



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

DOUGLAS CARDOSO BRANDÃO

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPOSTOS
FLUORESCENTES DERIVADOS DO BENZOTIADIAZOL
PRODUZIDOS PARA O IMAGEAMENTO CELULAR

Brasília

2017

DOUGLAS CARDOSO BRANDÃO

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
COMPOSTOS FLUORESCENTES DERIVADOS DO
BENZOTIADIAZOL PRODUZIDOS PARA O IMAGEAMENTO
CELULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo
Corrêa

Coorientadora: Prof. Dra. Bruna Cândido
Guido

Brasília

2017

DOUGLAS CARDOSO BRANDÃO

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
COMPOSTOS FLUORESCENTES DERIVADOS DO
BENZOTIADIAZOL PRODUZIDOS PARA O IMAGEAMENTO
CELULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Dr. Marcelo Pelajo Machado (Membro Titular)

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (Membro Titular)

Prof. Dr. Wender Alves da Silva (Membro Suplente)

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a tal ponto sem o valioso apoio de diversas pessoas: A Deus por me conceder a vida, saúde, coragem, força e proteção para enfrentar as batalhas. Aos meus pais, Sebastião e Maura, pois nada adiantaria minha caminhada se vocês não tivessem me ensinado os primeiros passos. Aos meus irmãos Iris, Luis e Geany, embora distantes, geograficamente, sempre se fizeram presentes com um cuidado inexplicável. Aos meus sobrinhos Igor e Gabriel, pelo carinho e compreensão da minha ausência. A minha sobrinha e afilhada Gabrielly, que com seu sorriso sempre me trouxe força e alegria. A todos os meus familiares, vós, tios (as), padrinhos (as) e primos (as) pela torcida incondicional, em todos os momentos.

Aos meus eternos amigos de graduação Elaine, Maryanne, Marcos, Tais e Samely, sinto profunda gratidão, pois tenho amigos maravilhosos, verdadeiros e eternos. Obrigado por terem ficado na minha vida e todos os dias me provarem que são os melhores. Aos meus amigos em especial ao Neurimar, Laine, Nathália, Nayara, Elias e Thaís Duarte pelo otimismo e amizade, de valor imensurável, que sempre estiveram ao meu lado e que mesmo longe me fazem companhia, eu agradeço de coração! Ao Ricardo pelo compartilhamento de experiências e convivência. As minhas eternas professoras Hélen Carla, Luciana Delfino e Larissa Keles, pelas palavras de ânimo e por serem referência para mim em diversos momentos.

A Universidade de Brasília (UnB) pelo acolhimento e apoio para a realização desta dissertação. Ao meu orientador, professor Dr. José Raimundo Corrêa, por seu apoio, amizade, dedicação, competência e atenção nas revisões e sugestões para a conclusão deste trabalho. A minha coorientadora Bruna Cândido Guido, que me auxiliou em todas as dúvidas e me ajudou em todos os momentos em que precisava. Sou enormemente grato a você, excelente pesquisadora e ser humano, a qual me espelha! Além disso, muito obrigado também por me confiar a fazer parte do seu projeto. Ao professor Brenno Amaro, pelo apoio e colaboração com esta pesquisa. A Lorena Andrade, que me possibilitou conhecer o laboratório e o programa de pós graduação em Patologia Molecular, me incentivando e fornecendo todos os conselhos. Obrigado por toda ajuda, amizade e carinho verdadeiro, te adoro muito! A Dani Carrilho, que no início iluminou o meu caminho, impulsionando o começo dos meus experimentos, que

com seu jeito engraçado, me mostrou a importância e leveza dos erros e acertos. Sou eternamente grato a você. A Nabylla Paixão, um anjo que surgiu em minha vida me mostrando os caminhos certos e sempre dando aquela força. Admiro-lhe muito pela forma de pensar e maneira em tratar o ser humano. A Yasmin (linda) que identifiquei desde o primeiro instante, que com sua carisma, sempre deixou os meus dias mais alegres. Obrigado por todas as ajudas nos momentos em que mais precisei, pelas boas conversas e pelas opiniões que me guiaram. A Núbia, que me trazia tantas lembranças das nossas “Minas Gerais” e que em todos os momentos transmitia paz com sua humildade e sabedoria. Gostaria de agradecer a todas as ajudas e momentos da pessoa mais fofa da Microscopia Eletrônica, grande Ingrid Graciele, ser humano de um imenso coração, obrigado por tudo. A Ana Luisa Barbosa, companheira de todas as horas, que esteve comigo em várias ocasiões, você foi e será a minha irmã de Brasília. A todos que passaram e hoje estão no laboratório de Microscopia Eletrônica: Shaiane, Sethéfanny Andrade, Ágata, Samira, Lídia, Mariane, Marina, Monique, José Assumpção, Mírian, Ana Gouvêa, Natália, Karine, Sthefany, Guilherme e José Henrique. Obrigado pelo acolhimento e convivência harmoniosa, estarei sempre à disposição. A todos os professores da Pós-Graduação, pelos ensinamentos e direcionamentos. A todos os laboratórios parceiros, Brenno e Camila (Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica); Tatiane (Laboratório de Imunologia); Vicente (Parasitologia); Dagon (Laboratório de Botânica) e Embrapa Agroenergia; Rhaul e Diego (Laboratório de Genética) e Kelly, Raquel e Gabriel (Laboratório de Imunologia), meu muito obrigado! Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. Por fim, a todos aqueles que, com suas formas peculiares de ajudar, foram fundamentais na realização dessa conquista.

“Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”. (Ana Vilela)

Resumo

A marcação celular específica vem sendo continuamente aprimorada visando sua aplicação como ferramenta para a pesquisa científica e o diagnóstico. O estudo de compartimentos celulares baseado em fluorescência tem auxiliado grandemente na investigação de processos químicos e biológicos essenciais a manutenção da vida das células. Moléculas como o benzotiadiazol, possibilitam a síntese de diversos derivados fluorescentes a partir do seu forte núcleo aceptor de elétrons. A simples confirmação da atividade fluorescente intracelular já habilita estas moléculas como potenciais compostos repórteres que poderão ser acoplados a outras moléculas que apresentem avidéz e estabeleçam ligações estáveis específicas com biomoléculas. Atualmente, existem diversos marcadores comerciais para marcação celular, porém estes agentes apresentam diversas desvantagens que tornam o seu uso limitado. Nosso grupo vem buscando desenvolver novas moléculas fluorescentes para aplicação em bioimageamento, visando suprir as limitações dos agentes fluorescentes comerciais de referência. Além disso, seu desenvolvimento se enquadra nos preceitos da química verde. Deste modo, trabalhamos com o núcleo 2,1,3 benzotiadiazol (BTD) que possui diversas características ideais para sondas fluorescentes. Esta pesquisa apresenta três moléculas derivadas deste núcleo BTD (BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3) e visa relacionar a estrutura química, solubilidade e o alvo celular em que são seletivas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 apresentam afinidade pela membrana plasmática, possivelmente se associando aos glicerofosfolípídeos de membrana. Sendo que o composto BJD#UnB1 apresenta o seu pico de fluorescência dentro da faixa do azul e o composto BJD#UnB2 apresenta seu pico de fluorescência dentro da faixa do verde, no espectro de luz visível. A solubilidade destes dois compostos foi variada, onde o composto BJD#UnB2 apresentou melhor solubilidade. Apesar da marcação no citoplasma apresentada por ambos os compostos, o mesmo se repetiu com o marcador comercial de membrana plasmática CellMask®. O composto BJD#UnB3 apresentou especificidade por corpúsculos lipídicos, emitindo intenso sinal de fluorescência na faixa do verde no espectro de luz visível, esta molécula apresentou ainda solubilidade similar a do composto BJD#UnB1. Quando comparado ao Bodipy®, o composto aqui testado (BJD#UnB3) apresentou maior intensidade de fluorescência que o marcador comercial de referência. Além disso, este composto foi excelente para marcações em outros modelos como *C. elegans*, Zebrafish e microalgas. Além destas propriedades, todos os marcadores aqui testados apresentaram ausência de citotoxicidade, fotoestabilidade durante o uso e estabilidade em solução e no meio intracelular.

Palavras chave: Bioimagens; Fluorescência; Benzotiadiazol; Membrana plasmática; Lipídeos.

Abstract

A specific cellular marking, which is continuously improved aiming its application as a tool for scientific research and diagnosis. Molecules, such as benzothiadiazole, enable the production of several fluorescent molecules derivatives, keeping its strongly electron acceptor nucleus. The simple determination of intracellular fluorescent activity has already enabled these molecules to work as potential reporters that can be coupled to other molecules that show avidity and establish specific stable bonds with other biomolecules. Currently, there are several markers used for fluorescent labeling, however, many of them show several disadvantages restricting their usage. Our group has been searching for new fluorescent molecules for bioimaging research, aiming to overcome the limitations of the commercial fluorescent agents. In addition, its development is based on processes that minimize environmental waste. Thus, we work with the 2,1,3-benzothiadiazole (BTD) nucleus that has several interesting features for fluorescent probes. This research presents three molecules derived from BTD nucleus (BJD#UnB1, BJD#UnB2 and BJD#UnB3) and aims to correlate their chemical structure, solubility and cellular target through *in vitro* and *in vivo* experiments. The results demonstrated that BJD#UnB1 and BJD#UnB2 compounds show affinity to plasma membrane, possibly associating with membrane glycerophospholipids. Being that BJD#UnB1 compound shows higher fluorescence intensity in the blue channel and the BJD#UnB2 compound presents higher fluorescence intensity in the green channel. The solubility of these probes varied, and the compound BJD#UnB2 showed better solubility. Despite the inespecific and weaker cytoplasmic labeling compared to cell membrane staining exhibited by both compounds, this pattern was also observed for the commercial CellMask® plasma membrane marker. Compound BJD#UnB3 exhibited specificity for lipid vesicles, emitting intense fluorescence signal in the green channel and exhibiting similar solubility to compound BJD#UnB1. Compared to Bodipy®, the compound tested in this work (BJD # UnB3) showed higher fluorescence intensity than the commercial probe. Besides, this compound was excellent for staining other models such as *C. elegans*, Zebrafish and microalgae. In addition, all markers showed photostability and no cytotoxicity during their use and they were stable in solution or in intracellular medium.

Keywords: Bioimaging; Fluorescence; Benzothiadiazole; Plasma membrane; Lipids.

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de Jablonski	18
Figura 2. Espectro eletromagnético visível.....	19
Figura 3. Pico de absorção e emissão máxima	20
Figura 4. Diferentes marcações produzidas por sondas fluorescentes comerciais.....	29
Figura 5. Mitocôndrias vistas por microscópio de ultra resolução.....	31
Figura 6. Esquema comparativo de diferentes tipos de reações	32
Figura 7. A química verde e seus 12 princípios	34
Figura 8. Estrutura do 2,1,3 benzotiadiazol.....	36
Figura 9. Derivados do benzotiadiazol produzidos pelo nosso grupo.....	37
Figura 10. Imageamento Celular.....	41
Figura 11. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas com BJD#UnB1 ou DMSO em concentração de 100, 10 e 1 μ M, por 24 horas de tratamento.....	52
Figura 12. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas com BJD#UnB2 ou DMSO em concentração de 100, 10 e 1 μ M, por 24 horas de tratamento.	52
Figura 13. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas com BJD#UnB3 ou DMSO em concentração de 100, 10 e 1 μ M, por 24 horas de tratamento	53
Figura 14. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com BJD#UnB3 (10 μ M) e Hidrazina (200 μ M).....	53

Figura 15. Marcação de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com DMSO concentração de 0,3% por 24 horas de tratamento.....	55
Figura 16. Marcação de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas pré fixadas com DMSO concentração de 0,3% por 24 horas de tratamento.....	56
Figura 17. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com BJD#UnB1 na concentração de 10µM por 24 horas de tratamento.....	58
Figura 18 Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas pré fixadas com BJD#UnB1 na concentração de 10µM por 24 horas de tratamento.....	59
Figura 19. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com BJD#UnB2 na concentração de 10µM por 24 horas de tratamento.....	60
Figura 20. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas pré fixadas com BJD#UnB2 na concentração de 10µM por 24 horas de tratamento.....	61
Figura 21. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com Hidrazina na concentração de 200µM por 24 horas de tratamento.....	63
Figura 22. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas pré fixadas com Hidrazina na concentração de 200µM por 24 horas de tratamento.....	64
Figura 23. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com BJD#UnB3 na concentração de 10µM por 24 horas de tratamento.....	66
Figura 24. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas pré fixadas com BJD#UnB3 na concentração de 10µM por 24 horas de tratamento.....	67

Figura 25. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas vivas com BJD#UnB3 e Hidrazina nas concentrações de 10 e 200µM, respectivamente, por 24 horas de tratamento	69
Figura 26. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e não-tumoral HUVEC, incubadas pré fixadas com BJD#UnB3 e Hidrazina nas concentrações de 10 e 200µM, respectivamente, por 24 horas de tratamento	70
Figura 27. Gráfico da intensidade de fluorescência no canal do vermelho nas linhagens MDAMB-231 e HUVEC	71
Figura 28. Marcação de células de linhagem tumoral MDA-MB-231 e MCF-7, incubadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3 e Iodeto de propídio	72
Figura 29. Células MCF-7 marcadas com BJD#UnB1, BJD#UnB2 e co-marcadas com o agente comercial CellMask®.	73
Figura 30. Células MDAMB-231 marcadas com o composto BJD#UnB3 e Bodipy®.	74
Figura 31. Projeção 3D do marcador comercial Bodipy®, do composto BJD#UnB3 e a co-marcação (Bodipy® + BJD#UnB3)	75
Figura 32. Marcação no modelo Zebrafish.....	76
Figura 33. Marcação no modelo <i>C. elegans</i>	78
Figura 34. Marcação em microalgas.....	79
Figura 35. Quantificação da intensidade da fluorescência do BJD#UnB1 em células MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC.	81
Figura 36. Quantificação da intensidade da fluorescência do BJD#UnB2 em células MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC	82
Figura 37. Quantificação da intensidade da fluorescência do BJD#UnB3 e Hidrazina em células MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC	83
Figura 38. Células MDAMB-231 incubadas com composto BJD#UnB2 em meios L15, RPMI, PBS e PBS pH 7,6	85
Figura 39. Células HUVEC incubadas com composto BJD#UnB3 em meios L15, RPMI, PBS e PBS pH 7,6	86

Figura 40. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231, incubadas com BJD#UnB3 na concentração de 10 μ M, em L15 e PBS, por 1 hora de tratamento.....	.87
Figura 41. Avaliação da estabilidade do composto BJD#UnB1 em solução e nas linhagens celulares MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC por um período de cinco horas.....	88
Figura 42. Avaliação da estabilidade do composto BJD#UnB2 em solução e nas linhagens celulares MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC por um período de cinco horas.....	89
Figura 43. Avaliação da estabilidade do composto BJD#UnB3 e Hidrazina em solução e nas linhagens celulares MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC por um período de cinco horas.....	90
Figura 44. Renderização em 3D e corte ortogonal de células MDAMB-231, <i>C elegans</i> e Microalgas	92

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole, diidroclorida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FITC	Fluoresceína
L15	Meio Leibovitz
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NGM	Nematode growth media
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Iodeto de propídeo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

Resumo	iii
Abstract	vii
Índice de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1. Introdução	15
1.1. Espectroscopia, Luminescência, Fotoluminescência e Fluorescência.....	15
1.2. Agentes fluorescentes	22
1.2.1. Aplicações e exemplos de sondas comerciais.....	24
1.3. O desenvolvimento de novas moléculas fluorescentes e as reações multicomponentes.....	29
1.4. Benzotiadiazol e seus derivados	35
1.5. Microscopia e Imageamento Celular	35
2. Justificativa	41
3. Objetivos.....	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. Materiais e Métodos	43
4.1. Manutenção de células normais e tumorais.....	43
4.2. Testes de solubilidade dos compostos.....	43
4.3. Avaliação da viabilidade celular	43
4.4. Marcação fluorescente em células de mamíferos (ensaios <i>in vitro</i>).....	44
4.4.1. Co-marcção dos compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 com CellMask®.....	45

4.4.2. Marcação de lipídeos intracelulares com marcador comercial Bodipy® e o composto BJD#UnB3.....	45
4.5. Marcação fluorescente em Zebrafish (ensaios <i>in vivo</i>)	46
4.5.1. Marcação de larvas de Zebrafish com derivados fluorescentes do benzotiadiazol.....	46
4.5.2. Marcação de Zebrafish com CellMask®.....	46
4.5.3. Marcação de Zebrafish com Bodipy®.....	47
4.6. Marcação fluorescente em <i>Caenorhabditis elegans</i> (ensaios <i>in vivo</i>)	47
4.6.1. Marcação de <i>C. elegans</i> com o derivado fluorescente BJD#UnB3.....	47
4.6.2. Marcação de <i>C. elegans</i> com DAPI.....	48
4.7. Marcação fluorescente em Microalgas (ensaios <i>in vitro</i>).....	48
4.8. Análise quantitativa da fluorescência emitida <i>in vitro</i>	48
4.9. Quantificação e comparação da intensidade da fluorescência entre diversas condições de tratamento	49
4.10. Avaliação da estabilidade dos compostos fluorescentes (BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3) em função do tempo.....	50
4.11. Análise de renderização 3D (Z-stack).....	50
4.12. Análises Estatísticas	51
5. Resultados.....	51
5.1. Viabilidade Celular.....	51
5.2. Marcação fluorescente em células de mamíferos (ensaios <i>in vitro</i>).....	54
5.3. Confirmação de marcação específica	72
5.4. Marcação fluorescente em Zebrafish (ensaios <i>in vivo</i>)	75
5.5. Marcação fluorescente em <i>C. elegans</i> (ensaios <i>in vivo</i>).....	77
5.6. Marcação fluorescente em Microalgas (ensaios <i>in vitro</i>).....	78

5.7. Quantificação da intensidade de fluorescência apresentada pelos compostos fluorescentes	80
5.8. Análise da influência do pH do meio de tratamento na intensidade média de fluorescência	84
5.9. Avaliação da estabilidade dos compostos fluorescentes em função do tempo.....	87
5.10. Análise de renderização 3D (Z-stack).....	91
6. Discussão.....	93
7. Conclusões e Perspectivas.....	99
8. Referências	100

1. Introdução

1.1. Espectroscopia, Luminescência, Fotoluminescência e Fluorescência

Os primeiros registros de observações de emissões luminosas vieram da Grécia Antiga, e foram relatadas por Aristóteles a partir da observação de peixes deteriorados. Nicolas Monardes, no ano de 1965, registrou a visualização de fluorescência em uma amostra líquida, mais precisamente um extrato de madeira, que emitia a luz em um tom azulado quando misturado em água (REZENDE, 2016). Os estudos de fluorescência feitos em materiais vegetais foi alvo de pesquisa no século XVI, pelos cientistas Athanasius Kircher, Robert Boyle, Issac Newton e Robert Hooke (TATSCH, 2008; SMITH & DENT, 2005).

Em sólidos, a fluorescência foi descoberta acidentalmente em 1603, por Bolognian Vincenzo Cescariolo, que após o aquecimento de sulfato de bário passou a observar uma emissão de luz avermelhada por um determinado período de tempo quando o material era mantido no escuro. Em meados de 1700, vários tipos de luminescência oriundos de fenômenos distintos foram relatados (TRANQUILIN, 2013; GUCHHAIT et al., 2010).

Em 1852, o cientista George Gabriel Stokes criou o termo fluorescência, que se deriva da palavra *fluoride*, durante o período que passou estudando a emissão de luz no mineral fluorita após ser irradiado por luz visível. Foi o primeiro cientista a explicitar claramente este tipo de emissão luminosa (fotoluminescência), e através disto, propôs a “Lei de Stokes”, que estabelece que o comprimento de onda de uma excitação fluorescente é sempre menor do que o da emissão. Parte da energia de excitação recebida pela estrutura atômica é liberada na forma de calor (cinética) através da colisão de moléculas excitadas com outras moléculas (NETO, 2006; GUCHHAIT et al., 2010).

Pode-se perceber que no século XX, houve grande aumento nas metodologias que englobam a fluorescência e grande parte do impulso e progresso da ciência foi devido à aplicação destas ferramentas analíticas. Nas áreas biológicas e da saúde, este método se enquadra na Microscopia, Biologia Molecular, Imunoensaios, Engenharia Genética, Análises Toxicológicas e Clínicas, dentre outras áreas. No fim deste século

houve a adaptação da técnica de PCR utilizando sondas fluorescentes para análises quantitativas.

O termo luminescência define o fenômeno através do qual ocorrem emissões de fótons por um determinado material depois de excitado com um tipo específico de energia. Os átomos presentes nestas moléculas ou materiais ao receber energia passam para um estado excitado (de alta energia) instável e para voltar à estabilidade, o mesmo retorna um estado de menor energia. Para que esta transição ocorra, o excesso de energia é parcialmente dissipado na forma de fótons e este é o mecanismo denominado de “luminescência”. Os materiais luminescentes emitem luz em um comprimento de onda de luz que é característico para cada material (ALBANI, 2007; HUANG et al., 2017).

A luminescência pode ser classificada de acordo com o tipo de energia utilizada na excitação do material luminescente. Excitação por: luz (Fotoluminescência), feixe de elétrons (Catodoluminescência), radiações nucleares, raios X e outros (Radioluminescência), energia térmica (Termoluminiscência), energia química (Quimioluminescência), energia mecânica (Triboluminescência), energia elétrica (eletroluminescência), energia bioquímica (Bioluminescência) e ondas sonoras (Sonoluminescência) (MURTHY & VIRK, 2014; JIAN et al., 2017).

Destacamos aqui como foco do trabalho a fotoluminescência que é o processo no qual determinada substância atinge um estado excitado a partir da absorção de radiação luminosa (nas faixas ultravioleta, visível ou infravermelho), reemitindo fótons para o seu retorno a um estado de menor energia (mais estável). Dependendo dos mecanismos envolvidos no processo, esta radiação emitida pode ter energia menor ou maior do que a energia dos fótons absorvidos. A interação entre íons ou moléculas de um sistema é um processo decorrente de transferência de energia na qual se relacionam com o fenômeno de fotoluminescência (SOUSA & NASCIMENTO, 2015; LIN et al., 2016).

Os processos de fotoluminescência são classificados em dois tipos: a fluorescência e a fosforescência. A diferença entre as duas se dá pelo tipo de transição eletrônica radiativa responsável pela desativação do estado excitado, o que determina no tempo de emissão do sinal luminoso (SO & DONG, 2002).

A incidência de um feixe de luz (radiação contínua) sobre uma amostra resulta em absorção da radiação, onde átomos e moléculas passam de um estado de energia mais baixa (estado fundamental) para um estado de energia maior (estado excitado). A radiação absorvida é quantizada, ou seja, tem um valor igual à diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental (DERMOT, 2001). O físico polonês Aleksander Jabłoński, propôs em 1933 um diagrama que é utilizado como modelo para explicar os processos quânticos envolvidos na absorção e na emissão da luz (JABLONSKI, 1933), hoje conhecido como “*diagrama de Jablonski*”. O diagrama de Jablonski (**Figura 1**) ilustra os estados energéticos de uma molécula e as transições entre elas. Os estados são arranjados verticalmente por energia e agrupados horizontalmente por multiplicidade de *spin*. Os processos fotofísicos que levam à desativação do estado excitado podem ser divididos em transições radiativas (indicadas por flechas retas) e transições não radiativas (indicadas por flechas onduladas). A emissão de radiação na qual a espécie formada tem a mesma multiplicidade de *spin* que o estado excitado é chamada fluorescência, enquanto o processo com mudança de multiplicidade é denominado fosforescência (BALZANI et al., 2007). A conversão interna e o cruzamento intersistema são exemplos de transições não radiativas. Na conversão interna, não há mudança de *spins* entre os estados energéticos envolvidos nas transições, diferentemente da conversão intersistema, onde há mudança de *spin*. Os estados fundamentais vibracionais de cada estado eletrônico são indicados por linhas grossas e, os estados vibracionais mais altos, por linhas mais finas (ELUMALAI et al., 2002, REZENDE, 2016; FATEMINIA et al., 2017).

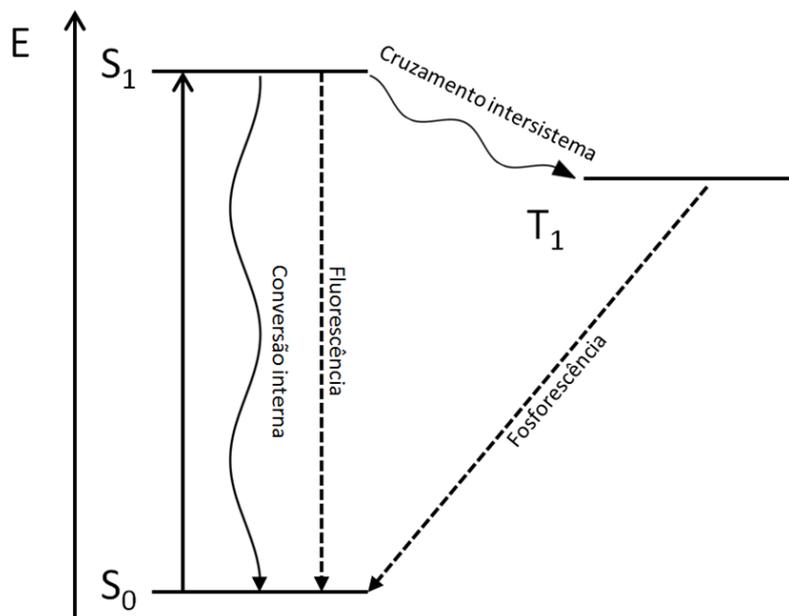


Figura 1. Diagrama de Jablonski mostrando a formação de um estado excitado singlete (S₁), que pode decair ao estado fundamental mantendo o estado singlete. A ocorrência da forma radiativa produz fluorescência e não radiativa se dá por conversão interna. Se o decaimento ocorrer a partir de um estado tripleto T₁ que é formado por um cruzamento intersistema, a emissão de um fóton será por fosforescência (BALZANI et al., 2007).

Ondas eletromagnéticas diferem profundamente quanto ao seu comprimento, a luz visível é uma estreita faixa na escala das ondas eletromagnéticas, e as cores do espectro visível podem ser separadas dentro de faixas de comprimento de onda aproximado: violeta 400–450 nm, azul 450–500 nm, verde 500–570 nm, amarelo e laranja 570–610 nm e vermelho 610 a aproximadamente 750 nm (**Figura 2**) (OLIVEIRA, 2013).

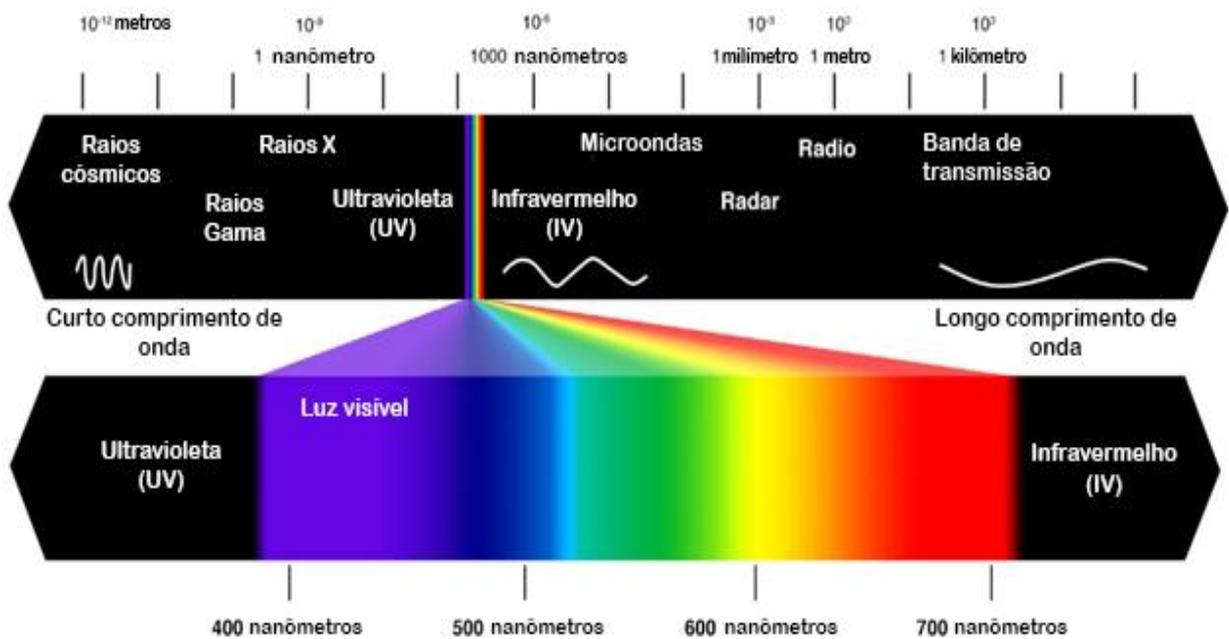


Figura 2: Ilustração do espectro eletromagnético com destaque para a luz visível.

Nas últimas décadas vem ocorrendo um grande aumento do uso de agentes fluorescentes nas áreas biomédicas. Estas moléculas vêm sendo utilizadas na biotecnologia, no diagnóstico médico, nas ciências forenses, nos estudos moleculares, nas avaliações anatômicas, como marcadores *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, dentre muitas outras aplicações. Sua principal vantagem é prover uma elevada sensibilidade às técnicas que a empregam, podendo permitir a detecção e visualização indireta de uma única molécula.

Para a produção de imagens por fluorescência os elementos primordiais para a análise são: (1) as fontes de iluminação, que são específicas e apresentam características distintas como: espectro de emissão, potência, pulso e a frequência em que ocorre a modulação da luz; (2) A emissão de fluorescência que depende da arquitetura atômica do agente fluorescente (o que terminará a energia do fóton produzido e, por conseguinte a cor da emissão fluorescente); (3) O sistema de detecção dos fótons e (4) a sua representação (comumente em formato digital) (STROBL et al., 2017; LI et al., 2017).

Em 1852, o físico e matemático Irlandês George Gabriel Stokes criou o termo fluorescência, que se derivou da palavra “*fluorite*”. Foi o primeiro cientista a explicitar claramente que este tipo de fotoluminescência era um processo de emissão avaliando minerais como fluorita e urbanita e soluções de sulfato de quinino. Suas conclusões produziram o que se conhece como “Lei de Stokes”, que estabelece que um comprimento de onda de uma emissão fluorescente é maior do que o comprimento de onda da excitação. Parte da energia de excitação é liberada pela forma de calor (cinética) através da colisão de moléculas excitadas com outras moléculas (NETO, 2006, MUKHERJEE et al., 2017). Em homenagem a Stokes a diferença entre os picos de emissão e de excitação de um agente florescente recebeu o nome de desvio ou deslocamento de Stokes (**Figura 3**).

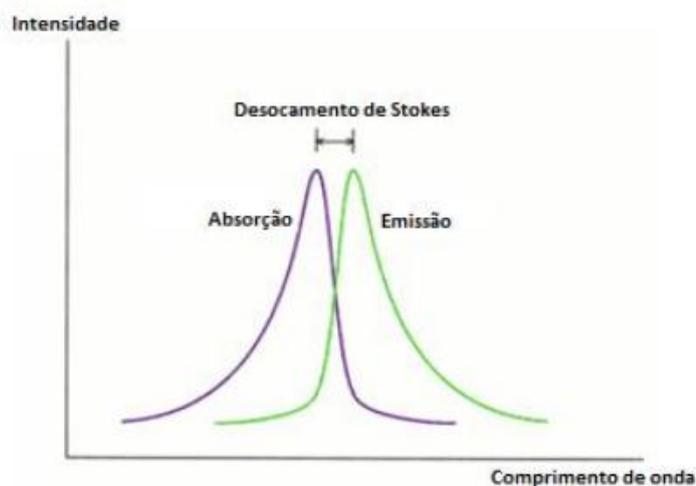


Figura 3. Demonstração do pico de absorção e emissão máxima, “Deslocamento de Stokes” (ARAÚJO, 2010).

Para avaliar o espectro de emissão de uma molécula, irradia-se a amostra com um comprimento de onda de excitação, com isso a uma intensidade de luz reemitida, em uma faixa de espectro definida. O comprimento de onda de excitação ideal de um fluoróforo se dá pela sua absorção quando atingida ao seu máximo (VALEUR, 2001).

Já no espectro de excitação, varia-se o comprimento de onda, diferente da emissão que é constante. O comprimento de onda ideal é aquele correspondente à posição do máximo espectro de emissão do composto (KALSI, 2016).

Dentre os métodos de espectroscopia, o uso da fluorescência é bastante vantajoso, pois a mesma se torna muito sensível quando associadas a outras substâncias, tem grande espectro de análise e seu erro na medição é bem constante em todo o intervalo da análise. A fluorescência apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos de espectroscopia, pois é muito sensível à vizinhança do fluoróforo, tem um amplo espectro de análise e o erro inerente à medição é praticamente constante em todo o intervalo de resposta. Uma característica importante de se observar na fluorescência é o rendimento quântico, que é razão entre a quantidade de fótons emitidos sobre a quantidade fótons absorvidos (SAUER, HOFKENS & ENDERLEIN, 2011; XU et al., 2017; GAROUX et al., 2017).

A fluorescência é um processo cíclico, desde que o agente fluorescente não seja destruído quando ocorra o processo de excitação (a extinção da fluorescência é conhecida como fotodecaimento), o mesmo pode ser excitado e detectado repetidamente. A alta sensibilidade da técnica de detecção fluorescente se deve pelo fato de um único fluoróforo permitir a produção de milhões de fótons (CAI, 2000).

A quantificação da fluorescência depende dos mesmos parâmetros que abrangem a espectrometria de absorvância, dentre eles a concentração da sonda, intensidade da origem de excitação e o método em que se é analisado.

Uma ferramenta que passou a ser bastante utilizada na área científica foi à espectroscopia, utilizada para avaliar estruturas atômicas e moleculares. O termo espectroscopia começou a ser empregado no final do século XIX, em meados de 1860, depois que os cientistas Bunsen e Kirchhoff verificaram que espectros de absorção e emissão favoreciam a determinação da presença de substâncias em uma amostra (FILGUEIRAS, 1996). Nos dias atuais, a espectrometria é entendida como uma grandeza referente a um determinado material de estudo como átomos, moléculas, partículas e entre outros, em função de uma energia, frequência ou comprimento de onda da radiação absorvida ou emitida (STUART, 2004; LANGGUTH et al., 2017).

A espectroscopia oferece métodos experimentais que contribuem para área da Biologia Molecular, Bioquímica, Biofísica, Química e Física Atômica. O atual conhecimento da matéria é baseado em investigações realizadas pelo método pressuposto. A interação da radiação com os átomos ou moléculas de uma matéria

qualquer proporciona a geração dos espectros de emissão ou de absorção, que derivam da interação destas estruturas (GAUGLITZ, 2003; PERKINELMER, 2000).

