiridina, BTD-Py e à direita o produto com o ácido fenilborônico, BTD-Ph. ....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular da quinina, produto natural com atividade fluorescente em solução aquosa. ....	5
<b>Figura 2.</b> Fórmula Estrutural de alguns marcadores biológicos que são comercializados. ....	6
<b>Figura 3.</b> Alguns aspectos importantes relacionados a luminescência. Observa-se que embora exista comportamento anti-Stokes, geralmente o comprimento de onda máximo de emissão é maior que o comprimento de onda máximo de absorção devido a perdas não radiativas e interferências supramoleculares. A diferença entre esses comprimentos de onda é denominado deslocamento de Stokes.(adaptado da referência 50).....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola. ....	19
<b>Figura 5.</b> Estruturas de derivados de BTD estudadas em publicações anteriores do nosso grupo de pesquisa. ....	20
<b>Figura 6.</b> <sup>1</sup> H RMN do catalisador PdMAI em D <sub>2</sub> O. ....	24
<b>Figura 7.</b> <sup>13</sup> C RMN do catalisador PdMAI em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ....	25
<b>Figura 8.</b> <sup>1</sup> H RMN do derivado BTD 4-naftilamina-2,1,3-benzotiadiazola, com os integrais. ....	26
<b>Figura 9.</b> <sup>13</sup> C RMN do derivado BTD 4-naftilamina-2,1,3-benzotiadiazola. ....	27
<b>Figura 10.</b> Duas possibilidades de utilização de BTD halogenada para composição do sistema de partida, que é constituído por essa espécie química juntamente com um catalisador ionofílico de paládio. ....	28
<b>Figura 11.</b> Os três reagentes dinâmicos que foram utilizados, até o momento, para a realização de reações bioortogonais com Br-BTD presente no sistema de partida. Da esquerda para a direita: 1-naftilamina, 2-aminopiridina e ácido fenilborônico.....	29
<b>Figura 12.</b> O padrão de fragmentação do íon m/z 563 bem como sua massa exata possuem correspondência precisa entre o perfil experimental e o calculado (barras cinzas). ....	31
<b>Figura 13.</b> ESI (+)-MS/MS do íon de m/z 563 transferidos de uma solução aquosa 100 µM diretamente para a fase gasosa. ....	32
<b>Figura 14.</b> A caracterização do cátion radical de m/z 283 via ESI(+)-MS/MS.....	32
<b>Figura 15.</b> ESI (+)-MS/MS do íon m/z 385 transferidos para a fase gasosa diretamente de uma solução aquosa 100 µM. ....	33

<b>Figura 16.</b> O padrão de fragmentação do íon $m/z$ 385 bem como sua massa exata possuem correspondência precisa entre o perfil experimental e o calculado (barras cinzas). .....	34
<b>Figura 17.</b> Viabilidades celulares mensuradas por ensaio MTT em células MCF-7. As células foram incubadas por 48h com soluções de 200 $\mu$ M de solução contendo Br-BTD, 20 $\mu$ M de PdMAI, e por último, com os dois compostos combinados (o sistema de partida).....	35
<b>Figura 18.</b> Viabilidades celulares mensuradas por ensaio MTT em células MCF-7. As células foram incubadas em ensaios independentes por 48h com soluções de 200 $\mu$ M de solução contendo Br-BTD ou 20 $\mu$ M de PdMAI ou as duas espécies juntas (sistema de partida), ou com os dois compostos combinados (o sistema de partida) ou com 1-naftilamina (reagente secundário) ou com todos os componentes da reação bioortogonal. ....	36
<b>Figura 19.</b> Células da linhagem MCF-7, de câncer de mama, após 48 horas de incubação com o sistema de partida. (A) Microscopia de campo claro demonstra a morfologia intacta e saudável das células. (B) Mostra os núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) Imagem mostra a ausência de fluorescência satisfatória, sendo possivelmente oriunda de ruídos e auto luminescência da célula. (D) Sobreposição das imagens referentes a marcação com DAPI (canal azul) e sistema de partida (canal vermelho).....	38
<b>Figura 20.</b> Células da linhagem MCF-7, de câncer de mama, após 48 horas de incubação com reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) Microscopia de campo claro demonstra a morfologia intacta e saudável das células. (B) Mostra os núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) Imagem mostra a ausência de fluorescência satisfatória, sendo possivelmente oriunda de ruídos e auto luminescência da célula. (D) Sobreposição das imagens referentes a marcação com DAPI (canal azul) e reagente dinâmico 1-naftilamina. ....	40
<b>Figura 21.</b> Células MCF-7, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTD capaz de atuar como marcador celular com eficiência quântica satisfatória. (D) superposição das imagens referentes a	

marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTB formado de maneira bioortogonal. As setas indicam a região mitocondrial. .... 41

**Figura 22.** Método bioortogonal desenvolvido no presente trabalho. Em (1) ocorre a incubação do sistema de partida na cultura celular. Em (2) ocorre a transposição do sistema de partida através da membrana para o meio intracelular. Após a lavagem das células, em (3) ocorre a incubação do reagente dinâmico e em (4) ocorre a reação bioortogonal com formação do produto luminescente..... 43

**Figura 23.** Células MCF-7 em ensaios com o marcador comercial mitoracker (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra o padrão de marcação referente a mitocôndrias e (D) mostra superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e mitotracker..... 46

**Figura 24.** Ensaio de co-marcação da BTB-Naft com o marcador splendor anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e de afinidade comprovada para mitocôndria. É notável a morfologia e comportamento semelhantes, o que sugere que a BTB-Naft sintetizada de maneira bioortogonal tem seletividade para esta organela. (A) demonstra a morfologia saudável por meio da técnica de campo claro, (C) sugere o comportamento seletivo para mitocôndrias quando comparado à marcação com (B) que é somente splendor. (D) mostra que a superposição da marcação de BTB-Naft e splendor tem o mesmo padrão de comportamento. .... 47

**Figura 25.** Células da linhagem DU145, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTB-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTB-Naft formado de maneira bioortogonal. As setas indicam a região mitocondrial..... 49

**Figura 26.** Células da linhagem MDAMB231, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTB-Naft. (D) superposição das imagens

referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BT-D-Naft. A morfologia sugere comportamento seletivo para mitocôndria. ....	50
<b>Figura 27.</b> Células da linhagem T47D, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BT-D-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BT-D-Naft, com comportamento que sugere seletividade para mitocôndria. ....	51
<b>Figura 28.</b> Células de fibroblasto sob as condições de reação bioortogonal entre sistema de partida e 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BT-D-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BT-D-Naft, que encontra-se mais disperso no citosol. ....	52
<b>Figura 29.</b> Solução de 3mg de BT-D-Naft solubilizada em dmsol. ....	53
<b>Figura 30.</b> <sup>13</sup> C RMN do derivado BT-D-Naft sintetizado em laboratório, como uma evidência da confirmação da estrutura formada pelo método bioortogonal. ....	53
<b>Figura 31.</b> <sup>1</sup> H RMN do derivado BT-D-Naft sintetizado em laboratório, como uma evidência da confirmação da estrutura formada pelo método bioortogonal. ....	54
<b>Figura 32.</b> Ensaios fotofísicos realizados mostram as curvas de absorção e emissão para o derivado BT-D-Naft sintetizado em laboratório. ....	54
<b>Figura 33.</b> Perfil fotofísico de absorção e emissão do mitotracker mostra um deslocamento de Stokes consideravelmente inferior ao do derivado BT-D-Naft desenvolvido. A curva em azul é referente a absorção e a curva em vermelho é referente a emissão. <sup>81</sup> ....	55
<b>Figura 34.</b> Células MCF-7 de câncer de mama vivas com os compostos fluorescentes formados por meio do método intracelular, após 6 horas. Em (A) e (C) são células com respectivamente BT-D-Py e BT-D-Ph. As setas sugerem morfologicamente a distribuição mitocondrial. A distribuição sugere que BT-D-Py tem tendência a seletividade mitocondrial, enquanto BT-D-Ph não demonstra a mesmo comportamento. Barra de escala 25 µm. ....	57

**Figura 35.** Células MCF-7 de câncer de mama vivas com os compostos fluorescentes após 24 horas. As colunas verticais iniciadas em (A) e (D) são células com respectivamente BTD-Py e BTD-Ph. As setas sugerem a distribuição mitocondrial dentro das células e as meia setas indicam a não interferência da atividade da pseudo-organela com os processos de divisão celular. (B) e (E) mostram os núcleos marcados com o marcador comercial DAPI. (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste, com os respectivos painéis. Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ . ..... 58

**Figura 36.** Células MCF-7 de câncer de mama vivas com os compostos fluorescentes formados *in cellulo* após 48 horas. As colunas verticais iniciadas em (A) e (D) são células marcadas respectivamente com BTD-Py e BTD-Ph. As setas sugerem a distribuição mitocondrial dentro das células. (B) e (E) mostram os núcleos marcados com o marcador comercial DAPI. (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste, com os respectivos painéis. Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ . ..... 59

**Figura 37.** Experimento de co-marcação utilizando Mitotracker. Em (A) e (C) estão expostas as imagens de confocal e campo claro para o produto formado BTD-Py. Em (B) e (D) as células estão marcadas com Mitotracker Red. Nota-se um comportamento análogo, sugerindo a seletividade para mitocôndria. As setas indicam a distribuição mitocondrial perinuclear. A letra N indica a posição dos núcleos. .... 60

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

**AOG** – N-amino-N-1-octilguanidina

**BODIPY** - *Boron difluoride dipyrromethene*

**BTD** – 2,1,3-benzotiadiazola

**Br-BTD** – 4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola

**BTD-Naft** – 1-naftilamina acoplada à 2,1,3-benzotiadiazola na posição 4.

**Cascade Blue** - *Acetic acid, [(3,6,8-trisulfo-1-pyrenyl)oxy]*

**DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenilindolphenylindol)

**DHA** - Ácido docosa-hexaenóico

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DU145** – Linhagem celular de câncer de próstata

**ESI** – Ionização por electrospray

**GFP** – *Green fluorescent protein*

**MAI** - 1-metil-3-carboximetilimidazol

**MCF-7** – Linhagem celular de câncer de mama

**MDAMB231** – Linhagem celular de câncer de mama

**Mitotracker** - *1H,5H,11H,15H-Xantheno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizin-18-ium, 9-[4-(chloromethyl)phenyl]-2,3,6,7,12,13,16,17-octahydro-, chloride*

**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

**PdMAI** - -metil-3-carboximetilimidazol complexado ao centro de paládio

**T47D** – Linhagem celular de câncer de mama

## RESUMO

O desenvolvimento de pequenas moléculas fluorescentes que sejam capazes de atuar como sonda no acompanhamento e monitoramento de moléculas, biomoléculas e organelas, é um campo da Química estratégico e fundamental. A literatura recente respalda a emergente utilização de derivados da estrutura 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) para essa aplicação. O presente trabalho apresenta um método versátil de síntese intracelular de derivados fluorescentes BTD a partir de sistemas desenvolvidos e definidos que possuem apenas capacidade pró-luminescente. Partindo de um sistema constituído por uma espécie BTD halogenada e um catalisador ionofílico de paládio solúvel em água, e portanto, em ambiente celular, é possível a síntese, por meio de reações e acoplamento-cruzado, de diferentes estruturas no citoplasma sem que haja prejuízo considerável na saúde celular. A tecnologia, inspirada na química bioortogonal, permitiu a obtenção de resultados que até o momento permitem concluir que a síntese intracelular é possível, com a formação de estruturas que possuem eficiência quântica satisfatória para ensaios de imageamento celular, comportamento seletivo. É notável que a tecnologia desenvolvida abrevia todas as etapas convencionais, estando à luz da química verde.

**Palavras chave:** Intracelular. Bioortogonal. Imageamento. Biosonda. Luminescente. BTD.

## ABSTRACT

The development of small fluorescent molecules that are capable of acting as a probe in the accompaniment and monitoring of molecules, biomolecules and organelles, is a strategic and fundamental area of Chemistry. Recent literature supports the emergent application of 2,1,3-benzothiadiazole (BTD). This work presents a versatile method of intracellular synthesis of fluorescent BTD derivatives from systems developed and defined that have only pro-luminescent capacity. Starting from a system consisting of a halogenated BTD species and a water soluble palladium ionophilic catalyst, therefore, soluble in a cellular environment, it is possible to synthesize, by cross-coupling reactions, different structures into cytoplasm without any considerable damage to cellular health. The technology, inspired on bioorthogonal chemistry, has allowed data to conclude that intracellular synthesis is possible, with formation of structures that constitute a satisfactory probe for cell imaging and selective behavior. It is remarkable that the developed technology shortens the steps of conventional methods, being in the light of green chemistry.

**Keywords:** Intracellular. Bioorthogonal. Bioimaging. Probe. Luminescent. BTD.

## 1) INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O uso de pequenas moléculas fluorescentes ou mesmo pró fluorescentes com aplicação biológica é um tópico de interesse atual e encontra-se na interface entre as ciências químicas e biológicas.<sup>1</sup>

Essas moléculas fluorescentes são frequentemente utilizadas como ferramentas de investigação em processos celulares, e podem ser obtidas por meio de diversas técnicas, ou mesmo a partir de fontes comerciais, para uso como marcadores celulares aplicados em estudos de células vivas.<sup>2</sup>

Hodiernamente existe no mercado uma variedade de marcadores biológicos destinados ao imageamento de estruturas celulares. Entretanto, algumas desvantagens são evidenciadas, desde a síntese de alguns desses compostos em laboratório ou indústria, ou quando inseridos em meios biológicos. Dentre as principais limitações, destacam-se a baixa estabilidade de alguns desses compostos, a toxicidade em meio celular, a baixa propriedade fotoluminescente, a pouca seletividade em relação aos sítios alvo de aplicação, citando-se também o alto custo de todo o processo, desde a obtenção.<sup>2</sup>

Nesse contexto destaca-se principalmente a emergente utilização de derivados do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola nos estudos de bioimageamento. Os derivados dessa estrutura fundamental apresentam resultados satisfatórios e eficientes não obstante às muitas das desvantagens citadas. Naturalmente, é essencial que exista um constante desenvolvimento de tecnologias e técnicas que sejam capazes de superar as limitações e dificuldades existentes, ao mesmo tempo em que sejam capazes de contemplar demandas da sociedade, como o interesse sobre a investigação de processos celulares. Também é um fator motivacional nos campos de pesquisa, gerar melhorias e soluções mais acessíveis e de baixo custo, aumentando assim o retorno da ciência à sociedade.<sup>2-4</sup>

É notável que não só a arquitetura de novas moléculas fluorescentes se faz necessária, como também é o desenvolvimento de novos métodos de investigação biológica. Assim, enquanto a literatura científica recente respalda o uso de derivados da estrutura 2,1,3-benzotiadiazola em aplicação biológica, todos os estudos biológicos não relacionados ao presente trabalho envolvendo esses derivados, ou mesmo em ensaios com marcadores obtidos comercialmente, são realizados incubando-se esses compostos em células vivas, após serem sintetizados em laboratório ou indústria.

Assim, o presente trabalho é o resultado de um conjunto de ideias, métodos, testes e resultados que configuram o primeiro relato sobre a síntese de derivados da estrutura 2,1,3-benzotiadiazola em meio intracelular. Essa metodologia de síntese intracelular de marcadores biológicos é fundamentada em dois pilares:

- A eficiência do uso biológico desses derivados já descrita na literatura;
- O conjunto de trabalhos e técnicas desenvolvidas principalmente no presente século que objetiva a realização de reações químicas no interior de células vivas, e denomina-se Química Bioortogonal.

A síntese de moléculas fluorescentes em ambiente celular expande a aplicação biológica dos marcadores, tornando possível a realização de investigações mais amplas. Por meio de uma técnica viável, capaz de superar ou contornar desvantagens e dificuldades como por exemplo aquelas relacionadas à passagem de compostos através da membrana plasmática, construindo também um cenário propenso a novas descobertas e compreensão sobre organismos vivos.

Nesse cenário, as discussões e descrições que sucedem o presente trabalho objetivam:

- Apresentar uma metodologia viável e versátil para estudos de células vivas, sendo descrito um método de arquitetura intracelular de moléculas fluorescentes, à partir de espécies pró-luminescentes, que possibilite a síntese de diversos derivados da estrutura 2,1,3-benzotiadiazola.
- O método vai ao encontro dos princípios da Química Verde, sendo comprometido com o desenvolvimento sustentável, realizando economia atômica e energética, por meio de uma inédita catálise homogênea intracelular promovida por espécies de paládio solúveis em água.
- Tornar público um método alternativo e mais econômico, possibilitando que mais grupos de pesquisa tenham possibilidade de realizar investigações biológicas.

## **2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1) Conceitos Fundamentais sobre Técnicas de Microscopia e Luminescência**

O interesse em pesquisas capazes de gerar melhorias e soluções de problemas para os indivíduos e o meio ambiente é consequência da intrínseca relação entre ciência, tecnologia e sociedade.<sup>5</sup> Tal relação é, portanto, força motriz para investigação de diversos processos químicos e bioquímicos.

É um notável desafio tecnológico a observação das células e suas estruturas. Muito por consequência de sua escala de tamanho, e foco de diversas técnicas de microscopia. Desde sua invenção e início do desenvolvimento, a microscopia óptica é a de mais amplo emprego para estudo de amostras biológicas, e envolve a passagem de luz visível que atravessa a amostra, ou é refletida por ela, para uma ou várias lentes, aumentando assim a magnitude da visão em até aproximadamente 1500 vezes.<sup>6</sup>

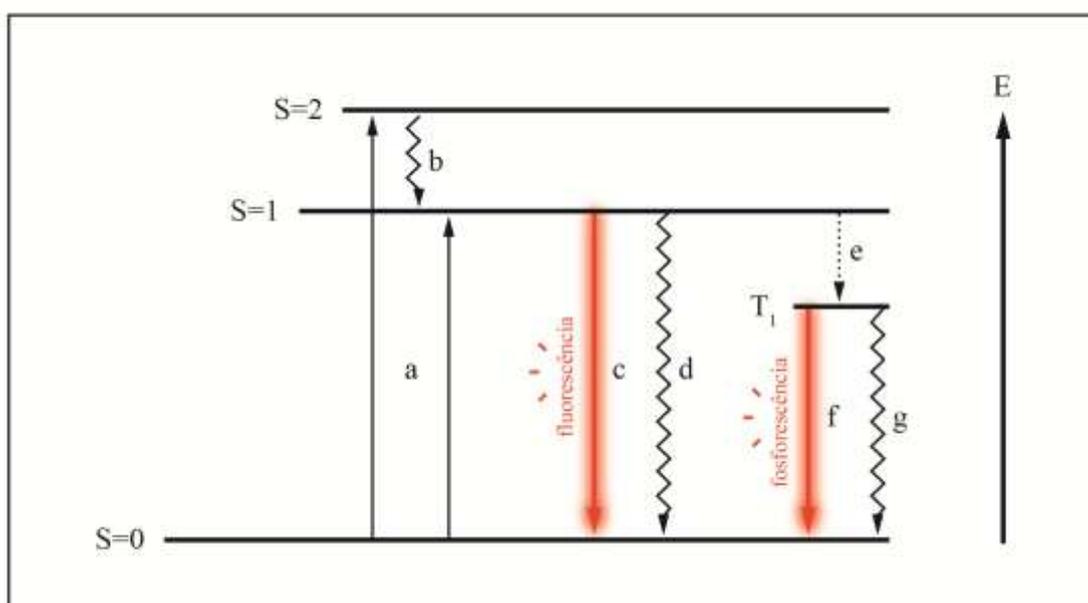
À parte de seu amplo uso, a técnica de microscopia óptica possui limitações que afetam particularmente o estudo de células vivas, que não possuem contraste suficiente para serem visualizadas com sucesso, assim como suas estruturas internas também são incolores e transparentes. Muitas técnicas de contraste celular envolvem a morte e fixação da célula, ou quando isso não ocorre, muitos dos corantes utilizados no mercado interferem na atividade celular, invalidando o método de estudo.

Nesse contexto, a microscopia de fluorescência é uma técnica óptica que utiliza compostos fluorescentes como fonte de contraste. Os compostos com atividade fotoluminescente podem ser fluorescentes ou fosforescentes, embora ambos emitam fótons após os elétrons estabilizarem-se a partir de um estado excitado.

A emissão por fluorescência ocorre em uma estrutura eletrônica molecular que absorveu energia de uma fonte luminosa. Na maioria dos casos, a luz emitida tem um comprimento de onda maior, e portanto, energia menor que a radiação absorvida. Essa característica possibilita aferir a diferença entre as posições das bandas de máxima absorção e emissão de uma mesma transição eletrônica, sendo conhecido como deslocamento de Stokes.

A fluorescência ocorre quando o elétron presente em um orbital molecular relaxa para seu estado fundamental emitindo fóton após ter sido excitado por uma fonte

luminosa. A fosforescência é um tipo específico de luminescência, pois a estrutura química não reemite imediatamente a radiação absorvida, pois a excitação para um estado de maior energia é acompanhada pela mudança no estado de spin. Uma vez que encontra-se em outro estado de spin, os elétrons não podem relaxar para o estado fundamental imediatamente, pois em um primeiro momento a emissão envolve um estado proibido de energia. Como o retorno ao estado fundamental é lento em certos materiais, a radiação absorvida pode ser emitida em uma intensidade inferior por várias horas após a excitação inicial. O mecanismo eletrônico relacionado ao fenômeno da luminescência está ilustrado no Esquema 1 .



**Esquema 4.** A natureza da fluorescência e fosforescência está no modo como ocorre a transição eletrônica do estado excitado para o fundamental. a) absorção de energia levando o elétron a um estado excitado de maior ou menor energia, b) conversão interna para o estado  $S_1$ , c) emissão por fluorescência, d) decaimento não radiativo para o estado fundamental, e) cruzamento intersistema para o estado  $T_1$ , f) emissão por fosforescência e g) decaimento não radiativo para o estado fundamental. (adaptado da referência 50)

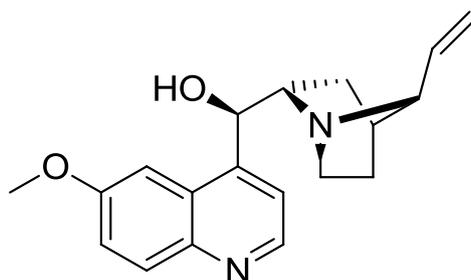
À luz dessa discussão, fica evidente a necessidade de um maior entendimento e desenvolvimento de sondas fluorescentes, especialmente os quimiossensores e biossensores, que diferem unicamente de sua origem abiótica ou biótica, são de

interesse para os estudos celulares.<sup>7</sup> Sondas celulares tem seu uso consolidado, com empresas envolvidas desde a síntese à comercialização desses produtos, embora muitos tenham limitações relevantes como: degradação do composto, citotoxicidade, formação de agregados e insolubilidade em condições biológicas. Além disso o elevado custo da obtenção comercial desses marcadores somado aos custos adicionais relacionados aos ensaios biológicos torna menos acessível e possível a realização de pesquisas relacionadas, em qualquer parte do mundo.

