



**UnB**

INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**TESE DE DOUTORADO**

---

**BENZOTIADIAZOLA EM SISTEMAS  
FLUORESCENTES MOLECULARES E  
NANOMÉTRICOS APLICADOS EM  
BIOIMAGEAMENTO**

---

**Gisele Alves Medeiros**

**Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto**

Brasília, março de 2018.



**UnB**

INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**TESE DE DOUTORADO**

---

**BENZOTIADIAZOLA EM SISTEMAS  
FLUORESCENTES MOLECULARES E  
NANOMÉTRICOS APLICADOS EM  
BIOIMAGEMAMENTO**

---

Tese apresentada ao PPGQ, como parte  
dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Química

**Gisele Alves Medeiros**

**Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto**

Brasília, abril de 2018

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Gisele Alves Medeiros**, matrícula nº 14/0120157, intitulada “*Benzotiadiazola em Sistemas Fluorescentes Moleculares e Nanométricos Aplicados em Bioimageamento*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 25 de abril de 2018.

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

Prof.<sup>a</sup> Dra. Leandra Franciscato  
Campo Membro Titular (UFRGS)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ingrid Távora Weber  
Membro Titular (IQ/UnB)

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

Em 25 de abril de 2018.

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho, que representa parte da minha vida, à minha família e aos anjos que Deus tem colocado no meu caminho pra tornar meus dias mais leves e cheios de amor.

## Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de trilhar um caminho de busca pelo conhecimento. Por me permitir acordar todos os dias e poder desfrutar das maravilhas que Ele criou. Por fazer da minha vida uma história de amor e superação. Por me mostrar que cada pequeno acontecimento está inserido em um plano de salvação maior. Por me amar independente de qualquer coisa e por nunca ter me abandonado.

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão. Em especial minha mãe Maria, por ser minha principal fonte de inspiração. Por todo sacrifício dedicado aos meus estudos e a minha carreira. Ao meu pai José por sempre estar disposto a me ajudar. Aos meus pais agradeço pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Jefferson e Ricardo pelo companheirismo, carinho e amizade. Agradeço a minha segunda família, Jedson, Carol e João que me acolheram com tanto amor e carinho. Obrigado por tornarem meus dias mais felizes. Meu amor, obrigado por todo apoio e companheirismo, você tem sido meu porto seguro. Agradeço a todos os familiares que sempre me incentivam, ficam felizes com minhas vitórias e nos momentos difíceis estão ao meu lado para me apoiar.

Agradeço aos colegas de laboratório. Desses longos dias de convívio que se toraram anos de partilha de momentos bons e ruins levarei grandes aprendizados e grandes amizades para a vida. Agradeço em especial a Haline, ao Thyago, ao Betinho, a Raquel, ao Alberto, ao Marcos e ao Pedro pela contribuição no meu trabalho e na minha formação. Um agradecimento especial para minhas duas ICs Izabela e Giorgiane por todo tempo dedicado ao laboratório e aos nossos projetos. Agradeço também aos colegas de outros grupos de pesquisa que sempre estiveram à disposição a ajudar no andamento do trabalho.

Agradeço as amigas de graduação, que mesmo após a conclusão do curso ainda estão presentes na minha vida e sempre vão estar no meu coração: Kênia, Juliete, Mayra, Paula e Carol. A amizade de vocês é muito especial e importante para mim.

Agradeço ao meu orientador Brenno pela ajuda e suporte no laboratório. Ao professor Marcelo pelo suporte e discussões a respeito do trabalho. Aos professores José Raimundo e Gustavo Menezes pelas contribuições no imageamento. Ao professor Heibbe pelos cálculos realizados. Em especial um agradecimento aos alunos desses grupos de pesquisa pelo excelente trabalho realizado.

A todas as pessoas e aos funcionários do Instituto de Química que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimeto desse trabalho e na minha formação acadêmica.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Prof. Jairton Dupont, Prof. Ingrid Tavora, Prof. Leandra Franciscato e Prof. Mauro Vicentini, por gentilmente terem aceitado o convite, dispondo do seu tempo e conhecimento para contribuir com este trabalho.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao Instituto de Química pela infraestrutura básica.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E ACRÔNIMOS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b>	<b>XXIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XXV</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>9</b>
Revisão Bibliográfica	11
<i>Q-Dots de carbono</i>	16
Parte Experimental	27
1.1 - <i>Obtenção do C-Dot passivado com aminas:</i>	27
1.2 – <i>Equipamentos e análises:</i>	28
1.3 - <i>Experimentos de imageamento celular:</i>	30
Resultados e Discussão	33
Conclusão & Perspectivas	58
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>60</b>
Revisão Bibliográfica	62
Parte Experimental	74
2.1 - <i>Obtenção do Híbrido fluorescente BTD-QN:</i>	74
2.2 – <i>Equipamentos e análises:</i>	74
2.3 - <i>Experimentos de imageamento celular:</i>	75
2.4 – <i>Cálculos computacionais</i>	79
Resultados e Discussão:	81
Conclusões e Perspectivas	107
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>108</b>
Revisão Bibliográfica	110
<i>Experimentação no Ensino de Química:</i>	117
Parte Experimental	121
3.1 - <i>Obtenção do PPZ:</i>	121

---

3.2 – Equipamentos e análises:	121
Resultados e Discussão	124
Conclusões e Perspectivas	142
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>143</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>156</b>



## Resumo

O presente trabalho apresenta, na primeira parte, a síntese, caracterização e aplicação no imageamento celular de um quantum dot de carbono (C-Dots) obtido da carbonização de esturmo de vaca e posterior passivação com o núcleo 2,1,3-benzotiadiazola e etilenodiamina. O material nanométrico obtido apresentou excelente fotoestabilidade, comportamento de dependência de emissão em relação ao comprimento de excitação, conversão descendente e ascendente de luz, uma faixa de pH de trabalho ampla (3 a 9) e seletividade de marcação para o nucléolo celular nos experimentos de imageamento. É importante destacar que a marcação seletiva ocorreu apenas após 30 minutos de incubação, o que significa que a utilização do núcleo BTB como agente passivador das nanopartículas retardou seu processo de internalização pelo nucléolo.

Na segunda parte, uma sonda lipofílica derivada do núcleo BTB foi projetada, sintetizada e aplicada como uma sonda fluorescente com seletividade para lipídeos localizados no ambiente celular. Os resultados dos experimentos de imageamento mostraram que a nova estrutura desenvolvida nesse trabalho marca as gotículas lipídicas de maneira mais seletiva e eficiente que o marcador comumente utilizado BODIPY disponível comercialmente. O corante foi testado em um modelo complexo (*C. elegans*), ou seja, um organismo multicelular e também apresentou seletividade na marcação das gotículas lipídicas presentes no corpo do verme, o que não é possível usando os marcadores lipídicos disponíveis comercialmente. A nova estrutura foi então aplicada em um procedimento cirúrgico para corar células de adipócitos e o novo corante foi capaz de diferenciar animais normais dos alimentados com alto teor de gordura. Em outro procedimento cirúrgico, células de hepatócitos foram usadas e elas puderam ser acompanhadas no fluxo sanguíneo do animal vivo usando a estrutura projetada em um procedimento *multistaining* juntamente com um marcador de núcleo comercial (Hoechst 33342).

Na terceira parte, um projeto avançado de prática experimental a nível de graduação é apresentado. Neste capítulo é discutido o uso de reações multicomponentes (MCR) para o entendimento de conceitos e mecanismos da química verde. A reação de quatro componentes para obter 6-amino-3-metil-4-fenil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazole-5-carbonitrile sob condições não catalisadas, básicas e ácidas é apresentada assim como sua

caracterização por ponto de fusão, IFTR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC. Os alunos são convidados a comparar os resultados, analisar as vantagens e limitações do uso dessas diferentes condições e a examinar a literatura científica. A MCR permite incorporar um núcleo BTB no ao esqueleto da molécula sintetizada e aplicação futura em estudos de bioimageamento celular e observação da localização desta classe de heterocíclicos no ambiente celular.

**Palavras chaves:** Sistemas fluorescentes; C-Dots; BTB-QN; Fotoluminescência; Imageamento celular; Imageamento de animais; Experimentação; Ensino de Química.

## Abstract

The current Thesis presents, in its first part, the synthesis, characterization and application in (live) cell imaging of quantum carbon dots (C-Dot) obtained from carbonization of cow manure and subsequent passivation with both 2,1,3-benzothiadiazole and ethylenediamine. The nanometric material presented excellent photostability, dependence behavior in relation to the wavelength of excitement, up and down conversion of light, a wide working pH range (3 to 9) and selective staining of cells' nucleoli in bioimaging experiments. It is important to note that selective marking occurred only after 30 minutes of incubation, which means that the use of BTD core as the passivating agent of the nanoparticles slowed down the process of internalizing into the nucleoli when compared to the analogous core without incorporating BTD.

In the second part, a lipophilic BTD small molecule was designed, synthesized and applied as fluorescent imaging probe to selectively stain lipid droplets at the cellular level. The results showed the designed structures is by far better than the commercially available BODIPY and that more lipid-based structures could be stained selectively. The dye was then tested in a complex model (*C. elegans*), that is, a multicellular organism and displayed selective also at the worm level, a feature not possible using the commercial available lipid markers. The new structure was then applied in a surgery procedure to stain adipocytes cells and the new dye was capable of differentiate from standard and high fat fed animals. In another surgery procedure, hepatocyte cells were used and they could be followed in the blood flow of the live animal using the designed structure in a multistaining procedure alongside with a commercial nuclei marker (Hoechst 33342).

In the third part, an advanced undergraduate program project is presented. In this chapter it is discussed the use of multicomponent reactions toward the understand of green chemistry concepts and mechanisms. The four-component reaction to obtain 6-amino-3-methyl-4-phenyl-2,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile under non-catalyzed, basic and acid conditions is presented as well as its characterization by melting point, IFTR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC and HMBC. The students are urged to compare the results, to analyze advantages and limitations of using these different conditions and to perusal the scientific literature. The MCR allows incorporate a BTD core in the scaffold to future bioimaging studies of cellular localization of this class of heterocycles.

**Key words:** C-Dots; Photoluminescence; Bioimaging experiments; Animal imaging; Experimentation; Chemistry teaching.

## Lista de Abreviaes e Acrnimos

AEAPMS	<i>N</i> -( $\beta$ -aminoetil)- $\gamma$ -aminopropil metildimetoxissilano
BODIPY	Boro-dipirometano
BTD	2,1,3- benzotiadiazola
BTD-NH <sub>2</sub>	4-amino-2,1,3-benzotiadiazola
BTD-QN	<i>N</i> -(quinolin-8-il)-4-amino-2,1,3-benzotiadiazol
Caco-2	Células de adenocarcinoma colorretal humano
C-Dot-NH <sub>2</sub>	Quantum Dot de carbono passivado com etilenodiamina
C-Dot-NH-BTD	Quantum Dot de carbono passivado com 4-amino-2,1,3-benzotiadiazola
C-Dots	Quantum Dots de carbono
CMC	Constante miscelar crítica
D <sub>2</sub> O	gua deuterada
DAPI	4-6-diamidino-2-fenilindol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilssulfxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilssulfxido deuterado
EDA	Etilenodiamina
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
HOMO	Orbital molecular ocupado de mais alta energia
HRTEM	Microscopia eletrnica de transmissão de alta resolução
HMBC	Espectro de correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HSQC	Espectro de correlação heteronuclear de um único quantum
ICT	Transferência intramolecular de carga
IFTR	Espectroscopia de Infravermelhos com transformadas de Fourier
IV	Infravermelho
JNK	Quinase <i>c-Jun N</i> -terminal
LEC	Células eletroquímicas emissoras de luz
LED	Diodos emissores de luz

LLC-PK1	Células de câncer de rim de porco
LUMO	Orbital molecular desocupado de mais baixa energia
MCF-7	Células de câncer de mama
MDA-MB-231	Células de adenocarcinoma de mama humano
MeCN	Acetonitrila
NASH	Esteato-hepatite não alcoolica
OLED	Diodos emissores de luz orgânico
PBS	Tampão de fosfato salino
PPZ	Piranopirazol
Q-Dots	Quantum Dots
QN	Quinolina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RQ	Rendimento quântico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Si-Dots	Quantum dot de Silício
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação da capacidade de penetração da radiação no tecido epitelial humano. Adaptado da referência 41. \_\_\_\_\_ 5
- Figura 2.** Núcleo 2,1,3-benzotiadiazola que também é conhecido como BTB.  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , e  $R^4$  indicam as posições no anel que podem ser utilizadas para inserção de novos grupos. \_\_\_\_\_ 7
- Figura 3.** Confinamento quântico dos elétrons. a) ilustra um material onde não existem barreiras quânticas e os elétrons podem se movimentar livremente ao longo de um espaço 3D. b) ilustra um material que possui barreiras quânticas na forma de camadas, fazendo com que o movimento dos elétrons se restrinja a um espaço 2D. c) ilustra um material que possui barreiras quânticas envolvendo um canal onde os elétrons podem se movimentar em uma única dimensão (ao longo do fio). d) ilustra um material que é completamente envolvido por barreiras quânticas em todas as dimensões, fazendo com que o movimento dos elétrons se restrinja a um ponto. (Os espaços em amarelo indicam a distribuição térmica dos elétrons.  $E_f$ : estado fundamental,  $E_1$  e  $E_2$ : estados excitados). Adaptada da referência 63. \_\_\_\_\_ 13
- Figura 4.** Densidade de estados em um Q-Dot em relação à energia dos elétrons. a) comportamento ideal do Q-Dot onde as partículas possuem o mesmo tamanho e consequentemente, os elétrons possuem a mesma energia. b) comportamento real dos Q-Dots, onde o tamanho das partículas varia e os elétrons possuem energias diferentes, gerando uma infinidade de níveis de energia provocando um alargamento não homogêneo dos mesmos. ( $E_c$ : parte inferior da banda de condução,  $E_f$ : estado fundamental e  $E_1$ : estado excitado). Adaptado da referência 66. \_\_\_\_\_ 15
- Figura 5.** Grupos de elementos que quando combinados podem possibilitar a formação de um Q-Dot. \_\_\_\_\_ 16
- Figura 6.** Exemplos de Q-Dots obtidos por meio da síntese de sistemas casca-núcleo. Adaptado da referência 70. \_\_\_\_\_ 17
- Figura 7.** Número de publicações em relação aos anos, a partir de 2004, sendo pesquisados os tópicos "*carbon dot\**" NOT *nanotube\** or "*carbon nanoparticle\**" NOT *nanotube\** or "*C-dot\**" NOT *nanotube\**. Obtido em 22/03/2018. \_\_\_\_\_ 18
- Figura 8.** Algumas possibilidades de emissão de energia que ocorrem com os C-Dots. \_\_\_\_\_ 19

- Figura 9.** Espectros de IV do núcleo BTD (em preto), do C-Dot passivado apenas com a BTD (em vermelho) e o C-Dot-NH-BTD (em azul). \_\_\_\_\_ 34
- Figura 10.** RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) do C-Dot-NH-BTD. A parte do espectro em destaque apresenta os sinais referentes aos H do anel 2,1,3-benzotiadiazol e os tripletos referentes aos  $\text{CH}_2$  da EDA. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 11.** RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ , 150 MHz) do C-Dot-NH-BTD. É possível observar em destaque na figura os sinais referentes à EDA de 38 a aproximadamente 53 ppm, dois sinais referentes ao anel 2,1,3-benzotiadiazol que aparecem em 165,8 e 166,5 ppm e dois sinais em 175,5 e em 176,3 ppm referentes às amidas. \_\_\_\_\_ 36
- Figura 12.** (a) Imagem de HRTEM dos C-Dot-NH-BTD. (b) Distribuição do tamanho das nanopartículas (percentual em relação ao diâmetro). \_\_\_\_\_ 37
- Figura 13.** Espectros de absorção (UV) do C-DOT-NH-BTD com concentração de  $0,346 \text{ g L}^{-1}$  em diferentes solventes. \_\_\_\_\_ 38
- Figura 14.** Espectros de emissão do C-Dot-NH-BTD com concentração  $0,166 \text{ g L}^{-1}$  em água. O comprimento de onda de excitação foi variado de 10 em 10 nm de 300 à 500 nm e o espectro de emissão adquirido para cada um deles (a direita). Para melhor visualização do comportamento das curvas de emissão a medida que se varia o comprimento de onda de excitação foram plotadas em um gráfico 7 curvas, à esquerda. \_\_\_\_\_ 39
- Figura 15.** Espectros de emissão do C-Dot-NH-BTD com concentração  $0,166 \text{ g L}^{-1}$  em diferentes solventes. O comprimento de onda de excitação foi variado de 10 em 10 nm de 300 à 400 nm e o espectro de emissão adquirido para cada um deles. \_\_\_\_\_ 40
- Figura 16.** A esquerda, gráfico com as curvas de emissão (com máximo em 420 nm) sob excitação em 340 nm para todos os solventes. A direita, gráfico com as intensidades de emissão normalizadas para as curvas de emissão sob excitação em 340 nm. \_\_\_\_\_ 41
- Figura 17.** Experimento de excitação da solução de C-Dot-NH-BTD em comprimentos de onda menos energéticos e a consequente emissão em comprimentos de onda mais energéticos. O solvente utilizado foi água e a concentração do C-Dot-NH-BTD foi de  $0,166 \text{ g.L}^{-1}$  (Exc = Comprimento de onda de excitação) \_\_\_\_\_ 42
- Figura 18.** a) Experimento de fotoestabilidade do C-Dot-NH-BTD com concentração  $0,333 \text{ g L}^{-1}$ , o comprimento de excitação utilizado foi 340 nm e a emissão monitorada foi 420 nm. b) À esquerda irradiação da solução de C-Dot-NH-BTD com luz branca e à direita mesma amostra submetida à irradiação UV ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ). \_\_\_\_\_ 43
- Figura 19.** (a) Efeito da variação da intensidade de fluorescência da solução de C-Dot-NH-BTD em função da variação do pH. (b) Efeito da variação da intensidade de



fluorescência da amostra de C-Dot-NH-BTD em função da variação da temperatura. (c) Comportamento não linear da intensidade de emissão observado nas soluções de pH 1 a 7. (d) Comportamento linear da supressão da intensidade de emissão observado nas soluções de pH 8 a 13 ( $R^2 = 0,932$ ). \_\_\_\_\_ 44

**Figura 20.** Viabilidade citotóxica da utilização de C-Dot-NH-BTD em células vivas. Nenhuma citotoxicidade foi observada para as células testadas. \_\_\_\_\_ 45

**Figura 21.** Células de câncer de mama MCF-7 incubadas com C-Dot-NH-BTD, visualizadas em ambos os canais (verde e vermelho). (A), (B) e (C) Células vivas. (D), (E) e (F) Células fixadas. Nenhuma coloração pode ser detectada no interior do núcleo das células, como pode ser observado pelos espaços vazios de marcados com (N). (C) e (F) mostram os aspectos normais da morfologia da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 46

**Figura 22.** Células de câncer de mama MCF-7 incubadas vivas com o C-Dot-NH<sub>2</sub> (sem unidades de BTD) mostrando a marcação fluorescente dos nucléolos celulares vistas no canal verde. (A) Mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células (indicados pelas setas amarelas). (B) Mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH<sub>2</sub> (indicado pelas setas amarelas). (C) Mostra a sobreposição dos dois sinais fluorescentes (DAPI e C-Dot-NH<sub>2</sub>). (D) Mostra o aspecto morfológico normal das células. A barra de escala de referencia 7,5  $\mu\text{m}$ .<sup>137</sup> \_\_\_\_\_ 48

**Figura 23.** Células de câncer de mama MCF-7 incubadas por 30 minutos com o C-Dot-NH-BTD mostrando a marcação fluorescente do nucléolo celular vistas no canal verde. (A), (B), (C) e (D) Células vivas. (E), (F), (G) e (H) Células fixadas. (A) mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células. (B) mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH-BTD indicado pelas setas em vermelho. As setas brancas indicam a região nuclear. (C) mostra a sobreposição dos dois sinais fluorescentes (DAPI e C-Dot-NH-BTD). (E), (F) e (G) mostram as marcações fluorescentes das células fixadas, que apresentam comportamento semelhante ao observado em (A), (B) e (C). (D) e (H) mostram o aspecto morfológico normal das células. Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 50

**Figura 24.** Células de câncer Caco-2 incubadas com o C-Dot-NH-BTD mostrando a marcação fluorescente do nucléolo celular vistas no canal verde. (A), (B) e (C) Células

vivas. (D), (E) e (F) Células fixadas. (A) Mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células. (B) Mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH-BTD indicado pelas setas em amarelo. (C) Mostra o aspecto morfológico normal das células. (D), (E) e (F) Mostram as marcações fluorescentes das células fixadas, que apresentam comportamento semelhante ao observado em (A), (B) e (C). Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 51

**Figura 25.** Células de câncer MDA-MB-231 incubadas com o C-Dot-NH-BTD mostrando a marcação fluorescente do nucléolo celular vistas no canal verde. (A), (B) e (C) Células vivas. (D), (E) e (F) Células fixadas. (A) Mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células. (B) Mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH-BTD indicado pelas setas em amarelo. (C) Mostra o aspecto morfológico normal das células. (D), (E) e (F) Mostram as marcações fluorescentes das células fixadas, que apresentam comportamento semelhante ao observado em (A), (B) e (C). Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 52

**Figura 26.** Potencial zeta dos C-Dots. Em (a) é apresentado o resultado da análise do C-Dot-NH<sub>2</sub>, em (b) é apresentado o resultado da análise do C-Dot-NH-BTD e em (c) é apresentado o resultado da análise do C-Dot sem nenhum tipo de passivação. \_\_\_\_\_ 54

**Figura 27.** Estrutura molecular dos fluoróforos que ganharam maior destaque nas pesquisas de bioimageamento celular. \_\_\_\_\_ 64

**Figura 28.** Estrutura molecular dos fluoróforos mais utilizados na marcação de lipídeos. \_\_\_\_\_ 68

**Figura 29.** Núcleo quinolina. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> indicam as posições no anel que podem ser utilizadas para inserção de novos grupos substituintes. \_\_\_\_\_ 71

**Figura 30.** Espectro de FTIR da **BTD-QN**. Os estiramentos e dobramentos das ligações foram apresentados em destaque. \_\_\_\_\_ 82

**Figura 31.** Espectro de <sup>1</sup>H da **BTD-QN** em acetona deuterada, com a integral dos picos. A região de 7,4 a 10,5 ppm foi ampliada para melhor visualização dos sinais. \_\_\_\_\_ 83

**Figura 32.** Espectro de <sup>13</sup>C da **BTD-QN** em acetona deuterada. A região de 100 a 160 ppm foi ampliada para melhor visualização dos sinais. \_\_\_\_\_ 85

**Figura 33.** HR-ESI(+)-MS da [**BTD-QN+H**]<sup>+</sup>. \_\_\_\_\_ 86

**Figura 34.** (a) Espectros de UV-VIS em diferentes solventes e em (b) Espectros de fluorescência em diferentes solventes da **BTD-QN**. \_\_\_\_\_ 87

**Figura 35.** (a) Efeito solvatocrômico obtido pelos Valores de  $E_T^N$  vs. deslocamento de Stokes ( $\text{cm}^{-1}$ ) para os solventes testados; (b) Análise de fotoestabilidade realizada em água; (c) Diagrama de energia orbitalar e gráficos HOMO-LUMO para a fase gasosa e em solução aquosa obtidas por meio de cálculo teórico com a base PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d, p) e em (d) Diferença entre as densidades eletrônicas de  $S_1$  e  $S_0$  obtidas por meio de cálculo teórico com a base PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d, p) da **BTD-QN**. \*Os dados obtidos por meio dos cálculos teóricos são apresentados no Anexo 1. \_\_\_\_\_ 90

**Figura 36.** (a) Espectros de fluorescência da **BTD-QN** na presença de diferentes concentrações de SDS. Em aproximadamente 520 nm observa-se uma banda de emissão proveniente do SDS. (b) Intensidade de fluorescência nas diferentes concentrações de SDS. \_\_\_\_\_ 91

**Figura 37.** Ensaio de viabilidade celular. Não foi observado efeito citotóxico estatisticamente significativo nas amostras incubadas com **BTD-QN** (24 horas). A incubação na presença de DMSO foi utilizada como um controle positivo devido ao seu efeito citotóxico já conhecido que depende da concentração do solvente no meio celular. As amostras mantidas apenas no meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. \_\_\_\_\_ 92

**Figura 38.** Perfil fluorescente das células Caco-2 incubadas com **BTD-QN** ( $1 \mu\text{M}$ ). (A) e (B) apresentam amostras vivas enquanto que (C) e (D) apresentam amostras fixadas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. As setas brancas indicam os corpos lipídicos amplamente distribuídos no citoplasma das células. A letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células (mostrados como vazios negros), onde não houve marcação fluorescente. Barra de escala de referência de  $25 \mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 93

**Figura 39.** Padrão de coloração fluorescente de células Caco-2 usando o BODIPY disponível comercialmente ( $12 \mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** ( $1 \mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. Os núcleos das células foram corados com o corante comercial conhecido como DAPI (emissão azul) e a letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de  $25 \mu\text{m}$ . 94

**Figura 40.** Padrão de coloração fluorescente das células MCF-7 usando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** (1  $\mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. A a letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 95

**Figura 41.** Padrão de coloração fluorescente de células MDA-MB-231 usando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** (1  $\mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. A a letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 96

**Figura 42.** Padrão de coloração fluorescente de células DU-145 utilizando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** (1  $\mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. A letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 97

**Figura 43.** Quantificação de estruturas lipídicas a partir do perfil fluorescente de células cancerígenas Caco-2 vivas coradas com **BTD-QN** e com BODIPY (comercialmente disponível). A diferença de gotículas lipídicas coradas por estes dois compostos foi estatisticamente significativa. \* =  $p < 0,05$ . \_\_\_\_\_ 98

**Figura 44.** *C. elegans* marcado com o composto **BTD-QN**, sem nenhum marcador fluorescente e marcado com o marcador de referência Bodipy. \_\_\_\_\_ 99

**Figura 45.** *C. elegans* tratado com o novo composto híbrido fluorescente **BTD-QN**. 100

**Figura 46.** Padrão de coloração fluorescente do *C. elegans* usando BODIPY (A, 12  $\mu\text{M}$ ) e **BTD-QN** (C, 10  $\mu\text{M}$ ). Observa-se em (C) uma notável especificidade de coloração de **BTD-QN** para corpos lipídicos dentro do verme enquanto (A) mostra o padrão de coloração com o BODIPY que produziu ruído de fundo (setas vermelhas). Barra de escala de referência 100  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 101

**Figura 47.** Células de adipócitos marcadas com o uso de **BTD-QN** (10  $\mu\text{M}$ ) e otimização das condições de visualização para acompanhar o imageamento in vivo dos camundongos. \_\_\_\_\_ 103

- Figura 48.** **BTD-QN** (10  $\mu\text{M}$ ) como corante para marcação dos adipócitos em modelo animal vivo. A esquerda, é possível observar o camundongo vivo com o tecido adiposo exposto. Acima na Figura encontram-se as células de adipócitos de camundongos com dieta padrão sem a marcação e marcadas com **BTD-QN**. Abaixo são apresentadas as imagens do tecido adiposo do camundongo com dieta rica em lipídeos sem marcação e marcadas com a **BTD-QN**. Barra de escala de 130  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 104
- Figura 49.** Marcação de acúmulos de lipídeos em hepatócitos com **BTD-QN** (10  $\mu\text{M}$ ). Acima a esquerda é apresentada a fotografia do camundongo vivo com o fígado exposto. Acima a direita observa-se a imagem do fígado apenas com o marcador comercial de núcleo (Hoechst 33342). Abaixo a esquerda é apresentada a imagem da marcação de hepatócitos do camundongo com a dieta padrão utilizando a **BTD-QN**. Abaixo a direita, é apresentada a imagem da marcação de regiões de acúmulo de lipídeos em hepatócitos de ratos com a dieta rica em gordura utilizando a **BTD-QN**. Barra de escala de 130  $\mu\text{m}$ . \_\_\_\_\_ 105
- Figura 50.** Estrutura molecular do núcleo piranopirazol.  $\text{R}^1$  e  $\text{R}^2$  indicam as posições no anel que podem ser utilizadas para inserção de novos grupos substituintes. \_\_\_\_\_ 110
- Figura 51.** Relação entre a teoria e a experimentação nos trabalhos científicos e consequente formação do conhecimento. Adaptada da referência 317. \_\_\_\_\_ 118
- Figura 52.** Espectro de FTIR e estrutura molecular do PPZ. Os estiramentos e dobramentos das ligações foram apresentados em destaque. \_\_\_\_\_ 125
- Figura 53.** Duas possibilidades de estrutura molecular do derivado do PPZ sintetizado com a identificação numérica dos átomos. \_\_\_\_\_ 126
- Figura 54.** Espectro de  $^1\text{H}$  do PPZ sintetizado nesse trabalho em  $\text{DMSO-}d_6$ . \_\_\_\_\_ 127
- Figura 55.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  do PPZ sintetizado nesse trabalho em  $\text{DMSO-}d_6$ . \_\_\_\_\_ 129
- Figura 56.** Espectro de HSQC correlacionando os núcleos C e H. Nesse espectro observam-se as interações entre carbonos e hidrogênios ligados. Em  $\text{DMSO-}d_6$ . \_\_\_\_ 131
- Figura 57.** HMBC correlacionando os núcleos C e H. Nesse espectro observam-se as interações entre carbonos e hidrogênios distantes (no mínimo duas ligações de distância). Em  $\text{DMSO-}d_6$ . \_\_\_\_\_ 133
- Figura 58.** Espectro de HSQC correlacionando os núcleos N e H. Nesse espectro observam-se as interações entre nitrogênios e hidrogênios ligados. Em  $\text{DMSO-}d_6$ . \_ 135

**Figura 59.** HMBC correlacionando os núcleos N e H. Nesse espectro observam-se as interações entre carbonos e hidrogênios distantes (no mínimo duas ligações de distância).

Em DMSO-*d*<sub>6</sub>. \_\_\_\_\_ 137

## Lista de Esquemas

- Esquema 1.** Diagrama de Jablonski simplificado ilustrando o processo de excitação por meio da absorção de um fóton e posterior emissão de energia na forma de luz (há a possibilidade da emissão de energia não ocorrer via mecanismos não radiativos). Adaptado da referência 36. \_\_\_\_\_ 4
- Esquema 2.** À esquerda tem-se a metodologia da passivação dos C-Dots passivado com orto, meta e para fenilenodiamina. Ao meio tem-se as fotografias dos C-Dots obtidos, dispersos em etanol, sob luz ambiente (esquerda) e sob excitação de  $\lambda_{\text{ex}} = 365\text{nm}$  (direita). E à direita tem-se as imagens das células MCF-7 incubadas com os C-Dots sintetizados obtida por meio de um microscópio confocal ( $\lambda_{\text{ex}} = 405\text{ nm}$ ). Adaptado da referência 126. \_\_\_\_\_ 22
- Esquema 3.** Representação do procedimento experimental para a síntese de C-dots passivados com BTDA e EDA (C-Dot-NH-BTDA). Em amarelo são representados os grupos ácido carboxílicos presentes na superfície do C-Dot. Em vermelho é representado o grupo amida obtido por meio da amidação do grupo ácido utilizando a BTDA-NH. E em verde é representado o grupo amida obtido por meio da amidação do grupo ácido utilizando a EDA. \_\_\_\_\_ 27
- Esquema 4.** Reação para obtenção do híbrido fluorescente N-(quinolin-8-il)-4-amino-2,1,3-benzotiadiazol. \_\_\_\_\_ 74
- Esquema 5.** Proposta de síntese obtenção de novos fluoróforos derivados dos núcleos BTDA. \_\_\_\_\_ 110
- Esquema 6.** Reação multicomponente para obtenção de moléculas derivadas do núcleo PPZ.  $R^1 = \text{H}$  e  $R^2 = \text{CH}_3$ . Os grupos substituintes R podem ser substituídos nos materiais de partida, dando origem a PPZs diferentes. \_\_\_\_\_ 111
- Esquema 7.** Acima é apresentada uma metodologia sintética linear com o exemplo de como o número de etapas influenciam no rendimento global da reação. A cada etapa tem-se a introdução de substratos e insumos orgânicos, onde A, B, C, D são os substratos reacionais, AB e ABC os intermediários e ABCD o produto final. Abaixo é apresentada a metodologia multicomponente. Na formação do produto (ABCD), tem-se apenas uma etapa sintética utilizando A, B, C e D como materiais de partida. Adaptado das referências <sup>296</sup> e <sup>297</sup>. \_\_\_\_\_ 113

- Esquema 8.** Demonstração da quantidade de produtos formados mediante diferentes formas de combinação dos materiais de partida em uma MCR. No esquema a MCR exemplificada é de 3 componentes, apresentando a possibilidade de variação de todos os substratos reacionais. Cada substrato foi variado duas vezes, sendo obtido oito diferentes produtos. Adaptado da referência 273. \_\_\_\_\_ 114
- Esquema 9.** Representações genéricas das reações de (a) Strecker; (b) Hantzsch; (c) Biginelli e (d) Ugi. \_\_\_\_\_ 116
- Esquema 10.** Reação para síntese do 6-amino-3-metil-4-fenil-1,4-diidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila utilizada para o estabelecimento da melhor condição experimental. Na reação modelo são utilizados NaOH como catalisador e etanol como solvente. \_\_\_\_\_ 121
- Esquema 11.** Proposta de síntese para futura obtenção de novos fluoróforos derivados dos núcleos BTB e PPZ. \_\_\_\_\_ 142



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais estiramentos observados nos espectros da BT-D-NH <sub>2</sub> , C-Dot-NH-BTD e C-Dot-NH-BTD com EDA. _____	33
<b>Tabela 2.</b> Principais estiramentos e dobramentos observados no espectro de FTIR da BT-D-QN. _____	81
<b>Tabela 3.</b> Dados de UV-VIS e emissão (em diferentes solventes) para <b>BT-D-QN</b> . Concentração de 10 µM para todas as análises. _____	88
<b>Tabela 4.</b> Principais estiramentos e dobramentos observados no espectro de FTIR do PPZ. _____	124
<b>Tabela 5.</b> Deslocamentos químicos dos átomos que constituem o PPZ obtido nesse trabalho. _____	130
<b>Tabela 6.</b> Relação de alguns grupos de pesquisa que apresentaram a estrutura correta e a estrutura errada. _____	138
<b>Tabela 7.</b> Rendimento obtido por meio da MCR modelo variando o solvente. O tempo reacional foi de 2 h e a temperatura foi de 60 °C utilizando 10 mol% de NaOH como catalisador. _____	139
<b>Tabela 8.</b> Rendimentos obtidos por meio da variação da temperatura da reação. Foram realizadas 5 reações de 30 a 60 °C variando a temperatura 1m 10 °C. _____	139
<b>Tabela 9.</b> Rendimentos obtidos por meio da variação do tempo reacional. Foram realizadas 4 reações com tempos de 30 até 120 min. variando de 30 em 30 min. ____	139
<b>Tabela 10.</b> Rendimentos obtidos por meio da variação do catalisador. Foram testados 5 catalisadores diferentes do NaOH, todos com concentração de 10 mol%. _____	140
<b>Tabela 11.</b> Dados teóricos calculados para a <b>BT-D-QN</b> obtidos empregando correlação de troca (XC) de diferentes funções (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE, ωB97XD) combinados com o conjunto de bases de valência dividida de Pople 6-311+g(2d, p). Todos os resultados foram obtidos usando as geometrias totalmente otimizadas no nível de cálculo CAM-B3LYP/6-311g(d, p). _____	157
<b>Tabela 12.</b> Propriedades de absorção calculadas para a <b>BT-D-QN</b> por meio de TD-DFT obtidas empregando correlação de troca (XC) de diferentes funções (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE, ωB97XD) combinados com o conjunto de bases de valência dividida de Pople 6-311+g(2d, p). Todos os resultados foram obtidos usando as geometrias totalmente otimizadas no nível de cálculo CAM-B3LYP/6-311g(d, p). _____	158

# Introdução

## Introdução

Moléculas e sistemas fluorescentes tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa no mundo inteiro por sua vasta possibilidade de aplicações tecnológicas, algumas delas são: fabricação de diodos emissores de luz (do inglês *Light Emitting Diode* - LED),<sup>1,2</sup> diodos emissores de luz orgânicos (do inglês *Organic Light Emitting Diode* - OLEDs),<sup>3-6</sup> células eletroquímicas emissoras de luz (do inglês *Light-emitting Electrochemical Cell* - LEC),<sup>7-9</sup> lasers,<sup>10,11</sup> sondas biológicas,<sup>12-16</sup> biosensores fluorescentes de temperatura,<sup>17-20</sup> pH<sup>21-24</sup> e íons,<sup>25-27</sup> dentre outras. Dentre todas as possibilidades de aplicação, se destaca a utilização das moléculas e sistemas fluorescentes como uma poderosa ferramenta para visualizar processos biológicos em células e organismos vivos.<sup>28</sup>

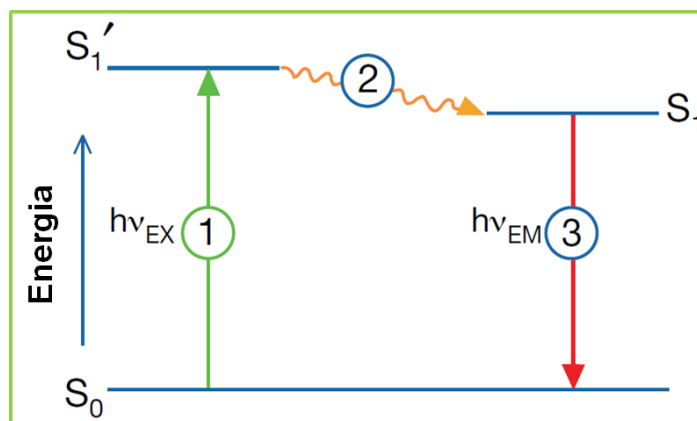
Sistemas fluorescentes projetados para visualizar, caracterizar e avaliar qualitativa e quantitativamente eventos biológicos por meio da obtenção de imagens (bioimageamento) tem causado um grande impacto e aberto possibilidades de trabalhos de pesquisas nas áreas Química, Biológica e Medicinal. O bioimageamento celular pode ser definido como a caracterização *in vivo* e a avaliação de processos biológicos, que permite a visualização da função celular e acompanhamento dos processos moleculares em organismos vivos sem perturbá-los significativamente.<sup>29-31</sup> Essa ferramenta possibilita o estudo dos mecanismos celulares de doenças (como por exemplo: doenças neurológicas, cardiovasculares, câncer, dentre outras) e a obtenção de diagnósticos precoces e precisos, assim como permite a previsão e o monitoramento da resposta terapêutica dos pacientes durante o tratamento.<sup>31-34</sup>

As metodologias e as ferramentas que nos permitem "ver o corpo" ou "ver as células" devem atender algumas condições básicas para serem consideradas viáveis para utilização em trabalhos de pesquisa. A técnica deve ser suficientemente sensível a ponto de permitir a visualização de compostos biológicos em concentrações fisiológicas (de nanomolar a micromolar). Também deve apresentar uma resolução espacial e temporal suficiente para que se possa analisar e avaliar dinamicamente os processos de marcação celular. A técnica não deve ser invasiva, ou seja, a detecção deve ser possível de fora das amostras. Deve permitir a utilização com confiança de instrumentos que não são muito especiais ou caros. Para células e tecidos dissecados o imageamento por microscopia de fluorescência é uma metodologia ideal que satisfaz todos esses requisitos, quando se comparada com outras técnicas existentes que se baseiam na radioatividade, bioluminescência, eletromagnetismo e eletroquímica. Outra vantagem da metodologia é

que além do acompanhamento da marcação celular pelo acúmulo de marcadores fluorescentes em determinadas regiões, o sinal de fluorescência de uma molécula pode ser modificado por alterações estruturais simples, sendo possível o controle da intensidade da fluorescência a partir do contato com substâncias presentes no ambiente celular (nesse caso, a molécula funcionaria como um sensor passível de ativação).<sup>28</sup>

Os estudos voltados para a compreensão de processos celulares e de internalização de inúmeros sistemas orgânicos (fluorescentes ou não) são de extrema importância para a evolução do conhecimento a respeito dos processos metabólicos à nível celular. Como estruturas celulares são muito pequenas seu estudo não é possível a olho nu, sendo muito comum a utilização de microscópios óticos que utilizam a luz visível para gerar imagens ampliadas. Entretanto, uma célula possui pouco conteúdo em seu interior que forneça contraste o suficiente para ser observado com nitidez, uma vez que sua composição é de aproximadamente 70% água. Uma das formas encontradas para se contornar esse problema é utilizando a técnica de microscopia de fluorescência, onde compostos fluorescentes são utilizados com o objetivo de produzir contraste.<sup>35</sup> Por esse motivo a obtenção de compostos fluorescentes que marquem seletivamente determinadas organelas é um tópico tão importante a ser trabalhado pela ciência.

Hidrocarbonetos poliaromáticos ou heterocíclicos, os quais são chamados de fluoróforos ou corantes fluorescentes apresentam o fenômeno da fluorescência. Outros sistemas fluorescentes conhecidos são cristais inorgânicos, polímeros ou nanopartículas, em específico os chamados de *Quantum Dots*. O fenômeno da fluorescência é o resultado de um processo de dois estágios que ocorre em certas moléculas sendo eles: (1) excitação e (3) emissão de luz. A transição representada por (2) indica tempo de vida do estado excitado. Uma sonda fluorescente é um fluoróforo projetado para responder a um estímulo específico ou para determinar a localização dentro de uma região específica de um espécime biológico. O processo responsável pela fluorescência de sistemas fluorescentes é ilustrado pelo diagrama de estados eletrônicos simplificado (diagrama de Jablonski), Esquema 1.<sup>36</sup>



**Esquema 1.** Diagrama de Jablonski simplificado ilustrando o processo de excitação por meio da absorção de um fóton e posterior emissão de energia na forma de luz (há a possibilidade da emissão de energia não ocorrer via mecanismos não radiativos). Adaptado da referência 36.

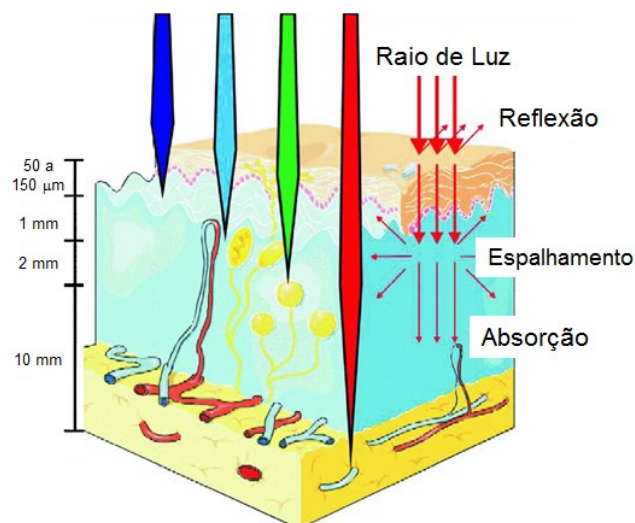
Na excitação, representada por 1 na Figura 1, um fóton ( $h\nu_{EX}$ ) é fornecido por uma fonte externa e absorvido pelo fluoróforo, dando origem a um estado excitado singlete ( $S_1'$ ). O estado excitado ocorre por um espaço de tempo muito curto (1 a 10 nanosegundos). Durante esse tempo, o sistema pode sofrer mudanças conformacionais e está sujeito a uma infinidade de possíveis interações com seu ambiente molecular, podendo ocasionar a dissipação parcial da energia de  $S_1'$  gerando o estado singlete  $S_1$  (representado por 2 no Esquema 1), a partir do qual a emissão de um fóton ( $h\nu_{EM}$ ) faz com que o fluoróforo retorne para seu estado fundamental  $S_0$  (representado por 3 no Esquema 1). É importante ressaltar que existem outros mecanismos pelos quais podem ocorrer a relaxação do estado excitado, são eles: fluorescência por transferência de energia de ressonância (do inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer* – FRET); conversão intersistema e colisão entre as moléculas que pode causar a supressão da fluorescência (do inglês, *quenching*).<sup>36</sup>

Como ocorre, na maioria das vezes, dissipação de energia via mecanismos não radiativos, a energia do fóton de emissão é menor que a do fóton de excitação e, por esse motivo, possui comprimento de onda maior. Essa diferença nos comprimentos de onda ou nas energias é conhecida como deslocamento de Stokes. Apresentar um deslocamento de Stokes grande é uma característica fundamental para que o sistema fluorescente seja considerado eficiente, pois os fótons de emissão precisam ser detectados sem que haja interferência da fonte de excitação. Outra forma de se determinar a eficiência da fluorescência do sistema é calculando o rendimento quântico (RQ), que é a proporção do

número de fótons de fluorescência emitidos (estágio 3) para o número de fótons absorvidos (estágio 1), é uma medida da extensão relativa em que esses processos ocorrem.<sup>36</sup>

Um sistema fluorescente é considerado de excelente desempenho para o bioimageamento quando apresenta algumas características fundamentais, são elas: a) solubilidade em água; b) permeabilidade às membranas celulares; c) especificidade por micro-ambientes celulares ou por moléculas específicas; d) ausência ou baixa atividade citotóxica; e) elevada fotoestabilidade; f) rendimento quântico elevado e, g) grande deslocamento de Stokes.<sup>37-39</sup> A disponibilidade dos materiais de partida, o processo de síntese e purificação e, principalmente, a reprodutibilidade da síntese destes sistemas, também devem ser levadas em consideração.

