



INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**SONDAS FLUORESCENTES LIPOFÍLICAS DO TIPO AIEE DERIVADOS DO NÚCLEO
2,1,3-BENZOTIADIAZOLA (BTD)**

Elaine Reis Sodré

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto
(Orientador)

Prof^ª. Dr^ª. Talita de Almeida Fernandes
(Coorientadora)

BRASÍLIA, DF

2021



INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**SONDAS FLUORESCENTES LIPOFÍLICAS DO TIPO AIEE DERIVADOS DO NÚCLEO
2,1,3-BENZOTIADIAZOLA (BTD)**

Tese apresentada ao PPGQ como
parte do requisito para obtenção
do título de Doutor em Química.

Elaine Reis Sodré

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Talita de Almeida Fernandes
(Coorientadora)

BRASÍLIA, DF

2021

Dedicatória

Aos meus pais Ana Célia e João, e à minha irmã Irlaine pelo carinho, compreensão, ensinamentos e motivação. Ao meu marido Ildemar, por fazer dos meus sonhos os seus sonhos e por compartilhar comigo todos os momentos que me fizeram chegar até aqui.

Eu dedico!!

Assim diz o Senhor: Eu não perdi o controle da tua vida, está tudo no meu tempo. Não há nada atrasado. Aquietai-vos e sabei que Eu sou Deus.

Salmo 46, V 10

Se me perguntassem, antes de partir, e partir definitivamente, se conheço uma chave mágica que nos abre a porta para a sabedoria da vida, eu lhes responderia: “Sim”. Esta chave mágica não é a reflexão, como talvez se esperasse de um filósofo, mas a oração. A oração, entendida como entrega suprema, nos dá a paz, nos faz crianças, nos torna objetivos. Para mim uma pessoa cresce em humanidade – não em humanismo – na medida em que for capaz de rezar. Refiro-me à verdadeira oração. A oração caracteriza a máxima “*humilitas*” do espírito. As grandes coisas da existência só são dadas aos espíritos orantes. E a melhor maneira de aprender a rezar é no sofrimento...

Peter Wust

Agradecimentos

- Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a graça de chegar até aqui com saúde, perseverança e determinação. Por não permitir que eu fraquejasse um só minuto e por me conceder a força necessária para seguir a diante na busca pela concretização dos meus sonhos.

- Aos meus pais, Ana Célia e João, que dedicaram boa parte de suas vidas a investirem na minha educação. Agradeço por eles serem tão cientes da importância da educação nas nossas vidas. À minha irmã Irlaine pela amizade e companhia.

- Ao meu querido marido Ildemar, pelo carinho, paciência, atenção, apoio emocional e respeito. Por estar ao meu lado me apoiando em todas as decisões.

- Ao meu orientador o professor Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto pela orientação, amizade, respeito, motivação e compreensão. À minha coorientadora a professora Dr^a. Talita de Almeida Fernandes muito obrigada por todo o suporte oferecido. Agradeço, igualmente ao dois pelos momentos de aprendizado e oportunidade de pesquisa.

- Aos professores que ajudaram a engrandecer este trabalho, por meio das colaborações: professor Dr. José Raimundo Corrêa e Dr^a. Bruna C. Guido pela colaboração com os testes de viabilidade celular e imageamento celular; professor Dr. Daniel F. S. Machado pela realização dos cálculos teóricos; professora Dr^a. Claudia Gatto pelas análises de raios X e superfície Hirshfeld; professor Dr. Juliano A. Chaker que cedeu o equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para análises; professor Dr. Valter H. Carvalho-Silva pela realização dos cálculos cinéticos e termodinâmicos dos nanoagregados; professor Dr. Paulo E. N. de Souza pela realização das análises e tratamento dos dados de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

- Ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília pela oportunidade de dar continuidade aos meus estudos, por meio do doutorado acadêmico.

- À todas as pessoas e aos funcionários do Instituto de Química que me ajudaram direta ou indiretamente na realização dos experimentos, em especial aos técnicos da Central Analítica.

- Aos colegas do Grupo de Pesquisa, em especial a Luciana, Ingrid, Alberto e Pedro Henrique que me auxiliaram inicialmente nos trabalhos de bancada. Aos alunos de iniciação científica Pedro Santana e Sofia pelos momentos de descontração. A Júlia e pelas conversas, conselhos e amizade.

- Aos amigos de longa data, principalmente a Viviane pelas visitas, momentos de descontração, motivação e animação.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de doutorado concedida.

- Agradeço aos membros da banca examinadora por gentilmente terem aceitado o convite, dispondo do seu tempo e conhecimento para avaliar este trabalho.

Resumo

Neste trabalho, três moléculas orgânicas fluorescentes derivadas do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD), foram sintetizadas através da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira com o fenilacetileno, e utilizadas como sondas fluorescentes seletivas para gotas lipídicas em imageamento celular. Dentre as características requeridas para esses tipos de sondas fluorescentes, tem-se o aumento ou ativação de intensidade de emissão de fluorescência no estado agregado, ou seja, a não ocorrência do efeito ACQ (*Aggregation Caused Quench*). Dessa forma, a arquitetura molecular dessas sondas foi planejada de modo a apresentarem design D- π -A e comportamento AIEE (*Aggregation-Induced Emission Enhancement*) no estado de agregação. A análise fotofísica e o espalhamento dinâmico de luz (DLS) demonstraram que as BTDs formam agregados em água associadas a um aumento da intensidade de fluorescência, devido ao efeito AIEE (*Aggregation-Induced Emission Enhancement*). Pela primeira vez foram aplicados com sucesso o modelo cinético de Finke-watzky e as leis de deformação Arrhenius (comportamento super-Arrhenius) para a elucidação dos processos dinâmicos de agregação/quebra de nanoagregados orgânicos. O coeficiente de partição e o teste SDS determinaram a lipofilicidade e o efeito light-up em meio lipofílico das BTDs. Os cálculos DFT revelaram que a Transferência Intramolecular de Carga (ICT) foi responsável pelas propriedades fluorescentes, o que é esperado para moléculas fluorescentes de design D- π -A. A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foi usada eficientemente para a caracterização da dinâmica do estado excitado e confirmação da estabilização do estado excitado pelo processo ICT. O uso das BTDs para a marcação de gotas lipídicas apresentou excelentes resultados, e as gotas lipídicas puderam ser marcadas seletivamente, quando comparados com o marcador comercialmente disponível (BODIPY), com emissões variando do azul ao vermelho.

Palavras chave: Gotas lipídicas, transferência intramolecular de carga, AIEE, fluorescência, lipofilicidade, núcleo BTD, nanoagregados, DLS, RPE, células vivas.

Abstract

Three fluorescent 2,1,3- benzothiadiazole (BTD) small-molecules derivatives, were synthesized through Sonogashira cross-coupling reaction with phenylacetylene, and applied as stain for the selective imaging of lipid droplets (LDs). Among the characteristics required for these types of fluorescent probes, there is the increase or activation of fluorescence emission intensity in the aggregate state, that is, the non-occurrence of the ACQ (Aggregation Caused Quench) effect. Thus, the molecular architecture of these probes was planned in such a way as to present D- π -A design and AIEE (Aggregation-Induced Emission Enhancement) behavior in the aggregation state. Photophysical analysis and dynamic light scattering (DLS) demonstrated that BTDs form aggregates in water associated with an increase in fluorescence intensity, due to the AIEE effect (*Aggregation-Induced Emission Enhancement*). For the first time, the Finke-watzky kinetic model and the Arrhenius deformation laws (super-Arrhenius behavior) were successfully applied to elucidate the dynamic processes of aggregation / breaking of organic nanoaggregates. The partition coefficient and the SDS test determined the lipophilicity and the light-up effect in lipophilic ambient. DFT calculations revealed that the Intramolecular Charge Transfer (ICT) was responsible for the fluorescent properties, which is expected for fluorescent molecules of design D- π -A. The electronic paramagnetic resonance (EPR) technique was used efficiently to characterize the excited state dynamics and confirm the stabilization of the excited state by the ICT process. The use of BTDs for live-cells staining showed excellent results, and lipid droplets (LDs) could be selectively stained, when compared with the commercially available dye (BODIPY), with emissions ranging from blue to red.

Keywords: Lipid droplets, intramolecular charge transfer, AIEE, fluorescence, lipophilicity, BTD core, nanoaggregates, DLS, EPR, living cells.

Sumário

1. Introdução & Revisão Bibliográfica.....	1
1.1 Imageamento Celular e Princípios básicos de Fluorescência.....	6
1.2 Sondas fluorescentes derivadas do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola.....	14
1.3 Agregação e Luminescência.....	19
1.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	24
1.4.1 Teoria Básica.....	24
1.4.2 RPE em Sistemas Luminescentes.....	29
2. Objetivos e Justificativa.....	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
2.3 Justificativa.....	34
3. Resultados e Discussão.....	36
3.1 Síntese dos derivados de BTD AIEE de design D- π -A e análogos.....	36
3.1.1 Síntese dos compostos BTDBrCCPh e BTD(CCPh) ₂	40
3.1.2 Síntese do composto BTDCCPH.....	42
3.2 Caracterização Estrutural das BTDs sintetizadas.....	45
3.2.1 Composto BTD(CCPh) ₂	47
3.2.2 Composto BTDBrCCPh.....	52
3.2.3 Composto BTDCCPH.....	57
3.3 Propriedades Fotofísicas.....	64
3.3.1 Efeito Solvatocrômico.....	64
3.3.2 Efeito AIEE (<i>Aggregation-induced Emission Enhancement</i>) – estudo cinético e dinâmico.....	67
3.3.3 Rendimento Quântico de Fluorescência.....	77
3.3.4 Teste de Fotoestabilidade.....	83
3.3.5 Lipofilicidade e Efeito Light-up.....	84
3.4 Cálculos Teóricos.....	87
3.5 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	95
3.6 Testes Biológicos.....	102
3.6.1 Viabilidade Celular.....	102
3.6.2 Imageamento Celular de Gotas Lipídicas.....	105
4. Conclusão e Perspectivas.....	111
5. Materiais e Métodos.....	114
5.1 Informações Gerais.....	114
5.2 Síntese dos derivados de BTD AIEE.....	115
5.2.1 Síntese de BTDBrCCPh (4-bromo-7-(feniletinil)-2,1,3-benzotiadiazola) e BTD(CCPh) ₂ (4,7-bis(feniletinil)-2,1,3-benzotiadiazola).....	115
5.2.2 Síntese de BTDCCPH (4-(feniletinil)-2,1,3-benzotiadiazola).....	115
5.3 Análises de Raio-X.....	116
5.4 Efeito AIEE.....	116
5.5 Rendimento Quântico de Fluorescência.....	117
5.6 Coeficiente de Partição Experimental.....	118
5.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	118
5.8 Cálculos Computacionais.....	119
5.8.1 Propriedades de Transporte.....	119
5.8.2 Agregação e Curvas de crescimento.....	119

5.8.3 Cálculos Teóricos	120
5.9 Medidas de RPE.....	121
5.10 Ensaio de Viabilidade Celular.....	121
5.11 Protocolo de Marcação Celular.....	122
6. Referências Bibliográficas.....	123
Anexos.....	143

Lista de Figuras

Figura 1. Representação de Gotas Lipídicas em células.....	1
Figura 2. Principais corantes comerciais utilizados para a marcação de gotas de lipídicas.....	3
Figura 3. Estruturas de algumas moléculas orgânicas utilizadas na síntese de novas sondas fluorescentes seletivas para LDs.....	4
Figura 4. Estruturas de algumas sondas fluorescentes sintetizadas recentemente para marcação de gotas lipídicas com emissões variando do azul ao vermelho.....	5
Figura 5. Estruturas de alguns fluoróforos orgânicos aplicadas no imageamento celular.....	7
Figura 6. Diagrama de Jablonski simplificado.....	8
Figura 7. Processo de excitação eletrônica.....	9
Figura 8. Representação do Deslocamento de Stokes.....	10
Figura 9. Adaptação do diagrama de Jablonski demonstrando a estabilização do estado excitado através do processo ICT para fluoróforos de arquitetura D-A e D- π -A.....	12
Figura 10. Diagrama de Energia durante a transferência intramolecular de carga (ICT) do grupo doador (D) para o grupo acceptor (A) do composto fluorescente merocianina de Brooker.....	13
Figura 11. Ilustração da estrutura básica do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) encontrada em alguns derivados fluorescentes aplicados em imageamento celular.....	14
Figura 12. Estruturas quinoidais (a) <i>para</i> -; (b) <i>orto</i> - e (c) forma quinoidal do núcleo BTD.....	14
Figura 13. Formas mesoméricas do núcleo BTD.....	15
Figura 14. Alguns derivados push-pull de sistemas D- π -A e análogos do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD).....	17
Figura 15. Arquitetura proposta para a marcação de estruturas de DNA.....	17
Figura 16. Derivados de BTDs fluorescentes sintetizadas para marcação de diferentes organelas celulares.....	18
Figura 17. Sondas fluorescentes derivadas de BTD seletivas para estruturas lipídicas com emissões de fluorescência no verde e vermelho.....	18
Figura 18. Variação na emissão de fluorescência causada pelo efeito ACQ do composto DDPD.....	20
Figura 19. Agregados do tipo disco não-emissivos de fluoróforos aromáticos como o perileno resultante da interação de empilhamento π - π	20
Figura 20. Molécula de HPS em forma de hélice é não-emissiva em solução	21
Figura 21. Estrutura molecular do composto fluorescente 1,2-Difenil-4-(2-metoxinafitil)-1,3-ciclopentadieno.....	22
Figura 22. Algumas moléculas fluorescentes que formam agregados do tipo AIEE.....	23
Figura 23. Algumas moléculas fluorescentes derivados do núcleo BTD que formam agregados do tipo AIE ou AIEE.....	23
Figura 24. Diagrama do efeito Zeeman para o elétron livre - desdobramentos dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético \vec{B}_0	25

Figura 25. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético oscilante B.....	26
Figura 26. Níveis de energia de um sistema com um elétron desemparelhado e um núcleo atômico de spin nuclear diferente de zero.....	27
Figura 27. Faixa de frequência na região micro-ondas comumente utilizada nos experimentos de RPE.....	28
Figura 28. Componentes básicos de um espectrômetro de RPE.....	29
Figura 29. Utilização da técnica de RPE em alguns Sistemas Luminescentes	30
Figura 30. Transições eletrônicas envolvidas no processo de foto-excitação em moléculas luminescentes.....	30
Figura 31. Alguns sistemas luminescentes que teve as transições tripleto estudadas pela técnica RPE.....	31
Figura 32. Derivados de BTD lipofílicos sintetizados e utilizados neste trabalho.....	33
Figura 33. Design molecular dos derivados fluorescentes de BTD proposto neste trabalho para marcação de gotas lipídicas.....	35
Figura 34. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDBrBr	46
Figura 35. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto Fenilacetileno.....	46
Figura 36. Massas de alta resolução [HR-ESI(+)-MS] para BTD(CCPh)₂ protonada.....	47
Figura 37. Estrutura molecular do composto BTD(CCPh)₂ com seus respectivos carbonos e hidrogênios identificados, onde C2 corresponde ao eixo de simetria.....	47
Figura 38. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTD(CCPh)₂	48
Figura 39. Expansão da região aromática do espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTD(CCPh)₂	48
Figura 40. Espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto BTD(CCPh)₂	49
Figura 41. Expansão do espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto BTD(CCPh)₂	49
Figura 42. Estrutura molecular de BTD(CCPh)₂ a partir da análise de raios X de monocristal mostrando a numeração de átomos (50% de probabilidade).	51
Figura 43. Massas de alta resolução [HR-ESI(+)-MS] para BTDBrCCPh protonada.....	52
Figura 44. Estrutura molecular do composto BTDBrCCPh com seus respectivos carbonos e hidrogênios identificados.....	52
Figura 45. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDBrCCPh	53
Figura 46. Expansão da região aromática do espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDBrCCPh	53
Figura 47. Espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto BTDBrCCPh	54
Figura 48. Expansão da região aromática do espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto BTDBrCCPh	54
Figura 49. Estrutura molecular de BTDBrCCPh a partir da análise de raios X de monocristal mostrando a numeração de átomos (50% de probabilidade)	56

Figura 50. Composto BTDBrCCPh : (I) Interações intermoleculares (linhas pontilhadas) para formar uma estrutura semelhante ao dímero (operações de simetria: -x, 2-y, 1-z).....	57
Figura 51. Massas de alta resolução [HR-ESI(+)-MS] para BTDCCPH protonada.....	58
Figura 52. Estrutura molecular do composto BTDCCPH com seus respectivos carbonos e hidrogênios.....	58
Figura 53. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	58
Figura 54. Expansão da região aromática do espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	59
Figura 55. Espectro de APT ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	59
Figura 56. Expansão do espectro de APT ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	60
Figura 57. Espectro de HSQC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	62
Figura 58. Expansão do espectro de HSQC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	62
Figura 59. Espectro de HMBC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	63
Figura 60. Expansão do espectro de HMBC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH	63
Figura 61. (a) Espectros de UV-Vis; (b) Espectros de emissão de fluorescência e (c) efeito solvatocrômico das BTDs sintetizadas em solventes de diferentes polaridades.....	65
Figura 62. Efeito solvatocrômico das BTDs (10 μM) sintetizados considerando a água como um dos solventes.....	67
Figura 63. Formação de nanoagregados de BTDs lipofílicas em água.....	67
Figura 64. Espectros UV-Vis das BTDs variando-se a fração de DMSO em água.....	68
Figura 65. Espectros de Emissão de Fluorescência das BTDs variando-se a fração de DMSO em água.....	68
Figura 66. Intensidade de fluorescência vs Fração de DMSO em água.....	69
Figura 67. Formação de nanoagregados orgânicos para BTD(CCPh)₂ (20 μM) por um período de tempo.....	70
Figura 68. Efeito da temperatura sob os nanoagregados orgânicos para a BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPh)₂ (20 μM cada).....	71
Figura 69. Comprimentos de correlação dinâmica em função de $1/T$ obtidos a partir dos nanoagregados dos compostos BTD(CCPh)₂ , BTDCCPH e BTDBrCCPh	75
Figura 70. Superfície de Hirshfeld mapeada em d_{norm} para BTD(CCPh)₂	76
Figura 71. Determinação do rendimento quântico de fluorescência da rodamina 6G através do método do método comparativo.....	77
Figura 72. Determinação do rendimento quântico de fluorescência da rodamina 6G através do método do ponto único.....	78
Figura 73. (a) Espectro UV-Vis e (b) Espectro de emissão de fluorescência..	80
Figura 74. Gráfico de Absorbância (A) em função da concentração (C).....	81
Figura 75. Espectros de UV-Vis e emissão de fluorescência das BTDs sintetizadas em solventes de diferentes polaridades.....	82

Figura 76. Espectros de fotoestabilidade dos compostos (a) BTDBrCCPh , (b) BTDCCPH e (c) BTD(CCPH)₂ , respectivamente.....	84
Figura 77. Intensidade de fluorescência relativa de BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPH)₂ em (10 μ M meio aquoso) abaixo e acima da Concentração Micelar Crítica de SDS (8 mmolar).....	85
Figura 78. Curvas de calibração para determinação dos coeficientes de partição (octanol / água) para BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPH)₂	86
Figura 79. Estruturas moleculares otimizadas de BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPH)₂ determinadas a partir de cálculos CAM-B3LYP / 6-311 + G (d) no vácuo.....	87
Figura 80. Erro Médio Absoluto (MAE) comparando as posições experimental e teórica λ_{max} em diferentes solventes para as três BTDs teoricamente investigadas.....	89
Figura 81. Espectros de absorção simulados de BTD(CCPH)₂ em diferentes solventes calculados no nível teórico pelo CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d).....	90
Figura 82. Espectros de absorção simulados de BTDBrCCPh em diferentes solventes calculados no nível teórico pelo CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d).....	91
Figura 83. Espectros de absorção simulados de BTDCCPH em diferentes solventes calculados no nível teórico pelo CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d).....	92
Figura 84. Densidades de buraco $\rho^{\text{buraco}}(r)$ e elétron $\rho^{\text{ele}}(r)$ dos cromóforos BTDCCPH , BTDBrCPh e BTD(CCPH)₂ em acetonitrila envolvida na excitação eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$ associada com a banda de maior comprimento de onda.....	93
Figura 85. CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d) orbitais HOMO e LUMO de BTDCCPH , BTDBrCCPh e BTD(CCPH)₂ (respectivamente) em acetonitrila na Transição $S_0 \rightarrow S_1$ responsável pela maior banda de comprimento de onda.....	94
Figura 86. Gráfico de amplitude de sinal de RPE em função da temperatura (100 a 250 K) para as BTDs lipofílicas.....	96
Figura 87. Diferentes regiões de acumulação de carga (destacadas em rosa) nas estruturas das BTDs responsáveis pelos sinais de RPE observados	98
Figura 88. Análise RPE e gráficos simulados para BTD(CCPH)₂	99
Figura 89. Análise de PRE para BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPH)₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.....	100
Figura 90. Campo de ressonância como uma função de temperatura nas análises de PRE para BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPH)₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.....	100
Figura 91. Largura de transição como uma função de temperatura nas análises de PRE para BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPH)₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.....	101
Figura 92. Análise de RPE para BTD(CCPH)₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.....	102
Figura 93. Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água).....	103
Figura 94. Redução de resazurina a resorufina em testes de viabilidade celular.....	104

Figura 95. Determinação da viabilidade celular após 30 min e 24 h para os compostos BTDBrCCPh , BTDCCPH e BTD(CCPh)₂	104
Figura 96. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando BTDBrCCPh em diferentes concentrações.....	106
Figura 97. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 fixadas usando BTDBrCCPh em diferentes concentrações.....	106
Figura 98. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando BTDCCPH em diferentes concentrações.....	107
Figura 99. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 fixadas usando BTDCCPH em diferentes concentrações.....	107
Figura 100. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando BTD(CCPh)₂ em diferentes concentrações.....	108
Figura 101. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 fixadas usando BTD(CCPh)₂ em diferentes concentrações.....	108
Figura 102. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando BTDBrCCPh (1,0 μM) e BODIPY (12 μM).....	109
Figura 103. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando BTDCCPH (1,0 μM) e BODIPY (12 μM).....	109
Figura 104. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando BTD(CCPh)₂ (500 nM) e BODIPY (12 μM).....	110

Lista de Esquema

Esquema 1. Síntese do composto 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola.....	16
Esquema 2. Mecanismo proposto para a formação da espécie ativa de Pd(0) responsável pela reação de acoplamento C(sp ²)-C(sp).....	38
Esquema 3. Ciclo catalítico de reação de acoplamento de Sonogashira “livre de cobre” proposto por Košmrlj e colaboradores.....	41
Esquema 4. Ciclo catalítico de reação de acoplamento de Sonogashira. Onde: AO = Adição Oxidativa.....	44

Lista de Tabela

Tabela 1. Síntese de derivados de BTB com espaçador π C \equiv C através da reação de Sonogashira.....	37
Tabela 2. Condições reacionais testadas para obtenção dos compostos BTDBrCCPh e BTB(CCPh) ₂	40
Tabela 3. Condições reacionais testadas para obtenção do composto BTBCCPh.....	43
Tabela 4. Dados obtidos por difração de raios X e parâmetros refinados para BTB(CCPh) ₂	51
Tabela 5. Dados obtidos por difração de raios X e parâmetros refinados para BTDBrCCPh.....	56
Tabela 6. Correlações heteronucleares ¹ H vs ¹³ C observadas no espectro bidimensional HMBC do composto BTBCCPh.....	64
Tabela 7. Dados UV-VIS e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para as estruturas sintetizadas. Concentração de 10 μ M para todas as análises.....	65
Tabela 8. Valores de E_T^N utilizados para os diferentes solventes e os respectivos valores de R ² encontrados para os compostos BTB(CCPh) ₂ , BTBCCPh e BTDBrCCPh.....	66
Tabela 9. Propriedades Fotofísicas do Bi-sulfato de Quinina.....	79
Tabela 10. Valores utilizados para a determinação do rendimento quântico do composto BTB(CCPh) ₂ através do método do ponto único.....	80
Tabela 11. Valores de Rendimento Quântico obtidos através do método do ponto único para as BTBs deste trabalho em solventes de diferentes polaridades.....	82
Tabela 12. Parâmetros utilizados no espectrofluorímetro para os testes de fotoestabilidade dos derivados de BTB.....	84
Tabela 13. Energia livre de solvatação calculada (PW6B95/6-311+G(d)) em água, em octanol e o coeficiente de partição (log P) (DFT) e log K _{ow} (experimental) para os três marcadores de BTB sintetizados.....	86
Tabela 14. RMSD de posições atômicas entre as geometrias otimizadas de BTBCCPh, BTDBrCCPh e BTB(CCPh) ₂ no vácuo e em PCM conforme obtido no nível de teoria CAM-B3LYP / 6-31G (d).....	87
Tabela 15. Comprimentos de onda de absorção eletrônica experimental e teórica para BTDBrCCPh, BTBCCPh e BTB(CCPh) ₂ conforme obtidos a partir de cálculos TD-DFT usando o conjunto de base 6-311 + G (2d, p).....	88
Tabela 16. Comprimento de onda de absorção eletrônica teórica para BTDBrCCPh, BTBCCPh e BTB(CCPh) ₂ conforme obtido a partir de cálculos TD-DFT usando o conjunto de base 6-311+G(2d,p).....	95
Tabela 17. Coeficientes e valores obtidos a partir dos dados do RPE por meio das equações (9), (10) e (11) para os três marcadores.....	97

Lista de Abreviações e Acrônimos

AIEE	Aggregation-Induced Emission Enhancement
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
BTD	2,1,3-benzotiadiazola
ICT	Transferência de Carga Intramolecular (<i>Intramolecular Charge Transfer</i>)
LD	Gota Lipídica (<i>Lipid Droplets</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\lambda_{abs(max)}$ ou λ_{max} (abs)	Comprimento de onda de absorção associada a banda de mais baixa energia
λ_{excit}	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{emis(max)}$ ou λ_{max} (em)	Comprimento de onda de emissão associada a maior intensidade de fluorescência
MDA-MB-231	Células epiteliais de carcinoma ductal da glândula mamária

1. Introdução & Revisão Bibliográfica

As gotas lipídicas são organelas celulares constituídas de um núcleo lipídico neutro contendo principalmente esteróis e triglicerídeos ou triacilgliceróis (TGLs) revestidos por uma única camada de fosfolipídios com algumas classes de proteínas integrais e periféricas (Figura 1).¹⁻⁴

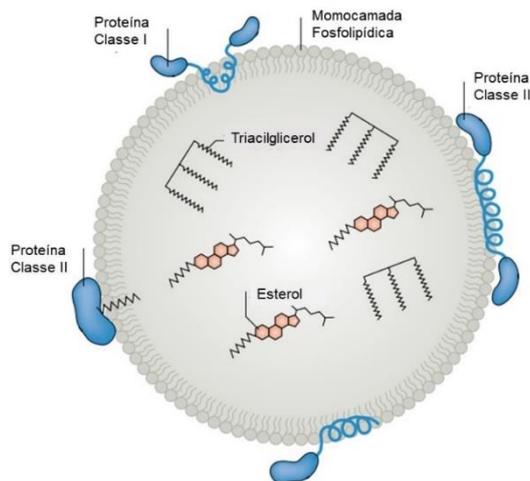


Figura 1. Representação de Gotas Lipídicas em células. Notam-se os fosfolipídios que constituem a monocamada da gota lipídica tem os seus grupos polares orientados para o citosol, enquanto suas cadeias acila entram em contato com o núcleo lipídico neutro hidrofóbico. Associados à monocamada, há uma variedade de proteínas distribuídas em sua superfície, mas ausentes no núcleo hidrofóbico. Adaptado da Referência da 4.

Por muitos anos, as gotas lipídicas foram consideradas somente sítios de transporte de lipídios e simples depósitos de gordura. Apenas recentemente foram demonstrados que estão relacionadas com a regulação do tráfego e metabolismo de lipídios, sinalização e ativação celular, controle de síntese e secreção de mediadores do processo inflamatório.¹⁻⁶ Além disso, foi apontado que a desregulação de suas funções pode levar à morte celular e distúrbios metabólicos como obesidade, doenças do fígado, diabetes e câncer.⁷⁻⁹

Dessa forma, a utilização de métodos apropriados de imageamento celular torna-se importante para eventual caracterização, avaliação de sua abundância relativa, tamanho, distribuição e elucidação de seus papéis fundamentais na saúde e nas doenças humanas.¹

A visualização de gotas lipídicas celulares pode ser realizada por técnicas de imagem sem o uso de etiquetas, tais como a microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de transmissão de luz convencional, microscopia de Raman e microscopia por espalhamento Raman coerente anti-Stokes.^{1,10}

Apesar dessas técnicas permitirem o estudo da biofísica das gotas lipídicas, requerem métodos complexos de preparações de amostras e análise de dados. Além disso, as

metodologias mencionadas geralmente exigem que as células sejam fixadas ou a extração de gotas lipídicas, impedindo a possibilidade de análise da dinâmica em tempo real das gotas lipídicas no ambiente celular.^{1,10}

Como alternativa, o uso da técnica de microscopia de fluorescência através da marcação específica de diferentes organelas celulares com corantes fluorescentes, mostrou-se eficaz no estudo de processos biológicos complexos devido à sua alta sensibilidade com a vantagem de permitir a observação de células vivas.¹

A análise de gotas lipídicas através da microscopia de fluorescência pode ser realizada por meio de dois processos:

- (i) **Imunofluorescência-** consiste em se ligar quimicamente um corante fluorescente a um anticorpo, que atua como uma etiqueta fluorescente. Esse processo permite o acompanhamento do anticorpo marcado por técnicas fluorescentes.¹¹ Para a identificação de gotas lipídicas, utilizam-se proteínas PAT como corante fluorescente, que se ligam covalentemente à proteína perilipina 2 (PLIN2), abundante na camada fosfolipídica (Figura 7). Contudo, o fato desse processo ser utilizado somente em células fixadas, não permite o acompanhamento da dinâmica de gotas lipídicas em tempo real;^{1,12}
- (ii) **Inserção de corantes fluorescentes provenientes de moléculas orgânicas sintéticas,** denominadas sondas fluorescentes ou fluoróforos, como alvos de marcação específica no interior da célula- nesse processo, a organela celular específica é identificada através de interações químicas ditadas pelas diferentes forças intermoleculares entre o fluoróforo e a organela de interesse. Para a identificação de gotas lipídicas, utiliza-se comumente a sonda comercial BODIPY 493/503, que cora o núcleo lipídico neutro das gotas lipídicas com emissão de fluorescência no verde. Essa seletividade é devido ao alto caráter hidrofóbico da sonda que favorece uma maior interação com organelas menos polares no ambiente celular.^{1,12}

Uma vantagem importante da inserção de sondas fluorescentes sobre a imunofluorescência é a capacidade de marcação específica de moléculas e regiões definidas dentro das células vivas.¹

Há, atualmente, uma grande variedade de classes de fluoróforos que se diferenciam pelos grupos substituintes ou pelos núcleos das moléculas que, livres ou conjugados a outros substituintes, produzem bons resultados.¹³ Dentre esses, vários corantes específicos de gotas lipídicas têm sido reportados na literatura, e são comercialmente

utilizados como Nile Red, boro-dipirometanos (BODIPY 493/503 e 505/515), corantes diazo (Sudan III e Oil Red O) e Lipid ToxTM (Thermofisher), como observados na Figura 2.^{1,14}

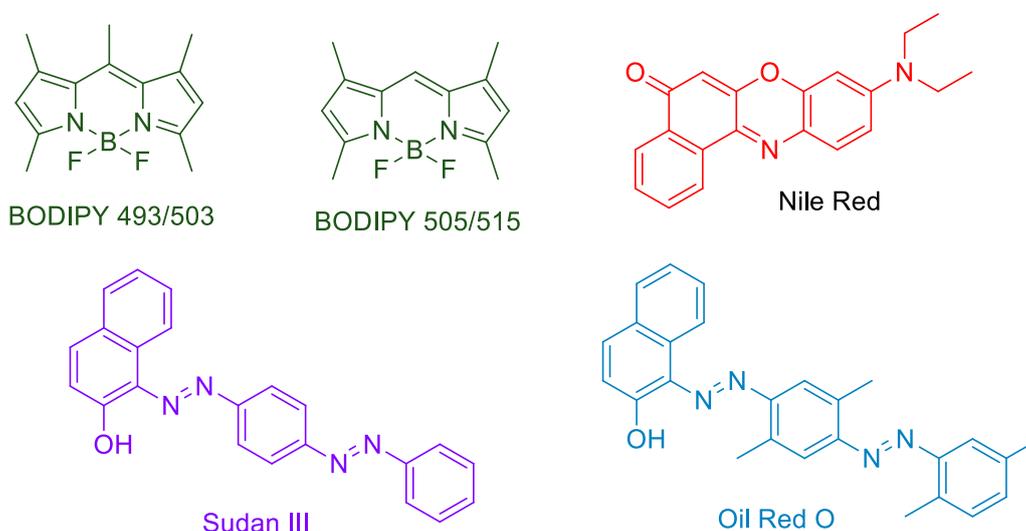


Figura 2. Principais corantes comerciais utilizados para a marcação de gotas de lipídicas. Adaptado da Referência da 1.

Esses corantes convencionais permitiram a elucidação de processos biológicos associados com as gotas lipídicas, como a biossíntese lipídica, bem como a sua associação com o retículo endoplasmático e a comunicação com outros compartimentos celulares.¹

O Nile Red, por exemplo, pôde corar o colesterol no plasma humano, produzindo a marcação de vesículas lipídicas em células do músculo liso e em culturas de macrófagos incubados em baixa densidade.¹⁵ O BODIPY 493/503 foi capaz de detectar gotas lipídicas nucleares e revelou a biogênese das gotas lipídicas em células infectadas por hepatite C.^{16,17}

Todavia, apesar destas contribuições, a presença de outras regiões hidrofóbicas nas membranas e citoplasma das células reduziram a seletividade dessas sondas para as gotas lipídicas, resultando em imagens contendo ruídos. As emissões de fluorescência associada a estas regiões que não são de interesse reduziram a qualidade das imagens adquiridas e interferiram, significativamente, com a precisão que é requerida em análises quantitativas.¹

Outras limitações observadas foram relacionadas às difíceis reações utilizadas nas sínteses dos corantes assim como o controle de algumas de suas propriedades fotofísicas como:^{1,10,13}

- (i) Baixa fotoestabilidade – causa fotodegradação do fluoróforo, sendo um significativo problema no imageamento em células vivas pois a aplicação de

iluminação de alta intensidade pode reduzir a capacidade de um fluoróforo ou torna-la completamente incapaz de fluorescer;

- (ii) Efeito ACQ (*Aggregation Caused Quench*) – o acúmulo contínuo do fluoróforo (agregação) no núcleo hidrofóbico da gota lipídica devido à baixa solubilidade em meios aquosos leva a perda de emissão de fluorescência, comprometendo a qualidade do imageamento celular;
- (iii) Pequenos deslocamentos de Stokes – causa interferência entre a fonte de excitação e a emissão de fluorescência, comprometendo a qualidade das imagens.

Nesse sentido, as pesquisas mais recentes estão voltadas para o aprimoramento da arquitetura molecular de novas sondas fluorescentes focadas nos seguintes aspectos:^{1,10,13,18}

- (i) Síntese utilizando as reações catalisadas por paládio- esses protocolos comumente requerem poucas etapas de síntese e purificação das sondas;
- (ii) Uso de substituintes orgânicos que favoreçam a especificidade para gotas lipídicas; (Figura 3)

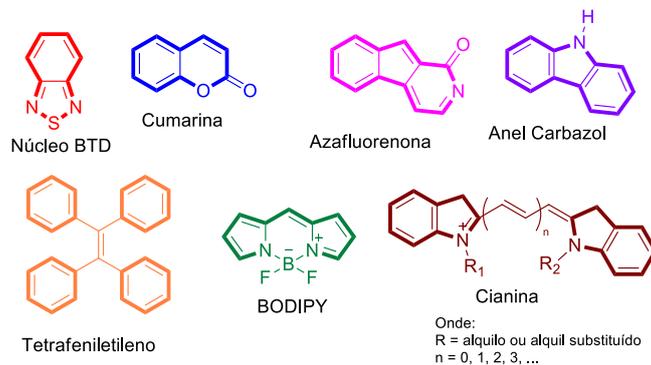


Figura 3. Estruturas de algumas moléculas orgânicas utilizadas na síntese de novas sondas fluorescentes seletivas para LDs. Adaptado das referências 1, 10 e 13.

- (iii) Sondas com altos deslocamentos de Stokes (valores superiores a 50 nm em solventes apolares), fotoestabilidade elevada e forte emissão de fluorescência em meios hidrofóbicos de baixa polaridade, mesmo no estado de agregado;
- (iv) Emissões de fluorescência próximas ao vermelho, os quais resultam em baixos sinais de fundo, eficientes excitações em amostras de tecidos mais espessos e reduzida dispersão de luz em comparação com as sondas que emitem na faixa do azul para o amarelo, tornando-os adequados para geração de imagens *in vivo*.

Com base nessas características, algumas sondas recentemente descritas exibem propriedades fluorescentes (Figura 4) que podem se originar de diferentes mecanismos fotofísicos como ICT (*Intramolecular Charge Transfer*), AIE (*Aggregation-induced emission*) e AIEE (*Aggregation-induced Emission Enhancement*).^{1,10}

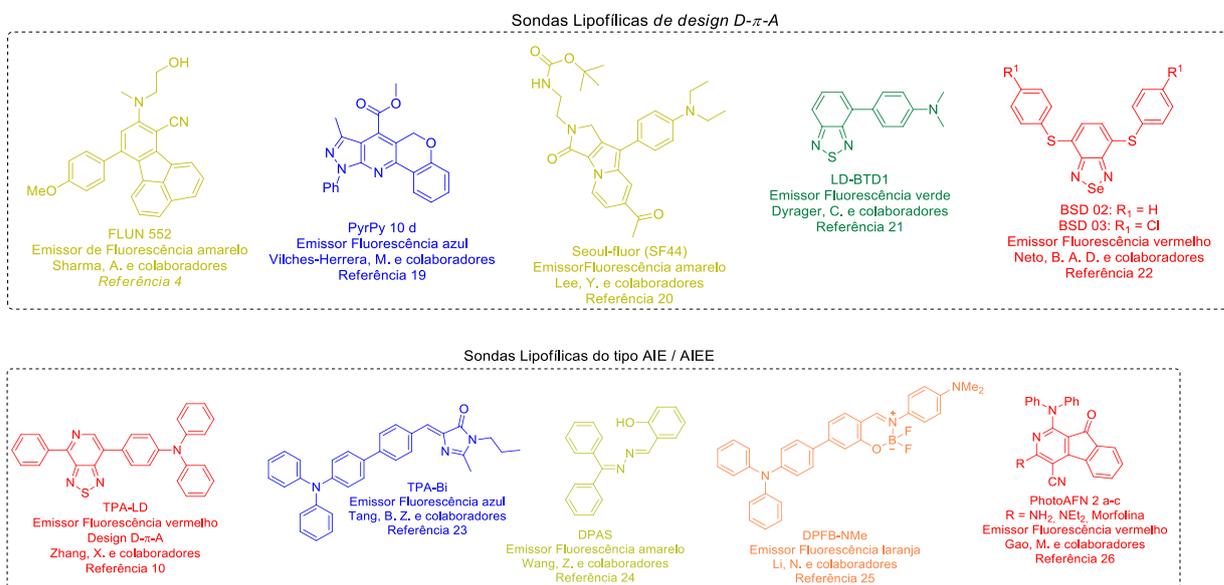


Figura 4. Estruturas de algumas sondas fluorescentes sintetizadas recentemente para marcação de gotas lipídicas com emissões variando do azul ao vermelho.

Nas sondas lipofílicas de design D- π -A, foram observados que o considerável caráter ICT, tornam essas sondas mais fluorescentes em meios menos polares e viscosos. Foram observadas também emissões de fluorescência próximas ou na região do vermelho e altos deslocamentos de Stokes, com valores superiores a 100 nm. A especificidade observada para gotas lipídicas foi devida à utilização de substituintes com maiores interações com ambientes hidrofóbicos.^{1,2,10,18-22}

Os outros dois mecanismos (AIE e AIEE), que serão descritos com mais detalhes no tópico 1.3, utilizaram princípios fotofísicos ativadores de fluorescência.¹ As sondas que apresentaram efeito AIE ou AIEE exibiram excelentes fotoestabilidade, formando nanoagregados hidrofóbicos em meio aquoso mais resistentes à fotodegradação, tornando-as seletivas para a região do núcleo das gotas lipídicas, além do efeito anti-ACQ (*Aggregation Caused Quenching*).^{1,11,23-29}

Portanto, progressos foram feitos no sentido de ampliar a quantidade de sondas fluorescentes provenientes de moléculas orgânicas sintéticas que permitem a visualização e detecção de gotas lipídicas em células, tecidos e animais vivos com poucas limitações em comparação às sondas comerciais.

Nota-se também o potencial das sondas fluorescentes com efeito AIE ou AIEE no imageamento celular. Logo, é importante buscar compreender como sua dinâmica de agregação, quebra, estado excitado e arranjos supramoleculares influenciam no aprimoramento das propriedades fluorescentes e especificidade para o alvo de marcação.

Nos próximos tópicos são abordados os seguintes aspectos importantes para este trabalho: (i) os princípios básicos de fluorescência; (ii) a utilização de marcadores fluorescentes derivados do núcleo 2,1,3 – benzotiadiazola (BTD) no imageamento celular, especificamente na identificação de gotas lipídicas; (iii) a relação entre a formação de agregados e os diferentes efeitos na intensidade de fluorescência e a (iv) a teoria básica da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), que nesse trabalho foi utilizada como ferramenta no estudo da dinâmica do estado excitado das BTDs lipofílicas.

1.1 Imageamento Celular e Princípios básicos de Fluorescência

O imageamento celular é uma das ferramentas mais antigas utilizadas para o estudo das células, sendo fundamental para a investigação na área biológica e ciências biomédicas, por possibilitar a análise de células e tecidos com elevada resolução espacial.³⁰⁻³²

Dentre as técnicas de imageamento celular, destaca-se a microscopia de fluorescência através do uso de substâncias fluorescentes, denominadas fluoróforos ou sondas fluorescentes. Tais compostos são utilizados como marcadores de biomoléculas, organelas celulares, indicadores de íons e substratos enzimáticos, permitindo uma ampla variedade de experimentos bioquímicos e biológicos.³⁰⁻³²

Uma das vantagens da microscopia de fluorescência frente a outras técnicas de imageamento é que pode ser aplicada em amostras vivas, o que possibilita o estudo da dinâmica celular em tempo real.³⁰

Os fluoróforos ou sondas fluorescentes são substâncias que alteram sua emissão de fluorescência em resposta a um evento de ligação, interação, reação química ou mudança imediata em seu ambiente. A estrutura de uma sonda pode ser modificada para controlar os comprimentos de onda de excitação e emissão, afinidade de ligação ao alvo, reatividade química e localização sub celular.^{13,33,34}

As principais modificações estão relacionadas ao uso da síntese orgânica para o preparo de moléculas com propriedades personalizadas para uma aplicação específica.⁷ Essa capacidade de regular a fluorescência das moléculas forma a base de um grande número de sondas fluorogênicas úteis (Figura 5).^{13,34}

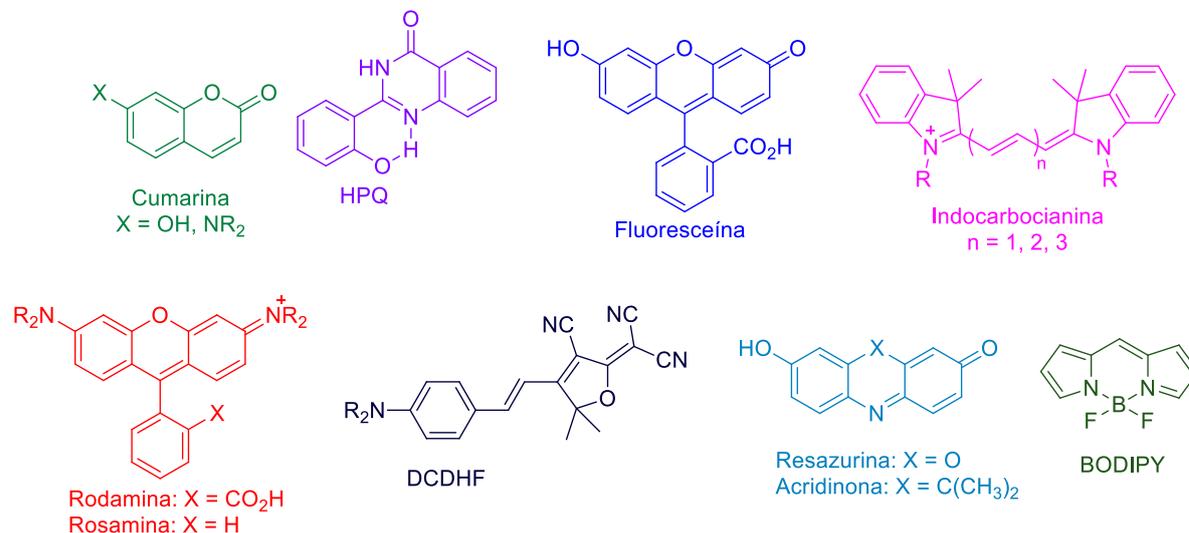


Figura 5. Estruturas de alguns fluoróforos orgânicos aplicadas no imageamento celular. Adaptado da referência 13.

A fotofísica é o ramo da Ciência que estuda os efeitos e mecanismos envolvidos no processo de excitação e desativação de moléculas fluorescentes, os fluoróforos. Grande parte do entendimento dessa área é baseado na interação da luz com a matéria. Para compreender a eficácia da utilização dessas moléculas, é preciso primeiramente estudar os processos fotofísicos envolvidos após a absorção de luz e suas consequências.³⁵⁻³⁷

A luminescência, observada nos fluoróforos, consiste em fenômenos que envolvem a absorção de energia e posterior emissão de radiação luminosa, geralmente na faixa UV-vis do espectro eletromagnético.^{32, 35-37}

Após a incidência de radiação luminosa nessas moléculas, ocorre o processo de excitação eletrônica. A energia absorvida nesse processo pode ser dissipada por duas vias: (i) radiativa, cuja energia é emitida em forma de luz através do processo de fluorescência ou fosforescência; e (ii) não-radiativa, em que a energia absorvida pode ser convertida em reação química ou liberada na forma de calor.^{30, 35-37}

As transições radiativas e não-radiativas que ocorrem após a absorção de energia são comumente ilustradas por um diagrama de nível de energia chamado Diagrama de Jablonski, Figura 6. Esse diagrama explica o mecanismo de absorção e emissão de luz na maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos luminescentes.³⁸

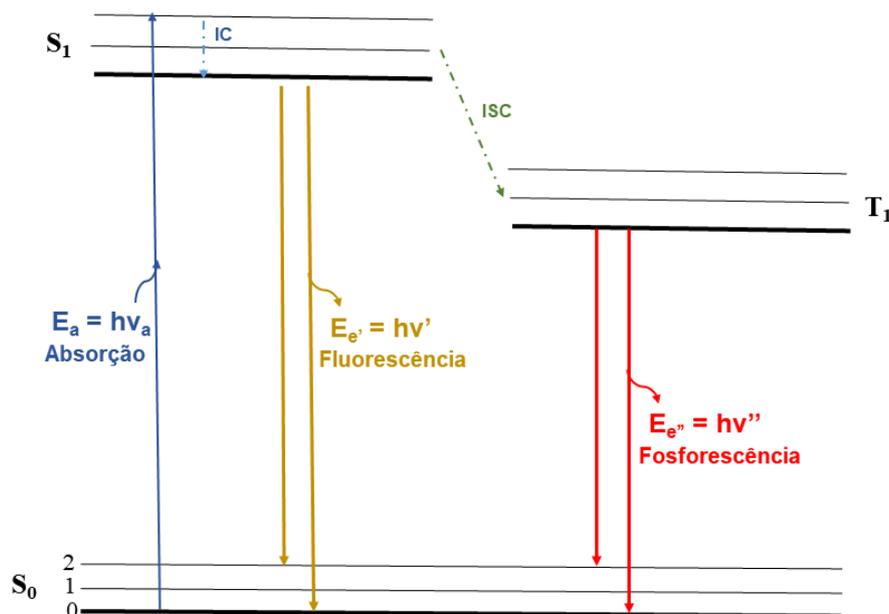


Figura 6. Diagrama de Jablonski simplificado. Onde: Processos radiativos e não-radiativos são representados como linhas sólidas e tracejadas, respectivamente. Os estados singletos são representados por S, sendo S₀ = estado fundamental e S₁ = primeiro estado excitado singlete. Os estados tripletos são representados por T em que T₁ = primeiro estado excitado tripleto. IC = cruzamento interno e ISC = Cruzamento Intersistemas. E_a = energia de absorção; E_e = energia de emissão de fluorescência e E_{e''} = energia de emissão de fosforescência; h = constante de Plank; ν = frequência. Níveis vibracionais (subníveis de energia) = 0, 1 e 2. Adaptado da referência 38.

Quando a molécula absorve a luz, um elétron é promovido do estado eletrônico fundamental (S₀) para o estado excitado (S₁). A molécula excitada é energeticamente instável em relação ao estado fundamental, de modo que se não ocorrer rearranjo ou fragmentação, esta buscará perder energia para retornar ao estado fundamental através dos processos físicos anteriormente citados (vias radiativas e/ou não-radiativas).^{34,37}

Nos processos radiativos, parte da energia absorvida na excitação eletrônica (S₀→S₁) é emitida em forma de luz através do processo de fluorescência ou fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. No estado singlete excitado (S₁), o elétron envolvido na transição S₀→S₁ preserva a multiplicidade do spin que tinha no estado fundamental (S₀). Assim o processo de retorno do elétron ao estado fundamental (S₁→S₀) tende a ocorrer muito rapidamente com tempo de vida tipicamente menores que 10⁻⁶ s. Esse processo é denominado de fluorescência.³⁸

Já o fenômeno fosforescência (T₁ → S₀) pode ocorrer caso o estado excitado tripleto (T₁) seja alcançado através do Cruzamento Intersistemas (ISC) (S₁ → T₁), com inversão do spin do elétron. Isto leva a transições com velocidades menores (10³ a 10⁰ s⁻¹), com o tempo de vida médio dos estados excitados variando normalmente de 10⁻⁶ a vários segundos.^{38,39}

As transições não-radiativas envolvem a conversão de um estado eletrônico para outro com ausência de emissão de radiação eletromagnética. Apesar de todas as transições que não geram emissão de luz serem consideradas não-radiativas, esse termo aplica-se preferencialmente em transições intramoleculares, que de acordo com a multiplicidade de spin dos estados participantes, podem ser identificados como conversão interna (IC) e o cruzamento intersistemas (ISC).³⁸

A conversão interna consiste na dissipação mecânica de energia entre os níveis vibracionais (subníveis de energia 0, 1 e 2), envolvendo a transferência de elétrons entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin em S_1 ou T_1 . Já no cruzamento intersistemas, a redução de energia ocorre pela inversão de spins dos elétrons entre estados de diferentes multiplicidades de spin ($S_1 \rightarrow T_1$).^{34,36,38}

Para os compostos luminescentes, o mecanismo de dissipação de energia por vias radiativas prevalece em relação aos processos não-radiativos. Levando em conta as sondas fluorescentes, quando ocorre absorção de energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado de maior energia (HOMO) ou orbitais moleculares ligantes (σ e π) ou não-ligantes (n) para um orbital desocupado de menor energia (LUMO) ou orbitais moleculares anti-ligantes (σ^* e π^*). A Figura 7 ilustra uma progressão típica de níveis de energia eletrônicos.³⁶

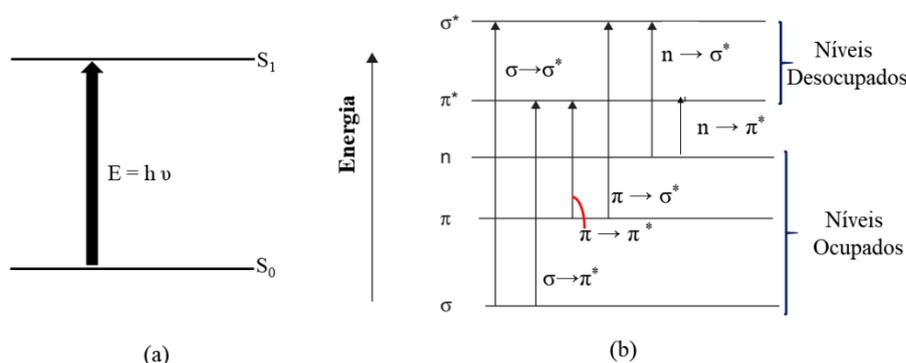


Figura 7. (a) Processo de excitação eletrônica e (b) Esquema geral de níveis de energia eletrônica e transições de uma molécula orgânica. Onde: S_0 = estado fundamental; S_1 = estado excitado singlete de maior energia; T_1 = estado excitado tripleto de maior energia. Adaptado da referência 36.

A Figura acima mostra que existem, em princípio, seis tipos de transições eletrônicas, designadas $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$. Das transições eletrônicas possíveis, aquelas mais importantes na fotofísica orgânica molecular são as transições singlete ($S_0 \rightarrow S_1$) de caráter $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, que produzem estados eletronicamente excitados, de mais baixas energias respectivamente, o que favorece a emissão de fluorescência.³⁶

Nesse sentido, as principais características requeridas na estrutura de um fluoróforo são:³⁷ (i) rigidez estrutural; (ii) planaridade; (iii) ligações π -conjugadas; (iv) grupos funcionais aromáticos e comumente (iv) anéis condensados. Na Figura 5, foram ilustradas estruturas de alguns fluoróforos orgânicos empregados no imageamento celular que possuem as características desejáveis para a dissipação de energia via emissão por fluorescência.

Considerando que um dos focos dessa pesquisa será o entendimento dos mecanismos que resultam na emissão por fluorescência, bem como as propriedades fotofísicas de determinados compostos, é importante a compreensão de uma série de características gerais relacionadas ao fenômeno de fluorescência: (i) deslocamento de Stokes; (ii) coeficiente de extinção molar (ϵ); (iii) Transferência Intramolecular de Carga (ICT), (iv) rendimento quântico de fluorescência (Φ) e (v) fotoestabilidade.

Observa-se, a partir da análise do diagrama de Jablonski (Figura 6), que a energia da emissão geralmente é menor do que a da absorção. Dessa forma, a emissão de fluorescência, normalmente, ocorre em energias mais baixas ou maiores comprimentos de onda.^{36,37}

Este fenômeno foi observado pela primeira vez pelo físico irlandês G. G. Stokes, em 1852, na Universidade de Cambridge, ao estudar a primeira molécula relatada como fluorescente, o sulfato de quinina.^{37,40} Suas conclusões resultaram no que é conhecido atualmente como Lei de Stokes, que estabelece que um comprimento de onda de emissão fluorescente é maior que o comprimento de onda de excitação. Em sua homenagem, a diferença, em unidades de λ , entre os picos de emissão e de excitação de uma molécula fluorescente recebeu o nome de deslocamento de Stokes, Figura 8.³⁷

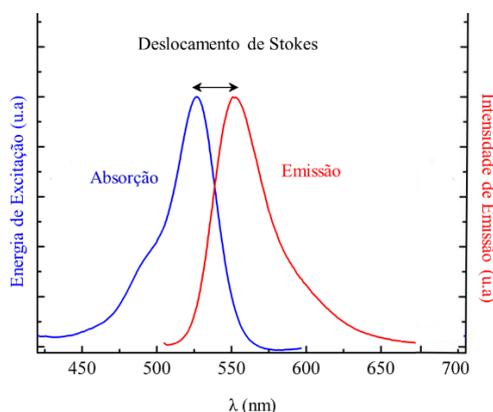


Figura 8. Representação do Deslocamento de Stokes. Adaptado das referências 37 e 38.

Essa propriedade fotofísica é muito importante na utilização de sondas fluorescentes no imageamento celular. Fluoróforos que exibem um grande deslocamento de Stokes (\geq

90 nm) são vantajosos, porque os comprimentos de onda de excitação e emissão são mais fáceis de serem isolados usando filtros de interferência no microscópio de fluorescência.^{33,34,41,42}

Para os fluoróforos com um pequeno deslocamento de Stokes (≤ 50 nm), a banda de excitação começa a se sobrepor à banda de emissão, resultando em imagens com altos níveis de ruídos e artefatos de fundo. Para minimizar esses efeitos, as amostras são excitadas em comprimentos de ondas menores que os comprimentos máximos de excitação, o que reduz a intensidade de emissão do fluoróforo.³⁴

O coeficiente de extinção molar ou absortividade molar (ϵ) é uma medida do potencial de absorção de luz pelo fluoróforo,⁴¹ sendo utilizada para determinar a natureza da transição $S_0 \rightarrow S_1$ ($n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$). Absorções relativamente fortes com valores ϵ_{max} de $\sim 10^3$ a $\sim 10^5$ mol⁻¹.cm⁻¹ são associadas a emissões de fluorescências com transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, além de ser um indicativo inicial da estabilização da molécula no estado excitado através da transferência intramolecular de carga.^{36,43}

O rendimento quântico (Φ) é definido como a razão do número de fótons emitidos sobre o número de fótons absorvidos. Logo, quanto menor for a taxa de emissão não-radiativa, maior o valor do rendimento quântico, que varia de $0 \leq \Phi \leq 1$. No entanto, o rendimento quântico é sempre menor que 1 devido à perda de energia interna via processos não-radiativos.³⁷

Experimentalmente, o rendimento quântico de fluorescência (ϕ) é determinado a partir do rendimento quântico relativo pelos métodos comparativos, através da comparação com uma molécula fluorescente de referência que tenha as propriedades fotofísicas previamente determinadas com os mesmos parâmetros experimentais da molécula em questão.^{37,44-47}

Outra propriedade fotofísica relevante de um fluoróforo é a sua fotoestabilidade, especialmente os que são utilizados no imageamento de células vivas. A aplicação de iluminações de alta intensidade pode reduzir a capacidade de uma sonda fluorescente ou torná-la completamente incapaz de fluorescer devido ao processo de fotodegradação da sonda, prejudicando a qualidade das imagens.^{10,33,37}

Esse processo de fotodegradação é atribuído à exposição contínua da sonda ao feixe de luz da fonte de excitação. Alguns dos fluoróforos apresentados na Figura 1 sofrem desse problema.^{48,49} Nesse âmbito, para determinar a estabilidade dos fluoróforos à exposição contínua de luz ultravioleta, é realizado o teste de fotoestabilidade, geralmente no fluorímetro.³¹

Uma classe de fluoróforos, de arquitetura molecular D-A e/ou D- π -A (D = ao substituinte orgânico doador de densidade eletrônica, A = substituinte orgânico aceptor de densidade eletrônica e π = espaçador conjugado), tem sido bastante requeridos para o imageamento celular, por apresentarem deslocamentos de Stokes superiores a 100 nm e emissões de fluorescência deslocadas para a região do vermelho, o que leva a menores relações *senal-ruído* das imagens.^{34,37,50}

O mecanismo que resulta na emissão de fluorescência nesses tipos de fluoróforos, envolve a estabilização do estado excitado através da Transferência Intramolecular de Carga (ICT). Basicamente, sua estrutura molecular é constituída de um grupo doador de elétrons (D) ligado covalentemente a um grupo aceptor de elétrons (A).^{18,34,50,51}

Nesses fluoróforos, as transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_1$ estão associadas a uma separação de cargas entre os grupos doadores (D) e aceptores (A), denominado de processo ICT. Esse processo leva à estabilização de energia do estado excitado S_1 , além da diminuição do momento de dipolo (μ_e) do fluoróforo (Figura 9). Então a emissão de fluorescência em comprimentos de onda menos energéticos é alcançada.^{35,37,50}

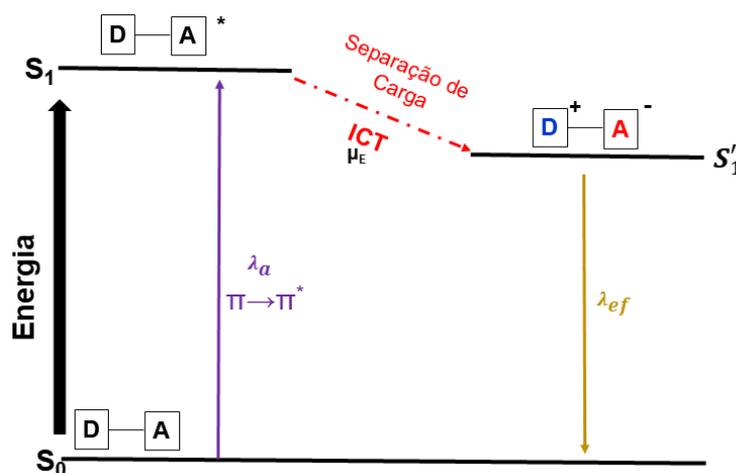


Figura 9. Adaptação do diagrama de Jablonski demonstrando a estabilização do estado excitado através do processo ICT para fluoróforos de arquitetura D-A e D- π -A. Onde: D = grupo doador de elétrons e A = grupo aceptor de elétrons do fluoróforo; λ_a = comprimento de onda de absorção; λ_{ef} = comprimento de onda de emissão de fluorescência; S_0 = estado fundamental; S_1 e S_1' = estados excitados singletos de maior energia com $S_1 > S_1'$. Adaptado das referências 37 e 50.

Foram demonstrados, por meio de cálculos teóricos, que a separação de cargas no fluoróforo ocorre devido à passagem de um elétron de um orbital molecular ligante π (HOMO) de um grupo doador (por exemplo, $-\text{NH}_2$, $-\text{NMe}_2$, $-\text{Ph}$, $-\text{CH}_3\text{O}$) para um orbital molecular anti-ligante desocupado π^* (LUMO) de um grupo aceptor de elétrons (por exemplo, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{CN}$, núcleo BTB) por ter níveis de energia mais próximos (Figura 10).^{50,51}

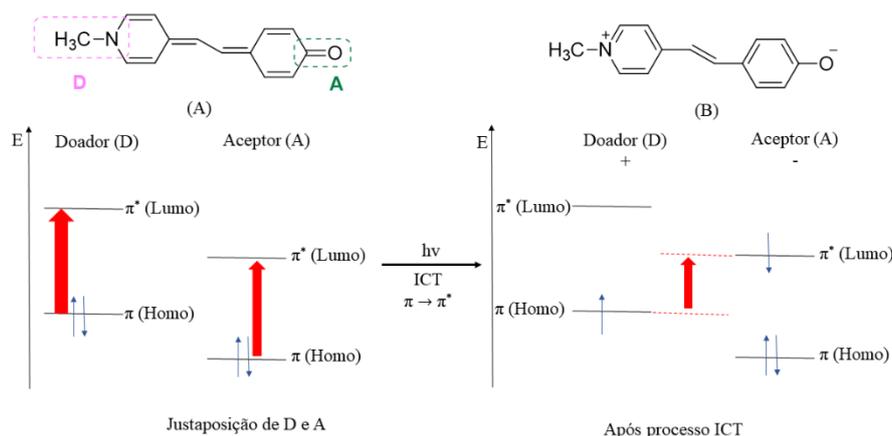


Figura 10. Diagrama de Energia durante a transferência intramolecular de carga (ICT) do grupo doador (D) para o grupo aceptor (A) do composto fluorescente merocianina de Brooker. Adaptado da referência 51.

A posição e a intensidade das bandas de emissão de fluorescência dependem do grau de interação entre os grupos doador (D) e aceptor (A). Esses, por sua vez, dependem de vários fatores, como a distância que separa os grupos D e A, sua orientação mútua, a natureza da ligação covalente e os padrões de substituintes.⁵¹

Com base nesses fatores, alguns desses fluoróforos apresentam em sua estrutura molecular espaçadores π C \equiv C ou C=C, que interligam o grupo doador (D) ao grupo aceptor de elétrons (A), denominados de sistemas D- π -A.^{51,52}

Os sistemas D- π -A podem ser classificados em diferentes famílias. Uma classe dessas moléculas é conhecida por apresentar fluorescência dupla dependente de solvente. A fotofísica de tais moléculas depende da estrutura eletrônica e da conformação dos fragmentos D e A nos estados excitados e dos fatores intramoleculares e ambientais que controlam a cinética e a dinâmica da passagem dos elétrons.⁵¹

Em sistemas D- π -A maiores, especificamente os que utilizam espaçadores π C=C, a fotofísica depende do ângulo de torção entre os planos das subunidades D e A.^{25,26} Os espaçadores π C \equiv C, por outro lado, provavelmente contribui para a maior planaridade e rigidez das estruturas moleculares, levando ao aprimoramento do processo ICT, devido à redução dos movimentos de torções das estruturas moleculares após as transições $S_0 \rightarrow S_1$.⁵²⁻⁵⁴

1.2 Sondas fluorescentes derivadas do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola

Várias moléculas orgânicas foram estudadas e utilizadas comercialmente (Figuras 2 e 5), com algumas modificações estruturais, como sondas fluorescentes na marcação celular. Entretanto, esses fluoróforos apresentam algumas limitações para aplicações biológicas que vão desde baixa especificidade e fotoestabilidade, *photobleaching* (perda de emissão de luz), à pequenos deslocamentos de Stokes, o que leva a necessidade de desenvolvimento de novos núcleos fluorescentes para a marcação celular.^{1,13,34}

Recentemente, vários derivados provenientes de moléculas orgânicas heterocíclicas foram sintetizados, exibindo propriedades fotofísicas requeridas para a aplicação como sondas fluorescentes no imageamento celular.^{1,55,56} Dentre esses heterocíclicos, destaca-se o núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) (Figura 11).^{55,56}

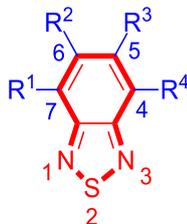


Figura 11. Ilustração da estrutura básica do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) encontrada em alguns derivados fluorescentes aplicados em imageamento celular. Observe que R^2 e R^3 geralmente são átomos de H e que R^1 e R^4 são comumente grupos usados como extensores π conjugados. Adaptado da Referência da 56.