## 2.2) Uso de Pequenas Moléculas Fluorescentes na Química Biológica

Nos diversos objetos de estudo relacionados à química biológica, pequenas moléculas fluorescentes tornaram-se ferramentas centrais nos processos investigativos acerca da marcação e monitoramento de biomoléculas, substratos e enzimas, indicadores de condições biológicas e marcadores celulares.<sup>8</sup>

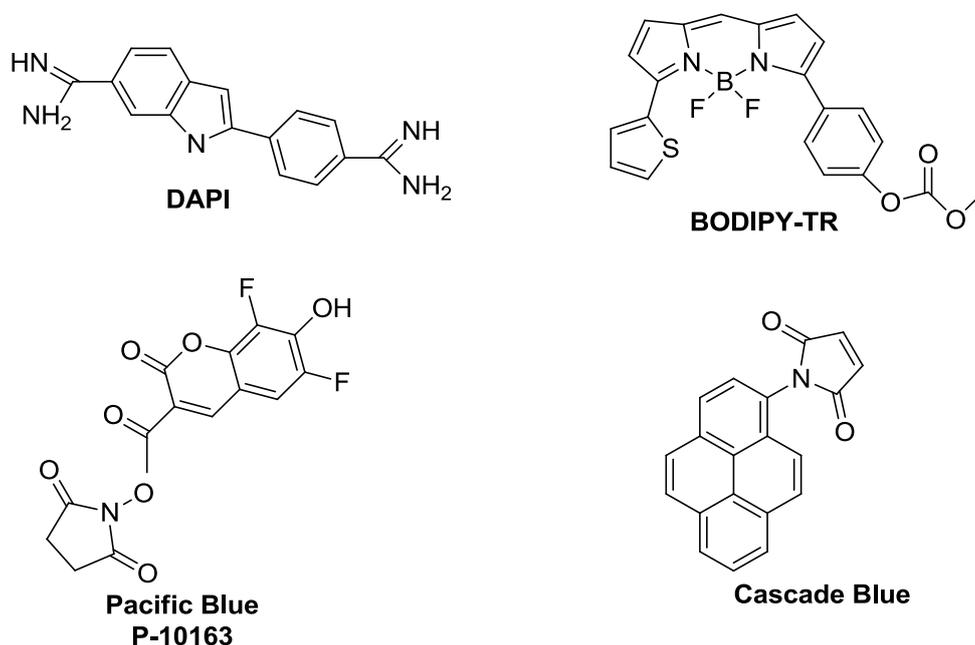
A primeira molécula fluorescente descrita cientificamente foi a quinina, produto natural ilustrado na Figura 1. A quinina teve papel importante no desenvolvimento de conceitos relacionados às moléculas com estruturas cromóforas, com o relato da emissão no visível de soluções aquosas de quinina, em 1845.<sup>9</sup>



**Figura 1.** Estrutura molecular da quinina, produto natural com atividade fluorescente em solução aquosa.

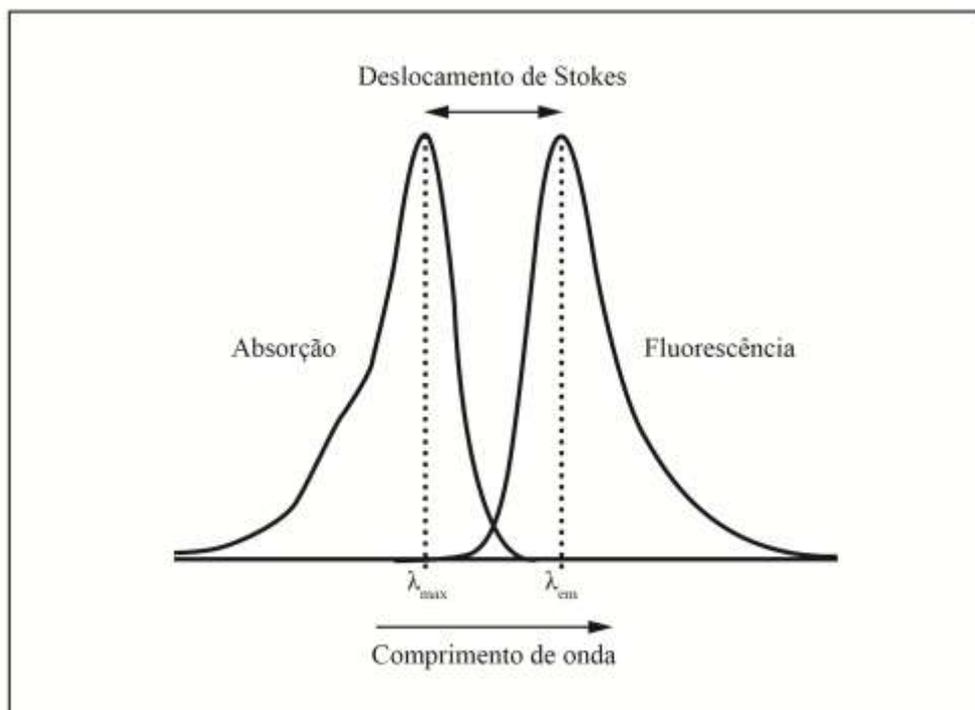
Nesse contexto, a definição de fluorescência e o entendimento da relação entre absorção e emissão de luz envolvidas nesse fenômeno foram dadas por Stokes, sete anos depois.<sup>10</sup>

Desses relatos iniciais aos dias de hoje, muitas moléculas e espécies com grupos cromóforos e atividade fluorogênica ou fluorescente foram desenvolvidas, destacando as GFP's,<sup>11</sup> os *quantum dots*,<sup>12-14</sup> e a emergente utilização derivados BTD.<sup>2</sup> Atualmente existe no mercado uma variedade de marcadores biológicos destinado ao imageamento de estruturas celulares tais como Pacific Blue P-10163, derivado da cumarina, o BODIPY-TR, o Cascade Blue, derivado do pireno, o DAPI, derivado indólico. Alguns marcadores celulares que podem ser obtidos de fonte comercial, tem sua fórmula estrutural representada na Figura 2.



**Figura 2.** Fórmula Estrutural de alguns marcadores biológicos que são comercializados.

A Figura 3 demonstra alguns conceitos fundamentais relacionados às estruturas de compostos fluorescentes. O comprimento de onda máximo de absorção tem natureza na transição energética entre um elétron no estado fundamental e um estado de mais alta energia. A absorvidade de uma substância é definido pela lei Beer-Lambert. Após o processo de absorção de energia, observa-se o fenômeno da emissão, situado em uma posição de maior comprimento de onda devido a perdas não radiativas de energia.<sup>8</sup>



**Figura 3.** Alguns aspectos importantes relacionados a luminescência. Observa-se que embora exista comportamento anti-Stokes, geralmente o comprimento de onda máximo de emissão é maior que o comprimento de onda máximo de absorção devido a perdas não radiativas e interferências supramoleculares. A diferença entre esses comprimentos de onda é denominado deslocamento de Stokes.(adaptado da referência 50).

A diferença entre os comprimentos de onda máximos de absorção e emissão é definido como deslocamento de Stokes.<sup>8</sup> Esse conceito é importante para a aplicação biológica desses compostos, pois tem influência direta na qualidade das imagens obtidas. Fluoróforos com baixos valores de deslocamento de Stokes geram imagens com maiores ruídos e também estão mais suscetíveis ao *self-quenching* por transferência de energia, limitando os sítios que podem atacar um alvo.<sup>15</sup> Outra propriedade importante de um fluoróforo é o rendimento quântico  $\phi$ , que é essencialmente uma razão entre os fótons emitidos e absorvidos.<sup>8</sup>

Além disso, é importante considerar o efeito que alguns compostos fluorescentes naturalmente presentes nos seres vivos geram no bioimageamento e ensaios celulares. A observação dessa luminescência natural, de intensidade baixa, é denominada autofluorescência. Marcadores biológicos com eficiência quântica satisfatória e que

apresentam comprimento de onda de emissão mais deslocado para o vermelho, em geral são mais úteis para contornar ruídos de fundo, incluindo a já citada autofluorescência.<sup>16</sup>

Entretanto, algumas desvantagens são evidenciadas quanto à síntese de alguns desses compostos fotoluminescentes, ou quando inseridos em meios biológicos. Dentre as principais limitações destacam-se a baixa estabilidade de seus compostos, a toxicidade ao meio celular, a baixa propriedade fotoluminescente, a pouca especificidade em relação aos sítios alvo de aplicação, além da necessidade de posterior incubação em meio celular, caracterizando-se como um processo dispendioso.<sup>2</sup>

Ainda em relação à posterior incubação dos compostos sintetizados em meio extracelular, existem outras significativas desvantagem no que diz respeito à eficiência do processo de interiorização celular como a segurança e preservação do meio intracelular.

Como forma de minimizar as limitações descritas e desenvolver marcadores celulares eficientes, as espécies com potencial aplicação devem contemplar características e propriedades fundamentais que corroborem com a baixa citotoxicidade, a seletividade por organelas, a eficiência no transporte através de membranas celulares além de uma larga estabilidade química e propriedades fotofísicas satisfatórias para aplicações em técnicas microscópicas.

Na década de 1990 a abordagem e técnica se aprofundaram, dando os primeiros passos na modificação de proteínas para uso como biosondas.<sup>17</sup>

Um exemplo didático nos dias de hoje acerca do uso de proteínas fluorescentes como biosonda ficou popularizado como GFP (*Green Fluorescent Protein*). Elas existem há milhões de anos em algumas espécies do filo cnidário, com a água viva *Aequorea victoria*,<sup>18</sup> tendo sido isolada pela primeira vez na década de 60 por Shimomura, que também identificou o grupo cromóforo dessa proteína.<sup>11</sup>

Essa classe de biosonda tornou-se ferramenta essencial na investigação da localização, dinâmica, e interações entre proteínas e organismos.<sup>19-21</sup> Um dos fatores que impulsionaram o uso das proteínas fluorescentes nos estudos bioquímicos, foi a associação da GFP com o gene que a codifica, por meio de técnicas de biologia molecular, formando estruturas denominadas proteínas de fusão.<sup>22</sup> A importância das proteínas de fluorescência, em especial as GFP, e seus usos como biosonda, foi reconhecida e laureada com o Prêmio Nobel de 2008.<sup>23</sup>

Embora essas proteínas sejam sintetizadas por meio de técnicas de engenharia molecular para somente depois serem aplicadas em organismos vivos para executarem a tarefa de sonda biológica, existem alguns relatos de reações químicas intracelulares envolvendo essas proteínas em ambiente celular.<sup>24-26</sup>

Infelizmente, o uso de proteínas fluorescentes para estudos biológicos apresenta algumas limitações. Muitas biomoléculas e estruturas que compõem organismos, como ácidos nucleicos, lipídios, organelas, não podem ser monitorados pelo uso dessas biosondas.<sup>27</sup> Além disso, o grande tamanho dessas proteínas fluorescentes também pode interferir na funcionalidade das proteínas de fusão.<sup>28</sup>

Ponderando esses fatos, é fundamental o constante desenvolvimento de tecnologias e técnicas que superem essas limitações e dificuldades existentes, ao mesmo tempo em que sejam capazes de contemplar a demanda e interesse da sociedade sobre processos celulares. Os métodos intracelulares, incluindo os bioortogonais que serão adiante definidos, aliados ao desenvolvimento de novas moléculas fluorescentes são poderosas ferramentas na investigação e entendimento de diversos processos biológicos.

### **2.3) Reações Intracelulares - Dos Primeiros Relatos à Química Bioortogonal**

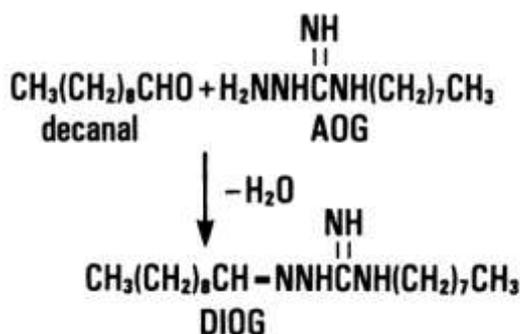
As investigações acerca dos vastos fenômenos celulares a nível molecular pode ser fascinante, e intrínseca a complexidade dos sistemas biológicos é a impetuosa tarefa de desenvolver metodologias que possibilitem as pesquisas.<sup>1</sup> É relevante que muitos processos bioquímicos careçam de elucidação, e que a compreensão desses mecanismos correlaciona-se com as possibilidades de tratamento de doenças associadas a defeitos na atividade e nas estruturas celulares, como mal de Alzheimer<sup>29-31</sup> e câncer.<sup>32</sup>

Assim, a última década tem evidenciado o desenvolvimento intenso de ferramentas químicas com potencial uso em investigações e manipulações de processos biológicos em sistemas vivos.<sup>33</sup> Embora a realização de reações químicas em ambientes biológicos tenha sido reportada de forma pontual nas décadas de 80 e 90, foi somente no início do século XXI, com a formalização da Química Bioortogonal, que essa estratégia passou a ser explorada de maneira vultosa<sup>33,34</sup> Dessa forma, o termo bioortogonal refere-se ao planejamento e realização de reações química no interior de

sistemas vivos, sem que ocorra interferência, por parte de qualquer componente do sistema, nos processos bioquímicos naturais do meio.<sup>35</sup>

Pesquisas sobre as diferenças bioquímicas entre células normais e células tumorais estão presentes na literatura científica há mais de 40 anos,<sup>36</sup> permanecendo como um tópico atual até os dias de hoje.<sup>37</sup> Entre as muitas razões para isso é que os métodos de quimioterapia utilizam agentes que exibem considerável citotoxicidade também sobre as células saudáveis.<sup>38</sup>

Foi nesse contexto que, em 1986, Rideout mediou a lise de eritrócitos em condições fisiológicas a partir de uma mistura de decanal e N-amino-N-1-octilguanidina (AOG), de acordo com o Esquema 2.<sup>39</sup> Ele notou que a lise não ocorria quando os reagentes eram incubados com somente uma das espécies participantes, e essa evidência aliada a dados de absorvância, levou ao registro do primeiro relato científico relacionado ao desenvolvimento de reações químicas em ambientes vivos.<sup>39,40</sup>



**Esquema 5.** Imagem original do pioneiro trabalho de Rideout, em 1986. O primeiro registro de reação bioortogonal, embora o conceito tenha sido criado apenas no início do século XXI.

Assim, embora a Química Bioortogonal tenha se desenvolvido historicamente a partir de fundamentos relacionados principalmente ao uso de proteínas fluorescentes e proteínas de fusão, ocorreu também, ao longo da evolução de seus conceitos e técnicas, o desenvolvimento de transformações bioortogonais envolvendo grupos e compostos não naturais que possibilitassem o estudo da dinâmica, de estruturas e biomoléculas que não podem ser monitoradas por biosondas essencialmente formadas por proteínas fluorescentes. Os trabalhos desenvolvidos por Sletten e Bertozzi, acrescentaram descobertas e conhecimentos muito relevantes nesse campo de estudo,

com o desenvolvimento de reações seletivas em ambiente celular que objetivam a superação de limitações e o estudo cada vez mais amplo e robusto dos fenômenos naturais de um organismo.<sup>34,40-42</sup>

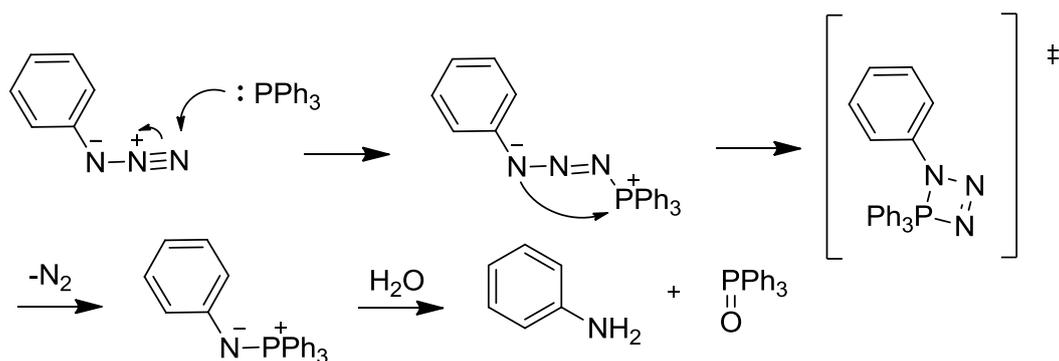
#### **2.4) Reações Intracelulares – Novas estratégias**

Os sistemas vivos possuem minuciosas redes de interações, estabelecidas por meio de processos bioquímicos de transferência de elétrons, ácido-base, reações estequiométricas, catalíticas, e outras.<sup>43</sup>

Novas estratégias baseadas em reações químicas realizadas no interior de organismos vivos, utilizando componentes incapazes de interferir na atividade biológica celular é uma poderosa ferramenta na compreensão de processos celulares. Com extensa aplicação em estudos, desenvolvimento de fármacos e compostos que só atuem em um tecido alvo, conseqüentemente diminuindo efeitos colaterais, são apenas exemplos no vasto campo de possibilidade.

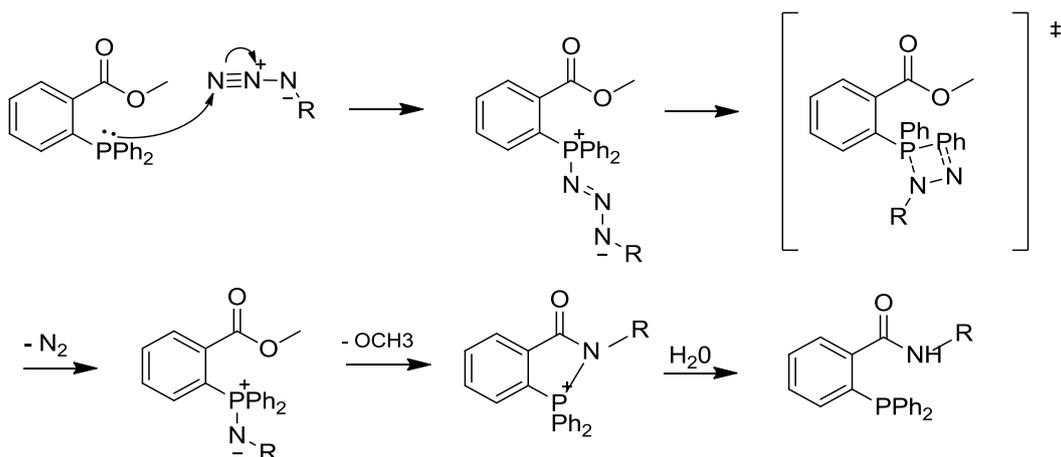
Entre aquelas metodologias bioortogonais que não estão relacionadas ao uso de proteínas fluorescentes ou de modificação de aminoácidos e proteínas, destaca-se historicamente o desenvolvimento do método *Staudinger Ligation*, caracterizado pela reação entre azidas e tri-aryl-fosfinas. Diferentemente dos exemplos discutidos até aqui, esse método que utiliza azidas que são grupos totalmente ausentes nos sistemas biológicos.<sup>44</sup> Além disso, o grupo azida é pequeno, diferentemente dos métodos envolvendo proteínas, interferindo minimamente nas propriedades do composto ou alvo modificado. Mesmo com essas propriedades favoráveis, as azidas não foram exploradas em sistemas biológicos, até que no ano 2000 foi desenvolvido um substrato adequado para a reação com azidas com fins de estudos biológicos.<sup>45</sup>

O método *Staudinger Ligation* foi inspirado na clássica reação de redução de Staudinger, entre azidas e tri-fenil-fosfinas.<sup>46</sup> De acordo com o Esquema 6, a estratégia utiliza a azida como um fraco eletrófilo e a fosfina como nucleófilo.



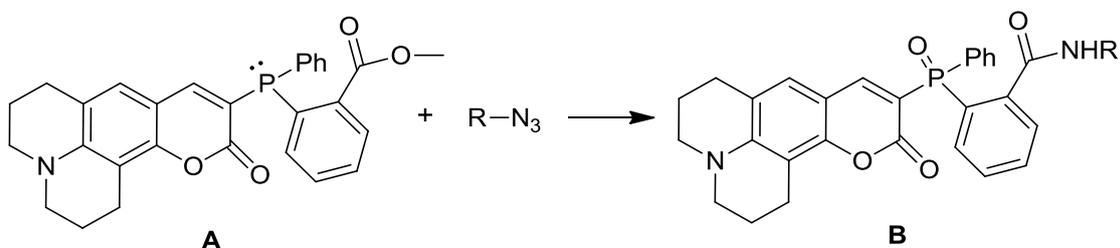
**Esquema 6.** A reação de Staudinger Clássica. A azida atua como um fraco eletrófilo, tendo afinidade por nucleófilos como fosfinas. Observa-se que a fosfina atua como nucleófilo atacando a azida no nitrogênio terminal eletrofílico. O estado de transição mostra a contribuição estérea para a formação do termodinamicamente estável  $\text{N}_2$ . O intermediário instável é hidrolisado, formando oxido de fosfina e amina primária.

Contudo, essa reação não tem aplicação útil ou inovadora para finalidades bioortogonais, pois a hidrólise causa a quebra de ligação covalente, modificando a composição das espécies, o que interfere na atividade biológica existente, além de afetar a característica fluorescente do produto. Por isso, essa reação foi modificada, incluindo um grupo éster na posição orto em relação ao átomo de fósforo para dirigir a reação por um novo caminho reacional, formando uma ligação peptídica estável, como observado no Esquema 7.



**Esquema 7.** Staudinger Ligation: a versão bioortogonal. O Ataque nucleofílico inicial da azida é a etapa determinante da velocidade. A ilida reage com o éster intramolecular por meio de ciclização, formando um anel de cinco membros que passa por hidrólise formando uma ligação peptídica estável.<sup>45</sup>

Um atrativo da ligação de Staudinger é que ele utiliza espécies reagentes com propriedades fluorogênicas e levam a formação de um produto luminescente que pode ser usado para fazer estudos de imageamento em tempo real. Por exemplo, Lemieux *et al.*, em 2003, reportaram que uma fosfina substituída por uma cumarina, conforme o Esquema 8. A fluorescência da espécie A é limitada devido a um efeito de *quench* devido ao par isolado de elétrons do átomo de fósforo. No entanto, a oxidação dessa espécie ao longo do curso da reação de ligação de Staudinger retira esse efeito de *quench* formando o produto B, com alto rendimento quântico e conseqüentemente alta intensidade de fluorescência.



**Esquema 8.** A fosfina pró luminescente ligada à cumarina (A) sofre oxidação durante a ocorrência da ligação e Staudinger dando origem a produto luminescente (B).

Mesmo que esse método tenha representado um grande avanço ao propulsionar as investigações relacionadas à Química Bioortogonal, também existem limitações relacionadas. Por exemplo, fosfinas reagirem sob as condições oxidativas de sistemas vivos, mesmo que lentamente. Além disso, a cinética dessa reação é razoavelmente lenta. Essa taxa cinética pode ser melhorada por meio da adição de grupos doadores de elétrons na fosfina, mas esse recurso também aumenta a taxa de oxidação do composto. Essa reação estequiométrica também requer altas concentrações de fosfina que geram ruídos de fundo no imageamento celular.<sup>47</sup>

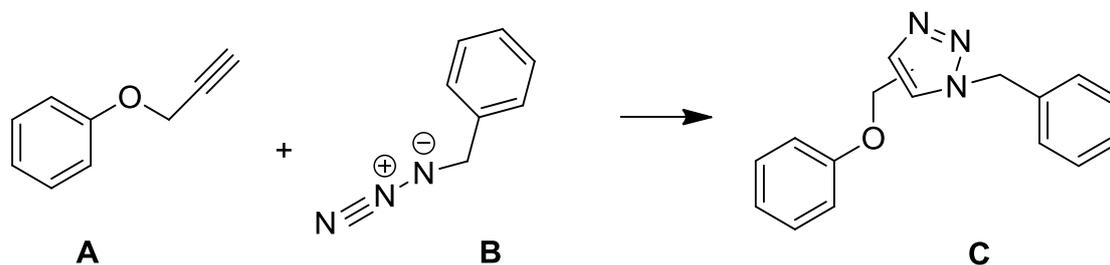
Outro exemplo de classe de reações que tornaram-se relevantes para a Química Bioortogonal na última década é a reação azida-alquino catalisada por espécies de cobre. Denomina-se *click chemistry* um conjunto de reações mediadas principalmente por espécies de cobre e que por definição vai ao encontro das seguintes características:<sup>48</sup>

- Objetiva o desenvolvimento de reações de acoplamento carbono-heteroátomo, úteis em pequena ou grande escala.
- Ampla em possibilidades, bom rendimento, geração de subprodutos não abrasivos.
- A estereosseletividade é um fator importante em *click chemistry*.
- Condições simples de reação, materiais de partida de fácil aquisição, utilização de nenhum solvente ou um solvente verde como água.
- Quando necessário o produto deve ser separado por métodos simples como recristalização ou destilação, não sendo por método cromatográfico.
- O produto deve ser estável em condições fisiológicas.

Devido essas características, é notável que essas reações tenham atributos apreciáveis para aplicação biológica. De fato, as reações *click chemistry* bioortogonais devem ter todos os requisitos mencionados acima, e adicionalmente, os sistemas e espécies envolvidos não devem interagir com alguma funcionalidade biológica, e devem ocorrer em condições fisiológicas. Além disso, nenhuma espécie deve ter citotoxicidade suficiente para alterar de maneira considerável a saúde celular.<sup>49</sup>

Algumas reações *click chemistry*, como o exemplo ilustrado no Esquema 9, podem ter utilidade em investigações medicinais e biológicas. Esse é o caso das adições

1,3-dipolar, com extensa possibilidade de aplicação relacionada à química bioortogonal ou mesmo em diversos relatos de uso medicinal.<sup>50</sup>



**Esquema 9.** Cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e alquinos, classe de reações com muitos relatos na literatura de aplicações biológicas e medicinais, incluindo métodos bioortogonais.