É importante considerar que, normalmente, existem três parâmetros principais para a visualização efetiva de eventos biológicos em sistemas vivos utilizando a técnica de fluorescência, são eles: absorção de luz, dispersão de luz e penetração da emissão fluorescente no tecido. Na faixa de comprimentos de onda do UV e visível (Uv-Vis), a luz não possui penetração profunda porque é facilmente absorvida e espalhada por biomoléculas presentes nos tecidos, como ilustra a Figura 1. Além disso, os tecidos geralmente geram autofluorescência, o que significa que obscurece a coleta e quantificação do sinal da imagem e resulta em baixas relações sinal-ruído. Sendo assim, a maioria dos fluoróforos que absorvem ou emitem na faixa Uv-Vis são inadequados para utilização no bioimageamento *in vivo*.<sup>30,40</sup>

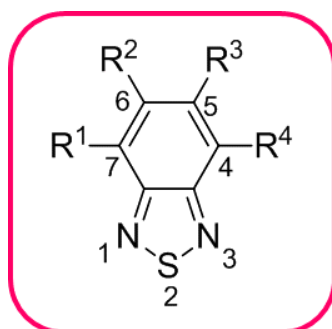


**Figura 1.** Representação da capacidade de penetração da radiação no tecido epitelial humano. Adaptado da referência 41.

Várias moléculas orgânicas foram estudadas e utilizadas (com algumas modificações estruturais) como sondas fluorescentes na marcação celular. Algumas das principais são: cumarinas, boro-dipirrometanos (BODIPYs), fluoresceínas, rodaminas, cianinas e fenoxazinas.<sup>42</sup> Entretanto esses núcleos não apresentam todas as vantagens que os enquadrariam como sendo sistemas fluorescentes de excelente desempenho. Além disso, os fluoróforos citados absorvem e emitem na faixa de comprimentos de ondas Uv-Vis, gerando imagens com relação sinal-ruído ruins (pela autofluorescência do tecido), inviabilizando suas utilizações no bioimageamento *in vivo*. Uma descrição mais detalhada das características desses fluoróforos é apresentada no capítulo 2 desse trabalho.

Na tentativa de superar as limitações apresentadas pelos fluoróforos comumente utilizados, muitos outros fluoróforos não convencionais também tem sido testados em trabalhos de bioimageamento, um exemplo é o núcleo 2,1,3-benzotiadiazol (BTD) que é em geral biocompatível e possui várias possibilidades de modificações estruturais, como é possível observar na Figura 2.<sup>37</sup> O interesse no estudo de compostos derivados desse núcleo pode ser atribuído em especial por suas diversas características desejáveis para aplicação como marcadores celulares. Algumas dessas características são: i) possui grupos funcionais aromáticos funcionalizáveis, o que permite sua fácil modificação de acordo com o interesse de aplicação; ii) são geralmente fluoróforos estáveis e eficientes, mesmo em seus estados excitados; iii) possui planaridade e rigidez estrutural uma vez que possui várias duplas ligações conjugadas; iv) apresenta conjugação  $\pi$  eficiente; v) tem forte caráter acceptor de elétrons facilitando, a transferência intramolecular de carga (ICT), característica essa importante para compostos luminescentes, pois desta maneira o orbital LUMO de seus derivados sofre uma diminuição em energia, e conseqüentemente o valor de *band gap* também diminui, levando à emissão de luz em comprimentos de onda maiores;<sup>43</sup> vi) as unidades BTDs são altamente polarizadas, o que possibilita a obtenção de estruturas cristalinas bem ordenadas por meio de interações entre os heteroátomos presentes nas estruturas e interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ ; vii) moléculas derivadas do núcleo BTD geralmente apresentam grandes deslocamentos de Stokes; viii) esses núcleos apresentam elevada fotoestabilidade, mantendo sua intensidade de emissão mesmo após longos períodos de irradiação; ix) um fator de grande importância para os experimentos de imageamento celular é a relação sinal-ruído da fluorescência dos corantes utilizados, e, nesse contexto os núcleos derivados da BTD apresentam uma excelente relação sinal-ruído; x) as BTDs, em geral, apresentam grande facilidade de transpor a membrana

celular, uma das características mais desejada para sondas biológicas; xi) podem ser armazenados por longos períodos de tempo à temperatura ambiente sem que degradem; xii) cálculos teóricos se mostraram eficientes na previsão de propriedades fotofísicas das BTDs, sendo assim é possível propor novas sínteses guiadas por previsões teóricas previamente obtidas.<sup>37,44-47</sup>



**Figura 2.** Núcleo 2,1,3-benzotriazolazola que também é conhecido como BTD. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, e R<sup>4</sup> indicam as posições no anel que podem ser utilizadas para inserção de novos grupos.

Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o núcleo BTD obtiveram sucesso no imageamento celular, marcando seletivamente mitocôndria,<sup>12</sup> DNA,<sup>48,49</sup> a região citoplasmática celular<sup>50</sup> e, além disso, também foi sintetizado um ácido graxo incorporando a BTD em sua estrutura.<sup>51</sup> Levando em consideração todas as vantagens apresentadas pelo núcleo BTD e no sucesso dos projetos de pesquisas que utilizaram derivados da BTD no imageamento celular no nosso grupo de pesquisa, tem-se como objetivo desse trabalho a síntese e aplicação no bioimageamento de novos sistemas fluorescentes incorporando esse núcleo.

O primeiro capítulo deste trabalho consiste na utilização da BTD para modificação estrutural da superfície de *Quantum Dots* de carbono (C-Dots). De maneira geral, os C-Dots são nanopartículas de carbono que por possuírem confinamento quântico, apresentam características fotofísicas singulares. A possibilidade de junção desse sistema (que por si só já é fluorescente) com um fluoróforo versátil e com características únicas como a BTD, se apresenta extremamente interessante.

No segundo capítulo é apresentada uma possibilidade de modificação estrutural do anel BTD por meio do acoplamento cruzado com a quinolina (QN), um composto heterocíclico aromático. Como descrito anteriormente, a BTD possui várias possibilidades de modificação estrutural, o que facilita o seu manuseio e a elaboração de



sínteses que dão origem a novos compostos. O núcleo QN foi escolhido pois apresenta diversas características desejáveis para utilização em sistemas biológicos vivos, que serão discutidas com maiores detalhes no capítulo 2.

Para finalizar, o terceiro capítulo apresenta uma proposta de síntese do núcleo piranopirazol (PPZ) por meio de uma reação multicomponente (com a otimização das condições de catálise) para ser futuramente acoplado ao anel BTB. O núcleo PPZ também foi escolhido para ser trabalhado, pois apresenta diversas características desejáveis para utilização em sistemas biológicos vivos, que serão discutidas com maiores detalhes no capítulo 3. Neste capítulo também é apresentada uma proposta de prática experimental a ser desenvolvida em laboratórios de ensino de orgânica.

# Capítulo 1

# **Revisão Bibliográfica**

## Revisão Bibliográfica

Q-Dots, que são comumente traduzidos como pontos quânticos, são sistemas tridimensionais muito pequenos cujas dimensões variam de 2 a 10 nm.<sup>52</sup> Seu tamanho é menor que o comprimento de onda para elétrons lentos definido por de Broglie, sendo portanto possível observar um comportamento quântico nesses materiais.<sup>53</sup> Dentre os efeitos quânticos observados em Q-dots destaca-se o efeito de confinamento quântico.

A compreensão da definição de confinamento quântico se torna mais fácil ao se levar em consideração a evolução dos estudos de materiais condutores e semicondutores. E, como consequência, o gradativo entendimento do comportamento do movimento dos elétrons nos materiais em questão.

A ligação entre átomos pode ser (superficialmente) explicada como sendo a situação em que os elétrons se movimentam livremente ao longo de um espaço em três dimensões (3 D). Utilizando a Teoria do Orbital Molecular (TOM) a ligação metálica é explicada como sendo a combinação dos orbitais ligantes e antiligantes dos átomos envolvidos na ligação. Essa combinação de orbitais origina orbitais moleculares que são muito próximos uns dos outros em energia e que podem ser agrupados em duas grandes bandas, de valência e de condução. As bandas de valência e de condução são separadas por uma diferença de energia, que varia de acordo com as especificidades de cada material.

Foi observado experimentalmente que a limitação do movimento dos elétrons em duas dimensões (2D) modifica de forma drástica as características do material produzido.<sup>54</sup> Essa diminuição no grau de liberdade de movimentação dos elétrons foi chamada de confinamento quântico, sendo observada sempre que uma das dimensões do material é suficientemente pequena (2-10 nm).<sup>55</sup> A partir de então, o interesse na limitação do movimento dos elétrons dentro dos materiais passou a aumentar.

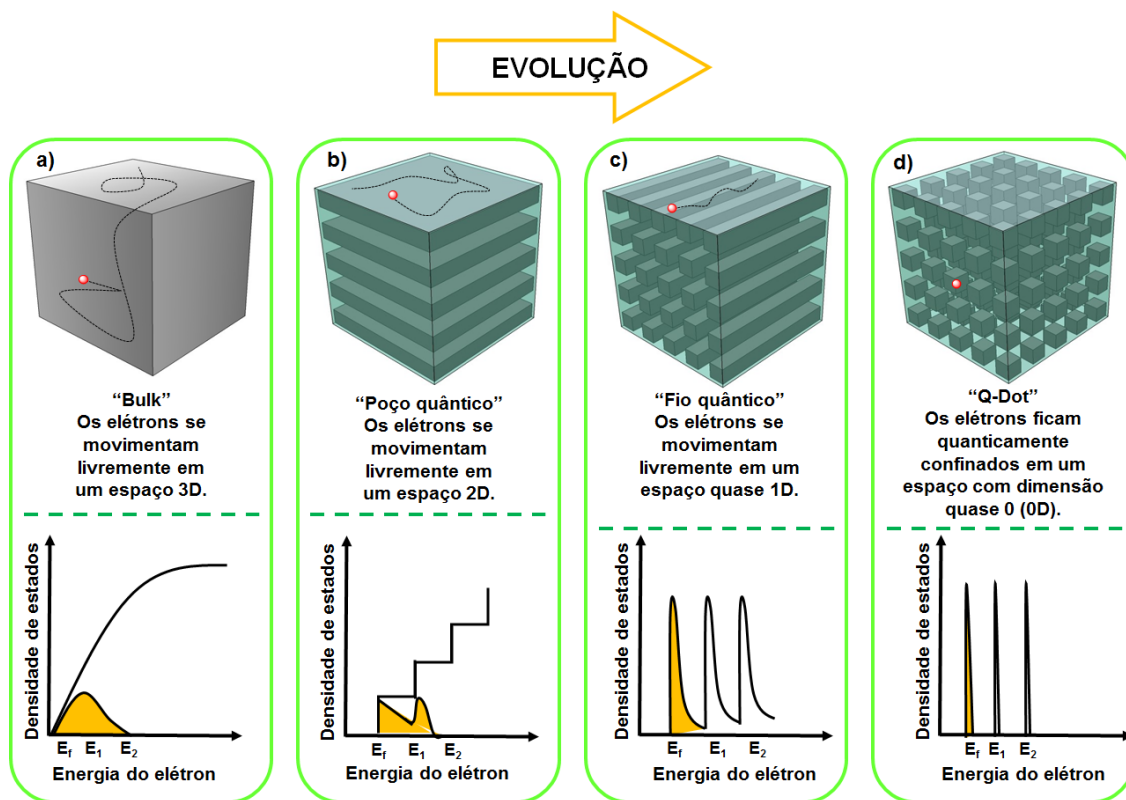
A possibilidade de se limitar a movimentação dos elétrons em um espaço 2D foi apresentada por volta dos anos 70. Os pesquisadores propuseram uma síntese onde uma camada bem fina de um material semicondutor (chamada de poço quântico) é envolvida por duas camadas de um outro material semicondutor com energia de *band gap* superior. Foi observado que, a diferença de energia entre as bandas de condução dos dois materiais confina os elétrons da camada fina, possibilitando assim, a sua movimentação apenas ao

longo da camada formada (espaço 2D), uma vez que a excitação perpendicular desses elétrons é quantizada.<sup>56,57</sup>

O interesse no confinamento quântico dos elétrons continuou atraindo a atenção dos pesquisadores e, por volta dos anos 80 foi possível se desenvolver um sistema no qual os elétrons foram confinados em uma estrutura quase unidimensional, denominada fio quântico. Os fios quânticos foram obtidos a partir da gravação de pequenas tiras, com auxílio de técnicas de litografia, em sistemas que já apresentavam poços quânticos. Como naquela época as técnicas litográficas eram limitadas, os fios quânticos acabavam apresentando dimensões maiores do que as dos poços quânticos (10 a 500 nm).<sup>58</sup> O interesse nesse tipo de sistema atrai, ainda hoje, a atenção de inúmeros grupos de pesquisa.<sup>59</sup>

Finalizando as possibilidades de limitação do movimento dos elétrons, foi apresentada, em 1986, o primeiro Q-Dot, obtido por meio de técnicas de litografia, um sistema tão pequeno (quadrados com 250 nm de lado e de 2-5 nm de espessura ) que sua proporção dimensional foi considerada como sendo quase zero.<sup>60,61</sup> Uma vez que a escala de comprimento de condução de um elétron livre é por volta de 10 nm, limitar o tamanho de uma das dimensões do sistema semiconductor por volta desse valor faz com que o elétron seja localizado basicamente em um ponto.<sup>52</sup>

A Figura 3 ilustra a evolução das possibilidades de confinamento quântico dos elétrons. A diferenciação entre os tipos de materiais é definida com base na direção com que as barreiras potenciais promovem o confinamento quântico,<sup>62</sup> permitindo os classificar em poços quânticos, fios quânticos e Q-Dot.



**Figura 3.** Confinamento quântico dos elétrons. a) ilustra um material onde não existem barreiras quânticas e os elétrons podem se movimentar livremente ao longo de um espaço 3D. b) ilustra um material que possui barreiras quânticas na forma de camadas, fazendo com que o movimento dos elétrons se restrinja a um espaço 2D. c) ilustra um material que possui barreiras quânticas envolvendo um canal onde os elétrons podem se movimentar em uma única dimensão (ao longo do fio). d) ilustra um material que é completamente envolvido por barreiras quânticas em todas as dimensões, fazendo com que o movimento dos elétrons se restrinja a um ponto. (Os espaços em amarelo indicam a distribuição térmica dos elétrons. E<sub>f</sub>: estado fundamental, E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>: estados excitados). Adaptada da referência 63.

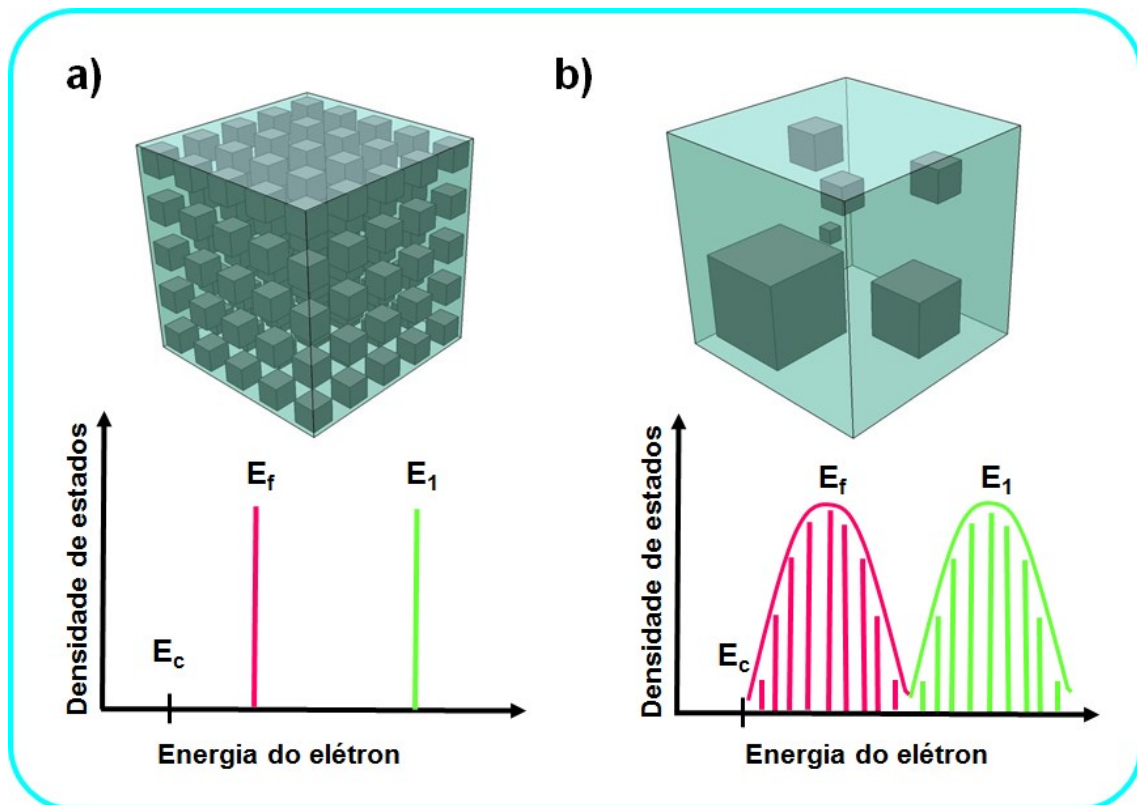
Portanto, o confinamento quântico consiste na limitação do movimento eletrônico dentro de um sistema nanométrico complexo. Sendo possível a escolha de como essa limitação deve ocorrer (1D, 2D ou 3D) no momento da síntese do material em questão.

Como resultado do confinamento quântico no Q-Dot, a energia dos estados eletrônicos, buracos e éxcitons (pares de elétrons e buracos interagindo mutualmente através da força Coulumbica) são compostas por séries discretas semelhantes às observadas em átomos. Ou seja, em um Q-Dot, cada nanopartícula possui um valor quantizado discreto de energia, assim como nas camadas eletrônicas de um átomo isolado.<sup>64</sup> Por esse motivo são eventualmente chamados de átomos artificiais.<sup>65</sup>

Os níveis de energia de um Q-Dot são estabelecidos pelo tamanho das partículas. A esse comportamento peculiar foi dado o nome de *quantum size effect* (efeito quântico do tamanho).<sup>52,55</sup> Um Q-Dot comum apresenta de  $10^3$  a  $10^5$  átomos. Esse número é extremamente inferior ao número de átomos que compõem um *bulk* (aglomerado), um poço quântico, ou mesmo um fio quântico, porém extremamente maior que átomos, moléculas e clusters.<sup>2</sup>

Por possuir um tamanho pequeno, a função de onda se estende de maneira homogênea ao longo do material e o quadrado do momento de dipolo dos éxcitons aumenta proporcionalmente com o volume dos Q-Dots. As características das propriedades ópticas dos Q-Dots podem ser resumidas ao efeito do confinamento quântico e ao efeito de superfície (referente à razão superfície/volume dos Q-Dots ser maior que 20%).<sup>52</sup>

Entretanto, tais efeitos são frequentemente mascarados pelo alargamento (não homogêneo) do espectro óptico causado pela formação de Q-Dots com tamanhos diferentes num mesmo sistema. Essa diferenciação no tamanho dos Q-Dots obtidos é proveniente da forma como ele é sintetizado, levando a uma distribuição gaussiana de tamanhos e conseqüentemente a uma distribuição gaussiana de frequências de emissão. A Figura 4 ilustra o comportamento ideal e o real da energia dos elétrons em um Q-Dot.<sup>66</sup>



**Figura 4.** Densidade de estados em um Q-Dot em relação a energia dos elétrons. a) comportamento ideal do Q-Dot onde as partículas possuem o mesmo tamanho e conseqüentemente, os elétrons possuem a mesma energia. b) comportamento real dos Q-Dots, onde o tamanho das partículas varia e os elétrons possuem energias diferentes, gerando uma infinidade de níveis de energia provocando um alargamento não homogêneo dos mesmos. ( $E_c$ : parte inferior da banda de condução,  $E_f$ : estado fundamental e  $E_1$ : estado excitado). Adaptado da referência 66.

Os Q-Dots apresentam características ópticas e eletrônicas únicas justamente por possuírem uma distribuição não homogênea na energia dos níveis eletrônicos. Como consequência dos vários níveis de energia presentes em um sistema Q-Dot existem diversas possibilidades para a recombinação dos elétrons, possibilitando uma recuperação extremamente rápida quando submetidos a condições de absorção de energia.<sup>67,68</sup>

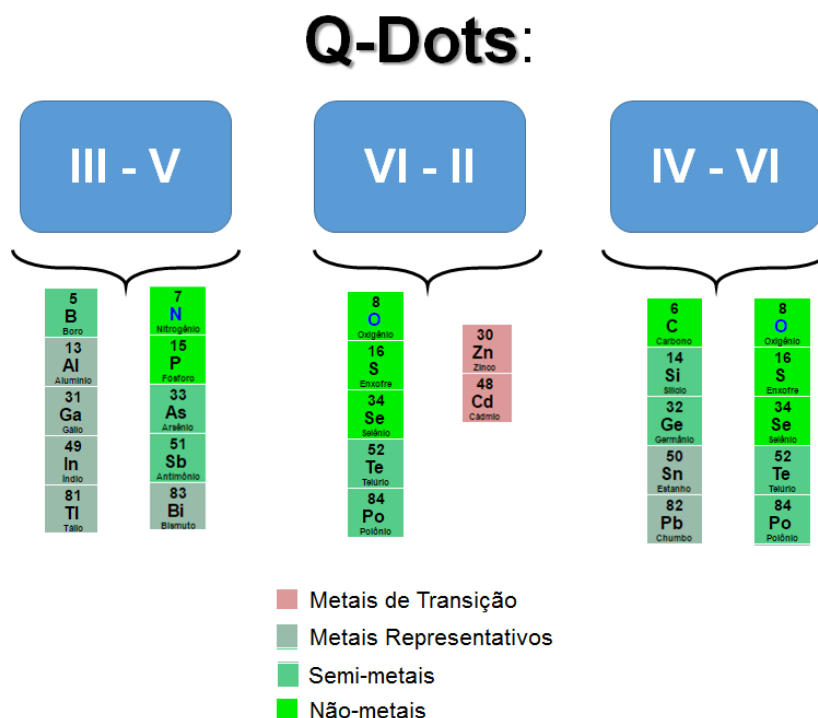
As características extremamente interessantes apresentadas pelos Q-Dots possibilitaram sua aplicação em vários ramos da ciência e tecnologia: na informática, na construção de lasers e dispositivos emissores de luz, na fabricação de telas de televisão e computadores, no imageamento celular, na liberação controlada de fármacos, dentre outros.<sup>69</sup>



Além das possibilidades de utilização dos Q-Dots em vários ramos da tecnologia, torna-se viável a concepção de estruturas com comportamentos de átomos, moléculas e cristais a medida que se modula o tamanho e forma da nanopartícula em seu processo de síntese. Estas tendências sintéticas podem ser vistas como um novo ramo para a ciência sendo extremamente atrativo do ponto de vista físico e químico. A limitação até então existente de se estudar apenas materiais complexos obtidos a partir natureza é substituída por novas possibilidades de estudos.

### Q-Dots de carbono

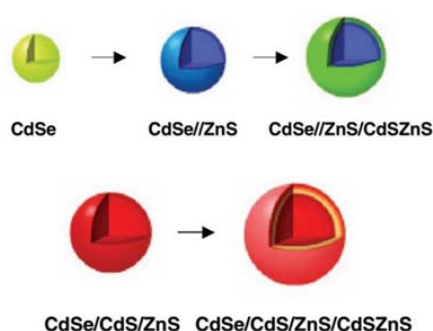
Existem muitas formas descritas para a síntese de Q-Dots metálicos, sendo as mais comuns provenientes da combinação de elementos dos grupos III-V, VI-II, e IV-VI da tabela periódica (Figura 5).<sup>70</sup> Os Q-Dots mais estudados até os dias de hoje são os derivados de Cádmio devido as suas excelentes propriedades ópticas, eletroquímicas e de fluorescência,<sup>71</sup> sendo amplamente utilizados no biosensoriamento intracelular e no imageamento celular *in vivo*.<sup>72,73</sup> Alguns exemplos de Q-Dots são: CdS, CdSe, CdTe.<sup>74</sup> Entretanto, o Cd por ser um metal bioacumulativo apresenta citotoxicidade elevada quando utilizado em sistemas biológicos vivos.<sup>75-80</sup>



**Figura 5.** Grupos de elementos que quando combinados podem possibilitar a formação de um Q-Dot.

Com o objetivo de se aumentar a biocompatibilidade, o rendimento quântico da fotoluminescência bem como a estabilidade desses nanocristais, foram propostos sistemas contendo uma fina camada de semicondutores com energia de *band gap* superior ao do Cd, formando um sistema casca/núcleo (Figura 6).<sup>70</sup> São exemplos desses sistemas: CdSe@ZnSe,<sup>81</sup> CdTe@CdS,<sup>82</sup> CdSe@ZnS, CdSeTe@ZnS.<sup>83,84</sup> Mesmo com essa modificação estrutural, vários estudos posteriores mostraram que Q-Dots contendo metais pesados em sua composição são tóxicos para os vertebrados, mesmo em concentrações relativamente baixas (partes por milhão).<sup>76,78,85-87</sup>

### Sistemas casca-núcleo (*core-shell*):

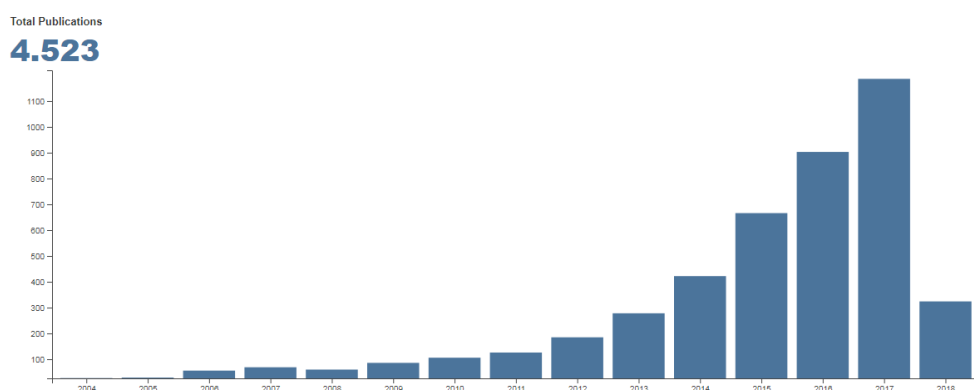


**Figura 6.** Exemplos de Q-Dots obtidos por meio da síntese de sistemas casca-núcleo. Adaptado da referência 70.

Nesse contexto, alguns grupos de pesquisas passaram a concentrar seus estudos no desenvolvimento de Q-Dots biocompatíveis, com potencial aplicação como marcadores celulares. Alguns dos materiais biocompatíveis mais promissores foram o Q-Dot de carbono (chamado de C-Dot) e o de silício (Si-Dot). Apesar de ter apresentado uma excelente biocompatibilidade, os Si-Dot sofrem degradação oxidativa no ambiente celular, sendo necessárias modificações superficiais dos nanomateriais, a fim de se coibir esse processo.<sup>88</sup> Em contrapartida os C-Dot, no geral, apresentam baixa citotoxicidade e estabilidade quando expostos ao ambiente celular.<sup>89</sup>

A obtenção de C-Dots foi relatada pela primeira vez em 2004 por Scrivens e colaboradores.<sup>90</sup> Na etapa de purificação do material de seu estudo (nanotubos de carbono isolados) o pesquisador submeteu a mistura reacional à eletroforese, o que levou à observação da formação de partículas de carbono com propriedades luminescentes.<sup>90</sup> A partir desse relato vários pesquisadores passaram a investigar as propriedades desses novos materiais nanométricos, com um especial interesse nas características ópticas de fotoluminescência.<sup>91-94</sup>

O carbono é um dos elementos mais abundante e renovável encontrado na Terra, sendo assim, a possibilidade de se obter sistemas nanométricos com potencial aplicação tecnológica e biotecnológica despertou o interesse da comunidade científica.<sup>95,96</sup> Desde 2004, uma quantidade crescente de trabalhos envolvendo os C-Dots vem sendo descritos na literatura (Figura 5). A Figura 7 foi gerada no site *Web of Science* com a seguinte configuração de pesquisa: *TOPIC: ("carbon dot\*" NOT nanotube\* or "carbon nanoparticle\*" NOT nanotube\* or "C-dot\*" NOT nanotube\*) AND YEAR PUBLISHED: (2004-2018)*.



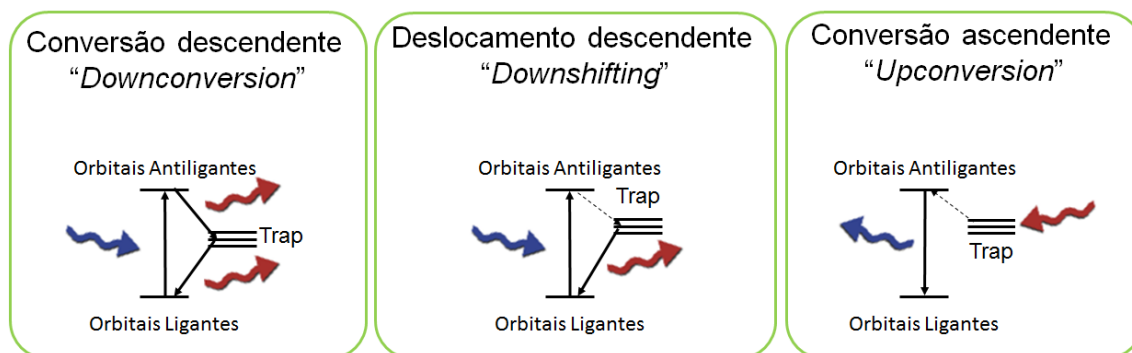
**Figura 7.** Número de publicações em relação aos anos, a partir de 2004, sendo pesquisados os tópicos *"carbon dot\*" NOT nanotube\* or "carbon nanoparticle\*" NOT nanotube\* or "C-dot\*" NOT nanotube\**. Obtido em 22/03/2018.

Os C-Dot constituem uma classe fascinante de nanopartículas quase esféricas (com defeitos em sua superfície) e com tamanhos inferiores a 10 nm.<sup>97-99</sup> Como possuem um tamanho muito pequeno, apresentam níveis discretos de energia (confinamento quântico). Comparado com os Q-Dots convencionais, os C-Dots são superiores em termos de estabilidade química (são inertes), são economicamente mais acessíveis, são virtualmente não-citotóxicos e possuem excelente biocompatibilidade.<sup>100,101</sup> Além das vantagens destacadas anteriormente, os C-Dots apresentam resistência a fotodegradação, possuem rotas sintéticas relativamente simples, sua bioconjugação é extremamente facilitada e são ambientalmente amigáveis (entretanto não existem estudos específicos sobre o impacto ambiental que causariam).<sup>93,94,99</sup>

Os C-Dots apresentam comportamento de quimioluminescência e eletroquimioluminescência que são dependentes do tamanho da partícula, da sua forma específica, composição e estrutura interna e do comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ )

ao qual é submetida, pois possuem características excepcionais de elétrons doadores e receptores.<sup>95,96</sup>

Os mecanismos pelos quais os C-Dots emitem luz são: a conversão descendente, do inglês *down conversion*; a conversão ascendente, do inglês *upconversion*; e o deslocamento descendente, do inglês *downshifting*. No mecanismo de conversão descendente, o material é excitado em determinado comprimento de onda e a emissão de luz ocorre em comprimentos de onda menos energéticos. No mecanismo de conversão ascendente, o material é excitado em comprimentos de onda menos energéticos e a emissão de luz ocorre em comprimentos de onda mais energéticos. No mecanismo de deslocamento descendente, o material é excitado em comprimentos de onda mais energéticos (ocorrem perdas de energia via mecanismos não radiativos) e emite em comprimentos menos energéticos, como ilustra a Figura 8.



**Figura 8.** Algumas possibilidades de emissão de energia que ocorrem com os C-Dots.

A explicação para a ocorrência do fenômeno de fotoluminescência via mecanismo de conversão ascendente ainda não foi bem estabelecida. Muitos pesquisadores atribuem esse fenômeno ao processo de excitação multifóton.<sup>102-106</sup> Li e colaboradores<sup>107</sup> apresentam algumas possibilidades de fenômenos que podem explicar esse comportamento fotoluminescente diferenciado apresentado pelos C-Dots, dentre elas se destaca a que sugere a existência de armadilhas de energia originadas dos defeitos de superfície existente nas nanopartículas. Shen e colaboradores<sup>108</sup> acreditam que o que observamos é o resultado da excitação de elétrons do orbital  $\pi$  para um estado de maior energia (Orbital desocupado de menor energia - LUMO), quando esses elétrons relaxam vão para o orbital  $\sigma$ , liberando mais energia do que a absorvida. Wen e colaboradores<sup>109</sup> acreditam que o fenômeno de conversão ascendente é, na verdade um sinal gerado pela emissão de segunda ordem da lâmpada do equipamento que o monocromador não

consegue barrar. Esse último grupo de pesquisa não acredita que esteja de fato ocorrendo o fenômeno de fotoluminescência via mecanismo de conversão ascendente.

Apesar de ainda não ter sido completamente compreendido, o processo de conversão ascendente permite a utilização (absorção) de maneira eficiente de todo o espectro de luz visível e possibilita a aplicação dos C-Dots em experimentos de terapia fotodinâmica, no carreamento de fármacos com liberação controlada, em terapias anticâncer, dentre outros.<sup>95,99,102</sup>

Como um dos fatores que influencia a fotoluminescência dos C-Dots é o tamanho das nanopartículas obtidas, a metodologia de obtenção escolhida para a síntese é determinante nas propriedades do material. Ou seja, é possível se moldar os C-Dots de acordo com as propriedades e o interesse de aplicação do material.<sup>99</sup>

As possibilidades de síntese do C-Dots são classificadas em duas categorias gerais: métodos *top-down* e métodos *bottom-up*. Nos métodos *top-down*, normalmente, é utilizada a ablação à laser,<sup>98,110</sup> oxidação eletroquímica,<sup>111</sup> imersão eletroquímica de nanotubos de carbono,<sup>112</sup> oxidação térmica de precursores moleculares adequados,<sup>97,113</sup> a partir da fuligem gerada pela combustão de velas<sup>114</sup> ou de gás<sup>115</sup> e síntese no microondas,<sup>116</sup> dentre outras. Em todas as metodologias *top-down*, os C-Dots são formados pela quebra de estruturas de carbono maiores, o que fornece uma infinidade de possibilidades de obtenção das nanopartículas mudando apenas o material precursor. Nos métodos *bottom-up*, os C-dots são formados a partir de precursores moleculares em solução. Algumas das soluções utilizadas são: citrato,<sup>117</sup> carboidratos,<sup>118,119</sup> nanocompositos de polímero-sílica;<sup>120</sup> por meio de tratamentos térmicos ou combustão e rotas de síntese utilizando microondas. Um outro exemplo de metodologia *bottom-up* simples, porém refinada foi apresentada por Zhu e colaboradores.<sup>69</sup> O grupo utilizou microesferas de sílica como suporte que funcionaram como micro reatores promovendo a formação dos C-Dots no seu interior poroso.<sup>101</sup>

A maioria das metodologias de obtenção dos C-Dots promove a oxidação da superfície das nanopartículas, em maiores ou menores proporções (dependendo da proporção de O<sub>2</sub> utilizada no processo), possibilitando a futura formação de ligações covalentes entre átomos de carbono da superfície das nanopartículas e heteroátomos. O processo de modificação da superfície de C-Dot por meio da inserção de novos grupos ou moléculas é conhecido como passivação.

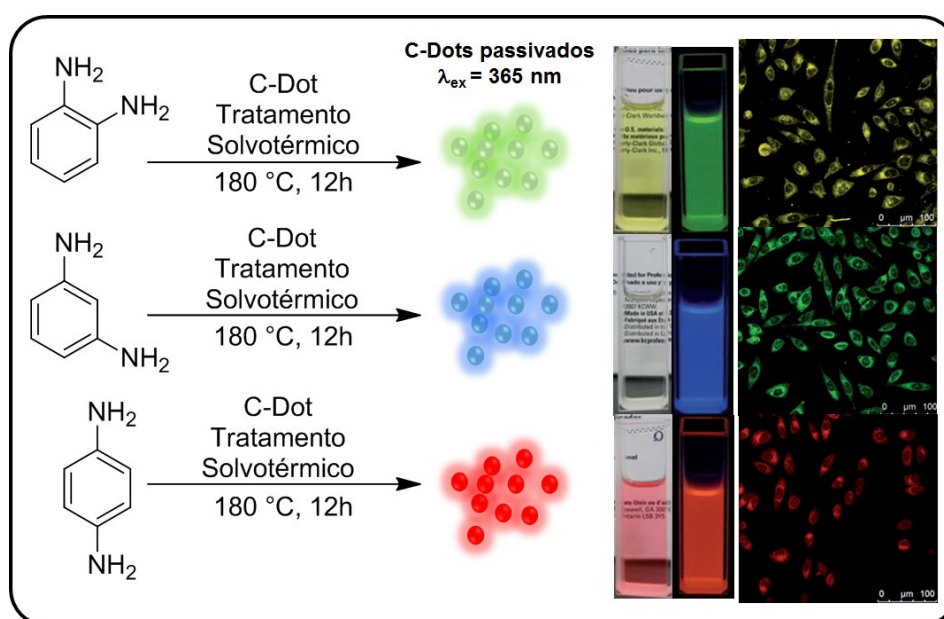
Átomos de O e N são facilmente introduzidos nas nanopartículas. Uma forma é utilizando-os para quebrar grandes estruturas de carbono (método *top-down*) por meio de reações químicas promovidas devido as características nucleofílicas desses átomos. Outra forma é utilizando precursores moleculares que já possuem O e N em suas estruturas (método *bottom-up*).<sup>94</sup> Recentemente, Zhang e colaboradores propuseram uma nova metodologia de obtenção de C-Dots dopados com nitrogênio, submetendo apenas etanolamina à pirólise.<sup>121</sup>

A introdução de grupos oxigenados e aminados na superfície dos C-Dots confere ao material excelente solubilidade em água. Facilita, também, sua futura funcionalização com diversos grupos orgânicos, inorgânicos, poliméricos ou espécies biológicas (favorecendo sua bioconjugação).<sup>40</sup>

Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) mostraram que todos os átomos de carbono que constituem os C-Dots possuem hibridização  $sp^2$ , indicando que as nanopartículas são formadas por sistemas conjugados.<sup>99,122</sup> Sendo assim, a funcionalização da superfície das nanopartículas utilizando grupos amins possibilita o aumento da conjugação das ligações  $\pi$  do material e um aumento na estabilidade da energia das armadilhas de emissão na superfície dos C-Dots.<sup>123,124</sup> Diferente do que é observado quando a passivação dos C-Dots é realizada com grupos oxigenados, uma vez que esses grupos facilitam a emissão de energia via mecanismos não radiativos.<sup>94</sup> Existem grande diferenças nas propriedades de C-Dots aminados e oxigenados. Sendo assim a escolha do agente passivador promoverá a obtenção de materiais com características intrínsecas únicas.

Ao se comparar os valores de rendimento quântico de C-Dots oxigenados e aminados nota-se uma grande discrepância. Como exemplo, a maioria dos C-Dots passivados apenas com grupos oxigenados apresentam valores de RQ por volta de 10%,<sup>94</sup> enquanto que C-dots aminados apresentam valores de RQ que podem chegar até 80%,<sup>125</sup> o que é comparável com os valores apresentados pela maioria dos corantes orgânicos e Q-Dots semicondutores. Essa diferença entre RQ pode ser explicada pela forma com a qual os níveis energéticos do C-Dots são estabilizados (pelo N) ou desestabilizado (pelo O) como explicado anteriormente.

Estudos recentes envolvendo a passivação de C-Dots com fenilenodiamina mostraram que a diferença na posição dos grupos amins no anel (orto, meta ou para) promovem uma variação na coloração da luminescência do material.<sup>126</sup> As partículas passivadas com *o*-fenilenodiamina apresentaram luminescência na cor verde, com *m*-fenilenodiamina apresentaram luminescência na cor azul e as com *p*-fenilenodiamina apresentaram luminescência na cor vermelha. Os C-Dots foram testados no imageamento celular, e conseguiram transpor a membrana celular, entretanto não apresentaram seletividade para nenhuma organela, ficando dispersa no citoplasma celular, como ilustra o Esquema 2.



**Esquema 2.** À esquerda tem-se a metodologia da passivação dos C-Dots passivado com orto, meta e para fenilenodiamina. Ao meio tem-se as fotografias dos C-Dots obtidos, dispersos em etanol, sob luz ambiente (esquerda) e sob excitação de  $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$  (direita). E à direita tem-se as imagens das células MCF-7 incubadas com os C-Dots sintetizados obtida por meio de um microscópio confocal ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ). Adaptado da referência 126.

Além das características positivas apresentadas inerentes aos C-Dots, eles apresentam elevada fotoestabilidade, o que significa que a intensidade de emissão (fluorescência) continua constante em longos tempos de exposição à excitação.<sup>126</sup> O que não ocorre com moléculas orgânicas utilizadas como marcadores celulares, pois degradam quando submetidas a longos tempos de exposição à excitação, diminuindo seu

RQ.<sup>127</sup> Em comparação com corantes fluorescentes convencionais, os C-Dots exibem, no geral, emissão em um espectro bem mais estreito.

Uma grande quantidade de trabalhos que utilizam os C-Dots no imageamento celular relatam que os materiais apresentam alta biocompatibilidade e viabilidade celular, elevada fotoestabilidade, RQ comparáveis ao de marcadores orgânicos e conseguem permear a membrana celular com facilidade, marcando todo o citoplasma. A principal diferença nos C-Dots estudados consiste na passivação de sua superfície.<sup>95,102,128-130</sup>

Um exemplo de trabalho de bioimageamento foi publicado por Sun e colaboradores.<sup>131</sup> Nele foi descrita a obtenção de um C-Dot passivado com polietilenoglicoldiamina (PEG<sub>1500</sub>), e os testes de toxicidade *in vivo* realizados em ratos, bem como em várias linhagens de células humanas cancerígenas indicaram que as nanopartículas não são citotóxicas. O material apresenta RQ de fotoluminescência em torno de 40%. Foram realizados testes de bioimageamento celular, que mostraram que o C-Dot foi internalizado pela célula, entretanto não apresentou seletividade na marcação de organelas, ficando disperso no citoplasma celular.

Chang e colaboradores<sup>132</sup> realizaram experimentos para testar a viabilidade do imageamento celular com C-Dots utilizando células de rim de porco (LLC-PK1). Os C-Dots utilizados nesse trabalho foram obtidos utilizando grão de café. O processo de internalização do C-Dot pela célula se deu via endocitose, e pôde-se observar que após sua internalização as nanopartículas foram localizadas no citoplasma e na membrana das células LLC-PK1. Os C-Dots sintetizados nesse trabalho apresentaram excelente fotoestabilidade, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade (viabilidade celular acima de 95%, mesmo com concentrações elevadas – 1,8 mg mL<sup>-1</sup>).

Células de adenocarcinomas de pulmão humano foram usadas para se avaliar a biocompatibilidade de C-Dots obtidos por meio do tratamento hidrotérmico de quitosana e posteriormente funcionalizados com aminas, por Liu e colaboradores.<sup>133</sup> As nanopartículas apresentaram viabilidade celular e baixa citotoxicidade. Foram facilmente internalizadas pela célula, ficando dispersas no citoplasma e na membrana celular e não conseguiram entrar no núcleo celular.

Os C-Dots também têm sido empregados como nanosensores. Shangguan e colaboradores<sup>134</sup> sintetizaram C-Dots utilizando *N*-( $\beta$ -aminoetil)- $\gamma$ -aminopropil metildimetoxisilano (AEAPMS) como principal matéria prima. O C-dots foram



depositados na superfície de nanopartículas de silício dopadas com rodamina, sendo assim o material nanométrico final obtido apresentou emissão em duas colorações (azul: proveniente dos C-Dots e vermelha: proveniente da sílica dopada com rodamina) e, na presença de cátions  $\text{Cu}^{2+}$  foi observada a supressão da emissão na coloração azul, uma vez que esse cátion pode interagir com os grupos residuais de etilenodiamina assim como sofrer reações de silanização com os grupos presentes na superfície dos C-Dots.