O núcleo BTD é um sistema heterocíclico insaturado com ligações π conjugadas deslocalizadas, constituído de um anel aromático fundido a um anel tiadiazol, cuja configuração assemelha-se à anéis quinoidais (Figura 12).⁵⁵ Os quinoides são moléculas orgânicas de estruturas cíclicas com ligações duplas conjugadas, contendo também duas ligações duplas exocíclicas nas posições *orto*- ou *para*- do anel.⁵⁷

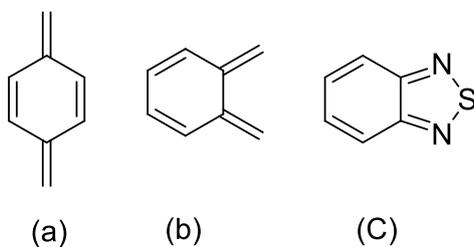


Figura 12. Estruturas quinoidais (a) *para*-; (b) *orto*- e (c) forma quinoidal do núcleo BTD. Adaptado da Referência 55.

Foram demonstrados, por meio de cálculos de energia de *band gap* (diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO), que as formas mesoméricas aromática vs. quinoide (Figura 13) não são energeticamente equivalentes, apesar de serem próximas. Foram verificados, que na maioria dos casos, a configuração quinoide apresenta energia de *band gap* menor que a sua forma aromática correspondente.^{55,58}

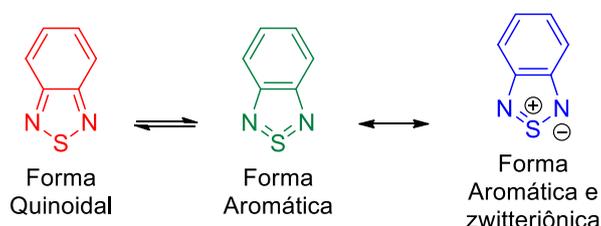


Figura 13. Formas mesoméricas do núcleo BTB. Adaptado da referência 55.

A preferência do núcleo BTB por uma configuração quinoidal (Figuras 12 e 13), em que se tem a deslocalização das ligações π , causa drásticos deslocamentos nos comprimentos de onda de absorção e emissão desses compostos na região UV-vis do espectro eletromagnético. Por essa razão esse núcleo é utilizado na síntese de fluoróforos com cores intensas, aplicados em diversas áreas da luminescência, dentre essas, no imageamento celular.^{55,56}

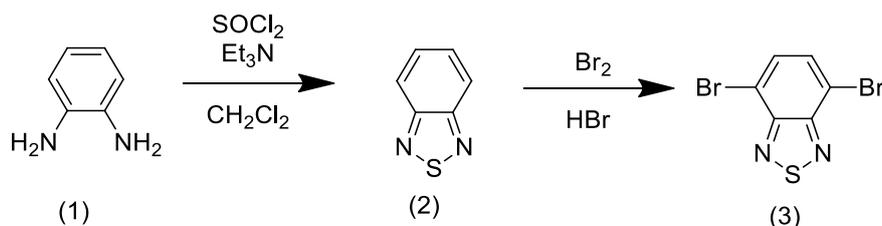
Outra característica importante está relacionada com a sua alta polarização no sentido do anel tiadiazol que resulta nas seguintes características: (i) núcleo fortemente aceptor (A) de elétrons, tornando-o apto para a síntese de fluoróforos de arquitetura D-A, D- π -A e análogos; e (ii) tendência em formar estruturas cristalinas bem ordenadas, promovida por uma alta organização intermolecular através de interações entre os heteroátomos presentes nas estruturas. Essa organização favorece as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, característica altamente desejável para os processos de fluorescência; e (ii)^{55,56}

Os aspectos que tornam os derivados desse núcleo aptos para aplicações como sondas fluorescentes no imageamento celular são: (i) elevados deslocamentos de Stokes; (ii) elevada fotoestabilidade; (iii) boa relação sinal-ruído; (iv) capacidade de transpor a membrana celular, com exceção dos marcadores de membrana celular; e (v) armazenamento por longos períodos de tempo a temperatura ambiente sem degradarem.^{55,56}

Os derivados do núcleo BTB são excitados em comprimentos de onda localizados no espectro do visível, o que possibilita a utilização do laser em níveis mínimos, evitando o aumento da temperatura nos materiais em estudo, alterações morfológicas e o estresse oxidativo do sistema biológico. Além de possibilitar a obtenção de imagens de alta

qualidade, uma vez que a autofluorescência do material em estudo pode ser facilmente evitada.⁵⁶

A síntese de novos derivados fluorescentes com substituição de extensão π nas posições 4 e 7 do núcleo BTB geralmente envolve o intermediário 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (BTB-Br₂), cujo processo de obtenção envolve três etapas de reações (Esquema 1).⁵⁵



Esquema 1. Síntese do composto 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola. Adaptado da referência 55.

Na primeira etapa, o composto o-fenilenediamina (1) foi tratado com cloreto de tiolina (SOCl₂) na presença de trietilamina (Et₃N) em um solvente apropriado para a obtenção do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (2). A partir desta reação, o composto (2) reagiu com bromo molecular (Br₂) em ácido bromídrico (HBr), obtendo-se o composto BTB-Br₂ (3). (Esquema 1).⁵⁵

As moléculas orgânicas luminescentes de sistemas D- π -A derivados do núcleo BTB tem sido sintetizadas devido às excelentes propriedades fotoluminescentes, como emissões de fluorescência próximos ou na região do vermelho, altos deslocamentos de Stokes e rendimentos quânticos.^{50,52,53,59,60}

Os cálculos teóricos e experimentos fotofísicos realizados com alguns desses derivados demonstraram que o forte caráter aceptor de elétrons do núcleo BTB favorece o processo ICT.^{50-54,63-69} Dessa forma, moléculas com esse design (Figura 14) têm sido aplicadas em várias áreas da luminescência, dentre essas, líquidos cristalinos luminescentes,^{60,61} diodos orgânicos emissores de luz (OLEDs)⁶⁵ e imageamento pela técnica de microscopia de fluorescência.^{53,66}

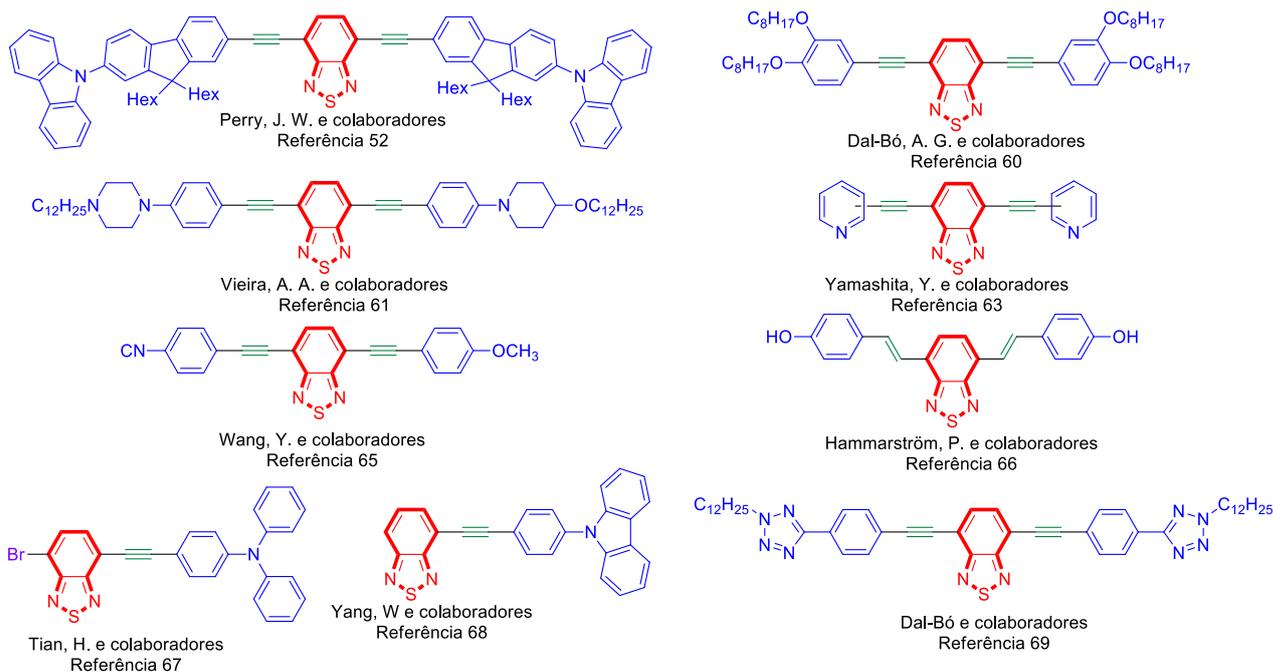


Figura 14. Alguns derivados push-pull de sistemas D- π -A e análogos do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD).

Com relação às aplicações na área de biologia molecular, em 2010, Neto e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, a utilização de uma molécula orgânica derivada do núcleo BTD (Figura 15), na detecção de DNA pela titulação espectrofluorimétrica.⁷⁰⁻⁷²

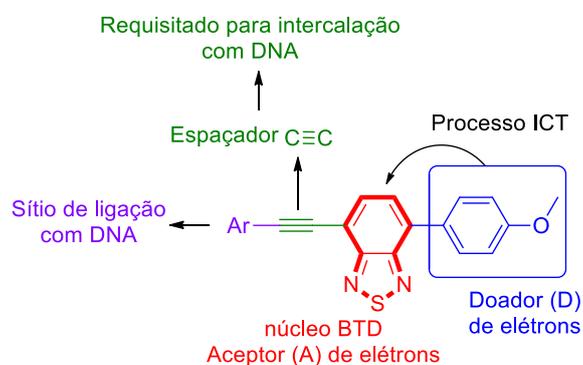


Figura 15. Arquitetura proposta para a marcação de estruturas de DNA, onde Ar = 2Py, 3Py ou Ph. Adaptado da Referência 70.

Essa pesquisa comprovou a capacidade que as BTDs têm em interagir e marcar seletivamente uma organela. Desde então, surgiram outros trabalhos nos quais são apresentadas diversas sondas fluorescentes derivadas desse núcleo aplicadas no imageamento celular, que têm capacidade de transpor a membrana celular e marcar seletivamente organelas como: (i) mitocôndrias,⁷³⁻⁷⁸ (ii) DNA nuclear,⁷⁹ (iii) etiquetas fluorescentes,⁸⁰ (iv) membrana plasmática,⁸¹ (v) detecção de células tumorais⁸²⁻⁸⁶ e (vi) proteínas.⁸⁷⁻⁹² Alguns desses derivados estão ilustrados na Figura 16.

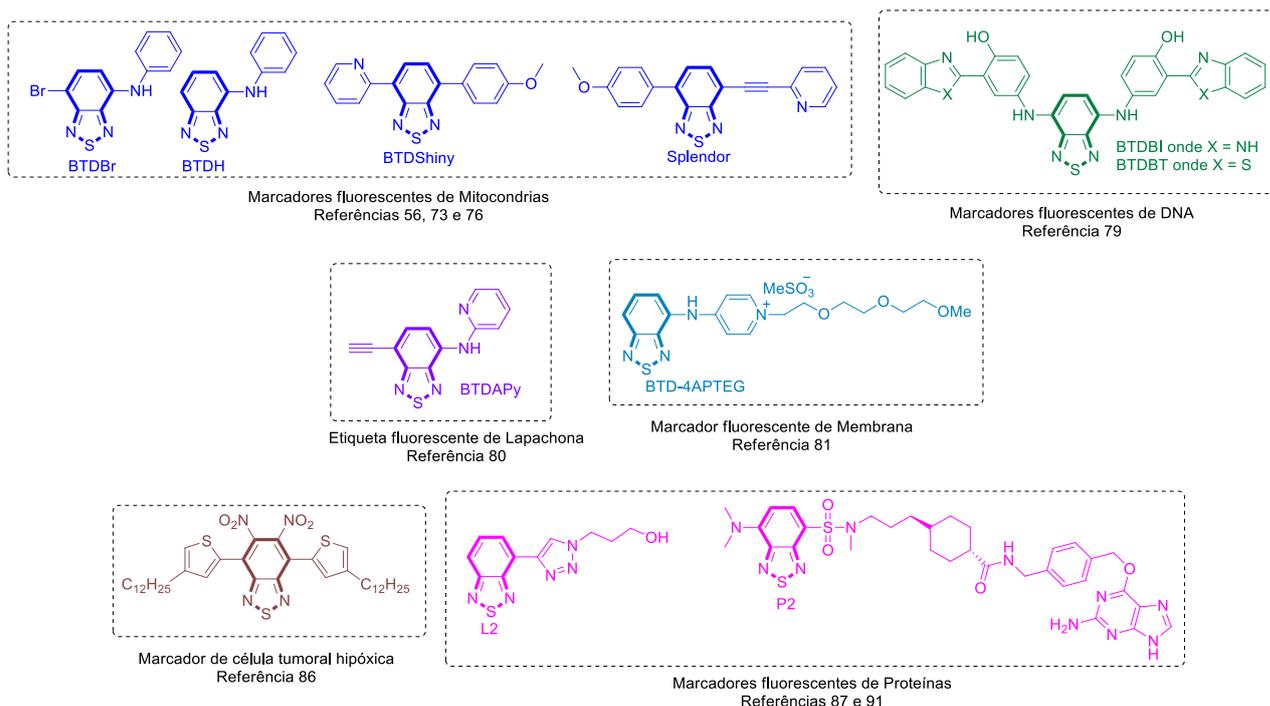


Figura 16. Derivados de BTDs fluorescentes sintetizadas para marcação de diferentes organelas celulares.

Com relação ao imageamento de estruturas lipídicas, foram publicados, nos últimos seis anos, pesquisas nas quais são descritas algumas sondas fluorescentes derivadas do núcleo BTD para essa finalidade (Figura 17).

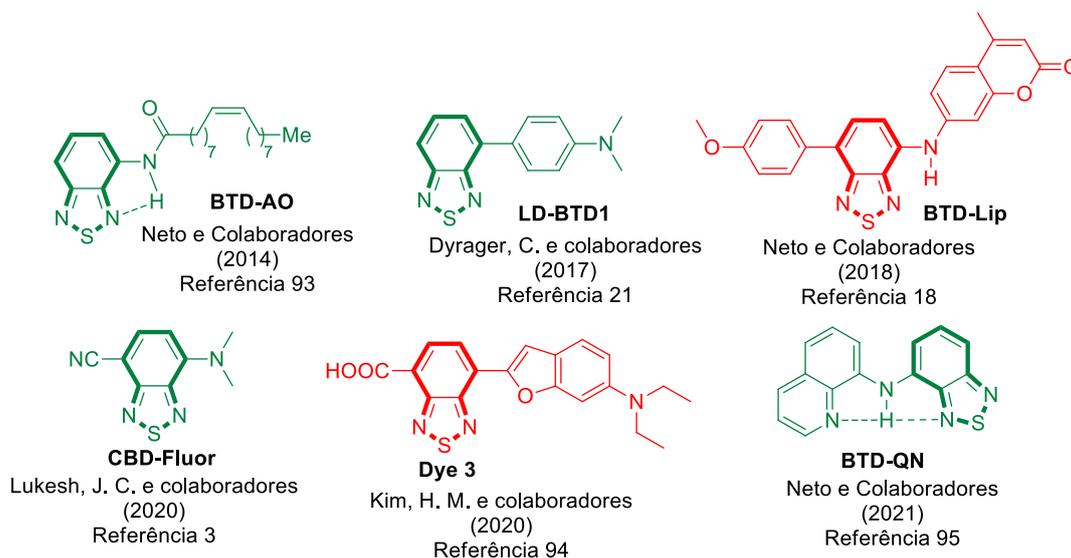


Figura 17. Sondas fluorescentes derivadas de BTD seletivas para estruturas lipídicas com emissões de fluorescência no verde e vermelho.

De um modo geral, as sondas lipofílicas descritas por diferentes grupos de pesquisa, com exceção da BTD-AO e BTD-QN, foram caracterizadas como fluoróforos de arquitetura D- π -A, cujos mecanismos de emissão de fluorescência são baseados na estabilização do estado excitado através do processo ICT. Com relação ao imageamento

de gotas lipídicas, mostraram-se seletivos tanto em células vivas quanto fixadas, com altos deslocamentos de Stokes, boa fotoestabilidade e emissões de fluorescência variando do verde ao vermelho.^{1,3,21,93,94}

Ressalta-se, que a sonda lipofílica BTD-AO, devido a sua similaridade estrutural com ácido oleico, permitiu uma nova abordagem para estudar a absorção e dinâmica de ácidos graxos (e derivados) em células vivas, especialmente em baixas temperaturas (4 °C), em que todas as vias endocíticas (processos passivos de tráfego de membrana) são completamente inibidas. A sonda provou ser mais fortemente associada à proteína de ligação de ácido graxo (FABP) ou albumina do que ao ácido oleico natural por causa de interações de ligação H adicionais.^{56,93}

As sondas BTD-Lip e BTD-QN, mostraram-se seletivas para gotas lipídicas dentro de um sistema vivo complexo (verme *Caenorhabditis elegans*), ao contrário do marcador comercial BODIPY. Foi possível também a aplicação do marcador BTD-QN em experimentos usando camundongos alimentados com alto teor de gordura, o que permitiu uma reconstrução de imagem 3D de alta resolução.^{1,18,95}

Contudo, com relação a sondas lipofílicas derivadas de BTD, não houve relatos de estudos teóricos e/ou experimentais relacionada ao comportamento fluorescente desses marcadores no estado agregado. Não foram encontrados também sondas lipofílicas derivadas de BTD anti-ACQ (tipo AIE ou AIEE).

1.3 Agregação e Luminescência

Os compostos orgânicos luminescentes no estado agregado podem experimentar efeitos de extinção, redução ou aumento na intensidade de fluorescência. O processo de agregação em solução ocorre quando as moléculas estão próximas umas das outras, podendo ser observados em compostos que apresentam hidrocarbonetos aromáticos em suas estruturas. Dentre as principais causas para a formação de agregados estão à atração eletrostática, ligação de hidrogênio, mudança de solubilidade e efeito hidrofóbico.⁹⁶⁻⁹⁹

A emissão de luz dos fluoróforos convencionais (Figura 5) são frequentemente extintas em altas concentrações ou no estado agregado devido ao efeito de Extinção Causada por Agregação (ACQ – *Aggregation Caused Quenching*), documentado pela primeira vez por Förster em 1954.^{96,98,99}

Um exemplo de efeito ACQ é apresentado na Figura 18. A solução diluída de DDPD em THF é altamente luminescente. Sua emissão diminui com o aumento do percentual de água em THF, devido a sua imiscibilidade em água. Quando o percentual de água é superior a 60%, as moléculas de DDPD começam a se agregarem e, como resultado, a emissão de luz é completamente extinta.^{96,97}

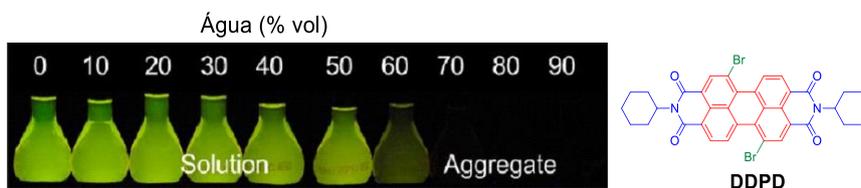


Figura 18. Variação na emissão de fluorescência causada pelo efeito ACQ do composto DDPD (10 μM), derivado do perileno, em misturas de THF-água com diferentes percentuais de água sob iluminação de luz UV. Nota-se que em maiores percentuais de água há formação de agregados do composto devido ao caráter hidrofóbico. Adaptado da Referência 97.

A molécula DDPD contém um núcleo de perileno semelhante a um disco. À medida que aumenta o grau de imiscibilidade de DDPD em água, há aumento na concentração de DDPD. Ao formarem agregados, os anéis de perileno passam a experimentar fortes interações intermoleculares de empilhamento π - π (Figura 19), levando à formação de espécies prejudiciais a fluorescência, os excímeros.⁹⁶⁻⁹⁹

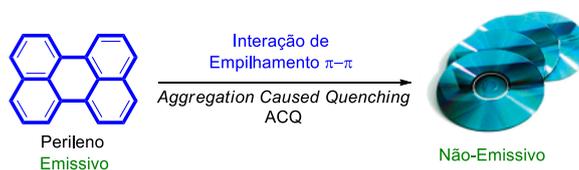


Figura 19. Agregados do tipo disco não-emissivos de fluoróforos aromáticos como o perileno resultante da interação de empilhamento π - π . Adaptado da Referência 98.

Os estados excitados de tais agregados geralmente decaem ou relaxam de volta ao estado fundamental por meio de emissões não radiativas, resultando no efeito ACQ.⁹⁶⁻⁹⁹

O efeito ACQ comprometeu a efetividade da marcação celular pelos fluoróforos. Mesmo em soluções diluídas, ainda é possível observar o efeito ACQ, pois as sondas fluorescentes tendem a se acumular nas superfícies das organelas ou se agruparem em suas cavidades hidrofóbicas, formando agregados com estruturas de empilhamento π - π . Como exemplo, o contínuo acúmulo das sondas fluorescentes lipofílicas nas gotas lipídicas leva à perda de emissão de fluorescência decorrente da agregação.^{1,97,100}

Em 2001, Tang e colaboradores¹⁰¹ observaram que compostos orgânicos derivados de silício, não-emissivos em soluções diluídas, são induzidos a emitirem fluorescência

pela formação de agregados (Figura 20). Esse comportamento foi denominado de Emissão Induzida por Agregação (AIE -*Aggregation-Induced Emission*) ou efeito AIE.^{99,101}

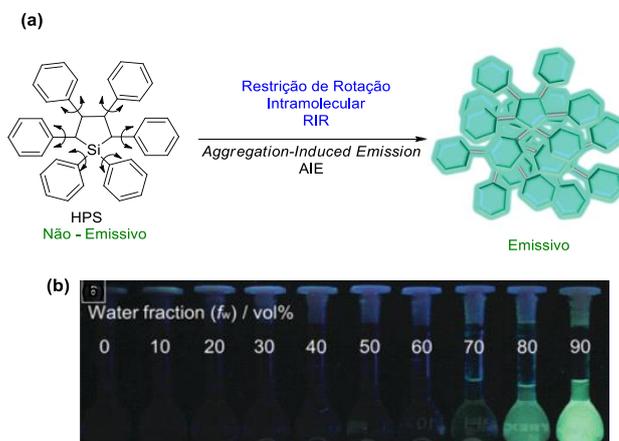


Figura 20. (a) Molécula de HPS em forma de hélice é não-emissiva em solução, mas torna-se altamente emissiva após a agregação em soluções mais concentradas, devido à restrição da rotação intramolecular (RIR) dos grupos fenil resultante do efeito AIE; (b) HPS (10 μM) em misturas de THF-água em diferentes frações de água (f_w). Adaptado da Referência 99.

Verificou-se que as unidades rotativas (grupos Ph) das estruturas do HPS são capazes de girar em soluções diluídas e, portanto, uma via não-emissiva é o processo de relaxação preferencial.^{99,101} Por outro lado, em soluções concentradas, quando a agregação ocorre, esses movimentos moleculares são bloqueados devido à restrição de rotação intramolecular (RIR) e a emissão por via radioativa é favorecida.^{8,11,97-99,102-114}

Em 2002, Parker e colaboradores,^{115,116} a partir do estudo das propriedades fotofísicas de nanopartículas orgânicas (CN-BEM), reportaram a existência de materiais luminescentes que tem a intensidade de fluorescência aumentada ou deslocadas ao formarem agregados. Esse comportamento foi denominado efeito AIEE (*Aggregation-induced Emission Enhancement*).^{96,115}

A Figura 21 ilustra o efeito AIEE observado no composto fluorescente 1,2-Difenil-4-(2-metoxinafitil)-1,3-ciclopentadieno. Nota-se que o aumento na intensidade de fluorescência está associado com a formação de agregados em maiores frações de água na mistura THF-água causada pela baixa miscibilidade do composto em água.¹¹⁷

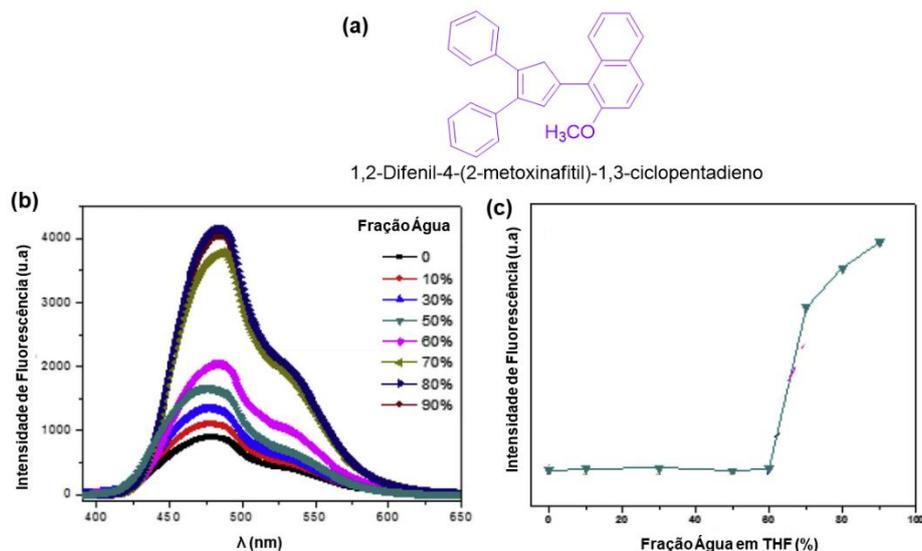


Figura 21. (a) Estrutura molecular do composto fluorescente 1,2-Difenil-4-(2-metoxinaftil)-1,3-ciclopentadieno; (b) Espectro de emissão de fluorescência em misturas de água/THF em diferentes frações de água; (c) gráfico de Intensidade de fluorescência vs fração de água em THF. Adaptado da Referência 117.

Estudos mecanísticos subsequentes, indicaram que o aumento na intensidade de fluorescência proveniente do efeito AIEE pode ser explicada pela Restrição de Rotação Intramolecular (RIR) e Restrição de Movimento Intramolecular (RIM) - inclui a restrição nos movimentos de rotação e vibração.^{96-99,115,116}

São várias as pesquisas que descrevem compostos fluorescentes, do tipo AIE/AIEE que tem aplicações que vão desde sensores fluorescentes de íons metálicos, OLEDs a marcadores fluorescentes celulares (Figura 22).^{10,11,117-146} Normalmente, são fornecidos os tamanhos dos agregados orgânicos e a relação com a variação da intensidade de fluorescência.

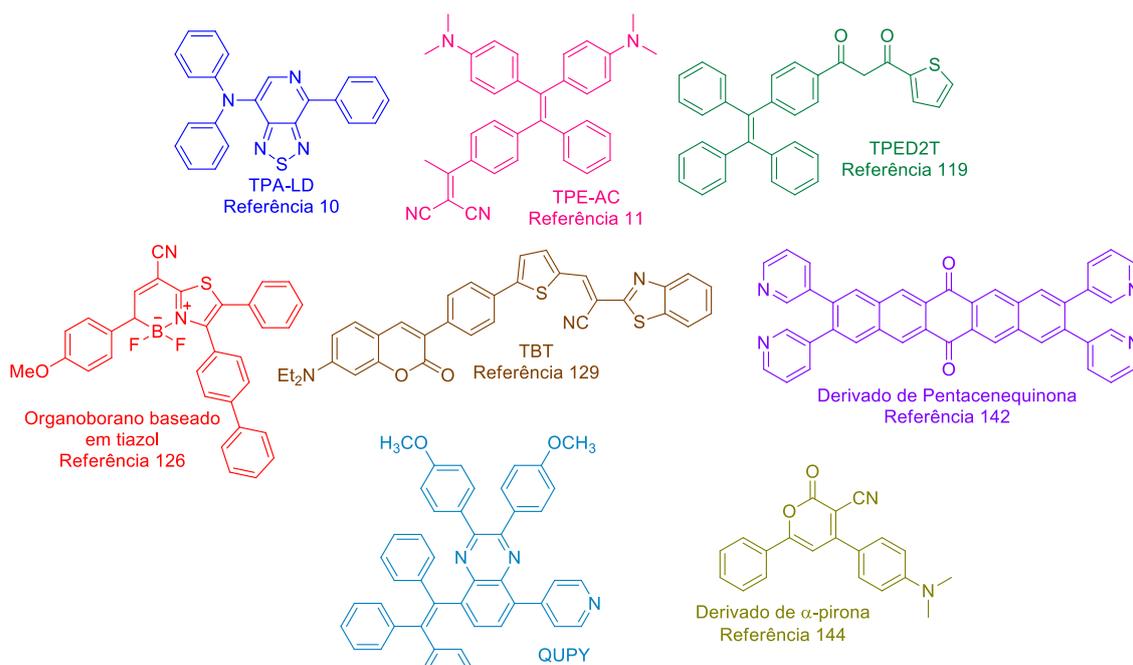


Figura 22. Algumas moléculas fluorescentes que formam agregados do tipo AIEE.

Contudo, são poucas as informações relacionadas à compreensão aprofundada da dinâmica de formação e ruptura dos agregados, bem como as principais interações que governam o processo de agregação em solução. Os mesmos aspectos são observados para os derivados de BTDs do tipo AIE/AIEE, Figura 23.^{65,147-157}

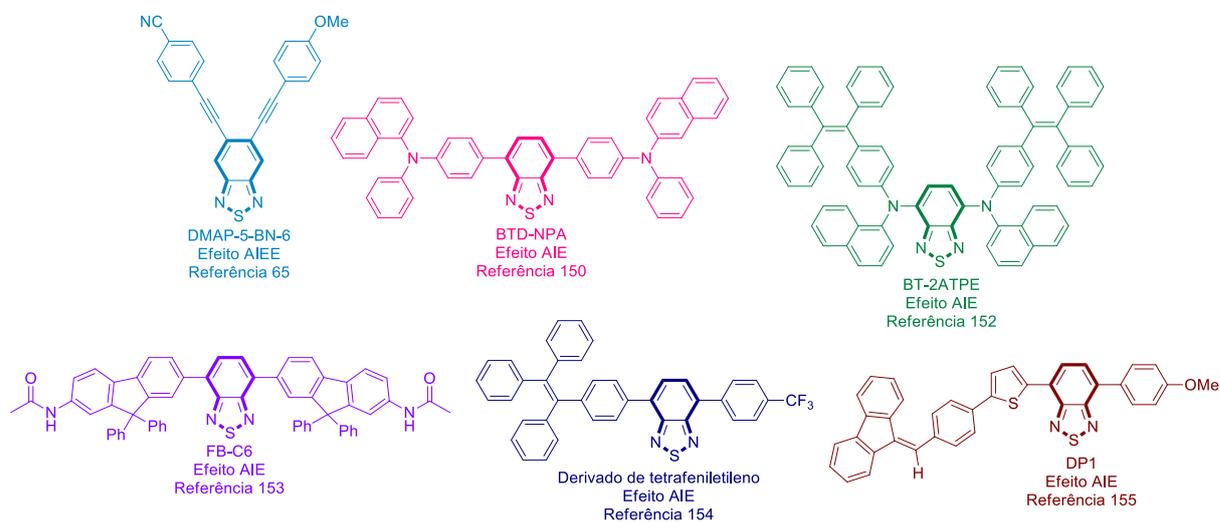


Figura 23. Algumas moléculas fluorescentes derivados do núcleo BTB que formam agregados do tipo AIE ou AIEE.

1.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

1.4.1 Teoria Básica

A ressonância magnética se trata de uma técnica espectroscópica de absorção. Uma amostra ao ser colocada dentro de um campo magnético e incide-se uma radiação, ocorre a degenerescência do spin eletrônico ou nuclear. Enquanto a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) monitora todos os núcleos de spins diferentes de zero, a ressonância paramagnética eletrônica identifica somente centros paramagnéticos, que são poucos nas biomoléculas.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Dessa forma, a Ressonância Paramagnética Eletrônica (ou EPR do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*) é uma técnica espectroscópica aplicada na detecção de espécies contendo elétrons desemparelhados, ou seja, compostos paramagnéticos.¹⁵⁸ Essa condição geralmente é verificada quando o composto orgânico é um radical livre, ou quando possui íons de metais de transição, como é o caso dos complexos inorgânicos ou metaloproteínas.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Dentre as aplicações dessa técnica, destacam-se as seguintes áreas: (i) física do estado sólido; (ii) química - identificação e quantificação de radicais, vias de reação química e caracterização do estado tripleto de bi-radicais e moléculas luminescentes; (iii) biologia e medicina - marcação de moléculas com sondas de *spin* e (iv) bioquímica - identificação e caracterização estrutural de centros metálicos em metaloproteínas.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Para um elétron livre, cujo spin é $S = 1/2$, o momento de dipolo magnético é dado por: $\vec{\mu}_S = -g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{S}$, onde g_e é o fator g do elétron livre, e μ_B é o magnéton de Bohr. Na ausência de um campo magnético externo (\mathbf{B}), não há diferença de energia entre a população de *spins* eletrônicos numa molécula, sendo denominados de degenerados. Para um campo magnético estático $\vec{B}_0 = B_0 \cdot \hat{k}$ (tomado, por convenção, na direção z) interagindo com este momento magnético, o Hamiltoniano do spin é descrito como sendo: $\mathcal{H} = -\vec{\mu}_S \cdot \vec{B}_0 = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \cdot S_z$.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Como o spin do elétron livre é $S = 1/2$, o momento de dipolo associado possui duas orientações possíveis na presença de \vec{B}_0 , ou autoestados ($|\alpha_e \rangle$ e $|\beta_e \rangle$). Os autovalores para estes autoestados são associados aos números quânticos $m_s = 1/2$ e $m_s = -1/2$, respectivamente, resultando nas equações das energias de orientação na presença de \vec{B}_0 .¹⁵⁸⁻¹⁶¹

$$\mathcal{H}|\alpha_e\rangle \geq E_\alpha|\alpha_e\rangle \Rightarrow E_\alpha = \frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$$

$$\mathcal{H}|\beta_e\rangle \geq E_\beta|\beta_e\rangle \Rightarrow E_\beta = -\frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$$

Essas equações são referentes aos alinhamentos paralelo e antiparalelo do elétron na direção z do campo. Logo, são formados dois níveis de energia (E_β e E_α), denominados níveis de Zeeman, ilustrados na Figura 24.

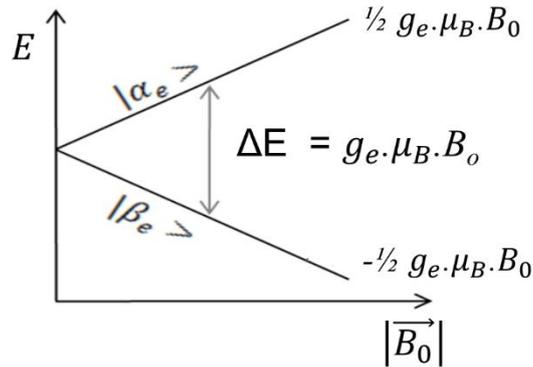


Figura 24. Diagrama do efeito Zeeman para o elétron livre - desdobramentos dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético \vec{B}_0 . Adaptado da Referência 161.

Na presença de um segundo campo magnético (\mathbf{B}), agora oscilante, as transições de dipolo magnético ocorrem caso a energia da radiação responsável por este campo, for igual à diferença de energia entre os níveis de spin, expressa por: $h\nu = \Delta E \Rightarrow h\nu = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$. A esta condição dá-se o nome de ressonância paramagnética.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

A energia $h\nu$ geralmente é fornecida à amostra através da exposição à radiação na frequência micro-ondas (campo magnético oscilante \mathbf{B}) perpendicular ao campo magnético (\vec{B}_0), que é variado até que ocorra a transição ($B \geq B_0$). Após a transição eletrônica, a amostra absorve energia da radiação de micro-ondas. Essa absorção, ou sua derivada é então detectada. A Figura 25 ilustra como ocorre essa transição e o respectivo sinal registrado pelo aparelho.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

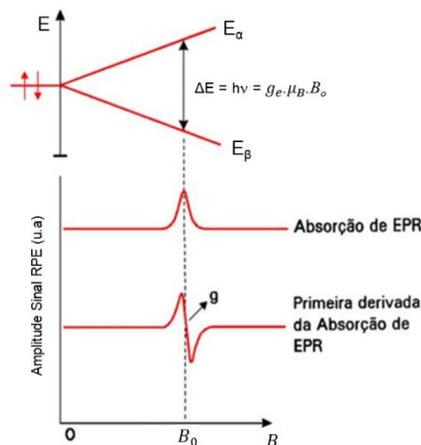


Figura 25. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético oscilante B ; Detecção do sinal de PRE e sua primeira derivada. Adaptado da Referência 159.

Outra condição importante para que a ressonância paramagnética ocorra é que a diferença entre as populações dos estados de spin (N_α e N_β) seja não nula. Na temperatura ambiente a razão entre estas populações segue a distribuição de Boltzmann: $\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\frac{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0}{k \cdot T}}$. Geralmente, à temperatura ambiente, esta diferença de população entre os dois níveis é muito pequena, visto que $g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \ll k \cdot T$. Como consequência, a absorção de micro-ondas também será pouco intensa. Logo, uma possível solução para se aumentar a absorção e o sinal de RPE é reduzir a temperatura do sistema, aumentando assim a diferença de ocupação entre os dois níveis de spin.¹⁶¹

Um elétron livre, ou seja, teoricamente não influenciado por qualquer fator externo, tem um valor g_e (constante giromagnética do elétron livre) igual a 2,0023. Contudo, na realidade, o elétron desemparelhado está localizado num orbital atômico e/ou molecular do composto paramagnético.^{160,161}

Como consequência, pode haver o acoplamento entre o spin do elétron desemparelhado e o orbital em que se encontra localizado, comportamento esse denominado de acoplamento spin-órbita. Logo, os sistemas reais se comportam como se o momento magnético de spin diferisse do valor de spin de elétron livre por um valor $\Delta g = g - g_e$. Dessa forma, sabendo-se que no fator g está embutido as interações do spin com o orbital em que se encontra, é possível fazer estimativas dos orbitais do centro paramagnético pelo cálculo do fator g através da medida de B onde ocorre a absorção quando o experimento de RPE é realizado, visto que a ν é conhecida.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Para radicais orgânicos, o desvio Δg é pequeno, geralmente na ordem de ppm, mas para sistemas contendo átomos mais pesados, como complexos de metal de transição, as

variações podem ser muito maiores. Esse comportamento observado em metais pesados é atribuído ao acoplamento spin-órbita.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

O Hamiltoniano (H_0) mais geral para um centro paramagnético é descrito pela seguinte equação:^{159,160}

$$H_0 = H_{EZ} + H_{ZFS} + H_{HF} + H_{NZ} + H_{NQ}$$

Esse hamiltoniano descreve todas as interações magnéticas do spin do elétron desemparelhado com seu ambiente na presença de um campo magnético externo. Os termos descrevem os seguintes efeitos possíveis:^{159,160}

- H_{EZ} - interação de Zeeman do elétron: descreve a interação do spin eletrônico com o campo magnético externo (\mathbf{B}), ilustrado nas Figuras 25 e 26, respectivamente. A partir de suas equações obtém-se o *fator-g*;
- H_{ZFS} - divisão de campo zero: é o termo hamiltoniano utilizado para descrever as interações individuais entre os elétrons individuais com spins desemparelhados aplicados em sistemas com spins de grupo $S > 1/2$. Existem dois mecanismos possíveis de tal interação: (i) interação spin-spin dipolar dentro de pares de elétrons ou (ii) o acoplamento spin-órbita.
- H_{HF} - acoplamento hiperfino: é observado em sistemas paramagnéticos com spins nucleares diferente de zero. A interação entre o spin nuclear e eletrônico resulta na divisão dos dois níveis de energia Zeeman, o que causa a chamada divisão hiperfina do sinal RPE (Figura 26)

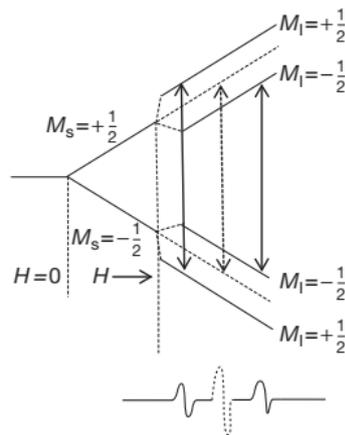


Figura 26. Níveis de energia de um sistema com um elétron desemparelhado e um núcleo atômico de spin nuclear diferente de zero. Para o elétron desemparelhado localizado próximo de um átomo de hidrogênio com $I = 1/2$. Ocorre a divisão hiperfina do sinal do sinal de RPE. Regra $2I + 1$ que resulta no sinal tripleto. Adaptado da referência 158.

- H_{NZ} - interação nuclear de Zeeman: Análogo à interação do elétron Zeeman, os spins nucleares acoplam-se ao campo magnético externo. O número quântico de

spin I e o fator g_n são propriedades inerentes de um núcleo. Na maioria dos experimentos, a interação nuclear Zeeman pode ser considerada isotrópica. Quase não influencia os espectros de RPE, porém afeta os espectros de frequência nuclear medidos por técnicas de RPE;

- H_{NQ} - interações quadrupolares: é visto em sistemas de spins nucleares com $I > \frac{1}{2}$. Os núcleos são caracterizados por uma distribuição de carga não esférica, que dá origem a um momento quadrupolo elétrico nuclear Q . Esse momento interage com o gradiente do campo elétrico no núcleo, causado pelos elétrons e núcleos em sua vizinhança.

Os diferentes termos do hamiltoniano de spin na equação que descreve o hamiltoniano de spin estático (H_0), são ordenados e aplicados de acordo com sua contribuição energética típica e características estruturais do sistema paramagnético.^{159,160}

O experimento de RPE mais comum é o de onda contínua, em que a amostra é irradiada por uma faixa contínua de micro-ondas. É bastante difícil a realização de experimentos de RPE produzindo uma fonte de micro-ondas com uma faixa de frequência variável com estabilidade suficiente de amplitude e frequência.¹⁵⁹

Assim, usualmente varia-se o campo magnético (B), mantendo a frequência (ν) constante, até que ocorra a transição entre os níveis de spin, com a frequência próxima de 9,0 GHz (banda-X) ou de 35GHz (banda-Q) (Figura 27).¹⁵⁹

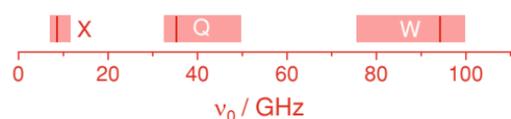


Figura 27. Faixa de frequência na região micro-ondas comumente utilizada nos experimentos de RPE. Adaptado da Referência 159.

Um outro aspecto importante é determinado pela instrumentação (Figura 28). O detector, um diodo de micro-ondas, é sensível a uma faixa ampla de frequências. A fim de reduzir a faixa de frequência de ruído detectado, o sinal de RPE é modulado por uma modulação do campo magnético e somente a parte modulada da saída do diodo é detectada.¹⁵⁹

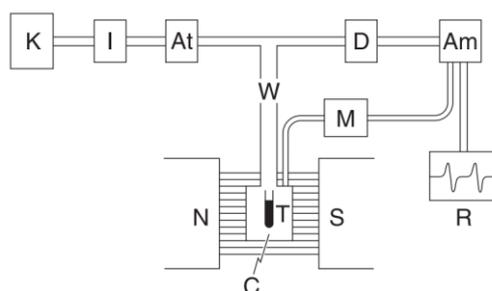


Figura 28. Componentes básicos de um espectrômetro de RPE. Onde: N e S são os polos do eletroímã; C é a cavidade de ressonância; T é o tubo de amostra; W é o guia de ondas; K é o klystron; I é o isolador; At é o atenuador; D é o detector de cristal; Am é o amplificador; R é o gravador e M é o modulador. Adaptado da Referência 158.

É importante ressaltar que a quantização do momento magnético leva somente a dois valores possíveis de μ_z (projeção do momento magnético sobre o eixo z). Assim, somente dois elétrons de *spins* contrários (elétrons emparelhados) poderão ocupar os orbitais, obedecendo o princípio de exclusão de Pauli. A partir do cancelamento do momento magnético eletrônico de um par de elétrons emparelhados, apenas moléculas contendo elétrons desemparelhados podem ter momento magnético total não-nulo, que poderão posteriormente serem detectados pela técnica de RPE. ^{158,159}

1.4.2 RPE em Sistemas Luminescentes

A técnica de RPE tem sido bastante aplicada no estudo alguns sistemas luminescentes, dentre esses, na (i) identificação de reações e/ou processos que levam a formação de intermediários paramagnéticos;¹⁶²⁻¹⁶⁶ (ii) caracterização estrutural de radicais orgânicos luminescentes utilizados em sistemas OLEDs ¹⁶⁷ e radicais orgânicos *turn-on* (sensoriamento químico e biológico, principalmente na detecção de espécies sensíveis a oxigênio e nitrogênio – ROS e RNS);¹⁶⁸ (iii) estudo da influência de marcador celular na produção de espécies reativas a oxigênio (ROS)⁷⁵ e (iv) caracterização estrutural sondas de spin utilizadas na oximetria de RPE. ^{169,170} Algumas desses sistemas luminescentes são ilustrados na Figura 29.

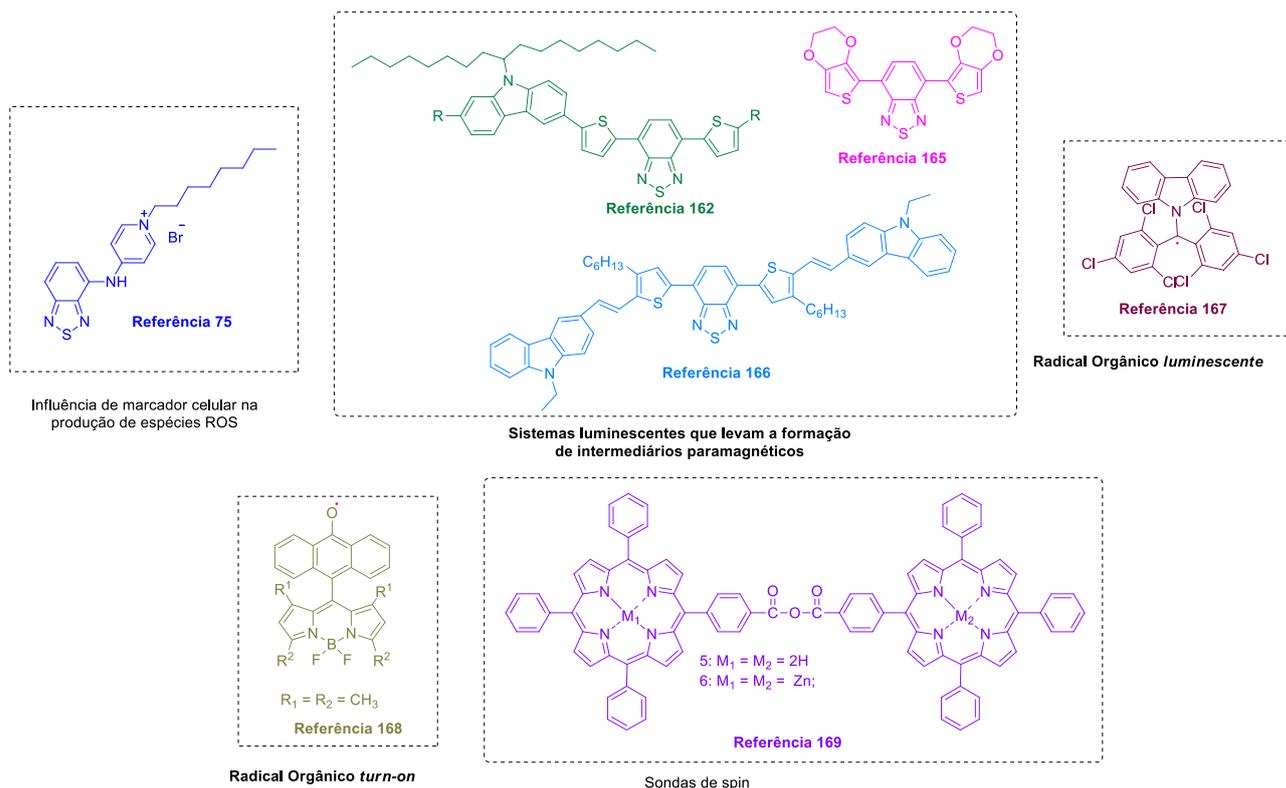


Figura 29. Utilização da técnica de RPE em alguns Sistemas Luminescentes.

Em moléculas luminescentes diamagnéticas, o processo de excitação eletrônica ($S_0 \rightarrow S_1$) induzido pela absorção de radiação UV resulta em emissões radiativas de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$) ou fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$) (Figura 5). Na técnica de RPE, os estados singletos são silenciosos ($S_0 \rightarrow S_1$ e $S_1 \rightarrow S_0$), mas após as transições tripletos ($S_1 \rightarrow T_1$ e/ou $T_1 \rightarrow S_0$), os sinais RPE podem ser identificados (Figura 30).^{37,158}

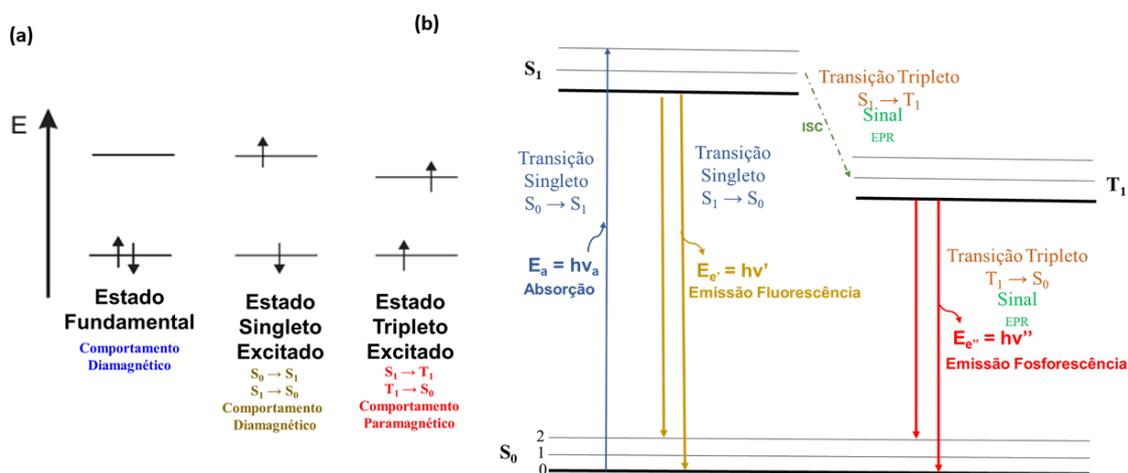


Figura 30. (a) Transições eletrônicas envolvidas no processo de foto-excitação em moléculas luminescentes. (b) Diagrama de Jablonski simplificado, mostrando as transições eletrônicas no qual são detectados os sinais de RPE. Adaptado da referência 37 e 158.

Os estados tripletos (T) provenientes de dois elétrons de spins paralelos ocupando o orbital π também podem ser observados nos sinais de RPE durante a transição $\pi \rightarrow \pi^*$

em moléculas luminescentes. Dessa forma, a técnica de RPE pode ser aplicada no estudo das transições eletrônicas envolvidas no processo de foto-excitação de moléculas luminescentes.^{159, 171-177} Na Figura 31 são ilustrados alguns compostos luminescentes que tiveram essas propriedades determinadas a partir da técnica de RPE.

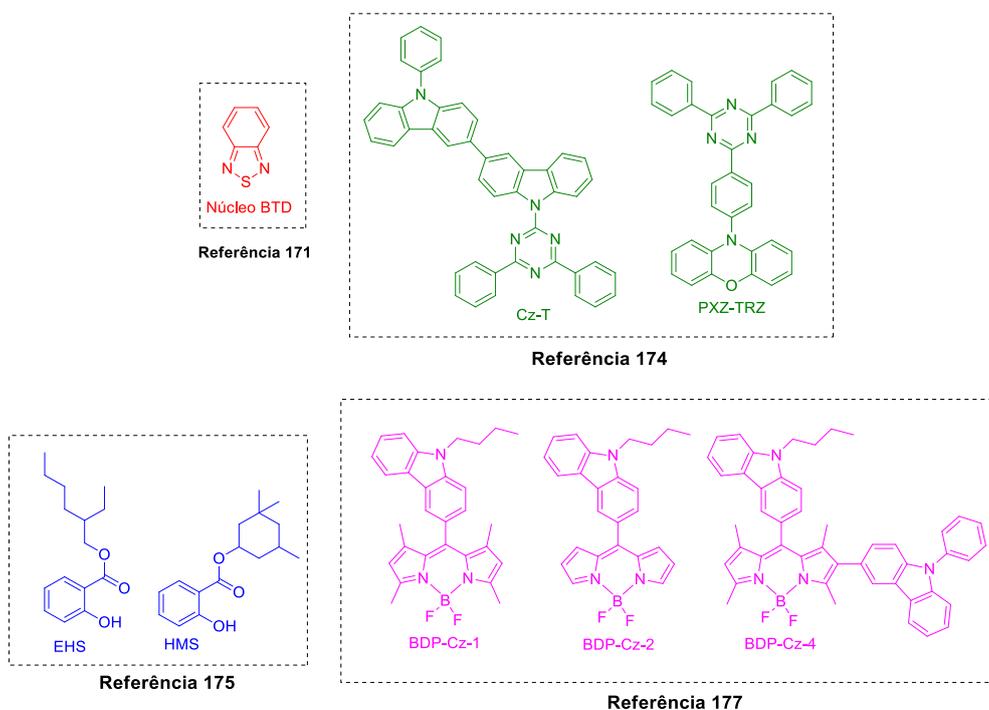


Figura 31. Alguns sistemas luminescentes que teve as transições tripletos estudadas pela técnica RPE.

No geral, as interações de elétrons π deslocalizados das moléculas luminescentes com o campo magnético externo aplicado durante as medidas permitiram a caracterização e o estudo de mecanismo das transições tripletos ($S_1 \rightarrow T_1$ e $T_1 \rightarrow S_0$) através da técnica RPE.^{158,169} Em alguns experimentos, o estado foto-excitado foi obtido pela excitação eletrônica da molécula por laser pulsado.¹⁷⁷ A seguir são descritas algumas pesquisas a respeito dessas pesquisas.

Lin¹⁷¹ realizou medidas de RPE do estado fosforescente do núcleo 2,1,3-benzotriazolene (BTDA) (Figura 31) num cristal hospedeiro de naftaleno a 77 K. A partir da análise de estrutura hiperfina pelos parâmetros da divisão de campo zero (ZFS) foram confirmados que a transição tripleto apresentava caráter $\pi-\pi^*$. Foi provado também que o estado fosforescente foi proveniente de um mecanismo de acoplamento spin-órbita.

Sugiyama e colaboradores¹⁷⁵ ao estudarem o estado tripleto excitado de mais baixa energia (T_1) de absorvedores UV-B (moléculas EHS e HMS, Figura 31) usando a técnica de RPE verificaram que as interações individuais entre os elétrons individuais com spins desemparelhados em sistemas com spins de grupo $S > 1/2$ (interação spin-spin dipolar

dentro de pares de elétrons ou o acoplamento spin-órbita) permitiram caracterizar essas transições através do valor do parâmetro D da divisão de campo zero (ZFS).

O parâmetro D pôde ser obtido experimentalmente através do campo de ressonância observado correspondente às transições entre os dois subníveis que não são adjacentes em campos magnéticos elevados, denominados $\Delta_{MS} = \pm 2$. Os resultados sugeriram que os estados T_1 das moléculas em etanol possuíam principalmente caráter $\pi-\pi^*$. Foram determinados também o tempo de vida do estado T_1 obtido a partir do decaimento do sinal RPE.¹⁷⁵

Hou e colaboradores¹⁷⁷ aplicaram a técnica de TR-PRE (Ressonância Paramagnética Eletrônica Resolvida no Tempo) para investigar o mecanismo responsáveis pelo processo ISC (Cruzamento Intersistemas) por meio do estado de transferência de carga em díades Bodipy (BDP) –carbazol (Cz) (BDT-Cz 1, 2 e 4 na Figura 31). As análises e determinação do mecanismo envolvido na transição ISC foram determinadas através do parâmetro D obtido experimentalmente pela divisão de campo zero (ZFS) e das taxas de população de spin do campo zero.

Os resultados confirmaram que as transições eletrônicas ocorreram via mecanismo SOCT-ISC (Cruzamento intersistema de transferência de carga spin-órbita). Foi mostrado também que a polarização do spin do elétron do estado tripleto foi altamente dependente da orientação mútua do grupo doador (unidade Cz da díade) e do grupo acceptor de elétrons (unidade BDT da díade).¹⁷⁷

2. Objetivos e Justificativa

2.1 Objetivo Geral

Obter compostos fluorescentes lipofílicos do tipo AIEE, derivados de BTD, para a marcação de gotas lipídicas (LDs) pela técnica de microscopia de fluorescência.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar, a partir das reações de acoplamento de Sonogashira, os marcadores fluorescentes **BTD(CcPh)₂**, **BTDCCPh** e **BTDBrCCPh**;

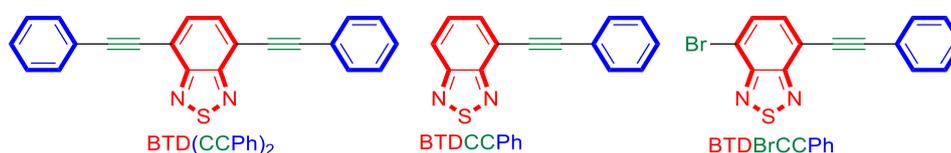


Figura 32. Derivados de BTD lipofílicos sintetizados e utilizados neste trabalho.

- Fazer a caracterização estrutural dos derivados de BTD pelas técnicas de infravermelho, raios X de monocristal, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas;
- Realizar a caracterização fotofísica através de experimentos de efeito solvatocrômico, rendimento quântico e fotoestabilidade;
- Investigar as propriedades fluorescentes e a dinâmica de agregação dos derivados de BTD no estado agregado;
- Determinar a lipofilicidade e efeito light-up através dos experimentos de coeficiente de partição e teste com SDS;
- Identificar as transições eletrônicas e mecanismos que resultam na emissão de luz (dinâmica do estado excitado) dos compostos através da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

2.3 Justificativa

A identificação das gotas lipídicas através dos marcadores celulares fluorescentes comerciais limita-se aos derivados de “*Nile Red*” e BODIPY que apresentam uma série de limitações tais como:²⁹

- Nile Red: marca outras estruturas hidrofóbicas na célula resultando na baixa seletividade para gotas lipídicas e a diminuição na relação sinal/ruído;
- Derivados de BODIPY: apesar de ter uma alta seletividade para as gotas lipídicas, apresentam baixa fotoestabilidade e pequenos deslocamentos de Stokes que pode resultar em artefatos de fundo devido a dispersão de luz originada na fonte de excitação;

Ressalta-se também que devido à natureza das membranas celulares e a presença de moléculas hidrofóbicas no citoplasma da célula, a utilização destes marcadores resulta em imagens contendo ruídos de fundo devido à marcação das membranas celulares e demais regiões hidrofóbicas presentes em diversas biomoléculas.²⁹

Dessa forma, a emissão de fluorescência associada às regiões que não são de interesse reduz a qualidade de imagem adquirida e interfere na precisão que é requerida em análises quantitativas.

Além disso, o contínuo acúmulo da sonda fluorescente no núcleo da gota lipídica pode induzir o estado de agregação da sonda. Essa agregação comumente proporciona interações sonda-sonda e o efeito ACQ (*Aggregation Caused Quenching*), o que leva a perda de radiação por mecanismos não radiativos e autosupressão de fluorescência, reduzindo a qualidade das imagens.²⁰

Para resolver estes problemas técnicos, para a marcação de LDs, é proposta a utilização de derivados de BTB do tipo AIEE (*Aggregation-Induced Emission Enhancement*).

Os fluoróforos derivados de BTB representam uma nova classe de emissores fotoestáveis capazes de transpor a membrana celular, apresentando vantagens frente aos marcadores comercialmente disponíveis nos seguintes quesitos:^{20,29,53,54}

- Ampla faixa de cores de emissão que vão desde o azul até o vermelho;
- Melhoria em algumas propriedades fotofísicas como maior brilho, rendimentos quânticos, fotoestabilidade, maiores deslocamentos de Stokes resultantes da estabilização do estado excitado pelo processo ICT;

- Boa relação sinal ruído;
- Alguns derivados apresentam aumento na intensidade de fluorescência no estado de agregação devido ao efeito AIE ou AIEE com deslocamentos de emissão para a região do azul e/ou vermelho.

Portanto, para o design dos novos compostos, foi escolhido como substituinte o fenilacetileno com o objetivo de obter estruturas moleculares altamente lipofílicas (Figura 33). Espera-se, com essas modificações, sanar os problemas comumente observados em marcadores de LDs comerciais, como a baixa fotoestabilidade, o baixo deslocamento de Stokes e o efeito ACQ.

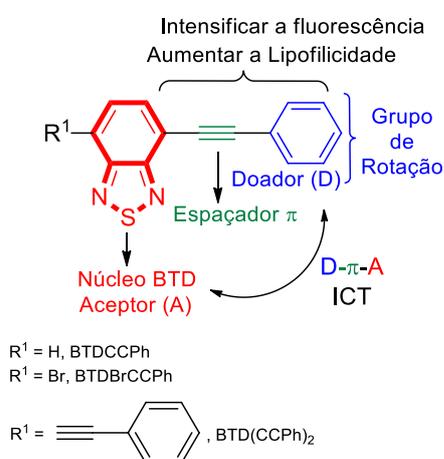


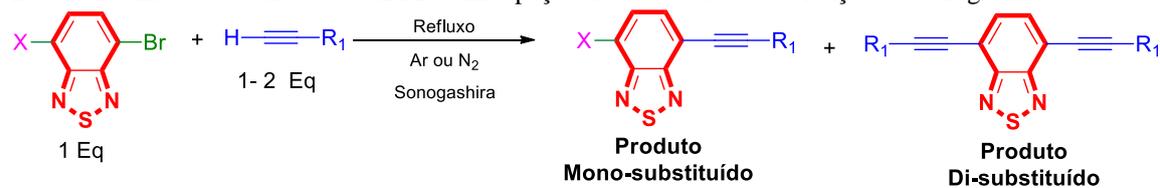
Figura 33. Design molecular dos derivados fluorescentes de BTD proposto neste trabalho para marcação de gotas lipídicas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Síntese dos derivados de BTDAIEE de design D- π -A e análogos

Inicialmente foi realizada uma pesquisa na literatura a fim de investigar a quantidade de protocolos destinados à síntese de derivados de BTDA do tipo D- π -A e análogos através de reações de acoplamento C(sp²)-C(sp).

No geral, foram verificadas que as metodologias baseadas nas reações de acoplamento cruzado de Sonogashira^{178,179} são as mais utilizadas. A Tabela 1 descreve as condições experimentais aplicadas na obtenção de alguns desses derivados de BTDA, dentre esses, o composto **BTDA(CCPh)₂**,^{65,70, 179-182} um dos produtos de interesse nessa pesquisa.