Saindo das sombras das limitações iniciais, de 2003, ano em que Bertozzi fez seu pioneiro trabalho, aos dias atuais, vieram à luz progressos consideráveis relacionados a reações bioortogonais, destacando-se:

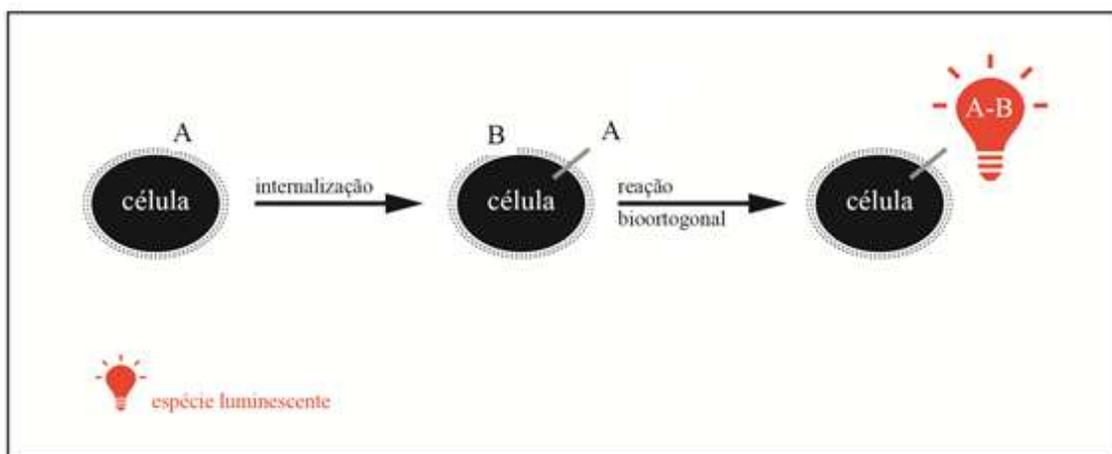
- Otimização da cinética da reação, seja por meio da ativação de um substrato ou do uso de catalisadores mais eficientes em condições fisiológicas.
- O desenvolvimento de fluoróforos e marcadores celulares cada vez mais seletivos e que melhoram o monitoramento e a elucidação de sistemas vivos.

Além disso, a arquitetura de uma reação bioortogonal deve satisfazer uma série de importantes requisitos:

- Seletividade: a reação deve ser seletiva entre os componentes para evitar reações laterais que interfiram no ambiente biológico.
- Não reatividade química e biológica: os componentes de todo o sistema reacional intracelular, incluindo substratos e produtos, devem ser incapazes de qualquer tipo de reatividade que desregule o sistema biológico nativo. Também deve ser quimicamente inerte para cumprir sua função em tempo hábil.
- Cinética: a reação deve ser rápida o suficiente para cumprir o objetivo antes de fazer parte do metabolismo celular e ser eliminado. Uma reação rápida também gera uma resposta rápida, requisito importante para o monitoramento e manipulação de processos dinâmicos.

- **Biocompatibilidade:** é fundamental que a reação planejada não seja tóxica e deve funcionar nas condições biológicas de pH, ambiente aquoso e temperatura. A farmacocinética também passa a ser importante quando a química bioortogonal expande para sistemas de animais vivos.

De uma maneira geral, uma reação idealmente bioortogonal deve ter, portanto, as características anteriormente citadas e que podem ser ilustradas de acordo com o Esquema 10 a seguir:



**Esquema 10.** Uma reação bioortogonal desejada: Primeiro ocorre a internalização de uma ou mais espécies químicas responsáveis pela reação, mas que não possuem atividade fluorescente considerável, denominando-se pró-luminescente. Apenas após a reação intracelular entre a espécie A e B é que ocorre a reação com a formação de um produto com fluorescência e, preferencialmente, seletividade desejada.

#### 2.4.1) Reações Intracelulares Mediadas por Paládio

Muitas reações bioquímicas são cineticamente promovidas por metais de transição, tipicamente na forma de metaloproteínas.<sup>51</sup> Com isso, a química dos compostos de coordenação está frequentemente evoluindo e abrindo dinâmicos campos de possibilidades, inclusive contribuindo para o monitoramento e manipulação de inúmeros processos biológicos.<sup>52,53</sup>

Uma classe importante de reações que utilizam precursores catalíticos de paládio são as reações de acoplamento-cruzado a partir de haletos. O mecanismo envolve adição

oxidativa do haleto no precursor catalítico Pd(0), para formar a espécie catalítica Pd(II)., o uso de outro metal que atue como co-catalisador é comum para facilitar a inserção do segundo reagente em uma etapa de transmetalização. No entanto, o uso de cobre muitas vezes é indesejável, incluindo as aplicações biológicas, já que espécies de cobre são tóxicas para serem usadas em células vivas. Essa toxicidade é devido a danos oxidativos de espécies formadas por espécies de cobre catalíticas, induzindo alterações no metabolismo e ainda sendo absorvidos pelas células.<sup>54</sup> Por isso, também é importante o desenvolvimento de catalisadores de paládio que possibilitem diversas reações de acoplamento-cruzado em condições fisiológicas.

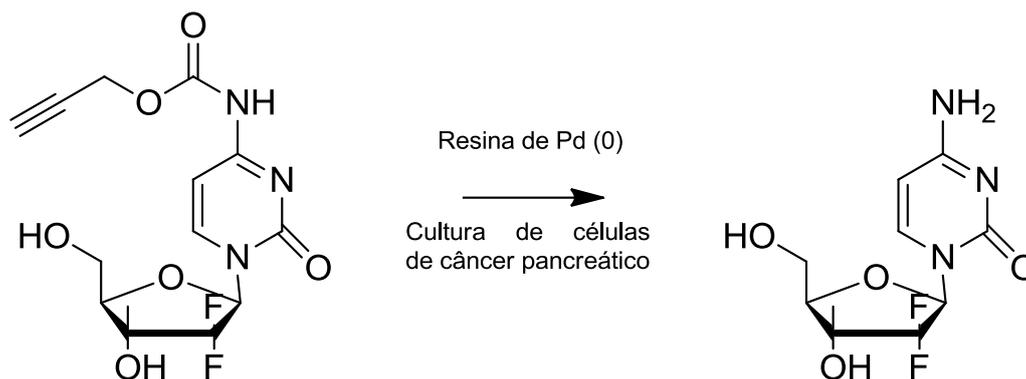
Mesmo com tantas aplicações que evidenciam a utilidade das reações catalíticas cineticamente promovidas por espécies de paládio, a exploração de catalisadores de paládio para reações intracelulares é recente.<sup>55-57</sup> Estes estudos mostraram que alguns complexos de paládio podem originar catalisadores com características bioortogonais.

Yusop *et al.*, motivados pela observação de que muitas reações bioquímicas importantes que ocorrem em meio intracelular são mediadas por metais de transição, conseguiram realizar algumas reações, como o acoplamento-cruzado de Suzuki, em meio intracelular.<sup>55</sup> Na metodologia desenvolvida, as espécies utilizadas eram nanopartículas de paládio suportadas em microesferas de poliestireno, realizando as reações, portanto, a partir de uma catálise heterogênea.

Brian *et al.* desenvolveram uma metodologia capaz de modificar espécies de paládio quando em contato com monóxido de carbono, gerando espécies fluorescentes úteis no monitoramento do monóxido de carbono em ambiente celular.<sup>58</sup>

Weiss *et al.* reportaram em 2013 um método para ativação de pró-fármaco combinado com resinas de Pd em estado de oxidação zero, suportadas em polietilenoglicol. No referido trabalho é relatada a formação *in situ* do fármaco 5-fluorouracil, muito utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer.<sup>59</sup> É notável na metodologia que as resinas de paládio utilizadas eram maiores que o tamanho médio de uma célula, para garantir que a reação fosse processada em meio extracelular. Os autores observaram atividade antiproliferativa das células tumorais comparáveis ao tratamento clássico com o fármaco. Essa eficiência demonstrou o potencial desenvolvimento da química bioortogonal na ativação de pró-fármacos, no desenvolvimento de metodologias que sejam mais seletivas e menos danosas ao

organismo saudável e é também um relato de como a química bioortogonal pode ser uma ferramenta poderosa em futuras investigações *in vivo*.<sup>56</sup> Um ano após a publicação desse trabalho, o mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um método utilizando essas resinas de paládio na formação de de pró-fármacos de gencitabina, composto utilizado com função quimioterápica.<sup>60</sup> O Esquema 8 ilustra esse trabalho realizado em 2014.



**Esquema 11.** Weiss *et al.* utilizaram pró-fármacos inativos de gencitabina (à esquerda) que podem ser ativadas de forma bioortogonal para a geração do fármaco ativo (à direita) com capacidade quimioterápica para células de câncer de pâncreas.

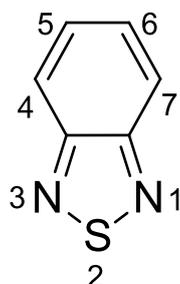
Embora exista uma série de estudos acerca de aplicações biológicas do paládio, não existe anterioridade científica sobre o uso de espécies desse metal para mediar a síntese intracelular de derivados seletivos de BTB destinados ao imageamento, *tracking* e manipulação celular, sendo este trabalho, portanto, pioneiro nesse sentido.

### 2.5) A Partir da 2,1,3-benzotriazin-4(1H)-ona: do Laboratório à Célula.

Uma sonda biológica fluorescente para aplicação em bioimageamento deve satisfazer rigorosos requisitos, e para ser eficiente, uma sonda deve ser capaz de interagir seletivamente no meio celular, desafio notável devido a vasta composição de moléculas e organelas.

Com características desejáveis, os derivados fluorescentes do núcleo 2,1,3-benzotriazin-4(1H)-ona (BTB, Figura 4) são quimiossensores que apresentam eficiência

comprovada como marcadores celulares evidenciados em diversos estudos. Neto *et al.*, desde seu pioneiro trabalho no uso de derivados fluorescentes de BTB's,<sup>17</sup> vem mostrando o uso eficiente desses derivados fluorescentes nas áreas de Química Biológica e Medicinal.<sup>3,4,61,62</sup>



**Figura 4.** Estrutura do núcleo 2,1,3-benzotriazol.

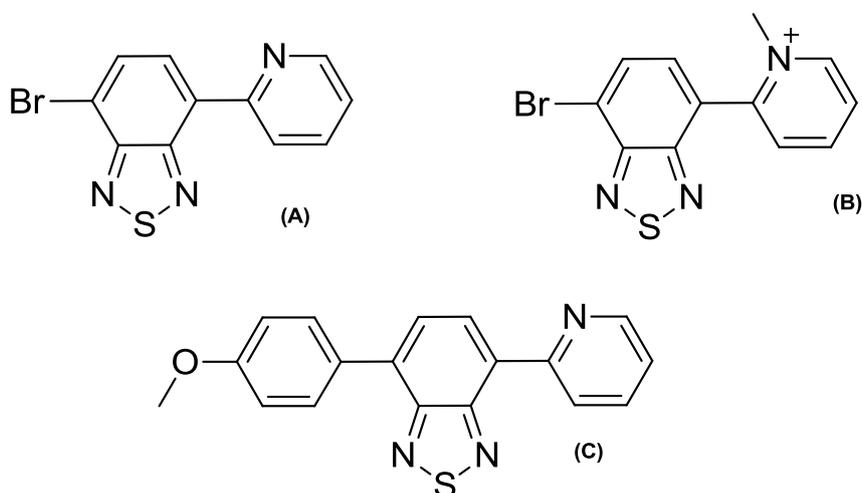
Carvalho *et al.* descreve uma série de marcadores celulares a partir da estrutura fundamental do núcleo 2,1,3-benzotriazol.<sup>63</sup> Ressalta-se que esse artigo publicado se diferencia da tecnologia que será descrita aqui no que diz respeito às etapas de síntese de marcadores e consequente gasto energético, a geração de resíduos, além da possível síntese de estruturas complexas que experimentalmente não são internalizadas pela célula. A síntese intracelular dessas estruturas é uma alternativa para obtê-las no citosol, tornando assim possível, investigações sobre o comportamento dessas estruturas no interior das células.

Mota e colaboradores investigaram a estrutura e aplicação em biologia molecular e celular de novos derivados da estrutura fundamental 2,1,3-benzotriazol a qual destaca-se a produção de marcadores fluorescentes derivados de ácidos graxos (ácido oléico e DHA), e fluorescentes híbridos, com mais de um núcleo em sua estrutura molecular. Estes novos fluoróforos foram utilizados desde estudos sobre mecanismos de internalização celular, até a detecção de espécies reativas de oxigênio em meio celular.<sup>64,65</sup>

Por meio do precursor 4,7-dibromo-2,1,3-benzotriazol, ou 4-bromo-2,1,3-benzotriazol, tem-se a vantagem de um substrato halogenado com um bom grupo de saída. Assim podem ocorrer substituições nas posições 4 e/ou 7, sendo assim possível

uma miríade de possibilidades de síntese de derivados, com notável possibilidade desses possuírem extensão das conjugações  $\pi$  em sua estrutura.<sup>66</sup>

Com essas motivações, diversos derivados BTDs foram sintetizados e testados em nosso grupo de pesquisa, e novamente Neto *et al.* voltaram seus esforços para compreensão do efeito das substituições nas posições 4 e 7 do núcleo BTB. Em minuciosa pesquisa envolvendo síntese, aplicação *in vivo*, *in vitro*, cálculos teóricos, os derivados BTB apresentaram seletividade para mitocôndria e eficiência em experimentos de imageamento celular superiores comparados ao marcador comercial Mitotracker Red.<sup>4</sup> A Figura 5 mostra os marcadores estudados na referida pesquisa.



**Figura 5.** Estruturas de derivados de BTB estudadas em publicações anteriores do nosso grupo de pesquisa.

Das propriedades e resultados já descritos, estão condensadas a seguir as características mais importantes dos derivados BTBs para aplicações celulares:

- A larga janela de estabilidade química é uma óbvia vantagem, pois os derivados se mantem estáveis tanto em temperatura ambiente como em temperaturas biológicas ( $\sim 36^{\circ}\text{C}$ ), e estáveis também ao armazenamento.
- A baixa energia de excitação também evidencia uma vantagem, já que a irradiação por ondas de maior energia podem causar danos celulares.

- As propriedades fotofísicas podem ser moduladas por meio da conjugação das ligações e portanto, dos substituintes das posições 4 e 7.
- A polarização do núcleo BTB causada pelo anel 2,1,3-benzotiadiazola torna o potencial eletrônico fortemente redutivo, estabilizando processos de relaxação da molécula a partir do estado excitado.

Sob esse aspecto, evidencia-se que não só a arquitetura de novas moléculas fluorescentes se faz necessária, como também o desenvolvimento de novos métodos de investigação biológica.

### 3) MATERIAIS E MÉTODOS

**Geral.** Reagentes químicos e solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Acros ou Aldrich) e usados sem tratamento prévio ou purificação.

**Sistema de Partida.** Constituído por duas espécies químicas que são incubados primeiramente com a célula. A primeira espécie é um derivado BTM halogenado (normalmente bromado), e a segunda espécie é o catalisador ionofílico de paládio. O derivado BTM bromado foi obtido de fonte comercial (Aldrich) e o catalisador sintetizado a partir de acetato de paládio (Aldrich) e líquido iônico.

**Reagente dinâmico.** É utilizado na segunda etapa de incubação com as células. Após a incubação das células com o sistema de partida, as células são lavadas e incubadas com o reagente dinâmico, obtido por meio de fonte comercial. As espécies 1-naftilamina, 2-aminopiridina e ácido fenilborônico foram utilizados. O reagente dinâmico escolhido reage com o sistema de partida, sendo assim responsável pela arquitetura final da molécula produzida de maneira bioortogonal.

**Análises de espectroscopia de massa.** As medidas de ESI-MS e ESI-MS/MS foram realizadas em modo íon positivo (alcance  $m/z$  50-2000) em um instrumento *Waters Synapt HDMS* (espectômetro de massa de alta definição, Manchester, Inglaterra). Esse instrumento é um híbrido (quadripolo/ íon mobilidade/ aceleração *time-of-flight* usado em modo TOF com a mobilidade da célula desligada e trabalhando apenas guiando o íon. Todas as amostras foram dissolvidas em água para formar soluções de concentração 100 $\mu$ M, e foram infusas diretamente no ESI em fluxo de 5  $\mu$ L/min. As condições da fonte do ESI foram: tensão capilar 3,0 kV, *sample cone* 30V, *extraction cone* 3V.

**Análises de RMN.** Os espectros de RMN foram realizados em um *Varian Mercury Plus 7.05T* (300MHz e/ou 600MHz) em temperatura ambiente, usando uma sonda de diâmetro interno de 5 mm. O clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) e TMS (tetrametilsilano) foram utilizados como padrões internos.

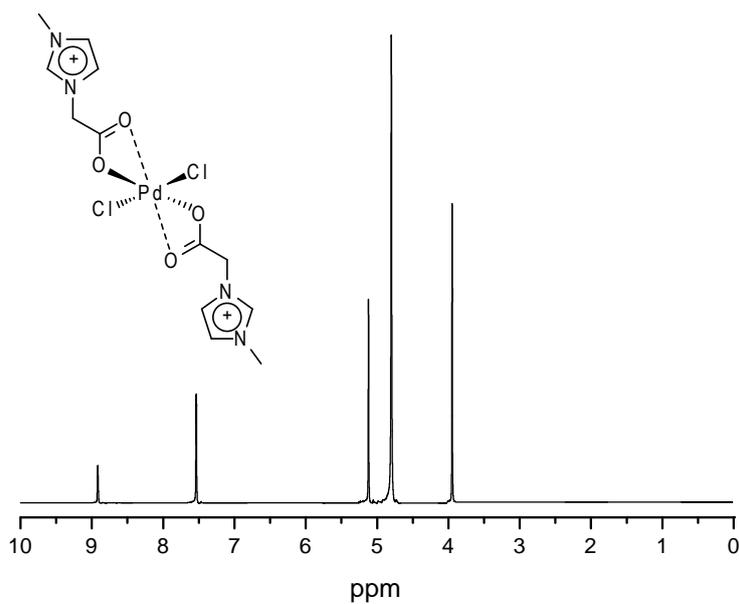
**Ensaio de viabilidade celular (MTT).** As células MCF-7, de linhagem de câncer de mama, foram semeadas *overnight* e tratadas por 48 horas com uma solução preparada em cultura de RPMI médio (10% soro fetal bovino, 25  $\mu$ g/mL gentamicina) contendo

4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola (Br-BTD, 200  $\mu\text{M}$ ), ou PdMAI (20  $\mu\text{M}$ ) ou uma mistura de ambos (o sistema de partida). O mesmo procedimento também foi realizado para o ensaio de viabilidade soluções de concentração 200  $\mu\text{M}$  de 1-naftilamina, ou 2-aminopiridina, ou ácido fenilborônico (os reagentes dinâmicos). A citotoxicidade foi determinada utilizando-se 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol-brometo (MTT, *Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) de acordo com as instruções do fabricante. As leituras de absorção foram obtidas usando um espectômetro (*SpectraMax M5, Molecular Devices – Sunnyvale, Califórnia, USA*). A viabilidade celular foi comparada com a amostra de controle (sem a presença de compostos abióticos) e os valores foram determinados utilizando *GraphPad Prism 5 (CA, USA)*.

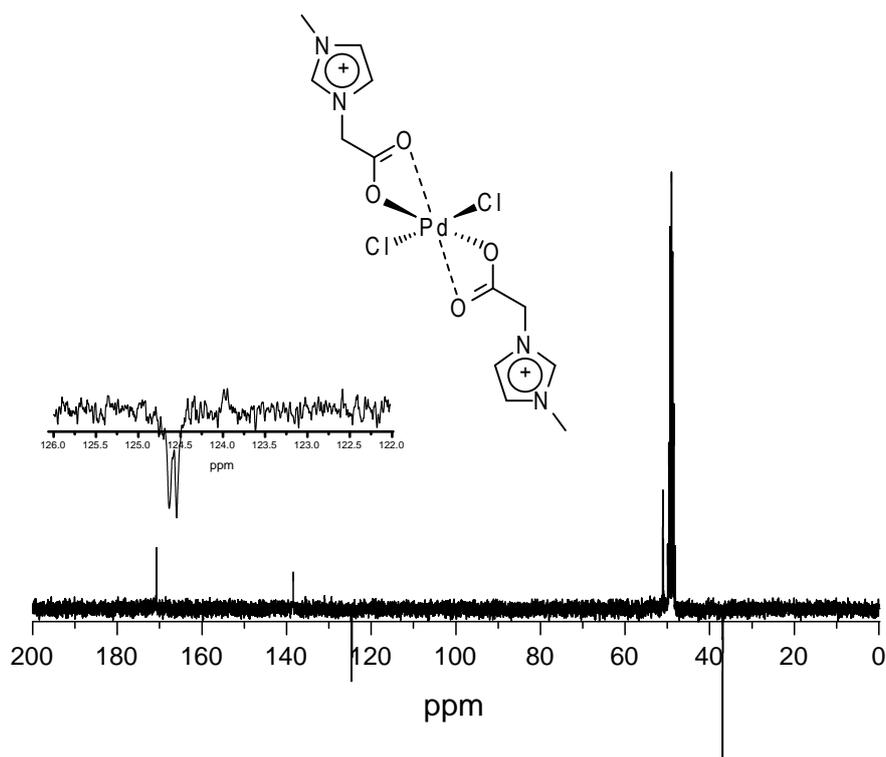
**Experimentos de imageamento celular.** Células MCF-7, ou DU145, ou MDAMB231, ou T47D ou fibroblasto,  $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  unidades, foram semeadas em lâminas de vidro redondas. Depois da adesão, as células foram incubadas por 2h a 37 °C com uma mistura denominada sistema de partida (núcleo BTD halogenado, como o 4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola (Br-BTD, 200  $\mu\text{M}$ ) e PdMAI a 20  $\mu\text{M}$ ) preparadas em cultura média RPMI (10% soro fetal bovino, 25  $\mu\text{g/mL}$  gentamicina). As amostras foram lavadas três vezes com solução tampão de fosfato pré aquecida e depois de 2h, incubadas com o reagente dinâmico (200  $\mu\text{M}$  de 1-naftilamina, ou 2-aminopiridina, ou ácido fenilborônico). Todos com compostos foram diluídos e todos os ensaios foram incubados por 6 h, 24 h e/ou 48 h a temperatura de 37 °C. Após esses momentos, as células foram lavadas com a solução tampão, fixadas com 3,7% de formaldeído por 15 minutos e lavadas novamente com a solução tampão. O núcleo celular foi incubado por 24 h e 48 h e marcados com o marcador comercialmente disponível DAPI (300 nM) por 7 minutos e temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com *ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)* e as espécies foram observadas no microscópio de escaneamento a laser confocal *Leica SP 5 (Leica Microsystems – Wetzlar Germany)*. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três séries independentes.

**Síntese do PdMAI.** 1.00 mmol do líquido iônico MAI.Cl, 0.50 mmol de Pd(OAc)<sub>2</sub> e 2 mL de acetonitrila foram misturados em um tubo *shclenk*. A mistura teve sua temperatura elevada a 110 °C por 18h para garantir a eliminação do ácido etanóico. O solvente e o ácido etanóico foram removidos em linha de vácuo e o sólido foi lavado com acetato de etila, resultando em um complexo de paládio com 95% de rendimento.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz),  $\delta$  ppm 8.92 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.95 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz),  $\delta$  ppm 175.6, 172.2, 137.3, 123.6, 122.7, 35.7, 30.8, 21.2. IV ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3218, 3177, 3139, 3080, 2969, 1760, 1627, 1568, 1175, 676, 614. Calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{Pd}$ : C, 31.50; H, 3.52; N, 12.24. Encontrado: C, 31.59; H, 3.61; N, 12.33.



**Figura 6.**  $^1\text{H}$  RMN do catalisador PdMAI em  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 7.** <sup>13</sup>C RMN do catalisador PdMAI em DMSO-*d*<sub>6</sub>

**Síntese em laboratório de BTD-Naft.** 0,4mmol de Br-BTD foram misturados, em um tubo *shclenk*, com 0,4 mmol de 1-naftilamina e 10% mol de PdMAI em acetonitrila suficiente. A mistura teve sua temperatura elevada a 90 °C por 48h. O solvente foi retirado do meio por linha de vácuo e o sólido purificado em coluna cromatográfica iniciando-se com hexano e aumentando-se a polaridade com acetato de etila, resultando no produto 4-naftilamina-2,1,3-benzotiadiazola, oriundo da reação de acoplamento cruzado, com 47% de rendimento.