Wu e colaboradores<sup>135</sup> reportaram, em 2013, o primeiro C-Dot utilizado como sensor de  $\text{H}_2\text{S}$  em meio aquoso. Este sensor é ativado por meio do processo de transferência ressonante de energia por fluorescência (conhecido como FRET). O  $\text{H}_2\text{S}$  está presente no corpo humano e contribui para processos de regulação do sistema cardiovascular, neural e imunológico. O  $\text{H}_2\text{S}$  também está associado à algumas doenças como hipertensão e Alzheimer, entretanto pouco se sabe sobre como a presença do  $\text{H}_2\text{S}$  contribui nesses processos. Sendo assim a síntese de um biossensor específico para essa molécula pode contribuir para a compreensão do seu metabolismo celular.<sup>136</sup> Para a obtenção do nanossensor utilizado nesse trabalho, foram obtidos C-Dots dopados com átomos de N em sua estrutura e, em seguida, a superfície das nanopartículas foi passivada com a sonda para o reconhecimento do  $\text{H}_2\text{S}$ , naftalimida-azida. O C-Dot obtido, quando excitado, emite luz na coloração azul, mas quando em contato com o  $\text{H}_2\text{S}$  passa a emitir no verde, com limite de detecção extremamente baixo (10 nM).

Tendo em vista todas as características inerentes aos C-Dots e que o fator determinante para o aumento de sua citotoxicidade é o grupo utilizado na passivação,<sup>131</sup> nosso grupo de pesquisa propôs a síntese de um C-Dot, obtido por meio da carbonização de esturmo de vaca e posteriormente passivado com etilenodiamina (EDA).<sup>137</sup> A escolha da EDA para funcionalizar as nanopartículas de carbono surgiu do fato de que C-Dots passivados com grupos aminados apresentam elevados valores de RQ (alcançando até 45% utilizando o sulfato de quinina como padrão)<sup>107</sup>. Muitos trabalhos publicados tem utilizado a EDA como agente passivador por ser uma molécula simples “fonte” de nitrogênio.<sup>138,139</sup> A escolha de EDA também se deu principalmente pelo fato de estruturas celulares apresentarem afinidade com grupos nitrogenados, o que possibilita o aumento da biocompatibilidade dos marcadores luminescentes.<sup>140</sup>

Os experimentos de imageamento celular realizados com os C-Dots passivados com EDA preparados por nosso grupo mostraram que esse novo sistema marca seletivamente e de maneira eficiente o nucléolo, no interior do núcleo celular.<sup>137</sup> Resultado diferente

dos relatados na literatura até então<sup>141</sup> e que motivaram o estudo apresentado no presente trabalho.

Levando em consideração os resultados surpreendentes obtidos previamente a partir da passivação do C-Dot com EDA,<sup>137</sup> surgiu o interesse no estudo do comportamento dos C-Dots com outros tipos de aminas. Como nosso grupo tem uma linha de pesquisa voltada para a síntese de fluoróforos com potencial aplicação no bioimageamento, com destaque para o núcleo 2,1,3- benzotiadiazola (BTD), a passivação dos C-Dots com esse fluoróforo pareceu extremamente promissora.

Como foi disposto na introdução, o núcleo BTD apresenta diversas características desejáveis para marcadores celulares e a inserção de um grupo amino na posição 4 do anel BTD dá origem à 4-amino-2,1,3-benzotiadiazola (BTD-NH<sub>2</sub>, disponível comercialmente), dessa forma, o fluoróforo pode ser utilizado na passivação de C-Dots. Assim como a passivação do C-Dot com apenas EDA originou um nanomaterial com comportamento surpreendente foi esperado que sua utilização juntamente com a BTD-NH<sub>2</sub> como agentes passivadores pudesse originar uma nova nanopartícula com igual ou superior atividade de marcação celular.

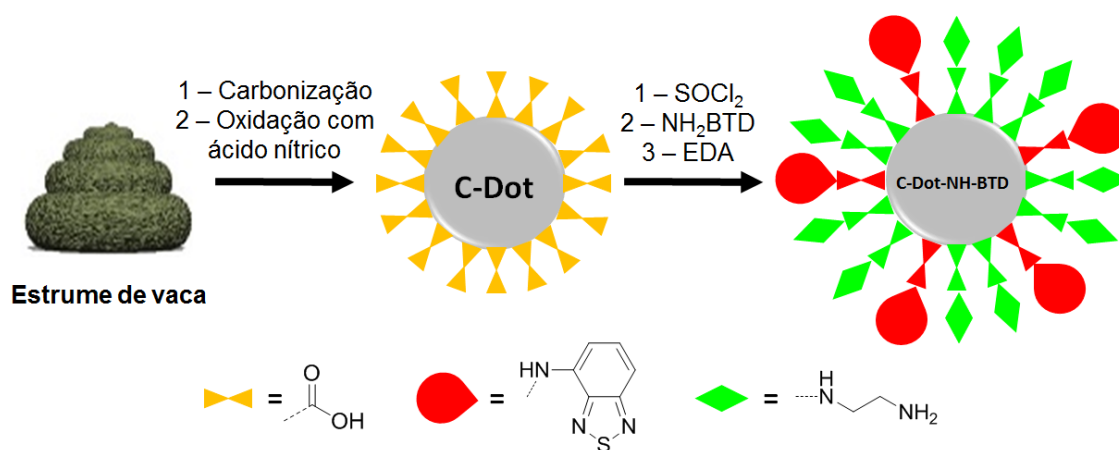
# Parte Experimental

## Parte Experimental

### 1.1 - Obtenção do C-Dot passivado com aminas:

O C-Dot estudado nesse trabalho, foi sintetizado utilizando como matéria prima (fonte de carbono) dejetos (estrupe) de vaca. 10 g de estrume de vaca fresco foram secos em um forno à 120 °C antes de ser triturado até formar um pó fino. O material obtido foi calcinado à 300 °C por 3 h e em seguida resfriado até atingir temperatura ambiente. Posteriormente, o pó preto obtido da calcinação foi submetido a temperatura de refluxo com ácido nítrico (5,0 M, 250 mL) por 72 h. Transcorridas as 72 h, a suspensão foi resfriada e submetida a um processo de filtração com o objetivo de se remover partículas insolúveis e em seguida centrifugada a 6000 rpms por 20 min. O sobrenadante contendo os C-dots foi filtrado com uma membrana de 0,22 µm para garantir a remoção de partículas grandes. Por fim, a água foi removida por evaporação e as nanopartículas obtidas (6,0 g).<sup>137</sup>

Os grupos carboxílicos presentes na superfície dos C-Dots foram ativados e passivados pela 4-amino-2,1,3-benzotiadiazola (BTD-NH<sub>2</sub>) seguido pela etilenodiamina (EDA) para garantir que o processo de passivação fosse completo (Esquema 3).



**Esquema 3.** Representação do procedimento experimental para a síntese de C-dots passivados com BTD e EDA (C-Dot-NH-BTD). Em amarelo são representados os grupos ácido carboxílicos presentes na superfície do C-Dot. Em vermelho é representado o grupo amida obtido por meio da amidação do grupo ácido utilizando a BTD-NH. E em verde é representado o grupo amida obtido por meio da amidação do grupo ácido utilizando a EDA.

Primeiramente foi realizada a incorporação do reagente comercialmente disponível BT-D-NH<sub>2</sub>. C-Dots (0,171 g) foram tratados com cloreto de tionila recém destilado (10 mL) sob temperatura de refluxo, por 4 h. A mistura reacional foi resfriada até alcançar temperatura ambiente e o excesso de cloreto de tionila foi removido sob vácuo. Em seguida foram adicionados, no bolão, 250 mg de BT-D-NH<sub>2</sub> e 10 mL de MeCN seca. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 24 h. A mistura foi lavada 5 vezes com acetonitrila em abundância para garantir que a BT-D-NH<sub>2</sub> que não reagiu fosse removida da mistura. Em seguida, a mistura foi lavada 3 vezes com cada um dos solventes: acetato de etila, diclorometano, metanol e etanol. O excesso de solventes foi removido com auxílio de uma bomba de vácuo. Uma análise de IV do produto obtido foi realizada, o que indicou a presença de grupos carboxílicos na superfície dos C-Dots que ainda não haviam sido amidados bem como a presença de amidas. O procedimento foi repetido com EDA para completar a passivação. 7 mL de EDA foram lentamente adicionados ao produto obtido anteriormente. Após a adição, a mistura foi aquecida por 4 h à 115 °C. O sistema foi resfriado e o excesso de EDA do meio reacional removido com auxílio de uma bomba de vácuo. Em seguida, a mistura foi lavada 3 vezes com cada um dos solventes: acetato de etila, diclorometano, metanol e etanol. O excesso de solventes foi removido com auxílio de uma bomba de vácuo. O sólido obtido foi então dispersado em água. A mistura recém preparada foi centrifugada a 16000 rpms por 20 min e filtrada com uma membrana de 0,22 µm. Por fim a água foi removida com auxílio de um rotaevaporador e com uma bomba de vácuo culminando na obtenção dos C-Dots modificados (C-Dot-NH-BT-D). O produto obtido foi caracterizado e utilizado em experimentos de imageamento celular posteriormente descritos.

## 1.2 – Equipamentos e análises:

### →Infravermelho:

Os espectros de infravermelho (IV) dos C-dots foram obtidos utilizando patilhas de KBr, em uma faixa spectral de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando o espectrômetro Varian 640-IR com transformada de Fourier.

**→  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN:**

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Ascend™ Avance III HD de 14,1 T (600 MHz para  $^1\text{H}$  e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), utilizando uma sonda de diâmetro interno de 5 mm (BBOFO 5mm). Como solvente foi utilizado água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e como referência interna dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*6).

**→ Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta resolução (HRTEM):**

As imagens de HRTEM foram adquiridas por um microscópio eletrônico Jeol, JEM-2100, equipado com EDS, *Thermo scientific*, operado em uma voltagem acelerada de 200 kV. Uma solução etanólica diluída de C-Dot-NH-BTD foi preparada e depositada em um gride de cobre de 400 mesh revestido de carbono (Ted Pella Inc-USA). Após a evaporação natural do solvente a amostra foi analisada.

**→ Espectrofotômetro de Absorção:**

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro CaryWin 50 Varian.

**→ Espectrofotômetro de Fluorescência:**

Os espectros de emissão, o rendimento quântico e a fotoestabilidade foram obtidos utilizando um Espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian CA-USA). O rendimento quântico relativo do C-Dot-NH-BTD foi adquirido utilizando o sulfato de quinina como padrão ( $\Phi_f 0.54$ )<sup>142</sup> e de acordo com a metodologia proposta pela *Jobin Yvon HORIBA*.

**→ Analisador de potencial zeta:**

A análise de potencial zeta foi realizada em solução aquosa (com água deionizada) de concentração de C-Dot-NH-BTD 0,2 g.L<sup>-1</sup> utilizando o equipamento Zetasizer Nano (Malvern).

### 1.3 - Experimentos de imageamento celular:

A experimentação em células foi realizada pelo grupo Coordenado pelo Prof. Dr. José R. Corrêa (IB-UnB).

A linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) utilizadas nos testes foram cultivadas em lamelas inseridas no interior de placas de 24 poços e mantidas em meio de D-MEM (Sigma, MO – USA) e suplementadas com soro fetal de bezerro à 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Foram preparadas duas amostras com as células. Uma das amostras foi incubada viva com o C-Dot-NH-BTD com concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup> por 30 minutos à 37 °C. Após esse período a amostra foi lavada três vezes com tampão salino de fosfato (PBS) na temperatura ambiente e em seguida fixadas na presença de formalina. A segunda amostra foi previamente fixada na presença de formalina, lavada três vezes com PBS à temperatura ambiente e em seguida foi incubada com o C-Dot-NH-BTD com concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup> por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as duas amostras foram lavadas três vezes com PBS à temperatura ambiente. Nesse primeiro momento, não foi realizada nenhuma marcação do núcleo com coloração com o objetivo de se analisar a afinidade do C-Dot-NH-BTD com o núcleo celular. As amostras foram montadas em lâminas de vidro utilizando o reagente ProLong® Gold Antifade (Life Technologies, NY – USA). As imagens celulares foram adquiridas utilizando o microscópio confocal de escaneamento à laser TCS SP5 (Leica, IL – USA). As imagens obtidas foram comparadas com imagens adquiridas regularmente, a fim de comparação. Esse ensaio foi feito em triplicata e os testes foram realizados três vezes. Para marcar o núcleo celular, todas as amostras foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com uma solução de 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), marcador nuclear disponível comercialmente, com concentração de 300 nM (ThermoFisher Scientific, CA, USA) por 5 minutos. As amostras foram novamente lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas de vidro utilizando o reagente ProLong® Gold Antifade (Life Technologies, NY – USA). As imagens celulares foram adquiridas aplicando um laser nos comprimentos de excitação de 405 e 488 nm. Todos os ensaios foram realizados três vezes em triplicata.

# Resultados & Discussão





## Resultados e Discussão

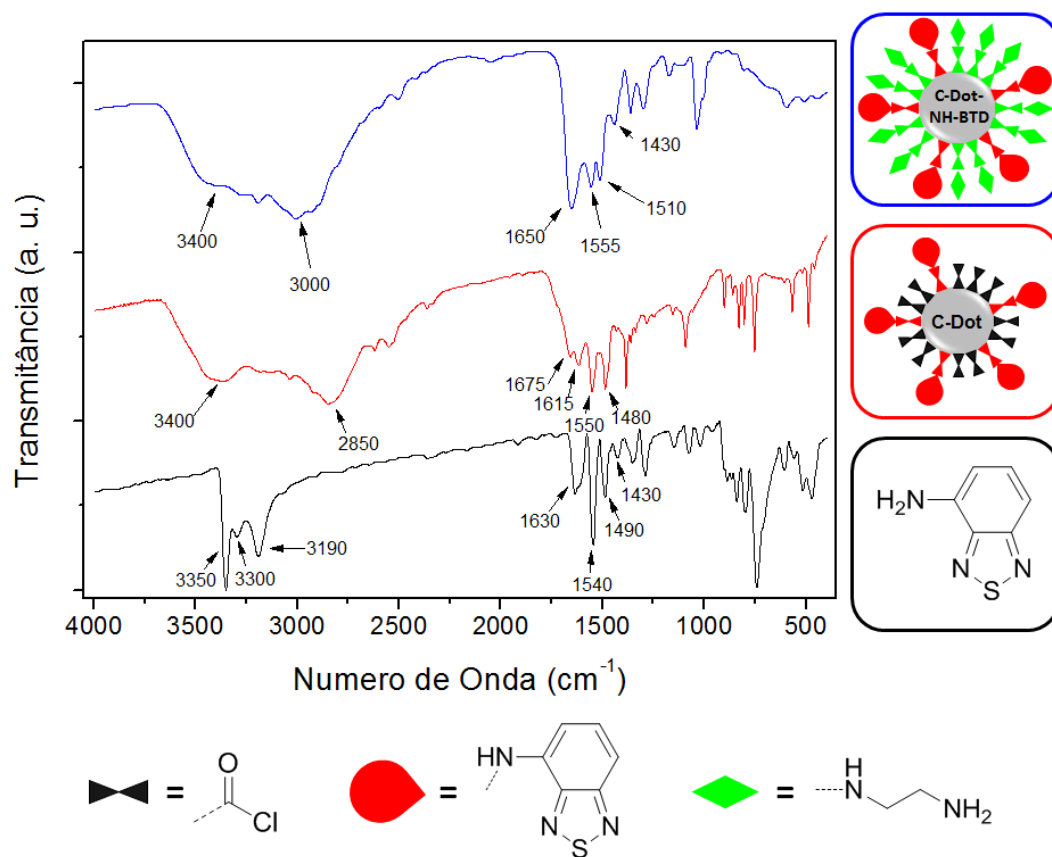
A aquisição dos espectros de FTIR foi de extrema importância para identificar se de fato as reações realizadas estariam culminando na modificação estrutural da superfície das nanopartícula. Para que fosse possível se comparar as diferenças nos comprimentos de onda nos espectros adquiridos da BTD-NH<sub>2</sub>, do C-Dot-NH-BTD e do C-Dot-NH-BTD com EDA os dados foram organizados em uma tabela (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais estiramentos observados nos espectros da BTD-NH<sub>2</sub>, C-Dot-NH-BTD e C-Dot-NH-BTD com EDA.

BTD-NH <sub>2</sub>		C-Dot-NH-BTD		C-Dot-NH-BTD com EDA	
Grupo	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )
C-N	1430	C=C	1480	C-N	1430
C=C	1490		1550	C=C	1510
	1540		1615	C=C	1555
C=N	1630	C=O	1675	C=O	1650
C-H (sp <sup>2</sup> )	3190	C-H (sp <sup>2</sup> )	2850	C-H (sp e sp <sup>2</sup> )	3000
H-N-H	3300	O-H	3400	N-H	3400
	3350				

No espectro da BTD-NH<sub>2</sub> (Figura 9, em preto) pode-se observar uma banda referente ao estiramento das ligações C=N em aproximadamente 1630 cm<sup>-1</sup>. Em 1540 e 1490 cm<sup>-1</sup> observam-se duas bandas referentes ao estiramento das ligações C=C aromáticas, em 1430 cm<sup>-1</sup> observa-se uma banda referente ao estiramento das ligações C-N, em 3190 cm<sup>-1</sup> uma banda referente ao estiramento das ligações C-H (sp<sup>2</sup>) e em 3300 e 3350 cm<sup>-1</sup> observam-se duas bandas referentes ao estiramento das ligações H-N-H. No espectro do C-Dot passivado apenas com a BTD (Figura 9, em vermelho) podem-se observar duas bandas referentes ao estiramento das ligações C=C da BTD sobrepostas as dos carbonos que constituem as nanopartículas em 1480 e 1550 cm<sup>-1</sup>, uma banda em 1615 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento das ligações C=O dos grupos amida recém formados, uma banda em 1675 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento das ligações C=O dos grupos de ácido carboxílicos restantes (que não reagiram com a BTD-NH<sub>2</sub>), uma banda larga em aproximadamente 2850 cm<sup>-1</sup> referente ao o estiramento das ligações C-H (sp<sup>2</sup> da BTD) e uma banda larga em aproximadamente 3400 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento das ligações O-H de ácido carboxílico. No espectro do C-Dot-NH-BTD passivado com BTD e EDA (Figura 9, em azul) podem ser observadas uma banda em 1430 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento das ligações C-N (da BTD e da EDA), uma banda em 1510 e uma em 1555

$\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento das ligações C=C (do anel BTD e dos C-Dots), uma banda um pouco alargada em aproximadamente  $1650 \text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento das ligações C=O das amidas formadas pela reação com a BTD e com a EDA, uma banda larga em aproximadamente  $3000 \text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento das ligações C-H ( $\text{sp}^3$  da EDA e  $\text{sp}^2$  da BTD) e uma banda larga em aproximadamente  $3400 \text{ cm}^{-1}$  de água presente na amostra. As principais diferenças nos espectros adquiridos, promovidas pelas modificações estruturais por meio das reações realizadas, foram observadas na região que indica os estiramentos que envolvem o grupo C=O.

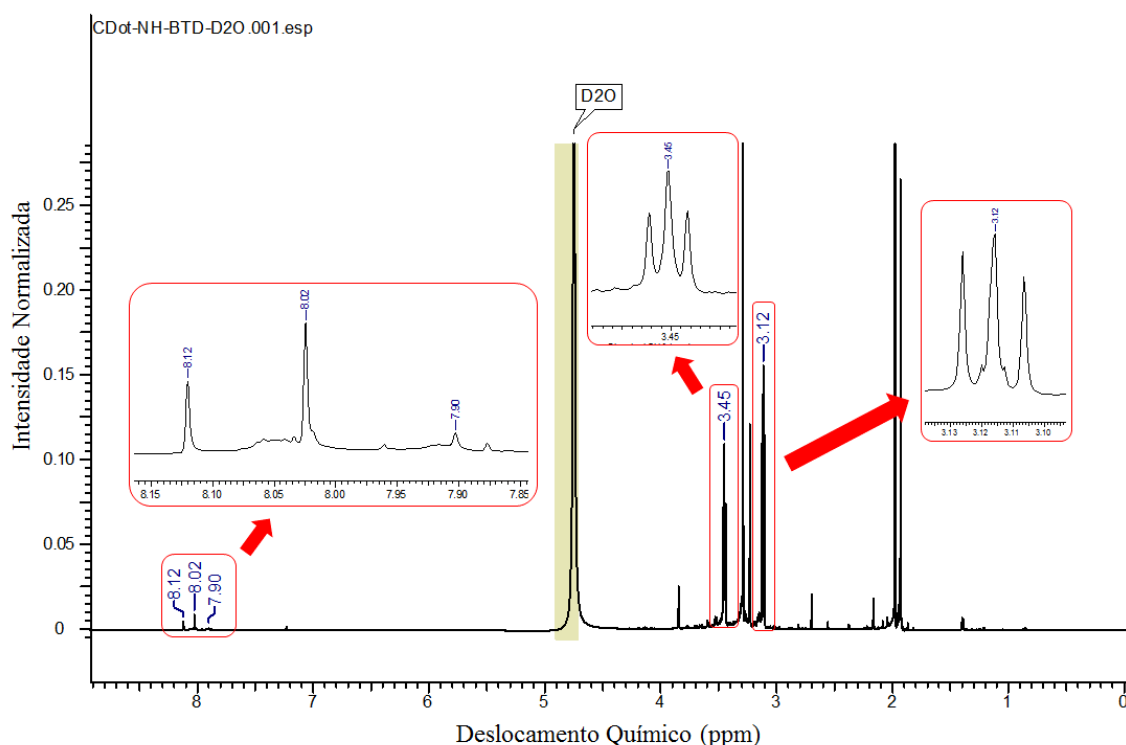


**Figura 9.** Espectros de IV do núcleo BTD (em preto), do C-Dot passivado apenas com a BTD (em vermelho) e o C-Dot-NH-BTD (em azul).

É sabido que diversos componentes celulares apresentam afinidade por sistemas que possuem moléculas nitrogenadas em sua estrutura.<sup>140,143</sup> Em um trabalho publicado anteriormente pelo grupo<sup>137</sup> C-Dots foram passivado apenas com EDA (C-Dot-NH<sub>2</sub>) e o sistema marcou seletivamente o nucléolo do núcleo celular. No presente trabalho foi proposta a modificação da superfície dos C-Dots utilizando o núcleo BTD. Entretanto essa molécula não apresenta nucleofilicidade elevada, o que é um indicativo de que a

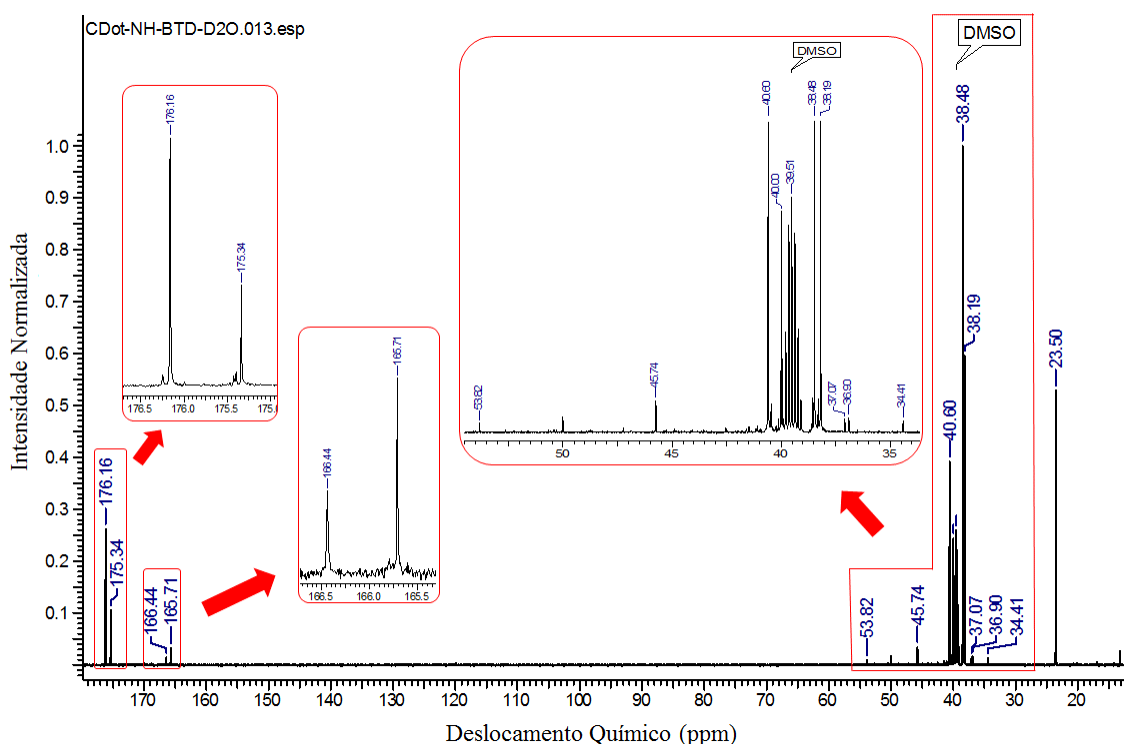
conversão dos grupos cloreto de ácido em amidas não seria completa. O espectro de FTIR do C-Dot obtido após a reação com a BTD (Figura 7, linha em vermelho) comprova esse comportamento esperado, uma vez que indicou a presença de uma banda em  $1615\text{ cm}^{-1}$  indicando o estiramento da ligação C=O referente à uma amida e uma banda em  $1675\text{ cm}^{-1}$  indicando o estiramento da ligação C=O referente à um grupo de ácido carboxílico que não sofreu amidação pelo grupo BTD-NH<sub>2</sub>. Sendo assim, para garantir a conversão completa dos grupos ácido, uma segunda etapa de amidação foi realizada. Nessa etapa, entretanto foi utilizada a EDA em largo excesso que apresenta uma nucleofilicidade muito superior à da BTD.

Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN permitiram a identificação de hidrogênios e carbonos com deslocamentos químicos característicos dos grupos que deveriam estar presentes na superfície das nanopartículas (na região dos aromáticos referente a porção BTD e na região de CH alifáticos referente a porção EDA), evidenciando, assim, que as reações de amidação ocorreram efetivamente. Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN são apresentados nas Figura 10 e figura 11, respectivamente.



**Figura 10.** RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 600 MHz) do C-Dot-NH-BTD. A parte do espectro em destaque apresenta os sinais referentes aos H do anel 2,1,3-benzotiadiazol e os tripletos referentes aos CH<sub>2</sub> da EDA.

Os sinais referentes aos  $^1\text{H}$  do anel BTB de 8,12 a 8,02 ppm apresentaram uma intensidade muito inferior aos demais sinais do espectro (Figura 10 em destaque), pois a porção da nanopartícula referente à BTB é inferior à dos demais componentes da nanopartícula. Os sinais referentes aos H da EDA podem ser observados em 3,12 ppm ( $t$ ,  $J = 6$  Hz -  $\text{CH}_2$ ) e em 3,45 ppm ( $t$ ,  $J = 6$  Hz -  $\text{CH}_2$ ), essa diferença no deslocamento dos dois sinais pode ser explicada pelo fato de existirem ambientes químicos diferentes na superfície das nanopartículas. Os sinais em 1,93, 1,98 e em 3,29 ppm são referentes a resíduos de solventes (acetonitrila, acetato de etila e metanol, respectivamente).

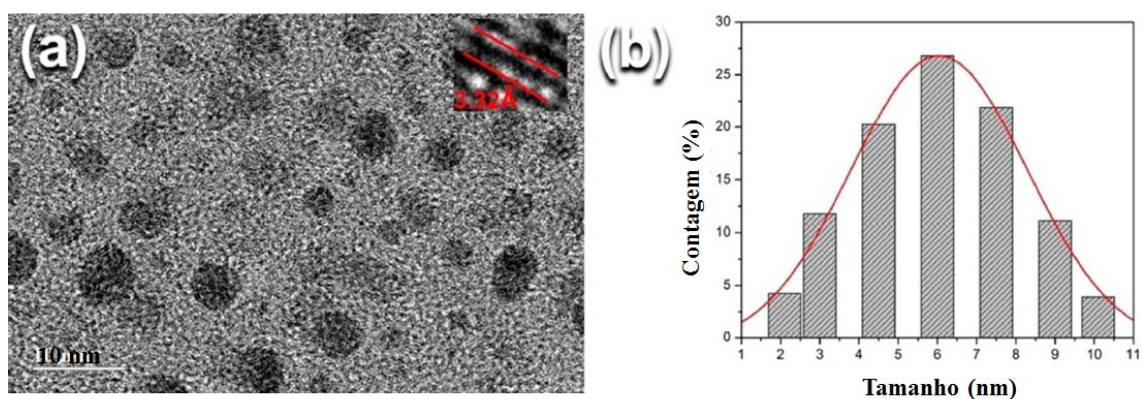


**Figura 11.** RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ , 150 MHz) do C-Dot-NH-BTD. É possível observar em destaque na figura os sinais referentes à EDA de 38 a aproximadamente 53 ppm, dois sinais referentes ao anel 2,1,3-benzotiadiazol que aparecem em 165,8 e 166,5 ppm e dois sinais em 175,5 e em 176,3 ppm referentes às amidas.

No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 11) é possível observar os carbonos que constituem a porção da EDA na nanopartícula com deslocamentos químicos diferentes (de 34 a 53 ppm), uma vez que o ambiente químico pode mudar ao longo da superfície das nanopartículas. São observados dois sinais pouco intensos referentes ao anel BTB em 165,8 e 166,5 ppm. O sinal em 175,5 ppm é referente ao carbono da amida formada pela porção EDA, o sinal em 176,3 ppm é referente ao carbono da amida formada pela porção BTB. Assim como no espectro de  $^1\text{H}$  também é possível observar no de  $^{13}\text{C}$  alguns sinais

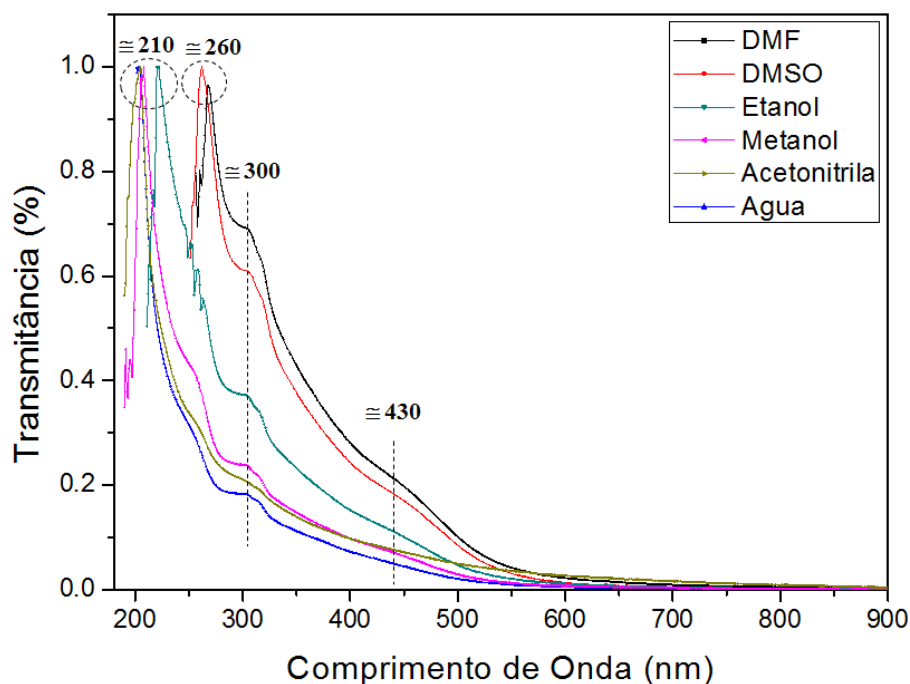
referentes aos solventes residuais (13,2 e 175,4 ppm referentes ao acetato de etila, 49,5 ppm referente ao metanol e 119,1 ppm referente a acetonitrila).

O HRTEM mostrou que o C-Dot-NH-BTD apresenta uma morfologia elipsoidal com uma distribuição estreita de tamanho de aproximadamente 5,2 nm. Também revelou a estrutura cristalina com distância interplanar de 3,32 Å, o que está de acordo com o plano cristalográfico (002) do grafite. A Figura 12 apresenta as imagens obtidas nessa análise.



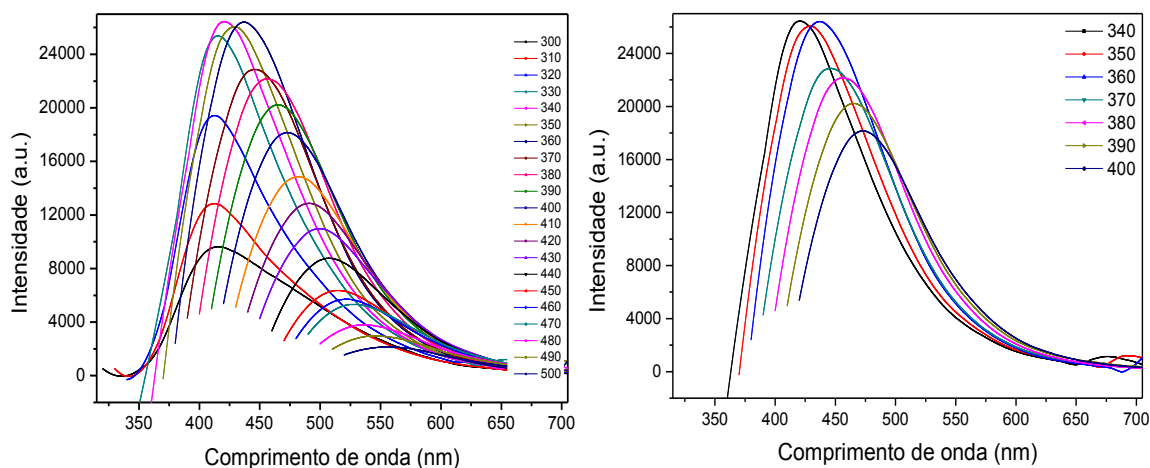
**Figura 12.** (a) Imagem de HRTEM dos C-Dot-NH-BTD. (b) Distribuição do tamanho das nanopartículas (percentual em relação ao diâmetro).

Os espectros de absorção, apresentados na Figura 13, indicaram que a natureza dos solventes utilizados interferem no deslocamento do comprimento de onda de absorção do material. Na presença do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF), o material apresentou um deslocamento batocrômico pronunciado, levando a primeira banda de absorção para aproximadamente 260 nm. Nos demais solventes, é possível observar a primeira banda de absorção em aproximadamente 210 nm. Esta primeira banda indica (em todos os solventes) a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  das ligações C-C aromáticas. O “ombro” em aproximadamente 300 nm pode ser atribuído à transição  $n \rightarrow \pi^*$ . O “ombro” alargado em aproximadamente 430 nm pode ser atribuído à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos carbonos aromáticos do anel BTB.<sup>94</sup>



**Figura 13.** Espectros de absorção (UV) do C-DOT-NH-BTD com concentração de  $0,346 \text{ g L}^{-1}$  em diferentes solventes.

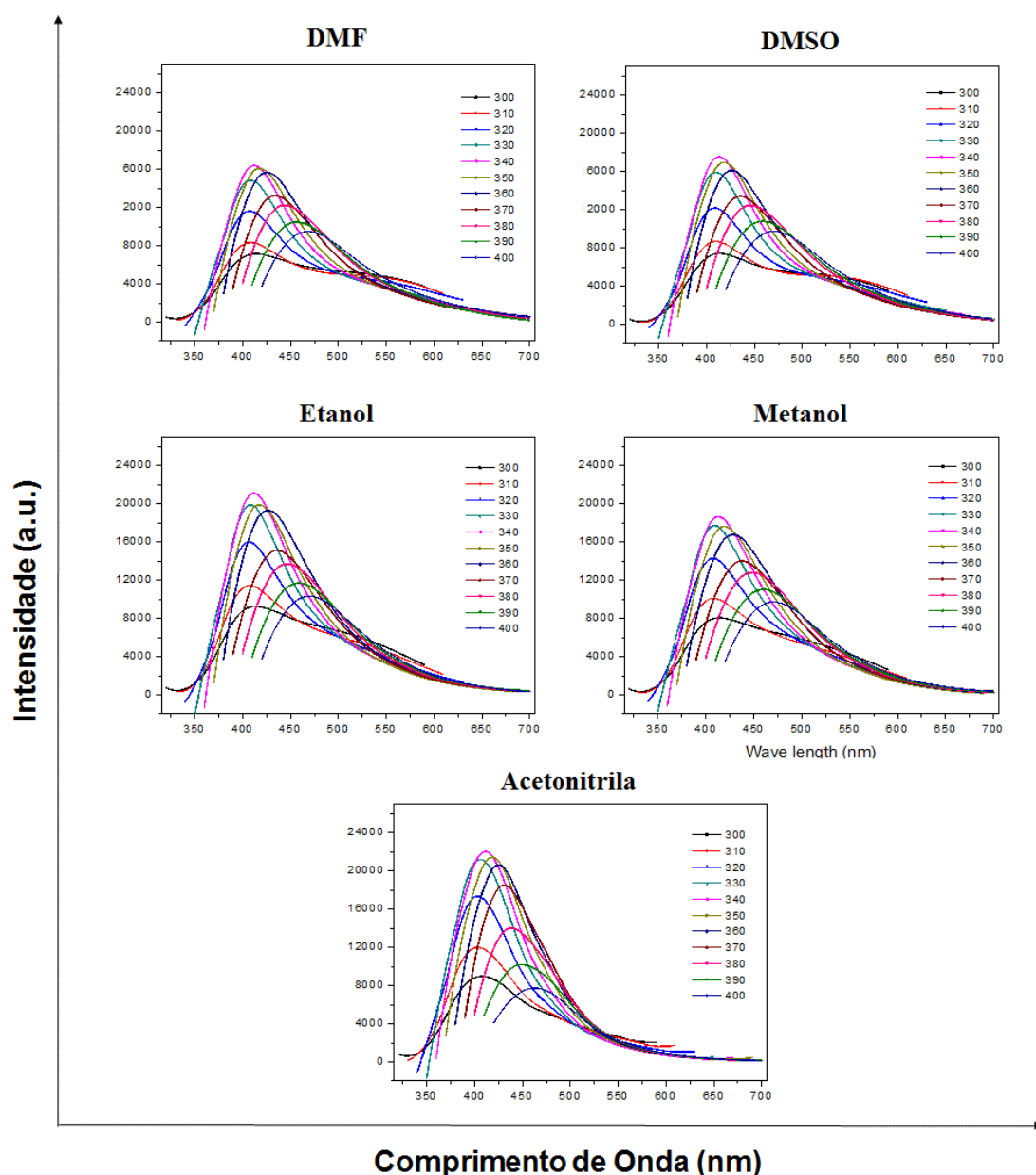
Os espectros de emissão do C-Dot-NH-BTD foram obtidos em diferentes solventes. A primeira análise foi realizada em água, consistindo na excitação de 21 comprimentos de onda diferentes (Figura 14). Foi observada uma intensidade máxima de emissão em aproximadamente 420 nm quando a solução foi excitada em 340 nm. Pôde-se observar, também, um comportamento espectral de excitação-dependência, onde o deslocamento para comprimentos de onda maiores do ponto máximo de emissão aumenta proporcionalmente com o aumento do comprimento de onda de excitação ( $\lambda > 340 \text{ nm}$ ).



**Figura 14.** Espectros de emissão do C-Dot-NH-BTD com concentração  $0,166 \text{ g L}^{-1}$  em água. O comprimento de onda de excitação foi variado de 10 em 10 nm de 300 à 500 nm e o espectro de emissão adquirido para cada um deles (a direita). Para melhor visualização do comportamento das curvas de emissão a medida que se varia o comprimento de onda de excitação foram plotadas em um gráfico 7 curvas, à esquerda.

A análise foi repetida com outros 5 solventes orgânicos, dessa vez coletando apenas 11 pontos de excitação diferentes (de 300 a 400 nm variando a excitação de 10 em 10 nm), sendo observada a mesma relação de excitação-dependência que foi observada quando o material foi analisado em água (Figura 15).



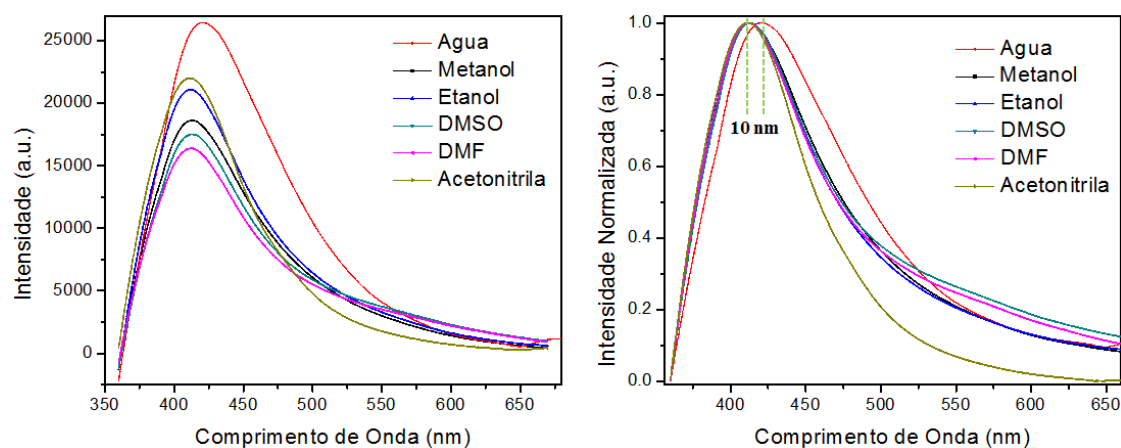


**Figura 15.** Espectros de emissão do C-Dot-NH-BTD com concentração  $0,166 \text{ g L}^{-1}$  em diferentes solventes. O comprimento de onda de excitação foi variado de 10 em 10 nm de 300 à 400 nm e o espectro de emissão adquirido para cada um deles.

Estes perfis espectrais sugerem a existência de diferentes sítios de emissão na superfície das nanopartículas de C-Dot-NH-BTD. O fenômeno de excitação-dependência em C-Dots tem sido amplamente reportado na literatura, entretanto sua origem ainda não foi completamente compreendida.<sup>144</sup> Alguns trabalhos sugerem que o fenômeno em questão não se relaciona apenas ao efeito de confinamento quântico (éxcitons) dos C-Dots, mas também aos defeitos da superfície das nanopartículas, que é responsável pela introdução de níveis de energia entre os orbitais HOMO e LUMO.<sup>107</sup> A existência desses

níveis energéticos intermediários, também conhecidos como armadilhas de emissão, pode ser corroborada pelos espectros de absorção (Figura 13) que apresentam “ombros” assimétricos de baixa intensidade (em aproximadamente 250 nm para as amostras analisadas nos solventes polares e em aproximadamente 320 nm para todas as amostras) no lugar de uma banda de absorção intensa e bem definida.<sup>107</sup>

As curvas de emissão para cada um dos solventes foram dispostas em um mesmo gráfico (Figura 16, esquerda). É possível observar que a natureza do solvente utilizado na análise interfere na intensidade de emissão dos C-Dot-NH-BTD. Em destaque é possível observar a curva de emissão da amostra em água, com um máximo de emissão superior ao dos demais solventes. Esse resultado é extremamente interessante para o trabalho, pois torna viável a utilização das nanopartículas em sistemas biológicos (que é constituído basicamente de água) sem que haja a supressão da intensidade de emissão.