Tabela 1. Síntese de derivados de BTD com espaçador π C \equiv C através da reação de Sonogashira

Referência	R ₁	X	Catalisador	Base	Solvente	Condições	Rendimento
52		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / CuI	LDA	Tolueno	80 °C / 12 h	Produto Di-substituído 13%
53 / 185		Br	Pd(PPh ₃) ₄ / CuI	LDA	---	50 °C / 18 h	Produto Di-substituído 80%
60		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / PPh ₃ / CuI	Et ₃ N	---	50 °C / 18 h	Produto Di-substituído 75%
61		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / PPh ₃ / CuI	Et ₃ N	THF	25 °C / 12h	Produto Di-substituído 89%
63,64		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / CuBr	Et ₃ N	---	60 °C / 1 h 90 °C / 2 d	Produto Di-substituído 78%
65		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / PPh ₃ / CuI	Et ₃ N	THF	60 °C / 12 h	Produto Di-substituído 81%
67		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / PPh ₃ / CuI	Et ₃ N	---	T.A / 24 h	Produto Mono-substituído 42%
68		H	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / CuI	(iPr) ₂ NH	THF	T.A / 6 h	Produto Mono-substituído 72%
69		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / PPh ₃ / CuI	Et ₃ N	---	55 °C / 2 h	Produto Di-substituído 95%
70 / 180 / 182	1. 2.	Br	1. PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / PPh ₃ / CuBr 3. PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / CuBr	1. Et ₃ N 2. KF 3. Et ₃ N	2. MeOH	1. 90 °C / 4 h 2. 25 °C / 8 h 3. 60 °C / 18h	Produto Di-substituído 99%
181		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / CuI	LDA	---	1. 25 °C / 1 h 2. 60 °C / 13 h	Produto Di-substituído 82%
183		Br	Pd-Encat / CuI	DBU	CH ₃ CN	MW 130 °C 25 min	Produto Di-substituído 76%
184		Br	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ / CuI	Et ₃ N	THF	T.A / 2 h	Produto Di-substituído 67%

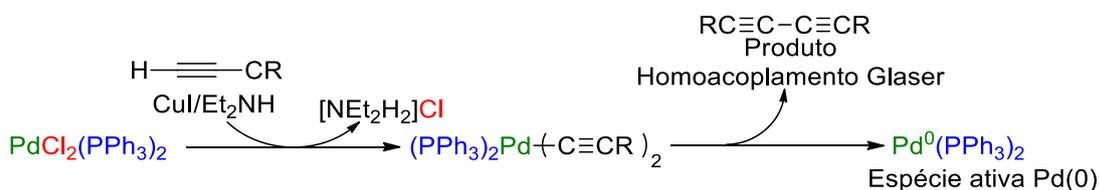
A partir dos dados apresentados na Tabela 1, nota-se que na maioria das reações são utilizados como catalisadores espécies de Pd⁰ [Pd(PPh₃)₄] ou Pd^{II} [PdCl₂(PPh₃)₂], aminas secundárias ou terciárias como base/solvente, o ligante PPh₃ em conjunto com os catalisadores de Pd^{II}, e em alguns casos, o tolueno, THF ou acetonitrila como solvente.

Observa-se também que a maioria das reações foram realizadas em temperaturas superiores a 50°C, ao invés de temperatura ambiente, como são comumente observadas nas reações de Sonogashira.¹⁸⁶ Uma das explicações dadas é baseada no fato dos brometos de arila, geralmente, não serem ativados na etapa de adição oxidativa em temperatura ambiente, o que requer a realização dessas sínteses em temperaturas mais elevadas.¹⁸⁶

Está bem documentado que a escolha do catalisador é fundamental para a seleção da base, ligante, solvente e temperatura.¹⁸⁷ Dessa forma, para estabelecer as condições reacionais para a sínteses dos marcadores de interesse, foram analisados primeiramente os prós e contras da utilização de cada espécie de catalisador de paládio nas metodologias apresentadas na Tabela 1.

O catalisador de Pd^{II}, [PdCl₂(PPh₃)₂], é amplamente utilizado nas reações de Sonogashira devido ao seu menor custo de síntese, estabilidade ao ar/temperatura e boa solubilidade em base/solventes.^{187,189} Como a reação de Sonogashira acontece na presença de espécies de Pd⁰, é necessário o uso de aminas em excesso, e/ou ligantes derivados de fosfinas como PPh₃, que auxiliam na redução de Pd^{II} a Pd⁰.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰

A utilização de co-catalisadores de cobre (I) mostrou-se bastante importante no processo de ativação do acetileno durante a reação de acoplamento. Todavia, uma das desvantagens é que pode promover a formação de dímeros de alcinos através da reação de homoacoplamento de Glaser durante o processo de redução de Pd^{II} a Pd⁰, descrito no Esquema 2.^{179,186}



Esquema 2. Mecanismo proposto para a formação da espécie ativa de Pd(0) responsável pela reação de acoplamento C(sp²)-C(sp). Adaptado da Referência 179.

Esses subprodutos podem ser formados com rendimentos consideráveis e geralmente são difíceis de serem separados dos produtos desejados devido à semelhança de mobilidade cromatográfica, o que requer várias etapas de purificação do produto

desejado.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Esse aspecto pôde ser observado ao analisar detalhadamente alguns procedimentos experimentais apresentados na Tabela 1.

Outro inconveniente está relacionado a utilização de ligante PPh₃ na reação, que apesar de contribuir para a formação da espécie ativa de Pd⁰, por meio do processo de oxidação, pode resultar na formação de subprodutos difíceis de serem removidos por coluna cromatográfica.^{186,190,191}

Para evitar esses inconvenientes durante a síntese das BTDs, realizou-se um levantamento das orientações/alternativas estabelecidos nos protocolos gerais das reações de acoplamento de Sonogashira. Dentre esses, destacam-se: (i) realização das reações em atmosfera inerte; (ii) utilização de catalisadores de Pd⁰;^{186,188} (iii) remoção do ligante PPh₃¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ e a (iv) remoção do co-catalisador de cobre, através dos protocolos de reações de Sonogashira “livres de cobre”.^{187,188,192-194}

O uso do catalisador de Pd⁰, [Pd(PPh₃)₄], tem como vantagem a obtenção direta de espécies de Pd⁰, de modo que não há necessidade do uso do co-catalisador de cobre, o que inibe a formação de subprodutos como os dímeros de alcino. Todavia, apesar dessas vantagens e dos melhores rendimentos, tem a desvantagem do alto custo na sua síntese e instabilidade em temperaturas maiores que 0 °C.^{186,188}

A outra opção é a utilização dos protocolos de Sonogashira “livres de cobre”, denominados também de acoplamento “Heck-Cassar”. Essas metodologias permitem a utilização de catalisadores de Pd^{II}, que são mais baratos e estáveis, juntamente com a base amina em excesso. Algumas pesquisas descreveram que as aminas são competitivas às fosfinas e podem participar como ligantes no ciclo catalítico, contribuindo para a ativação do acetileno e de Pd⁰. Dessa forma, o uso da base em excesso dispensa do uso dos ligantes derivados de fosfina.^{187,188,192-194}

Para a síntese de derivados de BTD através de reações de Sonogashira “livres de cobre” não foram encontrados protocolos.

Na Tabela 1 foram apresentados também algumas metodologias para síntese de um dos produtos de interesse, o composto **BTD(CCPh)₂**. Uma vez que nos procedimentos experimentais, o fenilacetileno foi utilizado em excesso, foi obtido somente o produto di-substituído **BTD(CCPh)₂**, como esperado.^{70,180-183} A formação de produtos mono-substituídos, dentre esses a **BTDBrCCPh**, como subproduto, foi observada somente em protocolos nos quais a BTD foi utilizada em excesso ou com o mesmo equivalente de acetileno.^{70,72,74} Para a obtenção do composto **BTDCCPH**, não foram encontradas nenhuma metodologia.

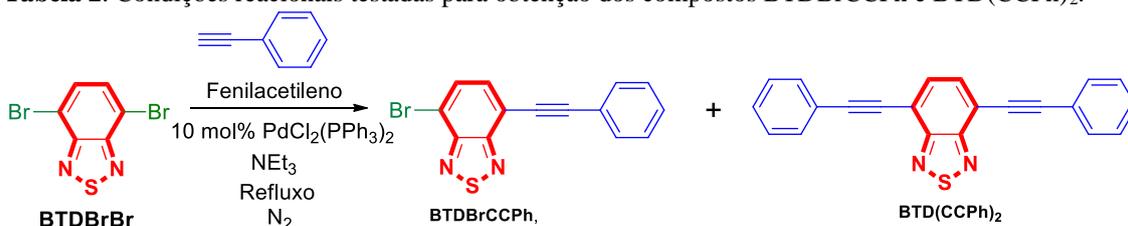
Portanto, considerando-se esse panorama apresentado, a metodologia de preparo dos compostos **BTDC(CPh)₂**, **BTDBrCCPh** e **BTDC(CPh)₂** foi planejada adaptando-se o protocolo de síntese de BTDs através da reação de Sonogashira sem o co-catalisador de cobre e o ligante PPh₃, utilizando o catalisador de paládio o PdCl₂(PPh₃)₂ e a trietilamina como base/solvente.

Levando em conta que algumas reações de acoplamento usando **BTDBrBr** (4,7 – dibromo – 2,1,3 – benzotiadiazola) ou **BTDBr** (4 – bromo – 2,1,3 – benzotiadiazola) como material de partida ocorreram em temperaturas superiores a 50°C,^{55, 70, 180, 183} foi escolhida inicialmente a temperatura de 100°C para as reações.

3.1.1 Síntese dos compostos BTDBrCCPh e BTDC(CPh)₂

Os resultados da síntese dos compostos **BTDBrCCPh** e **BTDC(CPh)₂** através da reação de Sonogashira sem cobre são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Condições reacionais testadas para obtenção dos compostos BTDBrCCPh e BTDC(CPh)₂.



Entrada	Metodologia	Produtos	Rendimento
1	1 Eq (0,51 mmol) BTDBrBr 1,7 Eq Fenilacetileno 100°C / 24h	BTDBrCCPh BTDC(CPh) ₂	30% 50%
2	1,5 Eq BTDBrBr 1 Eq (0,34 mmol) Fenilacetileno 100°C / 24h	BTDBrCCPh BTDC(CPh) ₂	31% 50%

Foram realizadas duas reações. Na primeira reação (Entrada 1), o fenilacetileno foi colocado em excesso e como esperado foram obtidos os dois produtos, o mono e di-substituídos. Para a obtenção do produto mono-substituído em maiores rendimentos, o material de partida **BTDBrBr** foi adicionado em excesso (Entrada 2). Contudo, além de ter sido formado o produto mono-substituído, foi obtido também o produto di-substituído com rendimento de 50%, comportamento similar a primeira reação.

Entretanto, na Entrada 1, os produtos na forma mais pura foram obtidos após duas etapas de purificação, devido à dificuldade de remoção de impurezas. Enquanto na Entrada 2, foi necessária somente uma única etapa de purificação. Nesse caso, o uso do

fenilacetileno como reagente limitante provavelmente inibiu a formação do subproduto de homoacoplamento, o que facilitou a purificação dos dois produtos.

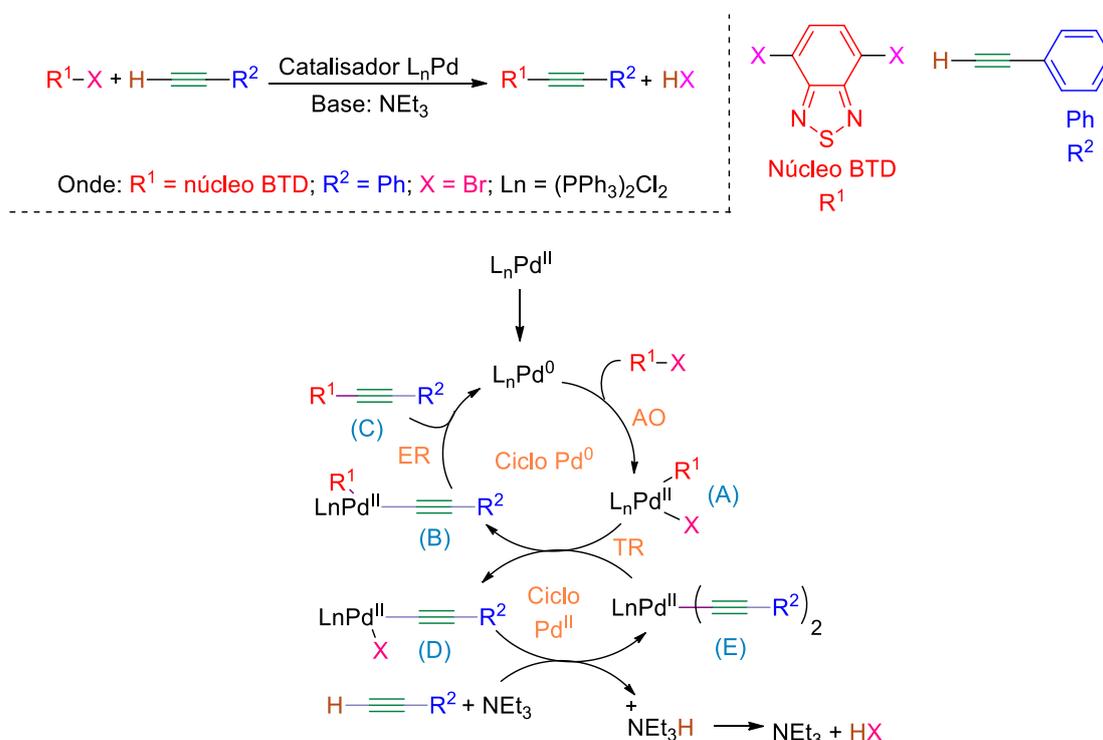
A confirmação da formação do composto **BTDCCPH**₂ foi através da comparação dos espectros de ¹H (600 MHz) e ¹³C RMN (150 MHz), espectrometria de massas e raios X de monocristal com os dados da literatura.¹⁸⁰⁻¹⁸³

A formação do composto **BTDBrCCPh** teve sua estrutura confirmada por ¹H RMN (600 MHz) e ¹³C RMN (150 MHz), espectrometria de massa de alta resolução e raios X de monocristal, com descrições detalhadas no próximo tópico (3.2).

Sobre o mecanismo de reação para obtenção desses derivados de BTDs, são considerados até o momento dados da literatura que descrevem o mecanismo geral de acoplamento cruzado de Sonogashira “livres de cobre”.

Muitos estudos experimentais e computacionais foram realizados para a elucidação do mecanismo de reação de acoplamento sem o uso de cobre e, até recentemente, o mecanismo exato pelo qual ocorre esta reação estava em debate, com questões mecanicistas críticas sem respostas.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

Somente em 2018, foi comprovado por Košmrlj e colaboradores que a reação prossegue através de dois ciclos catalíticos interligados de Pd⁰ e Pd^{II}, como ilustra o Esquema 3.^{187,195}



Esquema 3. Ciclo catalítico de reação de acoplamento de Sonogashira “livre de cobre” proposto por Košmrlj e colaboradores. Onde: AO = Adição Oxidativa; TR = Transmetalização e ER = Eliminação Redutiva. Adaptado das Referências 187 e 195.

O ciclo catalítico baseia-se na transmetalização entre duas espécies distintas de paládio, o intermediário (A), formado na etapa de adição oxidativa dentro do ciclo Pd^0 , e o complexo de acetileno de paládio (E), formado a partir da ativação do fenilacetileno com auxílio da base no ciclo Pd^{II} . Foi provado que o fenilacetileno forma tanto o monoacetileno de paládio (D) quanto o complexo bis-acetileno de paládio (E).^{187,195}

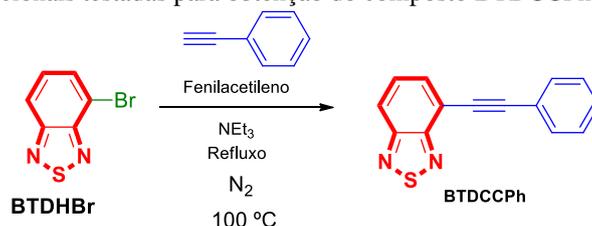
A amina adicionada em excesso participou tanto da etapa de redução do catalisador de Pd^{II} a Pd^0 no ciclo de Pd^0 , quanto na formação do intermediário (E) durante a ativação do acetileno no ciclo de Pd^{II} .¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Na sequência, o intermediário (E) participou da etapa de transmetalização com intermediário (A), formando o complexo (B) e regenerando o complexo (D). Em seguida, o complexo (B) participou da etapa de eliminação reductiva, levando à formação do produto de acoplamento (C) e regenerando o catalisador de Pd^0 .^{188,195}

Na reação entre a **BTDBrBr** e o fenilacetileno, foram obtidos dois produtos de acoplamento: o mono-substituído, **BTDBrCCPh**, e o di-substituído, **BTDC(Ph)2**. Nota-se também que no período de 24 h de reação, o rendimento do produto di-substituído foi maior, mesmo a **BTDBrBr** estando em excesso. Na etapa de purificação (Tabela 2, Entrada 2), foi recuperado, dentre os reagentes, somente o composto **BTDBrBr**. Não foram observados a formação de subprodutos.

Com base nesses fatos, tudo indica que no ciclo catalítico o produto mono-substituído foi primeiramente formado, e na sequência o produto mono-substituído reagiu preferencialmente com o fenilacetileno ao invés do material de partida **BTDBrBr** através desse mesmo ciclo catalítico para formar o produto di-substituído.

3.1.2 Síntese do composto **BTDCPh**

A síntese do composto **BTDCPh** foi realizada a partir do intermediário 4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola (**BTDBr**) utilizando também o protocolo de Sonogashira “livre de cobre”. Contudo, mesmo com o aumento do tempo reacional foi verificada a formação do produto de interesse com rendimentos abaixo de 30% (Tabela 3, Entradas 1 e 2).

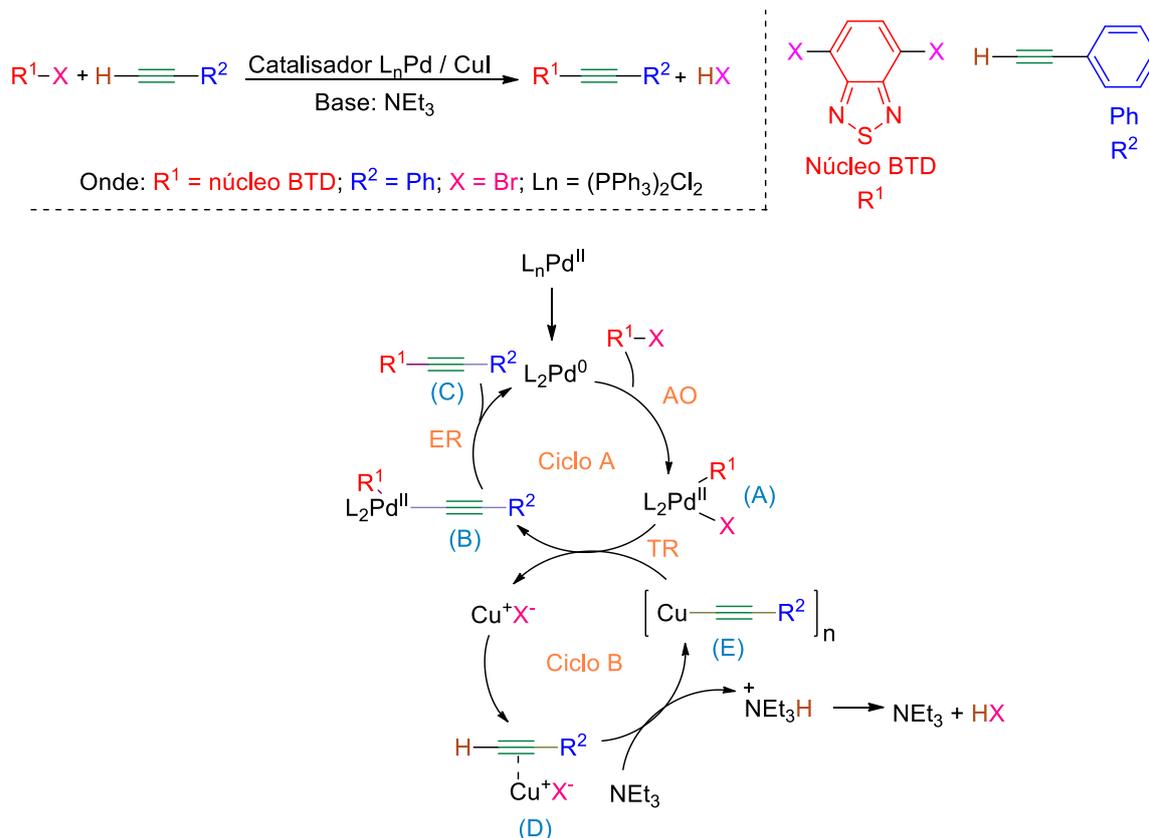
Tabela 3. Condições reacionais testadas para obtenção do composto **BTDCCPH**.

Entrada	Metodologia	Produto	Rendimento
1	1 Eq (0,47 mmol) BDHBr 2,6 Eq Fenilacetileno 10 mol% Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ 24h	BTDCCPH	20%
2	1 Eq (0,47 mmol) BDHBr 2,6 Eq Fenilacetileno 10 mol% Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ 3 dias	BTDCCPH	21%
3	1 Eq (0,47 mmol) BDHBr 2,6 Eq Fenilacetileno 10 mol% Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ 5 mol% CuI 24h	BTDCCPH	70%

Outra reação foi então realizada, desta vez com adição do co-catalisador de cobre (I) (Tabela 3, Entrada 3), resultando na formação do produto de interesse no rendimento de 70%. A estrutura do composto **BTDCCPH** foi identificada através de análises de ¹H (600 MHz) e ¹³C (150 MHz) RMN, e espectrometria de massas de alta resolução, conforme será descrito no próximo tópico. Devido a dificuldades na obtenção de monocristais, não foi possível a realização de análises de raios X de monocristal.

Sobre o mecanismo de formação da **BTDCCPH** através da reação de Sonogashira co-catalisada por cobre, não são encontrados na literatura descrições direta do ciclo catalítico envolvendo **BTDs**. Ao invés disso, diversos pesquisadores adotam as propostas atualmente aceitas pela comunidade científica que descrevem, de forma geral, o ciclo catalítico para a reações de Sonogashira.⁵⁵

O Esquema 4 ilustra as etapas envolvidas na formação do produto de acoplamento. O mecanismo para o acoplamento de Sonogashira ocorre através de dois ciclos (A e B), seguindo a etapa de adição oxidativa e eliminação redutiva. Entretanto, a estrutura da espécie cataliticamente ativa e o papel do sal de cobre é desconhecido.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹



Esquema 4. Ciclo catalítico de reação de acoplamento de Sonogashira. Onde: AO = Adição Oxidativa; TR = Transmetalção e ER = Eliminação Redutiva. Adaptado da Referência 186.

A reação começa com a ativação do catalisador de paládio L_nPd^{II} [$PdCl_2(PPh_3)_2$] a L_2Pd^0 , que pode ser por duas vias: (i) formação de uma espécie [$L_2Pd^{II}(C \equiv CR_2)_2$] que resulta em L_2Pd^0 após a eliminação redutiva, formando um dímero de alcino como subproduto (Esquema 2); ou (ii) redução de L_nPd^{II} a L_2Pd^0 através da formação de cátions imínio por uma base amina.^{185,186,188}

Então, o catalisador ativo L_2Pd^0 sofre adição oxidativa com o haleto de arila, formando o intermediário (A). Em seguida, ocorre a transmetalção entre o intermediário (A) e o acetileno de cobre (E), formado no ciclo B. O complexo (B) formado na transmetalção sofre eliminação redutiva, fornecendo o produto de acoplamento (C) e a regeneração do catalisador, completando o ciclo catalítico.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹

Embora o ciclo A seja bem compreendido, pouco se sabe sobre a sequência de reações envolvendo as espécies de cobre (ciclo B). É amplamente aceito que a geração inicial de um complexo π alcino-Cu (D) aumenta a acidez do hidrogênio do alcino terminal e, portanto, facilita a formação auxiliada pela base amina do acetileno de cobre (E).^{185,186,188}

No entanto, pesquisas recentes sugeriram outros processos envolvidos no ciclo B (cobre), como a pré-estabilização do iodeto de cobre (CuI) com ligantes polifosfínicos

multidentados e transferência de ligantes de um metal para outro, mostrando que as interações cobre-ligante também pode ser provável.^{186,188}

Um outro estudo, ainda, baseado em cálculos DFT, descreve que o ciclo de cobre poderia gerar uma espécie de carbânion de acetileno de cobre coordenado ao íon iodeto (I⁻) cataliticamente ativo, em vez de acetileno de cobre neutro, o que é geralmente considerado.¹⁹⁶

Para essa reação, foi necessário realizar a recristalização para a purificação do produto após a coluna cromatográfica, devido à dificuldade de remoção de impurezas. Provavelmente, devido à necessidade da utilização do co-catalisador de cobre, possam ter sido formado dímeros de alcinos como subproduto, como ilustrado anteriormente no Esquema 2, que são difíceis de serem separados por cromatografia.^{185,186}

3.2 Caracterização Estrutural das BTDs sintetizadas

Antes da análise dos espectros de RMN dos produtos sintetizados, foram obtidos os espectros de RMN ¹H dos materiais de partida – **BTDBrBr** e fenilacetileno (Figuras 34 e 35). Esses espectros serão utilizados posteriormente como uma das ferramentas para confirmar e identificar os sinais dos produtos de interesse nos seus espectros de ¹H RMN.

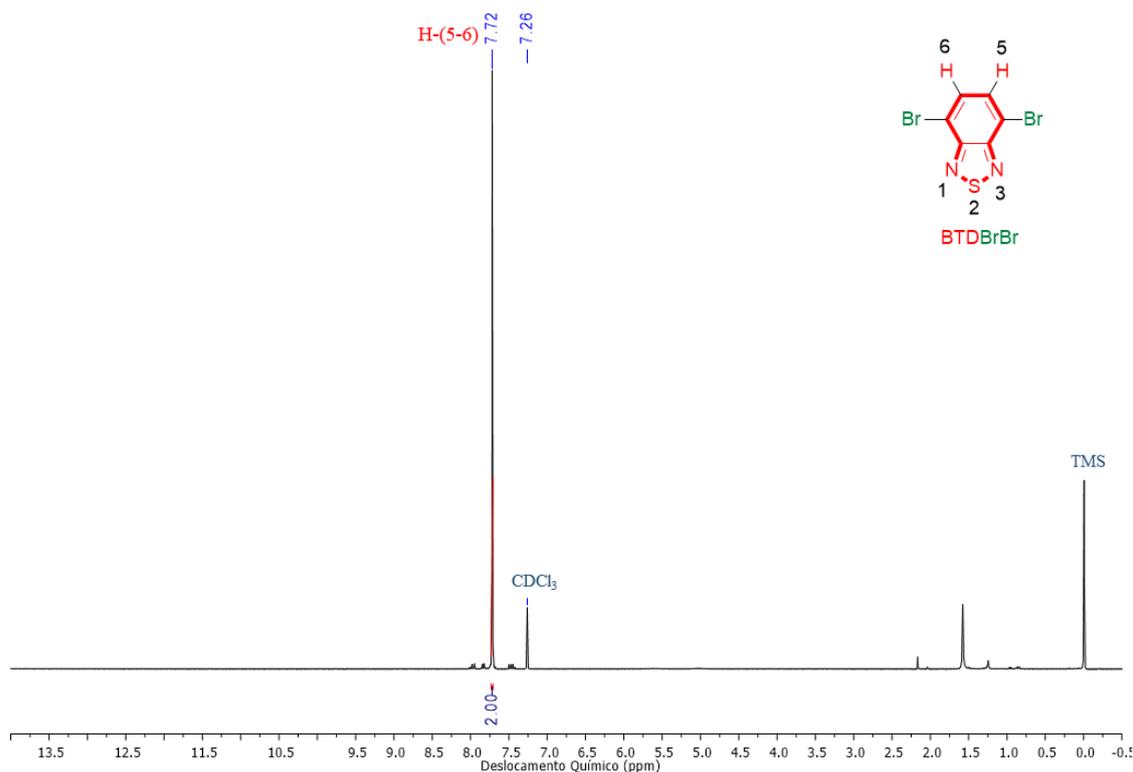


Figura 34. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto **BTDBrBr**.

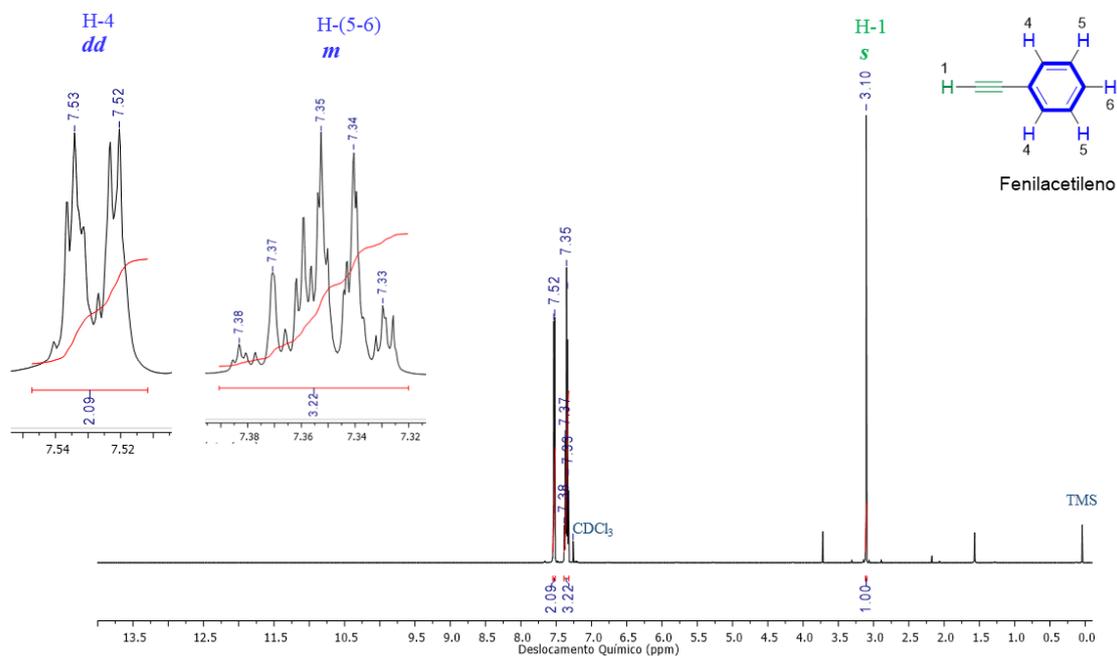


Figura 35. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto Fenilacetileno.

A **BTDBrBr** apresenta um único sinal em 7,72 ppm (s, 2H) (Figura 34), enquanto o fenilacetileno (Figura 35) apresenta três sinais, sendo o primeiro um simpleto de integral 1 na região alifática (3,06 ppm) correspondente ao hidrogênio do alcino terminal. Os

outros dois sinais são encontrados na região aromática referente ao grupo fenil em 7,33 – 7,39 ppm (m, 3H) e 7,52 – 7,53 ppm (dd, 2H).

3.2.1 Composto **BTD(CCPH)₂**

A confirmação da formação do composto **BTD(CCPH)₂** foi realizada através da comparação dos espectros de ¹H e ¹³C RMN, espectrometria de massas e raios X de monocristal com os dados da literatura.¹⁸⁰⁻¹⁸³

A técnica de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) com o modo de ionização positivo [M + H⁺] foi aplicada com o objetivo de obter o espectro de MS, espectro de fragmentação MS/MS e confirmação da fórmula molecular do composto **BTD(CCPH)₂**. Os resultados são apresentados na Figura 36.

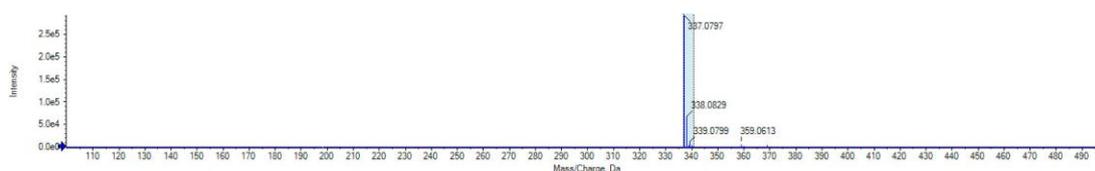


Figura 36. Massas de alta resolução [HR-ESI(+)-MS] para **BTD(CCPH)₂** protonada.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 36) forneceu o pico de íon molecular correspondente a m/z [M + H⁺] 337,0797; sendo m/z [M + H⁺] 337,0794 calculado. Foram determinados também as abundâncias relativas que permitiram confirmar a fórmula molecular como C₂₂H₁₂N₂S.

A estrutura molecular, bem como os espectros de ¹H e ¹³C RMN de expandidos do composto **BTD(CCPH)₂** são apresentados nas Figuras 37 – 41.

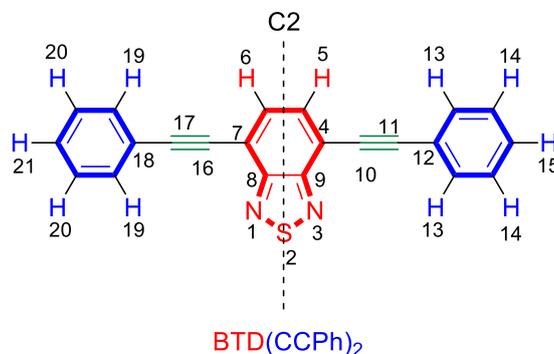


Figura 37. Estrutura molecular do composto **BTD(CCPH)₂** com seus respectivos carbonos e hidrogênios identificados, onde C2 corresponde ao eixo de simetria.

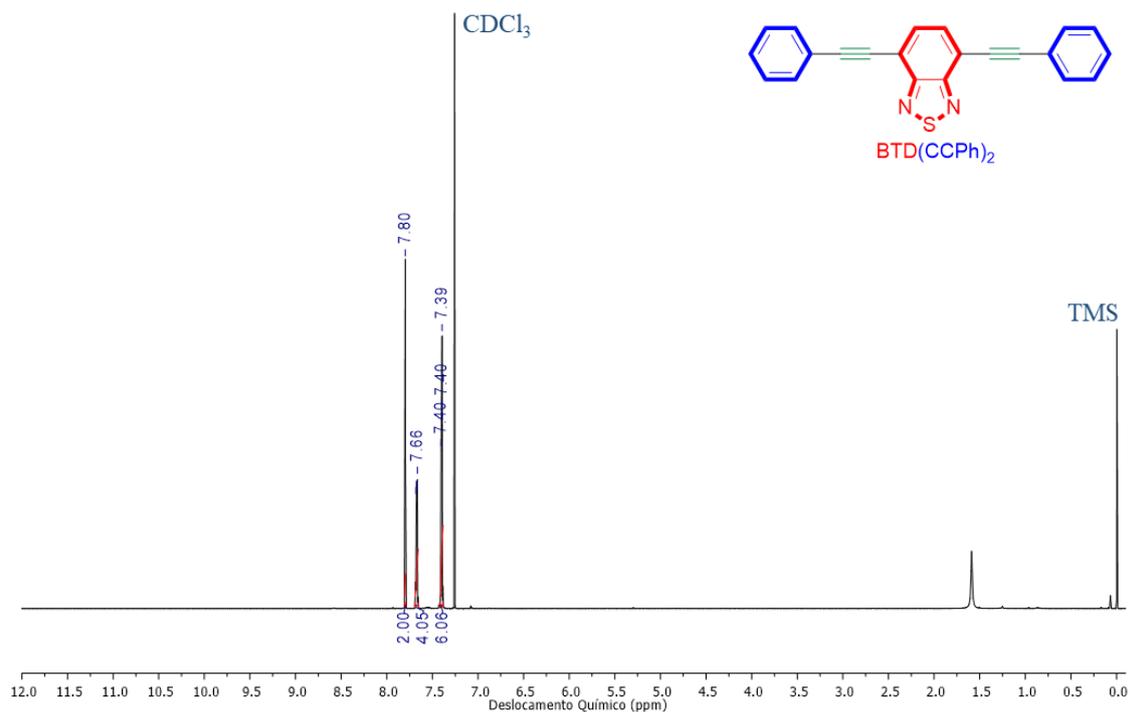


Figura 38. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto $\text{BTD}(\text{CPh})_2$.

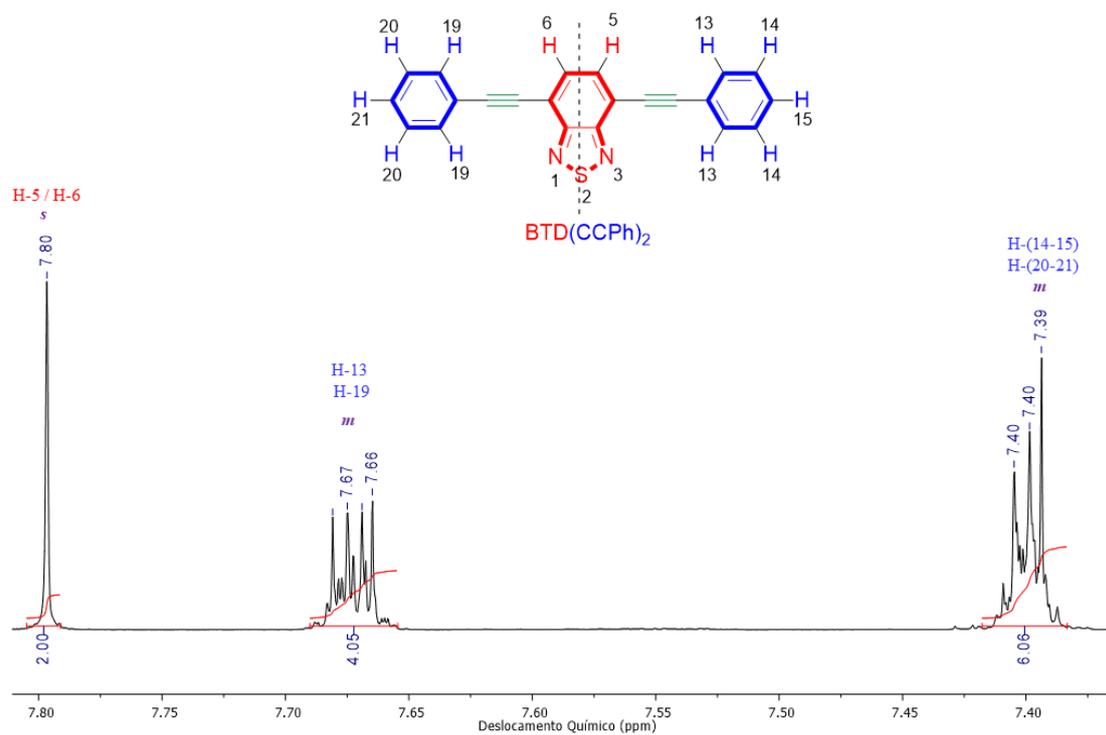


Figura 39. Expansão da região aromática do espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto $\text{BTD}(\text{CPh})_2$.

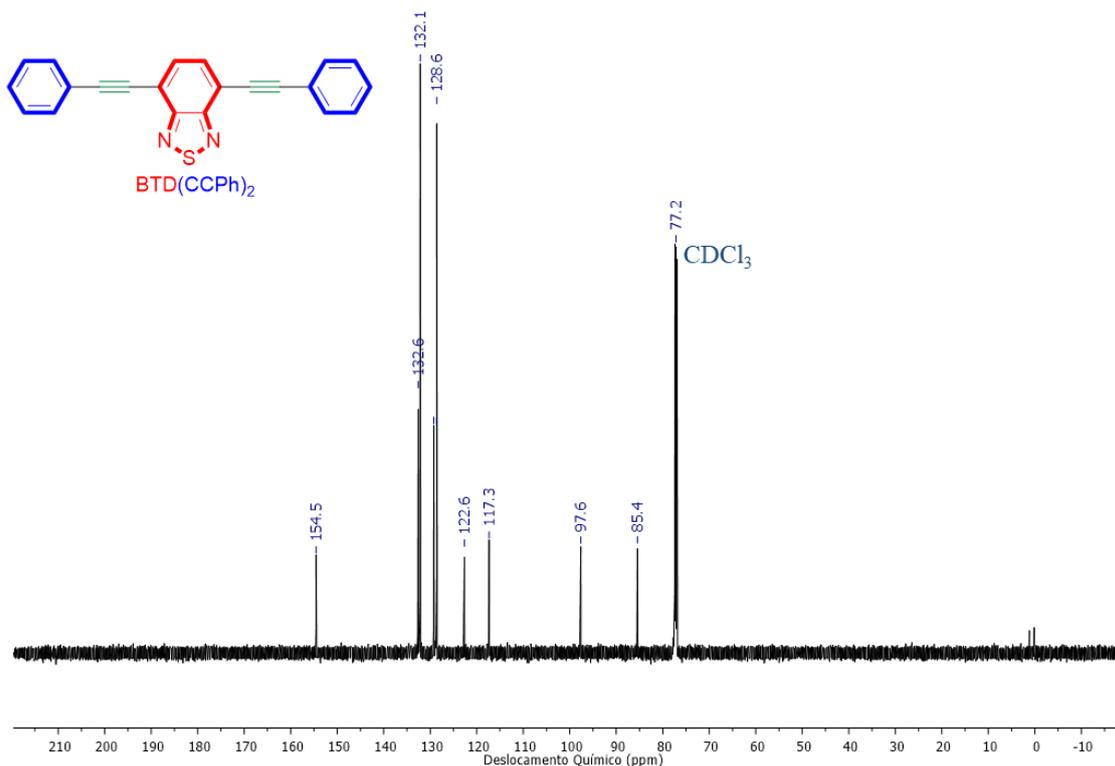


Figura 40. Espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto $\text{BTD}(\text{CPh})_2$.

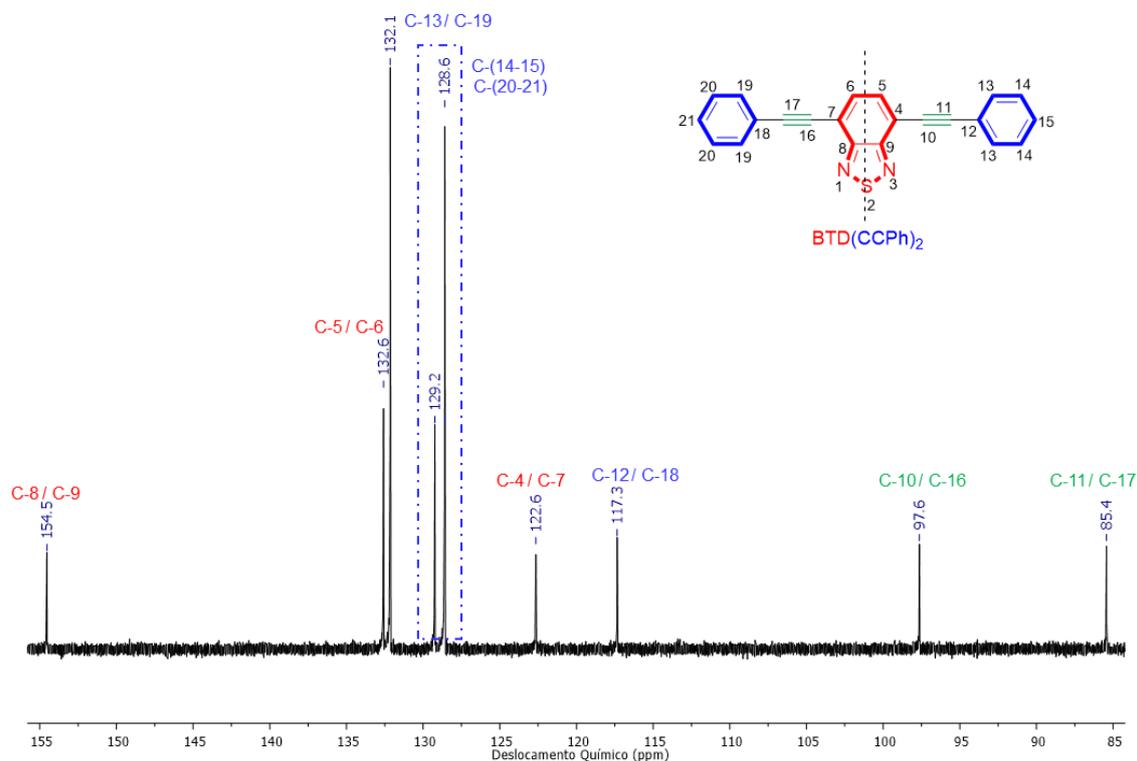


Figura 41. Expansão do espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto $\text{BTD}(\text{CPh})_2$.

Ao analisar a estrutura molecular de $\text{BTD}(\text{CPh})_2$ (Figura 37), percebe-se que a estrutura tem um plano de simetria na parte central do núcleo BTD, o que é esperado,

visto que foi acoplado o mesmo substituinte na posição 4 e 7 do núcleo. Outro plano de simetria também é identificado nos anéis aromáticos dos substituintes.

Dessa forma, os dois hidrogênios presentes no núcleo BTD (H-5 e H-6 na Figura 37) e anéis aromáticos (H-13 e H-19; H-14 e H-20; H-15 e H-21 na Figura 37) são equivalentes. São observados também equivalência entre os carbonos presentes no núcleo (C-4 e C-7; C-5 e C-6; C-8 e C-9 na Figura 37), os carbonos aromáticos (C-12 e C-18; C-13 e C-19; C-14 e C-20; C-15 e C-21 na Figura 37) e os carbonos dos espaçadores π C \equiv C (C-10 e C-16; C-11 e C-17 na Figura 37).

Foi demonstrado que as BTDs formam preferencialmente estruturas quinoidais (Figuras 12 e 13).⁵⁵ Contudo, os deslocamentos químicos referentes aos seus hidrogênios comumente são identificados na região referente aos compostos aromáticos,⁵⁹⁻⁹² entre 7,00 a 8,50 ppm do espectro ^1H RMN, por se tratar de um sistema policíclico insaturado de elétrons π deslocalizados. Esse comportamento pode ser devido ao efeito de anisotropia magnética, que juntamente com o efeito de eletronegatividade do grupo triazol (N-S-N) do núcleo levam aos deslocamentos químicos dos sinais no espectro de ^1H RMN.^{55, 197}

Dessa forma, devido à ausência de hidrogênios alifáticos, são esperados que todos os sinais de ^1H RMN sejam identificados na região aromática do espectro, como pode ser observado nas figuras 38 e 39. Para as atribuições desses sinais, foram realizadas comparações com dados da literatura. O mesmo sendo realizado no espectro de ^{13}C RMN (figuras 40 e 41).¹⁸⁰⁻¹⁸³

Para confirmar a estrutura, e corroborar com os espectros de RMN, foram realizadas análises de raios X de monocristal.¹ Os resultados obtidos são demonstrados abaixo na Figura 42 e Tabela 4, confirmando a estrutura do composto de interesse. As distâncias (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligações foram comparados com dados da literatura.¹⁸²

¹ Todas as análises de Raios X de monocristal foram realizadas pela professora Dr^a Claudia Gatto no Instituto de Química na UnB.

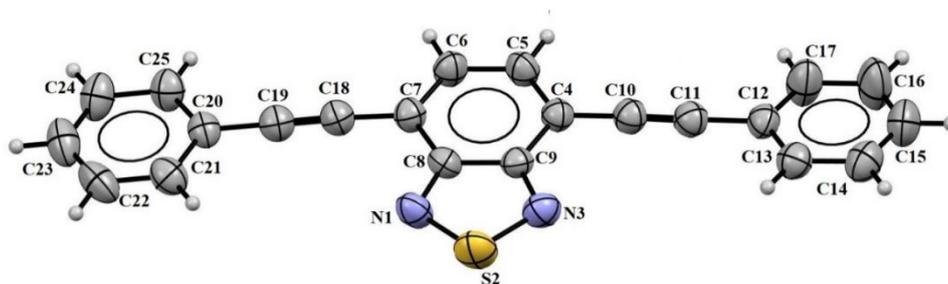


Figura 42. Estrutura molecular de **BTD(CCPH)₂** a partir da análise de raios X de monocristal mostrando a numeração de átomos (50% de probabilidade).

Tabela 4. Dados obtidos por difração de raios X e parâmetros refinados para **BTD(CCPH)₂**.

	BTD(CCPH)₂
Fórmula Química	C ₂₂ H ₁₂ N ₂ S
M (g mol ⁻¹)	336,40
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Cela Unitária	
<i>a</i> (Å)	12,055(2)
<i>b</i> (Å)	10,673(2)
<i>c</i> (Å)	13,426(2)
β	97,826(3)
<i>V</i> (Å ³)	1711,5(4)
<i>Z</i>	4
Dc /g.cm ⁻³	1,306
Índice de Varredura	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14 -12 ≤ <i>k</i> ≤ 12 -16 ≤ <i>l</i> ≤ 16
Coeficiente de Absorção /mm ⁻¹	0,194
Correção de Absorção	multi-scan
Max/min transmissão	0,93 / 0,85
Reflexões medidas	38593
Reflexões independentes / R _{int}	3145 / 0,0746
Parâmetros refinados	227
R1 (F) / wR2 (F ²) (I > 2s(I))	0,0448 / 0,1027
Goof	1,022
Densidade eletrônica residual (eÅ ⁻³)	0,20 and -0,34
Número de depósito CCDC	1997091

A análise de difração de raios X demonstrou que a BTD cristaliza no sistema de cristal monoclínico com quatro moléculas na unidade assimétrica. As distâncias de ligação N-S estão entre 1,610 (2) e 1,614 (3) Å, enquanto C10-C11 e C18-C19 entre 1,191 (5) Å e 1,196 (3) Å (Figura 36). O anel fenil apresenta distorção com ângulos diédricos é distorcido com ângulos diédricos de 43° com a unidade planar da BTD.

Com relação às interações intermoleculares, a estrutura cristalina dessa BTD mostrou somente uma ligação de hidrogênio intermolecular incomum entre C15-H15...C23 com distância de 2,783 Å (operação de simetria: -1+x, 1,5-y, -1/2+z).

3.2.2 Composto BTDBrCCPh

A confirmação da formação do composto **BTDBrCCPh** foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia de massas de alta resolução, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C e raios X de monocristal.

A técnica de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) com o modo de ionização positivo $[\text{M} + \text{H}^+]$ foi aplicada com o objetivo de obter o espectro de MS e a confirmação da fórmula molecular do composto **BTDBrCCPh**. O resultado é apresentado na Figura 43.

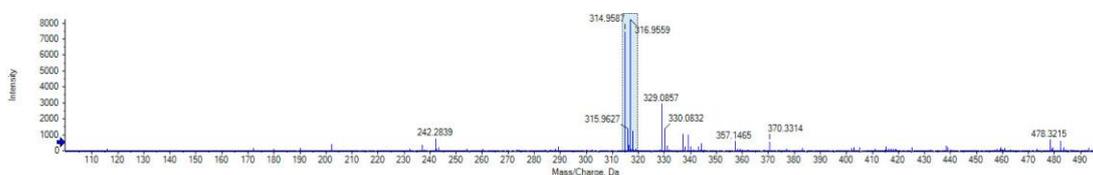


Figura 43. Massas de alta resolução [HR-ESI(+)-MS] para **BTDBrCCPh** protonada.

O espectro de massas (Figura 43) forneceu o pico de íon molecular correspondente a m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ 314,9587; sendo m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ 314,9586 o valor calculado. Como esse composto apresenta um átomo de bromo em sua estrutura, foi observado também o pico de massa $\text{M}+2$ (m/z 316,9559). A determinação das abundâncias relativas dos picos isotópicos permitiu confirmar a fórmula molecular desse composto como sendo $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{S}$.

A estrutura molecular, bem como os espectros de ^1H e ^{13}C RMN de expandidos do composto **BTDBrCCPh** são apresentados nas Figuras 44 – 48.

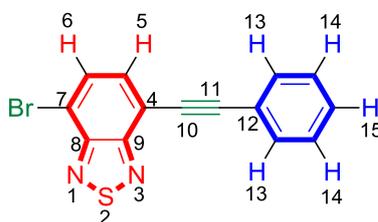


Figura 44. Estrutura molecular do composto **BTDBrCCPh** com seus respectivos carbonos e hidrogênios identificados.

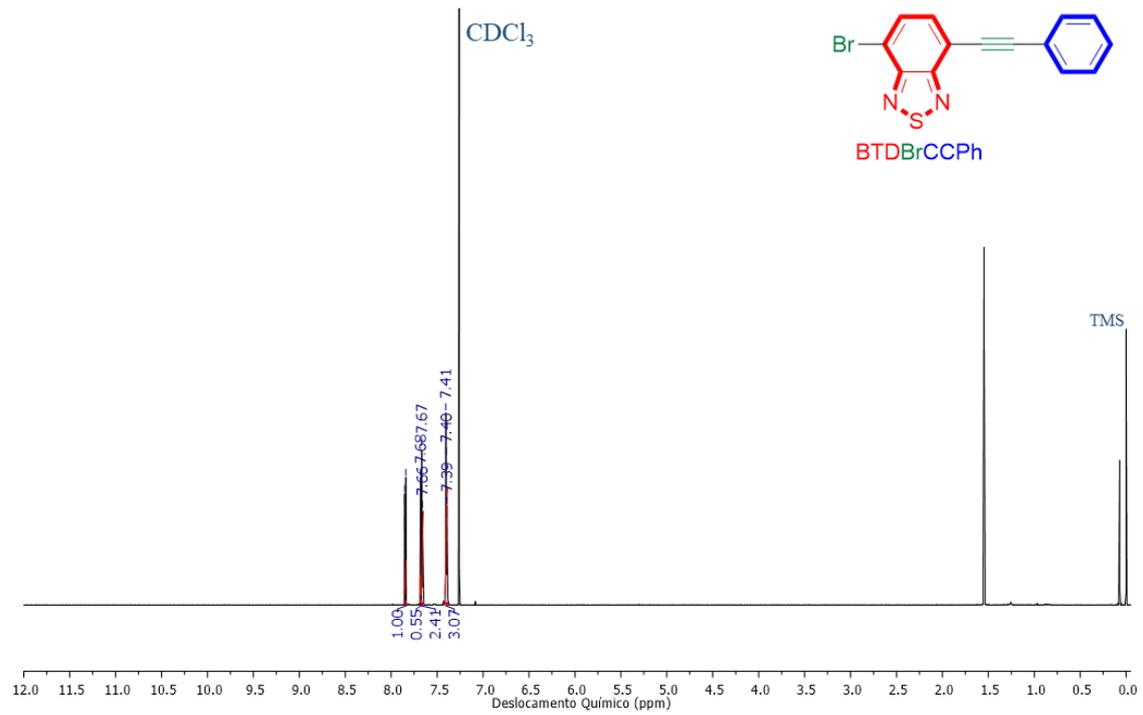


Figura 45. Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto **BTDBrCCPh**.

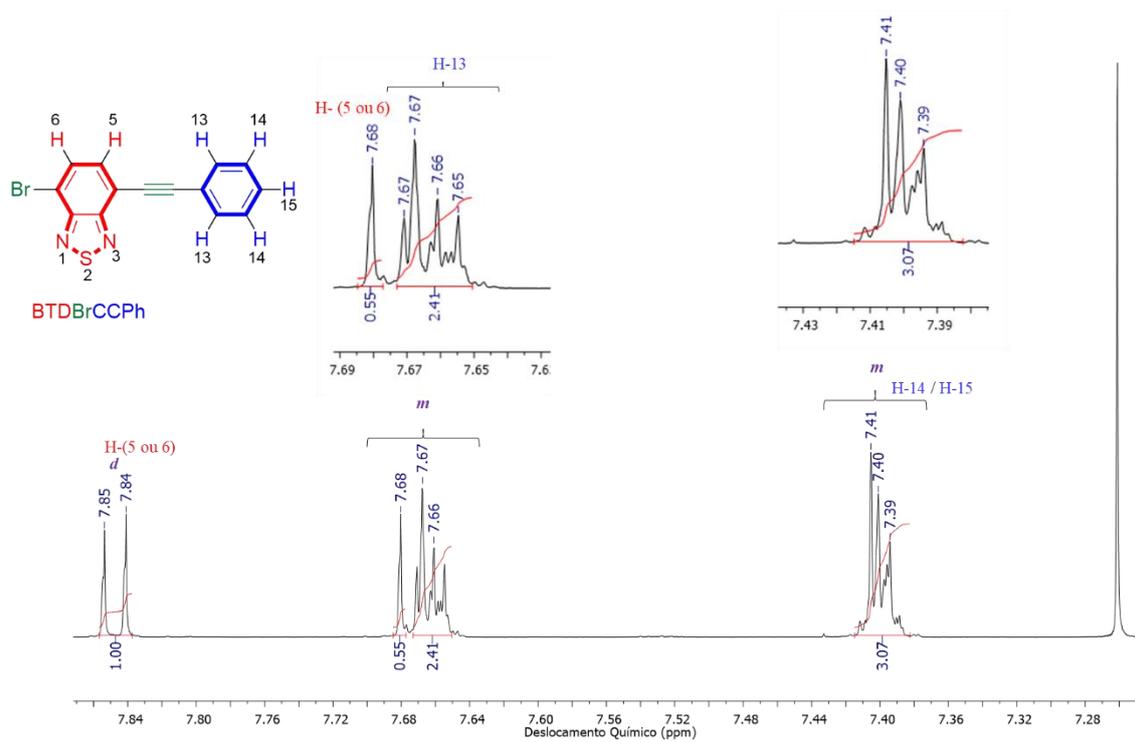


Figura 46. Expansão da região aromática do espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto **BTDBrCCPh**.

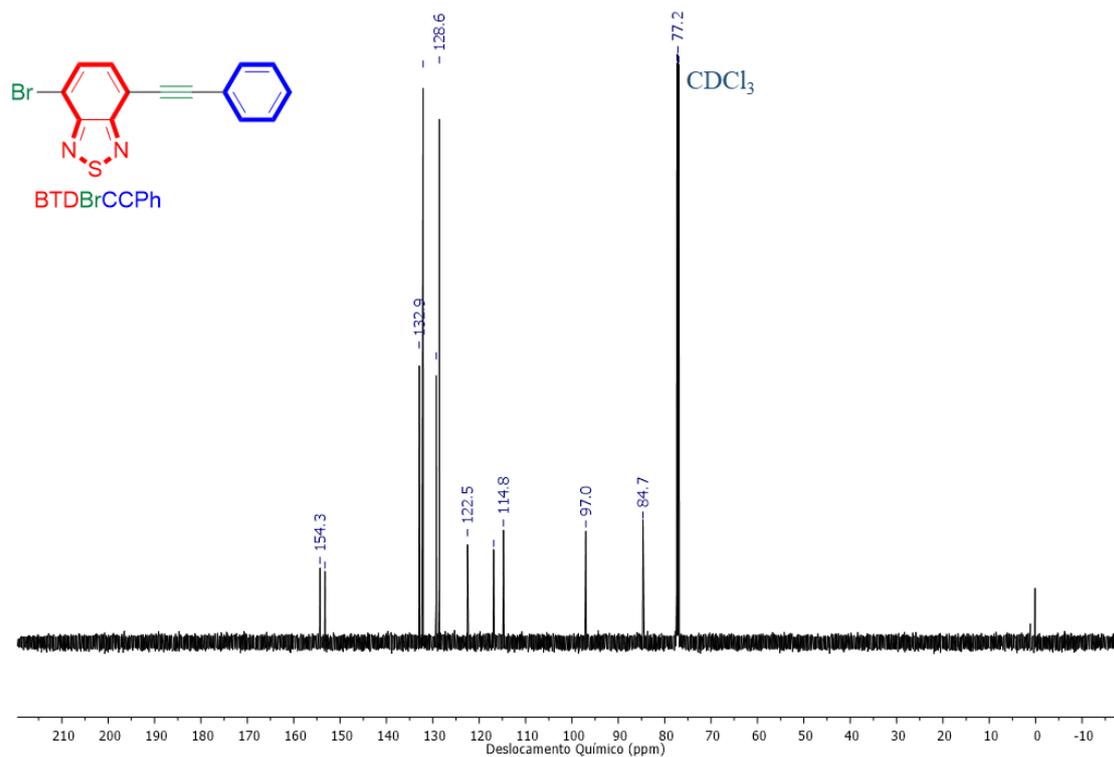


Figura 47. Espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto **BTDBrCCPh**.

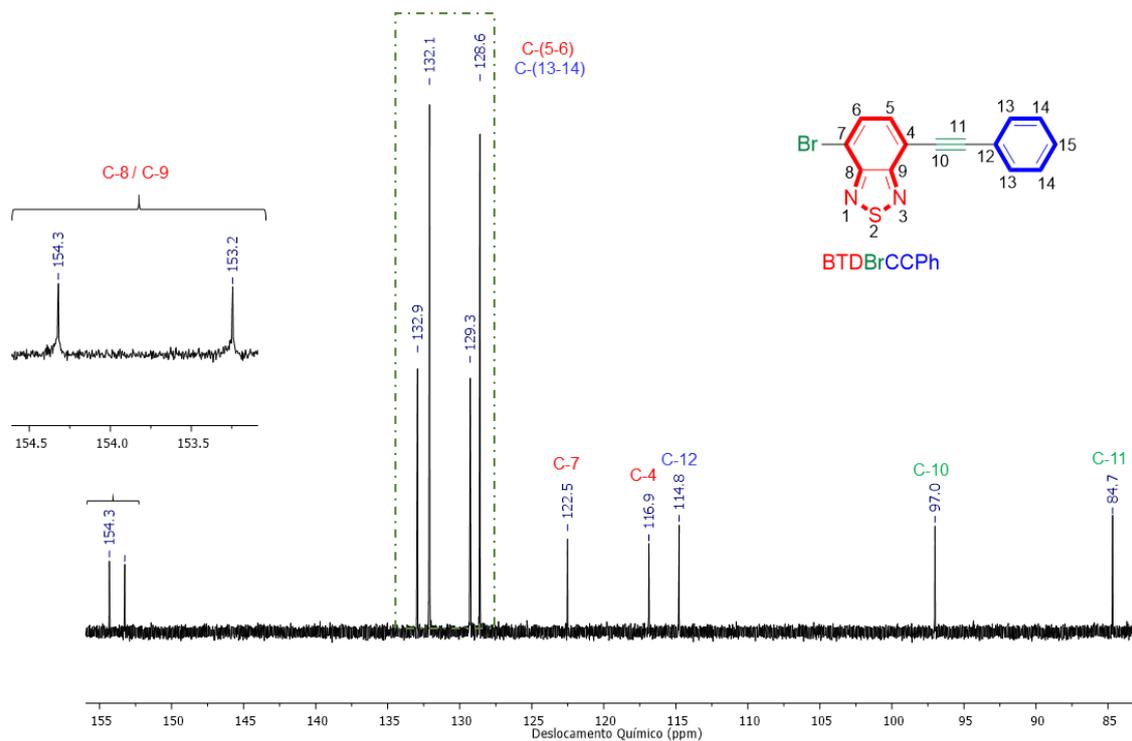


Figura 48. Expansão da região aromática do espectro de ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3) do composto **BTDBrCCPh**.

Ao analisar a estrutura molecular de **BTDBrCCPh** (Figura 44), nota-se que os dois hidrogênios presentes no núcleo BTB não são equivalentes (H-5 e H-6), devido à ausência

de plano de simetria. O anel aromático, por outro lado, apresenta plano de simetria de forma que podem haver alguns hidrogênios equivalentes (H-(13 a 15)). Não há hidrogênios alifáticos.¹⁹⁷ Como foi anteriormente descrito, espera-se que todos os sinais de hidrogênios, tanto do núcleo BTB quanto do anel aromático, sejam identificados na região entre 7,00 a 8,50 ppm, relativo à região dos aromáticos.^{53, 74-96, 197}

Com relação ao espectro de carbono, espera-se identificar sinais relativos ao espaçador π C \equiv C na região alifática do espectro¹⁹⁷ e sinais na região 150 a 155 ppm, que comumente são atribuídos aos carbonos quaternários do núcleo BTB devido ao forte efeito de desblindagem pelo grupo fortemente retirador de elétrons triazol (**N-S-N**).^{74-96,179-182}

Ao comparar os espectros de ¹H obtidos para BTDBrCCPh (Figuras 41 e 42) com os espectros de ¹H RMN dos materiais de partida (Figuras 34 e 35), nota-se que todos os sinais são diferentes. Portanto, é o primeiro indicativo de que se trata do espectro de um composto diferente.

Ao analisar o espectro de ¹H RMN na Figura 42 detalhadamente, foram observados um sinal na forma de duplete próximo de 8,00 ppm (região mais deslocado do espectro) e outro sinal na forma de multiplete em 7,68 ppm que podem ser atribuídos aos dois hidrogênios não equivalentes do núcleo BTB. Provavelmente trata-se do H-(5 ou 6) (Figura 46), por serem os hidrogênios mais próximos ao bromo (-Br) ligado ao carbono 7 do núcleo BTB (Figuras 44 e 46), o que tornam esses hidrogênios os mais desblindados da estrutura molecular. O desdobramento desse sinal em um duplete (~8,00 ppm) pode ser atribuído ao outro hidrogênio adjacente do núcleo BTB (H-(5 ou 6), Figura 46).

Observam-se ainda outros dois sinais correspondentes a multipletos em 7,68 – 7,65 ppm (integral 3) e 7,41 – 7,39 ppm (integral 3) relacionados provavelmente aos hidrogênios do anel aromático e ao outro hidrogênio não equivalente do núcleo BTB (H-(5 ou 6), Figura 46).

No espectro de ¹³C RMN (Figura 48), percebe-se dois sinais importantes em regiões mais deslocadas do espectro (153,2 e 154,3 ppm, Figura 48). Esses sinais são comumente atribuídos aos carbonos quaternários do núcleo BTB devido ao forte efeito de desblindagem pelo grupo fortemente retirador de elétrons triazol (**N-S-N**)^{74-96, 179-182} presente na estrutura desse núcleo (Figuras 11 e 44).

Portanto, os sinais 153,2 e 154,3 ppm (Figura 48) foram atribuídos aos dois carbonos quaternários do núcleo (C-8 e C-9, Figura 44). Os dois outros sinais relativos também a carbonos quaternários (84,7 ppm e 97,0 ppm), ambos localizados na região alifática do

espectro relativo aos alcinos,¹⁹⁷ foram atribuídos aos carbonos ao grupo C≡C do espaçador π (C-10 e C-11, Figura 44).

Para confirmar a estrutura e corroborar com os espectros de RMN, foram realizadas análises de raios X de monocristal. Os resultados obtidos são demonstrados abaixo na Figura 49 e Tabela 5, confirmando a estrutura do composto de interesse.