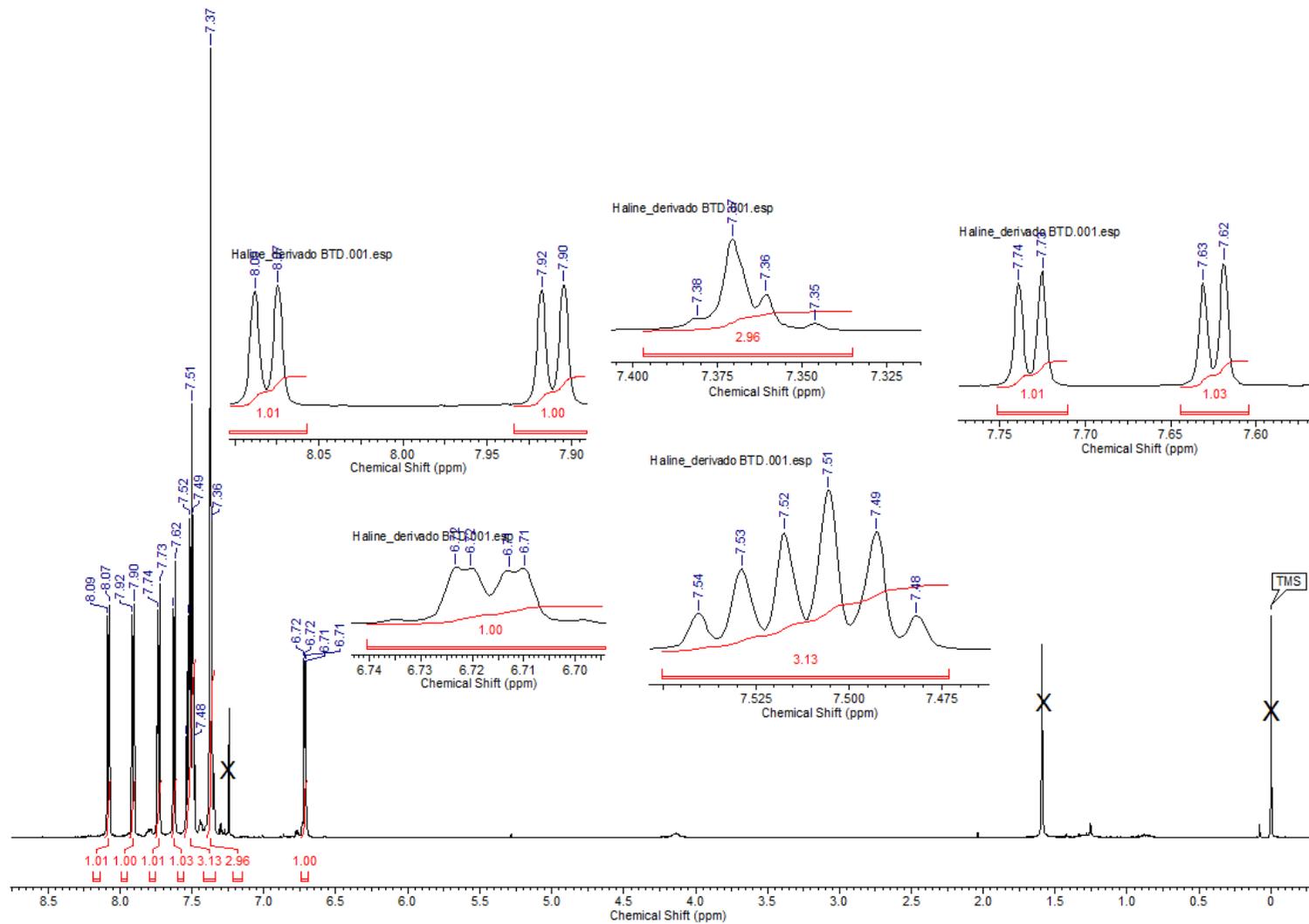
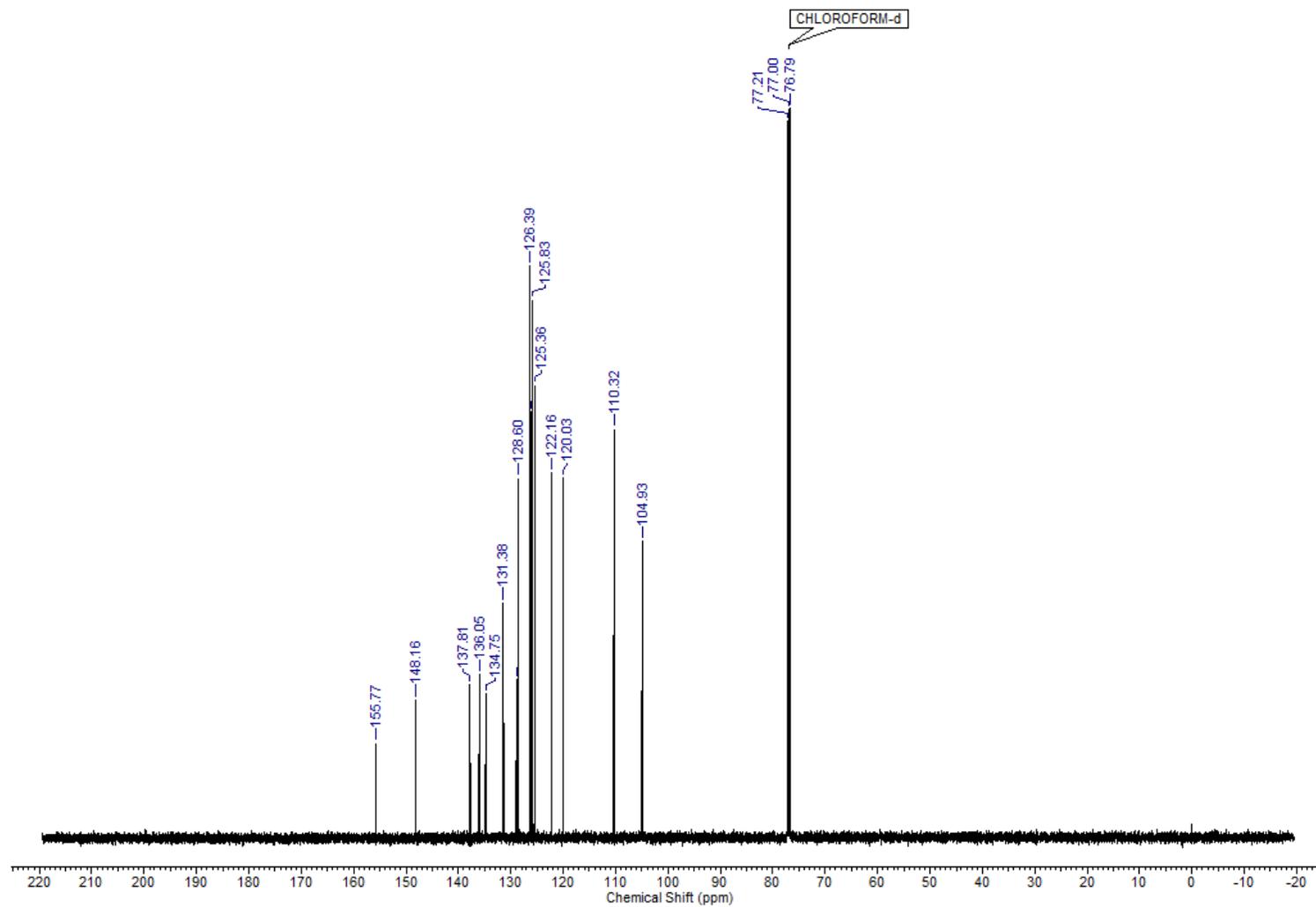


Figura 8.  $^1\text{H}$  RMN do derivado BTD 4-naftilamina-2,1,3-benzotiadiazola, com os integrais.

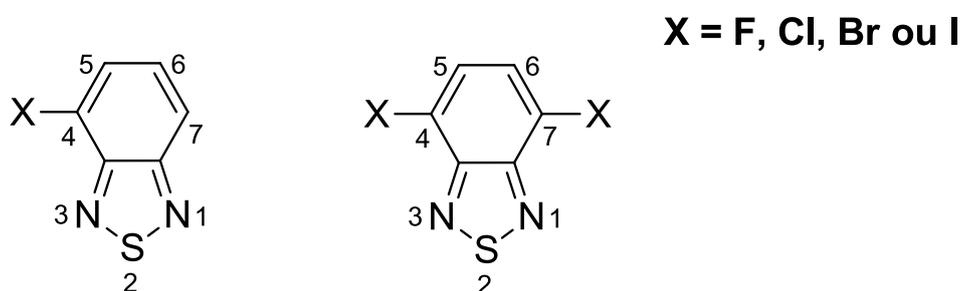


**Figura 9.** <sup>13</sup>C RMN do derivado BTD 4-naftilamina-2,1,3-benzotiadiazola.

#### 4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do desenvolvimento de todo este trabalho, incluindo produções científicas relacionadas, como um depósito de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (número de processo: **BR 10 2016 025541 4**), tornou-se necessária a construção e desenvolvimento de alguns conceitos e convenções. Duas definições são fundamentais: o sistema de partida e o reagente dinâmico.

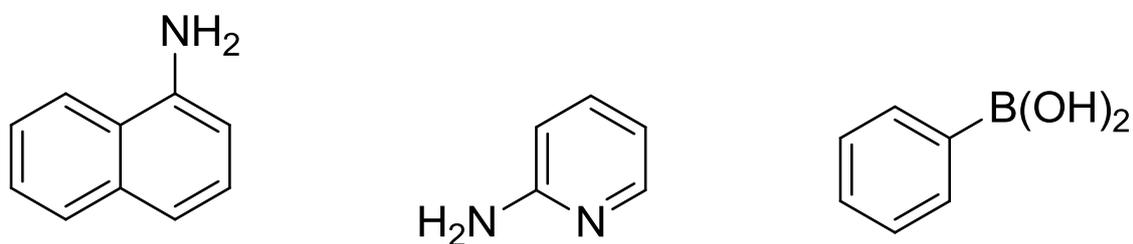
Foi definido sistema de partida a mistura constituída por duas espécies químicas que são utilizadas na primeira etapa da incubação. Uma espécie química é um núcleo BTM halogenado. Como ilustrado na Figura 10, essa a estrutura da BTM pode ser mono ou poli halogenado, com o halogênio ocupando preferencialmente as posições 4 e/ou 7. Essa BTM possui função pró luminescente, ou seja, o sistema de partida não rendimento quântico suficiente para obtenção de imagens satisfatórias. O outro componente do sistema de partida é o catalisador ionofílico de paládio, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa.



**Figura 10.** Duas possibilidades de utilização de BTM halogenada para composição do sistema de partida, que é constituído por essa espécie química juntamente com um catalisador ionofílico de paládio.

Nesse aspecto, também foi definido reagente dinâmico aquela espécie química utilizada na segunda etapa de incubação celular. Esse nome refere-se ao fato de que é a escolha desse reagente que determina a arquitetura do composto formado a partir da reação entre o reagente dinâmico e a BTM presente no sistema de partida. Sua estrutura determina, portanto, as características estruturais do derivado BTM formado, exercendo

assim, principalmente influência sobre as propriedades fotofísicas e de comportamento seletivo em ambiente celular. Como a escolha do reagente dinâmico depende do planejamento de qual derivado deseja-se formar de maneira bioortogonal, existe uma miríade de possibilidades de estruturas que podem ser arquitetadas. Essa versatilidade é uma característica central e diferencial da tecnologia desenvolvida, pois de acordo com a revisão bibliográfica, podem ser formados marcadores seletivos para diversas organelas ou mesmo biomoléculas. A princípio utilizou-se como reagente dinâmico em ensaios independentes, os compostos 1-naftilamina, 2-aminopiridina e ácido fenilborônico, com estruturas representadas Figura 11.



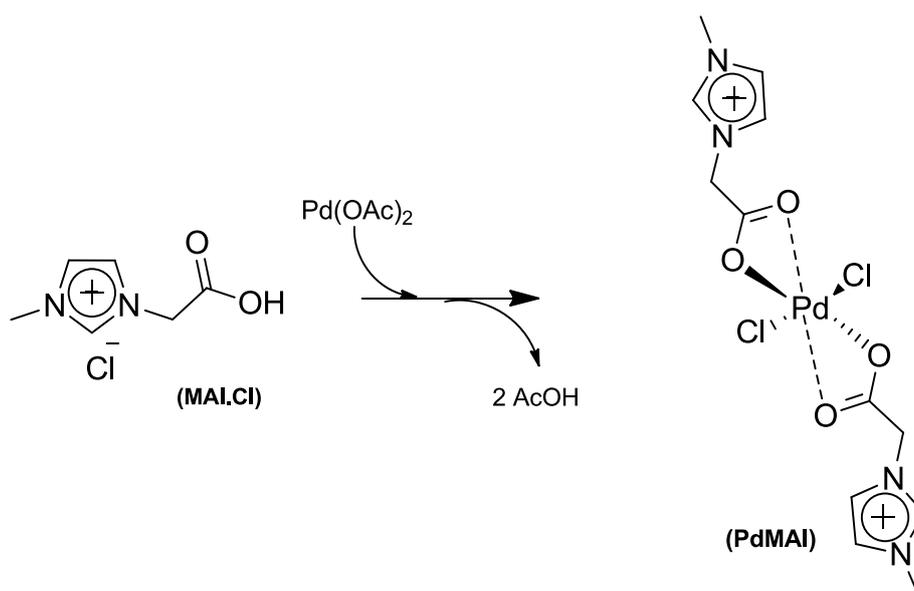
**Figura 11.** Os três reagentes dinâmicos que foram utilizados, até o momento, para a realização de reações bioortogonais com Br-BTD presente no sistema de partida. Da esquerda para a direita: 1-naftilamina, 2-aminopiridina e ácido fenilborônico.

Com o planejamento da reação e os reagentes de fonte comercial em mãos, também deve-se realizar a síntese do catalisador ionofílico de paládio, espécie química que está presente no sistema de partida.

#### 4.1) Síntese do Catalisador Ionofílico de Paládio

Em estudo publicado em 2011 no periódico *The Journal of Organic Chemistry*, nosso grupo de pesquisa utilizou uma classe de líquido iônico funcionalizado, o 1-N-metil-3-N-carboximetilimidazólio (MAI), para etiquetar ionicamente complexos de níquel, cobre e paládio, formando uma nova classe de complexos metálicos etiquetados.<sup>67</sup> Mais do que isso, os precursores catalíticos produzidos de forma inédita mostraram alta atividade catalítica e rendimentos superiores em reações de

acoplamento-cruzado, quando comparado a catalisadores de paládio comumente utilizados como Pd(OAc)<sub>2</sub>. O precursor catalítico etiquetado sintetizado, PdMAI, possui características que contemplam requisitos da bioortogonalidade, ressaltando sua solubilidade em água que possibilita assim a realização de catálise homogênea em aplicações biológicas. O **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta a síntese da referida espécie.



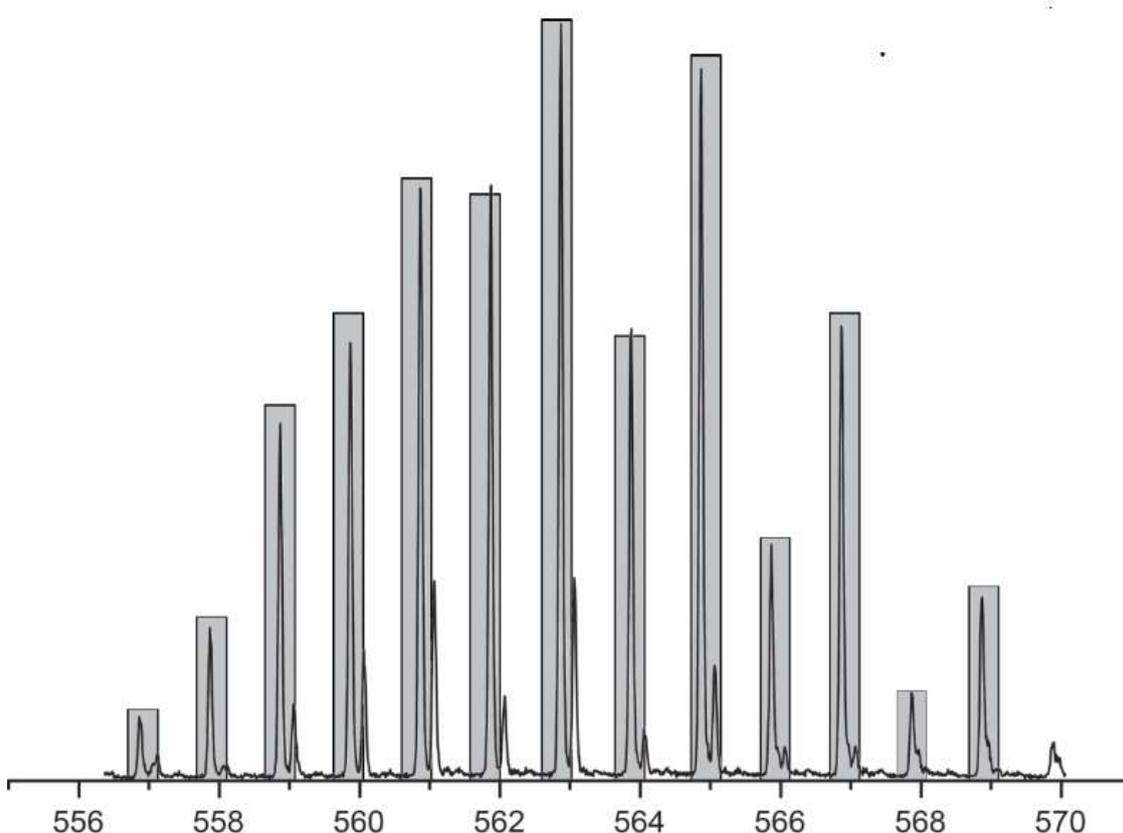
**Esquema 12.** Síntese do catalisador ionofílico de paládio por meio da reação entre do acetato de paládio e o líquido iônico 1-N-metil-3-N-carboximetilimidazólio (MAI). Condições da reação: 110 °C por 18 horas.

É notável da estrutura do catalisador sintetizado que podemos fazer uso de sua etiqueta iônica do cátion imadazólio para realizar estudos químicos por ESI-MS(/MS) em solução aquosa, como ensaio de seu comportamento no ambiente celular. A estratégia de etiquetar ionicamente o catalisador facilita a detecção pelo *tandem mass spectrometry*, mais referido como MS/MS, e que são múltiplas etapas da espectrometria de massa, havendo formas de fragmentação nessas etapas, caracterizando espécies chaves em solução sem necessidade de realizar protonação ou desprotonação.<sup>68</sup>

Dois íons de interesse foram detectados pela técnica ESI(+)-MS da solução aquosa de PdMAI e caracterizados adicionalmente por MS/MS. Em ambos os íons

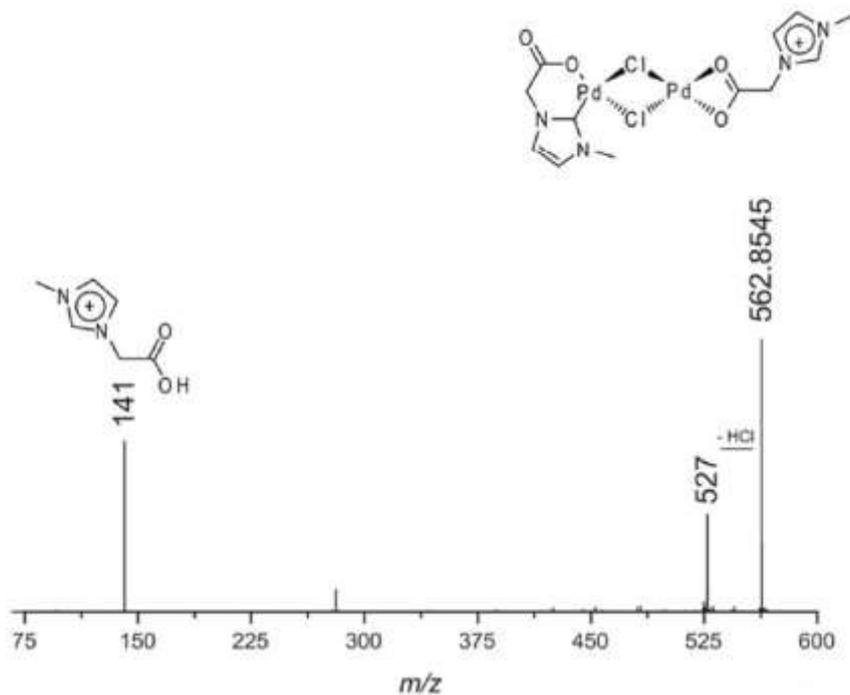
foram encontrados a coordenação do carbeno do N-Heterociclo (NHC) ao Pd central, estabilizando o átomo metálico, sendo um indício da alta atividade catalítica para o PdMAI dentro das células.

. Um íon de interesse, de  $m/z$  563, é provavelmente formado após a dimerização do PdMAI em solução aquosa. A comparação do espectro obtido, em relação ao padrão de fragmentação bem como padrão de distribuição isotopóloga esperado, mostra correspondência nítida, de acordo com a Figura 12, a seguir.



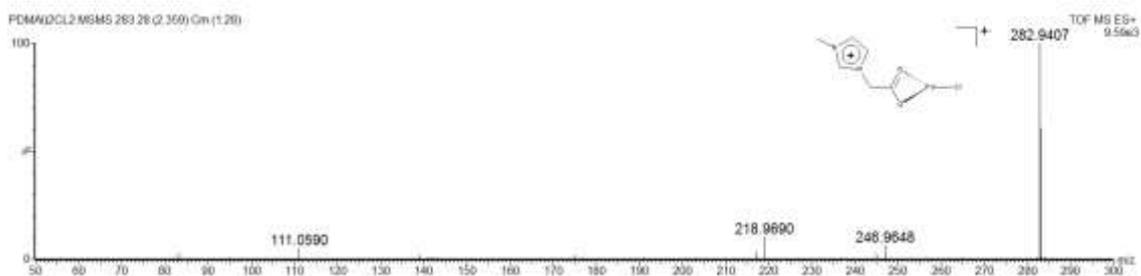
**Figura 12.** O padrão de fragmentação do íon  $m/z$  563 bem como sua massa exata possuem correspondência precisa entre o perfil experimental e o calculado (barras cinzas).

Essa espécie ionofílica foi devidamente selecionada para caracterização via dissociação induzida por colisão no experimento MS/MS. O padrão de fragmentação se mostrou de acordo com a estrutura proposta, de acordo com a Figura 13.



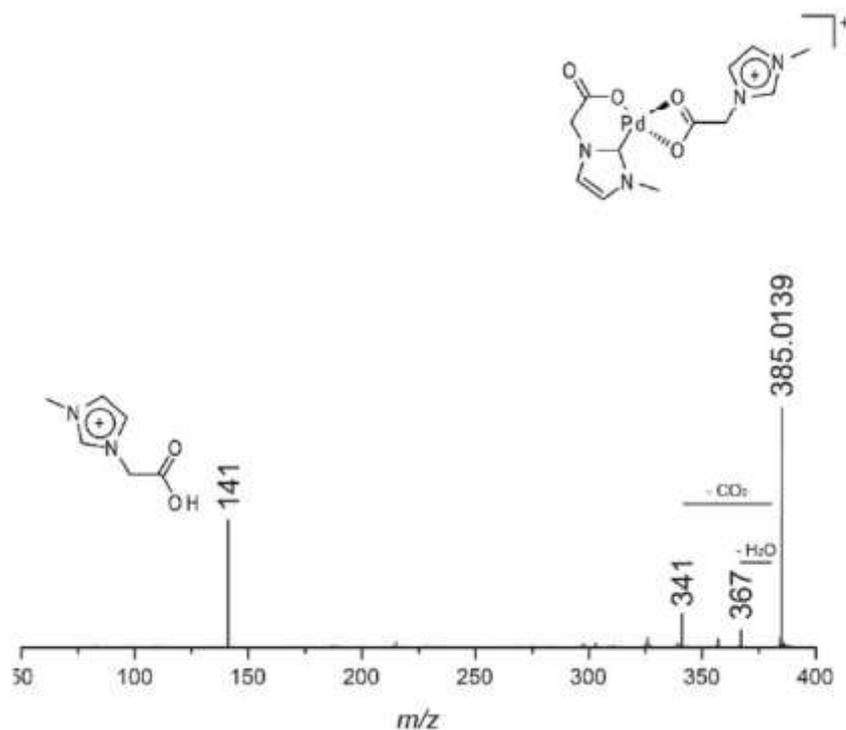
**Figura 13.** ESI (+)-MS/MS do íon de  $m/z$  563 transferidos de uma solução aquosa 100  $\mu$ M diretamente para a fase gasosa.

A Figura 14 apresenta a caracterização do cátion radical de  $m/z$  283.