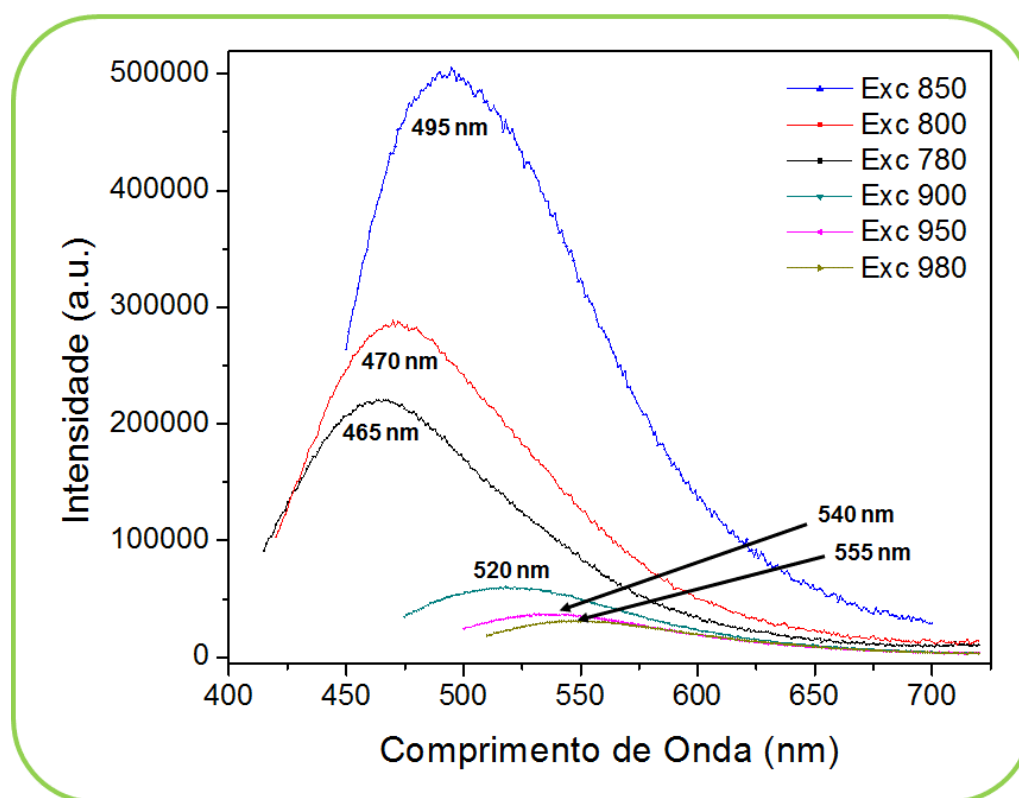


**Figura 16.** A esquerda, gráfico com as curvas de emissão (com máximo em 420 nm) sob excitação em 340 nm para todos os solventes. A direita, gráfico com as intensidades de emissão normalizadas para as curvas de emissão sob excitação em 340 nm.

Com o objetivo de analisar se a natureza dos solventes interfere na emissão das nanopartículas, as curvas de emissão de todos os solventes foram normalizadas e dispostas em um mesmo gráfico (Figura 16, direita). Pôde-se observar que não houve uma variação significativa nos comprimentos de onda de emissão. Houve apenas um pequeno deslocamento (10 nm) da emissão para comprimentos de onda menos energéticos quando a análise foi realizada em água. Como a água pode estabelecer ligações de hidrogênio com os grupos superficiais dos C-Dot-NH-BTD, essas interações favorecem a perda de energia via mecanismos não radiativos. Entretanto como o

deslocamento foi muito pequeno, pode-se concluir que essas interações não interferem de maneira significativa no comportamento dos C-Dot-NH-BTD.

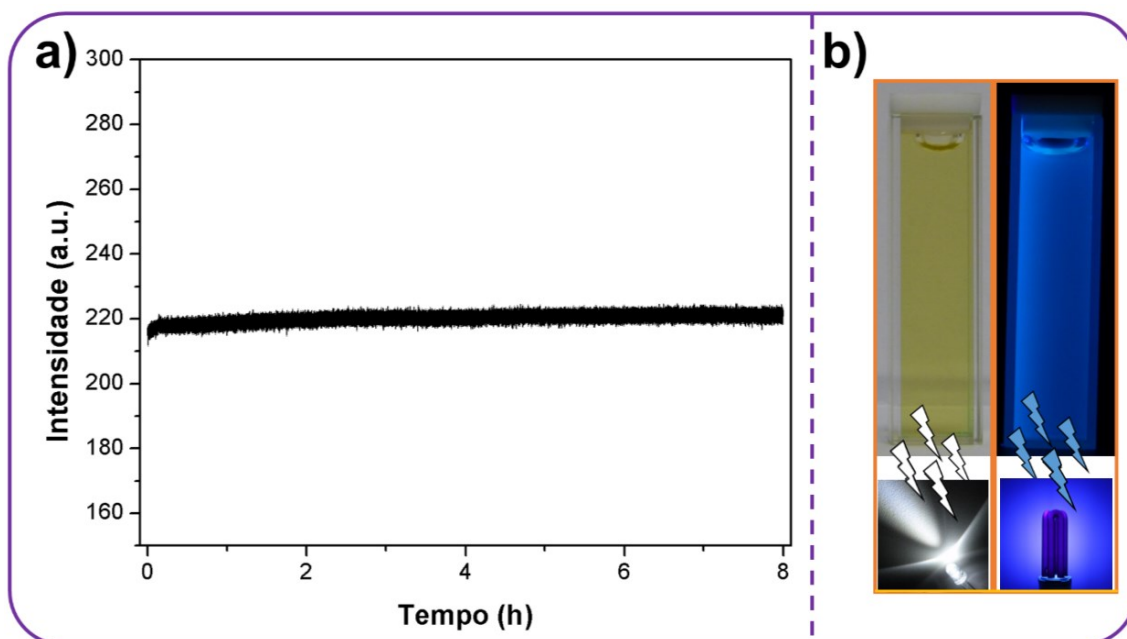
Outro experimento que pode corroborar com a explicação que sugere a existência de níveis de energia diferentes e defeitos de superfície no material consiste na excitação da mistura aquosa contendo o C-Dot-NH-BTD (concentração de  $0,166 \text{ g.L}^{-1}$ ) em comprimentos de onda menos energéticos e observação do espectro de emissão. Nesse caso, os comprimentos de onda máximos de emissão das nanopartículas foram mais energéticos que os de excitação, esse fenômeno é conhecido como *upconversion* (Figura 17). A ocorrência da absorção multifóton que consiste na absorção de dois ou mais fótons por um mesmo elétron seguida de seu relaxamento emitindo um único fóton mais energético também é comumente utilizada para explicar o fenômeno de *upconversion*.



**Figura 17.** Experimento de excitação da solução de C-Dot-NH-BTD em comprimentos de onda menos energéticos e a consequente emissão em comprimentos de onda mais energéticos. O solvente utilizado foi água e a concentração do C-Dot-NH-BTD foi de  $0,166 \text{ g.L}^{-1}$  (Exc = Comprimento de onda de excitação)

A Figura 18 (a) apresenta o experimento de fotoestabilidade do C-Dot-NH-BTD, onde a amostra (em água, concentração de  $0,333 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi excitada em 340 nm e a sua emissão foi monitorada em 420 nm por 8 horas. Não foi observada variação significativa

da intensidade da emissão, o que indica que o produto é extremamente estável, quando comparados com Q-Dots<sup>145,146</sup> (nos trabalhos citados, os Q-Dots perdem mais de 50% da intensidade de fluorescência entre 2,6 h e 3 h, respectivamente, de exposição à radiação) e com moléculas orgânicas luminescentes (começam a degradar em 1 h de exposição à radiação).<sup>147-151</sup> Essa fotoestabilidade superior quando comparada à compostos orgânicos convencionais indica que a aplicação das nanopartículas no imageamento celular é bastante promissora.

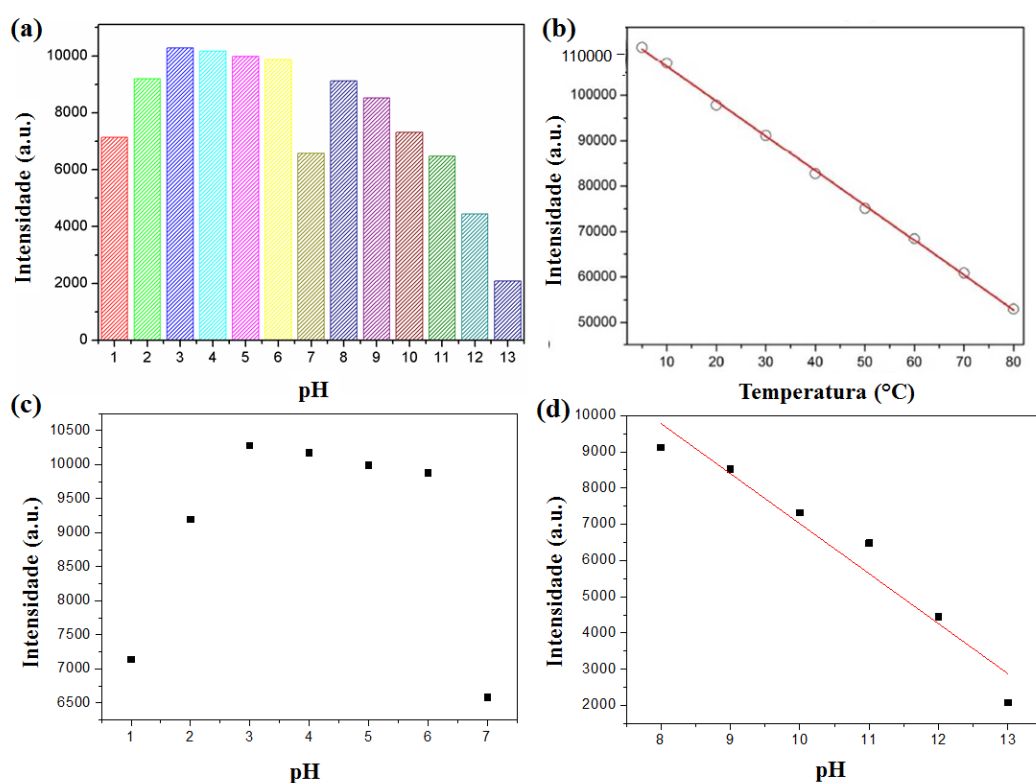


**Figura 18.** a) Experimento de fotoestabilidade do C-Dot-NH-BTD com concentração  $0,333 \text{ g L}^{-1}$ , o comprimento de excitação utilizado foi  $340 \text{ nm}$  e a emissão monitorada foi  $420 \text{ nm}$ . b) À esquerda irradiação da solução de C-Dot-NH-BTD com luz branca e à direita mesma amostra submetida à irradiação UV ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ).

O comportamento do C-Dot-NH-BTD frente à irradiação de luz branca e de UV está apresentado na Figura 18 (b). A fluorescência azul observada na irradiação da amostra em um comprimento de onda de  $365 \text{ nm}$  proporciona um rendimento quântico líquido de 10% dos C-Dot-NH-BTD em solução, obtido utilizando a fluorescência do sulfato de quinina como padrão de comparação.

O efeito do pH foi investigado e os resultados podem ser observados na Figura 19 (a). Os C-Dot-NH-BTD exibem uma faixa de pH de trabalho ótima, situada entre 3 e 6, onde são observadas emissões intensas. Esse intervalo ótimo de funcionamento é ideal para a realização de experimentos de bioimageamento celular de células cancerígenas,

uma vez que essas células são ligeiramente ácidas. Alguns trabalhos na literatura apresentam a utilização de C-Dots como sensores fluorescentes de pH, pois as nanopartículas desenvolvidas em cada um dos trabalhos apresentam uma variação da intensidade de emissão em relação a variação do pH.<sup>21,104,152-154</sup> Esse comportamento de supressão da intensidade de emissão em relação a variação de pH também pode ser observado para o C-Dot-NH-BTD na faixa de pH de 8 a 12 (Figura 19-d). O aumento da concentração de hidroxilas na solução pode estar contribuindo para a perda de energia via mecanismos não radiativos uma vez que há um aumento da quantidade de ligações de hidrogênio entre os grupos superficiais das nanopartículas e as hidroxilas.<sup>155</sup>

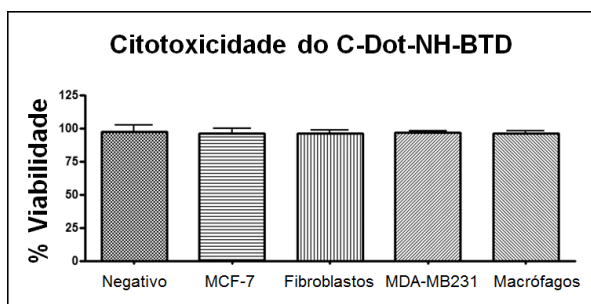


**Figura 19.** (a) Efeito da variação da intensidade de fluorescência da solução de C-Dot-NH-BTD em função da variação do pH. (b) Efeito da variação da intensidade de fluorescência da amostra de C-Dot-NH-BTD em função da variação da temperatura. (c) Comportamento não linear da intensidade de emissão observado nas soluções de pH 1 a 7. (d) Comportamento linear da supressão da intensidade de emissão observado nas soluções de pH 8 a 13 ( $R^2 = 0,932$ ).

Ao se avaliar o comportamento da emissão do C-Dot-NH-BTD em diferentes temperaturas (para isso foi utilizado o acessório do equipamento que permite o ajuste da temperatura da solução analisada), observa-se um padrão de decaimento da intensidade em relação ao aumento da temperatura Figura 19 (b). Este comportamento já era esperado,

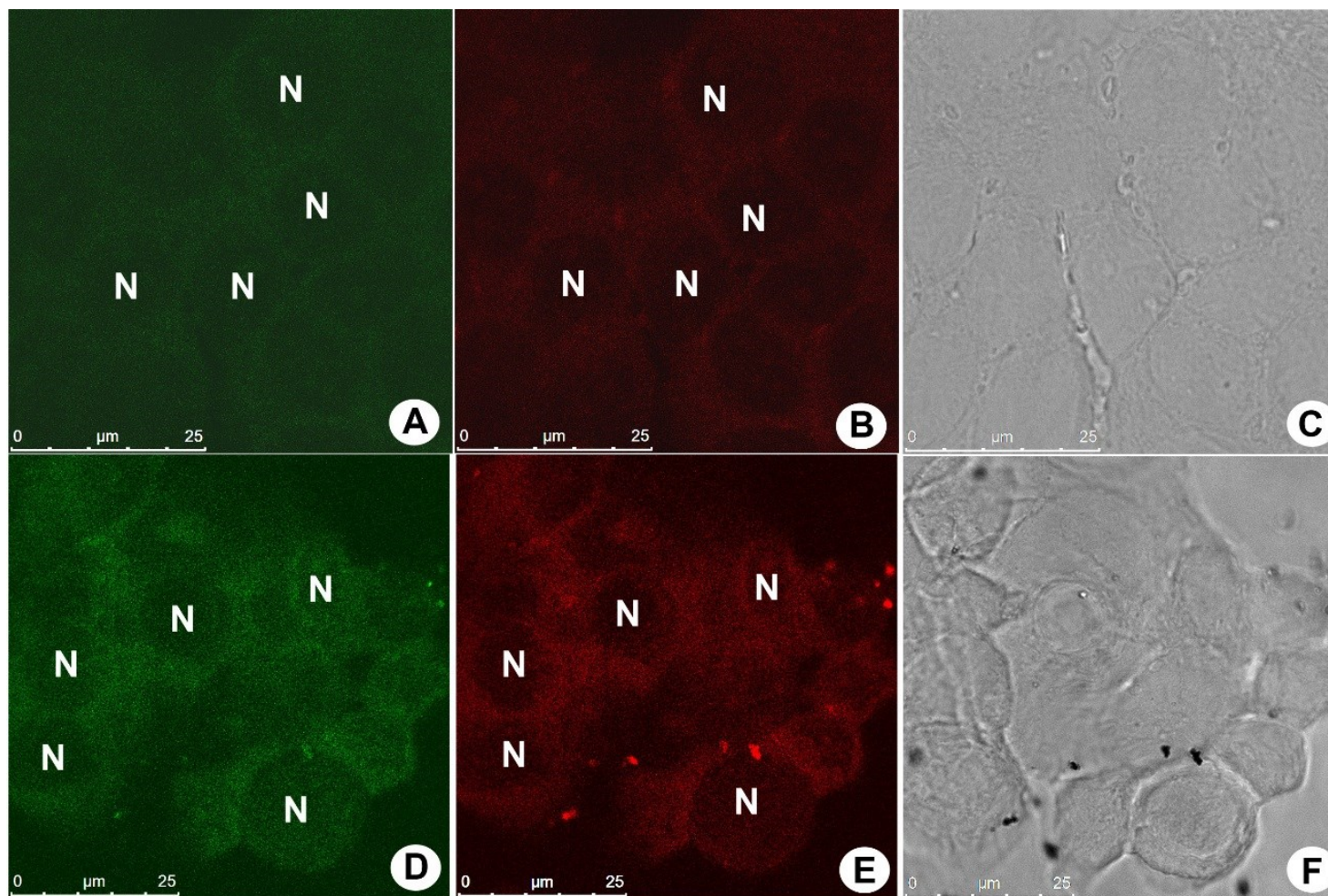
uma vez que o aumento da temperatura aumenta a liberação de energia via mecanismos não-radiativos.<sup>156</sup> Entretanto, é importante destacar que mesmo em elevadas temperaturas (80 °C) a intensidade de emissão corresponde a aproximadamente 55% da intensidade observada em 20°C. Muitos trabalhos atuais tem apresentado a síntese e aplicação de C-Dots para monitoramento da temperatura.<sup>17,25,156-161</sup> O que indica a viabilidade de utilização do C-Dot-NH-BTD como um sensor de temperatura, pois apresenta um comportamento similar aos demais trabalhos publicados.

Nesse trabalho, também foi avaliada a eficiência dos C-Dots-NH-BTD no bioimageamento celular. Nenhum efeito citotóxico, causado pela incubação do C-Dot-NH-BTD em células vivas, pode ser notado nas condições experimentais utilizadas. Para garantir que as nanopartículas não apresentam citotoxicidade seus efeitos foram observados em outras quatro linhagens diferentes de células (100 vezes mais concentrado que o utilizado em experimentos de imageamento celular), não apresentando potencial deletério. A Figura 20 mostra os resultados de citotoxicidade obtidos experimentalmente.



**Figura 20.** Viabilidade citotóxica da utilização de C-Dot-NH-BTD em células vivas. Nenhuma citotoxicidade foi observada para as células testadas.

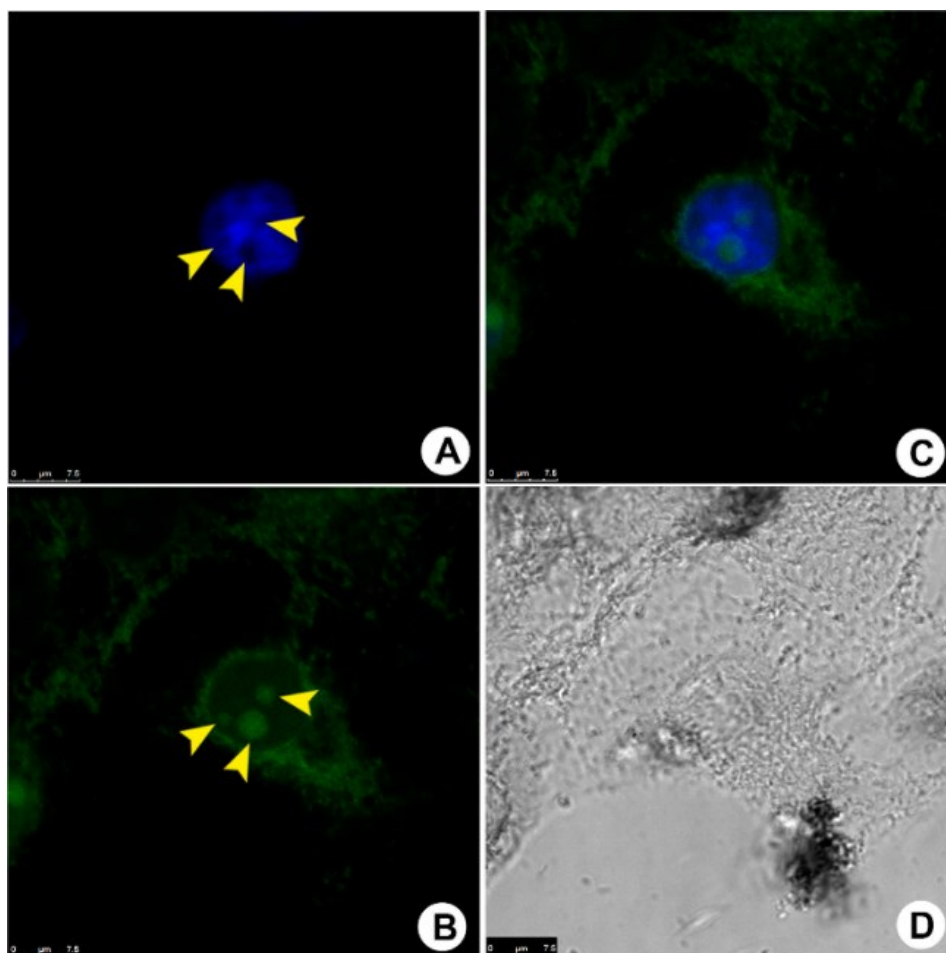
Os C-Dots funcionalizados, contendo BTD em sua superfície, apresentaram um sinal intenso de fluorescência no microscópio confocal, tanto no canal verde quanto no vermelho (Figura 21). Todas as imagens de marcação celular foram obtidas pelo grupo do professor Dr. José Raimundo (UnB-IB).



**Figura 21.** Células de câncer de mama MCF-7 incubadas com C-Dot-NH-BTD, visualizadas em ambos os canais (verde e vermelho). (A), (B) e (C) Células vivas. (D), (E) e (F) Células fixadas. Nenhuma coloração pode ser detectada no interior do núcleo das células, como pode ser observado pelos espaços vazios de marcados com (N). (C) e (F) mostram os aspectos normais da morfologia da célula por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência 25 μm.

Os resultados do bioimageamento celular assim como a análise das imagens obtidas indicam que o C-Dot-NH-BTD marca seletivamente o nucléolo celular após 30 min. de incubação. Assim que colocada em contato com a lamina contendo a cultura células, o C-Dot-NH-BTD é levemente acumulado em células vivas em função de suas membranas plasmáticas, ou seja, são internalizadas pela célula, entretanto não migram rapidamente para o nucleolo (Figura 21-A e B). O processo de fixar as células em lâminas de vidro induz a formação de poros na membrana plasmática, o que pode ter contribuído para livre movimentação das nanopartícula para dentro do ambiente celular (Figura 21-D e E). Um comportamento interessante do C-Dot-NH-BTD foi observado durante esse experimento. Em um primeiro momento as nanopartículas não conseguiram migrar para o interior dos núcleos celulares, o que foi uma surpresa, uma vez que o C-DOT-NH<sub>2</sub>, anteriormente estudado pelo grupo apresentou alta seletividade e interação com componentes ácidos dos nucléolos no interior núcleo celular (Figura 22, apenas emissão em verde, uma vez que o material não apresentou emissão considerável no vermelho). Os resultados obtidos inicialmente sugerem que não há nenhuma afinidade química entre C-Dot-NH-BTD e os componentes ácidos do núcleo, enquanto que os C-Dots-NH<sub>2</sub> (sem unidades BTD) exibem uma elevada afinidade e seletividade.<sup>137</sup>

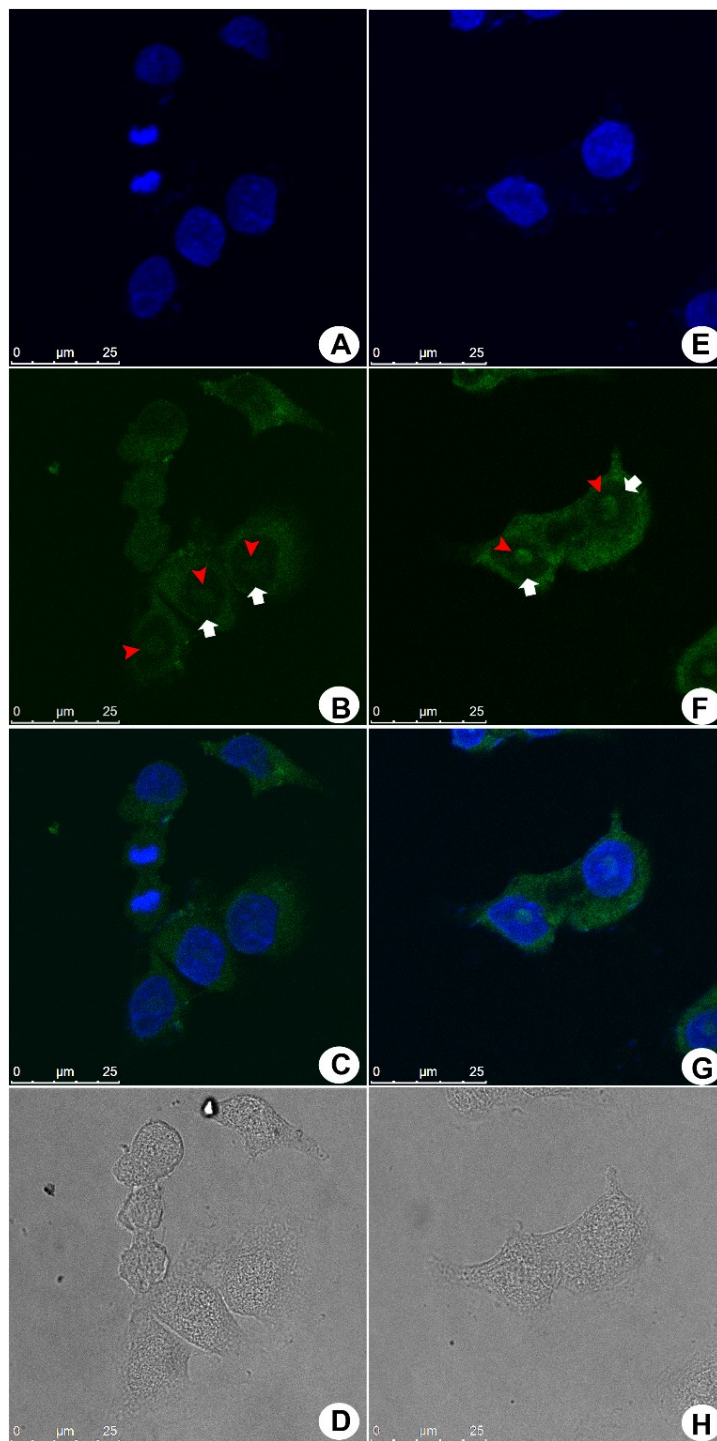




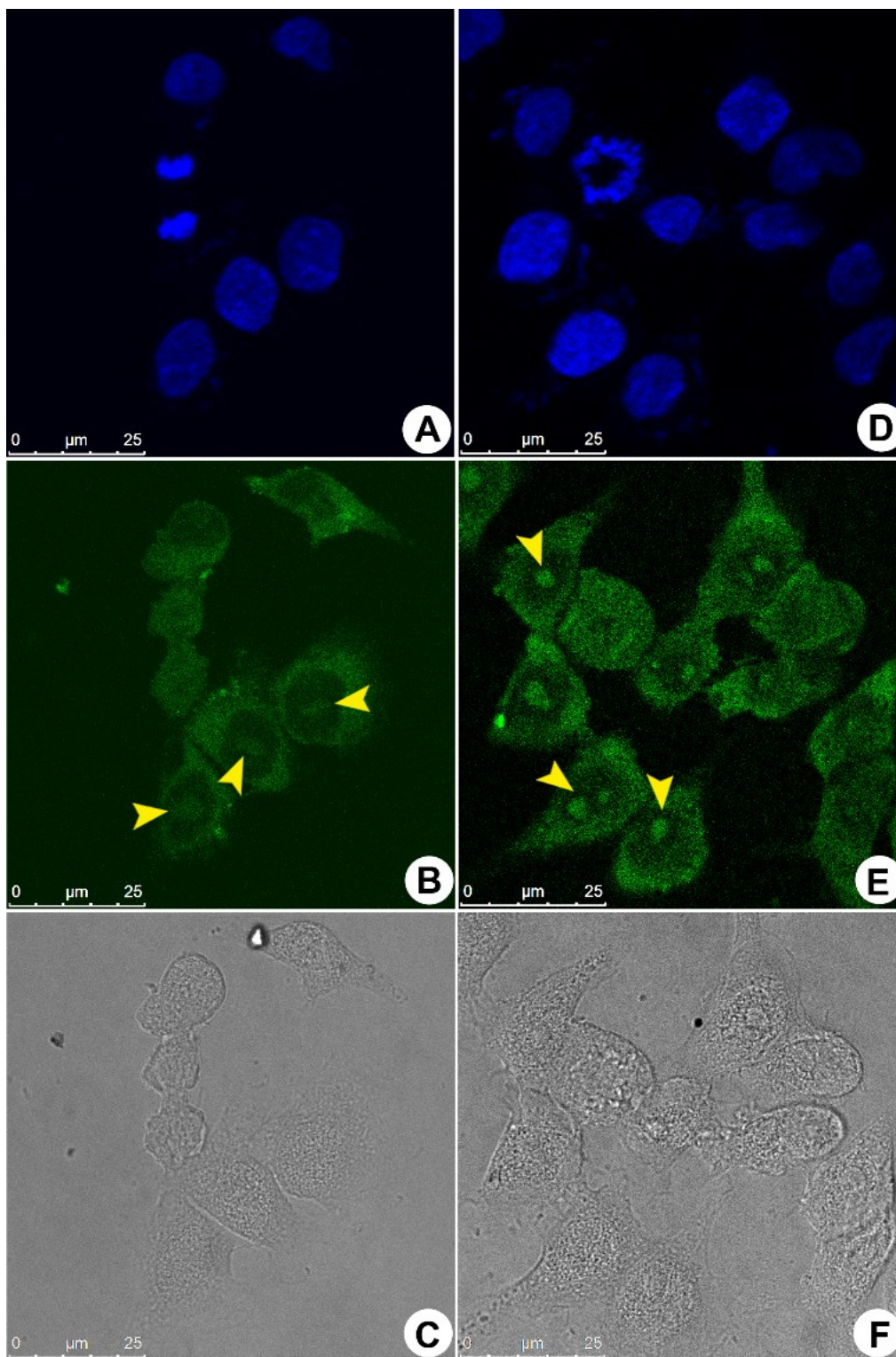
**Figura 22.** Células de câncer de mama MCF-7 incubadas vivas com o C-Dot-NH<sub>2</sub> (sem unidades de BTD) mostrando a marcação fluorescente dos nucléolos celulares vistas no canal verde. (A) Mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células (indicados pelas setas amarelas). (B) Mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH<sub>2</sub> (indicado pelas setas amarelas). (C) Mostra a sobreposição dos dois sinais fluorescentes (DAPI e C-Dot-NH<sub>2</sub>). (D) Mostra o aspecto morfológico normal das células. A barra de escala de referencia 7,5  $\mu\text{m}$ .<sup>137</sup>

Sabe-se que os fluoróforos contendo poliaminas podem exibir elevada afinidade por biopolímeros polianiônicos, tais como ácidos nucleicos e seus derivados.<sup>140</sup> As possibilidades de protonação da amina devido aos sítios básicos de uma poliamina (como o C-Dot-NH<sub>2</sub>) resultam em um fluoróforo positivamente carregado. Foi provado que a natureza catiônica dessas sondas em meios biológicos explica tanto a afinidade quanto a ligação com componentes ácidos do núcleo (ácidos nucleicos).<sup>143</sup> O comportamento seletivo do C-Dot-NH<sub>2</sub> está de acordo com o previamente descrito, uma vez que a nanopartícula foi encontrada associada à componentes ácidos que constituem o núcleo celular.

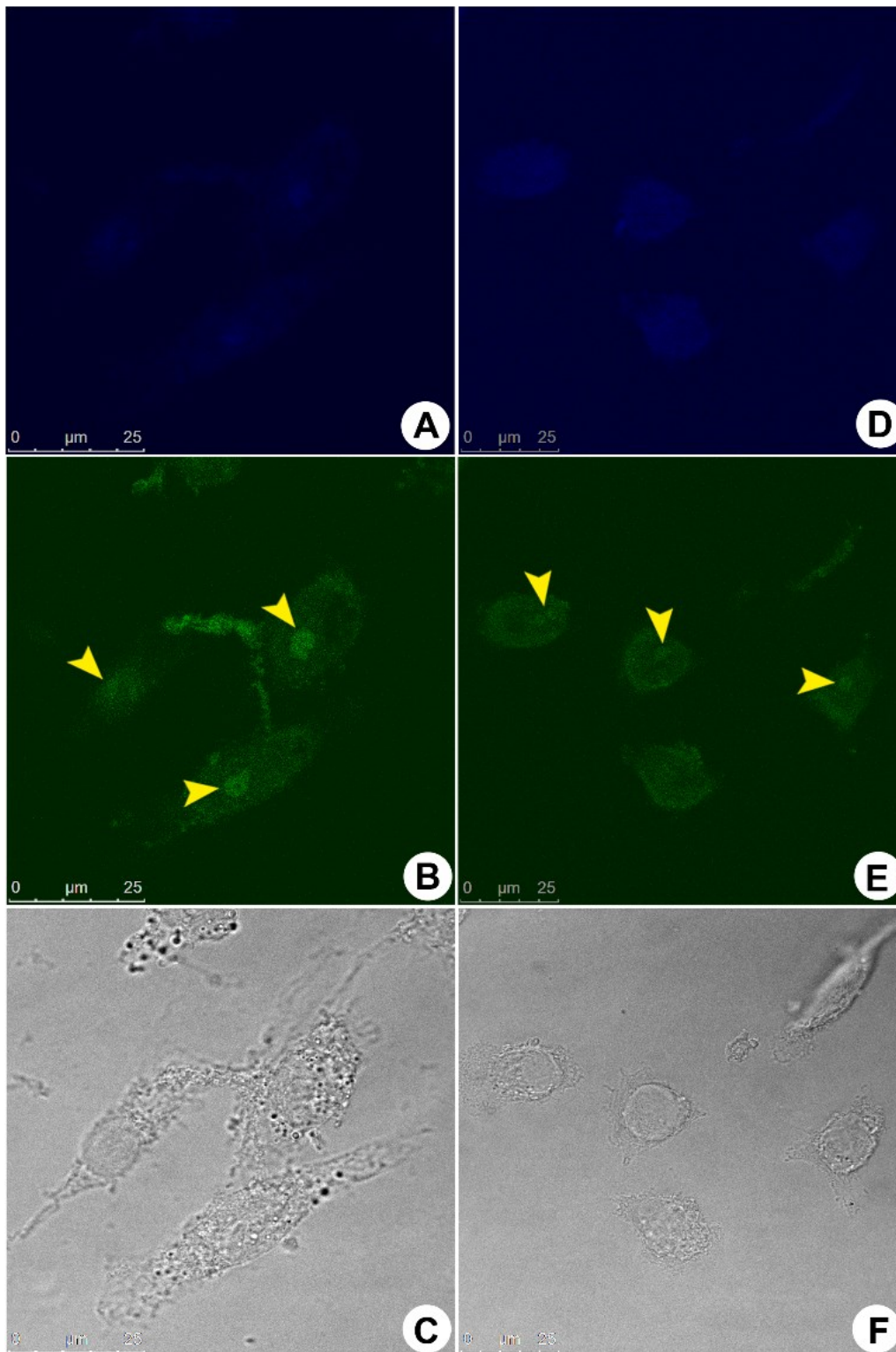
A incorporação de unidades BTD na superfície das nanopartículas, no entanto, reduz drasticamente o carácter básico do marcador biológico, uma vez que já foi demonstrado que os átomos de nitrogênio do anel BTD não são básicos.<sup>43</sup> Por esse motivo, a BTD diminui significativamente a multiprotonação do C-Dot-NH-BTD, modificando assim o padrão de comportamento esperado na marcação celular. Por esse motivo, apenas após 30 minutos de incubação o C-Dot passivado com BTD transpôs a membrana nuclear, marcando seletivamente os nucleolos (Figura 23). Para ter certeza que esse comportamento do C-Dot-NH-BTD seria reprodutível, foram realizados testes de marcação celular com outras linhagens de células, sendo elas: Caco-2 (células de adenocarcinoma colorretal humano) e MDA-MB-231 (células de adenocarcinoma de mama humano), apresentadas pela Figura 24 e Figura 25 respectivamente.



**Figura 23.** Células de câncer de mama MCF-7 incubadas por 30 minutos com o C-Dot-NH-BTD mostrando a marcação fluorescente do nucléolo celular vistas no canal verde. (A), (B), (C) e (D) Células vivas. (E), (F), (G) e (H) Células fixadas. (A) mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células. (B) mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH-BTD indicado pelas setas em vermelho. As setas brancas indicam a região nuclear. (C) mostra a sobreposição dos dois sinais fluorescentes (DAPI e C-Dot-NH-BTD). (E), (F) e (G) mostram as marcações fluorescentes das células fixadas, que apresentam comportamento semelhante ao observado em (A), (B) e (C). (D) e (H) mostram o aspecto morfológico normal das células. Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 24.** Células de câncer Caco-2 incubadas com o C-Dot-NH-BTD mostrando a marcação fluorescente do nucléolo celular vistas no canal verde. (A), (B) e (C) Células vivas. (D), (E) e (F) Células fixadas. (A) Mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células. (B) Mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH-BTD indicado pelas setas em amarelo. (C) Mostra o aspecto morfológico normal das células. (D), (E) e (F) Mostram as marcações fluorescentes das células fixadas, que apresentam comportamento semelhante ao observado em (A), (B) e (C). Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25.** Células de câncer MDA-MB-231 incubadas com o C-Dot-NH-BTD mostrando a marcação fluorescente do nucléolo celular vistas no canal verde. (A), (B) e (C) Células vivas. (D), (E) e (F) Células fixadas. (A) Mostra o núcleo celular marcado com DAPI (reagente disponível comercialmente). As regiões pretas são os nucléolos das células. (B) Mostra o perfil de marcação fluorescente do nucléolo pelo C-Dot-NH-BTD indicado pelas setas em amarelo. (C) Mostra o aspecto morfológico normal das células. (D), (E) e (F) Mostram as marcações fluorescentes das células fixadas, que apresentam comportamento semelhante ao observado em (A), (B) e (C). Barra de escala de referência 25  $\mu\text{m}$ .

É possível observar, por meio da análise das imagens obtidas, que houve reprodutibilidade no padrão de marcação celular dos C-Dot-NH-BTD. A amostra preparada em água que é colocada em contato com as células (vivas e fixadas), começam a ser internalizadas por meio da transposição da membrana plasmática e, após aproximadamente 30 minutos de contato da amostra com as células é possível observar a marcação seletiva do nucléolo.

A análise de potencial zeta foi realizada em solução aquosa (com água deionizada) de concentração de C-Dot-NH-BTD  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Essa análise dos C-Dots em estudo ajuda a compreender o fato de o C-Dot-NH<sub>2</sub> apresentar uma maior afinidade com os componentes aniônicos do núcleo celular, uma vez que seu valor é positivo +7,38 (Figura 26 a). Em contrapartida, o potencial zeta do C-Dot-NH-BTD é negativo -5,64 (Figura 26 b), o que justifica o comportamento da sonda biológica de marcar o nucléolo apenas após 30 minutos de incubação.

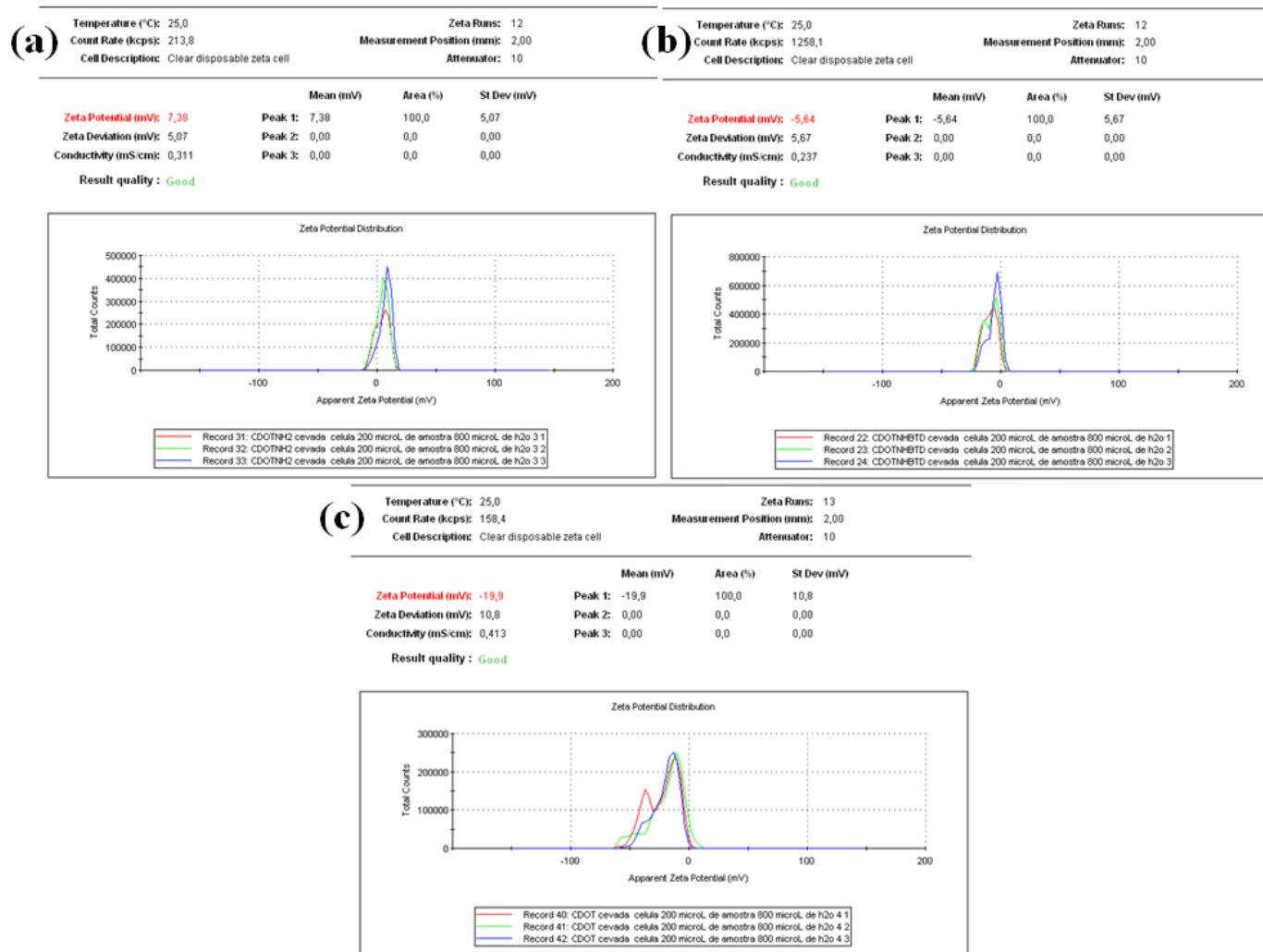


Figura 26. Potencial zeta dos C-Dots. Em (a) é apresentado o resultado da análise do C-Dot-NH<sub>2</sub>, em (b) é apresentado o resultado da análise do C-Dot-NH-BTD e em (c) é apresentado o resultado da análise do C-Dot sem nenhum tipo de passivação.

O C-Dot sem nenhuma modificação estrutural, utilizado como material de partida para passivação síntese dos marcadores modificados apresentou um potencial zeta de -19,90 (Figura 26 c). Esse resultado é compatível com a natureza aniônica dos grupos carboxílicos que compõem a superfície do C-Dot sem nenhum tipo de passivação.

O uso de medidas de potencial zeta é importante para investigar as possíveis interações que podem ser estabelecidas entre os C-Dots e as células utilizadas nos experimentos de bioimageamento. Ao se trabalhar com ensaios biológicos, o potencial zeta é muito útil no estudo da ativação biológica, aglutinação e adesão celular, processos estes que estão relacionados às propriedades da carga da superfície celular.<sup>162</sup> Observa-se geralmente que, no ambiente extracelular das células tumorais, o pH é ligeiramente ácido (6,5-7,2) quando comparado ao sangue e aos tecidos normais (7,4). Neste caso, o valor positivo do potencial zeta (+7.38) para C-dot-NH<sub>2</sub> pode explicar uma maior afinidade com os componentes aniônicos do núcleo celular e por isso há uma migração seletiva do C-Dot-NH<sub>2</sub> para o nucléolo quase que imediatamente após a adição da amostra à célula.

Outro fator determinante para a marcação celular é a forma com que as sondas fluorescentes são internalizadas (absorção ou processos endocitóticos).<sup>163</sup> E, a carga superficial das nanopartículas influenciam de maneira significativa nesse processo, uma vez que a membrana celular é negativamente carregada e atrai com maior facilidade materiais catiônicos.<sup>164</sup> Já foi descrito na literatura que C-Dots passivados com grupos aminados e que apresentam carga positiva são absorvidos pela célula de maneira rápida e facilitada, pois despolarizam a membrana celular.<sup>165,166</sup> No entanto, as células em geral podem absorver de forma não específica C-Dots carregados negativamente através de reações bioquímicas mediadas por receptores ou através de endocitose.<sup>167</sup> Essa diferença nos mecanismos de internalização celular pode justificar a mudança no tempo de marcação do nucléolo observadas nos experimentos de imageamento utilizando o C-Dot-NH<sub>2</sub> e o C-Dot-NH-BTD. É importante destacar que as interações entre células e partículas pequenas não são limitadas apenas às forças eletrostáticas e estudos mais específicos precisam ser realizados para que se possa compreender melhor esses processos biológicos.

A seletividade com atraso de 30 min apresentada pelo C-Dot-NH-BTD permite sua utilização futura em estudos do comportamento do nucléolo durante processos



metabólicos simples, tais como: divisão celular, geração de energia, apoptose, síntese de proteínas, dentre outros que demandam tempo para ocorrer. A utilização do C-dot-NH<sub>2</sub>, por apresentar uma imediata marcação, não é o mais recomendável para estudos dependente do tempo. Se torna viável também o monitoramento do comportamento do nucléolo frente às doenças relacionadas a ele e como essas doenças afetam suas características físicas (como tamanho e formato, por exemplo).