As espectroscopias de absorção (UV,UV-visível) medem a radiação emitida com a radiação absorvida e as espectroscopias de emissão (fluorescência, fosforescência, luminescência) mede a radiação emitida. Desse modo, há uma metodologia de medição para os espectros tanto de absorção quanto os de emissão (ALBANI, 2007).

1.2 Agentes fluorescentes

Entender a dinâmica dos estados excitados é de grande relevância para o entendimento dos processos fotobiológicos, fotofísicos e fotoquímicos, que nos fornece detalhes sobre o microambiente do agente fluorescente, de acordo com as reações moleculares (MARQUEZIN, 2008).

A fotofísica e fotoquímica são áreas que permitem explorar várias propriedades inerentes às classes de compostos fluorescentes. Grande parte do entendimento dos métodos utilizados nessas áreas é baseada na interação da luz com a matéria (DE PAULA, 2003).

Os agentes fluorescentes, ou fluoróforos, ou fluorocromos, ou ainda sondas fluorescentes, são compostos que quando excitados por faixa específica de radiação luminosa específica emitem luz em uma ou mais determinadas faixas de comprimento de onda luminoso, podendo ser amplamente utilizados como biomarcadores (DRUMMEN, 2012).

A utilização de fluoróforos se tornou um método indispensável no desenvolvimento da pesquisa nas áreas de Imunologia, Biologia Celular, Biologia Molecular, Biologia Estrutural, Bioquímica e diversas outras áreas afins, em decorrência da sua elevada versatilidade de emprego de forma isolada ou combinada com outras moléculas, especificidade intrínseca e crescente sensibilidade de detecção dos equipamentos desenvolvidos para estas áreas.

Segundo Suplicy (2010), os fluoróforos são classificados em duas categorias:

i) Fluoróforos intrínsecos ou naturais, que são aquelas moléculas com propriedades fluorescentes naturais, como proteínas fluorescentes, os aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano dentre muitas outras. Devido a esta propriedade, podem ser utilizados para estudos estruturais e de dinâmicas das células e de proteínas, assim como ser empregados para a determinação dos parâmetros de estudo com autofluorescência.

ii) Fluoróforos sintéticos são aqueles produzidos racionalmente ou acidentalmente em reações químicas e que podem ser adicionados a uma determinada amostra com finalidade de detecção específica de alvos celulares, e neste caso são denominados de biomarcadores. Como exemplo, temos as sondas da família das cianinas. Os fluoróforos sintéticos geralmente apresentam intensa emissão de fluorescência e elevada estabilidade quando iluminados.

Existem diversas famílias de fluoróforos e conseqüentemente uma ampla gama de espectros de excitação e emissão, além de uma grande diferenciação quanto ao tempo de vida de luminescência de cada uma destas moléculas (LI, YIM, JANG & YOON, 2016; WANG et al., 2017). A emissão de fluorescência pode estar sujeita a modificações na sua intensidade dependendo de alguns fatores, como: temperatura, pH, interação de substâncias, viscosidade do meio, polarização, pressão e interação com solutos (BEDENDO, 2007).

Para que os fluoróforos sejam de alta qualidade, são necessárias algumas características estarem presentes como: ser hidrossolúvel, produzir intenso sinal luminoso de emissão; emitirem em uma única faixa de comprimento de onda da luz visível, apresentarem um amplo desvio de Stokes, não apresentar ou apresentar reduzido fotodecaimento a temperatura, pH e condições de iluminação específicas das metodologias de seu emprego, apresentar citotoxicidade baixa ou ausente, quando associados a outras moléculas não perturbar a atividade da molécula e não promover agregação (BEDENDO, 2007, WITTEN et al., 2017; LEE et al., 2017).

Diversos fatores podem influenciar o desempenho de um agente fluorescente como: o rendimento quântico do fluoróforo; a fotoestabilidade a diferentes solventes, a exposição a luz ambiente, a temperatura, o pH, espectros de excitação e emissão em

relação à fonte de excitação, uso de filtros de comprimento de emissão (MARRAS, 2007; SAAKOV, 2001). O aumento da temperatura fornece uma maior eficácia do processo de conversão interna na desativação do estado excitado (OLIVER *et al.*, 2000). É necessário manter o pH do meio em que os compostos fluorescentes se encontram, pois dependendo do grupamento químico é preciso que se mantenha o potencial hidrogeniônico adequado e constante para o correto funcionamento da sonda (WANG, YU, YU, CHEN & YU, 2010; GUILLEN *et al.*, 2017).

Quando associados a determinados grupamentos químicos, a fluorescência do composto pode ser reduzida, devido ao aumento do cruzamento dos sistemas, como por exemplo o oxigênio dissolvido por levar a esta situação (WANG, YU & YU, 2010).

Outro fator é a presença de átomos pesados em solventes, que fazem com que ocorra uma diminuição de energia do estado excitado e conseqüentemente decaimento da intensidade de emissão de fluorescência (BEDENDO, 2007).

Atualmente, os marcadores fluorescentes se tornaram indispensáveis. A maioria são pequenas moléculas orgânicas. No entanto, algumas classes de agentes fluorescentes orgânicos estão sujeitos a rápidos desgaste e outras são tóxicas, ou apresentam estas duas características combinadas. As sondas fluorescentes são identificadas, qualificadas e quantificadas através do seu comprimento de onda de emissão (SU, XIAO & ZHAO, 2012; MARQUEZIN, 2008).

1.2.1 Aplicações e exemplos de sondas comerciais

A marcação molecular e/ou celular com fluoróforos é amplamente empregada em métodos de diagnóstico, devido à sensibilidade que as técnicas baseadas na detecção da luz proporcionam, o que aumenta as chances da realização da detecção precoce de diversas doenças, que por consequência traz um impacto positivo na expectativa e qualidade de vida dos doentes sejam eles humanos ou outros animais (NTZIACHRISTOS, 2006; LU *et al.*, 2017; DOMENECH & GARCIA, 2017).

Os agentes fluorescentes são fundamentais para a investigação de múltiplos fatores biológicos por espectroscopia de fluorescência ou detecção multiparamétrica de sinais. Por meio da interação com a luz, uma molécula pode absorver energia em um

determinado comprimento de onda específico e emitir em outro comprimento de onda diferente, mas igualmente específico. A combinação de diferentes moléculas com diferentes alvos celulares permitem uma avaliação mais abrangente e mais precisa do fenômeno em avaliação (GARAY, 2012; SINGH et al., 2017).

Muitos fluoróforos podem ser utilizados em diversos tipos de análises e detecção de variados analitos. Dentre suas aplicações, temos: (1) detecção de biomoléculas (2) análise de conformação de proteínas, (3) monitoramento de organelas (4) monitoramento da concentração de íons (5) medidas de pH e viscosidade, (6) avaliação de compartimentos celulares, (7) avaliação da integridade estrutural do tecido, célula ou seus componentes, (8) a detecção de contaminantes e agentes infecciosos, dentre outras aplicações (CARVALHO, 2014; MOHAMED et al., 2017; SINGH et al., 2017; CHAO et al., 2017).

Os aminoácidos não naturais são importantes para investigar peptídeos e proteínas, podendo servir como sondas para monitorar a especificidade em determinadas funções proteicas. São muito eficientes no processo de fluorescência, por serem altamente sensíveis quando em contato com a luz. O triptofano é um exemplo destas sondas fluorescentes, e hoje em dia muitos grupos de pesquisa vem trabalhando para o melhoramento das propriedades destes tipos de marcadores (ROCHA & RAMALHO, 2016; GARAY, 2012; SAITO et al., 2017; CHAKRABORTY & CHATTOPADHYAY, 2017).

As sondas fluorescentes baseadas em proteínas são utilizadas para detecção de processos bioativos, além de servir para investigar estruturalmente subunidades celulares relacionadas com a sua síntese, modificação, estocagem, transporte e reciclagem (GARAY, 2012; CHATURVEDI et al., 2017).

Os agentes fluorescentes podem ser ligados a anticorpos específicos ou a outras biomoléculas que apresentam afinidade e avidez por moléculas específicas (por exemplo, lecitinas e anexinas). Diversas técnicas empregadas nas áreas de Imunologia, Biologia Celular, Bioquímica e Biologia Molecular relacionam a ligação de antígeno a anticorpo e as emissões fluorescentes e podem ser detectadas e quantificadas por diferentes técnicas e instrumentos (SINGH et al., 2017; CHATURVERDI et al., 2017; TSUNEMATSU et al., 2006). O primeiro fluorocromo a ser ligado covalentemente a uma biomolécula (um anticorpo) foi o FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (Coons, et

al, 1943) este agente fluorescente apresenta picos de absorção e emissão (490nm e 520nm) (verde) respectivamente. Embora o FITIC apresente acentuado fotodecaimento continua sendo produzido e empregado ainda hoje. A rodamina é também um agente fluorescente amplamente utilizado acoplado a anticorpos, apresentando picos de absorção e emissão (530nm e 610nm), respectivamente, emitindo na cor vermelha (KRAKOWSKA & CHACHAJ-BREKIESZ, 2015; WANG et al., 2017). A partir da década de oitenta diversas outras classes de agentes fluorescentes foram produzidas com vistas a sanar o problema do fotodecaimento, assim surgiu uma família de agentes fluorescentes mais estáveis e de amplo emprego denominada AlexaFluorTM, que vem mantendo a liderança do mercado de agentes fluorescentes até os dias de hoje.

Os agentes fluorescentes são também utilizados em estudos do material genético, seja de forma mais macro como na avaliação de aneuploidias a partir de técnicas como a de FISH, ou em estudos da presença, quantidade e da própria estrutura do DNA/RNA, próprio ou exógeno, por meio de diferentes técnicas de PCR (OXLEY et al., 2017; WANG et al., 2017; MOHAMED et al., 2017). Ainda relacionado ao material genético, a tecnologia de microarranjo possibilitou a análise simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento ou condições ambientais diferentes. Dois fatores contribuíram para o avanço desta técnica: (1) a disponibilidade de sistemas que permitiram a confecção de arranjos de alta densidade e (2) a detecção óptica, por agentes fluorescentes que conferiu a sensibilidade ideal para se realizar as medidas desta intensidade (ROSA, ROCHA & FURLAN, 2007; LI et al., 2017).

O material genético pode ainda ser marcado por agente fluorescente apenas para o registro da localização do núcleo das células ou ainda para se determinar a presença de outras moléculas no interior do núcleo a partir do contraste entre as cores dos marcadores empregados. A sonda fluorescente mais amplamente utilizada para a marcação do DNA e identificação do núcleo das células é denominada 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), e se liga fortemente as regiões ricas em A-T (adenina e timina) no DNA. É utilizada em células vivas e fixadas, pois é facilmente permeável a membrana plasmática, porém em células vivas onde a membrana está intacta sua permeabilização é menor e conseqüentemente intensidade de fluorescência. Por se associar ao material genético apresenta elevada citotoxicidade e não é adequada para experimentos *in vivo* ou *in vitro* cuja condição seja manter as células vivas por longos

períodos. O pico de excitação e emissão é de aproximadamente (358nm e 461nm, respectivamente) (azul) (LI, WU & TSAI, 2003; TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2006; SHANKARAIHAH et al., 2017; SABZICHI et al., 2017).

Uma outra variante das aplicações dos fluoróforos refere-se à sua utilização como meio de detecção acoplado a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) na determinação de amostras contendo íons metálicos ou outras moléculas (BEDENDO, 2007). Assim como na identificação da biodistribuição de fármacos por meio da colocação de uma etiqueta fluorescente nestas moléculas (ZHENG et al., 2017).

Outro marcador fluorescente utilizado para evidenciar o núcleo das células é o iodeto de propídeo. Este marcador é eficiente somente em células fixadas, pois não é permeável a membrana plasmática intacta. Esta limitação foi importante para o seu emprego como um marcador de membranas danificadas associadas ao processo de morte celular por necrose. Um viés imposto por este marcador quanto à marcação de material genético, é que o mesmo se liga ao também fortemente ao RNA. Para evitar este sinal de ruído é necessário um tratamento prévio das amostras com RNase para só então se proceder a marcação, permitindo que apenas o núcleo das células sejam corados. Possui pico de excitação e emissão de (535nm e 617nm, respectivamente) (vermelho) (CHITARRA *et al.*, 2006; TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2006, ZATORSKA et al., 2017).

Outras biomoléculas despertam grande interesse por estarem envolvidas em processos cruciais na manutenção da vida das células e o seu metabolismo estarem diretamente envolvidos em diversos processos de adoecimento humano. Dentre estas moléculas se destacam os lipídios, encontrados normalmente nas células eucarióticas encerrados em pequenos compartimentos citoplasmáticos denominados de corpúsculos lipídicos (SONG et al., 2017). Para a marcação específica de lipídios a família de marcadores comerciais amplamente utilizadas é o BODIPYTM, sendo o mais empregado apresentando uma maior seletividade para lipídeos neutros. Sua faixa aproximada de espectros também depende da sonda pertencente a esta família que está sendo utilizada. No geral a família de marcadores lipídicos BODIPYTM apresenta pico de excitação e emissão no intervalo de 496/727 nm e emissão 510/780 nm. (NIU, 2011; TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2013; CHEN et al., 2017; YIN et al., 2017).

Outra aplicação muito comum em estudos de Biologia Celular, Imunologia, Parasitologia, Bioquímica e Biologia Molecular é a marcação específica de compartimentos subcelulares. Para este propósito existem marcadores para todos os compartimentos celulares. O LysoTrackerTM é o marcador comercial para a detecção de lisossomos, sua penetração ocorre somente em células vivas, pois os fixadores existentes baseados em aldeído inibem a associação do fluoróforo com seu alvo. Este fluoróforo consiste de uma base fraca que está apenas parcialmente protonado a pH neutro, permeando livremente as membranas celulares, acumulando-se em organelas ácidas (lisossomos). A afinidade do LysoTrackerTM por compartimentos ácidos leva a sua protonação, fazendo que o mesmo na condição protonada seja impermeável a membranas lipídicas e se acumule no interior dos lisossomos e endossomos tardios, permitindo a visualização destas organelas. O pico de espectros depende da sonda a ser utilizada, onde o pico de excitação varia de 335/647nm e emissão 422/668nm (ZU et al., 2013; MORDHORST et al., 2015). Nesta mesma linha, a sonda fluorescente MitoTrackerTM é o marcador comercial de mitocôndrias, sendo altamente permeável a membrana plasmática da célula, penetra nas mitocôndrias e sua marcação independe da manutenção do potencial de membrana das mitocôndrias. O MitoTracker é um agente fluorescente catiônico que se acumula eletroforicamente dentro das mitocôndrias por ser altamente negativo. Este agente fluorescente também possui um grupo clorometil que forma ligação covalente com os grupos tiol encontrados em proteínas e peptídeos. Esta ligação faz com que este agente fluorescente fique retido dentro das mitocôndrias. Por esta razão as mitocôndrias retêm o MitoTrackerTM mesmo após a perda de seu potencial de membrana. Sua faixa aproximada de espectros também depende da sonda a ser utilizada, onde a excitação varia de 554/644nm e emissão 576/665nm (WOJTALA, 2014; TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2008). Finalmente o agente denominado CellMask® é um marcador fluorescente comercial destinado a marcação específica da membrana plasmática. Este marcador apresenta alta afinidade por glicerofosfolipídeos que são encontrados majoritariamente na membrana celular. Este marcador pode ser empregado tanto em células vivas quanto em células fixadas e produz intenso sinal fluorescente formando um contorno luminoso em toda a célula (PIERZYNSKA-MACH, JANOWSKI, & DOBRUCKI, 2014; TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2013; TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2014).

Sondas fluorescentes são continuamente utilizadas isoladas ou em conjunto para o monitoramento de diferentes estruturas dentro de uma mesma célula (análises multiparamétricas) produzindo resultados visualmente inspecionáveis e às vezes de uma plasticidade e beleza artística. Para estes fins estão disponíveis comercialmente um grande número de marcadores fluorescentes, que isolados ou associados podem produzir incríveis resultados científicos e visuais (**Figura 4**).

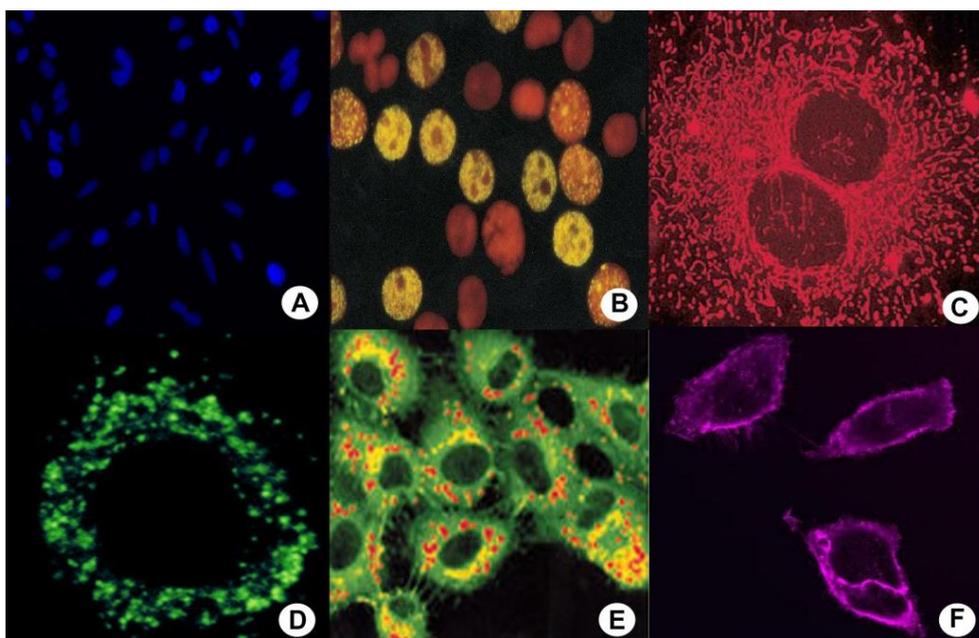


Figura 4. Diferentes marcações produzidas por sondas fluorescentes comerciais. (A) DAPI, (B) Iodeto de propídeo, (C) Mitotracker®, (D) Lisotracker®, (E) BODIPY® e (F) CellMasK® (TERMOFISHER, 2014).

1.3 O desenvolvimento de novas moléculas fluorescentes e as reações multicomponentes

Segundo Bhuiyan (2013) desenvolver um novo produto consiste no conjunto de atividades por meio das quais se busca, a partir das necessidades do mercado e das possibilidades e restrições tecnológicas, e considerando as estratégias competitivas e de produto da empresa, chegar às especificações de projeto de um produto e de seu processo de produção, para que a manufatura seja capaz de produzi-lo.

As etapas do processo de desenvolvimento de produtos consistem essencialmente em um fluxo de tarefas conjuntas, capazes de transformar uma ideia em um produto final (TAKAHASHI, 1999). Ulrich e Eppinger (2000) propõem um modelo genérico de desenvolvimento de produto voltado para o mercado, isto é, o processo tem início com a identificação de uma oportunidade de mercado, a partir do que a empresa utiliza toda a sua tecnologia disponível para satisfazer tal necessidade.

Atualmente, houve um grande aumento em grupos de pesquisas voltados para o desenvolvimento e melhoramento de tecnologias biomédicas, principalmente no que diz respeito a métodos de diagnóstico. Neste contexto, verifica-se que os compostos fluorescentes possuem características vantajosas frente a outros tipos de moléculas usadas como repórteres, podendo ser empregados para simples detecção e quantificação de sinais luminosos ou para a geração de imagens (ARAÚJO *et al.*, 2010; WITTEN *et al.*, 2017).

Contudo, quando avaliamos os agentes fluorescentes comercialmente disponíveis identificamos uma necessidade urgente de que novas moléculas sejam produzidas ou que as atuais sejam modificadas de forma a atender as expectativas de marcação associadas a elas, sobretudo no que se refere ao rendimento quântico, fotoestabilidade e citotoxicidade. Juntamente com os avanços trazidos pelo progresso contínuo das áreas da tecnologia da informação, a pesquisa científica tem procurado aprimorar o *design* destas moléculas de forma a aproximá-las das principais características desejadas (SUZUKI & YOKOYAMA, 2015).

Para analisar as células, é de extrema importância ter acesso a seus compartimentos, bem como a todos os processos bioquímicos que ocorrem em seu interior. Para isso, estruturas de interesse devem ser etiquetadas com marcadores que proporcionem a sua observação direta através da microscopia de ultra resolução (SHEN *et al.*, 2015; WITTEN *et al.*, 2017).

A produção e o isolamento de moléculas fluorescentes crescem a cada dia, assim como a produção de anticorpos em laboratório tem atingido um nível de complexidade e excelência jamais alcançadas. Novas metodologias de análise e equipamentos de aquisição de dados também vêm sendo produzidos acompanhando a crescente produção dos insumos fluorescentes. Uma grande parte destas tecnologias vem sendo posta a serviço do imageamento celular, o que tem proporcionado um

elevado grau de refinamento de dados e qualidade/quantidade dos detalhes estruturais, representando com precisão nanométricas a maioria das organelas celulares (ZHANG, 2002, HUANG et al. 2016; LEE et al., 2017) **Figura 5**.

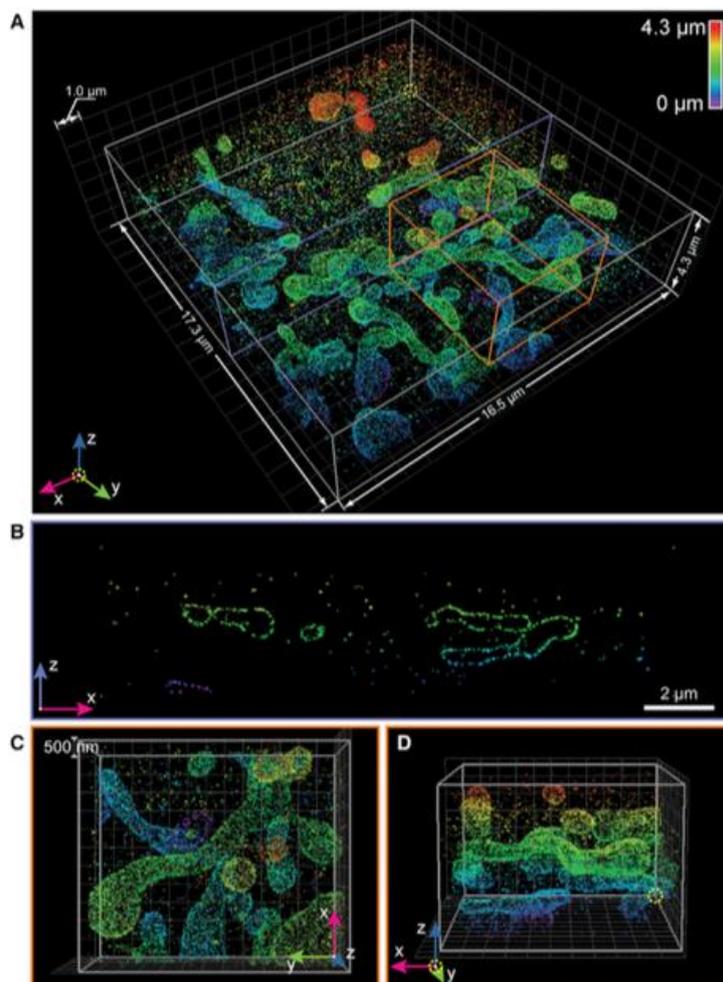


Figura 5. Mitocôndrias vistas por microscopia de ultra resolução. Reconstrução 3D das mitocôndrias a partir de planos com 500nm de espessura (HUANG et al., 2016).

A síntese orgânica vem se beneficiando de um tipo específico de reação denominada de reações multicomponentes (RMCs), as quais são definidas como reações que com três ou mais materiais de partida ocorre à formação de um produto em uma única etapa (BOREL, 2013). Além disso, existe a possibilidade da variação de um dos materiais de partida para formar diversos compostos (WANG et al., 2017).

As reações multicomponentes produzem uma grande economia de átomos e estão intimamente ligadas a eficiência da síntese, sendo este um dos pontos positivos considerados dentro do que se harmonizou em chamar de química verde. A massa molar

do produto desejado e a somatória das massas molares de todos os reagentes utilizados na síntese totaliza-se o percentual desta economia (RODRIGUES et al., 2016; SHEN et al., 2017).

As RMCs proporcionam o desenvolvimento de novas estruturas através do simples emprego de diferentes reagentes e a criação de amplas variedades de grupos funcionais, favorecendo a produção de uma grande gama de substâncias diferentes com diversidades estruturais, podendo apresentar atividade biológica ou serem modificadas para o mesmo fim (RODRIGUES; VORADI et al., 2016). A **Figura 6** compara dois tipos de reações, em que a primeira representa a reação multicomponente e a segunda uma síntese linear.

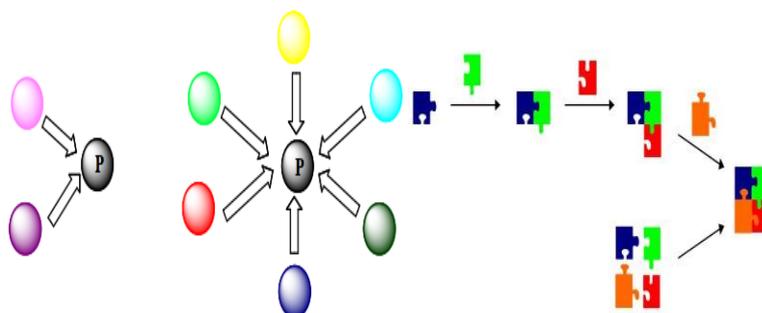


Figura 6. Esquema comparativo de diferentes tipos de reação. Reações do tipo multicomponentes (esquerda) e comparada com a síntese linear (direita).

A formação de vários produtos com elevada diversidade estrutural e diferentes níveis de complexidade a partir de materiais de partida estruturalmente simples são as principais vantagens das RMCs em relação a síntese realizada com base na química clássica. Estes tipos de reações apresentam as características de serem convergentes, com várias vantagens, como: economia de átomos, simplicidade operacional, produção de diversidade estrutural e complexidades dos compostos. Por isso, as RMCs estão emergindo como uma ferramenta superior para a síntese de compostos biologicamente ativos (BARRETO *et al.*, 2013).

Um dos setores mais dinâmicos das economias industrializadas é a indústria química, obtendo alta demanda de produtos em diversas áreas, como produtos

farmacêuticos, têxteis, eletrônicos, automobilísticos e dentre outros. Com isso, houve um grande aumento de resíduos gerados nas diversas fases do ciclo produtivo das indústrias químicas em todo o mundo (SMILEY & JACKSON, 2002, BARAN et al., 2016).

Desenvolver métodos e procedimentos químicos que sejam incapazes de causar danos ao planeta e à população devido à ejeção de poluição ao ambiente, tem sido uma preocupação constante. A química verde, procura meios para se obter os mesmos produtos que a química tradicional, porém com o mínimo possível de geração de resíduos juntamente com a formação de substâncias não contaminantes, contribuindo assim para a redução da degradação ambiental e ao mesmo tempo mantendo o alto índice de produção industrial (WARNER, CANNON & DYE , 2004; MARYAMABADI et al., 2016).

Os 12 princípios da química verde, como representados na **Figura 7** são: 1) prevenção: evitar a produção de um determinado resíduo; 2) economia de átomos: utilizar metodologias sintéticas que incorporam maior número de materiais de partidas no produto final; 3) síntese de produtos menos perigosos: produtos que contenham o mínimo possível de substâncias tóxicas a saúde humana e ao meio ambiente; 4) desenho de produtos seguros: produtos que além de exercerem a função desejada sejam ao mesmo tempo atóxicos; 5) substâncias auxiliares mais seguras: quando necessárias substâncias auxiliares, como solventes, o mesmo deve ser inócuo e sempre que possível reciclado ou evitado; 6) busca pela eficiência de energia: a utilização deve ser minimizada devido aos impactos ambientais e econômicos; 7) uso de matérias primas renováveis: este tipo de matéria prima deve ser priorizada, além do fato de ser economicamente viável; 8) evitar a formação de derivados: esta pode levar a geração de resíduos por requer etapas que precisem de reagentes adicionais; 9) catálise: os reagentes catalíticos são melhores que reagentes estequiométricos; 10) desenho para a degradação: deve ser desenhados para que no final, se fragmentem em pequenos produtos de degradação inócuos e não permaneçam no meio ambiente; 11) analisável em tempo real para prevenir a poluição: metodologias que monitorem e controlem o processo da formação das substâncias nocivas e 12) prevenção de acidentes a partir da química intrinsecamente segura: as substâncias devem ser escolhidas, a fim de minimizar o risco de acidentes químicos, que vão desde vazamentos e contaminação

humana e do meio ambiente até incêndios e explosões (LENARDÃO et al., 2003; CIOC, 2014; KUMAR et al., 2017).



Figura 7. A Química verde e seus 12 princípios (CIOC, 2014).

Quando se aborda a inovação de um produto, a possibilidade de introduzirem-se inovações pode partir de diversas dimensões. Para se obter sucesso, é necessário diversas atividades coordenadas e sincronizadas, as quais vem sendo realizadas de forma simultânea pelo nosso grupo. Estas atividades vão desde a criação de moléculas *in silico*, passando pela síntese e purificação da molécula até suas reais aplicações *in vitro* e *in vivo*, o que possibilita a abrangência de suas aplicações em diversas áreas (REGUIA, 2014; SILOCCHI, 2002; STEFANOVITS & NAGANO, 2014).

Quando os produtos levam a uma inovação, os mesmos devem passar pelo processo de patente. As patentes, além de protegerem os resultados do processo e desenvolvimento, estimulam outras empresas a buscarem produtos que contenham alternativas, aumentando assim, o desenvolvimento de produtos que auxiliem em

determinado requisito. Quando se menciona a proteção, deve-se também a prevenção de competidores que possam vir a reproduzir o produto e vender a um valor inferior, tendo em vista que nada foi gasto por ele no processo e no desenvolvimento. É imprescindível patentear quaisquer produtos para que processo de criação se torne um investimento rentável (KANAGAL, 2015; MONTEIRO, 2008).

Para que um produto seja patenteado, o mesmo deve atender a determinados quesitos, como: i) novidade, invenção e aplicabilidade, ii) seu processo seja prático, ou pelo menos parte dele, iii) seja possível de aplicação industrial, iii) deve apresentar melhoria funcional em seu uso (LEHMAN, 2003).

Para o processo de otimização de produção de marcadores fluorescentes é necessário que os mesmos apresentem as seguintes características: espectro definidos para excitação e emissão, amplo deslocamento de Stokes e elevado tempo de vida luminescente. Outras características também influenciam na intensidade da fluorescência do agente luminescente, como o rendimento quântico, fotoestabilidade, sensibilidade ambiental e coeficiente de extinção (capacidade que um mol de substância em absorver luz a um dado comprimento de onda) (ARAÚJO, 2010; JIAN et al., 2013).

1.4. Benzotriazol e seus derivados

Uma das arquiteturas atômicas mais importantes utilizadas na química de compostos fotoluminescentes e aplicáveis na tecnologia da luz são os derivados do núcleo benzotriazol (BTD), **Figura 8** (TUZIMOTO, 2010; JIAN et al., 2013; CHI, 2007). Os derivados fluorescentes do núcleo BTD, apresentam diversas características indispensáveis para novos marcadores fluorescentes celulares, pelo fato de ser um forte núcleo aceptor de elétrons e devido à propriedade de poder ser incorporado em moléculas aceptoras eletrônicas, formando um sistema útil para condução (LOPES *et al.*, 2014).

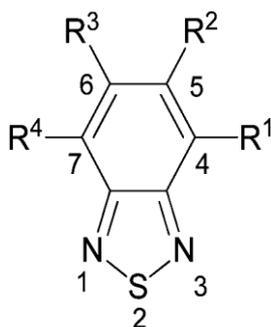


Figura 8: Estrutura do 2,1,3 benzotiadiazol (MOTA et al., 2015).

Derivados do núcleo (BTD) normalmente sofrem extensões das conjugações π nas posições 4 e 7, e são usualmente sintetizados a partir do derivado 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola por meio de reações de acoplamentos (CARVALHO et al., 2014).

Os heterocíclicos sintéticos derivados 2,1,3-benzothiadiazole (BTD), vem obtendo resultados positivos e ótimas perspectivas para as suas aplicações. O potencial de uso desta nova classe de biomarcadores vem sendo sistematicamente investigado, as quais apresentam diversas características desejáveis, como: apresenta-se como uma molécula estável em solução ou pura durante armazenamento; espectro de excitação na luz visível; apresenta baixo fotodecaimento; amplo desvio de Stokes, elevado rendimento quântico, oferece baixo custo e fácil produção; e sua reação é facilmente escalonável (NETO, et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Nosso grupo vem explorando estas propriedades, produzindo e avaliando diversos compostos biologicamente ativos (RAMOS et al., 2013, GUIDO et al., 2015; SILVA et al., 2015; ANDRADE et al., 2015) assim como derivados fluorescentes para emprego em imageamento celular (OLIVEIRA et al., 2010; NETO et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; NETO et al., 2015).

Como exemplos apresentamos a **Figura 9** que consiste de diversos resultados bastante satisfatórios obtidos pelo nosso grupo quanto a síntese, purificação e aplicação dos derivados de BTDs. O derivado de BTD (BTD-AO **imagem A**) demonstrou alta afinidade para corpúsculos lipídicos de maneira mais eficiente do que o composto comercial BODIPY™, além da sua alta permeabilidade à membrana celular (CARVALHO et al., 2014). Em 2007, nosso grupo desenvolveu derivados de BTD com propriedade de marcar DNA (**Figura 9 imagem b**) podendo tanto ser usado como uma

alternativa ao emprego do DAPI quanto para análises por PCR em tempo real (NETO et al., 2009). No ano de 2010, foram sintetizados os derivados de BTDBT (BTDBT e BTDBI), que foram também bastante específicos para DNA nuclear, **figura 9 imagem c** (OLIVEIRA et al., 2010). Em 2010, apresentamos outra molécula derivada de BTDBT para a localização seletivas em núcleos (CARVALHO et al., 2014). Em 2012, nosso grupo produziu o derivado BTDPyMe com alta afinidade para mitocôndrias, porém com baixa intensidade de fluorescência **figura 9 imagem d**. Logo, foram realizadas modificações em sua estrutura química gerando os derivados BTDShiny, BTDBH e BTDBr, e os resultados foram muito positivos, onde se obteve derivados com melhor intensidade de emissão de fluorescência (NETO et al., 2012), **figura 9 imagens E, F e G**. Esta molécula foi denominado de Splendor (**figura 9 imagem G**), apresentando melhores resultados para marcação de mitocôndrias do que a sonda comercial de referência Mitotracker® (CARVALHO et al., 2014). Outro derivado que também produziu marcação perinuclear foi o BTDB-FN, região esta rica em mitocôndrias (**figura 9 imagem H**). Além disso, estes compostos induziram a formação de espécies reativas de oxigênio (CARVALHO et al., 2014).