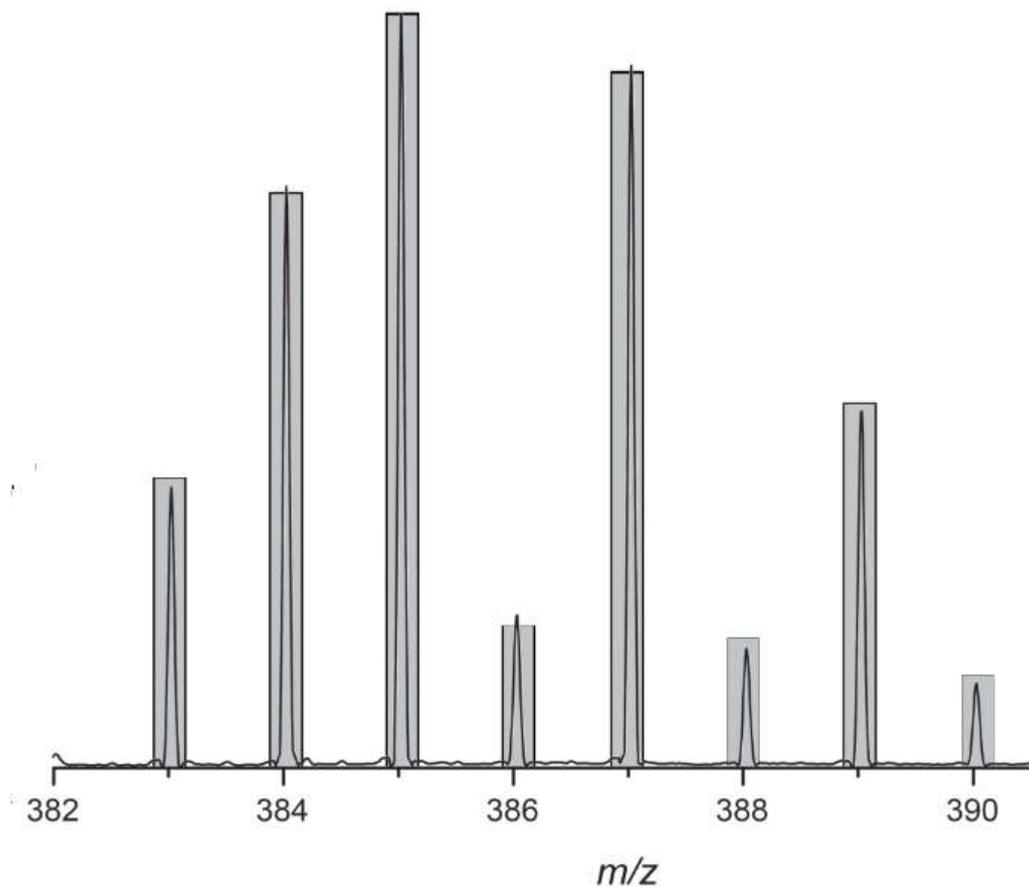
**Figura 14.** A caracterização do cátion radical de  $m/z$  283 via ESI(+)-MS/MS.

Ainda, o padrão de fragmentação do íon  $m/z$  385, bem como sua massa exata, estão de acordo com a estrutura proposta, de acordo com a Figura 15.



**Figura 15.** ESI (+)-MS/MS do íon m/z 385 transferidos para a fase gasosa diretamente de uma solução aquosa 100  $\mu$ M.

O padrão de fragmentação do íon de m/z 385 correspondente ao esperado, juntamente com a distribuição isotópica das espécies, comparando-se dados experimentais e teóricos, correlaciona o espectro obtido com as estruturas propostas, de acordo com a Figura 16.



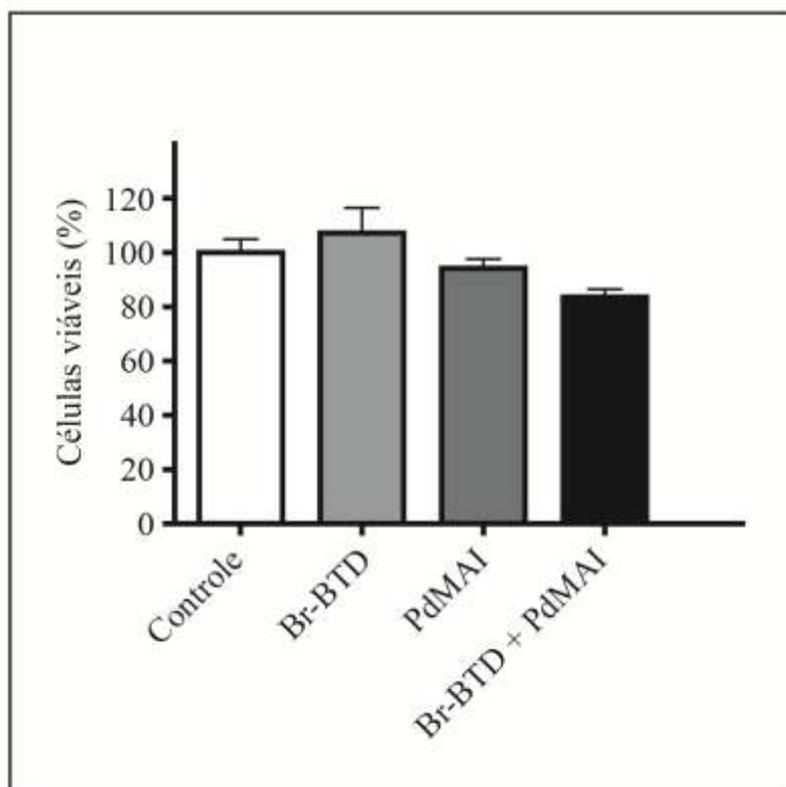
**Figura 16.** O padrão de fragmentação do íon  $m/z$  385 bem como sua massa exata possuem correspondência precisa entre o perfil experimental e o calculado (barras cinzas).

#### 4.2.1) Ensaios Celulares – Testes de Citotoxicidade

Para que o método desenvolvido tenha aplicações reais, é necessário testar se o sistema responsável pela reação intracelular apresenta resultados satisfatórios em relação a citotoxicidade, um objetivo fundamental no planejamento de reações bioortogonais.

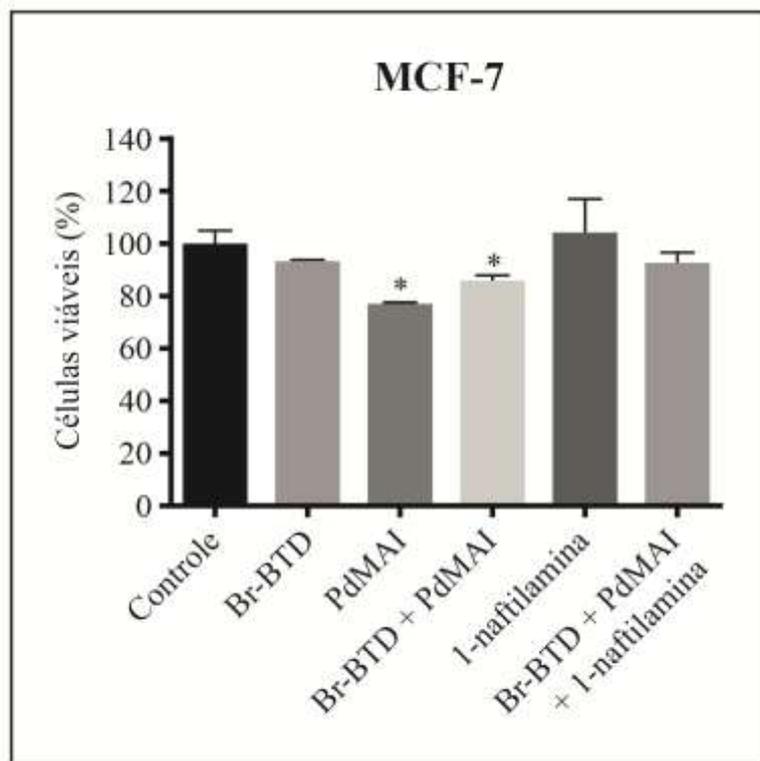
Os testes de citotoxicidade foram realizados por meio do método MTT, um ensaio colorimétrico capaz de aferir a atividade metabólica da célula. A dependência enzimática de oxiredutazes NAD(P)H pode, sob condições definidas, aferir o número de células viáveis. Essas enzimas são capazes de reduzir o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol-brometo) para sua forma insolúvel e de cor roxa.<sup>69</sup>

Em tal ensaio, foram testadas as citotoxicidades dos componentes do sistema de partida com 48h de incubação. Os compostos, testados de forma isolada ou combinada, produziram os resultados, expostos na Figura 17, demonstraram a biocompatibilidade do sistema de partida, evidenciando a capacidade de cumprir a função sem geração de compostos relevantemente tóxicos ou mesmo sem gerar interferência considerável em relação às atividades celulares naturais.



**Figura 17.** Viabilidades celulares mensuradas por ensaio MTT em células MCF-7. As células foram incubadas por 48h com soluções de 200  $\mu$ M de solução contendo Br-BTD, 20  $\mu$ M de PdMAI, e por último, com os dois compostos combinados (o sistema de partida).

A Figura 18 representa o ensaio MTT para a situação utilizando a 1-naftilamina como reagente dinâmico.



**Figura 18.** Viabilidades celulares mensuradas por ensaio MTT em células MCF-7. As células foram incubadas em ensaios independentes por 48h com soluções de 200  $\mu\text{M}$  de solução contendo Br-BTD ou 20  $\mu\text{M}$  de PdMAI ou as duas espécies juntas (sistema de partida), ou com os dois compostos combinados (o sistema de partida) ou com 1-naftilamina (reagente secundário) ou com todos os componentes da reação bioortogonal.

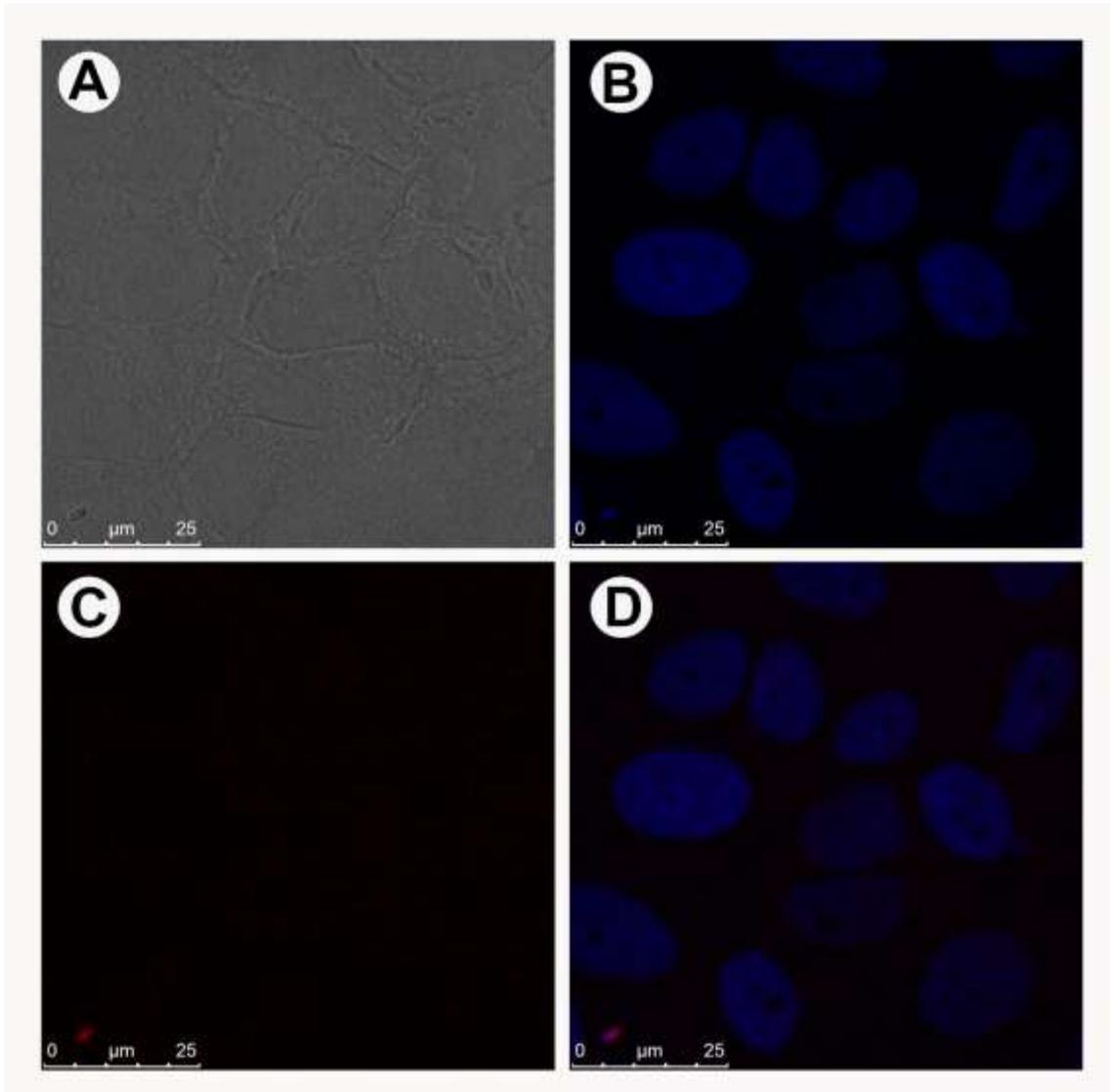
Os resultados obtidos permitem inferir que o planejamento do método bioortogonal é compatível com as características desejáveis, e que portanto, sua aplicação é exequível.

#### 4.2.2) Síntese Intracelular e Imageamento – Sistema de Partida + 1-naftilamina

Na fase de experimentação e imageamento celular, os componentes do método bioortogonal são incubados com cultura celular, de diferentes linhagens, em etapas. Primeiramente é realizada a incubação do sistema de partida, e na segunda etapa, incuba-se o reagente dinâmico, nesse caso, a 1-naftilamina.

Assim, o sistema de partida foi incubado com as células por duas horas. Após esse período, as células foram lavadas para garantir que qualquer espécie química que não tenha realizado a transposição da membrana, encontrando-se ainda em meio extracelular, seja retirado. Esse passo é importante para garantir que qualquer fluorescência observada após a reação bioortogonal tenha origem intracelular.

Somente após esse procedimento, o reagente dinâmico, 1-naftilamina, é incubado com as células. A logística dessa ordem das etapas assegura, além da ocorrência da reação em meio intracelular, que toda fluorescência eficiente observada nos ensaios seja de fato proveniente da reação entre o sistema de partida e o reagente dinâmico. Essa é uma característica notável e relevante para o presente método bioortogonal. O sistema de partida possui o catalisador e a espécie Br-BTD, com características pró-luminescentes. A eficiência quântica do sistema não é mínima o suficiente para a geração de intensidade de fluorescência satisfatória. Quando apenas o sistema de partida é incubado com as células por até 48 horas, observa-se em todo esse intervalo de tempo, a ausência de fluorescência satisfatória. As imagens obtidas por meio de microscopia confocal referentes a essa observação, quando o sistema de partida é incubado com células da linhagem MCF-7, de câncer de mama, estão na Figura 19.

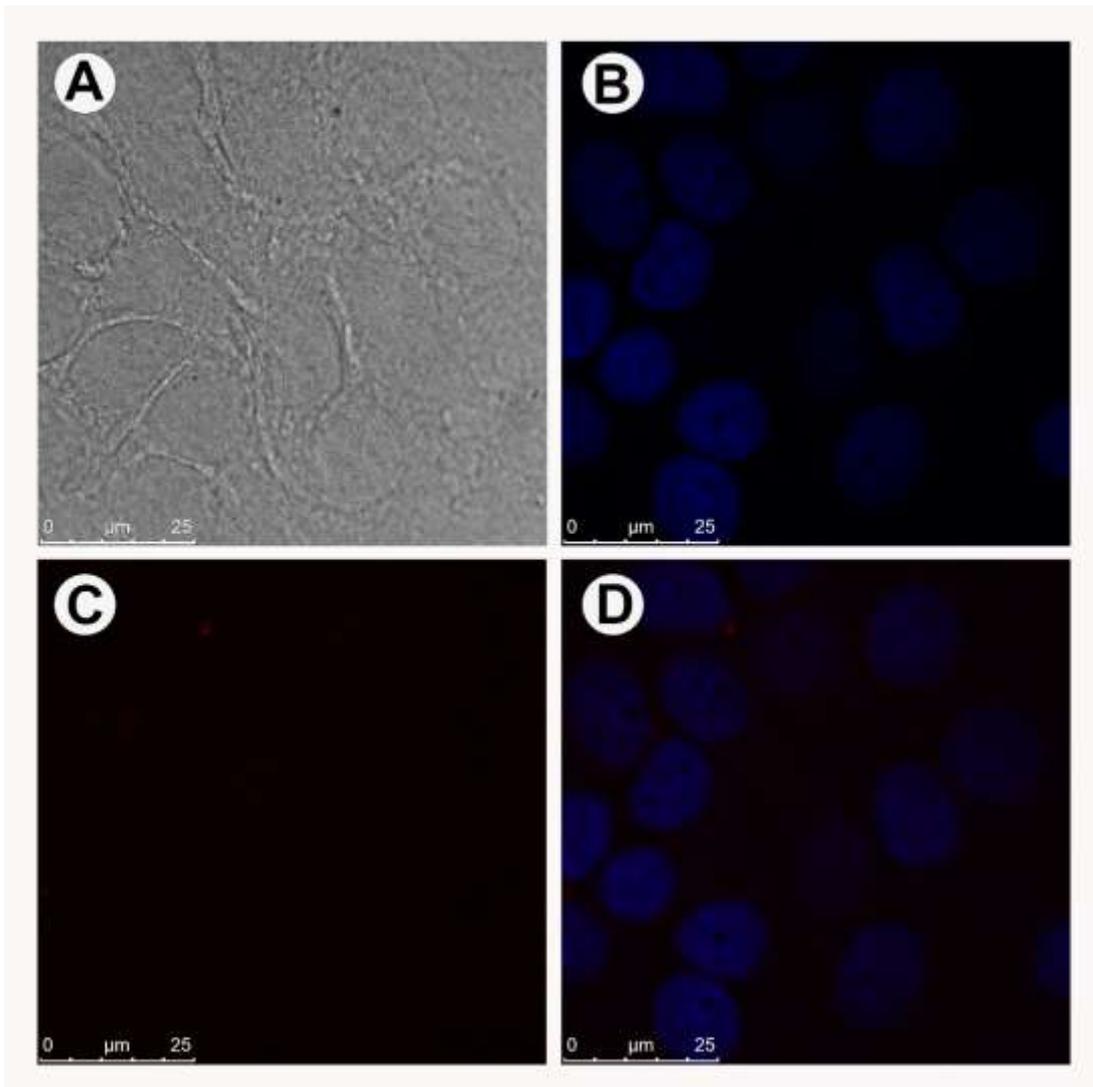


**Figura 19.** Células da linhagem MCF-7, de câncer de mama, após 48 horas de incubação com o sistema de partida. (A) Microscopia de campo claro demonstra a morfologia intacta e saudável das células. (B) Mostra os núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) Imagem mostra a ausência de fluorescência satisfatória, sendo possivelmente oriunda de ruídos e auto luminescência da célula. (D) Sobreposição das imagens referentes a marcação com DAPI (canal azul) e sistema de partida (canal vermelho).

A microscopia confocal é uma técnica de imageamento óptico destinada a aumentar a resolução óptica e o contraste, através da presença de um orifício de abertura denominado *pinhole*.<sup>70</sup> Esse orifício está situado no plano confocal da lente, sendo assim, capaz de eliminar a luz fora do foco.<sup>71</sup> A microscopia de campo claro é uma

técnica clássica que permite a visualização da morfologia geral da amostra de células, sendo utilizada como um complemento na interpretação das imagens, bem como evidência adicional sobre a saúde celular.

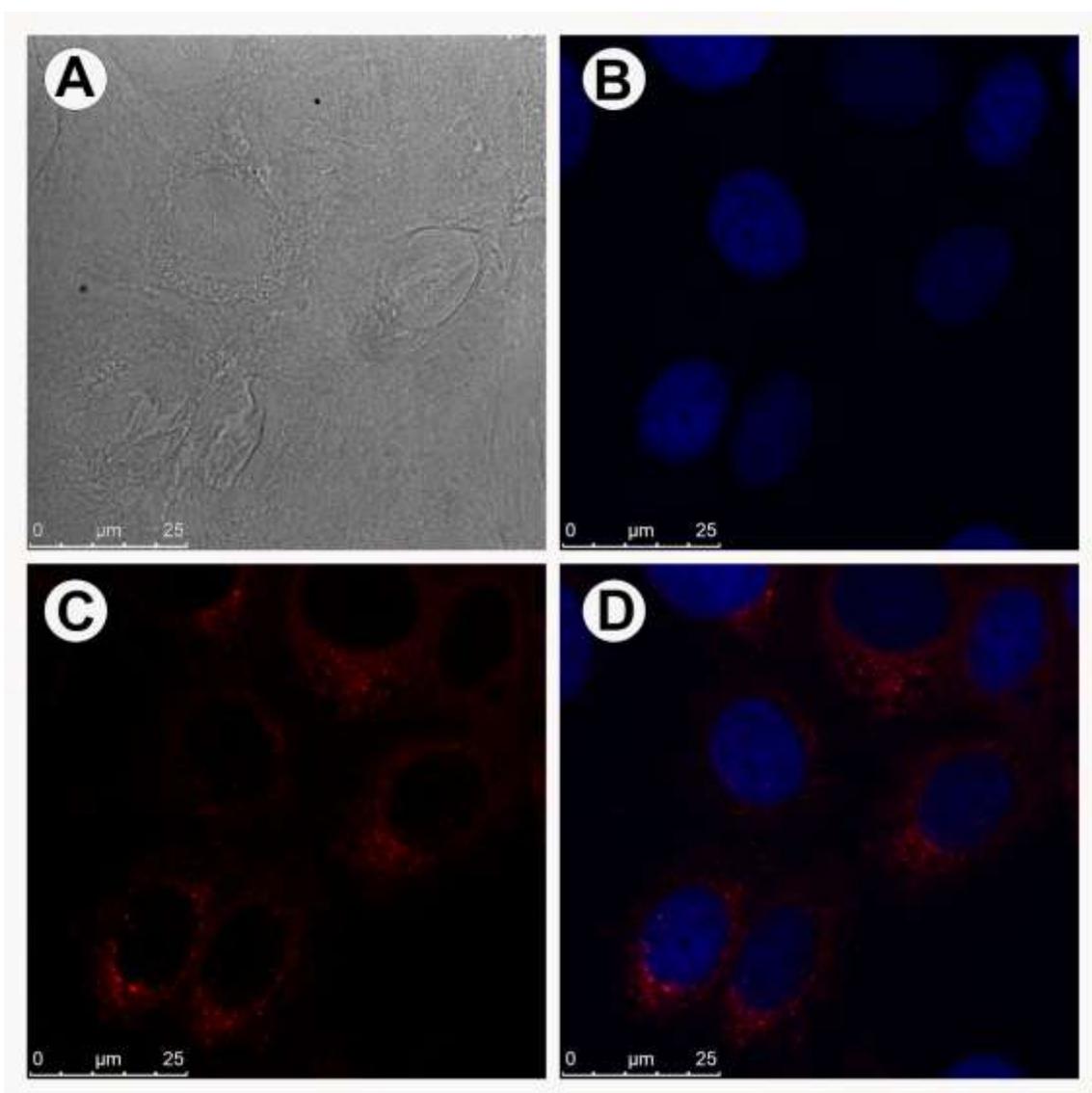
Portanto, a ordem com que os reagentes são incubados é relevante pois aumenta a garantia de que o surgimento da fluorescência é de fato oriunda da reação entre o sistema de partida e o reagente dinâmico, sendo a imagem anterior uma evidência de que não há reação entre o sistema de partida e alguma molécula naturalmente presente no meio. Assim, também fez-se o mesmo procedimento de incubação com o reagente dinâmico 1-naftilamina por até 48 horas. Durante todo o período, não foi observada fluorescência considerável, como mostram as imagens da Figura 20.



**Figura 20.** Células da linhagem MCF-7, de câncer de mama, após 48 horas de incubação com reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) Microscopia de campo claro demonstra a morfologia intacta e saudável das células. (B) Mostra os núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) Imagem mostra a ausência de fluorescência satisfatória, sendo possivelmente oriunda de ruídos e auto luminescência da célula. (D) Sobreposição das imagens referentes a marcação com DAPI (canal azul) e reagente dinâmico 1-naftilamina.