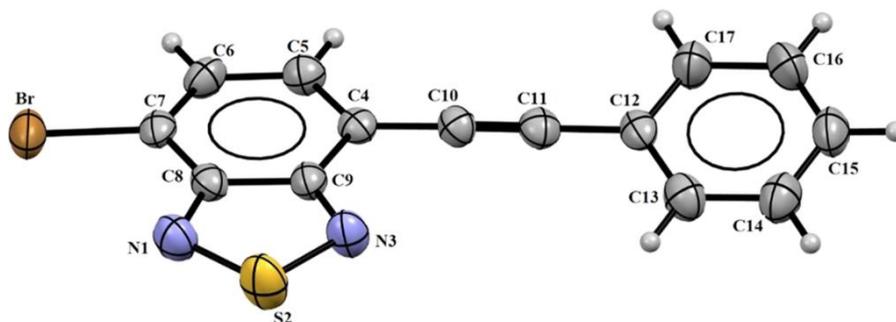


Figura 49. Estrutura molecular de **BTDBrCCPh** a partir da análise de raios X de monocristal mostrando a numeração de átomos (50% de probabilidade).

Tabela 5. Dados obtidos por difração de raios X e parâmetros refinados para **BTDBrCCPh**.

	BTDBrCCPh
Fórmula Química	C ₁₄ H ₇ BrN ₂ S
M (g mol ⁻¹)	315,19
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>P2₁/n</i>
Cela Unitária	
<i>a</i> (Å)	13,453(3)
<i>b</i> (Å)	4,844(2)
<i>c</i> (Å)	19,075(5)
β	99,076(5)
<i>V</i> (Å ³)	1227,6(6)
<i>Z</i>	4
<i>D_c</i> /g.cm ⁻³	1,705
Índice de Varredura	-16 ≤ <i>h</i> ≤ 16 -5 ≤ <i>k</i> ≤ 5 -23 ≤ <i>l</i> ≤ 22
Coefficiente de Absorção /mm ⁻¹	3,498
Correção de Absorção	multi-scan
Max/min transmissão	0,66 / 0,45
Reflexões medidas	26586
Reflexões independentes / <i>R_{int}</i>	2268 / 0.1024
Parâmetros refinados	164
<i>R</i> 1 (<i>F</i>) / <i>wR</i> 2 (<i>F</i> ²) (<i>I</i> > 2 <i>s</i> (<i>I</i>))	0,0361 / 0,0783
Goof	1.052
Densidade eletrônica residual (eÅ ⁻³)	0,44 e -0,47
Número de depósito CCDC	1997090

De acordo com os dados anteriormente demonstrados, a **BTDBrCCPh** cristaliza no sistema de cristal monoclínico com quatro moléculas na unidade assimétrica. Observa-se também que as distâncias das ligações N-S estão entre 1,610(2) e 1,614(3) Å, enquanto

C10-C11 e C18-C19 estão entre 1,191(5) - 1,196(3) Å. Já os anéis fenil têm ângulos diédricos de 44,5° em comparação com a unidade planar de BTD.

Na Figura 50 são apresentados os resultados referentes as interações intermoleculares na estrutura cristalina da **BTDBrCCPh** usando operações de simetria “-x, 2-y, 1-z”.

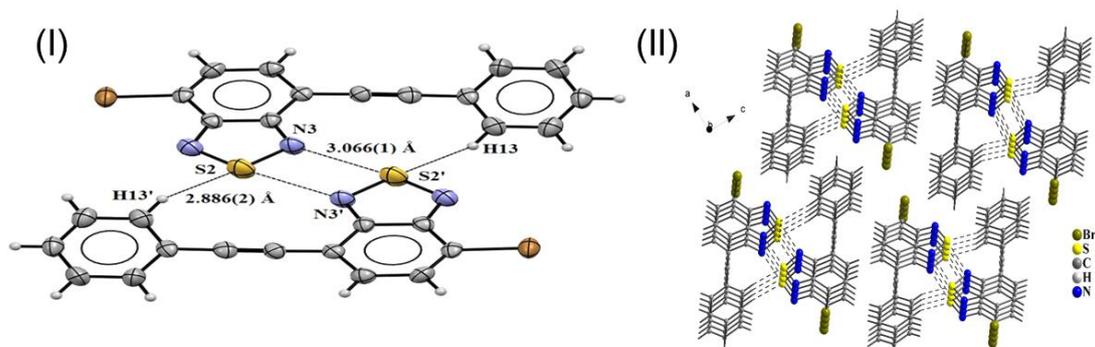


Figura 50. Composto **BTDBrCCPh**: (I) Interações intermoleculares (linhas pontilhadas) para formar uma estrutura semelhante ao dímero (operações de simetria: -x, 2-y, 1-z); (II) (operações de simetria: -x, 2-y, 1-z). (III) Canais e interações intermoleculares (linhas pontilhadas) visualizados ao longo do eixo b.

Foram observadas interações intermoleculares incomuns como consequência das propriedades altamente polarizadas do núcleo BTB, proporcionando uma estrutura semelhante ao dímero (I, Figura 50). Uma interação eletrostática entre $N \cdots S$ é observada com uma distância $N3 \cdots S2$ de 3,066(1) Å (operação de simetria: -x, 2-y, 1-z).

Este composto também foi estabilizado pela ligação intermolecular de hidrogênio entre $C13-H13 \cdots S2$ [$d(H \cdots S) = 2,866(2)$ Å, $d(C \cdots S) = 3,715(2)$ Å, $\angle(C13-H13 \cdots S2) = 149,12(2)^\circ$]. A análise de empacotamento do **BTDBrCCPh** também revelou que a estrutura está organizada através de canais (II, Figura 50).

3.2.3 Composto **BTDCCPH**

A confirmação da formação do composto **BTDCCPH** foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia de massas de alta resolução e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (1H e APT ^{13}C), além dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC.

A técnica de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) com o modo de ionização positivo foi aplicada com o objetivo de obter o espectro de MS e confirmação da fórmula molecular do composto **BTDCCPH**. Os resultados são apresentados na Figura 51.

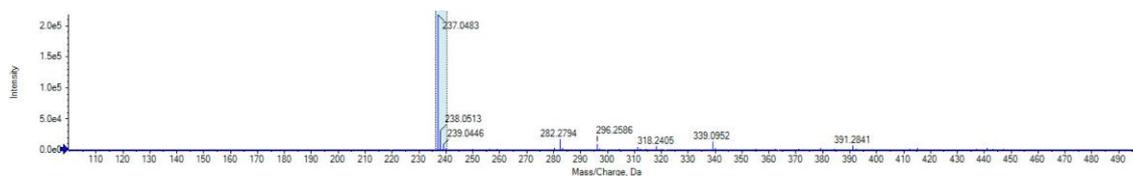


Figura 51. Massas de alta resolução [HR-ESI(+)-MS] para BTDCCPh protonada.

O espectro de massas (Figura 51) forneceu o pico de íon molecular correspondente a m/z $[M + H^+]$ 237,0483; sendo m/z $[M + H^+]$ 237,0481 calculado. Foram determinados também as abundâncias relativas que permitiram confirmar a fórmula molecular como sendo $C_{14}H_8N_2S$.

A estrutura molecular, bem como os espectros de 1H e APT ^{13}C RMN do composto **BTDCCPh** são apresentados nas Figuras 52 – 56.

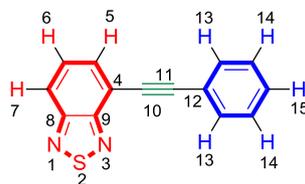


Figura 52. Estrutura molecular do composto **BTDCCPh** com seus respectivos carbonos e hidrogênios.

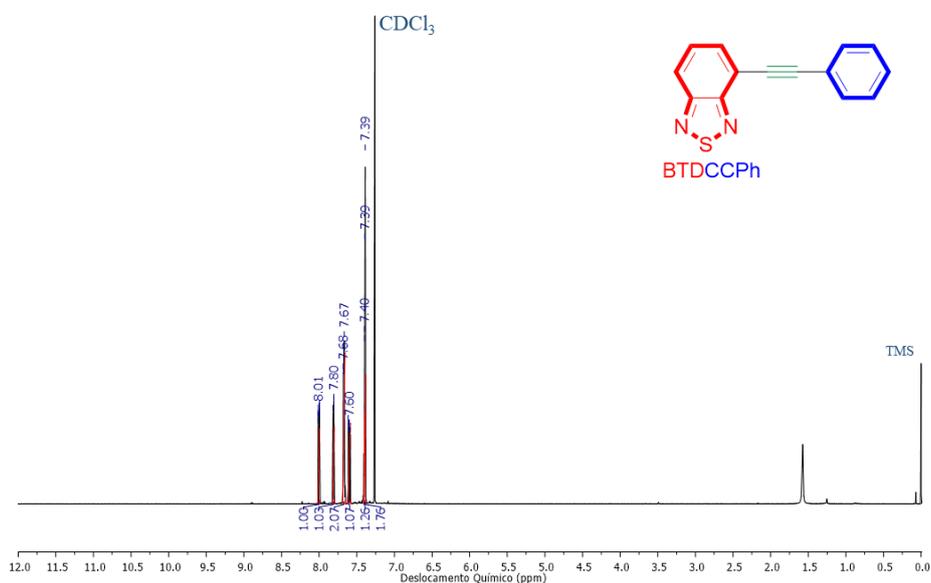


Figura 53. Espectro de 1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) do composto **BTDCCPh**.

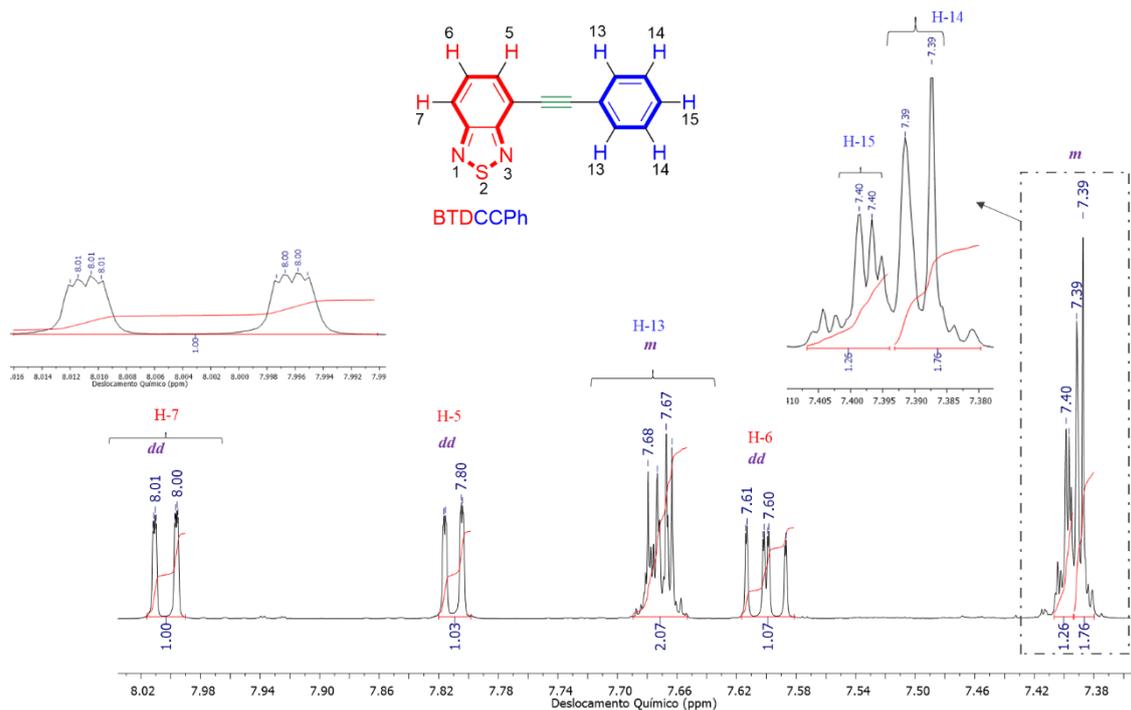


Figura 54. Expansão da região aromática do espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH.

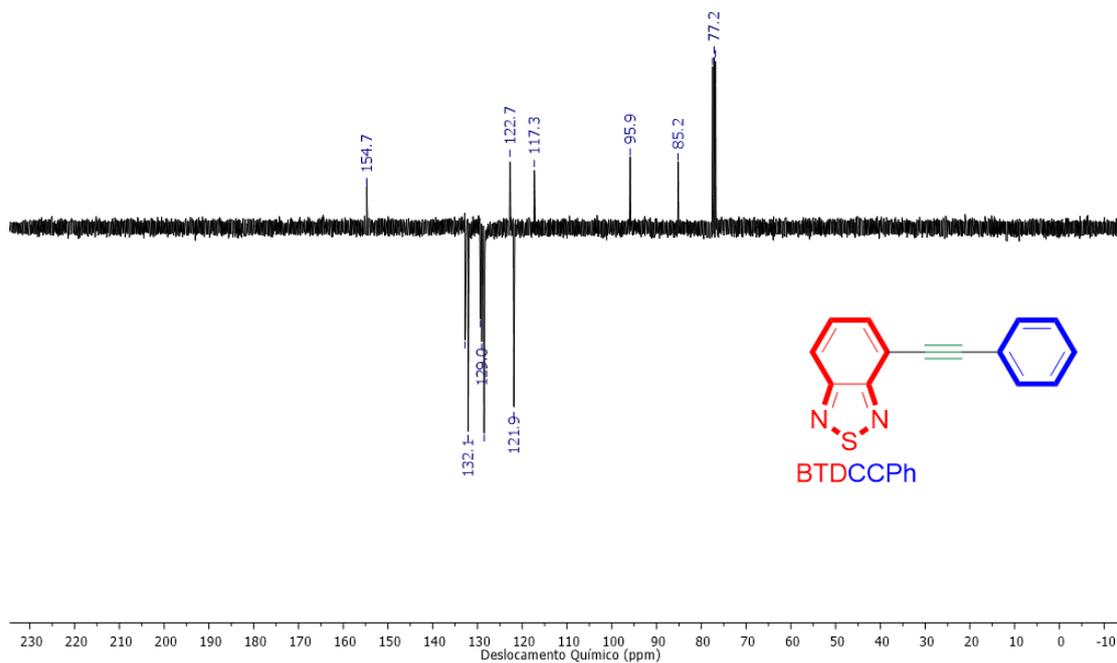


Figura 55. Espectro de APT ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH.

a multipletos em 7,69-7,66 ppm (integral 2) e 7,41-7,38 ppm (integral 3) relacionados provavelmente aos hidrogênios do anel aromático.

O espectro de APT ^{13}C RMN é mostrado na Figura 55. No experimento APT é possível identificar todos os carbonos presentes no composto, tanto os protonados (CH_3 , CH_2 e CH) quanto os não-protonados (carbonos quaternários – Cq), além de permitir caracterizar o C-7 do núcleo BTd. Nesses tipos de espectros os sinais referentes aos grupos CH_2 e Cq saem na parte de cima do espectro, enquanto os sinais CH e CH_3 saem para baixo.¹⁹⁷

Ao analisar a estrutura da **BTdCCPh** (Figura 52), nota-se que há somente grupos CH e Cq, sendo alguns destes equivalentes devido ao plano de simetria no anel aromático do substituinte fenilacetileno.

A partir da análise da Figura 56, percebe-se sinais importantes em regiões mais deslocadas do espectro (~ 155 ppm), característicos de sinais de carbonos quaternários do núcleo BTd.^{65,70, 180-183} Logo, foram atribuídos aos dois carbonos quaternários do núcleo (C-8 e C-9). Os dois outros sinais relativos também a carbonos quaternários (85,2 ppm e 95,9 ppm), ambos localizados na região espectro referente aos alcinos,¹⁹⁷ foram atribuídos aos carbonos quaternários do espaçador $\text{C}\equiv\text{C}$ (C-10 e C-11, Figura 56).

As atribuições desses e demais sinais puderam ser confirmadas através de análises bidimensionais HSQC (Figuras 57 e 58) e HMBC (Figuras 59 – 60 e Tabela 6), que serão discutidas adiante.

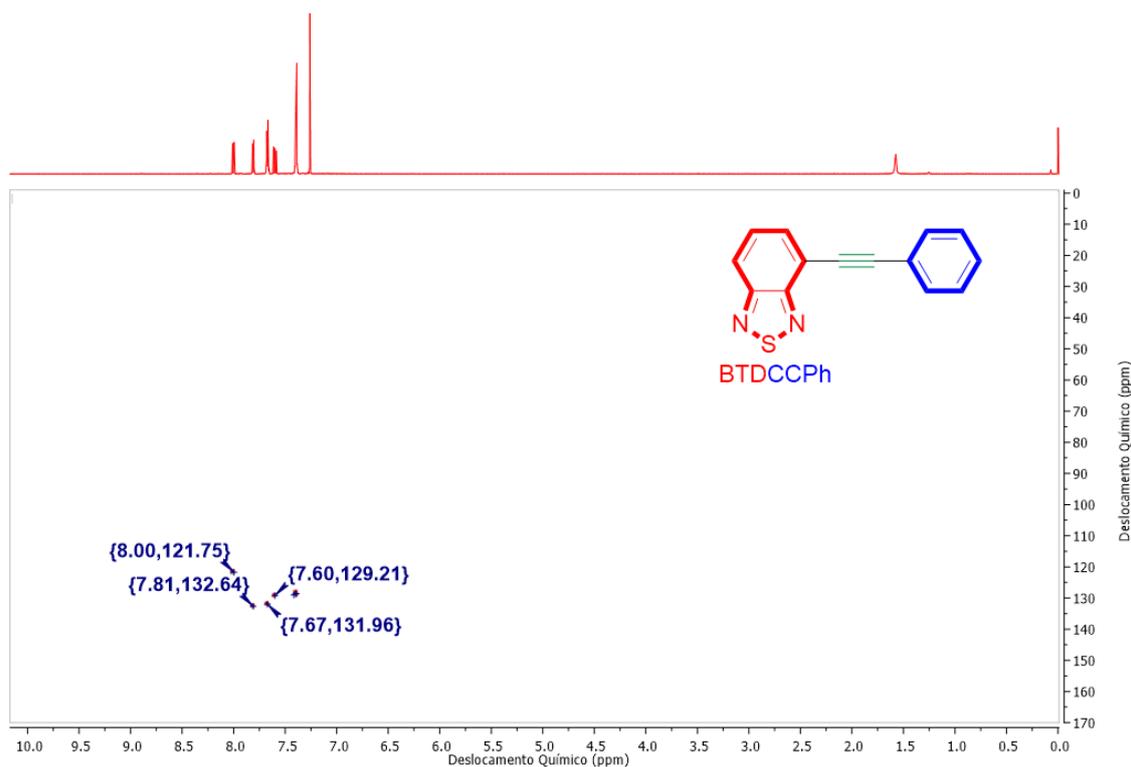


Figura 57. Espectro de HSQC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto **BTDCCPH**.

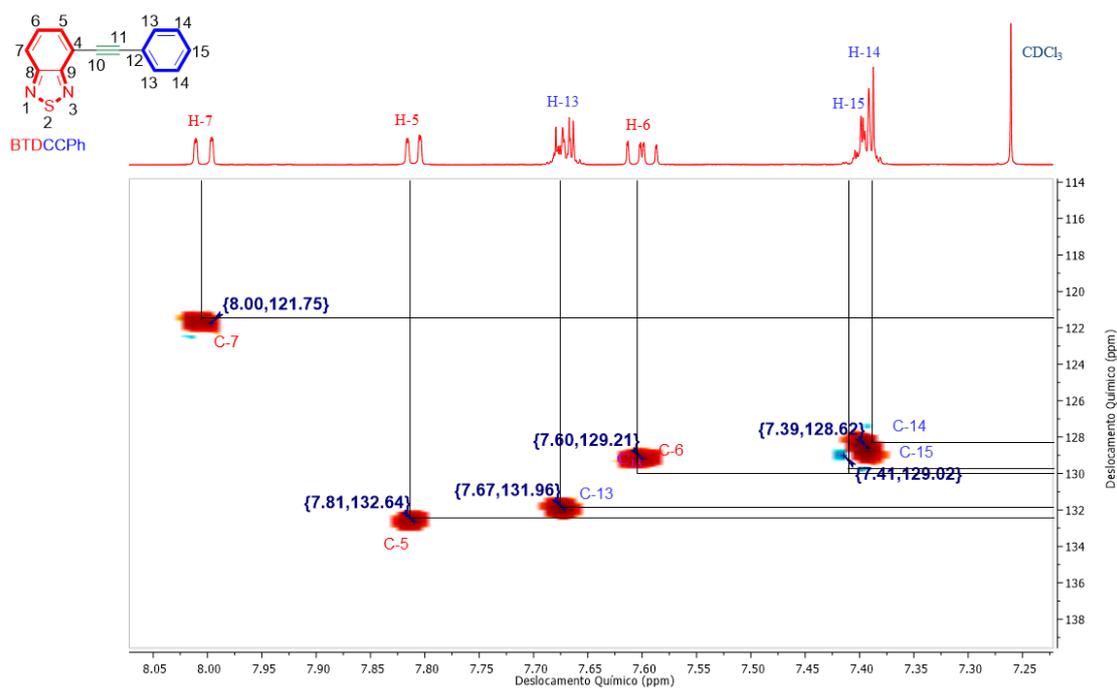


Figura 58. Expansão do espectro de HSQC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto **BTDCCPH**.

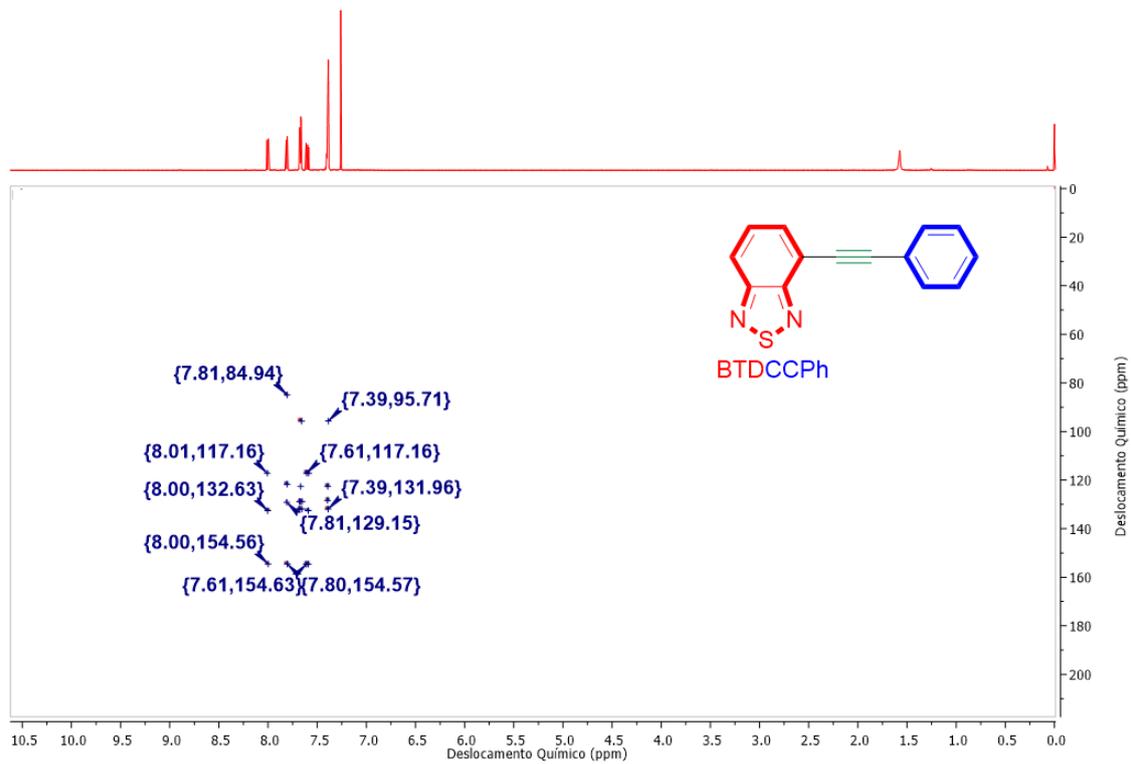


Figura 59. Espectro de HMBC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH.

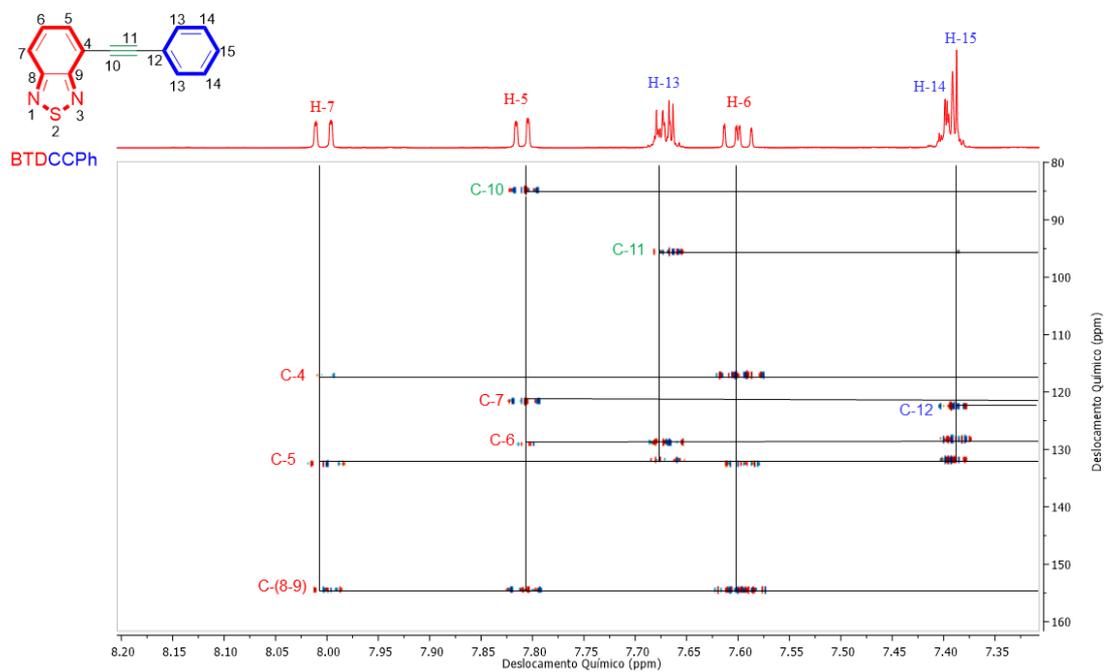


Figura 60. Expansão do espectro de HMBC 2D-RMN (600 MHz, CDCl_3) do composto BTDCCPH.

Tabela 6. Correlações heteronucleares ^1H vs ^{13}C observadas no espectro bidimensional HMBC do composto **BTDCCPH**.

Posição do Hidrogênio	δ ^1H (ppm)	Integração	Posição do Carbono	δ ^{13}C (ppm)
H-5	7,80	1	C-6	129,0
H-5	7,80	1	C-7	121,9
H-5	7,80	1	C-(8-9)	154,7
H-5	7,80	1	C-10	85,2
H-6	7,59 – 7,61	1	C-4	117,3
H-6	7,59 – 7,61	1	C-5	132,8
H-6	7,59 – 7,61	1	C-8	154,7
H-7	8,00	1	C-4	117,3
H-7	8,00	1	C-5	132,8
H-7	8,00	1	C-(8-9)	154,7
H-13	7,66 – 7,68	2	C-11	95,9
H-15	7,40	1	C-12	122,9
H-15	7,40	1	C-13	132,1
H-15	7,40	1	C-14	128,5

Pela análise de RMN bidimensional heteronuclear HSQC do composto **BTDCCPH** (Figura 58), que correlaciona $^1J_{\text{H-C}}$,¹⁹⁷ foi possível distinguir os sinais referentes ao grupo CH presentes tanto no núcleo BTDC quanto no anel aromático do substituinte (fenilacetileno).

Após a análise do mapa de contornos HMBC (Figura 60 e Tabela 6), que estabelece a correlação entre heteronúcleos H-C de 2 a 4 ligações de distância ($^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$, $^4J_{\text{CH}}$) e recorrendo a análise das conectividades, foi possível diferenciar as posições dos hidrogênios e correlacionar com a localização de carbonos quaternários.

3.3 Propriedades Fotofísicas

3.3.1 Efeito Solvatocrômico

Os três derivados fluorescentes sintetizados tiveram suas propriedades fotofísicas investigadas através de análises de espectrofotometria e espectrofluorimetria em diferentes solventes. Os dados são apresentados na Tabela 7 e Figura 61. Na tabela 8 são apresentados os valores do parâmetro empírico dos solventes, E_T^N , proposto por Reichardt^{198,199} utilizados para a avaliação do efeito dos solventes na posição do deslocamento de Stokes.

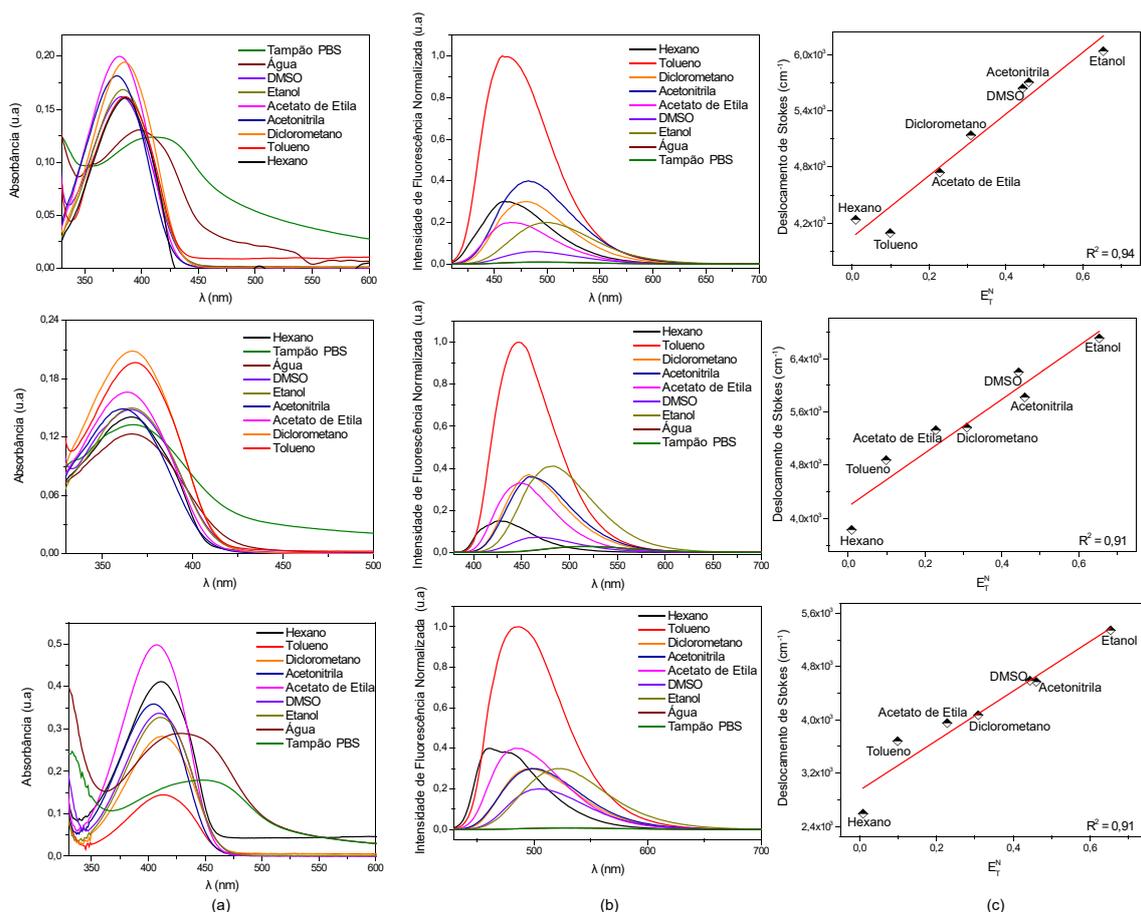


Figura 61. (a) Espectros de UV-Vis; (b) Espectros de emissão de fluorescência e (c) efeito solvatoacrômico das BTDBs sintetizadas em solventes de diferentes polaridades. De cima para baixo: **BTDBrCCPh**, **BTDCCPH** e **BTDC(Ph)₂**. Todas as análises foram realizadas em soluções de 10 µM.

Tabela 7. Dados UV-VIS e emissão de fluorescência (em diferentes solventes) para as estruturas sintetizadas. Concentração de 10 µM para todas as análises.

Composto	Solvente	λ_{max} (abs) (nm)	log (ϵ)	λ_{max} (em) (nm)	Deslocamento de Stokes (nm/cm ⁻¹)
BTDBrCCPh	Hexano	385	4,20	460	75 / 4235
	Tolueno	385	4,21	457	72 / 4092
	Diclorometano	385	4,29	480	95 / 5141
	Acetonitrila	378	4,26	482	104 / 5708
	Acetato de Etila	381	4,30	465	84 / 4741
	DMSO	382	4,21	487	105 / 5644
	Etanol	384	4,23	500	116 / 6042
	Água	398	4,29	495	97 / 4924
	Tampão PBS	426	4,17	500	74 / 3474
BTDCCPH	Hexano	367	4,29	427	60 / 3829
	Tolueno	367	4,15	447	80 / 4877
	Diclorometano	367	4,32	457	90 / 5366
	Acetonitrila	361	4,17	457	96 / 5819
	Acetato de Etila	363	4,22	450	87 / 5326
	DMSO	364	4,17	470	106 / 6196
	Etanol	366	4,18	485	119 / 6704
	Água	369	4,35	517	148 / 7758
	Tampão PBS	365	4,12	512	147 / 7866
BTDC(Ph)₂	Hexano	411	4,61	460	49 / 2592
	Tolueno	413	4,16	487	74 / 3679
	Diclorometano	412	4,45	495	83 / 4070
	Acetonitrila	405	4,55	497	92 / 4571
	Acetato de Etila	407	4,70	485	78 / 3951
	DMSO	410	4,53	505	95 / 4588
	Etanol	410	4,51	525	115 / 5343
	Água	430	4,46	527	97 / 4280
	Tampão PBS	447	4,25	530	83 / 3503

Tabela 8. Valores de E_T^N utilizados para os diferentes solventes e os respectivos valores de R^2 encontrados para os compostos $\text{BTD}(\text{CCPh})_2$, BTDCCPH e BTDBrCCPh .

BTD	Solvente	E_T^N	Deslocamento de Stokes (cm^{-1})	R^2
$\text{BTD}(\text{CCPh})_2$	Hexano	0,009	2592	0,91
	Tolueno	0,099	3679	
	Diclorometano	0,309	4070	
	Acetonitrila	0,46	4571	
	Acetato de Etila	0,228	3951	
	DMSO	0,444	4588	
	Etanol	0,654	5343	
BTDCCPH	Hexano	0,009	3829	0,91
	Tolueno	0,099	4877	
	Diclorometano	0,309	5366	
	Acetonitrila	0,46	5819	
	Acetato de Etila	0,228	5326	
	DMSO	0,444	6196	
	Etanol	0,654	6704	
BTDBrCCPh	Hexano	0,009	4235	0,94
	Tolueno	0,099	4092	
	Diclorometano	0,309	5141	
	Acetonitrila	0,46	5708	
	Acetato de Etila	0,228	4741	
	DMSO	0,444	5644	
	Etanol	0,654	6042	

Referências: 198 e 199.

As três BTDs tiveram suas bandas de energia de absorção atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ devido aos altos valores de coeficiente de extinção molar ($\log \epsilon$) na faixa de 4,17 – 4,30 (**BTDBrCCPh**), 4,12 – 4,35 (**BTDCCPH**) e 4,16 – 4,70 (**$\text{BTD}(\text{CCPh})_2$**). Os deslocamentos de Stokes indicaram uma boa estabilidade destas moléculas.

Os dados apresentados na Tabela 7 indicam também que a transferência de carga intramolecular (ICT) parece ser o processo de estabilização preferencial das transições $S_1 \rightarrow S_0$. O processo ICT pode ser estabilizado aumentando-se a polaridade do solvente.¹⁰ Para confirmar, foi avaliado o efeito solvatocrômico utilizando o parâmetro de polaridade dos solventes descritos por Reichardt (E_T^N vs cm^{-1})^{198,199} (Figura 61, c e Tabela 8).

Conforme mostrado na Figura 61 e Tabela 8, a correlação linear (valores de R^2 de 0,91-0,94) das BTDs estudadas está em concordância com um processo de estabilização do tipo ICT.⁷²⁻⁷⁴ Ressalta-se que esses dados foram obtidos sem considerar as análises fotofísicas em meio aquoso. Quando é incluído o efeito da água (Figura 62), os valores sofrem uma considerável queda de 0,91 para 0,37 (**$\text{BTD}(\text{CCPh})_2$**) e 0,94 para 0,21 (**BTDBrCCPh**). Entretanto, para a **BTDCCPH** , o valor permaneceu praticamente o mesmo, devido a maior polaridade desta molécula.

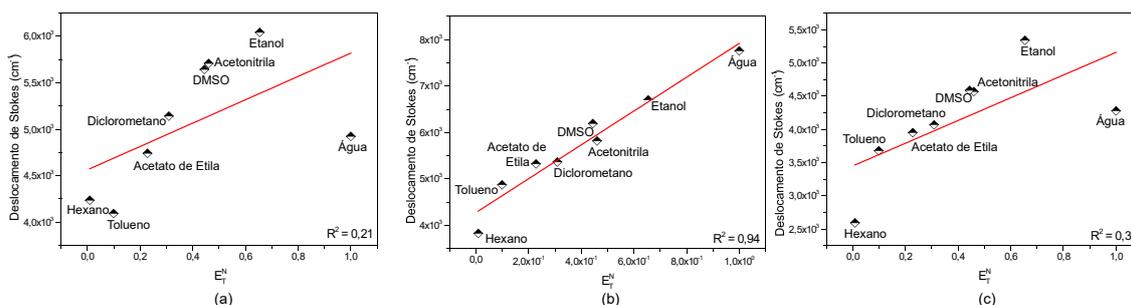


Figura 62. Efeito solvatocrômico das BTDs (10 μ M) sintetizados considerando a água como um dos solventes. Onde: (a) **BTDBrCCPh**, (b) **BTDCCPH** e (c) **BTDCCPH₂**. Onde: E_T^N (água) = 1,00.

Ao analisar a literatura disponível é possível notar que são poucas as descrições que explicam essas diferenças e que, no geral, a água não é considerada nesses tipos de análises.

Esse desvio solvatocrômico observado pode ser um indicativo da formação de nanoagregados dos compostos em água, devido ao caráter lipofílico das BTDs (Figura 63), tornando-se necessária o estudo das propriedades fluorescentes dos compostos em estado de agregação.^{1,22-26,28}

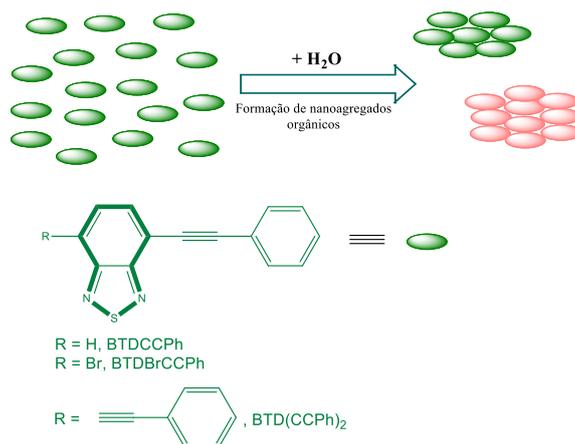


Figura 63. Formação de nanoagregados de BTDs lipofílicas em água.

3.3.2 Efeito AIEE (*Aggregation-induced Emission Enhancement*) – Estudo cinético e dinâmico

Os fluoróforos no estado agregado podem experimentar efeitos de extinção, redução ou aumento na intensidade de fluorescência.⁹⁶⁻¹⁰⁰ Dessa forma, para determinar o comportamento fluorescente das BTDs no estado agregado foram realizados experimentos no UV-Vis e fluorímetro em diferentes concentrações nos solventes DMSO/água em diferentes proporções.

Para a determinação do tamanho dos agregados formados, foram realizadas análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Os espectros UV-Vis e emissão de fluorescência são apresentados nas Figuras 64 e 65.

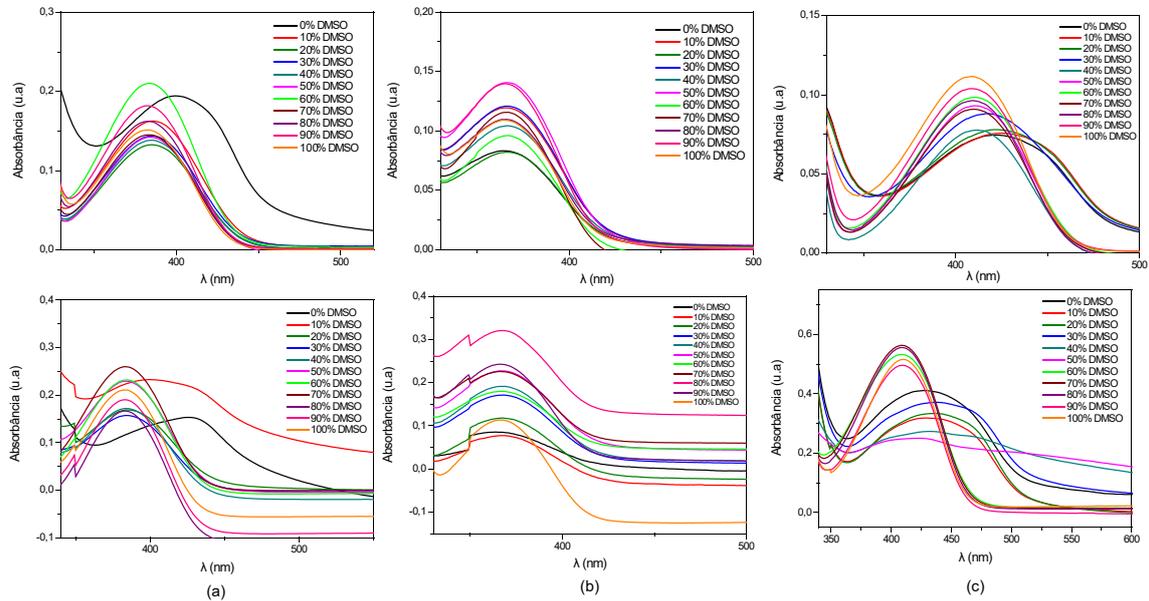


Figura 64. Espectros UV-Vis das BTDBs variando-se a fração de DMSO em água. (Topo) concentração 10 μM e (Abaixo) 20 μM . (a) BTDBrCCPh; (b) BTDCPh e (c) BTDCPh₂.

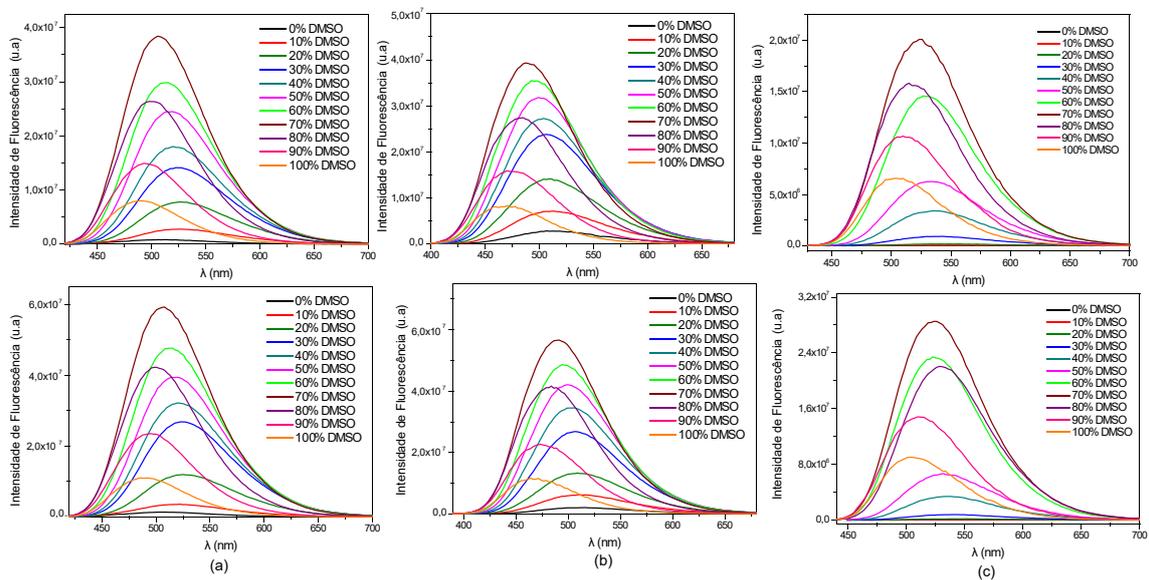


Figura 65. Espectros de Emissão de Fluorescência das BTDBs variando-se a fração de DMSO em água. (Topo) concentração 10 μM e (Abaixo) 20 μM . (a) BTDBrCCPh; (b) BTDCPh e (c) BTDCPh₂.

Como observado nas Figuras 64 e 65, houve mudanças significativas somente nos espectros de emissões de fluorescência. Nestas análises, notam-se que na presença dos solventes puros, DMSO e água, as intensidades de fluorescências foram mais baixas, em comparação com as misturas DMSO-Água. Provavelmente a variação na intensidade de

fluorescência esteja relacionada a formação e variação de tamanhos de agregados nessas soluções.

Foram então realizadas análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)² nas mesmas condições experimentais dos experimentos fotofísicos. Os resultados são apresentados na Figura 66. Para efeitos de comparação entre a agregação e intensidade de fluorescência, os gráficos foram plotados considerando a intensidade máxima de fluorescência nos diferentes percentuais de DMSO-água.

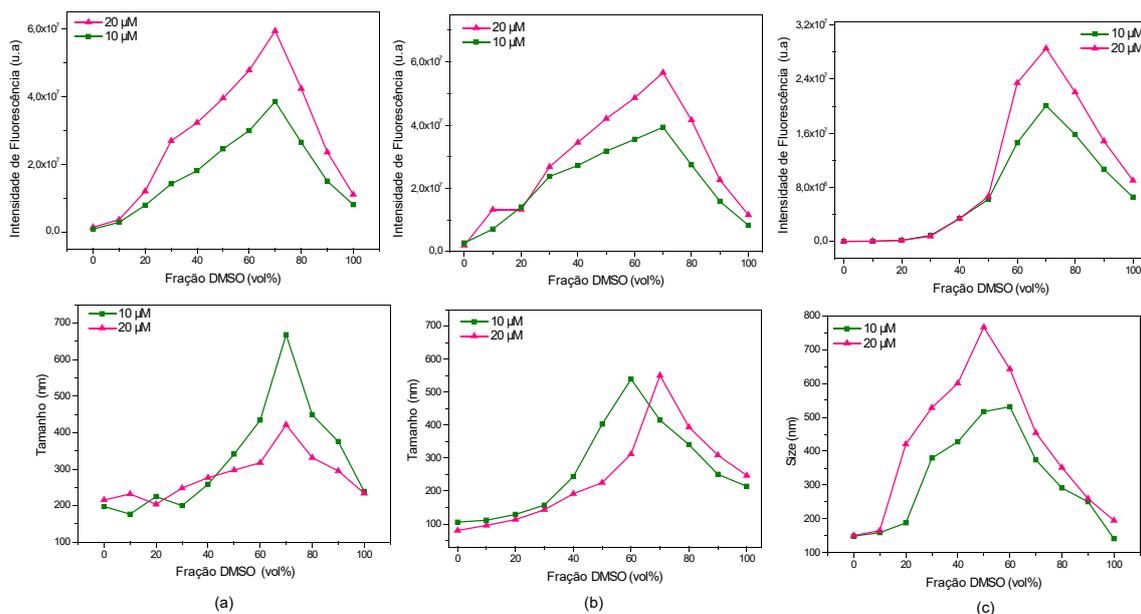


Figura 66. (Topo) Intensidade de fluorescência vs Fração de DMSO em água. (Abaixo) Análises DLS: Tamanho de nanoagregados orgânicos vs Fração de DMSO em água. Da esquerda para a direita: **BTDBrCCPh**, **BDTCCPh** e **BTD(CCPh)₂**.

Percebe-se uma concordância entre a variação do teor de água, tamanho e intensidade de fluorescência observados nos nanoagregados orgânicos. Entre 50-70% de DMSO em água a agregação é favorecida, com tamanhos de agregados atingindo o valor máximo, o mesmo sendo observado para a variação de intensidade de fluorescência, que atingiram o máximo nas mesmas frações.

Portanto, os resultados confirmam a ocorrência do efeito AIEE, e que as maiores nanoagregados são os mais emissivos. São demonstrados também que as BTDs apresentam um comportamento anti-ACQ de modo a não comprometer a marcação de LDs.^{1,22-26,28}

² Todas as análises de DLS foram realizadas em colaboração com o professor Juliano A. Chacker no laboratório da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília.

Durante as medidas de DLS para o composto **BTD(CCPH)₂**, foram observados um nanoagregado orgânico de menor tamanho (quase 100 nm) e outro de tamanho maior (quase 700 nm) na proporção de 20:80 DMSO/H₂O por um período de quase 12 minutos. A dinâmica e o equilíbrio durante o tempo foram obtidos para essa mistura de solventes (Figura 67) e o modelo de Finke-Watzky (FW)²⁰⁰ foi usado para fitar a cinética do processo.³

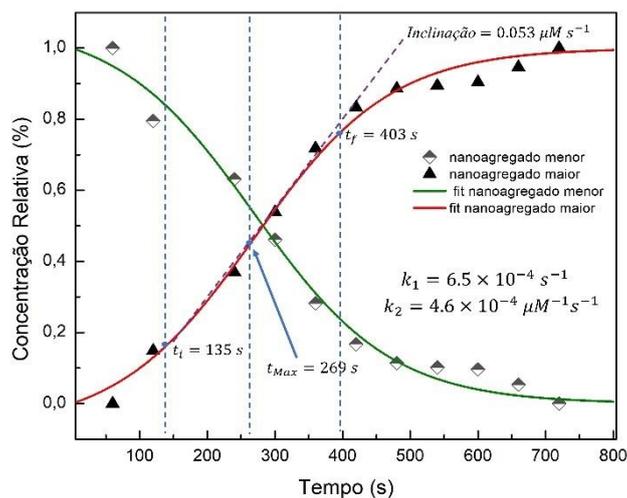


Figura 67. Formação de nanoagregados orgânicos para **BTD(CCPH)₂** (20 μM) por um período de tempo.

A partir da análise dos dados obtidos e apresentados na Figura 67, verifica-se que a cinética é governada por dois processos de agregação: (i) uma agregação inicial rápida (tipo nucleação), com taxa de k_1 ; e (ii) um processo médio de taxa de crescimento rápido k_2 , onde $t_i = 135$ s e $t_f = 403$ s.

Esses dois pontos sinalizaram duas transições importantes em todo o processo cinético de agregação e o primeiro delinea a transição entre a fase de atraso para a fase de crescimento e, posteriormente, a transição entre a fase de crescimento para a fase platô.

No gráfico é possível observar ainda um $t_{max} = 269$ s que corresponde ao ponto de aceleração zero, que indica um tempo em que o crescimento será retardado para atingir sua saturação em torno de 700 s. A condição $\frac{[k_2 \cdot \text{concentração inicial BTD}]}{k_1} \approx 14$ permite separar os processos de nucleação e crescimento durante o tempo, o que permite estimar o crescimento rápido dos menores nanoagregados orgânicos em nanoagregados maiores.

³ Os cálculos para a obtenção da dinâmica de equilíbrio foram realizados pelo professor Dr. Valter H. Carvalho-Silva da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual do Goiás.

Portanto, a partir da aplicação do modelo de Finke-Watzky (FW) para determinar a cinética de formação dos nanoagregados na Figura 67, nota-se que há um período de indução rápido (agregação inicial) ou duração da fase de atraso de aproximadamente 1 minuto, seguido de um período de crescimento dos nanoagregados orgânicos. Após um período de 7 minutos, a fase platô é atingida, indicando que os nanoagregados orgânicos atingiram seu tamanho máximo.

O período de indução indicou também a agregação inicial rápida similar à nucleação de nanopartículas orgânicas,^{201,202} nos quais as poucas partículas pequenas observadas na solução cresceram rapidamente para partículas grandes. Na fase final do monitoramento (12 min), a fase de platô, notou-se exclusivamente a presença dos nanoagregados de maiores tamanhos, demonstrando que o processo de nanoagregação chegou ao fim.

O maior tamanho da **BTD(CCPh)₂**, em comparação aos outros dois marcadores, pode ter sido responsável por um processo de difusão mais lento em duas etapas, permitindo o monitoramento da formação de nanoagregados orgânicos. Este modelo de crescimento explica o comportamento observado de forma satisfatória e parece estar de acordo com os fenômenos relacionados.²⁰⁰

Para a representação das propriedades dinâmicas dos nanoagregados foram investigados o efeito do aumento de temperatura na sua formação e/ou quebra.⁴ Como as medidas foram iniciadas em temperatura ambiente, considerou-se a proporção de mistura DMSO / H₂O onde foram obtidos os maiores nanoagregados, Figura 68.

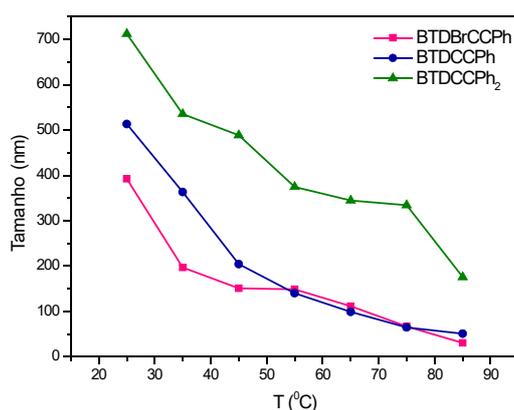


Figura 68. Efeito da temperatura sob os nanoagregados orgânicos para a **BTDBrCCPh**, **BTDCCPH** e **BTD(CCPh)₂** (20 μ M cada). Proporção DMSO/H₂O em 50:50 para **BTD(CCPh)₂** e 70:30 para **BTDCCPH** e **BTDBrCCPh**. As medidas foram realizadas na faixa de 25 a 85 °C.

⁴ Os cálculos aplicados nessa investigação foram feitos pelo professor Dr. Valter H. Carvalho-Silva da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual do Goiás.

Como consequência do processo de difusão mais lento observados nos maiores nanoagregados através do mecanismo de duas etapas de FW, a dependência da temperatura respeita um comportamento não-Arrhenius, culminando em um fenômeno crítico dinâmico.²⁰³

Sabe-se que a formulação deformada^{204,205} pode descrever satisfatoriamente a dinâmica crítica das propriedades de transporte χ (viscosidade, difusão), caracterizada principalmente por um aumento repentino quando a temperatura diminui, resultando em um comportamento cinético conhecido como super-Arrhenius. A lei da taxa de deformação de Arrhenius^{206,207} pode ser escrita como:

$$\chi(\beta) = \chi_0 (1 - d\varepsilon^\ddagger\beta)^{1/d}, \quad (1)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann; $\beta = \frac{1}{k_B T}$, T é a temperatura absoluta, d é o parâmetro de deformação da função exponencial e ε^\ddagger define a barreira de energia convencional Arrhenius-Eyring, que no presente estudo, é essencialmente um obstáculo energético para os processos de agregação.

Quando $d > 0$, correspondente ao caso super-Arrhenius, é possível obter uma generalização uniforme da mecânica estatística clássica, onde a distribuição de Boltzmann-Gibbs é deformada pela estatística Pareto-Tsallis.²⁰⁸ Em baixa temperatura, a energia aparente de ativação aumenta indefinidamente e, como consequência, a tendência a avançar para uma transição de agregação se aproxima de zero, permitindo assim estabelecer uma relação direta para o parâmetro d ,²⁰⁵ como:

$$d = \frac{k_B T^\ddagger}{\varepsilon^\ddagger}, \quad (2)$$

com T^\ddagger sendo uma temperatura fenomenológica de “congelamento” do processo, ou seja, a temperatura crítica, onde a energia cinética das partículas de fluido é muito baixa para que o processo seja ligado. Com uma simples manipulação matemática das Equações (1) e (2), finalmente é obtida a lei dinâmica crítica:

$$\chi(T) = \chi_0 \left(1 - \frac{T^\ddagger}{T}\right)^{\varepsilon^\ddagger/k_B T^\ddagger}. \quad (3)$$

Quando T^\ddagger tende a zero, a fórmula exponencial clássica de Arrhenius-Eyring para propriedades de transporte é recuperada, $\chi(T) = \chi_0 \exp(\varepsilon^\ddagger/k_B T)$ através do limite de Euler.^{206,209}

Uma ampla gama de estudos relacionados à dependência da temperatura das propriedades de transporte no campo de matéria condensada identificou o fenômeno do cruzamento a uma certa temperatura (T^*) para líquidos formadores de vidro, misturas binárias, líquidos poliméricos e líquidos iônicos.²¹⁰⁻²¹³

Argumentos convincentes foram apresentados apontando que T^* marca a transição de várias características: (i) perda de ergodicidade,²¹⁴ (ii) mudança significativa na dependência de temperatura,²¹⁵ (iii) início de fenômenos de enjaulamento e dinâmica heterogênea,²¹⁶ (iv) mudança de comportamento frágil para forte (cruzamento (FS)),²¹⁷ e (v) quebra na relação Stokes-Einstein.²¹⁸

A relação seminal de Stokes-Einstein, mostrada na Equação 4, descrita abaixo, foi formulada para solutos ou partículas que apresentam configuração esférica em concentração diluída.

$$D = \frac{k_B T}{n\pi\eta} \left(\frac{1}{R_H} \right), n = 4 \text{ or } 6, \quad (4)$$

onde D é a difusão translacional, η é a viscosidade do solvente e R_H é o raio hidrodinâmico envolvido no ambiente do solvente. Considerando processos complexos, nos quais a homogeneidade não é respeitada, espera-se uma relação mais genérica, tornando a chamada quebra na relação Stokes-Einstein.^{218,219}

A violação da relação de Stokes-Einstein é avaliada em líquidos usando a dependência da temperatura da razão de Stokes-Einstein ($\xi_{ES} = D\eta/T$). A avaliação da dinâmica das nanopartículas em uma mistura binária pode ser obtida através de um análogo do raio hidrodinâmico, ou seja, o comprimento da correlação dinâmica (R_D). Com uma simples manipulação matemática da Equação 4, é possível observar a proporcionalidade como:

$$\frac{1}{R_D} \propto \xi_{ES}. \quad (5)$$

Usando a Equação 3 e assumindo que a viscosidade da mistura binária diverge conforme $\eta \propto \left(\frac{T-T^+}{T}\right)^{1/d}$, é possível construir uma equação de detalhamento para ξ_{ES} a partir de:

$$\frac{\eta}{T^{-1/d}} = \eta_0(T - T^+)^{1/d} \propto \frac{1}{D}, \quad (6)$$

e conseqüentemente, ξ_{ES} pode ser racionalizado como:

$$\xi_{ES} = \frac{D\eta}{T} \propto \frac{1}{R_D} \propto T^\delta, \quad (7a)$$

$$\ln\left(\frac{1}{R_D}\right) = \ln \varrho + \delta \ln T, \quad (7b)$$

onde ϱ é a constante de proporcionalidade e $\delta = -\left(\frac{1+1}{d}\right)$. Se a Equação 7b for cumprida, espera-se uma violação na relação Stokes-Einstein. Ao tratar os dados resultantes do experimento de DLS em função da variação de temperatura para as misturas **BTDC(Ph)₂**, **BTDCPh** e **BTDBrPh** (Figura 63), foi plotado o gráfico $\frac{1}{R_D}$ vs. $\frac{1000}{T}$, como mostra a Figura 69.

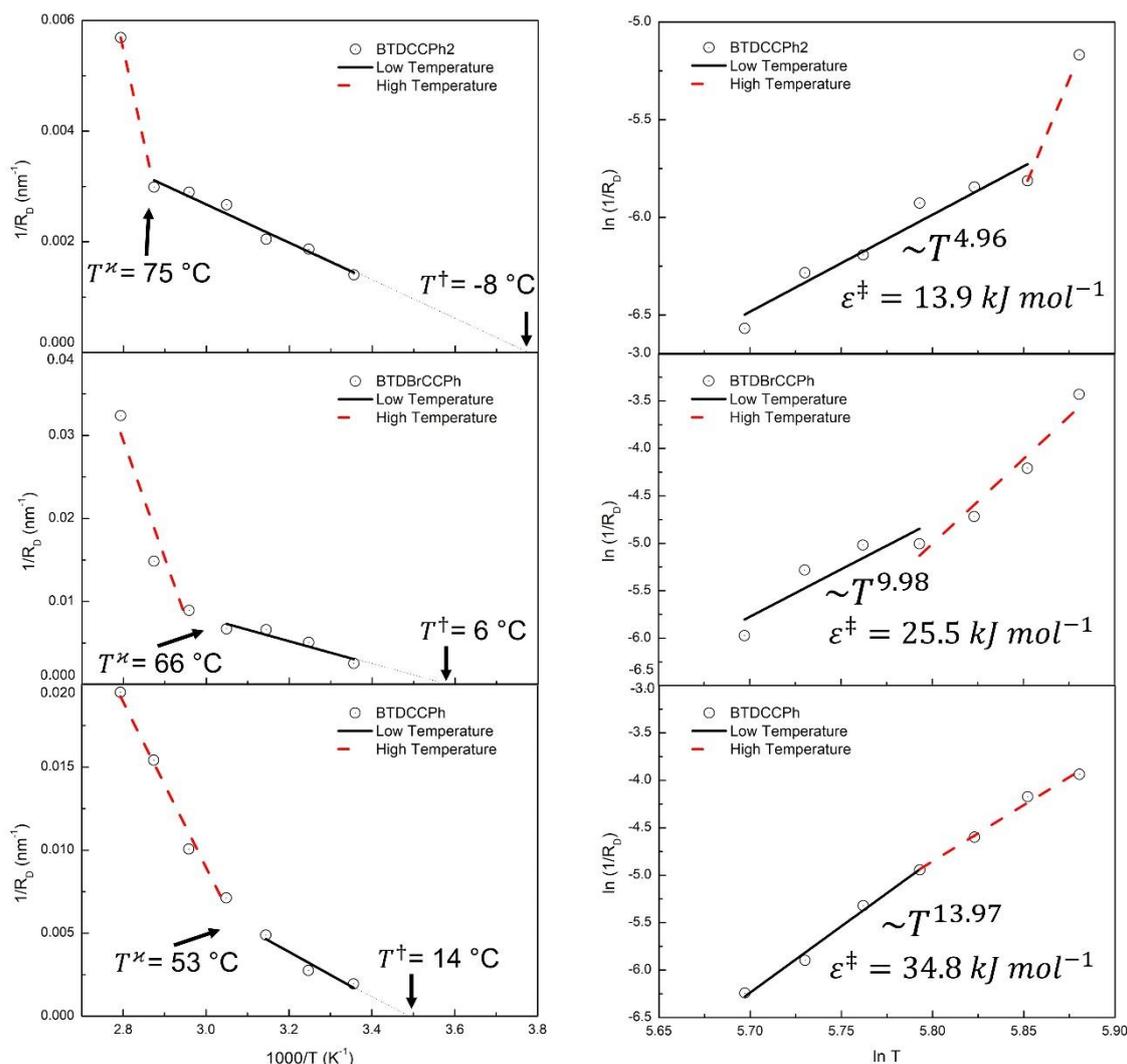


Figura 69. (Esquerda) Comprimentos de correlação dinâmica em função de $1/T$ obtidos a partir dos nanoagregados dos compostos **BTDC(Ph)₂**, **BTDCPh** e **BTDBrCCPh**. As linhas marcam as transições cinéticas na temperatura de cruzamento T^x da temperatura mais alta (tracejada) para a temperatura mais baixa (sólida). A extrapolação da linha de baixa temperatura encontra a temperatura dinâmica crítica T^d quando $1/R_D \rightarrow 0$. (Direita) Escala métrica da Equação 7b enfatizando a dependência da temperatura de $1/R_D$ e propiciando a estimativa da barreira energética para o processo de agregação (ϵ^\ddagger).

Nesta escala métrica, uma dependência linear marca uma transição cinética na temperatura de cruzamento T^x mais alta (linha tracejada) para temperatura mais baixa (linha sólida), cujo comportamento líquido muda para um ambiente molecular heterogêneo que melhora o processo de agregação, o que está de acordo com os fenômenos relacionados.²²⁰

Em termos de interações não covalentes, T^x segue a tendência esperada entre os derivados de BTDC projetados. O derivado **BTDC(Ph)₂**, o maior da série, é altamente propenso a estabelecer interações de empilhamento C-H- π , de modo que o ponto de cruzamento, onde agregados maiores começam a dominar, ocorrerá em temperaturas mais altas. O derivado **BTDBrCCPh** mostra interações não covalentes adicionais em uma

estrutura semelhante a dímero, conforme revelado pela análise de superfície Hirshfeld,⁵ Figura 70, devido à sua maior polaridade quando comparado com **BTDCCPH**. Portanto, o processo de agregação para o primeiro se inicia em temperaturas mais altas.