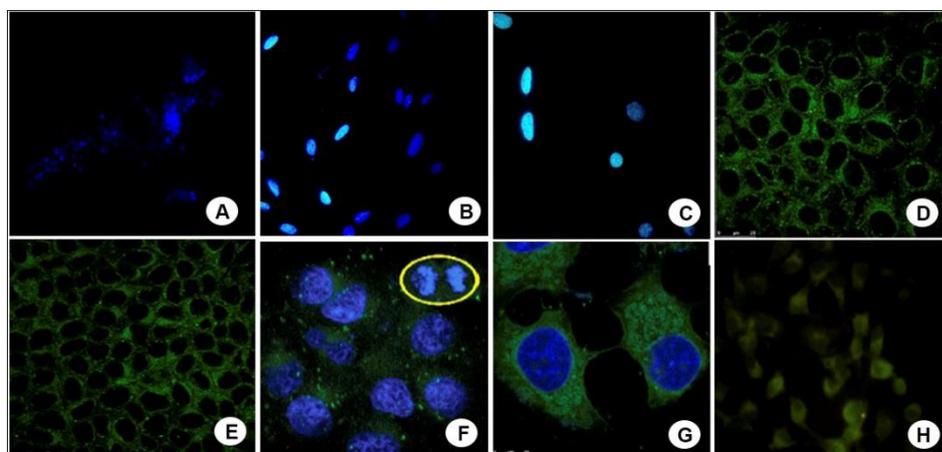


Figura 9: (A) BTDB-AO com seletividade em lipídeos, (B) BTDB-BT e (C) BTDB-BI seletivos para núcleo, (D) BTDB-H, (E) BTDB-Br, (F) BTDB Shiny, (G) Splendor, (H) BTDB-FN seletivos para mitocôndrias modificado de CARVALHO et al., 2014.

Outros grupos publicaram bons resultados obtidos com derivados de BTDB em diferentes modelos de estudo. O derivado BTDB-AO desenvolvido por Policar e colaboradores, acumulou-se nas membranas externas e internas, mostrando que pode ser utilizado em aplicações que envolvem compartimentos membranosos. O BTDB-NO₂, descrito por Jiang e seus colaboradores, tem a capacidade de distinguir células normais e

células tumorais sendo capaz de rastrear células tumorais em estado de hipoxia (CARVALHO et al., 2014).

1.5. Microscopia e Imageamento Celular

A citologia é o ramo da ciência que estuda a célula nos mais variados contextos e em particular a sua estrutura, morfologia, regulação e compreensão do funcionamento de suas organelas e vias metabólicas. A célula é denominada como a menor unidade estrutural e funcional dos organismos metazoários, por constituírem os tecidos e órgãos e exercerem funções básicas para a manutenção da vida do organismo (FOWLER & LACHAR, 2009).

O imageamento celular é uma das mais antigas ferramentas para o estudo das células, e é fundamental para investigação na área biomédica, possibilitando nos dias de hoje a análise destas células e tecidos, com elevada resolução espacial. A microscopia é conhecida desde o século XVII, porém somente utilizada para fins científicos a partir do século XIX, onde trouxe para a pesquisa na Biologia grande revelações e fundamentou novas teorias, revolucionando grandemente a área das Ciências Biológicas (MASTERS, 2006). A criação de lentes de aumento e o uso no microscópio permitiu enorme compreensão do estudo das células. As novas plataformas para imagens avançam cada dia mais visando alta resolução espacial e temporal. Em muitos casos, o microscópio padrão foi substituído por novas plataformas construídas especificamente que são muito mais flexíveis e permitem a implementação de novas modalidades de aquisição de imagem, dentre elas as de alta e super-resolução (LI, 2010).

Antigamente, o estudo das células eram um pouco restrito devido aos precários métodos. Com o passar do tempo os métodos e os instrumentos foram sendo aprimorados para o melhoramento à qualidade e aumentando a quantia de informações extraídas da avaliação das amostras celulares. No século XIX os microscópios apresentavam grandes restrições de resolução. A construção do primeiro microscópio composto ocorreu em 1611, por Kepler (SOUZA & SARAIVA, 2003). Somente no final deste século houve a invenção de microscópios binoculares e os microscópios com várias objetivas, criadas por Ernst Leitz só veio a ocorrer no ano de 1873 (PRATAVIEIRA, 2014). Em 1930, Lebedeff projetou e construiu o primeiro microscópio de interferência (PATTERSON, 2002) e em 1932 Frits Zernike criou o

microscópio de contraste de fases (KONINGSBERGEN, 2010). É notável a crescente evolução da microscopia em diferentes âmbitos. Em 1955, o cientista Marvin Minsky criou o conceito da microscopia confocal, e desde então esta metodologia de aquisição de imagens vem sendo melhorada, hoje trabalha com iluminação a laser que varre todos os pontos do plano focal de um material biológico, utiliza fotomultiplicadores em complexos arranjos capazes de amplificar o sinal de poucas unidades de fótons. A invenção da microscopia proporcionou diversas conquistas sobre a microscopia de luz convencional, destacando o controle da profundidade, eliminação das informações luminosas que se encontram fora do plano focal e a aquisição sequencial de imagens no eixo z das amostras (SEMWOGERERE & WEEKS, 2005; ESPOSITO et al., 2011; MULLER, 2006).

A aquisição das imagens no microscópio confocal trouxe significativas vantagens sobre as técnicas tradicionais de microscopia de fluorescência. Introduziu diversos outros elementos ao microscópio que permite o melhor aproveitamento da luz emitida pelos agentes fluorescentes que será a responsável pela produção de uma imagem de qualidade. A possibilidade de ajuste na velocidade de varredura da amostra, repetição de varredura, controle da abertura de entrada de luz (pinhole), controle da sensibilidade dos fotomultiplicadores, subtração digital de ruído na imagem dentre muitas outras funcionalidades elevou grandemente a qualidade das imagens adquiridas (MORTARA et al., 2016).

Combinado a todos estes aspectos, os programas computacionais realizam uma grande diversidade de tarefas aplicadas ao imageamento por microscopia confocal, tanto na exibição e correção da imagem quanto em sua análise quantitativa. Embora a base da aquisição da imagem continue sendo bidimensional, estes equipamentos permitem a aquisição de imagens em diferentes planos no eixo Z, em distâncias que vem sendo continuamente reduzidas. Este modo de aquisição de imagens sequências em Z produz uma série de imagens que são digitalmente alinhadas e combinadas permitindo a reconstrução tridimensional das amostras. Esta e outras aplicações são hoje realidades em muitos centros de microscopia graças ao pensamento e atitude visionária e empreendedora do cientista americano Marvin Lee Minsky (SEMWOGERERE & WEEKS, 2005; MASTERS, 2001; MULLER, 2006).

A microscopia continua uma área em franco desenvolvimento que tem como principal característica a plasticidade que permite a incorporação em seus instrumentos dos avanços obtidos em diversas outras áreas como a microeletrônica, óptica e informática. Desta forma, a formação das imagens por microscopia tem alcançado resoluções cada vez mais altas, estando hoje em dimensões nanométricas. A aplicação de programas computacionais de correção de distorções nas imagens, aliado a tecnologias inovadoras de iluminação tem produzido resultados surpreendentes antes observáveis apenas através da microscopia eletrônica de transmissão (JENSEN, 2013; MURPHY, 2001). Graças a estes avanços, o acúmulo de conhecimento sobre as células, seus compartimentos e componentes vem sendo acelerado e uma grande quantidade de detalhes estruturais puderam ser obtidas acrescentando informações importantes ao conhecimento vigente. O imageamento celular é uma metodologia amplamente empregada em uma variada gama de modelos e abordagens experimentais e vem ao longo dos séculos contribuindo de forma muito significativa para o avanço da ciência em diversas áreas (HARAGUCHI, 2008; CLAXTON, FELLERS & DAVIDSON, 2006; ESPOSITO et al., 2011).

A dinâmica do estudo das células a partir do imageamento celular fornece informações inestimáveis para o entendimento de diversos processos podendo ser aplicado a amostras vivas e em interação com outros tipos celulares, com agentes quimioterápicos, com parasitas e demais agentes infecciosos. A observação indireta de proteínas, suas interações, transporte, regulação e reciclagem é um dos métodos mais utilizados em estudos na área da Biologia. O uso de substâncias fluorescentes vem sendo a primeira escolha para estas finalidades devido à facilidade de manuseio das amostras, o reduzido tempo de incubação, a segurança para as amostras e para os pesquisadores (KIMURA et al., 2009; ZHANG et al., 2004).

Os agentes fluorescentes são hoje reagentes indispensáveis para o estudo das células e podem ser aplicados em uma grande variedade de técnicas e avaliados por um grande número de diferentes equipamentos além dos microscópios. O seu emprego aliado aos avanços na manutenção *in vitro* de diferentes tipos celulares e microorganismos compõe o conjunto básico de técnicas essenciais para o estudo das células e suas interações (DIXIT, CYR & GILROY, 2006; MEHLEM et al., 2013).

A **figura 10** mostra o resultado do imageamento celular produzido pelo nosso grupo, através da microscopia confocal de células tumorais em anáfase, marcadas com anticorpo anti tubulina conjugados ao agente fluorescente Alexa 488TM e material genético marcado com DAPI.

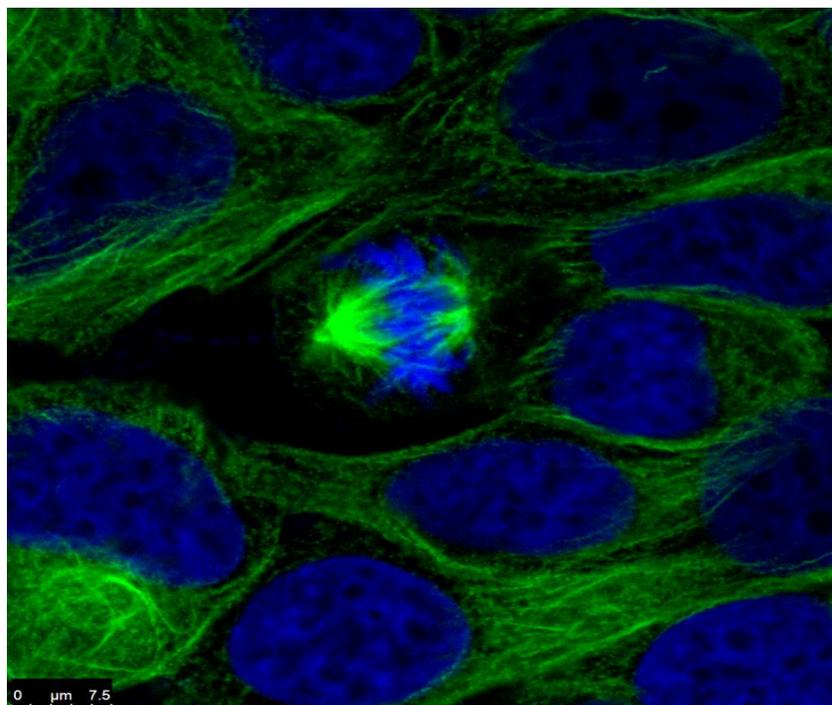


Figura 10. Células MCF-7 (células do adenocarcinoma mamário humano não invasivo) imunomarcadas com anticorpo anti- α -tubulina (verde) e o DNA marcado com DAPI (azul). A aquisição da imagem foi feita em microscópio confocal de varredura a laser e mostra a formação típica de fuso mitótico durante a anáfase (GUIDO, 2014).

2. Justificativa

O estudo da célula é uma parte fundamental da biologia, visando compreender a sua estrutura, funções, reações químicas e metabólicas da mesma. Um dos métodos analíticos mais importantes e utilizados em estudos biológicos é a microscopia de fluorescência. O conjunto de metodologias que dão suporte a esta Técnica é fortemente dependente do desenvolvimento de moléculas fluorescente que são os elementos chave para o seu avanço. A avaliação racional dos marcadores fluorescentes disponível comercialmente nos mostra diversas limitações destas moléculas que vão desde a baixa

especificidade, elevada citotoxicidade, insolubilidade, rápido fotodecaimento e dentre outros. Esta constatação nos fornece subsídios para a busca de novas moléculas que venham preencher as lacunas funcionais observadas nos agentes fluorescentes disponíveis hoje. Deste modo, o desenvolvimento de novos agentes fluorescentes que tenham suas características o mais próximo possível da molécula ideal e que sejam produzidos respeitando as condições definidas pela química verde, vem sendo cada vez mais procurados pelo setor industrial e pelos usuários finais. Com vistas para esta necessidade, este trabalho foi realizado com o propósito de avaliar biologicamente três derivados do benzotiadiazol produzidos pelo nosso grupo.

3. Objetivos

3.1. 3.1 Objetivo Geral

Avaliar biologicamente *in vitro* e *in vivo* três derivados fluorescentes do benzotiadiazol através de análises qualitativas e quantitativas.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos derivados fluorescentes do benzotiadiazol;
- Avaliar *in vitro* a especificidade dos derivados fluorescentes do benzotiadiazol a biomoléculas ou a microrregiões celulares;
- Analisar *in vivo* a marcação produzida pelos compostos que apresentarem especificidade por microrregiões ou moléculas celulares;
- Realizar a confirmação e avaliar por parâmetros quantitativos a seletividade apresentada pelos derivados com o uso de sondas fluorescentes comerciais;
- Avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos *in vitro* em modelos *in vivo*;
- Avaliar quantitativamente a intensidade e a estabilidade dos três derivados fluorescentes do benzotiadiazol.

4. Materiais e Métodos

4.1. Manutenção de células normais e tumorais

Os modelos celulares utilizados no estudo foram às células tumorais MCF-7 (células de adenocarcinoma mamário humano não invasivo), MDA-MB231 (células de adenocarcinoma mamário humano invasivo), Caco2 (células de adenocarcinoma corretal humano), T47D (células de carcinoma ductal de mama) e a células normais HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana). Estas células foram mantidas nos devidos meios de cultivo de acordo com a recomendação da ATCC (American Type Culture Collection), suplementados com 10% de soro fetal bovino e em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, com passagens semanais.

4.2. Testes de solubilidade dos compostos

Soluções estoques a 1 mM dos compostos fluorescentes testados neste trabalho foram preparadas com os seguintes solventes: (1) água destilada estéril, (2) DMSO, (3) Acetona e (4) hexano. Foi empregada agitação vigorosa em agitador tipo vórtex a 80% de sua potência durante 20 minutos. Em caso de não diluição as amostras foram aquecidas a 60°C e submetidas a agitação vigorosa conforme descrito acima. Foram considerados solúveis aqueles compostos cuja solução não apresentou precipitados detectáveis a olho nu após uma hora de repouso à temperatura ambiente. Em caso da presença de precipitados detectados a olho nu, o composto em questão foi considerado pouco solúvel no solvente testado e este composto foi submetido ao próximo solvente nas mesmas condições aqui descritas. Apenas os derivados solúveis em água ou em até 0,03% de dimetil sulfoxido (DMSO) foram avaliados em modelos *in vivo*.

4.3. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das amostras celulares incubadas com os derivados de BTB por 24 horas foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Foram semeadas 3×10^3 células por poço em placas de 96 poços que foram incubadas *overnight* a 37°C (para sua adesão na placa) com 150µL/poço de meio de cultivo

completo e apropriado. Após este período o meio de cultivo foi removido e as amostras teste foram incubadas com 150µL de meio de cultivo apropriado para o modelo celular contendo 10, 1 e 0,1 µM do derivado fluorescente. Foram utilizados dois controles negativos: (1) amostras incubadas com meio de cultivo contendo a mesma concentração do diluente. Este teste foi realizado apenas para os derivados que foram solúveis em água ou em DMSO; (2) amostras incubadas apenas com meio de cultivo completo apropriado. Após 24h de incubação, as amostras foram incubadas por 4h, no escuro e à 37°C, com 150µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultivo apropriado). Em seguida esta solução foi retirada e 150µL de DMSO foram adicionados a cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), sendo DMSO o branco. O ensaio de MTT foi realizado em triplicata para cada composto e concentração utilizada e em três experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte expressão: % células viáveis = [(amostra teste – branco)/(amostra controle – branco)] x 100. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA no software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

4.4 Marcação fluorescente em células de mamíferos (ensaios *in vitro*)

Para avaliar o perfil das marcações fluorescentes dos compostos, 3×10^5 células foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com os derivados fluorescentes por 30 minutos na concentração de 10, 1 e 0,1 µM. Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 minutos. As amostras foram novamente lavadas com PBS e as amostras foram montadas com *ProLong Gold Antifade* sobre lâminas, devidamente identificadas. O outro grupo de amostras foi pré-fixado em formaldeído 3,7% por 30 minutos a temperatura ambiente, lavado três vezes em PBS e incubado com os compostos também na concentração de 10, 1 e 0,1 µM por 30 minutos a temperatura ambiente. Os poços foram então lavados com PBS e as lâminas foram montadas com *ProLong Gold Antifade*. Além dos grupos citados anteriormente, outras amostras foram tratadas com o composto BJD#UnB3 e hidrazina, a fim de avaliar a capacidade deste derivado fluorescente de detectar esta substância, o qual provoca mudança no comprimento de onda de emissão do fluoróforo

(desaparecimento da emissão do canal do vermelho). Como controle negativo para autofluorescência das células, foram utilizadas amostras celulares vivas e fixadas incubadas apenas nos seus respectivos meios de cultivo. Todas as amostras foram devidamente identificadas, o ensaio foi feito em triplicata e as lâminas foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). Os parâmetros utilizados em todos os derivados para aquisição das imagens foram: excitação (UV 405nm), ganho (entre 1000 e 1200), *off set* (entre 2,5 e - 2,5), pinhole (300) e *line average* (2).

4.4.1 Co-marcação dos compostos BJD#UnB1 e BJD #UnB2 com CellMask®

Para a avaliação da seletividade dos compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 para a membrana plasmática foi realizada uma co-marcação das amostras com o marcador comercial de membrana plasmática CellMask® (5µg/mL). Foram utilizadas 3×10^5 células MCF-7 semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram fixadas em solução de formaldeído 3,7% em seguida as amostras foram lavadas três vezes em PBS à temperatura ambiente. Após a incubação com os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 por uma hora na concentração de 10µM, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e incubadas em solução de CellMask® por 30 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâmina de vidro com *Prolong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). Em seguida, as imagens foram sobrepostas no Adobe photoshop, para verificar a co-localização.

4.4.2 Marcação de lipídios intracelulares com marcador comercial Bodipy®

Para a marcação com Bodipy® foram utilizadas 3×10^5 células MDA-MB-231 semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram fixadas em solução de formaldeído 3,7%. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS à temperatura ambiente e incubadas com solução do marcador comercial de referência Bodipy® 1µg/mL por 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas novamente três vezes com PBS e as lamínulas montadas sobre lâmina de vidro com *Prolong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a

Laser (Leica TCS SP5), utilizando a mesma configuração para a adequada comparação da intensidade de fluorescência individual dos compostos BJD#UnB3, Bodipy® e dos dois compostos em co-marcação. Em seguida, as imagens foram analisadas pelo software ImageJ, com a utilização das ferramentas “Image” – “Color” Split channels” e em seguida “Adjust” – “Threshold”, onde dez diferentes pontos de três imagens de cada marcação foram quantificadas. Posteriormente analisadas pela ferramenta "Plot Profile" e pelo *plugin* "Interactive 3D Surface Plot". A edição de imagens foi realizada no software Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe). As alterações feitas se referem aos níveis de cores, contraste e sobreposição de imagens.

4.5 Marcação fluorescente em Zebrafish (ensaios *in vivo*)

4.5.1 Marcação de larvas de Zebrafish com derivados fluorescentes de benzotiadiazol

Os organismos foram mantidos em aquários com osmose reversa e água filtrada em filtros de carbono ativado. Os peixes foram cultivados em um biotério instalado na Universidade de Brasília com fotoperíodo de 12:12h (luz:escuro). Os parâmetros da água foram rigorosamente controlados: a temperatura foi mantida à $26,0 \pm 1^\circ\text{C}$, condutividade a $650 \pm 100 \mu\text{S}/\text{cm}$, pH a $7,0 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido $\geq 95\%$ de saturação. Os ovos de Zebrafish foram coletados imediatamente após o acasalamento natural, lavados e verificados em estereomicroscópio (Microscópio de Zoom Estereoscópico - SMZ 1500, Nikon Corporation, Japão). Os ovos não fertilizados, coagulados e aqueles com irregularidades foram descartados. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em eppendorf e incubadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3 na concentração de $10 \mu\text{M}$ por 3 horas. Outro grupo de larvas foi pré-fixada em formaldeído à 3,7% por 1 hora à temperatura ambiente, lavado três vezes com água de sistema e incubado com os compostos na concentração de $10 \mu\text{M}$ por 3 horas à temperatura ambiente. Para controle negativo, um grupo de amostras foram incubado somente com a água de sistema. Em seguida foram levadas e analisadas em microscópio.

4.5.2 Marcação de Zebrafish com CellMask®

Para análise de marcação de membrana com marcador comercial CellMask®, utilizou-se a mesma metodologia de manutenção e coleta citada anteriormente. Antes e

após a fixação das larvas, as mesmas foram incubadas com 500µL da solução de CellMask® por uma hora à temperatura ambiente.

4.5.3 Marcação de Zebrafish com Bodipy®

Para análise de marcação de lipídios com marcador comercial Bodipy®, utilizou-se também a mesma metodologia de manutenção e coleta citada anteriormente. Antes e após a fixação das larvas, as mesmas foram incubadas com 500µL da solução de Bodipy® (1µg/mL) por uma hora à temperatura ambiente.

4.6 Marcação fluorescente em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ensaios *in vivo*

4.6.1 Marcação de *C. elegans* com o derivado fluorescente BJD#UnB3

Neste ensaio os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 não tiveram bons resultados para este modelo, utilizando somente o derivado BJD#UnB3 para a marcação. Os *C. elegans* foram mantidos em meio líquido conforme descrito por Stiernagle (1999), em placa de NGM agar contendo *E. coli* a 22°C. Os nematódeos foram tratados vivos e pré-fixados. O grupo que foi tratado vivos, tiveram o composto BJD#UnB3 diluído no NGM agar, por 1 hora, em seguida foram lavados e montados em lâminula. Para o tratamento pré-fixado, os nematódeos foram coletados da placa de cultivo fazendo lavagem superficial com 1,5mL de tampão M9. Em seguida, o coletado foi transferido para um eppendorf de 1,5mL e centrifugado por 2 minutos a 300g. Descartou-se o sobrenadante, restituindo o volume com o tampão M9, ressuspendendo o precipitado e realizando novamente a centrifugação (passo realizado três vezes para lavagem dos nematódeos e retirada das bactérias). Após o último ciclo de lavagem, os nematódeos foram incubados com 1mL de solução de paraformaldeído à 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida o eppendorf foi congelado e descongelado (banho de nitrogênio líquido e água à 37°) em três ciclos de congelamento e descongelamento. Depois foi repetido o processo de lavagem por três vezes em tampão M9 para a remoção do paraformaldeído. Ao final do ciclo de lavagem, o eppendorf foi incubado com os marcadores BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3 por uma hora. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em tampão M9, sendo o precipitado ressuspenso e coletado o volume de 25µL para dispensar na lâmina. Este volume foi

espalhado sobre a lâmina de vidro com o uso da porção lateral de uma ponteira de plástico. A lâmina foi montada com lamínula retangular com o uso de *Prolong Gold Antifade*. As amostras foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). Foram feitas imagens em série no eixo Z de forma a subsidiar a reconstrução tridimensional da secção do organismo evidenciando a organização estrutural dos tecidos e a marcação do composto testado.

4.6.2 Marcação de *C. elegans* com DAPI

Para avaliar se havia a presença de alterações nos nematódeos, os mesmos foram tratados com marcador comercial DAPI, seguindo a metodologia de Fontodrona et al. (2012). Foram utilizados os mesmos métodos de manutenção e coleta já descritos acima. Após a fixação do nematódeo, incubaram-se os mesmos com 500 µL da solução de DAPI.

4.7 Marcação fluorescente em Microalgas

Neste ensaio os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 não tiveram bons resultados para este modelo, utilizando somente o derivado BJD#UnB3 para a marcação. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Botânica localizado no Instituto de Biologia da Universidade Brasília (UnB). As microalgas utilizadas nos experimentos foram da espécie *Chlorella sorokiniana* LBA39 identificada por Hadi e colaboradores (2016) e cedida pela Embrapa Agroenergia sendo cultivada em meio BG 11. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com volume útil de 150 mL em triplicata testando três diferentes meios de cultivo, mantidos em agitador rotatório orbital com fotoperíodo de 16/8 com 40 lux a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm durante 7 dias. 5×10^5 microalgas foram colocadas em eppendorf e centrifugadas para retirada do meio de cultivo, em seguida foram incubadas *overnight* com solução de formalina 3,7% e o composto BJD#UnB3 em uma concentração de 10µM. Posteriormente, foram centrifugadas e lavadas uma única vez com PBS, em seguida o *pellet* foi ressuscitado com 10 microlitros de PBS e colocadas em lâmina de vidro. Após secagem da amostra a mesma foi coberta por uma lamínula retangular. As amostras foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

4.8 Análise quantitativa da fluorescência emitida *in vitro*

Para analisar quantitativamente a fluorescência emitida nas linhagens celulares testadas, 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com os derivados fluorescentes por 30 minutos na concentração de $10 \mu\text{M}$. Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 minutos. Outro grupo de amostras foi pré-fixado em formaldeído 3,7% por 30 minutos à temperatura ambiente, lavado três vezes em PBS e incubado com os compostos também na concentração de $10 \mu\text{M}$ por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram levadas ao citômetro de fluxo BD Fortessa para a quantificação da fluorescência emitida. No citômetro foram coletados dados morfológicos das populações celulares e dentro da faixa mais homogênea destas populações foi quantificada a emissão fluorescente para dez mil eventos (células) em cada condição experimental. Posteriormente, os dados foram analisados no software FlowJo. A análise foi realizada em replicata.

4.9 Quantificação e comparação da intensidade da fluorescência entre diversas condições de tratamento

Para avaliar se as variáveis presentes no meio de incubação, como pH e composição nutricional, poderiam influenciar na intensidade de fluorescência apresentada pelo composto BJD#UnB3, foi realizado um experimento de marcação com o composto em diversas soluções. Para este ensaio, 3×10^5 células das linhagens MDAMB-231 e HUVEC foram semeadas sobre lâminulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com o derivado fluorescente (BJD#UnB3) por 30 minutos na concentração de $10 \mu\text{M}$, utilizando as seguintes soluções para tratamento (L15, RPMI, PBS pH 7,4 e PBS pH 7,6). Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 minutos. As amostras foram novamente lavadas com PBS e montadas com *ProLong Gold Antifade* sobre lâminas, devidamente identificadas. O ensaio foi feito em triplicata e analisado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). Utilizou-se a mesma configuração entre os grupos das duas linhagens celulares, para posterior quantificação da fluorescência. Após a aquisição das imagens, as mesmas

foram analisadas também pelo software ImageJ, analisando três fotos diferentes de cada grupo nas duas linhagens e foi quantificado dez pontos distintos.

4.10 Avaliação da estabilidade dos compostos fluorescentes em função do tempo

Com intuito de verificar a estabilidade dos compostos fluorescentes em solução e no meio intracelular, 3×10^3 células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e incubadas *overnight* a 37°C (para sua adesão na placa) com 150µL de meio de cultivo completo e apropriado por poço. Após a adesão, as células foram incubadas com os derivados fluorescentes por 30 minutos na concentração de 10 µM. Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 minutos. Outro grupo de amostras foi pré-fixado em formaldeído 3,7% por 30 minutos à temperatura ambiente, lavado três vezes em PBS e incubado com os compostos também na concentração de 10µM por 30 minutos à temperatura ambiente e os poços foram então lavados com PBS. Utilizou-se também a hidrazina para avaliar a estabilidade quando incubado juntamente com o BJD#UnB3. Em todos se adicionou 200µL de PBS e foram utilizados dois controles negativos: (1) poços apenas com PBS e (2) amostras incubadas com PBS. A fim de avaliar a estabilidade dos compostos em soluções aquosas, foram utilizados poços contendo PBS e a solução a 10µM dos compostos fluorescentes. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 por um período de cinco horas, totalizando em 301 leituras, sendo cada leitura realizada a cada minuto. (Molecular Devices – USA).

4.11 Análise de renderização 3D (Z-stack)

Nesta análise, foram utilizadas as células MDA-MB231, o nematódeo *C. elegans* e a microalga, onde foi adquirida uma série de imagens para a análise de renderização 3D. Estas imagens são imagens 2D em sequência no eixo Z de observação da amostra através do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). A sequência de imagens foi disposta em sobreposição pelo software Leica Application Suite Advanced Fluorescence o qual fez a reconstrução através de uma projeção 3D de todas as imagens adquiridas para cada amostra. Foram utilizados os campos de

fluorescências e omitido o campo claro (imagem por contraste de fase) para possibilitar uma melhor representação e visualização da distribuição dos corpúsculos lipídicos no interior das células, tecidos do *C. elegans* e em microalga. Foi também realizada análises ortogonais a partir das imagens adquiridas no eixo Z a fim de se demonstrar o posicionamento espacial das marcações no interior dos modelos.

4.12 Análises Estatísticas

As análises dos dados foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5, utilizando-se o teste ANOVA com pós teste Dunnet. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 Resultados

5.1 Viabilidade Celular

Realizou-se o teste de viabilidade celular para avaliar a atividade citotóxica dos derivados do benzotiadiazol contra as linhagens celulares utilizadas no presente trabalho. Determinou-se a porcentagem de células viáveis através do ensaio do sal de tetrazolium (MTT), onde as cinco linhagens celulares (MDAMB231, Caco-2, T47D, MCF-7 e HUVEC) foram tratadas durante 24 horas com os derivados em várias concentrações. As concentrações utilizadas dos derivados, foram: 100, 10 e 1 μM para BJD#UnB1 (**Figura 11**); BJD#UnB2 (**Figura 12**), BJD#UnB3 (**Figura 13**) e BJD#UnB3 + Hidrazina (**Figura 14**). Observou-se através dos resultados que no tratamento com os derivados BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3 e BJD#UnB3 + Hidrazina, que todas as linhagens apresentaram viabilidade maior que 80%, em todas as concentrações testadas (100, 10 e 1 μM). Vale ressaltar que o resultado foi bastante positivo, visto que o tempo de incubação dos derivados no tratamento celular é de apenas 30 minutos e o teste da viabilidade foi realizado por um período de 24 horas.

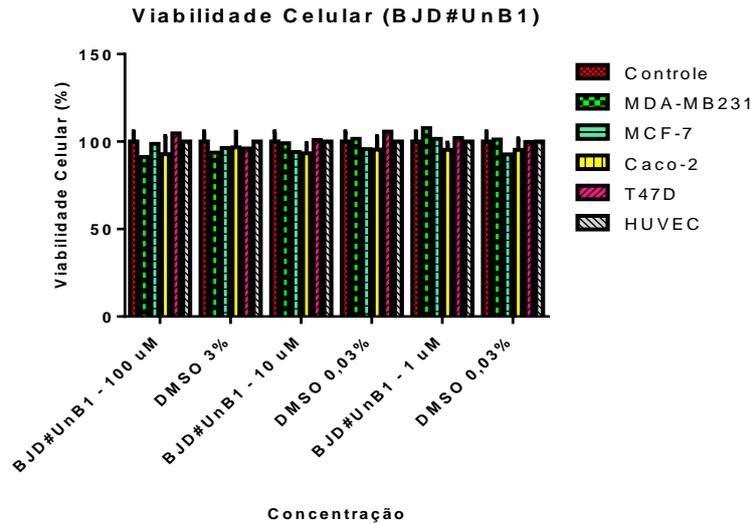


Figura 11. Viabilidade celular das linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com composto BJD#UnB1 e DMSO (controle) nas concentrações utilizadas para diluições dos compostos (100, 10 e 1uM), no período de 24 horas. Gráfico representativo de três experimentos independentes, demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnet. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

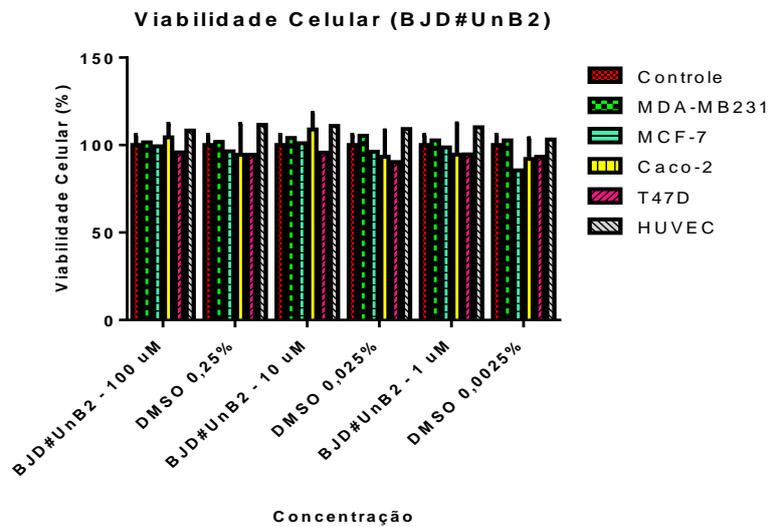


Figura 12. Viabilidade celular das linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com composto BJD#UnB2 e DMSO (controle) nas concentrações utilizadas para diluições dos compostos (100, 10 e 1uM), no período de 24 horas. Gráfico representativo de três experimentos independentes, demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnet. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

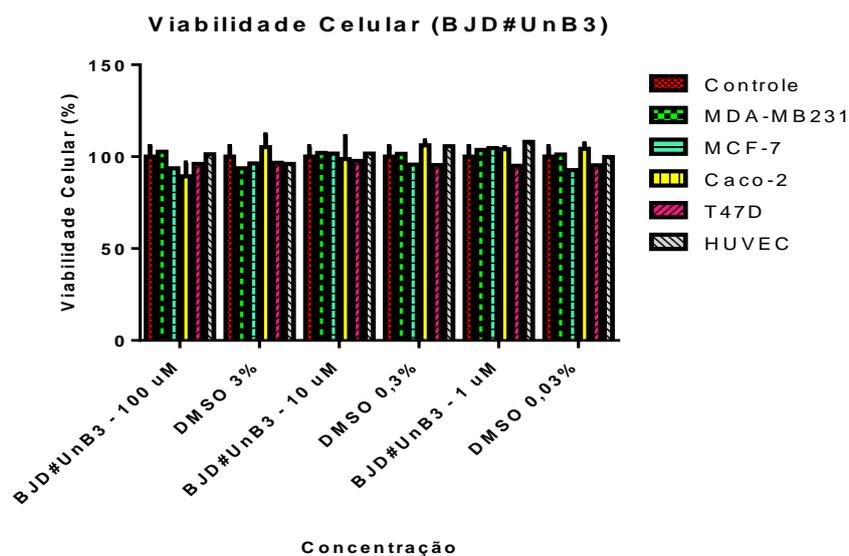


Figura 13. Viabilidade celular das linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com composto BJD#UnB3 e DMSO (controle) nas concentrações utilizadas para diluições dos compostos (100, 10 e 1uM), no período de 24 horas. Gráfico representativo de três experimentos independentes, demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnet. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

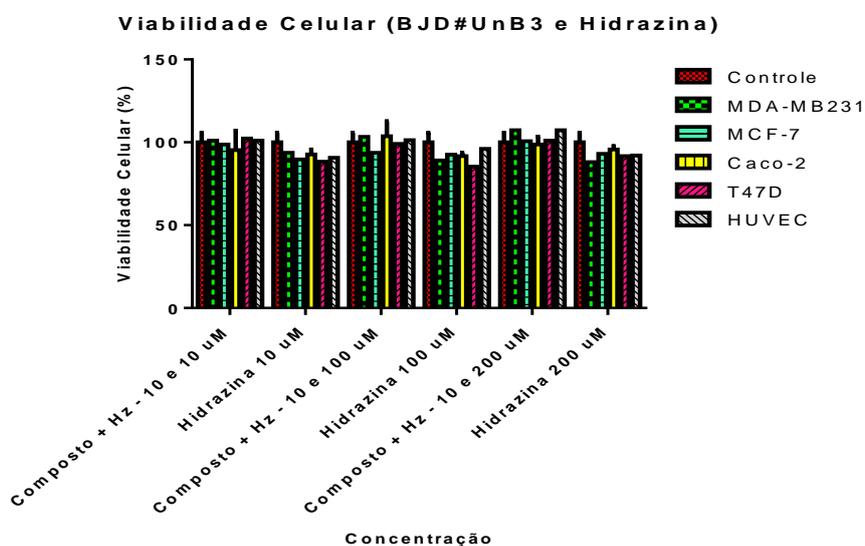


Figura 14. Viabilidade celular das linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com composto BJD#UnB3 e Hidrazina nas concentrações de 10, 100 e 200 uM, no período de 24 horas. Gráfico representativo de três experimentos independentes, demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnet. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.2 Marcação fluorescente em células de mamíferos (*in vitro*)

Os experimentos de imageamento celular foram realizados com as cinco linhagens celulares empregadas neste trabalho (MCF-7, MDA-MB231, Caco-2, T47D e HUVEC) onde as mesmas foram tratadas vivas e pré-fixadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3 e BJD#UnB3 + Hidrazina. O DMSO foi utilizado para diluição dos compostos, as **figuras 15 e 16** mostram o controle negativo, que foi feito através da incubação das linhagens celulares com as porcentagens respectivas de DMSO contidas em cada concentração de tratamento. As imagens são referentes à maior concentração de DMSO de um dos compostos. Pode-se observar que apesar do fraco sinal de fluorescência, o mesmo se torna disperso por toda a célula, não mostrando nenhuma especificidade celular. Mesmo sendo possível visualizar no microscópio um pouco desta autofluorescência, o aparelho não consegue reproduzir este sinal, sendo observado somente um ruído, tanto em células vivas (**Figura 15**) quanto em células pré-fixadas (**Figura 16**).

