

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Izadora Fonseca Reis

**Catálise no limite de molécula única na obtenção de corantes
fluorescentes**

São Carlos

2023

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Izadora Fonseca Reis

Catálise no limite de molécula única na obtenção de corantes fluorescentes

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciência.

Área de concentração: Físico-Química
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique
Gehlen

São Carlos

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Reis, Izadora Fonseca
Catálise no limite de molécula única na obtenção de corantes fluorescentes /
Izadora Fonseca Reis. — São Carlos, 2023.
125 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

1. Catálise. 2. Microzeólitas. 3. Fluorescência. 4. Molécula única. 5. Paládio.
I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8



Este trabalho é dedicado principalmente à minha família, e a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para possibilitar a realização deste projeto. Seu apoio e participação foram fundamentais ao longo deste percurso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus e quero expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Denilson e Sonia, por serem os pilares da minha vida, por todo o amor incondicional, apoio inabalável e pela dedicação incansável em me orientar e incentivar em cada etapa.

Aos meus queridos irmãos, Isabela e Cesar, pelo amor, carinho e apoio sempre.

Aos meus avós, pelo carinho, risadas e sabedoria que sempre compartilharam comigo, tornando minha vida mais rica e significativa.

Ao meu namorado Vinícius por estar sempre ao meu lado, trazendo alegria e tornando cada dia mais especial. Sou grata por compartilharmos juntos os desafios e as conquistas.

Aos meus queridos sogros, João e Ana, por todo o carinho, acolhimento e por fazerem parte da minha vida.

À minha cunhada e querida amiga Fabiana, por compartilharmos momentos maravilhosos juntas.

À minha querida família, por todo o suporte, compreensão e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen, pela orientação precisa, dedicação e conhecimentos compartilhados, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo apoio, colaboração, experiências e ideias compartilhadas. E aos funcionários do IQSC e da pós por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus amigos, pelo incentivo e por estarem sempre presentes, tornando os desafios mais leves e as conquistas mais memoráveis. Principalmente as minhas melhores amigas Dani e Bia e às meninas e técnicos do futsal.

À CAPES pela bolsa de doutorado, CNPq e FAPESP por tornarem possível a realização deste projeto, através do apoio financeiro e oportunidades concedidas.

*"A verdadeira jornada do descobrimento
não é buscar novas paisagens, mas ver
com novos olhos." (Marcel Proust)*

RESUMO

Neste estudo, quatro reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura utilizando paládio como catalisador foram estudadas em nível de molécula única (SM) por meio da microscopia de fluorescência por reflexão total interna (TIRF) e imagem óptica super-resolvida. Três metodologias distintas foram empregadas para depositar um pré-catalisador e conduzir os experimentos SM. Na primeira, o paládio foi adsorvido diretamente em sítios iônicos da superfície do vidro; na segunda, houve a complexação do paládio com um ligante fixado à superfície de vidro; e na terceira, microzeólitas funcionalizadas, silanadas e funcionalizadas com paládio foram utilizadas como um template reacional. Em todas as três metodologias, foram usados regimes extremamente diluídos do catalisador. A análise da intermitência da fluorescência proveniente de pontos localizados nanoscopicamente proporcionou uma medida direta da taxa de conversão do catalisador (SM-TOF) e, portanto, permitiu o cálculo do número médio de moléculas de produto geradas por um único centro catalítico ao longo do tempo. Os resultados revelaram melhorias significativas na eficiência catalítica das reações ao se empregar um silano modificado contendo um ligante ativo para a estabilização do paládio, assim como o uso de microzeólitas funcionalizadas, em comparação com a adsorção direta de paládio na superfície. Além das investigações experimentais, realizou-se um estudo de simulação para validar o sistema utilizado no tratamento dos dados de molécula única. Essa simulação reproduziu parte das condições experimentais e permitiu avaliar a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos experimentalmente. Adicionalmente, investigou-se o uso de dois derivados do fenantreno como marcadores nas microzeólitas empregadas nas reações de acoplamento cruzado. Esses derivados foram escolhidos por interagirem com grupos amino livres presentes na superfície das microzeólitas. Portanto, este trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento sobre as reações de acoplamento cruzado pelo mecanismo de Suzuki-Miyaura, fornecendo informações relevantes sobre o comportamento dessas reações em experimentos SM. Além disso, destacou-se a importância das simulações para validar e complementar os resultados experimentais, bem como a utilização de marcadores para investigar interações em sistemas baseados em microzeólitas.

Palavras chave: Paládio, acoplamento cruzado, Suzuki-Miyaura, microzeólitas.

ABSTRACT

In this study, four Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions using palladium as a catalyst were investigated at the single-molecule level (SM) through total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and super-resolved optical imaging. Three distinct methodologies were employed to deposit a pre-catalyst and conduct the SM experiments. In the first, palladium was directly adsorbed onto ionic sites on the glass surface; in the second, palladium was complexed with a ligand fixed to the glass surface; and in the third, functionalized, silanated, and palladium-functionalized microzeolites were utilized as a reaction template. Extremely diluted catalyst regimes were used in all three methodologies. Analysis of the intermittency of fluorescence originating from nanoscopically localized points provided a direct measure of the catalyst's conversion rate (SM-TOF) and thus allowed the calculation of the average number of product molecules generated by a single catalytic center over time. The results revealed significant improvements in the catalytic efficiency of reactions when using a modified silane containing an active ligand for palladium stabilization, as well as the use of functionalized microzeolites, compared to direct palladium adsorption on the surface. In addition to experimental investigations, a simulation study was conducted to validate the system used in treating single-molecule data. This simulation replicated part of the experimental conditions and allowed assessment of the precision and reliability of the experimentally obtained results. Additionally, the use of two derivatives of phenanthrene as markers in the microzeolites employed in the cross-coupling reactions was explored. These derivatives were chosen for their interaction with free amino groups present on the surface of the microzeolites. Therefore, this work contributed to expanding knowledge about Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions, providing relevant information about the behavior of these reactions in SM experiments. Furthermore, it emphasized the importance of simulations to validate and complement experimental results, as well as the use of markers to investigate interactions in microzeolite-based systems.

Keywords: Palladium, cross-coupling, Suzuki-Miyaura, microzeolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de <i>Jablonski</i> simplificado.....	2
Figura 2: Espectros para as transições radiativas entre estados eletrônicos.....	3
Figura 3: Representação de alguns compostos orgânicos com grupos doadores e aceptores.....	5
Figura 4: Pesquisa realizada no banco de dados da Web of Science utilizando o termo “Cross coupling” (acoplamento cruzado). Pesquisa feita em setembro de 2022.	6
Figura 5: Linha do tempo da descoberta e desenvolvimento de reações de acoplamento cruzado catalisadas por metais.	7
Figura 6: Produtos obtidos por reações de acoplamento cruzado catalisadas por Pd. Em laranja com um corte tracejado estão identificadas as ligações onde ocorre o acoplamento.....	11
Figura 7: Diferença entre a microscopia <i>widefield</i> convencional e a reflexão interna total.....	19
Figura 8: Diferença na resolução de imagens de células vivas capturadas na mesma região.....	19
Figura 9: Formação do campo evanescente gerado pela reflexão interna total (TIRF). 20	
Figura 10: Esquema da marcação da superfície do vidro com Pd(II). O íon Si-O ⁻ faz parte da superfície do vidro.	30
Figura 11: Célula de perfusão colada sobre a lamínula utilizada para estudos SM.	31
Figura 12: Estrutura do silano utilizado (Cat ₁) e representação do sistema montado para realizar o experimento de marcação da superfície utilizando vapor de Cat ₁	32
Figura 13: Esquema representativo de marcação da superfície utilizando Cat ₁ e PdCl ₂ .32	
Figura 14: Equipamento de microscopia de fluorescência de campo largo com câmera de alta sensibilidade (EMCCD) para imagens.....	35
Figura 15: Sistema (lamínula + célula de perfusão) colocada sobre a objetiva.	36
Figura 16: Exemplo de um gráfico qualitativo mostrando a variação de intensidade de fluorescência em função do tempo de cada etapa do mecanismo de Suzuki-Miyaura... 37	
Figura 17: Interface do programa desenvolvido para o tratamento das séries temporais de intermitência.	38
Figura 18: Microscópio confocal Olympus IX71.....	42
Figura 19: Produto Metil (<i>E</i>)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato obtido da reação de condensação de Knoevenagel.....	43

Figura 20: a) Foto mostrando a transição de cor e precipitação durante a reação de condensação de Knoevenagel. b) Foto capturada do material de aspecto cristalino obtido.....	43
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H do composto Metil (<i>E</i>)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato.....	44
Figura 22: Princípio de funcionamento da microscopia de fluorescência de molécula única. (a) Diagrama esquemático da localização de moléculas individuais com ajuste gaussiano. (b) Reconstrução de múltiplos eventos para uma imagem de super-resolução.	49
Figura 23: Imagens de alta resolução, imagens SOFI e três histogramas temporais de contagem para as reações SM1-4, obtidas utilizando a metodologia de localização do catalisador Pd(0) em superfície através da adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O ⁻	50
Figura 24: Exemplo de uma série temporal tratada tanto por um limite flutuante uniforme ou atribuindo um limite flutuante gaussiano. A região sombreada representa o limiar oscilante do tipo uniforme (imagem a esquerda) ou gaussiano (imagem a direita), e a linha tracejada é o seu centro.	52
Figura 25: I) Imagem de alta resolução, II) histograma temporal de contagem III) estrutura do complexo de Pd com fosfina ancorado na microzeólita. Experimento feito para a reação SM1.	57
Figura 26: Imagem de alta resolução, histograma temporal de contagem e a estrutura do 3-Cianopropiltrimetoxisilano.....	58
Figura 27: Imagem de alta resolução, histograma temporal de contagem e a estrutura do (3-trietoxisilil)propilsuccinato de anidrido.....	59
Figura 28: Imagem de alta resolução que destaca a natureza esférica de uma partícula capturada em diferentes planos focais.	60
Figura 29: Estrutura do $[\text{Pd}(\text{OAc})_2]_n$	60
Figura 30: Imagens de alta resolução, imagens SOFI e três histogramas temporais de contagem para as reações SM1-4, obtidas utilizando a metodologia de localização do catalisador Pd(0) pelo uso de um silano (Cat ₁) modificado contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0).....	61
Figura 31: Imagens de alta resolução, imagens SOFI e histogramas temporais de contagem para as quatro reações (SM1-4), utilizando microzeólitas como template reacional silanadas e ativadas por Pd(II). Cada centro ativo, representado por um círculo	

marcado, corresponde a um histograma de contagem com a mesma coloração envolvendo-o.	67
Figura 32: Exemplos de séries de intermitência simuladas para o mecanismo de Suzuki-Miyaura, com a variação da constante k_r nas seguintes condições: 0,4 (representado em roxo); 0,5 (verde); 0,75 (vermelho); 1 (azul).....	78
Figura 33: Exemplos de séries de intermitência simuladas para o mecanismo de Suzuki-Miyaura, com a constante k_r fixa em $1,0 \text{ s}^{-1}$, enquanto a probabilidade do estado ON do catalisador varia de 0,1 a 1.	78
Figura 34: Gráfico da variação estatística do valor de SM-TOF em função da probabilidade de estado ativo (ON) p do catalisador Pd na reação Suzuki-Miyaura. Simulação das séries temporais de intermitência com $k_r = 1,0 \text{ s}^{-1}$ (fixo) e o valor médio e desvio padrão sobre 10 séries para cada (ON) p	79
Figura 35: Resultado de análise de series temporais de intermitência simuladas pelo programa desenvolvido (variando a constante k_r). (---) valor exato usado na simulação para SM-TOF, (o) valor da série estocástica gerada pela simulação, (x) valor obtido da análise usando flutuação de limite por gaussiana, (+) valor obtido usando flutuação de limite uniforme.	81
Figura 36: Resultado de análise de series temporais de intermitência simuladas pelo programa desenvolvido (variando a probabilidade p_{ON} de a) 0,1 - j) 1,0). (---) valor exato usado na simulação para SM-TOF, (o) valor da série estocástica gerada pela simulação, (x) valor obtido da análise usando flutuação de limite por gaussiana, (+) valor obtido usando flutuação de limite uniforme.....	82
Figura 37: Estrutura dos compostos PIB e PA utilizados como marcadores em microzeólitas, e a estrutura da imida correspondente do composto PA, PI.	84
Figura 38: compostos PA e PIB após serem marcados nas microzeólitas.	86
Figura 39: Imagem da fluorescência capturada em um microscópio confocal dos compostos PA (a) e PIB (b) quimicamente ligados a microzeólitas. Em c) e d) estão as imagens em cores reais, com excitação do laser em 405 nm.	86
Figura 40: Imagem da fluorescência capturada em um microscópio confocal do composto PIB após redução com NaBH_4 . Imagem em cores reais, com excitação do <i>laser</i> em 405 nm.	87
Figura 41: Decaimento da fluorescência do composto PA-microzeólita (azul) e PIB-microzeólita (vermelho).	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempos característicos para os processos de absorção e emissão.....	3
Tabela 2: Reagentes e solventes com suas respectivas purezas e procedências.....	26
Tabela 3: Concentrações dos reagentes e da base $\text{NaOC}(\text{CH}_3)_3$ utilizada nos experimentos de molécula única com a deposição do pré-catalisador direto em superfície.	31
Tabela 4: Concentrações dos reagentes usados nos experimentos de molécula única utilizando vapor (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido (Cat_1) e PdCl_2 como marcadores.....	33
Tabela 5: Parâmetros específicos da câmera e potência do <i>laser</i> utilizado nos experimentos SM1-4 (a, b ou c).	37
Tabela 6: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM1 e SM2. Para a primeira reação foram analisados 160 centros ativos e para a segunda 180.	54
Tabela 7: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM3 e SM4. Para a terceira reação foram analisados 200 centros ativos e para a quarta 180.	54
Tabela 8: Cálculo do tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($1SM - TOF$) e número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } 1SM - TOF$) para as quatro reações (SM1-4).	55
Tabela 9: Cálculo da taxa efetiva do ciclo. Primeiramente foi obtido o tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($1SM - TOF$) e em seguida o número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } 1SM - TOF$) para as quatro reações (SM1-4)...	56
Tabela 10: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM1 e SM2. Para a primeira reação foram analisados 165 centros ativos e para a segunda 160.	63
Tabela 11: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM3 e SM4. Para a terceira reação foram analisados 159 centros ativos e para a quarta 149.	64
Tabela 12: Cálculo do tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($1SM - TOF$) e número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } 1SM - TOF$) para as quatro reações (SM1-4).	65

Tabela 13: Razões entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando o silano modificado em comparação com a adsorção de Pd(II) em centros Si-O.	66
Tabela 14: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM1 e SM2. Para a primeira reação foram analisados 187 centros ativos e para a segunda 139.	73
Tabela 15: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM3 e SM4. Para a terceira reação foram analisados 136 centros ativos e para a quarta 158.	74
Tabela 16: Cálculo do tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki (<i>1SM – TOF</i>) e número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } 1SM – TOF$) para as quatro reações (SM1-4).	75
Tabela 17: Razões entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando microzeólitas em comparação com silano em superfície.	76
Tabela 18: Propriedades fotofísicas do derivado fenantreno-imidazol (PIB), anidrido fenantreno (PA) e imida (PI) e foto das soluções sob radiação UV em diferentes solventes*.	84
Tabela 19: Tempos de decaimento da fluorescência e amplitudes normalizadas do derivado fenantreno-imidazol PIB, anidrido (PA) e imida (PI). A imagem representa o decaimento da fluorescência dos compostos PIB (amarelo) e PA (azul) em acetonitrila, a função de resposta do instrumento (irf) é representada pelo verde e magenta.	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação geral de acoplamento não balanceada para a formação de uma nova ligação C-C.....	6
Esquema 2: Reação geral para o acoplamento C-C do tipo Suzuki-Miyaura.	13
Esquema 3: Etapa de adição oxidativa para o mecanismo de Suzuki-Miyaura.	13
Esquema 4: Representação esquemática dos mecanismos concertado e SN_2	14
Esquema 5: Reação geral para a etapa de transmetalção.....	14
Esquema 6: Representação esquemática das vias A, B e 0 na etapa de transmetalção. 15	
Esquema 7: Etapa de eliminação redutiva para o mecanismo de Suzuki-Miyaura.	16
Esquema 8: Redução de Pd(II) a Pd(0) pelo solvente DMF.	17
Esquema 9: Reação de condensação de Knoevenagel entre o 4-bromobenzaldeído e Cianoacetato de metila.....	27
Esquema 10: Reações utilizadas como alvo de estudo a nível de molécula única, nomeadas SM1, SM2, SM3 e SM4. Os reagente nomeados de 1-5 foram - Composto 1: Ácido fenantreno-9-borônico; Composto 2: 4-bromo-1,8-anidrido naftálico; Composto 3: Metil(E)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato, Composto 4: Ácido 4-(dimetilamino)fenilborônico; Composto 5: 2-(6-Bromonaphtalen-2-il)-5-propil-1,3,4-oxadiazol.....	29
Esquema 11: Representação das etapas de preparação das microzeólitas usadas nos experimentos SM.....	35
Esquema 12: Esquema de reação não balanceada para a marcação das microzeólitas com (3-aminopropil) trietoxissilano e com os derivados de fenantreno 4-(1H-fenantrol [9,10-d] imidazol-2-il) benzaldeído (PIB) e anidrido fenantrênico (PA).....	40
Esquema 13: Mecanismo proposto para a condensação de Knoevenagel entre o 4-bromobenzaldeído e o cianoacetato de metila em meio básico de piperazina.	45
Esquema 14: Reações estudadas na aproximação de molécula única pela localização do catalisador Pd(0) em superfície pelos métodos: (a) Adsorção Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O ⁻ , (b) pelo uso de silanos modificados contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0) e (c) microzeólitas silanadas e ativadas por Pd(II).	46
Esquema 15: Modelo cíclico simplificado da reação de Suzuki-Miyaura.	56

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SIMBOLOS

- SM = *Single Molecule*
- TIRF = Fluorescência por reflexão interna total
- PSF = Propagação de pontos
- SOFI = Imagens de flutuação óptica de super-resolução
- ICT = Transferência de carga intramolecular
- *Digital Level* = Intensidade de fluorescência
- *Spikes/bursts* = Saltos de intensidade
- SM1, SM2, SM3 e SM4 = Reações estudadas pelo mecanismo de Suzuki Miyaura na aproximação de molécula única
- SM-TOF = *Single Molecule Turnover Frequency*
- *Average SM rate* = Taxa de reação (SM-TOF)
- Cat1 = (3-trietoxisilil) propil succinato de anidrido
- Pd(OAc)₂ = Acetato de paládio (II)
- PdCl₂ = Cloreto de paládio (II)
- PIB = Fenantrol [9, 10 - d] imidazol - 2-il-benzaldeído
- PA = Anidrido fenantrênico
- k_r = Taxa de reação da reação de Suzuki-Miyaura sendo representada por uma constante única
- ϕ = Rendimento quântico de fluorescência
- mW = Miliwatts
- ms = Milissegundo
- ns = Nanossegundo
- μm = Micrometro
- nm = Nanometro

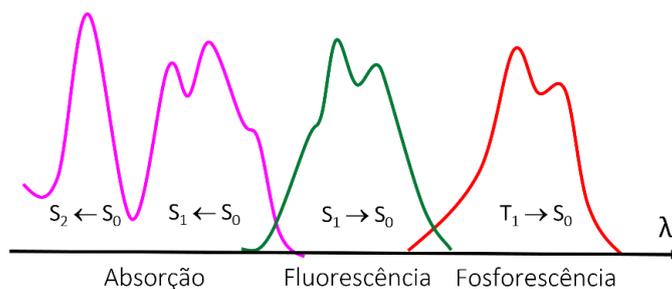
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Compostos Orgânicos Fluorescentes	2
1.2. Contexto Histórico das Reações de Acoplamento Carbono-Carbono	5
1.3. Aplicações das Reações de Acoplamento Cruzado	10
1.4. Mecanismo das reações de Suzuki-Miyaura	12
1.5. Microscopia de fluorescência de uma única molécula (<i>Single Molecule</i>)	17
1.6. Aplicação das técnicas de microscopia de fluorescência a nível de molécula única para investigar reações.....	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos gerais	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
2.2.1. Estudo SM das reações de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura	24
2.2.2. Derivados fenantreno reativos como potenciais marcadores de grupos amino.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Materiais	26
3.2. Síntese do Metil(<i>E</i>)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato	27
3.3. Limpeza das lamínulas	28
3.4. Estudo SM das reações de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura	29
a) Preparação dos sistemas pela localização do catalisador Pd(0) em superfície pela adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O ⁻ :	30
b) Preparação dos sistemas pela localização do catalisador Pd(0) em superfície utilizando vapor de (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido e PdCl ₂ :.....	31
c) Utilização de microzeólitas como template reacional, marcadas com (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido e cloreto de paládio (II) (PdCl ₂) como pré-catalisador:.....	33
3.5. Técnica de microscopia de fluorescência	35
3.6. Tratamento dos dados obtidos dos experimentos SM1-4 para as três metodologias de marcação de superfície (a, b e c).....	37
3.7. Simulação e Séries Temporais de Intermitência	39
3.8. Marcação dos derivados fenantreno reativos como potenciais marcadores de grupos amino	39
3.8.1. Caracterização dos compostos PIB e PA	41
3.8.1.1. Espectroscopia UV-Vis	41

3.8.1.2.Fluorescência em solução.....	41
3.8.1.3.Medições em microscópio.....	41
3.8.1.3.1.Imagens de fluorescência confocal	41
3.8.1.3.2.Decaimentos.....	42
3.8.1.3.3.Imagens em cores verdadeiras	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Reação de condensação de Knoevenagel.....	43
4.2. Reações de acoplamento cruzado do tipo Suzuki-Miyaura com catalisador em superfície para os estudos SM	45
a) Localização do catalisador Pd(0) em superfície por adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O ⁻	48
b) Localização do catalisador Pd(0) pelo uso de um silano modificado contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0).....	57
c) Microzeólitas como template reacional silanadas e ativadas por Pd(II).....	66
4.3. Simulação de Séries Temporais de Intermitência	76
4.4. Derivados fenantreno reativos como potenciais marcadores de grupos amino	83
a) Estudo das propriedades em solução dos compostos.....	84
b) Estudo das propriedades dos compostos marcados em microzeólitas	86
5. CONCLUSÕES	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS.....	101

(representada pelas setas verdes) que é a perda de energia por emissão de fótons entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin (singleto - singleto). Outra possibilidade é uma transição proibida, caracterizada pela inversão de spin de um estado singleto para um estado tripleto de energia ligeiramente menor (iv). Essa transição é chamada de transição intersistema e ocorre após uma mudança de multiplicidade. Após atingir o estado T_1 podem ocorrer processos não radiativos ou radiativos. Se for um processo radiativo, ocorre a fosforescência (v), que é uma transição radiativa entre estados eletrônicos com diferentes multiplicidades de spin (tripleto - singleto). A Figura 2 ilustra os espectros das transições radiativas entre os estados eletrônicos apresentados. É possível observar que os espectros de emissão e absorção para um determinado composto são praticamente imagens espelhadas ($S_0 \rightarrow S_1$ e $S_1 \rightarrow S_0$). Essa simetria pode ser atribuída à presença de estruturas de níveis vibracionais semelhantes envolvidas nesses processos.

Figura 2: Espectros para as transições radiativas entre estados eletrônicos.



Fonte: Imagem adaptada da referência 4. Número da licença – 5592030288733.

Todas as etapas mostradas no diagrama de *Jablonski* apresentam tempos característicos associados a absorção e a emissão de fótons, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Tempos característicos para os processos de absorção e emissão.

Processo	Tempo (s)
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-13} - 10^{-11}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 1$

Fonte: Tabela adaptada da referência 4. Número da licença – 5592030288733.

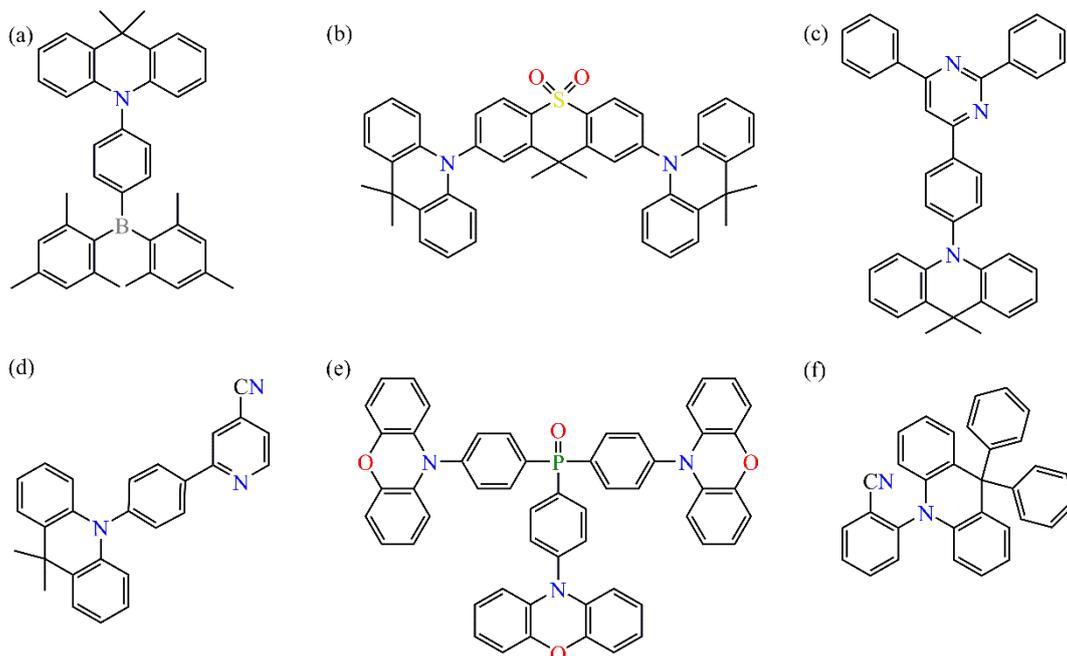
O tempo de vida da fluorescência e o rendimento quântico são parâmetros essenciais para um fluoróforo (um composto que emite luz em uma determinada região do espectro eletromagnético). O tempo de vida é definido como o período médio em que o composto permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Por outro lado, o rendimento quântico é a relação entre o número de fótons emitidos e o

número de fótons absorvidos, representando a fração dos fluoróforos no estado excitado que decai por meio de fluorescência. Através dessa medida, é possível avaliar a eficiência de emissão dos compostos fluorescentes.⁴

Em compostos orgânicos, a propriedade fluorescente é tipicamente encontrada em estruturas aromáticas com ligações duplas conjugadas. A deslocalização eletrônica gerada pela coplanaridade dos orbitais π e a presença de grupos funcionais nessas estruturas possibilitam as transições radiativas entre os estados eletrônicos, resultando na emissão desses compostos. De forma geral, grupos doadores de densidade eletrônica para o anel aromático, como hidroxila, alcóxila e amino, amplificam o efeito de ressonância, levando a um aumento na fluorescência, dependendo de suas posições. Por outro lado, grupos aceptores de densidade eletrônica, como nitro, carbonila e ciano, desestabilizam o anel aromático, afetando diretamente na ressonância e, conseqüentemente, reduzindo a fluorescência.⁴

Estudos recentes têm revelado progressos promissores na elaboração de moléculas modificadas com grupos funcionais doadores (D) e aceptores (A) de densidade eletrônica para obter compostos fluorescentes. Além disso, há investigações sobre o uso de moléculas contendo boro em sua estrutura, principalmente devido à mobilidade eletrônica proporcionada por um orbital p vazio presente nesse elemento. Compostos "triarylboron" têm se mostrado excelentes aceptores de densidade eletrônica.^{6,7} Nesse mesmo contexto, foram propostas estruturas D-A com a inclusão de triarilaminas como doadoras de densidade eletrônica.^{8,9} Um exemplo de composto contendo esses grupos é mostrado na Figura 3a¹⁰. Ao longo dos anos, outras classes de moléculas têm sido estudadas, tais como emissores baseados em difenilsulfonas (Figura 3b)¹¹, emissores de triazina-pirimidina (Figura 3c)¹², derivados de piridina e pirimidina substituídos por grupos nitrila (Figura 3d)¹³, derivados de óxido de fosfina (Figura 3e)¹⁴, derivados de benzonitrila (Figura 3f).¹⁵ Entre outros, incluindo derivados de benzoilpiridina¹⁶, trifenilaminas¹⁷ e de triazóis.¹⁸

Figura 3: Representação de alguns compostos orgânicos com grupos doadores e aceptores.

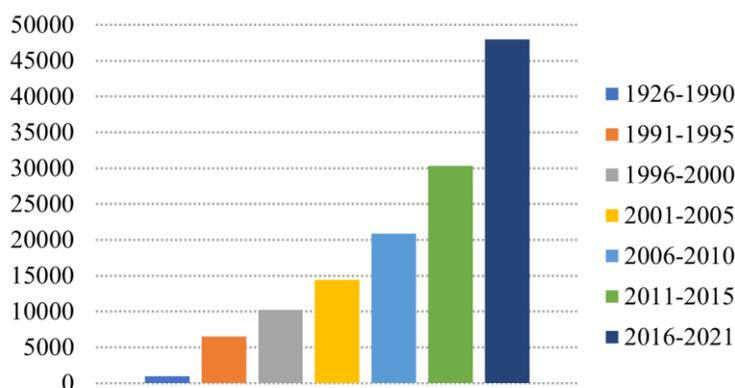


Fonte: Imagem de autoria própria.

1.2. Contexto Histórico das Reações de Acoplamento Carbono-Carbono

Existe uma crescente demanda pela construção de moléculas orgânicas complexas para diversas finalidades. Essa necessidade abrange diferentes setores, como a indústria farmacêutica, que busca sintetizar novos medicamentos; o setor agrícola, que procura desenvolver substâncias para proteger as plantações contra pragas; e a eletrônica, que está em busca de compostos que possam emitir luz. Uma das ferramentas fundamentais para a construção desses sistemas complexos são as reações de acoplamento. Essas reações envolvem a união de moléculas menores para formar compostos mais complexos por meio da formação de ligações carbono-carbono (C-C).^{19,20} O gráfico apresentado na Figura 4, obtido por meio de uma pesquisa no banco de dados da *Web of Science* usando o termo "*Cross coupling*" (acoplamento cruzado) como critério de busca, demonstra um aumento significativo no número de publicações ao longo dos anos, totalizando quase 140.000 artigos. Esse crescimento evidencia a importância das reações de acoplamento cruzado.

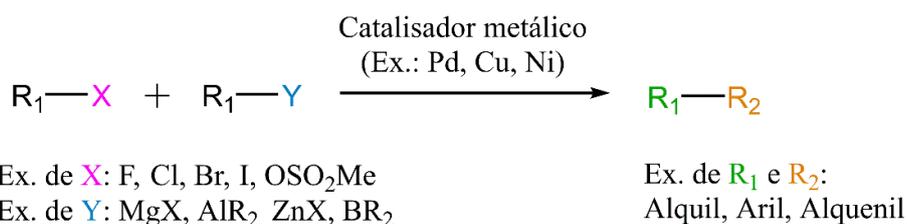
Figura 4: Pesquisa realizada no banco de dados da Web of Science utilizando o termo “Cross coupling” (acoplamento cruzado). Pesquisa feita em setembro de 2022.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Uma reação de acoplamento é caracterizada pela união de dois fragmentos com a ajuda de um catalisador metálico, resultando na formação de uma nova ligação C-C. O Esquema 1 é uma representação geral não balanceada desse tipo de transformação, que geralmente envolve a reação entre um eletrófilo orgânico do tipo R_1-X e um composto R_2-Y que possui um grupo ativador, contendo um átomo metálico ou não metálico ligado ao outro átomo de carbono da ligação a ser formada. Como resultado, um composto orgânico R_1-R_2 é formado, estabelecendo assim uma nova ligação química C-C.²¹

Esquema 1: Reação geral de acoplamento não balanceada para a formação de uma nova ligação C-C.

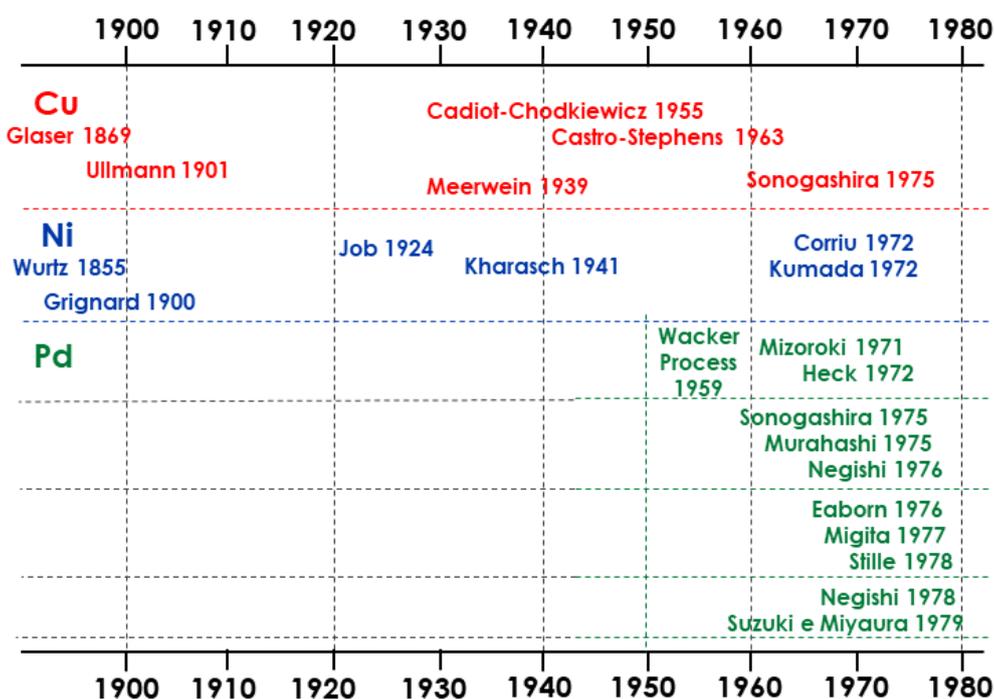


Fonte: Imagem adaptada da referência ²¹. Licença - <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Em termos gerais, existem dois tipos reconhecidos de reações de acoplamento: são as reações de acoplamento cruzado, também conhecidas como *heterocouplings*, que ocorre quando dois fragmentos diferentes reagem para formar uma nova ligação C-C; e as reações de homoacoplamento, também conhecidas como *homocouplings*, que ocorre quando dois compostos iguais reagem para formar uma nova ligação C-C.²²

Durante o final do século XIX e ao longo do século XX, houve significativos avanços no desenvolvimento e aprimoramento de várias reações de acoplamento catalisadas por metais. Essas reações desempenharam um papel crucial na comunidade científica. A Figura 5 apresenta uma linha do tempo que ilustra a origem de algumas das principais reações de acoplamento cruzado catalisadas por metais até o início da década de 80.²³

Figura 5: Linha do tempo da descoberta e desenvolvimento de reações de acoplamento cruzado catalisadas por metais.



Fonte: Imagem adaptada da referência ²³. Número da licença – 5591940749234.

A linha do tempo retratada na Figura 5, revela uma notável variação existente para reações de acoplamento catalisadas por metais, uma área de pesquisa que desempenhou um papel crucial no avanço da química orgânica. A história dessas reações teve início com os pioneiros estudos sobre homoacoplamento, representados por marcos fundamentais no desenvolvimento sintético.

Em 1869, Glaser relatou a dimerização oxidativa do fenilacetileno de cobre, inaugurando uma nova era de investigação na qual os metais desempenhariam um papel fundamental na formação de ligações carbono-carbono. Essa descoberta sinalizou o potencial das reações de acoplamento como uma estratégia para a síntese de moléculas complexas.²⁴

Na virada do século XX, Victor Grignard introduziu uma transformação de grande impacto ao demonstrar a adição nucleofílica de compostos organomagnésio a

compostos carbonílicos, uma reação que ficou conhecida como reação de Grignard. Essa descoberta abriu novos horizontes na síntese orgânica, permitindo a construção de cadeias carbonadas de forma eficiente e versátil.^{25,27} Esses avanços foram reconhecidos pela comunidade científica com o Prêmio Nobel de Química de 1912, compartilhado igualmente entre Victor Grignard e Paul Sabatier. Paul Sabatier foi honrado por suas contribuições no desenvolvimento da hidrogenação catalítica, um método essencial para a redução de compostos orgânicos utilizando metais finamente dispersos.²⁸

A primeira publicação abordando reações de acoplamento cruzado entre diferentes compostos utilizando metais de transição como catalisadores e reagentes de Grignard ocorreu em 1941, com um estudo conduzido por Kharasch. Nesse trabalho, foi realizado o acoplamento entre o brometo de vinila e compostos aril organomagnésio, empregando o cloreto de cobalto como catalisador.²⁹ Embora esses acoplamentos iniciais de Kharasch fossem restritos a certos tipos de substratos e à compatibilidade de grupos funcionais, eles representaram um marco fundamental na química de acoplamento, estabelecendo as bases para toda a área, ao utilizar quantidades catalíticas de metais de transição para formar ligações C-C. Essa abordagem pioneira desencadeou um campo de pesquisa prolífico e abriu caminho para o desenvolvimento de métodos mais abrangentes e versáteis de acoplamento cruzado.