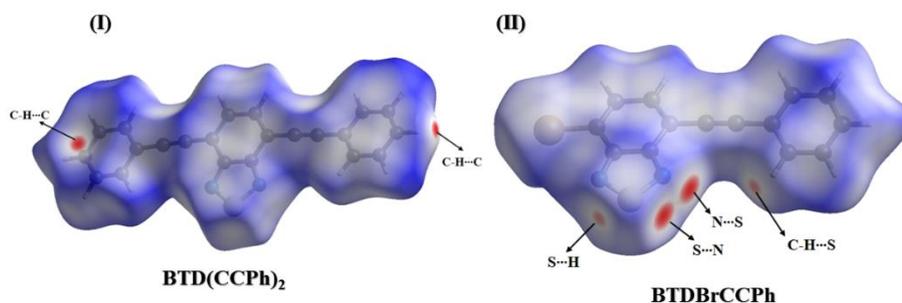


Figura 70. (I) Superfície de Hirshfeld mapeada em d_{norm} para **BTDCCPH**₂; (II) Superfície de Hirshfeld mapeada em d_{norm} para **BTDBrCCPh**.

Abaixo de T^* uma universalidade linearizada é acessada extrapolando para um fenômeno crítico em T^\dagger : a temperatura na qual o processo de agregação é “congelado”. A temperatura de cruzamento e a temperatura crítica apresentam uma forte correlação para os três sistemas, ou seja, uma diminuição em T^* produz um aumento em T^\dagger propiciando uma pequena faixa de temperatura para a mistura atingir o comprimento de correlação dinâmica crítica.

Um comportamento linear do gráfico de logaritmo da relação $1/R_D$ vs T no regime de baixa temperatura, para as três BTDs, do lado direito da Figura 49, mostra a concordância com um desarranjo da Equação (7b) com $\delta = -1 - 1/d$ e a temperatura crítica T^\dagger , permitindo assim uma boa estimativa da energia de ativação ε^\ddagger para o processo de agregação por meio da Equação (2).

Um aumento no grau de desvio δ da relação Stokes-Einstein está diretamente correlacionado com o aumento da energia de ativação dinâmica propiciada pela restrição na formação dos nanoagregados orgânicos por unidades moleculares. A energia de ativação de agregação também se correlaciona com as interações não covalentes esperadas para toda a série de derivadas BTD.

Interações não covalentes mais fortes proporcionarão uma penalidade de energia menor para que o processo seja bem-sucedido em relação a agregados maiores. As interações de empilhamento C-H- π são mais intensas para **BTDCCPH**₂ e, portanto, o

⁵ A análise de superfície Hirshfeld foi realizada pela professora Dr^a Claudia Gatto no Instituto de Química na UnB.

menor valor de ϵ^\ddagger é observado. Este tipo de interações não covalentes é aproximadamente igual para **BTDBrCCPh** e **BTDCCPH**, mas o primeiro estabelece contatos próximos adicionais, como pode ser visto na Esquema 3-II, atenuando o ϵ^\ddagger para agregação.

3.3.3 Rendimento Quântico de Fluorescência

Para a determinação dos rendimentos quânticos das três BTDs deste trabalho em solventes de diferentes polaridades, foi realizado primeiramente um levantamento bibliográfico das metodologias disponíveis, bem como a viabilidade de aplicação.

O rendimento quântico (Φ) de um fluoróforo é comumente determinado através de procedimentos comparativos utilizando moléculas padrões cujos valores de Φ são conhecidos. Existem dois métodos para medições de Φ : um método comparativo e um método de ponto único.

No primeiro método, proposto por Willians e Winfield,^{46,47,222} é construído um gráfico de integral da área da intensidade de fluorescência vs absorvância numa determinada faixa de concentração do fluoróforo e amostra de referência (Figura 71). A partir do valor de coeficiente de inclinação obtido da equação da reta da amostra e referência, é determinado o valor de Φ .

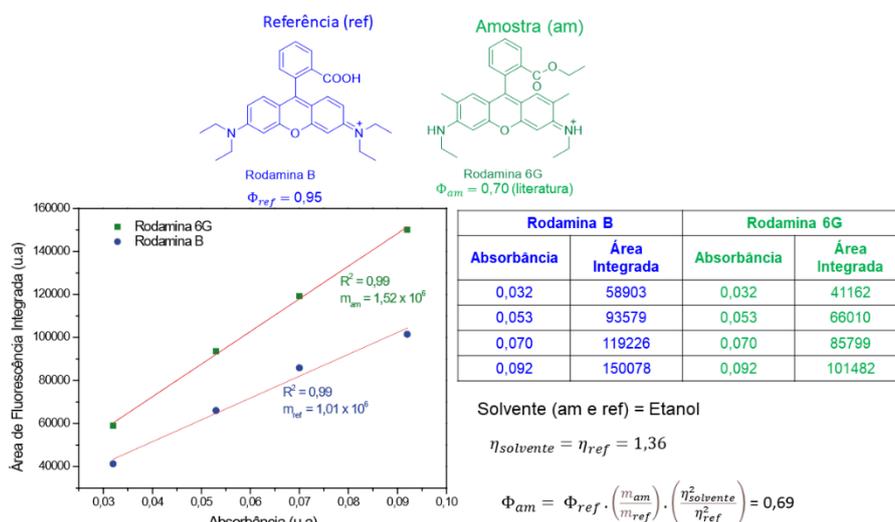


Figura 71. Determinação do rendimento quântico de fluorescência da rodamina 6G através do método do método comparativo. Adaptado das referências 46 e 47. Onde: m = coeficiente de inclinação da equação da reta; η = índice de refração.

No segundo método (Figura 72), o rendimento quântico de uma espécie emissiva é tipicamente obtido em relação a uma molécula de referência apropriada, com um

rendimento quântico conhecido, usando as configurações de instrumento/condições de medições idênticas, incluindo o mesmo comprimento de onda de excitação ($\lambda_{(excit)}$).^{45,46}

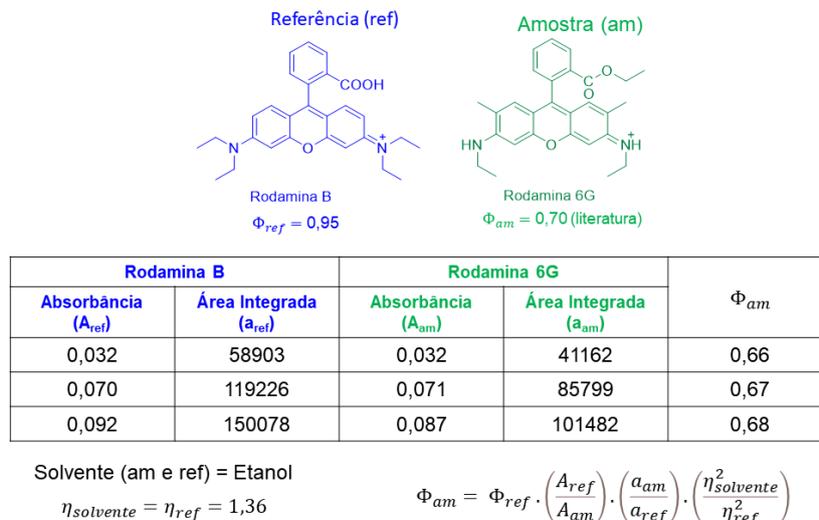


Figura 72. Determinação do rendimento quântico de fluorescência da rodamina 6G através do método do ponto único. Adaptado da referência 46. Onde: A = Absorbância; a = Área integrada da curva de intensidade de fluorescência; η = índice de refração.

Usar medições de ponto único para determinar o rendimento quântico de fluorescência tem como vantagem a obtenção de resultados mais rápido do que o método comparativo. Contudo esse método é considerado menos preciso. Portanto, com o objetivo de comparar a eficiência dos dois métodos, Allen⁴⁶ calculou o Φ de rodamina B através dessas duas metodologias usando a rodamina 6G como amostra de referência (Figuras 71 e 72). Foram verificados que os dois métodos produziram resultados razoáveis quando comparados com os dados da literatura.

Para o composto **BTD(CCPh)₂**, foi encontrado na literatura o rendimento quântico de fluorescência correspondente à 0,37 no solvente acetonitrila.¹⁸⁰ Para verificar a eficiência e fazer os ajustes experimentais necessários da metodologia do ponto único, foi realizada a medida do Φ no composto **BTD(CCPh)₂** em acetonitrila, seguida da comparação do valor obtido com a literatura.

Segundo esse protocolo, o procedimento para a realização das medidas deve seguir as seguintes etapas: (i) escolha da amostra de referência adequada, que apresente Φ_{ref} e $\lambda_{(excit)}$ conhecidos. A amostra de referência deve absorver e emitir dentro de regiões espectrais semelhantes às da molécula de interesse; (ii) medição preliminar dos espectros de absorção e emissão para a determinação do valor da absorbância e integral da área da intensidade de fluorescência da amostra de referência e da molécula de interesse.

Ressalta-se que para a obtenção dos espectros de emissão sejam utilizados o mesmo $\lambda_{(excit)}$ da amostra de referência; e (iii) cálculo de Φ_{am} de acordo com a eq. 8.⁴⁵⁻⁴⁷

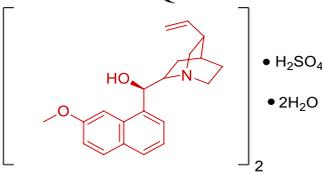
$$\Phi_{am} = \Phi_{ref} \cdot \left(\frac{A_{ref}}{A_{am}}\right) \cdot \left(\frac{a_{am}}{a_{ref}}\right) \cdot \left(\frac{\eta_{solvente}^2}{\eta_{ref}^2}\right) \quad (8)$$

Onde: Φ = rendimento quântico; A = absorvância; a = área integrada sobre a curva de emissão de fluorescência; η = índice de refração; ref = refere-se aos valores da molécula de fluorescência de referência; am= refere-se aos valores da molécula de fluorescência a ser analisada.

A determinação relativa de Φ depende da medição de amostras e padrões com baixas absorvâncias para minimizar a reabsorção e os efeitos do filtro interno, bem como a agregação do fluoróforos. Normalmente, absorvâncias abaixo de 0,1 são usadas no comprimento de onda de excitação e, geralmente, a absorvância do comprimento de onda máximo deve ser mantida abaixo de 0,1 para minimizar tais efeitos, além de evitar os desvios da Lei de Lambert-Beer. Para a determinação adequada dos valores Φ_{am} usando espectrofluorímetros, as absorvâncias da amostra e da solução padrão comumente são combinadas.^{45,46}

Dessa forma, para essas medidas foi escolhido o bi-sulfato de quinina como amostra de referência, visto que apresenta absorções e emissões dentro de regiões espectrais semelhantes às moléculas de interesse (Tabelas 7 e 9). Além disso, esse padrão costuma ser o mais utilizado na determinação de rendimentos quânticos das BTDs,^{18,21,73,80,92} dentre essas, a **BTDCCPH**₂ em acetonitrila.¹⁸¹

Tabela 9. Propriedades Fotofísicas do Bi-sulfato de Quinina.



Solvente	$\lambda_{(excit)}$ (nm)	Região de Emissão (nm)	Rendimento Quântico (Φ)	Referências
0,1 a 1,0 M H ₂ SO ₄	366	400 – 600	0,54 – 0,56	47 / 223 / 224

Inicialmente foi realizada a medida no espectrômetro UV-Vis para obter experimentalmente o valor de absorvância variando-se as concentrações de bi-sulfato de quinina e **BTDCCPH**₂ em acetonitrila de 0,6 a 10 μ M com o objetivo de determinar a concentração ideal para as medidas subsequentes. Os gráficos podem ser vistos na Figura 73 – a. Em seguida, foram realizadas as medidas de emissão de fluorescência nessa

mesma faixa de concentração usando o $\lambda_{(excit)}$ fornecido pela literatura para a amostra de referência (Tabela 9) para a obtenção dos valores da área integrada sobre a curva de emissão de fluorescência (b, Figura 73). Com esses dados foram então calculados o Φ para essa BTD através da equação (8) (Tabela 10).

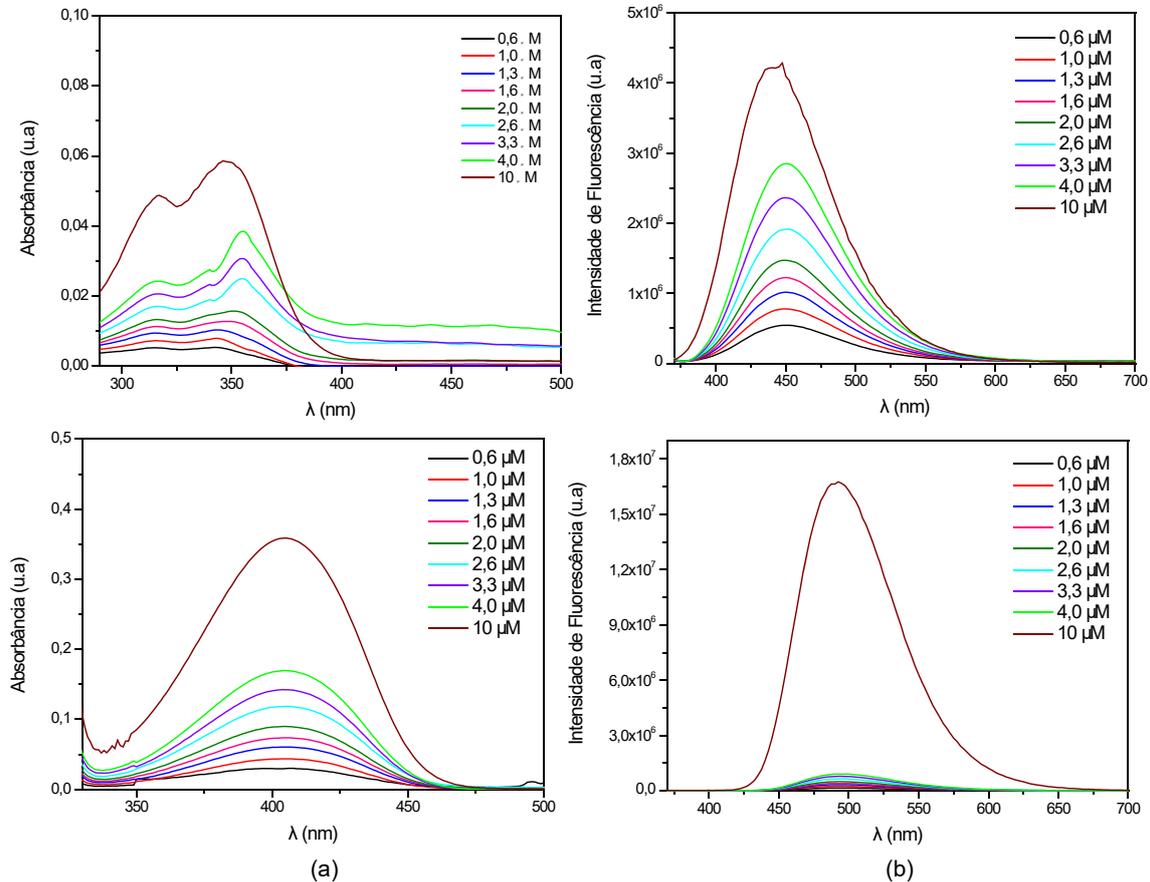


Figura 73. (a) Espectro UV-Vis e (b) Espectro de emissão de fluorescência. De cima para baixo: Bi-sulfato de quinina e **BTD(CCPH)₂**. Todas as medidas foram realizadas variando a concentração de 0,6 a 10 μM . Todas as medidas de emissão de fluorescência foram realizadas no $\lambda_{(excit)}$ de 366 nm.

Tabela 10. Valores utilizados para a determinação do rendimento quântico do composto **BTD(CCPH)₂** através do método do ponto único.

Bi-sulfato de Quinina			BTD(CCPH) ₂			
C (μM)	Absorbância (A)	Área de Fluorescência Integrada (a)	C (μM)	Absorbância (A)	Área de Fluorescência Integrada (a)	Rendimento Quântico (Φ)
0,6	0,005	54821658,45	0,6	0,029	17044462,94	0,50
1,0	0,007	75207886,25	1,0	0,044	24643447,11	0,43
1,3	0,0103	95463439,74	1,3	0,060	32298468,16	0,48
1,6	0,0127	113682452,4	1,6	0,074	38094311,65	0,46
2,0	0,015	136117526,2	2,0	0,089	45826243,12	0,45
2,6	0,0249	174710611,2	2,6	0,117	57919351,65	0,67
3,3	0,0307	214750736,6	3,3	0,142	69705995,39	0,55
4,0	0,038	255914089,4	4,0	0,169	80276334,46	0,54
10	0,058	376872672,5	10	0,358	1460235019	0,35

Onde: As soluções de bi-sulfato de quinina foram preparadas em H_2SO_4 1M; $\eta_{am} = 1,34$; $\eta_{ref} = 1,34$ ²²²

A partir da análise dos gráficos (Figura 73) e dados (Tabela 10), nota-se a baixa reprodutibilidade nos valores de Φ ao se variar as concentrações, apesar de que na concentração de 10 μM o valor de Φ para a **BTD(CCPh)₂** foi bem próximo ao descrito na literatura.¹⁸⁰ Esse comportamento é esperado visto que o método do ponto único é considerado por alguns autores menos preciso.⁴⁵⁻⁴⁷

Outro ponto a ser ressaltado é que o valor de absorvância para a BTD analisada foram maiores que 0,1, especificamente na concentração de 10 μM . Sabe-se que comumente em valores de absorvâncias maiores que 0,1 ocorre desvios na Lei de Lambert-Beer.¹⁹⁷ Para verificar se o mesmo ocorre nesse experimento, foram traçados os gráficos de concentração vs absorvância para a amostra de referência e a BTD (Figura 74), no qual a linearidade foi confirmada através dos valores de R^2 que ficaram próximos de 1. Logo, não foram observados desvios na Lei de Lambert-Beer para essas medidas, não havendo a necessidade de desconsiderar os resultados obtidos (Tabela 10).

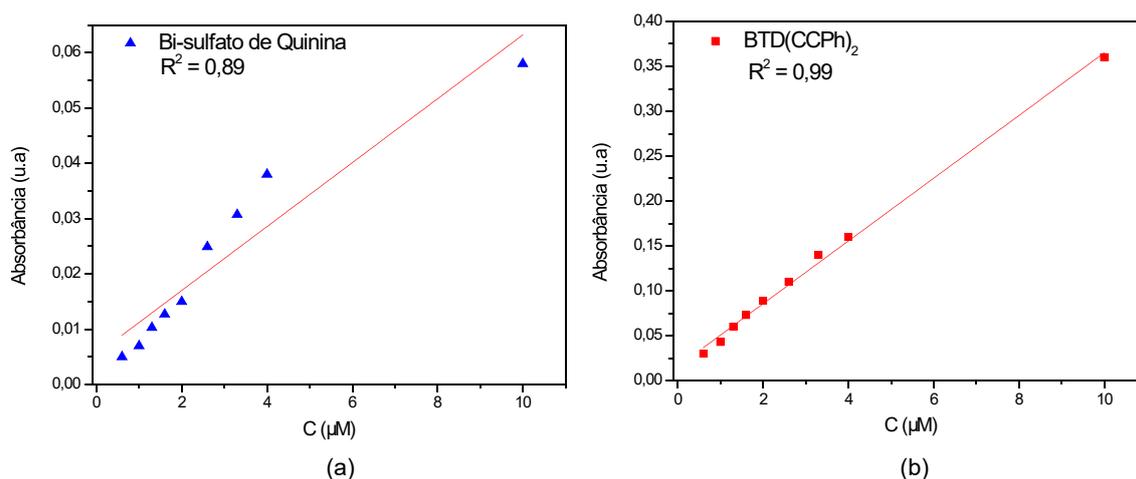


Figura 74. Gráfico de Absorvância (A) em função da concentração (C) para (a) Bi-sulfato de Quinina; (b) BTD(CCPh)₂.

Portanto, a concentração de 10 μM foi escolhida para realizar as medidas subsequentes de Φ para as outras BTDs em outros solventes de diferentes polaridades, uma vez que o valor de Φ para a **BTD(CCPh)₂** em acetonitrila foi o mais próximo da literatura.¹⁸⁰ Os resultados dos experimentos subsequentes são apresentados na Figura 75 e Tabela 11.

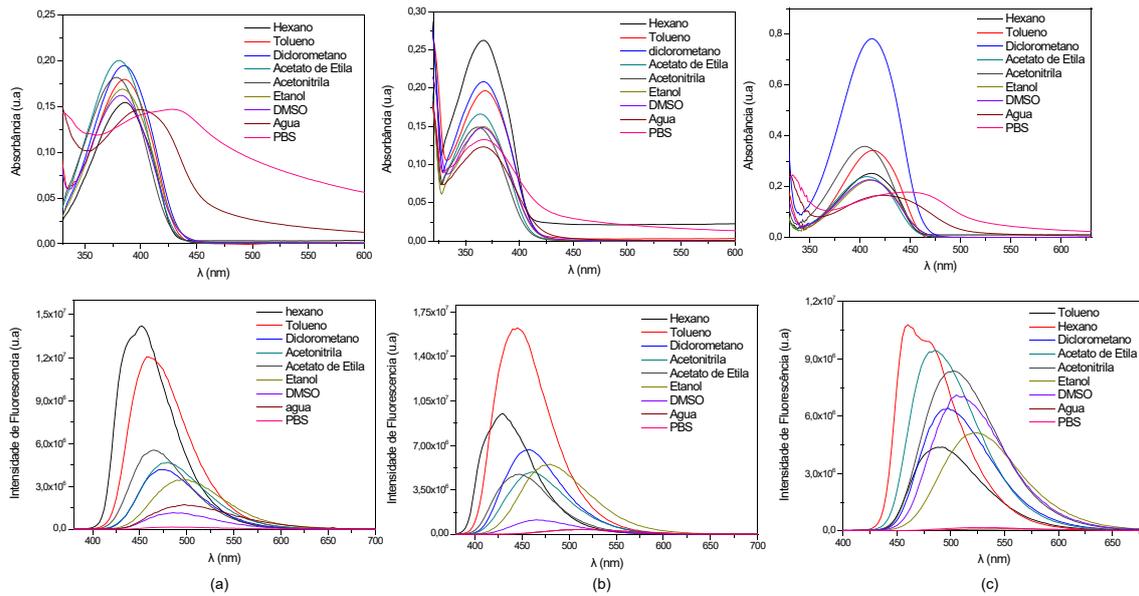


Figura 75. Espectros de UV-Vis e emissão de fluorescência das BTDs sintetizadas em solventes de diferentes polaridades. Da esquerda para a direita: (a) BTDBrCCPh, (b) BTDCCPH e (c) BTD(CCPH)₂. Todas as medidas foram realizadas na concentração de 10 μM. Todas as medidas de emissão de fluorescência foram realizadas no λ_(excit) de 366 nm.

Tabela 11. Valores de Rendimento Quântico obtidos através do método do ponto único para as BTDs deste trabalho em solventes de diferentes polaridades.

BTD	Solvente	Absorbância (A)	Área de Fluorescência Integrada (a)	Índice de Refração (η) ²²²	Rendimento Quântico (Φ)
BTDBrCCPh	Hexano	0,161	1020705752	1,49	0,68
	Tolueno	0,162	924737691,5	1,37	0,52
	Diclorometano	0,195	339710023,9	1,42	0,17
	Acetonitrila	0,182	398943487,6	1,34	0,19
	Acetato de Etila	0,200	428127071,7	1,37	0,19
	DMSO	0,162	107214259,6	1,47	0,07
	Etanol	0,169	333100348,1	1,36	0,18
	Água	0,197	192355723,6	1,34	0,08
	Tampão PBS	0,147	20057451,12	1,34	0,01
BTDCCPH	Hexano	0,197	1212121680	1,49	0,66
	Tolueno	0,141	657890968,1	1,37	0,42
	Diclorometano	0,209	521354883,3	1,42	0,24
	Acetonitrila	0,149	401241456,6	1,34	0,23
	Acetato de Etila	0,166	363302924,8	1,37	0,20
	DMSO	0,148	98586605,11	1,47	0,07
	Etanol	0,150	503288713,5	1,36	0,30
	Água	0,224	46489568,6	1,34	0,02
	Tampão PBS	0,133	45797037,61	1,34	0,03
BTD(CCPH) ₂	Hexano	0,411	1510739192	1,49	0,39
	Tolueno	0,144	707485751,7	1,37	0,44
	Diclorometano	0,282	1052183055	1,42	0,36
	Acetonitrila	0,358	1460235019	1,34	0,35
	Acetato de Etila	0,498	1481265116	1,37	0,27
	DMSO	0,337	1228630412	1,47	0,38
	Etanol	0,327	965169899,9	1,36	0,26
	Água	0,289	37705692,22	1,34	0,01
	Tampão PBS	0,179	40405524,77	1,34	0,02

Onde: Ref = bi-sulfato de quinina em H₂SO₄ 1M; Aref = 0,058; aref = 376872672,5; η_{ref} = 1,34.²²² Os valores de Φ foram calculados usando a Equação 8.

Os rendimentos quânticos variaram de 0,01 – 0,68 (**BTDBrCCPh**); 0,02 – 0,66 (**BTDDCCPh**) e 0,01 – 0,44 (**BTD(CCPh)₂**), cujo aumento, de um modo geral, foi proporcional à diminuição da polaridade do solvente.

Esses resultados mostraram que a interação entre as moléculas do solvente e as moléculas das BTDs influenciaram diretamente nos mecanismos de dissipação de energia, ou seja, nos processos de relaxação radiativos ou não-radiativos.³⁵⁻³⁸

Em solventes apolares houve uma maior interação entre as moléculas do solvente com os derivados de BTD beneficiada por sua alta lipofilicidade, que provavelmente resultou na baixa moção molecular. Esse comportamento favoreceu uma maior dissipação de energia por mecanismos de relaxação radiativos.

Em solventes polares, por sua vez, a menor interação das BTDs com as moléculas do solvente resultou na maior mobilidade das moléculas de BTDs levando ao maior favorecimento da desativação do estado singlete (S_1) por processos não-radiativos.^{21,35-38}

Comportamento similar foi observado Dyrager e colaboradores²¹ ao determinar o rendimento quântico do marcador fluorescente de gotas lipídicas LD-BTD1 em solventes orgânicos de diferentes polaridades. Os autores verificaram que valores de Φ diminuíram de 70% para menos de 1% à medida que se aumentou a polaridade do solvente.

3.3.4 Teste de Fotoestabilidade

O fotobranqueamento, conhecido também pelo seu termo em inglês, *photobleaching*, consiste na destruição de uma molécula devido à perda de estabilidade causada pela exposição prolongada à luz. Na microscopia de fluorescência, a aplicação de iluminações de alta intensidade pode reduzir a capacidade de uma sonda fluorescente ou torná-la completamente incapaz de fluorescer devido ao processo de *photobleaching* da sonda, o que prejudica a qualidade das imagens.^{1,5,10,37}

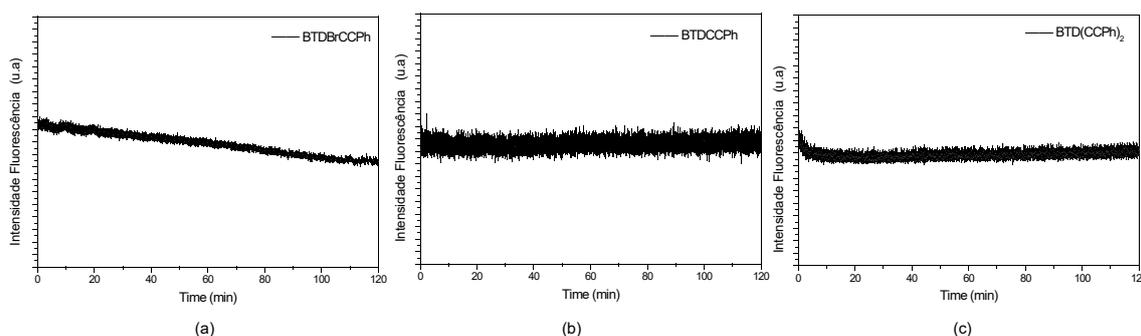
Logo, a fotoestabilidade trata-se de um teste no fluorímetro que tem por objetivo determinar a estabilidade dos fluoróforos à exposição contínua de luz UV-vis, ou seja, determinar se o fluoróforo sofrerá o processo de *photobleaching* durante o imageamento celular.^{30,56}

Para as BTDs estudadas, os testes de fotoestabilidade foram realizados no espectrofluorímetro nas seguintes condições (Tabela 12) por um período de 2 horas usando água como solvente na concentração de 10 μ M.

Tabela 12. Parâmetros utilizados no espectrofluorímetro para os testes de fotoestabilidade dos derivados de BTd.

Composto	λ_{excit}	λ_{max} (em)
BTd(CCPH) ₂	430	527
BTDBrCCPh	398	495
BTdCCPh	369	517

Os espectros obtidos a partir do teste realizados no fluorímetro podem ser observados na Figura 76.

**Figura 76.** Espectros de fotoestabilidade dos compostos (a) **BTDBrCCPh**, (b) **BTdCCPh** e (c) **BTd(CCPH)₂**, respectivamente.

Os compostos **BTd(CCPH)₂** e **BTdCCPh** apresentaram uma linearidade na intensidade de emissão ao longo do período de tempo analisado, indicando que esses compostos mantiveram suas propriedades frente à exposição prolongada aos seus respectivos comprimentos de onda de excitação, demonstrando uma boa estabilidade.

Portanto são bons candidatos para a aplicação em imageamento celular de LDs pela técnica de microscopia de fluorescência.

Por outro lado, para o composto **BTDBrCCPh**, foi observado um leve decaimento na fotoestabilidade a partir de 50 minutos, indicando uma pequena variação na estabilidade molecular diante da exposição prolongada da luz. Contudo apesar dessa pequena variação, ainda é possível a sua aplicação em imageamento celular, visto que tais análises são realizadas com a incidência de luz em comprimentos de onda mais brandos.¹⁰

3.3.5 Lipofilicidade e Efeito Light-up

Os três marcadores sintetizados foram submetidos ao teste SDS (dodecil sulfato de sódio)^{3,18,93,96} para verificar suas propriedades emissivas em meios lipofílicos. Para isso, as emissões das BTds foram medidas em concentrações de SDS abaixo e acima da Concentração Micelar Crítica²²⁵ (CMC, 8 mmolar).

O experimento pode ser visto como um prelúdio do comportamento dos fluoróforos em ambientes celulares, que são conhecidos por serem ricos em diferentes estruturas lipofílicas.¹ Os resultados são ilustrados na Figura 77.

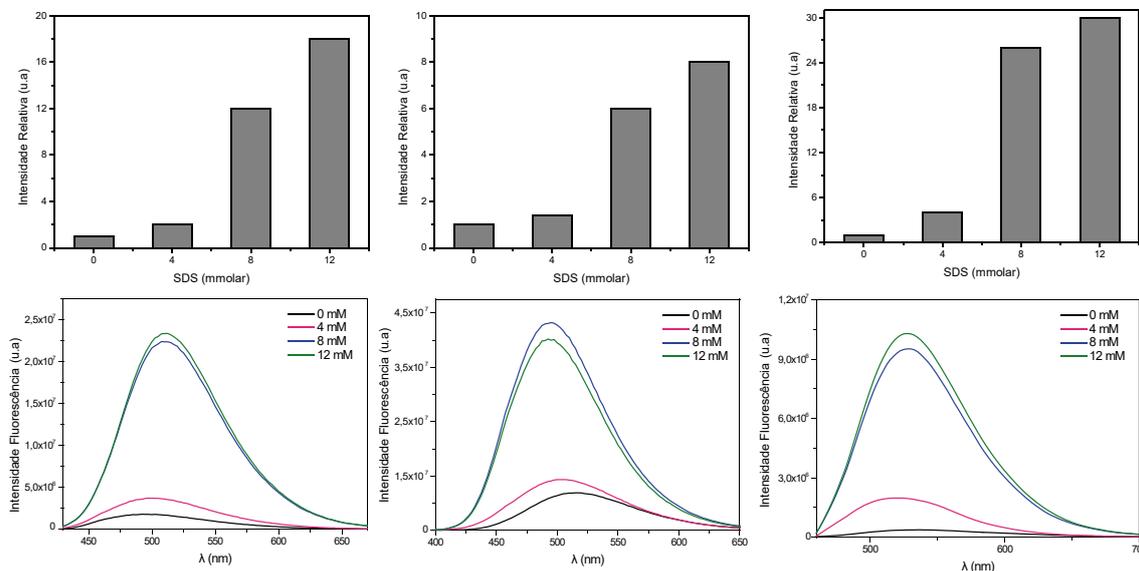


Figura 77. (Topo) Intensidade de fluorescência relativa de **BTDBrCCPh**, **BTDCPh** e **BTDCPh₂** em (10 μM meio aquoso) abaixo e acima da Concentração Micelar Crítica de SDS (8 mmolar); (Abaixo) Efeito da intensidade de fluorescência na presença de micelas lipofílicas.

Todas as três BTDs mostraram efeitos de luminescência significativas acima do CMC do SDS, cujas intensidades de emissão de fluorescência aumentaram quase 30 vezes para **BTDCPh₂**, 18 vezes para **BTDBrCCPh** e 8 vezes para **BTDCPh**. Uma vez que as três BTDs já são estruturas emissivas, esse efeito *light up* mostrou-se ainda mais significativos e indicaram um provável bom desempenho quando submetidos a testes como marcadores de estruturas lipídicas em experimentos de imageamento celular. Esse mesmo comportamento foi observado em alguns marcadores lipofílicos.^{18,20}

Foram também determinados os valores de coeficiente de partição (octanol / água) dos marcadores para quantificar sua preferência por ambientes lipofílicos. As curvas de calibração das BTDs em octanol foram obtidas (Figura 78) e, em seguida, os seus coeficientes de partição foram medidos. Os cálculos de DFT também foram realizados para prever a lipofilicidade dos corantes BTDCPh sintetizados e puderam ser comparados com os dados experimentais. Na tabela 13 são apresentados os coeficientes de partição determinados experimentalmente e teoricamente.

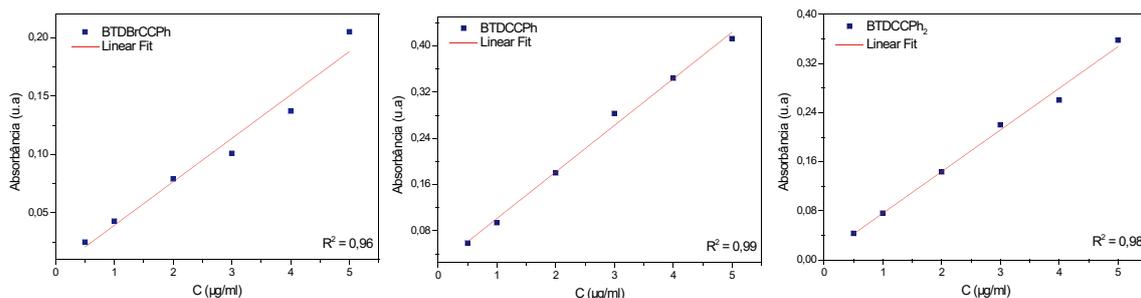


Figura 78. Curvas de calibração para determinação dos coeficientes de partição (octanol / água) para **BTDBrCCPh**, **BTDCPh** e **BTDCPh₂** (respectivamente).

Tabela 13. Energia livre de solvatação calculada (PW6B95/6-311+G(d)) em água ($\Delta G_{\text{água}}^{\text{sol}} / \text{kcal mol}^{-1}$), em octanol ($\Delta G_{\text{octanol}}^{\text{sol}} / \text{kcal mol}^{-1}$) e o coeficiente de partição ($\log P$) (DFT) e $\log K_{ow}$ (experimental) para os três marcadores de BTd sintetizados. *

Marcador	$\Delta G_{\text{água}}^{\text{sol}}$	$\Delta G_{\text{n-octanol}}^{\text{sol}}$	$\log P$ (DFT)	$\log K_{ow}$ (Exp.)
BTDBrCCPh	-7.3	-10.6	2.4	0.8
BTDCPh	-8.1	-10.2	1.5	1.4
BTDCPh ₂	-8.7	-13.8	3.7	1.4

*Energias livre de Solvatação corrigidas para $1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ do estado padrão adicionando um fator de $RT \ln 24.46 = 1.894 \text{ kcal mol}^{-1}$ em 298K.

Na Tabela 13, estão resumidas também as energias livres de solvatação teórica em soluções de água e n-octanol, conforme determinado com o modelo de solvatação baseado na densidade de elétrons de soluto (SMD).²²⁶

Experimentalmente, a lipofilicidade é medida em termos do logaritmo do coeficiente de partição n-octanol / água ($\log K_{ow}$, onde $K_{OW} = \frac{[BTDOctanol]}{[BTDAgua]}$), que é definido como a razão de concentração de equilíbrio do analito distribuído entre duas fases de polaridades opostas.²²⁷

Os cálculos DFT mostraram que as três BTds são preferencialmente distribuídas na fase apolar ou lipofílica. Os cálculos DFT mostraram também uma boa concordância qualitativa com os resultados obtidos experimentalmente ($\log K_{ow}$). Contudo, o padrão nos valores de $\log P$, calculados teoricamente, não foi seguido estritamente pelas previsões, ao ser comparados com os valores de $\log K_{ow}$. Mesmo assim, ambos os resultados apontam firmemente para a preferência dos marcadores por ambientes lipofílicos.

3.4 Cálculos Teóricos

A complexidade dos dados fotofísicos observados para as três BTDs em relação ao efeito solvatocrômico levaram a realização de cálculos DFT⁶ visando uma melhor compreensão de suas propriedades, especialmente em ambientes não aquosos. As estruturas moleculares otimizadas dos três fluoróforos são mostradas na Figura 79, conforme determinado a partir de cálculos CAM-B3LYP / 6-311 + G (d) no vácuo.

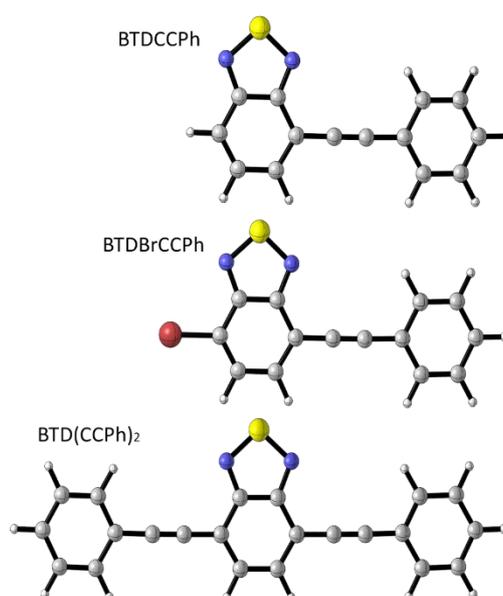


Figura 79. Estruturas moleculares otimizadas de BTDBrCCPh, BTDCCPH e BTD(CCPh)₂ determinadas a partir de cálculos CAM-B3LYP / 6-311 + G (d) no vácuo.

As estruturas das BTDs em um meio dielétrico também foram otimizadas com intuito de monitorar os efeitos do solvente e suas principais características geométricas. As modificações geométricas na presença dos solventes puderam ser desprezadas após a comparação com os Desvios Médios Quadráticos (RMSD) das posições atômicas entre as três estruturas moleculares no PCM e no vácuo (Tabela 14) com desvios na ordem de 10^{-3} Å.

Tabela 14. RMSD de posições atômicas entre as geometrias otimizadas de BTDCCPH, BTDBrCCPh e BTD(CCPh)₂ no vácuo e em PCM conforme obtido no nível de teoria CAM-B3LYP / 6-31G (d).

Molécula	RMSD (10^{-3} Å)							
	MeCN	CH ₂ Cl ₂	DMSO	EtOAc	EtOH	Tolueno	Hexano	Água
BTDBrCCPh	1,8664	1,6338	1,9936	1,5324	1,7651	0,8917	1,2579	1,7905
BTDCCPH	1,0702	0,9444	0,9778	0,3257	0,8425	0,4371	0,4918	0,8930
BTD(CCPh) ₂	1,4998	0,7453	1,3743	0,7455	1,5988	0,0000	0,3727	1,4525

⁶ Todos os cálculos teóricos foram realizados pelo professor Dr. Daniel F. S. Machado do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Os máximos de absorção para as BTDs em diferentes solventes (PCM) foram avaliados a partir de cálculos TD-DFT com diferentes funcionais de correlação de troca (XCF) junto com o conjunto de base 6-311G+(2d,p). Nomeadamente, foi avaliado o desempenho do B3LYP, CAM-B3LYP, LC- ω PBE, M06, M062X e PBE1PBE para selecionar qual XCF é o nível mais adequado para descrever as propriedades ópticas eletrônicas das BTDs sintetizadas.

Na Tabela 15 estão resumidos os máximos de absorção calculados para as BTDs investigadas. A discussão, entretanto, foi focada somente no modo de excitação de maior comprimento de onda (de mais baixa energia), ou seja, o interesse está principalmente em caracterizar as transições π - π^* .

Tabela 15. Comprimentos de onda de absorção eletrônica experimental e teórica para BTDBrCCPh, BTDCCPPh e BTD(CCPh)₂ conforme obtidos a partir de cálculos TD-DFT usando o conjunto de base 6-311 + G (2d, p).

	Exp.	B3LYP	CAM-B3LYP	LC- ω PBE	M06	M06-2X	PBE1PBE	
	Solvente			$\lambda_{\text{abs(max)}}$				
BTDBrCCPh	MeCN	378	442,75	373,44	334,89	426,45	365,78	422,11
	CH ₂ Cl ₂	385	444,70	375,18	336,43	428,54	367,62	424,05
	DMSO	382	443,69	374,32	335,68	427,42	366,62	423,02
	EtOAc	381	444,46	374,95	336,21	428,35	367,47	423,85
	EtOH	384	443,12	373,78	335,18	426,85	366,13	422,48
	Toluene	385	442,72	377,99	338,92	431,97	370,73	427,14
	Hexane	385	446,57	377,01	338,05	430,91	369,88	426,06
	Water	398	442,42	373,16	334,63	426,11	365,47	421,78
	BTDCCPPh	MeCN	361	417,94	356,47	322,50	403,09	348,78
CH ₂ Cl ₂		367	419,56	357,93	323,80	404,87	350,35	400,69
DMSO		364	418,72	357,26	323,24	403,90	349,53	399,80
EtOAc		363	419,25	357,60	323,48	404,61	350,11	400,43
EtOH		366	418,26	356,76	322,76	403,43	349,08	399,35
Toluene		367	421,70	359,99	325,66	407,50	352,76	403,05
Hexane		367	420,46	358,89	324,67	406,37	351,79	401,91
Water		369	417,62	356,20	322,27	402,74	348,48	398,70
BTD(CCPh)₂		MeCN	405	486,14	410,61	367,05	467,58	402,15
	CH ₂ Cl ₂	412	488,38	412,73	368,93	470,02	404,35	466,38
	DMSO	410	487,68	411,88	368,12	469,09	403,40	465,58
	EtOAc	407	487,55	412,18	368,51	469,33	403,86	465,63
	EtOH	410	486,60	411,03	367,42	468,07	402,59	464,55
	Toluene	413	491,00	415,63	371,63	473,29	407,49	469,21
	Hexane	411	488,67	413,93	370,28	471,20	405,89	467,03
	Water	430	485,79	410,27	366,74	467,19	401,80	463,72

Para entender melhor os desempenhos relativos dos seis XCF aqui estudados, uma análise estatística é fornecida na Figura 80, onde é relatado o Erro Absoluto Médio (MAE) responsável pela posição do pico de absorção máxima associada às transições π - π^* .

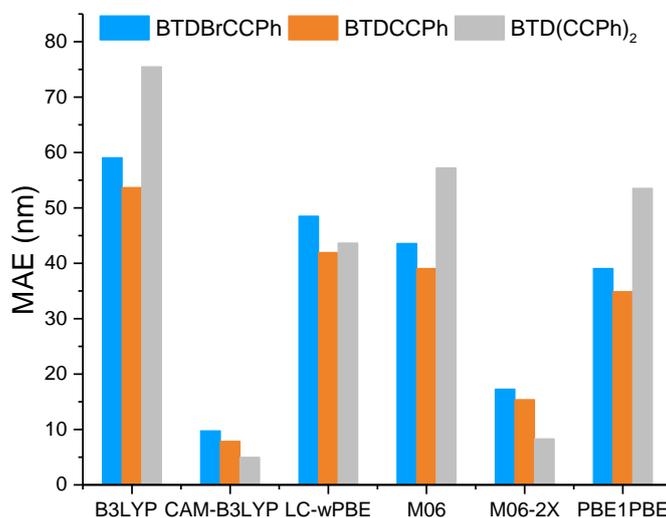


Figura 80. Erro Médio Absoluto (MAE) comparando as posições experimental e teórica λ_{\max} em diferentes solventes para as três BTDs teoricamente investigadas. O λ_{\max} calculado corresponde à maior banda de comprimento de onda associada à excitação eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$. Todos os cálculos teóricos foram realizados sob a estrutura TD-DFT usando diferentes DFT XCFs juntamente com o conjunto de base People-type 6-311 + G (2d, p).

Os B3LYP, LC- ω PBE, M06, e PBE1PBE forneceram posições menos precisas do que os outros dois XCF. CAM-B3LYP e M06-2X, por outro lado, produziram o melhor desempenho geral em todos os solventes estudados com desvios absolutos de até 10 nm ao empregar CAM-B3LYP. Este XCF foi, portanto, selecionado para maiores detalhes e investigações dos três corantes. O desempenho relativamente fraco de LC- ω PBE em cálculos TD-DFT, incluindo efeitos de solvente (PCM), já foi relatado para outros cromóforos orgânicos, conforme discutido em outro lugar.²²⁸

O espectro de absorção teórico do marcador **BTDCPh**₂, conforme calculado no nível de teoria CAM-B3LYP/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31G(d), é mostrado nas Figuras 81 – 83. Os espectros de absorção simulados resultaram em excelente concordância com a banda de excitação experimental. O Esquema de solvatação PCM no entanto, não resultou em mudanças solvatocrômicas significativas.

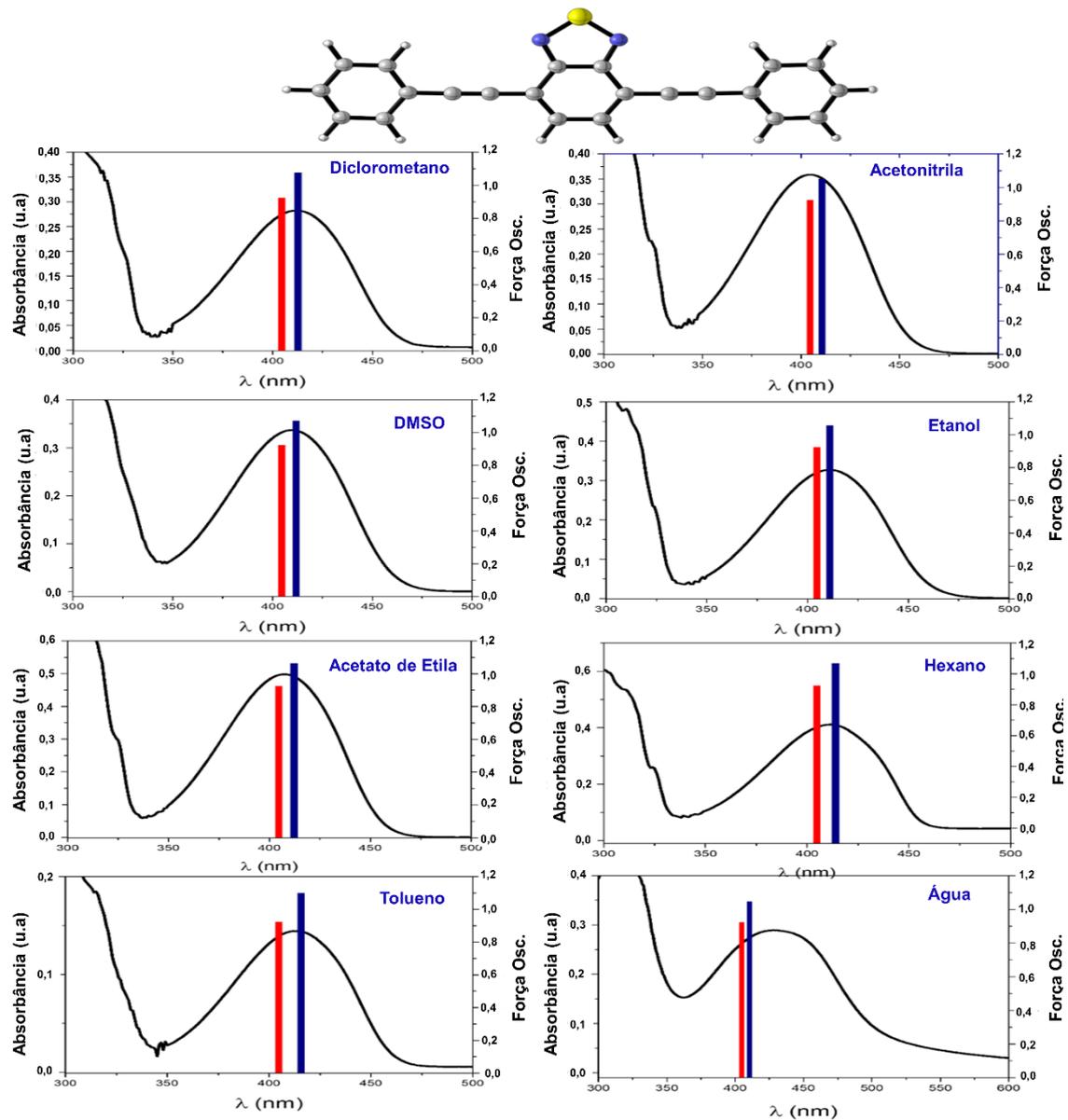


Figura 81. Espectros de absorção simulados de **BTD(CCPH)₂** em diferentes solventes calculados no nível teórico pelo CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d).

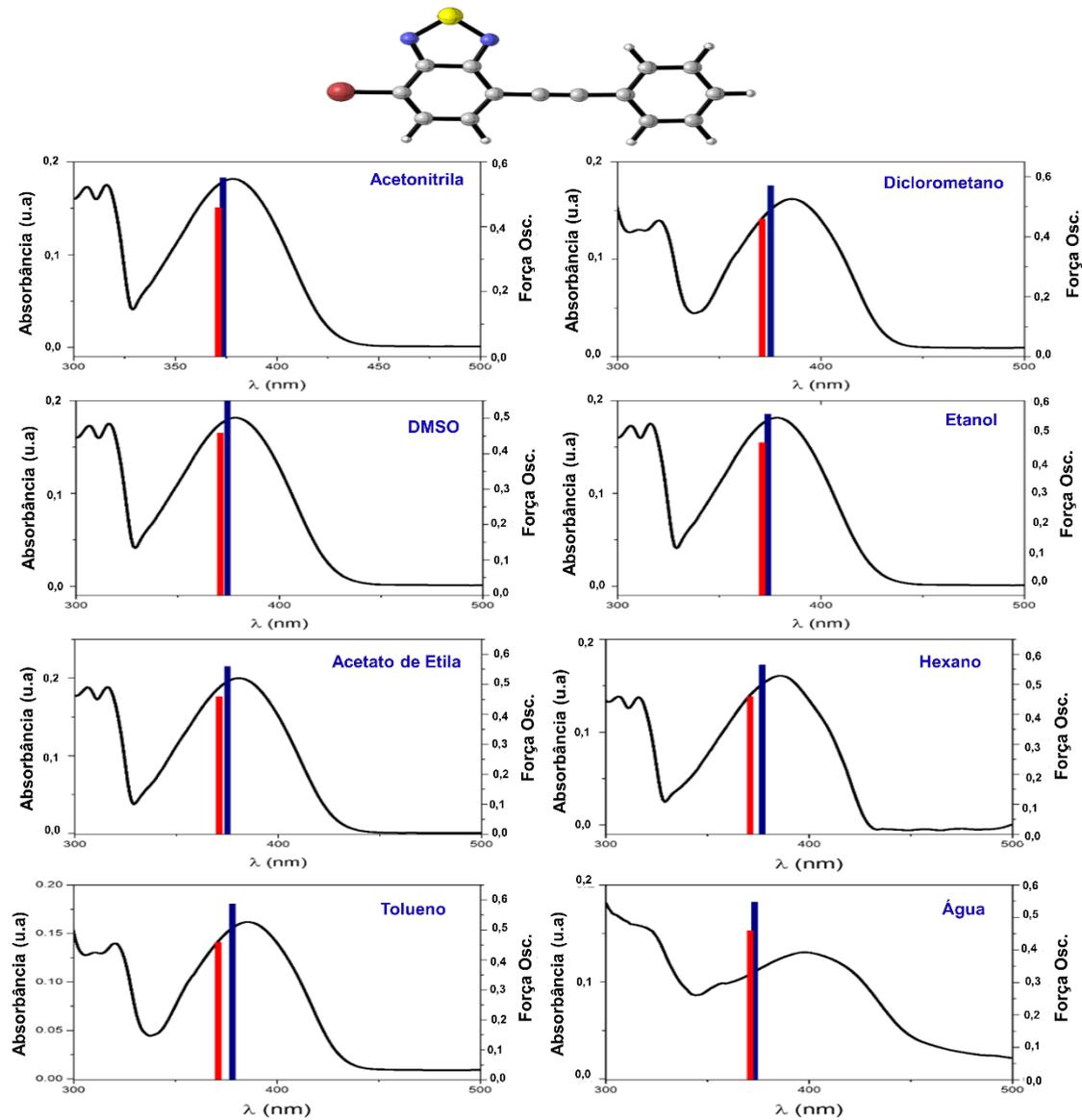


Figura 82. Espectros de absorção simulados de **BTDBrCCPh** em diferentes solventes calculados no nível teórico pelo CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d).

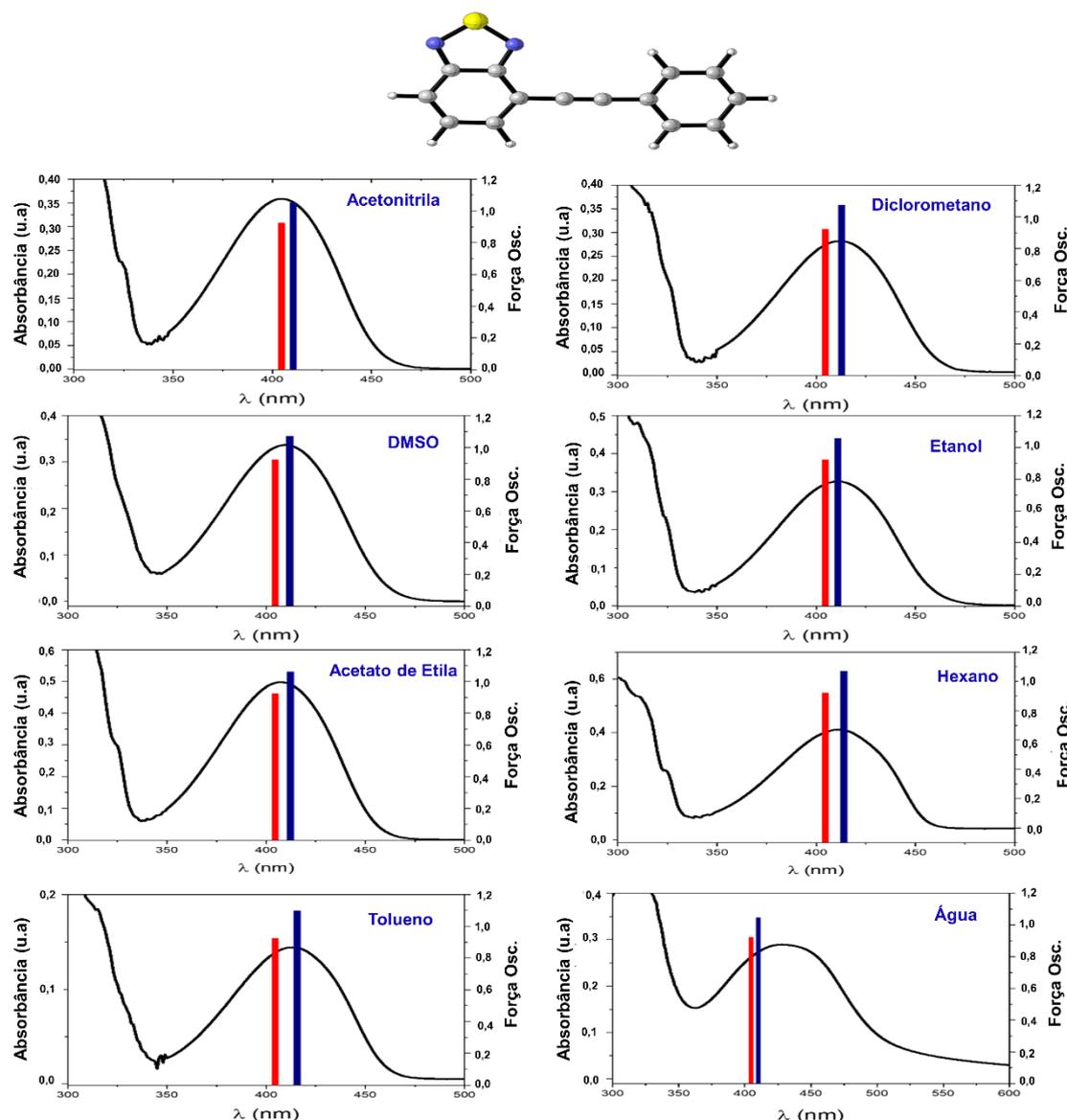


Figura 83. Espectros de absorção simulados de **BTDCPh** em diferentes solventes calculados no nível teórico pelo CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d).

Após a excitação eletrônica induzida por radiação UV-Vis, um elétron deixa seu estado de mais baixa energia ou fundamental (S_0) e se move para um estado de energia diferente em um processo de transferência de carga (CT). Essas novas configurações são chamadas de “*buraco*” e “*elétron*”.

Para as transições eletrônicas HOMO-LUMO diretas, as funções *buraco* (*hole*) e *elétron* (*ele*) são simplesmente os orbitais HOMO e LUMO. Para avaliar as transições eletrônicas em uma base quantitativa, os índices de transferência de carga foram calculados usando o programa de análise de função de onda Multiwfn.²²⁹

A distância entre os centróides das densidades *buraco* $\rho^{\text{hole}}(r)$ e *elétron* $\rho^{\text{ele}}(r)$ é uma medida de comprimento do CT (D_{CT}). O índice t (x, y, z) pode ser considerado como o

grau de separação do *buraco* e do *elétron*, de modo que se $t < 0$, uma sobreposição entre o *buraco* e o *elétron* é esperada. Para valores positivos de t , ocorre uma separação de $\rho^{\text{hole}}(r)$ e $\rho^{\text{ele}}(r)$ e é um indicativo de uma excitação CT de longo alcance.²³⁰

Guido e colaboradores²²⁷ propuseram o índice Δr para medir o comprimento do CT durante as transições eletrônicas. Valores menores de Δr significam que a transição é provavelmente uma excitação local, em vez de uma excitação de CT ou de Rydberg. Nesse trabalho, foi proposto o limite $\Delta r > 2 \text{ \AA}$ para que uma dada transição eletrônica fosse considerada um modo CT.

As densidades $\rho^{\text{hole}}(r)$ e $\rho^{\text{ele}}(r)$ envolvidas na excitação eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$ associada com a banda de maior comprimento de onda são exibidas na Figura 84, mostrando que esta transição é uma típica transição HOMO-LUMO com um forte caráter π - π^* .

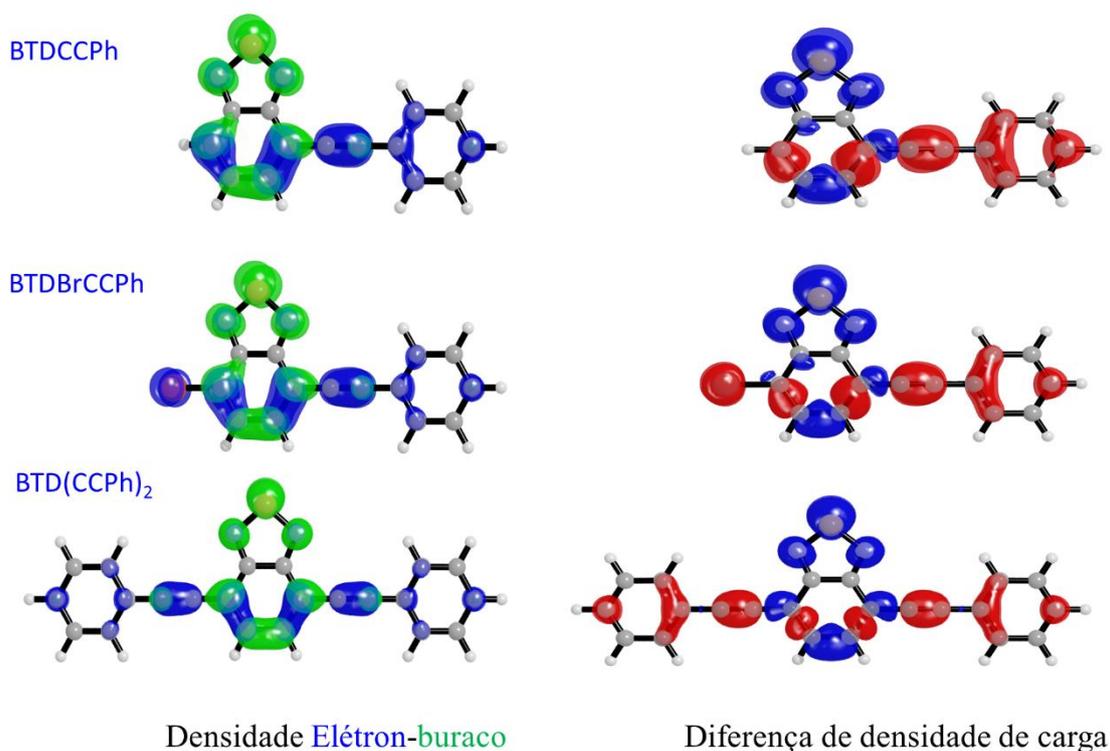


Figura 84. Esquerda. Densidades de buraco $\rho^{\text{buraco}}(r)$ e elétron $\rho^{\text{ele}}(r)$ dos cromóforos **BTDCcPh**, **BTDBrCPh** e **BTDCcPh₂** em acetonitrila envolvida na excitação eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$ associada com a banda de maior comprimento de onda. (Direita) Diferença de densidade de carga entre o estado fundamental (S_0) e primeiro estado excitado (S_1) indicando redução da densidade de carga eletrônica em vermelho e acúmulo de densidade de carga em azul.

A densidade de $\rho^{\text{ele}}(r)$ está centrada no núcleo BTDC, como esperado, uma vez que o núcleo BTDC é conhecido por ser um forte aceptor de elétrons.^{55,56} A densidade $\rho^{\text{hole}}(r)$ está predominantemente localizada nos fragmentos **-CCPh**, doador de densidade

eletrônica, mas com participação do anel aromático na porção do **núcleo BTD** (observe as semelhanças entre HOMO e $\rho^{\text{hole}}(r)$, e entre LUMO e $\rho^{\text{elec}}(r)$ na Figura 85).

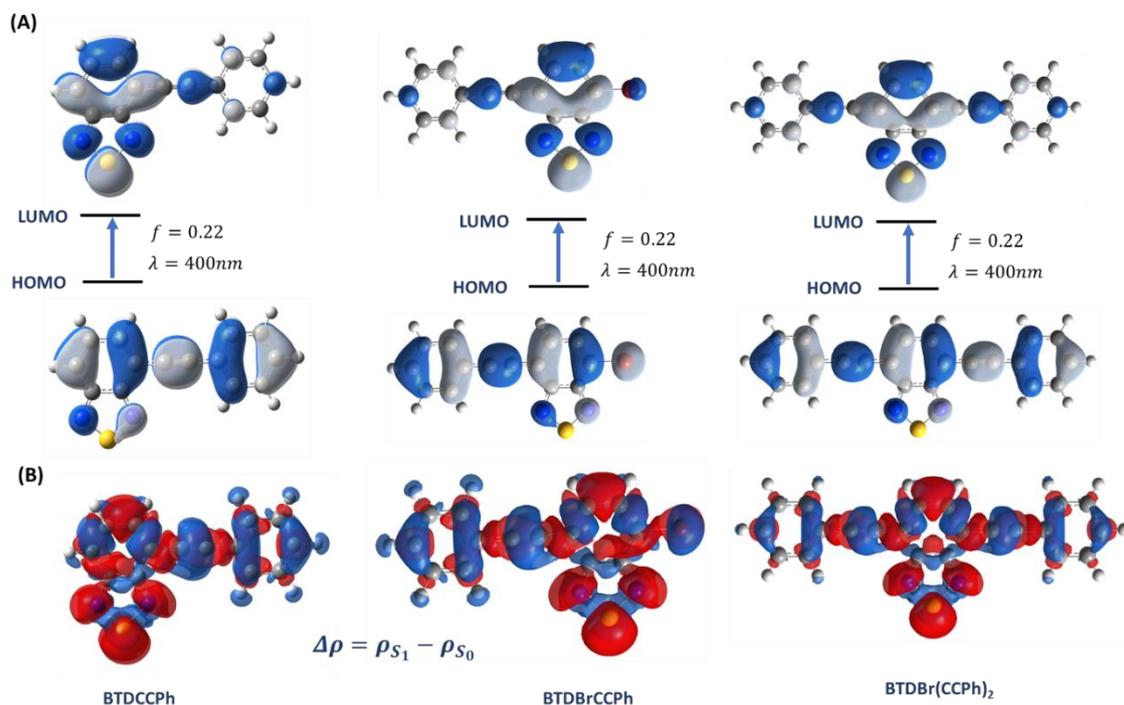


Figura 85. CAM-B3LYP / 6-311 + G (2d, p) // CAM-B3LYP / 6-311 + G (d) orbitais HOMO e LUMO de **BTDCcPh**, **BTDBrCCPh** e **BTDBr(CCPh)₂** (respectivamente) em acetonitrila na Transição $S_0 \rightarrow S_1$ responsável pela maior banda de comprimento de onda. (B) Diferença de densidade de elétrons entre o estado fundamental S_0 e o primeiro estado excitado S_1 obtido no mesmo nível da teoria; os efeitos do solvente foram incluídos por meio do modelo contínuo IEF-PCM em acetonitrila.