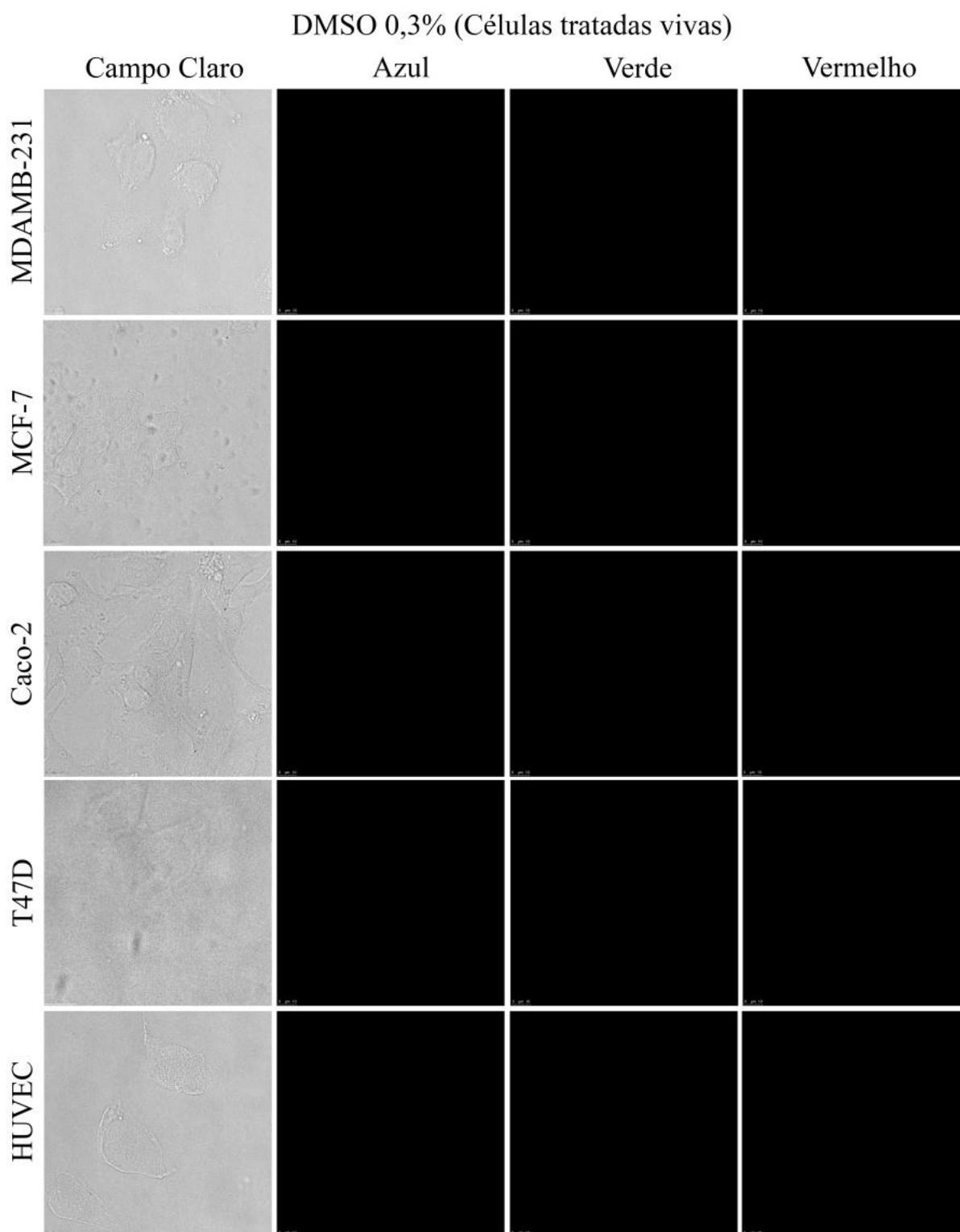


Figura 15. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, sem tratamento. Células vivas incubadas com DMSO (meio de diluição dos compostos) por trinta minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e não houve emissão de fluorescência em nenhum dos três canais. Barra de referência 10 μ M.

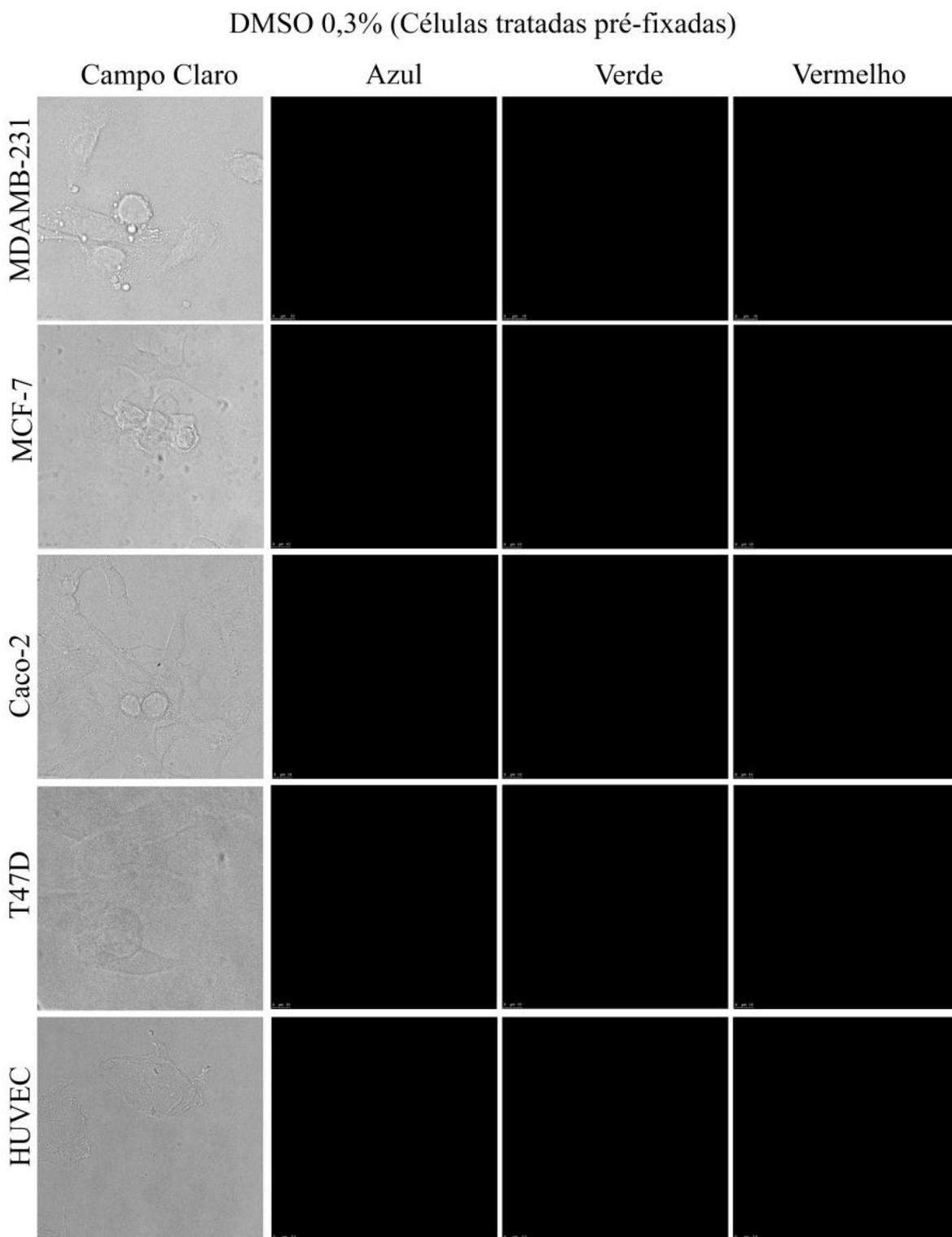


Figura 16. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, sem tratamento. Células pré-fixadas foram incubadas com DMSO (meio de diluição dos compostos) por trinta minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e não houve emissão de fluorescência em nenhum dos três canais. Barra de referência 10 μ M.

A marcação celular dos derivados BJD#UnB1 e BJD#UnB2 foram bastante similares, onde os mesmos apresentaram especificidade em torno da membrana celular. O derivado BJD#UnB1 (**Figuras 17 e 18**) apresentou intensa emissão de sinal fluorescente no azul (450/490 nm) , considerável sinal fluorescente no verde (500/570nm) e nenhum sinal no vermelho, tanto em células vivas quanto em células pré-fixadas. O derivado BJD#UnB2 (**Figuras 19 e 20**) apresentou baixo sinal no azul e vermelho e sinal de intensidade média no verde (500/570nm), tanto em células vivas quanto pré-fixadas.

Composto BJD#UnB1 (Células tratadas vivas)

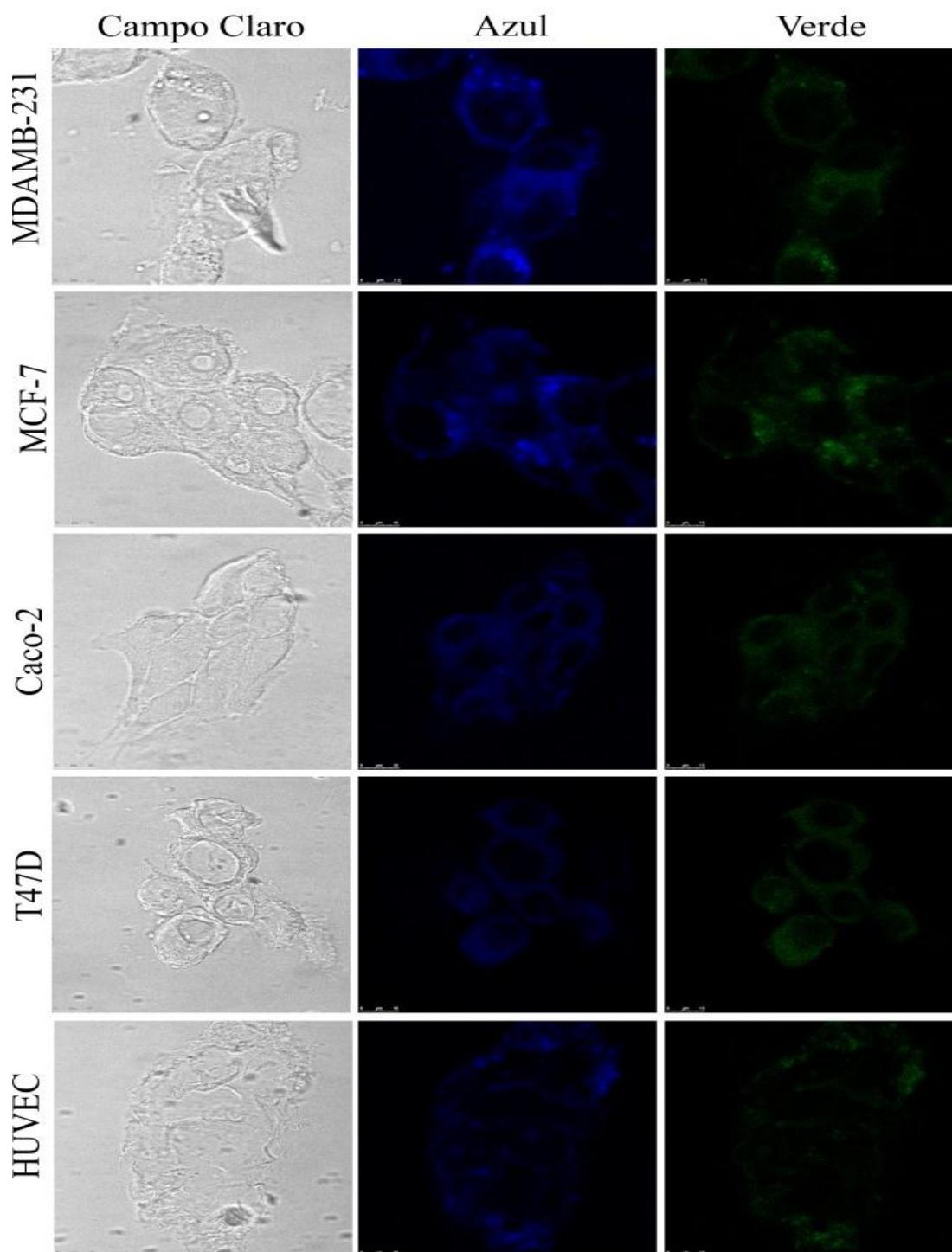


Figura 17. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB1. Células vivas foram incubadas com o composto BJD#UnB1 por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença da emissão de fluorescência nos canais do azul e verde. Barra de referência 10 μ M.

Composto BJD#UnB1 (Células tratadas pré-fixadas)

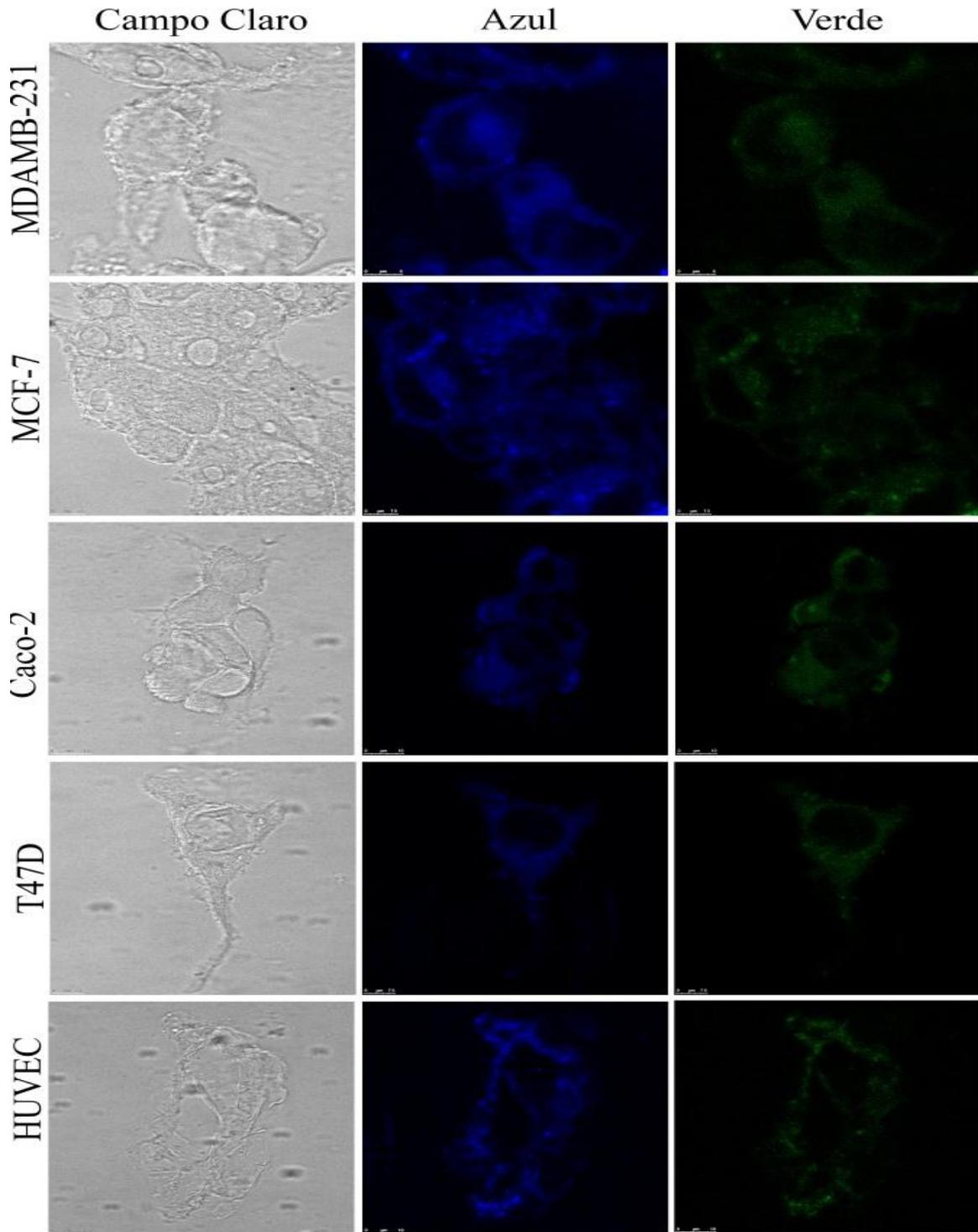


Figura 18. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB1. Células pré-fixadas foram incubadas com o composto BJD#UnB1 por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença da emissão de fluorescência nos canais do azul e verde. Barra de referência 10 μ M.

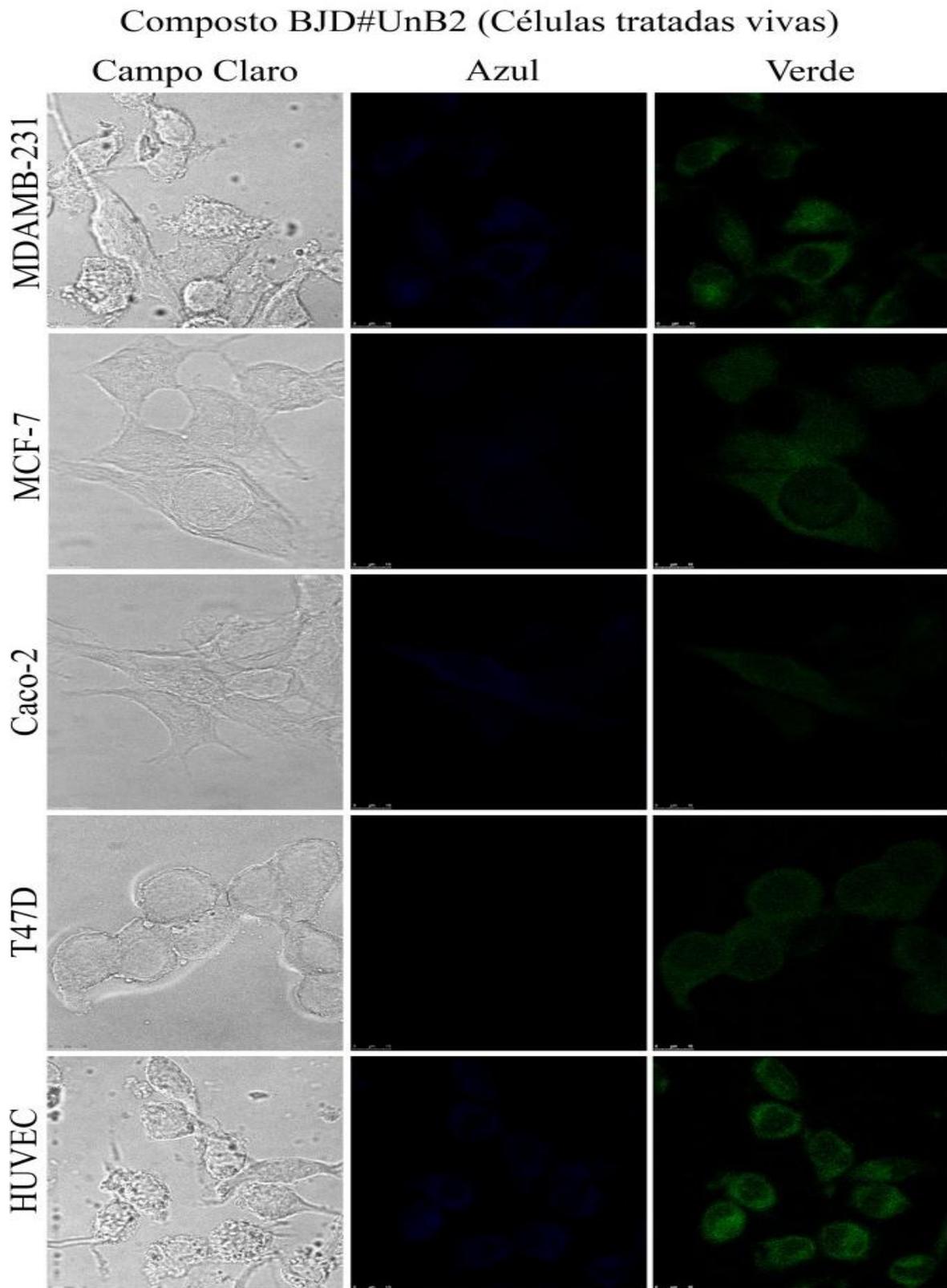


Figura 19. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB2. Células vivas foram incubadas com o composto BJD#UnB2 por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença da emissão de fluorescência nos canais do azul e verde. Barra de referência 10 μ M.

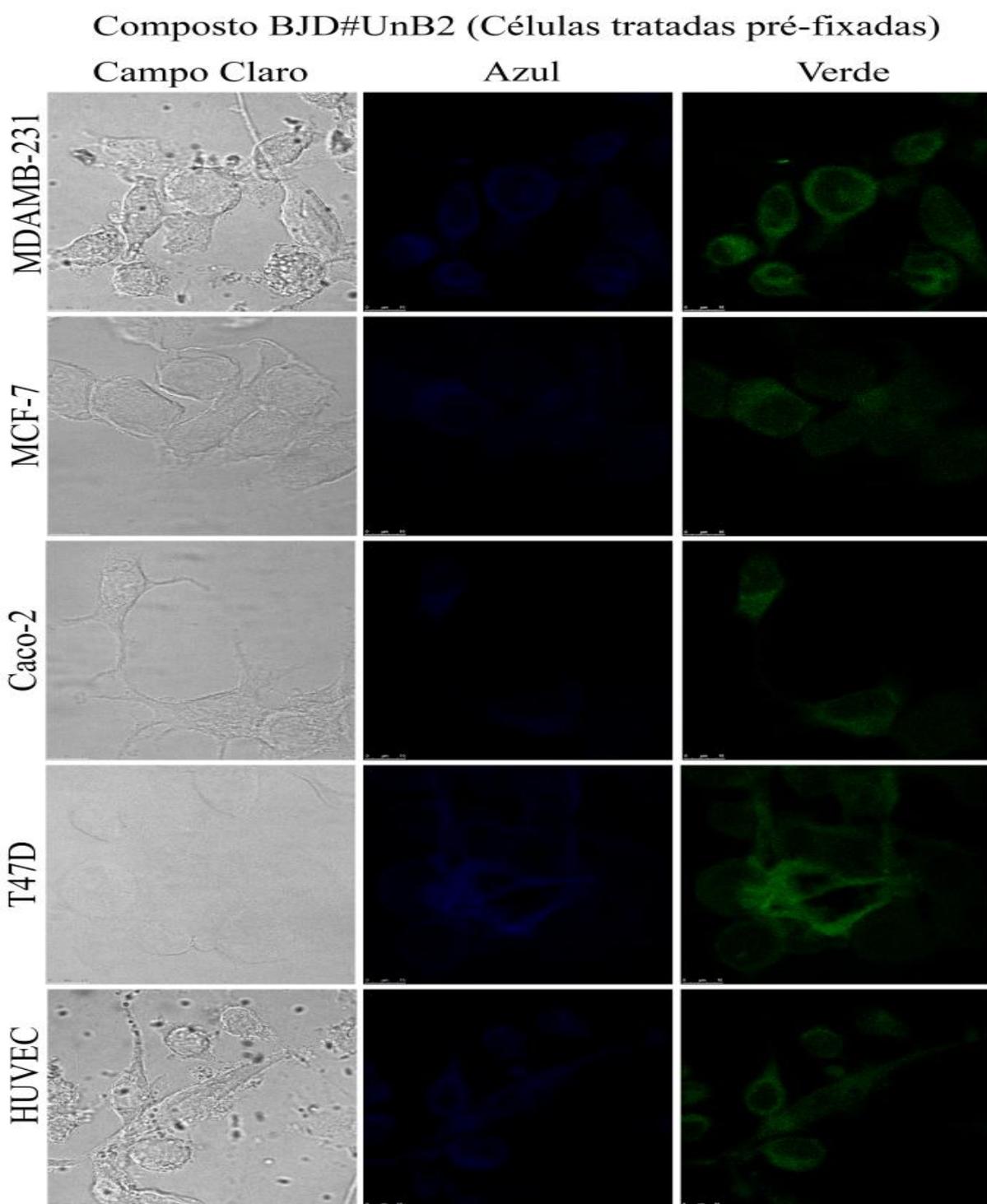


Figura 20. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB2. Células pré-fixadas foram incubadas com o composto BJD#UnB2 por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença da emissão de fluorescência nos canais do azul e verde. Barra de referência 10 μ M.

Para avaliar a detecção de hidrazina através do composto BJD#UnB3, as linhagens foram tratadas com 200 μ M da substância, para verificação da capacidade de emissão de fluorescência. Contudo, observou-se que as linhagens incubadas apenas com hidrazina não apresentaram emissão de fluorescência tanto em células vivas quanto em pré-fixadas (**Figuras 21 e 22**).

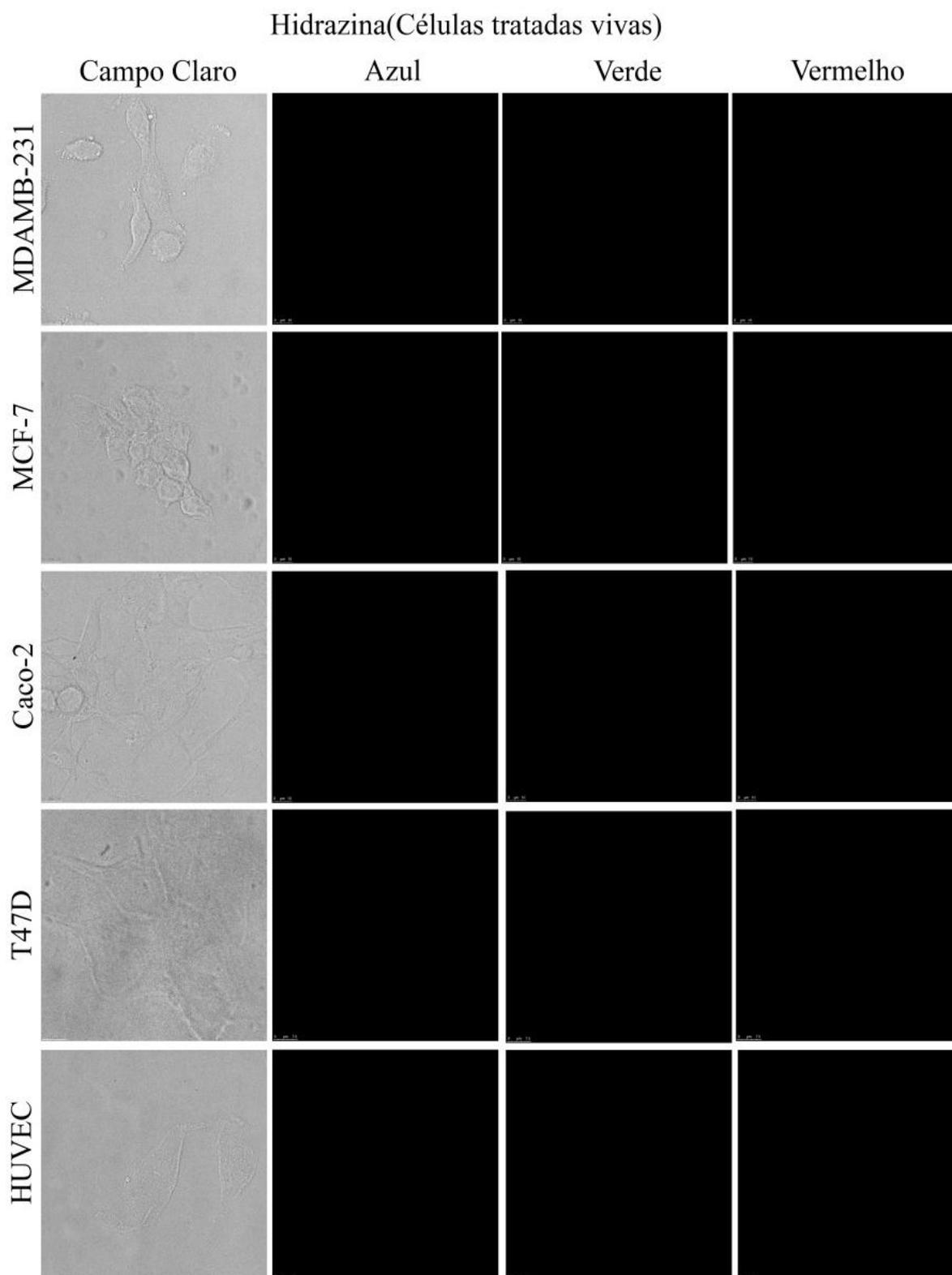


Figura 21. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com **Hidrazina**. Células vivas foram incubadas hidrazina (200 μ M) por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou que não houve emissão de fluorescência em nenhum dos três canais. Barra de referência 10 μ M.

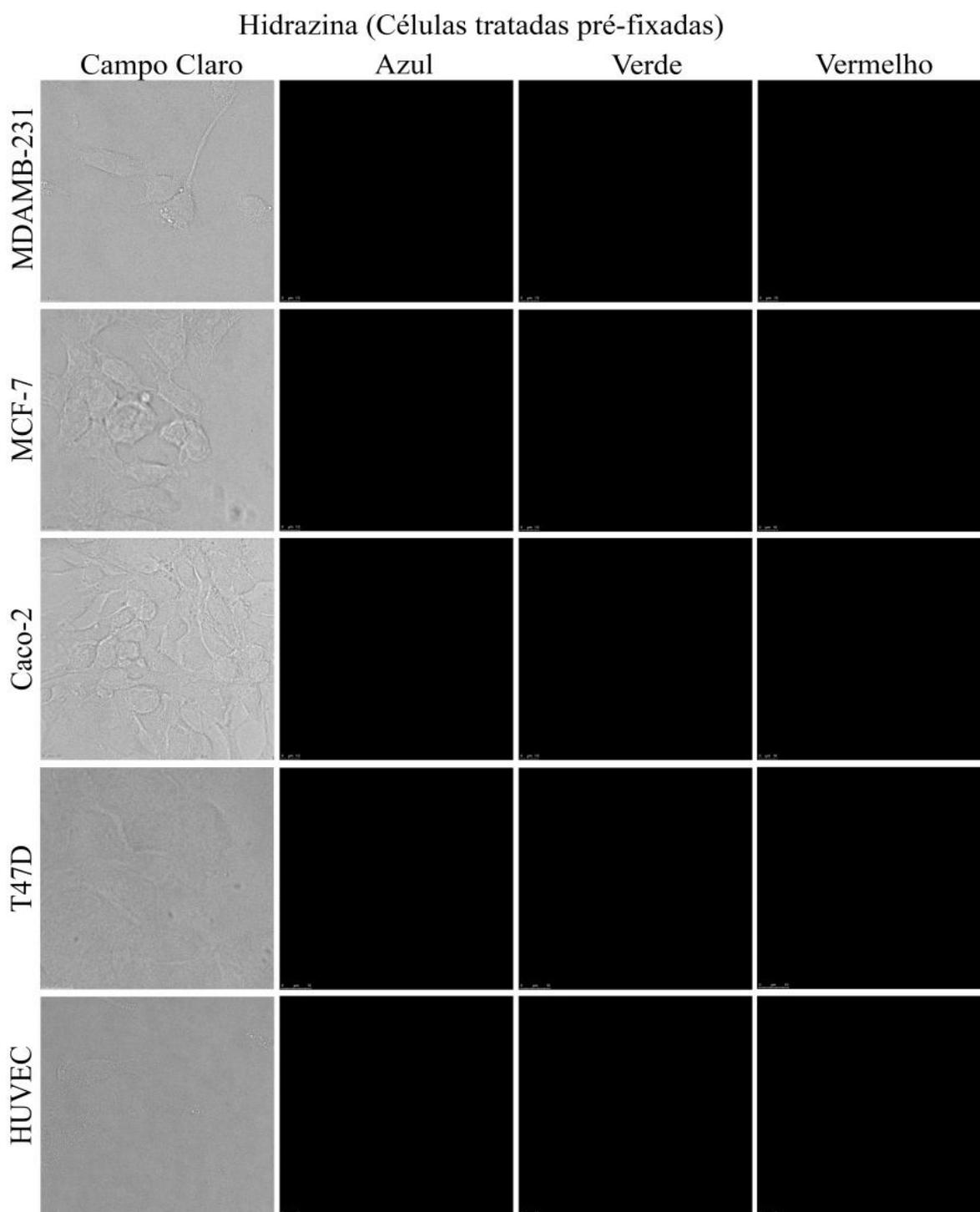


Figura 22. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com **Hidrazina**. Células pré-fixadas foram incubadas com hidrazina (200 μ M) por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou que não houve emissão de fluorescência em nenhum dos três canais. Barra de referência 25 μ M.