Uma das limitações encontradas nas reações de acoplamento era a baixa seletividade causada pelo uso de cobalto e níquel, além de rendimentos variáveis e difíceis de controlar, especialmente nas reações de acoplamento cruzado entre espécies diferentes.^{30,31} Com o objetivo de aprimorar a reatividade e seletividade dessas reações, os cientistas direcionaram seus esforços para explorar a influência do catalisador na ampliação do escopo do acoplamento cruzado. Nesse contexto, novos catalisadores de platina e níquel começaram a ser desenvolvidos, enquanto a química do paládio estava predominantemente voltada para aplicações em metalurgia, como substituto do aço na fabricação de instrumentos médicos.^{32,33}

Após a Segunda Guerra Mundial, a Europa passou por um período de reconstrução, onde a necessidade de fontes acessíveis de plástico e precursores químicos se tornou uma prioridade. Diante desse cenário, os químicos do Instituto Central de Pesquisa da *Wacker Chemie* se empenharam em encontrar uma rota de síntese para o óxido de etileno a partir do etileno. Nesse contexto, eles desenvolveram um método envolvendo o uso de uma espécie de paládio em carvão como catalisador. No entanto, durante o processo, eles sentiram um odor característico de acetaldeído. Essa

observação levou à descoberta do processo *Wacker*, que consiste na oxidação do etileno em atmosfera de oxigênio, empregando quantidades catalíticas de PdCl₂ para obter acetaldeído. Essa importante descoberta estabeleceu o papel fundamental do paládio na síntese de compostos orgânicos.³⁴

Richard Heck, trabalhando na *Hercules Powder Co*, teve uma liberdade incomum para um químico industrial moderno, o que lhe permitiu explorar novos horizontes científicos. Inspirado pelos avanços no processo *Wacker*, Heck direcionou sua atenção para a química de compostos contendo arilpaládio.^{35,36} Seu primeiro experimento consistiu na adição de acetato de fenilmercúrio a uma solução de tetracloropaladato de lítio (Li₂[PdCl₄]) em acetonitrila, sob uma atmosfera de etileno a 0 °C. Para sua surpresa, uma reação ocorreu imediatamente.³⁶ Esse resultado inicial foi o ponto culminante de sua pesquisa, levando-o a publicar, em 1968, *7 Communications* como único autor, abordando reações entre compostos organomercuriais e alcenos na presença de quantidades catalíticas de Li₂[PdCl₄] para a formação de ligações C-C.³⁷⁻⁴³ No entanto, devido à alta toxicidade dos reagentes contendo organomercúrio, foram desenvolvidos procedimentos alternativos. Nesse contexto, Mizoroki realizou reações de acoplamento cruzado entre haletos arila, benzila e estirila com alcenos, utilizando paládio (II) como catalisador. Essa descoberta marcou o surgimento de uma das reações de acoplamento cruzado mais importantes e influentes catalisadas por paládio, conhecida como reação de Mizoroki-Heck.⁴⁴

Em 1976, Negishi relatou o acoplamento de organoalumínio utilizando catalisadores de níquel, no entanto, observou-se baixa estereoespecificidade nesses sistemas. Foi somente quando o níquel foi substituído por paládio que ocorreu uma melhora significativa na seletividade da reação.⁴⁵

Negishi e seus colaboradores realizaram uma extensa investigação para identificar reagentes organometálicos adequados para reações de acoplamento cruzado. Após diversos testes, eles concluíram que o acoplamento catalisado por [PdCl₂(PPh₃)₂] entre iodetos arila e acetilenos organometálicos contendo zinco, boro e estanho proporcionou os melhores resultados na formação de alcinos.⁴⁶ Com essa descoberta, o escopo das reações de acoplamento catalisadas por paládio e níquel entre haletos orgânicos insaturados e reagentes organozinco avançou significativamente, englobando uma ampla variedade de grupos funcionais. Essa ampliação das possibilidades reacionais abriu novas perspectivas para a síntese de compostos orgânicos complexos e funcionais.⁴⁷

Em 1979, Suzuki reportou o desenvolvimento do acoplamento cruzado catalisado por paládio entre 1-alquênilboranos e brometos de arila em meio básico, introduzindo assim a reação de Suzuki-Miyaura.⁴⁸ Essa metodologia se revelou altamente eficiente para a formação de ligações carbono-carbono, devido às vantagens intrínsecas dos reagentes empregados. Os materiais de partida, compostos por organoboros, demonstraram ser facilmente manipuláveis e geralmente estáveis em contato com o ar e a umidade. Além disso, as condições reacionais eram brandas, resultando em subprodutos menos tóxicos e de remoção relativamente simples. Devido a essas características favoráveis, as reações de acoplamento Suzuki-Miyaura têm sido amplamente aplicadas em contextos industriais.⁴⁹

É importante salientar a relevância das metodologias envolvendo a formação de ligações C-C catalisadas por metais, com destaque para aquelas que empregam compostos de paládio como catalisadores. A partir das primeiras descobertas de Suzuki, uma série de outras reações de acoplamento cruzado tem sido desenvolvida, expandindo ainda mais o repertório de transformações sintéticas disponíveis.^{21,50} O reconhecimento da importância dessas reações foi evidenciado em 2010, quando os químicos Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi e Akira Suzuki foram laureados com o Prêmio Nobel de Química em virtude de suas contribuições no campo das reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio em síntese orgânica. Esse prestigioso prêmio ressaltou a relevância dessas reações e seu impacto significativo na síntese de compostos orgânicos complexos.²³

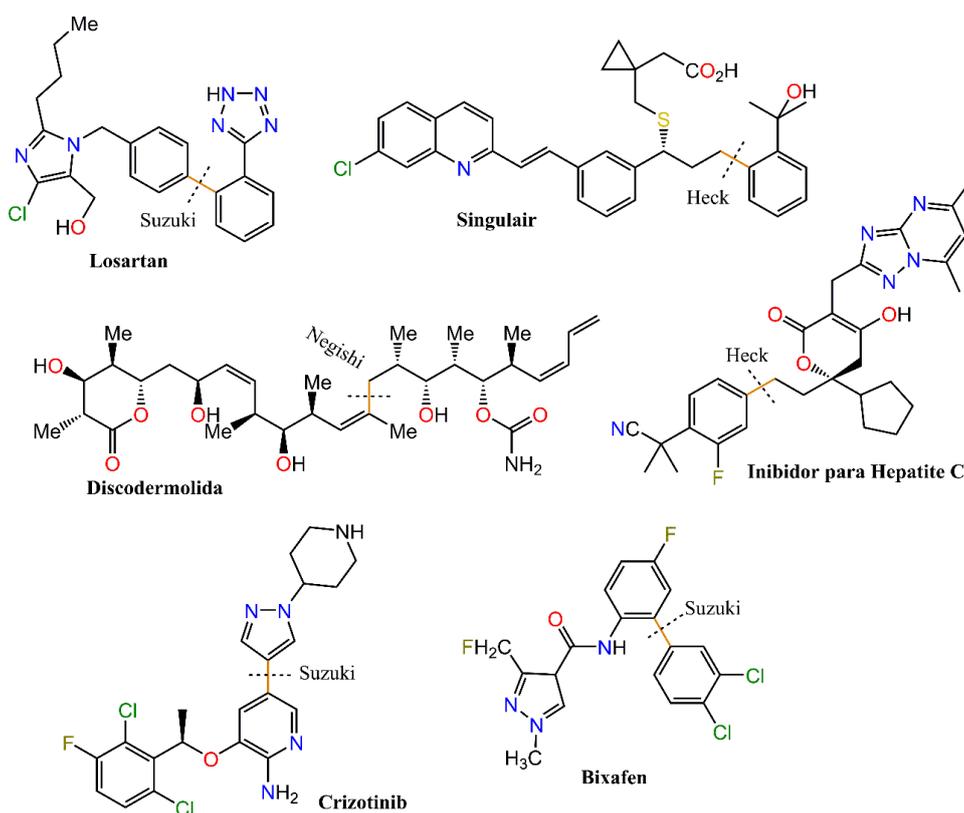
1.3. Aplicações das Reações de Acoplamento Cruzado

Na indústria química e farmacêutica, as reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio têm uma ampla gama de aplicações em diferentes áreas. Essas aplicações são evidenciadas por meio de exemplos ilustrativos na Figura 6. A síntese bem estabelecida do *Losartan*, um medicamento utilizado no tratamento de hipertensão arterial, é um exemplo do emprego da reação de Suzuki⁵¹. Além disso, a reação de Heck tem sido utilizada na produção do medicamento *Singulair*, amplamente empregado no tratamento da asma.⁵² Outro exemplo relevante é a síntese total da discodermolida, um composto que exibe potente atividade inibidora do crescimento de células tumorais. Essa síntese faz uso da variação de Negishi, destacando a versatilidade das reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio na síntese de compostos complexos. Na área farmacêutica, também merece destaque o processo *Pfizer*, empregado em larga escala na produção de um inibidor para hepatite C, que faz uso da reação de Heck.⁵³

Além disso, a aplicação da reação de Suzuki tem sido amplamente explorada na produção em grande escala do *Crizotinib*, um agente antitumoral utilizado no tratamento de metástases pulmonares.⁵³ No setor agrícola, a variação de Suzuki também desempenha um papel importante, sendo empregada na produção em larga escala do fungicida *Bixafen*, que desempenha um papel crucial no controle de doenças em plantações.⁵⁴

Esses exemplos ilustram a significativa contribuição das reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio na indústria química e farmacêutica, evidenciando sua importância na síntese de compostos de alto valor e impacto nas áreas médica, agrícola e farmacêutica.

Figura 6: Produtos obtidos por reações de acoplamento cruzado catalisadas por Pd. Em laranja com um corte tracejado estão identificadas as ligações onde ocorre o acoplamento.



Fonte: Imagem adaptada da referência ²³. Número da licença – 5591940749234.

Além das aplicações já mencionadas, é importante destacar as promissoras áreas de pesquisa que exploram o uso das reações de acoplamento cruzado, em particular as reações de Suzuki-Miyaura, para o planejamento de sistemas orgânicos emissores de luz. Estudos recentes têm demonstrado o potencial dessas reações na construção de dispositivos eletrônicos multifuncionais. Por exemplo, filmes poliméricos conjugados e

emissores podem ser preparados por meio da reação de Suzuki-Miyaura, permitindo o desenvolvimento de fotodetectores, dispositivos eletroluminescentes e sensores com propriedades específicas. Essas aplicações abrem caminho para avanços significativos na área de tecnologia de dispositivos optoeletrônicos.⁵⁵

Outra área de interesse é a utilização das reações de acoplamento para a elaboração de sensores fluorescentes e colorimétricos. Através da condensação de Knoevenagel e da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura, é possível sintetizar sensores altamente sensíveis e seletivos para a detecção de compostos nitroaromáticos tóxicos, como o ácido pícrico presente em explosivos. Esses sensores oferecem uma abordagem promissora para a detecção ultrasensível e seletiva desses compostos em meio aquoso.⁵⁶

Além das aplicações mencionadas anteriormente, outro campo de pesquisa em ascensão relacionado às reações de acoplamento cruzado é a marcação de micro e nanosistemas com sondas fluorescentes. Essa abordagem tem grande relevância científica nas áreas da química e bioquímica, sendo amplamente explorada pela microscopia óptica há décadas.⁵⁷⁻⁵⁹

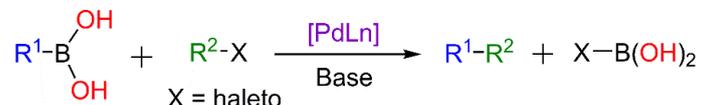
Embora alguns sistemas e sondas fluorescentes estejam disponíveis no mercado, muitas vezes apresentam custos elevados. No entanto, os corantes fluorescentes reativos com sinal de emissão modulado por solventes ou por propriedades do meio são particularmente interessantes devido à sua especificidade. Essas sondas ou marcadores fluorescentes encontram aplicação em estudos de fluorescência em micro e nano catalisadores, permitindo a visualização desses sistemas por meio de técnicas microscópicas de fluorescência antes e durante um processo químico ou fotoquímico.^{60,61} Essas sondas fluorescentes oferecem percepções significativas sobre as transformações químicas que ocorrem nos sistemas estudados, permitindo a observação direta de reações e processos em escala micro e nano. Essa capacidade de monitorar visualmente os catalisadores em ação abre portas para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e seletivas no campo da catálise, contribuindo para o avanço da química e para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas reações catalíticas.^{62,63}

1.4. Mecanismo das reações de Suzuki-Miyaura

O mecanismo dessas reações é de grande interesse, pois entender como essas transformações ocorrem em nível molecular permite o desenvolvimento de novos métodos sintéticos e a otimização de condições reacionais. Ao explorar as propriedades e comportamentos das moléculas envolvidas nessas reações, é possível obter uma visão

mais aprofundada do processo químico e suas aplicações. As reações de Suzuki-Miyaura envolvem a combinação de um ácido borônico com um haleto de arila, catalisada por um complexo de paládio, como ilustrado no Esquema 2.⁶⁴

Esquema 2: Reação geral para o acoplamento C-C do tipo Suzuki-Miyaura.



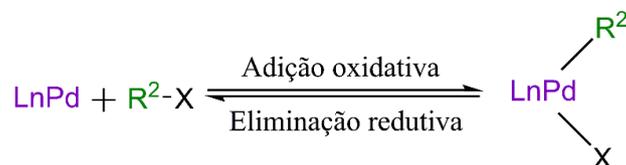
Fonte: Adaptado com permissão da *Chem. Rev.* 1995, 95, 7, 2457–2483. Copyright 1995, American Chemical Society.

O mecanismo das reações de Suzuki-Miyaura envolve uma série de etapas sequenciais que ocorrem normalmente na presença de um catalisador de paládio. O ciclo catalítico mais consensual consiste em três etapas principais: adição oxidativa, transmetalção e eliminação redutiva.⁶⁵ Além das etapas do ciclo catalítico, outros fatores são importantes para a compreensão das reações de Suzuki-Miyaura. A presença de uma base adequada é crucial para facilitar a etapa de transmetalção, enquanto o solvente utilizado pode influenciar na estabilidade e na reatividade dos reagentes e intermediários. Dessa forma, é necessário considerar cuidadosamente essas variáveis para otimizar as condições reacionais e obter os melhores resultados.

- **Adição Oxidativa:**

Segundo um estudo teórico realizado por García e colaboradores, na primeira etapa do ciclo, conhecida como Adição Oxidativa, ocorre a quebra da ligação entre o grupo R² e o heteroátomo X. Nesse processo, o metal se liga aos ligantes R² e X, resultando na formação de uma nova ligação metal-ligante. A representação do metal pode ser feita considerando-o como tendo um ligante Ln, juntamente com os ligantes R² e X, conforme ilustrado no Esquema 3.⁶⁶

Esquema 3: Etapa de adição oxidativa para o mecanismo de Suzuki-Miyaura.



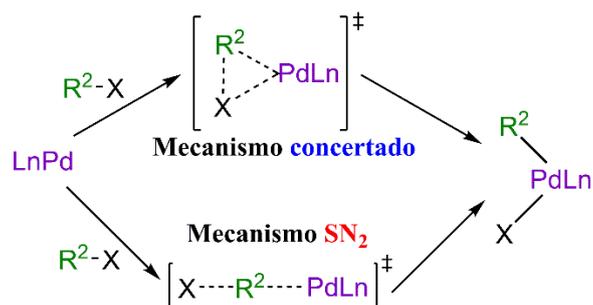
Fonte: Adaptado com permissão de *J. Org. Chem.* 1994, 59, 26, 8151–8156. Copyright 1994, American Chemical Society.

Essas reações podem ser reversíveis, mas é esperado que o equilíbrio seja deslocado em direção ao produto da etapa de adição oxidativa quando ligantes doadores de densidade eletrônica são utilizados. Esses ligantes têm a capacidade de estabilizar

estados de oxidação mais altos do metal. A etapa de adição oxidativa tem sido identificada como limitante de velocidade em várias reações de acoplamento cruzado.⁶⁷

Existem duas propostas de mecanismos para a etapa de adição oxidativa, representadas pelo Esquema 4. O primeiro é o mecanismo via concertada, onde ocorre a formação simultânea das ligações Pd-R² e Pd-X no estado de transição. Esse mecanismo leva à retenção da configuração em um átomo de carbono estereogênico quando eletrófilos quirais R²-X estão envolvidos. A segunda proposta é um processo bimolecular associativo, que ocorre em duas etapas. Primeiro, o carbono é atacado pelo metal e o ânion X⁻ é expelido, formando uma espécie catiônica. Em seguida, as duas espécies carregadas se combinam para gerar o produto final. Esse segundo mecanismo é conhecido como SN₂, em analogia com a reação de substituição nucleofílica, e pode levar à inversão de configuração quando um centro de carbono estereogênico está envolvido.⁶⁸

Esquema 4: Representação esquemática dos mecanismos concertado e SN₂.

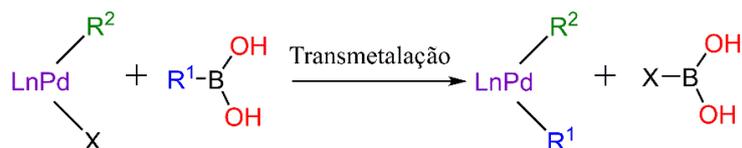


Fonte: Adaptado com permissão de *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 11, 2626–2634.
Copyright 2013, American Chemical Society.

- **Transmetalção:**

Na etapa subsequente, ilustrada no Esquema 5, ocorre a transmetalção, na qual o intermediário formado na etapa de adição oxidativa reage com o grupo orgânico presente no composto R¹-B(OH)₂, levando à formação de um segundo intermediário.

Esquema 5: Reação geral para a etapa de transmetalção.

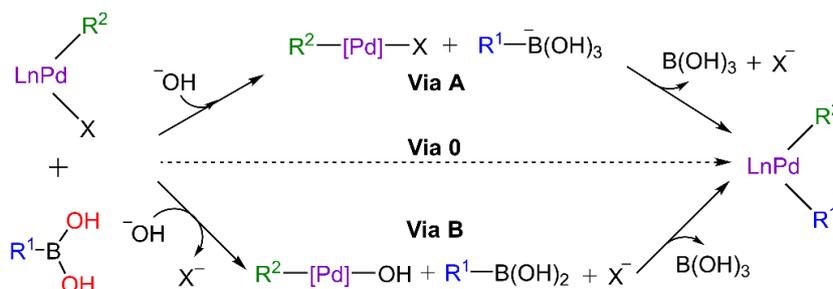


Fonte: Adaptado com permissão de *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 11, 2626–2634.
Copyright 2013, American Chemical Society.

Na etapa de transmetalção, a presença de uma base desempenha um papel fundamental. Foram propostos dois principais mecanismos envolvendo a base: na Via

A, a base se liga inicialmente ao ácido borônico, formando uma espécie organoborato, enquanto na Via B, a base substitui primeiro o grupo de saída X na esfera de coordenação do catalisador. Além disso, uma terceira via, denominada Via 0, foi avaliada, na qual a reação ocorre na ausência de uma base. O Esquema 6 ilustra as Vias A, B e 0.

Esquema 6: Representação esquemática das vias A, B e 0 na etapa de transmetalção.



Fonte: Adaptado com permissão de *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 11, 2626–2634.

Copyright 2013, American Chemical Society.

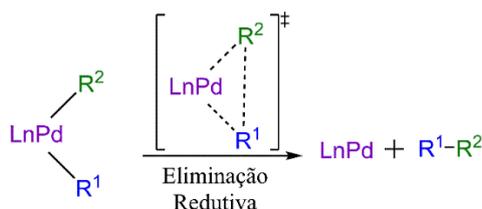
Primeiramente foi realizado um estudo teórico para investigar o papel da base na etapa de transmetalção nas reações de Suzuki-Miyaura. Na ausência de base (Via 0), utilizando *trans*- $[\text{Pd}(\text{CH}_2=\text{CH})\text{-Br}(\text{PH}_3)_2]$, $\text{CH}_2=\text{CH-B(OH)}_2$ e OH^- como reagentes, observou-se uma reação altamente endotérmica com uma barreira energética significativamente elevada. Esses resultados corroboram com os resultados experimentais, confirmando que a presença de uma base adequada é necessária para a ocorrência da reação.⁶⁹

Por meio da Via A, no mesmo estudo teórico, a transmetalção foi considerada um processo composto por várias etapas. Isso resultou na formação do complexo *trans*- $[\text{Pd}(\text{CH}_2=\text{CH})_2\text{-(PH}_3)_2]$, ácido organoborônico B(OH)_3 e haleto livre Br^- . A diferença de energia calculada entre os estados de menor e maior energia foi mínima, indicando que essa via é adequada para explicar o papel da base no mecanismo da reação. Porém, ao explorar a Via B usando o mesmo sistema modelo, não foi possível encontrar um estado de transição para a substituição direta do haleto pelo grupo hidroxila no complexo de bisfosfina. As tentativas de otimização levaram à ligação do OH^- a um centro de fosfina ou à substituição de uma das fosfinas por OH^- na esfera de coordenação do metal. Concluiu-se, portanto, que o ciclo catalítico principal deve ocorrer predominantemente pela Via A, que possui barreiras energéticas mais baixas e não produz produtos indesejados evidentes.⁷⁰

- **Eliminação Redutiva**

A etapa final para completar o ciclo catalítico é a eliminação redutiva, que ocorre após a transmetalização. Nessa etapa, os grupos R¹ e R² se acoplam na posição cis. O Esquema 7 fornece uma ilustração dessa etapa do mecanismo.

Esquema 7: Etapa de eliminação redutiva para o mecanismo de Suzuki-Miyaura.



Fonte: Adaptado com permissão de *Organometallics* 2005, 24, 15, 3703–3710. Copyright 2005, American Chemical Society.

No caso em que o complexo resultante da etapa de transmetalização seja um produto *trans*, geralmente é necessária uma etapa referente a uma reação de isomerização antes da eliminação redutiva. O mecanismo normalmente aceito para esta etapa é concertado e apresenta um estado de transição cíclico de três coordenadas que resulta no acoplamento C-C final e na regeneração concomitante das espécies catalíticas, PdLn, como mostra o esquema 7. A eliminação redutiva costuma ser uma etapa irreversível.⁷¹

Em relação ao ligante L na barreira energética da reação, a barreira diminui com o aumento da capacidade π -aceptora de densidade eletrônica dos ligantes L e conseqüentemente leva a uma aceleração da reação. Estudos mostram que a formação da ligação R¹-R² é o produto favorecido de acordo com resultados experimentais.⁷²

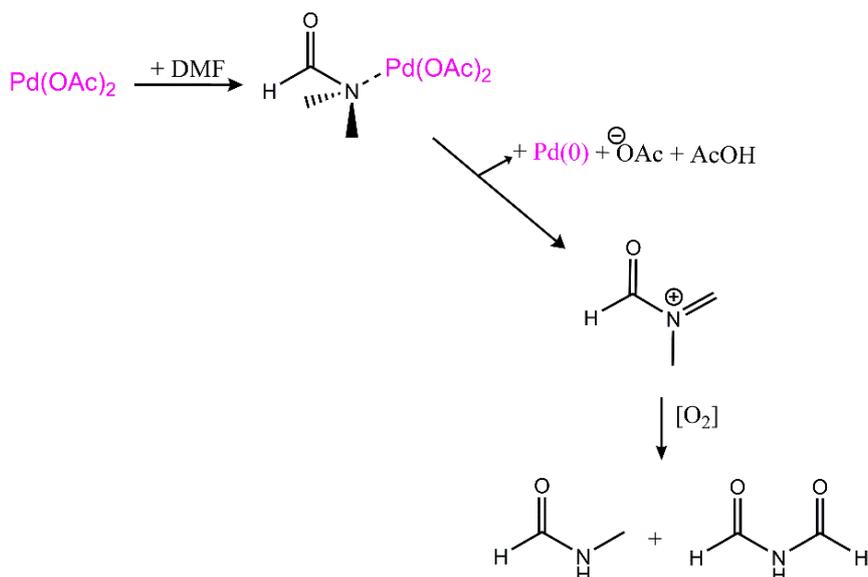
- **Efeito do solvente**

Para compreender a influência do solvente nas reações de acoplamento cruzado, é fundamental considerar as forças intermoleculares envolvidas. Dentre essas forças, as interações de dispersão, resultantes da polarização das moléculas orgânicas, são as mais abundantes, embora relativamente fracas. Essas interações estão presentes em todos os solventes. Em alguns protocolos de acoplamento cruzado, os solventes próticos, como os álcoois, são evitados devido à sua reatividade. No entanto, em métodos que utilizam organometálicos menos reativos, os solventes alcoólicos podem ser benéficos. Em certas circunstâncias, os álcoois podem atuar como agentes redutores, reduzindo os

precursores de Pd(II), sem afetar outros componentes da reação, como ligantes, bases e organometálicos.⁷³

É importante destacar que a espécie de paládio adicionada à reação nem sempre é o catalisador ativo. Geralmente, são utilizados pré-catalisadores de Pd(II) comercialmente disponíveis, que se convertem *in situ* em espécies ativas de Pd(0). Embora solventes menos polares sejam adequados para reações de borilação, os acoplamentos cruzados são frequentemente realizados em solventes mais polares, que auxiliam na estabilização das cargas envolvidas. Por exemplo, quando o acetato de paládio é usado como pré-catalisador, o íon acetato desempenha um papel na formação de uma espécie aniônica de Pd(0). Além disso, solventes apróticos como a dimetilformamida (DMF) podem ser oxidados por espécies de Pd(II), resultando na formação de um subproduto imida.⁷⁴ O Esquema 8 ilustra esse mecanismo. Assim, o próprio solvente pode desempenhar um papel direto na formação de catalisadores ativos. Outros solventes, como a cicloexanona, o 1,4-dioxano e o 1,2-dimetoxietano, também podem ter a capacidade de gerar Pd(0).

Esquema 8: Redução de Pd(II) a Pd(0) pelo solvente DMF.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁷³. ID da licença - [1376879-1](#).

1.5. Microscopia de fluorescência de uma única molécula (*Single Molecule*)

Há uma falta considerável de pesquisas na área dos mecanismos cinéticos e comportamento dos catalisadores nas reações de acoplamento cruzado. No entanto, nas últimas décadas, houve avanços notáveis na área da microscopia de fluorescência, com o desenvolvimento de técnicas de super-resolução e alta sensibilidade. Essas técnicas

possibilitam a avaliação do comportamento de sistemas individuais e permitem obter detalhes em nível molecular, permitindo uma observação temporal e espacial da fotofísica e reatividade química em escala microscópica.^{75,76}

A aplicação dessas técnicas avançadas de microscopia de fluorescência oferece uma oportunidade única para investigar a reatividade e a catálise de diversas reações e classes de compostos orgânicos. A condição fundamental é que os produtos das reações sejam fluorescentes, o que permitirá a visualização direta e o monitoramento das flutuações de intensidades de fluorescência. Dessa forma, é possível obter informações pertinentes sobre a cinética das reações e o comportamento do catalisador em escala molecular.^{77,78}

A microscopia de fluorescência convencional normalmente envolve a observação de centenas ou até milhares de fluoróforos espalhados em uma amostra, fornecendo uma visão geral do comportamento das moléculas presentes. No entanto, essa abordagem pode ocultar informações importantes que estão contidas em moléculas específicas ou em pequenos grupos de moléculas. Ao visualizar um grande número de fluoróforos, é difícil distinguir e analisar individualmente cada molécula presente na amostra. Detalhes cruciais sobre o comportamento molecular, como interações específicas e eventos transitórios, podem ficar mascarados pela média dos resultados obtidos de todas as moléculas presentes.⁷⁹

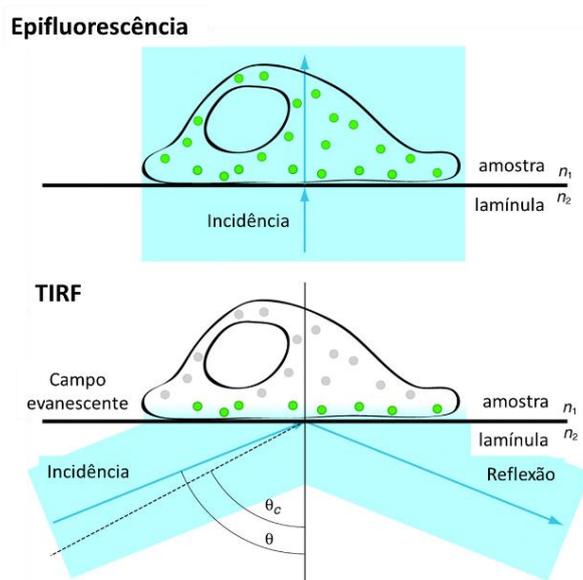
Por outro lado, a imagem de uma única molécula proporciona uma visão mais aprofundada e detalhada do comportamento molecular. Essa abordagem permite observar características específicas, tais como, dinâmicas moleculares e interações com outras moléculas ou ambiente circundante. Ao analisar uma única molécula, é realizável obter informações que seriam impossíveis de serem identificadas ao considerar a média de um grande número de moléculas.^{79,80} Ao focar em moléculas individuais, a microscopia de fluorescência de molécula única revela informações sutis e nuances que podem ser essenciais para compreender reações químicas e processos biológicos.⁸¹

Uma abordagem de destaque utilizada para investigar eventos em nível de uma única molécula é a microscopia de campo largo (*widefield microscopy*). Essa técnica permite a excitação de sistemas por meio de *lasers* na região visível e a observação por detectores pontuais ou câmeras de alta sensibilidade. A configuração da microscopia de campo largo possibilita o acompanhamento e a caracterização de processos químicos e fotoquímicos em regiões nanométricas de amostras, permitindo o estudo da cinética de

reação e das relaxações de estados excitados envolvendo um número limitado de moléculas, atingindo o limite *Single Molecule (SM)*.⁸²

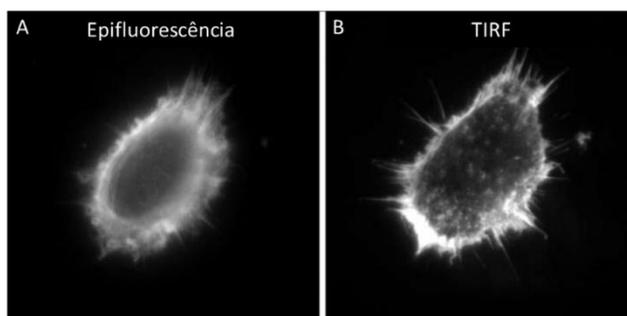
Na microscopia de campo largo convencional, a iluminação é projetada em uma linha através da amostra, o que permite a excitação de fluoróforos em profundidades superiores a 1 mm. Em contraste, na técnica de fluorescência por reflexão interna total (TIRF), ondas evanescentes são geradas e rapidamente decaem, penetrando no máximo 100 nm na amostra. Essa propriedade possibilita a excitação seletiva de um grupo específico de moléculas, resultando em uma resolução aprimorada para a visualização de células vivas, como ilustrado na Figura 7.⁸³ Essa capacidade seletiva e de alta resolução é particularmente vantajosa para a obtenção de imagens de células vivas com maior detalhamento, conforme exemplificado na Figura 8.⁷⁹

Figura 7: Diferença entre a microscopia *widefield* convencional e a reflexão interna total.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁸³. ID da licença - [1376884-1](#).

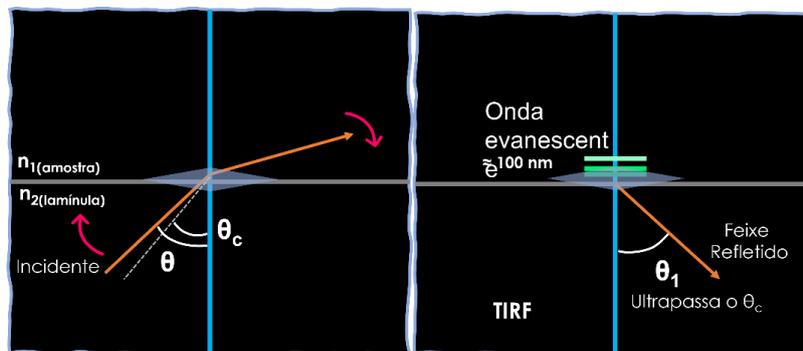
Figura 8: Diferença na resolução de imagens de células vivas capturadas na mesma região.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁷⁹. Número da licença - 5592071412330.

Na microscopia TIRF (Fluorescência por Reflexão Interna Total), a luz de excitação é direcionada de forma oblíqua, diferente da microscopia de epifluorescência onde a luz vem de uma objetiva focalizada, como ilustrado na Figura 9. Nessa técnica, a luz do microscópio incide na superfície da amostra com um ângulo específico de incidência, resultando em uma reflexão total interna. Como consequência, o feixe de luz não se propaga através da amostra, mas gera um campo evanescente dentro de uma camada com espessura mínima. Esse campo evanescente apresenta alta sensibilidade e permite a observação da fluorescência de uma única molécula com grande precisão. Essa capacidade de visualizar moléculas individuais é possível devido à excitação seletiva e à localização restrita do campo evanescente na interface entre a superfície da amostra e o meio circundante.^{79,84}

Figura 9: Formação do campo evanescente gerado pela reflexão interna total (TIRF).



Fonte: Imagem de autoria própria.

Na técnica TIRF, ilustrada na Figura 9, a ocorrência da reflexão total interna depende da relação entre os índices de refração da amostra (n_1) e da lamínula (n_2). O feixe de excitação entra na amostra a partir da esquerda com um ângulo de incidência θ . À medida que θ aumenta e ultrapassa o ângulo crítico θ_c , ocorre a reflexão do feixe na interface entre a lamínula e a amostra (ângulo de reflexão θ_1), e um campo evanescente é gerado no lado oposto dessa interface, dentro da amostra. A determinação precisa do ângulo é realizada utilizando a Lei de Snell, conforme descrito pela equação 1:

$$n_2 \cdot \text{sen}\theta = n_1 \cdot \text{sen}\theta_1 \quad (\text{Equação 1})$$

A condição para a reflexão interna total seja alcançada ocorre quando o ângulo de incidência θ é suficientemente grande para que a radiação refratada se torne paralela à interface, formando um ângulo de 90° com a direção normal à interface lamínula-amostra. Portanto, para determinar o ângulo mínimo de incidência θ necessário para a reflexão interna total, deve-se resolver a Lei de Snell atribuindo 90° a θ_1 . Além do controle do ângulo de incidência, é necessário utilizar uma objetiva com alta abertura

numérica (maior que 1.4) para possibilitar a incidência do feixe de excitação na interface lamínula-amostra com ângulos maiores que o ângulo crítico, garantindo assim a ocorrência do TIRF.⁸³

A microscopia de fluorescência de molécula única é uma metodologia avançada que se baseia no princípio fundamental da localização precisa das coordenadas dos emissores individuais usando a função de propagação de pontos (PSF).⁸⁵ Na análise de dados experimentais de molécula única, é comum empregar programas de análise de séries temporais para investigar a evolução temporal da intermitência de fluorescência em um local específico de reação. Para melhorar a precisão na localização da molécula em cada ponto de tempo, é essencial considerar a função de propagação de pontos na análise da série temporal. A PSF descreve como a imagem de um ponto de luz emitido por uma molécula única se espalha ao passar pelo sistema óptico da microscopia, levando em conta os efeitos de difração e ópticos presentes no sistema. Ao incorporar a PSF na análise da série temporal, é possível obter informações espaciais e temporais mais precisas sobre a fluorescência da molécula. Essa abordagem aprimorada permite uma compreensão mais abrangente da dinâmica molecular, das interações com o ambiente e dos estados de fluorescência das moléculas únicas. Portanto, ao combinar a microscopia de fluorescência de molécula única, a análise de séries temporais e a consideração da função de propagação de pontos (PSF), é possível obter uma visão mais completa e detalhada do comportamento desses sistemas.⁸⁶

1.6. Aplicação das técnicas de microscopia de fluorescência a nível de molécula única para investigar reações

Uma das aplicações importantes das técnicas de microscopia de fluorescência a nível de molécula única é o estudo da catalise de reação em sistemas específicos. Essa abordagem dinâmica permite observar as variações presentes no sistema, proporcionando uma compreensão mais detalhada do comportamento das moléculas.

Os experimentos de reações em nível de molécula única utilizando a reflexão interna total combinada com a detecção de fluorescência permitem o estudo da dinâmica de moléculas individuais em tempo real. Essa técnica emprega a excitação com o campo evanescente, possibilitando a observação da fluorescência de moléculas individuais à medida que elas são produzidas em sítios catalíticos ativos. Essa abordagem oferece vantagens significativas, pois permite a excitação da fluorescência apenas em moléculas

que estão muito próximas à superfície, o que viabiliza a observação da dinâmica individual dessas moléculas em tempo real.⁸⁷

Uma das abordagens para investigar o mecanismo cinético e comportamento dos catalisadores, utilizando a microscopia de fluorescência em nível de molécula única, consiste em funcionalizar a superfície de lamínulas com um discreto número de sítios catalíticos ou utilizar templates reacionais, como as microzeólitas.^{87,88} As zeólitas são materiais com estrutura porosa amplamente utilizados como catalisadores ou suportes para catalisadores e são compostas por alumino silicatos cristalinos. O tamanho dos poros dessas zeólitas pode ser ajustado por meio de diferentes técnicas de modificação, permitindo a adsorção seletiva e o transporte de moléculas específicas. Além disso, existem sítios ácidos dentro desses poros, que podem atuar como locais ativos para reações catalíticas. Utilizando a microscopia de fluorescência de molécula única, em 2009, Hofkens e colaboradores conseguiram monitorar com sucesso a condensação do álcool furfurílico catalisada por partículas de zeólita ácida e reconstruir a atividade catalítica de um único cristal de zeólita.⁸⁹ Kubarev e colaboradores integrando a microscopia de fluorescência de molécula única com a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mapearam a reatividade catalítica em nanobastões de zeólitas fundidos lateralmente, nomeados H-ZSM-22. Foi observado que o alumínio não catalítico na área da casca de uma única estrutura de H-ZSM-22 foi convertido em alumínio catalítico interno nas partículas fundidas de H-ZSM-22.⁹⁰ Portanto, devido à sua estrutura altamente organizada e aos tamanhos bem definidos dos poros, as microzeólitas podem fornecer um ambiente confinado e controlado para a realização de reações químicas que não seriam possíveis em condições convencionais.⁹¹

Além disso, as microzeólitas podem ser utilizadas como suporte para melhorar a estabilidade e seletividade de marcadores fluorescentes no contexto da marcação. Ao incorporar marcadores em microzeólitas, é possível protegê-los contra a degradação, aumentar sua vida útil e melhorar a eficiência da marcação em sistemas específicos. Essa estratégia de encapsulamento em microzeólitas oferece vantagens significativas, proporcionando um ambiente protegido para os marcadores e permitindo seu uso em diversas aplicações.^{92,93}

Ao utilizar a microscopia de fluorescência de molécula única em conjunto com microzeólitas como templates reacionais, torna-se possível explorar e compreender os processos químicos em escala molecular, contribuindo para o avanço da área da catálise

e o desenvolvimento de catalisadores mais eficientes e seletivos em diversas aplicações científicas e industriais.

Portanto, este trabalho apresenta os resultados de experimentos em nível de molécula única (SM) para quatro reações de acoplamento cruzado do tipo Suzuki-Miyaura. Foram realizadas análises cinéticas detalhadas dessas reações, utilizando a abordagem de experimentos SM aplicando diferentes métodos de localização do catalisador em superfície, bem como o uso de microzeólitas como template reacional. Além disso, foi desenvolvido um programa de simulação para validar a metodologia utilizada na análise dos resultados cinéticos experimentais de molécula única. Adicionalmente, serão apresentados os resultados de um estudo envolvendo a marcação de dois derivados do fenantreno, que foram utilizados como marcadores em microzeólitas contendo grupos amino livres em sua superfície. Essas abordagens têm como objetivo aprofundar o entendimento em cinética molecular e explorar novas estratégias para a marcação de compostos específicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Neste projeto, o objetivo principal foi realizar experimentos em nível de molécula única, utilizando técnicas avançadas de microscopia de fluorescência. Esses experimentos foram aplicados a quatro reações específicas estudadas pelo mecanismo de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura. Para alcançar esse objetivo, foram preparados sistemas com catalisador imobilizado em suportes adequados para a microscopia de fluorescência. Além disso, foi desenvolvido um simulador estocástico que foi usado para verificar a consistência dos resultados experimentais. Simultaneamente, foi conduzido um estudo de marcação de dois derivados do fenantreno como marcadores em microzeólitas que possuem grupos amino livres em sua superfície. O objetivo desse estudo foi explorar novas abordagens para a marcação de compostos fluorescentes, ampliando o conhecimento sobre a interação entre esses marcadores e as microzeólitas.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudo SM das reações de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura

Os estudos de molécula única foram conduzidos por meio da preparação de diferentes sistemas. Essas abordagens permitiram examinar de forma detalhada as reações, compreendendo os padrões de intermitência associados à catálise. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- a)** Preparação dos sistemas contendo pré-catalisador de acetato de paládio (II) ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$), adsorvidos em sítios aniônicos do tipo Si-O^- localizados na superfície das lamínulas;
- b)** Marcação da superfície das lamínulas utilizando silanos modificados contendo ligante ativo para $\text{Pd}(\text{II})/\text{Pd}(0)$.
- c)** Utilização de microzeólitas como template reacional, marcadas com silanos modificados e ligante ativo para $\text{Pd}(\text{II})/\text{Pd}(0)$;
- d)** Foi conduzida uma análise das séries temporais de intermitência nos três sistemas modelo mencionados (a, b e c), por meio da observação no lócus nanométrico de catálise. Essa análise foi realizada utilizando tratamentos estocásticos, com o objetivo de compreender os padrões de intermitência associados ao processo de catálise. Essa abordagem permitiu uma investigação detalhada dos fenômenos de intermitência e

sua relação com a eficiência catalítica, contribuindo significativamente para o aprofundamento do entendimento das reações em escala molecular.

e) Com o objetivo de avaliar as capacidades do programa de tratamento de séries temporais de intermitência no contexto de limite flutuante, foi desenvolvido um simulador estocástico de séries temporais. Este simulador foi elaborado considerando algumas aproximações ao ciclo de reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura formando uma molécula de produto.

2.2.2. Derivados fenantreno reativos como potenciais marcadores de grupos amino

Para investigar o potencial dos derivados fenantreno reativos como marcadores de grupos amino, foram realizadas análises abrangentes visando compreender suas propriedades fotofísicas e comportamento em diferentes ambientes. As principais abordagens adotadas incluíram:

a) Estudo detalhado das propriedades fotofísicas dos derivados fenantreno por meio de técnicas espectroscópicas de absorção (UV-vis) e emissão (fluorescência) em solventes variados;

b) Determinação do rendimento quântico (Φ_f) dos derivados fenantreno em diferentes solventes, proporcionando informações sobre a eficiência de emissão;

c) Análise do decaimento da fluorescência dos derivados fenantreno, o que possibilitou investigar o comportamento temporal de emissão e sua estabilidade ao longo do tempo;

d) Utilização da técnica de microscopia confocal para aquisição de imagens dos derivados fenantreno marcados em microzeólitas, permitindo uma visualização precisa e detalhada da distribuição espacial desses marcadores;

Essas abordagens abrangentes foram essenciais para caracterizar as propriedades fotofísicas dos derivados fenantreno reativos e avaliar seu potencial como marcadores de grupos amino presentes em microzeólitas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, serão apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do projeto. Serão descritas as metodologias empregadas para a realização dos experimentos em nível de molécula única, assim como a abordagem adotada para desenvolver o simulador estocástico de séries temporais. Além disso, serão detalhadas as metodologias de análises utilizadas para investigar o potencial dos derivados fenantreno como marcadores de grupos amino livre em microzeólitas. Serão fornecidas informações detalhadas sobre os procedimentos experimentais e as técnicas específicas utilizadas, com o intuito de assegurar uma compreensão abrangente do processo de pesquisa e análise realizado.

3.1. Materiais

Na Tabela 2 são apresentados os reagentes e solventes utilizados durante experimentos.

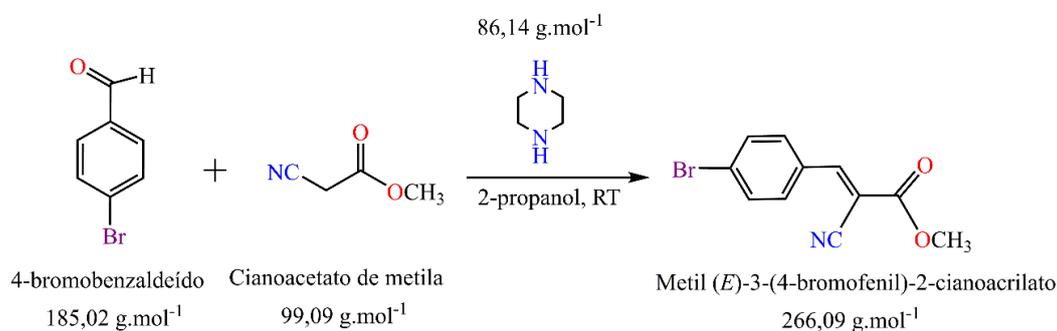
Tabela 2: Reagentes e solventes com suas respectivas purezas e procedências.

Reagentes e Solventes	Pureza (%)	Marca
2-(6-Bromonaphtalen-2-il)-5-propil-1,3,4-oxadiazol	96	Combi-Blocks
(3-aminopropil) trietoxissilano	≥ 98	Sigma Aldrich
4-bromo-1,8-anidrido naftálico	95	Sigma Aldrich
4-Bromobenzaldeído	99	Sigma Aldrich
Acetato de etila HPLC	99,9	Panreac
Acetato de paládio (Pd(OAc) ₂)	≥ 99,9	Sigma Aldrich
Acetonitrila HPLC	99,9	Panreac
Ácido 4-(dimetilamino)fenilborônico, HCl	98	Combi-Blocks
Ácido fenantreno-9-borônico	98	Combi-Blocks
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) PA	-	Êxodo Científica
Cianoacetato de metila		
Ciclohexano HPLC	-	Êxodo Científica
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂) HPLC	-	Scharlau
Dimetilformamida (DMF)	99,97	JT Baker
Dimetilsulfóxido (DMSO) HPLC	99,9	Panreac
<i>p</i> -Dioxano HPLC	99,9	JT Baker
Isopropanol HPLC	99,5	Biograde
Metanol HPLC	99,9	Panreac
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) PA	-	Êxodo Científica
Piperazina	99	Sigma Aldrich
terc-butóxido de sódio (NaOC(CH ₃) ₃)	99,9	Sigma Aldrich
Tetraidrofurano (THF) HPLC	99,9	Panreac
Lamínulas	-	Menzel-Gläser

3.2. Síntese do Metil(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato

Para viabilizar um dos estudos em nível de molécula única utilizando a reação de Suzuki-Miyaura, foi necessário realizar uma reação de condensação de Knoevenagel para obter o reagente Metil(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato. Essa reação consistiu na combinação de 4-bromobenzaldeído e cianoacetato de metila em uma proporção estequiométrica de 1:1,2, respectivamente. A piperazina foi usada como base na proporção de 1:0,5 em relação ao 4-bromobenzaldeído. O Esquema 9 ilustra a reação de condensação de Knoevenagel mencionada.