# Conclusões & Perspectivas

## Conclusão & Perspectivas

Um novo sistema C-Dot incorporando unidades de BTB em sua superfície foi sintetizado com sucesso e aplicado em experimentos de imageamento celular com uma seletividade modificada (controlada) quando comparada com C-Dots sem a presença o anel BTB. O C-Dot-NH-BTB apresenta um desvio da emissão de fluorescência para o vermelho e, com isso, também pode ser visualizada no canal vermelho também. Característica que não é observada no outro derivado sintetizado anteriormente pelo grupo (C-ponto-NH<sub>2</sub> – sem unidades BTB incorporada à estrutura).

A funcionalização da superfície dos C-Dots com anéis BTB promoveu um efeito de bloqueio nuclear, atrasando a entrada do C-Dot-NH-BTB em 30 minutos. Após 30 minutos, os novos C-Dots contendo BTB foram capazes de marcar seletivamente os núcleos celulares. Com base nesta modificação química simples novos experimentos de marcação celular fluorescente e de dinâmica usando dois canais diferentes podem ser realizados.

Através de uma modificação química simples (incorporação da BTB à superfície da nanopartícula) foi possível mudar completamente o efeito celular (seletividade e dinâmica) e as propriedades de emissão do C-Dot. Esse comportamento sugere a possibilidade de modificar a seletividade celular e a dinâmica através de modificações químicas simples culminando na obtenção de vários corantes com novas propriedades e aplicações biológicas distintas.

Além disso, a funcionalização modifica a distribuição elétrica superficial do material, o que pôde ser confirmado com as análises de potencial zeta. Entretanto, muito ainda precisa ser estudado em relação a compreensão de como as modificações na superfície dos C-Dots interferem em suas propriedades óticas.

Como perspectivas tem-se a realização de experimentos de reversibilidade de pH e temperatura, que consiste em modificar o pH e a temperatura em ciclos e observar se a intensidade de emissão do C-Dot-NH-BTB é afetada. Caso seja confirmada a capacidade de alterar a temperatura e o pH sem que as nanopartículas percam sua eficiência luminosa, se torna interessante o estudo da possibilidade de aplicação do C-Dot-NH-BTB como sensores. Para isso, também será necessária a avaliação da sensibilidade das nanopartícula.

Outra perspectiva é o desenvolvimento de ensaios biológicos para se avaliar como os processos de absorção e transporte das nanopartículas ocorrem. Os resultados desses experimentos são determinantes para explicar a diferença no tempo de internalização e migração para o nucléolo dos C-Dot-NH-BTD e dos C-Dot-NH<sub>2</sub>.

# Capítulo 2

# **Revisão Bibliográfica**

## Revisão Bibliográfica

Na natureza é possível observar a existência de diversos materiais e plantas que manifestam o fenômeno da fluorescência, apesar disso, a identificação da primeira molécula orgânica fluorescente foi apresentada apenas em 1845 por John Herschel.<sup>168</sup> A molécula descrita pelo cientista foi o sulfato de quinina que emite energia na forma de luz azul quando irradiada com luz UV. Contudo, é importante destacar que a teoria que explica o fenômeno da fluorescência foi apresentada formalmente alguns anos após a descoberta dessa característica no sulfato de quinina, em 1852 por George Stokes.<sup>169</sup>

A partir dessa descoberta, houve então, um aumento de interesse no desenvolvimento e síntese de compostos orgânicos que apresentassem fluorescência. E com isso, técnicas que possibilitassem uma melhora nas análises de caracterização e abrissem novas possibilidades de utilização desses compostos foram criadas e aprimoradas. Um exemplo disso é a técnica de microscopia de fluorescência, que foi criada pouco tempo depois da publicação dos primeiros trabalhos de síntese de compostos fluorescentes.<sup>28</sup>

A criação do microscópio de fluorescência surgiu na tentativa de se melhorar a resolução das imagens obtidas pelo microscópio de transmissão, trocando a luz branca, utilizada até então, pela luz UV. Essa alteração foi proposta em 1904 por Kohler, entretanto alguns problemas foram observados ao se tentar obter imagens de células e tecidos, uma vez que esses materiais apresentam autofluorescência quando excitados com radiação UV e absorvem certos comprimentos de onda. Tendo em vista essa problemática, alguns anos depois, Heimstad (em 1911) e Lehmann (em 1913) apresentaram, cada um deles, uma versão de um microscópio de fluorescência diferente da proposta anteriormente. Os microscópios consistiam basicamente na utilização de uma lâmpada com um arco voltaico de carbono como fonte de luz UV, com isso foi possível produzir uma luz mais intensa. Além disso, foram introduzidos filtros para que a imagem ficasse mais nítida e a energia luminosa da fonte de excitação não interferisse na imagem obtida.<sup>170</sup>

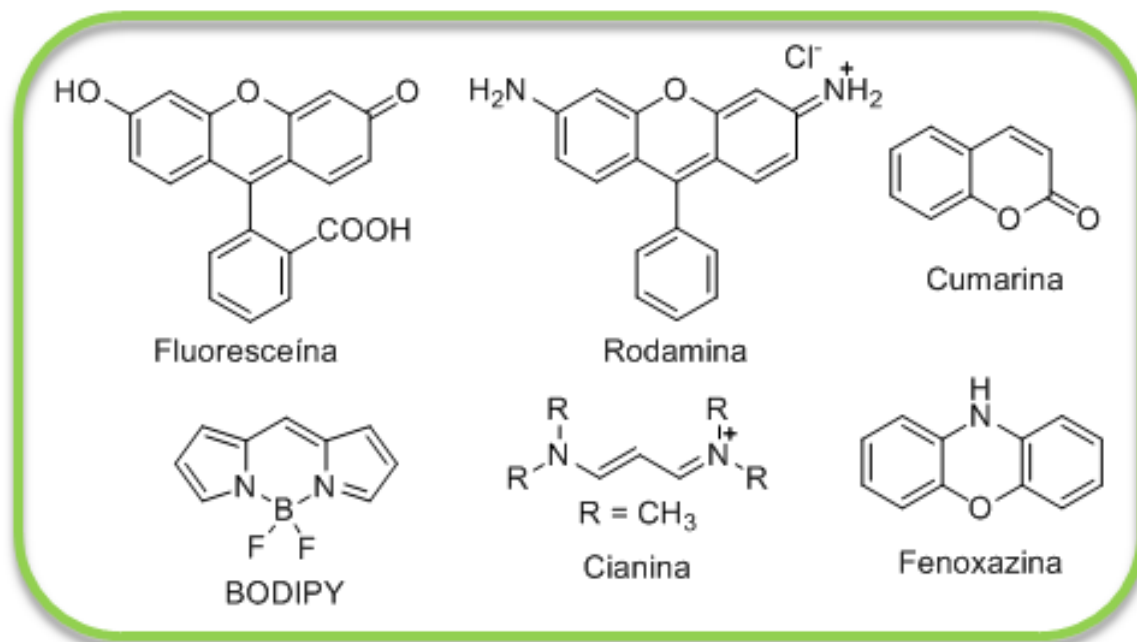
Em 1914, Von Prowazek apresentou um estudo das possibilidades de interação de corantes com células, o que pode ser considerada a primeira tentativa de marcação celular com compostos fluorescentes.<sup>28</sup> Entretanto, a técnica de imageamento celular com fluoróforos só se tornou de fato eficiente quando se passou a utilizar compostos que

emitiam luz em comprimentos de onda razoavelmente diferentes dos comprimentos de onda de excitação de modo que a energia de um não interferisse no outro e a separação dos sinais por filtros fosse viável.<sup>170</sup>

Um avanço importante que ainda hoje é amplamente explorado foi apresentado em 1942 por Coons e colaboradores.<sup>171</sup> Nesse trabalho o grupo sintetizou um marcador fluorescente, o isocinato de fluoresceína, que posteriormente foi ligado à anticorpos promovendo sua marcação fluorescente e possibilitando o bioimageamento dos mesmos. Muitos grupos de pesquisa se dedicaram ao estudo e síntese de moléculas luminescentes que pudessem ser utilizadas no bioimageamento e hoje é possível encontrar, disponíveis comercialmente vários marcadores com seletividade para diversas organelas, tais como: mitocôndria, lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e núcleo.<sup>36,172,173</sup>

Dentre todos os fluoróforos desenvolvidos e apresentados na literatura alguns ganharam destaque por possibilitarem a obtenção de uma variedade de novas moléculas luminescentes com pequenas modificações estruturais as quais apresentaram características específicas que viabilizaram sua utilização no bioimageamento. Nesse contexto as moléculas que merecem destaque são: fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, boro-dipirometanos (BODIPYs), cianinas e fenoxazinas, apresentadas na Figura 27. Esses núcleos são especialmente importantes, pois estão entre as plataformas representativas empregadas atualmente na síntese de sondas utilizadas para a obtenção de imagens de células e tecidos por meio da microscopia de fluorescência.<sup>28</sup>





**Figura 27.** Estrutura molecular dos fluoróforos que ganharam maior destaque nas pesquisas de bioimagemamento celular.

A síntese de derivados de fluoresceína foi apresentada pela primeira vez em 1871 pela Bayer. Entretanto, a utilização desses compostos como marcadores fluorescentes ocorreu muitos anos depois, sendo considerado o fluoróforo pioneiro em trabalhos de imunofluorescência. As sondas obtidas a partir do núcleo fluoresceína são de fácil obtenção, apresentam ótimos valores de rendimento quântico (normalmente acima de 0,90) e, em geral, são solúveis em água. Apesar de apresentar qualidades, algumas características estruturais desses compostos limitam seu uso na biologia celular. Eles são relativamente instáveis, apresentam uma elevada taxa de *photobleaching*, sua excitação produz espectros de emissão largos e valores de deslocamento de Stokes pequenos. Além disso, a variação do pH do meio causa mudanças em seu sinal podendo suprimir a fluorescência do composto por completo, pois apenas a estrutura quinoide emite energia na forma de luz (quando a estrutura se converte em uma lactona nenhuma emissão de luz é observada). As sondas biológicas à base de fluoresceína são amplamente utilizados conjugados com algum agente que possibilita sua internalização no ambiente celular (um exemplo são anticorpos), portanto, requerem armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .<sup>45,174</sup>

Os corantes derivados do núcleo rodamina são similares em estrutura e em propriedades fotofísicas aos derivados de fluoresceína. Foram descritos pela primeira vez em 1888 por Ceresole em uma patente.<sup>175</sup> Trabalhos mais detalhados a respeito das

propriedades desses compostos foram publicados alguns anos depois, porém o interesse inicial nesses compostos era para utilização na indústria têxtil.<sup>176</sup> Esses fluoróforos apresentam elevados valores de rendimento quântico (por volta de 0,92). Algumas modificações estruturais possibilitam uma drástica alteração nas propriedades fotofísicas dos compostos, por exemplo, a acilação do núcleo faz com que ele adquira um comportamento semelhantes ao das fluoresceínas, o que não é tão interessante uma vez que viabiliza o fechamento do anel e a formação de uma lactona (configuração estrutural na qual não há emissão de fluorescência). Os derivados do núcleo rodamina, apresentam, no geral, alta hidrofobicidade, o que promove um estado de agregação elevado em solução aquosa. Essa agregação geralmente proporciona interações corante-corante e um efeito de perda de radiação via mecanismos não radiativos e de autossupressão de fluorescência. Esses compostos também apresentam valores de deslocamento de Stokes pequenos e amplos espectros de emissão (comumente observado do laranja para vermelho distante) o que impossibilita sua utilização em ensaios que envolvem a utilização de vários marcadores ao mesmo tempo.<sup>177-179</sup>

O núcleo cumarina é encontrado em diversos produtos naturais que apresentam distintas atividades farmacológicas. Os marcadores celulares derivados do núcleo cumarina apresentam bons rendimentos quânticos (geralmente por volta de 0,60) e deslocamentos de Stokes grandes (por volta de 100 nm). A modificação estrutural desse núcleo por meio da inserção de novos grupos alquila ou acila no oxigênio ou de grupos retiradores de elétrons promove a supressão da fluorescência dos novos compostos e, conseqüentemente diminuição do rendimento quântico.<sup>180,181</sup> Um inconveniente encontrado ao se trabalhar com sondas derivadas do núcleo cumarina é que, geralmente, não são adequadas para uso em amostras biológicas fixadas (células aderidas), o que reduz o alcance de potenciais aplicações biológicas e médicas. Embora apresentem bons deslocamentos de Stokes, seus espectros de emissão são largos (tipicamente do amarelo ao vermelho distante), impossibilitando seu uso em combinação com outras sondas fluorescentes vermelhas, além disso essas sondas degradam com facilidade.<sup>182,183</sup>

Os fluoróforos derivados do núcleo BODIPY apresentam elevados rendimentos quânticos (por volta de  $\Phi = 0,80$ ) e em geral, não são afetados pelo ambiente celular, o que possibilita a obtenção de BODIPYs ligados a enzimas proteases, glicosilases e lipases fluorescentes.<sup>184</sup> A inserção de grupos alquenil ou aril no núcleo promove a extensão da conjugação das ligações e modifica suas propriedades fotofísicas, favorecendo o

deslocamento da emissão de energia para regiões do espectro menos energéticas (vermelho). Apresentam deslocamentos de Stokes pequenos (por volta de 20 nm). Diferente de outros fluoróforos o BODIPY não apresenta posições óbvias em que novos grupos podem ser ligados o que limita a obtenção de novas moléculas a partir deste núcleo. É importante destacar que os corantes BODIPY perdem rapidamente a potência de emissão através do *photobleaching* (perda de emissão de luz). Por serem estruturas lipofílicas, apresentam solubilidade apenas em solventes orgânicos que são normalmente tóxicos para células de mamíferos, prejudicando experimentos de imageamento *in vivo* que demandam longos tempos de exposição. Dentre todos os fluoróforos citados, esses compostos apresentam-se fotoestáveis apenas quando comparados com os derivados de fluoresceína.<sup>185-187</sup>

Os compostos derivados do núcleo cianina apresentam valores de rendimento quântico relativamente baixos (por volta de 0,15). Inicialmente, essas moléculas lipofílicas eram utilizadas principalmente como sondas de membrana celular<sup>188</sup> e DNA.<sup>189</sup> Modificações estruturais como, por exemplo, a sulfonação desse núcleo possibilita sua utilização na marcação de proteínas.<sup>190,191</sup> Essas sondas apresentam baixa polaridade, devendo ser diluídas em solventes orgânicos tais como dimetilformamida ou dimetilsulfóxido (para o preparo da solução estoque utilizada no experimento de imageamento) que são tóxicos para células de mamíferos em níveis acima 0,01%. Esses compostos não apresentam grandes deslocamentos de Stokes e, portanto, é necessária uma demanda maior de trabalho para se encontrar uma configuração adequada do detector para obtenção da imagem celular. A temperatura de armazenamento sugerida para essas sondas é de -20°C, entretanto foi demonstrado que repetidos ciclos de congelamento-descongelamento reduzem sua vida útil. Além disso, em ambientes que apresentam condições potencialmente redutoras, as propriedades fotofísicas dos fluoróforos derivados da cianina são alteradas, podendo até causar a extinção da fluorescência.<sup>42,185,192,193</sup>

As sondas derivadas do núcleo fenoxazina apresentam bons rendimentos quânticos, a mais utilizada é a resorufina ( $\Phi = 0,75$ ) que apresenta fluorescência na região do vermelho, com máximo de emissão em 585 nm.<sup>194</sup> Essas sondas, no geral, apresentam absorção e emissão em comprimentos de onda longos, o que é uma vantagem para aplicação no bioimageamento, pois reduz significativamente as interferências causadas pela autofluorescência. Por esse motivo, derivados do núcleo fenoxazina tem sido

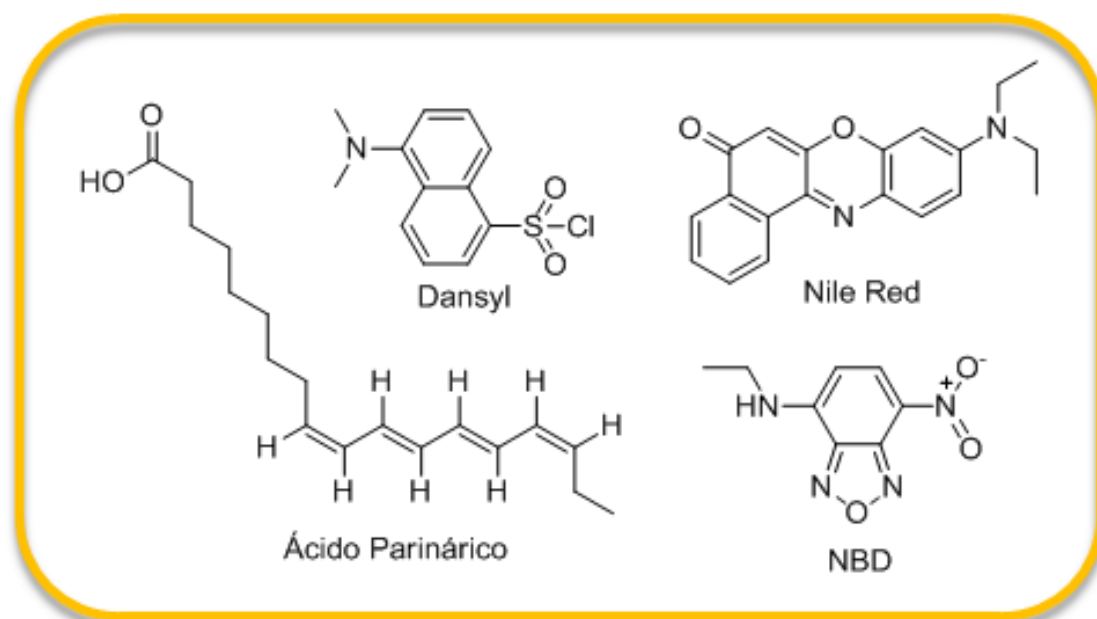
utilizados para se obter uma variedade de substratos enzimáticos com emissão na região do vermelho.<sup>195</sup> Assim como os derivados dos núcleos fluoresceína e rodamina, a classe das fenoxazinas é sensível a variação de pH do meio e além disso, caso grupos substituintes acila ou alquila sejam inseridos na estrutura molecular podem promover a formação de uma lactona, e assim extinguir a fluorescência do núcleo. Reações que promovem redução ou a oxidação desse núcleo causam uma diminuição significativa da fluorescência.<sup>196</sup> As sondas derivadas do núcleo fenoxazina são menos utilizadas (quando comparada com a demais citadas), pois apresentam deslocamentos de Stokes pequenos o que resulta em algumas dificuldades relacionadas ao ajuste necessário para a obtenção de imagens das células estudadas, principalmente na microscopia confocal.<sup>194,197</sup> Esses compostos também são muito sensíveis à polaridade do ambiente ao qual estão inseridos, sendo observada uma diminuição da eficiência da fluorescência quando em contato com soluções aquosas (ambiente celular).<sup>198</sup>

Até por volta da década de 90 os marcadores celulares orgânicos eram as únicas ferramentas disponíveis para a marcação celular fluorescente. O grande número de trabalhos a respeito de moléculas fluorescentes permitiu vários avanços na arquitetura dos fluoróforos possibilitando a elaboração de estruturas mais complexas assim como endógenas ao ambiente celular. Um exemplo de grande destaque foi o início da utilização da proteína *Aequorin* descrita por Shimomura e colaboradores<sup>199</sup>, como um novo marcador celular fluorescente.<sup>200</sup> As proteínas fluorescentes são ferramentas muito utilizadas atualmente, entretanto os fluoróforos orgânicos ainda ganham muito destaque, tanto como agentes de marcação seletiva quanto como sensores biológicos ativáveis, porque podem ser utilizados em qualquer amostra (incluindo o corpo humano), são relativamente baratos e fáceis de manusear, e, geralmente, fornecem imagens com elevada razão sinal ruído (até mais de 1000).<sup>28</sup>

Muitos marcadores fluorescentes apresentam bons resultados quanto a especificidade, baixa citotoxicidade e aos parâmetros relacionados a emissão de fluorescência, o que implica diretamente na versatilidade de seu emprego. Um exemplo dessa versatilidade pode ser observado na existência de diversas sondas comerciais utilizadas como marcadores específicos para lipídeos. Contudo, devido à natureza das membranas celulares e a presença de moléculas com características hidrofóbicas no citoplasma das células, o uso destes marcadores ainda produz imagens contendo ruído. A emissão de fluorescência associada a estas moléculas que não são as de interesse reduz a

qualidade das imagens adquiridas e interfere significativamente na precisão que é requerida em análises quantitativas.

Dentre os principais fluoróforos utilizados para marcação de lipídeos, podemos destacar: os marcadores da família BODIPY, os fluoróforos nitrobenzoxadiazol (NBD), o cloreto de 5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonil (Dansyl), o ácido *cis*-parinarico e o Nile Red. Em termos de demanda comercial os três primeiros são mais utilizados. A Figura 28 apresenta a estrutura molecular dos corantes citados (a estrutura do núcleo BODIPY foi apresentada na Figura 25).<sup>201,202</sup>



**Figura 28.** Estrutura molecular dos fluoróforos mais utilizados na marcação de lipídeos.

Alguns derivados do núcleo BODIPY são seletivos para marcação fluorescente de lipídeos neutros. Essa classe de fluoróforos apresenta baixa solubilidade em água, entretanto vem sendo amplamente utilizado para a marcação de acúmulos de lipídeos intracelulares (gotas lipídicas). A marcação de corpúsculos lipídicos em células vivas com BODIPY é clara e distintamente visualizada tanto em microscopia de epifluorescência quanto pela microscopia confocal, entretanto essa sonda também marca lipídeos neutros presentes na constituição da membrana celular, gerando ruído nas imagens obtidas. Apesar de ser muito utilizado, alguns autores relataram algumas desvantagens associadas ao emprego do BODIPY, uma delas é a formação de background de fluorescência no meio. A necessidade de utilização de solventes orgânicos para sua solubilização (mesmo

em baixas concentrações) faz com que haja uma redução da fluorescência e aumento significativo de debris celulares.<sup>37,51,203</sup>

Os NBDs são compostos que apresentam sensibilidade ao meio ao qual estão inseridos e um rápido fotodecaimento implicando em um tempo de vida útil muito inferior ao do BODIPY, quando diluídos em solventes aquosos.<sup>204</sup> Esta característica reduz a aplicação deste fluoróforo principalmente para ensaios cujas aquisições de imagem sejam pretendidas a partir de modelos vivos. Para esse tipo de experimento de marcação, as sondas devem ficar expostas aos marcadores por longos períodos devido a complexidade dos tecidos e o retardo no tempo de penetração dos reagentes até atingir as células. Além disso, já foi demonstrado que essa classe de marcadores não são muito bem metabolizadas por células vivas.<sup>36,205,206</sup>

O ácido undecanóico Dansyl (DAUDA, D94) é uma sonda derivada do núcleo Dansyl que apresenta afinidade pelas cabeças polares dos glicerofosfolídeos encontrados nas bicamadas lipídicas das membranas celulares.<sup>207</sup> Essa sonda apresenta uma acentuada emissão fluorescente e uma mudança no comprimento de onda de emissão fluorescente de menos energéticos para mais energéticos quando associados a determinadas proteínas. Esta característica fotofísica vem sendo utilizada para a análise de proteínas que promovem a ligação de ácidos graxos.<sup>208,209</sup> Esse marcador apresenta seletividade bastante comprometida o que gera imagens de baixa qualidade (com uma pequena razão sinal ruído). Esta limitação é ainda mais acentuada quando a sonda é utilizada na marcação de modelos celulares vivos, pois células eucarióticas apresentam uma grande quantidade de proteínas que promovem a ligação de lipídeos no citoplasma, as quais sequestram estes marcadores, sendo marcadas por esta sonda e comprometendo significativamente a sua especificidade.<sup>37</sup>

O ácido cis-Parinarico é o análogo estrutural mais próximo entre as sondas fluorescentes atualmente disponíveis dos lipídeos da membrana. Este marcador apresenta propriedades ópticas vantajosas como um grande deslocamento de Stokes (aproximadamente 100nm) e uma fluorescência quase nula em água. Porém, o seu grande número de insaturações faz com que ele seja bastante suscetível a oxidação, o que demanda maiores cuidados em seu armazenamento, tais como: abrigo da luz, baixas temperaturas (-20°C) e atmosfera inerte (argônio).<sup>36</sup> A exposição do ácido a intensa iluminação provoca sua fotodimerização, o que leva a extinção da sua fluorescência.<sup>210</sup> Essa sonda já foi utilizado na detecção de interações entre lipídeos e proteínas,<sup>211</sup> na

caracterização de proteínas,<sup>212</sup> investigação do mecanismo de ligação entre ácidos graxos e proteínas<sup>213</sup> e do mecanismo de proteínas de transferência fosfolipídicas.<sup>214</sup>

Nile red é um corante da família benzofenoxazona utilizado para marcar lipídeos neutros que foi comercialmente substituído pelos derivados do BODIPY.<sup>198,215</sup> Esse corante é solúvel em uma variedade de solventes orgânicos não sendo observado nenhum efeito solvatocrômico em suas propriedades fotofísicas. Entretanto, são fracamente solúveis em água e sua fluorescência é extinta na presença desse solvente.<sup>216,217</sup> É um composto hidrofóbico e metacromático, com sua emissão variando do vermelho longo ao amarelo dourado em ambientes hidrofóbicos. Essa sonda já foi utilizada para marcar o colesterol no plasma humano, vesículas lipídicas em células do músculo liso e culturas de macrófagos incubados em baixa densidade.<sup>203</sup>

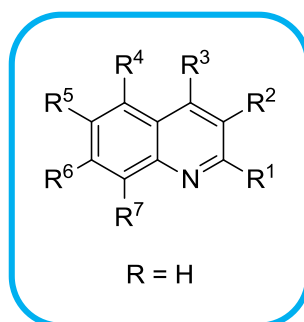
Diversos estudos permitiram o reconhecimento do envolvimento de lipídeos em inúmeras vias essenciais a vida e a homeostase das células e dos organismos, por esse motivo o estudo da captação e do metabolismo de lipídeos vem se tornando uma demanda crescente nas áreas das ciências biológicas e da saúde.<sup>218</sup> Os lipídeos estão envolvidos em diversos processos de elevada importância biológica que vão desde a manutenção das membranas celulares até a produção de moléculas que atuam como segundos mensageiros envolvidos nos processos de sinalização celular e em processos inflamatórios.<sup>219</sup> Sendo assim, entender o metabolismo de lipídeos tem implicações clínicas muito relevantes, pois hoje é amplamente reconhecido o seu envolvimento em uma série de doenças graves como as cardíacas, imunes, metabólicas, neurodegenerativas, disfunções ligadas ao desenvolvimento embrionário/infantil e no câncer.<sup>220-226</sup>

Devido às limitações impostas à marcação de lipídeos pelos marcadores fluorescentes comerciais é urgente que se pense em novas moléculas fluorescentes que apresentem ótima especificidade, estabilidade, reduzido fotodecaimento, elevado rendimento quântico, deslocamentos de Stokes grandes, e acima de tudo, solubilidade em soluções aquosas (mesmo que parcial) de forma a manter-se disponíveis tanto em estoque quanto durante a sua interação com as células.

Nesse sentido, novos núcleos fluorescentes têm sido estudados e apresentados na literatura. Um exemplo disso é o núcleo BTB, que teve sua primeira aplicação como marcador fluorescente celular em 2007.<sup>38</sup> Nesse trabalho, Neto e colaboradores apresentaram a síntese de vários derivados do núcleo BTB que foram utilizados como

marcadores fluorescentes intercaladores de DNA. Nesse mesmo ano, Chi e colaboradores<sup>227</sup> sintetizaram um copolímero de fenileno-fluoreno com a unidade BTB, caracterizaram e aplicaram na marcação de DNA. Em 2010 Oliveira e colaboradores descreveram pela primeira vez a utilização de uma pequena molécula derivada da unidade BTB na marcação seletiva do núcleo de células tronco humanas. Inclusive um dos derivados sintetizados no trabalho em questão apresentou uma performance de marcação melhor que o marcador comercial (DAPI).<sup>228</sup> Em 2012 Neto e colaboradores<sup>12</sup> publicaram seus trabalhos de síntese e aplicação biológica de novos marcadores celulares derivados do núcleo BTB. As moléculas apresentadas pelo trabalho marcaram de maneira muito eficiente e seletiva as mitocôndrias celulares. O que demonstra a grande versatilidade desse núcleo em relação a sua aplicação biológica, uma vez que modificações em seus grupos substituintes altera de maneira significativa a marcação seletiva desses compostos no meio celular.

Outra molécula orgânica que tem sido utilizada cada vez mais na síntese de marcadores celulares fluorescentes é a quinolina (QN), apresentado na Figura 27. Principalmente pelo fato de seus derivados serem compostos heterocíclicos aromáticos utilizados com frequência na química medicinal por várias décadas. Os compostos derivados do núcleo QN apresentam atividade anticarcinogênica,<sup>229</sup> anti-inflamatória,<sup>230</sup> antibacteriana,<sup>231,232</sup> antimalárica,<sup>233,234</sup> antifilária,<sup>235</sup> biocida,<sup>236,237</sup> apresenta uma elevada atividade antiplasmodial,<sup>238,239</sup> inibe o vírus da imunodeficiência humana (HIV),<sup>240</sup> são excelentes sondas luminescentes para detecção de determinados íons no ambiente celular<sup>241-243</sup> e também funcionam como corantes no imageamento celular.<sup>244-246</sup>



**Figura 29.** Núcleo quinolina. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> indicam as posições no anel que podem ser utilizadas para inserção de novos grupos substituintes.



Um exemplo prático da utilização do núcleo QN no bioimageamento celular foi publicado em 2015, por Kumar e colaboradores.<sup>244</sup> Nesse trabalho foi descrita a síntese e aplicação como intercalador luminescente de DNA de um composto derivado do núcleo QN acoplado a uma chalcona. Eles apresentaram de maneira detalhada o estudo fotofísico do novo composto obtido. Foram os primeiros a apresentarem de maneira detalhada a interação da nova molécula com o DNA assim como seu padrão de orientação na dupla hélice. Outro exemplo de utilização do núcleo QN para síntese de compostos fluorescentes foi publicado em 2017, por Kwon e colaboradores.<sup>245</sup> Nesse trabalho três novas sondas derivadas do núcleo QN foram sintetizadas e testadas quanto sua afinidade no meio celular. Duas delas apresentaram afinidade pelo material genético celular (DNA, RNA) e após uma pequena modificação estrutural a terceira apresentou seletividade para marcação dos lisossomos das células testadas. Assim como a BTM o núcleo QN é bastante versátil, uma pequena modificação estrutural da molécula pode atribuir aos compostos propriedades fotofísicas e seletividade completamente distintas.

A utilização de moléculas derivadas do núcleo QN no imageamento celular pode ser explicada pelo fato desses compostos apresentarem, em geral, eficiente e rápida permeabilidade no meio celular, baixa toxicidade, apresentam elevados rendimento quânticos de fluorescência, boa razão sinal ruído na fluorescência, bons deslocamentos de Stokes, relativa solubilidade em sistemas biológicos aquosos, versatilidade do núcleo para modificações estruturais e potencial para futuras aplicações biológicas diferenciadas.<sup>246</sup>

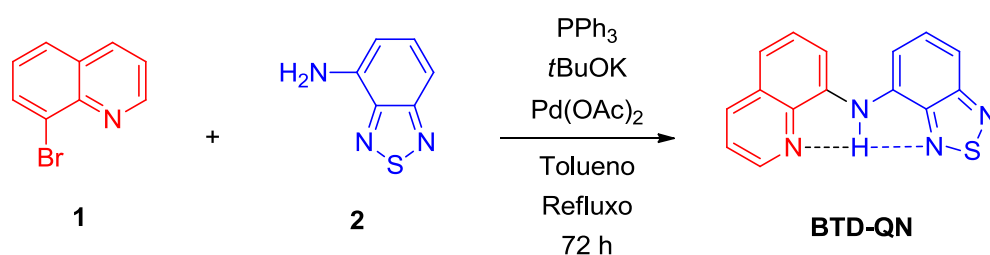
A junção de compostos heterocíclicos para formar novos sistemas moleculares ainda hoje é um desafio de grande relevância para a química orgânica, pois esses novos sistemas apresentam características químicas e físicas completamente diferente dos materiais de partida.<sup>247</sup> A conformação e o tamanho molecular, o grau e o padrão de substituição do composto são responsáveis pelo reconhecimento e interação com biomoléculas. Núcleos que apresentem essas características são preferencialmente adotados para atuarem como sondas. Sendo assim, a junção do núcleo BTM com o núcleo QN surgiu como uma alternativa interessante para obtenção de uma nova sonda fluorescente. É importante destacar que essa é a primeira proposta conhecida de síntese de um híbrido fluorescente (junção de duas moléculas fluorescentes) utilizando o núcleo BTM. Fazendo a proposta inédita e possibilitando a oportunidade de tornar esse processo pioneiro nesse tipo de síntese.

# Parte Experimental

## Parte Experimental

### 2.1 - Obtenção do Híbrido fluorescente **BTD-QN**:

Para a síntese do híbrido fluorescente *N*-(quinolin-8-il)-4-amino-2,1,3-benzotiadiazol, apresentado nesse capítulo, foi adicionado em um tubo Schlenk 0,68 mmol (103 mg) de 4-amino-2,1,3-benzotiadiazol, 1,32 mmol (275 mg) de 8-bromoquinolina, 5 mol% de Pd(OAc)<sub>2</sub> (ca. 8 mg), 10 mol% de PPh<sub>3</sub> (ca. 17 mg), 200 mol% de tBuOK (154 mg) e 5 mL de tolueno seco (Esquema 3). A mistura reacional foi submetida ao aquecimento (100 °C) e agitação magnética por 72 h.



**Esquema 4.** Reação para obtenção do híbrido fluorescente *N*-(quinolin-8-il)-4-amino-2,1,3-benzotiadiazol.

Ao fim do período de 72 h a mistura reacional bruta foi filtrada com celite e o produto foi purificado por cromatografia de coluna usando sílica (230 mesh) como fase estacionária e uma mistura de hexano:acetato de etila (3:1 v/v). Rendimento: 13%.

### 2.2 – Equipamentos e análises:

#### →Infravermelho:

Os espectros de infravermelho (IV) da **BTD-QN** foram obtidos utilizando patilhas de KBr, em uma faixa espectral de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando o espectrômetro Varian 640-IR com transformada de Fourier.

#### →<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN:

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Ascend™ Avance III HD de 14,1 T (600 MHz para <sup>1</sup>H e 150 MHz para <sup>13</sup>C), utilizando uma sonda de diâmetro interno de 5 mm (BBOFO 5mm). Como solvente foi utilizado acetona deuterada (COC<sub>2</sub>D<sub>6</sub>).

**→ Espectrofotômetro de Absorção:**

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro CaryWin 50 Varian.

**→ Espectrofotômetro de Fluorescência:**

Os espectros de emissão, o rendimento quântico e a fotoestabilidade foram obtidos utilizando um Espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian CA-USA). O rendimento quântico relativo do C-Dot-NH-BTD foi adquirido utilizando o sulfato de quinina como padrão ( $\Phi_f=0.54$ )<sup>142</sup> e de acordo com a metodologia proposta pela *Jobin Yvon HORIBA*.

**→ Espectrômetro de Massas:**

O espectro de massas de alta resolução foi adquirido por um Espectrômetro AB Sciex TripleTOF 5600+, com calibração interna por meio da infusão direta da amostra diluída em uma solução de 1 ppm.

**2.3 - Experimentos de imageamento celular:**

A experimentação em células foi realizada pelo grupo Coordenado pelo Prof. Dr. José R. Corrêa (IB-UnB). Gostaria de agradecer pela colaboração.

*→ Cultura de células*

Nesse trabalho foram utilizadas células MCF-7 (célula de adenocarcinoma de mama humano), MDA-MB-231 (célula de adenocarcinoma invasivo de mama humano), DU-145 (células de câncer de próstata humano) e Caco-2 (células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano). Todas as linhagens de células foram mantidas em meio de cultura apropriado conforme recomendado pela ATCC (American Type Culture Collection), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomicina a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

*→ Ensaios de fluorescência*

As células foram cultivadas em lamelas de vidro redondas (de 13 mm) no fundo de uma placa de 24 poços, deixadas “*overnight*” para aderir e lavadas três vezes com meio isento de soro para remoção de células não aderentes. Após atingir a confluência, as células

foram separadas em duas amostras: células vivas e células fixadas. As amostras vivas foram incubadas por 30 minutos em uma solução de 1  $\mu\text{M}$  de **BTD-QN** a 37 °C. Estas amostras foram lavadas três vezes com uma solução tampão de PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e fixadas em formaldeído a 3,7% durante 30 minutos. As amostras foram lavadas novamente três vezes com a solução tampão de PBS 1X (pH 7,4) a temperatura ambiente e as lamelas foram montadas sobre lamínas de vidro utilizando o ProLong Gold Antifade (Invitrogen, OR, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras fixadas foram primeiramente lavadas três vezes com uma solução tampão PBS 1X (pH 7,4) e então fixadas em formaldeído a 3,7% durante 30 minutos. Após o procedimento de fixação, as amostras foram lavadas três vezes com a solução tampão de PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e em seguida incubadas durante 30 minutos em solução 1  $\mu\text{M}$  de **BTD-QN** a 37 °C. Após o tempo de incubação as amostras foram lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e as lamelas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando o ProLong Gold Antifade (Invitrogen, OR, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O controle negativo foi realizado por incubação das amostras até 0,1% de DMSO, solvente utilizado no preparo da solução estoque de **BTD-QN**. As amostras foram analisadas utilizando a Microscopia Confocal Leica TCS SP5 e excitadas usando um laser com comprimento de emissão de 488 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram realizadas três repetições para cada amostra de célula e condição experimental.

→ *Marcação de lipídeos neutros com a sonda comercial BODIPY*

Os procedimentos de marcação com BODIPY foram realizados com o mesmo grupo de células (células vivas e fixas) como descrito anteriormente. Resumidamente, as amostras de células foram incubadas com BODIPY usando uma solução de DMSO (12  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação das amostras, as células foram lavadas três vezes com uma solução tampão de PBS e as amostras foram montadas sobre lâminas de vidro usando o agente Prolong Gold Antifade (Invitrogen, OR, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas utilizando Microscopia Confocal Leica TCS e excitadas usando um laser com comprimento de emissão de 488 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram realizadas três repetições para cada amostra de célula e condição experimental.

*→ Quantificação de estruturas lipídicas*

Foi realizada uma quantificação lipídica utilizando o software ImageJ. As imagens obtidas das amostras marcadas pelo BODIPY e pelo **BTD-QN** foram ajustadas aos mesmos limiares de cor. Além disso, as imagens foram tratadas por ajuste de nível para remoção máxima de colorações de fundo. Aplicou-se a ferramenta de análise de partículas com a faixa de configuração de circularidade de 0,25 a 1,00. A opção in situ mostra que os contornos de sobreposição foram selecionados no software para possibilitar uma inspeção visual da seleção automática. O ajuste descrito acima foi capaz de incluir todas as estruturas lipídicas das imagens.

*→ Ensaio de viabilidade celular*

Os testes de viabilidade celular foram realizados utilizando-se células MCF-7 (linhagem de célula de adenocarcinoma de mama humano), MDA-MB-231 (linhagem de célula de adenocarcinoma invasivo de mama humano), DU-145 (linhagem de célula de câncer de próstata humano) e Caco-2 (linhagem de célula de adenocarcinoma epitelial colorretal humano). As células foram incubadas com uma solução 100 µM de **BTD-QN** e analisadas por ensaios padrão de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio), seguindo as recomendações do fabricante (P & D System Inc, MN, EUA).

Resumidamente,  $3 \times 10^3$  de cada linhagem de célula foi cultivada em uma placa de 96 poços e mantidos a 37 ° C durante a noite. Essas amostras foram incubadas por 24 horas em uma solução de **BTD-QN** (100 µM). Como controle negativo, células foram incubadas apenas com o meio de cultura e como controle positivo, células foram incubadas com solução de DMSO com concentração abaixo de 0,1 % nas mesmas condições.

As amostras foram incubadas em meio de cultura celular com uma solução de 150 µl de MTT (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) por 4 horas, no escuro e a 37 ° C. O MTT é reduzido por células metabolicamente ativas a cristais insolúveis de formazan (de coloração púrpura) que se acumularam no interior do citoplasma das células. A solução de MTT foi removida e foi adicionado 200 µl de DMSO em todas as amostras para solubilizar os cristais do corante formazan. A placa foi lida no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices, CA, EUA) e o comprimento de onda ideal para absorvância foi de 570 nm. O ensaio MTT foi realizado em triplicata e também foram realizados três ensaios independentes. A inibição da viabilidade celular foi determinada pela avaliação do resultado MTT obtido

para amostras de teste comparadas com as amostras controle nas mesmas condições, seguindo a expressão Sobrevivência % = [(Amostra Testada - Branco)/(Amostra Controle - Branco)] x 100.

→ *Procedimentos de manutenção e marcação do Caenorhabditis elegans*

Os nematoides foram mantidos em meio de ágar NGM (meio de crescimento nematódeo) inoculado com *E-coli* (estirpe NA22) em placas de Petri. Os vermes foram cultivados e mantidos a 22 ° C por 30 dias. Foi adicionado meio M2 nas placas de petri e o meio M2 e os vermes foram recolhidos e transferidos para tubos de plástico (de 1,5 mL) e centrifugados a 2348 G durante um minuto. O sobrenadante foi descartado e este processo foi repetido por duas vezes. Os vermes foram incubados em paraformaldeído 4% por 15 minutos, as amostras foram submetidas a congelamento (em N<sub>2</sub>) e descongeladas (em água à temperatura ambiente). As amostras foram lavadas três vezes em meio M2 e incubadas por duas horas com **BTD-QN** (10 µM) ou em BODIPY (12 µM). As amostras foram lavadas três vezes em meio M2 e colocadas em lâminas de vidro contendo Poli-L-Lisina com concentração 0,1%. As amostras foram montadas usando o agente Prolong Gold Antifade (Invitrogen, OR, EUA). As aquisições de imagens foram realizadas utilizando Microscopia Confocal Leica TCS-SP5. Os ensaios envolvendo *C. elegans* foram realizados em triplicata e os experimentos foram repetidos três vezes.

→ *Marcação animal (camundongos) e procedimento cirúrgico*

A experimentação *in vivo* de camundongos foi realizada pelo grupo Coordenado pelo Prof. Dr. Gustavo Menezes (UFMG). Gostaria de agradecer pela colaboração.

Camundongos C57Bl/6 machos com 13 semanas de idade foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG, Brasil). Os ratos foram condicionados sob condições controladas de temperatura (24 °C) e luminosidade (ciclos de luz/escuridão de 12/12 h), com ração e água *ad libitum*. Os ratos foram alimentados com dieta rica em gordura (HFD) ou dieta padrão (SD) por nove semanas. Após esse período, os camundongos foram submetidos ao imageamento confocal intravital. Para o procedimento, eles foram anestesiados (i.p.) com uma mistura de cetamina (60 mg por kg, Syntec) e xilazina (15 mg por kg, Syntec) e foi realizada uma laparotomia de linha média para expor o tecido adiposo e o fígado para o imageamento. Após a cirurgia, os camundongos receberam a solução de **BTD-QN** (20 µL, 10 µM) diretamente na superfície do tecido adiposo epididimal e na superfície do fígado (5 min

de exposição). Para o vídeo, após a cirurgia, o camundongo recebeu uma dose única da solução de **BTD-QN** (20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) e de Hoechst 33342 (5  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de  $3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por injeção intravenosa. Os camundongos de controle foram submetidos ao mesmo processo experimental mas não receberam o corante de **BTD-QN**. Os camundongos foram visualizados usando um Microscópio Nikon A1R Confocal equipado com excitação a laser a 488 nm e emissão a 531-541 nm. As imagens foram analisadas usando o software Volocity 6.3.

*Todos os estudos com animais foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (CEUA 147/2016).*

## 2.4 – Cálculos computacionais

Os cálculos computacionais foram realizados pelo grupo Coordenado pelo Prof. Dr. Heibbe Cristhian Benedito de Oliveira (IQ-UnB). Gostaria de agradecer pela colaboração.