Diferentemente, o composto BJD#UnB3 apresentou afinidade por corpúsculos esféricos dispersos no citoplasma. O derivado BJD#UnB3 (**Figuras 23 e 24**) apresentou intensa emissão de fluorescência no verde (500/570 nm) em todas as linhagens celulares e moderada emissão de fluorescência no azul (450/490nm) e vermelho (610/690) em algumas linhagens celulares avaliadas, tanto em células vivas quanto em fixadas.

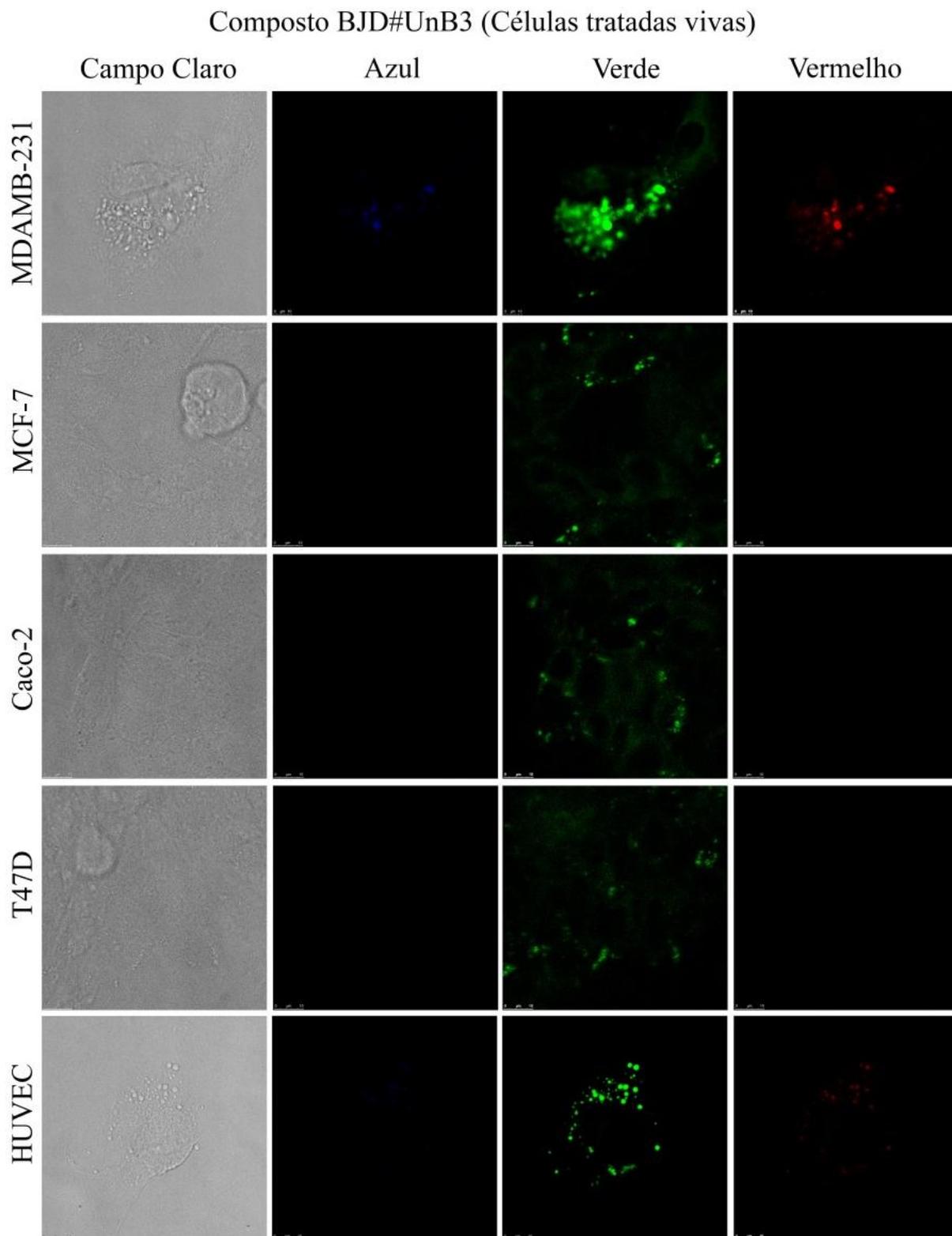


Figura 23. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB3. Células vivas foram incubadas com o composto BJD#UnB3 por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença de uma fraca emissão de fluorescência nos canais do azul e vermelho e intensa emissão de fluorescência no canal do verde. Barra de referência 10 μ M.

Composto BJD#UnB3 (Células tratadas pré-fixadas)

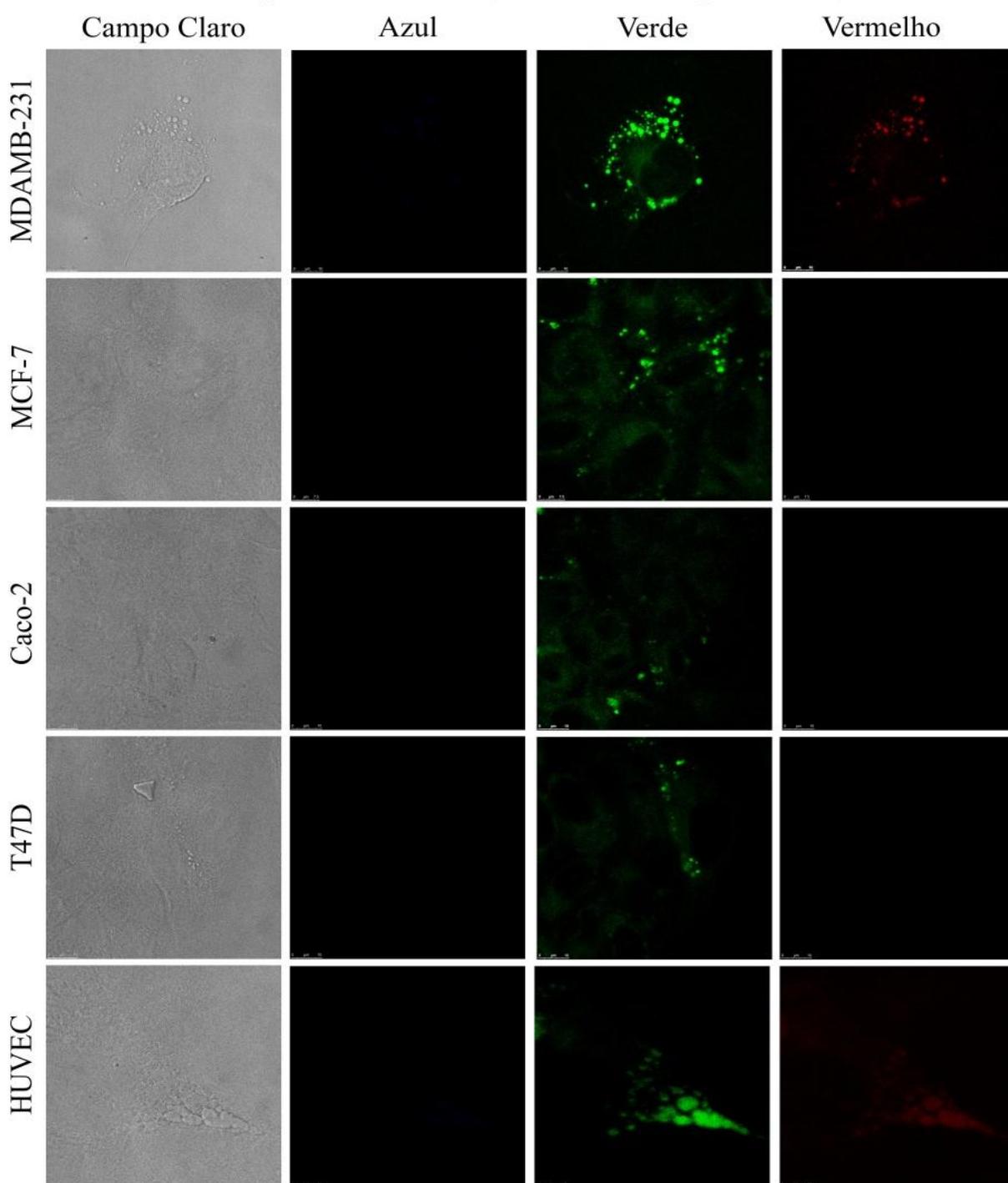


Figura 24. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB3. Células pré-fixadas foram incubadas com o composto BJD#UnB3 por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença de uma fraca emissão de fluorescência nos canais do azul e vermelho e intensa emissão de fluorescência no canal do verde. Barra de referência 10 μ M.

Os resultados demonstraram que quando as células das linhagens MDAMB-231 e HUVEC eram tratadas com BJD#UnB3 mais Hidrazina, a emissão do sinal de fluorescência no canal do vermelho desaparecia, diferentemente do ocorrido com células incubadas apenas com o composto BJD#UnB3 (**Figuras 25 a 26**). Análises feitas no software ImageJ, demonstram a diminuição da intensidade de fluorescência no vermelho quando o composto BJD#Unb3 foi incubado com hidrazina (**Figura 27**).

Composto BJD#UnB3 e Hidrazina (Células tratadas vivas)

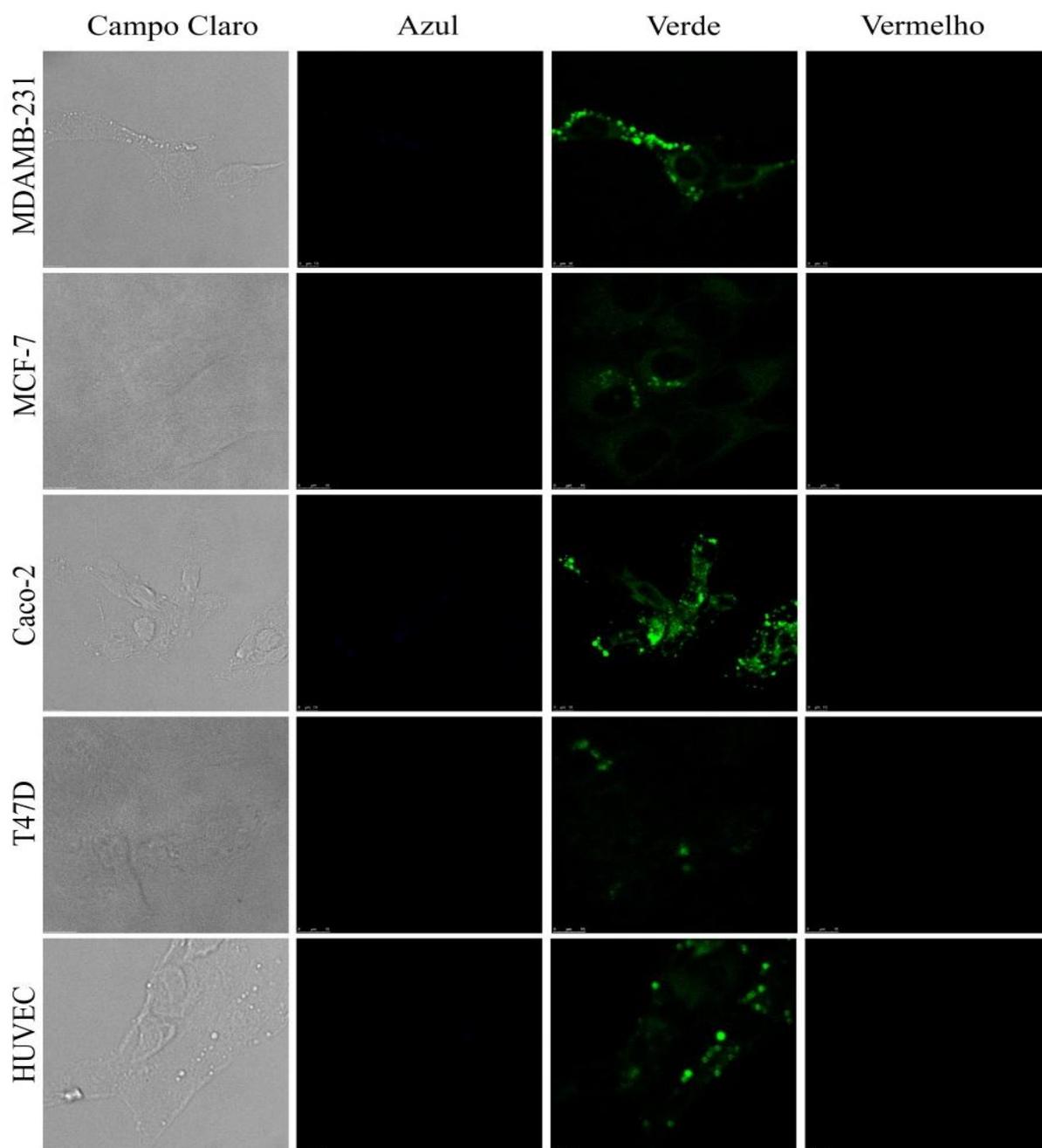


Figura 25. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB3 + Hidrazina. Células vivas foram incubadas com o composto BJD#UnB3 (10 μ M) e Hidrazina (200 μ M) por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença de uma fraca emissão de fluorescência nos canais do azul e vermelho e intensa emissão de fluorescência no canal do verde. Barra de referência 10 μ M.

Composto BJD#UnB3 e Hidrazina (Células tratadas pré-fixadas)

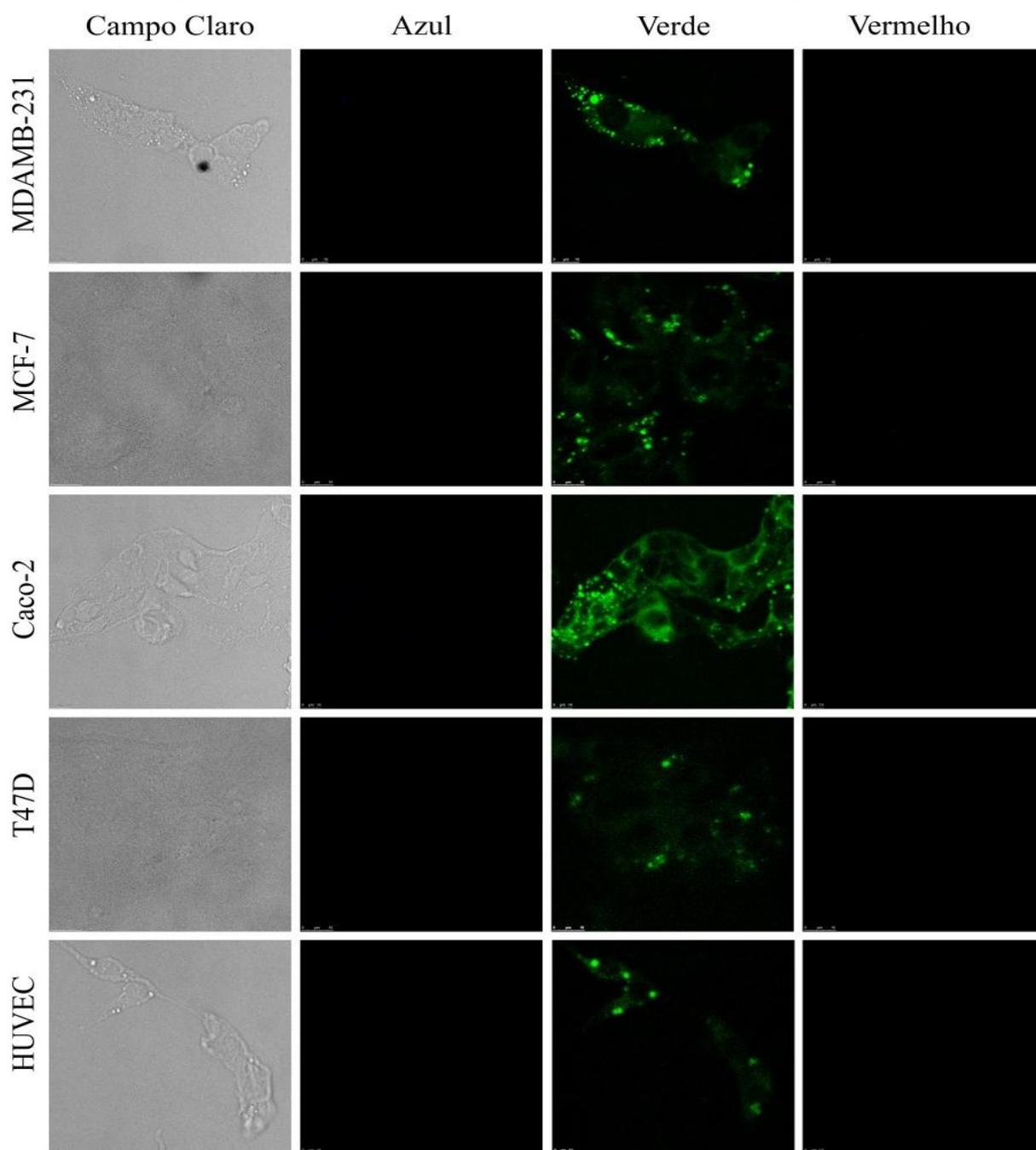


Figura 26. Linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas com o composto BJD#UnB3 + Hidrazina. Células pré-fixadas foram incubadas com o composto BJD#UnB3 (10 μ M) e Hidrazina (200 μ M) por 30 minutos. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostrou a presença de uma fraca emissão de fluorescência nos canais do azul e vermelho e intensa emissão de fluorescência no canal do verde. Barra de referência 10 μ M.

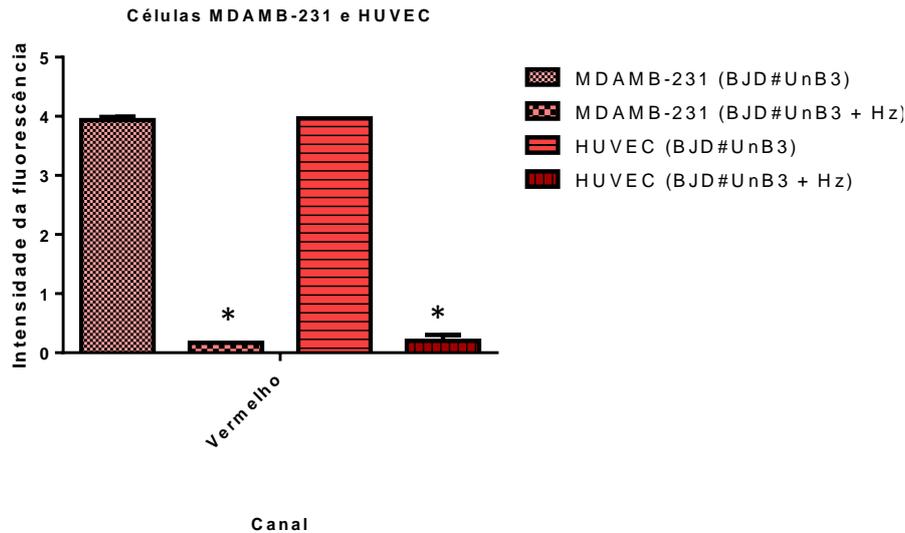


Figura 27. Análise da intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB3 e Hidrazina no canal do vermelho nas linhagens celulares MDAMB-231 e HUVEC. Nota-se a diminuição da intensidade de fluorescência nas linhagens citadas anteriormente quando incubadas com Hidrazina. Houve diferença estatisticamente significativa.

A **figura 28** mostra a marcação produzida pelos compostos BJD#UnB1 (azul), BJD#UnB2 (verde) e BJD#UnB3 (verde). O núcleo das células está marcado com iodeto de propídio (vermelho). Todos os compostos foram excitados em 405nm. Observou-se a repetição do padrão de marcação com todos os compostos testados e em todas as cinco linhagens analisadas. Além disso, nas células tratadas vivas não foi visualizado nenhuma alteração morfológica proveniente de citotoxicidade causada pelos compostos, o que confirma o ensaio de viabilidade celular citado anteriormente. Para melhor visualização das estruturas marcadas, as linhagens MCF-7 e MDAMB-231 foram co-marcadas com iodeto de propídio para corar o núcleo (**Figura 28**).

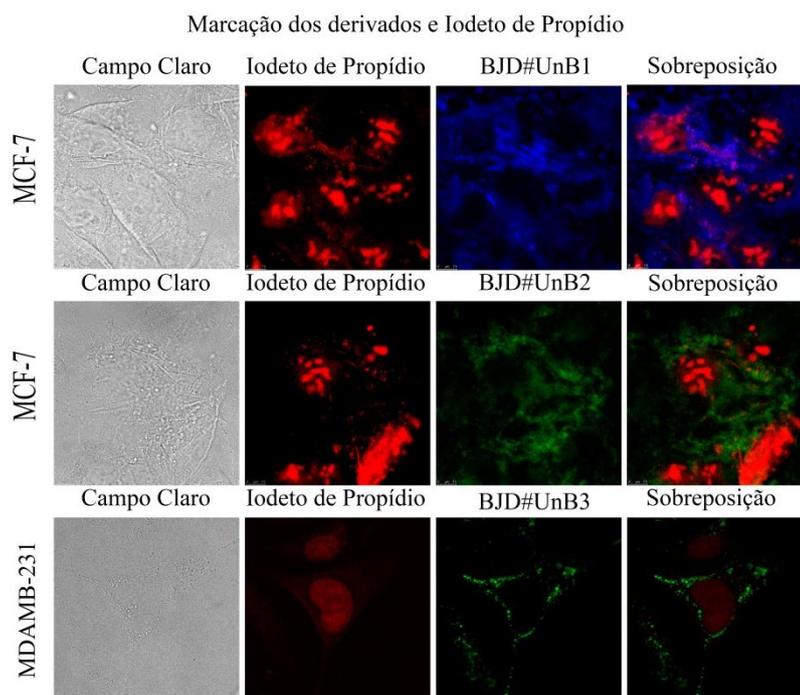


Figura 28. Linhagens MCF-7 e MDAMB-231 marcadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3 e Iodeto de Propídeo. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser. Para melhor visualização das estruturas intracelulares, as células foram marcadas com PI (vermelho) e com os compostos BJD#UnB1 (azul), BJD#UnB2 (verde) e BJD#UnB3 (verde). Barra de referência 7.5 μ M.

5.3 Confirmação da marcação específica

Como foi observado que os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 apresentaram uma marcação associada com a periferia das células, mais precisamente parecendo estar ligado à componentes da membrana plasmática, um ensaio com o agente fluorescente comercial de referência CellMask[®] para membrana plasmática foi realizado para confirmar esta hipótese. Este marcador apresenta pico de excitação e emissão no intervalo de 649 e 666nm, respectivamente. Através da co-marcação, foi confirmado que os compostos (BJD#UnB1 e BJD#UnB2) possuem especificidade pela membrana plasmática, sendo visível a co-localização expressada pela cor lilás (BJD#UnB1 e CellMask[®]) e alaranjada (BJD#UnB2 e CellMask[®]) (**Figura 29**).

Já o composto BJD#UnB3, apresentou um padrão de marcação característico se acumulando em vesículas esféricas distribuídas pelo citoplasma. Para confirmar se os compostos testados estavam se associando especificamente a corpúsculos lipídicos,

realizamos uma marcação com o marcador comercial de referência Bodipy[®] para lipídios neutros, para comparação dos padrões de marcação obtidos. Este marcador apresenta pico ótimo de emissão de fluorescência no intervalo de 500-530nm. Como o composto testado possui emissão de fluorescência nos três canais, ficou inviável a identificação visual de co-localização das marcações. Sendo assim, a co-marcação foi realizada para posterior análise quantitativa pelo software ImageJ. O objetivo desta análise era permitir a quantificação da fluorescência individual dos compostos BJD#UnB3 e Bodipy[®] e também de sua intensidade quando realizada a co-marcação com os mesmos. Com isto, o resultado da análise demonstrou que quando realizada a co-marcação, a intensidade de fluorescência aumenta significativamente, sugerindo uma colocalização entre os dois marcadores. Além disso, os resultados indicaram uma maior intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB3, quando comparado com o marcador comercial Bodipy[®], ressaltando que todas as imagens foram adquiridas com a mesma configuração do microscópio confocal, visando obter um resultado real e comparativos das intensidades de fluorescência (**Figura 30**).

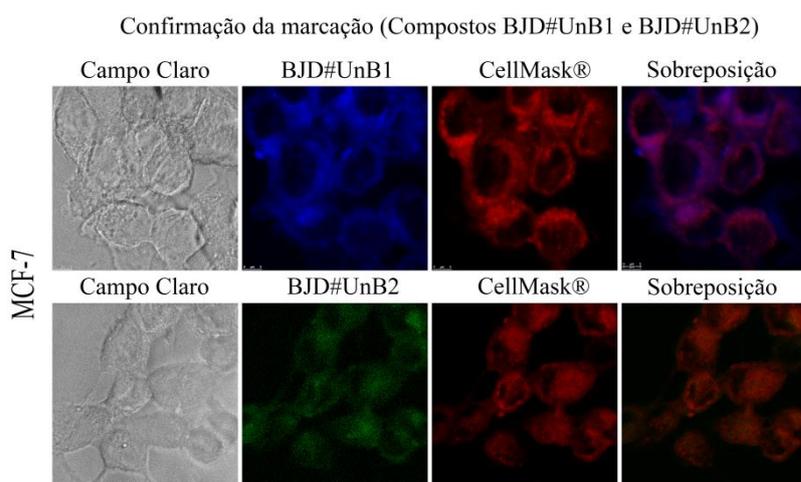


Figura 29. Células MCF-7 tratadas com o composto BJD#Unb1, BJD#UnB2 e CellMask[®]. Os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 foram co-marcados com o marcador comercial de membrana plasmática CellMask[®] por trinta minutos. Através das imagens de microscopia confocal pode-se observar a co-localização dos compostos apresentadas pelas imagens em lilás (BJD#UnB1 + CellMask[®]) e alaranjado (BJD#UnB2 + CellMask[®]). Barra de referência 7.5 μ M.

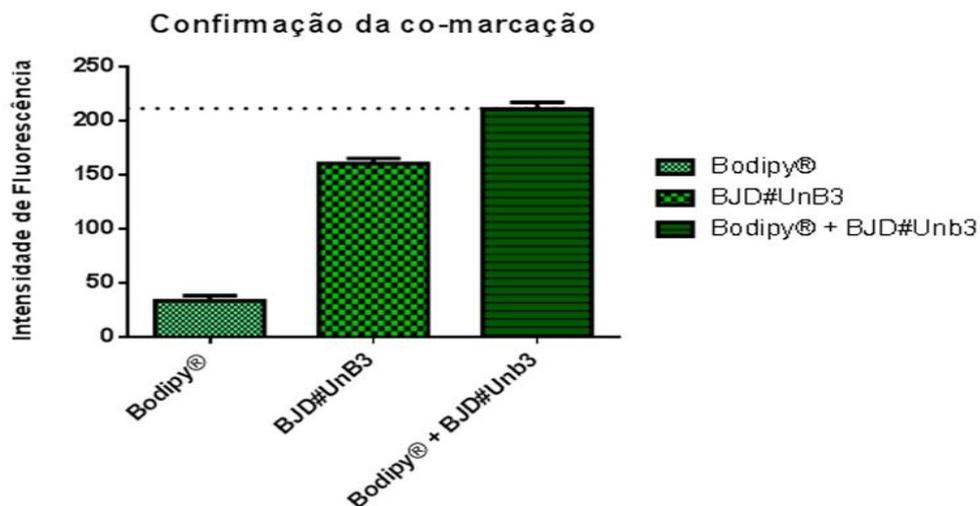
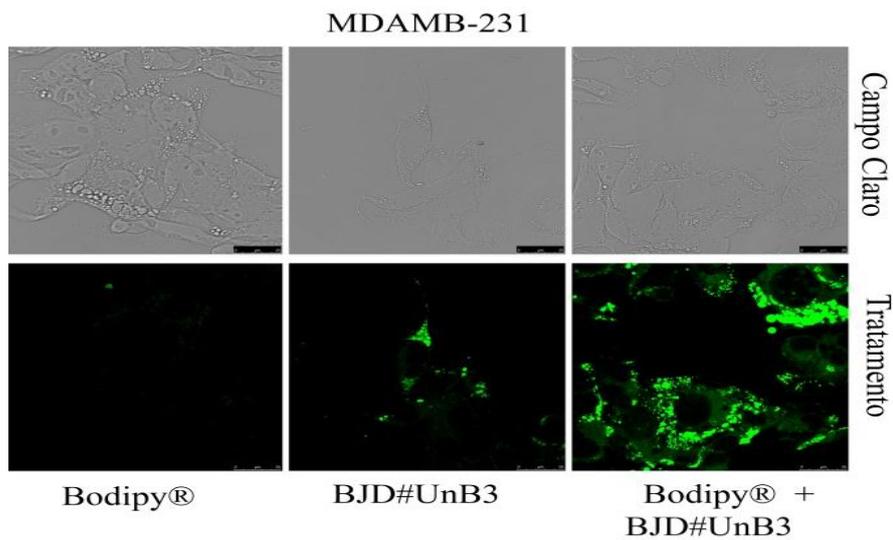


Figura 30. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJD#UnB3, Bodipy® e BJD#UnB3 + Bodipy®. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser e mostram a intensa fluorescência no canal do verde em vesículas lipídicas, quando tratados com os compostos. As imagens e o gráfico demonstram que o composto BJD#UnB3 apresenta intensidade de fluorescência maior que o marcador comercial de referência Bodipy®. Quando tratados juntos, essa fluorescência se intensifica ainda mais, demonstrando uma colocalização das marcações. Barra de referência 25 μ M.

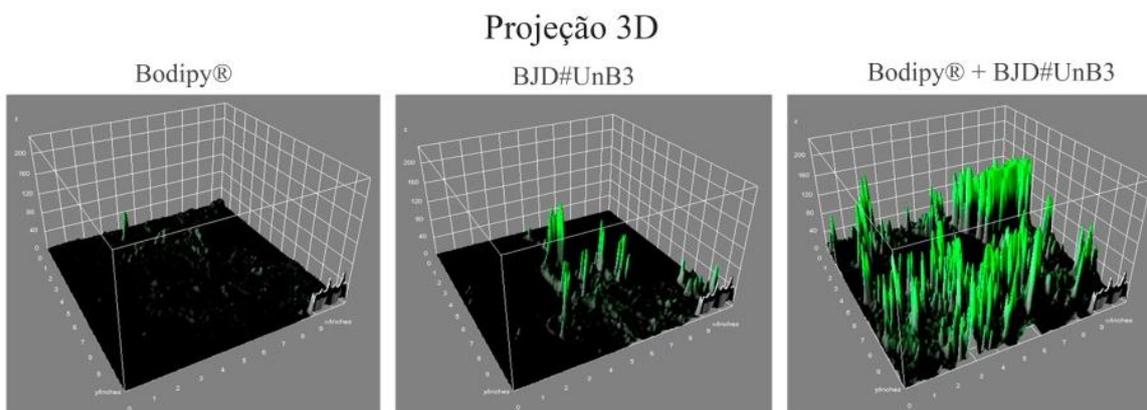


Figura 31. Análise da intensidade de fluorescência do marcador comercial Bodipy®, do composto BJD#UnB3 e da co-marcação (Bodipy® + BJD#UnB3). A intensidade de fluorescência foi realizada através da análise ratiométrica das imagens adquiridas no microscópio confocal, utilizando software ImageJ. As áreas de maior intensidade de fluorescência são apresentadas na projeção 3D através da escala, indicando que o composto BJD#UnB3 apresenta maior intensidade de fluorescência em relação ao marcador comercial Bodipy®. Além disso, a projeção mostra o aumento dos picos quando co-marcados.

5.4 Marcação de Zebrafish

Larvas de zebrafish foram incubadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3, CellMask® e Bodipy®, e após o tratamento as amostras foram analisadas no microscópio de fluorescência AxioPhot. Os resultados mostraram que as larvas não tratadas apresentaram fraca autofluorescência no azul, verde e vermelho. As larvas quando incubadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3 apresentaram um acúmulo de marcação na região cerebral e nos somitos. Quando comparados com o marcador comercial CellMask®, o mesmo obteve um acúmulo de marcação também na região da cabeça e boa parte no cérebro. Quando marcados com Bodipy®, o acúmulo foi observado no saco vitelínico das larvas. Tanto o cérebro quanto o saco vitelínico são regiões com acúmulo de lipídeos, o que pode diferenciar a marcação do composto BJD#UnB3 e o marcador comercial de lipídeos Bodipy® é o tipo de lipídeo para o qual ambos tem afinidade. A marcação dos compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 foi possível pela rica quantidade de membranas

existentes nestas estruturas marcadas (**Figura 32**

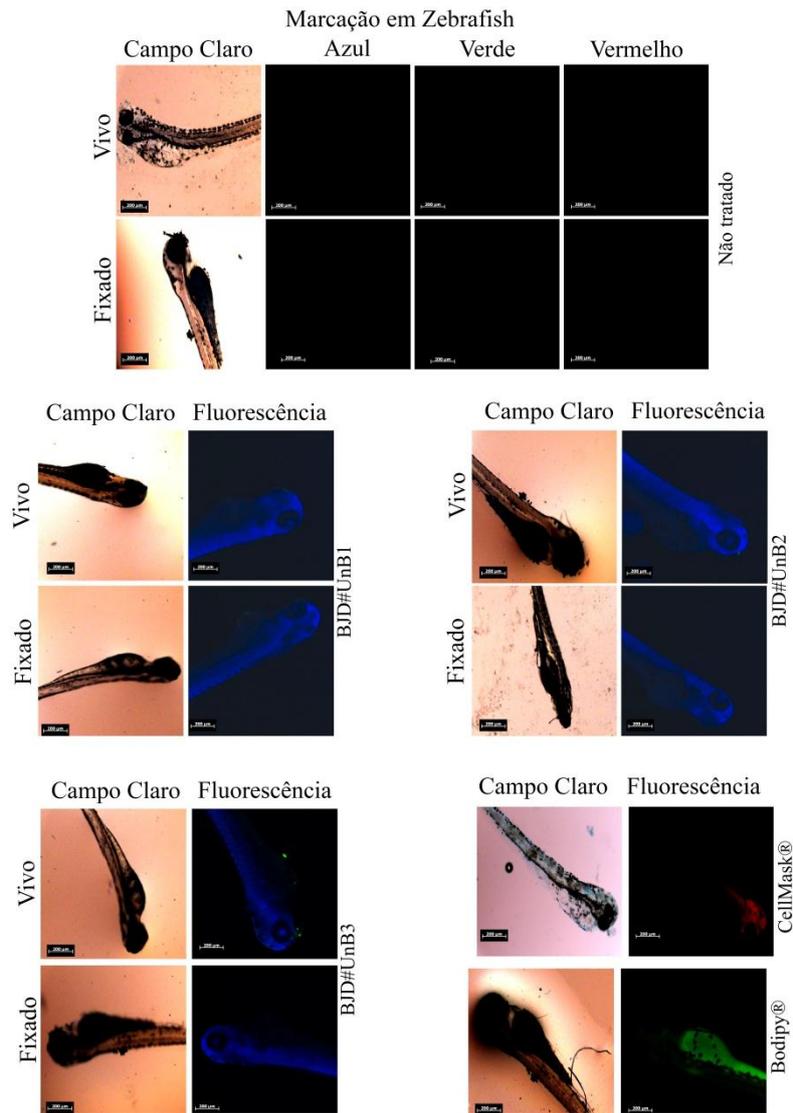


Figura 32. Zebrafish não tratado e tratado com BJD#UnB3. As larvas não tratadas foram incubadas com DMSO (meio de diluição dos compostos) e tratadas com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3, durante três horas. Foram observados nas imagens de microscopia de fluorescência, que a amostra não tratada, apresenta uma leve autofluorescência com emissão no azul e verde, de forma difusa em todo corpo da larva. A marcação com os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3 demonstram marcação no cérebro e somitos (estruturas em formato de “v” que auxila na coluna vertebral). CellMask® teve especificidade pela região da cabeça e cérebro e Bodipy® pelo saco vitelínico. O canal de contraste de fases permite visualizar a morfologia normal das larvas. Barra de referência 200 μ M.