Esquema 9: Reação de condensação de Knoevenagel entre o 4-bromobenzaldeído e Cianoacetato de metila.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Inicialmente, o 4-bromobenzaldeído (5,40 mmol, 100 mg) foi dissolvido em 3 mL de isopropanol de alta pureza (HPLC) e combinado com o cianoacetato de metila (6,50 mmol, 64,40 mg) em um frasco reacional previamente descontaminado. A piperazina (2,70 mmol, 23,25 mg) foi adicionada após dissolução em 2 mL do mesmo solvente. Para garantir a completa solubilização, os reagentes passaram por um processo de ultrassom utilizando uma cuba ultrassônica modelo 1510 da marca Branson. Em seguida, o sistema reacional foi agitado constantemente, à temperatura ambiente, por 1 hora. Após o tempo de reação, o precipitado obtido foi centrifugado e submetido a uma recristalização em metanol de alta pureza (HPLC). O sólido resultante foi dissolvido no álcool a 50 °C e resfriado durante a noite para promover a formação de um material com aspecto cristalino. Realizou-se então uma segunda recristalização utilizando o mesmo solvente e condições. Por fim, o produto final foi isolado por decantação, seco e armazenado sob refrigeração.

O composto foi caracterizado por RMN de ^1H utilizando um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 500 MHz da marca Agilent Technologies e modelo

500/54 Premiun Shielded. E o ponto de fusão foi determinado em um medidor da marca Gehaka modelo PF1000.

3.3. Limpeza das lamínulas

Para realizar os experimentos em nível de molécula única, foi necessário realizar uma limpeza adequada das lamínulas utilizadas. O processo de limpeza consistiu nos seguintes passos:

a) As lamínulas foram colocadas em um suporte de teflon e imersas em um banho de água mili-Q, detergente neutro incolor e etanol HPLC. O banho foi aquecido suavemente a uma temperatura entre 40 °C e 50 °C;

b) Em seguida, o sistema (suporte + banho) foi submetido a uma cuba ultrassônica por 30 minutos;

c) Após o processo de ultrassom, as lamínulas foram lavadas com água mili-Q em abundância, sem serem removidas do suporte de teflon. Utilizando uma pisseta, elas foram cuidadosamente lavadas com um jato de isopropanol de alto grau de pureza;

d) As lamínulas foram individualmente acomodadas em frascos de vidro adequados para o armazenamento, e colocadas em uma chapa de aquecimento em temperatura baixa para secagem;

e) Uma vez secas, elas foram imersas em uma solução piranha recém-preparada, composta por uma proporção de 2 partes de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para 1 parte de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A imersão foi realizada por 1 minuto, com agitação constante;

f) Por fim, as lamínulas passaram por uma exaustiva lavagem com água mili-Q e foram novamente secas em uma chapa de aquecimento em temperatura baixa, permanecendo dispostas individualmente dentro dos frascos apropriados para lamínulas.

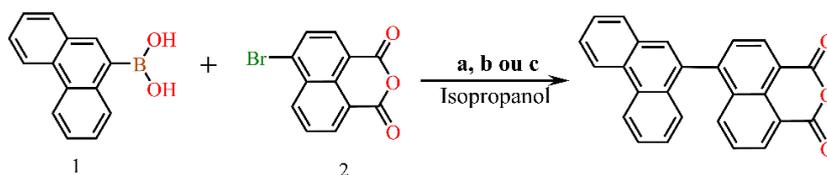
Após a conclusão do processo de limpeza, as lamínulas foram expostas a um tratamento com ozônio/UV por 10 minutos em um UV Ozone Cleaner da marca Ossila, garantindo a eliminação de quaisquer resíduos emissivos. Esse procedimento adicional foi realizado para assegurar a máxima pureza das lamínulas antes do início dos experimentos.

3.4. Estudo SM das reações de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura

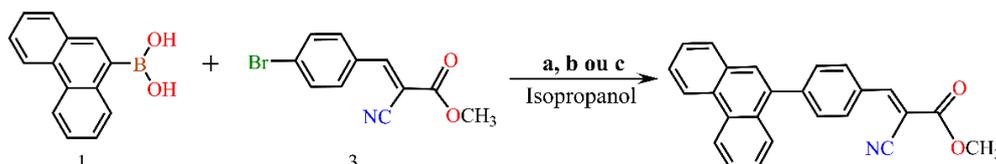
O Esquema 10 ilustra as quatro reações investigadas por meio do mecanismo de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura em experimentos de molécula única. Essas reações foram selecionadas como parte do estudo para obter uma compreensão aprofundada de suas cinéticas. Um aspecto importante desse estudo foi a utilização de diferentes métodos de preparação e deposição de pré-catalisadores em superfície (lamínulas), visando investigar sua influência no desempenho e na eficiência das reações.

Esquema 10: Reações utilizadas como alvo de estudo a nível de molécula única, nomeadas SM1, SM2, SM3 e SM4. Os reagentes nomeados de 1-5 foram - Composto 1: Ácido fenantreno-9-borônico; Composto 2: 4-bromo-1,8-anidrido naftálico; Composto 3: Metil(E)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato, Composto 4: Ácido 4-(dimetilamino)fenilborônico; Composto 5: 2-(6-Bromonaphtalen-2-il)-5-propil-1,3,4-oxadiazol.

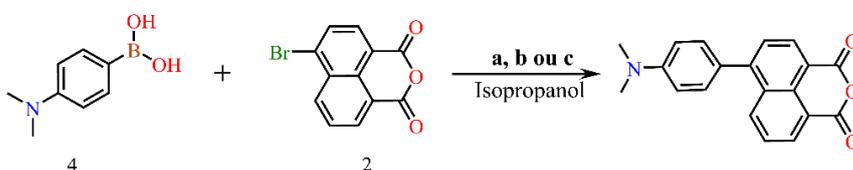
Reação SM1



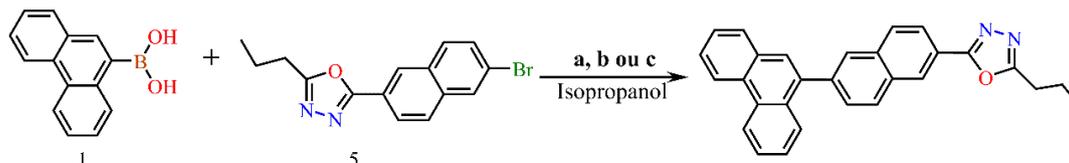
Reação SM2



Reação SM3



Reação SM4

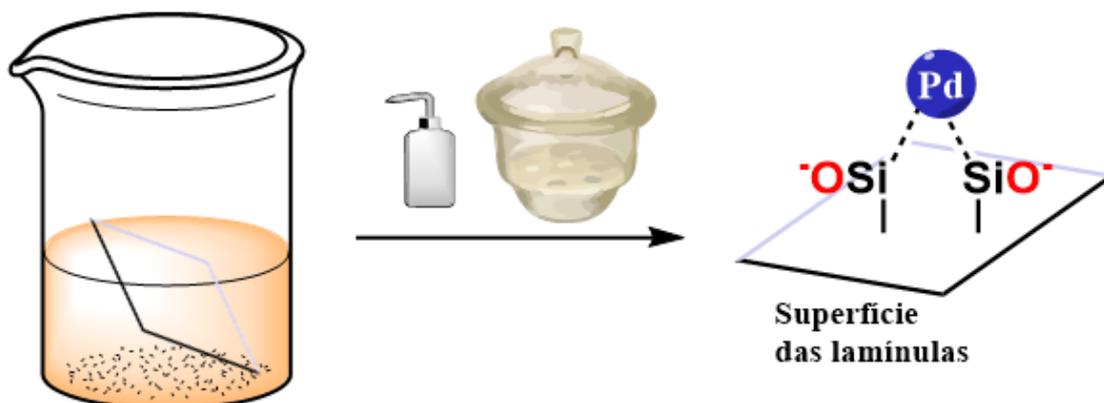


Fonte: Imagem de autoria própria.

a) Preparação dos sistemas pela localização do catalisador Pd(0) em superfície pela adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O⁻:

Em um frasco, foram adicionados 15 mL de isopropanol HPLC contendo uma concentração muito baixa de Pd(OAc)₂, na ordem de 10⁻³ mmol.L⁻¹. As lamínulas foram imersas nessa solução e mantidas sob agitação constante em um agitador magnético, à temperatura ambiente, por 3 minutos. Em seguida, elas foram lavadas com isopropanol HPLC seco em peneira molecular. Por fim, foram cuidadosamente secas em uma placa aquecedora em temperatura moderada (40-50 °C), dentro de frascos de vidro apropriados para lamínulas. A Figura 10 exibe um esquema representativo da marcação da superfície do vidro com Pd(II).

Figura 10: Esquema da marcação da superfície do vidro com Pd(II). O íon Si-O⁻ faz parte da superfície do vidro.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Para preparar as soluções estoque dos reagentes 1 a 5, conforme indicado no Esquema 10, inicialmente adicionaram-se aproximadamente 2,5 mg dos compostos a 1 mL de THF e 1 mL de isopropanol, ambos de alta pureza. As concentrações dos reagentes e da base NaOC(CH₃)₃ utilizada nos experimentos podem ser consultadas na Tabela 3, que fornece informações detalhadas, inclusive o volume das soluções estoque utilizado para a preparação final da solução empregada nos experimentos de molécula única com a deposição do pré-catalisador direto em superfície. Após a deposição do catalisador em superfície, uma célula de perfusão com capacidade volumétrica de 50 µL foi colada sobre a lamínula funcionalizada e preenchida com a solução reativa final. A célula de perfusão, ilustrada na Figura 11 é mostrada em uma foto que evidencia a sua fixação sobre a lamínula.

Tabela 3: Concentrações dos reagentes e da base $\text{NaOC}(\text{CH}_3)_3$ utilizada nos experimentos de molécula única com a deposição do pré-catalisador direto em superfície.

Reação	Reagente	Concentração* (mmol.L^{-1})	Volume adicionado** (μL)	Concentração final*** (mmol.L^{-1})
SM1	1	4,50	250	1,12
	2	9,02	250	2,25
	$\text{NaOC}(\text{CH}_3)_3$	2,80	100	0,28
SM2	1	4,50	250	1,12
	3	3,72	250	0,93
	$\text{NaOC}(\text{CH}_3)_3$	2,80	100	0,28
SM3	4	7,50	100	0,75
	2	9,02	100	2,25
	$\text{NaOC}(\text{CH}_3)_3$	2,80	40	0,28
SM4	1	4,50	100	1,12
	5	3,94	100	0,39
	$\text{NaOC}(\text{CH}_3)_3$	2,80	40	0,28

* Solução estoque de cada reagente;

** Volume adicionado a 1 mL de isopropanol seco em peneira molecular de cada reagente;

*** Solução final contendo o volume referente a cada reagente, usada para preencher a célula de perfusão realizar os experimentos SM.

Figura 11: Célula de perfusão colada sobre a lamínula utilizada para estudos SM.



Fonte: Imagem de autoria própria.

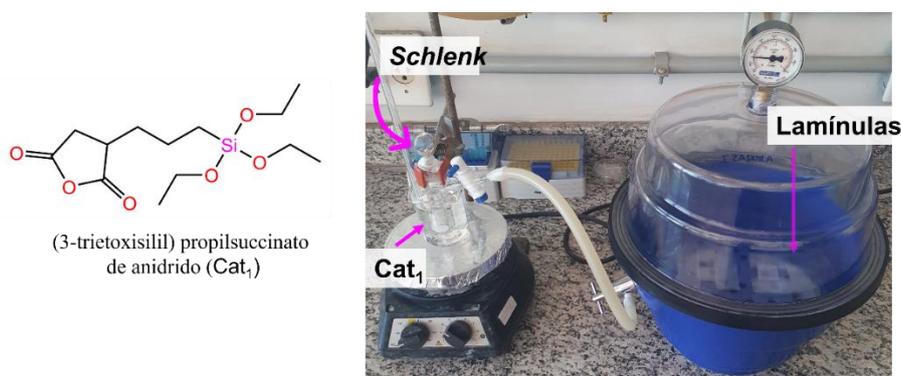
b) Preparação dos sistemas pela localização do catalisador Pd(0) em superfície utilizando vapor de (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido e PdCl_2 :

Uma abordagem empregada para experimentos SM envolve o uso de uma superfície funcionalizada com silano contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0). Diversas metodologias e silanos foram investigados neste estudo, no entanto, optou-se por adotar a estratégia de utilização de vapor de silano em superfície, que foi recentemente publicada por Kai Gu e colaboradores, como suporte para o procedimento em questão.⁸⁸

Para esse procedimento foi usado (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido (Cat_1) como silano e $PdCl_2$ como pré-catalisador, sem a adição de uma base.

As lamínulas foram cuidadosamente posicionadas dentro de um dessecador conectado a um *Schlenk*, que foi preenchido com 500 μL de Cat_1 . A Figura 12 apresenta a estrutura do silano utilizado e ilustra o sistema montado para realizar o experimento de marcação com vapor de Cat_1 . Durante o procedimento, o dessecador foi mantido em vácuo para criar uma atmosfera adequada.

Figura 12: Estrutura do silano utilizado (Cat_1) e representação do sistema montado para realizar o experimento de marcação da superfície utilizando vapor de Cat_1 .

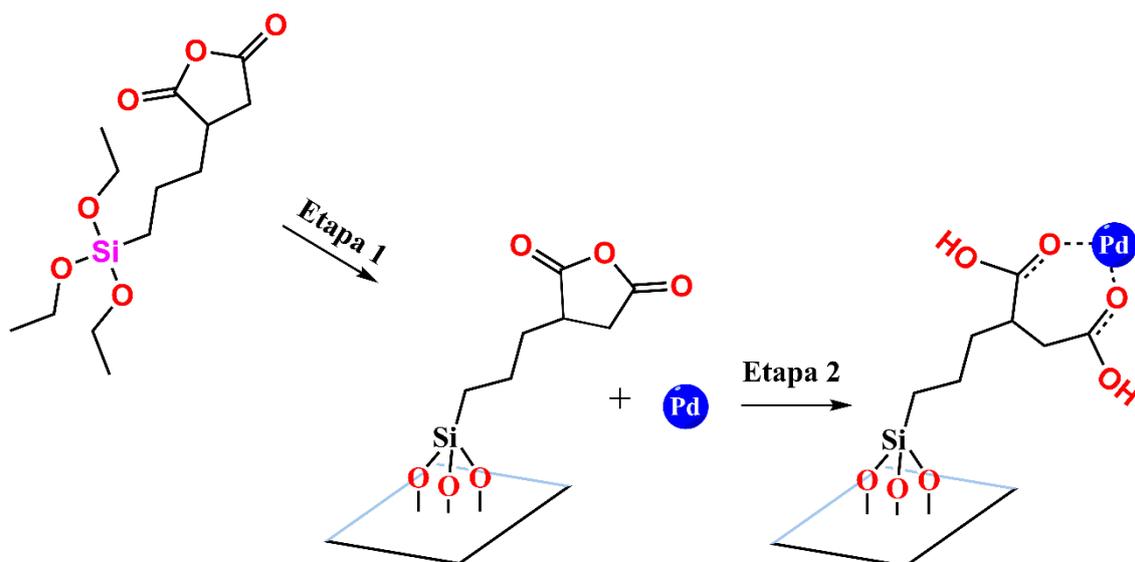


Fonte: Imagem de autoria própria.

Mantendo ambas as vias hermeticamente fechadas, o *Schlenk* foi submetido a uma temperatura de 45 °C, imerso em um banho, durante 30 minutos. Após esse intervalo, as vias foram abertas, sendo a do *Schlenk* a primeira a ser acessada. Em seguida, a marcação por vaporização do silano foi realizada ao longo de 2 horas. Posteriormente, as lamínulas foram submetidas a uma sequência de lavagens em etanol HPLC, água mili-Q e etanol novamente, seguidas de secagem a vácuo para preparação da superfície antes da deposição subsequente de $PdCl_2$.

Após a conclusão do processo de silanação na superfície das lamínulas, elas foram imersas em uma solução ácida aquosa de HCl com pH em torno de 3 para facilitar a hidrólise do anidrido derivado do Cat_1 . Em seguida, as lamínulas foram submersas em uma solução ligeiramente alcalina de KOH, com pH aproximadamente 8. Para a deposição do pré-catalisador de $PdCl_2$, foi preparada uma solução aquosa de baixa concentração, na ordem de 10^{-4} mmol.L⁻¹, com pH aproximadamente 5. As lamínulas foram imersas duas vezes nessa solução antes de serem lavadas com água mili-Q e etanol, seguidas de secagem a vácuo. A Figura 13 mostra uma representação esquemática da superfície da lamínula durante o processo de marcação.

Figura 13: Esquema representativo de marcação da superfície utilizando Cat_1 e $PdCl_2$.



Fonte: Imagem de autoria própria.

As concentrações dos reagentes utilizados nos experimentos de molécula única, empregando o vapor (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido (Cat₁) e PdCl₂ como marcadores, estão disponíveis na Tabela 4. Após a marcação da superfície, o procedimento de montagem da célula de perfusão ilustrado na Figura 11 foi realizado para dar continuidade ao experimento.

Tabela 4: Concentrações dos reagentes usados nos experimentos de molécula única utilizando vapor (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido (Cat₁) e PdCl₂ como marcadores.

Reação	Reagente	Concentração* (mmol.L ⁻¹)	Volume adicionado** (μL)	Concentração final*** (mmol.L ⁻¹)
SM1	1	4,50	100	0,45
	2	9,02	100	0,90
SM2	1	4,50	50	0,22
	3	3,72	50	0,19
SM3	4	7,50	100	0,75
	2	9,02	100	2,25
SM4	1	4,50	100	1,12
	5	3,94	100	0,39

* Solução estoque de cada reagente;

** Volume adicionado a 1 mL de isopropanol seco em peneira molecular de cada reagente;

*** Solução final contendo o volume referente a cada reagente, usada para preencher a célula de perfusão realizar os experimentos SM.

c) Utilização de microzeólitas como template reacional, marcadas com (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido e cloreto de paládio (II) (PdCl₂) como pré-catalisador:

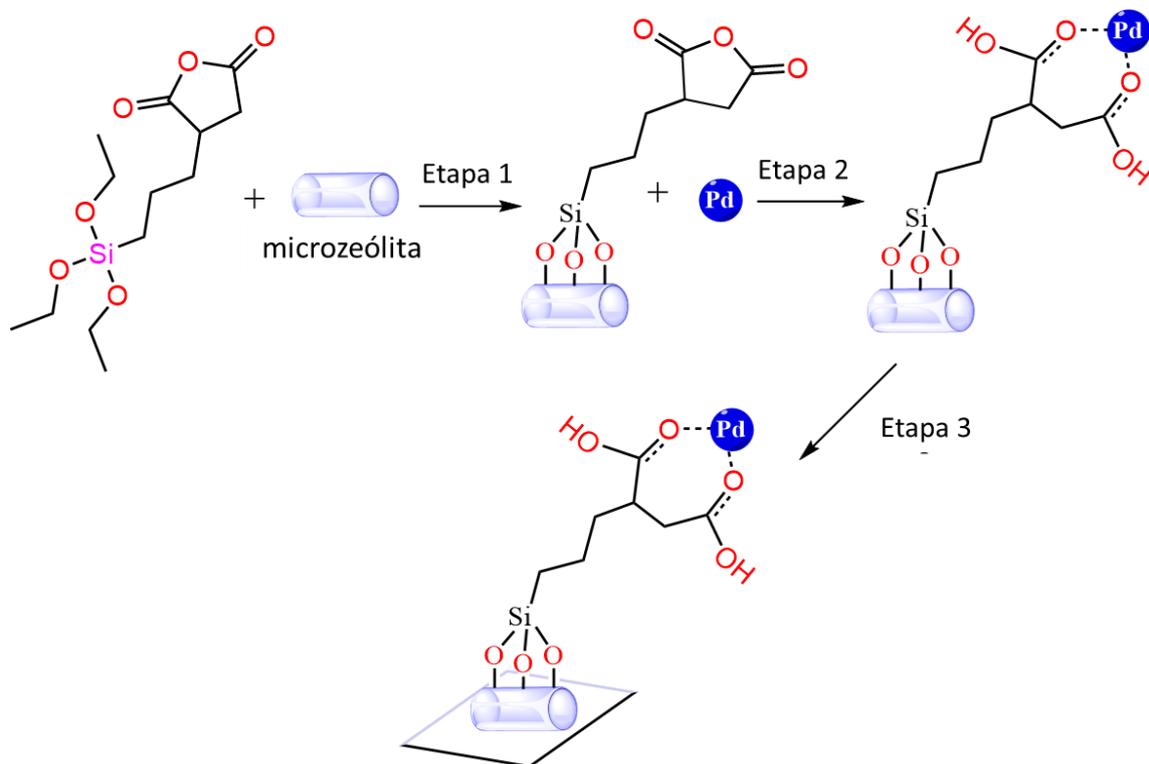
Nos experimentos SM utilizando microzeólitas marcadas com (3-trietoxisilil) propilsuccinato de anidrido (Cat₁) e PdCl₂, optou-se também pela não utilização de uma base. O processo de marcação envolveu várias etapas, que incluem: O preparo das microzeólitas com Cat₁, a marcação das microzeólitas silanadas com Cat₁ utilizando PdCl₂ como pré-catalisador e a deposição das microzeólitas silanadas e funcionalizadas com PdCl₂ na superfície das lamínulas.

Para a primeira etapa de marcação das microzeólitas com Cat₁, uma solução de silano com concentração de 0,24 mmol/L foi preparada. Isso envolveu a adição de 10 µL de Cat₁ a 2 mL de isopropanol HPLC, seguido pela dispersão de aproximadamente 3 mg de microzeólitas. Essa dispersão ocorreu devido à insolubilidade das microzeólitas no álcool. O sistema foi submetido a agitação e aquecimento brando (40 °C) por 40 minutos. Após o tempo de reação, a suspensão foi lavada com isopropanol três vezes e seca a vácuo. Dessa forma, as microzeólitas foram efetivamente silanadas com Cat₁.

A segunda etapa consistiu na funcionalização das microzeólitas previamente marcadas com Cat₁ utilizando PdCl₂. Para isso, as microzeólitas silanadas foram dispersas em uma solução aquosa de PdCl₂, recém-preparada e levemente ácida, com um pH aproximado de 5, e uma concentração da ordem de 10⁻⁴ mmol.L⁻¹. A dispersão das microzeólitas na solução foi realizada por alguns segundos. Em seguida, elas foram lavadas três vezes com água mili-Q, submetidas a centrifugação e, por fim, secas a vácuo para remoção do solvente.

Na etapa final do processo, ocorreu a deposição das microzeólitas, previamente silanadas e funcionalizadas com PdCl₂, na superfície vítrea das lamínulas. Para isso, as microzeólitas foram dispersas em 500 µL de isopropanol HPLC e aplicadas em uma lamínula através da técnica de *spin-coating*. Utilizou-se um Spin Coater Ossila, com as seguintes configurações: velocidade de rotação ajustada para 5000 rpm e tempo de preparo de 30 segundos. O procedimento foi realizado duas vezes na mesma lamínula, adicionando 30 µL da suspensão a cada aplicação, garantindo uma deposição uniforme e consistente das microzeólitas na superfície. O Esquema 11 mostra uma representação das três etapas descritas.

Esquema 11: Representação das etapas de preparação das microzeólitas usadas nos experimentos SM.



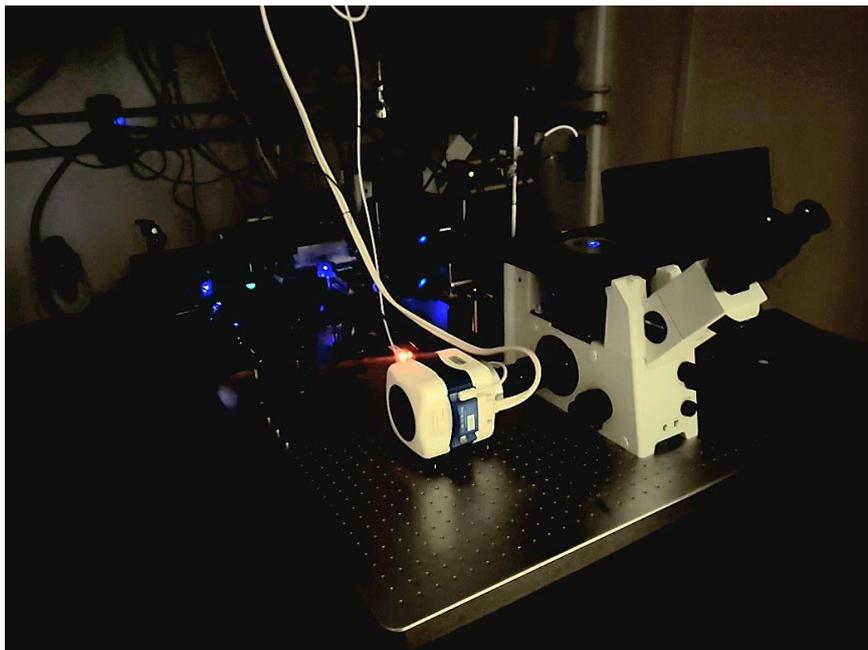
Fonte: Imagem de autoria própria.

As concentrações dos reagentes utilizados nos experimentos envolvendo microzeólitas, previamente silanadas e funcionalizadas com PdCl₂ como template reacional, foram as mesmas utilizadas no experimento de molécula única que empregou vapor Cat₁ e PdCl₂ como marcadores, conforme detalhado na Tabela 4. Após a conclusão do processo de marcação da superfície, o procedimento de montagem da célula de perfusão, ilustrado na Figura 11, foi realizado novamente, porém, desta vez, nas lamínulas contendo as microzeólitas funcionalizadas.

3.5. Técnica de microscopia de fluorescência

O Laboratório de Fluorescência Molecular é equipado com um sistema de microscopia de fluorescência de campo largo acoplado a uma câmera de alta sensibilidade e resolução, conforme ilustrado na Figura 14. Esse equipamento projetado dessa forma é capaz de realizar experimentos de molécula única. Ele desempenhou um papel fundamental na condução desses experimentos, permitindo a observação e análise precisa dos eventos moleculares em nível individual.⁹⁴⁻⁹⁶

Figura 14: Equipamento de microscopia de fluorescência de campo largo com câmera de alta sensibilidade (EMCCD) para imagens.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Por meio dessa técnica, foi possível realizar a monitorização da cinética da reação em escala de molécula única nas quatro reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura (Esquema 10). As sequências de imagens foram capturadas utilizando um microscópio invertido de campo largo IX71 da Olympus. Para a excitação dos sistemas, foi utilizado um *laser* contínuo modelo Cobalt Blues com comprimento de onda de 473 nm. As lamínulas preparadas, contendo as células de perfusão devidamente coladas e preenchidas com os reagentes, foram colocadas sobre a objetiva do microscópio, com uma fina camada de óleo previamente depositada, para dar início aos experimentos SM1-4. A Figura 15 ilustra uma foto tirada dessa configuração experimental.

Figura 15: Sistema (lamínula + célula de perfusão) colocada sobre a objetiva.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Utilizando essa abordagem, foi possível obter uma visão detalhada da cinética de reação em escala de molécula única, por meio da análise de séries temporais de

intermitência de fluorescência. Essas séries temporais foram processadas e analisadas utilizando um programa desenvolvido pelo grupo de pesquisa, especialmente projetado para o estudo de reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura. Esse programa forneceu informações sobre a dinâmica das reações, incluindo as taxas de reação.

Para cada experimento SM1-4, foram utilizados diferentes métodos de preparação de superfície, seja ativando-a diretamente com pré-catalisador ou utilizando um template reacional. Para cada experimento, foram configurados parâmetros específicos. A Tabela 5 apresenta os parâmetros utilizados durante os experimentos.

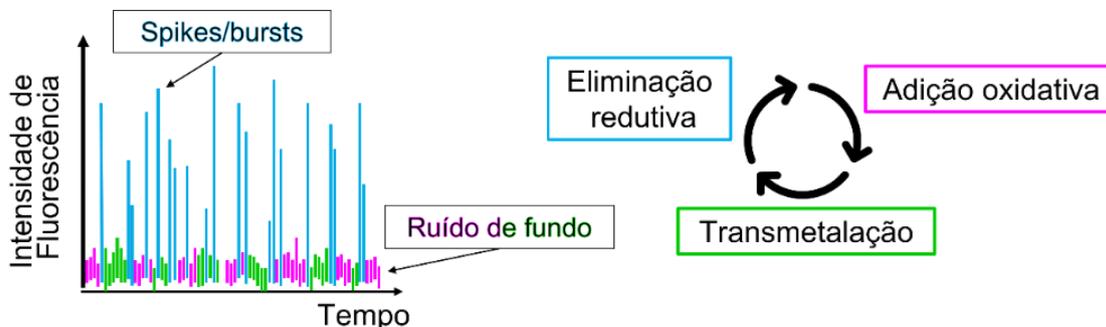
Tabela 5: Parâmetros específicos da câmera e potência do *laser* utilizado nos experimentos SM1-4 (a, b ou c).

Parâmetros/ Método	a) Pd(OAc) ₂ em superfície	b) Cat ₁ -PdCl ₂ em superfície	c) Microzeólitas - Cat ₁ -PdCl ₂
Resolução das sequências (<i>pixels</i>)	300 x 300	250 x 250	200 x 200
Potência do laser (mW)	15	40	40
Tempo de aquisição (ms)	50	SM 1 e 2: 40 SM 3 e 4: 30	30
nº de imagens	3000	2000	2000

3.6. Tratamento dos dados obtidos dos experimentos SM1-4 para as três metodologias de marcação de superfície (a, b e c)

A reação de acoplamento resulta em uma série temporal contendo vários saltos de intensidade, conhecidos como "*spikes*" ou "*bursts*", que indicam a provável formação de moléculas de produto fluorescente e esses sinais se destacam acima de um ruído de fundo, como representado qualitativamente no gráfico da Figura 16.

Figura 16: Exemplo de um gráfico qualitativo mostrando a variação de intensidade de fluorescência em função do tempo de cada etapa do mecanismo de Suzuki-Miyaura.



Fonte: Imagem de autoria própria.

O gráfico apresenta de forma qualitativa o comportamento de cada etapa em relação às flutuações de intensidade do sinal ao longo do tempo. Quando o produto é

formado durante a etapa de eliminação redutiva, observa-se um aumento na intensidade de fluorescência. O principal objetivo dessa análise é calcular a taxa de transição na formação do produto, o que permite determinar o tempo médio necessário para a primeira ocorrência do ciclo de Suzuki-Miyaura, resultando na formação de uma molécula de produto.

A análise de centenas de centroides (local ativo onde ocorre a reação química) é coletada e suas séries temporais obtidas dos experimentos de molécula única mencionados (SM1-4; a, b e c) são analisadas com o programa desenvolvido e projetado para processar um histograma de contagem e convertê-lo em um histograma on/off, contabilizando as transições de off (catalisador inativo) para on (catalisador ativo). Permitindo obter valores médios representativos de diversos parâmetros e o cálculo subsequente da taxa de reação (inverso do tempo de primeira passagem) que é melhor definida com um SM-TOF (*Single-Molecule Turnover Frequency*).

O programa desenvolvido para essa análise requer a inserção de diversos parâmetros de entrada, como o arquivo de entrada, a taxa de quadros, o número de pontos de dados e o tipo de ruído presente na análise. Para facilitar a inserção desses parâmetros, foi desenvolvida uma interface, exemplificada na Figura 17, onde o usuário pode inserir os valores obtidos e usado nos experimentos.

Figura 17: Interface do programa desenvolvido para o tratamento das séries temporais de intermitência.

```
file is called phcXXX.dat
enter 3 digits file identifier
000
frame rate per second used
00
What is the number of data points? <8192
0000
Threshold = factor*sqrt(average_noise)
Factor?? (usually near 2.0)
0
Fluctuating threshold
uniform = 1 ; gauss = 2
0
```

Fonte: Imagem de autoria própria.

3.7. Simulação de Séries Temporais de Intermitência

Com o objetivo de avaliar as capacidades do programa de tratamento de séries temporais de intermitência em um contexto de limite flutuante, foi desenvolvido um simulador estocástico de séries temporais. Esse simulador foi elaborado considerando algumas aproximações ao ciclo de reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura formando uma molécula de produto. O simulador gera uma representação temporal do sinal de fluorescência produzido, levando em consideração diversos fatores, como a reatividade do catalisador, a probabilidade de dessorção da molécula, a atividade do catalisador (ligado/desligado) e a adição de um ruído de detecção.

Descrição geral do fluxo do programa:

O usuário fornece várias entradas, como o número de pontos de dados, a taxa de quadros por segundo, a constante do catalisador, a probabilidade de dessorção, a probabilidade de o catalisador estar ativo, o rendimento quântico de fluorescência e a amplitude média do ruído de detecção.

A simulação é iniciada e para cada ponto de dados, o programa gera números aleatórios para determinar se o catalisador está ativo, calcula a probabilidade de reação, gera um número aleatório para determinar se a reação ocorre, e calcula o sinal de fluorescência resultante levando em consideração a presença do catalisador, o número de moléculas fluorescentes adsorvidas e o ruído de detecção.

Por fim, o programa calcula a taxa de transições das moléculas fluorescentes e fornece um arquivo de saída. Nota-se que esta intermitência de fluorescência simulada será analisada pelo mesmo programa de análise de séries temporais (item anterior 3.6) obtidas experimentalmente.

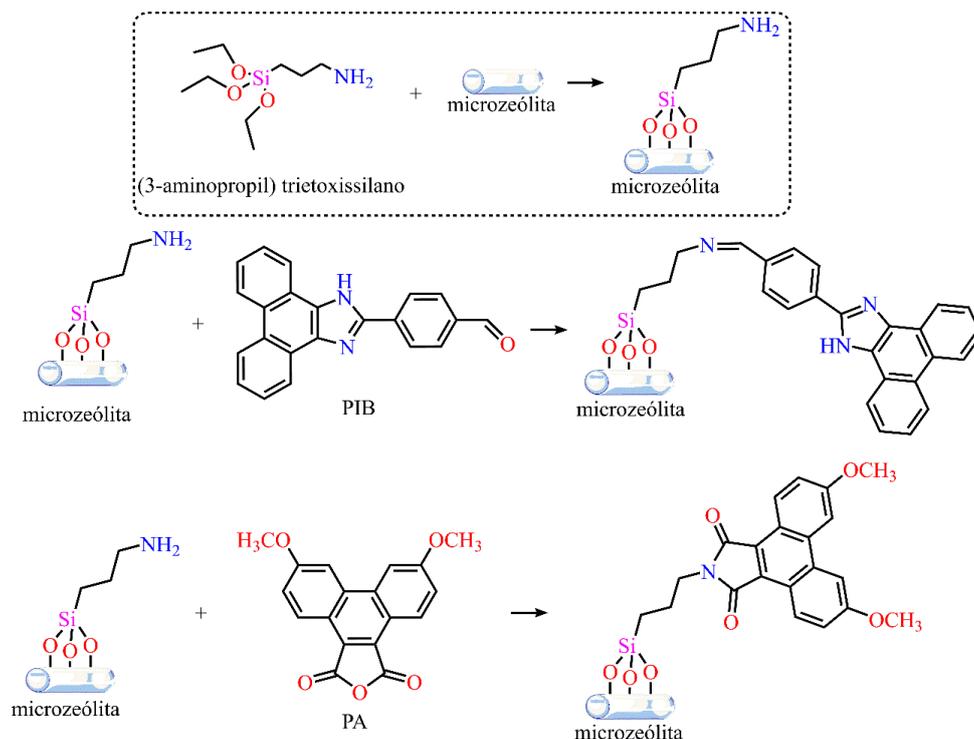
3.8. Marcação dos derivados fenantreno reativos como potenciais marcadores de grupos amino

Além de serem usadas como template reacional, as microzeólitas podem desempenhar a função de suporte para melhorar a estabilidade e a seletividade de marcadores fluorescentes. Ao incorporar os marcadores em microzeólitas, é possível protegê-los contra a degradação, aumentar sua vida útil e melhorar a eficiência da marcação em determinados sistemas.

Para esse trabalho foram testados dois derivados de fenantreno como marcadores em microzeólitas que possuem grupos amino livres em sua superfície. O

Esquema 12 ilustra uma reação não balanceada de silanação dessas microzeólitas e a marcação com os derivados PIB e PA.

Esquema 12: Esquema de reação não balanceada para a marcação das microzeólitas com (3-aminopropil) trietoxissilano e com os derivados de fenantreno 4-(1H-fenantrol [9,10-d] imidazol-2-il) benzaldeído (PIB) e anidrido fenantrênico (PA).



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

Primeiramente as partículas de microzeólitas (20 mg) foram submetidas a um processo de secagem a vácuo e adicionadas a uma solução contendo (3-aminopropil) trietoxissilano em isopropanol HPLC, sob atmosfera de argônio. O sistema foi então aquecido suavemente a 50 °C, com agitação constante, por um período de 20 minutos. Após essa etapa, o sólido resultante foi submetido a centrifugação, seguida de lavagem com isopropanol e secagem a vácuo, preparando-o para a reação com os derivados de fenantreno.

Os reagentes PIB ou PA foram adicionados às suspensões das partículas de microzeólitas em isopropanol HPLC, utilizando uma proporção de massa de 1:20. A reação foi mantida por um período de 2 horas. Posteriormente, o sólido obtido foi submetido a centrifugação, lavagem por três vezes com isopropanol HPLC e secagem a vácuo. Para as análises de microscopia, as partículas foram suspensas em isopropanol e depositadas em lamínulas de vidro através do processo de *spin coating*.

3.8.1. Caracterização dos compostos PIB e PA

3.8.1.1. Espectroscopia UV-Vis

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos utilizando um Espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-1800, com varredura na região de 200 a 800 nm, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. O equipamento fica localizado na CAQI.

3.8.1.2. Fluorescência em solução

Os espectros de emissão em solução foram obtidos utilizando um Espectrofluorímetro da marca Hitachi, modelo F-4500, com varredura na região de 200 a 800 nm, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. O equipamento fica localizado na CAQI.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_s) das amostras foram calculados usando como padrão 9,10-difenilantraceno (DPA) ($\Phi_F = 0,9$, ciclohexano) para o composto PA e sulfato de quinina ($\Phi_F = 0,546$, H_2SO_4 0,5 mol/L) para PIB. A equação 2 foi utilizada para realizar o cálculo.

$$\phi_S = \phi_R \cdot \left(\frac{I_S}{I_R} \right) \cdot \left(\frac{1 - 10^{-AR}}{1 - 10^{-AS}} \right) \cdot \left(\frac{n_S}{n_R} \right) \quad \text{equação 2}$$

Sendo ϕ_s = rendimento quântico da amostra (S); ϕ_R = rendimento quântico da referência (R); I é a intensidade de fluorescência integrada; A é a absorvância no comprimento de onda de excitação e n é o índice de refração do solvente.

3.8.1.3. Medições em microscópio

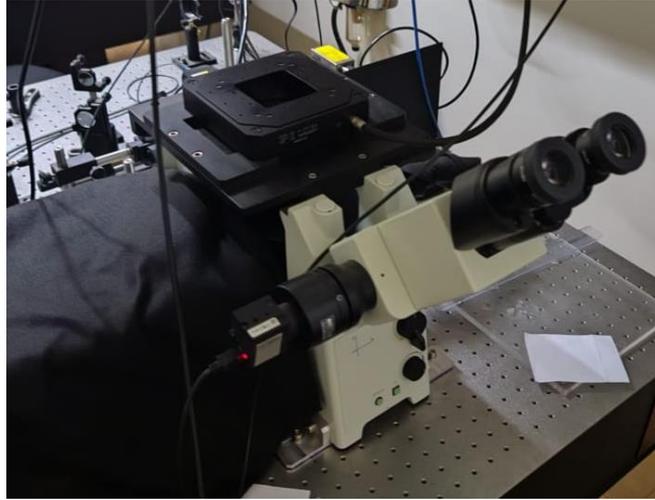
3.8.1.3.1. Imagens de fluorescência confocal

Para realizar as medições em microscópio confocal, as partículas de microzeólitas marcadas com os fluoróforos PIB e PA foram depositadas em lamínulas de vidro limpas utilizando a técnica de *spin-coating* em suspensão de isopropanol HPLC.

O laboratório está equipado com um microscópio Olympus IX71 que possui um controlador digital piezoelétrico e um estágio para varredura de amostras em escala nanométrica. Esse microscópio foi utilizado para conduzir os experimentos e a Figura 18 apresenta uma foto desse equipamento. A excitação das amostras foi realizada usando um *laser* de diodo da marca Coherent Cube com um comprimento de onda de 405 nm. Para separar o sinal de emissão do feixe de excitação, foram utilizados um

cubo dicróico e um filtro *notch*. As imagens obtidas foram registradas e o contraste foi aprimorado por meio de mapeamento de falsa cor.

Figura 18: Microscópio confocal Olympus IX71.



Fonte: Imagem de autoria própria.