Os orbitais LUMO e as densidades $\rho^{\text{elec}}(r)$ foram estritamente centrados sobre o núcleo BTD para os três fluoróforos investigados, o que é esperado devido às suas propriedades de remoção de elétrons. A densidade da diferença de carga também é mostrada na Figura 84 e indica que a transição π - π^* tem um caráter CT claro, sendo muito semelhante à diferença de densidade do elétron, conforme mostrado na Figura 85.

Com relação aos índices CT de Guido e colaboradores²²⁷ e de Le Bahers e colaboradores,²³⁰ a Tabela 16 resume esses valores para as transições $S_0 \rightarrow S_1$. Os valores de Δr indicam que a **BTDBr(CCPh)₂** tem um comprimento de CT mais fraco (abaixo do limite proposto de 2 Å), que também é refletido por seu comprimento de CT menor D_{CT} e a diferença de momentos de dipolo entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado $\Delta\mu_{ge}$.

Tabela 16. Comprimento de onda de absorção eletrônica teórica para **BTDBrCCPh**, **BTDCCPH** e **BTDCCPH**₂ conforme obtido a partir de cálculos TD-DFT usando o conjunto de base 6-311+G(2d,p).

	BTDBrCCPh	BTDCCPH	BTDCCPH ₂
λ (nm)	373,44	356,47	410,61
f	0,5513	0,7565	1,0509
S	0,4523	0,4605	0,4483
D_{CT} (Å)	1,5500	2,0131	0,8718
Δr (Å)	2,4108	2,7121	0,8656
μ_{ge} (D)	-8,02	7,29	-10,68
	-0,24	-2,03	0,00
	0,00	0,00	0,00
$\Delta\mu_{ge}$ (D)	7,26	9,27	4,01
t	-1,539	-0,660	-3,603
	-0,432	-0,783	-0,534
	-0,799	-0,796	-0,787

Os baixos índices de CT para a **BTDCCPH**₂ reforçam a importância do efeito de difusão observado na dinâmica de agregação, que é possível pela menor energia de ativação, como pode ser visto na Figura 85, e não é controlado por interações de longo alcance. Esses efeitos coletivos rápidos promovidos pelo meio do solvente levaram a um processo de nucleação mais eficaz (fase de atraso rápido) conforme o comportamento revelado pelo modelo F-W.

Esses resultados ajudam a explicar por que alguns deslocamentos de Stokes são menores do que aqueles normalmente esperados para as BTDCs fluorescentes. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato do fragmento **-CCPh** ser um doador mais neutro e devido também à ausência de um grupo fortemente doador de elétrons, como o p-metoxifenil.⁶³

Os marcadores **BTDCCPH** e **BTDBrCCPh**, por outro lado, apresentaram os maiores valores de Δr e D_{CT} , acompanhados por grande $\Delta\mu_{ge}$. Isso era esperado, uma vez que esses dois fluoróforos são mais polares do que **BTDCCPH**₂ e, portanto, propensos a transições CT mais fortes.

O índice t resultou em valores negativos em todas as direções em todos os três fluoróforos, indicando, portanto, que as transições CT não são unidimensionais e que existem algumas misturas ou sobreposição entre $\rho^{\text{hole}}(r)$ e $\rho^{\text{ele}}(r)$.

3.5 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os processos de foto-excitação, em moléculas luminescentes, induzem transições $S_0 \rightarrow S_1$ seguido pelas transições radiativas que resultam em emissões de fluorescência ou fosforescência.³⁵⁻³⁸ A remoção de oxigênio (O_2) em soluções contendo BTDCs resulta na

ativação das transições tripleto ($S_1 \rightarrow T_1$ e/ou $T_1 \rightarrow S_0$),¹⁷⁹ que podem ser detectadas nas análises de RPE (Figura 30). As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no estado tripleto significa que há dois elétrons com spins paralelos nesse orbital e, portanto, são observados nos sinais de PRE.^{158, 171-177}

As transições tripleto podem ser melhor observadas em baixas temperaturas ou meios rígidos, pois o tempo de vida do estado tripleto pode, nessas condições, ser longo o suficiente para se observar a fosforescência em uma escala de tempo até segundos ou minutos.^{35-38,158}

As regiões de maior acumulação de carga nas BTDs, após a foto-excitação ($\pi \rightarrow \pi^*$), foram então determinadas através de medidas de RPE com a variação de temperatura, no qual o monitoramento do decaimento radiativo ($S_1 \rightarrow T_1$ e $T_1 \rightarrow S_0$) permitiu entender a dinâmica do estado excitado das moléculas.

As soluções de cada BTD (10 μM) em DMSO foram coletadas, submetidas à atmosfera de nitrogênio para remoção do oxigênio dissolvido e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida as soluções congeladas foram foto-excitadas (254 nm) por 25 min, e medidas num espectrômetro de RPE variando-se a temperatura na faixa de 100 a 250 K. O gráfico de amplitude de sinal de RPE em função da temperatura é mostrado na Figura 86.

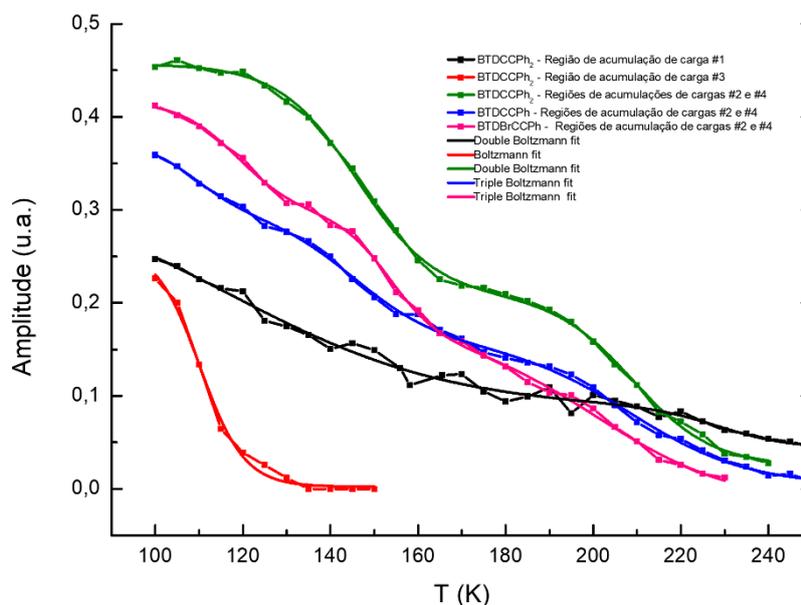


Figura 86. Gráfico de amplitude de sinal de RPE em função da temperatura (100 a 250 K) para as BTDs lipofílicas.

A figura acima mostra a dependência dos espectros com a temperatura. Como era esperado, os sinais de amplitude de RPE mais intensos foram obtidos em temperaturas

mais baixas, na faixa de 100 K, tornando possível a análise da dinâmica do estado excitado para as BTDs.

Foram observadas também na temperatura de 100 K, na região correspondente ao campo magnético 3400 G, uma clara sobreposição entre as transições geradas por diferentes densidades eletrônicas. Dessa forma, o ajuste dos dados de amplitude do RPE foi realizado por meio das funções apresentadas nas Equações (9), (10) e (11).

$$y = y_0 + A/(1 + \exp((x-x_0)/k)) \text{ (Boltzmann)} \quad (9)$$

$$y = y_0 + A \times (B_1/(1 + \exp((x-x_{01})/k_1)) + (B_2)/(1 + \exp((x-x_{02})/k_2))) \text{ (Double-Boltzmann)} \quad (10)$$

$$y = y_0 + A \times (B_1/(1 + \exp((x-x_{01})/k_1)) + (B_2)/(1 + \exp((x-x_{02})/k_2)) + (B_3)/(1 + \exp((x-x_{03})/k_3))) \text{ (Triple-Boltzmann)} \quad (11)$$

Essas equações mostraram uma dependência das transições RPE, apresentando uma ou mais exponenciais de forma a incorporar os diferentes componentes geradores dos espectros coletados (Tabela 17).

Tabela 17. Coeficientes e valores obtidos a partir dos dados do RPE por meio das equações (9), (10) e (11) para os três marcadores.

Marcador	y_0	A	B_1	B_2	B_3	x_{01}	x_{02}	x_{03}	k_1	k_2	k_3	χ^2	R^2
BTDCCPH	0.0035	0.509	0.148	0.302	0.279	108	208	145	6.2	13.3	9.8	2 E^{-5}	0.998
BTDBrCCPh	-0.017	0.520	0.243	0.362	0.230	153	201	118	5.6	15.9	6.7	2 E^{-5}	0.998
BTDCCPH ₂ Acumulação de Carga Região #1	0.042	0.289	0.853	0.147		117	229		25.5	8.0		6 E^{-5}	0.983
BTDCCPH ₂ Acumulação de Carga Região #2	0.024	0.476	0.386	0.523		209	146		9.1	8.9		2 E^{-5}	0.999
BTDCCPH ₂ Acumulação de Carga Região #3	0.002	0.258	110.2	5.055								5 E^{-5}	0.993

Os dados da Figura 86 e Tabela 17 indicaram transições eletrônicas dos estados excitados para as BTDs projetadas, ou seja, indicações das regiões de maior acumulação de carga nas BTDs, após a foto-excitação. Na Figura 87, são mostrados os espectros de RPE obtidos após o tratamento dos dados para a BTDCCPH₂ na temperatura de 100K.

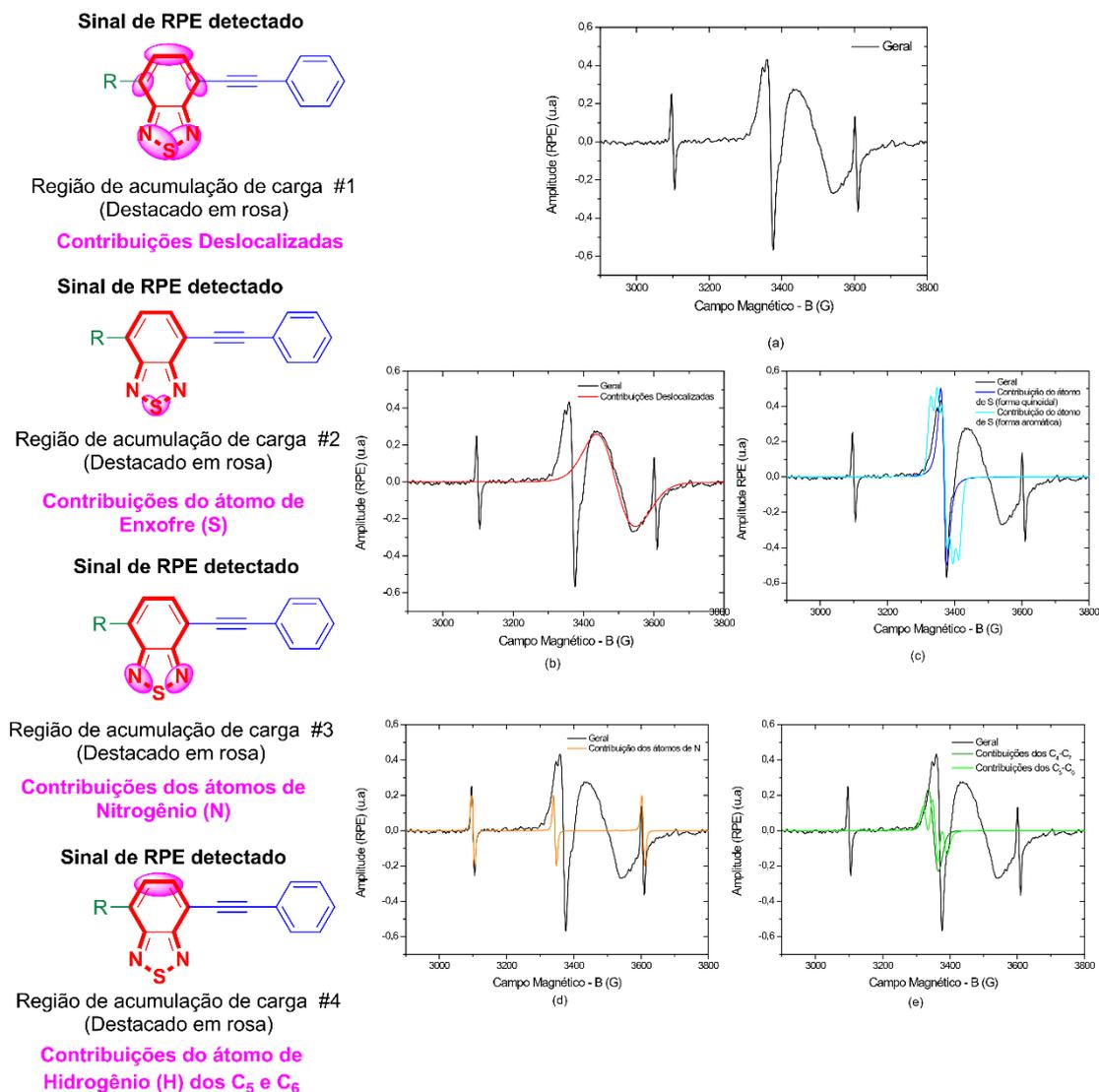


Figura 87. Diferentes regiões de acumulação de carga (destacadas em rosa) nas estruturas das BTDs responsáveis pelos sinais de RPE observados, onde: (a) Análise geral de RPE para a **BTDC(CCPh)₂** a 100 K após a irradiação de luz (254 nm) por 25 min contendo todas as contribuições das diferentes regiões do núcleo BTDC; (b) Espectro de RPE indicando as contribuições das formas deslocalizadas do núcleo BTDC; (c) Espectro de RPE indicando as contribuições do átomo de enxofre na forma quinoidal e aromática do núcleo BTDC; (d) Espectro de RPE indicando as contribuições dos átomos de nitrogênio do núcleo BTDC; (e) Espectro de RPE indicando as contribuições dos átomos de hidrogênio dos C₅ e C₆ do núcleo BTDC.

Conforme ilustrado na Figura 87, os estados T₁ (Figura 30), estados a partir dos quais os processos de decaimento ocorrem, puderam ser monitoradas. As análises de RPE também revelaram as transições entre as formas quinóide, aromática zwitteriônica e aromática (contendo um enxofre hipervalente) do núcleo BTDC.⁵⁵

Essas três formas mesoméricas não são energeticamente equivalentes para derivados de BTDCs.⁵⁵ Foram observados que o átomo de enxofre (região de acumulação de carga #2, espectro da Figura 87 (d)) desempenha um papel central na característica de aceitação de elétrons das contribuições heterocíclicas e zwitteriônicas do núcleo BTDC.^{55,231} O átomo

de enxofre, de fato, tem contribuições importantes para os sinais dos espectros RPE. Todas essas formas possíveis podem ter contribuído para os sinais do RPE, tornando-os mais complexos de serem compreendidos.

Foram possíveis verificar também as interações hiperfinas do spin eletrônico relacionadas aos átomos de nitrogênio (região de acumulação de carga #3, espectro da Figura 87 (e)) e átomos de hidrogênio dos C₅ e C₆ do núcleo BTB (região de acumulação de carga #4, espectro da Figura 87 (f)).

A região de acumulação de carga # 4 (Figura 87 (f)), também prevista a partir dos cálculos DFT, tem um $n = 1$ (sinal tripleto) devido as interações hiperfinas com os hidrogênios dos carbonos. Os dois átomos de N também podem também ser responsáveis por interações hiperfinas conforme previsto por cálculos DFT (Figura 84).

A aproximadamente a 3.500 G, um grande sinal (≈ 100 G) foi detectado devido às cargas deslocalizadas (região de acumulação de carga # 1 na Figura 87 (c)) e este resultado parece estar de acordo com a literatura.¹⁶⁵

Os sinais RPE foram simulados (Figura 88). Os espectros obtidos experimentalmente e simulados (a 100 K) estão de acordo. Para a forma quinóide do núcleo BTB, nenhuma interação hiperfina é previsível, enquanto para as formas aromáticas é provavelmente uma função de onda mais distribuída entre os átomos N-S-N do núcleo tiadiazol e, portanto, com um número de spin total $n = 2$. O resultado líquido é um sinal quártuplo (regra $2n + 1$) conforme indicado na Figura 87 (e) (região de acumulação de carga # 3 e considere as formas mesoméricas aromáticas).

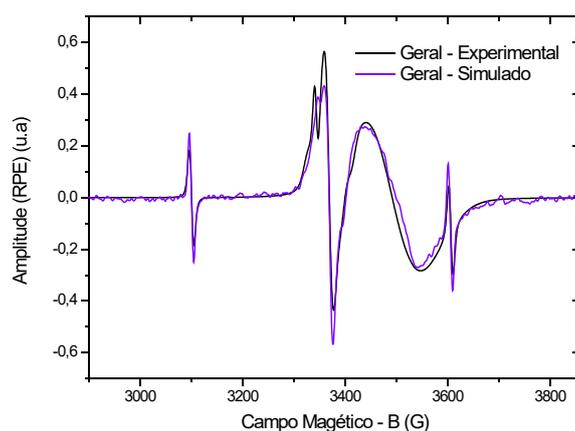


Figura 88. Análise RPE e gráficos simulados para BTB(CCPh)₂.

Para os outros dois derivados de BTBs (BTDBrCCPh e BTDCPh), a diferença mais significativa é a ausência das interações hiperfinas atribuídas aos átomos de N. Essas transições provavelmente requerem temperaturas mais baixas para serem detectadas. As

outras transições (Figura 89) são muito semelhantes àsquelas observadas para **BTDCCPH**₂.

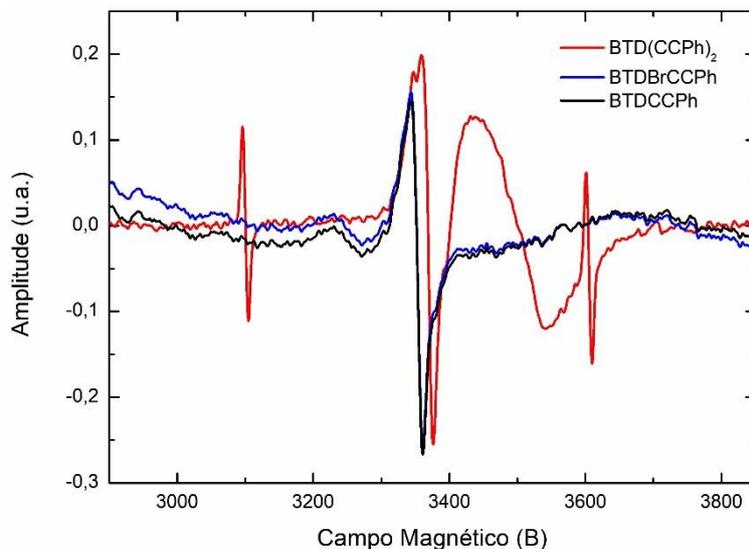


Figura 89. Análise de PRE para **BTDBrCCPh**, **BTDCCPH** e **BTDCCPH**₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.

O campo de ressonância para as três BTDCs em função da temperatura também foi obtido (Figura 90). A linearidade do gráfico indicou a alta estabilidade das moléculas projetadas em decorrência da estabilidade do campo interno mesmo variando a temperatura das análises.

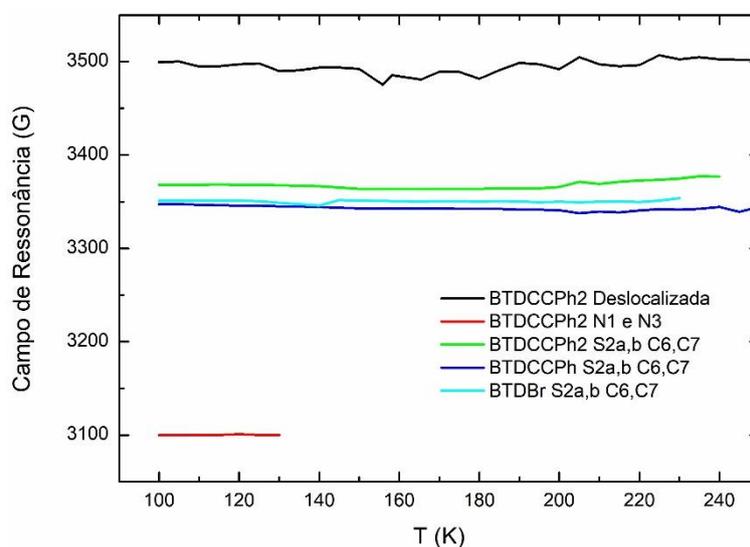


Figura 90. Campo de ressonância como uma função de temperatura nas análises de PRE para **BTDBrCCPh**, **BTDCCPH** e **BTDCCPH**₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.

A largura da linha (ou largura das transições RPE) é determinada pelo tempo em que os elétrons permanecem no estado de *spin-up* e depende essencialmente de duas contribuições para o mecanismo de relaxação, ou seja, o tempo de relaxação da rede de

spin (T_1) e o tempo de relaxação spin-spin (T_2). Sabe-se que radicais orgânicos tipicamente possuem $T_1 \gg T_2$ ¹⁵⁹ de forma que o tempo de relaxação total (T) é dado na Equação (12).

$$\frac{1}{T} \approx \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (12)$$

Como $T_1 \gg T_2$, então o tempo é provavelmente determinado por $1/T \approx 1/T_2$. A Figura 91 mostra que a largura de transição das diferentes amostras permanece constante em função da temperatura, reforçando, portanto, a independência de relaxação em relação ao mecanismo de rede de spin como esperado para materiais orgânicos.

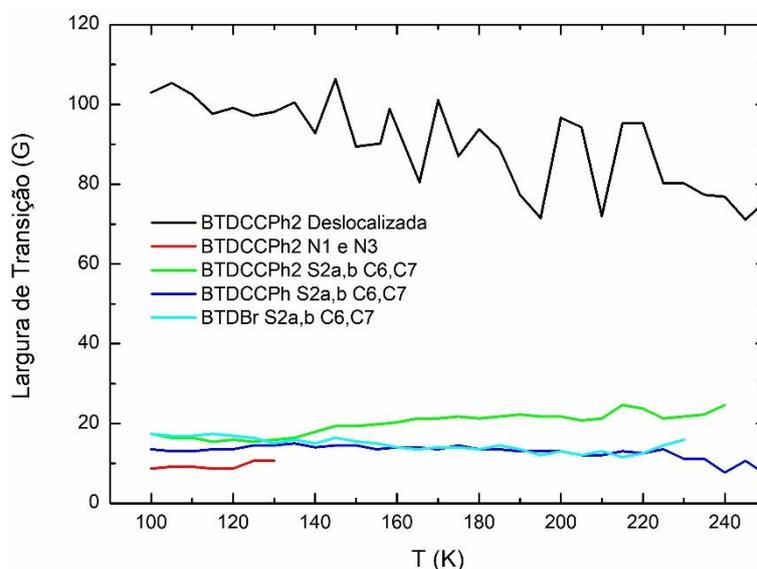


Figura 91. Largura de transição como uma função de temperatura nas análises de PRE para **BTDBrCCPh**, **BTDCPh** e **BTDCPh**₂ (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min.

Com relação aos dados de amplitude de RPE (Figura 86), considerando os sistemas orgânicos onde o estado tripleto excitado resulta do decaimento de um estado singleto excitado por meio de um mecanismo de cruzamento intersistema (ISC), as populações eletrônicas no nível tripleto não satisfazem a distribuição de Boltzmann para a diferença de população entre os dois estados de spin.^{161,232}

Como previsto por cálculos DFT e análises de RPE, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem com a estabilização do estado excitado pelo processo ICT, que está direcionado no sentido dos substituintes **-CCPh** para o núcleo BTDCPh e as multiplicidades observadas nos espectros de RPE revelaram essa tendência (Figura 92). Dessa forma a técnica de RPE permitiu o entendimento da dinâmica do estado excitado para as três BTDCPhs sintetizadas.

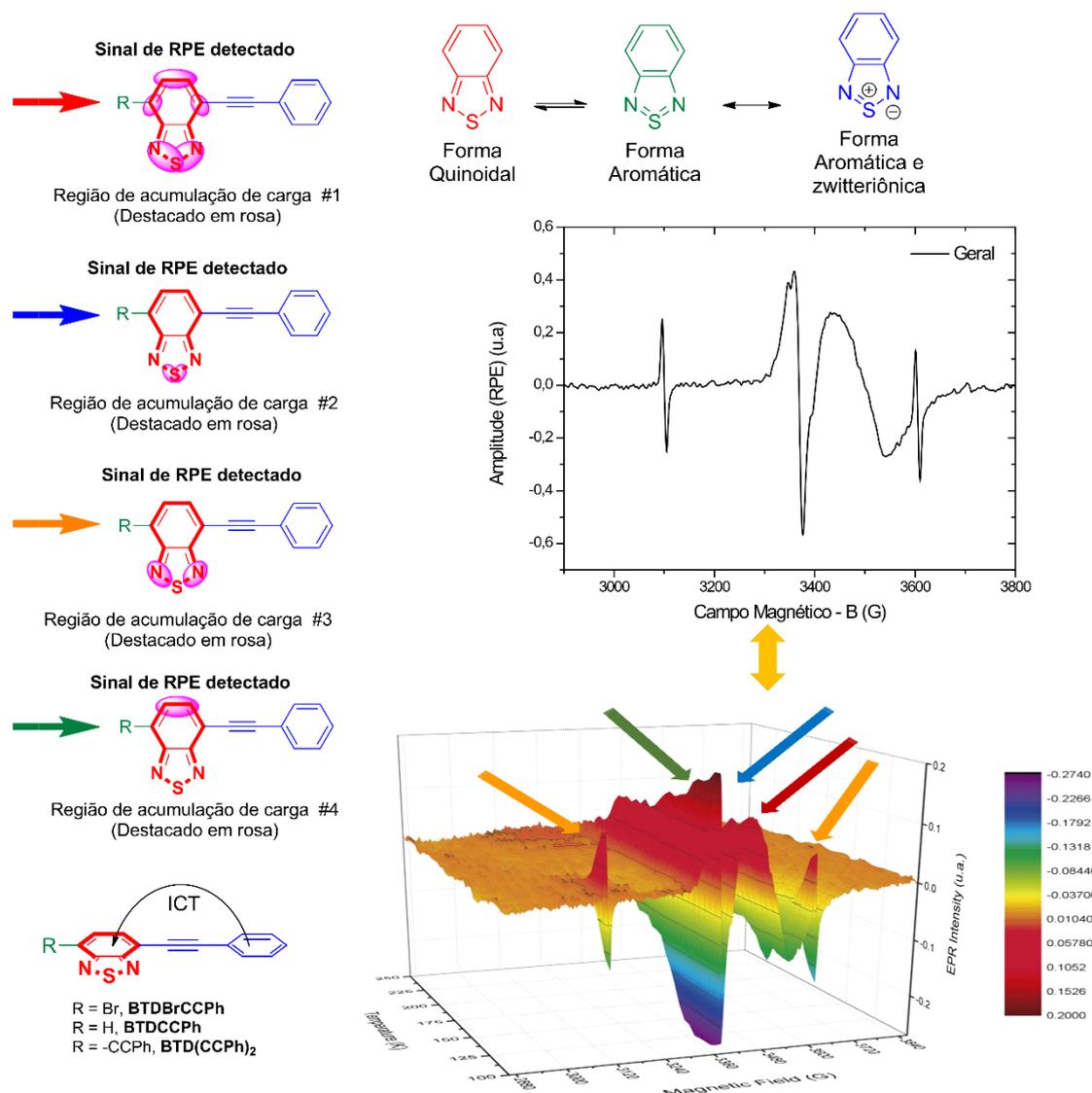


Figura 92. Análise de RPE para **BTD(CCPh)₂** (10 μ M) a 100 K após irradiação de luz (254 nm) por 25 min. O gráfico 3D está relacionado ao decaimento para **BTD(CCPh)₂** na faixa de 100 a 250 K. As três formas mesoméricas do núcleo BTd parecem contribuir para os sinais RPE. Observe que apenas as formas quinóides dos derivados são mostradas para maior clareza. Nas estruturas das BTds, são indicadas (destacadas em rosa) as regiões de acumulação de carga do PRE responsáveis pelos sinais observados.

3.6 Testes Biológicos

3.6.1 Viabilidade Celular

Os ensaios de viabilidade ou citotoxicidade são bons indicadores da saúde celular. Os agentes físicos e químicos como as sondas fluorescentes podem afetar o metabolismo das células. Esses agentes podem causar toxicidade nas células por meio de diferentes

mecanismos, como destruição das membranas celulares, prevenção da síntese de proteínas, ligação irreversível a receptores e reações enzimáticas.²³³⁻²³⁵

Vários ensaios de citotoxicidade estão disponíveis. Cada um deles utiliza uma abordagem específica para detectar diferentes aspectos da viabilidade celular, como a proliferação de células e funções metabólicas. Dentre esses ensaios destacam-se os colorimétricos (teste MTT) e os fluorimétricos (reagente Presto-Blue).²³³

O teste colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é baseado na redução do MTT, um sal amarelo solúvel em água, através do efeito da atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH (Figura 93). Nesse processo são formados cristais insolúveis de formazan, de coloração azul ou roxa, que atua como um quantificador da viabilidade das células.²³⁶

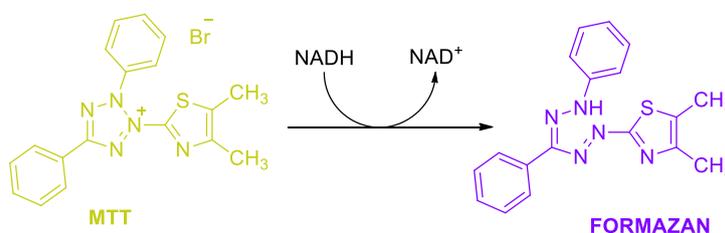


Figura 93. Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água). Adaptado da referência 236.

O teste fluorimétrico com o reagente Presto Blue, conhecido também por resazurina (7-hidroxi-3*H*-fenoxazina-3-ona 10-óxido), é usado como um indicador de oxirredução em ensaios de viabilidade celular em células bacterianas e de mamíferos, sendo bastante utilizado em estudos mais longos, pois é pouco tóxico. Apresentam excelentes correlações com ensaios de referência, como os testes MTT.^{233,234}

Nesse teste, o composto resazurina, de cor azul e não fluorescente é reduzido a um composto fluorescente, de cor rosa, o resorzufin (Figura 94). Como essa reação ocorre geralmente em células metabolicamente ativas, esse teste é um indicativo de atividade celular, podendo ser usado na determinação qualitativa e quantitativa. A quantificação celular pode ser realizada de duas formas: (i) colorimetria ou (ii) fluorescência; essa última é considerada a mais sensível.²³⁴

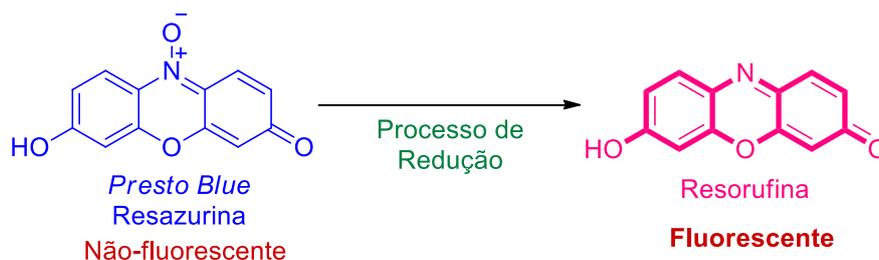


Figura 94. Redução de resazurina a resorufina em testes de viabilidade celular. Adaptado da referência 234.

Os fluoróforos sintetizados foram finalmente avaliados em termos de viabilidade celular qualitativa e quantitativamente em linhagens de células de câncer de mama MDA-MB-231 usando o reagente de viabilidade Presto-Blue.^{233,234} Os resultados são apresentados na Figura 95.⁷

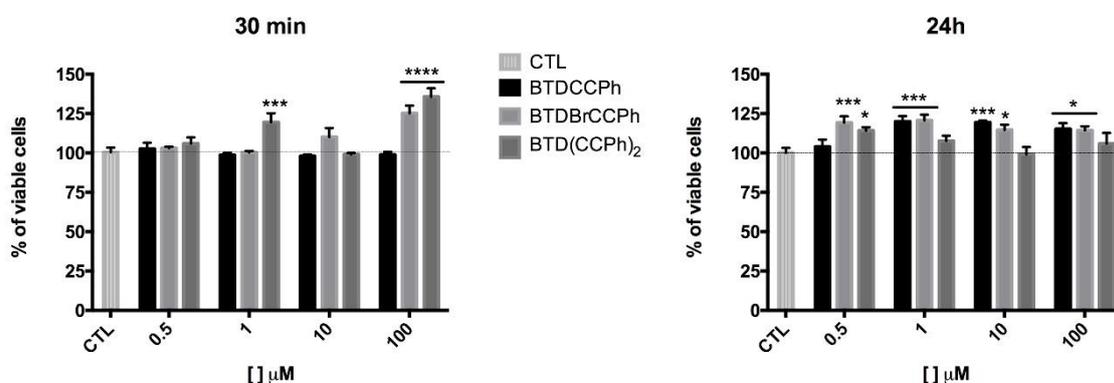


Figura 95. Determinação da viabilidade celular após 30 min e 24 h para os compostos **BTDBrCCPh**, **BTDCCPH** e **BTD(CCPh)₂**. A barra gráfica não mostra nenhum efeito citotóxico estatisticamente significativo após 24 horas de incubação para os compostos testados.

Verificou-se que os marcadores não são citotóxicos mesmo em altas concentrações de BTDs após 24 horas. Foram verificados também a ocorrência de proliferação celular com percentuais acima de 100%. Dessa forma, foram demonstrados que as sondas fluorescentes podem ser aplicadas na marcação de gotas lipídicas sem interferir no metabolismo celular, o que traz a possibilidade de serem aplicadas também no estudo da dinâmica das gotas lipídicas.

⁷ Os testes de viabilidade celular foram realizados por Bruna Guido, aluna de pós-doutorado do professor Dr. José R. Correa, no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3.6.2 Imageamento Celular de Gotas Lipídicas

A marcação de gotas lipídicas utilizando sondas fluorescentes baseadas em BTB sintetizadas foram realizadas pela técnica de microscopia de fluorescência confocal.⁸ Os testes foram realizados em linhagens de células de câncer de mama MDA-MB-231 vivas e fixadas variando-se as concentrações das BTBs de 1 a 100 μM . O $\lambda_{(excit)}$ selecionado na fonte de excitação do microscópio de fluorescência foi de 405 nm, com as emissões de fluorescência sendo medidas no canal do azul (407 – 474 nm), verde (530 – 570) e vermelho (603 – 717).³⁰⁻³⁷

O objetivo dessa análise, foi avaliar, em termos práticos, a presença ou ausência de emissão fluorescente no ambiente celular, assim como definir a concentração mínima ideal necessária de cada fluoróforo para que houvesse emissão de sinal fluorescente detectável pela microscopia de fluorescência.

A escolha de células tumorais se deu pelo fato vários estudos descreverem que há um aumento do acúmulo de lipídios intracelulares em diferentes processos neoplásicos nesses tipos de células, embora não esteja claro se o acúmulo de gotas lipídicas esteja diretamente envolvido no estabelecimento desses diferentes tipos de neoplasias.^{4,6-9, 237}

Os resultados dos imageamentos celulares podem ser vistos nas Figuras 96 – 101, onde foi possível confirmar a seletividade para as LDs com emissões variando do azul para vermelho.

⁸ Todos os testes de imageamento celular foram realizados por Bruna Guido, aluna de pós-doutorado do professor Dr. José R. Correa, no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

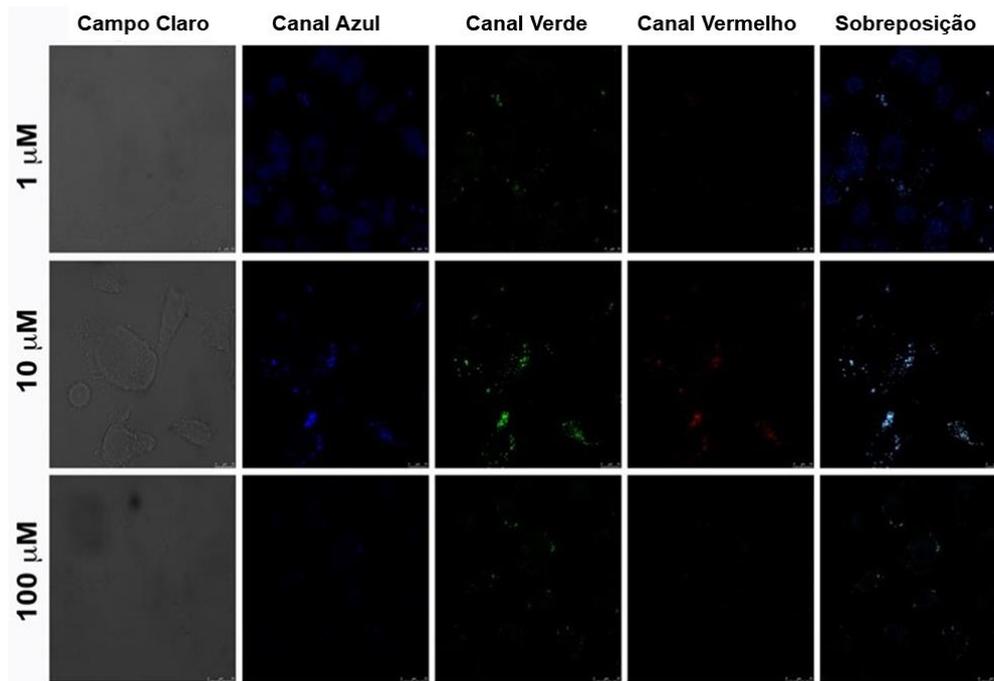


Figura 96. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando **BTDBrCCPh** em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm.

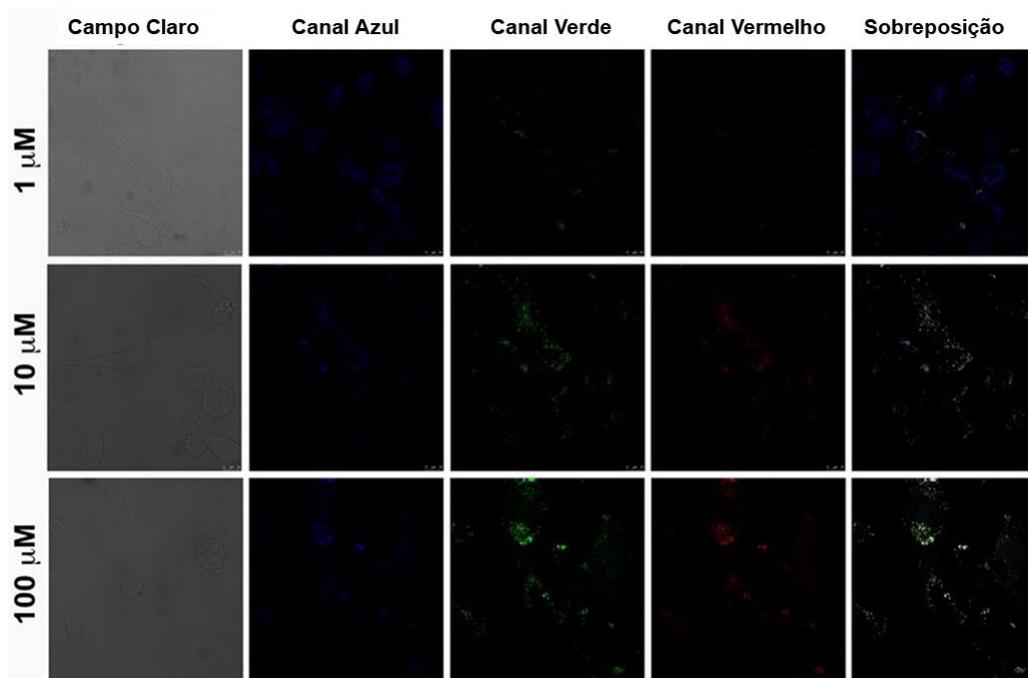


Figura 97. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 fixadas usando **BTDBrCCPh** em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm.

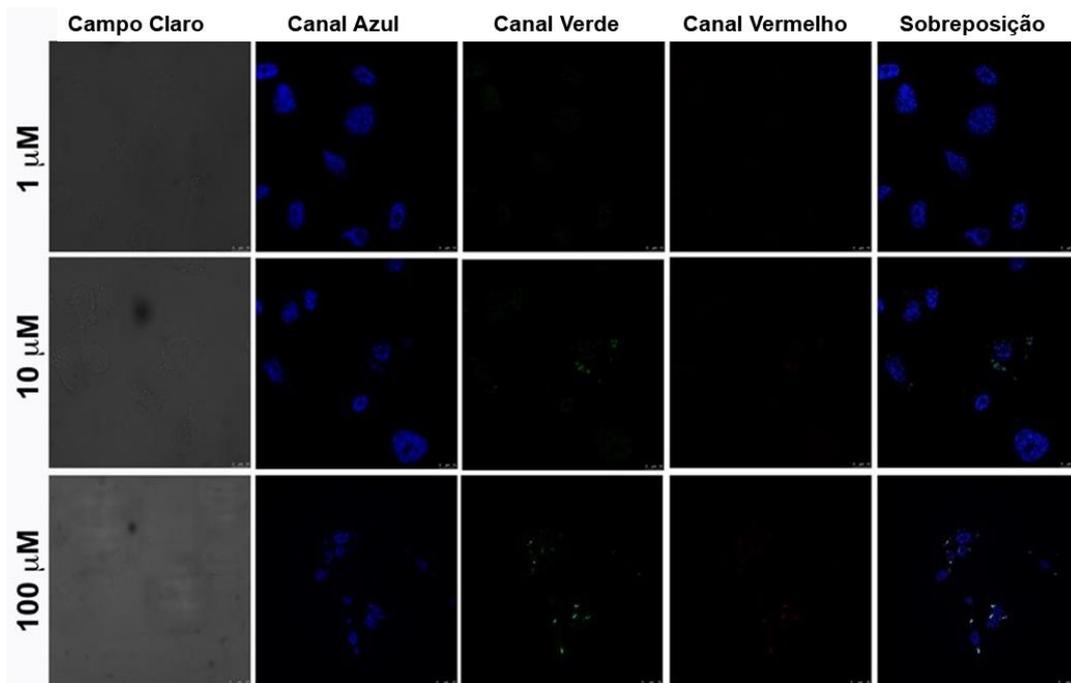


Figura 98. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando **BTDCCP** em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm .

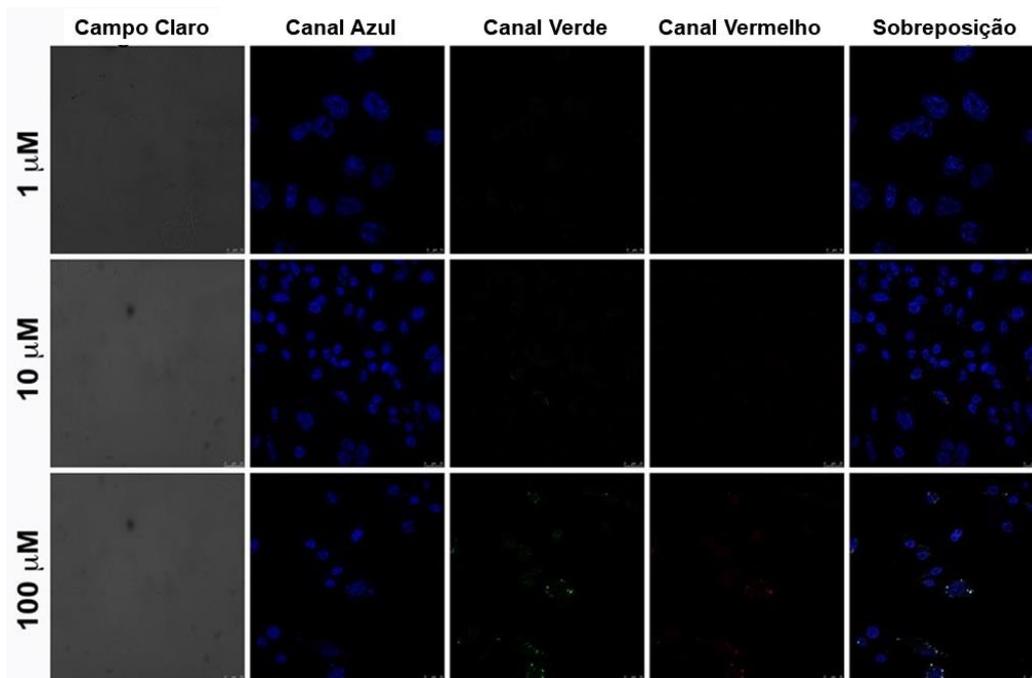


Figura 99. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 fixadas usando **BTDCCP** em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm .

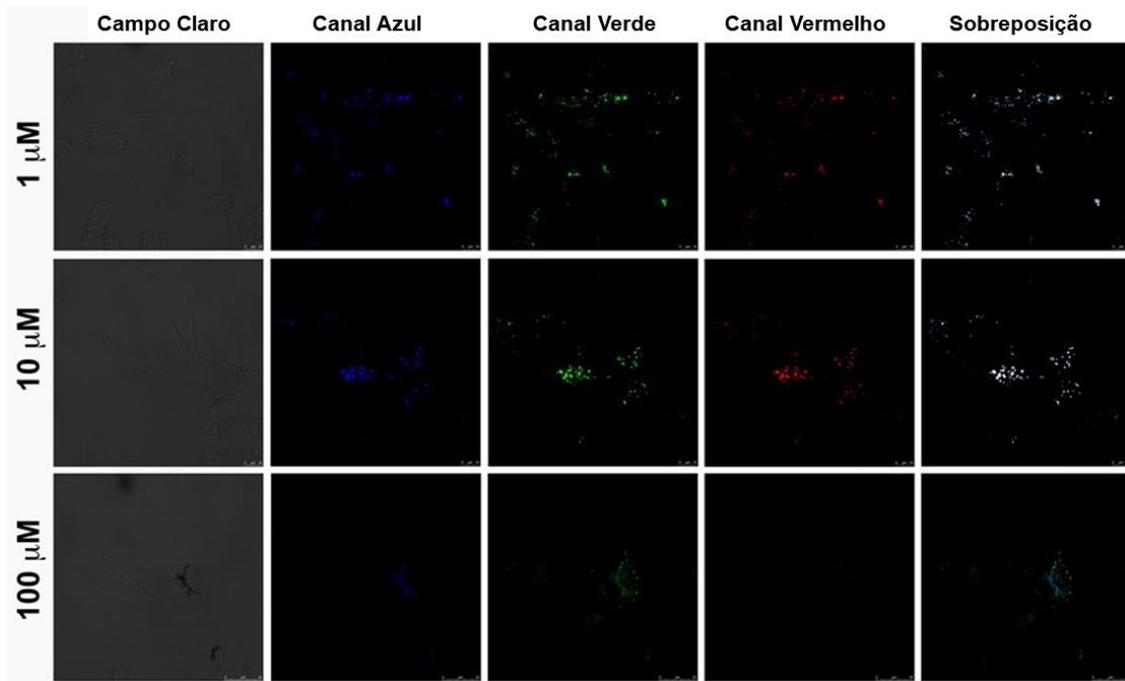


Figura 100. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando $\text{BTD}(\text{CCPh})_2$ em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm.

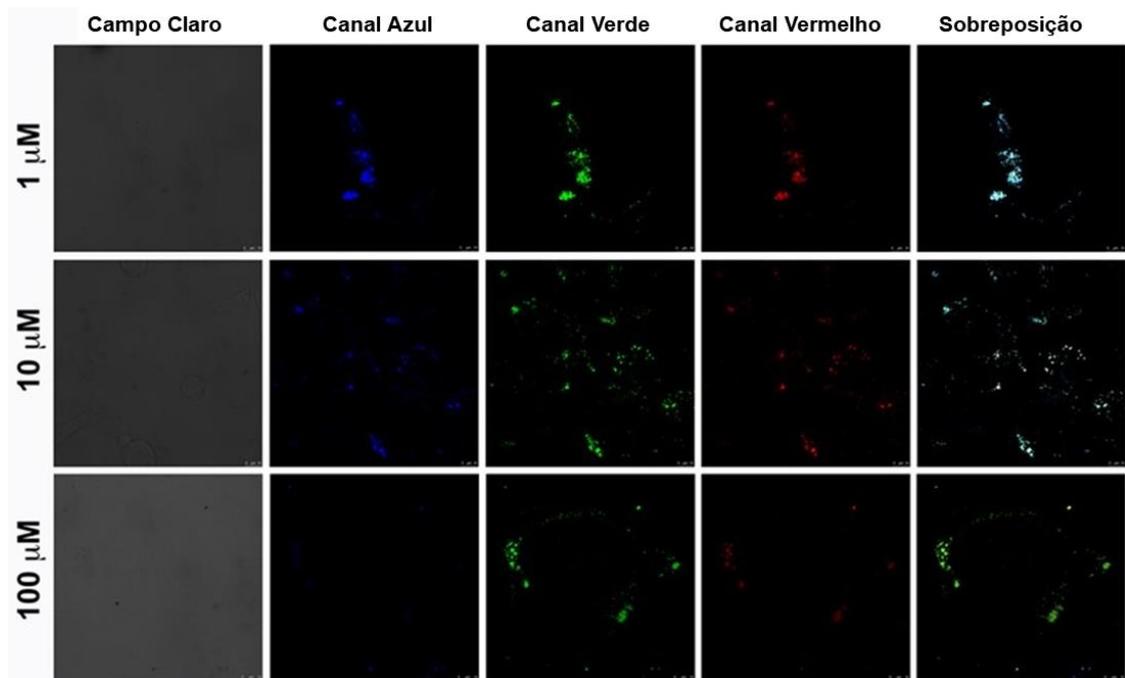


Figura 101. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 fixadas usando $\text{BTD}(\text{CCPh})_2$ em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm.

Todas as sondas puderam ser usadas em baixas concentrações e, como visto nas Figuras 96 – 101, são notadas emissões de fluorescência satisfatórias do azul ao vermelho

sem vazamento para os outros canais de cor. Para **BTDBrCCPh** (Figuras 96 e 97) foram observadas emissões satisfatórias no canal do azul em concentrações de 10 μM , enquanto para a **BTDCCPH** (Figuras 99 e 100) foi em 100 μM . O composto **BTDCCPH**₂ (Figuras 100 e 101) foi o que apresentou melhor sinal, com excelente intensidade de fluorescência já em 1 μM , apresentando forte emissão no azul, verde e vermelho.

A etapa seguinte foi a co-marcação de gotas lipídicas utilizando novamente as células vivas ou fixadas usando as BTDs juntamente com o marcador comercial de gotas lipídicas BODIPY (emissor verde), como pode ser visto nas Figuras 102 – 104.

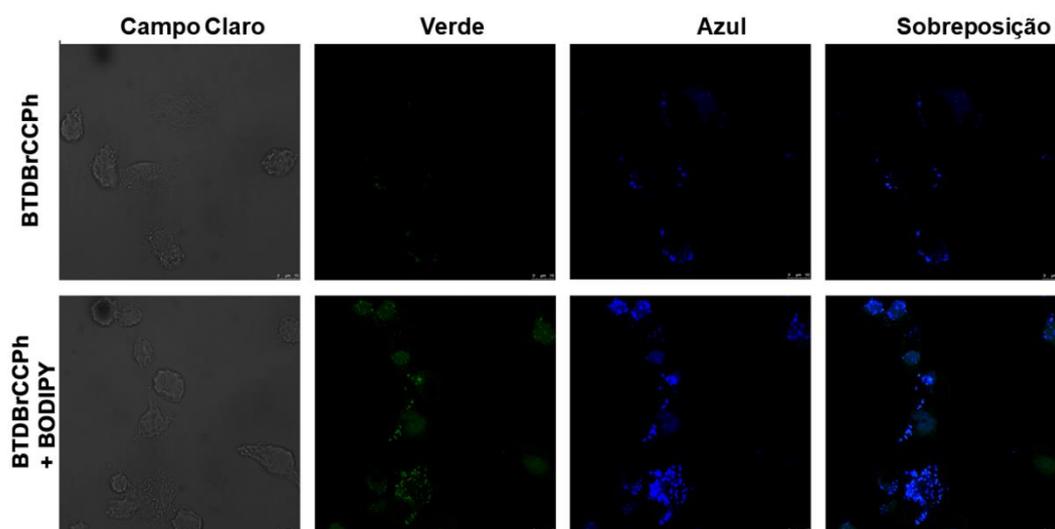


Figura 102. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando **BTDBrCCPh** (1,0 μM) e BODIPY (12 μM). Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm .

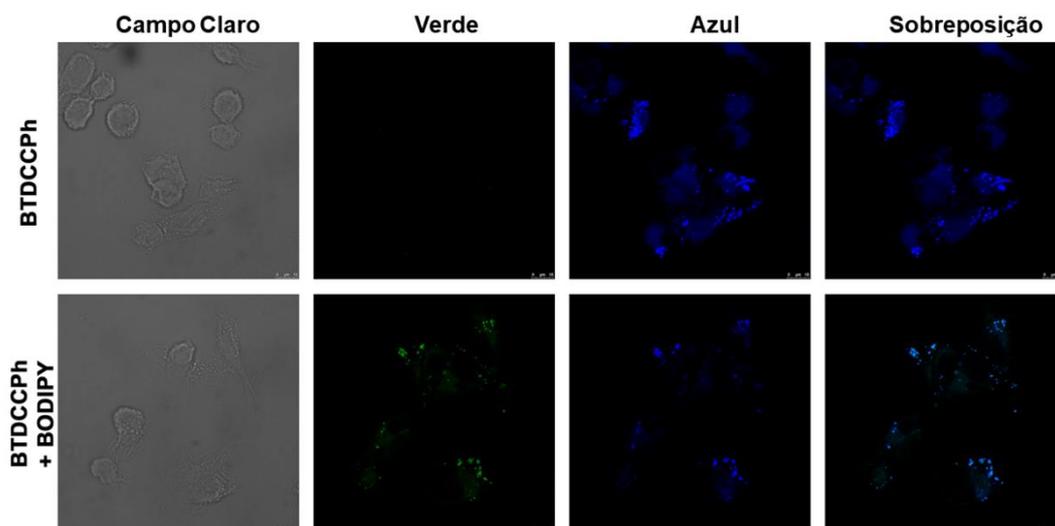


Figura 103. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando **BTDCCPH** (1,0 μM) e BODIPY (12 μM). Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 μm .

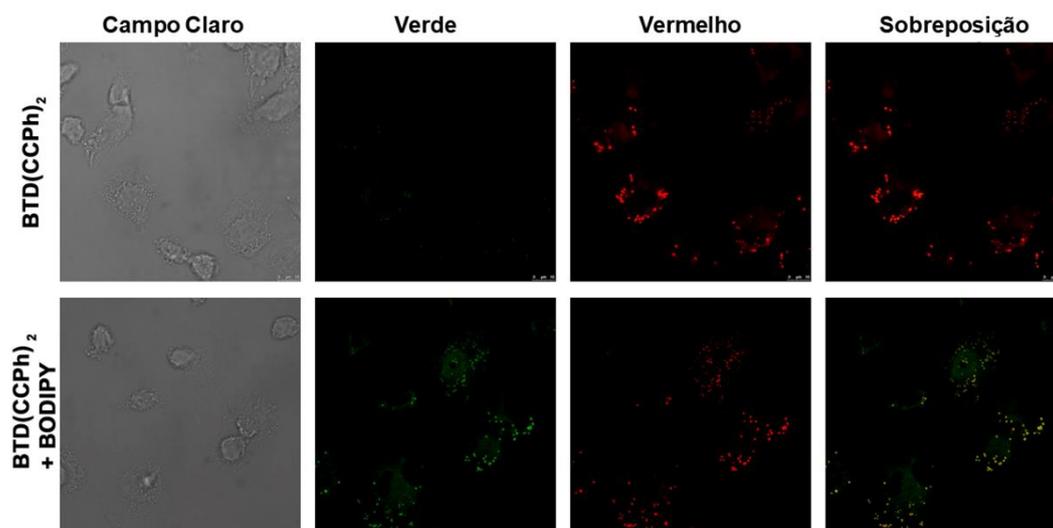


Figura 104. Marcação de células cancerígenas do tipo MDA-MB-231 vivas usando **BTD(CCPh)₂** (500 nM) e BODIPY (12 µM). Da esquerda para a direita: Os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase, canal verde, canal azul e sobreposição das imagens anteriores. Barra de escala de 10 µm.

A sobreposição dos canais de emissão verde (BODIPY) com os canais de emissão azul (**BTDCCPH** e **BTDBrCCPh**) e vermelho (**BTD(CCPh)₂**), mostradas nas figuras 102 – 104, confirmaram mais uma vez a seletividade das BTDs para gotas lipídicas. Todas as sondas puderam ser usadas em baixas concentrações e a alta luminescência mostrada pela **BTD(CCPh)₂** permitiu que fosse usada em concentrações nanomolares (Figura 104).

As gotas lipídicas puderam ser coradas seletivamente, conforme previsto pelos experimentos anteriormente discutidas. Para garantir uma correta análise de co-localização, os coeficientes de correlação de Pearson (PCCs) foram analisados para as três BTDs. O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida estatística da variância compartilhada entre duas variáveis.²³⁸

Os valores de PCCs foram os seguintes: 0,87 para **BTDBrCCPh**, 0,98 para **BTDCCPH** e 0,99 para **BTD(CCPh)₂**. Esses resultados demonstram o alto nível de afinidade das BTDs lipofílicas aqui sintetizadas e as gotas lipídicas. Dessa forma, esses dados estão de acordo com os testes SDS e coeficientes de partição octanol / água, e experimentos de efeito AIEE anteriormente descritos.

4 Conclusão e Perspectivas

Ao fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos com os objetivos propostos neste trabalho, é possível inferir algumas observações importantes sobre os estudos realizados: neste trabalho foram sintetizados três derivados de BTDs lipofílicos através da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira com o objetivo de utilizá-los na marcação de gotas lipídicas em células vivas pela da técnica de microscopia confocal de fluorescência.

Para uma das BTDs sintetizadas, o composto **BTD(CCPH)₂**, foram encontrados alguns trabalhos relacionados à algumas aplicações na área de luminescência.^{75,179-182} Contudo, não foram relatadas aplicações como sondas fluorescentes em bioimageamento, apresentando poucos dados relacionadas às propriedades fotofísicas e caracterização estrutural. Não foram encontrados também estudos relacionados à formação e dinâmica de nanoagregados.

A análise do efeito solvatocrômico, especificamente o parâmetro de Reichardt (E_T^N), indicou um desvio desse efeito em água. Com base nesse comportamento, foi proposto que o alto caráter lipofílico das BTDs resultou em sua agregação em água. As análises fotofísicas e medidas de DLS das BTDs em misturas de DMSO-água confirmou esse comportamento e o efeito AIEE, com a ausência de efeito – ACQ. Esse resultado foi um indicativo de uma eficiente marcação de gotas lipídicas sem o risco de perda de fluorescência. Esses experimentos permitiram também entender o processo e dinâmica de agregação/quebra, através do estudo cinético e efeito de temperatura.

Pela primeira vez o modelo de Finke – Watzky (FW), desenvolvido em 1997 por Murielle Watzky e Richard Finke para explicar a cinética a formação de materiais como nanoclusters em solução pôde ser aplicado com sucesso na elucidação do processo de formação de nanoagregados orgânicos.

Para as estruturas lipofílicas, **BTDBrCCPh** e **BTDCCPH**, a técnica de raios X além de ter sido utilizada para a confirmação da estrutura, foi aplicada também no estabelecimento dos tipos de interações intermoleculares envolvidas nas estruturas através análise de Superfícies de Hirshfeld, podendo ser aplicada com sucesso para explicar os comportamentos cinéticos e termodinâmicos obtidos a partir dos experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Dessa forma, esses resultados contribuem para o entendimento de processos dinâmicos de agregação/quebra de nanoagregados orgânicos e a sua relação com os processos luminescentes em diferentes soluções.

Os rendimentos quânticos de fluorescência das três BTDs sintetizadas em solventes de diferentes polaridades foram determinados através do método de ponto único utilizando uma amostra de referência com o rendimento quântico conhecido. Com esses dados, foi possível estabelecer a ocorrência do aumento de intensidade de fluorescência em meios lipofílicos.

Os resultados obtidos através dos testes com SDS e lipofilicidade mostrou a preferência das sondas por ambientes lipofílicos e o efeito *light-up* nesses meios. Esses resultados foram bons indicativos de que essas BTDs apresentarão bons desempenhos quando submetidos a testes como marcadores de estruturas lipídicas em experimentos de imageamento celular.

Através dos cálculos teóricos e medidas de RPE das moléculas foto-excitadas foi possível o entendimento da dinâmica do estado excitado. Apesar da complexidade das diferentes funções de onda obtidas pelas análises de RPE, foram determinadas as regiões de maior acúmulo de carga nas moléculas após a transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Assim, sendo confirmadas a estabilização do estado excitado pelo mecanismo ICT, cujo substituinte -CCPh atuou como o grupo doador de densidade eletrônica, enquanto o núcleo BTd atuou como grupo aceptor de densidade eletrônica.

A partir desses dados foram atribuídos que essas transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_1$, além de terem caráter $\pi - \pi^*$, apresentaram caráter ICT que seguiu a ordem **BTdCCPh** > **BTdBrCCPh** > **BTd(CCPh)₂** devido às diferentes interações intermoleculares.

Esses resultados contribuíram para o entendimento do fato de alguns deslocamentos de Stokes serem menores do que aqueles normalmente esperados para as BTDs fluorescentes D- π -A, que apresentam transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_1$ de caráter ICT. Esse comportamento foi atribuído ao fato do fragmento **-CCPh** ser um doador menos eficaz em comparação com os substituintes como o p-metoxifenil.

As análises de RPE também identificaram as transições entre as formas quinóide, aromática zwitteriônica e aromática (contendo um enxofre hipervalente) do **núcleo BTd**, onde o átomo de enxofre exerceu um papel central na característica de aceitação de elétrons das contribuições heterocíclicas e zwitteriônicas do núcleo BTd. Dessa forma, a partir desses dados foi possível estabelecer a importância das formas mesoméricas para entender os estados excitados desses fluoróforos orgânicos.

Com relação às aplicações biológicas, foram feitos testes de viabilidade celular a fim de verificar a citotoxicidade das sondas em ambiente celular. Todas as três BTDs testadas não apresentaram citotoxicidade significativa para células vivas, mesmo em altas concentrações (100 μM) e após 24 horas.

Finalmente, os experimentos de imageamento celular realizados em células vivas e fixadas mostraram que as gotas lipídicas puderam ser coradas seletivamente usando concentrações de marcadores na faixa nanomolares. O comportamento fluorescente e seletividade para gotas lipídicas ocorreu de forma esperada e confirmou os dados previamente obtidos dos experimentos fotofísicos. Foi possível também a co-marcação com o marcador comercial BODIPY, e juntamente com os coeficientes de correlação de Pearson (PCCs) validaram a seletividade das BTDs para as gotas lipídicas.

Portanto, os resultados divulgados nesta pesquisa abriram um novo caminho de oportunidades no projeto de BTDs fluorescentes mais eficientes e seletivos com propriedades AIEE.

Esses resultados aqui apresentados encontram-se publicados desde setembro/2020 no Journal of Organic Chemistry (*J. Org. Chem.* **2020**, 85, 19, 12614 – 12634.) sob o título “*Deciphering the Dynamics of Organic Nanoaggregates with AIEE Effect and Excited States: Lipophilic Benzothiadiazole Derivatives as Selective Cell Imaging Probes*” (<https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01805>). O processo de proteção intelectual (patenteamento) das BTDs como sondas fluorescentes lipofílicas no Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB encontra-se em andamento.