O tratamento teórico do composto **BTD-QN** foi realizado utilizando a teoria da teoria do funcional de densidade (DFT) implementada no conjunto de programas Gaussian 09.<sup>248</sup> A otimização da geometria do estado fundamental ( $S_0$ , em fase gasosa e água) foi conduzida com o conjunto de bases e valências divididas 6-311G (d,p) de Pople e o funcional de correlação híbrida de troca usando o método atenuante de Coulomb (CAM-B3LYP). Os cálculos de frequência harmônica foram realizados para verificar se localizamos um mínimo genuíno. As geometrias otimizadas foram usadas para o cálculo de TD-DFT de ponto único usando diferentes correlações de troca (XC) funcionais (wB97XD, PBE1PBE, M062X e CAM-B3LYP) em combinação com um conjunto de base 6-311+G(2d,p). Em particular, os espectros de absorção foram obtidos em estreita concordância com os experimentos usando o conjunto de bases 6-311+G (2d,p).<sup>249,250</sup> Para incluir os efeitos do solvente (água) em nossos cálculos da mecânica quântica, empregamos o campo de reação auto-consistente (SCRF) com o modelo de continuidade polarizável (PCM)<sup>251-253</sup> a molécula de soluto foi encerrada em uma cavidade embutida em um meio dielétrico.



# Resultados & Discussão

## Resultados e Discussão:

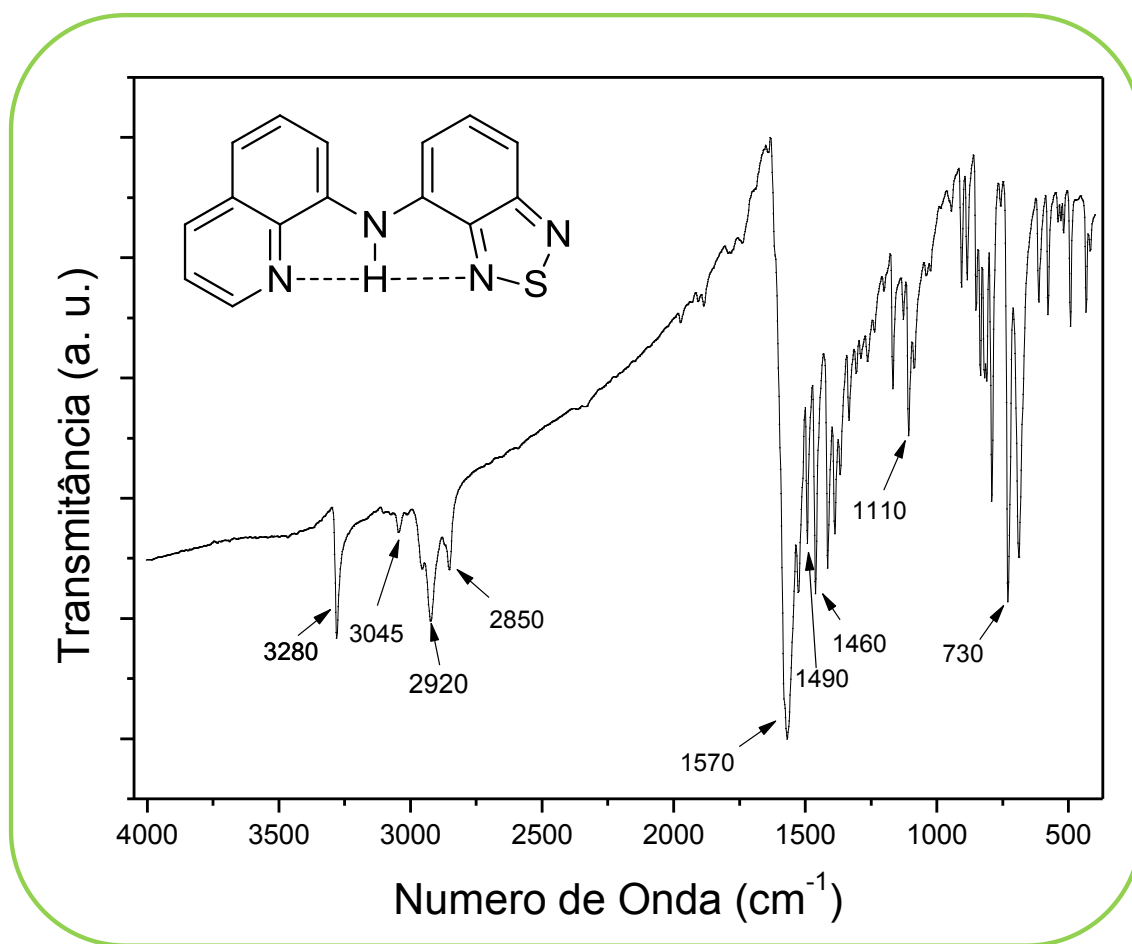
O híbrido fluorescente **BTD-QN** foi obtido utilizando a metodologia de acoplamento cruzado proposta pelos cientistas Stephen L. Buchwald e John F. Hartwig. Essa metodologia é conhecida como reação de acoplamento cruzado Buchwald-Hartwig e consiste na síntese de aril aminas mediada comumente por um catalizador de paládio, na presença de uma base, um solvente orgânico e aquecimento. Os reagentes necessários para síntese são: um haleto de arila ou pseudoarilas (por exemplo triflatos) e uma amina primária ou secundária. Nesse trabalho o haleto de arila utilizado foi a 8-bromoquinolina e a amina primária foi a 4-amino-2,1,3-benzothiadiazol.

Os principais sinais vistos no espectro de FTIR da **BTD-QN** estão apresentados na Tabela 2. O espectro de FTIR, também é apresentado (Figura 30). É possível observar várias bandas de 900 a 690  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos dobramentos para fora do plano dos C-H aromáticos (em destaque a banda em 730  $\text{cm}^{-1}$ ). Em 1110  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma banda referente ao estiramento da ligação C-N. Em 1490  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma banda referente ao estiramento das ligações C=C aromáticas. Em 1460 e em 1570  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar o estiramento das ligações C=N do anel da BTD. Em 2850, 2920 e em 3045  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar bandas referentes aos estiramentos das ligações C-H aromáticas. E em 3280  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma banda referente ao estiramento da ligação N-H.

**Tabela 2.** Principais estiramentos e dobramentos observados no espectro de FTIR da BTD-QN.

BTD-QN	
Grupo	Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
<i>C-H aromático (dobramento)</i>	730
<i>C-N</i>	1110
<i>C=C</i>	1490
<i>C=N</i>	1460
	1570
<i>C-H aromático (estiramento)</i>	2850
	2920
	3045
<i>N-H</i>	3280

O espectro de FTIR é apresentado juntamente com a estrutura molecular da **BTD-QN** para melhor visualização dos comprimentos de onda referentes a cada banda (Figura 30).



**Figura 30.** Espectro de FTIR da **BTD-QN**. Os estiramentos e dobramentos das ligações foram apresentados em destaque.

A aquisição dos espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN (Figuras 31 e 32) permitiram a caracterização da molécula obtida. No espectro de <sup>1</sup>H (Figura 30) é possível observar um singlete em 10.06 ppm referente a um H da amina presente na molécula. Observam-se três dupletos de dupletos referentes aos três H da porção BTB da molécula em 8.97 ppm ( $J_1 = 4$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz), 8.38 ppm ( $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz) e em 7.96 ppm ( $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 1$  Hz). Observam-se três multipletos referentes aos 6 H da porção QN da molécula em 7.72 ppm (m, 2H), 7.64 ppm (m, 2H) e em 7.53 ppm (m, 2H). Também é possível observar, no espectro de <sup>1</sup>H, alguns sinais provenientes de resíduos de solventes e graxa. Em 0,12 ppm é possível observar um sinal referente a graxa de silicone, em 0,89 e em 1,28 ppm é possível observar sinais característicos de resíduo de hexano em acetona, em 1,41 ppm é possível observar um sinal característico de resíduo de ciclohexano em acetona e em 2,82 ppm é possível observar um sinal característico de resíduo de água em acetona.

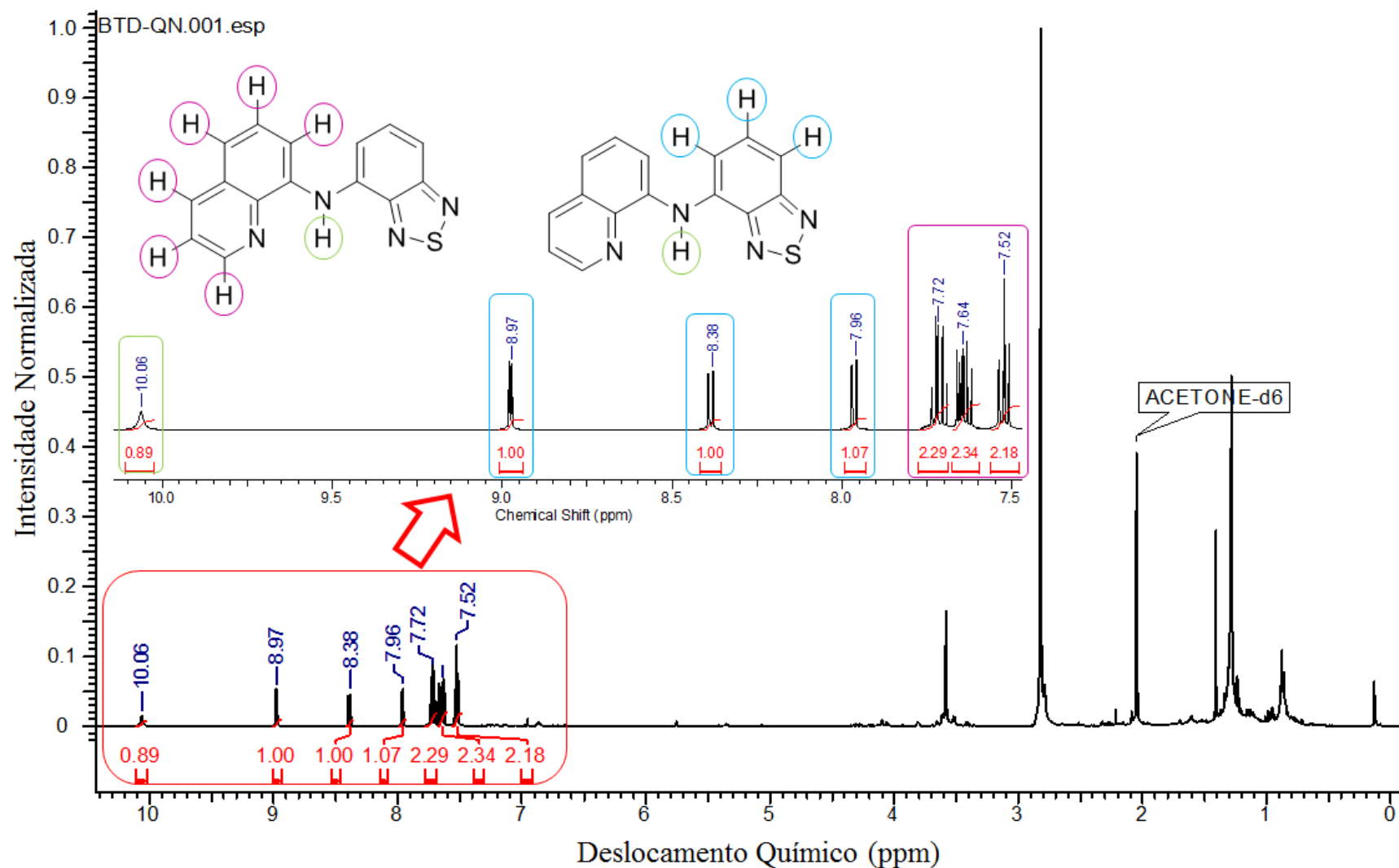


Figura 31. Espectro de <sup>1</sup>H da BTD-QN em acetona deuterada, com a integral dos picos. A região de 7,4 a 10,5 ppm foi ampliada para melhor visualização dos sinais.

No espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) observam-se sinais seis sinais de 156,6 até 137,5 ppm referentes aos carbonos da porção BTB da molécula e de 135,3 até 107,9 ppm nove sinais dos carbonos da porção QN da molécula. Também é possível observar sinais característicos de impurezas e solventes analisando o espectro de  $^{13}\text{C}$ . Em 14,40, 23,37 e 32,66 ppm é possível observar sinais característicos de resíduo de hexano em acetona.

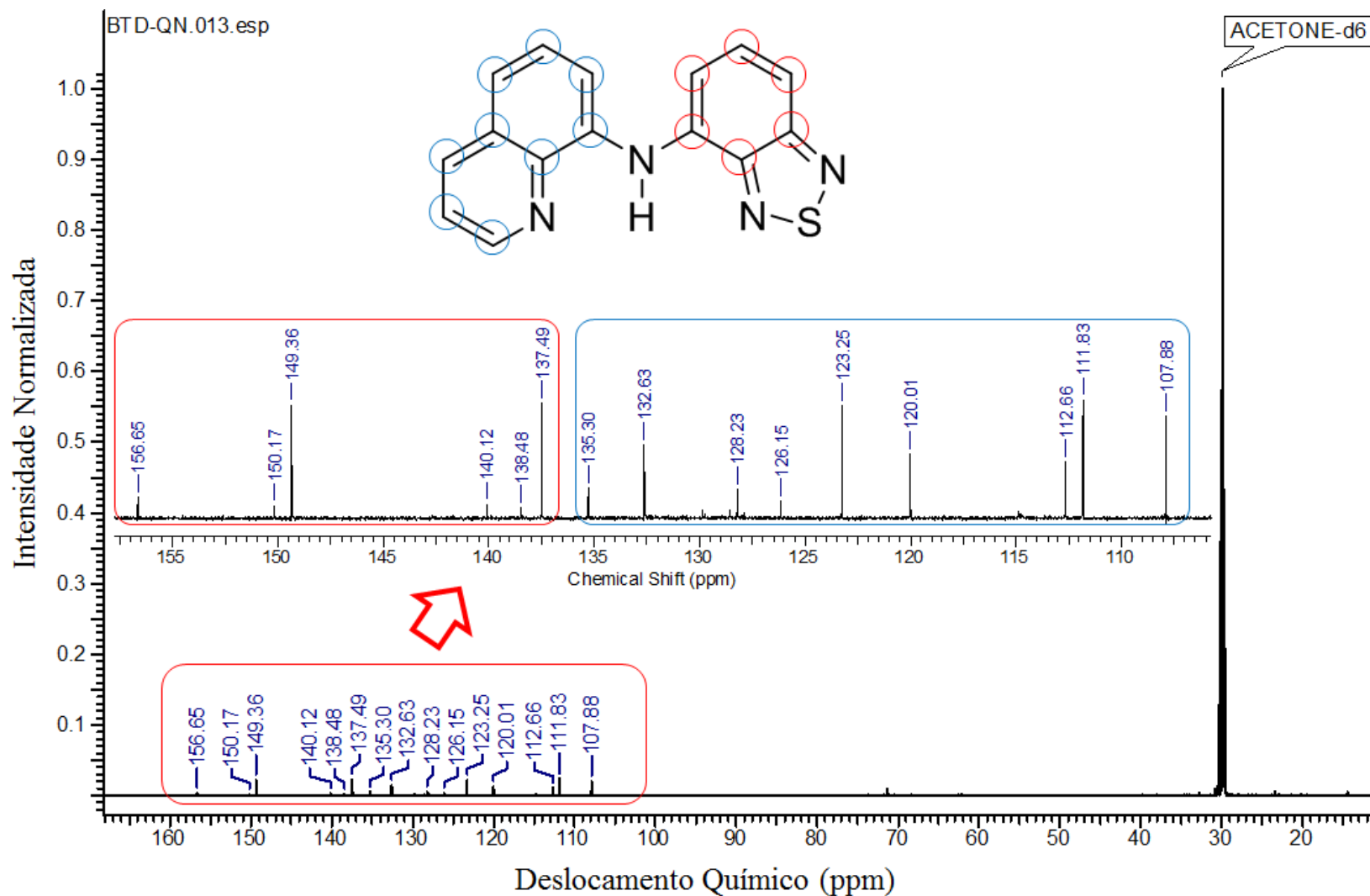
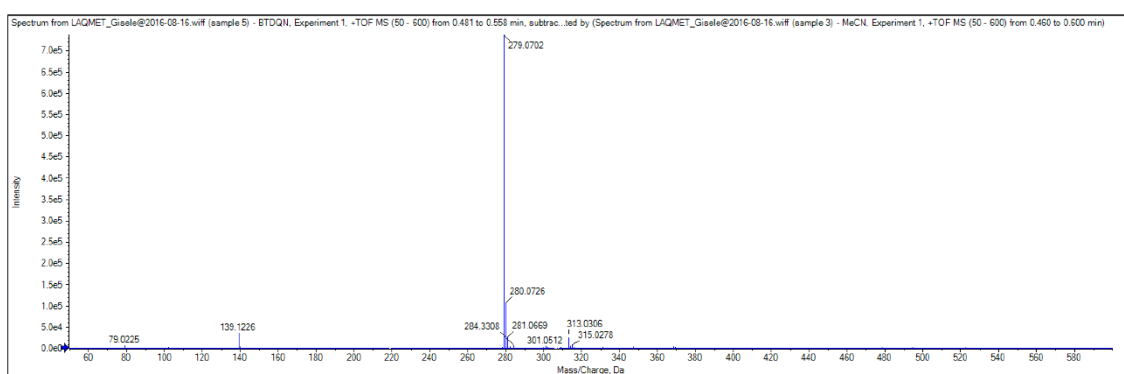


Figura 32. Espectro de  $^{13}\text{C}$  da BTD-QN em acetona deuterada. A região de 100 a 160 ppm foi ampliada para melhor visualização dos sinais.

No espectro de ESI(+)-MS de alta resolução (Figura 33) é possível observar um sinal de razão massa carga de 279.0702 referente a estrutura da **BTD-QN** mais um próton ( $[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S} + \text{H}]^+$ ). O valor exato calculado para o composto é de 279.0704, o que confere um erro muito baixo (0,7 ppm) para a análise. São observados dois sinais de razão massa carga 280,0726 e 281,0669 que correspondem ao padrão isotópico dos átomos de nitrogênio e enxofre respectivamente, presentes na estrutura.



**Figura 33.** HR-ESI(+)-MS da  $[\text{BTD-QN}+\text{H}]^+$ .

As características fotofísicas da **BTD-QN** foram determinadas por meio da aquisição dos espectros de UV-Vis e de emissão (Figura 34-a e b, respectivamente) em doze diferentes solventes e com concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Nos espectros de UV-Vis (Figura 34-a) observa-se uma banda com máximo de absorção em aproximadamente 360 nm (menos para a água e o clorofórmio) que pode ser atribuída a transição  $n \rightarrow \sigma^*$  das ligações C—N e N—S. Também é observada uma banda de absorção larga com máximos em aproximadamente 450 nm que pode ser atribuída a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos carbonos  $sp^2$  aromáticos. Analisando os espectros de fluorescência para os diferentes solventes (Figura 34-b) é possível observar que o padrão de fluorescência é extremamente dependente da natureza o solvente.

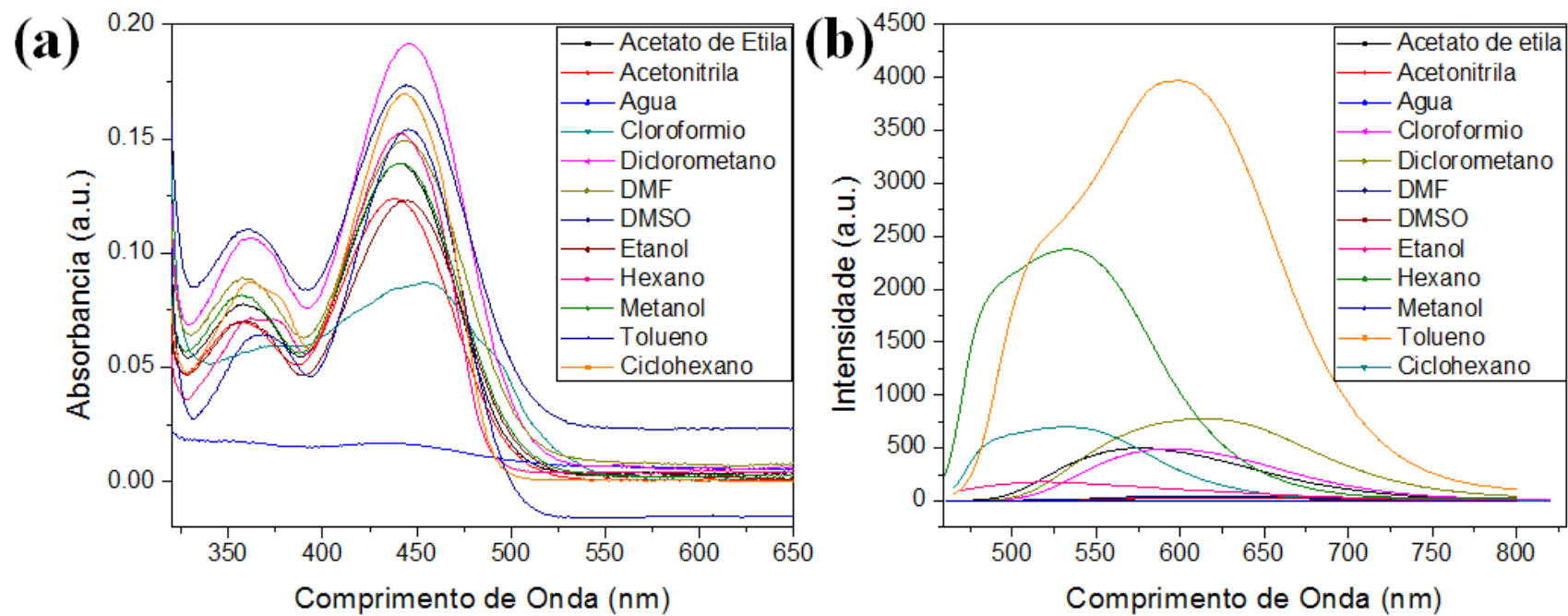


Figura 34. (a) Espectros de UV-VIS em diferentes solventes e em (b) Espectros de fluorescência em diferentes solventes da **BTD-QN**.



Para melhor visualização, os dados obtidos foram organizados e dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Dados de UV-VIS e emissão (em diferentes solventes) para **BTD-QN**. Concentração de 10  $\mu\text{M}$  para todas as análises.

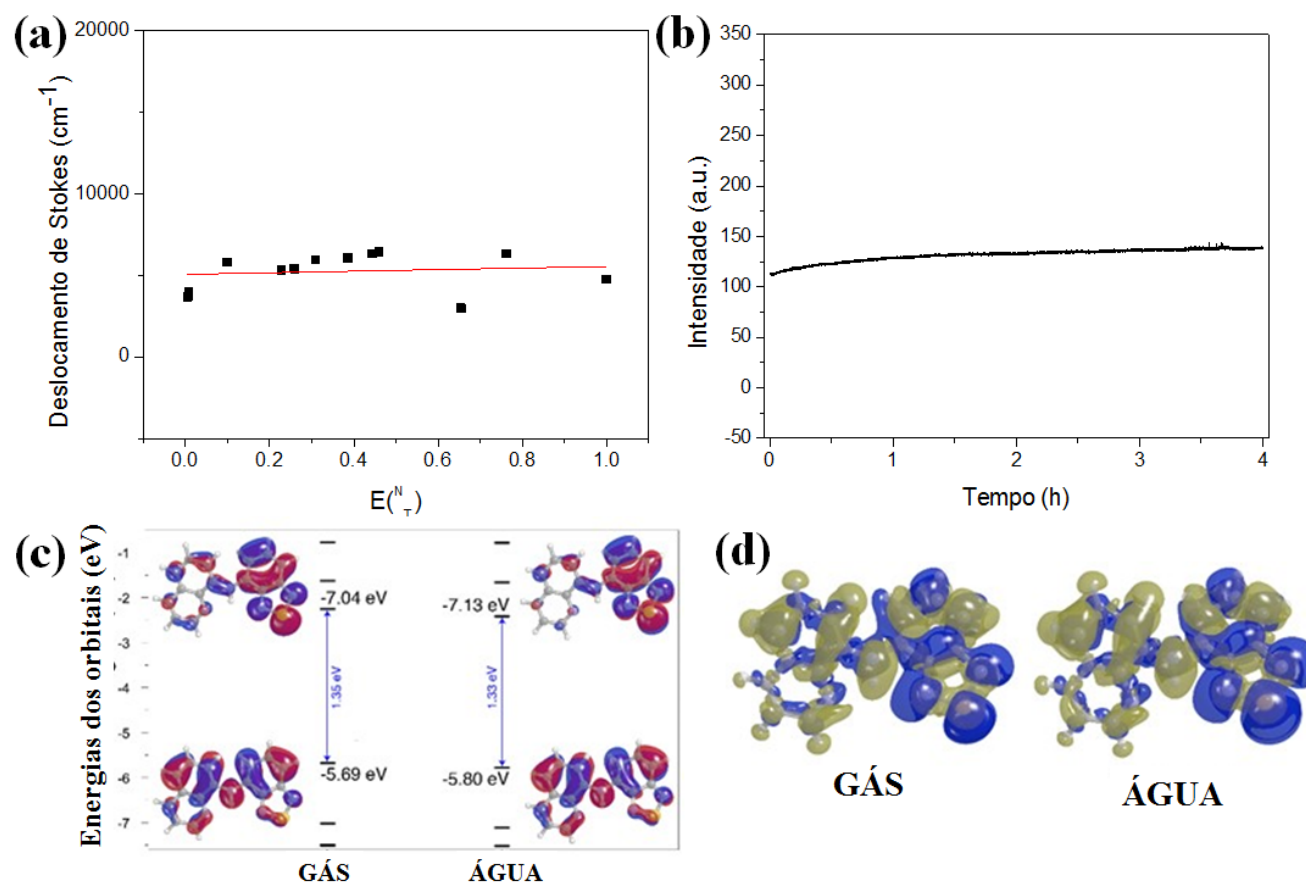
Solventes	$\lambda_{\text{max}}$ (abs)(nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\text{max}}$ (em)(nm)	Stokes shift (nm)
Dimetil Sulfóxido	445	3.94	620	175
Água	445	2.93	565	120
Acetato de Etila	440	3.84	575	135
Diclorometano	450	3.98	615	165
Acetonitrila	440	3.79	615	175
Tolueno	440	3.89	600	155
Etanol	450	3.79	570	120
Clorofórmio	450	3.64	595	145
Metanol	440	3.84	610	170
Dimetilformamida	445	3.87	610	165
Ciclohexano	445	3.93	533	88
Hexano	440	3.88	533	93

São observados grandes deslocamentos de Stokes (88-175 nm) e coeficientes de extinção molar (valores de  $\log \epsilon$  entre 2,93 - 3,98  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). O grande deslocamento de Stokes (120 nm) observado em meio aquoso indica a possibilidade de utilização dessa sonda em experimentos de bioimageamento uma vez que essa é uma das características essenciais que uma sonda de alto desempenho deve apresentar.

A diferença nos valores de máximos de absorção da **BTD-QN** para os diferentes solventes testados é bem pequena (440-450 nm,  $\Delta\lambda = 10$  nm), o que indica a quase ausência de transferência de carga no estado fundamental desse composto. Os máximos de absorção da molécula em todos os solventes estão na região visível, sendo assim, nenhuma irradiação na região UV seria necessária para os experimentos de bioimageamento e, portanto, a autofluorescência pode ser facilmente evitada.

Todos os espectros de fluorescência foram obtidos irradiando as soluções em seus máximos de absorção. Observa-se que os máximos de emissão para os diferentes solventes estão entre as regiões verde e vermelha. Os máximos de emissão foram

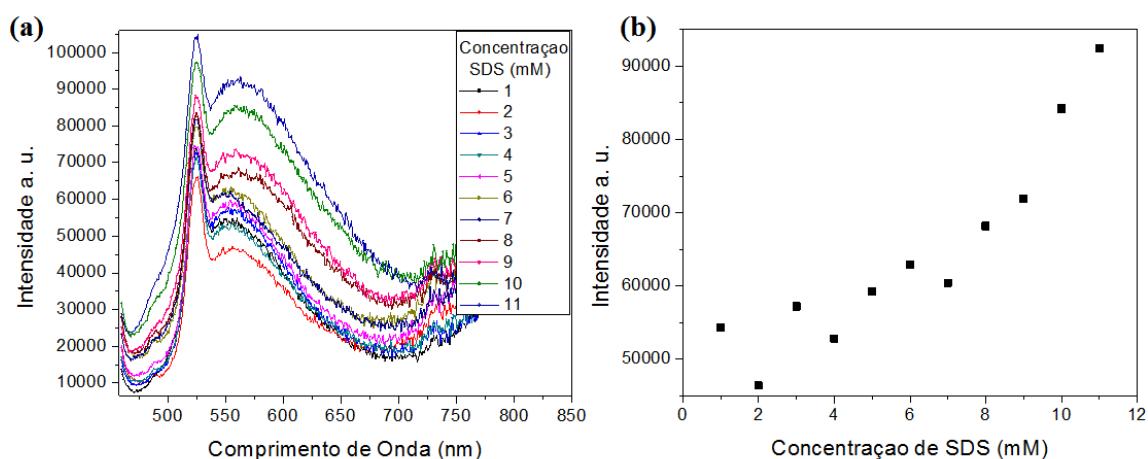
observados entre 533 e 620 nm, o que indica a existência de algum tipo de efeito de estabilização do estado excitado. A metodologia para avaliação do efeito solvatocrômico proposta por Reichardt<sup>254</sup> (Figura 35-a) indica que o solvente promove a estabilização do estado excitado e permite o processo de transferência de carga, o que não ocorre no estado fundamental. Uma vez que as polaridades do estado fundamental e do estados excitado de um fluoróforo são diferentes, uma mudança na polaridade do solvente induzirá uma estabilização diferente dos estados, portanto, ocorrerá uma modificação da energia entre esses estados eletrônicos (Figura 35-c e d).<sup>255</sup> Dessa forma, variações na posição, intensidade e forma dos espectros de absorção e emissão podem ser usados como um indicador direto de mudanças de solventes ou modificação das características do ambiente que circunda a sonda.<sup>256</sup> Além dos espectros de absorção e emissão, o rendimento quântico pode ser afetado pela polaridade do meio. Esse efeito foi observado ao se determinar o rendimento quântico da **BTD-QN** em acetonitrila e em tolueno. Os valores de RQ obtidos foram de 0,003 e 0,260, respectivamente, mostrando que a fluorescência da **BTD-QN** é intensificada na presença de solventes apolares.



**Figura 35.** (a) Efeito solvatocrômico obtido pelos Valores de  $E_T^N$  vs. deslocamento de Stokes ( $\text{cm}^{-1}$ ) para os solventes testados; (b) Análise de fotoestabilidade realizada em água; (c) Diagrama de energia orbital e gráficos HOMO-LUMO para a fase gasosa e em solução aquosa obtidas por meio de cálculo teórico com a base PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d, p) e em (d) Diferença entre as densidades eletrônicas de  $S_1$  e  $S_0$  obtidas por meio de cálculo teórico com a base PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311G(d, p) da **BTD-QN**. \*Os dados obtidos por meio dos cálculos teóricos são apresentados no Anexo 1.

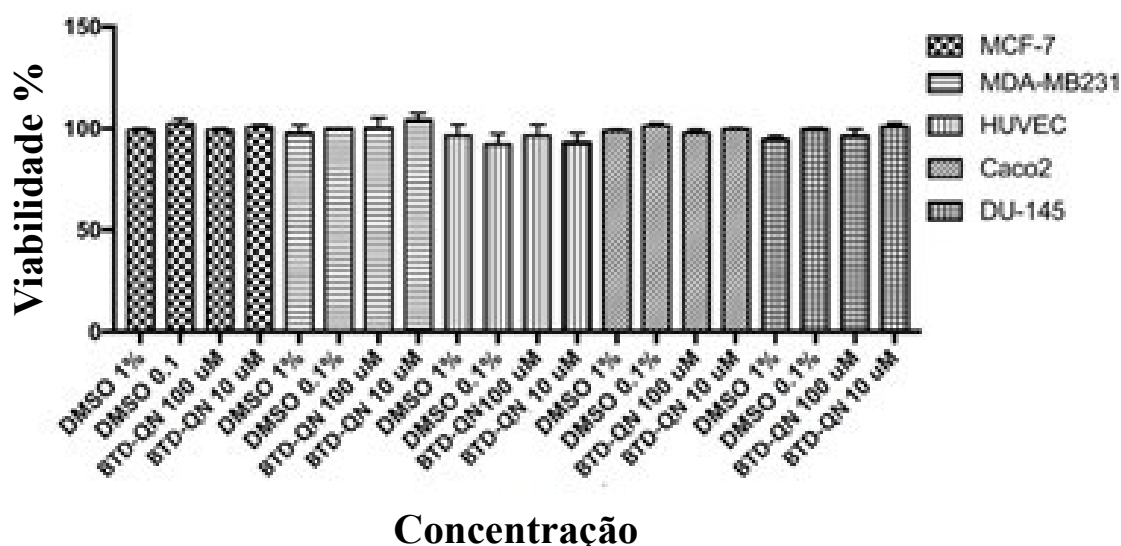
Apesar da estabilização do estado excitado promovida pelos solventes, os dados do experimento de fotoestabilidade indicam que o composto é capaz de voltar para seu estado fundamental sem degradação. O experimento de fotoestabilidade (Figura 35-b) foi realizado irradiando a solução aquosa com o composto no máximo de absorção (445 nm) e coletando a intensidade de emissão no seu máximo de emissão (565 nm), por 4 horas. Não ocorreu diminuição da fluorescência durante a realização do experimento, como tipicamente observado para derivados de BTB fluorescentes.<sup>257-259</sup> No geral, os dados fotofísicos obtidos são típicos para BTBs  $\pi$ -substituídas fluorescentes.<sup>260</sup>

A fluorescência da **BTB-QN** também foi avaliada na presença do agente surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). Foi preparada uma solução aquosa de **BTB-QN** com concentração 10  $\mu$ M e foram sendo adicionadas quantidades conhecidas de SDS e adquiridos os respectivos espectros de emissão. A Figura 36-a, apresenta os espectros da solução de 10 $\mu$ M de **BTB-QN** em diferentes concentrações de SDS, onde é observado que a presença do surfactante suprime de maneira significativa a emissão de energia em forma de luz da **BTB-QN**. Entretanto, quando o SDS atinge sua constante micelar crítica (CMC) em 8 mM<sup>261</sup>, observa-se um aumento gradativo da fluorescência a medida que a concentração de SDS é aumentada (Figura 36-b). Isso indica que a **BTB-QN** é altamente apolar e interage com a parte apolar do SDS, quando o mesmo começa a formar micelas.



**Figura 36.** (a) Espectros de fluorescência da **BTB-QN** na presença de diferentes concentrações de SDS. Em aproximadamente 520 nm observa-se uma banda de emissão proveniente do SDS. (b) Intensidade de fluorescência nas diferentes concentrações de SDS.

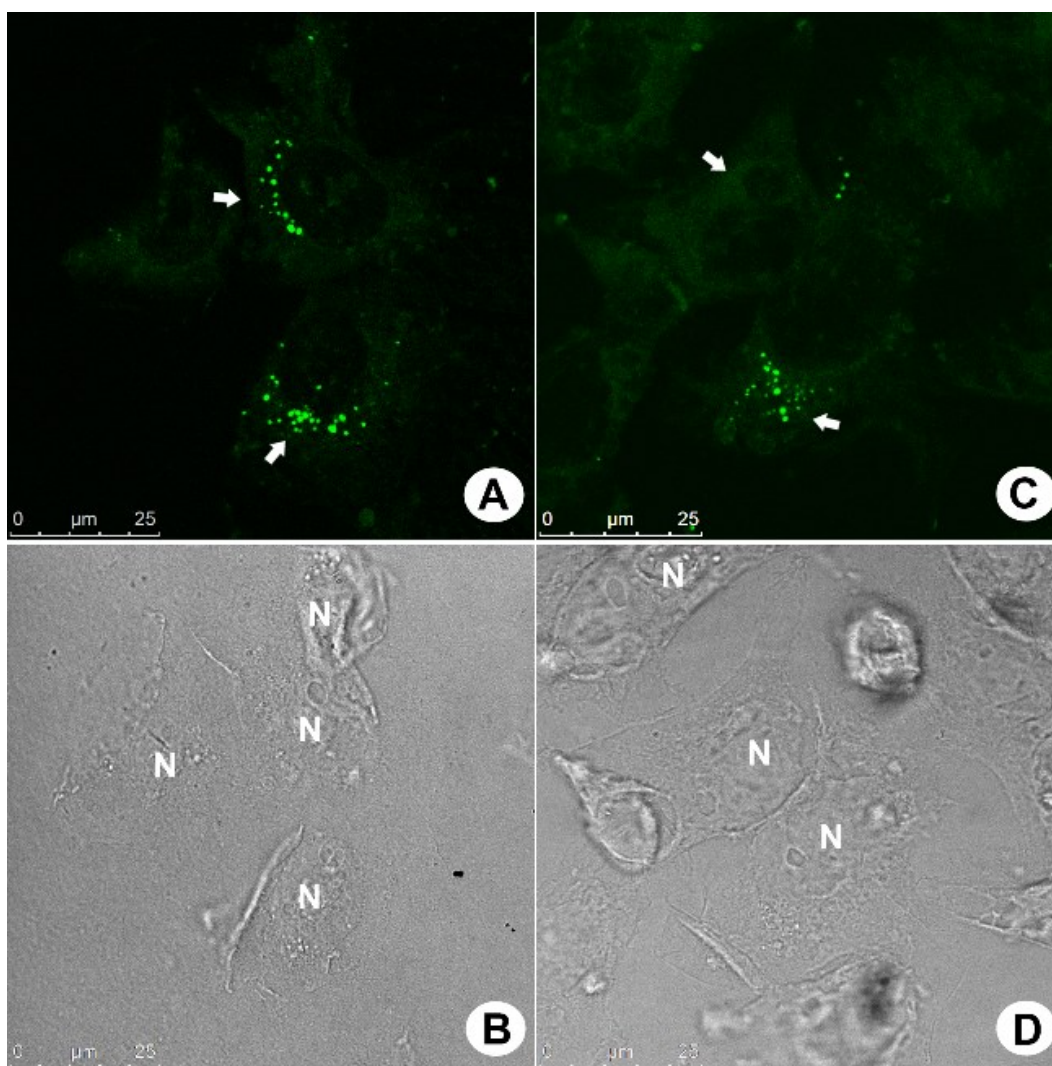
Antes de se iniciar os experimentos de bioimageamento, foram realizados experimentos de viabilidade celular, não sendo observado nenhum efeito citotóxico causado pela **BTD-QN** (Figura 37). Para esse experimento, foi utilizada uma solução de **BTD-QN** de 100  $\mu\text{M}$ , ou seja, aproximadamente 100 vezes mais concentrada que as soluções utilizadas nos experimentos de imageamento das células cancerígenas. Os testes de viabilidade foram realizados para todas as linhagens celulares utilizadas nos experimentos de bioimageamento, são elas: células MCF-7 (linhagem de célula de adenocarcinoma de mama humano), MDA-MB-231 (linhagem de célula de adenocarcinoma invasivo de mama humano), DU-145 (linhagem de célula de câncer de próstata humano) e Caco-2 (linhagem de célula de adenocarcinoma epitelial colorretal humano).



**Figura 37.** Ensaios de viabilidade celular. Não foi observado efeito citotóxico estatisticamente significativo nas amostras incubadas com **BTD-QN** (24 horas). A incubação na presença de DMSO foi utilizada como um controle positivo devido ao seu efeito citotóxico já conhecido que depende da concentração do solvente no meio celular. As amostras mantidas apenas no meio de cultura foram utilizadas como controle negativo.

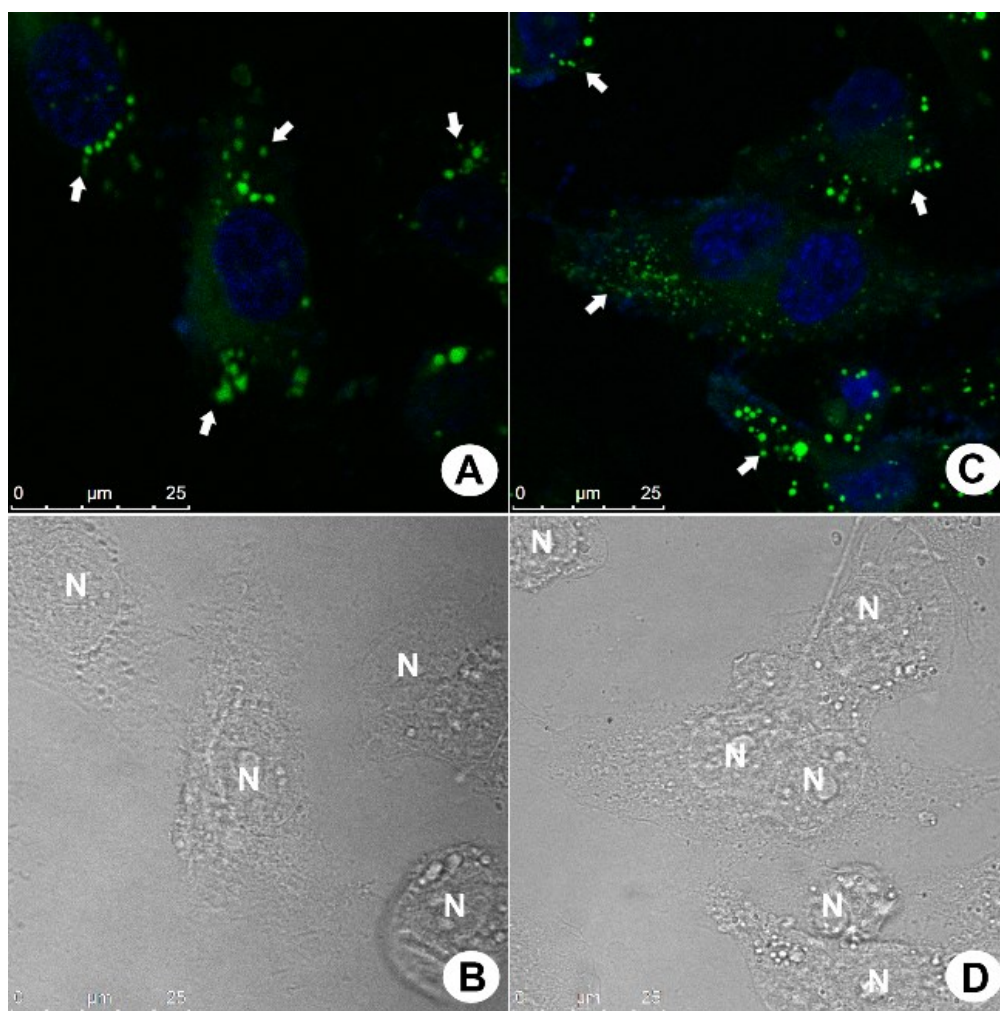
A **BTD-QN** foi testada no bioimageamento de diferentes linhagens celulares para estabelecer se o fluoróforo híbrido projetado mostraria de fato uma preferência por estruturas lipofílicas no ambiente celular. As células Caco-2 foram utilizadas nos testes iniciais de marcação celular Figura 36. Os resultados obtidos utilizando essa linhagem celular mostraram que a estratégia usada para direcionar a sonda híbrida fluorescente para estruturas lipofílicas foi bem-sucedida. Gotículas lipídicas foram coradas seletivamente. O composto proporcionou um sinal fluorescente verde brilhante e intenso, como esperado

a partir dos dados fotofísicos. Não foi observado a diminuição da intensidade de emissão (fotobranqueamento) a olho nu nas condições operacionais padrão durante o processo de aquisição de imagens. Estruturas citoplasmáticas especificamente esféricas foram seletivamente marcadas tanto nas células vivas (Figura 38-A) quanto nas células fixadas (Figura 38-C). Devido aos aspectos morfológicos e à distribuição celular das estruturas coradas, a **BTD-QN** pode ser usado como um eficiente corante seletivo de gotículas lipídicas. Nenhuma alteração morfológica pôde ser detectada por microscopia de contraste de fase (Figura 38-B e D), indicando, não haver citotoxicidade promovida pelo corante testado. Resultados que está de acordo com os ensaios de viabilidade celular.