3.8.1.3.2. Decaimentos

Os decaimentos de fluorescência foram medidos usando uma técnica de contagem de fóton único. Utilizou-se uma placa de contagem Becker & Hickl 140 e pulsos de *laser* acionados por um fotodiodo Pico-Quant TDA 200. Os decaimentos foram analisados por ajuste multiexponencial com deconvolução utilizando o *software* FAST (Edinburgh Instruments).

3.8.1.3.3. Imagens em cores verdadeiras

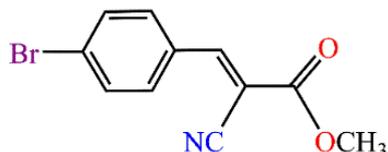
As imagens em cores verdadeiras das amostras de fluorescência foram registradas usando uma câmera colorida Thorlabs DCU 223C, acoplada ao microscópio Olympus IX71.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reação de condensação de Knoevenagel

A reação de condensação de Knoevenagel entre o 4-bromobenzaldeído e o Cianoacetato de metila, utilizando piperazina como base, resultou na formação do produto ilustrado na Figura 19.

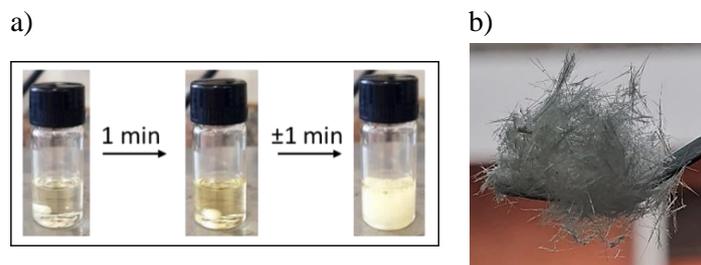
Figura 19: Produto Metil (*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato obtido da reação de condensação de Knoevenagel.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Após 1 minuto do início da reação, observou-se uma mudança de coloração na solução reacional, inicialmente incolor, para um leve tom amarelado. Em aproximadamente mais 1 minuto, ocorreu a formação de um precipitado branco. A Figura 20a apresenta essa transição de cor e a formação do sólido. Após a recristalização em metanol, o produto de aparência cristalina foi separado por decantação, completamente seco e armazenado em refrigeração, resultando em um rendimento de 95%. A Figura 20b exibe uma imagem do sólido cristalino após a completa remoção do solvente por secagem.

Figura 20: a) Foto mostrando a transição de cor e precipitação durante a reação de condensação de Knoevenagel. b) Foto capturada do material de aspecto cristalino obtido.

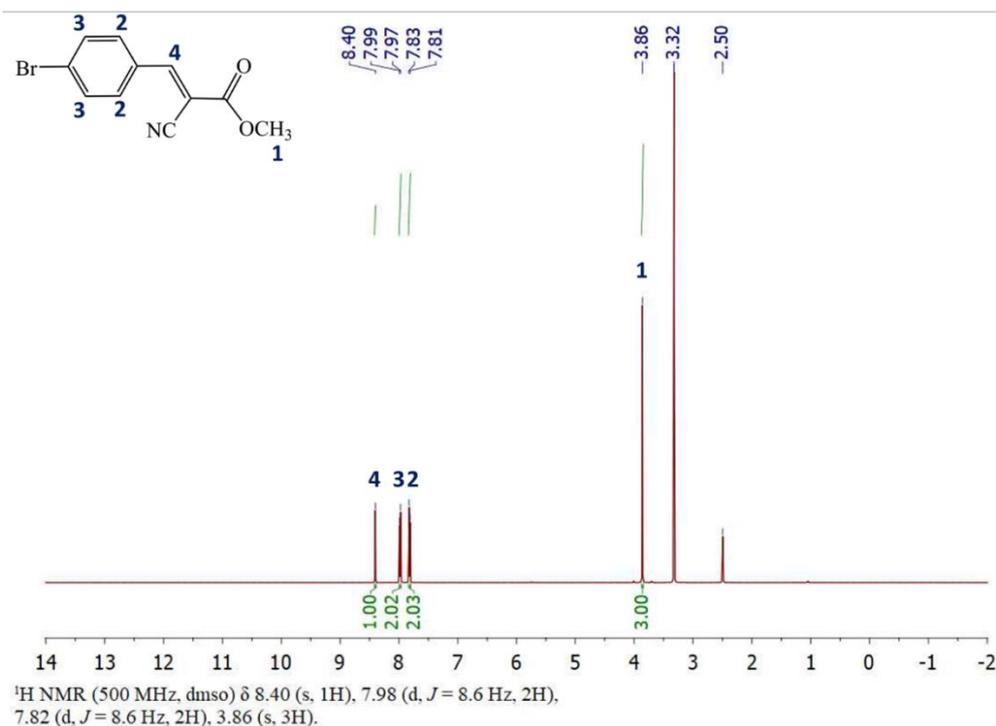


Fonte: Imagem de autoria própria.

A caracterização do composto Metil (*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato foi realizada por RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6), como pode ser observado no espectro da Figura 21, revelando deslocamentos químicos consistentes com a literatura, embora tenha havido uma leve variação nos valores observados.⁹⁷ Essa discrepância sutil pode ser atribuída ao uso de um solvente diferente e às particularidades do espectrômetro de

ressonância magnética utilizado. Além disso, em 2,50 ppm, foi identificado o pico correspondente ao solvente dimetilsulfóxido-d₆, enquanto em 3,30 ppm é comum observar um pico correspondente ao óxido de deutério.⁹⁸

Figura 21: Espectro de RMN de ¹H do composto Metil (*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato.

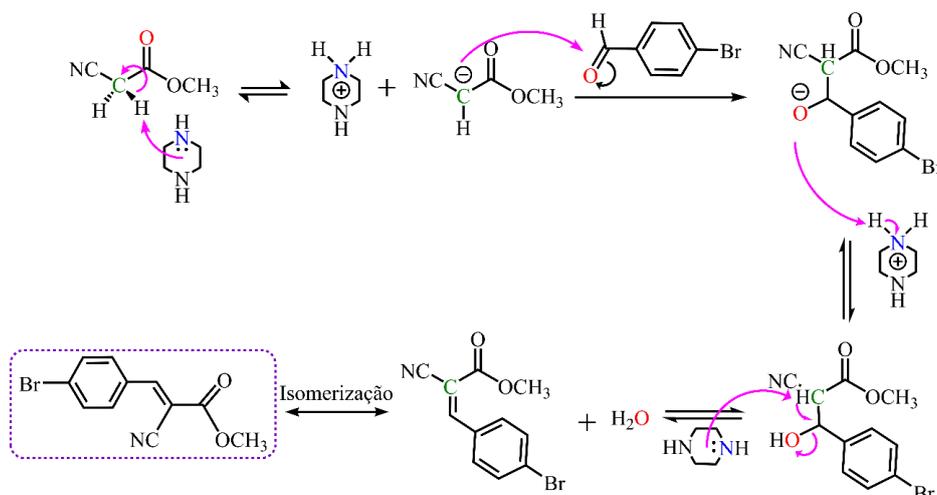


Fonte: Imagem de autoria própria.

O ponto de fusão do produto foi determinado a 130 °C, enquanto a literatura reporta uma faixa de 132 - 133 °C. Diferentes métodos de determinação podem resultar em valores ligeiramente diferentes devido a variações na taxa de aquecimento, taxa de resfriamento ou precisão do equipamento. Além disso, o ponto de fusão de alguns compostos orgânicos pode ser sensível ao tempo de fusão, resultando em leituras mais baixas com taxas de aquecimento ou observação mais rápidas.⁹⁷ Portanto, essas duas técnicas foram eficazes para assegurar a pureza e caracterização do produto obtido.

Um dos mecanismos propostos para a condensação de Knoevenagel envolve inicialmente a etapa de adição nucleofílica à carbonila, seguida da eliminação de uma molécula de água, resultando na formação da ligação dupla carbono-carbono. O Esquema 13 ilustra o mecanismo da condensação de Knoevenagel entre o 4-bromobenzaldeído e o cianoacetato de metila em meio básico de piperazina.

Esquema 13: Mecanismo proposto para a condensação de Knoevenagel entre o 4-bromobenzaldeído e o cianoacetato de metila em meio básico de piperazina.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁹⁹. Número da licença - 5592080718377.

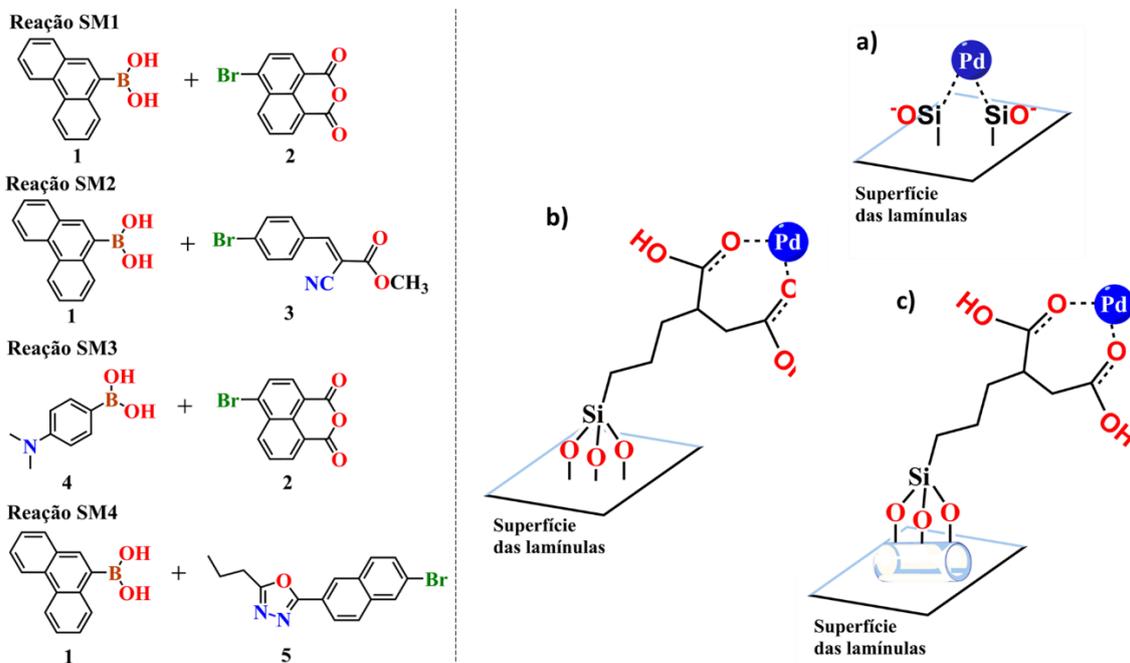
Nesse tipo de reação, é comum que um dos precursores apresente um centro metilênico ativo, ou seja, um carbono ligado a grupos que retiram elétrons. No mecanismo ilustrado no Esquema 13, o cianoacetato de metila possui uma nitrila e um éster em sua estrutura, que atuam como grupos retiradores de densidade eletrônica. Conseqüentemente, os centros metilênicos são desprotonados pela ação da base (neste caso, a piperazina), resultando na perda de um hidrogênio ácido ligado ao centro metilênico e gerando uma espécie nucleofílica. O nucleófilo formado ataca o carbono carbonílico do 4-bromobenzaldeído, formando uma ligação carbono-carbono entre as duas espécies. Essa espécie reage novamente com a base protonada, formando um terceiro intermediário. Por fim, o terceiro intermediário sofre uma reação de ataque da piperazina à ligação carbono-hidrogênio do centro metilênico, resultando na formação de uma ligação dupla carbono-carbono e na eliminação de uma molécula de água. Essa molécula de água é gerada pela eliminação de uma espécie OH⁻, que reage com o íon referente a piperazina protonada.⁹⁹

4.2. Reações de acoplamento cruzado do tipo Suzuki-Miyaura com catalisador em superfície para os estudos SM

Nesta seção, serão apresentados os resultados relacionados as reações de acoplamento C-C do tipo Suzuki-Miyaura, que foram estudadas na aproximação de molécula única pela localização do catalisador Pd(0) em superfície pelos métodos: (a) Adsorção Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O⁻, (b) pelo uso de um silano modificado contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0) e (c) pelo uso de microzeólitas como template

reacional silanadas e ativadas por Pd(II). O Esquema 14 apresenta de forma resumida as reações e os métodos utilizados nos experimentos.

Esquema 14: Reações estudadas na aproximação de molécula única pela localização do catalisador Pd(0) em superfície pelos métodos: (a) Adsorção Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O⁻, (b) pelo uso de silanos modificados contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0) e (c) microzeólitas silanadas e ativadas por Pd(II).



Fonte: Imagem de autoria própria.

Este estudo utilizou reagentes estrategicamente selecionados para conduzir reações em nível de molécula única. Esses reagentes apresentam diferentes grupos funcionais em suas estruturas, os quais exercem influência direta na taxa das reações. O Ácido fenantreno-9-borônico (1) foi escolhido para compor três das quatro reações estudadas (SM1, SM2 e SM4) devido à sua estabilidade em condições normais de temperatura, pressão e exposição à atmosfera.

Além disso, uma característica fundamental desse composto é a presença do grupo fenantreno em sua estrutura, que atua como um cromóforo devido à extensa conjugação de elétrons ao longo dos anéis aromáticos. Essa conjugação eletrônica permite que o fenantreno absorva energia quando exposto a um comprimento de onda específico. Quando o composto é excitado por essa energia absorvida, um dos elétrons da cadeia conjugada é promovido a um estado eletrônico excitado mais elevado. Após a excitação, ocorre um processo de relaxação eletrônica, no qual o elétron retorna ao seu

estado fundamental. Durante esse processo, parte da energia absorvida é liberada na forma de luz por meio de processos radiativos, resultando na emissão de fluorescência.

Ao ser utilizado como reagente nas reações de acoplamento de Suzuki, o Ácido fenantreno-9-borônico possui a capacidade de gerar produtos que exibem emissão de fluorescência na região visível do espectro eletromagnético quando excitados por comprimentos de onda específicos. Por exemplo, essa propriedade pode ser observada na reação do Ácido fenantreno-9-borônico com o 4-bromo-1,8-anidrido naftálico (2), que foi escolhido como o segundo reagente na primeira reação de acoplamento de Suzuki deste estudo (SM1).

A escolha do 4-bromo-1,8-anidrido naftálico como reagente se justifica pela sua capacidade de reagir com compostos organoborônicos na presença de um catalisador de paládio. Além disso, a parte anidrido da molécula pode participar de diversas reações químicas, como acilação, hidrólise, ciclização e oxidação. Essa versatilidade dos anidridos abre um leque de potenciais aplicações, incluindo o seu uso como marcadores em reações específicas. Portanto, a combinação do Ácido fenantreno-9-borônico com o 4-bromo-1,8-anidrido naftálico em uma reação de acoplamento de Suzuki não só possibilita a formação de produtos fluorescentes, mas também utiliza as propriedades reativas do anidrido para ampliar as aplicações do composto resultante, incluindo o potencial de ser utilizado como marcador.

O Metil(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato (3) que foi obtido por meio de uma reação de condensação de Knoevenagel, foi selecionado como reagente na segunda reação (SM2), em conjunto com o Ácido fenantreno-9-borônico. A presença dos grupos ciano e acrilato na estrutura desse composto pode influenciar a conjugação eletrônica, tendo potenciais efeitos sobre as propriedades ópticas do produto resultante após a reação com o fenantreno.

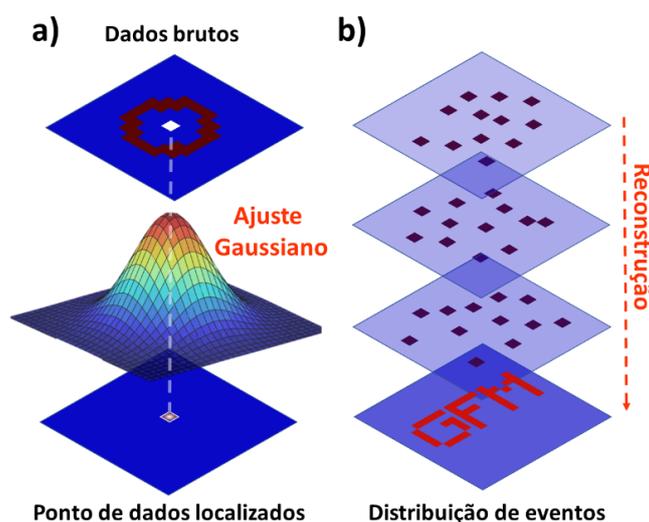
A terceira reação (SM3) foi conduzida entre o Ácido 4-(dimetilamino)fenilborônico (4) e o 4-bromo-1,8-anidrido naftálico. O Ácido 4-(dimetilamino)fenilborônico possui o grupo dimetilamino em sua estrutura, que é um doador de densidade eletrônica e tem o potencial de influenciar a conjugação eletrônica, impactando diretamente nas propriedades fluorescentes do produto resultante da reação. A escolha desse reagente na terceira reação também levou em consideração sua capacidade de formar complexos estáveis com catalisadores de paládio, facilitando a formação do produto desejado pela reação de acoplamento de Suzuki.

A quarta e última reação (SM4) realizada neste estudo envolveu o Ácido fenantreno-9-borônico, porém, desta vez, reagindo com o composto 2-(6-Bromonaphtalen-2-il)-5-propil-1,3,4-oxadiazol (5). O grupo propil-1,3,4-oxadiazol presente no composto 5 possui a capacidade retiradora de elétrons impactando diretamente nas propriedades fluorescentes do produto. Portanto, as reações SM1-4 foram selecionadas para realizar os experimentos em nível de molécula única, levando em consideração as propriedades ópticas, grupos funcionais específicos e reatividade dos reagentes envolvidos nas reações de acoplamento de Suzuki. Essa abordagem permitiu uma análise das diferentes cinéticas proporcionadas por essas reações quando submetidas a diversas variáveis experimentais.

a) Localização do catalisador Pd(0) em superfície por adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O⁻

Para investigar as quatro reações em escala de molécula única, utilizando as três metodologias mencionadas (Esquema 14), foram produzidos vários filmes utilizando a técnica de microscopia de campo largo em TIRF. Em seguida, foram obtidas imagens de alta resolução utilizando o software *Igor-Localizer*. Para obter essas imagens de alta resolução, os resultados dos experimentos de molécula única forneceram dados de emissão de apenas uma pequena fração das moléculas em um determinado momento, permitindo isolar várias emissões no espaço. Utilizando o ajuste dos pontos isolados das moléculas individuais através da função de propagação de pontos (PSF) da emissão, que normalmente segue uma função gaussiana, foi possível determinar com precisão as coordenadas das moléculas, conforme ilustrado na Figura 22a. Após a obtenção das coordenadas de todos os eventos de emissão, foi realizada a reconstrução de uma imagem da amostra, projetando todas as coordenadas em uma única imagem, como mostrado na Figura 22b. Essa imagem reconstruída apresenta uma resolução espacial muito alta. É importante ressaltar que as emissões das moléculas individuais geralmente são fracas, exigindo o uso de uma câmera sensível para aquisição dessas imagens. Por esse motivo, foi utilizada uma câmera EMCCD (*electron-multiply charge couple device*), que possui alta sensibilidade e taxa de quadros.¹⁰⁰

Figura 22: Princípio de funcionamento da microscopia de fluorescência de molécula única. (a) Diagrama esquemático da localização de moléculas individuais com ajuste gaussiano. (b) Reconstrução de múltiplos eventos para uma imagem de super-resolução.

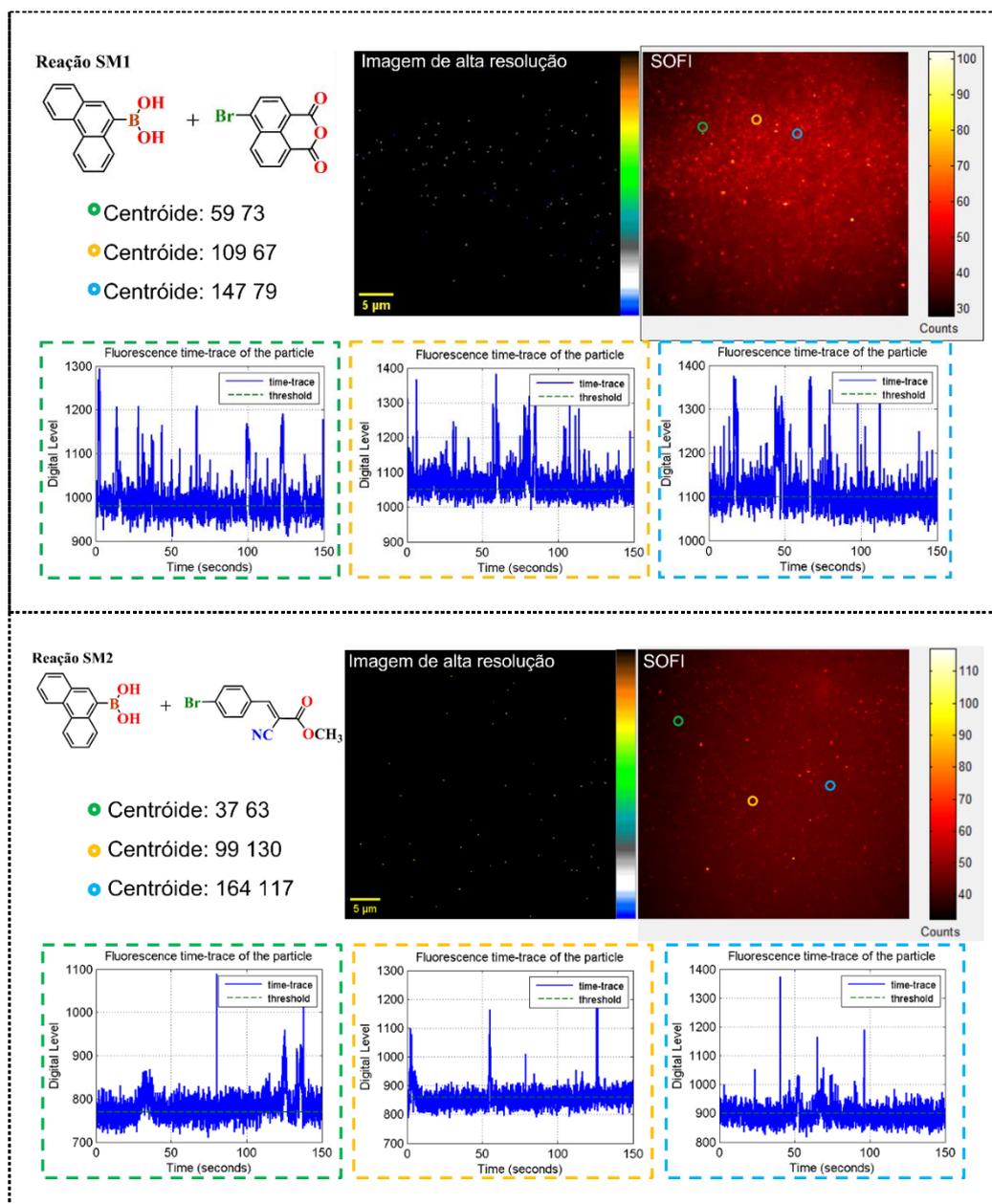


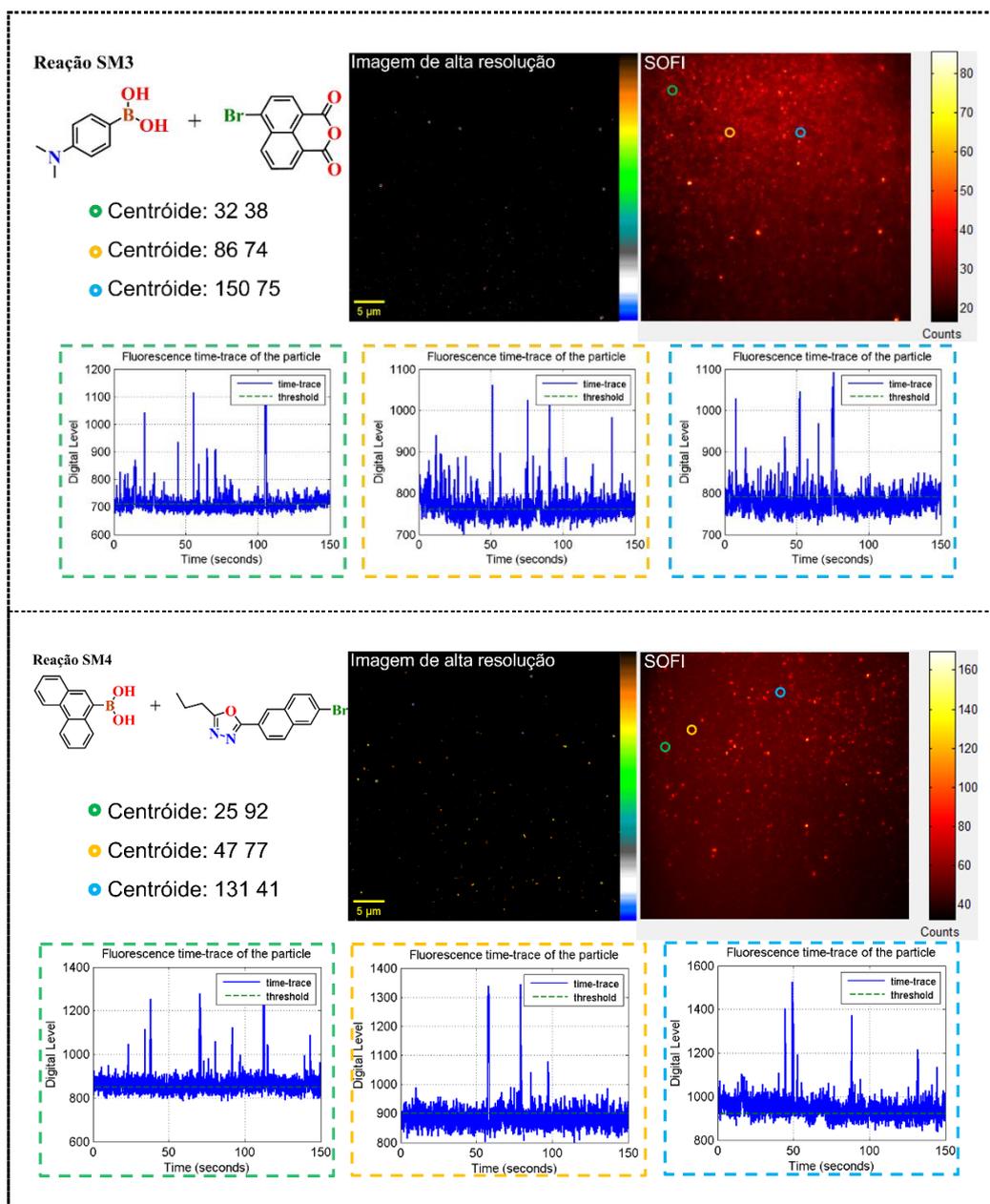
Fonte: Figura adaptada da referência¹⁰⁰. Número da licença - 5592081122719.

Vários centros reativos (ponto de dados localizados) foram identificados por meio de imagens de flutuação óptica de super-resolução, isto é, análise SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging) de segunda ordem. Essa técnica analisa as flutuações temporais da fluorescência em cada *pixel* individualmente, empregando estatísticas de ordem superior. Através dessa abordagem, é possível aumentar a resolução espacial, ao mesmo tempo em que se elimina a contribuição de fluorescência de fundo não flutuante. Esses centros reativos, ou centróides, foram selecionados com base em critérios que evidenciam uma variação de intermitência na formação de saltos de intensidade.

A seguir, serão apresentadas imagens de alta resolução, imagens SOFI e três histogramas temporais de contagem para as quatro reações, utilizando a metodologia de localização do catalisador Pd(0) em superfície através da adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O⁻.

Figura 23: Imagens de alta resolução, imagens SOFI e três histogramas temporais de contagem para as reações SM1-4, obtidas utilizando a metodologia de localização do catalisador Pd(0) em superfície através da adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos do tipo Si-O⁻.





Fonte: Imagem de autoria própria.

Ao analisar a Figura 23, é possível observar que a reação de acoplamento produz uma série temporal com vários saltos de intensidade (*spikes/bursts*) para todas as reações estudadas, indicando a formação do produto fluorescente. A análise dos picos na intensidade de fluorescência (Digital level) exibem variações significativas, sugerindo que a entrada de luz proveniente da fluorescência detectada pelo detector ocorre por diferentes orientações moleculares, resultando em diferentes intensidades. Além disso, os histogramas revelam uma marcante variação no número de eventos de fluorescência de molécula única ao longo do tempo. Essa variabilidade reflete a natureza dinâmica e intrínseca do funcionamento do sítio catalítico, onde os processos reacionais ocorrem de maneira estocástica. Portanto, o comportamento dos eventos de

fluorescência não segue um padrão pré-definido, tornando esse sistema altamente complexo.

Esses sinais de intensidade observados nos histogramas se destacam acima do ruído de fundo, e uma técnica de análise foi utilizada para determinar estatisticamente um limite apropriado acima do qual o sinal é considerado um evento de formação de molécula de produto fluorescente, enquanto abaixo desse valor não há formação. Assim, a série temporal é convertida em uma série binária de eventos, representada pelos valores 0 e 1, ou seja, uma série temporal de Bernoulli. A análise foi realizada usando um limite flutuante, que pode ser escolhido com base em uma distribuição uniforme, 5% do valor do segundo limite, ou seja, 5% acima ou abaixo (faixa cinza) do segundo limite fixo (linha tracejada verde) ou considerando um desvio gaussiano em torno desse valor, basicamente a raiz quadrada acima ou abaixo (faixa cinza) do segundo limite fixo (linha tracejada verde). Portanto, a série temporal é reordenada com a aplicação do limiar oscilante a cada ponto, convertendo-a em uma série temporal lógica de estados ligado e desligado. A Figura 24 exibe uma mesma série temporal tratada tanto por um limite flutuante uniforme quanto atribuindo um limite flutuante gaussiano.

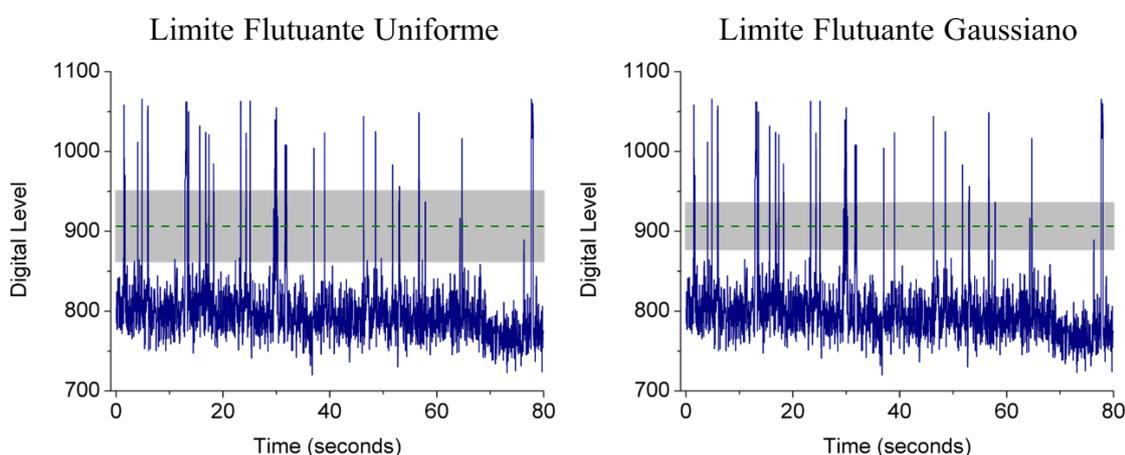


Figura 24: Exemplo de uma série temporal tratada tanto por um limite flutuante uniforme ou atribuindo um limite flutuante gaussiano. A região sombreada representa o limiar oscilante do tipo uniforme (imagem a esquerda) ou gaussiano (imagem a direita), e a linha tracejada é o seu centro.

O arquivo de saída gerado pelo programa calcula vários parâmetros relacionados à série temporal, incluindo:

- Média das contagens na série temporal (*Average count*);
- Primeiro limiar calculado para a discretização on/off da série temporal (*First threshold*), baseado na média das contagens e em um fator estatístico;

- Segundo limiar calculado levando em consideração os picos (spikes) e o primeiro limiar (*Second threshold*);
- Número total de transições on/off na série temporal (*Total number of SM transitions*);
- Tempo total da série temporal em segundos (*Experimental time*);
- Taxa média de transições on/off por segundo na série temporal (*Average SM rate*);
- Tempo médio de atividade off (unidade) (*Average off time*);
- Tempo médio de atividade off em segundos (*Average off time*);
- Tempo médio de atividade on (unidade) (*Average on time*);
- Tempo médio de atividade on em segundos (*Average on time*);
- Limiar de atividade off para identificar picos isolados (*Threshold off units for isolated spike*);
- Número de picos isolados encontrados na série temporal (*Number of spikes found*);
- Taxa de transições on/off efetiva por segundo, descontando tempos longos de atividade off/on e picos isolados (*Effective cycle SM rate*);
- Constante de dessorção (*Desorption constant*).

Esses parâmetros fornecem informações sobre a série temporal, incluindo atividade on/off, frequência de transições, tempos médios, taxa média, entre outros, permitindo uma análise mais detalhada do comportamento da série temporal em estudo.

A análise foi realizada em centenas de centroides em diferentes filmes e regiões das amostras, e suas séries temporais foram analisadas usando a programação desenvolvida. Isso permitiu obter valores médios representativos de diversos parâmetros e o cálculo subsequente da taxa de reação, também conhecida como SM-TOF (*Single-Molecule Turnover Frequency*). Os resultados das reações SM1-4 podem ser observados na Tabela 6 e Tabela 7. A análise foi feita tanto para um limite flutuante de distribuição uniforme ($\pm 5\%$ do valor do segundo limite) quanto assumindo um desvio gaussiano ao redor desse mesmo valor. Ambos os tratamentos estocásticos das séries temporais de intermitência resultaram em valores próximos para os principais parâmetros, considerando o desvio padrão obtido na análise de centenas de centros catalíticos.

Tabela 6: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM1 e SM2. Para a primeira reação foram analisados 160 centros ativos e para a segunda 180.

PROGRAM rate_SM_on/off	SM1				SM2			
	Uniforme		Gaussiana		Uniforme		Gaussiana	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Average count	1026	72	1026	72	801	51	801	51
First threshold	1090	74	1090	74	858	53	858	53
Second threshold	1119	77	1119	77	887	56	887	56
Total number of SM transitions	70	42	80	43	52	39	71	48
Experimental time (s)	150	-	150	-	150	-	150	-
Average SM rate (s^{-1})	0,47	0,28	0,53	0,29	0,35	0,26	0,47	0,32
Average off time (unit)	32,86	15,00	31,77	13,33	23,79	17,46	27,12	16,32
Average off time (s)	1,64	0,75	1,59	0,67	1,19	0,87	1,36	0,82
Average on time (unit)	2,51	1,37	2,33	1,45	3,83	5,46	3,06	4,99
Average on time (s)	0,13	0,07	0,12	0,07	0,19	0,27	0,15	0,25
Threshold off units for isolated spike	66	30	64	27	48	35	54	33
Number of spikes found	7	2	7	2	5	3	6	3
Effective cycle SM rate (s^{-1})	0,67	0,50	0,80	0,52	0,44	0,37	0,74	0,59
Desorption constant	11	7	11	7	9	7	12	10

Tabela 7: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM3 e SM4. Para a terceira reação foram analisados 200 centros ativos e para a quarta 180.

PROGRAM rate_SM_on/off	SM3				SM4			
	Uniforme		Gaussiana		Uniforme		Gaussiana	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Average count	835	121	783	61	878	53	878	53
First threshold	893	125	839	63	937	54	937	54
Second threshold	917	131	864	69	980	54	980	54
Total number of SM transitions	63	38	70	31	60	48	69	51
Experimental time (s)	150	-	150	-	150	-	150	-
Average SM rate (s^{-1})	0,42	0,25	0,46	0,21	0,40	0,32	0,46	0,34

Average off time (unit)	34,03	14,24	35,01	12,28	23,46	18,64	25,77	18,82
Average off time (s)	1,70	0,71	1,75	0,61	1,17	0,93	1,29	0,94
Average on time (unit)	2,22	1,13	1,84	0,76	3,55	3,20	3,29	3,16
Average on time (s)	0,11	0,06	0,09	0,04	0,18	0,16	0,16	0,16
Threshold off units for isolated spike	68	29	70	25	47	37	52	38
Number of spikes found	6	2	6	2	5	3	6	3
Effective cycle SM rate (s ⁻¹)	0,57	0,43	0,71	0,43	0,48	0,46	0,63	0,58
Desorption constant	9	5	10	5	8	4	9	5

Com base nos dados obtidos e analisados, o valor mais significativo para este estudo é o número de moléculas de produto formadas por minuto por um único catalisador Pd(0), que é calculado utilizando a taxa média SM (Average SM rate) destacada em azul na Tabela 6 e Tabela 7. Esse valor de taxa média corresponde ao SM-TOF e apresenta um alto desvio padrão, justificado pela natureza dinâmica e intrinsecamente estocástica do funcionamento dos sítios catalíticos. Para obter o número de moléculas por minuto, foi calculado inicialmente o tempo médio de primeira passagem do ciclo, tanto para o limite flutuante de distribuição uniforme ($\pm 5\%$ do valor do segundo limite) quanto assumindo um desvio gaussiano. A Tabela 8 exibe o cálculo de primeira passagem do ciclo de Suzuki e os números de moléculas por minuto calculados para as reações SM1-4.

Tabela 8: Cálculo do tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($\frac{1}{SM-TOF}$) e número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } \frac{1}{SM-TOF}$) para as quatro reações (SM1-4).

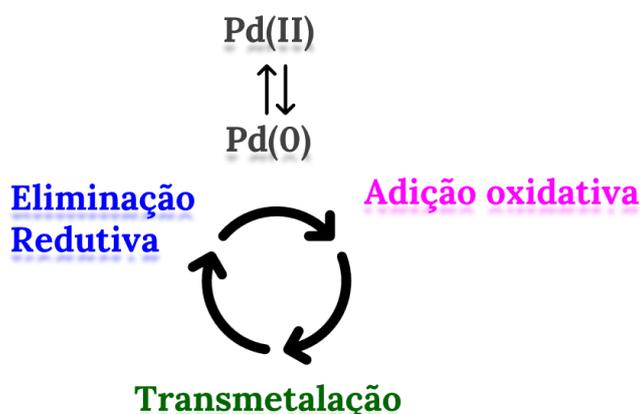
Reação	Uniforme (moléculas/min)	Gaussiano (moléculas/min)
SM1:	$\frac{1}{0,47} = 2,13 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,13} = 28$	$\frac{1}{0,53} = 1,89 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,89} = 32$
SM2:	$\frac{1}{0,35} = 2,86 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,86} = 21$	$\frac{1}{0,47} = 2,13 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,13} = 28$
SM3:	$\frac{1}{0,42} = 2,38 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,38} = 25$	$\frac{1}{0,46} = 2,17 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,17} = 28$
SM4:	$\frac{1}{0,40} = 2,50 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,50} = 24$	$\frac{1}{0,46} = 2,17 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,17} = 28$

Nota-se que para diversas reações tem-se valores coerentes (seja na análise com flutuação do limite por distribuição uniforme ou por gaussiana). Além disso, os valores

obtidos são consistentes com os valores reportados na literatura em reações de acoplamento cruzado usando técnicas macroscópicas de cinética química determinística tradicional.¹⁰¹⁻¹⁰³

Por outro lado, a fim de calcular a taxa efetiva do ciclo, foi necessário descontar os tempos mortos do catalisador, nos quais ele supostamente passa para o estado Pd(II) (pré-catalisador) sem estar complexado com nenhum dos reagentes. Para reentrar no ciclo, o catalisador deve ser primeiramente reduzido a Pd(0), formando a espécie ativa, e então reiniciar a reação de acoplamento cruzado de Suzuki, como ilustrado no Esquema 15.

Esquema 15: Modelo cíclico simplificado da reação de Suzuki-Miyaura.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Para realizar esse cálculo, foram utilizados os dados destacados em laranja da Tabela 6 e Tabela 7. A análise foi conduzida considerando tanto a flutuação do limite por distribuição uniforme quanto por gaussiana. Os resultados correspondentes à taxa efetiva do ciclo, descontando-se os tempos “mortos” do catalisador, estão apresentados na Tabela 9. Esses valores destacam a importância de levar em consideração os tempos reais de inatividade do catalisador (Pd(II)), pois sem isso mais moléculas de produto seriam formadas, em teoria. A taxa de formação real está diretamente associada às características fundamentais do catalisador durante o ciclo catalítico.

Tabela 9: Cálculo da taxa efetiva do ciclo. Primeiramente foi obtido o tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($\frac{1}{SM-TOF}$) e em seguida o número de moléculas / minuto (60 / resultado de $\frac{1}{SM-TOF}$) para as quatro reações (SM1-4).