5 Materiais e Métodos

5.5 Informações Gerais

- Os reagentes (**BTDBr** e **fenilacetileno**), catalisadores de paládio/cobre e solventes foram obtidos de fontes comerciais. O reagente **BTDBrBr** foi previamente sintetizado pelo grupo de pesquisa.⁵⁵ Todas as reações que exigiram aquecimento foram realizadas em banhos de óleo; Todas as reações foram realizadas num tubo schlenk sob atmosfera de N₂;
- Após as reações os produtos de interesse foram determinados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio, revestidas com sílica gel e indicador fluorescente de 250 nm da Merck (sílica gel 60 F₂₅₄), de 0,2 mm de espessura. Após eluição, as placas foram reveladas em luz ultravioleta. Os produtos foram então obtidos por recristalização ou cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária sílica (230 mesh) e a fase móvel, conforme consta nos procedimentos experimentais;
- Os pontos de fusão foram medidos em um equipamento *IA9000 Electrothermal*;
- Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro *Bruker Ascend* (600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C). Foi utilizado TMS (trimetilsilano) como referência interna. As abreviações das multiplicidades dos sinais nos espectros de RMN ¹H foram utilizadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), m (multipeto) e ddd (duplo duplo dupleto);
- Os espectros de massa de alta resolução foram realizados utilizando os equipamentos VG AutoSpec High Resolution Mass Spectrometer (Micromass Company) e triple TOF 5600+ High Resolution Mass Spectrometer (AB Sciex), ambos operando em modo ESI (Electron Spray Ionization). As medidas de espectrometria de massa de ionização por eletropulverização (ESI-MS) / MS foram realizadas no modo de íon positivo e dentro do intervalo de 50-500 m / z, usando 1 µM dos derivados BTDB em acetonitrila (detectados como moléculas protonadas), em um fluxo taxa de 5 µL min⁻¹, usando uma fonte ESI;
- Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, da *Varian modelo 640*. As medidas

foram realizadas utilizando-se uma célula horizontal de ATR de 7 cm de comprimento;

- Todos os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro *Cary 5000* da *Varian* na faixa de 800 a 200 nm. Todos os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro *Fluorolog* da *Horiba*. As medidas foram realizadas com slit de excitação e emissão de 1 nm e incremento de emissão de 2,5.

5.6 Síntese dos derivados de BTDAIEE

5.6.1 Síntese de BTDBrCCPh (4-bromo-7-(feniletinil)-2,1,3-benzotiadiazola) e BTDCPh₂ (4,7-bis(feniletinil)-2,1,3-benzotiadiazola)

4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (**BTDBrBr**) (0,51 mmol, 150 mg), **fenilacetileno** (0,34 mmol, 35 mg), 10 mol % de PdCl₂(PPh₃)₂ (24 mg), e 4 mL trietilamina (NEt₃) anidro foram adicionados e selados num tubo schlenk por 24 h à 100 °C sob atmosfera de N₂. A mistura com ambos os compostos foi filtrada em celite usando acetato de etila como eluente para remoção do catalisador. Os compostos foram separados e purificados via coluna cromatográfica em sílica usando uma mistura de eluentes hexano-diclorometano (95:5 v/v). O rendimento geral foi 81%. **BTDCPh₂** foi obtida com rendimento de 50% como sólido cristalino amarelo claro (p.f. 179-180 °C). RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ ppm 7,80 (s, 2H), 7,69-7,66 (m, 4H), 7,42-7,39 (m, 6H). RMN ¹³C{¹H} (150 MHz, CDCl₃): δ ppm 154,5; 132,6; 132,1; 129,2; 128,6; 122,6; 117,3; 97,6; 85,4. HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]⁺ calc. para C₂₂H₁₂N₂S: 337,0794. Encontrada: 337,0797. **BTDBrCCPh** foi obtido com rendimento de 31% como sólido cristalino amarelo (p.f. 119-120 °C). RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ ppm 7,85 (d, 1H), 7,68-7,65 (m, 3H), 7,41-7,39 (m, 3H). RMN ¹³C{¹H} (150 MHz, CDCl₃): δ ppm 154,3; 153,2; 132,9; 132,1; 129,3; 128,6; 122,5; 116,9; 114,8; 97,0; 84,7. HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]⁺ calc. para C₁₄H₇BrN₂S: 314,9586; Encontrada: 314,9587.

5.6.2 Síntese de BTDCPh (4-(feniletinil)-2,1,3-benzotiadiazola)

4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola (**BTDBr**) (0,47 mmol, 100 mg), **fenilacetileno** (1,20 mmol, 122 mg), 10 mol % de PdCl₂(PPh₃)₂ (32 mg), 5 mol % de CuI (5 mg) e 2 mL

triethylamina (NEt_3) anidro foram adicionados e selados num tubo schlenk por 72 h à 100 °C sob atmosfera de N_2 . A mistura foi filtrada em celite usando acetato de etila como eluente para remoção dos catalisadores. O composto foi separado da mistura reacional via coluna cromatográfica em sílica usando uma mistura de eluentes hexano-diclorometano (95:5 v/v). Depois, o composto isolado foi também recristalizado em acetona. BTDCCPH foi obtido com rendimento de 70% como sólido mostarda (p.f 71-72 °C). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ ppm 8,00 (dd, 1H); 7,80 (dd, 1H); 7,69-7,66 (m, 2H); 7,59-7,61 (dd, 1H); 7,41-7,38 (m, 3H). RMN-APT $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (150 MHz, CDCl_3): δ ppm 154,7; 132,8; 132,1; 129,3; 129,0; 128,5; 122,7; 121,9; 117,3; 95,9; 85,2. HRMS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$: 237,0481; Encontrada: 237,0483.

5.7 Análises de Raio-X

As análises de monocristais de BTDBrCCPh e $\text{BTD}(\text{CCPh})_2$ foram realizadas em um difratômetro de cristal único Bruker CCD SMART APEX II com radiação $\text{Mo K}\alpha$ (0,71073 Å) a 296 K. Usando o Olex2,²³⁹ as estruturas foram resolvidas com o olex2.solve,²⁴⁰ um programa de solução de estrutura, e refinado com o pacote de refinamento olex2.refine²⁴⁰ através da minimização de Gauss-Newton.

Os gráficos moleculares foram gerados com os programas MERCURY e DIAMOND. As superfícies de Hirshfeld 3D e os gráficos de impressão digital 2D^{200,241} foram gerados com o programa CrystalExplorer 17,5;²⁴⁰ usando os arquivos de informação cristalográfica (CIFs).

As superfícies dnorm 3D (distância de contato normalizada) foram mapeadas em uma escala de cor fixa de -0,1703 (vermelho) a 1,2921 (azul). Os gráficos de impressão digital 2D de d_i vs d_e foram usados para indicar e quantificar diferentes tipos de contatos intermoleculares nos cristais; e foram usados na faixa traduzida de 0,4 - 3,0 Å, incluindo contatos recíprocos.

5.8 Efeito AIEE

Foram preparadas soluções de cada uma das três BTDs em DMSO e em água nas concentrações de 10 e 20 μM . Essas soluções foram então misturadas de acordo os percentuais de DMSO-Água a serem medidos (0 a 100%).

A etapa seguinte consistiu em medidas de UV-Vis no espectrofotômetro de 200 a 800 nm com a finalidade de determinar o $\lambda_{(abs)max}$ associada a banda de mais baixa energia das BTDs nos diferentes percentuais de DMSO-Água.

O valor $\lambda_{(abs)max}$ obtido foi então utilizado como λ_{excit} para a determinação dos espectros de emissão de fluorescência das BTDs nos diferentes percentuais de DMSO-Água.

Todas as análises foram feitas usando um volume total de 1 ml das misturas de soluções de cada BTD em diferentes percentuais DMSO-água.

5.9 Rendimento Quântico de Fluorescência

- Foi preparada uma solução estoque de bi-sulfato de quinina na concentração de 10 mM em H₂SO₄ 1 M usando como material de partida o sal hidrocloreto de quinina di-hidratado (C₂₀H₂₄N₂O₂ · HCl · 2H₂O).
- Foi preparada uma solução estoque de cada uma das BTDs na concentração de 10 mM em DMSO;
- Foram realizadas medidas no espectrofotômetro UV-Vis do bi-sulfato de quinina na concentração de 10 μM em H₂SO₄ 1 M para determinação do valor de absorbância no $\lambda_{(abs)max}$. Em seguida foram realizadas as medidas de cada uma das BTDs nas concentrações de 10 μM nos seguintes solventes: tolueno, hexano, diclorometano, acetonitrila, acetato de etila, DMSO, etanol, água deionizada e tampão PBS para obter os valores de absorbância no $\lambda_{(abs)max}$ para cada solvente. Todas as análises foram feitas na faixa de 200-800nm;
- Foram realizadas medidas no esptrofluorímetro na faixa de 380-730 nm usando o λ_{excit} de 366nm^{19,220,221} com o bi-sulfato de quinina na concentração de 10 μM em H₂SO₄ 1 M e cada uma das BTDs nas concentrações de 10 μM nos seguintes solventes: tolueno, hexano, diclorometano, acetonitrila, acetato de etila, DMSO, etanol, água deionizada e tampão PBS para a obtenção dos valores da área integrada sobre a curva de emissão de fluorescência.
- Os valores obtidos experimentalmente da absorbância e a área integrada sobre a curva de emissão de fluorescência, juntamente com o valor teórico do rendimento quântico do bi-sulfato de quinina^{47,223,224} e o índice de refração para cada solvente²²² utilizado nas medidas das BTDs e bi-sulfato de quinina foram então aplicados

na equação 8, sendo calculados os valores de rendimento quântico de fluorescência para cada uma das três BTDs nos solventes anteriormente citados.

5.10 Coeficiente de Partição Experimental

- Foram preparadas soluções de cada uma das BTDs em octanol nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram obtidos os valores de absorvâncias em cada uma das concentrações através de medidas no espectrofotômetro UV-Vis; esses valores de absorvâncias foram então usados para construir a curva de calibração (UV-Vis) dos experimentos (Figura 78);
- Foram adicionados 1 mL das soluções de BTDs de diferentes concentrações em 1 mL de água e misturados vigorosamente em um funil de separação. As fases foram então separadas e novamente medidas no espectrofotômetro UV-Vis.
- Os valores máximos de absorvância obtidos foram utilizados para determinar a concentração final das BTDs em cada fase (octanol e água) através das equações da reta obtidas da curva de calibração. O $\text{Log } K_{ow}$ foi obtido usando a Equação (14):

$$\text{Log } K_{ow} = \log \frac{[BTDoctanol]}{[BTDAgua]} \quad (14)$$

5.11 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica é baseada na medição de luz espalhada em diferentes ângulos e intensidades, que permite determinar o tamanho das partículas usando a relação de Stokes-Einstein. Como fonte de luz foi utilizada a radiação laser (633 nm) He-Ne 4mW (633 nm). A Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) foi usado no estudo.

Foram preparadas soluções de cada uma das três BTDs em DMSO e água nas concentrações de 10 e 20 μM . Essas soluções foram então misturadas de acordo os percentuais de DMSO-Água a serem medidos (0 a 100%) até completarem o volume de 1 ml na cubeta de quartzo. Foram realizados ajustes no software do equipamento com relação aos valores de índice de refração e viscosidade para os diferentes percentuais de DMSO em água de acordo com os valores fornecidos pela literatura.^{243,244}

5.12 Cálculos Computacionais

5.12.1 Propriedades de Transporte

A representação do recíproco de R_D em função da temperatura inversa (Equação 4) permitiu estimar T^\ddagger e com o diagrama construído pela Equação 7b, $\ln\left(\frac{1}{R_D}\right)$ vs $\ln T$. A barreira de energia ε^\ddagger foi estimado a partir da Equação (2). A temperatura de cruzamento T^\times foi acessada a partir do diagrama anterior, onde uma quebra clara no comportamento linear é observada.

Os coeficientes das funções propostas para descrever os dados nas representações anteriores foram otimizados usando o método de otimização global conhecido como Generalized-Simulated Annealing (GSA).^{245,246}

5.12.2 Agregação e Curvas de crescimento

A abordagem de duas etapas de Finke-Watzky (FW) governada primeiramente por uma agregação molecular inicial rápida (partículas pequenas \rightarrow partículas grandes) com a constante de taxa (k_1), seguido de um processo de taxa média de crescimento rápido (partículas pequenas + partículas grandes \rightarrow partículas grandes), com a constante de velocidade (k_2) foi aplicado para avaliar o comportamento cinético da formação e quebra de nanoagregados orgânicos.

A integração das leis de taxas específicas produz expressões para a dependência do tempo (t) das concentrações de partículas pequenas $[S]$ e partículas grandes $[L]$, como visto nas Equações (15 a-b).

$$[S(t)] = [S]_0 \cdot \frac{k_1 + k_2[S]_0}{k_2[S]_0 + k_1 \cdot e^{(k_1+k_2[S]_0) \cdot t}} \quad (15 \text{ a})$$

$$[L(t)] = [S]_0 \cdot \left(1 - \frac{k_1 + k_2[S]_0}{k_2[S]_0 + k_1 \cdot e^{(k_1+k_2[S]_0) \cdot t}}\right) \quad (15 \text{ b})$$

$[S]_0$, k_1 e k_2 foram obtidos ajustando as Equações (14) usando o método GSA. Tempos específicos que delimitam as transições entre as fases de defasagem, crescimento e platô foram calculados seguindo a prescrição sugerida em outro lugar.²⁴⁷

5.12.3 Cálculos Teóricos

Todos os cálculos DFT foram realizados usando o conjunto de programas Gaussian 09 (Revisão D.01).²⁴⁸ As otimizações de geometria foram realizadas com o funcional de densidade corrigido de longo alcance CAM-B3LYP com 6-311 + G (d) conjunto de base de divisão de Pople. Os cálculos de frequência harmônica foram realizados para verificar se um mínimo energético genuíno foi alcançado. Os efeitos do solvente sobre as geometrias das BTDs foram avaliados usando o modelo contínuo polarizável (PCM), no qual a molécula de soluto está inserida em uma cavidade embutida em um meio dielétrico.²⁴⁹

As geometrias otimizadas do estado fundamental (S_0) no vácuo e na solução foram usadas para o cálculo de TD-DFT de ponto único usando funcionais de densidade de diferentes sabores para avaliar o desempenho de diferentes funcionais de densidade: B3LYP, CAM-B3LYP, LC- ω PBE, M06, M06-2X e PBE1PBE.

O conjunto de base 6-311 + G (2d, p) foi usado para simular os espectros de excitação dos BTDs. Para incluir os efeitos do solvente, o tratamento PCM implícito foi incluído nos cálculos TD-DFT, selecionando os mesmos solventes das medições experimentais (acetoneitrila, etanoato de etila, diclorometano, DMSO, etanol hexano, tolueno e água).

Os índices de transferência de carga de Le Bahers²³¹ foram calculados usando o programa de análise de função de onda Multiwfn.²³⁰ CYLview foi usado para renderizar as estruturas moleculares. O logaritmo teórico do coeficiente de partição para as misturas de n-octanol / água a temperatura e pressão constantes foi calculado usando a equação (13),²⁵⁰ onde a temperatura de 298 K foi selecionada.

$$\log P = \frac{\Delta G_{water}^{solv} - \Delta G_{n-octanol}^{solv}}{2.303RT}, \quad (13)$$

As energias livres de solvatação foram determinadas com o modelo de solvatação baseado na densidade de elétrons de soluto (SMD)²²⁷ a partir de cálculos de frequência nas geometrias otimizadas PW6B95 / 6-311 + G (d). O modelo SMD apresenta bom desempenho para determinar energias livres de solvatação em várias estruturas orgânicas.²²⁷

5.13 Medidas de RPE

Todas as medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker (Bruker EMXplus, Alemanha), equipado com uma cavidade de alta sensibilidade de banda X (9 GHz) (Bruker ER 4119HS, Alemanha) usando amostras congeladas dentro de um Dewar de quartzo preenchido com nitrogênio líquido. 400 µl das soluções de cada BTB (10 µM em DMSO) foram coletados e transferidos para uma seringa sem tampa de 1,0 ml e congelados em nitrogênio líquido.

Todas as soluções também foram previamente submetidas à atmosfera de nitrogênio para remoção do oxigênio dissolvido. Com este procedimento nenhum sinal de estado de tripleto referente ao oxigênio molecular foi detectado. Após esse procedimento, as soluções foram congeladas e submetidas à irradiação UV-Vis (254 nm) por 25 min.

Em seguida, essas amostras cilíndricas congeladas foram transferidas para um Dewar de quartzo preenchido com nitrogênio líquido, colocado dentro do ressonador e seus espectros de RPE foram registrados em diferentes temperaturas. Este procedimento garantiu volumes idênticos para todas as amostras, permitindo a comparação quantitativa entre os espectros de RPE registrados.

As configurações instrumentais foram 2 mW de potência de micro-ondas, modulação de amplitude de 10 G, frequência de modulação de 100 kHz, largura de varredura de 1000 G, campo central de 3365 G e tempo de varredura de 50s. A amplitude pico a pico, que é a diferença entre a amplitude mais baixa e a mais alta no primeiro espectro derivado, foi usada para detectar a quantificação do sinal.

5.14 Ensaio de Viabilidade Celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em uma placa de 96 poços. Cinco mil células de MDA-MB-231 foram semeadas por poço e tratadas com BTDCCPH, BTDBrCCPh e BTB(CCPh)₂ ou veículo (DMSO, até 0,1%) diluído em meio de cultura, em concentrações que variam de 500 nM a 100 µM.

A viabilidade celular foi avaliada após 30 min e após 24 h usando o Reagente de Viabilidade Celular Presto-Blue (Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. A absorvância a 570 nm foi medida e normalizada para células expostas ao veículo. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

5.15 Protocolo de Marcação Celular

Todas as BTDs foram diluídas em água na presença de DMSO (até 0,1%) no meio celular suplementado com 10% de soro fetal bovino. As amostras de células foram mantidas de acordo com as recomendações da ATCC (American Type Culture Collection)²⁵¹ a 37 ° C numa atmosfera com 5% de CO₂. 7×10^4 .

As células MDA-MB-231 foram semeadas em lamelas de vidro redondas no fundo de uma placa de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas durante a noite com 300 µM de ácido oleico para estimular a formação de gotas lipídicas.

As amostras foram lavadas três vezes com solução salina tampão de fosfato pré-aquecido (PBS, pH 7,4) e incubadas com BTDCCPH (1-100 µM), BTDBrCCPh (1-100 µM) ou BTDCCPH 2 (500 nM a 100 µM) por 30 minutos a 37 ° C. Todas as BTDs foram diluídas em meio Leibovitz L15 suplementado.

As amostras foram lavadas três vezes com PBS pré-aquecido (pH 7,4), fixadas por 15 minutos em solução de formaldeído 3,7% em PBS em temperatura ambiente. Novamente foram lavadas três vezes com PBS.

Para o procedimento de co-marcção, as células foram incubadas com BODIPY (12 µM) por 30 minutos a 37 ° C. As amostras foram então lavadas três vezes com PBS e as lamínulas foram montadas usando Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EUA). As amostras foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (TCS SP5).

6 Referências Bibliográficas

- (1) Fam, T. K.; Klymchenko, A. S.; Collot, M. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials*. **2018**, *11*, 1768, 1 – 19.
- (2) Yao, S.; Kim, B.; Yue, X.; Gomez, M. Y. C.; Bondar, M. V.; Belfield, K. D. Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Two-Photon-Absorbing Fluorenyl Benzothiadiazole and Benzoselenadiazole Derivatives. *ACS Omega*. **2016**, *1*, 1149 – 1156.
- (3) Suarez, S. I.; Warner, C. C.; Brown-Harding, H.; Thoof, A. M.; VanVeller, B.; Lukesh, J. C. Highly selective staining and quantification of intracellular lipid droplets with a compact push-pull fluorophore based on benzothiadiazole. *Org. Biomol. Chem*. **2020**, *18*, 495 – 499.
- (4) Goel, A.; Sharma, A.; Jha, A.K.; Jain, A.; Chauhan, B.S.; Kathuria, M.; Rawat, K.S.; Gupta, N.M.; Tripathi, R.; Mitra, K.; Sachdev, M.; Bhatt, M.L.B. Imaging and Quantitative Detection of Lipid Droplets by Yellow Fluorescent Probes in Liver Sections of *Plasmodium* Infected Mice and Third Stage Human Cervical Cancer Tissues. *Bioconjugate Chem*. **2018**, *29*, 11, 3606 – 3613.
- (5) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol*. **2014**, *9*, 855-866.
- (6) Olzmann, J. A.; Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2019**, *20*, 3, 137 – 155.
- (7) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol*. **2008**, *3*, 142 – 155.
- (8) Shi, J.; Tian, Y.; Guo, B.; Wu, Y.; Jing, J.; Zhang, R.; Zhang, X. An AIEgen-based fluorescent probe for highly selective and specific imaging of lipid droplets in L02 and HepG2 cells. *Sensors & Actuators: B. Chemical*. **2019**, *284*, 545 – 552.
- (9) Collot, M.; Fam, T.K.; Ashokkumar, P.; Faklaris, O.; Galli, T.; Danglot, L.; Klymchenko, A. Ultrabright and Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging and Tracking of Lipid Droplets in Cells and Tissues. *J. Am. Soc.* **2018**, *140*, 5401 – 5411.
- (10) Zhang, X.; Yuan, L.; Jiang, J.; Hu, J.; Du Rietz, A.; Cao, H.; Zhang, R.; Tian, X.; Zhang, F.; Ma, Y.; Zhang, Z.; Uvdal, K.; Hu, Z. Light-Up Lipid Droplets Dynamic Behaviors Using a Red-Emitting Fluorogenic Probe. *Anal. Chem*. **2020**, *92*, 3613-3619.
- (11) Kang, M.; Gu, X.; Kwok, R.T.K.; Leung, C.W.T.; Lam, J.W.Y.; Li, F.; Tang, B.Z. A near-infrared AIEgen for specific imaging of lipid droplets. *Chem. Commun*. **2016**, *52*, 5957 – 5960.
- (12) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*. **2006**, *312*, 217 – 224.
- (13) Wysocki, L. M.; Lavis, L. D. Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2011**, *15*, 752 - 759.

- (14) Listenberger, L. L.; Studer, A. M.; Brown, D. A.; Wolins, N. E. Fluorescent Detection of Lipid Droplets and Associated Proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2016**, 71, 4.31.1 - 4.31.14.
- (15) *Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11 ed. ThermoFisher Scientific, **2010**.
- (16) Rumin, J.; Bonnefond, H.; Saint-Jean, B.; Rouxel, C.; Sciandra, A.; Bernard, O.; Cadoret, J-P.; Bougaran, G. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for biofuels*. **2015**, 8, 42, 1 – 16.
- (17) Layerenza, J. P.; González, P.; Bravo, M. M. G.; Polo, M. P.; Sisti, M. S.; Ves-Losada, A. Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2013**, 1831, 327–340.
- (18) Mota, A. A. R.; Correa, J. R.; de Andrade, L. P.; Assumpcao, J. A. F.; de Souza Cintra, G. A.; Freitas-Junior, L. H.; da Silva, W. A.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. From Live Cells to Caenorhabditis elegans: Selective Staining and Quantification of Lipid Structures Using a Fluorescent Hybrid Benzothiadiazole Derivative. *ACS Omega*. **2018**, 3, 3874 – 3881.
- (19) Becerra-Ruiz, M.; Vargas, V.; Jara, P.; Tirapegui, C.; Carrasco, C.; Nuñez, M.; Lezana, N.; Galdámez, A.; Vilches-Herrera, M. Blue-fluorescent probes for lipid droplets based on pyrazolepyridine or pyrrolopyridine fused dihydrochromeno. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 34, 4795 – 4801.
- (20) Lee, Y.; Na, S.; Lee, S.; Jeon, N. L.; Park, S. B. Optimization of Seoul-Fluor-based lipid droplet bioprobes and their application in microalgae for bio-fuel study. *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 952 – 956.
- (21) Appelqvist, H.; Stranius, K.; Borjesson, K.; Nilsson, K. P. R.; Dyrager, C. Specific Imaging of Intracellular Lipid Droplets Using a Benzothiadiazole Derivative with Solvatochromic Properties. *Bioconjugate Chem.* **2017**, 28, 1363 – 1370.
- (22) Medeiros, I. R.; Correa, J. R.; Barbosa, A. L. A.; Krüger, R.; Balaguez, R. A.; Lopes, T. O.; Oliveira, H. C. B.; Alves, D.; Neto, B. A. D. Fluorescent Benzoselenadiazoles: Synthesis, Characterization, Quantification of Intracellular Lipid Droplets and Multicellular Model Staining *J. Org. Chem.* **2020**, 85, 16, 10561–10573.
- (23) Jiang, M.; Gu, X.; Lam, J. W. Y.; Zhang, Y.; Kwok, R. T. K.; Wong, K. S.; Tang, B. Z. Two-photon AIE bio-probe with large Stokes shift for specific imaging of lipid droplets *Chem. Sci.* **2017**, 8, 5440 – 5446.
- (24) Wang, Z.; Gui, C.; Zhao, E.; Wang, J.; Li, X.; Qin, A.; Zhao, Z.; Yu, Z.; Tang, B. Z. Specific Fluorescence Probes for Lipid Droplets Based on Simple AIEgens. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2016**, 8, 16, 10193–10200.
- (25) Zhao, N.; Ma, C.; Yang, W.; Yin, W.; Wei, J.; Li, L. Facile construction of boranil complexes with aggregation-induced emission characteristics and their specific lipid droplet imaging applications *Chem. Commun.* **2019**, 55, 8494 – 8497.

- (26) Gao, M.; Su, H.; Lin, Y.; Ling, X.; Li, S.; Qin, A.; Tang, B. Z. Photoactivatable aggregation-induced emission probes for lipid droplets-specific live cell imaging. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 1763 – 1768.
- (27) Nevo-Yassaf, I.; Lovelle, M.; Nahmias, Y.; Hirschberg, K.; Sklan, E. H. Live cell imaging and analysis of lipid droplets biogenesis in hepatitis C virus infected cells. *Methods.* **2017**, 127, 30 – 36.
- (28) Wang, E.; Zhao, E.; Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. A highly selective AIE fluorogen for lipid droplet imaging in live cells and green algae. *J. Mater. Chem. B.* **2014**, 2, 2013 – 2019.
- (29) Li, S.; Ling, X.; Lin, Y.; Qin, A.; Gao, M.; Tang, B. Z. In situ generation of photoactivatable aggregation-induced emission probes for organelle-specific imaging. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 5730 – 5735.
- (30) Raines, T.; Lavis, L. D. Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chemical Biology.* **2008**, 3, 3, 142-155.
- (31) Murphy, D. B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging.* Wiley-Liss, **2001**.
- (32) Matsumoto, B. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy: methods in cell biology.* 2 ed, v 70. Estados Unidos: Elsevier Science, **2002**.
- (33) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 855-866.
- (34) Fu, Y.; Finney, N. S. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv.* **2018**, 8, 29051 – 29061.
- (35) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications.* Weinheim – Alemanha: Wiley-VCH, **2001**.
- (36) Wardle, B. *Principles and Applications of Photochemistry.* 1 ed. West Sussex-Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, **2010**.
- (37) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 3 ed. Baltimore, Maryland – EUA: Springer, **2011**.
- (38) Lindon, J. C.; Tranter, G. E. e Koppenaal, D. W. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* 3 ed, V1. Elsevier, **2017**.
- (39) Horiba Jobin Yvon IBL. *A practical guide to time-resolved luminescence lifetime determination using dedicated Time-Correlated Single-Photon Counting systems.* Disponível em: <https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Downloads/UserArea/Fluorescence/Manuals/IBH-TCSPC-Guide.pdf> . Acessado em janeiro **2020**.
- (40) Terai, T.; Nogano, T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Eur. J. Physiol.* **2013**, 465, 347 - 359.

- (41) Murphy, D.B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley-Liss, **2001**.
- (42) Grimm, J. B.; Heckman, L. M.; Lavis, L. D. The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. *Prog. Mol. Bio. Transl. Sci.* **2013**, 113, 1-34.
- (43) Alvim, H. G. O.; Fagg, E.; Oliveira, A. L.; Oliveira, H. C. B.; Freitas, S. M.; Xavier, M. E.; Soares, T. A.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Silva, W. A.; Neto, B. A. D. Probing deep into the interaction of a fluorescent chalcone derivative and bovine serum albumin (BSA): an experimental and computational study. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 4764 – 4777.
- (44) Crosby, G.A.; Demas, J.A. Measurement of photoluminescence quantum yields. *The Journal of Physical Chemistry.* **1971**, 75, 8, 991-1024.
- (45) Rurack, K.; Genger, U.R. Determination of the photoluminescence quantum yield of dilute dye solutions. *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85, 10, 2005–2026.
- (46) Allen, W.M. *Measurement of Fluorescence Quantum Yields*. Madison, EUA: Thermo Fisher Scientific, **2010**.
- (47) Gardens, D. *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*. Stanmore, Londres: Horiba, **2016**. Disponível em: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material_Research/Quantum_Dots/quantumyieldstrad.pdf. Acessado em fevereiro de 2017.
- (48) Zheng, Q.; Lavis, L. D. Development of photostable fluorophores for molecular imaging. *Current Opinion in Chemical Biology.* **2017**, 39, 32 – 38.
- (49) Demchenko, A. P. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods. Appl. Fluoresc.* **2020**, 20, 8, 2.
- (50) Bhattacharyya, P.S.; MISRA, R. *Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications*. 1 ed. Wiley-VCH, **2018**.
- (51) *Photoinduced Intramolecular Charge Transfer: fundamental concepts and applications*. Disponível em: http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/130215/6/06_chapter1.pdf Acessado em outubro, **2018**.
- (52) Perry, J.W.; Bhanuprakash, K.; Rao, V.J.; Makarov, N.S.; Yesudas, K.; Devi, C.L. Combined experimental and theoretical study of one- and two-photon absorption properties of D- π -A- π -D type bis(carbazolyfluorenylethynyl) arene derivatives: Influence of aromatic acceptor bridge. *Dyes and Pigments.* **2015**, 113, 682 – 691.
- (53) Carlotti, B.; Spalletti, A.; Marrocchi, A.; Foggi, P.; Elisei, F.; Ricci, F. Photobehavior and Nonlinear Optical Properties of Push–Pull, Symmetrical, and Highly Fluorescent Benzothiadiazole Derivatives. *J. Phys. Chem.* **2016**, 120, 23726 – 23739.
- (54) Yang, W.J.; Kim, C.H.; Jeong, M.; Lee, S.K.; Piao, M.J.; Jeon, S.; Cho, B.R. Synthesis and Two-Photon Absorption Properties of 9,10 Bis(arylethynyl)anthracene Derivatives. *Chem Mater.* **2004**, 16, 2783 – 2789.

- (55) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Dupont, J. 2,1,3-Benzothiadiazole and Derivatives: Synthesis, Properties, Reactions, and Applications in Light Technology of Small Molecules. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 228 – 255.
- (56) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R. Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 1560 – 1569.
- (57) Patai, S. *The Chemistry of the quinonoid compounds*. 1 ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd, **1974**.
- (58) Miranda, M. S.; Matos, M. A. R.; Morais, V. M. F.; Liebman, J. F. Paradigms and paradoxes: en route to the understanding of the aromaticity of the “iso-species” isobenzofuran, anthranil, benzofurazan and 2,1,3-benzothiadiazole. *Struct Chem.* **2012**, 23, 1241 – 1243.
- (59) Mataka, S.; Kato, S.; Matsumoto, T.; Gorohmaru, H.; Maeda, S.; Ishi-I, T. Novel 2,1,3-Benzothiadiazole-Based Red-Fluorescent Dyes with Enhanced Two-Photon Absorption Cross-Sections. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2303 – 2317.
- (60) Dao-Bó, A.L.G.; Frizon, T.E.A.; Martínez, J.C.V.; Westrup, J.L.; Duarte, R.C.; Zapp, E.; Domiciano, K.G.; Rodembusch, F.S. 2,1,3-Benzothiadiazole-based fluorophores. Synthesis, electrochemical, thermal and photophysical characterization. *Dyes and Pigments.* **2016**, 135, 26 – 35.
- (61) Vieira, A.A.; Benevides, T.O.; Regis, E.; Nicoletti, C.R.; Bechtold, I.H. Phase-dependent photoluminescence of non-symmetric 2,1,3-benzothiadiazole liquid crystals. *Dyes and Pigments.* **2019**, 163, 300 – 307.
- (62) Pazini, A.; Maqueira, L.; da Silveira Santos, F.; Jardim Barreto, A. R.; Carvalho, R. D. S.; Valente, F. M.; Back, D.; Aucélio, R. Q.; Cremona, M.; Rodembusch, F. S.; Limberger, J. Designing highly luminescent aryloxy-benzothiadiazole derivatives with aggregation-induced enhanced emission. *Dyes Pigment.* **2020**, 178, 108377, 1 – 17.
- (63) Yamashita, Y.; Akhtaruzzaman, M.; Tomura, M.; Zaman, M. B.; Nishida, J. Synthesis and Characterization of New Linear π -Conjugated Molecules Containing Bis(ethynylpyridine) Units with a Benzothiadiazole Spacer. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7813 – 7818.
- (64) Yamashita, Y.; Tomura, M.; Nishida, J.; Akhtaruzzaman, M. Synthesis and Characterization of Novel Dipyridylbenzothiadiazole and Bisbenzothiadiazole Derivatives. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2953 – 2958.
- (65) Wang, Z.; Peng, Z.; Huang, K.; Lu, P.; Wang, Y. Butterfly-shaped π -extended benzothiadiazoles as promising emitting materials for white OLEDs. *J. Mater. Chem. C.* **2019**, 7, 6706 – 6713.
- (66) Zhang, J.; Konsmo, A.; Sandberg, A.; Wu, X.; Nyström, S.; Obermüller, U.; Wegenast-Braun, B. M.; Konradsson, P.; Lindgren, M.; Hammarström, P. Phenolic Bis-styrylbenzo[c]-1,2,5-thiadiazoles as Probes for Fluorescence Microscopy Mapping of A β Plaque Heterogeneity. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 2038 – 2048.

- (67) Ma, X.; Hua, J.; Jin, Y.; Meng, F.; Zhan, Y.; Tian, H. A high-efficiency cyanine dye for dye-sensitized solar cells. *Tetrahedron*. **2008**, 64, 345 – 350.
- (68) Jiang, D.; Chen, S.; Xue, Z.; Li, Y.; Liu, H.; Yang, W.; Li, Y. Donor-acceptor molecules based on benzothiadiazole: Synthesis, X-ray crystal structures, linear and third-order nonlinear optical properties. *Dyes and Pigments*. **2016**, 125, 100 – 105.
- (69) Westrup, J. L.; Oenning, L. W.; Paula, M. M. S.; Duarte, R. C.; Rodembusch, F. S.; Frizon, T. E. A.; Silva, L.; Dal-Bó, A. G. New photoactive D- π -A- π -D benzothiadiazole derivative: Synthesis, thermal and photophysical properties. *Dyes and Pigments*. **2016**, 126, 209 – 217.
- (70) 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. *Org. Lett.* **2007**, 9, 20, 4001 – 4004.
- (71) Neto, B.A.D.; Lapis, A.M. Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends. *Molecules*. **2009**, 14, 1725 – 1746.
- (72) Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M.; Mancilha, F.S.; Junior, E.L.B.; 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. *Mol. Bio. Syst.* **2010**, 6, 967 – 975.
- (73) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Silva, R. G. Selective Mitochondrial Staining with Small Fluorescent Probes: Importance, Design, Synthesis, Challenges and Trends for new Markers. *RSC Adv.* **2013**, 3, 5291 – 5301.
- (74) Carvalho, T. O.; Carvalho, P.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Medeiros, G. A.; Eberlin, M. N.; Coelho, S. E.; Domingos, J. B.; Neto, B. A. D. Palladium Catalyst with Task-Specific Ionic Liquid Ligands: Intracellular Reactions and Mitochondrial Imaging with Benzothiadiazole Derivatives. *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 5118 – 5128.
- (75) Carvalho, P.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Baril, M.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; de Souza, P. E. N.; Veiga-Souza, F. H.; Spencer, J.; Neto, B. A. D. When the strategies for cellular selectivity fail. Challenges and surprises in the design and application of fluorescent benzothiadiazole derivatives for mitochondrial staining. *Org. Chem. Front.* **2019**, 6, 2371 – 2384.
- (76) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. Designed Benzothiadiazole Fluorophores for Selective Mitochondrial Imaging and Dynamics. *Chem.-Eur. J.* **2014**, 20, 15360 – 15374.
- (77) Sun, J.; Li, X.; Cao, J.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Wang, X.; Wu, T.; Hu, X.; Feng, F. Mitochondria Targeting Fluorescent Probes Based on through Bond-Energy Transfer for Mutually Imaging Signaling Molecules H₂S and H₂O₂. *Chem.-Eur. J.* **2019**, 25, 9164 – 9169.
- (78) Han, X.; Wang, Z. R.; Cheng, Q.; Meng, X. R.; Wei, D. H.; Zheng, Y. C.; Ding, J.; Hou, H. W. Mitochondria-dependent benzothiadiazole-based molecule probe for quantitatively intracellular pH imaging. *Dyes Pigment.* **2017**, 145, 576 – 583.

- (79) Oliveira, F. F. D.; Santos, D.; Lapis, A. A. M.; Correa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. On the Use of 2,1,3 Benzothiadiazole Derivatives as Selective Live Cell Fluorescence Imaging Probes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6001 – 6007.
- (80) da Cruz, E. H. G.; Carvalho, P.; Correa, J. R.; Silva, D. A. C.; Diogo, E. B. T.; de Souza, J. D.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; de Oliveira, H. C. B.; Guido, B. C.; da Silva, D. A.; Neto, B. A. D.; da Silva, E. N. Design, Synthesis and Application of Fluorescent 2,1,3-Benzothiadiazole-Triazole-Linked Biologically Active Lapachone Derivatives. *New J. Chem.* **2014**, 38, 2569 – 2580.
- (81) Neto, B.A.D.; Carvalho, P.H.P.R.; Correa, J.R.; Paiva, K.L.R.; Machado, D.F.S.; Scholten, J.D. Plasma membrane imaging with a fluorescent benzothiadiazole derivative. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, 15,2644–2654.
- (82) Boucard, J.; Linot, C.; Blondy, T.; Nedellec, S.; Hulin, P.; Blanquart, C.; Lartigue, L.; Ishow, E. Small Molecule-Based Fluorescent Organic Nanoassemblies with Strong Hydrogen Bonding Networks for Fine Tuning and Monitoring Drug Delivery in Cancer Cells. *Small.* **2018**, 14, 1802307, 1 – 10.
- (83) Yang, D.; Wang, H.; Sun, C.; Zhao, H.; Hu, K.; Qin, W.; Ma, R.; Yin, F.; Qin, X.; Zhang, Q.; Liang, Y.; Li, Z. Development of a high quantum yield dye for tumour imaging. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 6322 – 6326.
- (84) Huang, Y.; Qiu, F.; Chen, D.; Shen, L.; Xu, S.; Guo, D.; Su, Y.; Yan, D.; Zhu, X. Color-Convertible, Unimolecular, Micelle-Based, Activatable Fluorescent Probe for Tumor-Specific Detection and Imaging In Vitro and In Vivo. *Small.* **2017**, 13, 1604062, 1 – 11.
- (85) Yao, S.; Kim, B.; Yue, X.; Gomez, M. Y. C.; Bondar, M. V.; Belfield, K. D. Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Two-Photon-Absorbing Fluorenyl Benzothiadiazole and Benzoselenadiazole Derivatives. *ACS Omega.* **2016**, 1, 1149 – 1156.
- (86) Jiang, Q.; Zhang, Z.; Lu, J.; Huang, Y.; Lu, Z.; Tan, Y.; Jiang, Q. A Novel Nitro-Substituted Benzothiadiazole as Fluorescent Probe for Tumor Cells under Hypoxic Condition. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 7735 – 7741.
- (87) Jung, K. H.; Kim, S. F.; Liu, Y.; Zhang, X. A Fluorogenic AggTag Method Based on Halo- and SNAP-Tags to Simultaneously Detect Aggregation of Two Proteins in Live Cells. *ChemBioChem.* **2019**, 20, 1078 – 1087.
- (88) Wu, S.; Su, F.; Magee, H. Y.; Meldrum, D. R.; Tian, Y. cRGD functionalized 2,1,3-benzothiadiazole (BTD)-containing two-photon absorbing red-emitter-conjugated amphiphilic poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) for targeted bioimaging. *RSC Adv.* **2019**, 9, 34235 – 34243.
- (89) Chen, F. Z.; Zhang, J.; Qu, W. B.; Zhong, X. X.; Liu, H.; Ren, J.; He, H. P.; Zhang, X. H.; Wang, S. F. Development of a novel benzothiadiazole-based fluorescent turn-on probe for highly selective detection of glutathione over cysteine/homocysteine. *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, 266, 528 – 533.

- (90) Liu, Y.; Miao, K.; Dunham, N. P.; Liu, H.; Fares, M.; Boal, A. K.; Li, X.; Zhang, X. The Cation- π Interaction Enables a Halo-Tag Fluorogenic Probe for Fast No-Wash Live Cell Imaging and Gel-Free Protein Quantification. *Biochemistry*. **2017**, 56, 1585 – 1595.
- (91) Dyrager, C.; Vieira, R. P.; Nystrom, S.; Nilsson, K. P. R.; Storr, T. Synthesis and evaluation of benzothiazole-triazole and benzothiadiazole-triazole scaffolds as potential molecular probes for amyloid-beta aggregation. *New J. Chem.* **2017**, 41, 1566 – 1573.
- (92) Chen, C.; Hua, Y.; Hu, Y.; Fang, Y.; Ji, S.; Yang, Z.; Ou, C.; Kong, D.; Ding, D. Far-red/near-infrared fluorescence light-up probes for specific in vitro and in vivo imaging of a tumour-related protein. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 23190, 1 – 9.
- (93) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. Bioimaging, Cellular Uptake and Dynamics in Living Cells of a Lipophilic Fluorescent Benzothiadiazole at Low Temperature (4 °C). *Chem. Sci.* **2014**, 5, 3995 – 4003.
- (94) Park, S. J.; Juvekar, V.; Jo, J. H.; Kim, H. M. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity. *Chem. Sci.* **2020**, 11, 596 – 601.
- (95) Neto, B. A. D.; Medeiros, G. A.; Correa, J. R.; Andrade, L. P.; Lopes, T. O.; Oliveira, H. C. B.; Diniz, A. B.; Menezes, G. B.; Rodrigues, M. O. A benzothiadiazole-quinoline hybrid sensor for specific bioimaging and surgery procedures in mice. *Sensor. Actuator. B - Chem.* **2021**, 328, 128998 – 129046.
- (96) Mei, J.; Leung, N. L. C.; Kwok, R. T. K.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem. Rev.* **2015**, 115, 11718 – 11940.
- (97) Ding, D.; Li, K.; Liu, B.; Tang, B. Z. Bioprobes Based on AIE Fluorogens. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2441 – 2453.
- (98) Hong, Y. N.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Aggregation-induced emission. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5361 – 5388.
- (99) Kwok, R. T. K.; Leung, C. W. T.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Biosensing by luminogens with aggregation-induced emission characteristics. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4228 – 4238.
- (100) Kang, M.; Gu, X.; Kwok, R.T.K.; Leung, C.W.T.; Lam, J.W.Y.; Li, F.; Tang, B.Z. A near-infrared AIEgen for specific imaging of lipid droplets. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 5957 – 5960.
- (101) Luo, J.; Xie, Z.; Lam, J. W. Y.; Cheng, L.; Chen, H.; Qiu, C.; Kwok, H. S.; Zhan, X.; Liu, Y.; Zhu, D.; Tang, B. Z. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole. *Chem. Commun.* **2001**, 1740 – 1741.
- (102) Zhou, Y.; Hua, J.; Barritt, G.; Liu, Y.; Tang, B. Z.; Tang, Y. Live Imaging and Quantitation of Lipid Droplets and Mitochondrial Membrane Potential Changes with Aggregation-Induced Emission Luminogens in an in Vitro Model of Liver Steatosis. *ChemBioChem.* **2019**, 20, 1256 – 1259.

- (103) Dong, J.; Liu, M.; Jiang, R.; Huang, H.; Huang, Q.; Wen, Y.; Tian, J.; Dai, Y.; Zhang, X.; Wei, Y. Ultrafast fabrication of fluorescent organic nanoparticles with aggregation-induced emission feature through the microwave-assisted Biginelli reaction. *Dyes Pigment*. **2019**, 165, 90 – 96.
- (104) Zheng, S.; Huang, C.; Zhao, X.; Zhang, Y.; Liu, S.; Zhu, Q. A hydrophobic organelle probe based on aggregation-induced emission: Nanosuspension preparation and direct use for endoplasmic reticulum imaging in living cells. *Spectrosc. Acta A*. **2018**, 189, 231 – 238.
- (105) Zhang, J.; Yan, Z.; Wang, S.; She, M.; Zhang, Z.; Cai, W.; Liu, P.; Li, J. Water soluble chemosensor for Ca²⁺ based on aggregation-induced emission characteristics and its fluorescence imaging in living cells. *Dyes Pigment*. **2018**, 150, 112 – 120.
- (106) Jiang, R. M.; Liu, M. Y.; Huang, H. Y.; Mao, L. C.; Huang, Q.; Wen, Y. Q.; Cao, Q. Y.; Tian, J. W.; Zhang, X. Y.; Wei, Y. Facile fabrication of organic dyed polymer nanoparticles with aggregation-induced emission using an ultrasound-assisted multicomponent reaction and their biological imaging. *J. Colloid Interface Sci*. **2018**, 519, 137 – 144.
- (107) Long, Z.; Mao, L. C.; Liu, M. Y.; Wan, Q.; Wan, Y. Q.; Zhang, X. Y.; Wei, Y. Marrying multicomponent reactions and aggregation-induced emission (AIE): new directions for fluorescent nanoprobes. *Polym. Chem*. **2017**, 8, 5644 – 5654.
- (108) Yang, X.; Chen, X.; Lu, X.; Yan, C.; Xu, Y.; Hang, X.; Qu, J.; Liu, R. A highly selective and sensitive fluorescent chemosensor for detection of CN⁻, SO₃²⁻ and Fe³⁺ based on aggregation-induced emission. *J. Mater. Chem. C*. **2016**, 4, 383 – 390.
- (109) Xu, S. Y.; Bai, X. L.; Ma, J. W.; Xu, M. M.; Hu, G. F.; James, T. D.; Wang, L. Y. Ultrasmall Organic Nanoparticles with Aggregation-Induced Emission and Enhanced Quantum Yield for Fluorescence Cell Imaging. *Anal. Chem*. **2016**, 88, 7853 – 7857.
- (110) Chen, S.; Hong, Y.; Zeng, Y.; Sun, Q.; Liu, Y.; Zhao, E.; Bai, G.; Qu, J.; Hao, J.; Tang, B. Z. Mapping Live Cell Viscosity with an Aggregation-Induced Emission Fluorogen by Means of Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging. *Chem.-Eur. J*. **2015**, 21, 4315 – 4320.
- (111) Xiao, H.; Chen, K.; Cui, D.; Jiang, N.; Yin, G.; Wang, J.; Wang, R. Two novel aggregation-induced emission active coumarin-based Schiff bases and their applications in cell imaging. *New J. Chem*. **2014**, 38, 2386 – 2393.
- (112) Wang, L.; Yang, L.; Cao, D. Application of Aggregation-Induced Emission (AIE) Systems in Sensing and Bioimaging. *Curr. Org. Chem*. **2014**, 18, 1028 – 1049.
- (113) Mei, J.; Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Qin, A.; Tang, Y.; Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission: The Whole Is More Brilliant than the Parts. *Adv. Mater*. **2014**, 26, 5429 – 5479.
- (114) Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Aggregation-induced emission: phenomenon, mechanism and applications. *Chem. Commun*. **2009**, 4332 – 4353.

- (115) Park, Y.; An, B.; Kwon, S.; Jung, S. Enhanced Emission and Its Switching in Fluorescent Organic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14410 – 14415.
- (116) Zeng, Q.; Li, Z.; Dong, Y.; Di, C. a.; Qin, A.; Hong, Y.; Ji, L.; Zhu, Z.; Jim, C. K. W.; Yu, G.; Li, Q.; Li, Z.; Liu, Y.; Qin, J.; Tang, B. Z. Fluorescence enhancements of benzene-cored luminophors by restricted intramolecular rotations: AIE and AIEE effects. *Chem. Commun.* **2007**, 70 – 72.
- (117) Ye, J.; Huang, X.; Li, Y.; Zheng, T.; Ning, G.; Liang, J.; Liu, Y.; Wang, Y. AIEE-active blue-emitting molecules derived from methoxyl-decorated triarylcyclopentadienes: Synthesis, crystal structures, photophysical and electroluminescence properties. *Dyes Pigment.* **2017**, 147, 465 – 475.
- (118) Wang, Y.; Cheng, D.; Zhou, H.; Liu, J.; Liu, X.; Cao, J.; Han, A.; Zhang, C. Mechanochromic luminescence of AIEE-active tetraphenylethene-containing cruciform luminophores. *Dyes Pigment.* **2019**, 171, 107739, 1 – 9.
- (119) Liu, W.; Wang, Y.; Yang, J.; Li, X.; Wang, X.; Ma, L. The abnormal solvatochromism, high-contrast mechanochromism and internal mechanism of two AIEE-active beta-diketones. *Dyes Pigment.* **2020**, 175, 108149, 1 – 8.
- (120) Tang, A.; Chen, Z.; Deng, D.; Liu, G.; Tu, Y.; Pu, S. Aggregation-induced emission enhancement (AIEE)-active tetraphenylethene (TPE)-based chemosensor for Hg²⁺ with solvatochromism and cell imaging characteristics. *RSC Adv.* **2019**, 9, 11865 – 11869.
- (121) Ding, Z.; Ma, Y.; Shang, H.; Zhang, H.; Jiang, S. Fluorescence Regulation and Photoresponsivity in AIEE Supramolecular Gels Based on a Cyanostilbene Modified Benzene-1,3,5-Tricarboxamide Derivative. *Chem.-Eur. J.* **2019**, 25, 315 – 322.
- (122) Zhang, W.; Wang, N.; Yu, Y.; Shan, Y.-M.; Wang, B.; Pu, X.-M.; Yu, X.-Q. Synthetic Regulation of 1,4-Dihydropyridines for the AIE or AIEE Effect: From Rational Design to Mechanistic Views. *Chem.-Eur. J.* **2018**, 24, 4871 – 4878.
- (123) Xu, L.; Wang, R.; Cui, W.; Wang, L.; Meier, H.; Tang, H.; Cao, D. Stronger host-guest binding does not necessarily give brighter particles: a case study on polymeric AIEE-tunable and size-tunable supraspheres. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 9274 – 9277.
- (124) Shan, Y.; Yao, W.; Liang, Z.; Zhu, L.; Yang, S.; Ruan, Z. Reaction-based AIEE-active conjugated polymer as fluorescent turn on probe for mercury ions with good sensing performance. *Dyes Pigment.* **2018**, 156, 1 – 7.
- (125) Puri, P.; Kumar, G.; Paul, K.; Luxami, V. Self-agglomerated crystalline needles harnessing ESIPT and AIEE features for the 'turn-on' fluorescence detection of Al³⁺ ions. *New J. Chem.* **2018**, 42, 18550 – 18558.
- (126) Lugovik, K. I.; Eltyshv, A. K.; Suntsova, P. O.; Slepukhin, P. A.; Benassi, E.; Belskaya, N. P. Highlights on the Road towards Highly Emitting Solid-State Luminophores: Two Classes of Thiazole-Based Organoboron Fluorophores with the AIEE/AIE Effect. *Chem.-Asian J.* **2018**, 13, 311 – 324.

- (127) Islam, A. S. M.; Sasmal, M.; Maiti, D.; Dutta, A.; Show, B.; Ali, M. Design of a Pyrene Scaffold Multifunctional Material: Real-Time Turn-On Chemosensor for Nitric Oxide, AIEE Behavior, and Detection of TNP Explosive. *ACS Omega*. **2018**, 3, 10306 – 10316.
- (128) Liang, C.; Jiang, S. Fluorescence light-up detection of cyanide in water based on cyclization reaction followed by ESIPT and AIEE. *Analyst*. **2017**, 142, 4825 – 4833.
- (129) Garzon, A.; Navarro, A.; Lopez, D.; Perles, J.; Garcia-Frutos, E. M. Aggregation-Induced Enhanced Emission (AIEE) from N,N-Octyl-7,7'-diazaisoindigo-Based Organogel. *J. Phys. Chem. C*. **2017**, 121, 27071 – 27081.
- (130) Paramasivam, M.; Kanvah, S. Rational Tuning of AIEE Active Coumarin Based alpha-Cyanostilbenes toward Far-Red/NIR Region Using Different pi-Spacer and Acceptor Units. *J. Phys. Chem. C*. **2016**, 120, 10757 – 10769.
- (131) Niu, C.; You, Y.; Zhao, L.; He, D.; Na, N.; Ouyang, J. Solvatochromism, Reversible Chromism and Self-Assembly Effects of Heteroatom-Assisted Aggregation-Induced Enhanced Emission (AIEE) Compounds. *Chem.-Eur. J.* **2015**, 21, 13983 – 13990.
- (132) Mi, S.; Wu, J.; Liu, J.; Xu, Z.; Wu, X.; Luo, G.; Zheng, J.; Xu, C. AIEE-Active and Electrochromic Bifunctional Polymer and a Device Composed thereof Synchronously Achieve Electrochemical Fluorescence Switching and Electrochromic Switching. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2015**, 7, 27511 – 27517.
- (133) Mei, X.; Wen, G.; Wang, J.; Yao, H.; Zhao, Y.; Lin, Z.; Ling, Q. A Lambda-shaped donor-pi-acceptor-pi-donor molecule with AIEE and CIEE activity and sequential logic gate behaviour. *J. Mater. Chem. C*. **2015**, 3, 7267 – 7271.
- (134) Chen, W.; Zhang, Z.; Li, X.; Agren, H.; Su, J. Highly sensitive detection of low-level water content in organic solvents and cyanide in aqueous media using novel solvatochromic AIEE fluorophores. *RSC Adv*. **2015**, 5, 12191 – 12201.
- (135) Mukherjee, S.; Thilagar, P. Insights into the AIEE of 1,8-Naphthalimides (NPIs): Inverse Effects of Intermolecular Interactions in Solution and Aggregates. *Chem.-Eur. J.* **2014**, 20, 8012 – 8023.
- (136) Huang, W.; Tang, F.; Li, B.; Su, J.; Tian, H. Large cyano- and triazine-substituted D-pi-A-pi-D structures as efficient AIEE solid emitters with large two-photon absorption cross sections. *J. Mater. Chem. C*. **2014**, 2, 1141 – 1148.
- (137) Mukherjee, S.; Thilagar, P. Molecular flexibility tuned emission in "V" shaped naphthalimides: Hg(II) detection and aggregation-induced emission enhancement (AIEE). *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7292 – 7294.
- (138) Li, Y.-X.; Pang, M.-P.; Zhang, Z.-W.; Li, G.-B.; Sun, G.-X. Substitution position tuning of the different aggregation-induced emission properties of four (1-naphthyl)vinyl(9-anthryl)vinylbenzene isomers: from ACQ to AIEE and AIE. *RSC Adv*. **2013**, 3, 14950 – 14953.

- (139) Lai, Y.-W.; Kuo, S.-W.; Hong, J.-L. Complexing AIEE-active tetraphenylthiophene fluorophore to poly(N-isopropyl acrylamide): fluorescence responses toward acid, base and metal ions. *RSC Adv.* **2012**, 2, 8194 – 8200.
- (140) Cai, M.; Gao, Z.; Zhou, X.; Wang, X.; Chen, S.; Zhao, Y.; Qian, Y.; Shi, N.; Mi, B.; Xie, L.; Huang, W. A small change in molecular structure, a big difference in the AIEE mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 5289 – 5296.
- (141) Zhang, X.; Chi, Z.; Zhou, X.; Liu, S.; Zhang, Y.; Xu, J. Influence of Carbazolyl Groups on Properties of Piezofluorochromic Aggregation-Enhanced Emission Compounds Containing Distyrylanthracene. *J. Phys. Chem. C.* **2012**, 116, 23629 – 2363.
- (142) Kaur, S.; Gupta, A.; Bhalla, V.; Kumar, M. Pentacenequinone derivatives: aggregation-induced emission enhancement, mechanism and fluorescent aggregates for superamplified detection of nitroaromatic explosives. *J. Mater. Chem. C.* **2014**, 2, 7356 – 7363.
- (143) Kui, M.; Li, W.; Gong, L.; Tang, H.; Cao, D. Twisted intramolecular charge transfer and aggregation-enhanced emission characteristics based quinoxaline luminogen: photophysical properties and a turn-on fluorescent probe for glutathione. *J. Mater. Chem. C.* **2019**, 7, 3779 – 3786.
- (144) Breuer, N.; Gruber, I.; Janiak, C.; Müller, T.J.J. Emission solvatochromic, solid-state and aggregation-induced emissive α -pyrones and emission-tunable 1H-pyridines by Michael addition–cyclocondensation sequences. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, 15, 2684–2703.
- (145) Baig, M.Z.K.; Prusti, B.; Roy, D.; Sahu, P.K.; Sarkar, M.; Sharma, A.; Chakravarty, M. Weak Donor-/Strong Acceptor-Linked Anthracenyl π -Conjugates as Solvato(fluoro)chromophore and AEEgens: Contrast between Nitro and Cyano Functionality. *ACS Omega.* **2018**, 3, 9114–9125.
- (146) Dong, Y.; Zhang, Y.; Han, T.; Gu, S.; Zhou, T.; Zhao, C.; Guo, Y.; Feng, X.; Tong, B.; Bing, J.; Shi, J. Mechanochromic Behavior of Aryl-Substituted Buta-1,3-Diene Derivatives with Aggregation Enhanced Emission. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 8856 – 8861.
- (147) Wang, R.; Hou, M.; Xu, Z.; Tan, L.; Zhong, C.; Zhu, L. A new red fluorophore with aggregation enhanced emission by an unexpected "One-step" protocol. *RSC Adv.* **2018**, 8, 18327 – 18333.
- (148) Lu, N.; Jiang, T.; Tan, H.; Hang, Y.; Yang, J.; Wang, J.; Qu, X.; Hua, J. A red fluorescent turn-on chemosensor for Al^{3+} based on a dimethoxy triphenylamine benzothiadiazole derivative with aggregation-induced emission. *Anal. Methods.* **2017**, 9, 2689 – 2695.
- (149) Sun, H.; Tang, X.-X.; Zhang, R.; Sun, W.-H.; Miao, B.-X.; Zhao, Y.; Ni, Z.-H. Tetraphenylethene-substituted benzothiadiazoles: AIE and TICT properties, tunable intramolecular conjugation and application in detecting trace water in organic solvents. *Dyes Pigment.* **2020**, 174, 108051.

- (150) Li, Z.; Qin, W.; Wu, J.; Yang, Z.; Chi, Z.; Liang, G. Bright electrochemiluminescent films of efficient aggregation-induced emission luminogens for sensitive detection of dopamine. *Mater. Chem. Front.* **2019**, 3, 2051 – 2057.
- (151) Zhang, B.; Banal, J. L.; Jones, D. J.; Tang, B. Z.; Ghiggino, K. P.; Wong, W. W. H. Aggregation-induced emission-mediated spectral downconversion in luminescent solar concentrators. *Mater. Chem. Front.* **2018**, 2, 615 – 619.
- (152) Lee, W. W. H.; Zhao, Z.; Cai, Y.; Xu, Z.; Yu, Y.; Xiong, Y.; Kwok, R. T. K.; Chen, Y.; Leung, N. L. C.; Ma, D.; Lam, J. W. Y.; Qin, A.; Tang, B. Z. Facile access to deep red/near-infrared emissive AIEgens for efficient non-doped OLEDs. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 6118 – 6125.
- (153) Naeem, K. C.; Neenu, K.; Nair, V. C. Effect of Differential Self-Assembly on Mechanochromic Luminescence of Fluorene-Benzothiadiazole-Based Fluorophores. *ACS Omega.* **2017**, 2, 9118 – 9126.
- (154) Jadhav, T.; Dhokale, B.; Patil, Y.; Mobin, S. M.; Misra, R. Multi-Stimuli Responsive Donor Acceptor Tetraphenylethylene Substituted Benzothiadiazoles. *J. Phys. Chem. C.* **2016**, 120, 24030 – 24040.
- (155) Gopikrishna, P.; Iyer, P. K. Monosubstituted Dibenzofulvene-Based Luminogens: Aggregation Induced Emission Enhancement and Dual-State Emission. *J. Phys. Chem. C.* **2016**, 120, 26556 – 26568.
- (156) Jadhav, T.; Dhokale, B.; Misra, R. Effect of the cyano group on solid state photophysical behavior of tetraphenylethylene substituted benzothiadiazoles. *J. Mater. Chem. C.* **2015**, 3, 9063 – 9068.
- (157) Chen, S.; Qin, Z.; Liu, T.; Wu, X.; Li, Y.; Liu, H.; Song, Y.; Li, Y. Aggregation-induced emission on benzothiadiazole dyads with large third-order optical nonlinearity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 12660 – 12666.
- (158) Gerson, F.; Huber, W.: *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*; John Wiley & Sons, **2003**.
- (159) Junk, M. J. N. *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*. 1 ed. Springer Theses, **2012**.
- (160) Munzarová, M. L. Electron Paramagnetic Resonance. In: Reedijk, J. e Poepelmeier, K. (Org). *Comprehensive Inorganic Chemistry II – From elements to Applications*. 2 ed. Elsevier, **2013**.
- (161) Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Barr, D. P.; Weber, R. T. *Quantitative EPR*. Springer-Verlag/Wien, **2010**.
- (162) Niklas, J.; Mardis, K. L.; Banks, B. P.; Grooms, G. M.; Sperlich, A.; Dyakonov, V.; Beaupré, S.; Leclerc, M.; Xu, T.; Yu, L.; Poluektov, O. G. Highly-efficient charge separation and polaron delocalization in polymer-fullerene bulk-heterojunctions: a comparative multi-frequency EPR and DFT study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 9562 – 9574.

- (163) Barbieriková, Z.; Stasˇko, A.; Semanová, J.; Dvoranová, D.; Karabín, M.; Bella, M.; Milata, V.; Brezová, V. Photoinduced processes of 2,1,3 benzoselena(thia)diazole derivatives in dimethylsulfoxide: an in situ EPR spin trapping study. *Monatsh Chem.* **2014**, 145, 1449–1460.
- (164) Kawashima, H.; Kawabata, K.; Goto, H. Intramolecular charge transfer (ICT) of a chiroptically active conjugated polymer showing green colour. *J. Mater. Chem. C.* **2015**, 3, 1126–1133.
- (165) Ledwon, P.; Thomson, N.; Angioni, E.; Findlay, N. J.; Skabara, P. J.; Domagala, W. The role of structural and electronic factors in shaping the ambipolar properties of donor–acceptor polymers of thiophene and benzothiadiazole. *RSC Adv.* **2015**, 5, 77303 – 77315.
- (166) Ledwon, P.; Zassowski, P.; Jarosz, T.; Lapkowski, M.; Wagner, P.; Cherpak, V.; Stakhira, P. Novel donor-acceptor carbazole and benzothiadiazole material for deep red and infrared emitting applications. *J. Mater. Chem. C.* **2016**, 4, 2219 – 2227.
- (167) Ai, X.; Chen, Y.; Feng, Y.; Li, F. A Stable Room-Temperature Luminescent Biphenylmethyl Radical. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 2869 –2873.
- (168) Miao, F.; Lim, Z. L.; Hu, P.; Dong, S.; Qi, Q.; Zhang, X.; Wu, J. BODIPY blocked anthroxyl radicals: the substituent effect on reactivity and fluorescence turn-on detection of a hydroxyl radical. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 3188–3191.
- (169) Zheng, W.; Shan, N.; Yu, L.; Wang, X. UVevisible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins. *Dyes and Pigments.* **2008**, 77, 153 – 157.
- (170) Ahmad, R.; Kuppusamy, P. Theory, Instrumentation, and Applications of Electron Paramagnetic Resonance Oximetry *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3212–3236.
- (171) Lin, T. EPR measurements of the phosphorescent state of 2,1,3-benzothiadiazole. *Chem. Phys. Lett.* **1976**, 43, 338 – 343.
- (172) Hirota, N.; Yamauchi, S. Short-lived excited triplet states studied by time-resolved EPR spectroscopy *J. Photochem. Photobiol. C.* **2003**, 4, 109–124.
- (173) Kraffert, F.; Steyrlleuthner, R.; Albrecht, S.; Neher, D.; Scharber, M. C.; Bittl, R.; Behrends, J. Charge Separation in PCPDTBT:PCBM Blends from an EPR Perspective. *J. Phys. Chem. C.* **2014**, 118, 28482–28493.
- (174) Ogiwara, T.; Wakikawa, Y.; Ikoma, T. Mechanism of Intersystem Crossing of Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecules. *J. Phys. Chem. A.* **2015**, 119, 14, 3415–3418.
- (175) Sugiyama, K.; Tsuchiya, T.; Kikuchi, A.; Yagi, M. Optical and electron paramagnetic resonance studies of the excited triplet states of UV-B absorbers: 2-ethylhexyl salicylate and homomenthyl salicylate. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, 14, 1651 – 1659.