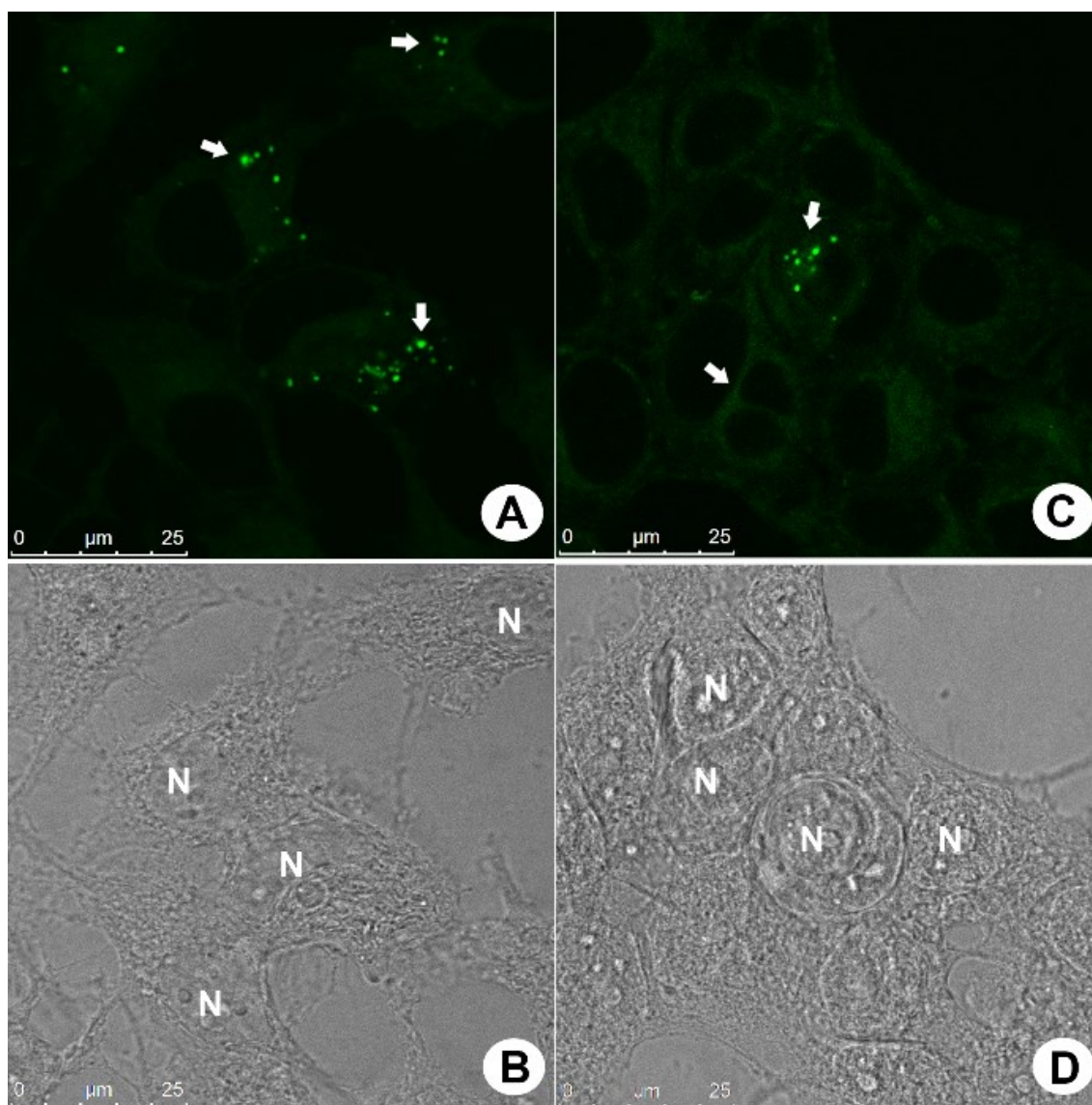
**Figura 38.** Perfil fluorescente das células Caco-2 incubadas com **BTD-QN** (1  $\mu$ M). (A) e (B) apresentam amostras vivas enquanto que (C) e (D) apresentam amostras fixadas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. As setas brancas indicam os corpos lipídicos amplamente distribuídos no citoplasma das células. A letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células (mostrados como vazios negros), onde não houve marcação fluorescente. Barra de escala de referência de 25  $\mu$ m.

A fim de se confirmar a coloração seletiva de gotículas lipídicas usando a **BTD-QN**, foi realizado um ensaio adicional com o BODIPY, um marcador amplamente utilizado para coloração com lipídios neutros. Os resultados (Figura 39) confirmaram que as estruturas celulares esféricas coradas pela **BTD-QN** eram gotículas lipídicas, uma vez que o padrão fluorescente e a distribuição obtida pela coloração do BODIPY em células vivas têm o mesmo padrão obtido do grupo de células vivas coradas com a sonda desenvolvida. É possível afirmar, ao fazer uma comparação das imagens, que a **BTD-QN** poderia de fato marcar mais estruturas esféricas do que aquelas observadas pelo corante comercial, uma vez que o BODIPY é usado para marcação de estruturas neutras e, portanto, gotículas não neutras podem escapar à detecção.



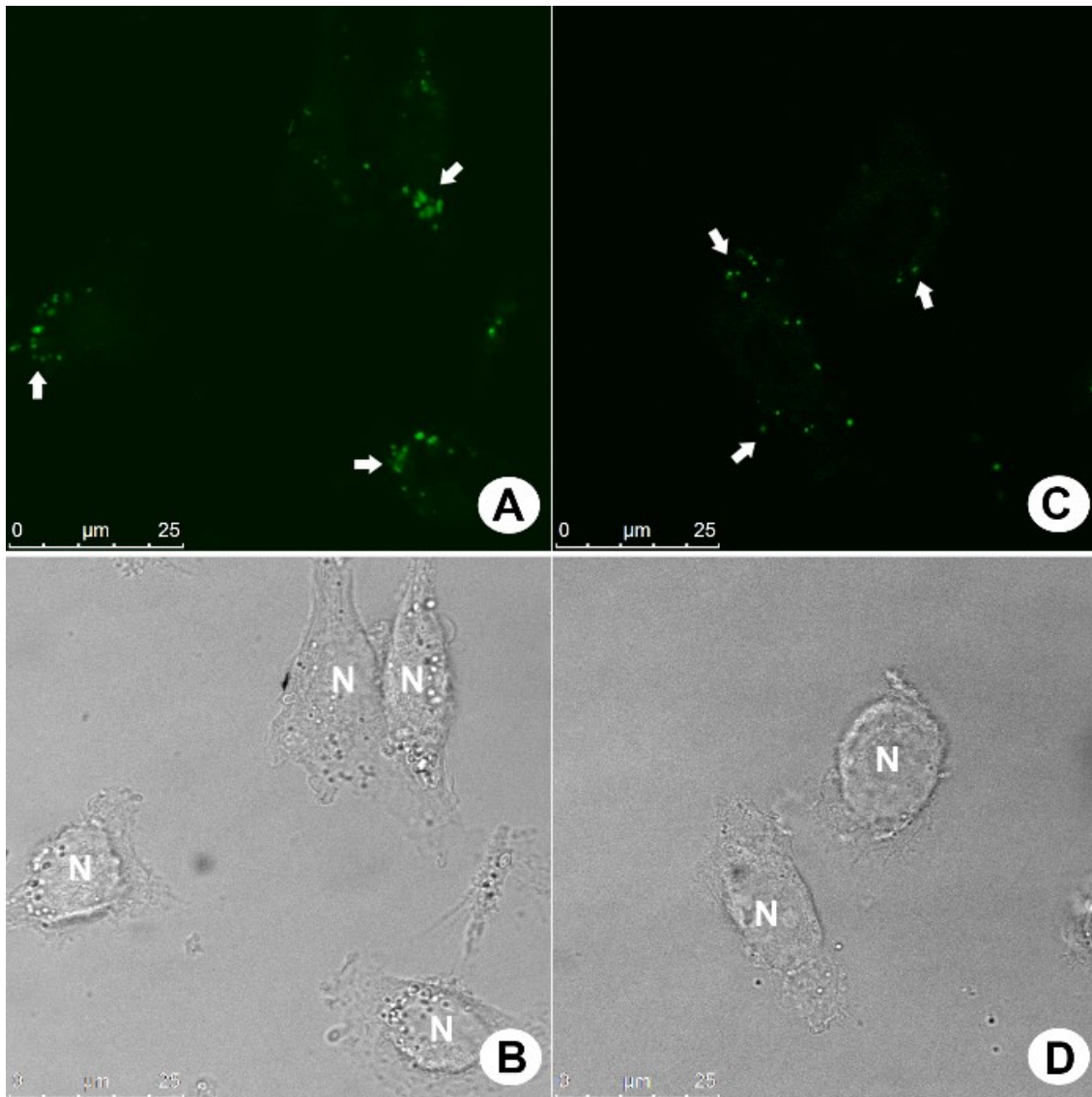
**Figura 39.** Padrão de coloração fluorescente de células Caco-2 usando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** (1  $\mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. Os núcleos das células foram corados com o corante comercial conhecido como DAPI (emissão azul) e a letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ .

Linhagens celulares adicionais também foram testadas para mostrar a especificidade do corante híbrido para estruturas de gotículas lipídicas (Figuras 40 a 42). A linhagens de células MCF-7, MDA-MB-231 e DU-145 tiveram suas gotículas lipídicas coradas com sucesso com o híbrido **BTD-QN**. Todas as amostras das diferentes células mostraram sinais fluorescentes verdes brilhantes e, como esperado para o marcador lipídico, não foram encontradas dentro dos núcleos dos modelos celulares.

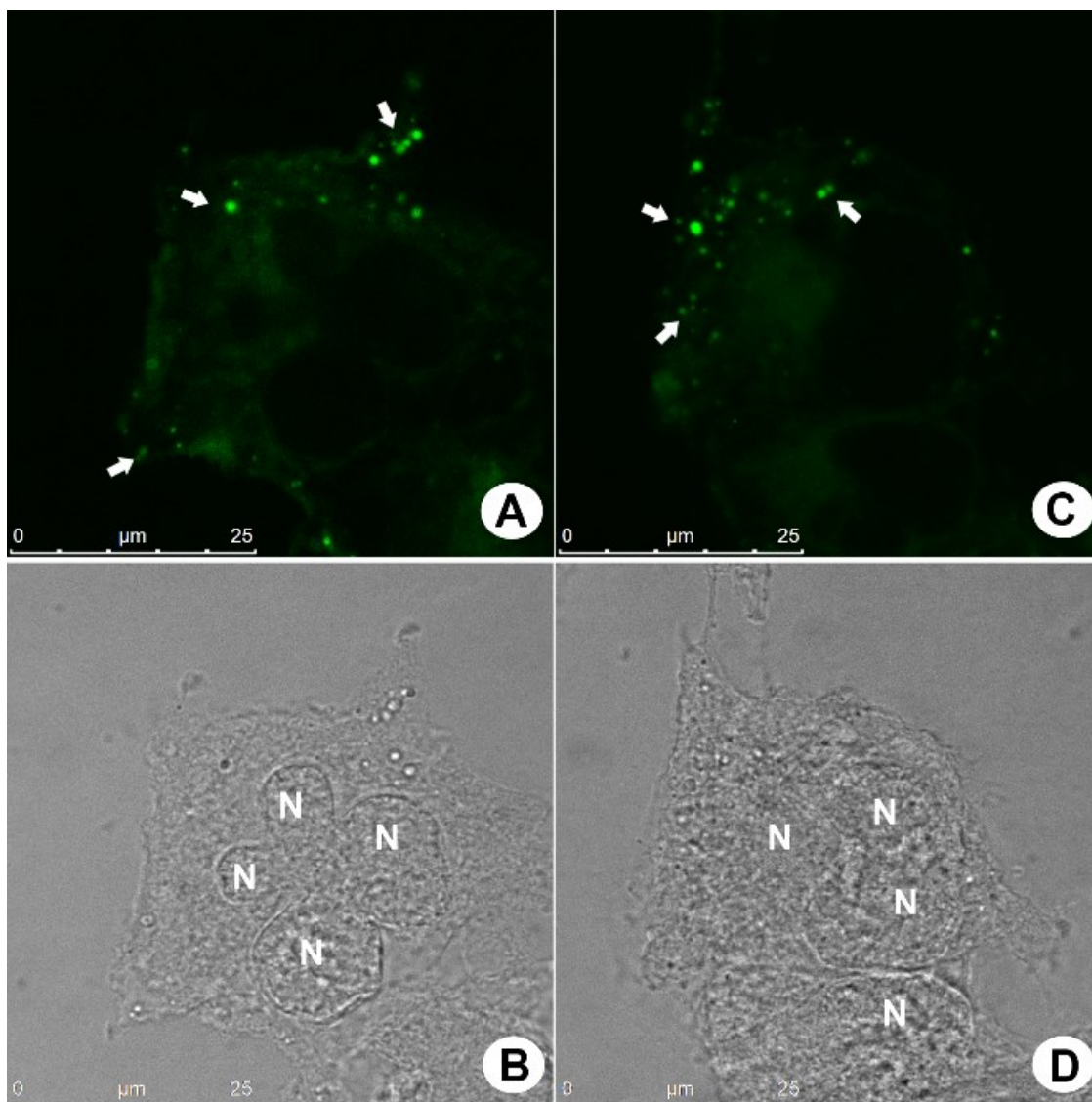


**Figura 40.** Padrão de coloração fluorescente das células MCF-7 usando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu$ M) e a **BTD-QN** (1  $\mu$ M). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. A letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu$ m.



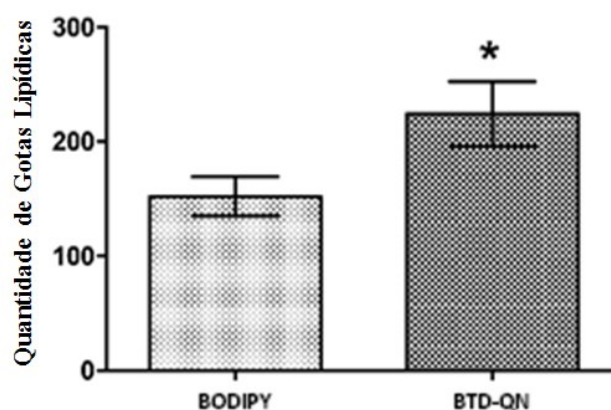


**Figura 41.** Padrão de coloração fluorescente de células MDA-MB-231 usando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** (1  $\mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. A letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 42.** Padrão de coloração fluorescente de células DU-145 utilizando o BODIPY disponível comercialmente (12  $\mu\text{M}$ ) e a **BTD-QN** (1  $\mu\text{M}$ ). (A) e (C) apresentam as imagens das células vivas marcadas com BODIPY e **BTD-QN**, respectivamente. As setas brancas mostram as estruturas de gotículas lipídicas. (B) e (D) mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. A letra “N” corresponde às regiões dos núcleos das células. Barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ .

As imagens dos dois ensaios de coloração (BODIPY e **BTD-QN** para a linhagem Caco-2) foram submetidas a uma análise quantitativa dos valores de pixels realizados no software ImageJ<sup>262</sup> e os dados são mostrados em formato de histograma (Figura 43). A utilização do fluoróforo híbrido desenvolvido permitiu a coloração de ca. 47% mais estruturas lipídicas do que o uso do BODIPY comercial. A média calculada para o BODIPY foi de 152 estruturas, enquanto que para o **BTD-QN** foi de 224 estruturas. Essa é uma diferença estatisticamente significativa.



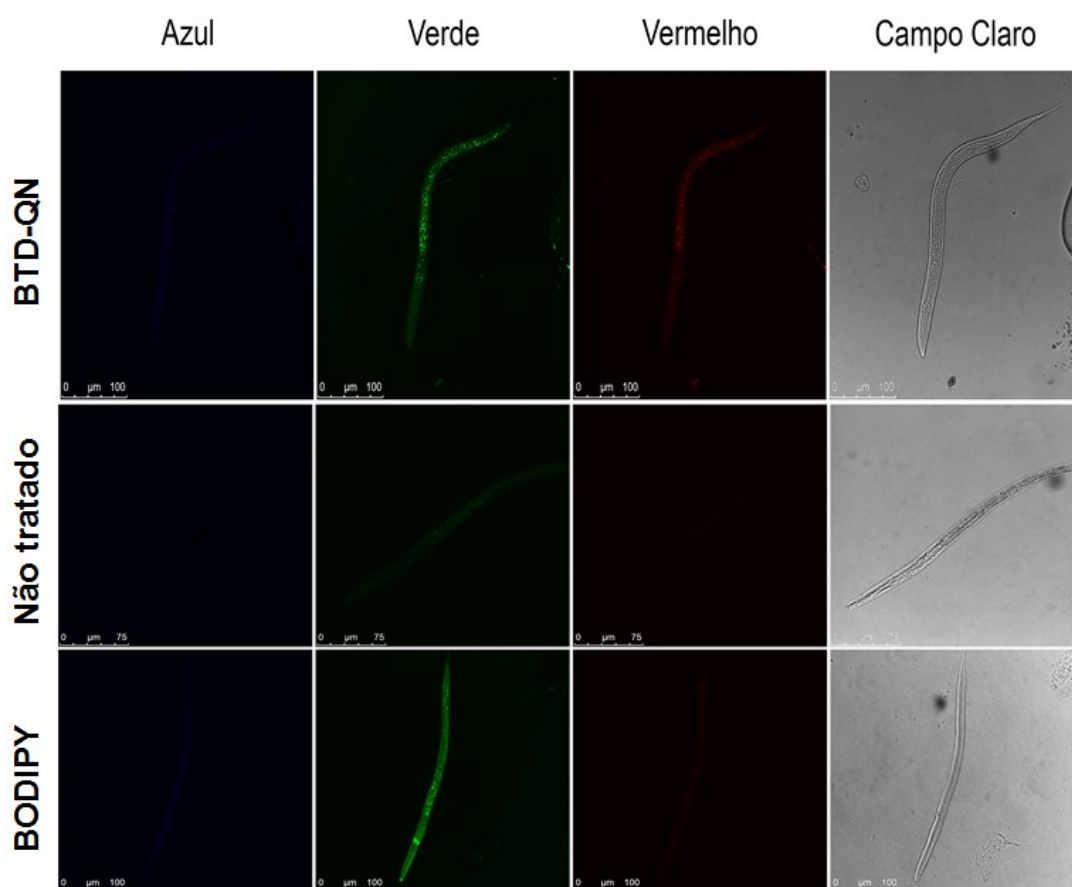
**Figura 43.** Quantificação de estruturas lipídicas a partir do perfil fluorescente de células cancerígenas Caco-2 vivas coradas com **BTD-QN** e com BODIPY (comercialmente disponível). A diferença de gotículas lipídicas coradas por estes dois compostos foi estatisticamente significativa. \* =  $p < 0,05$ .

Para melhor compreensão destes resultados, foi realizado um experimento para determinação do equilíbrio de partição (entre octanol:água a 30 °C) da **BTD-QN**. Para a realização do experimento, foi adicionada uma quantidade conhecida de amostra em uma mistura de octanol e água (1:1). A mistura foi agitada vigorosamente e depois deixada em repouso até a separação das fases. Foi coletada uma amostra de cada fase para posterior análise de Uv. A concentração em cada solvente foi determinada com auxílio de uma curva de calibração. O experimento visa estimar a distribuição do corante entre as gotículas lipídicas e o citosol. Pode-se determinar que até 1% de **BTD-QN** foi encontrado no meio aquoso enquanto 95% estava na fase apolar (octanol). Houve uma perda de 4 % durante a realização do experimento. A alta afinidade da **BTD-QN** pelas estruturas lipofílicas é, portanto, uma boa indicação para a origem da alta especificidade observada nos experimentos celulares e aponta firmemente para a eficiência da estrutura sintetizada.

Para ampliar as possibilidades de aplicação no bioimageamento dos derivados fluorescentes de BTD, a nova estrutura híbrida também foi utilizada como um marcador para coloração de *C. elegans* (modelo complexo). Experimentos de marcação utilizando modelos complexos, isto é, um organismo multicelular são essenciais para assimilar os processos biológicos não compreendidos no nível celular.<sup>263</sup> Por exemplo, a genética e a regulação fisiológica do armazenamento lipídico pode não ser avaliada exclusivamente no nível celular, e esse tipo de estudo exige modelos complexos vivos intactos, como o

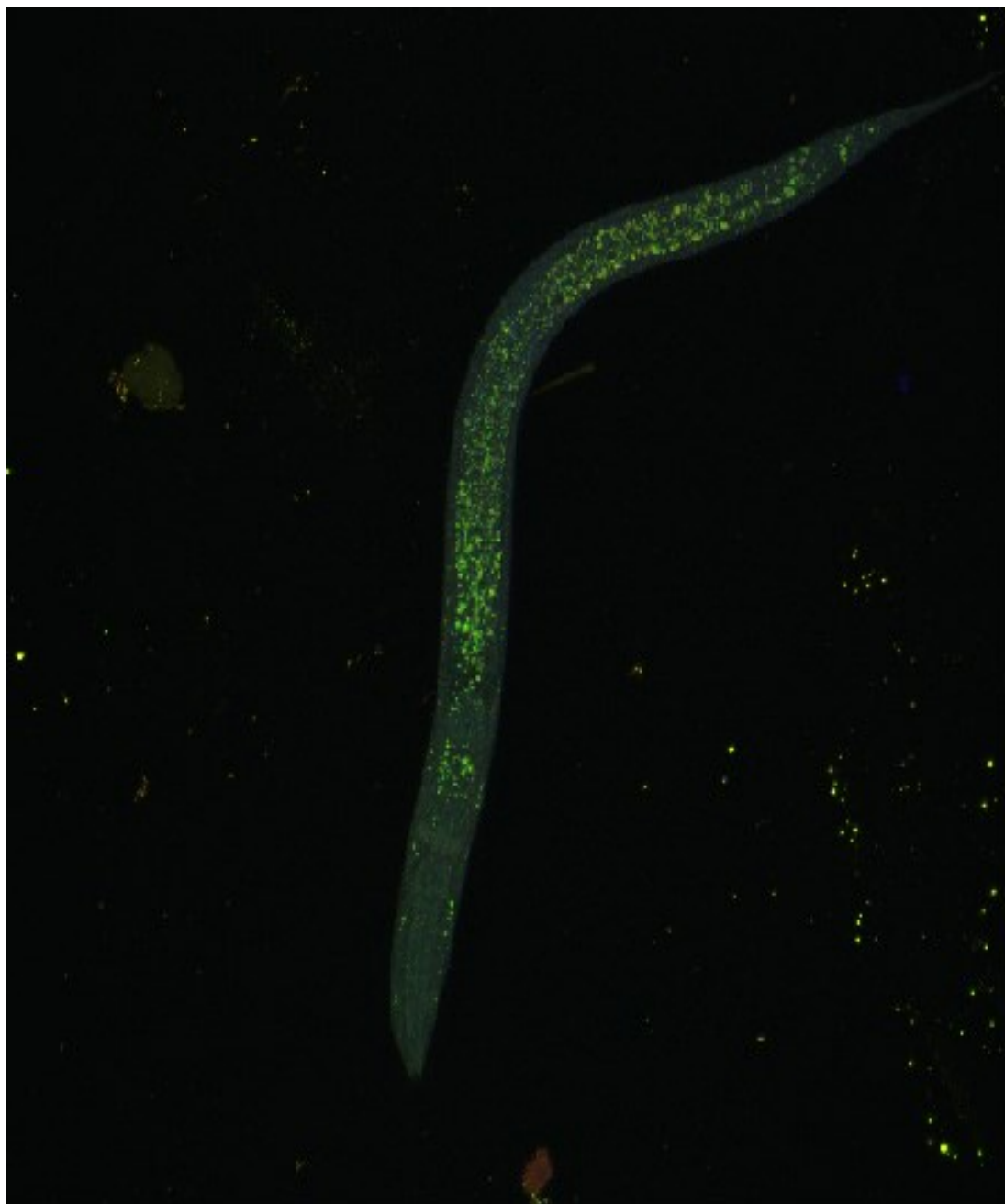
*C. elegans*.<sup>264</sup> Esse modelo complexo também é conhecido por ser de suma importância para os estudos de biologia lipídica.<sup>265</sup>

As melhores condições de análise foram totalmente otimizadas (Figura 44) e a região verde (como esperado) foi a melhor para acompanhar a emissão de fluorescência, entretanto vale destacar que a **BTD-QN** apresentou emissão de luz na região do vermelho. Sem o uso do corante, nenhuma marcação seletiva pode ser observada, apenas a autofluorescência do verme, mas na presença de **BTD-QN** e do marcador de referência BODIPY, é possível observar as gotas lipídicas que compõem o corpo do verme.



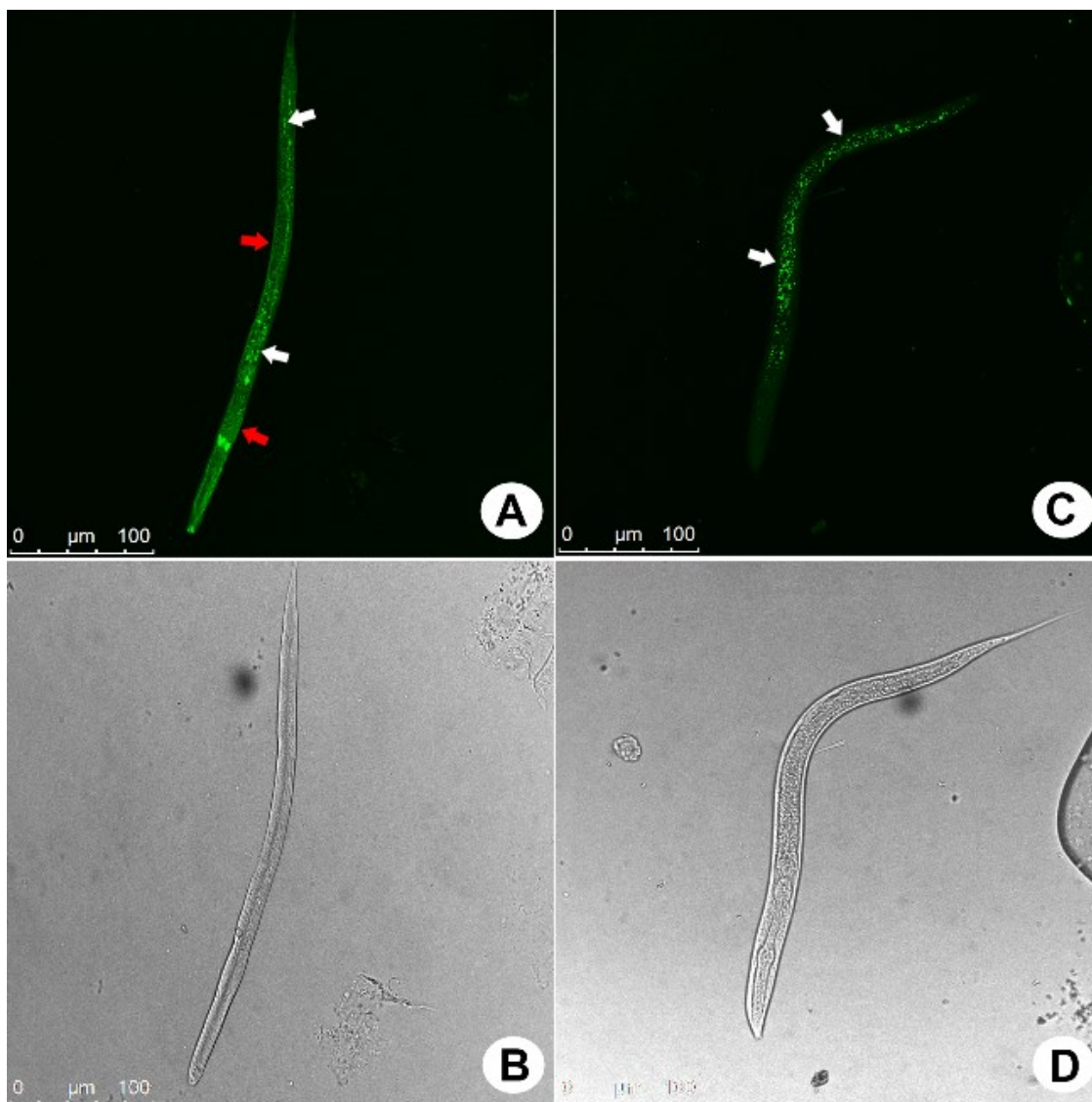
**Figura 44.** *C. elegans* marcado com o composto **BTD-QN**, sem nenhum marcador fluorescente e marcado com o marcador de referência Bodipy.

A Figura 45 apresenta a imagem ampliada obtida do *C. elegans* após a marcação com a **BTD-QN**. É possível observar a alta seletividade da **BTD-QN** pela alta definição das gotículas lipídicas no corpo do verme.



**Figura 45.** *C. elegans* tratado com o novo composto híbrido fluorescente **BTD-QN**.

Uma grande desvantagem dos corantes comerciais comumente utilizados, como BODIPY, é sua elevada inespecificidade quando usados como o marcador lipídico para modelos complexos.<sup>266</sup> Corantes comerciais também coram grânulos autofluorescentes nos *C. elegans*, levando a conclusões errôneas devido à falta de especificidade para a coloração do verme.<sup>266</sup> Esses problemas não foram observados usando o novo híbrido fluorescente **BTD-QN**, uma vez que a sua seletividade para os corpos lipídicos foi de longe melhor e não se observou autofluorescência nas condições das análises (Figura 46).



**Figura 46.** Padrão de coloração fluorescente do *C. elegans* usando BODIPY (A, 12  $\mu\text{M}$ ) e **BTD-QN** (C, 10  $\mu\text{M}$ ). Observa-se em (C) uma notável especificidade de coloração de **BTD-QN** para corpos lipídicos dentro do verme enquanto (A) mostra o padrão de coloração com o BODIPY que produziu ruído de fundo (setas vermelhas). Barra de escala de referência 100  $\mu\text{m}$ .

O padrão de coloração do BODIPY observado no *C. elegans* mostrou os corpos lipídicos corados, entretanto também foi observada coloração de fundo inespecífica distribuída ao longo do corpo de vermes (Figura 46-A). O padrão de fluorescência observado nos nematóides corados com a **BTD-QN** foi muito mais intenso e altamente específico, e nenhuma coloração de fundo pôde ser detectada nos vermes (Figura 46-B). A **BTD-QN** promoveu uma coloração precisa dos corpos lipídicos, mostrando várias estruturas esféricas dispersas no interior do corpo do nematóide, com uma clara acumulação na região anterior do corpo do verme (uma região normalmente rica em

lipídios). Para mostrar a seletividade do corante dentro do verme, um vídeo de curta duração (distribuição 3D do marcador) foi gravado.

Com o objetivo de se ampliar ainda mais as possibilidades de aplicação dos fluorescentes seletivos derivados da BTD, a **BTD-QN** foi testada para marcação em animais vivos. O teste inicial foi realizado com células de adipócitos porque elas estão diretamente envolvidas em questões de obesidade e são conhecidas por serem ricas em lipídeos, especialmente em animais alimentados com dieta rica em gordura. Os adipócitos ricos em lipídios são propensos a acumular ácidos graxos livres tóxicos e ativar as vias de apoptose via quinase c-Jun *N*-terminal, conhecida como JNK.<sup>267</sup> Quando as gorduras viscerais se acumulam, a ação hepática é estabelecer um ambiente pró-inflamatório. As células hepáticas, por sua vez, estão muito próximas das células imunológicas, e têm acesso direto a uma vasta rede de vasos sanguíneos.<sup>267</sup> Um dos principais problemas causados pelo acúmulo de lipídeos nas células é a indução de lipotoxicidade, como demonstrado recentemente.<sup>268</sup> Questão esta, associada a várias doenças e condições patológicas, incluindo inflamação hepática, resistência à insulina e esteato-hepatite não alcoólica (NASH), entre outras.<sup>269-272</sup>

O corante desenvolvido (**BTD-QN**) foi então utilizado na marcação de adipócitos e hepatócitos de camundongos submetidos a uma dieta padrão e uma dieta rica em gordura. As melhores condições de análise foram totalmente otimizadas (Figura 47) e a região verde (como esperado) foi a melhor para acompanhar a emissão de fluorescência. Sem o uso do corante, nenhuma resolução celular pode ser observada, mas na presença de **BTD-QN**, adipócitos puderam ser muito bem marcados.

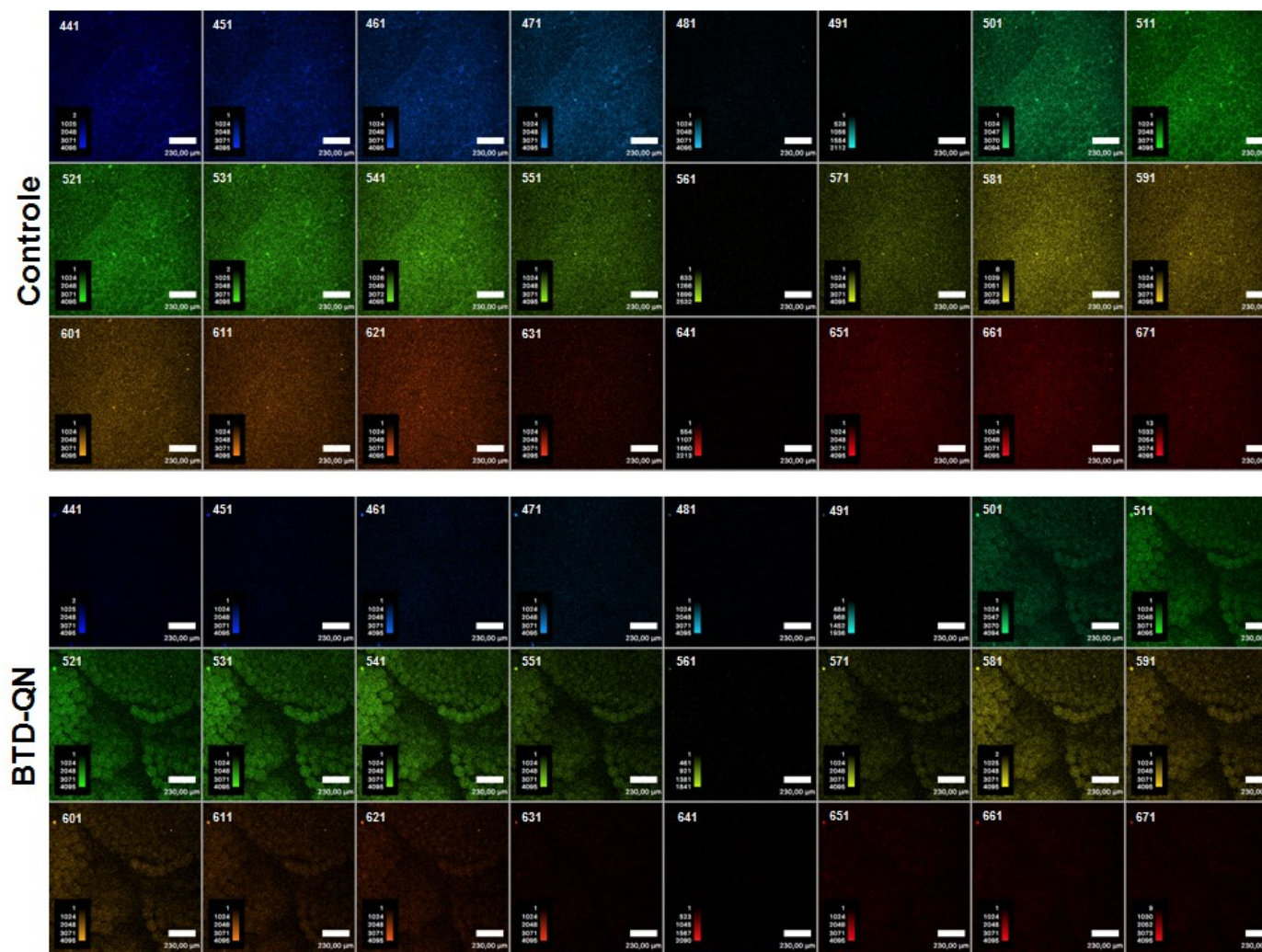
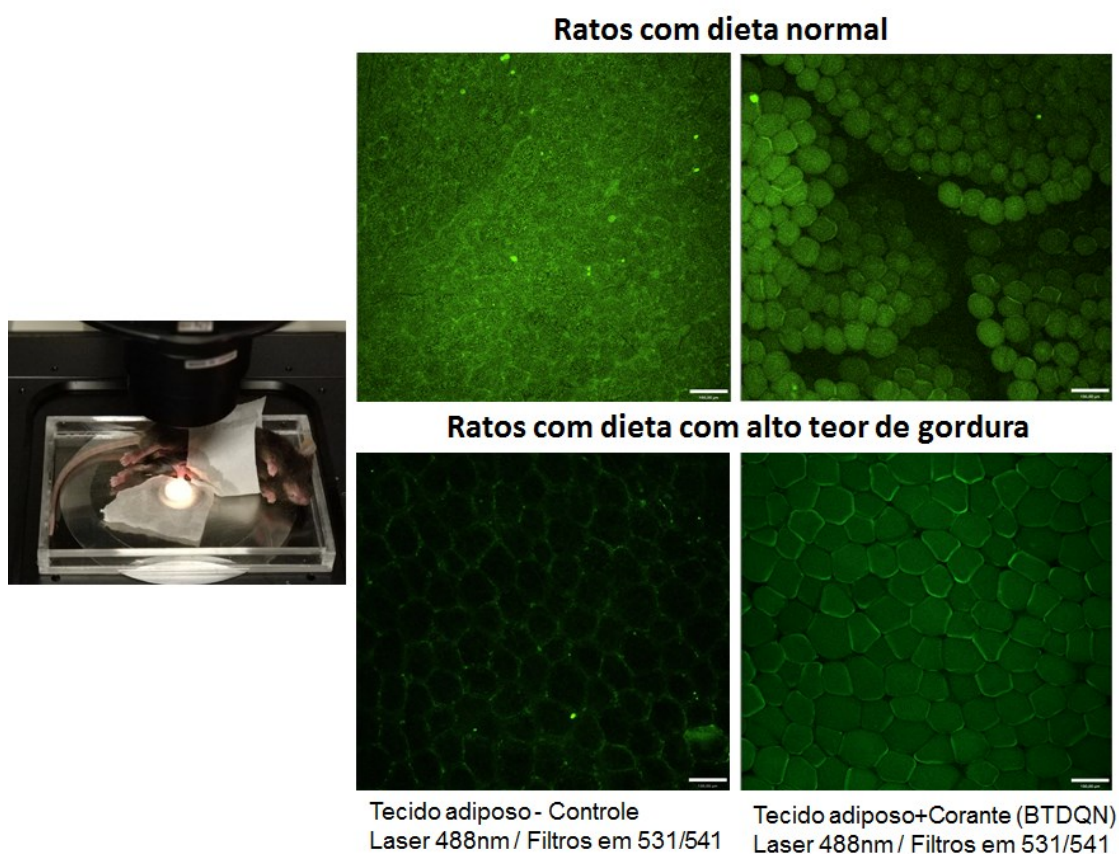


Figura 47. Células de adipócitos marcadas com o uso de BTD-QN (10 μM) e otimização das condições de visualização para acompanhar o imageamento in vivo dos camundongos.



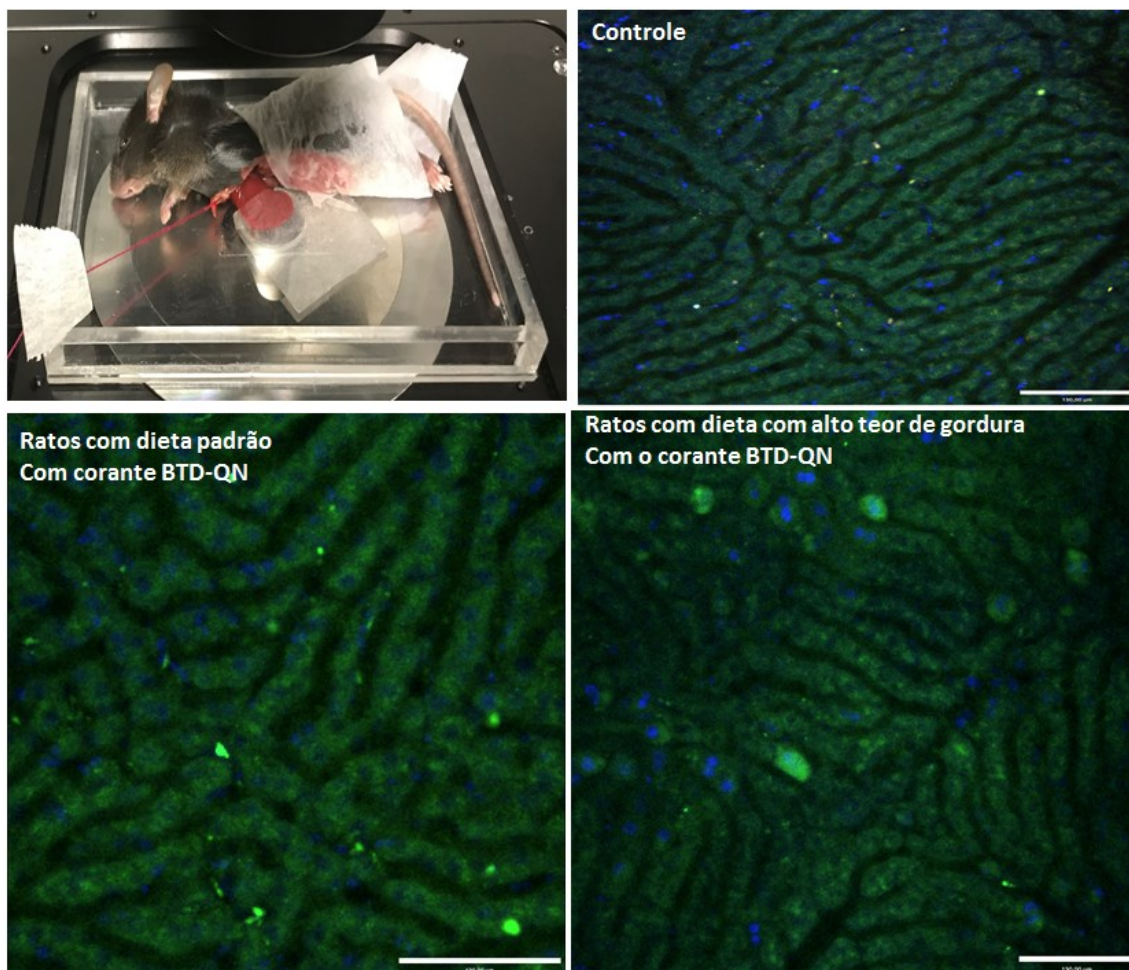
Os experimentos foram realizados em um procedimento cirúrgico usando animais vivos anestesiados e expondo o tecido adiposo e posteriormente o fígado do animal. A fluorescência verde brilhante da **BTD-QN** permite a perfeita visualização da morfologia dos adipócitos com alta resolução (Figura 48). A alta fotoestabilidade do composto desenvolvido evitou qualquer degradação notável nem fotodegradação durante o período de tempo do experimento.



**Figura 48.** **BTD-QN** (10  $\mu$ M) como corante para marcação dos adipócitos em modelo animal vivo. A esquerda, é possível observar o camundongo vivo com o tecido adiposo exposto. Acima na Figura encontram-se as células de adipócitos de camundongos com dieta padrão sem a marcação e marcadas com **BTD-QN**. Abaixo são apresentadas as imagens do tecido adiposo do camundongo com dieta rica em lipídeos sem marcação e marcadas com a **BTD-QN**. Barra de escala de 130  $\mu$ m.

Foi realizado um procedimento de coloração dupla (**BTD-QN** mais Hoechst 33342 marcador de núcleo disponível comercialmente) para visualizar os corpos lipídicos e núcleos das células (coradas em azul) através do fluxo sanguíneo. Ambos os corantes foram injetados por via intravenosa do animal e visualizados no fígado (Figura 47). Um vídeo da marcação de acúmulo de lipídeos nas células do fígado do animal foi gravado.

A capacidade da **BTD-QN** em marcar os acúmulos de lipídeos nos hepatócitos pode ser utilizada no estudo de doenças associadas ao acúmulo de gordura no fígado.



**Figura 49.** Marcação de acúmulos de lipídeos em hepatócitos com **BTD-QN** (10  $\mu$ M). Acima a esquerda é apresentada a fotografia do camundongo vivo com o fígado exposto. Acima a direita observa-se a imagem do fígado apenas com o marcador comercial de núcleo (Hoechst 33342). Abaixo a esquerda é apresentada a imagem da marcação de hepatócitos do camundongo com a dieta padrão utilizando a **BTD-QN**. Abaixo a direita, é apresentada a imagem da marcação de regiões de acúmulo de lipídeos em hepatócitos de ratos com a dieta rica em gordura utilizando a **BTD-QN**. Barra de escala de 130  $\mu$ m.

O experimento mostrou que a **BTD-QN** poderia ser usada para seguir os corpos lipídicos no fluxo sanguíneo através da injeção intravenosa da solução da sonda fluorescente. A **BTD-QN** também pode ser utilizada ao lado da sonda comercial marcadora de núcleo Hoechst 33342 sem interferência no comportamento esperado de ambos os corantes.

# Conclusões & Perspectivas

## Conclusões e Perspectivas

Foi sintetizado um híbrido fluorescente a partir das unidades BTD e QN utilizando a metodologia de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig. O novo híbrido fluorescente obtido foi caracterizado e suas propriedades fotofísicas foram determinadas, o que indicou sua alta estabilidade mesmo com irradiação de luz constante. Foi apresentada sua elevada eficiência e seletividade no imageamento celular. O corante desenvolvido mostrou uma alta afinidade pelas estruturas lipídicas no interior celular. Nenhuma citotoxicidade foi observada para a **BTD-QN**, mesmo em altas concentrações. Experimentos de bioimageamento em nível celular revelaram sua preferência por gotículas lipídicas e mostraram uma melhor qualidade de imagem do que o marcador comercial BODIPY, mesmo em baixas concentrações.