Reação	Uniforme (moléculas/min)	Gaussiano (moléculas/min)
SM1:	$\frac{1}{0,67} = 1,49 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,49} = 40$	$\frac{1}{0,80} = 1,25 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,89} = 48$

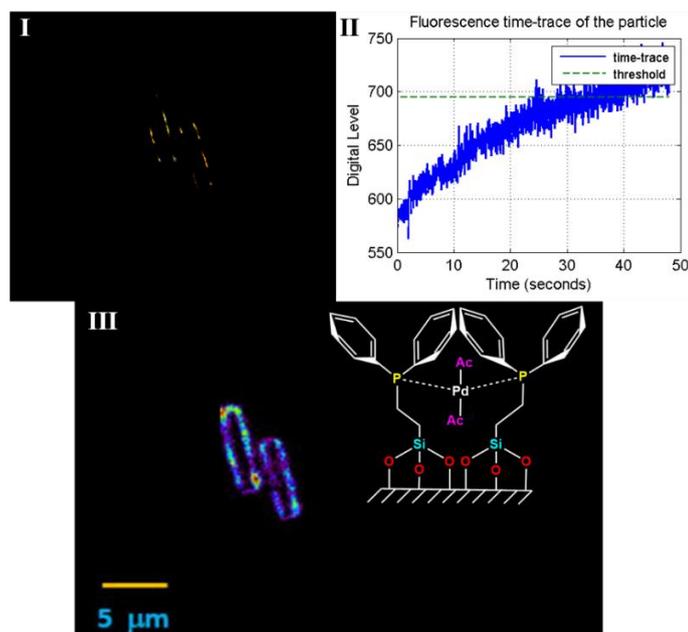
SM2:	$\frac{1}{0,44} = 2,27 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,27} = 26$	$\frac{1}{0,74} = 1,35 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,35} = 44$
SM3:	$\frac{1}{0,57} = 1,75 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,75} = 34$	$\frac{1}{0,71} = 1,41 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,41} = 43$
SM4:	$\frac{1}{0,48} = 2,08 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{2,08} = 29$	$\frac{1}{0,63} = 1,59 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,59} = 38$

b) Localização do catalisador Pd(0) pelo uso de um silano modificado contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0)

Para os próximos estudos de molécula única, foram conduzidos diversos testes em solução utilizando diferentes sistemas e silanos. Em todos os casos, optou-se por utilizar um silano modificado contendo um ligante ativo para Pd(II)/Pd(0). A escolha de não utilizar uma base durante os experimentos foi feita com o intuito de evitar danos à superfície das lamínulas. Vale destacar que a própria superfície das lamínulas oferece sítios básicos que favorecem a ocorrência das reações.

O primeiro sistema avaliado foi um silano-fosfina utilizado para marcar microzeólitas e realizar a reação SM1. A Figura 25 apresenta uma imagem de alta resolução, um histograma temporal de contagem e a estrutura do complexo de paládio com fosfina ancorado na microzeólita.

Figura 25: I) Imagem de alta resolução, II) histograma temporal de contagem III) estrutura do complexo de Pd com fosfina ancorado na microzeólita. Experimento feito para a reação SM1.



Fonte: Imagem de autoria própria.

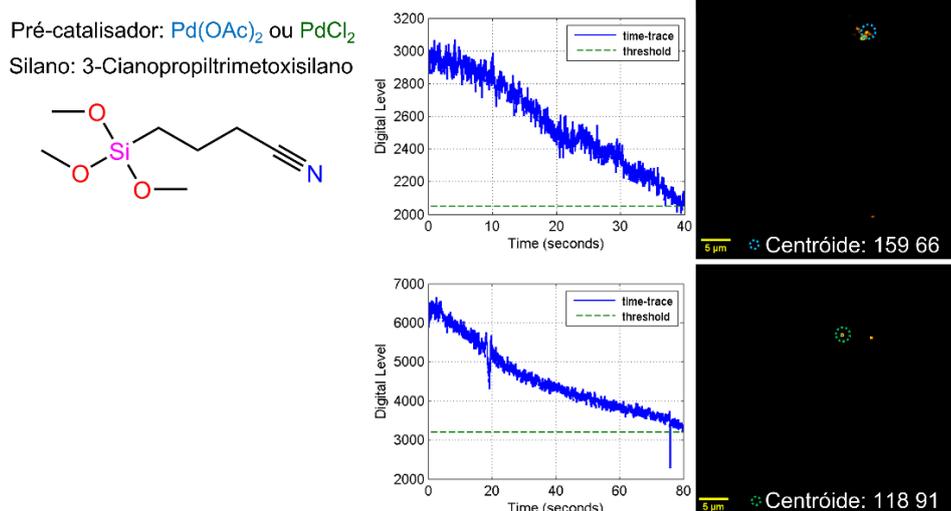
No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios devido à distribuição inadequada do silano e do pré-catalisador de Pd(II) nas microzeólitas, resultando na

formação de agregados nanoscópicos, mesmo quando utilizado em baixas concentrações e com diferentes tempos de exposição ao reagente. Quando muitas moléculas emitem simultaneamente, é impossível distinguir os emissores individuais devido a sobreposição dos pontos limitados pela difração. Como consequência, ao filmar os sistemas em TIRF, foram observados centros contendo um grande número de átomos de Pd associados, o que comprometia a reatividade nos limites discretos da catálise de molécula única, conforme evidenciado pelo histograma de contagem da Figura 25. Esses agregados reativos se manifestavam como centros altamente brilhantes, levando à formação de múltiplas moléculas de produto por unidade de tempo. Embora esses resultados sejam interessantes, não permitem a utilização da análise de séries temporais com formação discreta de produto para calcular a reatividade catalítica de molécula única (*single molecule turnover frequency*, SM-TOF).

Uma complicação adicional encontrada ao utilizar esse silano foi a ocorrência de fluorescência quando ele foi excitado pelo *laser* de 473 nm. Esse fenômeno foi observado ao analisar as microzeólitas silanadas, mesmo na ausência dos reagentes da reação. Essa fluorescência indesejada representa um problema significativo, pois pode mascarar os resultados reais relacionados à detecção de molécula única. Isso significa que a presença da fluorescência pode interferir na correta interpretação dos dados, dificultando a análise e a obtenção de informações precisas sobre a reatividade em nível molecular.

Foi realizado um teste com outro silano em solução, o 3-Cianopropiltrimetoxisilano para marcar a superfície. Nesse teste, foram utilizados Pd(OAc)₂ ou PdCl₂ como pré-catalisadores. Na Figura 26, é possível visualizar uma imagem de alta resolução, um histograma temporal de contagem e a estrutura do silano em questão. Esses testes foram conduzidos especificamente para a reação SM1, buscando obter resultados mais favoráveis.

Figura 26: Imagem de alta resolução, histograma temporal de contagem e a estrutura do 3-Cianopropiltrimetoxisilano.

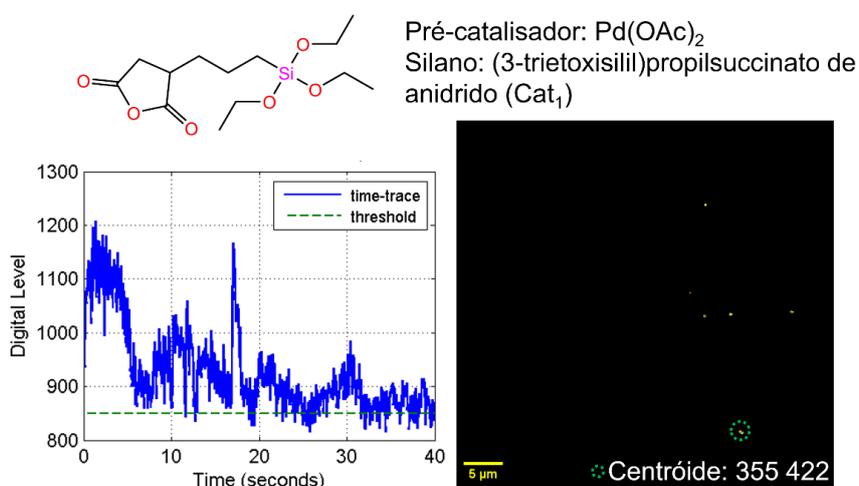


Fonte: Imagem de autoria própria.

A partir da análise da Figura 26, é possível observar, por meio da imagem de alta resolução, a formação de agregados localizados em microrregiões da lamínula de vidro. Além disso, ao analisar os histogramas de contagem, nota-se que o comportamento da série temporal revela a presença de centros altamente reativos que não podem ser adequadamente utilizados para o cálculo do SM-TOF.

O último silano testado em solução para experimentos a nível de molécula única foi o (3-trietoxissilil)propilsuccinato de anidrido (Cat_1) com $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ como pré-catalisador. Na Figura 27, é apresentada uma imagem de alta resolução, um histograma de contagem e a estrutura do silano mencionado. Esse teste também foi realizado para reação SM1, revelando o mesmo efeito de formação de agregados reativos.

Figura 27: Imagem de alta resolução, histograma temporal de contagem e a estrutura do (3-trietoxissilil)propilsuccinato de anidrido.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Na primeira tentativa de utilizar o vapor do silano em conjunto com $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, ocorreu a formação de partículas reativas, como pode ser observado na imagem de super resolução da Figura 28, que destaca a natureza esférica de uma partícula capturada em diferentes planos focais.

Figura 28: Imagem de alta resolução que destaca a natureza esférica de uma partícula capturada em diferentes planos focais.



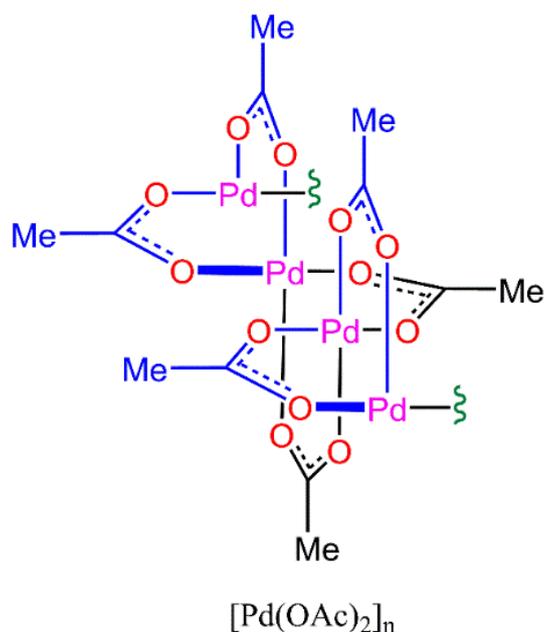
Fonte: Imagem de autoria própria.

Nesta nova sistemática de deposição/silanação por vapor, com o andamento da reação observada por microscopia de campo largo em TIRF, foi notado que rapidamente o sistema envolvia a formação de agregados altamente reativos indicando uma provável nucleação de $\text{Pd}(0)$ em nanopartículas altamente reativas. Isto indicava que o sistema não era estável em manter núcleos de $\text{Pd}(\text{II})/\text{Pd}(0)$ isolados em regime dinâmico de interconversão necessários para um ciclo em SM.

Após uma revisão dos procedimentos adotados até então, verificou-se que a abordagem inicial consistia no uso de uma solução original e filtrada de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ como precursor do catalisador. Essa solução, em baixa concentração era usada para mergulhar as lamínulas silanadas por meio da técnica de vapor à pressão reduzida. Ao que tudo indica, as soluções estoque contendo acetato de $\text{Pd}(\text{II})$ utilizadas possuíam uma quantidade considerável de partículas nucleadas de $\text{Pd}(0)$, altamente catalíticas, o que explica os resultados insatisfatórios anteriormente obtidos.

O $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ pode apresentar uma tendência para a formação de partículas devido às interações entre as moléculas e à sua estrutura molecular. Esse composto de coordenação contém o íon paládio (II) central ligado a ligantes acetato. A presença dos ligantes acetato, que possuem grupos carboxilato, pode facilitar as interações entre as moléculas de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, resultando na agregação e formação de partículas. Essas interações ocorrem entre os ligantes acetato dos complexos de paládio, promovendo a união das moléculas e a formação de partículas maiores, como ilustrado na Figura 29.¹⁰⁴

Figura 29: Estrutura do $[\text{Pd}(\text{OAc})_2]_n$.



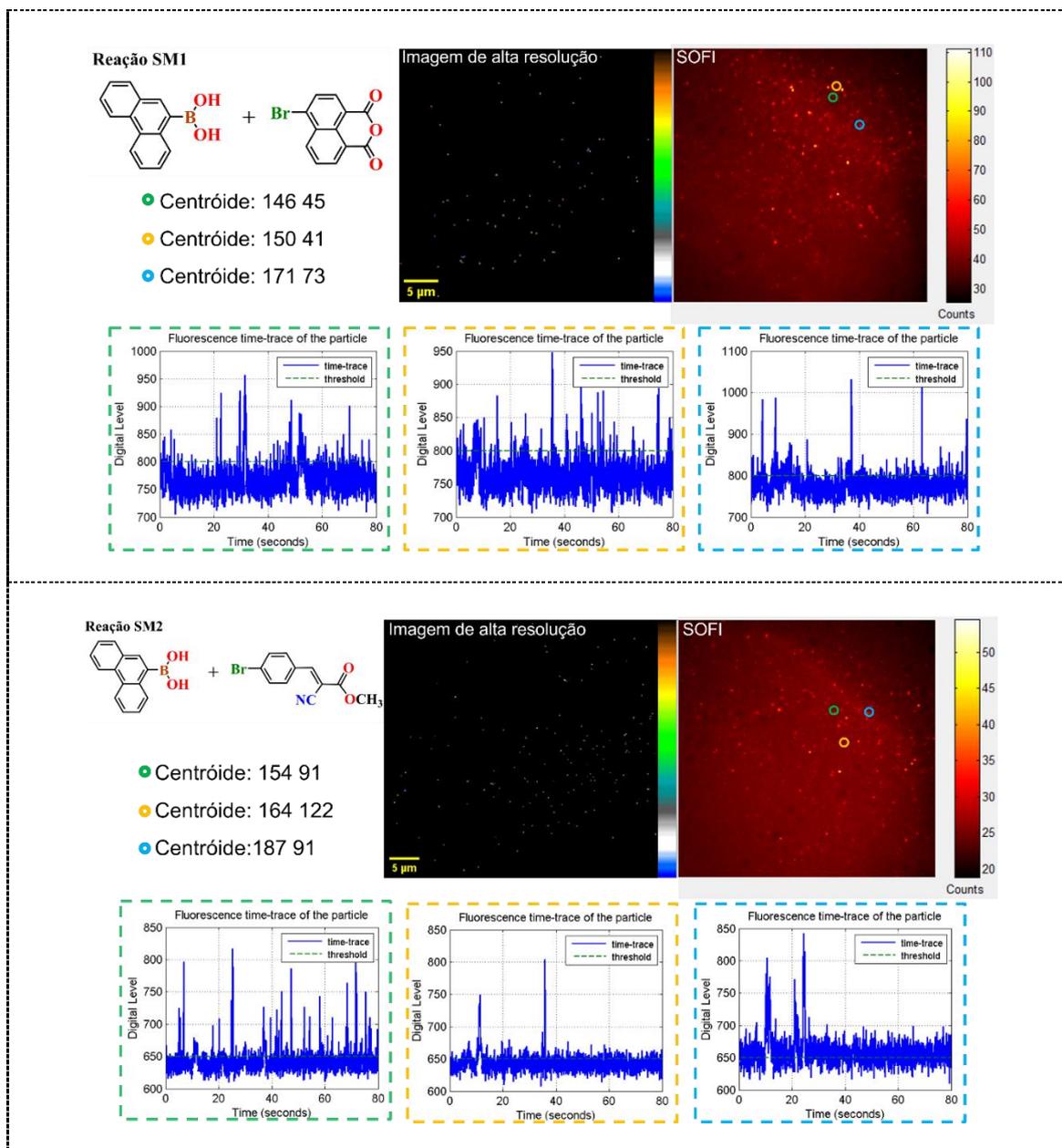
Fonte: Imagem adaptada da referência ¹⁰⁴. Número da licença - 5592080908964.

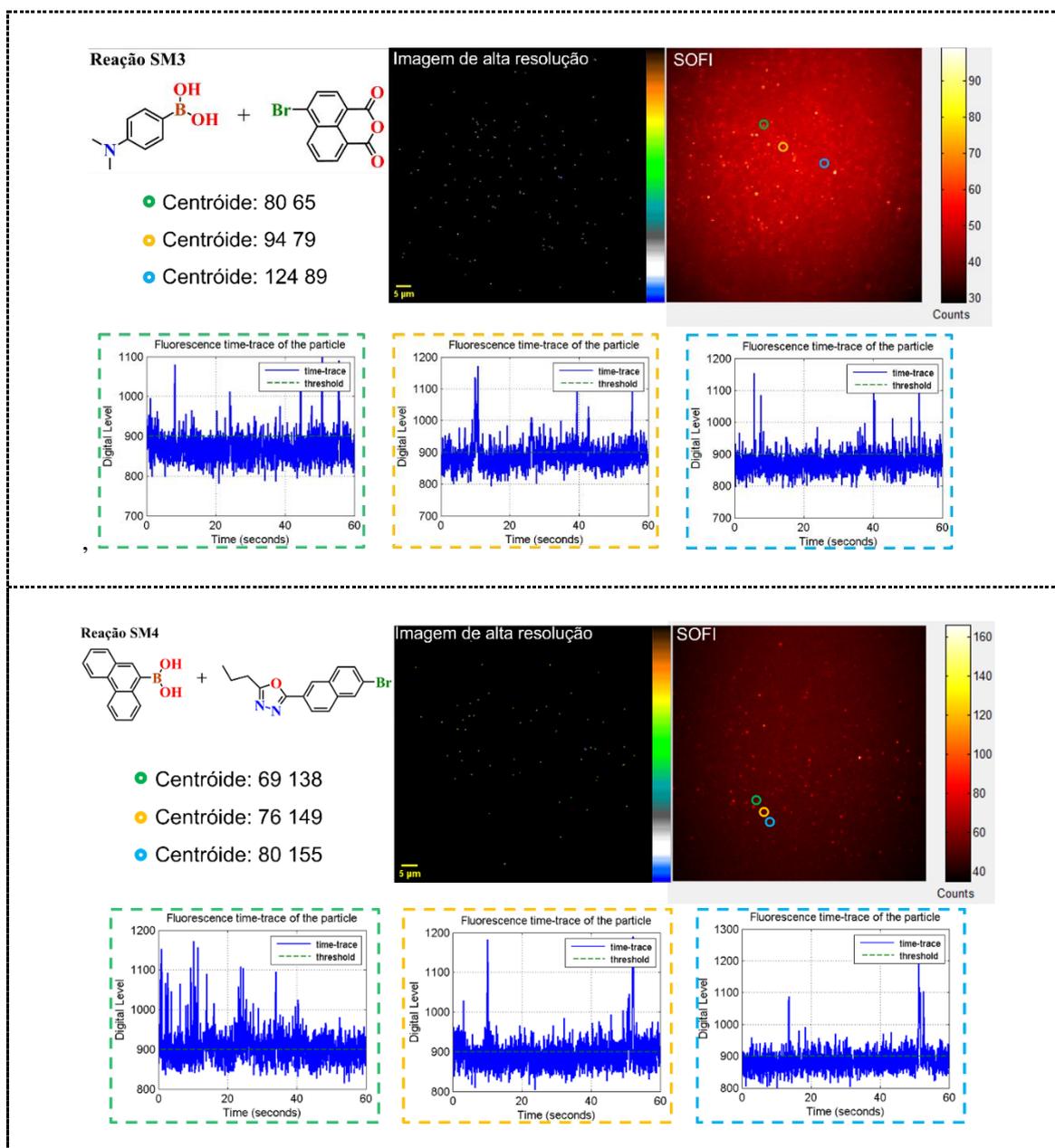
Além disso, a presença de solventes ou outros íons na solução também pode desempenhar um papel na formação de partículas. Interações solvente-soluto e interações íon-ligante podem influenciar a estabilidade das espécies de paládio presentes na solução e favorecer a aglomeração e precipitação de partículas. Portanto, possivelmente a formação de partículas pode ser atribuída a uma interação entre o silano e o $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ favorecendo a agregação, já que esse fenômeno não foi observado utilizando esse composto adsorvido sobre centros Si-O^- naturais da superfície das lamínulas.

Após análise desses fatos, decidiu-se realizar uma modificação no procedimento, adotando uma solução aquosa diluída e recém-preparada de PdCl_2 em meio ácido, contendo a forma oxidada do catalisador. Ao implementar essa nova estratégia, foi possível visualizar e registrar, por meio de observação direta e filmagem, diversos centros reativos nanoscópicos com comportamento de molécula única. Essa característica foi evidenciada pela presença de séries temporais discretas, que se assemelham aos resultados obtidos com a adsorção de $\text{Pd}(\text{II})$ em centros Si-O^- . As imagens de alta resolução, imagens SOFI e três histogramas temporais de contagem para as quatro reações, utilizando a metodologia de localização do catalisador $\text{Pd}(0)$ pelo uso de um silano modificado contendo ligante ativo para $\text{Pd}(\text{II})/\text{Pd}(0)$, podem ser observados na Figura 30.

Figura 30: Imagens de alta resolução, imagens SOFI e três histogramas temporais de contagem para as reações SM1-4, obtidas utilizando a metodologia de

localização do catalisador Pd(0) pelo uso de um silano (Cat₁) modificado contendo ligante ativo para Pd(II)/Pd(0).





Fonte: Imagem de autoria própria.

A análise foi realizada em centenas de centroides em diferentes filmes, assim como feito pela adsorção de Pd(II) em centros Si-O⁻, e suas séries temporais foram analisadas. Observa-se que novamente ocorre variação nos saltos de intensidade e no número de eventos SM, justamente pelo uso de um mesmo detector e mesmas reações. Os resultados das reações SM1-4 podem ser observados na Tabela 10 e Tabela 11. A análise também foi feita para um limite flutuante de distribuição uniforme e assumindo um desvio gaussiano.

Tabela 10: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM1 e SM2. Para a primeira reação foram analisados 165 centros ativos e para a segunda 160.

PROGRAM rate_SM_on/off	SM1				SM2			
	Uniforme		Gaussiana		Uniforme		Gaussiana	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Average count	809	34	809	34	654	10	654	10
First threshold	865	36	865	36	705	10	705	10
Second threshold	880	38	880	38	708	21	708	21
Total number of SM transitions	65	22	81	22	47	40	90	56
Experimental time (s)	80	-	80	-	80	-	80	-
Average SM rate (s ⁻¹)	0,81	0,28	1,02	0,27	0,59	0,49	1,12	0,70
Average off time (unit)	28,42	11,20	23,53	7,76	28,63	18,93	24,07	12,50
Average off time (s)	1,14	0,45	0,94	0,31	1,15	0,76	0,96	0,50
Average on time (unit)	1,68	0,56	1,54	0,43	2,22	4,16	1,67	2,41
Average on time (s)	0,07	0,02	0,06	0,02	0,09	0,17	0,07	0,10
Threshold off units for isolated spike	57	22	47	16	57	38	48	25
Number of spikes found	5	2	6	2	4	3	7	4
Effective cycle SM rate (s ⁻¹)	1,36	0,64	1,71	0,59	0,80	0,79	1,68	1,03
Desorption constant	10	6	11	7	10	7	12	11

Tabela 11: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM3 e SM4. Para a terceira reação foram analisados 159 centros ativos e para a quarta 149.

PROGRAM rate_SM_on/off	SM3				SM4			
	Uniforme		Gaussiana		Uniforme		Gaussiana	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Average count	920	47	920	47	927	43	927	43
First threshold	981	49	981	49	988	45	988	45
Second threshold	999	51	999	51	1010	50	1010	50
Total number of SM transitions	73	26	85	29	60	28	70	29
Experimental time (s)	60	-	60	-	60	-	60	-
Average SM rate (s ⁻¹)	1,21	0,43	1,42	0,48	1,00	0,47	1,17	0,49
Average off time (unit)	24,51	9,24	22,49	8,59	27,63	13,67	26,49	12,29
Average off time (s)	0,74	0,28	0,68	0,26	0,84	0,41	0,80	0,37

Average on time (unit)	1,76	1,04	1,65	0,97	1,97	1,16	1,85	1,23
Average on time (s)	0,05	0,03	0,05	0,03	0,06	0,04	0,06	0,04
Threshold off units for isolated spike	49	18	45	17	55	27	53	25
Number of spikes found	6	2	6	2	5	2	5	2
Effective cycle SM rate (s ⁻¹)	2,01	0,94	2,38	0,93	1,56	0,92	1,92	0,98
Desorption constant	11	6	12	7	10	5	11	6

Com base nos dados obtidos e analisados, também foram calculados o tempo médio de primeira passagem do ciclo e o número de moléculas de produto formadas por minuto por um único catalisador Pd(0), utilizando a taxa média SM-TOF destacada em azul na Tabela 10 e Tabela 11. A Tabela 12 exibe o cálculo de primeira passagem do ciclo de Suzuki e os números de moléculas por minuto calculados para as reações SM1-4.

Tabela 12: Cálculo do tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($\frac{1}{SM-TOF}$) e número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } \frac{1}{SM-TOF}$) para as quatro reações (SM1-4).

Reação	Uniforme (moléculas/min)	Gaussiano (moléculas/min)
SM1:	$\frac{1}{0,81} = 1,23 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,23} = 49$	$\frac{1}{1,02} = 0,98 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,98} = 61$
SM2:	$\frac{1}{0,59} = 1,69 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,69} = 35$	$\frac{1}{1,12} = 0,89 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,89} = 67$
SM3:	$\frac{1}{1,21} = 0,83 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,83} = 73$	$\frac{1}{1,42} = 0,70 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,70} = 85$
SM4:	$\frac{1}{1,0} = 1,00 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{1,00} = 60$	$\frac{1}{1,17} = 0,85 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,85} = 70$

Os resultados das reações SM1-4 demonstraram novamente valores coerentes. Foi observado que os tempos médios para a primeira passagem do ciclo foram menores, resultando em uma maior produção de moléculas por minuto, em comparação com os resultados de adsorção de Pd(II) em centros Si-O⁻ (Tabela 8). Essa melhora na atividade catalítica das quatro reações pode ser atribuída a um menor impedimento estérico dos reagentes ao reagir com os catalisadores Pd(0), utilizando um silano modificado contendo um ligante ativo para Pd(II)/Pd(0), como pode ser visto no Esquema 14.

Além disso, após a hidrólise do anidrido proveniente do silano em meio ácido para gerar o diácido, que é um excelente complexante para Pd(II), ocorre uma maior estabilidade do catalisador quando está interagindo com o diácido formado. Isso

contribui para a melhora na eficiência catalítica do sistema, pois provavelmente o diácido atua como um estabilizador para o centro ativo formado. A Tabela 13 apresenta a relação entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando o silano modificado contendo um ligante ativo para Pd(II)/Pd(0) em comparação com a adsorção de Pd(II) em centros Si-O⁻.

Tabela 13: Razões entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando o silano modificado em comparação com a adsorção de Pd(II) em centros Si-O⁻.

Reação	Variação	Silano contendo Pd(II)/Pd(0)	Pd(II) adsorvido em SiO ⁻	Razão
		moléculas/minuto	moléculas/minuto	
SM1	Uniforme	49	28	1,75
	Gaussiano	61	32	1,91
SM2	Uniforme	35	21	1,67
	Gaussiano	67	28	2,39
SM3	Uniforme	73	25	2,92
	Gaussiano	85	28	3,04
SM4	Uniforme	60	24	2,50
	Gaussiano	70	28	2,50

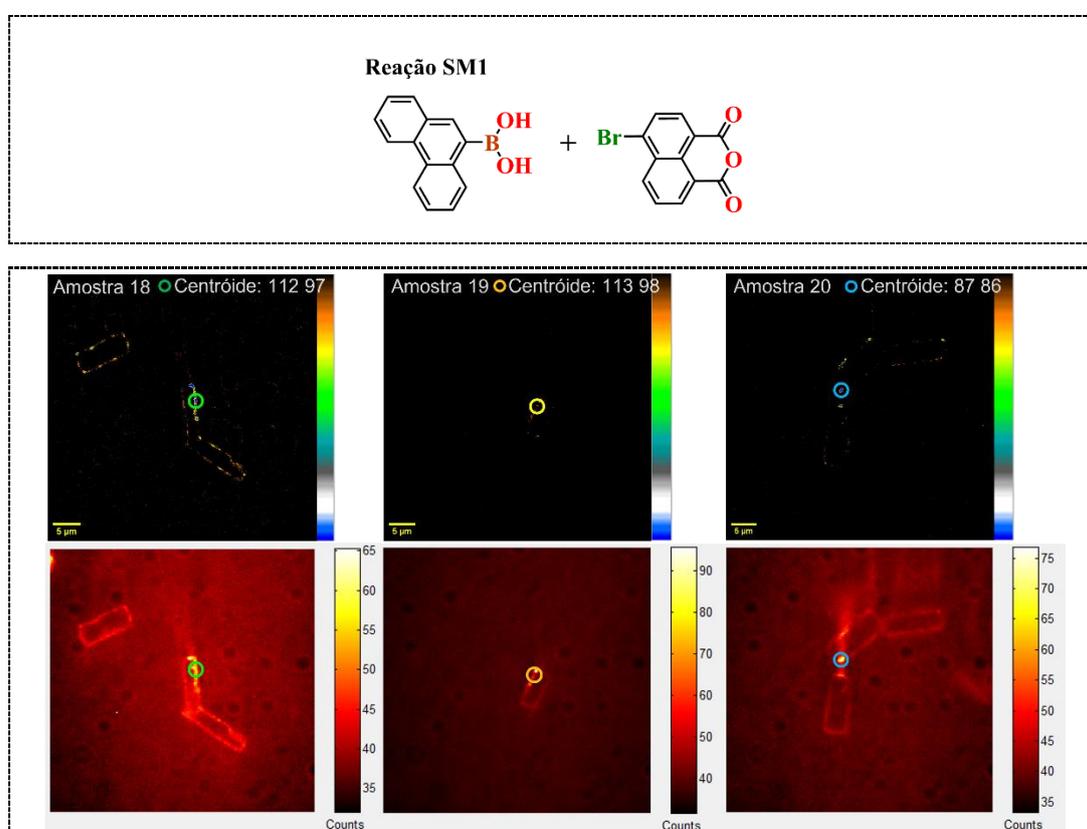
Ao analisar a Tabela 13, é possível observar que as razões entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando o silano modificado em comparação com a adsorção de Pd(II) em centros Si-O⁻ variam de 1,67 a 3,04. Esses resultados indicam que o uso do silano modificado, com o ligante ativo para Pd(II)/Pd(0), resulta em um aumento significativo na produção de moléculas em todas as reações. Esses resultados reforçam que o uso de catalisadores adequados e estrategicamente modificados podem otimizar reações químicas e aumentar a produção de moléculas desejadas em um mesmo intervalo de tempo.

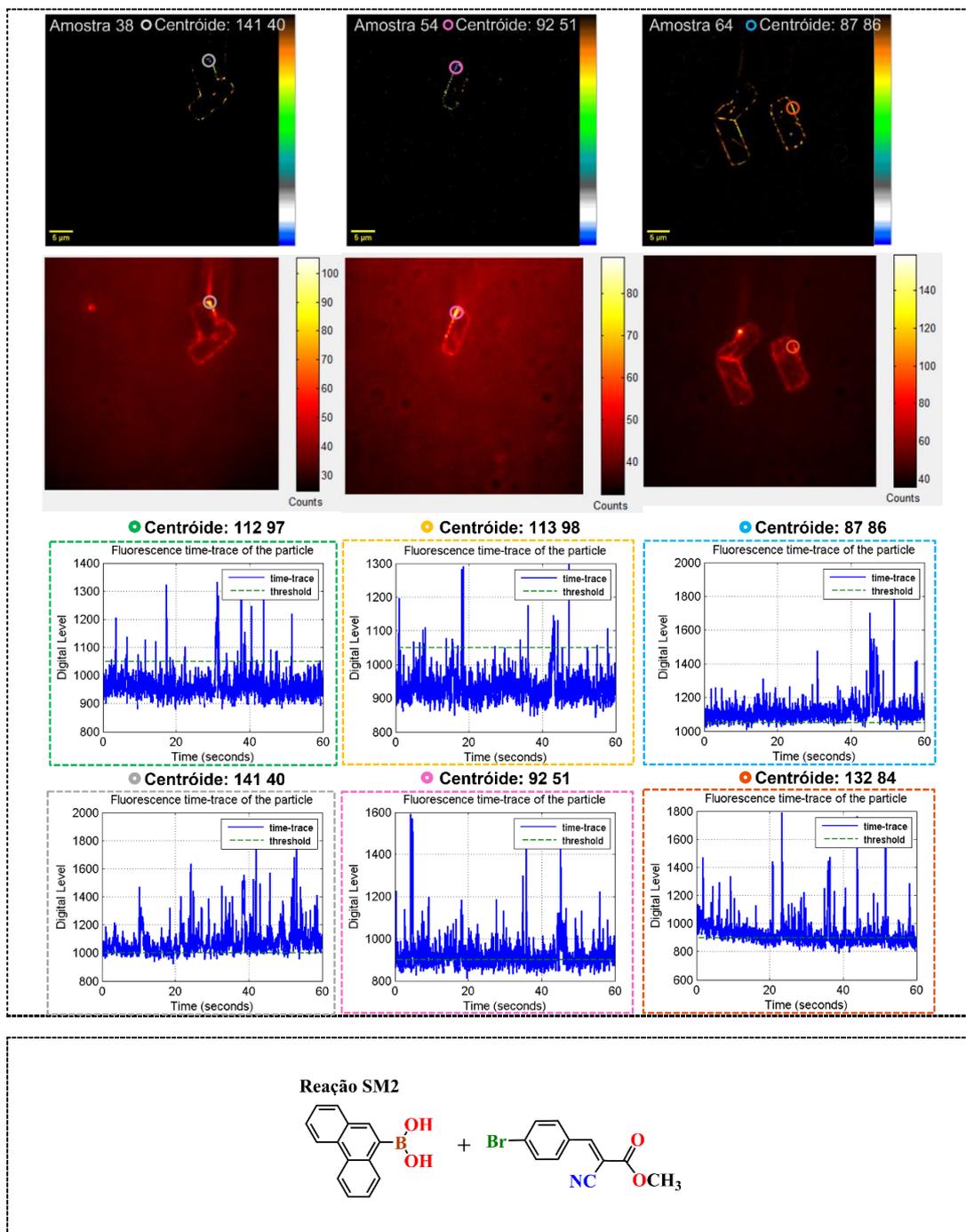
c) **Microzeólitas como template reacional silanadas e ativadas por Pd(II)**

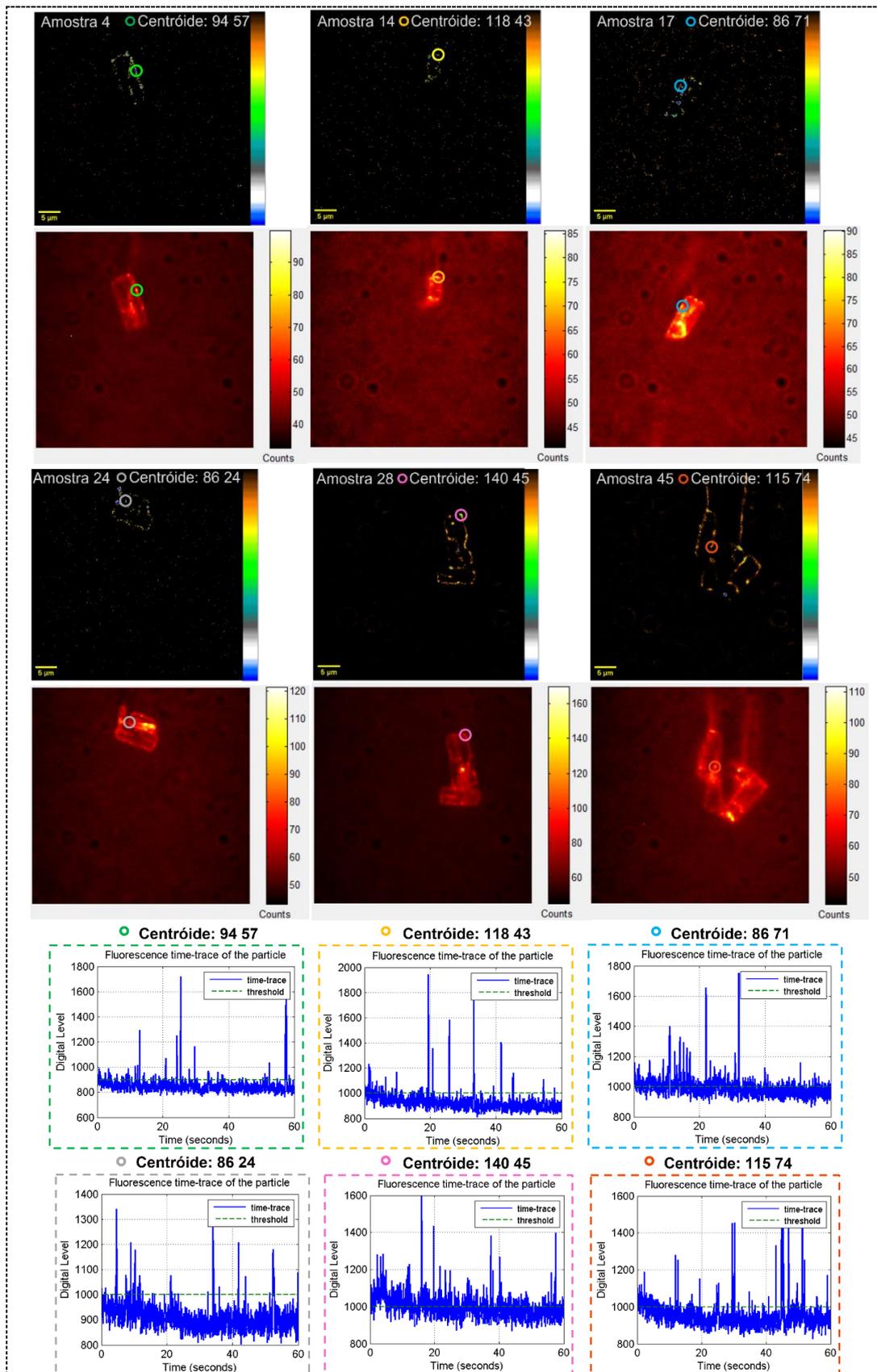
Ao utilizar um silano modificado contendo um ligante ativo para Pd(II)/Pd(0) na superfície, foi possível aumentar a eficiência catalítica das reações SM1-4. Com o objetivo de aprimorar ainda mais essa eficiência, adotou-se um template reacional composto por microzeólitas modificadas, onde o mesmo silano (Cat₁) com o ligante ativo (PdCl₂) foi empregado. A utilização das microzeólitas modificadas permitiu a realização da silanação e ativação por Pd(II) em solução, sem a formação de agregados indesejados. Além disso, o uso de baixas concentrações favoreceu a marcação e a formação discreta do produto, viabilizando a avaliação da reatividade catalítica em nível de molécula única para as reações SM1-4.

Essa abordagem possibilitou uma análise mais precisa da eficiência catalítica, permitindo a quantificação da atividade reacional de forma individualizada para cada centro ativo. As 6 imagens de alta resolução, 6 imagens SOFI e 6 histogramas temporais de contagem para cada uma das quatro reações, utilizando microzeólitas modificadas como template podem ser observados na Figura 31.

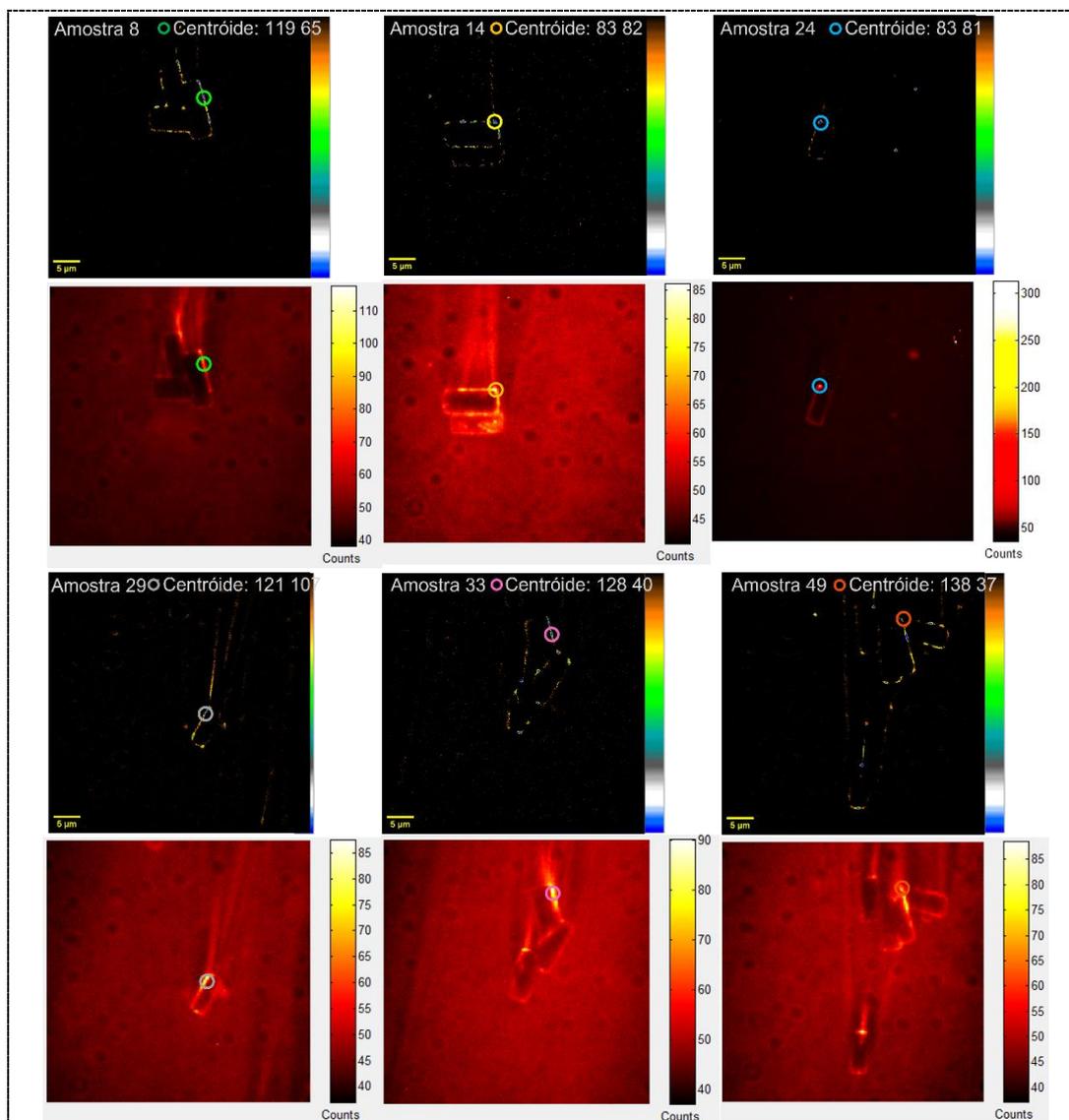
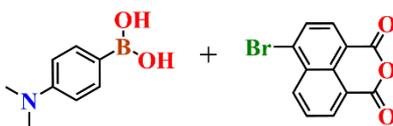
Figura 31: Imagens de alta resolução, imagens SOFI e histogramas temporais de contagem para as quatro reações (SM1-4), utilizando microzeólitas como template reacional silanadas e ativadas por Pd(II). Cada centro ativo, representado por um círculo marcado, corresponde a um histograma de contagem com a mesma coloração envolvendo-o.