5.5 Marcação no modelo *Caenorhabditis elegans*

A fim de avaliar a aplicação do derivado BJD#UnB3, que demonstrou especificidade para corpúsculos lipídicos nas linhagens celulares, em tecidos, fez-se a marcação no modelo *C. elegans* vivos e em um curto ensaio de fixação utilizando o derivado citado. Os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 não produziram bons resultados neste modelo, deste modo optou-se por não colocar as imagens. O controle negativo demonstrou uma fraca autofluorescência emitida pelo nematódeo, com emissão no azul, verde e vermelho. Assim como nas linhagens celulares, apesar da visualização da autofluorescência no microscópio, o sinal não pôde ser reproduzido pelo equipamento (**Figura 33**). Não foi observado qualquer tipo de alterações morfológicas do nematódeo após os procedimentos de marcação com o derivado avaliado, de acordo com a imagem de contraste de fase. Além disso, a marcação com DAPI demonstrou que o nematódeo utilizado apresentava suas estruturas bastante preservadas e sem alterações visíveis (**Figura 33**). Foi observada uma marcação na derme dos nematódeos quando tratados vivos com o composto BJD#UnB3. Já quando tratados após um curto processo de fixação, observou o acúmulo do fluoróforo em regiões esféricas no intestino e na hipoderme dos nematódeos, emitindo intenso sinal fluorescente no verde (**Figura 33**).

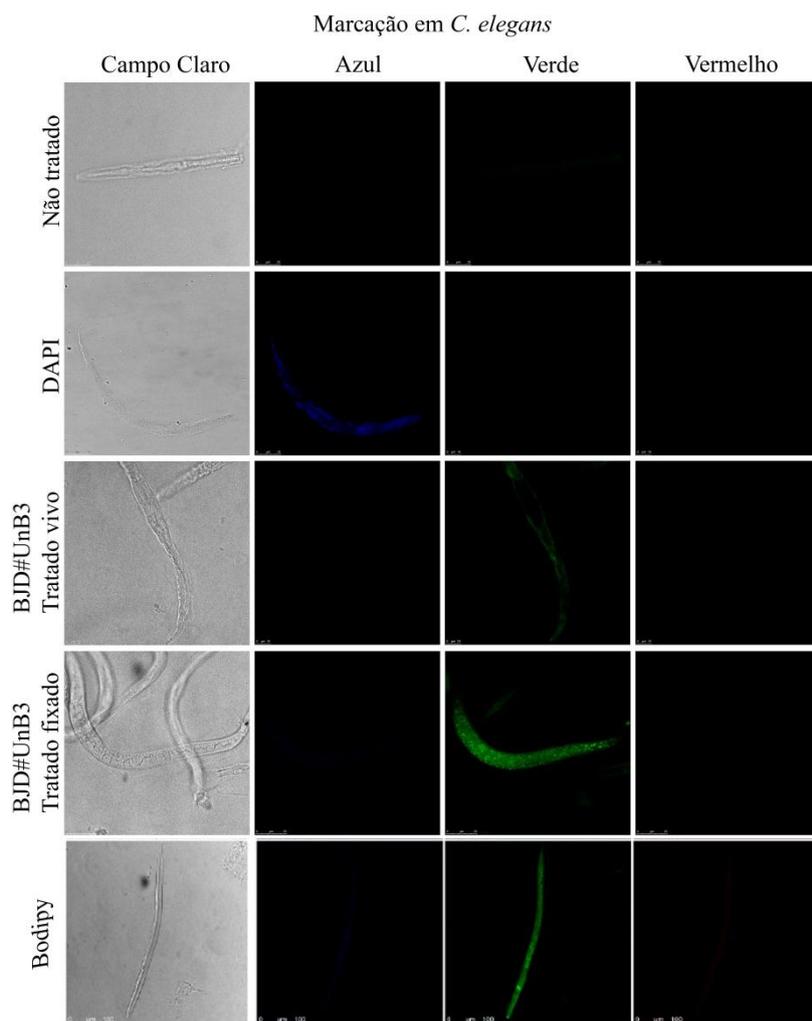


Figura 33. *C. elegans* não tratado e tratado com BJD#UnB3 e DAPI. Através das imagens de microscopia confocal de varredura a laser, foi observado na amostra não tratada, uma leve autofluorescência com emissão no azul, verde e vermelho, de forma difusa em todo corpo do nematódeo. A marcação com DAPI demonstra a morfologia normal dos vermes. Quando tratados vivos, os nematódeos apresentaram marcação em torno de sua membrana, diferente dos tratados após a pré-fixação, que apresentaram marcação de vesículas no intestino e hipoderme. O canal de contraste de fases permitiu a visualização da morfologia normal dos nematódeos. Barra de referência 10 μ M.

5.6 Marcação de microalgas

Com intuito de avaliar a marcação de lipídeos em um outro modelo de organismo, microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* (usadas na produção de lipídios para a fabricação de biodiesel) foram incubadas com o composto BJD#UnB3 *overnight* e após a análise, foi observado que as microalgas possuem uma

autofluorescência no vermelho e quando tratadas com o composto BJD#UnB3 as mesmas apresentam uma considerável emissão de fluorescência no canal do azul e intensa emissão de fluorescência no verde com pronunciada marcação de vesículas no seu interior (**Figura 34**). Este resultado demonstrou a afinidade do composto por vesículas lipídicas presentes nesta espécie de microalgas. Finalmente, nossos resultados sugerem que este marcador pode ser utilizado para a quantificação dessas estruturas por métodos de espectrofotometria, o que é de grande interesse da indústria de biocombustíveis. Os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 não produziram bons resultados neste modelo, deste modo optou-se por não colocar as imagens.

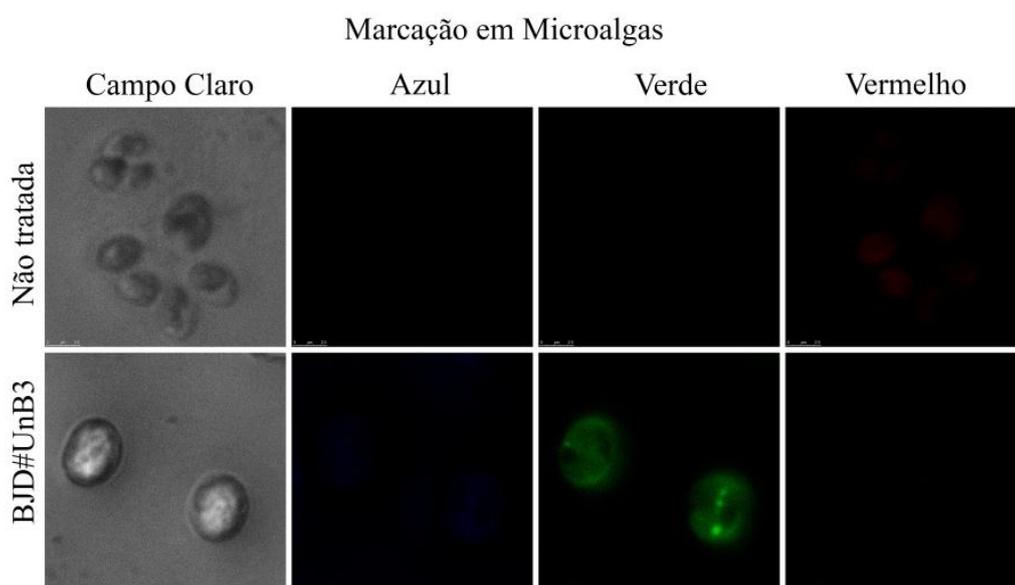


Figura 34. Microalgas não tratadas e tratadas com BJD#UnB3. As microalgas não tratadas foram incubadas com DMSO (meio de diluição do composto) ou com o composto BJD#UnB3 *overnight*. As imagens demonstram que as microalgas não tratadas apresentam significativa autofluorescência no canal do vermelho. Quando tratadas com o composto BJD#UnB3, as amostras apresentaram fluorescência difusa no canal do azul e intensa fluorescência no canal do verde, evidenciando corpúsculos esféricos no interior das microalgas. O canal de contraste de fases permite visualização da morfologia normal das microalgas. Barra de referência 2.5 μM .

5.7 Quantificação da intensidade de fluorescência apresentada pelos compostos fluorescentes

Com intuito de quantificar a fluorescência emitida pelos compostos nas linhagens celulares testadas, as amostras vivas e pré-fixadas foram incubadas com os derivados na concentração de 10 μ M por 30 minutos e analisadas em citômetro de fluxo. A fluorescência apresentada pelas amostras incubadas com os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 foi analisada nos canais AmyCian (verde) e Pacific blue (azul), enquanto que a fluorescência apresentada pelas amostras incubadas com o composto BJD#UnB3 foi analisada nos canais AmyCian (verde), Pacific blue (azul) e Qdot 605 (vermelho). Os resultados demonstraram que o composto BJD#UnB1 (**Figuras 35**) apresentou uma emissão de fluorescência mais pronunciada no canal do azul (Pacific blue) do que no canal do verde (Amycian), comparada com as amostras controle. O composto BJD#UnB2 apresenta menor intensidade de fluorescência que o composto BJD#UnB1. As análises quantitativas indicam que as amostras incubadas com este marcador são apenas sutilmente mais fluorescentes que as amostras controle, sendo a intensidade média de fluorescência consideravelmente baixa em ambos os canais (Amycian e Pacific Blue (**Figuras 36**)). Já o composto BJD#UnB3 teve considerável emissão de fluorescência no canal do azul (Pacific blue) e vermelho (Qdot 605), entretanto esta foi mais intensa no canal do verde (AmyCian). Quando incubados juntamente com a Hidrazina, o composto BJD#UnB3 apresentou um aumento da intensidade de fluorescência nas linhagens tumorais (MDAMB-23, MCF-7, Caco-2 e T47D) e uma diminuição da intensidade na linhagem celular normal (HUVEC) (**Figuras 37**).

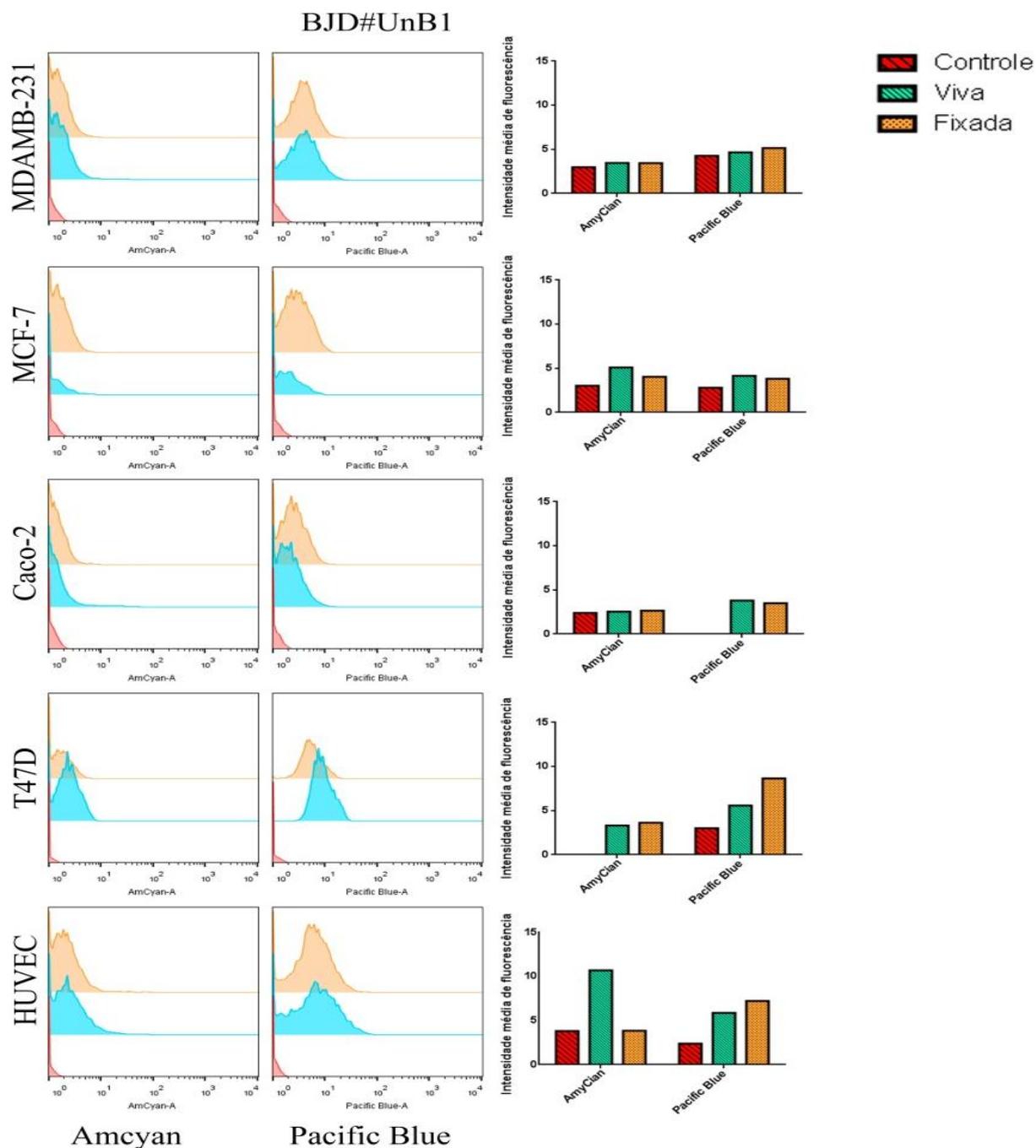


Figura 35. Quantificação da intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB1 nas linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC. As análises foram feitas em citômetro de fluxo e os dados analisados no software FlowJo. Os histogramas e gráficos demonstram intensidade de fluorescência do composto em todas as linhagens quando tratadas vivas (azul) e pré fixadas (laranja) em comparação com o controle não tratado (vermelho). Foram adquiridos 10.000 eventos nos canais de fluorescência Amycyan (verde) e Pacific blue (azul).

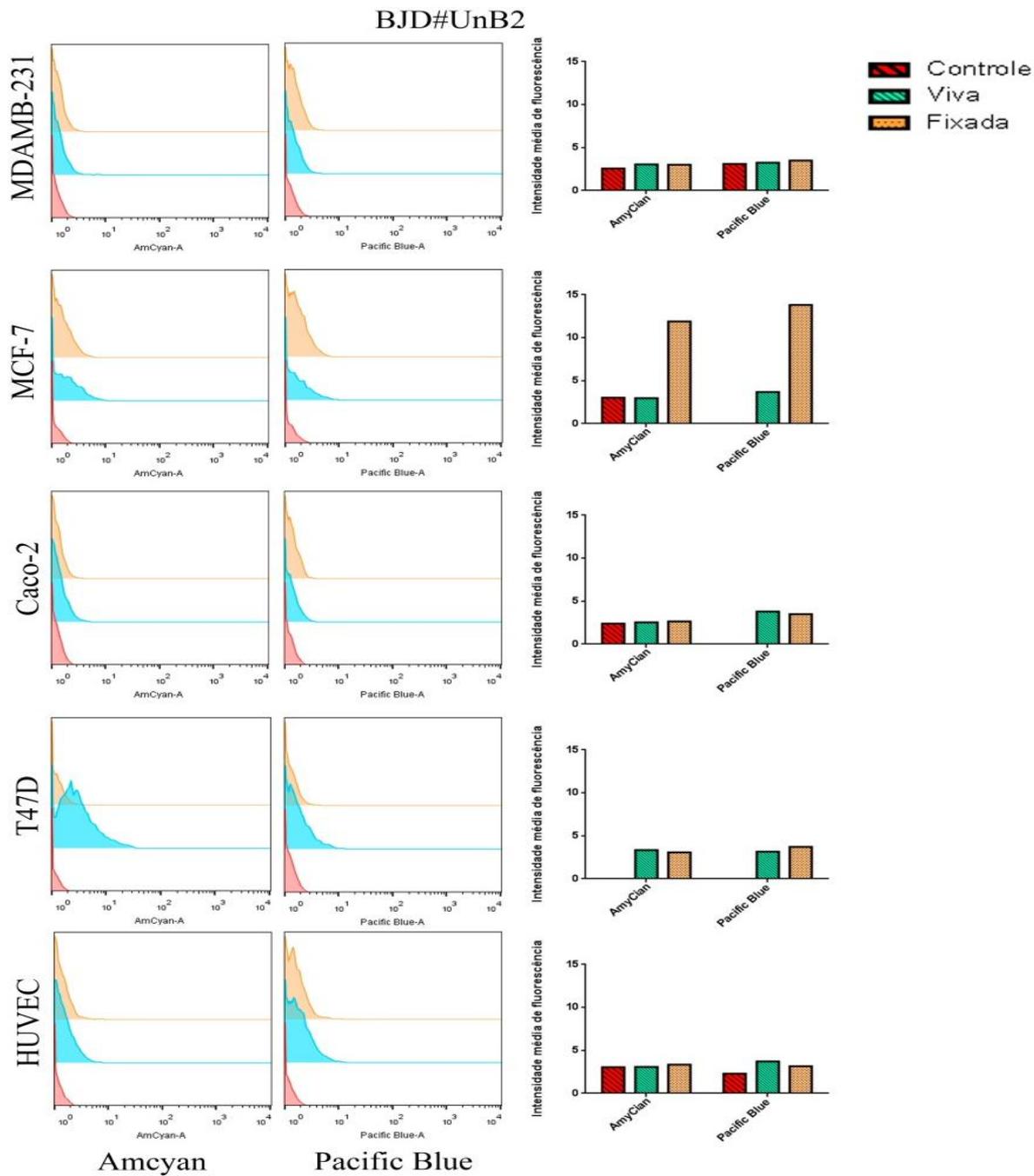


Figura 36. Quantificação da intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB2 nas linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC. As análises foram feitas em citômetro de fluxo e os dados analisados no software FlowJo. Os histogramas e gráficos demonstram intensidade de fluorescência do composto em todas as linhagens quando tratadas vivas (azul) e pré fixadas (laranja) em comparação com o controle não tratado (vermelho). Foram adquiridos 10.000 eventos nos canais de fluorescência Amycyan (verde) e Pacific blue (azul).

BJD#UnB3 e Hidrazina

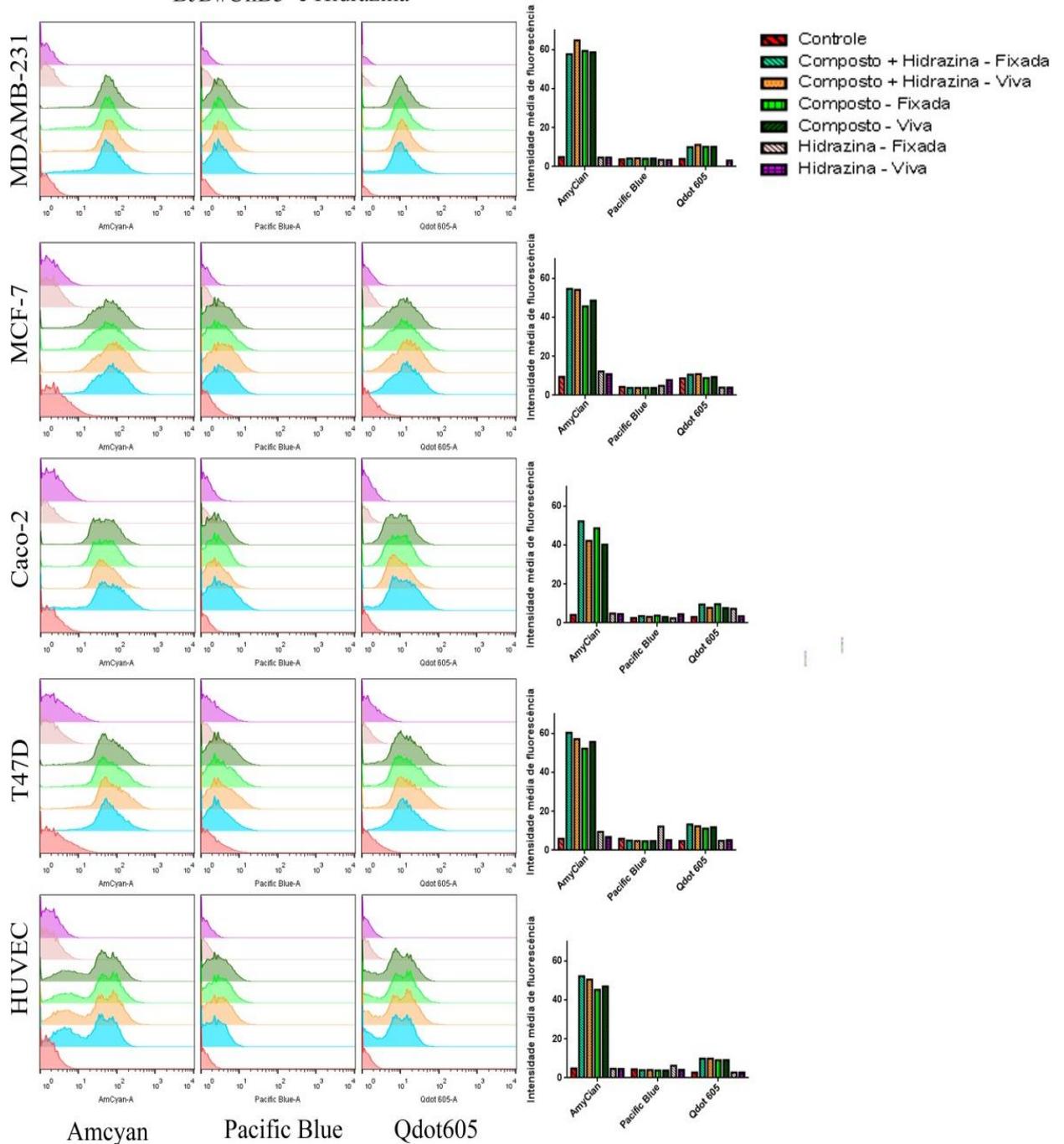


Figura 37. Quantificação da intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB3 e Hidrazina nas linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC. As análises foram feitas em citômetro de fluxo e os dados analisados no software FlowJo. Os histogramas e gráficos demonstram o intenso sinal de fluorescência do composto no verde em todas as linhagens quando tratadas vivas (azul) e pré fixadas (laranja) em comparação com o controle não tratado (vermelho). Foram adquiridos 10.000 eventos nos canais de fluorescência Amcyan (verde), Pacific blue (azul) e Qdot 605 (vermelho).

5.8 Análise da influência do pH do meio de tratamento na intensidade média de fluorescência

Ao compararmos as imagens obtidas das diferentes linhagens incubadas com os compostos fluorescentes, observamos que havia uma diferença considerável entre a intensidade de fluorescência apresentada pelos compostos na linhagem MDA-MB-231 (**Figura 38**) e na linhagem normal HUVEC (**Figura 39**). Estas duas linhagens celulares apresentaram um padrão da intensidade de fluorescência bastante distinto tanto quando pré-fixadas quanto incubadas vivas e também quando pré-fixadas e incubadas em associação com hidrazina. Um dos pontos que diferenciam o procedimento de marcação destas duas linhagens é o meio de cultura utilizado para solubilizar o composto fluorescente. A linhagem MDA-MB-231 é normalmente cultivada no meio Leibovitz L15, já a linhagem HUVEC é cultivada em meio RPMI 1640. Além da diferença na composição nutricional entre esses dois meios de cultivos, eles também apresentam pH ligeiramente diferentes, ou seja, o potencial hidrogeniônico difere-se um do outro. O meio L15 apresenta um pH um pouco mais ácido que o meio RPMI e devido ao fato de sua forma de tamponamento ser baseada na presença de aminoácidos de base livre e não na presença de bicarbonato de sódio, como para o meio RPMI, ele tende a se acidificar mais rapidamente quando em cultura. Sabe-se que o pH influencia consideravelmente na emissão da fluorescência, sendo assim as duas linhagens foram tratadas em diferentes situações para verificar se o pH realmente estava influenciando na intensidade de fluorescência ou se outro viés seria a causa. Para isso, as linhagens foram tratadas com as quatro diferentes soluções (L15 pH 7,56; RPMI pH 7,70; PBS pH 7,0 e PBS 7,7). Com o resultado, foi observado que tratando as duas linhagens com as soluções L15 (pH 7,56) e PBS (pH 7,0) a intensidade de fluorescência era consideravelmente maior quando comparadas às mesmas linhagens tratadas com as soluções RPMI (pH 7,7) e PBS (pH 7,6). Assim, por meio desta análise é possível concluir que o diluente ideal para o composto fluorescente testado BJD#UnB3 seria PBS pH 7,0, pois assim seria possível obter dados mais reprodutíveis independentes da linhagem a ser analisada além de se evitar qualquer outro viés proveniente da composição dos meios de cultura. Pensando na padronização de um protocolo para melhor qualidade da análise, seria necessária a verificação da viabilidade celular no tratamento de células vivas, visto que nos trinta minutos de marcação as mesmas estariam isentas de nutrientes fornecidas pelo meio de cultivo. Para isso, realizou-se o

teste de viabilidade celular, através do ensaio de MTT, para o período de uma hora de incubação dos compostos fluorescentes diluídos em PBS. Os resultados demonstraram que neste período, não houve diminuição significativa da viabilidade celular, assegurando que o tratamento com PBS pode ser realizado para esta marcação (**Figura 40**). Vale ressaltar que a marcação com BJD#UnB3 é realizado em um período de 30 minutos, tempo inferior ao analisado.

Avaliação da intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB3 na linhagem MDAMB-231

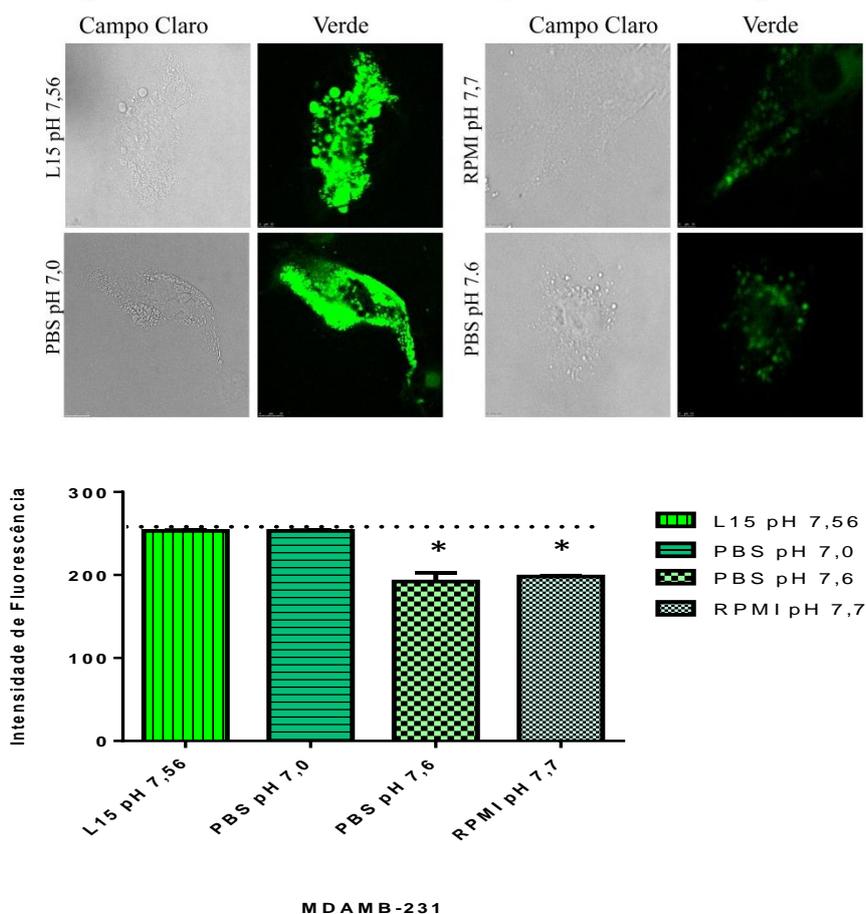


Figura 38. Comparação da intensidade de fluorescência em diferentes meios de tratamento na linhagem MDAMB-231. As células foram incubadas com BJD#UnB3 (10 μ M) em diferentes soluções (L15 pH 7,56; PBS pH 7,0; PBS pH 7,6 e RPMI pH 7,7) durante 30 minutos. Foi observado aumento na intensidade de fluorescência quando as células foram tratadas com as soluções com pH mais ácidos (L15 e PBS pH 7,0), no entanto este aumento não foi estatisticamente significativo. Barra de referência com 10 μ m.

Avaliação da intensidade de fluorescência do composto BJD#UnB3 na linhagem HUVEC

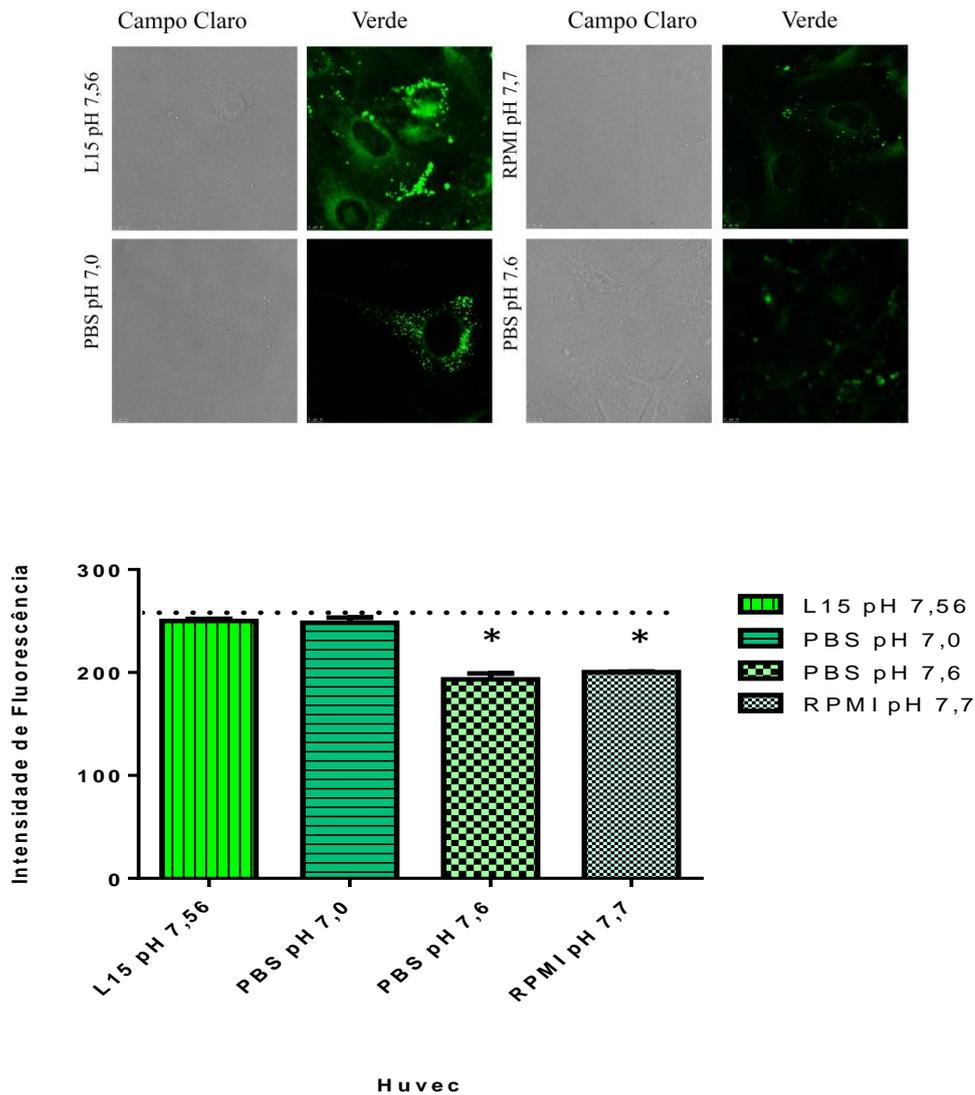


Figura 39. Comparação da intensidade de fluorescência em diferentes meios de tratamento na linhagem HUVEC. As células foram incubadas com BJD#UnB3 (10 μ M) em diferentes soluções (L15 pH 7,56; PBS pH 7,0; PBS pH 7,6 e RPMI pH 7,7) durante 30 minutos. Foi observado aumento na intensidade de fluorescência quando as células foram tratadas com as soluções com pH mais ácidos (L15 e PBS pH 7,0), no entanto este aumento não foi estatisticamente significativo. Barra de referência com 10 μ m.

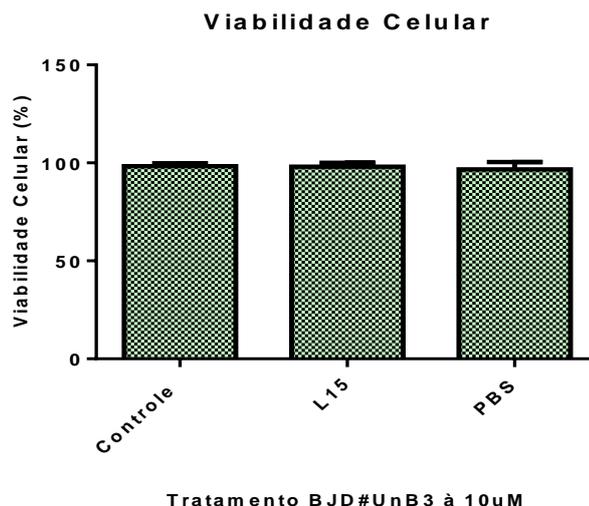


Figura 40. Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231, incubada com o composto BJD#UnB3 diluído em meio L15 e PBS (pH 7,0) em uma concentração de 10 μ M. Gráfico representativo de três experimentos independentes demonstrando média e erro padrão médio. ANOVA, pós-teste Dunnet, não houve diferença estatisticamente significativa entre as três condições experimentais.