Com a garantia de que sistema de partida e reagente dinâmico não são capazes de gerar, isoladamente, luminescência com eficiência satisfatória para o imageamento celular, parte-se então para os ensaios de reação bioortogonal. Portanto, após um período de 2 horas de incubação das células MCF-7 com o sistema de partida, a amostra

é lavada três vezes com solução tampão e após, incubada por mais 2 horas como reagente dinâmico 1-naftilamina. Novamente as células são lavadas, e a partir daí, progressivamente é observada o aumento da fluorescência, devido a reação de acoplamento-cruzado entre os componentes capaz de formar um produto derivado BTD com eficiência respaldada na literatura científica. Após ensaios, concluiu-se que para a cinética dessa reação bioortogonal, as melhores imagens são obtidas após aproximadamente 48 horas de reação. As imagens obtidas por microscopia confocal para essa situação reacional estão expostas na Figura 21.

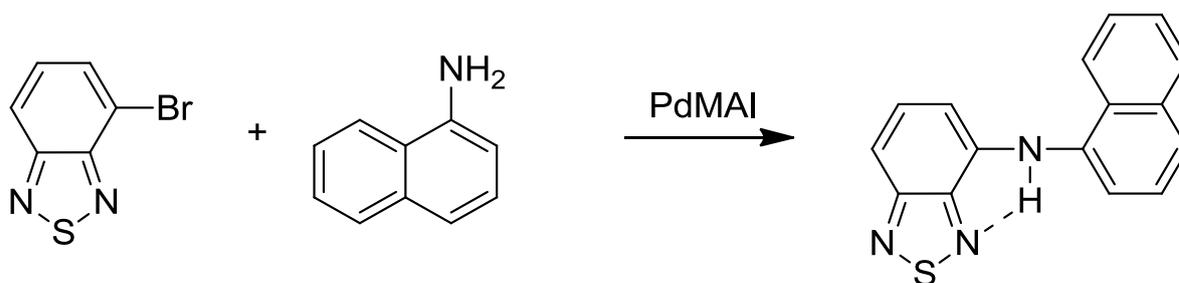


**Figura 21.** Células MCF-7, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o

marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTB capaz de atuar como marcador celular com eficiência quântica satisfatória. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTB formado de maneira bioortogonal. As setas indicam a região mitocondrial.

Com a metodologia científica à favor, as evidências são de que a reação planejada ocorreu com sucesso e que além disso, foi capaz de produzir uma espécie útil em investigações celulares, com comportamento que sugere seletividade para mitocôndrias. Essa seletividade será minuciosamente discutida por meio de dados obtidos logo adiante, embora seja de conhecimento biológico que as mitocôndrias estão situadas na região perinuclear.

A reação planejada que ocorreu ao encontro das características bioortogonais é demonstrada no . Reação bioortogonal realizada entre Br-BTB e 1-naftilamina. A reação de acoplamento cruzado formou um derivado BTB A reação de acoplamento cruzado formou um derivado BTB nomeado de BTB-Naft, em analogia às espécies participantes da reação.

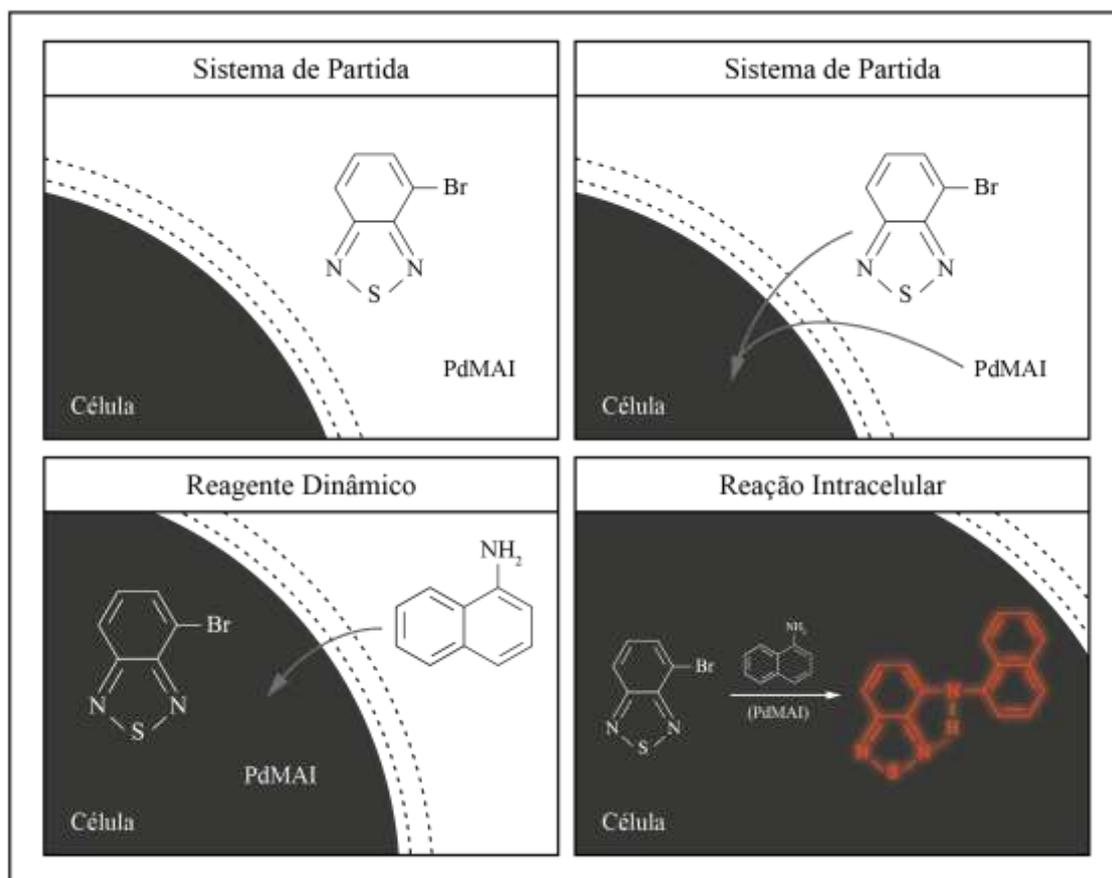


**Esquema 13.** Reação bioortogonal realizada entre Br-BTB e 1-naftilamina. A reação de acoplamento cruzado formou um derivado BTB batizado de BTB-Naft.

Essa reação de acoplamento que gera a síntese de ligações carbono-nitrogênio via catálise por espécies de paládio é descrita como acoplamento cruzado de Buchwald-

Hartwig.<sup>72</sup> Ressalta-se que não há anterioridade na literatura científica para a ocorrência dessa classe de reação em meio intracelular.

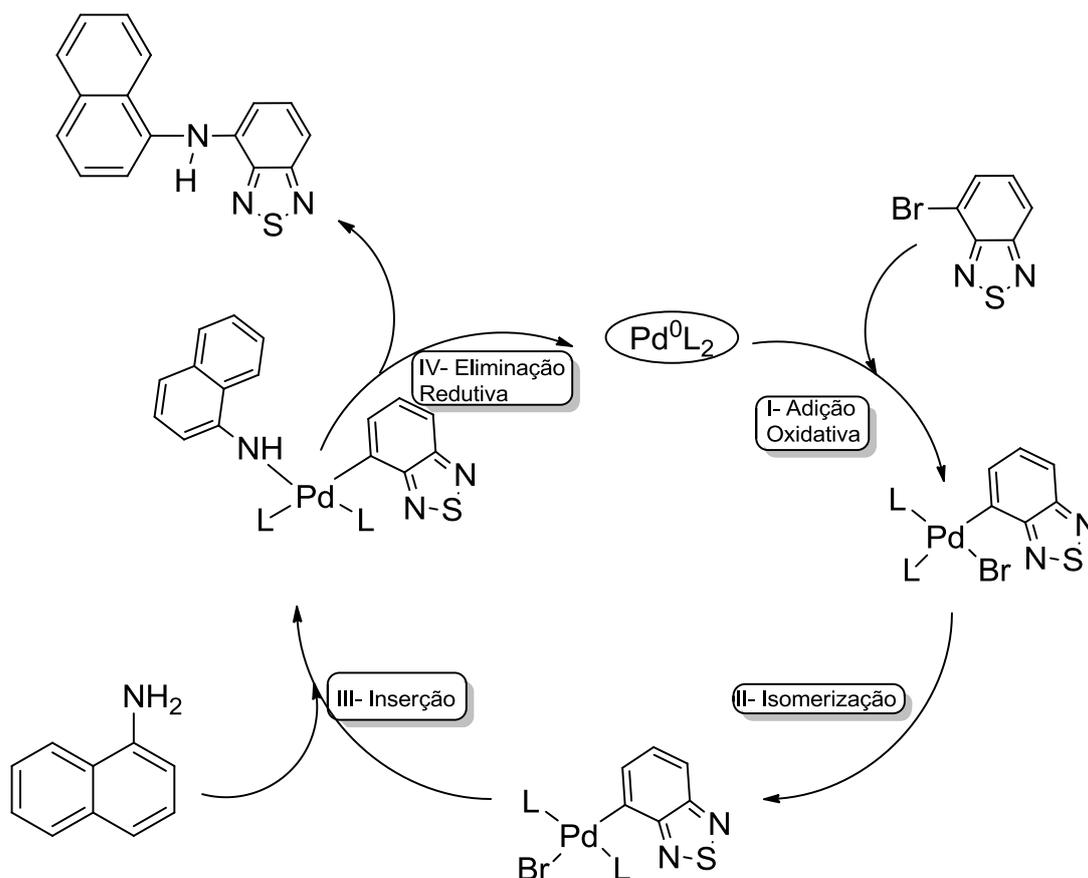
A Figura 22 ilustra de maneira concisa e didática o método bioortogonal realizado com sucesso.



**Figura 22.** Método bioortogonal desenvolvido no presente trabalho. Em (1) ocorre a incubação do sistema de partida na cultura celular. Em (2) ocorre a transposição do sistema de partida através da membrana para o meio intracelular. Após a lavagem das células, em (3) ocorre a incubação do reagente dinâmico e em (4) ocorre a reação bioortogonal com formação do produto luminescente.

A literatura científica existente ampara a proposição de ciclos catalíticos. Assim, o ciclo catalítico proposto para a aminação de Buchwald-Hartwig realizada

bioortogonalmente possui o mecanismo catalítico proposto no **Erro! Fonte de referência não encontrada.**



**Esquema 14.** Mecanismo catalítico proposto para a reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig, realizando pela primeira vez em ambiente celular. L= MAI complexo ao paládio.

A reação de acoplamento cruzado realizada Buchwald-Hartwig, inicia-se com a etapa de adição oxidativa, quando a ligação carbono-halogênio é desfeita, enquanto novas ligações carbono-Pd e halogênio-Pd são formadas. Normalmente essa etapa de adição oxidativa é considerada como determinante da reação.

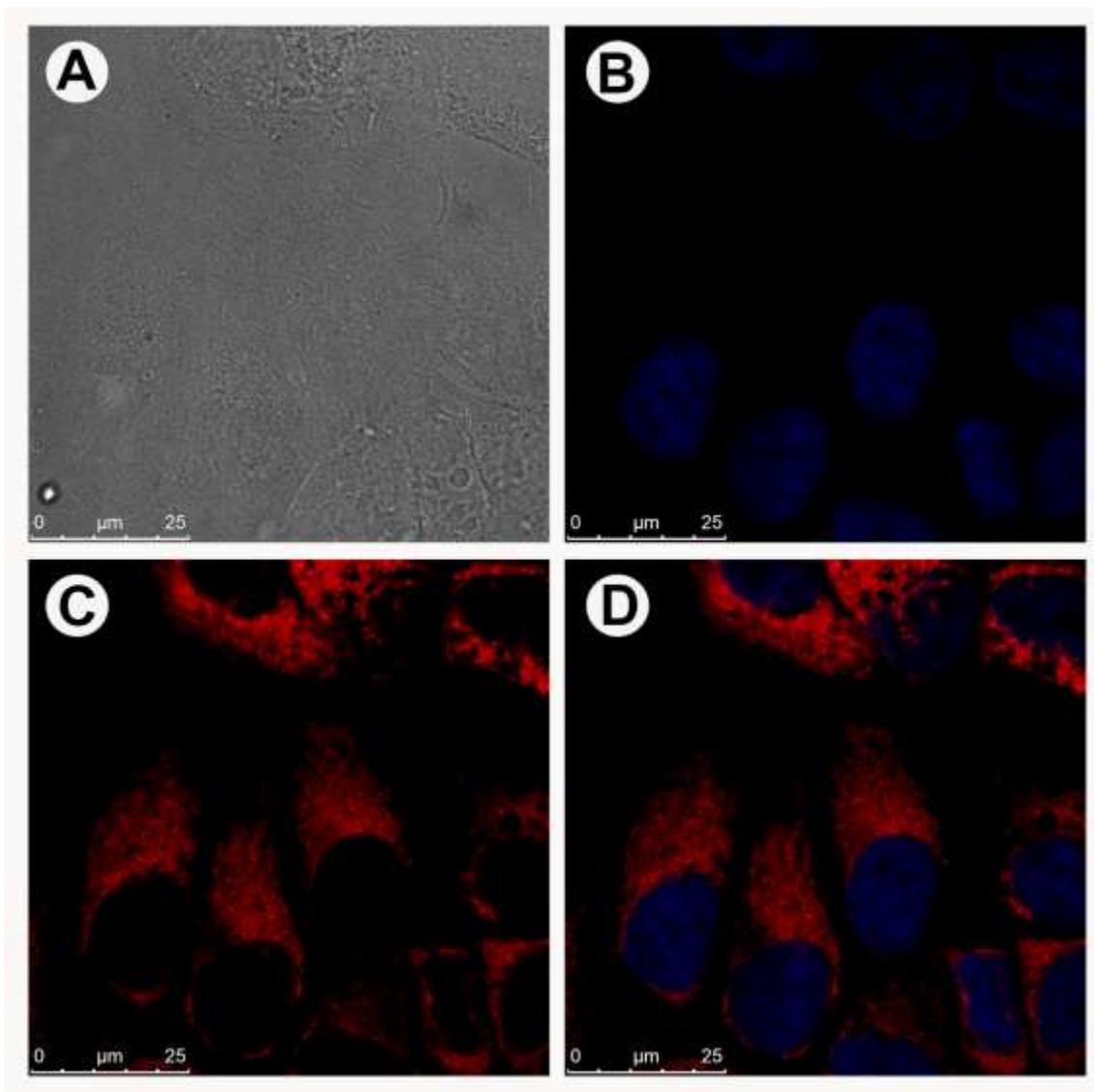
Estudos mecanísticos da etapa de adição oxidativa mostram que raramente são formados complexos *cis*- $PdL_2RX$ ,<sup>73,74</sup> sendo portanto, considerada a proposta de isomerização do *cis*- $PdL_2RX$  para o *trans*- $PdL_2RX$ .<sup>74,75</sup> A próxima etapa em uma reação de acoplamento-cruzado clássica, consiste em transmetalização, normalmente com o ciclo co-catalítico envolvendo cobre, ou de espécies organoboradas.<sup>76</sup>

O uso de cobre algumas vezes é indesejável, sobretudo do ponto de vista biológico, já que espécies de cobre não estáveis frequentemente são tóxicas para serem utilizadas em células vivas. Essa toxicidade é devido a danos oxidativos de espécies formadas pelo catalisador de cobre, induzindo alterações no metabolismo e ainda sendo absorvidos pelas células.<sup>77</sup> Por isso, também é importante o desenvolvimento de catalisadores de paládio que possibilitem o acoplamento-cruzado *copper-free*.

A última etapa é a etapa de eliminação redutiva, similar a adição oxidativa, e portanto, amplamente estudada e descrita na literatura tanto com fundamentação experimental,<sup>78</sup> quanto teórica.<sup>79</sup> A etapa de eliminação redutiva pode ocorrer por meio de alguns caminhos de reação, embora a via mais favorecida energeticamente seja mediante a espécie *cis*-PdR<sub>2</sub>L<sub>2</sub>.<sup>80</sup>

Diante do método bioortogonal realizado com sucesso, a metodologia envolvida nos estudos biológicos frequentemente ampara o sucesso e coerência dos dados experimentais por meio de ensaios envolvendo co-marcação, multi-marcação, comparação com ensaios envolvendo marcadores comerciais e outras linhagens científicas.

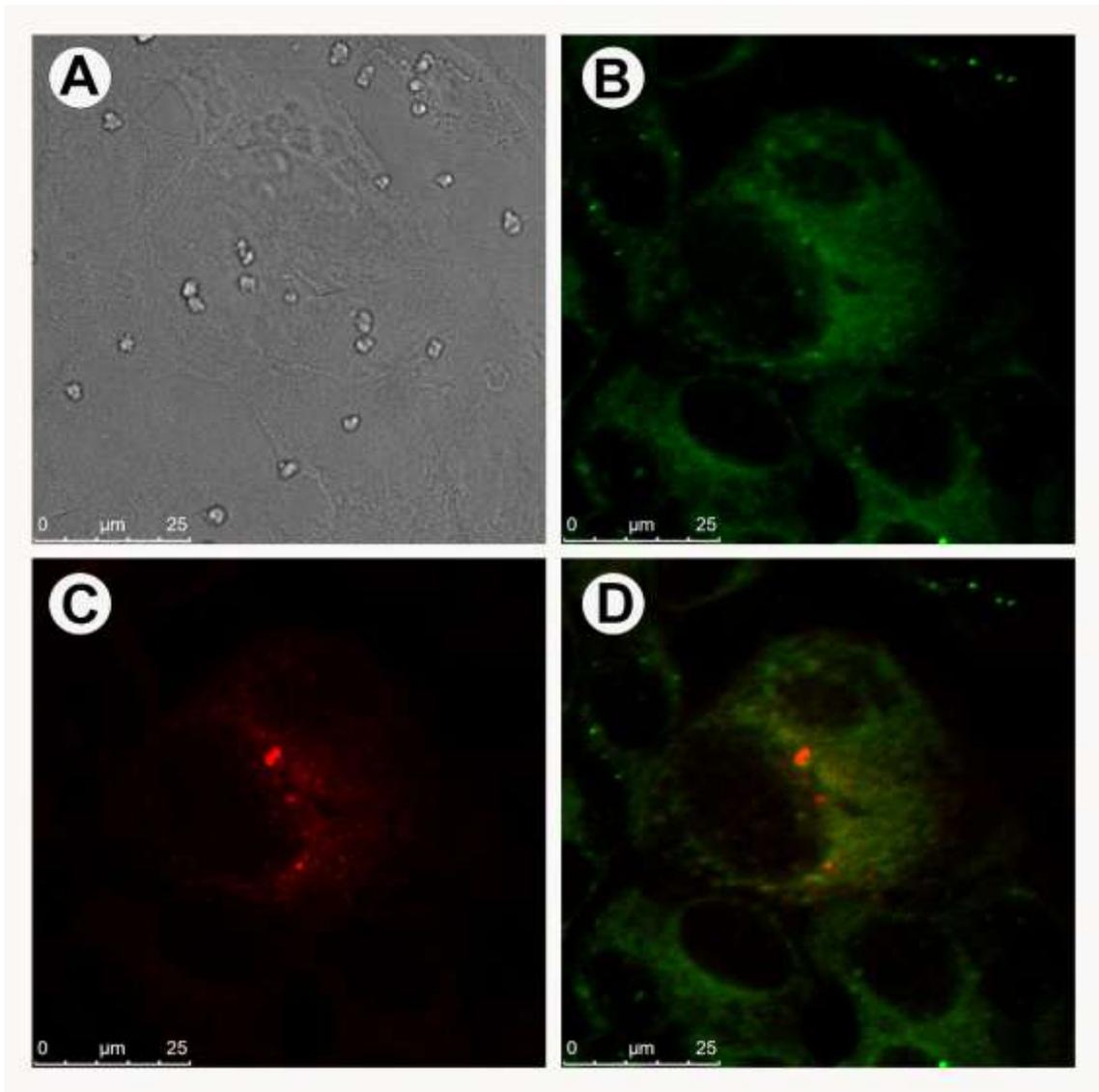
Por isso, a Figura 23 é referente a marcação de células MCF-7 com o marcador comercial Mitotracker, seletivo para mitocôndrias. O resultado dessa marcação permite inferir que o comportamento da BTD-Naft possui padrão semelhante à marcação com Mitotracker, aumentando as evidências do comportamento seletivo para mitocôndrias.



**Figura 23.** Células MCF-7 em ensaios com o marcador comercial mitoracker (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra o padrão de marcação referente a mitocôndrias e (D) mostra superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e mitotracker.

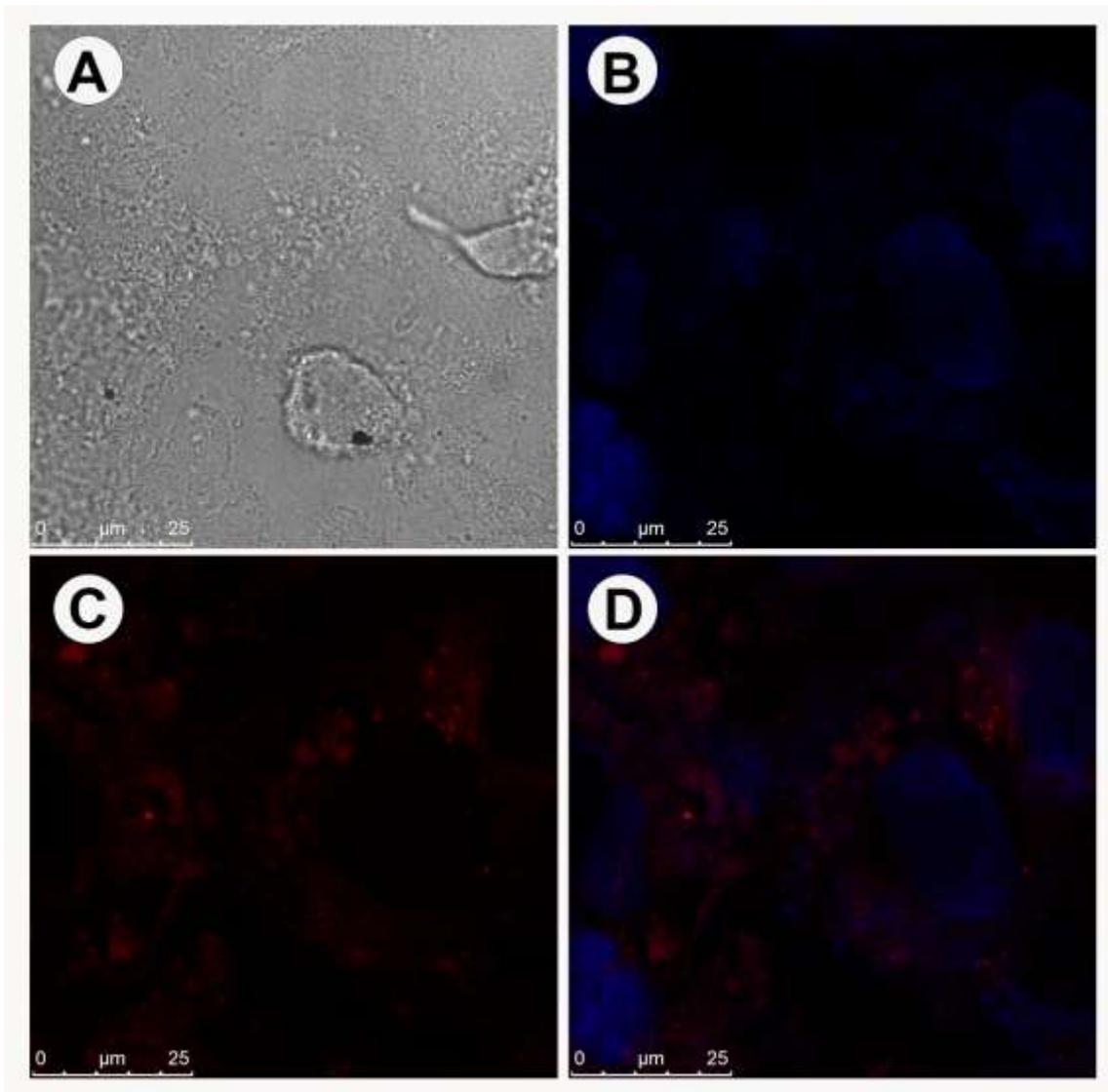
Ainda com a finalidade de confirmação do comportamento seletivo para mitocôndrias da BTD-Naft produzida por meio do presente método bioortogonal, realizou-se a co-marcação utilizando-se o composto splendor, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e com seletividade para mitocôndrias relatada na literatura

científica.<sup>62</sup> A Figura 24 é clara no que se refere a percepção de que a BTD-Naft possui seletividade para mitocôndrias assim como o splendor.