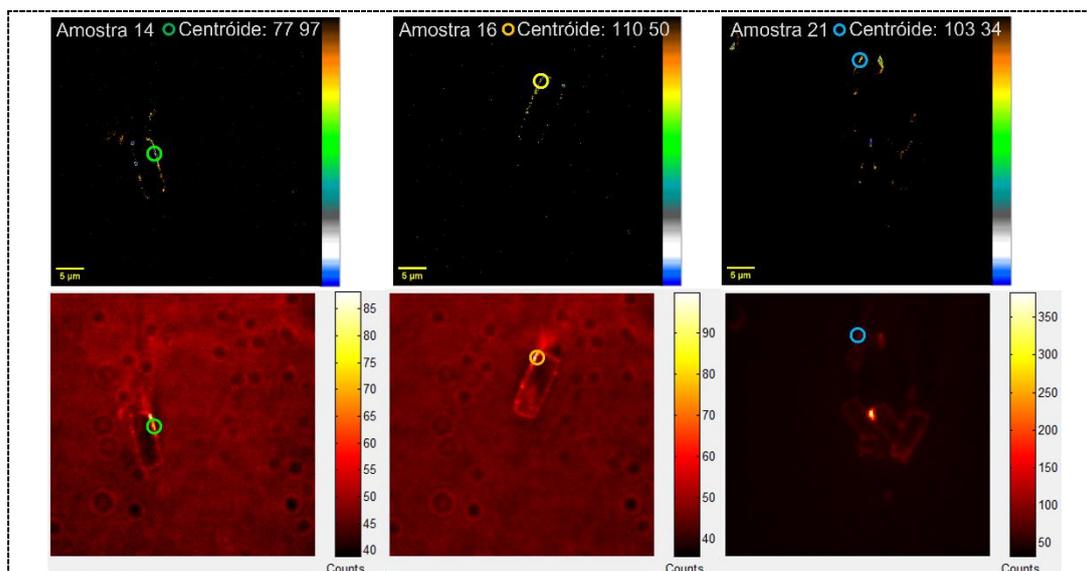
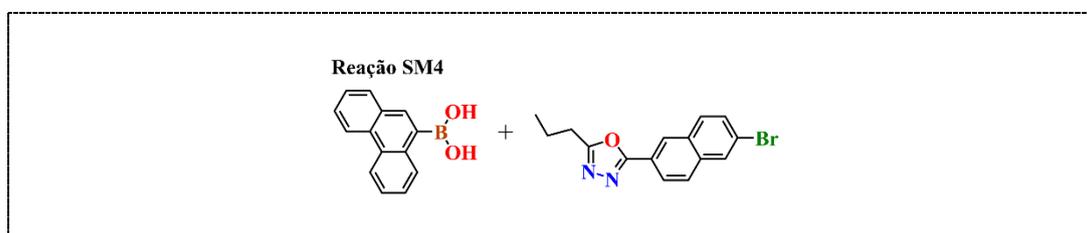
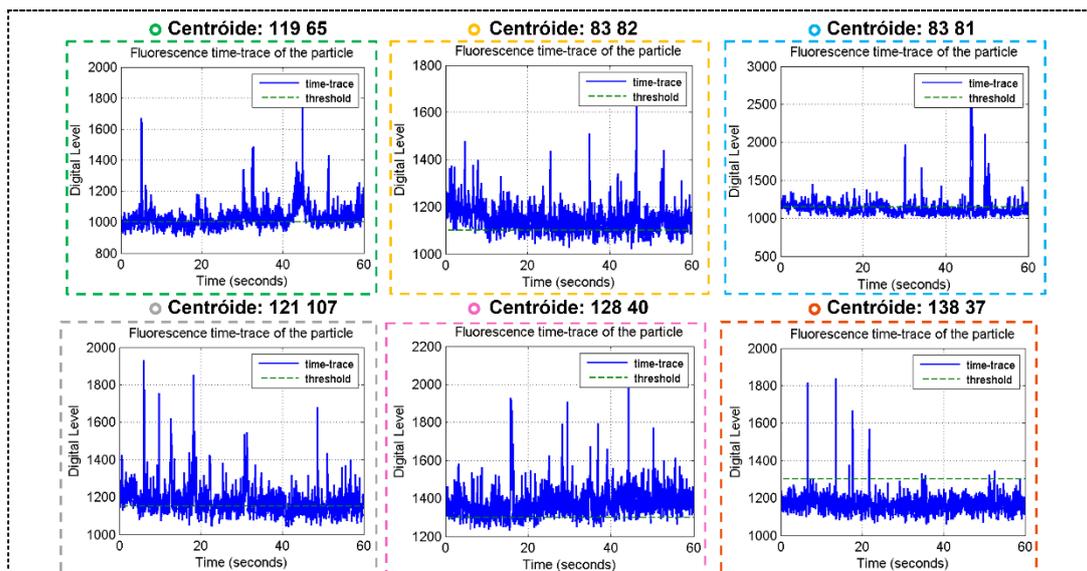


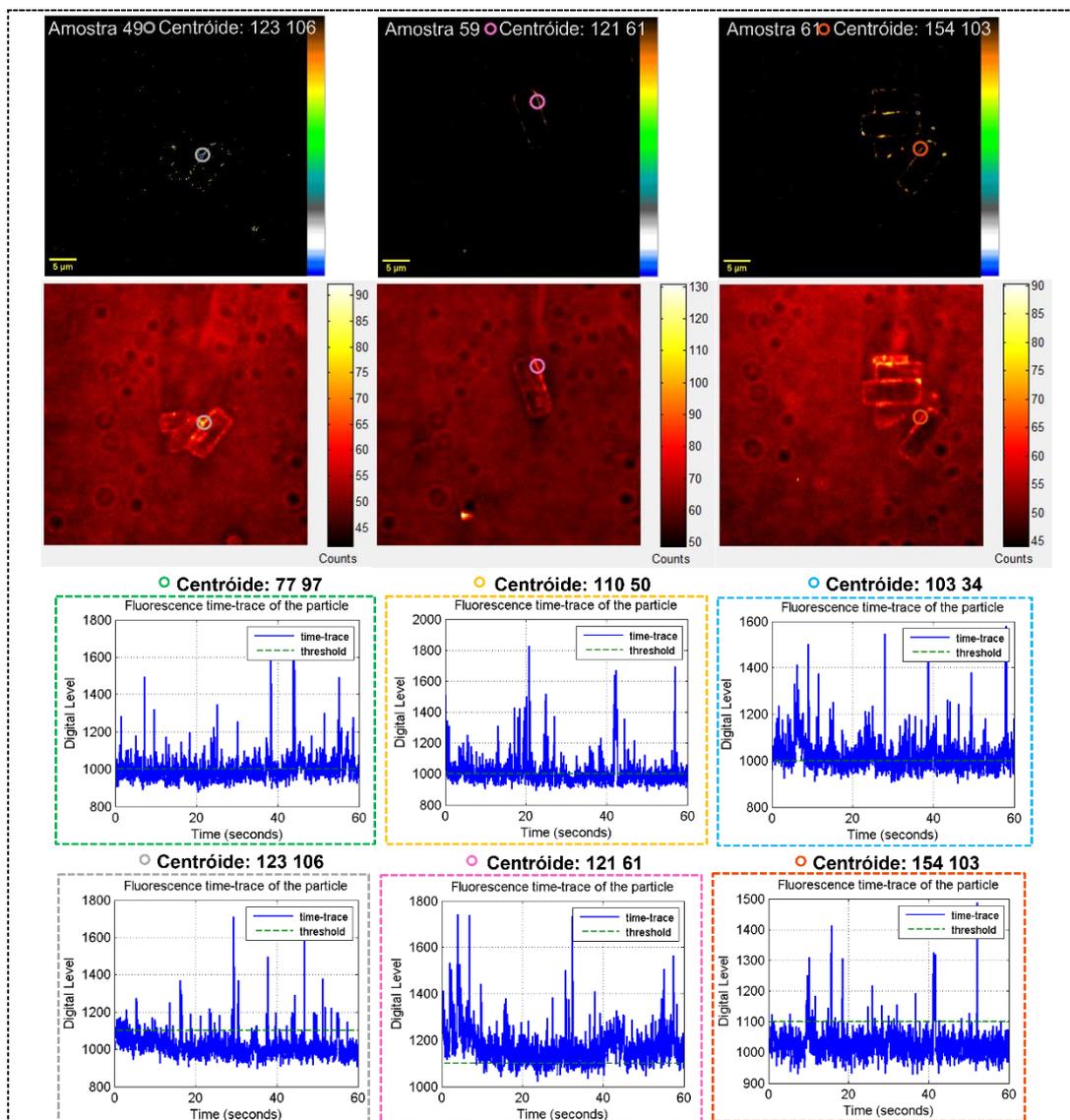




Reação SM3







Fonte: Imagem de autoria própria.

A análise foi conduzida em centenas de centroides localizados nas microzeólitas modificadas em diferentes filmes, seguindo a mesma abordagem utilizada para a adsorção de Pd(II) em centros Si-O⁻ e o uso do silano modificado com ligante ativo na superfície. As imagens de alta resolução e as imagens SOFI apresentadas na Figura 31 revelam uma distribuição discreta de centros ativos ao longo da superfície das microzeólitas. Essa distribuição é confirmada pela observação da fluorescência proveniente da formação do produto, que é visualizada em algumas regiões da borda das microzeólitas, mas não no centro, conforme observado nas imagens de alta resolução. Essa observação sugere que a modificação ocorre principalmente na parte externa das microzeólitas. Estudos indicam que a formação de cristais de microzeólitas é um processo complexo que pode resultar em defeitos em sua estrutura. Esses defeitos

podem ajudar a expor mais poros e sítios ativos, o que explicaria a alta atividade catalítica observada nas bordas.¹⁰⁵ Além disso, as microzeólitas não apresentam diâmetro dos poros suficientemente grandes para acomodar os sítios catalíticos e os reagentes, contribuindo para a atividade catalítica observada na superfície dessas partículas.

A fluorescência revela visualmente a forma cilíndrica característica dessas partículas de microzeólitas. Através da emissão de fluorescência, é possível observar diretamente a morfologia cilíndrica dessas partículas, adicionando um elemento visual e morfológico ao estudo das microzeólitas.

Os histogramas de contagem (Figura 31) foram analisados, revelando uma variação significativa nos perfis de intermitência, assim como nas outras metodologias empregadas no estudo. Essa variação é responsável pelo alto desvio padrão observado nas taxas de reação (SM-TOF). Sendo isso coerente com os resultados das metodologias anteriores, indicando que cada centro ativo não segue um padrão de atividade predefinido. Os resultados da análise dos histogramas de contagem das reações SM1-4, empregando microzeólitas como templates, estão apresentados na Tabela 14 e Tabela 15. Além disso, a análise considerou um limite flutuante de distribuição uniforme, bem como um desvio gaussiano.

Tabela 14: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM1 e SM2. Para a primeira reação foram analisados 187 centros ativos e para a segunda 139.

PROGRAM rate_SM_on/off	SM1				SM2			
	Uniforme		Gaussiana		Uniforme		Gaussiana	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Average count	983	95	983	95	952	50	952	50
First threshold	1045	98	1045	98	1014	52	1014	52
Second threshold	1076	104	1076	104	1039	53	1039	53
Total number of SM transitions	78	22	83	22	92	27	98	27
Experimental time (s)	60	-	60	-	60	-	60	-
Average SM rate (s ⁻¹)	1,30	0,37	1,38	0,37	1,53	0,45	1,64	0,46
Average off time (unit)	23,32	7,01	22,38	6,74	18,60	7,11	18,27	6,49
Average off time (s)	0,71	0,21	0,68	0,20	0,56	0,22	0,55	0,20
Average on time (unit)	1,70	0,42	1,65	0,39	1,63	0,43	1,60	0,39
Average on time	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01

(s)								
Threshold off units for isolated spike	47	14	45	13	37	14	36	13
Number of spikes found	6	2	6	2	7	2	7	2
Effective cycle SM rate (s ⁻¹)	2,24	0,83	2,37	0,77	2,66	1,04	2,94	1,01
Desorption constant	9	4	10	5	10	7	10	4

Tabela 15: Resultados médios das análises de intermitência das séries temporais das reações SM3 e SM4. Para a terceira reação foram analisados 136 centros ativos e para a quarta 158.

PROGRAM rate_SM_on/off	SM3				SM4			
	Uniforme		Gaussiana		Uniforme		Gaussiana	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Average count	1134	100	1134	100	1038	73	1038	73
First threshold	1201	103	1201	103	1103	75	1103	75
Second threshold	1229	103	1229	103	1131	79	1131	79
Total number of SM transitions	105	24	105	22	87	22	92	22
Experimental time (s)	60	-	60	-	60	-	60	-
Average SM rate (s ⁻¹)	1,75	0,40	1,76	0,37	1,45	0,37	1,53	0,37
Average off time (unit)	17,54	4,34	17,53	4,23	20,51	5,49	19,92	5,57
Average off time (s)	0,53	0,13	0,53	0,13	0,62	0,17	0,60	0,17
Average on time (unit)	1,52	0,26	1,51	0,26	1,60	0,36	1,58	0,37
Average on time (s)	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01
Threshold off units for isolated spike	35	9	35	8	41	11	40	11
Number of spikes found	8	2	8	2	7	2	7	2
Effective cycle SM rate (s ⁻¹)	3,09	0,82	3,07	0,79	2,60	0,90	2,72	0,88
Desorption constant	11	5	11	5	10	6	11	7

Os sistemas estudados utilizando microzeólitas em nível de molécula única também foram analisados quanto ao tempo médio de primeira passagem do ciclo e ao número de moléculas de produto formadas por minuto por um único sítio ativo de Pd(0). Esses cálculos foram realizados com base na taxa média SM-TOF, destacada em

azul na Tabela 14 e Tabela 15. Os resultados dos cálculos de primeira passagem do ciclo de Suzuki e dos números de moléculas por minuto produzidas para as reações SM1-4 estão apresentados na Tabela 16

Tabela 16: Cálculo do tempo médio de primeira passagem do ciclo de Suzuki ($\frac{1}{SM-TOF}$) e número de moléculas / minuto ($60 / \text{resultado de } \frac{1}{SM-TOF}$) para as quatro reações (SM1-4).

Reação	Uniforme	Gaussiano
SM1:	$\frac{1}{1,30} = 0,77 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,77} = 78 \text{ moléculas/s}$	$\frac{1}{1,38} = 0,72 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,72} = 83 \text{ moléculas/s}$
SM2:	$\frac{1}{1,53} = 0,65 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,65} = 92 \text{ moléculas/s}$	$\frac{1}{1,64} = 0,61 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,61} = 98 \text{ moléculas/s}$
SM3:	$\frac{1}{1,75} = 0,57 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,57} = 105 \text{ moléculas/s}$	$\frac{1}{1,76} = 0,57 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,57} = 105 \text{ moléculas/s}$
SM4:	$\frac{1}{1,45} = 0,70 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,70} = 87 \text{ moléculas/s}$	$\frac{1}{1,53} = 0,65 \text{ s} \rightarrow \frac{60}{0,65} = 92 \text{ moléculas/s}$

Os resultados das reações SM1-4 demonstraram uma consistência notável, revelando tempos médios para a primeira passagem do ciclo ainda menores em comparação com os obtidos usando silano modificado (conforme apresentado na Tabela 12). Essa redução nos tempos de reação resultou em uma produção ainda maior de moléculas por minuto. A melhora significativa na atividade catalítica dessas reações pode ser atribuída a um impedimento estérico ainda menor dos reagentes ao interagir com os catalisadores Pd(0) localizados nas microzeólitas. Essa diminuição do impedimento estérico ocorre devido aos sítios ativos estarem mais distantes da superfície das lamínulas, o que proporciona um maior acesso dos reagentes aos centros catalíticos. Essa observação é ilustrada no Esquema 14, onde é possível visualizar o acesso mais facilitado dos reagentes aos centros ativos dos catalisadores Pd(0) nas microzeólitas, em comparação com as metodologias anteriores.

Além disso, essa eficiência catalítica das reações SM1-4 ainda mais aprimorada pela utilização das microzeólitas como suporte reacional pode ser atribuída a outros fatores. Em primeiro lugar, a estrutura porosa das microzeólitas oferece uma área superficial que favorece a interação entre os reagentes e os catalisadores Pd(0), aumentando assim a taxa de reação. Em segundo, o ancoramento dos catalisadores Pd(0) nas microzeólitas impede sua aglomeração e dispersão, preservando sua atividade catalítica ao longo do tempo. Esse ancoramento também permite um acesso facilitado dos reagentes aos sítios ativos, direcionando eficientemente os reagentes para os catalisadores Pd(0) nas microzeólitas e aumentando a eficácia das reações. A Tabela 17

apresenta a relação entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando microzeólitas em comparação com silano modificado em superfície.

Tabela 17: Razões entre o número de moléculas formadas por minuto utilizando microzeólitas em comparação com silano em superfície.

Reação	Variação	Microzeólitas	Silano contendo Pd(II)/Pd(0)	Razão
		moléculas/minuto	moléculas/minuto	
SM1	Uniforme	78	49	1,59
	Gaussiano	83	61	1,36
SM2	Uniforme	92	35	2,63
	Gaussiano	98	67	1,46
SM3	Uniforme	105	73	1,44
	Gaussiano	105	85	1,24
SM4	Uniforme	87	60	1,45
	Gaussiano	92	70	1,31

Ao analisar os valores da Tabela 17 nota-se que a eficiência catalítica das reações foi melhorada significativamente com o uso das microzeólitas. Em todas as reações, a razão é maior do que 1, o que indica que a produção de moléculas por minuto foi maior com o emprego das microzeólitas em comparação com o silano modificado. Essa diferença pode ser atribuída as vantagens da utilização das microzeólitas mencionados anteriormente, como área superficial, ancoramento dos catalisadores Pd(0) e acesso dos reagentes aos sítios ativos.

Esses fatores combinados resultam em um aumento notável na taxa de reação e em uma melhoria geral na eficiência catalítica das reações SM1-4 em comparação com as outras duas metodologias estudadas. Os resultados apresentados ressaltam o potencial dessas partículas como ferramentas promissoras para otimizar processos catalíticos e facilitar reações químicas específicas. Essas evidencias têm implicações significativas na área de catálise no limite de molécula única e podem direcionar o desenvolvimento de novas estratégias catalíticas mais eficientes e seletivas na síntese de compostos.

4.3. Simulação de Séries Temporais de Intermitência

O simulador estocástico de séries temporais foi desenvolvido com a finalidade de testar a eficácia do programa de tratamento de séries temporais de intermitência utilizado para analisar histogramas de contagem experimentais. O objetivo foi avaliar se o programa é capaz de lidar adequadamente com a análise desses histogramas. O simulador foi projetado utilizando aproximações e simplificações do ciclo de reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura para formar uma molécula de produto fluorescente, conforme exemplificado no Esquema 15.

Uma das aproximações adotadas foi considerar que a conversão entre os estados do catalisador ativo Pd(0) e do catalisador não ativo Pd(II) segue um processo de dinâmica de Bernoulli, em que o estado ativo tem probabilidade p , enquanto o estado inativo tem probabilidade $1-p = q$. Essa relação estatística é descrita pela expressão $p/q = p/(1-p)$ no limite estatístico.

Outra aproximação utilizada foi considerar que a taxa de reação é determinada pela etapa de adição oxidativa, que é a etapa principal do ciclo (etapa lenta). Assim, a taxa de reação do processo é representada por uma constante única k_r (s^{-1}), considerando uma aproximação de pseudo-primeira ordem, já que os reagentes estão sempre em excesso e pode-se considerar que são pouco consumidos. Essa taxa de reação segue uma distribuição exponencial. Uma vez formada a molécula de produto fluorescente, ela pode sofrer dessorção com probabilidade p_d ou permanecer ligada/adsorvida próximo ao local de reação com probabilidade $1-p_d$, seguindo uma dinâmica de Bernoulli. O sinal de fundo foi modulado por um ruído branco gaussiano aditivo, e as intensidades de pico de fluorescência apresentaram flutuações devido à variação no rendimento quântico de fluorescência, quando calculado para uma única molécula isolada.

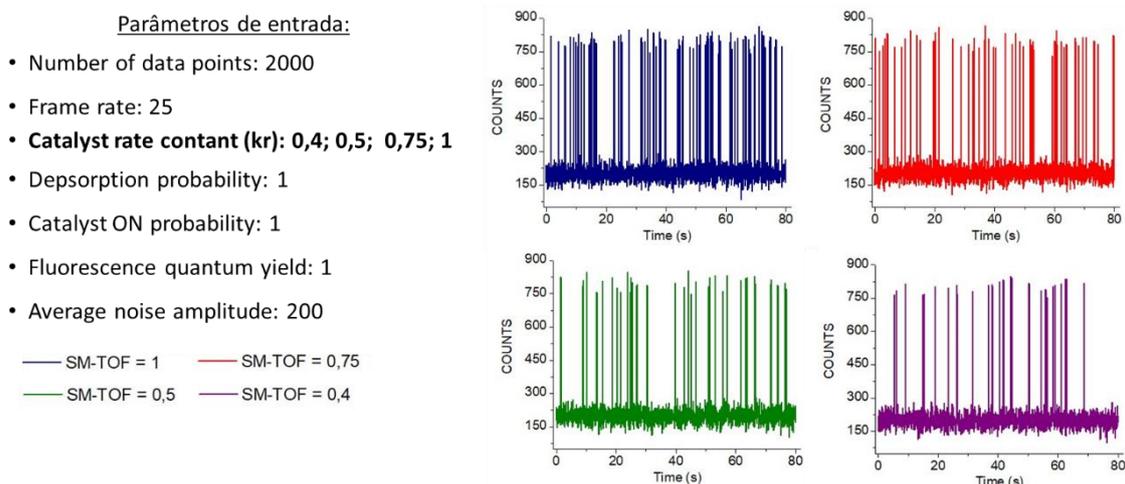
Embora a molécula fluorescente tenha a capacidade de se converter em estados não fluorescentes (estados escuros) por meio de cruzamento intersistemas, a frequência de Rabi nos seus estados excitados, como *singlete*, *triplet* e *singlete* fundamental, é muito maior do que a frequência de amostragem utilizada no experimento, que é de 20 Hz.

A frequência de Rabi é a taxa de oscilação entre os estados quânticos de uma molécula sob a influência de um campo eletromagnético. Para moléculas fluorescentes, ocorrem transições rápidas entre seus estados excitados devido à alta frequência de Rabi associada a esses estados. Ao utilizar uma frequência de amostragem menor que a frequência de Rabi, como 20 Hz, é possível capturar essas transições rápidas e registrar a fluorescência emitida pela molécula e sua dinâmica nos estados excitados. Essa abordagem permite estudar os processos reativos/difusivos da molécula, excluindo os processos fotoquímicos rápidos.

Para obter os resultados da simulação de séries de intermitência de fluorescência em SM, foram realizadas variações em algumas variáveis de entrada do programa, como a constante k_r e a probabilidade de atividade ativa do catalisador. A Figura 32

exemplifica séries de intermitência simuladas para o mecanismo de Suzuki-Miyaura, com a variação da constante k_r .

Figura 32: Exemplos de séries de intermitência simuladas para o mecanismo de Suzuki-Miyaura, com a variação da constante k_r nas seguintes condições: 0,4 (representado em roxo); 0,5 (verde); 0,75 (vermelho); 1 (azul).

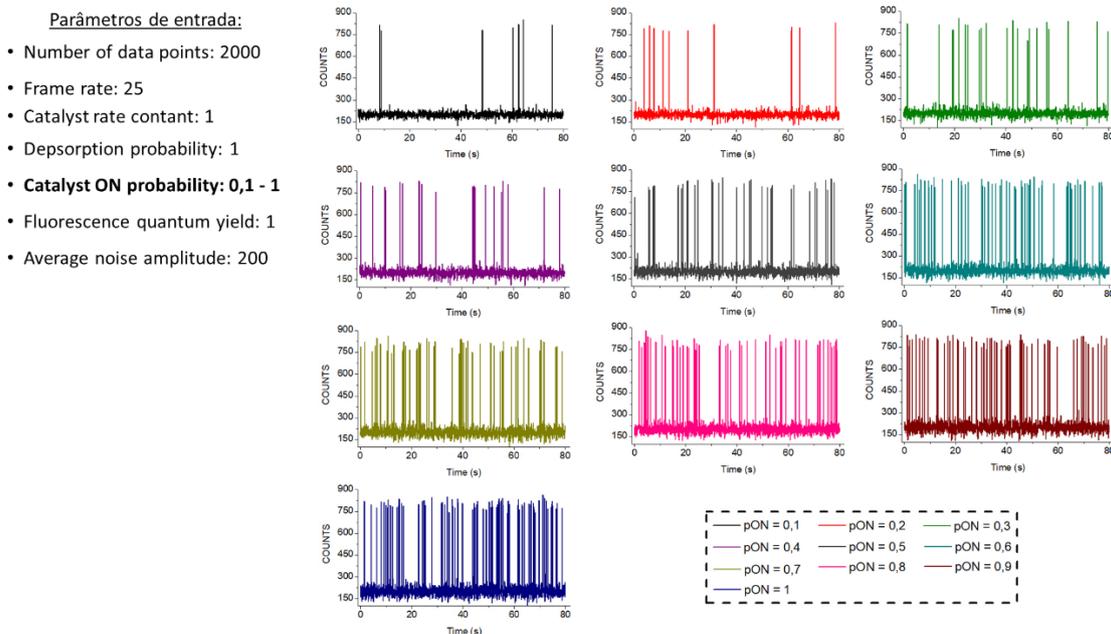


Fonte: Imagem de autoria própria.

Os valores das constantes utilizadas nas simulações foram determinados com base nos resultados SM-TOF experimentais obtidos. Ao analisar os gráficos apresentados na Figura 32 observa-se uma relação direta entre a constante k_r (SM-TOF) e o número de eventos de acoplamento de Suzuki-Miyaura. Mantendo os parâmetros constantes e variando a constante k_r , fica evidente que um aumento na taxa de reação resulta em uma maior formação de moléculas de produto em um determinado intervalo de tempo. Portanto, de acordo com esses resultados há uma consistência entre as simulações realizadas e os resultados dos histogramas de contagem obtidos experimentalmente. Os resultados simulados não contemplam todas as variáveis de uma reação química, o que resulta em gráficos com variações menores na intensidade (*Counts*), correspondentes a uma simulação modulada.

Os gráficos simulados exibidos na Figura 33 foram gerados ao variar a probabilidade do estado ON do catalisador, mantendo as demais variáveis constantes. Essa análise permitiu investigar o efeito da probabilidade de atividade do catalisador na formação de moléculas de produto ao longo do tempo.

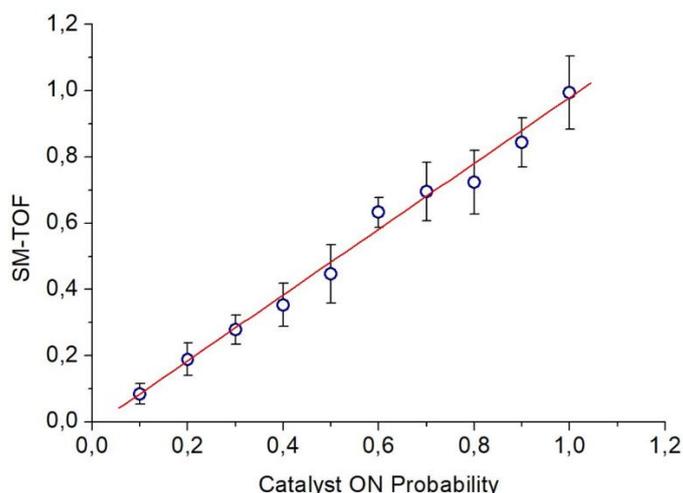
Figura 33: Exemplos de séries de intermitência simuladas para o mecanismo de Suzuki-Miyaura, com a constante k_r fixa em $1,0 \text{ s}^{-1}$, enquanto a probabilidade do estado ON do catalisador varia de 0,1 a 1.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Conforme foi observado ao variar a constante k_r , também foi constatada uma relação direta entre o aumento da probabilidade do estado ON do catalisador e o aumento do número de eventos de acoplamento de Suzuki-Miyaura. Com o objetivo de obter uma análise mais abrangente, foram conduzidas 10 simulações para cada probabilidade usando os mesmos parâmetros de entrada mostrados na Figura 33. A média e o desvio padrão dessas simulações foram calculados e utilizados para gerar o gráfico apresentado na Figura 34. Essa abordagem estatística permitiu uma melhor compreensão da variabilidade dos resultados e oferece uma representação mais precisa do comportamento da reação em diferentes configurações de probabilidade do estado ON do catalisador. O número de simulações realizadas para cada variação é significativamente menor do que o número de sítios catalíticos analisados nos experimentos SM. No entanto, essas simulações são suficientes para compreender a influência das variações das constantes k_r e das probabilidades ON, permitindo fazer uma analogia com os resultados reais obtidos em experimentos de molécula única.

Figura 34: Gráfico da variação estatística do valor de SM-TOF em função da probabilidade de estado ativo (ON) p do catalisador Pd na reação Suzuki-Miyaura. Simulação das séries temporais de intermitência com $k_r = 1,0 \text{ s}^{-1}$ (fixo) e o valor médio e desvio padrão sobre 10 séries para cada (ON) p .



Fonte: Imagem de autoria própria.

A análise linear dos pontos simulados na Figura 34 indica que o valor de SM-TOF segue uma relação direta com o produto da probabilidade do estado ON do catalisador (p) e a taxa de reação kr . Essa relação pode ser expressa pela equação:

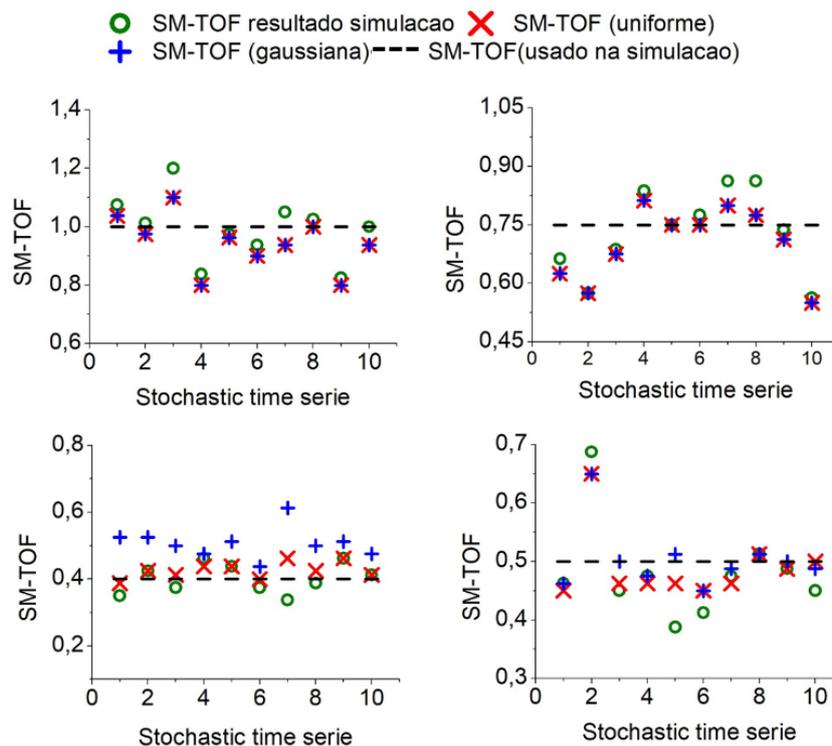
$$\text{SM-TOF} = pkr = krK/(K+1) = krk_1\tau_r$$

onde $K = k_1/k_{-1}$ representa a "constante de equilíbrio da semi-reação" entre os estados Pd(II) e Pd(0), juntamente com suas respectivas constantes cinéticas de interconversão. O tempo de relaxação dessa dinâmica, τ_r , é determinado por $(k_1 + k_{-1})^{-1}$. Sendo que o valor de K depende do redutor utilizado, já que não é uma constante absoluta. É relevante levar em consideração que, em medidas experimentais, apenas o valor de SM-TOF é determinado, o qual converge para kr quando K é muito maior que 1. Esse comportamento indica que o catalisador passa a maior parte do tempo no estado ativo Pd(0) durante a reação. No entanto, ao obter o valor de $K = \text{Pd}(0)/\text{Pd}(\text{II})$ por meio de um método auxiliar específico para um determinado redutor, torna-se possível calcular, de forma mais precisa, o valor da constante de reação kr do ciclo de Suzuki-Miyaura.

A segunda parte deste estudo de simulação foi analisar as séries de intermitência simuladas para verificar se é possível determinar o valor de SM-TOF denominada de taxa média de reação no limite de molécula única (average SM rate). A Figura 35 apresenta os resultados da média de 10 séries temporais de intermitência simuladas para cada valor específico de constante (0,4; 0,5; 0,75 e 1) usando o programa desenvolvido para calcular o SM-TOF. É possível observar a relação entre o valor da série estocástica gerada pela simulação e o valor obtido na análise usando flutuação de limite por gaussiana e flutuação de limite uniforme. Essas análises são métodos estatísticos utilizados para estimar a aproximação dos resultados simulados aos resultados obtidos

pelo programa de tratamento usado para analisar os histogramas de contagem experimentais.

Figura 35: Resultado de análise de series temporais de intermitência simuladas pelo programa desenvolvido (variando a constante kr). (---) valor exato usado na simulação para SM-TOF, (○) valor da série estocástica gerada pela simulação, (x) valor obtido da análise usando flutuação de limite por gaussiana, (+) valor obtido usando flutuação de limite uniforme.



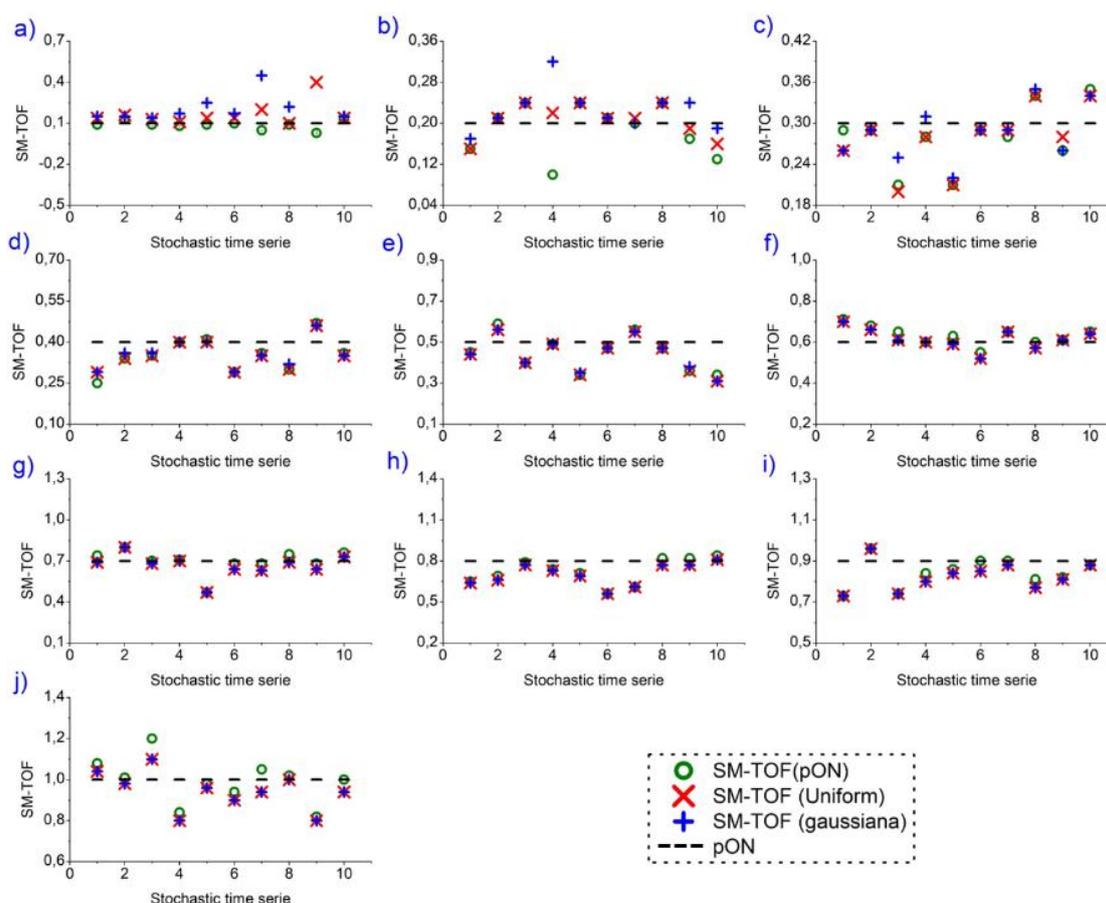
Fonte: Imagem de autoria própria.

Ao comparar os resultados de SM-TOF obtidos pelas séries estocásticas simuladas com as duas análises (uniforme e gaussiana), é possível determinar a proximidade entre os dados simulados e os dados obtidos pelo programa de tratamento dos histogramas experimentais. Observou-se que, para um número significativo de trajetórias, o valor médio de SM-TOF está convergindo para o valor médio esperado. Essa análise foi importante para verificar a precisão e a confiabilidade dos resultados da simulação, bem como para validar o programa utilizado na análise dos dados experimentais de séries temporais de intermitência de fluorescência.

Outra análise realizada, apresentada na Figura 36, envolveu os resultados da média de 10 séries temporais de intermitência simuladas para cada valor específico de probabilidade ativa do catalisador (p_{ON} : 0,1 – 1, a-j), utilizando o mesmo programa desenvolvido para calcular o SM-TOF. Além disso, foi feita uma comparação entre o

valor da série estocástica gerada pela simulação e os valores obtidos por meio da análise usando flutuação de limite por gaussiana e flutuação de limite uniforme.

Figura 36: Resultado de análise de series temporais de intermitência simuladas pelo programa desenvolvido (variando a probabilidade pON de a) 0,1 - j) 1,0). (---) valor exato usado na simulação para SM-TOF, (○) valor da série estocástica gerada pela simulação, (x) valor obtido da análise usando flutuação de limite por gaussiana, (+) valor obtido usando flutuação de limite uniforme.



Fonte: Imagem de autoria própria.

Ao comparar os resultados da variação da constante k_r com os resultados da variação da probabilidade ativa do catalisador, é possível observar que, ao variar a probabilidade ativa, os valores de SM-TOF gerados se aproximam ainda mais dos valores obtidos pela análise por variação de limite uniforme e gaussiano. Além disso, todos os valores convergem para o valor exato de pON utilizado na simulação dos dados. Isso indica uma maior precisão e concordância entre os resultados simulados e os

obtidos por meio dessas análises estatísticas, reforçando a validade e a confiabilidade do modelo utilizado.

As simulações desempenharam um papel crucial na análise da intermitência da fluorescência. Através dessas simulações, foi possível explorar diferentes variáveis, como a constante k_r e a probabilidade do estado ON do catalisador, e observar o impacto dessas variáveis nos resultados. A análise dos resultados simulados permitiu identificar relações diretas entre as variáveis de entrada e a taxa de reação SM-TOF. Além disso, foi possível analisar os resultados simulados pelo mesmo método estatístico usado para tratar os dados experimentais, utilizando as análises estatísticas de flutuação de limite por gaussiana e pela análise de flutuação de limite uniforme. Essas comparações foram fundamentais para validar o modelo utilizado na simulação, fornecendo uma estimativa da precisão dos resultados. De forma geral, as simulações ofereceram uma abordagem eficaz para investigar o mecanismo de Suzuki-Miyaura, permitindo uma análise detalhada das variáveis envolvidas. Além disso, foi possível realizar comparações com dados experimentais e validar o modelo para o tratamento dos histogramas de contagem obtidos por meio de experimentos de molécula única.

4.4. Derivados fenantreno reativos como potenciais marcadores de grupos amino

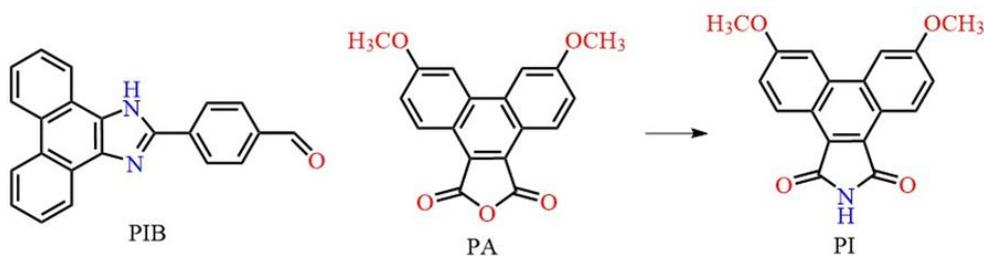
Além de serem usadas como template reacional para catálise no limite de molécula única, as microzeólitas podem desempenhar um papel como suporte para marcação. Suas características, como alta área superficial, estabilidade térmica, seletividade molecular, tamanhos de poros variados, facilidade de funcionalização e baixa toxicidade, tornam-nas opções versáteis e eficientes para marcação. Nesse contexto, um estudo foi realizado em colaboração para explorar estratégias de marcação utilizando microzeólitas contendo grupos amino livres em sua superfície. Os resultados desse estudo envolveram a marcação de dois derivados do fenantreno, que foram utilizados como marcadores. Essa abordagem teve o objetivo de explorar a marcação utilizando compostos específicos.