5.9 Avaliação da estabilidade dos compostos fluorescentes em função do tempo

Os resultados deste teste demonstraram que os compostos são estáveis em soluções e no meio intracelular, não havendo grande diminuição da intensidade de fluorescência durante as cinco horas analisadas. Vale lembrar, que no ensaio as amostras foram excitadas a cada minuto, totalizando em 301 leituras. Para os compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 não foi observado diminuição da intensidade de fluorescência, em solução de PBS e nos tratamentos das cinco linhagens, durante o tempo da análise (**Figuras 41 e 42**). Os gráficos demonstram que houve uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência nos tratamentos com o composto BJD#UnB3 e BJD#UnB3 + hidrazina em solução de PBS e nas linhagens testadas, nas três primeiras horas. No entanto, a intensidade de fluorescência permaneceu constante após as quatro horas de exposição à excitação com luz ultravioleta (**Figura 43**). Sendo assim, os resultados demonstram uma excelente estabilidade dos compostos aqui testados (BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3).

Estabilidade do composto BJD#UnB1

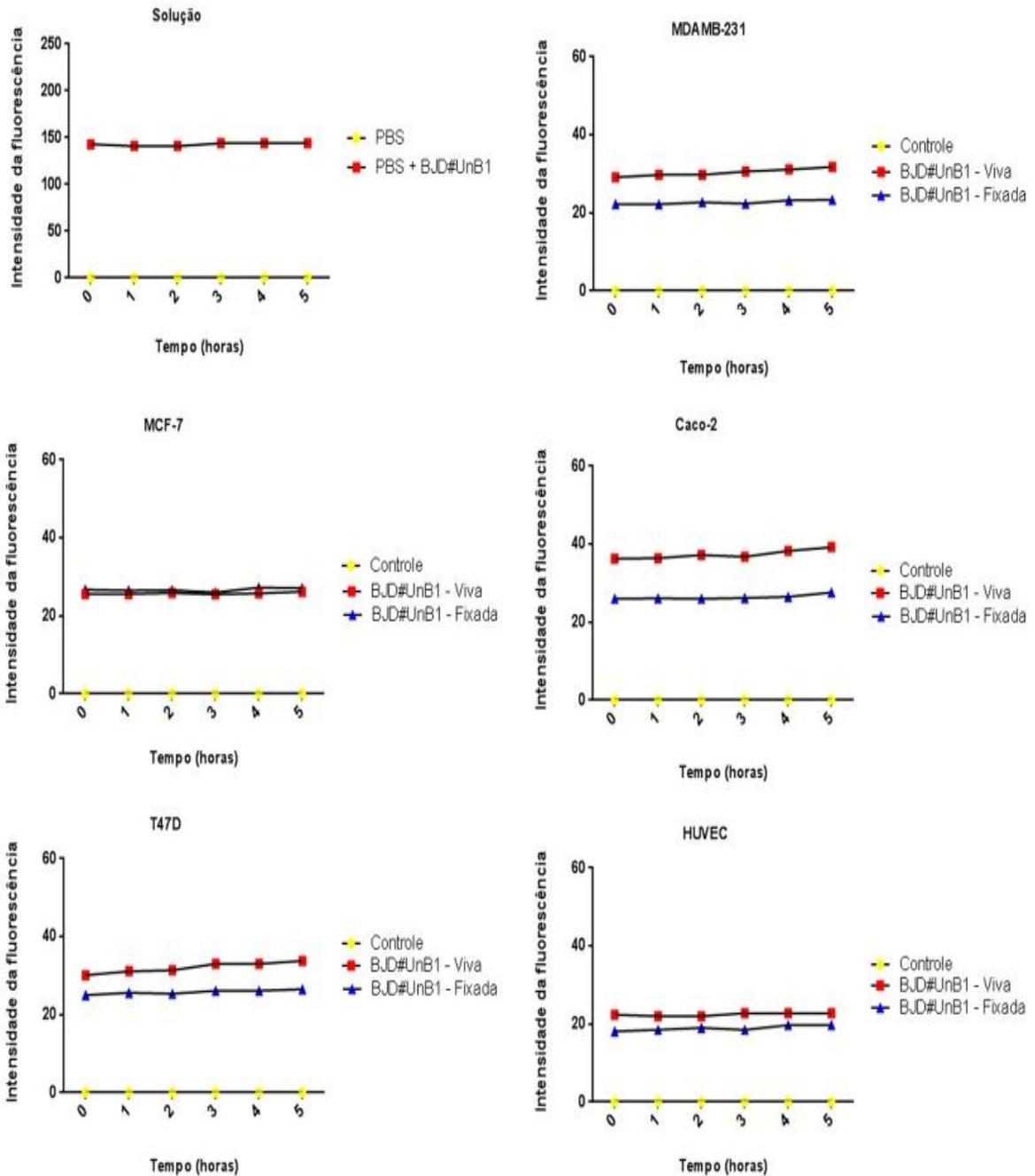


Figura 41: Estabilidade do composto BJD#UnB1 em PBS e nas linhagens tumorais MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e na linhagem normal HUVEC, vivas e pré fixadas. Nota-se a constante intensidade de fluorescência em todos os tempos da análise.

Estabilidade do composto BJD#UnB2

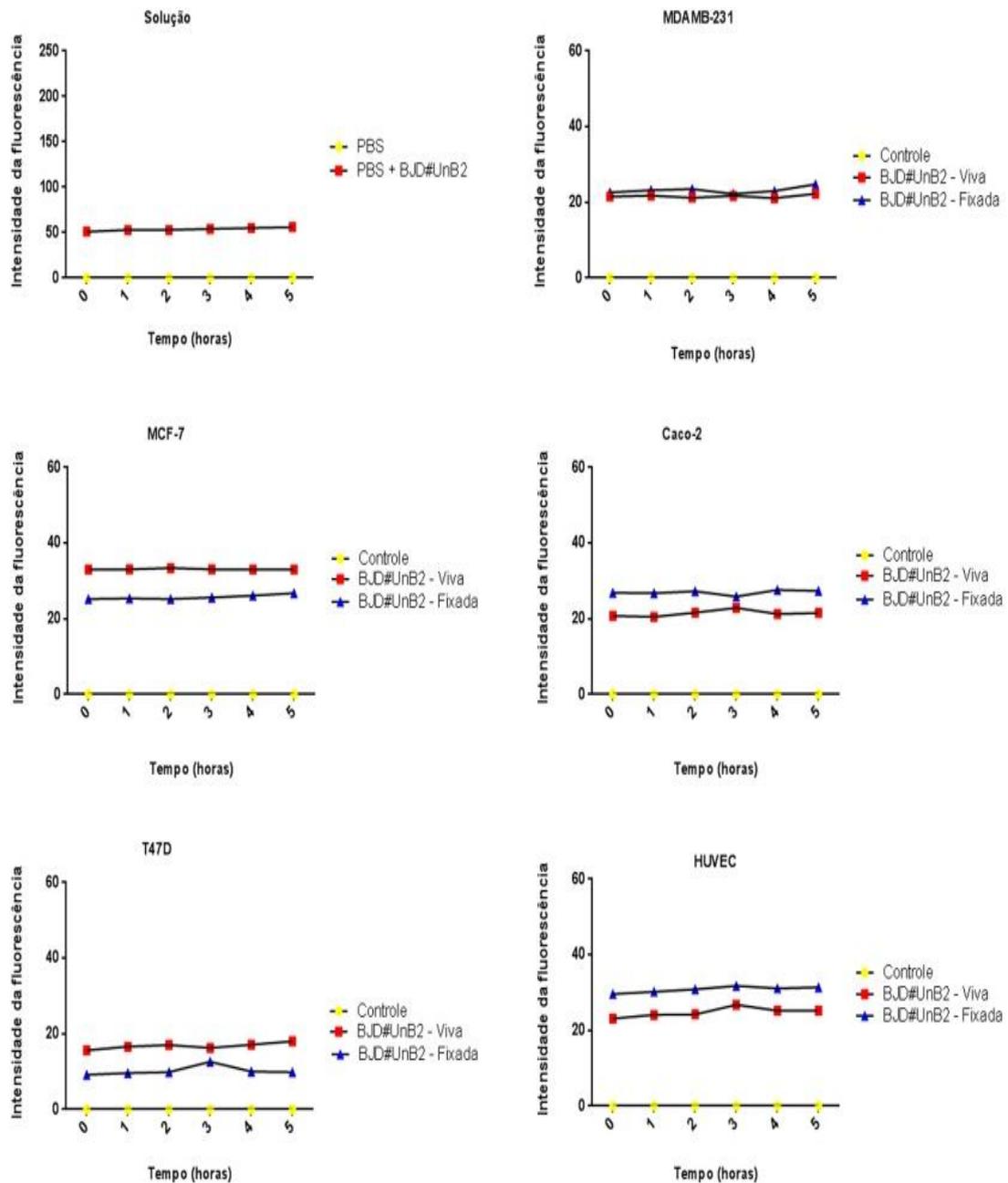


Figura 42: Estabilidade do composto BJD#UnB2 em PBS e nas linhagens tumorais MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e na linhagem normal HUVEC, vivas e pré fixadas. Nota-se a constante intensidade de fluorescência em todos os tempos da análise.

Estabilidade do composto BJD#UnB3 e Hidrazina

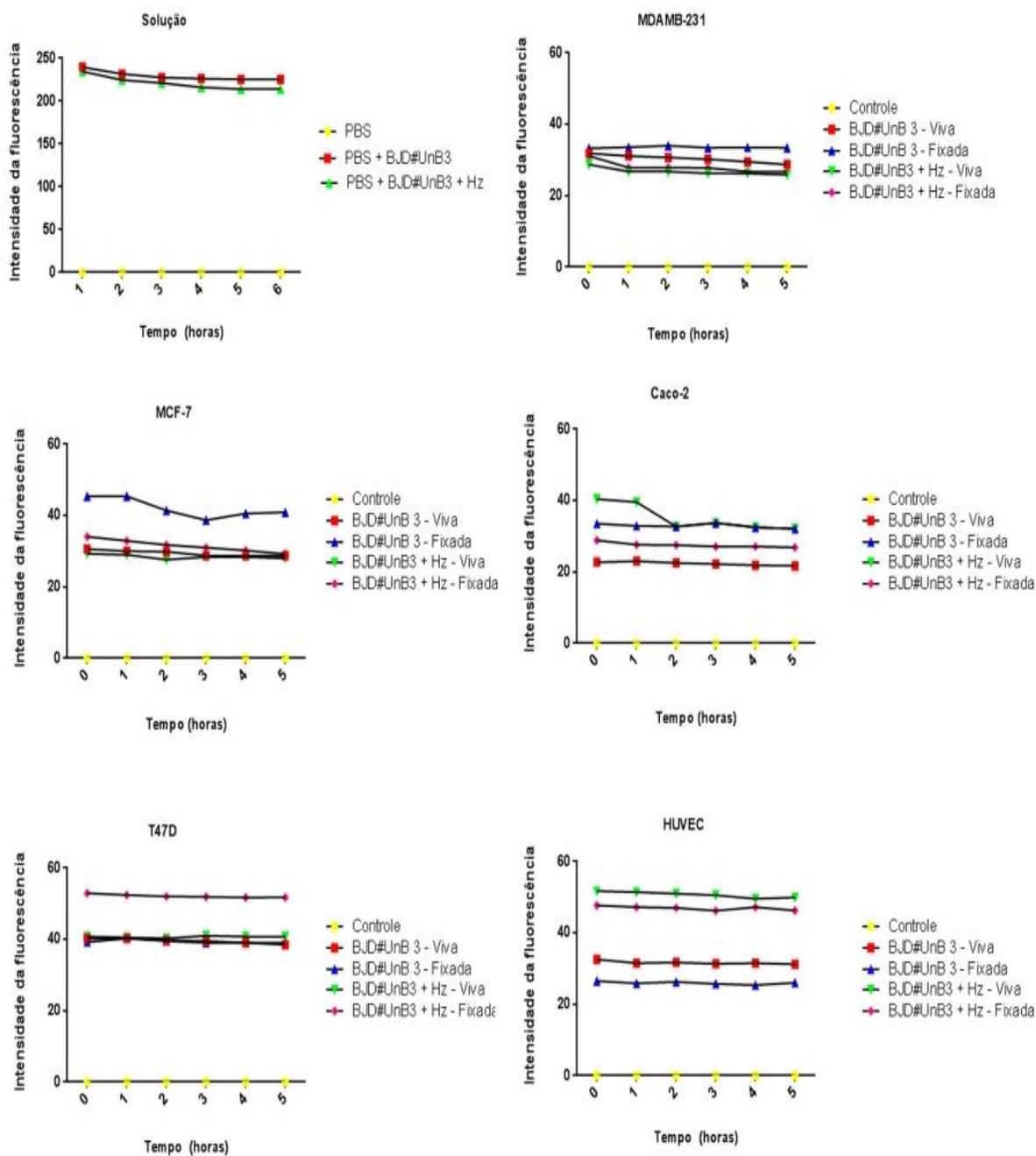


Figura 43: Estabilidade do composto BJD#UnB3 e BJD#UnB3 + Hidrazina em PBS e nas linhagens tumorais MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e na linhagem normal HUVEC, vivas e pré fixadas. Nota-se uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência nas três primeiras horas de análise, e após esse tempo o intensidade mantém tanto na solução de PBS quanto nas linhagens celulares tratadas com o composto e hidrazina.

5.10 Técnica de renderização 3D (Z-stack) e análise ortogonal

Com intuito de confirmar a marcação intracelular e intratecidual das estruturas esféricas marcadas com o derivado BJD#UnB3 nos modelos testados, realizou-se a técnica de renderização 3D e em seguida a análise ortogonal da linhagem celular MDAMB-231, da microalga e do organismo *C. elegans*. A análise ortogonal mediante as renderizações 3D demonstraram que as estruturas esféricas marcadas pelo derivado BJD#UnB3 se encontravam de forma clara no interior das células, não sendo a marcação por adsorção do composto na membrana plasmática das células (**Figura 44**). O resultado se reproduziu no modelo de *C. elegans*, que demonstrou de forma conclusiva que as esferas lipídicas se encontravam no interior dos nematódeos, sendo as moléculas testadas capazes de permear diversas camadas do nematódeo e marcar com especificidade vesículas lipídicas. Na técnica de renderização foram utilizadas 30 imagens (MDAMB-231), 20 imagens (microalgas) e 30 imagens (*C. elegans*), com distância de 0.1µM. Foram produzidos vídeos de curta duração em que as amostras foram rotacionadas 180° sobre o seu eixo Y para demonstrar tais resultados.

Técnica de renderização 3D e corte ortogonal

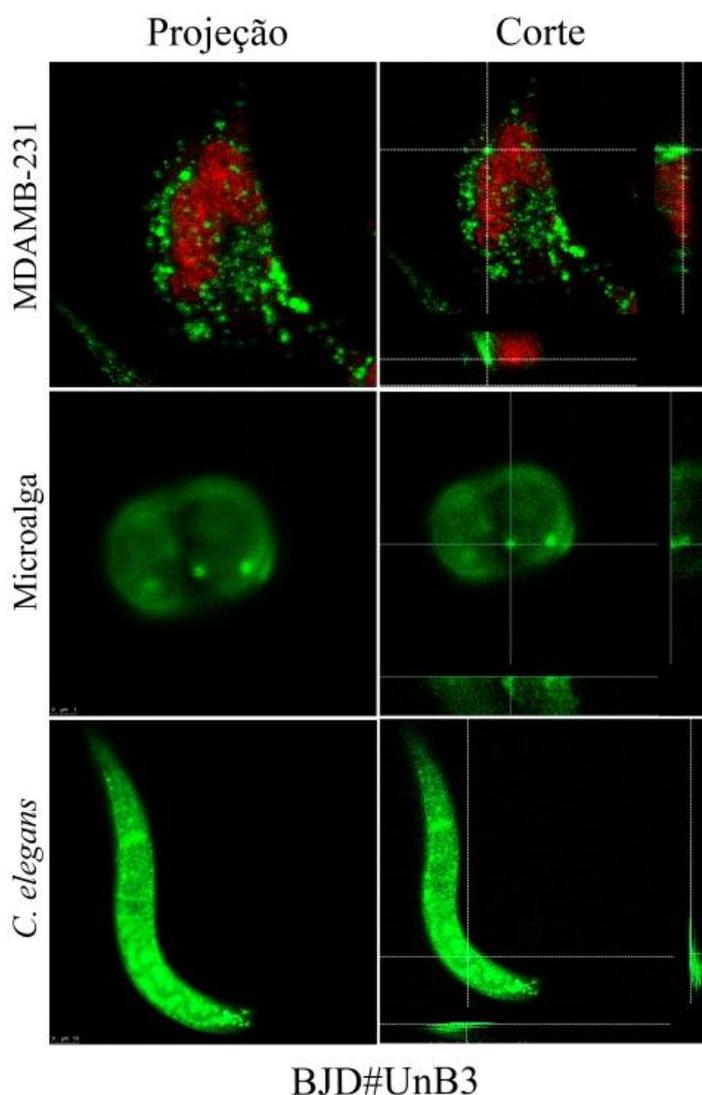


Figura 44. Renderização 3D e análise ortogonal das células MDA-MB-231 e dos organismos microalga e *C. elegans* tratados com o composto BJD#UnB3. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser após tratamento com o composto. Realizou-se a projeção da sequência de imagens adquiridas e através dos cortes pôde-se observar a localização intracelular entre o núcleo (vermelho) e os corpúsculos lipídicos (verde) na célula MDA-MB-231. Tanto na linhagem analisada, quanto na microalga e *C. elegans*, o corte permitiu visualizar que as vesículas lipídicas marcadas com o composto BJD#UnB3 se encontram no interior dos modelos.

6 Discussão

Os compostos fluorescentes aqui testados são derivados da família do benzotiadiazol (BTDs) e sua síntese é feita a partir do núcleo 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazol, através de reações de acoplamentos (NETO et al., 2009). Esta família de BTDs apresenta características desejáveis como marcadores celulares, por apresentar um forte núcleoceptor de elétrons e devido à propriedade de poder ser incorporada em moléculasceptoras eletrônicas, formando um sistema útil para condução (OLIVEIRA et al., 2010). As reações de acoplamentos possibilitam a montagem de uma diversidade de estruturas químicas produzindo moléculas em um curto tempo. Além disso, são reações que atendem os preceitos da química verde, onde todo o processo visa reduzir e eliminar substâncias nocivas ao homem e ao meio ambiente (CARVALHO et al., 2014). Diversos outros compostos fluorescentes vem sendo continuamente produzidos seguindo este mesmo racional no qual se procura uma aproximação da molécula produzida com a molécula fluorescente ideal, além de inserir todo o processo de produção dentro dos parâmetros estabelecidos pela química verde (BARAN et al., 2016; MARYAMABADI et al., 2016; BARRETO et al., 2013).

Os compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3 são solúveis em soluções aquosas, não são citotóxicos e podem ser empregados em células vivas e pré-fixadas. Estas características estão dentro das expectativas para que moléculas fluorescentes tenham potencial de mercado (QUEHENBERGER et al., 2010; HALLAMAA et al., 2016). Dois dos marcadores testados (BJD#UnB1 e BJD#UnB2) se associam a membrana plasmática, por uma possível interação com os glicerofosfolípeios da membrana celular. As membranas plasmáticas são dinâmicas, flexíveis e seletivamente permeáveis a solutos polares, sendo capazes de controlar a homeostase celular. A participação das membranas em diversos processos celulares é de extrema importância, dos quais podemos destacar a endocitose, a secreção de produtos celulares, associação com a síntese proteica e lipídica, transdução de sinais, e outros que dependem da mudança de conformação como a divisão e morte celular (GARCIA et al., 2014; YANG et al., 2017; CHAO et al., 2017; GOUDSMITS et al., 2017). As membranas celulares são constituídas de lipídeos e proteínas, contendo glicídios associados a estas duas classes de moléculas. Esta estrutura mantém a regulação da composição molecular e iônica do meio intracelular através de sistemas especializados, como bombas, canais iônicos e proteínas da família das transferases que são reguladas na membrana

plasmática por meio de variação na sua permeabilidade (PATHAK-SHARMA et al., 2017; CHAO et al., 2017).

Estudos com membranas plasmáticas tem sido bastante utilizadas, para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que cerca de 70% dos medicamentos atuam sobre as proteínas da membrana (ZIÓŁKOWSKA, CHRISTIANO & WALTHER, 2011, VICKERY et al., 2016; ROHRSCHEIDER et al., 2015). São poucas as sondas fluorescentes específicas para membrana plasmática, sendo uma delas o CellMask®. Uma das limitações dos fluoróforos específicos para a membrana é a internalização celular, devido ao fato do citoplasma ser rico em membranas. Este marcador comercial é mais utilizado em tratamento com células vivas e apesar de poder ser empregado para marcação de células fixadas, não é amplamente indicado devido ao fato da permeabilização celular ocasionar a entrada do composto no citoplasma, acarretando na marcação de todas as estruturas membranosas intracelulares.

O outro marcador avaliado neste trabalho (BJD#UnB3) apresentou especificidade para os corpúsculos lipídicos livres no citoplasma. Corpúsculos lipídicos são organelas envolvidas em diversos processos essenciais para a manutenção da homeostase celular e do organismo. Inicialmente identificado como um estoque de lipídios, estes corpúsculos vem sendo reconhecido como uma estrutura dinâmica e funcionalmente ativa, envolvida em uma variedade de funções tais como metabolismo de lipídios, sinalização celular e nos processos inflamatórios (revisto em BELLER et al. 2010, BOZZA et al. 2007, FARESE & WALTHER 2009; WELLER et al., 2011).

A marcação de lipídeos intracelulares vem sendo bastante empregada devido ao grau de importância que as vias do metabolismo envolvendo esse tipo de molécula apresentam para a saúde humana. Os lipídeos exercem funções essenciais no organismo, que vão desde proteção dos órgãos, isolamento térmico, fornecimento de energia e auxílio na absorção de diversas vitaminas (DEVARANAVADGI, 2011; MERRILL, 2011; HULST et al., 2017; KAPOOR et al., 2017). Entretanto, o excesso de lipídeos também é responsável pelo surgimento de doenças e distúrbios, como câncer, problemas cardiovasculares e neurológicos, doenças associadas ao estresse oxidativo, alteração do metabolismo hormonal, mudanças na modulação de transdução de sinalização celular e na regulação da expressão gênica (COSKUN & SIMONS, 2012; LINGWOOD, 2011; FURUKAWA et al., 2017; VEMURI et al., 2017; HULST et al., 2017; KAPOOR et al., 2017). Contudo, é de grande valia propormos um novo marcador fluorescente para

lipídeos que sejam mais eficientes, se associem a diferentes classes de lipídeos, sejam menos tóxico as amostras e ao meio ambiente e principalmente que o custo destes marcadores seja reduzido.

Além da utilização destes marcadores em células, os mesmos foram aplicados com sucesso em outros modelos, como em microalgas, zebrafish e nos nematódeos da espécie *C. elegans*, os quais foram avaliados neste trabalho. Todos os modelos aqui avaliados são empregados regularmente para o estudo de conteúdos lipídicos ligados a diversos contextos biológicos (HARBETTE et al., 2017; AVITAN et al., 2017; LI et al., 2017).

Por todas estas razões, diversas empresas comercializam diferentes marcadores de lipídios para emprego tanto em microscopia de luz de campo claro como para avaliações por microscopia de fluorescência (MORTARA et al., 2016; CAI 2000; LANGGUTH et al., 2017). O marcador comercial Bodipy® apesar de ser amplamente utilizado, apresenta diversas limitações, dentre elas, pouca solubilidade em soluções aquosas, o que faz com que este marcador seja diluído em solventes orgânicos que são altamente tóxicos para células (DAHIN, 2002; HERMANSON, 2013). Outra limitação deste marcador comercial é a produção de uma marcação de ruído de fundo ("*background*") o que reduz a qualidade das imagens obtidas em amostras marcadas com este agente fluorescente. Estudos feitos por nosso grupo em 2015 demonstraram que o marcador BODIPY® apresenta afinidade por apenas alguns tipos específicos de corpúsculos lipídicos, sem no entanto, ter sido feita uma identificação das classes para as quais este marcador tem afinidade. Segundo o fabricante, o BODIPY® apresenta especificidade para lipídeos neutros (ANDRADE, 2015; ŠKORPILOVÁ et al., 2017; SONG et al., 2017).

Quanto à marcação no modelo *in vivo* Zebrafish, o padrão de fluorescência apresentado pelos compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2, BJD#UnB3 indicam especificidade por regiões ricas em membranas (BJD#UnB1 e BJD#UnB2) e acúmulos de lipídeos (BJD#UnB3). Os somitos são estruturas epiteliais em forma de cubos e são de extrema importância para a formação da coluna vertebral, do sistema nervoso periférico e músculos esqueléticos (SUN et al., 2017; LIN et al., 2017). O cérebro da larva deste peixe contém uma grande quantidade de lipídios devido a sua estrutura celular (KORZH, 2017; AVITAN et al., 2017). Tem-se realizado muitos estudos a respeito das bases moleculares da neurobiologia no modelo zebrafish, resultando na

caracterização de diversas vias e genes (HSU *et al.*, 2007; LIESCHK & CURRIE, 2010, ZANGH *et al.*, 2017). Os marcadores BJD#UnB1 e BJD#UnB2 foram capazes de marcar com eficiência tanto os somitos quanto o cérebro das larvas do peixe aqui avaliados.

O marcador comercial utilizado neste trabalho para a marcação de membranas CellMask® foi capaz de marcar amplamente a região do cérebro do modelo estudado, no entanto, não foi capaz de marcar os somitos. Essa diferença entre os marcadores de membrana plasmática BJD#UnB1 e BJD#UnB2 com marcador comercial de referência CellMask®, demonstra uma menor especificidade do composto comercial por regiões relevantes para o estudo do desenvolvimento embrionário neste modelo.

O saco vitelino ou vesícula vitelina é um anexo embrionário dos vertebrados, formado a partir do endoderma e da mesoderme e que armazena substâncias nutritivas para os embriões, denominada de vitelo (SAKAGUCHI *et al.*, 2013; NORATA *et al.*, 2013). Esta vesícula é bastante desenvolvida nas aves, répteis e nos peixes apresentando-se ligada ao intestino embrionário e ao embrião por meio de ductos que auxiliam nos processos relativos à alimentação do organismo em formação (MIRANDA *et al.*, 2006; NORATA *et al.*, 2013). Como esta ligação auxilia nos processos de alimentação da larva, isto explica a especificidade do marcador comercial Bodipy® pelos tipos de lipídeos presentes nesta região. A diferença da marcação entre o composto testado BJD#UnB3 e Bodipy®, pode ser devido a especificidade destes compostos por diferentes classes de lipídeos, ponto este não avaliado neste trabalho.

O modelo utilizado *C. elegans* é bastante atrativo para a pesquisa devido a diversos atributos morfológicos, como pequeno tamanho e transparência, características estas que auxiliam na observação e identificação de diversas estruturas internas através da microscopia convencional e a partir de marcações fluorescentes podem ser avaliados não apenas do ponto de vista morfológico, mas também por espectroscopia de fluorescência (FAY, 2005; LEMIEUX e ASHRAFI, 2014; ROMANOS *et al.*, 2017). Além disso, a sua utilização neste trabalho deveu-se ao fato de hoje ser o modelo de escolha para avaliações das vias do metabolismo lipídico devido à alterações genéticas e respostas à substâncias regulatórias deste metabolismo através de diversos tratamentos (QI *et al.*, 2017; NECHIPURENKO & SENGUPTA, 2017). Diferente dos mamíferos, estes nematódeos não possuem tecido de armazenamento lipídico específico como o tecido adiposo, seus lipídeos são armazenados na forma de triacilgliceróis em pequenos

corpúsculos que se localizam nas células do intestino, hipoderme e gônadas (SMOLENTSEVA et al., 2017; KESHET et al., 2017). Com isso, verificamos através do protocolo de marcação com o composto BJD#UnB3, que o mesmo produziu com sucesso a marcação dos corpúsculos lipídicos nas células dos tecidos do nematódeo e com a mesma intensidade de fluorescência obtida nos ensaios *in vitro* para os modelos celulares. Estes resultados indicam que este composto é uma alternativa para ser aplicado em estudos das vias metabólicas envolvendo lipídios neste modelo. Quando comparado a marcação do composto BJD#UnB3 e Bodipy® observa-se um maior número de marcação de lipídeos pelo composto BJD#UnB3 em relação ao marcador comercial. Diversos outros autores vem empregando técnicas e reagentes diferentes para a marcação de lipídios em *C. elegans* dentro de uma grande variedade de ensaios voltados para o estudo da dinâmica dos lipídios neste organismo (LI et al., 2017; NIE et al., 2017; HARVALD et al., 2017; ZHANG et al., 2017) o que subsidia a importância de marcadores fluorescentes de alto rendimento para estas aplicações.

Outra vertente de pesquisa com fonte de lipídeos que tem cada vez mais explorada é a extração destas biomoléculas em algas para a produção de biocombustíveis (MIRANDA et al., 2015; HUTTON, 2009). As microalgas são microrganismos unicelulares e possuem crescente relevância na pesquisa de pigmentos, carboidratos, proteínas e compostos bioativos, alta produtividade de biomassa com acúmulo de lipídeos, além de serem facilmente cultivadas (IAN *et al.*, 2013; OHSE, 2014; COUTO et al., 2017). É de extrema importância acompanhar o aumento da quantidade destas biomoléculas para o correto momento de extração de lipídeos de forma a se obter o máximo rendimento (GONZÁLEZ-CAMEJO et al., 2017). Um dos métodos utilizados para a quantificação de lipídios em microalgas é a espectroscopia de fluorescência, onde o marcador de lipídeos vermelho do Nilo é o mais utilizado (RUMIN, 2015; ABDO, 2014). Apesar de ser o mais utilizado, o vermelho do Nilo apresenta várias limitações como baixa solubilidade em soluções aquosas, sendo que a exatidão e precisão de coloração diferem fortemente dependendo da espécie da alga avaliada devido à polaridade do solvente, a absorção desigual nas diferentes espécies e à dificuldade de penetração do corante através das paredes celulares espessas e rígidas destas algas, requerendo vários tratamentos antes da sua utilização (IAN et al., 2013; SUN et al., 2017; BAGUL et al., 2017). Outra limitação bastante influente na qualidade do processo de quantificação é que o marcador tem um fotodecaimento significativo

após 10 minutos de exposição à luz quando utilizado em algas (ABDO, 2014; SI et al., 2013). Sendo assim, o marcador de lipídeos aqui testado BJD#UnB3 é uma nova molécula com características que suprem as limitações verificadas com o uso do vermelho do Nilo e que pode ser utilizado para este tipo de análise.

Além da marcação de lipídeos, o composto BJD#UnB3 foi avaliado nos modelos celulares MDAMB-231 e HUVEC quanto a sua capacidade de detectar a presença de hidrazina. Esta avaliação foi feita através das aquisições de imagens no microscópio confocal e análise quantitativa pelo software ImageJ. A padronização de métodos que consigam detectar esta substância em pequenas concentrações tem se destacado cada vez mais no meio científico. A utilização da hidrazina em indústrias químicas, agrícolas e farmacêuticas é bastante frequente, além do seu uso como combustível de alta energia na propulsão de foguetes e sistemas de mísseis. Esta substância apesar de ser bastante utilizada é altamente tóxica e pode ser absorvida facilmente por via oral, inalatória e dérmica, podendo causar problemas nos órgãos humanos e prejudicar o sistema nervoso central (LI, LIU & YE, 2017; SUN *et al.*, 2014; SHARMA et al., 2017). Geralmente, os métodos utilizados para detecção de hidrazina são cromatografia, incluindo a gasosa; titrimetria, colorimetria e eletroforese capilar (SHARMA et al., 2017; AN, 2017). Estes métodos são bastante demorados e com um custo muito elevado, além do sucesso das análises *in vivo* ficar muito abaixo do esperado (MUKHERJEE, 2017; SONG et al., 2017). Sondas fluorescentes são uma boa opção na detecção desta substância, pois são sensíveis, seletivas e a metodologia aplicada por ser rápida, fácil de utilizar e econômica, podendo ainda monitorar condições de contaminação em tempo real. Na aquisição de imagens, não foi possível detectar emissão de fluorescência no canal do vermelho nas amostras de células MCF-7, Caco-2 e T47D tratadas com o composto BJD#UnB3. No entanto, foi demonstrado nas linhagens MDAMB-231 e HUVEC marcadas com o composto BJD#UnB3, o desaparecimento da fluorescência no canal do vermelho, quando as amostras foram incubadas com hidrazina. Deste modo, além da marcação específica de lipídeos, o marcador BJD#Unb3 aqui avaliado, apresenta mais esta característica o que o habilita para ser usado como um sensor para hidrazina em amostras biológicas podendo estas amostras serem analisadas por microscopia de fluorescência e confocal.

7 Conclusões e Perspectivas

O processo utilizado na síntese dos derivados auxilia na produção em larga escala e minimização de rejeitos e/ou reduzindo os impactos ambientais advindos da sua produção, estando em consonância com a proposta da “Química Verde”. Os derivados de BTDs aqui testados possuem boas características como sondas fluorescentes, atendendo aos quesitos essenciais, como boa solubilidade em soluções aquosas, fotoestabilidade em soluções e durante as aquisições de imagens, elevado rendimento quântico e amplo desvio de Stokes. A utilização dos compostos pode ser feita em células vivas e fixadas, além do seu emprego com sucesso em modelos multicelulares como *C. elegans* e Zebrafish.

O composto BJD#UnB3 produziu fluorescência com maior intensidade do que a obtida com o marcador comercial Bodipy®, tendo ainda provável especificidade por classes de lipídios não marcadas pelo marcador comercial. Além disso, o marcador comercial apresenta diversas outras limitações que não foram identificadas no derivado aqui testado, como baixa solubilidade em soluções aquosas e elevada citotoxicidade. Deste modo, este trabalho foi altamente relevante pois contribuiu com a validação biológica para o emprego dos compostos BJD#UnB1, BJD#UnB2 e BJD#UnB3 e caracterizou as suas principais propriedades em ensaios *in vitro* e *in vivo*, subsidiando a sua proposição como alternativas fluorescentes para a marcação de membrana plasmática e análises de lipídeos em amostras biológicas aplicada a diversas áreas biotecnológicas. Como perspectivas, ficam a avaliação da estabilidade dos compostos a longo prazo de forma a contribuir ou não para a sua indicação comercial e reavaliar as estruturas atômicas dos compostos BJD#UnB1 e BJD#UnB2 de forma a aumentar o rendimento quântico destas moléculas (aumento da emissão fluorescente).