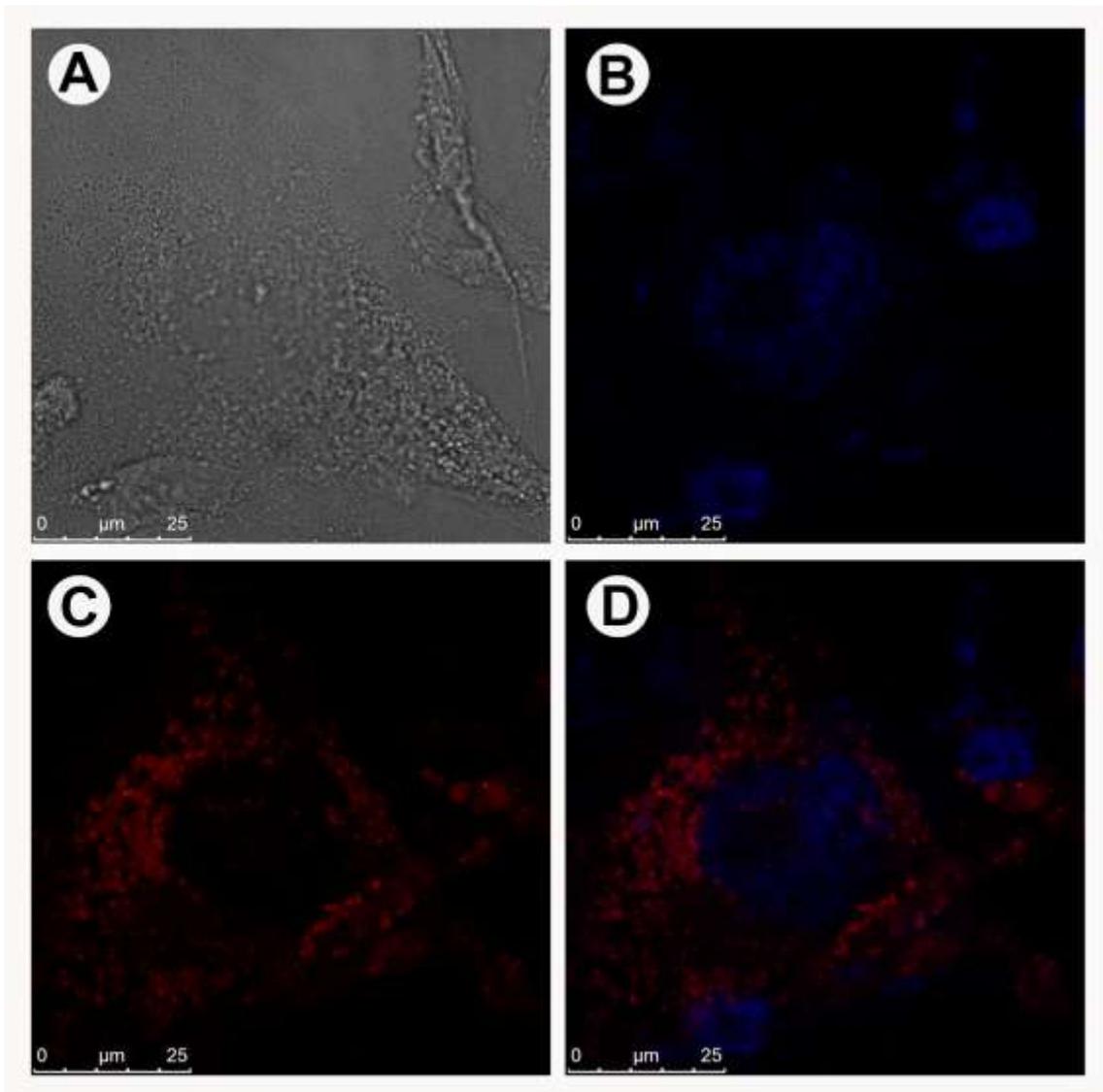


**Figura 24.** Ensaio de co-marcação da BTD-Naft com o marcador splendor anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa e de afinidade comprovada para mitocôndria. É notável a morfologia e comportamento semelhantes, o que sugere que a BTD-Naft sintetizada de maneira bioortogonal tem seletividade para esta organela. (A) demonstra a morfologia saudável por meio da técnica de campo claro, (C) sugere o comportamento seletivo para mitocôndrias quando comparado à marcação com (B) que é somente splendor. (D) mostra que a superposição da marcação de BTD-Naft e splendor tem o mesmo padrão de comportamento.

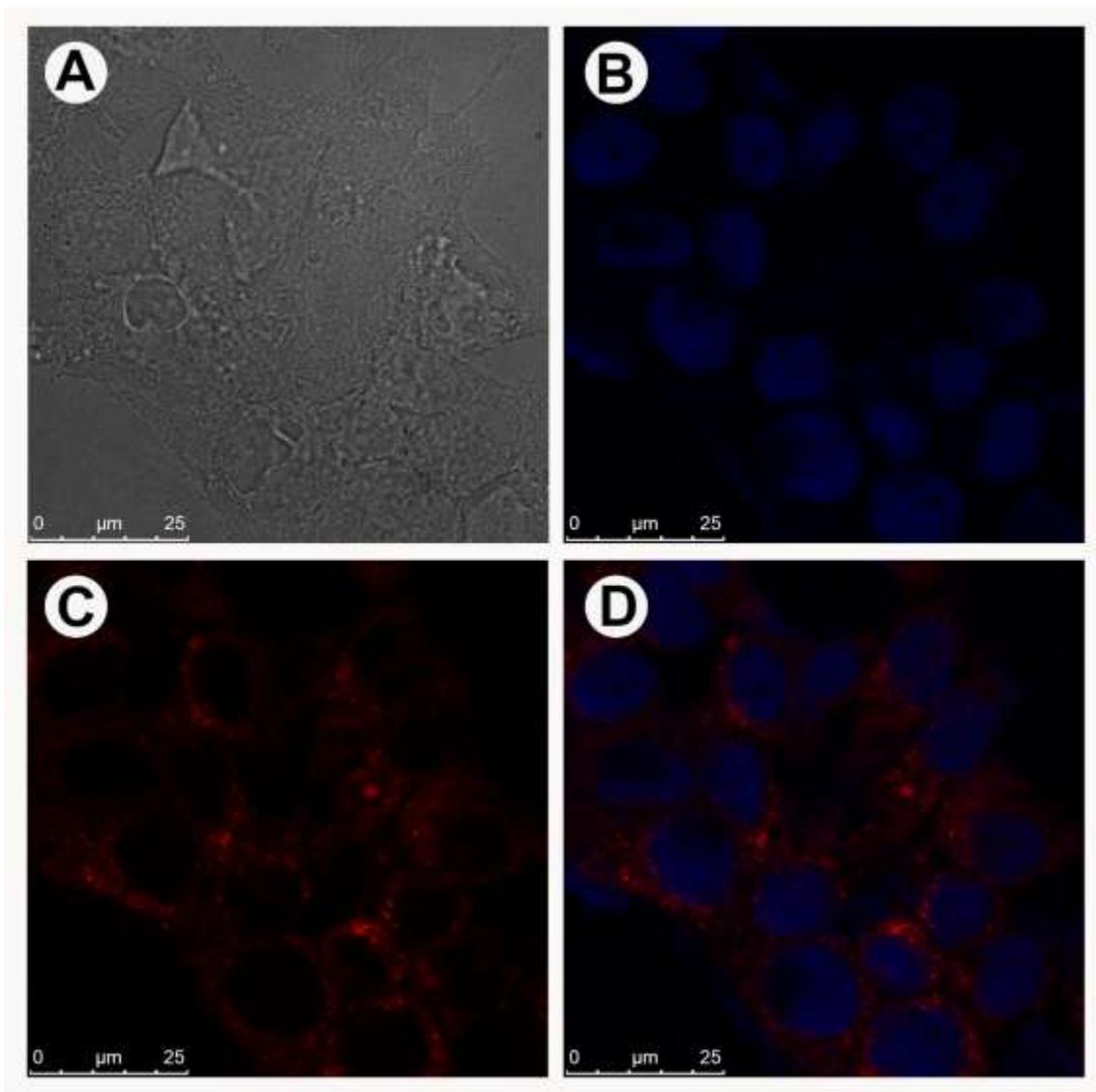
No que se refere à ensaios biológicos utilizando linhagens celulares variadas, como uma confirmação desse comportamento seletivo, além é claro, da confirmação da reação bioortogonal planejada, foram feitos testes em linhagens celulares de câncer denominadas: DU145, MDAMB231 e T47D. Além disso, também foi realizada a síntese bioortogonal em células de fibroblasto. Os ensaios com as linhagens DU145, MDAMB231, T47D e também fibroblastos estão respectivamente expostas na Figura 25 e Figura 26 e Figura 27 e Figura 28. Em todos os casos foram analisadas as pranchas com o controle (apenas sistema de partida ou apenas reagente dinâmico), mostrando o mesmo comportamento discutido anteriormente quando esses componentes foram incubados separadamente com a cultura celular, ou seja, não ocorreu fluorescência considerável.



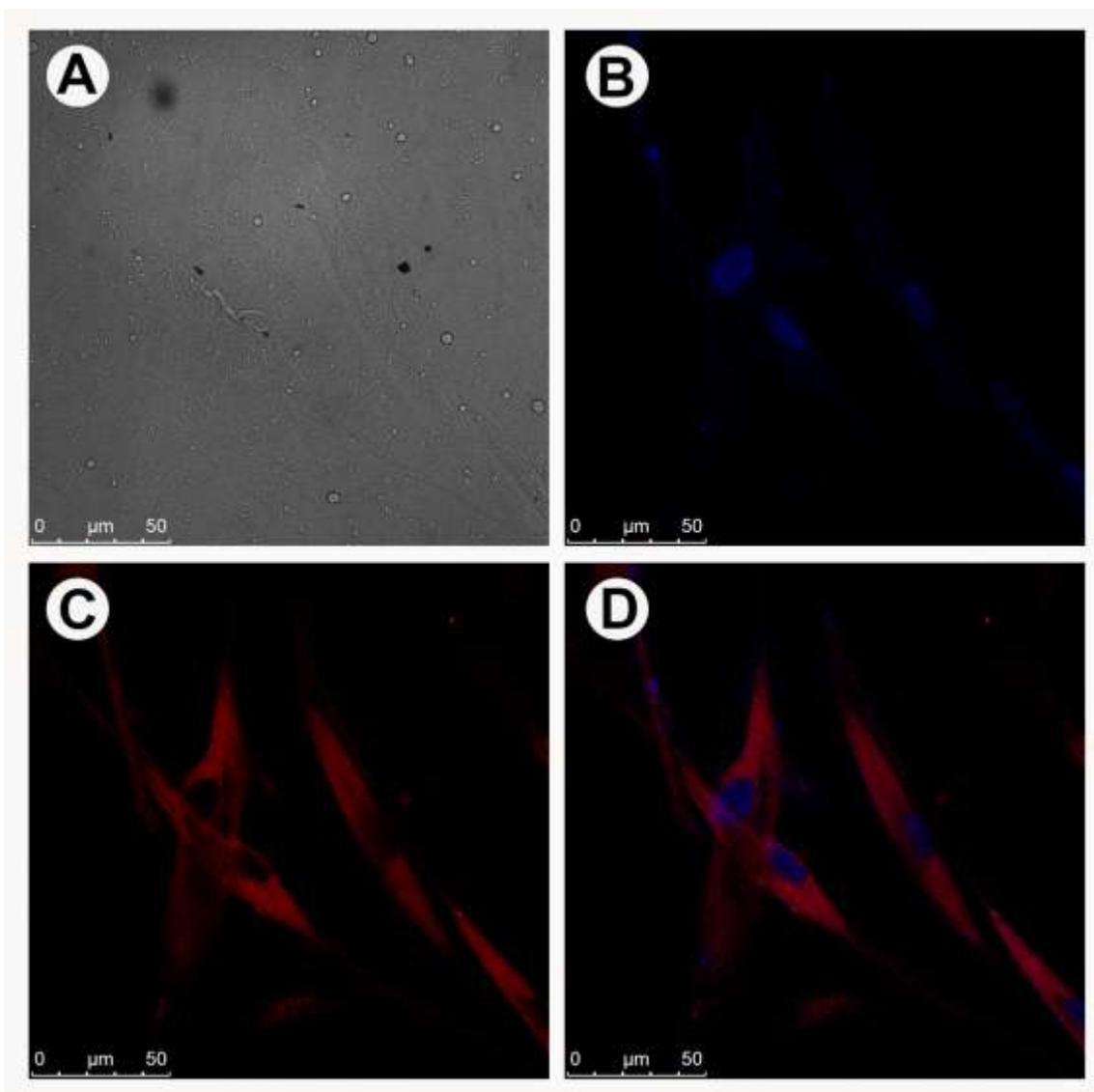
**Figura 25.** Células da linhagem DU145, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTD-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTD-Naft formado de maneira bioortogonal. As setas indicam a região mitocondrial.



**Figura 26.** Células da linhagem MDAMB231, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTD-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTD-Naft. A morfologia sugere comportamento seletivo para mitocôndria.



**Figura 27.** Células da linhagem T47D, após 48 horas reação bioortogonal entre sistema de partida e reagente dinâmico 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTD-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTD-Naft, com comportamento que sugere seletividade para mitocôndria.



**Figura 28.** Células de fibroblasto sob as condições de reação bioortogonal entre sistema de partida e 1-naftilamina. (A) mostra a morfologia saudável por meio da microscopia de campo claro. (B) é o imageamento dos núcleos marcados com o marcador celular comercial DAPI. (C) imagem mostra que a reação bioortogonal ocorreu com sucesso, formando o derivado BTD-Naft. (D) superposição das imagens referentes a marcação do núcleo com DAPI (azul) e derivado BTD-Naft, que encontra-se mais disperso no citosol.

#### 4.3) Caracterização do Derivado Inédito BTD-Naft Sintetizado em Laboratório

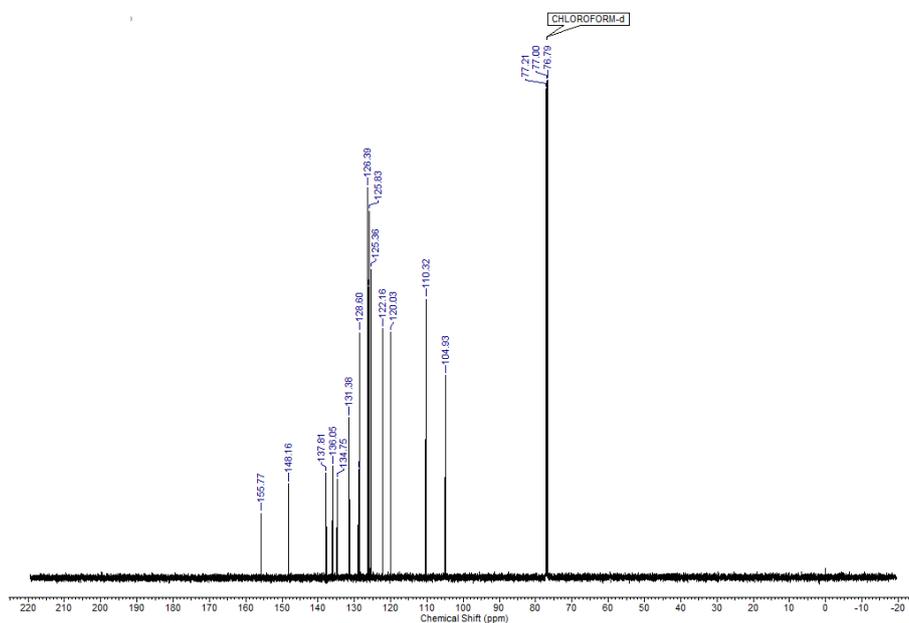
Também foi realizada em laboratório a reação entre Br-BTD e 1-naftilamina catalisada pela mesma espécie ionofílica PdMAI, como um prelúdio de que o composto

formado em meio intracelular refere-se a estrutura proposta no planejamento da reação. O aspecto do produto BTD-Naft em solução de dmso está evidenciado na foto da Figura 29.

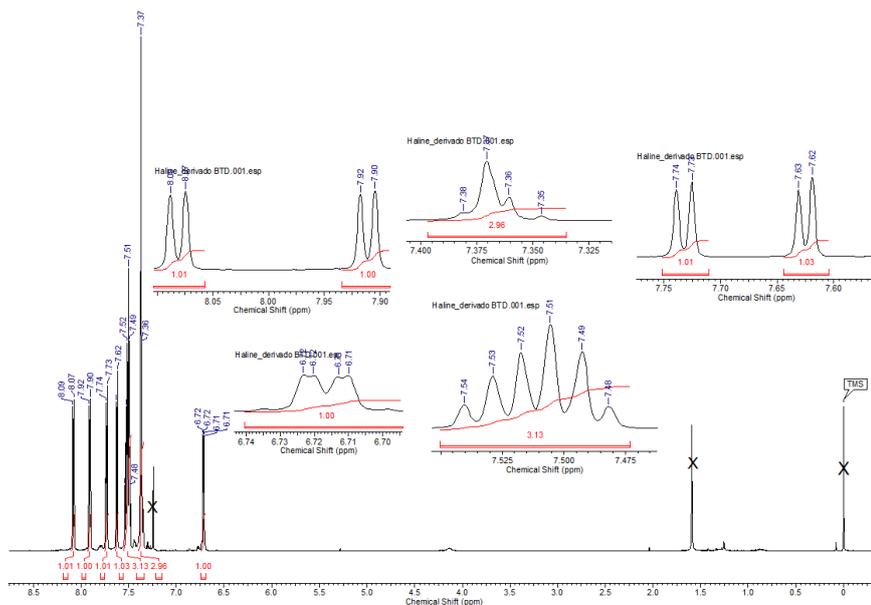


**Figura 29.** Solução de 3mg de BTD-Naft solubilizada em dmso.

A Figura 30 e a Figura 31 mostram respectivamente os espectros de  $^1\text{H}$ RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN para o produto obtido após purificação em coluna cromatográfica. Como observa-se a seguir, os espectros obtidos corroboram com a estrutura do produto almejado.

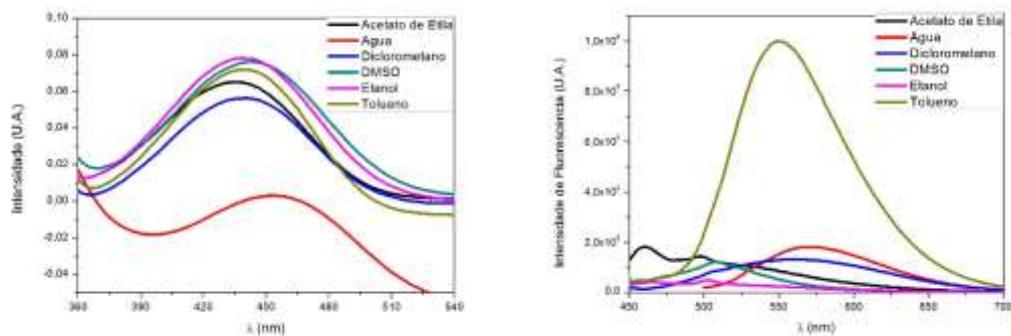


**Figura 30.**  $^{13}\text{C}$  RMN do derivado BTD-Naft sintetizado em laboratório, como uma evidência da confirmação da estrutura formada pelo método bioortogonal.



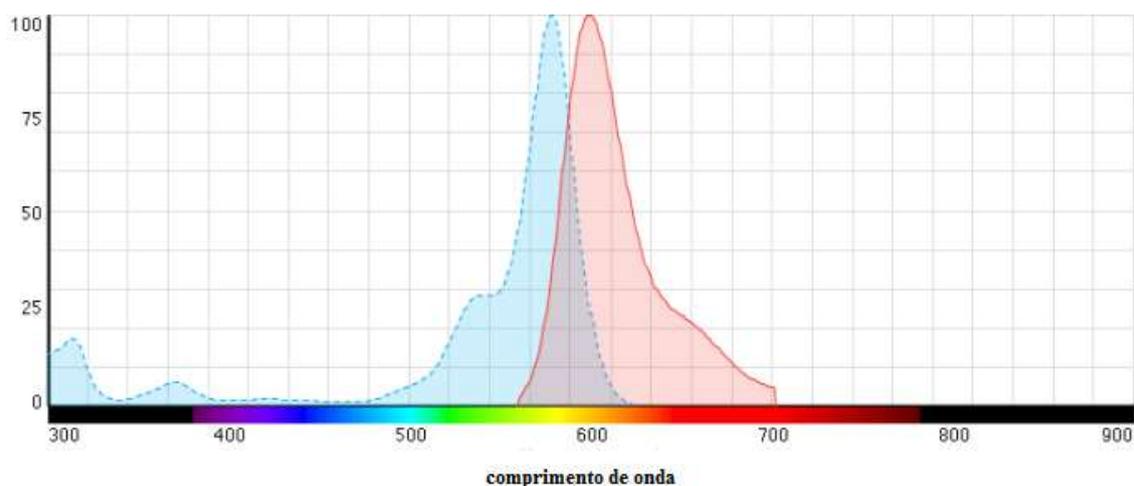
**Figura 31.**  $^1\text{H}$  RMN do derivado BTD-Naft sintetizado em laboratório, como uma evidência da confirmação da estrutura formada pelo método bioortogonal.

Com o derivado BTD-Naft em mãos, também foram realizados testes fotofísicos como mostra a Figura 32.



**Figura 32.** Ensaios fotofísicos realizados mostram as curvas de absorção e emissão para o derivado BTD-Naft sintetizado em laboratório.

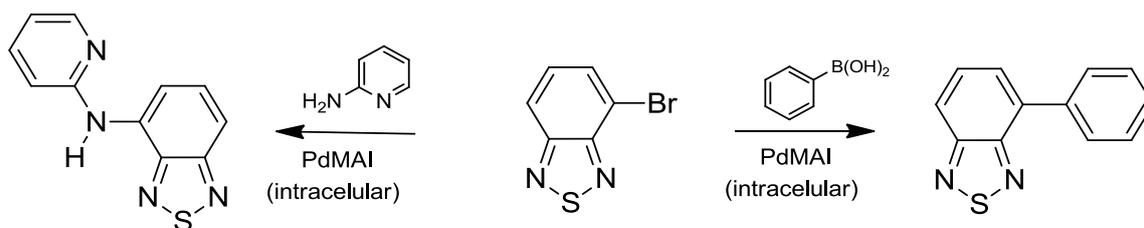
É notável que o produto sintetizado no presente trabalho tem deslocamentos de Stokes que em média superam 100 nanômetros. Essa é uma característica superior do marcador celular desenvolvido quando comparado ao perfil fotofísico do marcador comercial mitotracker, ilustrado na Figura 33.



**Figura 33.** Perfil fotofísico de absorção e emissão do mitotracker mostra um deslocamento de Stokes consideravelmente inferior ao do derivado BTD-Naft desenvolvido. A curva em azul é referente a absorção e a curva em vermelho é referente a emissão.<sup>81</sup>

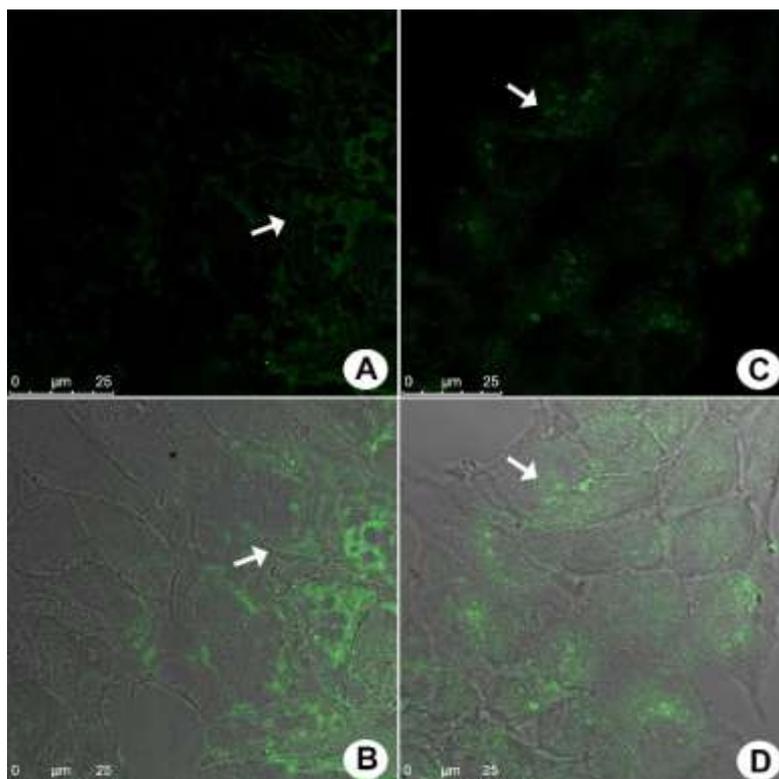
#### 4.4) Síntese Intracelular de Outros Derivados BTD

O Esquema 12 mostra as demais reações que foram planejadas, com a formação de produtos que já existem na literatura. O mesmo sistema de partida foi utilizado. Dois reagentes dinâmicos foram escolhidos nessa parte experimental: a 2-aminopiridina e o ácido fenil borônico. Os pontos de fusão foram mensurados e apresentaram valores na faixa de 57 a 60 °C para a 2-aminopiridina (padrão é de 55-58 °C) e 218 a 221 °C para o ácido fenilborônico (o padrão é 216-219 °C). A presença de impurezas de fato tende a aumentar a entropia do sólido, diminuindo seu potencial químico e dificultando a mudança de fase, necessitando de maior temperatura. Essa é uma possibilidade, visto que em escala celular, a presença de pouca quantidade de contaminante pode ser suficiente para inviabilizar a reação.