Foram conduzidos estudos sobre os derivados do fenantreno nos quais foram realizadas análises da absorção e emissão, determinação do rendimento quântico (Φ_f) em diferentes solventes, avaliação do decaimento da fluorescência e captura de imagens através de microscopia confocal. Essas análises contribuíram para a compreensão das características fotofísicas desses compostos.

a) **Estudo das propriedades em solução dos compostos**

A estrutura dos compostos PIB, PA e PI podem ser visualizadas na Figura 37. Na Tabela 18, é apresentada uma imagem dos derivados em solução sob a influência de radiação ultravioleta (UV), juntamente com os rendimentos quânticos obtidos nos comprimentos de onda de absorção e emissão máximos para os sistemas PIB, PA e PI (imida proveniente do composto PA).

Figura 37: Estrutura dos compostos PIB e PA utilizados como marcadores em microzeólitas, e a estrutura da imida correspondente do composto PA, PI.



Fonte: Figura adaptada da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

Tabela 18: Propriedades fotofísicas do derivado fenantreno-imidazol (PIB), anidrido fenantreno (PA) e imida (PI) e foto das soluções sob radiação UV em diferentes solventes*.

Composto	Solvente	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f
PIB	1,4-dioxano	374	459	0,48
	THF	375	455	0,66
	Acetato de Etila	374	463	0,49
	Isopropanol	376	505	0,51
	Acetonitrila	373	487	0,25
PA	1,4-dioxano	391	464	0,66
	THF	396	468	0,72
	DMSO	408	505	0,09
	DMF	401	499	0,32
	Acetonitrila	408	496	0,56
PI	1,4-dioxano	397	488	0,92
	THF	398	477	0,69
	DMSO	402	504	0,57
	DMF	408	500	0,46
	Acetonitrila	402	501	0,54

PIB

DMSO DMF ACN THF 1,4-Dioxano

PA

DMSO ACN 1,4-Dioxano

PI

DMSO DMF ACN THF 1,4-Dioxano

*DMSO: Dimetilsulfóxido; DMF: Dimetilformamida; ACN: Acetonitrila; THF: Tetrahidrofurano e 1,4-Dioxano.

Fonte: Tabela e Figura adaptados da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

Analisando a Tabela 18, os compostos apresentam um deslocamento de Stokes considerável, superior a 80 nm, em solventes polares. Esse deslocamento indica a presença de uma transferência de carga intramolecular (ICT), devido à presença do grupo carbonila na região oposta ao doador da molécula do fenantreno. Essa

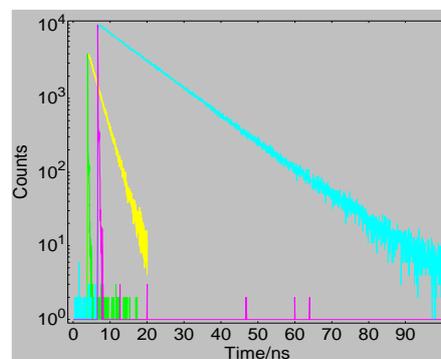
característica de ICT se torna mais evidente ao observar as cores de emissão exibidas pelos compostos em diferentes solventes após a excitação com radiação UV. Além disso, os compostos apresentam Φ_f moderado a alto com alguma dependência da natureza do solvente, como tipo e polaridade. Essas observações revelam informações importantes sobre as propriedades ópticas e a interação entre os grupos funcionais presentes nessas moléculas.

A Tabela 19 apresenta os tempos de decaimento da fluorescência e as amplitudes normalizadas dos derivados fenantreno-imidazol PIB, anidrido fenantreno (PA) e imida (PI). Além disso, a imagem ilustra o comportamento do decaimento da fluorescência dos compostos PIB (amarelo) e PA (azul) em acetonitrila, enquanto a função de resposta do instrumento (irf) é representada em verde e magenta. Essas informações permitem compreender a dinâmica da fluorescência desses compostos.

Tabela 19: Tempos de decaimento da fluorescência e amplitudes normalizadas do derivado fenantreno-imidazol PIB, anidrido (PA) e imida (PI). A imagem representa o decaimento da fluorescência dos compostos PIB (amarelo) e PA (azul) em acetonitrila, a função de resposta do instrumento (irf) é representada pelo verde e magenta.

Composto	Solvente	τ_1 (ns)*	τ_2 (ns)	b_1	b_2	χ^2_g
PIB	1,4-dioxano	0,38	2,27	0,12	0,88	1,27
	THF	0,24	2,02	0,08	0,92	1,04
	Acetato de etila	0,23	2,50	0,29	0,71	1,15
	Isopropanol	0,03	1,72	0,88	0,12	1,12
	Acetonitrila	0,21	2,44	0,13	0,87	1,08
PA	1,4-dioxano	0,94	8,45	0,05	0,95	1,15
	THF	1,17	9,03	0,05	0,95	1,18
	DMSO	0,88	3,60	0,13	0,87	1,35
	DMF	1,59	10,73	0,06	0,94	1,09
	Acetonitrila	1,45	11,75	0,06	0,94	1,09
PI	1,4-dioxano		12,98		1	1,25
	THF	1,10	13,24	0,15	0,85	1,18
	DMSO	1,84	14,70	0,08	0,92	1,11
	DMF	1,65	14,43	0,06	0,94	1,15
	Acetonitrila	134	16,29	0,05	0,95	1,13

* Desvio padrão de $\pm 0,01$ ns.



Fonte: Tabela e Figura adaptados da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

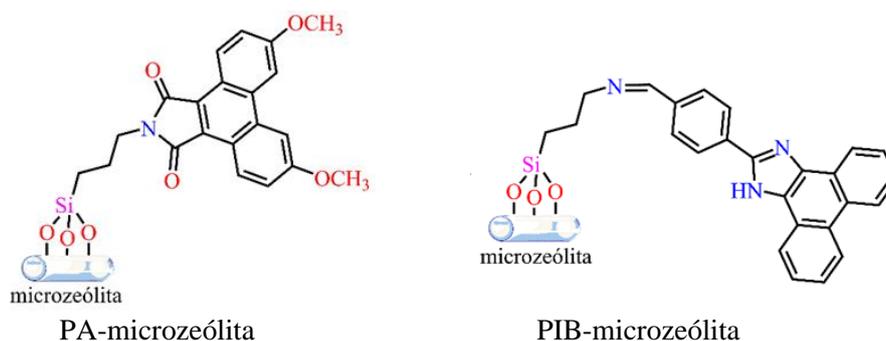
Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 19 que o decaimento da fluorescência dos compostos apresenta um comportamento biexponencial na maioria dos solventes, sendo dominado pelo componente de tempo longo. Esse componente de longa vida exibe uma inclinação praticamente linear quando representado em um gráfico logarítmico, como ilustrado na imagem.

O único comportamento atípico é observado para o composto PIB em isopropanol. Nesse solvente, a fluorescência do PIB apresenta uma rápida transição de 30 ps, seguida por um componente de longa duração de aproximadamente 1,7 ns. O componente rápido pode ser atribuído a um processo de tautomerização no estado excitado, facilitado pela ligação de hidrogênio do isopropanol com o grupo N-H do imidazol, o qual poderia modular a transição do estado excitado local (LE) para o estado excitado de transferência de carga intramolecular (ICT). Alguns dos valores de tempo de decaimento obtidos na análise biexponencial para o PIB são bastante similares aos resultados relatados por Krawczyk e colaboradores¹⁰⁶, em que a desativação da fluorescência é dominada por um componente de longa duração de cerca de 2 ns.

b) Estudo das propriedades dos compostos marcados em microzeólitas

A Figura 38 ilustra uma representação dos compostos PA e PIB após serem marcados nas microzeólitas.

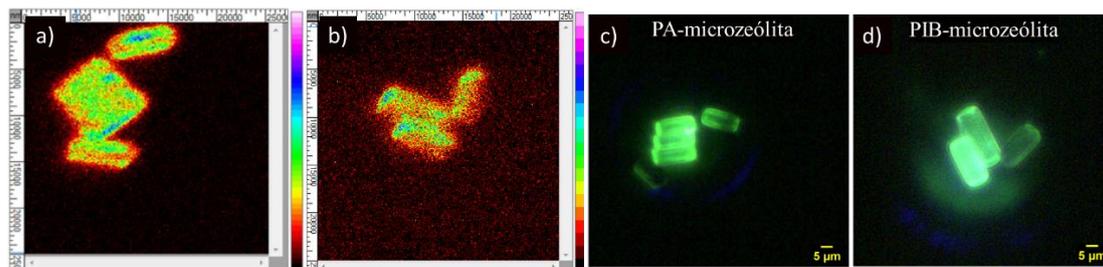
Figura 38: compostos PA e PIB após serem marcados nas microzeólitas.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

As fluorescências das microzeólitas marcadas com os compostos PA e PIB foram avaliadas utilizando um microscópio confocal. A Figura 39a) e b) apresentam as imagens correspondentes a esses compostos, respectivamente. Além disso, as cores de emissão real das amostras foram medidas e ilustradas na Figura 39c) e d). Essas informações fornecem uma representação visual das propriedades de fluorescência das microzeólitas marcadas com esses compostos, permitindo uma análise mais detalhada da sua fluorescência.

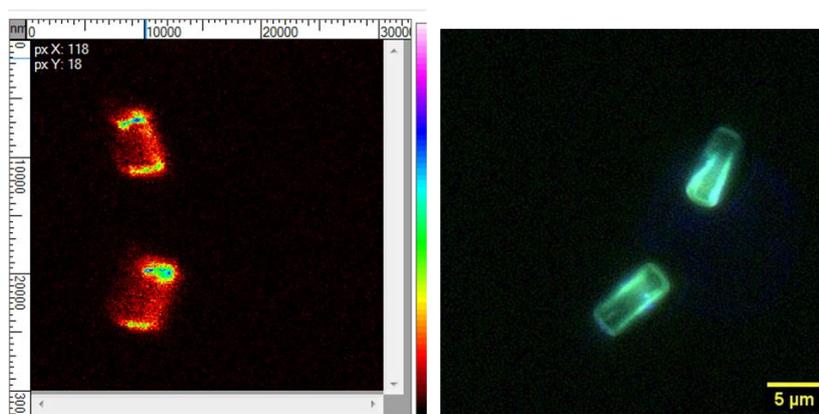
Figura 39: Imagem da fluorescência capturada em um microscópio confocal dos compostos PA (a) e PIB (b) quimicamente ligados a microzeólitas. Em c) e d) estão as imagens em cores reais, com excitação do laser em 405 nm.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

As imagens de fluorescência mostradas na Figura 39a) e b) revelam uma distribuição relativamente homogênea da marcação dos fluoróforos, uma vez que os mapas de intensidade não mostram grandes gradientes. No entanto, a definição menos nítida da microestrutura é resultado da incompatibilidade do índice de refração devido à deposição em 3D das microzeólitas na superfície do vidro, sem um meio condensado (amostras secas). Ao comparar as imagens confocais, observa-se que o sistema PIB-microzeólita (Figura 39b)) apresenta um sinal de fundo muito mais alto fora da partícula, o que pode indicar que parte dos fluoróforos foram dispersos para o meio. Isso provavelmente ocorre devido à menor estabilidade da ligação imina, que pode sofrer hidrólise devido ao caráter ácido da superfície das microzeólitas. Essa desvantagem pode ser corrigida pela redução da imina para amina utilizando NaBH_4 , evitando assim a hidrólise indesejada. A emissão do sistema foi novamente medida após reação de redução e os resultados são apresentados na Figura 40. Observa-se um contraste melhorado nas imagens de fluorescência, devido ao baixo ruído de fundo, indicando que a conversão da imina para amina resultou em uma marcação mais estável e em menor perda para o meio durante a preparação da amostra.

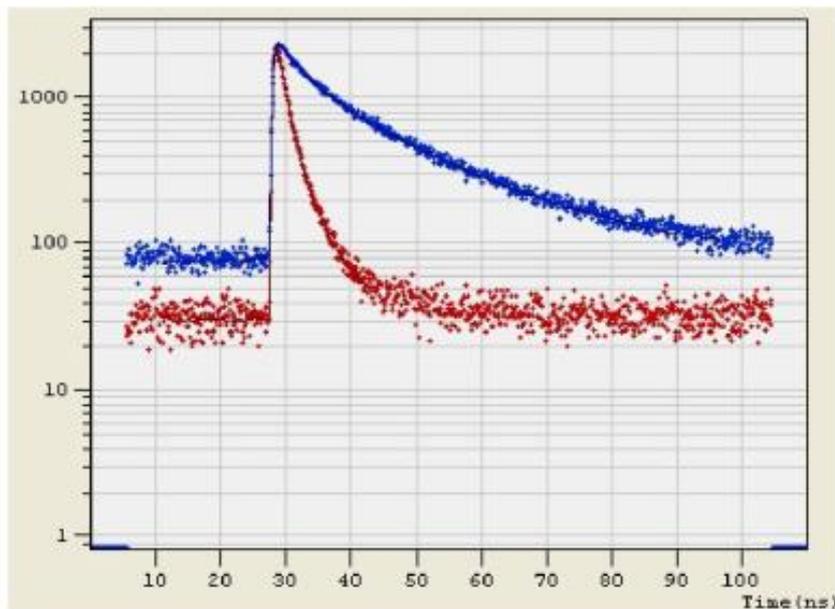
Figura 40: Imagem da fluorescência capturada em um microscópio confocal do composto PIB após redução com NaBH_4 . Imagem em cores reais, com excitação do *laser* em 405 nm.



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

Os perfis de decaimento da fluorescência das amostras de microzeólitas marcadas com PIB e PA são apresentados na Figura 41.

Figura 41: Decaimento da fluorescência do composto PA-microzeólita (azul) e PIB-microzeólita (vermelho).



Fonte: Imagem adaptada da referência ⁹². Número da licença - 5592080301440.

Em contraste com o decaimento em solução homogênea, observa-se que, quando marcados nas microzeólitas, os fluoróforos exibem um decaimento altamente não exponencial, que pode ser atribuído ao caráter heterogêneo da superfície e à possível migração de energia para fluoróforos vizinhos por meio de interação dipolo-dipolo. No caso do sistema PIB-microzeólita, o decaimento é bem descrito por três componentes com tempos de vida de 0,10 ns (31%), 1,12 ns (34%) e 3,90 ns (35%), enquanto para o sistema PA-microzeólita, os componentes são de 0,43 ns (4%), 4,70 ns (18%) e 17,5 ns (78%). A presença de um componente de tempo de longa duração no sistema PA-microzeólita contribui para uma maior eficiência de emissão e uma melhor resolução de imagem confocal, como ilustrado na Figura 39. Esses resultados destacam a relevância das propriedades das microzeólitas na modulação da dinâmica da fluorescência e no desempenho dos fluoróforos em aplicações de imagem.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, foram conduzidos experimentos de molécula única para investigar quatro reações de acoplamento cruzado pelo mecanismo de Suzuki-Miyaura. Foram utilizadas três abordagens distintas, a primeira envolvendo a localização do catalisador em superfície por adsorção, a segunda pelo uso de silanos modificados com ligante ativo e a terceira pela aplicação de microzeólitas como templates reacionais. Os resultados obtidos para as quatro reações nas três metodologias, apresentaram variações significativas nos picos de intensidade de fluorescência nos histogramas de contagem, sugerindo diferenças na orientação do cromóforo com emissão de fluorescência detectada. Além disso, foi observada uma flutuação significativa no número de eventos de fluorescência de molécula única ao longo do tempo, o que sugere que os catalisadores possuem propriedades intrínsecas no sítio catalítico e seguem um comportamento estocástico de atividade.

A análise de centenas de centroides em diferentes filmes e amostras permitiu a obtenção de valores médios representativos de diversos parâmetros e o cálculo da taxa de reação, ou SM-TOF. Com base nos dados obtidos e analisados, foi calculado o número de moléculas de produto formadas por minuto por um único sítio catalítico. Para as quatro reações abordadas utilizando diferentes condições experimentais, os valores obtidos foram consistentes tanto na análise de flutuação do limite por distribuição uniforme quanto por gaussiana. Além disso, os valores obtidos foram altamente concordantes com os valores reportados na literatura.

Ao examinar o número de moléculas produzidas utilizando microzeólitas como templates reacionais, observou-se uma melhoria significativa na eficiência catalítica em comparação com as outras duas metodologias empregadas no estudo. Essa diferença pode ser atribuída às vantagens do uso de microzeólitas, como sua área superficial, ancoragem dos catalisadores Pd(0) e acesso dos reagentes aos sítios ativos. Os resultados apresentados destacam o potencial das microzeólitas como ferramentas promissoras na área de catálise no limite de molécula única e podem direcionar o desenvolvimento de novas estratégias catalíticas mais eficientes na síntese de compostos.

Os resultados obtidos forneceram informações significativas sobre as reações de acoplamento cruzado pelo mecanismo de Suzuki-Miyaura, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada do comportamento do catalisador. Esses resultados podem implicar no desenvolvimento de estratégias catalíticas mais eficientes e seletivas.

Ademais a validação do sistema de tratamento de dados por meio do estudo de simulação reforça a confiabilidade dos resultados experimentais.

Em relação às microzeólitas, a investigação do uso de marcadores baseados em derivados do fenantreno, devido à sua interação com grupos amino livres na superfície dessas estruturas, proporcionou uma melhor compreensão das interações nesses sistemas. Observou-se que a marcação foi mais estável e consistente para um dos compostos (PA), enquanto uma modificação estrutural realizada no composto PIB mostrou-se uma estratégia eficaz para garantir uma marcação mais eficiente desse composto. Essas análises foram relevantes para o desenvolvimento de estratégias práticas para a aplicação dessas estruturas como templates para marcadores fluorescentes, contribuindo para o avanço da área de marcadores e fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento desses sistemas.

Em suma, este estudo de molécula única para reações de acoplamento cruzado pelo mecanismo de Suzuki-Miyaura, juntamente com a simulação e a investigação dos marcadores nas microzeólitas, podem desempenhar um papel significativo no avanço do conhecimento nessas áreas da química e fotoquímica. Os resultados obtidos fornecem contribuições substanciais para o aprimoramento de processos catalíticos com paládio e futuras aplicações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 FAN, K. J.; SU, W. H. Applications of fluorescence spectroscopy, RGB- and multispectral imaging for quality determinations of white meat: A review. **Biosensors**, Basel, v. 12, n. 2, p. 21, 2022.
- 2 ADARSH, U. K.; KARTHA, V. B.; SANTHOSH, C.; UNNIKRISHNAN, V. K. Spectroscopy: A promising tool for plastic waste management. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 149, n. 116534, p. 13, 2022.
- 3 VOGT, M.; SMOLENTSEV, G. Time-resolved X-ray spectroscopy to study luminophores with relevance for OLEDs. **Chemphotochem**, Weinheim, v. 6, n. 5, p. 12, 2022.
- 4 VALUE, B.; SANTOS, M. **Molecular fluorescence**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2012. 569 p.
- 5 ZACHARIOUDAKI, D.-E.; FITILIS, I.; KOTTI, M. Review of fluorescence spectroscopy in environmental quality applications. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 15, p. 4801, 2022.
- 6 KINOSHITA, M.; KITA, H.; SHIROTA, Y. A novel family of boron-containing hole-blocking amorphous molecular materials for blue- and blue-violet-emitting organic electroluminescent devices. **Advanced Functional Materials**, Weinheim, v. 12, n. 11-12, p. 780-786, 2002.
- 7 TURKOGLU, G.; CINAR, M. E.; OZTURK, T. Triarylborane-based materials for OLED applications. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 9, p. 24, 2017.
- 8 KITAMOTO, Y.; NAMIKAWA, T.; IKEMIZU, D.; MIYATA, Y.; SUZUKI, T.; KITA, H.; SATO, T.; OI, S. Light blue and green thermally activated delayed fluorescence from 10H-phenoxaborin-derivatives and their application to organic light-emitting diodes. **Journal of Materials Chemistry C**, Cambridge, v. 3, n. 35, p. 9122-9130, 2015.
- 9 LEE, Y. H.; PARK, S.; OH, J.; SHIN, J. W.; JUNG, J.; YOO, S.; LEE, M. H. Rigidity-induced delayed fluorescence by ortho donor-appended triarylboron compounds: Record-high efficiency in pure blue fluorescent organic light-emitting diodes. **Acs Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 9, n. 28, p. 24035-24042, 2017.
- 10 KITAMOTO, Y.; NAMIKAWA, T.; SUZUKI, T.; MIYATA, Y.; KITA, H.; SATO, T.; OI, S. Dimesitylarylborane-based luminescent emitters exhibiting highly-efficient thermally activated delayed fluorescence for organic light-emitting diodes. **Organic Electronics**, Amsterdam, v. 34, p. 216-225, 2016.
- 11 DOS SANTOS, P. L.; WARD, J. S.; BRYCE, M. R.; MONKMAN, A. P. Using guest-host interactions to optimize the efficiency of TADF OLEDs. **Journal of Physical Chemistry Letters**, Washington, v. 7, n. 17, p. 3341-3346, 2016.

- 12 NAKAO, K.; SASABE, H.; KOMATSU, R.; HAYASAKA, Y.; OHSAWA, T.; KIDO, J. Significant enhancement of blue OLED performances through molecular engineering of pyrimidine-based emitter. **Advanced Optical Materials**, Weinheim, v. 5, n. 6, p. 6, 2017.
- 13 SASABE, H.; ONUMA, N.; NAGAI, Y.; ITO, T.; KIDO, J. High power efficiency blue-to-green organic light-emitting diodes using isonicotinonitrile-based fluorescent emitters. **Chemistry-an Asian Journal**, Weinheim, v. 12, n. 6, p. 648-654, 2017.
- 14 DUAN, C. B.; LI, J.; HAN, C. M.; DING, D. X.; YANG, H.; WEI, Y.; XU, H. Multi-dipolar chromophores featuring phosphine oxide as joint acceptor: A new strategy toward high-efficiency blue thermally activated delayed fluorescence dyes. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 28, n. 16, p. 5667-5679, 2016.
- 15 NODA, H.; KABE, R.; ADACHI, C. Blue thermally activated delayed fluorescence molecule having acridane and cyanobenzene units. **Chemistry Letters**, Kanda-Surugadai, v. 45, n. 12, p. 1463-1466, 2016.
- 16 RAJAMALLI, P.; SENTHILKUMAR, N.; GANDEEPAN, P.; REN-WU, C. C.; LIN, H. W.; CHENG, C. H. A method for reducing the singlet-triplet energy gaps of tadf materials for improving the blue OLED efficiency. **Acs Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 8, n. 40, p. 27026-27034, 2016.
- 17 SOHN, S.; KOH, B. H.; BAEK, J. Y.; BYUN, H. C.; LEE, J. H.; SHIN, D. S.; AHN, H.; LEE, H. K.; HWANG, J.; JUNG, S.; KIM, Y. H. Synthesis and characterization of diphenylamine derivative containing malononitrile for thermally activated delayed fluorescent emitter. **Dyes and Pigments**, Oxford, v. 140, p. 14-21, 2017.
- 18 LEE, J.; SHIZU, K.; TANAKA, H.; NOMURA, H.; YASUDA, T.; ADACHI, C. Oxadiazole- and triazole-based highly-efficient thermally activated delayed fluorescence emitters for organic light-emitting diodes. **Journal of Materials Chemistry C**, Cambridge, v. 1, n. 30, p. 4599-4604, 2013.
- 19 DEVENDAR, P.; QU, R.-Y.; KANG, W.-M.; HE, B.; YANG, G.-F. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions: A powerful tool for the synthesis of agrochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 66, n. 34, p. 8914-8934, 2018.
- 20 GIOIELLO, A.; PICCINNO, A.; LOZZA, A. M.; CERRA, B. The medicinal chemistry in the era of machines and automation: Recent advances in continuous flow technology. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 63, n. 13, p. 6624-6647, 2020.
- 21 SANTOS, A. S.; MORTINHO, A. C.; MARQUES, M. M. B. Metal-catalyzed cross-coupling reactions on azaindole synthesis and functionalization. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 10, p. 2673, 2018.
- 22 NAVNEET, K.; GURMEET, K. A review on Homo- and Hetero- coupling reactions. **Materials Today: Proceedings**, Amsterdam, v. 48, p. 1283-1300, 2022.

- 23 SEECHURN, C.; KITCHING, M. O.; COLACOT, T. J.; SNIECKUS, V. Palladium-catalyzed cross-coupling: A historical contextual perspective to the 2010 Nobel Prize. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 51, n. 21, p. 5062-5085, 2012.
- 24 SIEMSEN, P.; LIVINGSTON, R. C.; DIEDERICH, F. Acetylenic coupling: A powerful tool in molecular construction. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 39, n. 15, p. 2633-2657, 2000.
- 25 BACHMANN, W. E.; CLARKE, H. T. The mechanism of the Wurtz-Fittig reaction. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 49, p. 2089-2098, 1927.
- 26 WURTZ, A. Ueber eine neue klasse organischer radicale. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 96, n. 3, p. 364-375, 1855.
- 27 PELTZER, R. M.; GAUSS, J.; EISENSTEIN, O.; CASCELLA, M. The Grignard reaction - unraveling a chemical puzzle. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 142, n. 6, p. 2984-2994, 2020.
- 28 CHE, M. Nobel Prize in chemistry 1912 to Sabatier: Organic chemistry or catalysis? **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 218, p. 162-171, 2013.
- 29 KHARASCH, M. S.; FIELDS, E. K. Factors determining the course and mechanisms of Grignard reactions. IV. The effect of metallic halides on the reaction of aryl grignard reagents and organic halides. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 63, n. 9, p. 2316-2320, 1941.
- 30 LI, J. J. **Name reactions**: A collection of detailed reaction mechanisms. 3. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006. 601 p.
- 31 STEPHENS, R. D.; CASTRO, C. E. The substitution of aryl iodides with cuprous acetylides. A synthesis of tolanes and heterocyclics. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 28, n. 12, p. 3313-3315, 1963.
- 32 LINDLAR, H. Ein neuer katalysator fur selektive hydrierungen. **Helvetica Chimica Acta**, Weinheim, v. 35, n. 2, p. 446-456, 1952.
- 33 MOZINGO, R. R. Palladium catalysts. **Organic Syntheses**, Rahway, v. 26, p. 77-82, 1946.
- 34 SMIDT, J.; HAFNER, W.; JIRA, R.; SEDLMEIER, J.; SIEBER, R.; RUTTINGER, R.; KOJER, H. Catalytic reactions of olefines on platinum metal compounds. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 71, n. 5, p. 176-182, 1959.
- 35 HECK, R. F. Cobalt and palladium reagents in organic synthesis: The beginning. **Synlett**, Stuttgart, n. 18, p. 2855-2860, 2006.

- 36 HENRY, P. M. Oxidation of olefins by palladium(II). II. Effect of structure on rate in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 88, n. 8, p. 1595-1597, 1966.
- 37 HECK, R. F. Acylation, methylation, and carboxyalkylation of olefins by Group VIII metal derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5518-5526, 1968.
- 38 HECK, R. F. The arylation of allylic alcohols with organopalladium compounds. A new synthesis of 3-aryl aldehydes and ketones. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5526-5531, 1968.
- 39 HECK, R. F. Allylation of aromatic compounds with organopalladium salts. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5531-5534, 1968.
- 40 HECK, R. F. The palladium-catalyzed arylation of enol esters, ethers, and halides. A new synthesis of 2-aryl aldehydes and ketones. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5535-5538, 1968.
- 41 HECK, R. F. Aromatic haloethylation with palladium and copper halides. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5538-5542, 1968.
- 42 HECK, R. F. The addition of alkyl- and arylpalladium chlorides to conjugated dienes. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5542-5546, 1968.
- 43 HECK, R. F. A synthesis of diaryl ketones from arylmercuric salts. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 90, n. 20, p. 5546-5548, 1968.
- 44 TSUTOMU, M.; KUNIO, M.; ATSUMU, O. Arylation of olefin with aryl iodide catalyzed by palladium. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Kanda-Surugadai, v. 44, n. 2, p. 581-581, 1971.
- 45 NEGISHI, E.-I.; BABA, S. Novel stereoselective alkenyl-aryl coupling via nickel-catalysed reaction of alkenylanes with aryl halides. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, n. 15, p. 596b-597b, 1976.
- 46 NEGISHI, E. Palladium- or nickel-catalyzed cross coupling. A new selective method for carbon-carbon bond formation. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 15, n. 11, p. 340-348, 1982.
- 47 KING, A. O.; OKUKADO, N.; NEGISHI, E.-I. Highly general stereo-, regio-, and chemo-selective synthesis of terminal and internal conjugated enynes by the Pd-catalysed reaction of alkynylzinc reagents with alkenyl halides. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, n. 19, p. 683-684, 1977.
- 48 MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, n. 19, p. 866-867, 1979.

- 49 SUZUKI, A. Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995–1998. **Journal of Organometallic Chemistry**, Amsterdam, v. 576, n. 1, p. 147-168, 1999.
- 50 HAMANN, B. C.; HARTWIG, J. F. Palladium-catalyzed direct α -arylation of ketones. Rate acceleration by sterically hindered chelating ligands and reductive elimination from a transition metal enolate complex. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 119, n. 50, p. 12382-12383, 1997.
- 51 LARSEN, R. D.; KING, A. O.; CHEN, C. Y.; CORLEY, E. G.; FOSTER, B. S.; ROBERTS, F. E.; YANG, C.; LIEBERMAN, D. R.; REAMER, R. A.; TSCHAEN, D. M.; VERHOEVEN, T. R.; REIDER, P. J.; LO, Y. S.; ROSSANO, L. T.; BROOKES, A. S.; MELONI, D.; MOORE, J. R.; ARNETT, J. F. Efficient synthesis of Losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 59, n. 21, p. 6391-6394, 1994.
- 52 SHINKAI, I.; KING, A. O.; LARSEN, R. D. A practical asymmetric synthesis of LTD4 antagonist. **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 66, n. 7, p. 1551-1556, 1994.
- 53 CAMP, D.; MATTHEWS, C. F.; NEVILLE, S. T.; ROUNS, M.; SCOTT, R. W.; TRUONG, Y. Development of a synthetic process towards a hepatitis C polymerase inhibitor. **Organic Process Research & Development**, Washington, v. 10, n. 4, p. 814-821, 2006.
- 54 ORECCHIA, P.; PETKOVA, D. S.; GOETZ, R.; ROMINGER, F.; HASHMI, A. S. K.; SCHAUB, T. Pd-catalysed Suzuki-Miyaura cross-coupling of aryl chlorides at low catalyst loadings in water for the synthesis of industrially important fungicides. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 23, n. 20, p. 8169-8180, 2021.
- 55 LI, C. G.; WANG, Y. S.; ZOU, Y.; ZHANG, X. T.; DONG, H. L.; HU, W. P. Two-dimensional conjugated polymer synthesized by interfacial Suzuki reaction: Towards electronic device applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 59, n. 24, p. 9403-9407, 2020.
- 56 TAHIR WASEEM, M.; MUHAMMAD JUNAID, H.; GUL, H.; ALI KHAN, Z.; YU, C.; ANJUM SHAHZAD, S. Fluorene based fluorescent and colorimetric sensors for ultrasensitive detection of nitroaromatics in aqueous medium. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Amsterdam, v. 425, p. 113660, 2022.
- 57 JRADI, F. M.; LAVIS, L. D. Chemistry of photosensitive fluorophores for single-molecule localization microscopy. **Acs Chemical Biology**, Washington, v. 14, n. 6, p. 1077-1090, 2019.
- 58 LI, Y.; YANG, C.; GUO, X. F. Single-molecule electrical detection: A promising route toward the fundamental limits of chemistry and life science. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 53, n. 1, p. 159-169, 2020.

- 59 XU, J.; WANG, L. P.; MU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, M. Y.; WANG, Q. F.; WANG, K.; GUAN, S. W.; LI, J. Y.; WANG, L. C. Carbon quantum dots as fluorescent probes for imaging and detecting free radicals in *C. Elegans*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Valencia, v. 18, n. 2, p. 763-771, 2018.
- 60 FIALA, T.; WANG, J. H.; DUNN, M.; SEBEJ, P.; NWADIBIA, E.; MARTINEZ, D. M.; CHEETHAM, C. E. J.; FOGLE, K. J.; PALLADINO, M. J.; BANDO, Y.; YUSTE, R.; FREYBERG, Z.; SULZER, D.; SAMES, D.; CHOI, S. J.; FIALOVA, E. Chemical targeting of voltage sensitive dyes to specific cells and molecules in the brain. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 142, n. 20, p. 9285-9301, 2020.
- 61 ZHANG, Z. H.; LIU, H.; SUN, Q. Z.; SHAO, F.; PAN, Q. Y.; ZHUANG, T.; ZHAO, Y. J. Interfacial synthesis of a monolayered fluorescent two-dimensional polymer through dynamic imine chemistry. **ChemistryOpen**, Weinheim, v. 9, n. 3, p. 381-385, 2020.
- 62 SILVA, G. T. M.; DA SILVA, K. M.; SILVA, C. P.; RODRIGUES, A. C. B.; OAKE, J.; GEHLEN, M. H.; BOHNE, C.; QUINA, F. H. Highly fluorescent hybrid pigments from anthocyanin- and red wine pyranoanthocyanin-analogs adsorbed on sepiolite clay. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 1750-1760, 2019.
- 63 SPRUNG, C.; WECKHUYSEN, B. M. Differences in the location of guest molecules within zeolite pores as revealed by multilaser excitation confocal fluorescence microscopy: Which molecule is where? **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 137, n. 5, p. 1916-1928, 2015.
- 64 MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. **Chemical Reviews**, Washington, v. 95, n. 7, p. 2457-2483, 1995.
- 65 AMATORE, C.; JUTAND, A.; LE DUC, G. Kinetic data for the transmetalation/reductive elimination in palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura reactions: Unexpected triple role of hydroxide ions used as base. **Chemistry-a European Journal**, Weinheim, v. 17, n. 8, p. 2492-2503, 2011.
- 66 SMITH, G. B.; DEZENY, G. C.; HUGHES, D. L.; KING, A. O.; VERHOEVEN, T. R. Mechanistic studies of the Suzuki cross-coupling reaction. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 59, n. 26, p. 8151-8156, 1994.
- 67 SENN, H. M.; ZIEGLER, T. Oxidative addition of aryl halides to palladium(0) complexes: A density-functional study including solvation. **Organometallics**, Washington, v. 23, n. 12, p. 2980-2988, 2004.
- 68 LYNQVI, E.; SCHOENEBECK, F. Oxidative addition transition states of Pd(0) complexes in polar solvent—a DFT study involving implicit and explicit solvation. **Tetrahedron**, Oxford, v. 69, n. 27, p. 5715-5718, 2013.

- 69 BRAGA, A. A. C.; MORGON, N. H.; UJAQUE, G.; MASERAS, F. Computational characterization of the role of the base in the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 127, n. 25, p. 9298-9307, 2005.
- 70 GARCÍA-MELCHOR, M.; BRAGA, A. A. C.; LLEDÓS, A.; UJAQUE, G.; MASERAS, F. Computational perspective on Pd-catalyzed C–C cross-coupling reaction mechanisms. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 46, n. 11, p. 2626-2634, 2013.
- 71 ZUIDEMA, E.; VAN LEEUWEN, P. W. N. M.; BO, C. Reductive elimination of organic molecules from palladium–diphosphine complexes. **Organometallics**, Washington, v. 24, n. 15, p. 3703-3710, 2005.
- 72 PEREZ-RODRIGUEZ, M.; BRAGA, A. A. C.; DE LERA, A. R.; MASERAS, F.; ALVAREZ, R.; ESPINET, P. A DFT study of the effect of the ligands in the reductive elimination from palladium bis(allyl) complexes. **Organometallics**, Washington, v. 29, n. 21, p. 4983-4991, 2010.
- 73 SHERWOOD, J.; CLARK, J. H.; FAIRLAMB, I. J. S.; SLATTERY, J. M. Solvent effects in palladium catalysed cross-coupling reactions. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 2164-2213, 2019.
- 74 MOLINA DE LA TORRE, J. A.; ESPINET, P.; ALBÉNIZ, A. C. Solvent-induced reduction of palladium-aryls, a potential interference in Pd catalysis. **Organometallics**, Washington, v. 32, n. 19, p. 5428-5434, 2013.
- 75 DEDECKER, P.; DUWE, S.; NEELY, R. K.; ZHANG, J. Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, Bellingham, v. 17, n. 12, p. 5, 2012.
- 76 MARKUS SAUER, J. H., JÖRG ENDERLEIN. **Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: From ensemble to single molecules**. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. 290 p.
- 77 CORDES, T.; BLUM, S. A. Opportunities and challenges in single-molecule and single-particle fluorescence microscopy for mechanistic studies of chemical reactions. **Nature Chemistry**, Londres, v. 5, n. 12, p. 993-999, 2013.
- 78 BARD, A. J.; FAN, F. R. F. Electrochemical detection of single molecules. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 29, n. 12, p. 572-578, 1996.
- 79 FISH, K. N. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. **Current Protocols**, Hoboken, v. 2, n. 8, p. e517, 2022.
- 80 BOND, C.; SANTIAGO-RUIZ, A. N.; TANG, Q.; LAKADAMYALI, M. Technological advances in super-resolution microscopy to study cellular processes. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 315-332, 2022.

- 81 ELF, J.; BARKEFORS, I. Single-molecule kinetics in living cells. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 88, p. 635-659, 2019.
- 82 MICHALET, X.; COLYER, R. A.; SCALIA, G.; WEISS, S.; SIEGMUND, O. H. W.; TREMSIN, A. S.; VALLERGA, J. V.; VILLA, F.; GUERRIERI, F.; RECH, I.; GULINATTI, A.; TISA, S.; ZAPPA, F.; GHIONI, M.; COVA, S. New photon-counting detectors for single-molecule fluorescence spectroscopy and imaging. *In*: CONFERENCE ON ADVANCED PHOTON COUNTING TECHNIQUES, 5., 2011, Orlando. **Proceedings of SPIE**. Orlando: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2011. 21 p.
- 83 MATTHEYSES, A. L.; SIMON, S. M.; RAPPOPORT, J. Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 123, n. Pt 21, p. 3621-3628, 2010.
- 84 BOULANGER, J.; GUEUDRY, C.; MUNCH, D.; CINQUIN, B.; PAUL-GILLOTEAUX, P.; BARDIN, S.; GUERIN, C.; SENGER, F.; BLANCHOIN, L.; SALAMERO, J. Fast high-resolution 3D total internal reflection fluorescence microscopy by incidence angle scanning and azimuthal averaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 48, p. 17164-17169, 2014.
- 85 WHELAN, D. R.; BELL, T. D. M. Super-resolution single-molecule localization microscopy: Tricks of the trade. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, Washington, v. 6, n. 3, p. 374-382, 2015.
- 86 CHEN, Y.; LI, Z.; HUANG, X.; LU, G.; HUANG, W. Single-molecule mapping of catalytic reactions on heterostructures. **Nano Today**, Amsterdam, v. 34, p. 100957, 2020.
- 87 COSTA, P.; SANDRIN, D.; SCAIANO, J. C. Real-time fluorescence imaging of a heterogeneously catalysed Suzuki–Miyaura reaction. **Nature Catalysis**, Londres, v. 3, n. 5, p. 427-437, 2020.
- 88 GU, K.; LIU, S.; LIU, C. Surface preparation for single-molecule fluorescence imaging in organic solvents. **Langmuir**, Washington, v. 38, n. 50, p. 15848-15857, 2022.
- 89 ROEFFAERS, M. B. J.; DE CREMER, G.; LIBEERT, J.; AMELOOT, R.; DEDECKER, P.; BONS, A.-J.; BÜCKINS, M.; MARTENS, J. A.; SELS, B. F.; DEVOS, D. E.; HOFKENS, J. Super-resolution reactivity mapping of nanostructured catalyst particles. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 48, n. 49, p. 9285-9289, 2009.
- 90 LAYEK, A.; VAN LOON, J.; ROEFFAERS, M. B. J.; KUBAREV, A. V. Correlated super-resolution fluorescence and electron microscopy reveals the catalytically active nanorods within individual H-ZSM-22 zeolite particles. **Catalysis science & technology**, Cambridge, v. 9, n. 17, p. 4645-4650, 2019.

- 91 HENDRIKS, F. C.; MOHAMMADIAN, S.; RISTANOVIĆ, Z.; KALIRAI, S.; MEIRER, F.; VOGT, E. T. C.; BRUIJNINCX, P. C. A.; GERRITSEN, H. C.; WECKHUYSEN, B. M. Integrated transmission electron and single-molecule fluorescence microscopy correlates reactivity with ultrastructure in a single catalyst particle. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 57, n. 1, p. 257-261, 2018.
- 92 REIS, I. F.; FOLTRAN, L. S.; LAUER, M. H.; GEHLEN, M. H.; DREKENER, R. L.; CORREIA, C. R. D. Reactive phenanthrene derivatives as markers of amino groups in fluorescence microscopy of surface modified micro-zeolite L. **Journal of Fluorescence**, Nova Iorque, v. 31, n. 5, p. 1417-1424, 2021.
- 93 HASHIMOTO, S.; MOON, H. R.; YOON, K. B. Optical microscopy study of zeolite-dye composite materials. **Microporous and mesoporous materials**, Amsterdam, v. 101, n. 1-2, p. 10-18, 2007.
- 94 FREDERICE, R.; LENCIONE, D.; GEHLEN, M. H. Imaging the photoinduced charge injection in CdS/TiO₂ nanoparticles by the sequential fluorescence mapping method. **Methods and Applications in Fluorescence**, Bellingham, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2017.
- 95 LENCIONE, D.; GEHLEN, M. H.; TRUJILLO, L. N.; LEITAO, R. C. F.; ALBUQUERQUE, R. Q. The spatial distribution of the photostability of thionine in zeolite L nanochannels investigated by Photobleaching Lifetime Imaging Microscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 398-404, 2016.
- 96 LINO, A. M.; GEHLEN, M. H. Styryl dye formation promoted by catalytic centers of piperazine bound to a silica surface traced by single molecule fluorescence microscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 19, n. 31, p. 20984-20990, 2017.
- 97 TUKHTAEV, H. B.; IVANOV, K. L.; BEZZUBOV, S. I.; CHESHKOV, D. A.; MELNIKOV, M. Y.; BUDYNINA, E. M. Aza-Wittig reaction with nitriles: How carbonyl function switches from reacting to activating. **Organic Letters**, Washington, v. 21, n. 4, p. 1087-1092, 2019.
- 98 GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 62, n. 21, p. 7512-7515, 1997.
- 99 XU, Q. F.; NIU, Y. J.; WANG, G.; LI, Y. G.; ZHAO, Y.; SINGH, V.; NIU, J. Y.; WANG, J. P. Polyoxoniobates as a superior Lewis base efficiently catalyzed Knoevenagel condensation. **Molecular catalysis**, Amsterdam, v. 453, p. 93-99, 2018.
- 100 CHEN, Y. Q.; LI, Z. Y.; HUANG, X.; LU, G.; HUANG, W. Single-molecule mapping of catalytic reactions on heterostructures. **Nano Today**, Amsterdam, v. 34, n. 100957, p. 15, 2020.