8 Referências

ABDO, S. M., AHMED, E., EL-ENIN, S. A., DIN, R. S. EL, DIWANI, G. EL, ALI, G. Qualitative and quantitative determination of lipid content in microalgae for biofuel production, 5(3), 23–28, 2014.

ALBANI, J. R. Principles and applications of fluorescence spectroscopy, 2007.

ANDRADE, L.P., CORREA, J.R., Marcadores celulares fluorescentes baseados no benzotiadiazol, prova de conceito e tendências **Dissertação de mestrado** — Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

ARAÚJO, P. Análise de Detecção de Fluorescência para Aplicação em Sistemas de Diagnóstico em Saúde, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2010.

AVITAN, L., PUJIC, Z., MO, J., AMOR, R., SCOTT, E. K., GOODHILL, G. J., AMOR, R. Spontaneous Activity in the Zebrafish Tectum Reorganizes over Development and Is Influenced by Article Spontaneous Activity in the Zebrafish Tectum Reorganizes over Development and Is Influenced by Visual Experience, *Current Biology*, 1–13, 2017.

BAGUL, S. Y., BHARTI, R., DHAR, D. W., Assessing biodiesel quality parameters for wastewater grown *Chlorella* sp. *Water Science & Technology*, 1–9, 2017.

BALZANI, V., SEBASTIANO, B., CIAMICIAN, C. G., BOLOGNA, U., INORGANICA, C., ANALITICA, C., ... MESSINA, U. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds : Overview and General Concepts, (June), 1–36, 2007.

BALZANI, V.; CAMPAGNA, S. *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I*, Springer: Berlin, 2007.

BARAN, P. S. Total synthesis of eudesmane terpenes by site-selective C-H oxidations. *Nature*, v. 459, n. 7248, p. 824-828, 2016.

BARRETO, A., F.,S. Reações multicomponentes de isocianetos consecutivas assistidas por micro-ondas: síntese de ciclopeptóides e ciclodepsipeptóides análogos da verticilidade e sansalvamida A. xvii, 284 f., II. Tese de Doutorado em Química – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BEDENDO, G.C. Estudo de sondas fluorescentes para determinações de cátions. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

BELLER, M., BULANKINA, A.V., HSIAO, H.H., URLAUB, H., JÄCKLE, H., KÜHNLEIN, R.P., PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*. *Cell Metab.* 12, 521-532, 2010.

BHUIYAN, NADIA. “A Framework for successful new product development”. *Journal of Industrial Engineering and Management*, 4 (4); 746-770, 2011.

BOREL, C. R. Desenvolvimento de reações multicomponentes para a síntese de 2- (2-piridil) quinolinas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Minas Gerais, 2013.

BOZZA, R. Associação do gasto energético diário com fatores de risco para aterosclerose em adolescentes. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CAI, Y. Atomic Fluorescence in Environmental Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2270–2292, 2000.

CARVALHO, P. H. P. R.; CORRÊA, J. R.; GUIDO, B. C.; GATTO, C. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; SOARES, T. A.; NETO, B. A. D. Designed benzothiadiazole fluorophores for selective mitochondrial imaging and dynamics. *European Journal of Chemistry*. vol. 20, p. 15360-15374, 2014.

CHAKRABORTY, H., CHATTOPADHYAY, A. Sensing Tryptophan Microenvironment of Amyloid Protein Utilizing Wavelength-Selective Fluorescence Approach, *Journal of Fluorescence*, 2017.

CHAO, J., WANG, H., ZHANG, Y., YIN, C., HUO, F., SONG, K., LI, Z., A Novel “donor- π -acceptor” type fluorescence probe for sensing pH: mechanism and application *in vivo*. *Talanta*, 2017.

CHEN, A. C., YEH, S., WANG, L., DAI, Y., JENG, R., LIN, C., LIN, C. Structure-property relationship study of donor and acceptor 2 , 6- disubstituted BODIPY derivatives for high performance dye- sensitized solar cells, *Chemistry – A European Journal*, 2017.

CHEN, W., ROSSER, E. W., MATSUNAGA, T., PACHECO, A., AKAIKE, T., XIAN, M. The Development of Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Hydrogen Polysulfides. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(47), 13961–13965, 2015.

CHITARRA, L. G., BREEUWER, P., ABEE, T., BULK, R. W. The use of fluorescent probes to assess viability of the plant pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by flow cytometry. *Fitopatologia Brasileira*, 31(4), 349–356, 2006.

CIOC, R. C., RUIJTER, E., ORRU, R. V. A. Multicomponent reactions: advanced tools for sustainable organic synthesis. *Green Chemistry*, 16(6), 2958–2975, 2014.

CLAXTON, N. S., FELLERS, T. J., DAVIDSON, M. W. Laser Scanning Confocal Microscopy, 1979(21), 1–37, 2006.

COONS, A. Pineal serotonin N acetyltransferase expression cloning and molecular analyses. *Science*. 670 1681-1683, 1943.

COSKUN, A, SIMONS, B.; VARY C. P. Lipid Profiling of In Vitro Cell Models of Adipogenic Differentiation: Relationships with Mouse Adipose Tissues. **J Cell Biochem**. 2012.

COUTO, E. A., CALIJURI, M. L., ASSEMANY, P. P., SOUZA, M. H. B. Effect of depth of high rate ponds on the assimilation of CO₂ by microalgae cultivated in domestic sewage, *Journal of Environmental Technology*, 3330(August), 2017.

DA ROCHA, E. P., RAMALHO, T. C. Processo De Transferência Proteônica Intramolecular no Estado Excitado (ESIPT): Aplicações em Sondas Fluorescentes. *Revista Virtual de Química*, 8(2), 466–482, 2016.

DE PAULA, R. Aplicação de uma cumarina como sonda fluorescente e caracterização fotofísica e espectroscópica de três análogos de psoraleno em meios homogêneo e microheterogêneo. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, 2003.

DERMOT, G. (2001). Photoluminescence and Excitation Studies of Semiconductors, *Dissertação de Mestrado School of Physical Sciences of Dublin City University*, 82. USA, 2001.

DEVARANAVADGI, S.B, BIRADAR, A.P., SUNITA, N.D., TEGGELLI, R.G. Effect of vermicomposts on the incidence of subabul psyllid. *Insect Environment*, 4, 55-56, 2008.

DIXIT, R., CYR, R., GILROY, S. Using intrinsically fluorescent proteins for plant cell imaging. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 45(4), 599–615, 2006.

DOMENECH, M., GARCÍA, E. Fluorescence Imaging of *Streptococcus pneumoniae* with the *Helix pomatia* agglutinin (HPA) As a Potential , Rapid Diagnostic Tool, *Front. Microbiol.*, 8(July), 1–12, 2017.

DRUMMEN, A. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques - FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 17, 4047-4132, 2012.

DRUMMEN, G. P. C. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques-illuminating biological and biomedical research. *Molecules*, 17(12), 14067–14090, 2012.

ELUMALAI, P., ATKINS, P., DE PAULA, J. *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, 2002.

ESPOSITO, A., BADER, A. N., SCHLACHTER, S. C., H, D. J. VAN DEN, SCHIERLE, G. S. K., ASHOK, R. V, GER, H. C. Design and application of a confocal microscope for spectrally resolved anisotropy imaging. *Optics Express*, 19(3), 2546–2555, 2011.

FARESE-JR, R.V.; WALTHER, T.C. Lipid droplets finally get a little. *Cell*, v. 139, n. 5, p. 855 – 860, 2009.

FATEMINIA, JIELIU, BINGGUO, XIAOLEICAI, SHIDANGXU, SYED MOHAMMAD ALIFATEMINIA, JIELIU, JINGLIANG, GUANGXUEFENG, WENBOWU, BINLIU. Decoration of porphyrin with tetraphenylethene: converting a fluorophore with aggregation-caused quenching to aggregation-induced emission enhancement. *J. Mater. Chem. B*, 4:27, 4690-4695, 2016.

FAY, D. S. The cell cycle and development : Lessons from *C. elegans*, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16, 397–406, 2005.

FILGUEIRAS, C. A. L. A espectroscopia e a química: da descoberta de novos elementos ao limiar da teoria quântica. *Química Nova Na Escola*, 3, 22–25, 1996.

FOWLER, L. J., LACHAR, W. A. Application of Immunohistochemistry to Cytology, 373–383, 2009.

FURUKAWA, T., HINO, H., TAKEDA, S., CHIBA, H., NISHIMURA, S. An efficient glycoblotting-based analysis of oxidized lipids in liposomes and a lipoprotein, *ChemBioChem*, 2017.

GARAY, R. M. Uso de sondas fluorescente e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*). 2012. 71 p. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)* – Departamento, 2012.

GAUGLITZ, E. G. *Handbook of Spectroscopy Near-Infrared Spectroscopy Handbook of Analytical Techniques In-situ Spectroscopy in Heterogeneous Catalysis. Journal of the American Chemical Society* (Vol. 126), 2003.

GUCHHAIT, B., AL, H., GAZI, R., KASHYAP, H. K., BISWAS, R. Fluorescence Spectroscopic Studies of (Acetamide + Sodium / Potassium Thiocyanates)

Molten Mixtures : Composition and Temperature Dependence, *The Journal of Physical Chemistry*, 5066–5081, 2010.

GUIDO, B.C. CORREA, J.R. BOCCA, A.L. Avaliação da atividade antitumoral dos derivados da 3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) sobre células do adenocarcinoma mamário humano. *Tese de Doutorado*, Universidade de Brasília, UnB, 2014.

HALLAMAA, R.; BATCHU, K. Phospholipid analysis in sera of horses with allergic dermatitis and in matched healthy controls. **Lipids health Dis.** v. 1, n. 45, p. 2-15, 2016.

HARAGUCHI, T., KOJIDANI, T., KOUJIN, T., SHIMI, T., OSAKADA, H., MORI, C., HIRAOKA, Y. Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 15), 2540–2554, 2008.

HARVALD, E. B., SPRENGER, R. R., DALL, K. B., GARTNER, A., LAMOND, A. I., FÆRGEMAN, N. J., NIELSEN, R. Multi-omics Analyses of Starvation Responses Reveal a Central Role for Lipoprotein Metabolism in Acute Starvation Survival in *C. elegans* Article Multi-omics Analyses of Starvation Responses Reveal a Central Role for Lipoprotein Metabolism in Acute Starvation Survival in *C. elegans*. *Cell Systems*, 1–15, 2017.

HEBRANT, M., GAROUX, L., MEUX, E., SCHNEIDER, M. Hydrodemetallation and Hydrodesulfurization Spent Catalysts Elemental Analysis : Comparison of Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence and Atomic Emission Spectrometries, *Applied Spectroscopy*, 1–10, 2017.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 3 ed. Academic Press, 2013.

HSU, C., WEN, Z., LIN, C., CHAKRABORTY, C. The Zebrafish Model: Use in Studying Cellular Mechanisms for a Spectrum of Clinical Disease Entities, *Current Neurovascular Research*, 2007, 4, 111-120, 2007.

HUANG, H., FENG, J., LUO, X., FANG, K., WANG, Z., WANG, A. A polypeptide-mediated synthesis of green fluorescent gold nanoclusters for Fe³⁺ sensing and bioimaging. *Journal of Colloid And Interface Science*, 506, 386–392, 2017.

HUANG, J., YU, Y., WANG, L., WANG, X., GU, Z., ZHANG, S., Tetraphenylethylene-Induced Cross-Linked Vesicles with Tunable Luminescence and Controllable Stability, *American Chemical Society*, 2017.

HULST, A. VAN, BARNETT, T. A., PARADIS, G., GOMEZ-LOPEZ, L. Birth Weight, Postnatal Weight Gain, and Childhood Adiposity in Relation to Lipid Profile and Blood Pressure During Early Adolescence, *JAMA*, 2017.

JENSEN, E. C. Overview of Live-Cell Imaging: Requirements and Methods Used. *Anatomical Record*, 296(1), 1–8, 2013.

JIANG, Z. WANG, N. Fluorinated Benzothiadiazole-Based Conjugated Polymers for High-Performance Polymer Solar Cells without Any Processing Additives or Post-treatments. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135 (45), pp 17060–17068, 2013.

KALSI, P. S. Spectroscopy of Organic Compounds, 1–36. Retrieved from <https://books.google.co.in/books?id=-gTdjwEACAAJ> , 2016. Acessado em: Agosto, 2016.

KANAGAL, N. B. Innovation and product innovation in marketing strategy. *Journal of Management and Marketing Research*, 18, 1–25, 2015.

KAPOOR, A. A., PRAKASH, A. V., SEKHAR, B. M., GREENFIELD, C. D. M., HATTON, D. M., LEAN, M. E. J., H, T. S. H. Monitoring risk factors of cardiovascular disease in cancer survivors, *17*(4), 2017.

KESHET, A., MERTENSKÖTTER, A., WINTER, S. A., BRINKMANN, V., DÖLLING, R., PAUL, R. J. PMK - 1 p38 MAPK promotes cadmium stress resistance , the expression of SKN - 1 / Nrf and DAF - 16 target genes , and protein biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Genetics and Genomics*, (123456789), 2017.

KIMURA, Y.; SUGIURA, Y.; HAYASAKA, T.; SETOU, M. Visualizing the spatial distribution of biomolecules in *C. elegans* by imaging mass Spectrometry. **The Worm Breeder's Gazette**. vol. 18, p.4, 2009.

KONINGSBERGEN, V. J. Huygens Institute - Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW), (September), 304–308, 2010.

KORZH, V. Transposons as tools for enhancer trap screens in vertebrates. *Genome biology*. 8(1):S8, 2007.

KRAKOWSKA, P., KO, T., CHACHAJ-BREKIESZ, A. Molecular fluorescent probes in biology, biochemistry and biotechnology, *Biochemii i biotechnologii* 19–25, 2015.

KUMAR, A., KARMAKAR, P., MANNA, S., MAITI, K. Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry Benzthiazole-derived chromogenic, fluorogenic and ratiometric probes for detection of hydrazine in environmental samples and living cells, *334*, 1–12, 2017.

LANGGUTH, L., SZUBA, A., MANN, S. A., GARNETT, E. C., GIJSJE, H. K., KOENDERINK, F. Nano-antenna enhanced two- focus fluorescence correlation spectroscopy. *Scientific Reports*, (June), 1–9, 2017.

LEHMAN, B. The pharmaceutical industry and the patent system. *International Intellectual Property Institute*, 1–14, 2003.

LEMIEUX, G. A.; ASHRAFI, K. Insights and challenges in using *C. elegans* for investigation of fat metabolism. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. vol. 50, p. 69 - 84, 2014.

LENARDÃO, E. J., DABDOUB, M. J., BATISTA, C. F. *Divulgação*, 26(1), 123–129, 2003.

LI, J. A Scanning Kerr Microscope with High Spatial and Temporal Resolutions. Retrieved from <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netahtml/HSS/Diss/LiJie/diss.pdf>, 2010.

LI, J., YIM, D., JANG, W.-D., YOON, J. Recent progress in the design and applications of fluorescence probes containing crown ethers. *Chem. Soc. Rev*, 2017.

LIESCHKE, G. J., CURRIE, P. D. Animal models of human disease : zebrafish swim into view, 8(May 2007), 353–367., 2010.

LIN, C., HE, J., ZENG, C., LOO, M., CHANG, W., ZHANG, P., TSAI, H. microRNA-206 modulates an Rtn4a / Cxcr4a / Thbs3a axis in newly forming somites to maintain and stabilize the somite boundary formation of zebrafish embryos, *The Royal Society Publishing*, 2017.

LIZHANG, W., LIU, C., YU, M., ZHANG, H. Sensors and Actuators B : Chemical A colorimetric and ratiometric fluorescent probe for hydrazine and its application in living cells with low dark toxicity, 241, 665–671, 2017.

LOPES, T, O. Derivados não-simétricos de 2,1,3-benzotiadiazolas de conjugações π -estendidas: DFT como guia de síntese. 2014. viii, 46 f., il. *Dissertação (Mestrado em Química)*—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MARQUEZIN, C.A. Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

MARRAS, S. A. E. Interactive Fluorophore and Quencher Pairs for Labeling Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes, 3–16, 2007.

MASTERS, B. R. A Brief History of the Microscope and Its Significance in the Advancement of Biology and Medicine. *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy*, 3–17, 2006.

MASTERS, B. R. History of the Electron Microscope in Cell Biology. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, (December), 1–9, 2006.

MASTERS, B., SO, P. Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo. *Optics Express*, 8(1), 2–10, 2001.

MERRILL, A. H.; BANDYOPADHYAY, S.; JONES, K. N.; KELLY, S.; SHANER, R. L.; SULLARDS, C. M.; WANG, E.; MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; LEIKER, T. J.; RAETZ, C. R.; GUAN, Z.; LAIRD, G. M.; SIX, D. A.; RUSSELL, D.W.; MCDONALD, J. G.; SUBRAMANIAM, S.; FAHY, E.; DENNIS, E. A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. **Jornal of Lipid Research**. v. 51, n. 11, p. 299-305, 2010.

MIRANDA, C. T., PINTO, R. F., LIMA, D. V. N. DE, VIEGAS, C. V, COSTA, S. M., AZEVEDO, S. M. F. O. Microalgae Lipid and Biodiesel Production : A Brazilian Challenge, *AJPS*, (September), 2522–2533, 2015.

MIRANDA, E. A. K. New Insights into the in situ Microscopic Visualization and Qualification of Inorganic Polyphosphate Stores by 4'6-Diamidino-2-Phenylindone (DAPI)-Staining. **European Journal of Histochemistry**. vol. 4, 2006.

MOHAMED, M., GONZALEZ, D., FRITCHIE, K. J., SWANSBURY, J., WREN, D., THWAY, K. Desmoplastic small round cell tumor : evaluation of reverse transcription-polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization as ancillary molecular diagnostic techniques, *Virchows Archiv*, 2017.

MOHAPATRA, M.; SAHOO, S. K.; ANAND, S.; DAS, R. P.; J. Colloid Interface Sci,298, 6, 2017.

MONTEIRO, I, P. Criatividade E Inovação Empresarial Nas Indústrias Criativas. Teoria e Prática em Administração. São Paulo, v. 5, n. 2, p.121-139, out, 2008.

MORDHORST T., KOCK M. Synthesis of 3-alkyl pyridinium alkaloids from the arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Marine Drugs*.8:483 – 497, 2015.

MORTARA, A. Microscopia Confocal Aplicada às Ciências Biológicas Básicas, 2016.

MOTA, A, A,R. Benzotiadiazolas Fluorescentes Planejadas: Aplicações em Biologia Molecular e Celular. Tese de Doutorado em Química.—Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MUKHERJEE, K., CHIO, T. I., GU, H., BANERJEE, A., SORRENTINO, A. M., SACKETT, D. L., DAN, L. Benzocoumarin hydrazine : A large Stokes shift fluorogenic sensor for detecting carbonyls in isolated biomolecules and in live cells, *ACS Sensors*, 2017.

MÜLLER, M. **Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy**. 2 ed. SPIE, Washington, 2006.

MURTHY, K. V. R., VIRK, H. S. Luminescence Phenomena: An Introduction. *Defect and Diffusion Forum*, 347, 1–34, 2013.

NECHIPURENKO, E, SENGUPTA, P.S. Transmembrane protein OSTA-1 shapes sensory cilia morphology via regulation of intracellular membrane trafficking in *C. elegans*. 140: 1560-1572. 2017.

NETO, B. A. D., CARVALHO, P. H. P. R., CORREA, J. R. Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. *Accounts of Chemical Research*, 48(6), 1560–1569. 2015.

NETO, B. A. D.; CARVALHO, P. H. P. R.; CORREA, J. R. Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. **Accounts of Chemical Research**. DOI: 10.1021/ar500468p, 2014.

NETO, B. A. D.; CARVALHO, P. H. P. R.; SANTOS, D. C.B. D.; GATTO, C. C.; RAMOS, L. M.; VASCONCELOS, N. M.; CORRÊA, J. R.; COSTA, M. B.; OLIVEIRA, H. C. B.; SILVA, R. G. Synthesis, properties and highly selective mitochondria staining with novel, stable and superior benzothiadiazole fluorescent probes. **Royal Society of Chemistry Advances**. vol. 2 p. 1524-1532, 2012.

NETO, B. A. D.; CORRÊA, J. R.; CARVALHO, P. H. P. R.; SANTOS, D. C.B. D.; GUIDO, B. C.; GATTO, C. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; FASCIOTTI, M.; EBERLIN, M. N.; DA SILVA JUNIOR, E. N. Selective and efficient mitochondrial staining with designed 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as live cell fluorescence imaging probe. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. vol. 23 n.4, p. 770-781, 2012.

NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. .M.; MANCILHA, F. S.; BATISTA, E. L.; NETZ, P. A.; ROMINGER, F.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DUPONT, J. On the selective detection of duplex deoxyribonucleic acids by 2,1,3-benzothiadiazole fluorophores. **Molecular BioSystems**. vol. 6, p. 967-975, 2010.

NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. .M.; MANCILHA, F. S.; VASCONCELOS, I. B.; THUM, C.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DUPONT, J. New sensitive fluorophores for selective dna detection. **Organic Letters**. vol. 9 n.20, p. 4001-4004, 2007.

NIE, Y., LITTLETON, B., KAVANAGH, T., ABBATE, V., BANSAL, S. S., RICHARDS, D., ST, S. R. Proanthocyanidin trimer gallate modulates lipid deposition and fatty acid desaturation in *Caenorhabditis elegans*, *The FASEB Journal*, 2017.

NIU, S. Advanced water soluble BODIPY dyes : Synthesis and application, (July), 182, 2011.

NTZIACHRISTOS, V. Fluorescence Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006.

OHSE, S., DERNER, R. B., OZÓRIO, R. Á., CORRÊA, R. G., FURLONG, E. B., CESAR, P., CUNHA, R. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae, *IDESIA* (Chile),93–102, 2015.

OLIVEIRA, F. F. D.; LAPIS, A. A. M.; DA SILVA JUNIOR, E. N.; DUPONT, J. On the use of 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as selective live cell fluorescence imaging probes, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. vol, 20, p. 6001-6007, 2010.

OLIVEIRA, K. T.; DE SOUZA, J. M.; GOBO, N. R. S.; DE ASSIS, F. F.; BROCKSOM, T. J. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas Rev. Virtual Quima, 7 (1), 310-335, 2015.

OXLEY, A. P. A., CATALANO, S. R., WOS-OXLEY, M. L., WESTLAKE, E. L., GRETCHEN, L., STEER, M. A. Using in situ hybridisation to expand the Daily Egg Production Method (DEPM) to new fish species, *Molecular Ecology Resources*, 2017.

PATHAK-SHARMA, S., ZHANG, X., LAM, J. G. T., WEISLEDER, N. High-Throughput Microplate-Based Assay to Monitor Plasma Membrane Wounding and Repair, *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 7(July), 1–11. 2017.

PATTERSON, S. I. Biological Research. *Journal of Biological Chemistry*, 35(2), 139–150, 2002.

PERKINELMER. An Introduction to fluorescence spectroscopy. *PerkinElmer, Inc.*, 1–36, 2000.

PIERZYASKA-MACH, A., JANOWSKI, P. A., DOBRUCKI, J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry Part A*, 85(8), 729–737, 2014.

PIRILLO A, CALLEGARI E, HAMSTEN A, CATAPANO AL, ERIKSSON P. Gene expression and intracellular pathways involved in endothelial dysfunction induced by VLDL and oxidised VLDL. *Cardiovasc Res*;59:169-80, 2013.

PRATAVIEIRA, S. Montagem e caracterização de um microscópio óptico não linear para imagens de tecidos biológicos, 106, 2014.

QI, W., GUTIERREZ, G. E., GAO, X., DIXON, H., MCDONOUGH, J. A., MARINI, A. M., FISHER, A. L. The ω -3 fatty acid α -linolenic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan via NHR-49/PPAR α and oxidation to oxylipins, *Aging Cell*, 2017.

QUEHENBERGER, O.; ARMANDO, A. M.; BROWN, A. H.; MILNE, S. B.; MYERS, D. S.; MERRILL, A. H.; BANDYOPADHYAY, S.; JONES, K. N.; KELLY, S.; SHANER, R. L.; SULLARDS, C. M.; WANG, E.; MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; LEIKER, T. J.; RAETZ, C. R.; GUAN, Z.; LAIRD, G. M.; SIX, D. A.; RUSSELL, D.W.; MCDONALD, J. G.; SUBRAMANIAM, S.; FAHY, E.; DENNIS, E. A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Jornal of Lipid Research*. v. 51, n. 11, p. 299-305, 2010.

REZENDE, L. C. D. Síntese caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do Bodipy. *Tese de Doutorado*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP - Ribeirão Preto, 2016.

RODRIGUES ROGERIO, K., VITÓRIO, F., EUGEN KUMMERLE, A., GRAEBIN, C. S. Multicomponent Reactions: A Brief History and their Versatility for the Synthesis of Biologically Active Molecules. *Revista Virtual de Química*, 8(6), 1934–1962, 2016.

ROHRSCHEIDER, M., BHAGWAT, S., KRAMPE, R., MICHLER, V., BREITKREUTZ, J., HOCHHAUS, G. Evaluation of the Transwell® system for characterization of dissolution behavior of inhalation drugs : Effects of membrane and surfactant, *ACS – Molecular Pharmaceutics*, 2015.

ROMANOS, T. R., PLADEVALL-MORERA, D., LANGEBECK-JENSEN, K. LIN-32 / Atonal Controls Oxygen Sensing Neuron Development in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 2–11, 2017.

ROSA, A. ROCHA, J. C.; FURLAN, A. H. Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas. UNESP: São Paulo, 2003.

RUMIN J, BONNEFOND I, SAINT-JEAN B, ROUXEL C, SCIANDRA, A BERNARD, O CADORET, G BOUGARAN. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 8:42, 2015.

SAAKOV, V. Hight-temperature stress-related changes in the harmonics Fo, Fm and Fv of pulse-amplitud modulated fluorescence signals: Locating thermal damage in reactioncenter in photosystem II. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 382: 4-9, 2001.

SAITO, K., HIRAI, T., TAKESHIMA, H., KADOTA, Y., YAMASHITA, S., IVANOVA, A., YOKOGAMI, K. Genetic factors affecting intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence of diffuse gliomas, *1. Radiology and Oncology*, 2017.

SAKAGUCHI TF, SADLER KC, COSNIER C, STAINIER DYI. Endothelial signals modulate hepatocyte apicobasal polarization in zebrafish. *Curr Biol*.;18:1565–1571, 2013.

SAUER, M., HOFKENS, J., ENDERLEIN, J. Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, 1–29, 2011.

SEMWOGERERE, D., WEEKS, E. R. (2005). Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 1–10, 2005.

SHANKARAIHAH, N., NEKKANTI, S., BRAHMA, U. R., KUMAR, N. P., DESHPANDE, N., PRASANNA, D., LAKSHMI, U. J. Synthesis of different heterocycles-linked chalcone conjugates as cytotoxic agents and tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017.

SHARMA, S. H., RAJ, D., CHINNASWAMY, P., NAGARAJAN, S. ScienceDirect Protective effect of p -coumaric acid against 1 , 2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 94, 577–588, 2017.

SHEN, H., MA, H., LIU, P., HUANG, W., HAN, L., LI, C., LI, Y. Facile Synthesis of In-Chain , Multicomponent , Functionalized Polymers via Living Anionic Copolymerization through the Ugi Four-Component Reaction (Ugi-4CR), 1700353, 1–6, *Macromoleculr Rapid Communications*, 2017.

SINGH, V., NERIMETLA, R., YANG, M., KRISHNAN, S. Magnetite-Quantum Dot Immunoarray for Plasmon-coupled- Magnetite-Quantum Dot Immunoarray for Plasmon-coupled- Fluorescence Imaging of Blood Insulin and Glycated Hemoglobin, *ACS SENSOR*, 2017.

SKORPILOVA, A, RIMPELOVA, S. BODIPY-based fluorescent liposomes with sesquiterpene lactone trilobolide Guest Editor: J. S. Dickschat *Beilstein J. Org. Chem*, 2017.

SMILEY, R.W, JACKSON, A. Soil C and N changes under tillage and cropping systems in semi-arid pacific northwest agriculture. *Soil Till. Res.*, 47:197-205, 2002.

SMITH, DENT, G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, 2005.

SMOLENTSEVA, I. SHAMOVSKY, S. EREMINA, A. MIRONOV, E. NUDLER **Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans*** *Cell*, 152, pp. 818-830, 2013.

SO, P. T. C., DONG, C. Y. Fluorescence Spectrophotometry. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–4, 2002.

SONG, J., YE, Y. A Fluorescein-Based Colorimetric and Fluorescent Probe for Hydrazine and its Bioimaging in Live Cells, (2), 323–329, 2017.

SOUZA, P. J. Organismos geneticamente modificados: impacto ambiental, legislação e bioética, 2009.

STEFANOVITZ, J. P.; NAGANO, M. S.; VICK, T. E. Innovation management processes, their internal organizational elements and contextual factors: An investigation in Brazil. *Journal of Engineering and Technology Management*, v. 33, p. 63-92, 2014.

STROBL, F., SCHMITZ, A., STELZER, E. H. K. Improving your four-dimensional image : traveling through a decade of light-sheet-based fluorescence microscopy research. *Nature Publishing Group*, 12(6), 1103–1109, 2017.

STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester: Wiley, 224p, 2004.

SU, M., GUO, J., YANG, Q., XIAO, N., LI, Y. hydrazine and its application in biological systems †, 1846–1851, 2014.

SUN, Z., FANG, X. Oleaginous Microalgae from Dairy Farm Wastewater for Biodiesel Production : Isolation , Characterization and Mass Cultivation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017.

SUPLICY, D. V , PAULO, U. D. S., CRISTINA, C., SUPLICY, D. V., PROFA, O., MARIA, D., MOURA, T. Estudos experimentais e teóricos dos espectros eletrônicos das sondas fluorescentes Prodan e Laurdan em solventes e bicamadas lipídicas. Tese de Doutorado em Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SUZUKI, Y., YOKOYAMA, K. Development of functional fluorescent molecular probes for the detection of biological substances. *Biosensors*, 5(2), 337–363, 2015.

TAKAHASHI, S. Knowledge integrated management. In: PICMET, Portland, 1999. New Product Development Proceedings. Portland, 1999.

TATSCH, P. Produção de carotenoides: microorganismos como fontes de pigmentos naturais Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Brasil. Sousa, R.B, Nascimento, V.A. (2015). Síntese, caracterização e propriedade fotoluminescente de tungstato de bário puro e dopado com hólmio, 2008.

TERMOFISHER SCIENTIFIC. Revisado em: Julho/2017. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>

TRANQUILIN, R.L. Estudo das propriedades estruturais, ópticas e fotocatalíticas do PbMoO por intermédio do método hidrotermal. *Tese de Doutorado*. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais, Araraquara, 2013.

TSUNEMATSU, H.; BAN, T. Genetic diversity and relationships of Japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.53,p.883-889, 2006.

ULRICH, K.; EPPINGER, S. Product design and development. 3.ed. New York: McGraw Hill, 2004.

VALEUR, B. *Related Titles from WILEY-VCH Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution . Methods and Applications. Methods* (Vol. 8), 2001.

VICKERY, O. N., MACHTENS, J., ZACHARIAE, U. ScienceDirect Membrane potentials regulating GPCRs : insights from experiments and molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Pharmacology*, 30, 44–50, 2016.

VORADI, A., PALMER, T. C., DARDASHTI, R. N., MAJUMDAR, S. Isocyanide-based multicomponent reactions for the synthesis of heterocycles. *Molecules*, 21(1), 2016.

WANG, B., SUN, S., YU, JIN-TAO., JIANG, Y., CHENG, J., Palladium Catalyzed Multicomponent Reactions of *o*-Alkynylanilines, Aryl Iodides, and CO₂ toward 3,3-Diaryl 2,4-Quinolinediones, *Organic Letters*, 2017.

WANG, K., JIN, Z., SHANG, H., LV, C., ZHANG, Q., CHEN, S., HU, Z. A highly Selective Fluorescent Chemosensor for Zn²⁺ Based on the Rhodamine Derivative Incorporating Coumarin Group. *Journal of Fluorescence*, 0–4, 2016.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Food Science & Technology*, v. 17, 300-312, 2006.

WANG, R., YU, C., YU, F., CHEN, L., YU, C. Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1004–1013, 2010.

WARNER, A, S.CANNON, K, M. DYE. Green Chemistry. Center for Green Chemistry, University of Massachusetts-Boston, 100 Morrissey Boulevard, Boston, MA 02125-3393, USA, 2004.

WARNER, J. C., CANNON, A. S., DYE, K. M. (2004). Green chemistry. *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7–8), 775–799, 2004.

WHITTEN, R. A. GIERAY, P. T. A. REILLY, A. LAZAR, AND J. M. RAMSEY. Detection and classification of individual airborne microparticles using laser ablation mass spectroscopy and multivariate analysis. *Field Analytical Chemical Technology* 4(1): 31–42, 2017.

WOJTALA, A., BONORA, M., MALINSKA, D., PINTON, P., DUSZYNSKI, J., WIECKOWSKI, M. R. *Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 542). Elsevier Inc, 2014.

YANG, S., KREUTZBERGER, A. J. B., KIESSLING, V., GANSER-PORNILLOS, B. K., WHITE, J. M., TAMM, L. K. HIV virions sense plasma membrane heterogeneity for cell entry, *Science Advances* (June), 1–13, 2017.

YIN J, ZHANG Q, YING CAI, QIU-YAN LI, LIN-NA HAO, ZHENG MA, AND XIAO-JUN WANG. Targeted Delivery of Mannose-Conjugated BODIPY Photosensitizer by Nanomicelles for Photodynamic Breast Cancer Therapy. *Chem. Eur. J*, 2017.

ZATORSKA, B., GROGER, M., MOSER, D., DIAB-ELSCHAHAWI, M., LUSIGNANI, L. S. Does Extracellular DNA Production Vary in Staphylococcal Biofilms Isolated From Infected Implants versus Controls, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2017.

ZHANG, J., HAO, J., ZHANG, Y., WANG, Y., LI, M., MIAO, H. Zinc Mediates the SREBP-SCD Axis to Regulate Lipid Metabolism in *Caenorhabditis elegans*, *J. Lipid Res.*, 2017.

ZHENG, G., SHEN, Y., ZHAO, R., CHEN, F., ZHANG, Y., XU, A., SHAO, J. Dual-Targeting Multifunctional Mesoporous Silica Nanocarrier for Codelivery of siRNA and Ursolic Acid to Folate Receptor Overexpressing Cancer Cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017.

ZIOLKOWSKA NE, CHRISTIANO R, WALTHER TC. Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* ;22:151–158, 2012.

ZU T., LIU Y., BANEZ-CORONEL M., REID T., PLETNIKOVA O., LEWIS J. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E4968–E4977, 2013.