**Esquema 15.** Reações bioortogonais planejadas que não ocorreram de forma desejada em relação aos resultados reprodutíveis. À esquerda o produto do sistema de partida com a 2-aminopiridina, denominado **BTD-Py** e à direita o produto com o ácido fenilborônico, denominado **BTD-Ph**.

Na sexta hora do experimento, de acordo com a Figura 34 já foi detectada a formação de cada um dos produtos de acoplamento, fluorescentes, nesse primeiro momento ainda dispersos no citossol. O derivado **BTD-Ph** não mostrou preferência por nenhuma organela, enquanto o derivado **BTD-Py**, entretanto, mostrou comportamento que indica tendência a migração para a mitocôndria, colorindo seletivamente a organela. Nenhum dos dois compostos fluorescentes foi encontrado no núcleo celular.

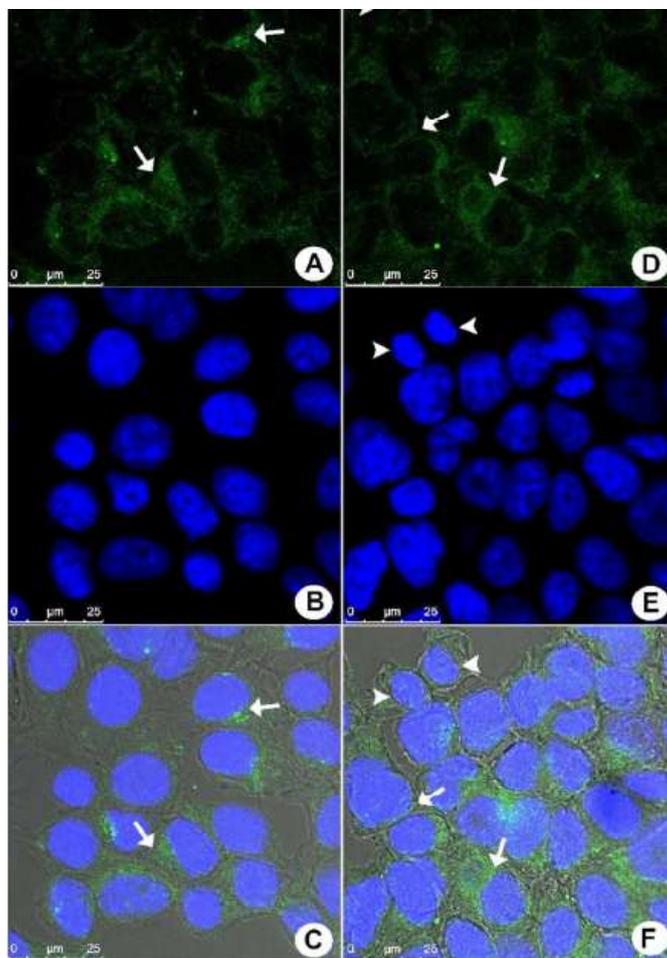


**Figura 34.** Células MCF-7 de câncer de mama vivas com os compostos fluorescentes formados por meio do método intracelular, após 6 horas. Em (A) e (C) são células com respectivamente BTM-Py e BTM-Ph. As setas sugerem morfologicamente a distribuição mitocondrial. A distribuição sugere que BTM-Py tem tendência a seletividade mitocondrial, enquanto BTM-Ph não demonstra a mesmo comportamento. Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ .

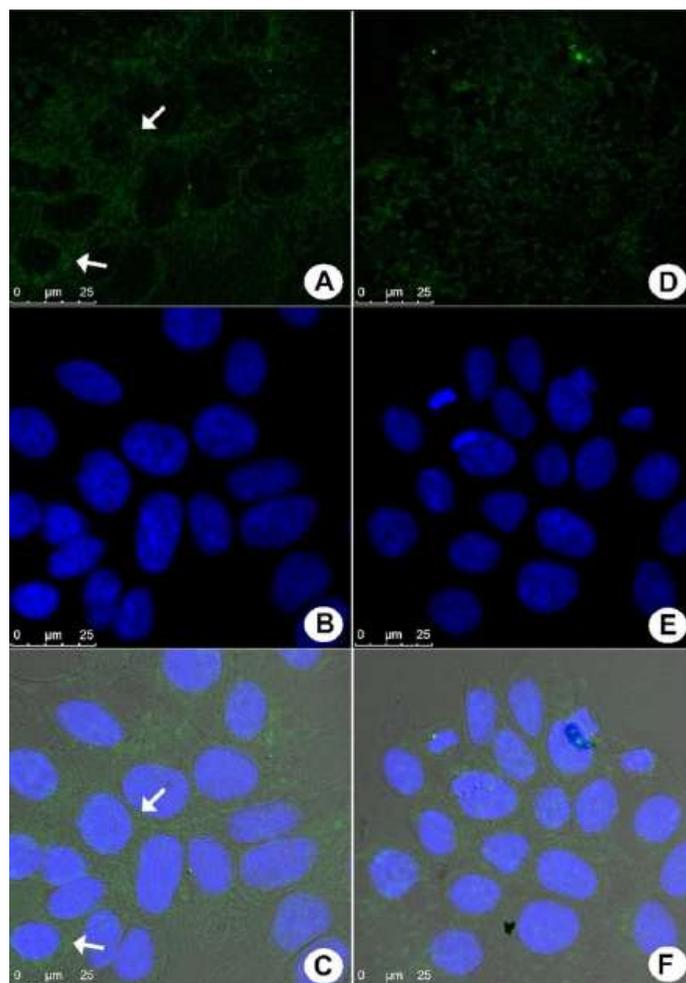
Após 24 horas (Figura 35) de experimento, BTM-Ph mostrou uma tendência a coloração mitocondrial, porém de forma pobremente seletiva. Contudo, a BTM-Py continuou com tendência a seletividade mitocondrial, e assim, a biosonda foi capaz de migrar da pseudo-organela, através do citoplasma até a mitocôndria, sem degradação.

Após 48 horas (Figura 36) de reação intracelular, a BTM-Ph pode ser encontrada não só na mitocôndria, como também disperso no citossol, confirmando a tendência inicial a marcação não seletiva. BTM-Py, após 48h, foi encontrada quase exclusivamente na mitocôndria, confirmando que após a síntese na pseudo-organela, ela foi capaz de se mover dentro da célula para marcar seletivamente as mitocôndrias, preservando o metabolismo nativo da célula. A fluorescência em 48h é menos intensa que em 24h, provavelmente devido a processos de divisão celular, que notavelmente

não sofreu interferência da atividade da pseudo-organela nem do produto da síntese intracelular. O imageamento e rastreamento dinâmico mitocondrial foi possível durante todo o período do experimento.



**Figura 35.** Células MCF-7 de câncer de mama vivas com os compostos fluorescentes após 24 horas. As colunas verticais iniciadas em (A) e (D) são células com respectivamente BTD-Py e BTD-Ph. As setas sugerem a distribuição mitocondrial dentro das células e as meia setas indicam a não interferência da atividade da pseudo-organela com os processos de divisão celular. (B) e (E) mostram os núcleos marcados com o marcador comercial DAPI. (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste, com os respectivos painéis. Barra de escala 25 µm.

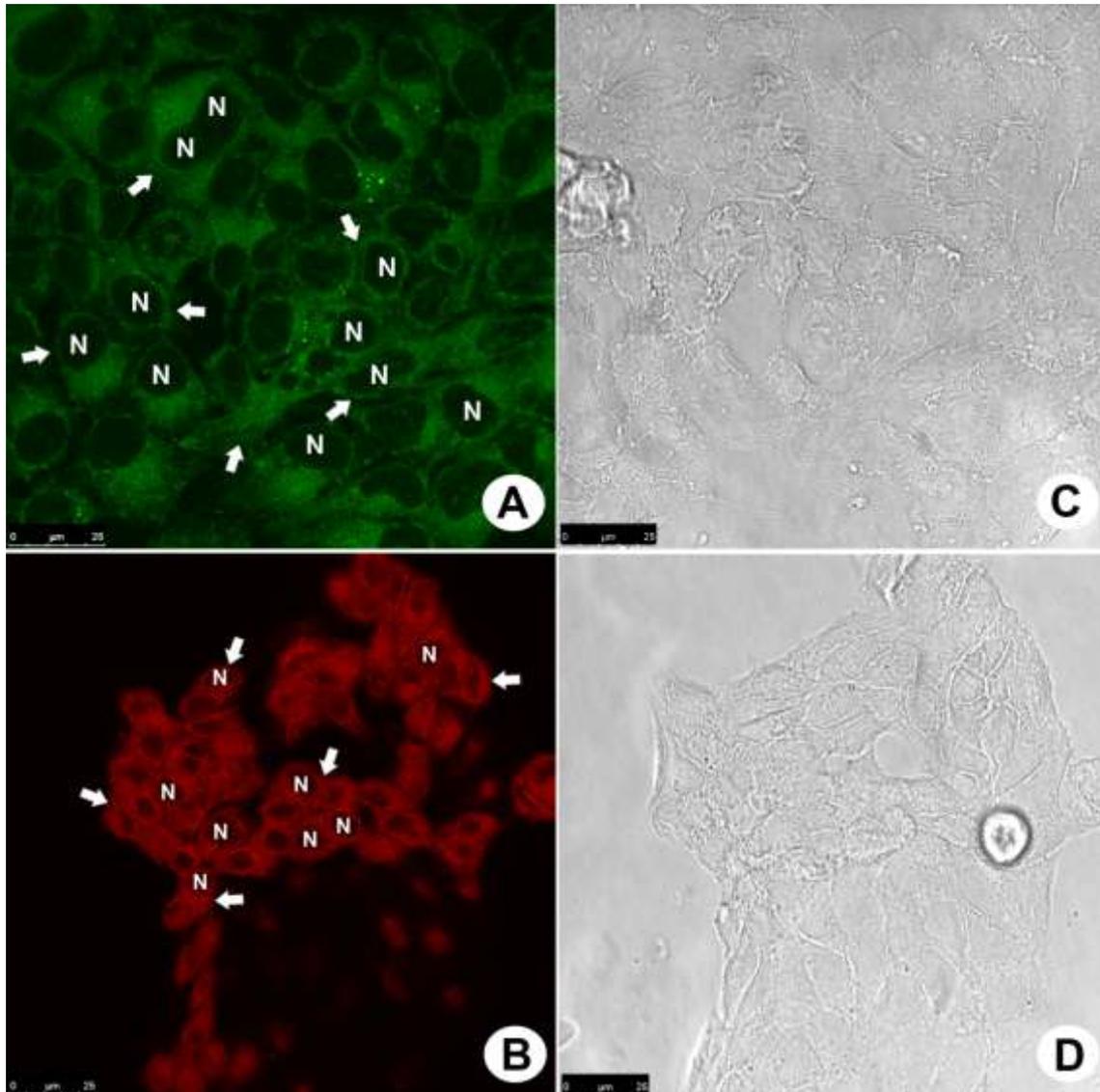


**Figura 36.** Células MCF-7 de câncer de mama vivas com os compostos fluorescentes formados *in cellulo* após 48 horas. As colunas verticais iniciadas em (A) e (D) são células marcadas respectivamente com BTM-Py e BTM-Ph. As setas sugerem a distribuição mitocondrial dentro das células. (B) e (E) mostram os núcleos marcados com o marcador comercial DAPI. (C) e (F) mostram a morfologia normal da célula por microscopia de contraste, com os respectivos painéis. Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ .

Uma notável característica desse experimento é que foi possível o imageamento multicolor, usando o marcador comercial DAPI seletivo para o núcleo celular com emissão azul, sem nenhuma interferência com a atividade do sistema reacional. Nenhuma precipitação das sondas BTM nem fotodegradação foi observada, indo ao encontro das características desejáveis de pequenas moléculas fluorescentes.

O experimento de co-marcação utilizando Mitotracker Red, foi realizado também para o reagente dinâmico BTM-Py, como forma de confirmar e assegurar o

comportamento seletivo para mitocôndria. Os resultados obtidos vão ao encontro da proposta de seletividade e estão na **Figura 37**.



**Figura 37.** Experimento de co-marcação utilizando Mitotracker. Em (A) e (C) estão expostas as imagens de confocal e campo claro para o produto formado BTD-Py. Em (B) e (D) as células estão marcadas com Mitotracker Red. Nota-se um comportamento análogo, sugerindo a seletividade para mitocôndria. As setas indicam a distribuição mitocondrial perinuclear. A letra N indica a posição dos núcleos.

## 5) CONCLUSÕES

Por meio dos dados obtidos e discussão realizada, é possível concluir que o método desenvolvido para realização de reações bioortogonais, que sejam capazes de gerar derivados BTM com utilidade em aplicação de estudos biológicos, ocorreu com sucesso. Os dados analisados até o momento permitem concluir que é possível desempenhar um método alternativo e inovador para investigações de processos celulares.

Foram realizadas reações de acoplamento-cruzado de Buchwald-Hartwig e Suzuki. O produto da reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig entre Br-BTM e 1-naftilamina ocorreu de maneira totalmente reprodutível e o derivado formado em ambiente intracelular apresenta comportamento sugestivo de seletividade mitocondrial.

As reações intracelulares foram possíveis devido a catálise promovida por espécies de paládio, especificamente o PdMAI que possibilitou a catálise homogênea inédita.

Os experimentos de monitoramento e tracking celular ocorreram com sucesso, com bom contraste e mostrando-se não interferente ao uso de marcadores nucleares comerciais, apresentando assim uma vantagem para estudos celulares.

O método desenvolvido corrobora com a responsabilidade ambiental que os químicos possuem, à luz da Química Verde. As reações de acoplamento-cruzado realizadas em laboratório demandam cerca de 48h em temperaturas elevadas, com a necessidade de posterior purificação, gerando resíduos e gasto energético. Já o presente método utiliza apenas quantidades mínimas, suficientes em escala celular, abreviando todo o processo até agora utilizado comercialmente.

Ainda, com a diminuição de custos e simplificação dos métodos, é possível que mais grupos de pesquisa ao redor do mundo se envolvam com investigações biológicas, favorecendo um cenário no qual esteja propício uma maior chance de descobertas relacionadas à doenças celulares, contribuindo de maneira positiva com indivíduos da sociedade.

Ressalta-se ainda que nenhum dos componentes do sistema de partida ou do reagente dinâmico possui eficiência luminescente. Assim, a ocorrência da fluorescência é evidência da formação do produto e o êxito da reação.

## 6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. *Nat Chem* **2012**, *4*, 973.
- (2) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48*, 1560.
- (3) Neto, B. A. D.; Carvalho, P.; Santos, D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; de Vasconcelos, N. M.; Correa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *Rsc Advances* **2012**, *2*, 1524.
- (4) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Carvalho, P.; Santos, D.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; de Oliveira, H. C. B.; Fasciotti, M.; Eberlin, M. N.; da Silva, E. N. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23*, 770.
- (5) dos Santos, W. L. P. *Cultural Studies of Science Education* **2014**, *9*, 663.
- (6) Douglas B. Murphy, M. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*; Willey Blackwell: New Jersey, 2013.
- (7) Rogers, C. W.; Wolf, M. O. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *233–234*, 341.
- (8) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *Acs Chemical Biology* **2008**, *3*, 142.
- (9) Herschel, J. F. W. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1845**, *135*, 143.
- (10) Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463.
- (11) Zimmer, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 2823.
- (12) Rodrigues, C. V.; Correa, J. R.; Aiube, C. M.; Andrade, L. P.; Galvão, P. M.; Costa, P. A.; Campos, A. L.; Pereira, A. J.; Ghesti, G. F.; Felix, J. F.; Weber, I. T.; Neto, B. A.; Rodrigues, M. O. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2015**, *26*, 2623.
- (13) Sankaran, R. M.; Holunga, D.; Flagan, R. C.; Giapis, K. P. *Nano Letters* **2005**, *5*, 537.
- (14) D'Angelis do E. S. Barbosa, C.; Corrêa, J. R.; Medeiros, G. A.; Barreto, G.; Magalhães, K. G.; de Oliveira, A. L.; Spencer, J.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 5055.
- (15) Xu, Y.-Y.; Hemmila, I. A.; Lovgren, T. N. E. *Analyst* **1992**, *117*, 1061.
- (16) Byron, B.; Lauren, A. E.; Alan, S. W. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 795.
- (17) Cornish, V. W.; Hahn, K. M.; Schultz, P. G. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 8150.
- (18) Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. *Gene* **1992**, *111*, 229.
- (19) Tsien, R. Y. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, *67*, 509.
- (20) Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. *Nat Meth* **2005**, *2*, 905.
- (21) Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W. *Journal of Cell Science* **2007**, *120*, 4247.
- (22) Snapp, E. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]* **2005**, CHAPTER, Unit.
- (23) Nienhaus, G. U. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8992.
- (24) Tanaka, T.; Yamamoto, T.; Tsukiji, S.; Nagamune, T. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 802.
- (25) Johnsson, N.; George, N.; Johnsson, K. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 47.
- (26) Joshi, A. K.; Zhang, L.; Rangan, V. S.; Smith, S. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 33142.
- (27) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6974.

- (28) Andresen, M.; Schmitz-Salue, R.; Jakobs, S. *Molecular Biology of the Cell* **2004**, *15*, 5616.
- (29) Jonsson, T.; Stefansson, H.; Steinberg, S.; Jonsdottir, I.; Jonsson, P. V.; Snaedal, J.; Bjornsson, S.; Huttenlocher, J.; Levey, A. I.; Lah, J. J.; Rujescu, D.; Hampel, H.; Giegling, I.; Andreassen, O. A.; Engedal, K.; Ulstein, I.; Djurovic, S.; Ibrahim-Verbaas, C.; Hofman, A.; Ikram, M. A.; van Duijn, C. M.; Thorsteinsdottir, U.; Kong, A.; Stefansson, K. *The New England journal of medicine* **2013**, *368*, 107.
- (30) Hardy, J.; Allsop, D. *Trends in Pharmacological Sciences* **1991**, *12*, 383.
- (31) Iqbal, K.; del C. Alonso, A.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C.-X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2005**, *1739*, 198.
- (32) Anand, P.; Kunnumakara, A.; Sundaram, C.; Harikumar, K.; Tharakan, S.; Lai, O.; Sung, B.; Aggarwal, B. *Pharmaceutical Research* **2008**, *25*, 2097.
- (33) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat Chem Biol* **2005**, *1*, 13.
- (34) van Swieten, P. F.; Leeuwenburgh, M. A.; Kessler, B. M.; Overkleeft, H. S. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 20.
- (35) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 666.
- (36) Rosenberg, B. In *Inorganic and Nutritional Aspects of Cancer: Proceedings of the First Conference of the International Association of Bioinorganic Scientists, Inc. held in La Jolla, California, January 3–5, 1977*; Schrauzer, G. N., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1978, p 129.
- (37) Amoêdo, Nívea D.; Valencia, Juan P.; Rodrigues, Mariana F.; Galina, A.; Rumjanek, Franklin D. *Bioscience Reports* **2013**, *33*, e00080.
- (38) Chinery, R.; Brockman, J. A.; Peeler, M. O.; Shyr, Y.; Beauchamp, R. D.; Coffey, R. J. *Nat Med* **1997**, *3*, 1233.
- (39) Rideout, D. *Science* **1986**, *233*, 561.
- (40) Ramil, C. P.; Lin, Q. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 11007.
- (41) Ovaa, H.; van Swieten, P. F.; Kessler, B. M.; Leeuwenburgh, M. A.; Fiebiger, E.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; Galardy, P. J.; van der Marel, G. A.; Ploegh, H. L.; Overkleeft, H. S. *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, 3754.
- (42) Li, J.; Chen, P. R. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 129.
- (43) Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 973.
- (44) Griffin, R. J. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G. P., Luscombe, D. K., Eds.; Elsevier: 1994; Vol. Volume 31, p 121.
- (45) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007.
- (46) Staudinger, H.; Meyer, J. *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635.
- (47) Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 8400.
- (48) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004.
- (49) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26*, 1211.
- (50) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Medicinal Research Reviews* **2008**, *28*, 278.
- (51) Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, G. L.; Thornton, J. M. *J Biol Inorg Chem* **2008**, *13*, 1205.
- (52) Lu, Y. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 5588.
- (53) Haas, K. L.; Franz, K. J. *Chem Rev* **2009**, *109*, 4921.
- (54) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 17993.
- (55) Yusop, R. M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M. V.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. *Nat Chem* **2011**, *3*, 239.

- (56) Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Macleod, K. G.; Rybski, W.; Fraser, C.; Torres-Sánchez, C.; Patton, E. E.; Bradley, M.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. *Nat Commun* **2014**, *5*.
- (57) Li, J.; Yu, J.; Zhao, J.; Wang, J.; Zheng, S.; Lin, S.; Chen, L.; Yang, M.; Jia, S.; Zhang, X.; Chen, P. R. *Nat Chem* **2014**, *6*, 352.
- (58) Michel, B. W.; Lippert, A. R.; Chang, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 15668.
- (59) Joag, M. G.; Sise, A.; Murillo, J. C.; Sayed-Ahmed, Ibrahim O.; Wong, J. R.; Mercado, C.; Galor, A.; Karp, C. L. *Ophthalmology*, *123*, 1442.
- (60) Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Fraser, C.; Rybski, W.; Torres-Sánchez, C.; Bradley, M.; Patton, E. E.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 5395.
- (61) Oliveira, F. F. D.; Santos, D.; Lapis, A. A. M.; Correa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 6001.
- (62) Carvalho, P.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. *Chemistry-a European Journal* **2014**, *20*, 15360.
- (63) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, n/a.
- (64) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. *Chemical Science* **2014**, *5*, 3995.
- (65) Mota, A. A. R.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; de Sousa, N. M. P.; de Oliveira, H. C. B.; Gatto, C. C.; da Silva Filho, D. A.; de Oliveira, A. L.; Neto, B. A. D. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 2958.
- (66) Pilgram, K.; Zupan, M.; Skiles, R. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1970**, *7*, 629.
- (67) Oliveira, F. F.; dos Santos, M. R.; Lalli, P. M.; Schmidt, E. M.; Bakuzis, P.; Lapis, A. A.; Monteiro, A. L.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. *J Org Chem* **2011**, *76*, 10140.
- (68) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9*, 37.
- (69) Marks, D. C.; Belov, L.; Davey, M. W.; Davey, R. A.; Kidman, A. D. *Leukemia Research* **1992**, *16*, 1165.
- (70) Robert, H. W. *Reports On Progress In Physics* **1996**, *59*, 427.
- (71) Patel, D. V.; McGhee, C. N. J. *Clinical & Experimental Ophthalmology* **2007**, *35*, 71.
- (72) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Chemical Science* **2011**, *2*, 27.
- (73) Urata, H.; Tanaka, M.; Fuchikami, T. *Chemistry Letters* **1987**, 751.
- (74) Casado AL, E. P. *Organometalics* **1998**, *17*
- 954.
- (75) Faza, R. Á. O. N.; de Lera, A. R.; Cárdenas, D. J. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349*, 887.
- (76) Mino, T.; Shirae, Y.; Saito, T.; Sakamoto, M.; Fujita, T. *J Org Chem* **2006**, *71*, 9499.
- (77) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 17993.
- (78) Espinet, P.; Echavarren, A. M. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 4704.
- (79) Fan, T.; Chen, X.; Lin, Z. *Chem Commun* **2012**, *48*, 10808.
- (80) Perez-Rodriguez, M.; Braga, A. A.; Garcia-Melchor, M.; Perez-Temprano, M. H.; Casares, J. A.; Ujaque, G.; de Lera, A. R.; Alvarez, R.; Maseras, F.; Espinet, P. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 3650.
- (81) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M7512> acessado em 10/01/2017.