- 101 SOLTANI, S.; MONTAZERI, N.; HERAVI, M. M.; ZEYDI, M. M. PdCl₂ immobilized on poly(styrene-co-maleimide) as an effective heterogeneous catalyst for Suzuki cross-coupling reaction. **Russian Journal of Organic Chemistry**, Heidelberg, v. 56, n. 5, p. 884-893, 2020.
- 102 RENUKA, M. K.; GAYATHRI, V. Polymer supported palladium complex as a reusable catalyst for Suzuki coupling. **Journal of Organometallic Chemistry**, Amsterdam, v. 874, p. 26-31, 2018.
- 103 HERAVI, M. M.; HASHEMI, E.; BEHESHTIHA, Y. S.; AHMADI, S.; HOSSEINNEJAD, T. PdCl₂ on modified poly(styrene-co-maleic anhydride): A highly active and recyclable catalyst for the Suzuki–Miyaura and Sonogashira reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 394, p. 74-82, 2014.
- 104 CAROLE, W. A.; COLACOT, T. J. Understanding palladium acetate from a user perspective. **Chemistry – A European Journal**, Weinheim, v. 22, n. 23, p. 7686-7695, 2016.
- 105 VAN LOON, J.; JANSSEN, K. P. F.; FRANKLIN, T.; KUBAREV, A. V.; STEELE, J. A.; DEBROYE, E.; BREYNAERT, E.; MARTENS, J. A.; ROEFFAERS, M. B. J. Rationalizing acid zeolite performance on the nanoscale by correlative fluorescence and electron microscopy. **Acs Catalysis**, Washington, v. 7, n. 8, p. 5234-5242, 2017.
- 106 KRAWCZYK, P.; JĘDRZEJEWSKA, B.; PIETRZAK, M.; JANEK, T. Synthesis, spectroscopic, physicochemical properties and binding site analysis of 4-(1H-phenanthro[9,10-d]-imidazol-2-yl)-benzaldehyde fluorescent probe for imaging in cell biology: Experimental and theoretical study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 164, p. 112-122, 2016.

ANEXOS

A aluna foi agraciada com o prêmio de Melhor Pôster no *15^o Latin American Conference on Physical Organic Chemistry* em 2022, em reconhecimento à sua apresentação dos resultados obtidos pela catálise de molécula única por meio da metodologia de adsorção de Pd(II) em sítios aniônicos SiO⁻ referentes as reações SM1 e SM2. Além disso, a aluna teve um trabalho publicado no *Journal of Fluorescence* em setembro de 2021, em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Dr. Carlos Roque da UNICAMP. O artigo, intitulado "*Reactive Phenanthrene Derivatives as Markers of Amino Groups in Fluorescence Microscopy of Surface Modified Micro-Zeolite L*", aborda os resultados obtidos na utilização de derivados do fenantreno como marcadores em grupos amino livres presentes em microzeólitas. Esses reconhecimentos destacam a relevância do trabalho realizado, contribuindo para o avanço do conhecimento na área da catálise de molécula única e de marcadores fluorescentes.





Reactive Phenanthrene Derivatives as Markers of Amino Groups in Fluorescence Microscopy of Surface Modified Micro-Zeolite L

Izadora Fonseca Reis¹ · Larissa Schumekel Foltran¹ · Milena Helmer Lauer¹ · Marcelo Henrique Gehlen¹ · Roberta Lopes Drekenner² · Carlos Roque Duarte Correia²

Received: 9 April 2021 / Accepted: 30 June 2021 / Published online: 9 July 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Two reactive phenanthrene derivatives, 4-(1H phenanthrol [9,10-d] imidazole-2-yl) benzaldehyde (PIB) and 6,9-dimethoxyphenanthro[9,10-c]furan-1,3-dione (PA) with high fluorescent quantum yields were prepared and used as fluorescent marker in fluorescence microscopy. In particular, silane modified μm Zeolite-L containing amino group ($-\text{NH}_2$) in the surface were labeled with the phenanthrene derivatives allowing good imaging resolution and spectroscopy measurements. The presence of a large Stokes shift of the probes due to their intramolecular charge-transfer character gives an advantage of the compounds in confocal laser fluorescence microscopy due to easy signal separation in excitation and emission wavelengths. On the other hand, these results open up the possibility of using these probes for visualization of Zeolite-based materials commonly used as catalysts in thermal and photochemical reactions.

Keywords Phenanthrene · Zeolite · Fluorescence · Lifetimes · Optical microscopy

Introduction

The labelling of micro and nano-systems with fluorescent probes is an important topic in chemistry and biochemistry and it has been extensively explored in optical microscopy for decades [1–6]. Standard and new fluorophores for labelling of synthetic polymers and proteins are well known and most of probes may be available from the chemical market but typically at a high cost [7]. On the other hand, reactive fluorescent dyes with emission signal modulated by the solvent or medium properties as well are more specific [8, 9]. Such fluorescent probes or markers found applications in fluorescence studies of micro and nano catalyst or solid support because they allow the visualization of the systems by fluorescence microscopy prior and during a thermal or photochemical process, and changes in solvent medium during reaction or presence of fluorescence quenchers may be indicated from the type of fluorescence signal recorded [10–12].

In addition, reactive chemosensors based on absorption or fluorescence are used for detection of metal ions [13, 14] or inorganic anion (CN^-) with high selectivity and sensitivity in aqueous solution as well as in biological cells [15, 16]. In this contribution, two new reactive phenanthrene derivatives with moderate to high fluorescent quantum yields were prepared and used as fluorescent markers of the free amino groups chemically bound to silane-modified μm Zeolite-L. This Zeolite L is a micrometer solid particle with elongated barrel shape displaying several open channels that allow encapsulation of molecules or surface functionalization forming inorganic–organic hybrid systems [17]. The presence of a large Stokes shift of the probes due to their intramolecular charge-transfer character gives advantage of the compounds in fluorescence microscopy measurements. These results open up the possibility of using the probes for visualization of Zeolite-based catalysts in situ chemical reactions at single-particle level.

✉ Marcelo Henrique Gehlen
marcelog@iqsc.usp.br

¹ Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

² Institute of Chemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Experimental

4-(1H phenanthrol [9,10-d] imidazole-2-yl) benzaldehyde (PIB). The fluorescent probe was prepared by standard method of Debus-Radziszewski imidazole synthesis

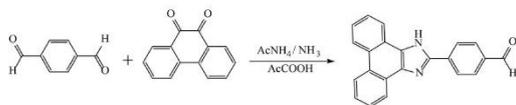


Fig. 1 Synthesis route of PIB

following a similar route described recently in the literature [18–20]. 9,10 phenanthraquinone (Sigma-Aldrich, 99%, 1.04 g, 5 mmol), terephthalaldehyde 0.80 g (Sigma-Aldrich, 99%, 6 mmol) were mixed with ammonium acetate/NH₄OH (0.05 mol) and dissolved in 15 mL of glacial acetic acid. The system was heated to 85–90 °C under argon atmosphere for 6 h. The solid compound was filtered and washed several times with cold water/ethanol, followed by recrystallization (¹H NMR (400 MHz, dmsO) δ 13.71 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.86 (dd, *J* = 15.1, 8.3 Hz, 2H), 8.56 (ddd, *J* = 24.8, 12.7, 4.7 Hz, 4H), 8.16–8.07 (m, 2H), 7.81–7.58 (m, 4H). IR main ν cm⁻¹(KBr pellet) 3380, 1680, 1600, 1425. TOF MS (C₂₂H₁₄N₂O) *m/z*: Calc. 322.11, found: 323.1182 [M+H]⁺). The reaction scheme is given in Fig. 1.

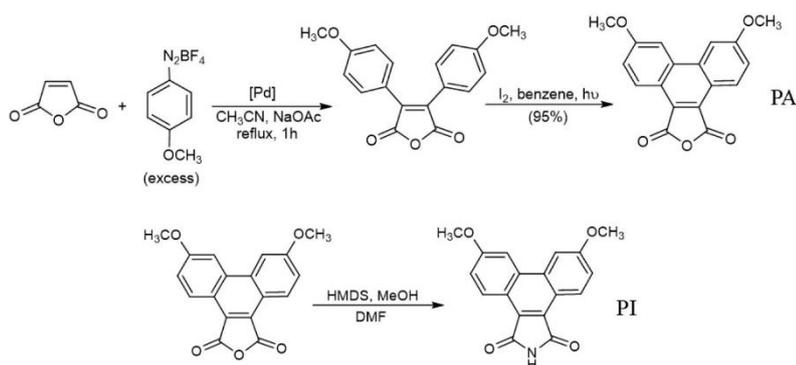
The 6,9-dimethoxyphenanthro[9,10-*c*]furan-1,3-dione (phenanthrene anhydride: PA) was prepared as described in Fig. 2. First, maleic anhydride underwent a two-step Heck-Matsuda arylation process to provide the 3,4-bis(4-methoxyphenyl)furan-2,5-dione as previously described [21], followed by photochemical cyclization under light irradiation in the presence of I₂ as follows: to a solution of the 3,4-bis(4-methoxyphenyl)furan-2,5-dione (261 mg, 0.84 mmol) in 300 mL of benzene, it was added molecular iodine (108 mg, 42 mmol). The resulting solution was then placed in a water bath with continuous water circulation and irradiated with ultraviolet light (Hanovia, 450 W) for 12 h. Next, the reaction mixture was extracted with EtOAc and washed with saturated Na₂S₂O₃ solution (3 × 10 mL). The organic phases were combined, dried over MgSO₄, filtered, and the solvent removed under vacuum. The residue

was then purified using silica-gel column chromatography (hexanes/EtOAc as eluent) to provide 231 mg of the 6,9-dimethoxyphenanthro[9,10-*c*]furan-1,3-dione (PA) as a yellow solid (89% yield). Spectroscopic characterization of the PA yielded: ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.08 (s, 3H); 7.44 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H); 7.95 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H); 8.85 (d, *J* = 9 Hz, 1H). ¹³C NMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ 55.7; 105.5; 118.8; 119.7; 125.7; 128.0; 135.4; 161.3 e 164.0.

The corresponding imide (PI) was obtained following the reaction procedure illustrated in Fig. 2. To a vial containing a solution of PA (1 mmol) in 4 mL of DMF, it was added 2.08 mL (10 mmol) of hexamethyldisilazane (HMDS) and 0.2 mL of methanol (5 mmol). The vial was then closed and left stirring for 24 h at room temperature. Next, the reaction was diluted with water and the resulting mixture extracted with ethylacetate (3 × 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the evaporated in vacuum to provide a residue, which was filtered through silica gel to give compound PI as a yellow solid in 83% yield. 6,9-dimethoxy-1H-dibenzo[*e,g*]isoindole-1,3(2H)-dione: ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (s, 3H); 7.46 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H); 7.93 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H); 8.85 (d, *J* = 9 Hz, 1H).

The characterization of the μmZeolite-L particles used in this study is reported elsewhere [22]. 20 mg of the solid were initially dried under vacuum and added to an argon purged solution of (3-aminopropyl) triethoxysilane (Aldrich) in cyclohexane. The system was gently heated up to 50 °C under constant stirring for 20 min. The solid was centrifuged, washed with 2-propanol and dried under vacuum before reacting with the phenanthrene anhydride (PA) or the benzaldehyde (PIB) derivatives. The reagents PIB or PA were then added to suspended μmZeolite-L particles (1:20 mass ratio) in isopropyl alcohol and the system was allowed to react for 2 h. The solid was centrifuged, washed several times with 2-propanol and dried under vacuum. The respective reaction schemes are illustrated in Fig. 3.

Fig. 2 Synthesis route of phenanthrene anhydride (PA) and the corresponding imide (PI)



Absorption and emission spectra of the compounds in different solvent were recorded with spectrophotometer model *UV-1800* and spectrofluorometer model *RF-5301 PC* both from Shimadzu Co. Fluorescence quantum yields (Φ_f) of samples were calculated using as standard 9,10-diphenylanthracene (DPA) ($\Phi_f=0.9$, cyclohexane) in the case of PA and PI and quinine sulfate ($\Phi_f=0.546$, H_2SO_4 0.5 mol/L) for PIB. Fluorescence decays were recorded by time correlated single photon counting (TCSPC) method using the laser spectrometer described elsewhere [23].

For microscope measurements, the $\mu\text{mZeolite-L}$ particles were deposited over clean glass coverslips by spin-coating drops of particles suspended in 2-propanol. Confocal fluorescence images were obtained using a custom-made instrument based on Olympus IX71 microscope with digital piezoelectric controller and stage (PI, E-710.3CD and P-517.3CD) for nanometric sample scanning. The excitation was provided by Coherent Cube, 405 nm, solid-state diode laser. The excitation beam was converted into a circularly polarized laser beam by using the $\lambda/2$ and $\lambda/4$ waveplates, models AHWP05M-600 and AQWP05M-600 from Thorlabs and focused on the sample with an objective Olympus, UPLFLN 100X. The emission signal was separated from the laser excitation beam using a dichroic cube (Chroma, z405lp) and notch filter (Semrock, NF02-405U-25). Emission photons were counted using an avalanche photodiode point detector (Perkin Elmer, SPCM-AQR-14) aligned with the 50-mm pinhole in the confocal line. Transistor-transistor logic detector signals were collected with a counter/timer card (NI 6601) and transferred to a personal computer for

2D plotting using a scanning control program written in C#. Images were registered using false-color mapping, reaching the best contrast enhancement according to the difference in intensity of the fluorescence signal. Fluorescence decays were measured by a single-photon timing technique using a counting board (Becker & Hickl, 140) with start laser pulses triggered by a photodiode (Pico-Quant TDA 200). Decays were analyzed by multiexponential fitting with deconvolution using the FAST software (Edinburgh Instruments). Emission spectra were obtained using a spectrometer (Maya 2000 Pro, Ocean Optics) fiber-coupled to right-side port of the Olympus IX71 microscope. True color images of the fluorescence samples were registered by Thorlabs DCU 223C color camera coupled to the binocular side port of the Olympus IX71 microscope.

Results and Discussion

Photophysical Properties in Solution

The absorption and emission maximum wavelength and emission quantum yields Φ_f of PIB, PA and PI in different solvents are reported in Table 1. Those compounds display a significant Stokes-shift in polar solvent larger than 80 nm. This would indicate an intramolecular charge-transfer (ICT) character due to the carbonyl EWG on the opposite side of phenanthrene donor moiety. This ICT character becomes more evident from the emission colors displayed by the compounds in different solvents upon excitation with UV light

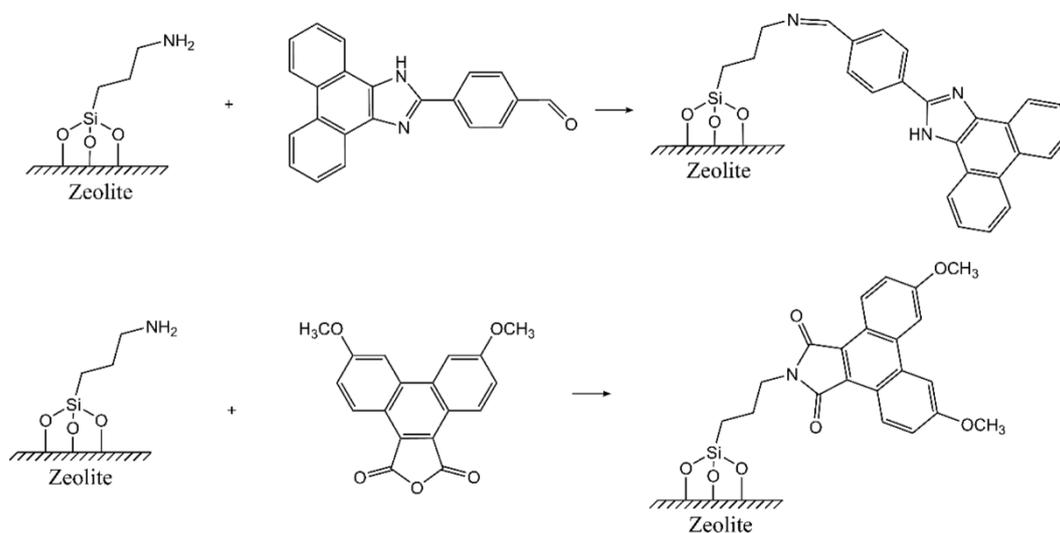


Fig. 3 Surface labeling of $\mu\text{mZeolite-L}$ particles with phenanthrene fluorophores

Table 1 Photophysical properties of phenanthrene-imidazole benzaldehyde (PIB), phenanthrene anhydride (PA) and phenanthrene imide (PI).

Compound	Solvent	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f
PIB	1,4-dioxane	374	459	0.48
	THF	375	455	0.66
	Ethyl acetate	374	463	0.49
	2-propanol	376	505	0.51
	Acetonitrile	373	487	0.45
PA	1,4-dioxane	391	464	0.66
	THF	396	468	0.72
	DMSO	408	505	0.10
	DMF	401	499	0.32
	Acetonitrile	408	496	0.56
PI	1,4-dioxane	397	488	0.92
	THF	398	477	0.69
	DMSO	402	504	0.57
	DMF	408	500	0.46
	Acetonitrile	402	501	0.54

λ_{abs} is the band maximum of the low energy transition

as illustrated in Fig. 4. Absorption and emission spectra of PIB, PA and PI in acetonitrile are illustrated in Fig. 5. The compounds have moderate to high Φ_f with some dependency on the type or polarity of the solvent. For PA and PI, Φ_f is higher than that of the precursor compounds without being cyclized [23] which points out that the preclusion of internal rotation due to phenanthrene ring formation is given less deactivation modes to the electronic excited-state.

The fluorescence decay of the compounds is biexponential in most of the solvents but with predominance of the

long-lived component which gives a practically linear slope in a log plot as exemplified in Fig. 6. The fluorescence decay components of the three phenanthrene derivatives are listed on Table 2. The only atypical behavior is found for PIB in 2-propanol. In such solvent, PIB fluorescence has a fast transient of 30 ps followed by a long-lived component of about 1.7 ns. The fast component could be ascribed to an excited-state tautomerization process assisted by 2-propanol hydrogen bonding with the imidazole N–H group which could modulate the transition from the prompt LE to ICT excited-state. Some of the values of decay times in biexponential fitting obtained for PIB are quite similar to the results reported by Krawczyk and coworker [19] with a fluorescence deactivation dominated by a long lived component of about 2 ns.

Fluorescent in Labeling $\mu\text{mZeolite-L}$

The fluorescence of the labelled $\mu\text{mZeolite-L}$ with PIB and PA were measured using confocal microscopy and typical images are shown in Fig. 7. Also, we measured the true emission color of samples as illustrated on the right side of each confocal image. The fluorescence images show that the fluorophore labelling is roughly homogeneously distributed because the intensity maps do not present large intensity gradients. On the other hand, the non-sharp definition of the microstructure is a result of the refraction index mismatch due to the deposition of the 3D $\mu\text{mZeolite-L}$ over glass surface without a condensed solvent medium (dry samples). On the other hand, the true color emission of the samples in the color palette of Fig. 4 corresponds to acetonitrile, thus indicating a highly polar surface of $\mu\text{mZeolite-L}$ reported by the molecular fluorophores attached to it. Comparing the confocal images, the PIB- $\mu\text{mZeolite-L}$ system has in general

Table 2 Fluorescence decay times and normalized amplitudes of the phenanthrene-imidazole benzaldehyde (PIB), phenanthrene anhydride (PA) and imide (PI)

Compound	Solvent	τ_1 (ns)*	τ_2 (ns)	b_1	b_2	χ^2_g
PIB	1,4-dioxane	0.38	2.27	0.12	0.88	1.27
	THF	0.24	2.02	0.08	0.92	1.04
	Ethyl acetate	0.23	2.50	0.29	0.71	1.15
	2-propanol	0.03	1.72	0.88	0.12	1.12
	Acetonitrile	0.21	2.44	0.13	0.87	1.08
PA	1,4-dioxane	0.94	8.45	0.05	0.95	1.15
	THF	1.17	9.03	0.05	0.95	1.18
	DMSO	0.88	3.60	0.13	0.87	1.35
	DMF	1.59	10.73	0.06	0.94	1.09
	Acetonitrile	1.45	11.75	0.06	0.94	1.09
PI	1,4-dioxane		12.98		1	1.25
	THF	1.10	13.24	0.15	0.85	1.18
	DMSO	1.84	14.70	0.08	0.92	1.11
	DMF	1.65	14.43	0.06	0.94	1.15
	Acetonitrile	1.34	16.29	0.05	0.95	1.13

*Standard deviate in decay time is ± 0.02 ns

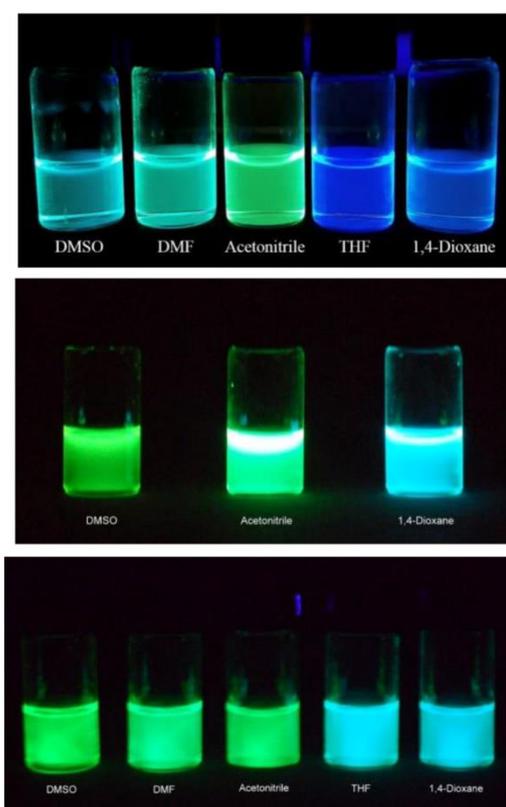


Fig. 4 Pictures of liquid solution of PIB, PA, and PI under UV irradiation (top to bottom). Solvents (left to right) are DMSO (dimethyl sulfoxide), DMF (dimethyl formamide), acetonitrile, tetrahydrofuran, 1,4 dioxane. PA sample appears only in DMSO, acetonitrile and 1,4 dioxane

much higher background signal outside the particle which could indicate that some of the fluorophore is leaking most probable to the less stability of the imine bond that could undergoes hydrolysis due to the acid character of the zeolite surface. Such drawback could be amended by reducing the imine to amine to prevent hydrolysis.

The fluorescence decay profiles of the $\mu\text{mZeolite-L}$ samples labelled with PIB and PA are shown in Fig. 8. Contrasting with the decay in homogeneous solvent, in $\mu\text{mZeolite-L}$ the fluorophores show a highly non-exponential decay which may be ascribed to the heterogeneous character of the zeolite surface and also to possible energy migration to neighboring fluorophores by dipole–dipole long-range interaction. In the case of PIB- $\mu\text{mZeolite-L}$, the decay is well represented by three components of 0.10 (31%), 1.12 (34%) and 3.90 ns (35%) while for PI- $\mu\text{mZeolite-L}$ the components are 0.43 (4%), 4.70 (18%) and 17.5 ns (78%). The presence of a

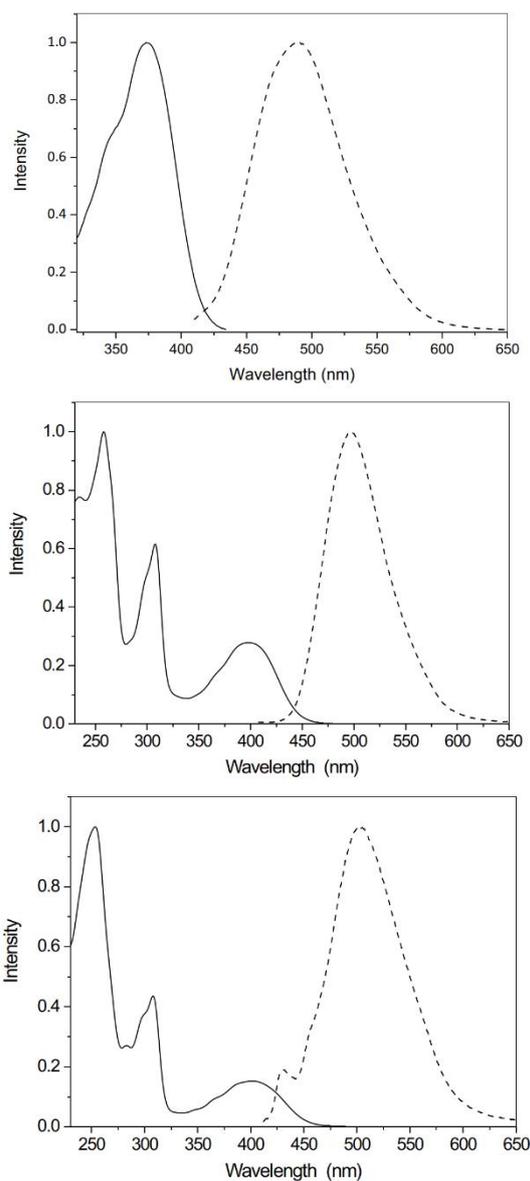


Fig. 5 Absorption (—) and emission spectra (---) of PIB, PA and PI in acetonitrile from top to bottom

leading long-lived component in the case of PI- $\mu\text{mZeolite-L}$ gives a higher emission efficiency and better confocal image resolution as depicted in Fig. 7.

The emission spectra of the samples are slightly red-shifted and the band FWHM is somewhat larger when compared to the corresponding emission band in homogeneous

Fig. 6 Fluorescence decay of PIB (yellow) and PA (blue) in acetonitrile, instrument response function (irf) is represented by green and magenta profiles

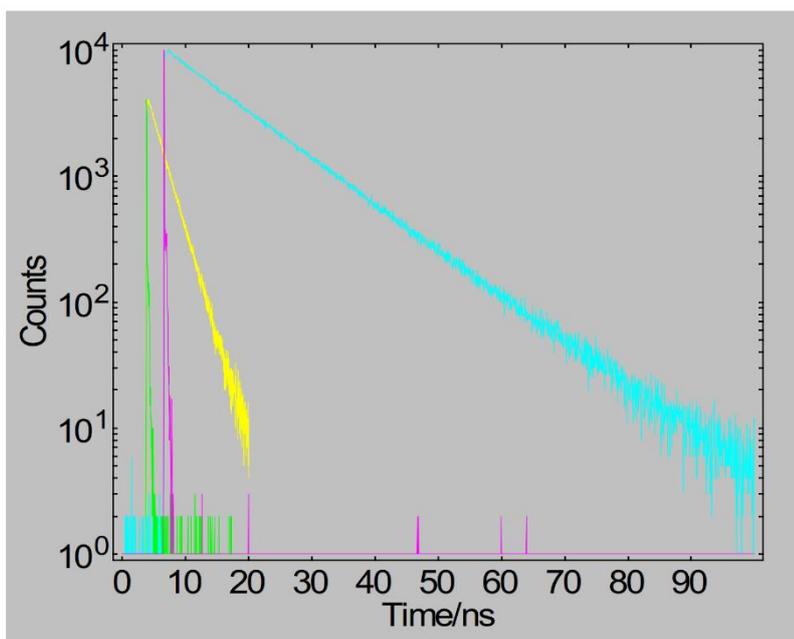
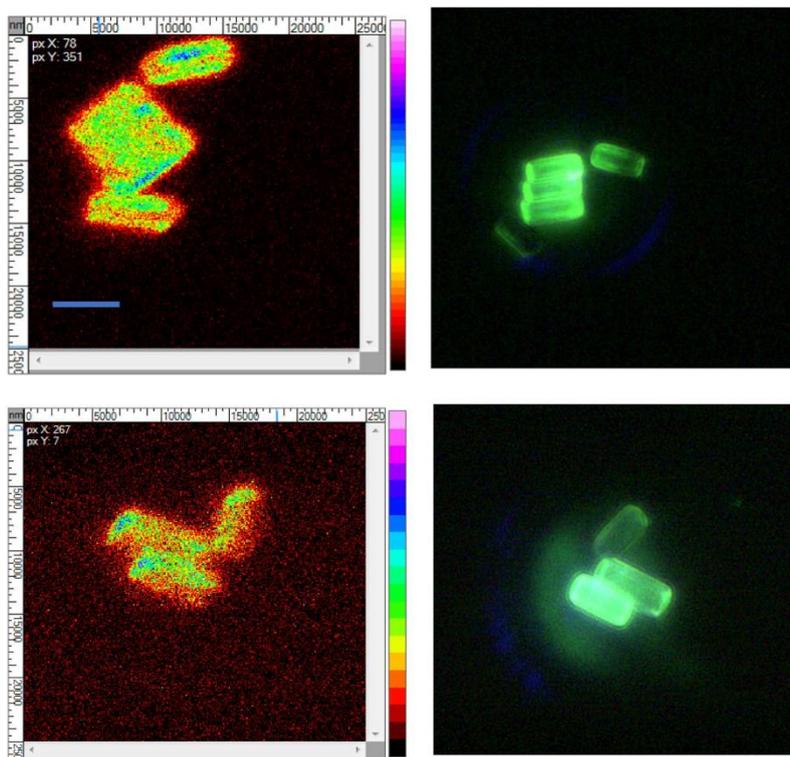


Fig. 7 Confocal fluorescence image of PI (upper case) and PIB (lower case) chemically bound to $\mu\text{mZeolite-L}$. Right-side images are the corresponding pseudo-wide field true color imaging of the same objects recorded. Laser excitation at 405 nm, scale bar = 5 μm



solvent. In the case of PI- μ Zeolite-L, the emission maximum is 520 nm being 20 nm red-shifted when compared to the emission spectra in acetonitrile (see Table 1 and emission spectrum in the bottom of Fig. 8). For PIB- μ Zeolite-L, the maximum is about 518 nm indicating a red-shift is about 31 nm when compared to emission maximum of free PIB in acetonitrile reported in Table 1.

Considering that the imine bridge may undergo hydrolysis or could be less photo-stable under UV irradiation, the

PIB- μ Zeolite-L was converted into its amine form by hydrogenation using NaBH_4 . The system emission was again measured and the results are presented in Fig. 9. A better contrast in the fluorescence images are observed owing to the low background indicating that the conversion from imine to amine resulted in more stable labeling and less leaching during sample preparation. Nevertheless, the emission

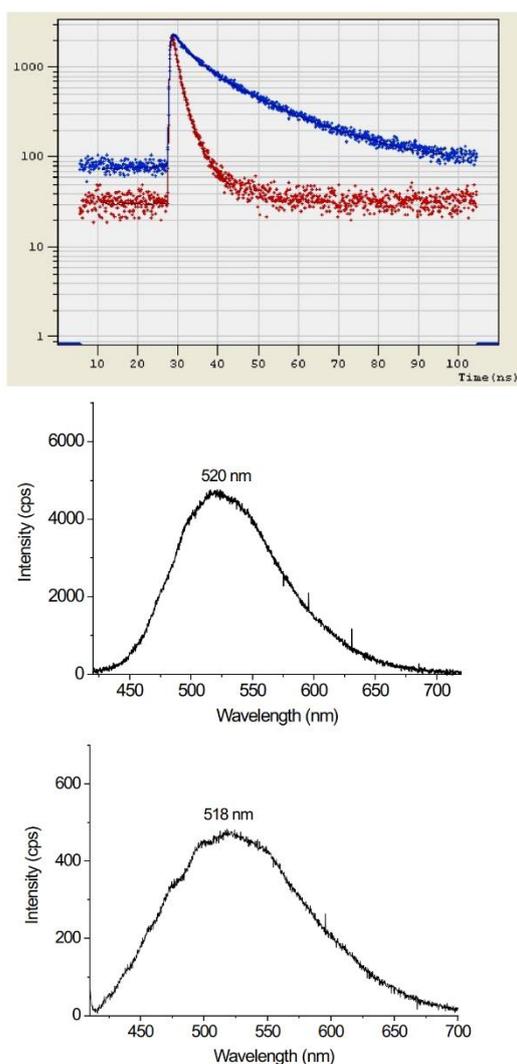


Fig. 8 Fluorescence decay profiles (top) of PA- μ Zeolite-L (blue) and PIB- μ Zeolite-L (red). Emission spectra of PA- μ Zeolite-L particle (middle) and PIB- μ Zeolite-L (bottom) with excitation at 405 nm

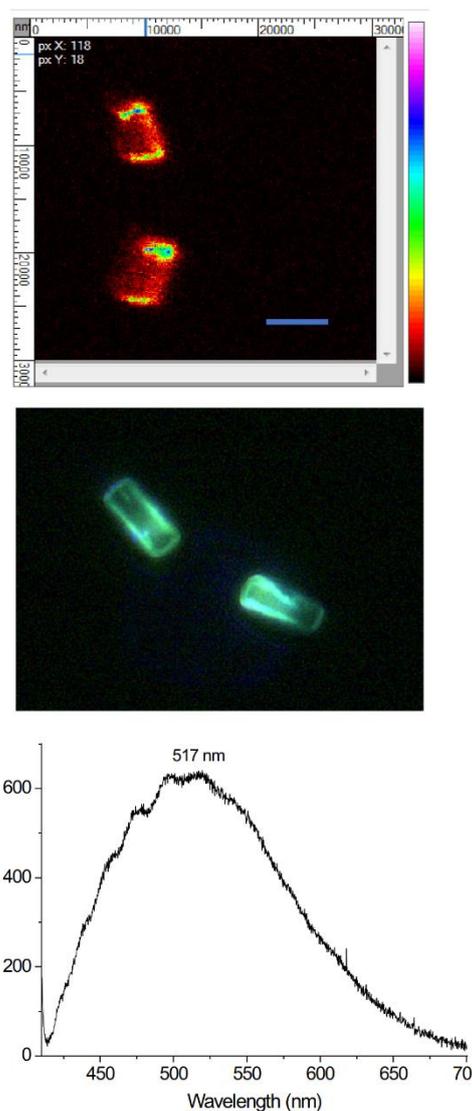


Fig. 9 Fluorescence images of confocal (top) and pseudo-wide field real color image (middle) and emission spectrum of PIB- μ Zeolite-L particles (bottom) after conversion of the imine to amine in the labeling group. scale bar = 5 μ m

spectra obtained is very similar to the precursor system with maximum at 517 nm.

Conclusions and Remarks

Two reactive phenanthrene derivatives were prepared and applied as fluorescent markers for free amino groups present in silane modified $\mu\text{mZeolite-L}$. The presence of a large Stokes shift of the probes due to their intramolecular charge-transfer character and moderate to high emission quantum yield allow easy and efficient fluorescence imaging of the zeolite particles. The system PI- $\mu\text{mZeolite-L}$ has improved performance because it combines higher emission signal and better chemical and photochemical stability of the imide when compare to the imine bond in PIB- $\mu\text{mZeolite-L}$. Nevertheless, the imine bridge can be easier reduced to amine after labeling which enhances its chemical and photochemical stability given more defined images with small change in emission spectrum when compared with its precursor system.

Author's Contribution Izadora Fonseca Reis performed the fluorescence microscopy experiments and sample preparation. Larissa Schumekel Foltran worked in the synthesis of the compounds. Milena Helmer Lauer contributed to the spectroscopic measurements. Marcelo Henrique Gehlen contributed to the conception of the study and the writing of the manuscript. Roberta Lopes Drekenner worked in the synthesis of the compounds. Carlos Roque Duarte Correia contributed to organic synthesis design and support as well as constructive discussion.

Funding This research was supported by the following Brazilian Agencies: São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant 2021/01718–9 and grant 17660–7/2018, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 303997/2017–6, INCT-Catalysis/CNPq grant 444061/2018–5 and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) grant 8887.334692/2019.

Declarations

Ethical Approval This article does not contain any studies with human or animal subjects.

Conflicts of Interest There are no conflicts of interest to declare.

References

- Udhayakumari D, Inbaraj V (2020) A Review on Schiff Base Fluorescent Chemosensors for Cell Imaging Applications. *J Fluoresc* 30:1203–1223
- Kim D, Ma D, Kim M et al (2017) Fluorescence labeling of protein using blue-emitting 8-amino-BODIPY derivatives. *J Fluoresc* 27:2231–2238
- Pak YL, Swamy KMK, Yoon J (2015) Recent progress in fluorescent imaging probes. *Sensors* 15:2437424396
- Chowdhury S, Rooj B, Dutta A, Mandal U (2018) Review on recent advances in metal ions sensing using different fluorescent probes. *J Fluoresc* 28:999–1021
- Terai T, Nagano T (2008) Fluorescent probes for bioimaging applications. *Curr Opin Chem Biol* 12(5):515–521
- Lauer MH, Vranken C, Deen J et al (2017) Methyltransferase-directed covalent coupling of fluorophores to DNA. *Chem Sci* 8:3804–3811
- Molecular Probes Handbook (2010) A Guide to Fluorescence Probes and Labeling Technologies, 11th Edition
- Suzuki Y, Yokoyama K (2005) Design and synthesis of intramolecular charge transfer-based fluorescent reagents for the highly-sensitive detection of proteins. *J Am Chem Soc* 127:17799–17802
- Pereira RV, Gehlen MH (2007) Polymerization and conformational transition of poly(methacrylic acid) probed by electronic spectroscopy of aminoacridines. *Macromolecules* 40:2219–2223
- Matos MS, Hofkens J, Gehlen MH (2008) Static and dynamic bimolecular fluorescence quenching of porphyrin dendrimers in solution. *J Fluoresc* 18:821–826
- Ferreira APG, Frederice R, Janssen KPF, Gehlen MH (2011) Dually fluorescent silica nanoparticles. *J Lumin* 131:888–893
- Gehlen MH, Sabatini CA (2014) Enzymatic hydrolysis of quinzarin diester by lipase in silica nanoparticles investigated by fluorescence microscopy. *J Nanopart Res* 16(2):2–7
- Kundu A, Anthony SP (2017) Triphenylamine based reactive coloro/fluorimetric chemosensors: Structural isomerism and solvent dependent sensitivity and selectivity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 189:342–348
- Kundu A, Pichaimani J, Madhu V, Sakthivel P, Ganesamoorthy R, Anthony SP (2017) Bay functionalized peryleneimide with pyridine positional isomers: NIR absorption and selective colorimetric/fluorescent sensing of Fe^{2+} and Al^{3+} ions. *J Fluoresc* 27:491–500
- Robbins T, Qian H, Su X, Hughes RP, Aprahamian I (2013) Cyanide detection using a triazolopyridinium salt. *Org Lett* 15(10):2386–2389
- Agarwalla H, Gangopadhyay M, Sharma DK, Basu SK, Jadhav S, Chowdhury A, Das A (2015) Fluorescent probe for detection of cyanide ion in aqueous medium: Cellular uptake and assay for β -glucosidase and hydroxynitrile lyase. *J Mater Chem B* 3:9148–9156
- Fois E, Tabacchi G, Devaux A, Belser P, Brühwiler D, Calzaferri G (2013) Host-Guest interactions and orientation of dyes in the one-dimensional channels of zeolite L. *Langmuir* 29:9188–9198
- Kong F, Liu Q, Wu X, Wang Z, Chen Q, Chen L (2011) 2-(4-Formylphenyl) phenanthroimidazole as a colorimetric and fluorometric probe for selective fluoride ion sensing. *J Fluoresc* 21:1331–1335
- Krawczyk P, Jędrzejewska B, Pietrzak M, Janek T (2016) Synthesis, spectroscopic, physicochemical properties and binding site analysis of 4-(1H-phenanthro[9,10-d]-imidazol-2-yl)-benzaldehyde fluorescent probe for imaging in cell biology: Experimental and theoretical study. *J Photochem Photobiol B Biol* 164:112–122
- Gehlen MH, Foltran LS, Kienle DF, Schwartz DK (2020) Single-Molecule Observations Provide Mechanistic Insights into Bimolecular Knoevenagel Amino Catalysis. *J Phys Chem Lett* 11:9714–9724
- Canto K, Rodrigo RS, Biajoli AFP, Correia CRD (2013) Expedient synthesis of the marine natural products prepolyctrin A, as well as polycitrins A and B, via Heck Arylations. *Eur J Org Chem* 8004–8013
- Lencione D, Gehlen MH, Trujillo LN, Leitão RCF, Albuquerque RQ (2016) The spatial distribution of the photostability of thionine in zeolite L nanochannels investigated by photobleaching Lifetime Imaging Microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 15:398–404
- Lauer MH, Drekenner RL, Correia CRD, Gehlen MH (2014) Fluorescence from bisaryl-substituted maleimide derivatives. *Photochem Photobiol Sci* 13:859–866

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.