- (176) Kandrashkin, Y. E.; Wang, Z. J.; Sukhanov, A. A.; Hou, Y. Q.; Zhang, X.; Liu, Y.; Voronkova, V. K.; Zhao, J. Z. Balance between Triplet States in Photoexcited Orthogonal BODIPY Dimers. *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, 10, 4157 – 4163.
- (177) Hou, Y. Q.; Kurganskii, I.; Elmali, A.; Zhang, H. M.; Gao, Y. T.; Lv, L. L.; Zhao, J. Z.; Karatay, A.; Luo, L.; Fedin, M. Electronic coupling and spin-orbit charge transfer intersystem crossing (SOCT-ISC) in compact BDP-carbazole dyads with different mutual orientations of the electron donor and acceptor. *J. Chem. Phys.* **2020**, 152, 114701, 1 – 18.
- (178) CZAKÓ, B.; KÜRTI, L. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. 2 ed. Universidade da Pensilvânia: Elsevier, **2011**.
- (179) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 50, 4467 – 4470.
- (180) Dupont, J.; Neto, B.A.D.; Lopes, A.S.; Ebeling, G.; Gonçalves, R.S.; Costa, V.E.U.; Quina, F.H. Photophysical and electrochemical properties π -extended molecular 2,1,3-benzothiadiazoles. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 10975 – 10982.
- (181) Shigehiro, T.; Yagi, S.; Maeda, T.; Nakazumi, H.; Fujihara, H.; Sakurai, Y. Novel 10,13-disubstituted dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazines and their platinum(II) complexes: highly luminescent ICT-type fluorophores based on D-A-D structures. *Tetrahedron*. **2014**, 55, 5195 – 5198.
- (182) Gallardo, H.; Vieira, A.; Cristiano, R.; Bortoluzzi, A.J. Luminescent 2,1,3-benzothiadiazole-based liquid crystalline compounds. *Journal of Molecular Structures*. **2008**, 875, 364 – 371.
- (183) Martín, R.; Prieto, P.; Carrillo, J. R.; Torres, I.; Strassert, C. A.; Soloviova, K.; Rodríguez, A. M.; Sánchez, L.; Díaz-Ortiz, A. Colored optical waveguides in self-assembled thiadiazole-based materials. *Dyes and Pigments*. **2018**, 151, 327–334.
- (184) Kitamura, C.; Saito, K.; Ouchi, M.; Yoneda, A.; Yamashita, Y. Synthesis and crystal structure of 4,7-bis(2-thienylethynyl)-2,1,3-benzothiadiazole. *J. Chem. Research (S)*. **2002**, 2002, 10, 511 – 513.
- (185) Silvestri, F.; Marrocchi, A.; Seri, M.; Kim, C.; Marks, T. J.; Facchetti, A.; Taticchi, A. Solution-Processable Low-Molecular Weight Extended Arylacetylenes: Versatile p-Type Semiconductors for Field-Effect Transistors and Bulk Heterojunction Solar Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 17, 6108 – 6123.
- (186) Kivala, M. e Schaub, T. A. Cross-Coupling Reactions to sp Carbon Atoms. In: Meijere, A; Bräse, S. e Oestreich, M. (org). *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions and More, 1, 2 and 3*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, **2014**.
- (187) Gazvoda, M., Virant, M., Pinter, B.; Košmrlj, J. Mechanism of copper-free Sonogashira reaction operates through palladium-palladium transmetallation. *Nat Commun*. **2018**, 9, 4814.
- (188) Najéra, C.; Chinchilla, R. Recent advances in Sonogashira reactions. *Chem Soc. Rev.* **2011**, 40, 5084 – 5121.

- (189) Barbosa, L.C.A.; Karak, M.; Hargaden, G. Recent mechanistic developments and next generation catalysts for the Sonogashira coupling reaction. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 53442 – 53466.
- (190) Mino, T.; Shirae, Y.; Saito, T.; Sakamoto, M.; Fujita, T. Palladium-Catalyzed Sonogashira and Hiyama Reactions Using Phosphine-Free Hydrazone Ligands. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9499 – 9502.
- (191) Guo, M.; Wei, Z.; Yang, J.; Xie, Z.; Zhang, W. α , β -Alkynone Accelerated PPM Level Pd-Catalyzed Sonogashira Coupling Reaction. *Catalysts.* **2020**, *10*, 302, 1 – 8.
- (192) Cassar, L. Synthesis of Aryl- and Vinyl-substituted Acetylene derivatives by the use of nickel and palladium complexes. *J. Org. Chem.* **1975**, 253 – 257.
- (193) Heck, F.R.; Dieck, H.A. Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives. *J. Org. Chem.* **1975**, 259 – 263.
- (194) Doucet, H.; Hierso, J. Palladium-Based Catalytic Systems for the Synthesis of Conjugated Enynes by Sonogashira Reactions and Related Alkynylations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 834 – 837.
- (195) Martek, B. A.; Gazvoda, M.; Urankar, D.; Kosmrlj, J. Designing Homogeneous Copper-Free Sonogashira Reaction through a Prism of Pd–Pd Transmetalation. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4938 – 4943.
- (196) Wang, X.; Song, Y.; Qu, J.; Luo, Y. Mechanistic Insights into the Copper-Cocatalyzed Sonogashira Cross-Coupling Reaction: Key Role of an Anion. *Organometallics.* **2017**, *36*, 5, 1042 – 1048.
- (197) D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz. *Introduction to Spectroscopy. A Guide for Students of Organic Chemistry.* 2 ed. S. College, **1996**.
- (198) Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319 – 2358.
- (199) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry.* 3ed. Wiley-VCH, **2003**.
- (200) Bentea, L.; Watzky, M. A.; Finke, R. G. Sigmoidal Nucleation and Growth Curves Across Nature Fit by the Finke-Watzky Model of Slow Continuous Nucleation and Autocatalytic Growth: Explicit Formulas for the Lag and Growth Times Plus Other Key Insights. *J. Phys. Chem. C.* **2017**, *121*, 5302-5312.
- (201) Watzky, M. A.; Finney, E. E.; Finke, R. G. Transition-metal nanocluster size vs formation time and the catalytically effective nucleus number: A mechanism-based treatment. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11959 – 11969.
- (202) Watzky, M. A.; Finke, R. G. Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: Slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10382 – 10400.

- (203) Wang, W.; Roberts, C. J. Non-Arrhenius Protein Aggregation. *Aaps Journal* **2013**, *15*, 840 – 851.
- (204) Aquilanti, V.; Coutinho, N. D.; Carvalho-Silva, V. H. Kinetics of low-temperature transitions and a reaction rate theory from non-equilibrium distributions. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*. **2017**, *375*.
- (205) Carvalho-Silva, V. H.; Coutinho, N. D.; Aquilanti, V. Temperature Dependence of Rate Processes Beyond Arrhenius and Eyring: Activation and Transitivity. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 380, 1 – 11.
- (206) Silva, V. H. C.; Aquilanti, V.; de Oliveira, H. C. B.; Mundim, K. C. Uniform description of non-Arrhenius temperature dependence of reaction rates, and a heuristic criterion for quantum tunneling vs classical non-extensive distribution. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *590*, 201 – 207.
- (207) Aquilanti, V.; Mundim, K. C.; Elango, M.; Kleijn, S.; Kasai, T. Temperature dependence of chemical and biophysical rate processes: Phenomenological approach to deviations from Arrhenius law. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *498*, 209 – 213.
- (208) Tsallis, C. Possible Generalization of Boltzmann-Gibbs Statistics. *J. Stat. Phys.* **1988**, *52*, 479 – 487.
- (209) Carvalho-Silva, V. H.; Aquilanti, V.; de Oliveira, H. C. B.; Mundim, K. C. Deformed Transition-State Theory: Deviation from Arrhenius Behavior and Application to Bimolecular Hydrogen Transfer Reaction Rates in the Tunneling Regime. *J. Comput. Chem.* **2017**, *38*, 178 – 188.
- (210) Drozd-Rzoska, A. Universal behavior of the apparent fragility in ultraslow glass forming systems. *Sci. Rep.* **2019**, *9*.
- (211) Mallamace, F.; Branca, C.; Corsaro, C.; Leone, N.; Spooren, J.; Chen, S.-H.; Stanley, H. E. Transport properties of glass-forming liquids suggest that dynamic crossover temperature is as important as the glass transition temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 22457 – 22462.
- (212) Drozd-Rzoska, A.; Rzoska, S. J.; Paluch, M. Universal critical-like scaling of dynamic properties in symmetry-selected glass formers. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*.
- (213) Martinez-Garcia, J. C.; Rzoska, S. J.; Drozd-Rzoska, A.; Martinez-Garcia, J. A universal description of ultraslow glass dynamics. *Nat. Commun.* **2013**, *4*.
- (214) Gotze, W.; Sjogren, L. Relaxation Processes in Supercooled Liquids. *Rep. Prog. Phys.* **1992**, *55*, 241 – 376.
- (215) Mauro, J. C.; Yue, Y.; Ellison, A. J.; Gupta, P. K.; Allan, D. C. Viscosity of glass-forming liquids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 19780 – 19784.
- (216) Debenedetti, P. G.; Stillinger, F. H. Supercooled liquids and the glass transition. *Nature*. **2001**, *410*, 259 – 267.

- (217) Martinez-Garcia, J. C.; Martinez-Garcia, J.; Rzoska, S. J.; Hulliger, J. The new insight into dynamic crossover in glass forming liquids from the apparent enthalpy analysis. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 064501.
- (218) Tarjus, G.; Kivelson, D. Breakdown of the Stokes-Einstein Relation in Supercooled Liquids. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 3071-3073.
- (219) Charbonneau, P.; Jin, Y.; Parisi, G.; Zamponi, F. Hopping and the Stokes-Einstein relation breakdown in simple glass formers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 15025-15030.
- (220) Bakaeva, Z.; Cernoch, P.; Stepanek, P.; Nallet, F.; Noirez, L. Critical behavior of nanoparticle-containing binary liquid mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 5831-5835.
- (221) Melhuish, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229 – 232.
- (222) Adams, M. J.; Highfield, J. G.; Kirkbrigh, G. F. Determination of Absolute Fluorescence Quantum Efficiency of Quinine Bisulfate in Aqueous Medium by Optoacoustic Spectrometry *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 12, 1850 – 1852.
- (223) Melhuish, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229 – 232.
- (224) Adams, M. J.; Highfield, J. G.; Kirkbrigh, G. F. Determination of Absolute Fluorescence Quantum Efficiency of Quinine Bisulfate in Aqueous Medium by Optoacoustic Spectrometry *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 12, 1850 – 1852.
- (225) Lee, K.; Kunjappu, J.; Jockusch, S.; Turro, N. J.; Widerschpan, T.; Zhou, J. M.; Smith, B. W.; Zimmerman, P.; Conley, W.: Amplification of the index of refraction of aqueous immersion fluids by ionic surfactants. In *Advances in Resist Technology and Processing XXII, Pt 1 and 2*; Sturtevant, J. L., Ed.; Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (Spie). **2005**, Vol. 5753, pp 537-553.
- (226) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 6378 – 6396.
- (227) Guido, C. A.; Cortona, P.; Mennucci, B.; Adamo, C. On the Metric of Charge Transfer Molecular Excitations: A Simple Chemical Descriptor. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3118 – 3126.
- (228) Charaf-Eddin, A.; Planchat, A.; Mennucci, B.; Adamo, C.; Jacquemin, D. Choosing a Functional for Computing Absorption and Fluorescence Band Shapes with TD-DFT. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 2749 – 2760.
- (229) Lu, T.; Chen, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 580 – 592.

- (230) Le Bahers, T.; Adamo, C.; Ciofini, I. A Qualitative Index of Spatial Extent in Charge-Transfer Excitations. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2498 – 2506.
- (231) Patel, D. G.; Feng, F. D.; Ohnishi, Y. Y.; Abboud, K. A.; Hirata, S.; Schanze, K. S.; Reynolds, J. R. It Takes More Than an Imine: The Role of the Central Atom on the Electron-Accepting Ability of Benzotriazole and Benzothiadiazole Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2599 – 2612.
- (232) Roessler, M. M.; Salvadori, E. Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 2534 – 2553.
- (233) Aslantürk, Ö. S. (December 20th 2017). *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*. **2017**. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>. Acessado em novembro – 2020.
- (234) Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Okhura Y, Ueno KA. Combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **1996**, *19*, 11, 1518 – 1520.
- (235) Niles, A.L.; Moravec, R. A.; Worzella, T. J.; Evans, N. J.; Riss, T. L. *High-Throughput Screening Assays for the Assessment of Cytotoxicity*. John Wiley & Sons, **2013**. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1002%2F9781118538203.ch5>. Acessado em novembro – 2020.
- (236) Magalhães, W. L. E.; Thá, E. L.; Leme, D. M. *Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA*. Comunicado Técnico. Colombo, PR: Embrapa, dezembro, **2018**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1104215/metodo-de-determinacao-de-concentracoes-nao-citotoxicas-para-avaliacao-da-capacidade-protetora-da-lignina-contra-danos-ao-dna>. Acessado em outubro – 2020.
- (237) Cruz, A.L.S., Barreto, E.d.A., Fazolini, N.P.B. *et al.* Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 105.
- (238) Figueiredo Filho, D. B.; Silva Junior, J. A. S. *Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r)**. Disponível em: <file:///C:/Users/elain/Downloads/3852-8315-1-PB.pdf>. Acessado em: setembro – **2020**.
- (239) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339 – 341.
- (240) Bourhis, L. J.; Dolomanov, O. V.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. The anatomy of a comprehensive constrained, restrained refinement program for the modern computing environment-Olex2 dissected. *Acta Crystallogr. A* **2015**, *71*, 59 – 75.
- (241) Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld surface analysis. *Crystengcomm* **2009**, *11*, 19 – 32.

- (242) Turner, M. J.; McKinnon, J. J.; Wolff, S. K.; Grimwood, D. J.; Spackman, P. R.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A.: *CrystalExplorer17*. University of Western Australia, **2017**.
- (243) COWIE, J. M. G.; TOPOROWSKI, P. M. Association in the binary liquid system dimethyl sulphoxide – water. *Can. J. Chem.* **1961**, 39, 2240 – 2256.
- (244) LeBEL, R. G.; GORING, D. A. I. Density, Viscosity, Refractive Index, and Hygroscopicity of Mixtures of Water and Dimethyl Sulfoxide. *Journal of Chemical & Engineering Data.* **1962**, 7, 1, 100 – 101.
- (245) Mundim, K. C.; Tsallis, C. Geometry optimization and conformational analysis through generalized simulated annealing. *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, 58, 373 – 381.
- (246) Moret, M. A.; Pascutti, P. G.; Bisch, P. M.; Mundim, K. C. Stochastic molecular optimization using generalized simulated annealing. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 647 – 657.
- (247) Bentea, L.; Watzky, M. A.; Finke, R. G. Sigmoidal Nucleation and Growth Curves Across Nature Fit by the Finke-Watzky Model of Slow Continuous Nucleation and Autocatalytic Growth: Explicit Formulas for the Lag and Growth Times Plus Other Key Insights. *J. Phys. Chem. C.* **2017**, 121, 5302-5312.
- (248) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.: *Gaussian 09*, Revision D.01. Wallingford CT, **2009**.
- (249) Mennucci, B. Polarizable continuum model. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, 2, 386-404.
- (250) Garrido, N. M.; Economou, I. G.; Queimada, A. J.; Jorge, M.; Macedo, E. A. Prediction of the n-hexane/water and 1-octanol/water partition coefficients for environmentally relevant compounds using molecular simulation. *AIChE J.* **2012**, 58, 1929 – 1938.
- (251) ATCC: The Global Bioresource Center. Disponível em: <https://www.atcc.org/>. Acessado em setembro de **2020**.

Anexos

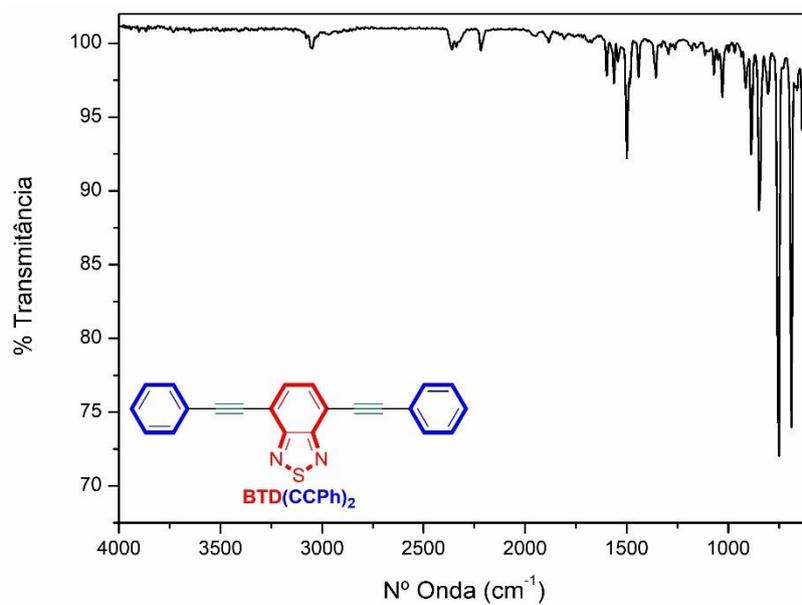


Figura A1. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto BTD(CCPh)₂.

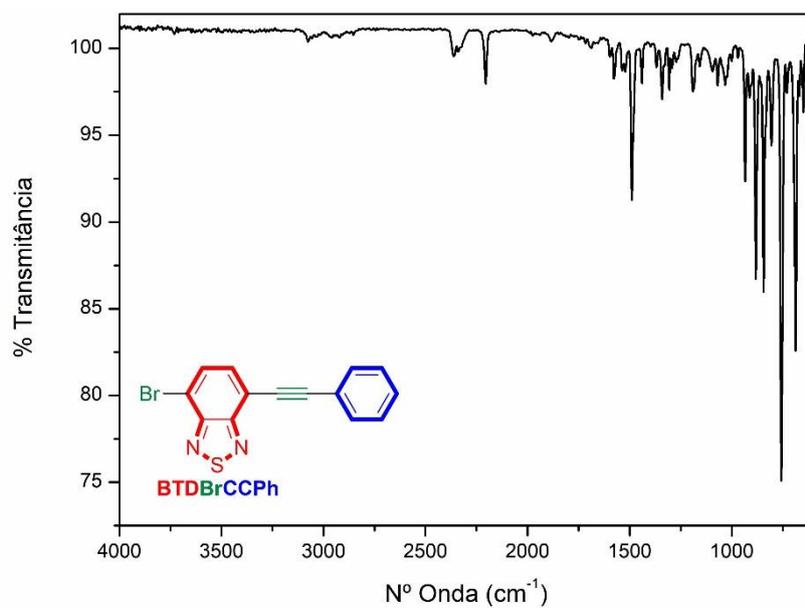


Figura A2. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto BTDBrCCPh.

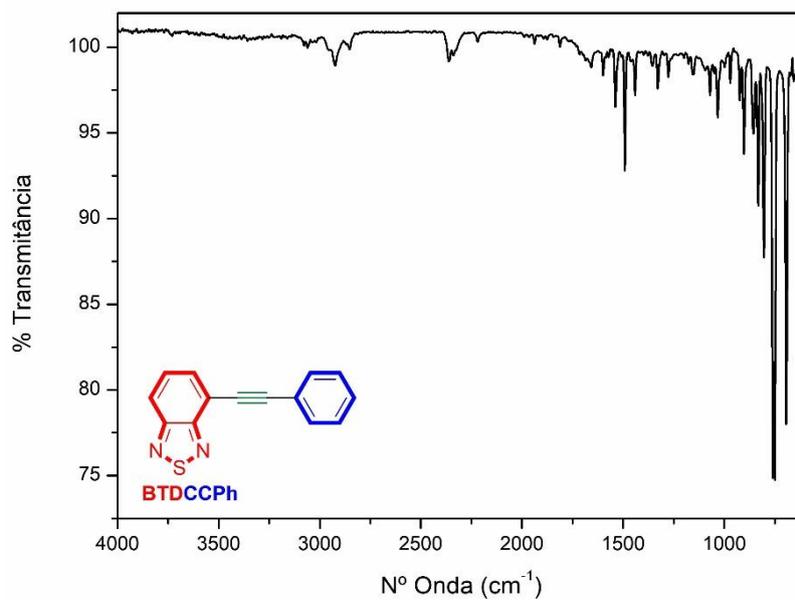


Figura A3. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto BTDCCPH.

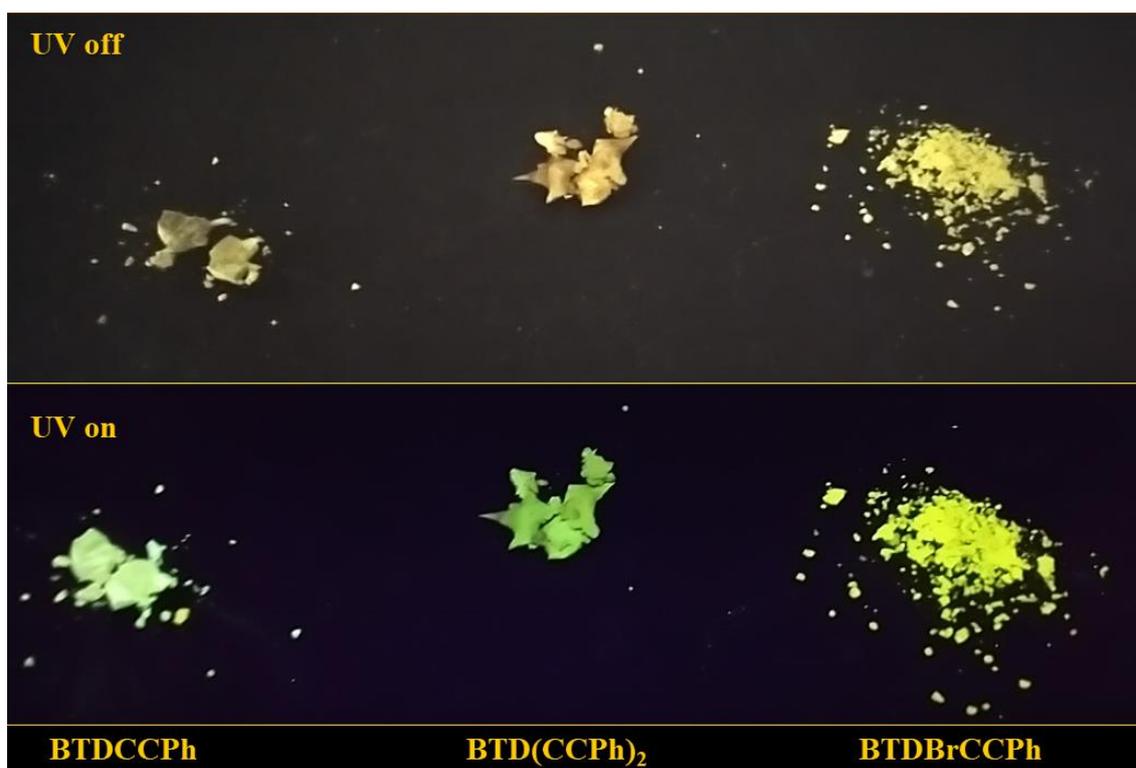


Figura A4. Emissão de estado sólido (irradiação UV a 265 nm).

Tabela A1. Coordenadas Cartersianas para BTDBrCCPh calculadas com o nível de aproximação CAM-B3LYP/6-311+G(d).

Vacuum			
Energy = -3619.36582788 a.u.			
C	-1.98234800	-1.83405600	-0.00006600
C	-0.56058300	-1.76800100	-0.00007700
C	0.12520200	-0.58292300	-0.00004100
C	-0.66165600	0.61753200	-0.00001100
C	-2.10121900	0.55641800	0.00000000
C	-2.74912200	-0.71270300	-0.00002100
N	-0.19563700	1.85780300	0.00006600
S	-1.48159500	2.84675300	-0.00007900
N	-2.67597500	1.74976100	0.00009600
C	1.54160500	-0.51642200	-0.00002800
C	2.74192300	-0.45082100	-0.00001400
C	4.16325700	-0.34217800	0.00000000
C	4.96819000	-1.48533100	0.00000200
C	6.34777000	-1.36705900	0.00001800
C	6.94141000	-0.11167300	0.00003100
C	6.14876600	1.02881800	0.00002900
C	4.76876300	0.91865900	0.00001500
Br	-4.63211100	-0.80194900	0.00003300
H	-2.45703600	-2.80714500	-0.00007700
H	-0.00354800	-2.69675400	-0.00009700
H	4.50124100	-2.46308700	-0.00000800
H	6.96358100	-2.25938300	0.00002000
H	8.02190700	-0.02205600	0.00004300
H	6.60900000	2.01043900	0.00004000
H	4.14378500	1.80363700	0.00001400
MeCN			
Energy = -3619.38510787 a.u.			
C	1.96428900	-1.83306900	0.00002000
C	0.54313100	-1.75056800	0.00001000
C	-0.12695600	-0.55580400	-0.00000300
C	0.67253600	0.63507300	-0.00000900
C	2.10963300	0.55797900	0.00000200
C	2.74099500	-0.71829700	0.00001900
N	0.22249700	1.88277300	0.00001100
S	1.51600800	2.86277300	-0.00010500
N	2.69552600	1.74795100	0.00002800
C	-1.54441500	-0.47423900	0.00000300
C	-2.74566800	-0.40275700	0.00000600
C	-4.17029500	-0.31849300	-0.00000700
C	-4.94893200	-1.48137500	0.00000200
C	-6.33232700	-1.39417200	-0.00001000
C	-6.95508700	-0.15130500	-0.00003200
C	-6.18794700	1.00826100	-0.00004200
C	-4.80422700	0.92946500	-0.00002900
Br	4.62651800	-0.82887100	0.00005400
H	2.42350900	-2.81324300	0.00004100
H	-0.02081800	-2.67484500	0.00002300
H	-4.46247900	-2.44959100	0.00001900
H	-6.92702000	-2.30039200	-0.00000300
H	-8.03711800	-0.08635000	-0.00004200
H	-6.66994900	1.97911400	-0.00005800
H	-4.20492400	1.83217200	-0.00003700
CH ₂ Cl ₂			
Energy = -3619.38367656 a.u.			
C	1.96848000	-1.83359400	0.00002100
C	0.54711900	-1.75470100	0.00000800
C	-0.12642200	-0.56189500	-0.00000500
C	0.67026400	0.63101400	-0.00001000
C	2.10792400	0.55749800	0.00000200
C	2.74288600	-0.71714700	0.00002000
N	0.21685800	1.87729600	0.00000700
S	1.50833100	2.85995800	-0.00010100
N	2.69106700	1.74858900	0.00002700
C	-1.54379800	-0.48356600	-0.00000200
C	-2.74491200	-0.41216500	0.00000000
C	-4.16902600	-0.32299400	-0.00001100
C	-4.95278600	-1.48222700	0.00000000
C	-6.33567200	-1.38905800	-0.00000900
C	-6.95292100	-0.14360200	-0.00003100
C	-6.18070500	1.01241000	-0.00004200
C	-4.79748800	0.92757600	-0.00003200

Br	4.62826200	-0.82305100	0.00005700
H	2.43071500	-2.81243000	0.00004100
H	-0.01495400	-2.68016300	0.00002000
H	-4.47028500	-2.45243700	0.00001700
H	-6.93439300	-2.29267900	0.00000000
H	-8.03469700	-0.07386300	-0.00003800
H	-6.65847100	1.98540000	-0.00005900
H	-4.19352500	1.82712400	-0.00004100

DMSO

Energy = -3619.38523158 a.u.

C	1.96385000	-1.83300700	0.00002000
C	0.54271400	-1.75013000	0.00001000
C	-0.12702000	-0.55516900	-0.00000300
C	0.67276700	0.63549900	-0.00000800
C	2.10981100	0.55803000	0.00000200
C	2.74080200	-0.71841500	0.00001900
N	0.22308000	1.88334400	0.00001200
S	1.51681600	2.86305100	-0.00010500
N	2.69600200	1.74787500	0.00002800
C	-1.54448500	-0.47328000	0.00000400
C	-2.74575100	-0.40181700	0.00000700
C	-4.17042600	-0.31804600	-0.00000700
C	-4.94855300	-1.48128600	0.00000200
C	-6.33199600	-1.39467800	-0.00001000
C	-6.95530200	-0.15207200	-0.00003200
C	-6.18866800	1.00784500	-0.00004200
C	-4.80490100	0.92964900	-0.00002900
Br	4.62632800	-0.82947400	0.00005300
H	2.42276800	-2.81331600	0.00004100
H	-0.02143900	-2.67427900	0.00002300
H	-4.46170300	-2.44930200	0.00001900
H	-6.92628800	-2.30115700	-0.00000300
H	-8.03735800	-0.08759200	-0.00004200
H	-6.67109200	1.97848400	-0.00005900
H	-4.20605400	1.83266500	-0.00003600

EtOAc

Energy = -3619.38284751 a.u.

C	1.97026300	-1.83374500	0.00002100
C	0.54882500	-1.75640600	0.00000800
C	-0.12626300	-0.56448800	-0.00000600
C	0.66924000	0.62931200	-0.00001100
C	2.10719700	0.55731200	0.00000200
C	2.74374700	-0.71662500	0.00002000
N	0.21438800	1.87495600	0.00000600
S	1.50508700	2.85864800	-0.00010100
N	2.68923700	1.74880700	0.00002700
C	-1.54356900	-0.48764300	-0.00000300
C	-2.74461600	-0.41651200	-0.00000100
C	-4.16846300	-0.32510900	-0.00001200
C	-4.95461100	-1.48260600	0.00000000
C	-6.33723500	-1.38666800	-0.00000900
C	-6.95190700	-0.14003100	-0.00003000
C	-6.17733500	1.01430200	-0.00004200
C	-4.79437500	0.92665500	-0.00003300
Br	4.62894600	-0.82054300	0.00005700
H	2.43388800	-2.81196500	0.00004200
H	-0.01252000	-2.68233700	0.00002000
H	-4.47391500	-2.45372100	0.00001700
H	-6.93783400	-2.28907400	0.00000000
H	-8.03356200	-0.06806400	-0.00003700
H	-6.65312900	1.98828300	-0.00005900
H	-4.18818000	1.82468000	-0.00004200

EtOH

Energy = -3619.38488528 a.u.

C	1.96504700	-1.83317500	0.00002100
C	0.54385000	-1.75132200	0.00000900
C	-0.12684800	-0.55690300	-0.00000400
C	0.67213500	0.63433600	-0.00000900
C	2.10932400	0.55789100	0.00000200
C	2.74132900	-0.71809400	0.00001900
N	0.22148800	1.88178600	0.00001000
S	1.51461400	2.86228600	-0.00010400
N	2.69470800	1.74807900	0.00002800
C	-1.54429800	-0.47590300	0.00000200
C	-2.74552700	-0.40439700	0.00000500

C	-4.17006900	-0.31927300	-0.00000800
C	-4.94959600	-1.48152700	0.00000100
C	-6.33290700	-1.39328700	-0.00001000
C	-6.95471100	-0.14996600	-0.00003200
C	-6.18668800	1.00898700	-0.00004200
C	-4.80305100	0.92914200	-0.00003000
Br	4.62684400	-0.82782700	0.00005400
H	2.42479400	-2.81311500	0.00004100
H	-0.01974800	-2.67582000	0.00002200
H	-4.46383500	-2.45009400	0.00001800
H	-6.92829900	-2.29905700	-0.00000200
H	-8.03669900	-0.08418000	-0.00004100
H	-6.66795500	1.98021200	-0.00005800
H	-4.20294900	1.83130900	-0.00003800

Toluene

Energy = -3619.37980952 a.u.

C	1.97458100	-1.83367800	0.00002200
C	0.55299400	-1.76018500	0.00000900
C	-0.12615400	-0.57065500	-0.00000500
C	0.66652400	0.62541800	-0.00001000
C	2.10547100	0.55705700	0.00000200
C	2.74613200	-0.71514400	0.00002100
N	0.20803800	1.86931800	0.00000700
S	1.49727800	2.85507600	-0.00010500
N	2.68509600	1.74923300	0.00002700
C	-1.54312100	-0.49785000	-0.00000200
C	-2.74396100	-0.42833500	0.00000000
C	-4.16695400	-0.33100800	-0.00001100
C	-4.95965600	-1.48360400	0.00000000
C	-6.34146100	-1.38013600	-0.00001000
C	-6.94907100	-0.13038400	-0.00003000
C	-6.16808700	1.01925700	-0.00004100
C	-4.78592200	0.92390700	-0.00003200
Br	4.63033700	-0.81447500	0.00005700
H	2.44202900	-2.81021400	0.00004300
H	-0.00693400	-2.68708700	0.00002200
H	-4.48371700	-2.45707800	0.00001600
H	-6.94720200	-2.27921100	-0.00000100
H	-8.03038300	-0.05233400	-0.00003800
H	-6.63850400	1.99593900	-0.00005800
H	-4.17335300	1.81756000	-0.00004000

Hexane

Energy = -3619.37878191 a.u.

C	1.97544400	-1.83350300	0.00004100
C	0.55385800	-1.76075300	0.00003900
C	-0.12622000	-0.57174500	0.00001900
C	0.66597400	0.62485400	-0.00000100
C	2.10528400	0.55714600	0.00000100
C	2.74684900	-0.71478700	0.00002000
N	0.20668800	1.86833500	-0.00004700
S	1.49592500	2.85419400	0.00003300
N	2.68460200	1.74934400	-0.00004400
C	-1.54310400	-0.49981900	0.00000400
C	-2.74397200	-0.43093400	-0.00000600
C	-4.16680400	-0.33244800	-0.00001400
C	-4.96102700	-1.48395400	0.00000100
C	-6.34271200	-1.37876100	-0.00000700
C	-6.94878700	-0.12824900	-0.00003000
C	-6.16634200	1.02042900	-0.00004500
C	-4.78430900	0.92329900	-0.00003700
Br	4.63071600	-0.81336300	0.00000600
H	2.44372900	-2.80969500	0.00004900
H	-0.00588300	-2.68781500	0.00004700
H	-4.48610800	-2.45795500	0.00001900
H	-6.94963100	-2.27707500	0.00000400
H	-8.03002700	-0.04886300	-0.00003600
H	-6.63559400	1.99770300	-0.00006300
H	-4.17017300	1.81589200	-0.00004800

Water

Energy = -3619.38539353 a.u.

C	1.96325700	-1.83292200	0.00002000
C	0.54215100	-1.74953800	0.00001000
C	-0.12710900	-0.55431000	-0.00000200
C	0.67307700	0.63607600	-0.00000800
C	2.11005200	0.55809700	0.00000200

C	2.74054300	-0.71857400	0.00001900
N	0.22386700	1.88411500	0.00001300
S	1.51791100	2.86342300	-0.00010500
N	2.69664900	1.74776900	0.00002800
C	-1.54457900	-0.47198800	0.00000500
C	-2.74586400	-0.40055500	0.00000800
C	-4.17060200	-0.31744700	-0.00000600
C	-4.94804500	-1.48116600	0.00000200
C	-6.33155100	-1.39535600	-0.00001100
C	-6.95559100	-0.15310000	-0.00003300
C	-6.18963500	1.00728600	-0.00004200
C	-4.80580600	0.92989600	-0.00002900
Br	4.62606800	-0.83028700	0.00005200
H	2.42176700	-2.81341100	0.00004000
H	-0.02228100	-2.67351200	0.00002400
H	-4.46066300	-2.44891100	0.00002000
H	-6.92530600	-2.30218000	-0.00000300
H	-8.03767900	-0.08925800	-0.00004300
H	-6.67262500	1.97763900	-0.00005900
H	-4.20757000	1.83332300	-0.00003600

Tabela A2. Coordenadas Cartersianas para BTDCPh calculadas com o nível de aproximação CAM-B3LYP/6-311+G(d).

Vacuum			
Energy = -1045.72384870 a.u.			
C	2.95106100	2.50053800	0.00030400
C	1.55045500	2.23384700	0.00030800
C	1.04480900	0.96101000	0.00013700
C	1.99534300	-0.11581800	-0.00002500
C	3.40682900	0.16276100	-0.00002700
C	3.87574700	1.50496800	0.00013400
N	1.71534800	-1.41123000	-0.00019800
S	3.13562400	-2.19853400	-0.00024700
N	4.15489600	-0.93489200	-0.00022600
C	-0.34878100	0.69259300	0.00011100
C	-1.52801000	0.45945200	0.00008200
C	-2.92004600	0.15147300	0.00004200
C	-3.87872200	1.16918000	-0.00060600
C	-5.22793600	0.85741900	-0.00065100
C	-5.63865500	-0.46906100	-0.00004900
C	-4.69269200	-1.48596200	0.00059900
C	-3.34198300	-1.18200200	0.00064600
H	3.27453500	3.53515300	0.00043000
H	0.86015000	3.06867400	0.00043900
H	4.94058900	1.69909300	0.00011000
H	-3.55436500	2.20307600	-0.00107800
H	-5.96339500	1.65406800	-0.00115900
H	-6.69571400	-0.71030300	-0.00008500
H	-5.00959200	-2.52282800	0.00107100
H	-2.59840300	-1.96992400	0.00113600
MeCN			
Energy = -1045.74265005 a.u.			
C	2.91956300	2.51509000	-0.00010100
C	1.52328700	2.22480400	-0.00009200
C	1.03990600	0.94233700	-0.00001900
C	2.00755800	-0.11811200	0.00005500
C	3.41338400	0.18418400	0.00004700
C	3.86120600	1.53383900	-0.00003400
N	1.75135000	-1.42004300	0.00012000
S	3.18289600	-2.18943800	0.00023200
N	4.17731900	-0.90488100	0.00010800
C	-0.35152300	0.65221900	-0.00001900
C	-1.53034000	0.40882600	-0.00002300
C	-2.92885100	0.12182700	-0.00005600
C	-3.86633700	1.16110700	-0.00034100
C	-5.22327000	0.87672400	-0.00037600
C	-5.66209300	-0.44251600	-0.00013000
C	-4.73674000	-1.48041200	0.00015700
C	-3.37840500	-1.20416300	0.00019300
H	3.22478100	3.55463500	-0.00016700
H	0.82224700	3.05047100	-0.00015100
H	4.92164100	1.75189500	-0.00004700
H	-3.52355400	2.18910300	-0.00053300
H	-5.94136800	1.68867600	-0.00059700

H	-6.72370500	-0.66155000	-0.00015800
H	-5.07488100	-2.51027500	0.00035300
H	-2.65625900	-2.01201200	0.00041500

CH₂Cl₂

Energy = -1045.74131253 a.u.

C	2.92105000	2.51408300	-0.00012100
C	1.52455400	2.22495300	-0.00011300
C	1.03981700	0.94306000	-0.00002800
C	2.00682400	-0.11817600	0.00005900
C	3.41315400	0.18301500	0.00005200
C	3.86200100	1.53228800	-0.00004300
N	1.74944300	-1.41964800	0.00013700
S	3.18054100	-2.18955600	0.00026300
N	4.17659400	-0.90616000	0.00012600
C	-0.35164200	0.65437700	-0.00002800
C	-1.53047000	0.41203000	-0.00003200
C	-2.92843600	0.12367700	-0.00006500
C	-3.86738300	1.16140100	-0.00032900
C	-5.22380300	0.87532700	-0.00036100
C	-5.66076100	-0.44435900	-0.00013200
C	-4.73396300	-1.48075900	0.00013200
C	-3.37612400	-1.20272200	0.00016500
H	3.22728900	3.55341300	-0.00019700
H	0.82386000	3.05096100	-0.00018200
H	4.92272900	1.74883300	-0.00005500
H	-3.52562800	2.18974200	-0.00050700
H	-5.94306600	1.68632200	-0.00056500
H	-6.72211700	-0.66487000	-0.00015800
H	-5.07071000	-2.51112000	0.00031300
H	-2.65218200	-2.00888800	0.00036900

DMSO

Energy = -1045.74276567 a.u.

C	2.91884600	2.51513200	-0.00013000
C	1.52262600	2.22474300	-0.00016300
C	1.03964300	0.94220800	-0.00006900
C	2.00746700	-0.11791700	0.00006300
C	3.41309600	0.18447700	0.00009500
C	3.86065200	1.53399100	-0.00000300
N	1.75162800	-1.41995400	0.00018500
S	3.18320100	-2.18937200	0.00024700
N	4.17713800	-0.90457700	0.00023800
C	-0.35172000	0.65205200	-0.00010100
C	-1.53032200	0.40858400	-0.00012800
C	-2.92862900	0.12142000	-0.00010700
C	-3.86595900	1.16069900	-0.00031600
C	-5.22283700	0.87654100	-0.00030300
C	-5.66173300	-0.44247500	-0.00008300
C	-4.73646200	-1.48019800	0.00012700
C	-3.37816100	-1.20413800	0.00011500
H	3.22401000	3.55473500	-0.00020400
H	0.82142400	3.05026200	-0.00026100
H	4.92097100	1.75241400	0.00002700
H	-3.52303800	2.18860600	-0.00048800
H	-5.94087300	1.68857300	-0.00046700
H	-6.72336800	-0.66146100	-0.00007400
H	-5.07456500	-2.51007200	0.00029900
H	-2.65618300	-2.01211000	0.00027700

EtOAc

Energy = -1045.74053225 a.u.

C	2.92172800	2.51338900	-0.00015500
C	1.52510900	2.22515300	-0.00019300
C	1.03963400	0.94364100	-0.00008500
C	2.00616700	-0.11801100	0.00006800
C	3.41269800	0.18232900	0.00010600
C	3.86219400	1.53117200	-0.00000800
N	1.74815100	-1.41924100	0.00020800
S	3.17885500	-2.18976000	0.00028500
N	4.17573400	-0.90700900	0.00027100
C	-0.35182600	0.65606700	-0.00012100
C	-1.53046400	0.41417100	-0.00015000
C	-2.92789600	0.12468700	-0.00012300
C	-3.86774800	1.16132900	-0.00029900
C	-5.22375700	0.87421400	-0.00027900
C	-5.65945600	-0.44561500	-0.00008200
C	-4.73171400	-1.48083000	0.00009500

C	-3.37425700	-1.20166900	0.00007500
H	3.22875800	3.55256700	-0.00024200
H	0.82465300	3.05138400	-0.00030700
H	4.92303600	1.74690000	0.00002700
H	-3.52665700	2.18985500	-0.00045400
H	-5.94378400	1.68459100	-0.00041700
H	-6.72063700	-0.66714200	-0.00006600
H	-5.06744200	-2.51154900	0.00024800
H	-2.64928100	-2.00685100	0.00021000

EtOH

Energy = -1045.74244299 a.u.

C	2.91963200	2.51498100	-0.00010400
C	1.52334600	2.22476200	-0.00009500
C	1.03985300	0.94234600	-0.00002000
C	2.00749400	-0.11814400	0.00005600
C	3.41337500	0.18409300	0.00004700
C	3.86124800	1.53372400	-0.00003600
N	1.75120900	-1.42002200	0.00012200
S	3.18274400	-2.18938300	0.00023600
N	4.17732100	-0.90492800	0.00011100
C	-0.35156300	0.65235900	-0.00002000
C	-1.53038000	0.40912500	-0.00002400
C	-2.92882400	0.12199800	-0.00005800
C	-3.86645800	1.16110800	-0.00033900
C	-5.22333300	0.87656900	-0.00037400
C	-5.66196700	-0.44270600	-0.00013000
C	-4.73646800	-1.48044000	0.00015400
C	-3.37818800	-1.20402000	0.00018900
H	3.22492600	3.55451700	-0.00017100
H	0.82229500	3.05042800	-0.00015500
H	4.92171200	1.75162900	-0.00004800
H	-3.52375400	2.18913100	-0.00052900
H	-5.94154900	1.68843000	-0.00059300
H	-6.72355600	-0.66188700	-0.00015800
H	-5.07447300	-2.51035400	0.00034800
H	-2.65582100	-2.01165800	0.00040900

Toluene

Energy = -1045.73763911 a.u.

C	2.93001800	2.50974500	-0.00017900
C	1.53224200	2.22748300	-0.00022100
C	1.04075700	0.94840800	-0.00009800
C	2.00302800	-0.11752300	0.00007400
C	3.41135900	0.17692000	0.00011600
C	3.86641100	1.52390500	-0.00001400
N	1.73909100	-1.41713100	0.00023200
S	3.16707200	-2.19227600	0.00032600
N	4.17055700	-0.91450100	0.00030100
C	-0.35126300	0.66670900	-0.00013600
C	-1.53001300	0.42710100	-0.00016600
C	-2.92582000	0.13229800	-0.00013700
C	-3.87119600	1.16343300	-0.00028200
C	-5.22543000	0.86937500	-0.00025800
C	-5.65407700	-0.45244400	-0.00008900
C	-4.72089800	-1.48237500	0.00005500
C	-3.36521600	-1.19609200	0.00003200
H	3.24170600	3.54772300	-0.00027700
H	0.83448700	3.05607200	-0.00034900
H	4.92842200	1.73371000	0.00002400
H	-3.53480100	2.19351600	-0.00041400
H	-5.94986000	1.67593800	-0.00037100
H	-6.71414400	-0.67964100	-0.00007000
H	-5.05119700	-2.51493800	0.00018700
H	-2.63470500	-1.99619400	0.00014200

Hexane

Energy = -1045.73665068 a.u.

C	2.93362500	2.50825600	-0.00018100
C	1.53535000	2.22858800	-0.00022300
C	1.04134300	0.95053700	-0.00009900
C	2.00170300	-0.11724300	0.00007500
C	3.41074700	0.17461600	0.00011700
C	3.86821500	1.52079100	-0.00001400
N	1.73520000	-1.41618600	0.00023400
S	3.16196800	-2.19347000	0.00033100
N	4.16818500	-0.91781100	0.00030400
C	-0.35093800	0.67126700	-0.00013600

C	-1.52971300	0.43236400	-0.00016500
C	-2.92488500	0.13539400	-0.00013800
C	-3.87246300	1.16435000	-0.00028000
C	-5.22599400	0.86748100	-0.00025700
C	-5.65182200	-0.45514200	-0.00009300
C	-4.71647800	-1.48297800	0.00004800
C	-3.36150600	-1.19382500	0.00002600
H	3.24729000	3.54570500	-0.00028000
H	0.83881900	3.05822900	-0.00035200
H	4.93070400	1.72815000	0.00002400
H	-3.53800500	2.19506500	-0.00040900
H	-5.95217800	1.67250100	-0.00036800
H	-6.71142400	-0.68461100	-0.00007400
H	-5.04458900	-2.51626900	0.00017700
H	-2.62889700	-1.99200100	0.00013500

Water

Energy = -1045.74291594 a.u.

C	2.91881500	2.51520000	-0.00012900
C	1.52259900	2.22478000	-0.00016100
C	1.03968300	0.94221500	-0.00006800
C	2.00750300	-0.11789000	0.00006300
C	3.41309500	0.18452900	0.00009400
C	3.86062900	1.53405400	-0.00003300
N	1.75170300	-1.41996200	0.00018400
S	3.18327800	-2.18941800	0.00024400
N	4.17711600	-0.90456700	0.00023600
C	-0.35168900	0.65197400	-0.00009900
C	-1.53029500	0.40843000	-0.00012700
C	-2.92864300	0.12133300	-0.00010600
C	-3.86589400	1.16070500	-0.00031600
C	-5.22280500	0.87662300	-0.00030500
C	-5.66180000	-0.44237800	-0.00008300
C	-4.73660400	-1.48018900	0.00012800
C	-3.37827300	-1.20421200	0.00011700
H	3.22393400	3.55480900	-0.00020200
H	0.82140700	3.05030100	-0.00025800
H	4.92093100	1.75257200	0.00002700
H	-3.52294300	2.18860200	-0.00049000
H	-5.94078100	1.68869900	-0.00047000
H	-6.72344500	-0.66128800	-0.00007500
H	-5.07477300	-2.51003600	0.00030200
H	-2.65642700	-2.01231100	0.00028100

Tabela A3. Coordenadas Cartersianas para $\text{BTD}(\text{CCPh})_2$ calculadas com o nível de aproximação CAM-B3LYP/6-311+G(d).

Vacuum

Energy = -1352.82120494 a.u.

C	-0.70880100	-1.70182500	-0.00001500
C	0.70897200	-1.70175000	-0.00000100
C	1.45094100	-0.54811700	0.00003900
C	0.71914300	0.68638900	0.00003800
C	-0.71922400	0.68631200	0.00002800
C	-1.45089100	-0.54827100	0.00001600
N	1.24163800	1.90436000	-0.00000500
S	-0.00016100	2.94957500	0.00006100
N	-1.24184700	1.90422800	0.00012400
C	2.86804500	-0.54875200	0.00001300
C	4.07048700	-0.53996700	-0.00000400
C	5.49506600	-0.49907100	-0.00001800
C	6.24520300	-1.67910100	0.00007500
C	7.62885200	-1.62668100	0.00006100
C	8.28177000	-0.40107300	-0.00004600
C	7.54406500	0.77572500	-0.00013800
C	6.16037900	0.73141400	-0.00012400
C	-2.86799700	-0.54906100	0.00003600
C	-4.07043900	-0.54032000	0.00003900
C	-5.49501600	-0.49924100	-0.00001100
C	-6.16017600	0.73132700	-0.00005300
C	-7.54385600	0.77581100	-0.00008500
C	-8.28170700	-0.40089500	-0.00007000
C	-7.62894000	-1.62658500	-0.00001600
C	-6.24529800	-1.67917800	0.00001300
H	-1.22554200	-2.65381300	-0.00004100

H	1.22581400	-2.65368300	-0.00003200
H	5.73216800	-2.63350300	0.00015900
H	8.20135300	-2.54743200	0.00013300
H	9.36532700	-0.36296300	-0.00005800
H	8.05042300	1.73441300	-0.00022100
H	5.57824000	1.64513700	-0.00019300
H	-5.57792400	1.64497800	-0.00005800
H	-8.05009400	1.73456200	-0.00011900
H	-9.36525900	-0.36265300	-0.00009400
H	-8.20155700	-2.54726400	0.00000000
H	-5.73238200	-2.63364400	0.00005700

MeCN

Energy = -1352.84543508 a.u.

C	0.70889200	-1.64954600	0.00007400
C	-0.70913900	-1.64944000	0.00001200
C	-1.44927900	-0.49369700	-0.00000800
C	-0.71828500	0.74009900	0.00003800
C	0.71839400	0.73999200	0.00010100
C	1.44920400	-0.49391300	0.00011700
N	-1.23844200	1.96095800	0.00003300
S	0.00022300	3.01100600	0.00008500
N	1.23873100	1.96077400	0.00014200
C	-2.86807700	-0.49582400	-0.00007100
C	-4.07184000	-0.49866400	-0.00012000
C	-5.49864800	-0.50347200	-0.00009700
C	-6.20293500	-1.71311200	-0.00010600
C	-7.58902700	-1.71308400	-0.00009100
C	-8.28888800	-0.51187100	-0.00006500
C	-7.59614500	0.69355700	-0.00005500
C	-6.21016400	0.70197700	-0.00007100
C	2.86800200	-0.49625300	0.00019200
C	4.07176400	-0.49921900	0.00024100
C	5.49857400	-0.50374000	0.00007800
C	6.20985100	0.70185000	0.00002900
C	7.59583400	0.69370400	-0.00011100
C	8.28881500	-0.51158700	-0.00020500
C	7.58919100	-1.71293800	-0.00015500
C	6.20309900	-1.71324100	-0.00001600
H	1.22175100	-2.60332300	0.00009000
H	-1.22213900	-2.60314200	-0.00001900
H	-5.65657000	-2.64885400	-0.00012700
H	-8.12539700	-2.65501800	-0.00009900
H	-9.37285900	-0.51507500	-0.00005200
H	-8.13816800	1.63224700	-0.00003600
H	-5.66920300	1.64081000	-0.00006500
H	5.66870500	1.64057500	0.00010400
H	8.13767200	1.63250100	-0.00014700
H	9.37278700	-0.51457800	-0.00031400
H	8.12574600	-2.65476600	-0.00022600
H	5.65691900	-2.64909000	0.00002500

CH₂Cl₂

Energy = -1352.84359380 a.u.

C	0.70911000	-1.65301300	0.00005500
C	-0.70887600	-1.65311400	0.00000600
C	-1.44961000	-0.49779100	-0.00000800
C	-0.71863300	0.73621500	0.00003100
C	0.71853000	0.73631700	0.00008200
C	1.44968000	-0.49758500	0.00009200
N	-1.23918900	1.95667400	0.00003100
S	-0.00021300	3.00635600	0.00007100
N	1.23891300	1.95684900	0.00011800
C	-2.86819800	-0.50068400	-0.00005800
C	-4.07181000	-0.50338900	-0.00009600
C	-5.49842000	-0.50407200	-0.00007800
C	-6.20712700	-1.71092200	-0.00009800
C	-7.59309400	-1.70605200	-0.00008600
C	-8.28862200	-0.50249900	-0.00005200
C	-7.59151200	0.70025300	-0.00003200
C	-6.20564100	0.70373300	-0.00004500
C	2.86826900	-0.50027500	0.00015200
C	4.07188200	-0.50285900	0.00019100
C	5.49849100	-0.50381600	0.00006200
C	6.20593900	0.70385500	0.00002600
C	7.59181000	0.70011300	-0.00008500
C	8.28869300	-0.50277000	-0.00016300

C	7.59293900	-1.70619200	-0.00012600
C	6.20697100	-1.71080000	-0.00001600
H	1.22269900	-2.60645500	0.00006500
H	-1.22233000	-2.60662800	-0.00002100
H	-5.66381000	-2.64845000	-0.00012500
H	-8.13288600	-2.64607800	-0.00010200
H	-9.37264100	-0.50180800	-0.00004200
H	-8.13017300	1.64092000	-0.00000700
H	-5.66050000	1.64007900	-0.00003000
H	5.66097500	1.64030400	0.00008900
H	8.13064800	1.64067900	-0.00011100
H	9.37271200	-0.50228300	-0.00025000
H	8.13255300	-2.64632000	-0.00018500
H	5.66347600	-2.64822500	0.00001400

DMSO

Energy = -1352.84559482 a.u.

C	0.70889600	-1.64939400	0.00008000
C	-0.70914000	-1.64928900	0.00001500
C	-1.44924200	-0.49352000	-0.00000800
C	-0.71826400	0.74026800	0.00004000
C	0.71837100	0.74016200	0.00010700
C	1.44916800	-0.49373300	0.00012500
N	-1.23840300	1.96115400	0.00003400
S	0.00022100	3.01125100	0.00008800
N	1.23868900	1.96097200	0.00014900
C	-2.86805900	-0.49557500	-0.00007500
C	-4.07183400	-0.49837200	-0.00012600
C	-5.49866000	-0.50340300	-0.00010200
C	-6.20268300	-1.71321400	-0.00011000
C	-7.58878500	-1.71346800	-0.00009400
C	-8.28890200	-0.51238800	-0.00006900
C	-7.59641800	0.69320300	-0.00006100
C	-6.21042800	0.70191300	-0.00007700
C	2.86798400	-0.49600000	0.00020400
C	4.07175900	-0.49892100	0.00025600
C	5.49858600	-0.50366800	0.00008300
C	6.21011900	0.70178700	0.00003000
C	7.59611100	0.69334900	-0.00011900
C	8.28883000	-0.51210700	-0.00021700
C	7.58894800	-1.71332300	-0.00016400
C	6.20284500	-1.71334200	-0.00001600
H	1.22170100	-2.60319500	0.00009700
H	-1.22208600	-2.60301500	-0.00001700
H	-5.65614700	-2.64885400	-0.00013000
H	-8.12495100	-2.65551300	-0.00010100
H	-9.37286800	-0.51582300	-0.00005600
H	-8.13864000	1.63177400	-0.00004300
H	-5.66974000	1.64090900	-0.00007200
H	5.66924700	1.64067800	0.00010900
H	8.13815000	1.63202600	-0.00015800
H	9.37279700	-0.51533000	-0.00033400
H	8.12529700	-2.65526400	-0.00023800
H	5.65649200	-2.64908900	0.00002800

EtOAc

Energy = -1352.84253330 a.u.

C	0.70906000	-1.65630900	0.00012000
C	-0.70891300	-1.65637300	0.00003300
C	-1.44984600	-0.50120900	-0.00000500
C	-0.71874600	0.73283600	0.00004900
C	0.71868100	0.73290000	0.00013900
C	1.44989000	-0.50108000	0.00017100
N	-1.23940800	1.95311200	0.00003100
S	-0.00013400	3.00245800	0.00010000
N	1.23923400	1.95322200	0.00018600
C	-2.86830800	-0.50418900	-0.00009500
C	-4.07183400	-0.50620800	-0.00016300
C	-5.49832000	-0.50389700	-0.00013300
C	-6.21014300	-1.70879200	-0.00014600
C	-7.59602800	-1.70046800	-0.00012600
C	-8.28848000	-0.49524300	-0.00009000
C	-7.58829100	0.70562900	-0.00007700
C	-6.20249400	0.70560100	-0.00009800
C	2.86835200	-0.50393200	0.00027700
C	4.07187800	-0.50587600	0.00034600
C	5.49836500	-0.50373600	0.00011400

C	6.20268100	0.70567800	0.00003300
C	7.58847800	0.70554200	-0.00016700
C	8.28852500	-0.49541300	-0.00028900
C	7.59593100	-1.70055600	-0.00020800
C	6.21004500	-1.70871600	-0.00000900
H	1.22294000	-2.60962700	0.00014900
H	-1.22270800	-2.60973600	-0.00000400
H	-5.66902800	-2.64760000	-0.00017500
H	-8.13823400	-2.63913300	-0.00013700
H	-9.37251700	-0.49179000	-0.00007400
H	-8.12457000	1.64768300	-0.00005100
H	-5.65453100	1.64027200	-0.00008900
H	5.65482900	1.64041400	0.00013100
H	8.12486900	1.64753200	-0.00022700
H	9.37256300	-0.49208900	-0.00044600
H	8.13802600	-2.63928500	-0.00030000
H	5.66881900	-2.64746000	0.00005800

EtOH

Energy = -1352.84514789 a.u.

C	0.70888800	-1.64988900	0.00005800
C	-0.70913500	-1.64978300	0.00000600
C	-1.44934300	-0.49408800	-0.00000900
C	-0.71832400	0.73972500	0.00003300
C	0.71843300	0.73961700	0.00008600
C	1.44926800	-0.49430400	0.00009700
N	-1.23851300	1.96053400	0.00003300
S	0.00022400	3.01049500	0.00007600
N	1.23880400	1.96035000	0.00012400
C	-2.86811000	-0.49633500	-0.00006200
C	-4.07184900	-0.49922400	-0.00010200
C	-5.49862700	-0.50358000	-0.00008200
C	-6.20343400	-1.71288600	-0.00009600
C	-7.58950700	-1.71229900	-0.00008200
C	-8.28886200	-0.51081700	-0.00005500
C	-7.59560600	0.69429100	-0.00004200
C	-6.20964200	0.70213600	-0.00005500
C	2.86803400	-0.49676600	0.00016000
C	4.07177300	-0.49978100	0.00020100
C	5.49855200	-0.50384900	0.00006500
C	6.20932800	0.70200900	0.00002700
C	7.59529400	0.69443900	-0.00009000
C	8.28878900	-0.51053300	-0.00017200
C	7.58967200	-1.71215200	-0.00013400
C	6.20359800	-1.71301500	-0.00001700
H	1.22184200	-2.60362400	0.00006900
H	-1.22223100	-2.60344100	-0.00002200
H	-5.65741200	-2.64883000	-0.00011800
H	-8.12627900	-2.65401100	-0.00009400
H	-9.37284100	-0.51356700	-0.00004400
H	-8.13723600	1.63321400	-0.00002100
H	-5.66815600	1.64065400	-0.00004500
H	5.66765600	1.64041900	0.00009300
H	8.13673900	1.63346900	-0.00011700
H	9.37276800	-0.51306800	-0.00026400
H	8.12662900	-2.65375800	-0.00019500
H	5.65776200	-2.64906700	0.00001400

Toluene

Energy = -1352.83868430 a.u.

C	0.70900000	-1.67143200	0.00010100
C	-0.70895000	-1.67145400	0.00002400
C	-1.45059500	-0.51689800	-0.00000500
C	-0.71916500	0.71733300	0.00005000
C	0.71914200	0.71735600	0.00012900
C	1.45060900	-0.51685400	0.00015200
N	-1.24034200	1.93687100	0.00004000
S	-0.00004700	2.98512500	0.00010500
N	1.24028200	1.93690900	0.00017700
C	-2.86856200	-0.51964300	-0.00008400
C	-4.07177500	-0.51778700	-0.00014500
C	-5.49772300	-0.50240900	-0.00012100
C	-6.22271500	-1.69899800	-0.00013600
C	-7.60818900	-1.67590200	-0.00012000
C	-8.28750600	-0.46358900	-0.00008800
C	-7.57431500	0.72928600	-0.00007300
C	-6.18889300	0.71430100	-0.00009000

C	2.86857700	-0.51955400	0.00024600
C	4.07179000	-0.51767100	0.00030700
C	5.49773800	-0.50235300	0.00009900
C	6.18895900	0.71432800	0.00003200
C	7.57438100	0.72925600	-0.00014800
C	8.28752300	-0.46364800	-0.00026400
C	7.60815600	-1.67593300	-0.00019600
C	6.22268200	-1.69897200	-0.00001800
H	1.22392000	-2.62430700	0.00012200
H	-1.22384000	-2.62434500	-0.00001300
H	-5.69108900	-2.64323000	-0.00016200
H	-8.16060800	-2.60870300	-0.00013300
H	-9.37152700	-0.44839400	-0.00007500
H	-8.10046100	1.67713600	-0.00004900
H	-5.62936600	1.64205600	-0.00007900
H	5.62946900	1.64210600	0.00012600
H	8.10056600	1.67708500	-0.00019700
H	9.37154500	-0.44849800	-0.000040500
H	8.16053700	-2.60875700	-0.00028400
H	5.69101700	-2.64318300	0.00003800

Hexane

Energy = -1352.83739461 a.u.

C	0.70883400	-1.67661600	-0.00003400
C	-0.70911400	-1.67649300	-0.00003000
C	-1.45085600	-0.52206500	-0.00000700
C	-0.71922100	0.71215900	0.00001200
C	0.71935200	0.71203400	0.00000700
C	1.45077500	-0.52231500	-0.00001600
N	-1.24047300	1.93148500	0.00003200
S	0.00026100	2.97927700	0.00005200
N	1.24081400	1.93127100	0.00002500
C	-2.86864900	-0.52449900	-0.00000300
C	-4.07175000	-0.52119600	-0.00000100
C	-5.49748700	-0.50165800	-0.00000400
C	-6.22665500	-1.69555500	-0.00003600
C	-7.61196200	-1.66775000	-0.00003900
C	-8.28707300	-0.45322300	-0.00000900
C	-7.56976600	0.73707700	0.00002400
C	-6.18451000	0.71731900	0.00002600
C	2.86856700	-0.52499700	-0.00002300
C	4.07166800	-0.52184100	-0.00002700
C	5.49740100	-0.50197000	-0.00001500
C	6.18414500	0.71716500	0.00001600
C	7.56939600	0.73724300	0.00002700
C	8.28697600	-0.45289200	0.00000700
C	7.61214300	-1.66757500	-0.00002300
C	6.22684300	-1.69569900	-0.00003400
H	1.22398900	-2.62940200	-0.00005300
H	-1.22443400	-2.62919100	-0.00004500
H	-5.69805500	-2.64148700	-0.00006000
H	-8.16762000	-2.59866300	-0.00006400
H	-9.37106300	-0.43428600	-0.00001100
H	-8.09268600	1.68674600	0.00004800
H	-5.62132000	1.64285700	0.00005200
H	5.62074200	1.64257400	0.00003100
H	8.09209800	1.68703100	0.00005000
H	9.37096100	-0.43370700	0.00001600
H	8.16801500	-2.59836000	-0.00003800
H	5.69846000	-2.64175200	-0.00005700

Water

Energy = -1352.84580407 a.u.

C	0.70890100	-1.64923800	0.00008500
C	-0.70914200	-1.64913500	0.00001700
C	-1.44919500	-0.49333000	-0.00000800
C	-0.71823600	0.74044600	0.00004200
C	0.71834200	0.74034100	0.00011200
C	1.44912100	-0.49354100	0.00013100
N	-1.23835200	1.96136700	0.00003500
S	0.00021800	3.01152900	0.00009200
N	1.23863500	1.96118700	0.00015600
C	-2.86803400	-0.49528400	-0.00007800
C	-4.07182600	-0.49800800	-0.00013200
C	-5.49867500	-0.50330100	-0.00010700
C	-6.20237900	-1.71332100	-0.00011300
C	-7.58849500	-1.71391200	-0.00009600

C	-8.28891900	-0.51299200	-0.00007200
C	-7.59675000	0.69279700	-0.00006600
C	-6.21074700	0.70185600	-0.00008300
C	2.86796000	-0.49570300	0.00021400
C	4.07175300	-0.49855000	0.00026900
C	5.49860200	-0.50356300	0.00008700
C	6.21044200	0.70173200	0.00003000
C	7.59644600	0.69294000	-0.00012600
C	8.28884800	-0.51271500	-0.00022800
C	7.58865500	-1.71377000	-0.00017000
C	6.20253900	-1.71344700	-0.00001500
H	1.22163600	-2.60307100	0.00010400
H	-1.22201500	-2.60289400	-0.00001700
H	-5.65563900	-2.64884100	-0.00013300
H	-8.12441500	-2.65609100	-0.00010200
H	-9.37288000	-0.51670400	-0.00005800
H	-8.13921100	1.63122400	-0.00004800
H	-5.67039600	1.64105600	-0.00007900
H	5.66991000	1.64082700	0.00011200
H	8.13872700	1.63147300	-0.00016800
H	9.37280900	-0.51621800	-0.00035000
H	8.12475700	-2.65584600	-0.00024700
H	5.65598000	-2.64907200	0.00003200