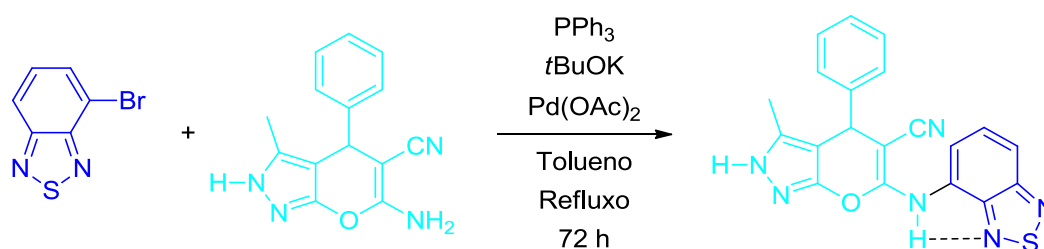
O uso de modelos complexos (*C. elegans*) provou que o corante desenvolvido teve preferência por regiões ricas em lipídeos do verme, característica não observada para o corante comercial que não apresentou especificidade. Finalmente, o corante foi testado em animais vivos durante um procedimento cirúrgico e mostrou resultados muito melhores do que o corante comercial. O fluoróforo desenvolvido pode ser usado para seguir corpos lipídicos no fluxo sanguíneo e também pode ser usado juntamente com outros corantes comerciais.

# Capítulo 3

# **Revisão Bibliográfica**

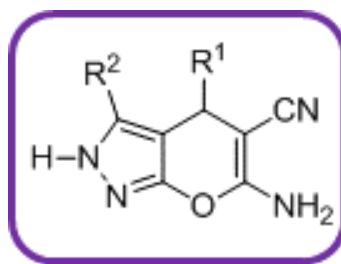
## Revisão Bibliográfica

Esse capítulo foi pensado no intuito de se desenvolver futuramente novas sondas fluorescentes a partir do acoplamento do núcleo BTB com outras moléculas orgânicas (Esquema 5). Como o núcleo BTB apresenta diversas propriedades fotofísicas interessantes para aplicação no imageamento celular (apresentadas com mais detalhe anteriormente) e possui, em sua estrutura molecular, várias possibilidades de funcionalização, a obtenção de novas sondas derivadas desse núcleo é extremamente interessante.



**Esquema 5.** Proposta de síntese obtenção de novos fluoróforos derivados dos núcleos BTB.

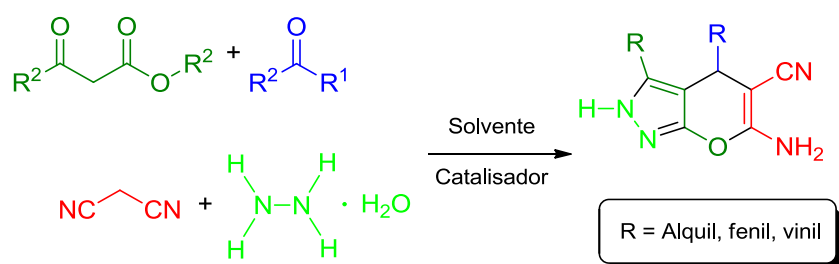
Dentre diversas moléculas orgânicas, nos últimos anos, os compostos que possuem a unidade piranopirazol (PPZ) em sua estrutura têm interessado químicos orgânicos sintéticos e bioquímicos por apresentarem diversas atividades biológicas e farmacológicas.<sup>273</sup> Moléculas obtidas a partir do núcleo PPZ (Figura 50) apresentam atividade anti-inflamatória,<sup>274</sup> anticâncer,<sup>275</sup> moluscicida,<sup>276</sup> analgésica,<sup>277</sup> inibidor de quinase,<sup>278</sup> antimicrobiana<sup>279</sup> e atuam como vasodilatadores, bem como agentes hipotensivos<sup>280</sup> e hipoglicêmicos.<sup>281</sup>



**Figura 50.** Estrutura molecular do núcleo piranopirazol. R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> indicam as posições no anel que podem ser utilizadas para inserção de novos grupos substituintes.

Inicialmente as metodologias utilizadas para a síntese de moléculas derivadas do núcleo piranopirazol eram obtidas da reação de 3-methyl-1-phenylpyrazolin-5-one com

tetracianoetileno na presença de trietilamina. Posteriormente várias metodologias alternativas foram apresentadas, uma delas consiste na reação de arilidenomalononitrilas e 3-metil-5-pirazolona. Outras duas possibilidades de obtenção ocorrem pela reação da malonitrila com 4-arilideno-3-metil-5-pirazolonas e pela condensação de aldeídos aromáticos, malononitrila e 3-metil-5-pirazolona. Em 2003, Shestopalov e colaboradores<sup>282</sup> reportaram o desenvolvimento de uma nova metodologia de obtenção de PPZs, que consiste na condensação de três componentes utilizando uma série de piperidin-4-onas N-substituídas no lugar de aldeídos aromáticos (até então utilizados nesse tipo de síntese), malononitrila e pirazolin-5-onas. Alguns anos depois, em 2006, Peng e colaboradores,<sup>283</sup> desenvolveram uma metodologia que utiliza micro-ondas e ultrassom para promover a reação de derivados do anel heterocíclico pirano e hidrato de hidrazina, formando derivados do núcleo PPZ. Ainda nesse âmbito de propostas metodológicas, em 2008 Vasuki e colaboradores<sup>284</sup> reportaram uma nova forma de obtenção de PPZs, que consiste em uma reação de quatro componentes, também conhecida como reação multicomponente (MCR) entre acetoacetato de etila, hidrato de hidrazina, aldeído e malononitrila, apresentada no Esquema 6.



**Esquema 6.** Reação multicomponente para obtenção de moléculas derivadas do núcleo PPZ.  $R^1 = H$  e  $R^2 = CH_3$ . Os grupos substituintes R podem ser substituídos nos materiais de partida, dando origem a PPZs diferentes.

Muitos dos catalisadores e reagentes comumente utilizados como material de partida para a síntese de PPZs são tóxicos, caros e de difícil manuseio. Portanto é importante destacar que o desenvolvimento de metodologias experimentais que possibilitem a simplificação do processo de obtenção de substâncias, assim como a diminuição de subprodutos e resíduos gerados em cada etapa de produção é extremamente relevante para o progresso sustentável da Química como ciência, do ponto de vista da química verde.<sup>285</sup>

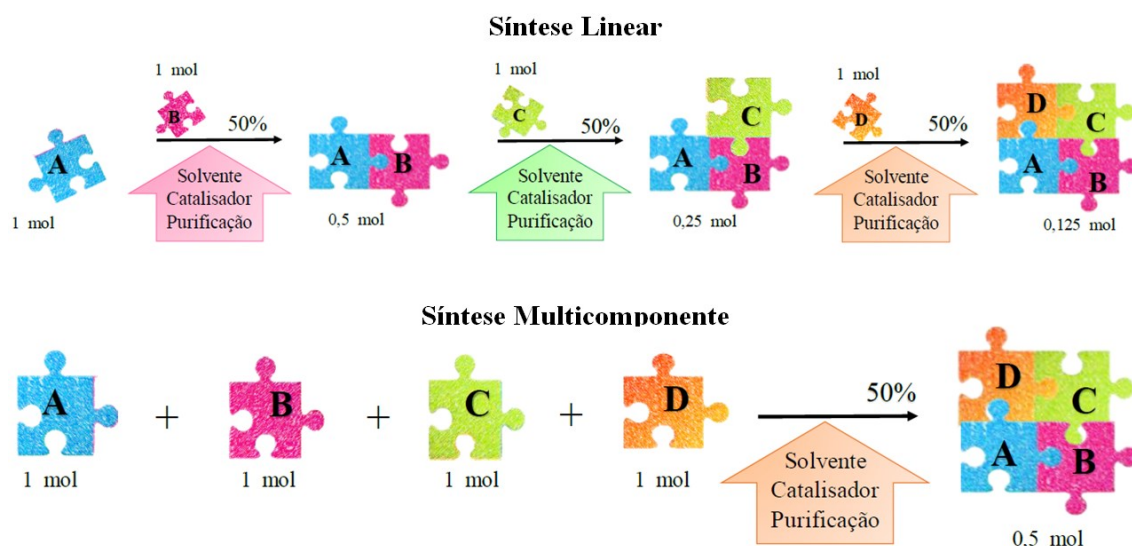


Nesse contexto as MCRs têm ganhado bastante espaço no ramo da síntese orgânica, pois possuem diversas vantagens inerentes à sua metodologia. Um exemplo prático disso são os diversos trabalhos publicados com propostas de melhora nas condições experimentais de MCRs utilizadas para a obtenção de compostos derivados do núcleo PPZ.<sup>284,286-289</sup>

As MCRs são reações altamente convergentes, em que 3 ou mais reagentes são adicionados simultaneamente ao recipiente reacional fornecendo apenas um produto em que todos ou quase todos os átomos presentes nos reagentes encontram-se no produto final. Nestas reações tem-se, simultaneamente, tanto clivagens de ligações existentes quanto formação de novas ligações, construindo, o aduto da MCR.<sup>290-293</sup>

As MCRs também são conhecidas como reações “one pot”,<sup>285</sup> que significa que a síntese transcorre em um único recipiente reacional. Sendo assim, em comparação com a síntese linear de um mesmo produto, as MCRs possibilitam a diminuição da geração de resíduos (uma vez que o processo de purificação reacional é realizado uma única vez ao fim do procedimento, enquanto que na síntese linear uma etapa purificação é necessária após cada etapa reacional) e minimiza a possibilidade de formação de subprodutos indesejados.<sup>294,295</sup>

É apresentado no Esquema 7, uma metodologia genérica de uma rota sintética linear para formação de um produto (ABCD). Em contraste a uma síntese MCR, na síntese linear, a medida que a reação acontece há a necessidade de etapas de purificação que demandam uma quantidade significativa de reagentes orgânicos (solventes e catalisadores).<sup>296</sup> De forma geral, neste tipo de metodologia, obter um rendimento global quantitativo é extremamente difícil, uma vez em cada uma das etapas (obtenção dos intermediários) ocorrem perdas que afetam o valor de rendimento ao final.



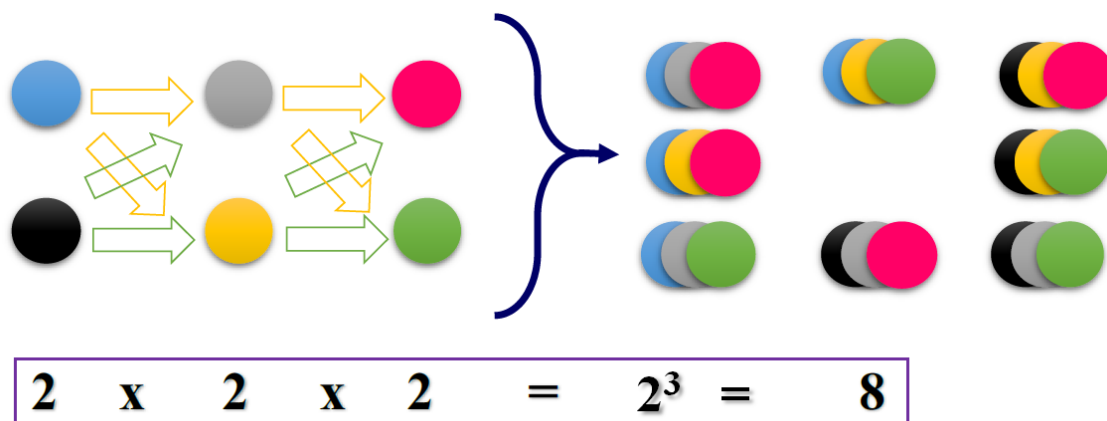
**Esquema 7.** Acima é apresentada uma metodologia sintética linear com o exemplo de como o número de etapas influenciam no rendimento global da reação. A cada etapa tem-se a introdução de substratos e insumos orgânicos, onde A, B, C, D são os substratos reacionais, AB e ABC os intermediários e ABCD o produto final. Abaixo é apresentada a metodologia multicomponente. Na formação do produto (ABCD), tem-se apenas uma etapa sintética utilizando A, B, C e D como materiais de partida. Adaptado das referências 296 e 297.

Também no Esquema 7, é apresentada uma metodologia genérica de uma rota sintética para obtenção de um produto (ABCD) por meio de uma MCR. Esse tipo de síntese, geralmente, é realizada em uma única operação sintética.<sup>294</sup> Idealmente, tem-se a adição simultânea de todos os componentes da reação logo no início da mesma, sem uma ordem de adição preferencial e caracteriza-se como sendo uma sequência de eventos mono e bimoleculares que procede sequencialmente até a formação do produto.<sup>298,299</sup>

Ainda analisando o Esquema 7, é possível observar que a metodologia genérica adotando uma MCR, possibilita uma utilização diminuta de insumos e baixa formação de resíduos. Ao contrário das sínteses lineares, nas quais se tem usualmente a formação de ligações individuais em sequência até a formação da molécula de interesse. Nas sínteses de MCRs a formação de várias ligações ocorre em uma única etapa reacional, sem necessidade de isolamento de intermediário, de alteração das condições reacionais ou mesmo adição de reagentes suplementares ao longo do processo. Dessa forma, a preferência pela utilização dessa estratégia sintética proporciona o controle da problemática relacionada as sínteses lineares, possibilitando a mitigação da quantidade de resíduos, subprodutos e de despesas laboratoriais desnecessárias.<sup>300</sup>

Apesar de ser realizada em uma única etapa, as MCRs possibilitam a formação de moléculas estruturalmente complexas e muitas delas biologicamente ativas.<sup>301</sup> Sendo possível se modificar o produto obtido variando-se apenas um dos reagentes utilizados, o que proporciona a obtenção de bibliotecas de produtos com atividade biológica.<sup>298,302</sup> A quantidade de produtos possíveis pela síntese MCR pode ser estimado pela fórmula  $X^n$ , onde  $X$  é quantidade de reagentes de partida que se deseja variar e  $n$ , número de componentes reacionais. O Esquema 8 exemplifica a quantidade de produtos formados quando se deseja variar duas vezes cada reagente em uma MCR de três componentes. Nesse caso, oito é a quantidade de derivados do aduto da MCR hipotética. Em comparação com a síntese linear, as MCRs têm grande vantagem na obtenção de moléculas orgânicas por permitirem uma rápida expansão (processos one-pot e baixo tempo reacional).<sup>301</sup>

As MCRs, dessa forma, preenchem o requisito de uma síntese eficiente, na qual tem-se a obtenção de estruturas altamente complexas, com custo e tempo satisfatórios.<sup>299</sup> Além de permitirem uma rápida obtenção de moléculas orgânicas, por meio da inserção de grupos funcionais através de formação de novas ligações carbono-carbono, carbono-nitrogênio e carbono-heteroátomo.<sup>292,293,295</sup>



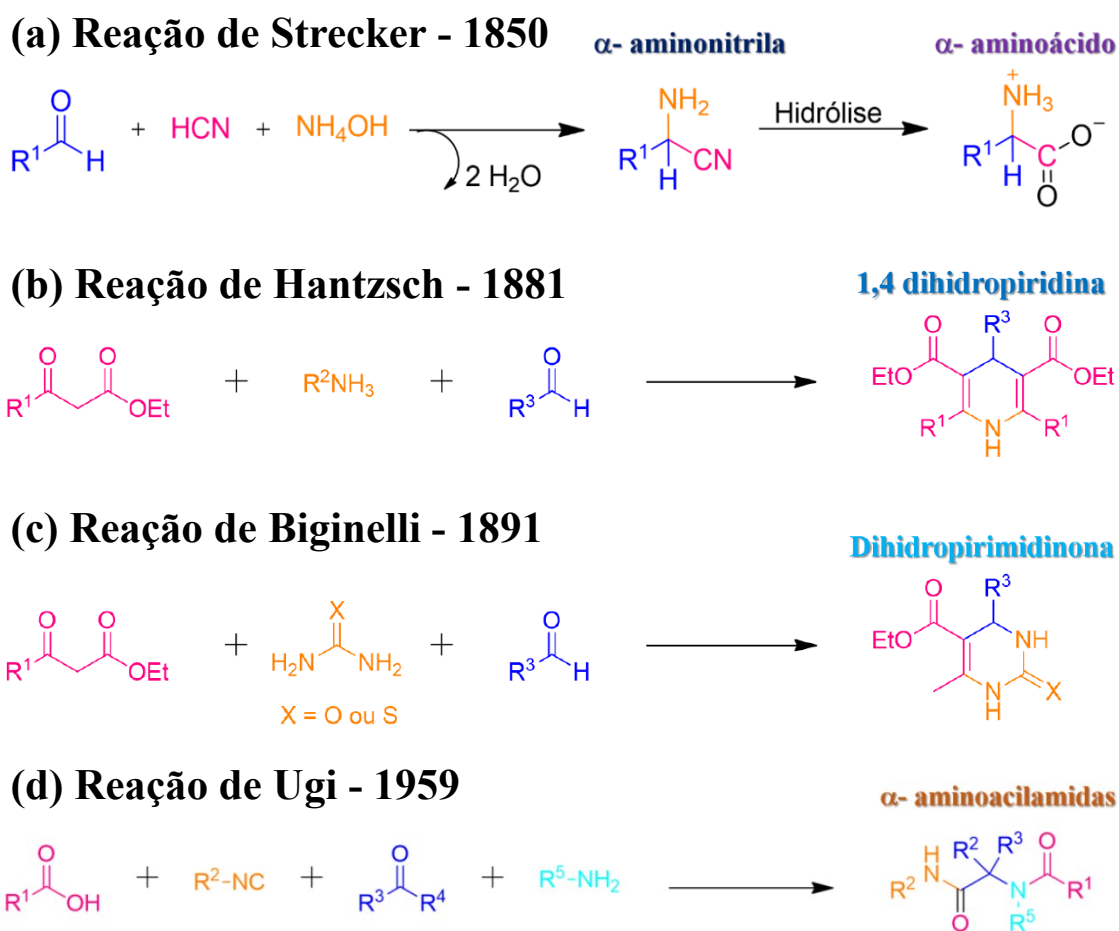
**Esquema 8.** Demonstração da quantidade de produtos formados mediante diferentes formas de combinação dos materiais de partida em uma MCR. No esquema a MCR exemplificada é de 3 componentes, apresentando a possibilidade de variação de todos os substratos reacionais. Cada substrato foi variado duas vezes, sendo obtido oito diferentes produtos. Adaptado da referência 273.

Muitos grupos de pesquisa têm conciliado o uso de MCRs com abordagens combinatórias permitindo, assim, a criação de diversas moléculas orgânicas, levando à rápida evolução da química farmacêutica.<sup>303-305</sup> Essas abordagens têm ganhado destaque principalmente pelas vantagens inerentes a utilização de metodologias de MCRs, algumas delas merecem destaque:

- i) são de fácil operação: não há a necessidade de utilização de vidrarias muito sofisticadas, sendo possível realizá-las em apenas um recipiente reacional e necessitando de poucas etapas de purificação.<sup>298</sup>
- ii) são sustentáveis e eco-eficientes: há pouca formação de subprodutos reacionais e resíduos, além de demandarem uma menor quantidade de compostos orgânicos, como solventes, catalisadores e reagentes.<sup>300</sup>
- iii) possibilitam alta economia de átomos: o produto final é composto pela maioria dos átomos presentes nos reagentes utilizados.<sup>306</sup>
- iv) apresentam elevada convergência: todos os componentes adicionados produzem um único produto, não havendo a formação de subprodutos indesejáveis (geralmente a água é um subproduto formado).<sup>294</sup>
- v) viabiliza a formação de uma biblioteca de produtos: a facilidade na utilização de substratos diferentes possibilita a obtenção de uma vasta quantidade de moléculas, com pequenas diferenças estruturais, mas que podem interferir de maneira significativa em sua atividade biológica e conseqüentemente, em sua aplicabilidade.<sup>307,308</sup>

A primeira proposta de uma MCR foi apresentada em 1850 por Strecker,<sup>309</sup> que recebeu o nome de reação de Strecker em homenagem a seu descobridor (Esquema 9-a). A reação de Strecker consiste na condensação de um aldeído com um cloreto de amônio na presença de cianeto dando origem a  $\alpha$ -amino nitrilas, que após uma etapa de hidrólise forma  $\alpha$ -aminoácidos.<sup>310,311</sup> Desde então várias outras MCRs tem sido propostas. Em 1881, Hantzsch apresentou a síntese direta de derivados do núcleo 1,4-dihidropiridina (DHPs),<sup>312</sup> a partir da reação de condensação de um aldeído com dois equivalentes do composto 1,3-dicarbonílico e um composto fonte de nitrogênio, podendo ser o cloreto de amônio,<sup>313</sup> como pode ser visto no Esquema 9-b. Em 1891, Biginelli apresentou outra abordagem multicomponente, por meio da qual obtinha-se derivados do núcleo 1,2-

dihidropirimidinonas (DHPMs), por meio da reação de um composto 1,3-dicarbonílico, (tio) ureia e um aldeído, apresentada no Esquema 9-c.<sup>314,315</sup> Um pouco mais a frente, em 1959 Ugi propôs uma MCR para a obtenção de derivados de  $\alpha$ -aminoacilamidas por meio da reação de um isocianeto, um ácido carboxílico, uma amina primária e um componente carbonílico (aldeído ou cetona), apresentada no Esquema 9-d.<sup>313,316</sup> Essa é uma das MCRs que ganharam mais destaque após sua publicação. As MCRs geralmente recebem o nome do pesquisador que desenvolveu a metodologia sintética.



**Esquema 9.** Representações genéricas das reações de (a) Strecker; (b) Hantzsch; (c) Biginelli e (d) Ugi.

A proposta de uma MCR de 4 componentes para a obtenção de derivados do núcleo piranopirazol é recente (quando comparada com as primeiras MCRs apresentadas) e não recebeu nenhum nome específico. Como foi proposta pela primeira em 2008, ainda há muitas possibilidades de sínteses a serem exploradas e estudadas. É importante compreender seu mecanismo para se aprimorar a metodologia, escolher catalisadores e solventes que se adequem melhor à síntese e, como consequência, possibilitar o aumento

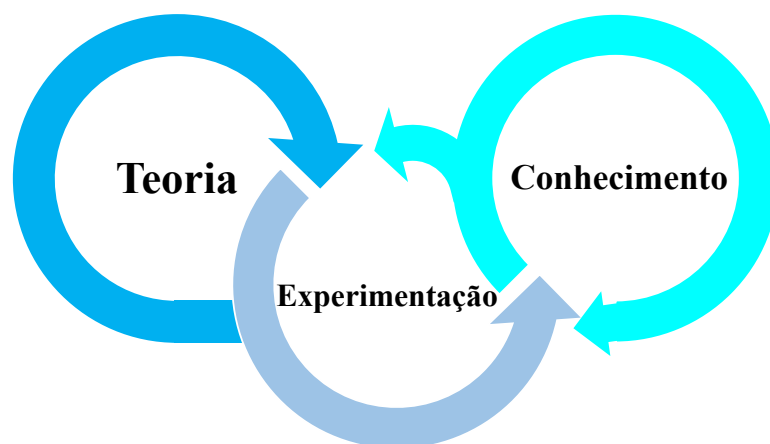
do rendimento reacional, bem como a obtenção de uma variedade maior de produtos. Quanto mais substratos sintetizados maior serão as possibilidades de acoplamento com o fluoróforo BTD, para a obtenção de novas potenciais sondas fluorescentes.

Tendo em vista todas as vantagens inerentes a utilização de MCRs na síntese de diversos compostos orgânicos com atividade biológica, esse trabalho almeja alcançar sucesso ao utilizar uma metodologia que as combine satisfatoriamente e de maneira orientada na obtenção de moléculas derivadas do núcleo piranopirazol para posteriormente incorporar grupos fluoróforos nessas estruturas.<sup>317</sup> Além disso, tem-se o interesse em propor uma prática experimental para ser utilizada no ensino de química a nível de graduação, uma vez que as MCR são reações que tem ganhado um grande destaque na química orgânica e sua abordagem na graduação se torna relevante.

### **Experimentação no Ensino de Química:**

Assim como a evolução do conhecimento ocorre de maneira rápida e dinâmica, as práticas voltadas ao ensino de Química também devem acompanhar essa evolução, uma vez que a formação do conhecimento científico depende essencialmente da experimentação para evoluir. Formalmente, a experimentação se tornou parte obrigatória na metodologia científica, para se verificar as hipóteses formuladas, por volta do século XIX.<sup>318</sup>

Há uma relação íntima entre a experimentação e o embasamento teórico. De maneira geral, o experimento é realizado baseado em uma hipótese a respeito do fenômeno que se deseja observar. Por sua vez, as hipóteses são formuladas a partir da observação de fenômenos. Tendo em vista essa dinâmica, pode-se dizer que a relação entre teoria e experimento é cíclica, como ilustra a Figura 51. A teoria ou o conhecimento (ou seja, a compreensão de conceitos e princípios) não se desenvolve única e exclusivamente a partir da experimentação. A origem do conhecimento científico é um processo cíclico que liga a teoria e a prática.<sup>319</sup>



**Figura 51.** Relação entre a teoria e a experimentação nos trabalhos científicos e consequente formação do conhecimento. Adaptada da referência 317.

O objetivo da Química como ciência é proporcionar uma compreensão mais aprofundada da composição, das propriedades e das mudanças que podem ser observadas na matéria a nível macroscópico e microscópico. Sendo que, para explicar os fenômenos que não podem ser observados a “olho nu” (microscópicos) é necessária a utilização de modelos simbólicos.<sup>320</sup>

Para Talanquer,<sup>321</sup> o conhecimento químico pode ser de três tipos diferentes: empírico (por meio da realização de experimentos), explicativo (por meio da utilização de modelos) e simbólico (pela utilização de signos visuais). Para ele, o conhecimento químico pode apresentar diferentes dimensões (estrutura/composição, energia e tempo) e ser trabalhado de formas distintas (matemática, conceitual, contextual e histórica).<sup>322</sup>

Johnstone em 1982, foi o primeiro pesquisador a destacar a importância de três níveis diferentes de explicação no ensino de química, são eles: i) descritivo e funcional: nesse nível os fenômenos são experimentados, observados e descritos; ii) representacional: nesse nível os sinais são usados para representar e comunicar conceitos e ideias; e iii) explicativo: nesse nível os fenômenos são explicados.<sup>323,324</sup>

Por esse motivo, há a necessidade de que as explicações em química sejam corroboradas por dados experimentais,<sup>325,326</sup> uma vez que a elaboração do conhecimento científico é dependente de uma abordagem experimental, pois a organização desse conhecimento ocorre preferencialmente por meio de trabalhos investigativos.<sup>316</sup>

Geralmente as práticas experimentais estão previstas no currículo dos cursos de Química com o objetivo de capacitar os alunos para o planejamento e realização de

experimentos, avaliação de possíveis riscos durante a prática, determinação de possíveis fontes de erros e interpretação dos resultados obtidos.<sup>317</sup> Aprender essa dinâmica que engloba o desenvolvimento de práticas experimentais contribuiu de maneira única para a promoção da capacidade dos alunos em realizar pesquisas, tendo em vista que a experimentação permite o contato com manipulações de processos observados na natureza e na tecnologia e não apenas com o aspecto teórico a respeito desses temas.<sup>316</sup>

Sendo assim, novas práticas experimentais devem ser propostas com o intuito de incorporar as novas metodologias experimentais desenvolvidas pelo meio científico ao longo do tempo nas disciplinas experimentais dos alunos de graduação. Permitindo aos alunos acompanhar o que tem se discutido na comunidade científica.

Por esse motivo, surgiu o interesse em elaborar uma proposta de prática experimental. Nesse capítulo será apresentado o trabalho de otimização das condições experimentais para obtenção de moléculas derivadas do núcleo PPZ por meio de uma MCR. Ainda nessa temática, uma prática experimental dessa metodologia de MCR será apresentada como uma proposta para utilização no laboratório de ensino em química orgânica.

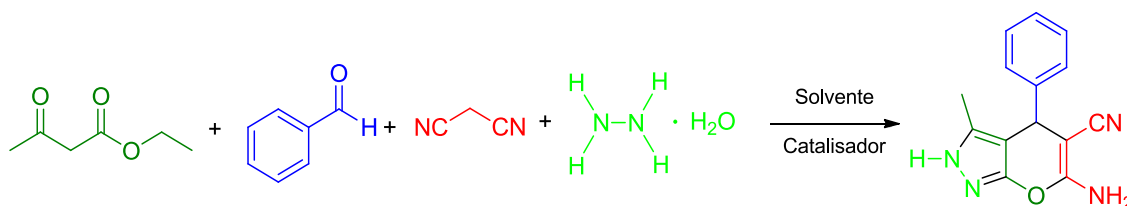


# Parte Experimental

## Parte Experimental

### 3.1 - Obtenção do PPZ:

A síntese do composto 6-amino-3-metil-4-fenil-1,4-diidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila foi utilizada como modelo para otimizar as condições experimentais (Esquema 10). A obtenção do composto derivado do núcleo PPZ correu pela reação de 1 mmol dos seguintes reagentes: acetoacetato de etila (130 mg), benzaldeído (106 mg), malonitrila (66 mg) e hidrato de hidrazina (50 mg).<sup>327</sup>



**Esquema 10.** Reação para síntese do 6-amino-3-metil-4-fenil-1,4-diidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila utilizada para o estabelecimento da melhor condição experimental. Na reação modelo são utilizados NaOH como catalisador e etanol como solvente.

Para purificação do produto foi realizado sua precipitação em uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila (8:2). Reações para se determinar o melhor solvente, catalisador, tempo de reação e temperatura ideal, foram realizadas.<sup>328</sup>

### 3.2 – Equipamentos e análises:

#### → Infravermelho:

Os espectros de infravermelho (IV) do PPZ foram obtidos utilizando patilhas de KBr, em uma faixa espectral de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando o espectrômetro Varian 640-IR com transformada de Fourier equipado com detector TA DLaTGS.

#### → Ponto de fusão:

Os pontos de fusão foram medidos em um equipamento IA9000 Eletrotermal.

**→  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC e HSQC RMN:**

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Ascend<sup>TM</sup> Avance III HD de 14,1 T (600 MHz para  $^1\text{H}$  e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), utilizando uma sonda de diâmetro interno de 5 mm (BBOFO 5mm). Como solvente foi utilizado dimetilssulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ).

# Resultados & Discussão

## Resultados e Discussão

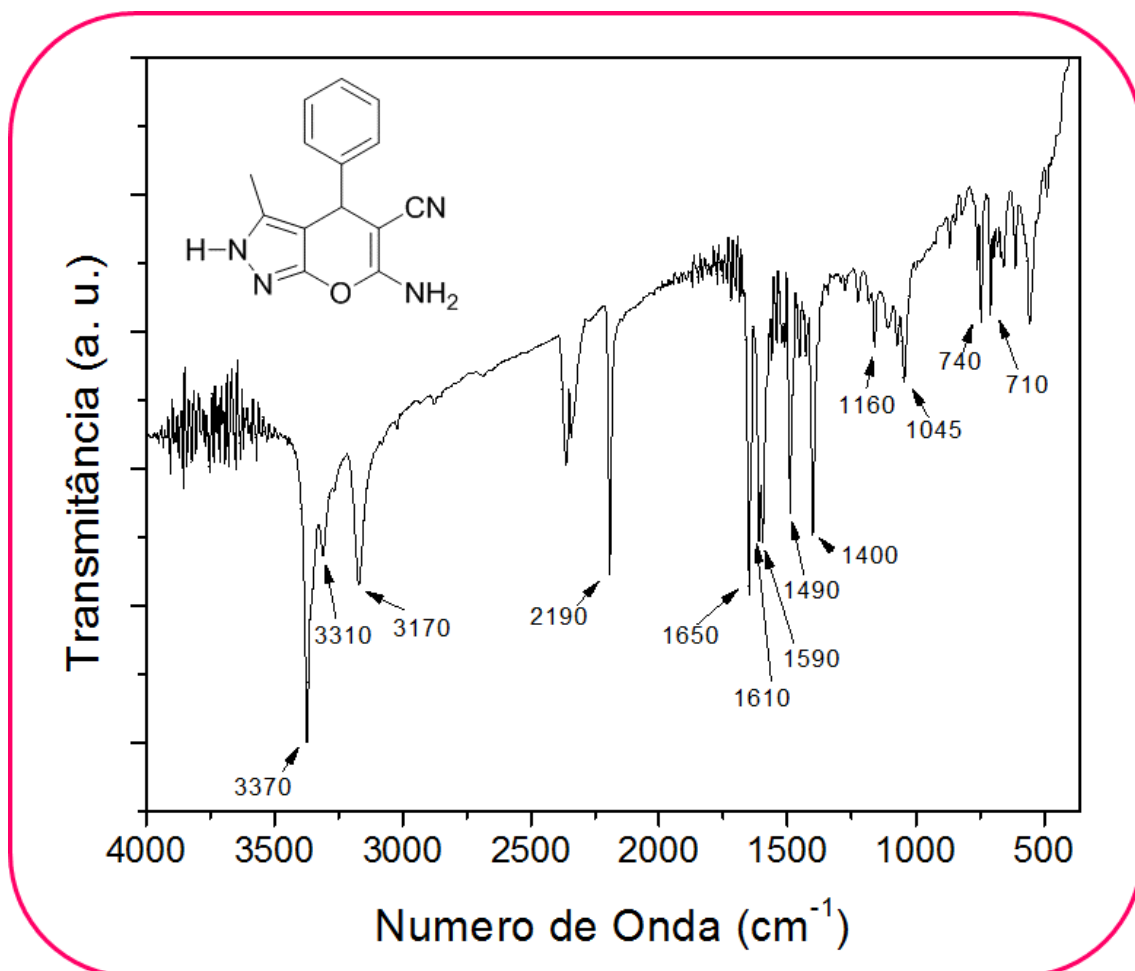
Após a obtenção do derivado do PPZ por meio da MCR entre o acetoacetato de etila, benzaldeído, malononitrila e hidrato de hidrazina utilizando 10 mol% de NaOH e etanol como solvente, foram realizadas as análises de IFTR e RMN do produto obtido. A otimização da reação será apresentada após os dados de caracterização.<sup>327,328</sup>

Os principais sinais vistos no espectro de FTIR do PPZ foram apresentados na Tabela 4. O espectro de FTIR, também é apresentado (Figura 52). É possível observar várias bandas de 900 a 690  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos dobramentos para fora do plano dos C-H aromáticos (em destaque as bandas em 710, 740 e 840  $\text{cm}^{-1}$ ). Em 1045 e em 1160  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar duas bandas referentes ao estiramento das ligações C-O. Em 1490 e em 1590  $\text{cm}^{-1}$  observam-se duas bandas referentes ao estiramento das ligações C-N. Em 1610  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma banda referente ao estiramento das ligações C=C aromáticas. Em 1650  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar o estiramento da ligação C=N. Em 2190  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma banda referente ao estiramento da ligação C $\equiv$ N. Em 3170  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma banda referente ao estiramento das ligações C-H aromáticas. Em 3310 e em 3370  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar duas bandas referentes aos estiramentos das ligações N-H.

**Tabela 4.** Principais estiramentos e dobramentos observados no espectro de FTIR do PPZ.

PPZ	
Grupo	Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
<i>C-H aromático (dobramento)</i>	710
	740
	840
<i>C-O</i>	1045
	1160
<i>C-N</i>	1490
	1590
<i>C=C</i>	1610
<i>C=N</i>	1650
<i>C<math>\equiv</math>N</i>	2190
<i>C-H aromático (estiramento)</i>	3170
<i>N-H</i>	3310
	3370

O espectro de FTIR é apresentado juntamente com a estrutura molecular do PPZ para melhor visualização dos comprimentos de onda referentes a cada banda (Figura 52).

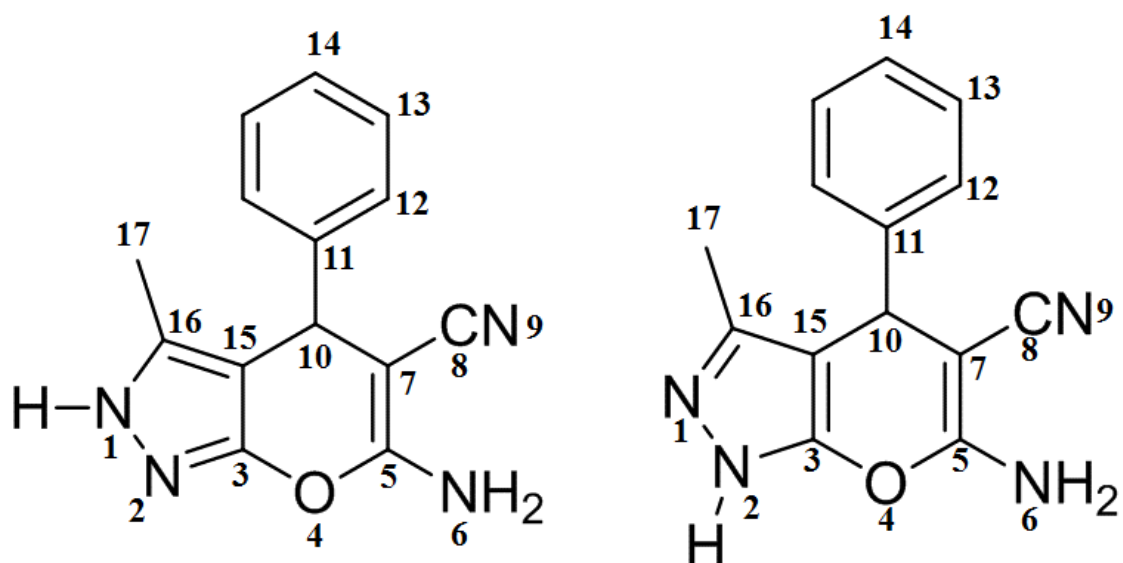


**Figura 52.** Espectro de FTIR e estrutura molecular do PPZ. Os estiramentos e dobramentos das ligações foram apresentados em destaque.

Apenas a aquisição dos espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN não foram suficientes para a caracterização da molécula obtida. Além deles foram adquiridos os espectros de correlação heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC) e de correlação heteronuclear de um único quantum (HSQC) para as interações entre C e H e para as interações entre N e H. Para maior compreensão da atribuição dos sinais nos espectros, a estrutura molecular foi numerada de forma que cada átomo recebeu um número identificador, os hidrogênios receberam o mesmo número que os átomos aos quais estão ligados e, pelo fato de haver simetria, apenas 4 carbonos do benzeno receberam a identificação numérica (Figura 53).

A motivação do estudo espectroscópico tão detalhado por meio de análises de RMN surgiu do fato de não haver consenso na literatura da estrutura dos derivados do PPZ.

Alguns artigos apresentam a estrutura como o hidrogênio ligado ao N1 e outros ligados ao N2 (Figura 53).



**Figura 53.** Duas possibilidades de estrutura molecular do derivado do PPZ sintetizado com a identificação numérica dos átomos.

Após a obtenção do espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 54) da molécula foi calculada a integral dos sinais. Atribuiu-se o valor de 3 para o sinal com deslocamento 1,78 ppm referente à única metila da molécula (17), pois esse deslocamento é característicos de metilas. Com isso foi possível observar (Figura 54) que o singlete em 12,10 ppm é referente à um H ligado ao N (1), deslocamento químico característicos de hidrogênio ligado a nitrogênio com caráter eletronegativo mais pronunciado. Que o singlete em 6,85 ppm é referente aos dois H do  $\text{NH}_2$  (6), deslocamento característico de hidrogênios de aminas pouco desblindadas. O singlete em 4,60 ppm (10) é referente ao H ligado ao carbono quaternário ligado ao anel aromático, sinal característico de hidrogênios desblindados. O duplete em 7,18 ppm é referente a dois H do anel aromático tendo apenas um H como vizinho (12), uma vez que é observada simetria nessa parte da molécula. O tripleto em 7,32 ppm é referente a dois H do anel aromático tendo mais dois H como vizinhos (13). O tripleto em 7,22 ppm é referente a um H do anel aromático com dois H vizinhos (14). Em aproximadamente 2,50 ppm é possível observar um multiplete referente ao solvente utilizado (DMSO).

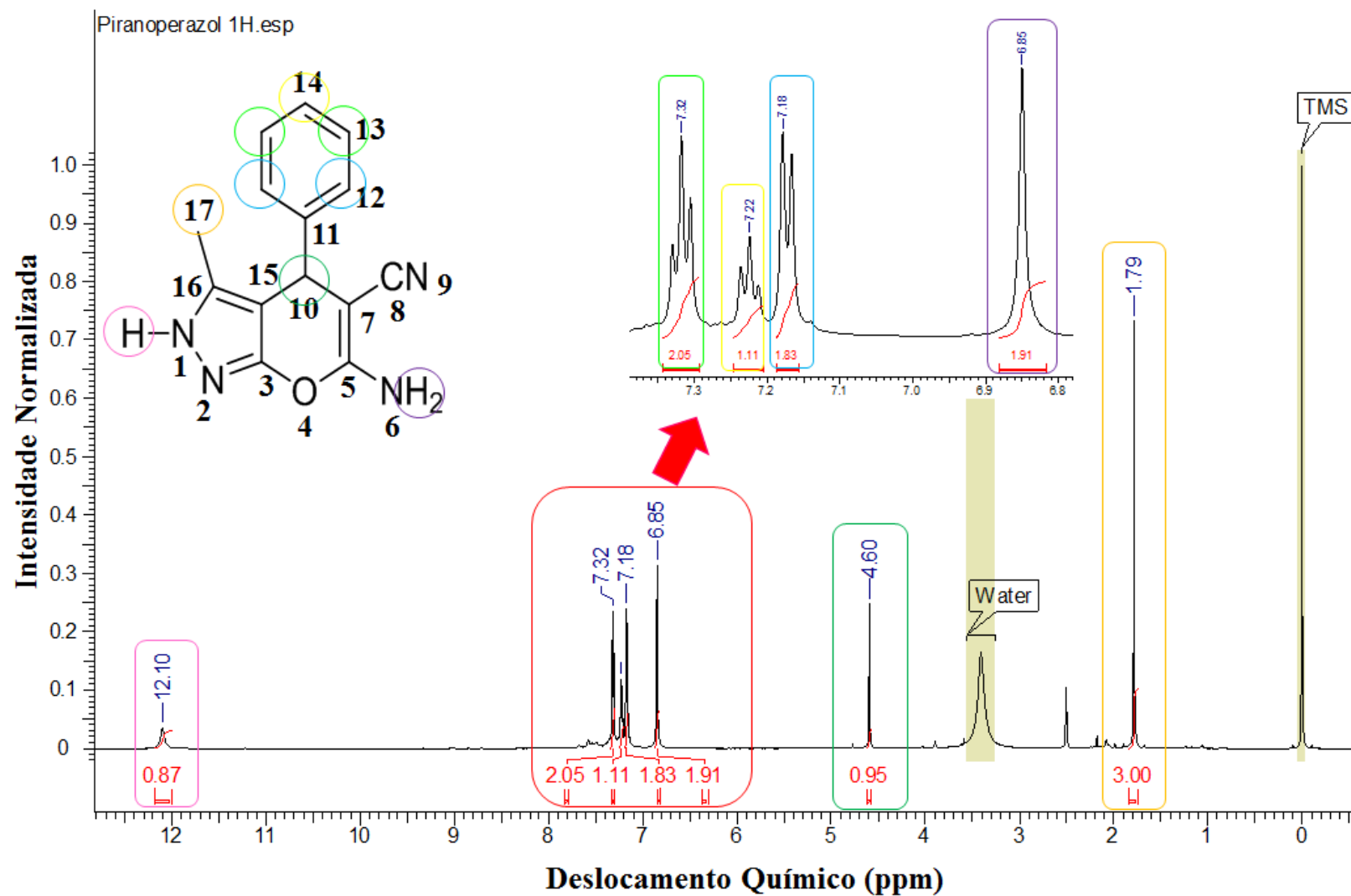


Figura 54. Espectro de <sup>1</sup>H do PPZ sintetizado nesse trabalho em DMSO-*d*<sub>6</sub>.



O espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 55) foi adquirido e foram observados (Figura 54) 12 sinais com os seguintes deslocamentos químicos em ppm: 9,7; 36,3; 57,3; 97,7; 120,8; 126,7; 127,5; 128,5; 135,7; 144,4; 154,8 e 160,9. Essa quantidade de sinais corresponde com a quantidade esperada, uma vez que há simetria no anel benzênico presente na estrutura molecular. Apenas analisando o espectro de  $^{13}\text{C}$  não é possível fazer a atribuição com precisão de todos os sinais observados. Alguns sinais são de fácil atribuição, pois possuem deslocamentos químicos bem característicos, como por exemplo a metila em aproximadamente 9,7 ppm.

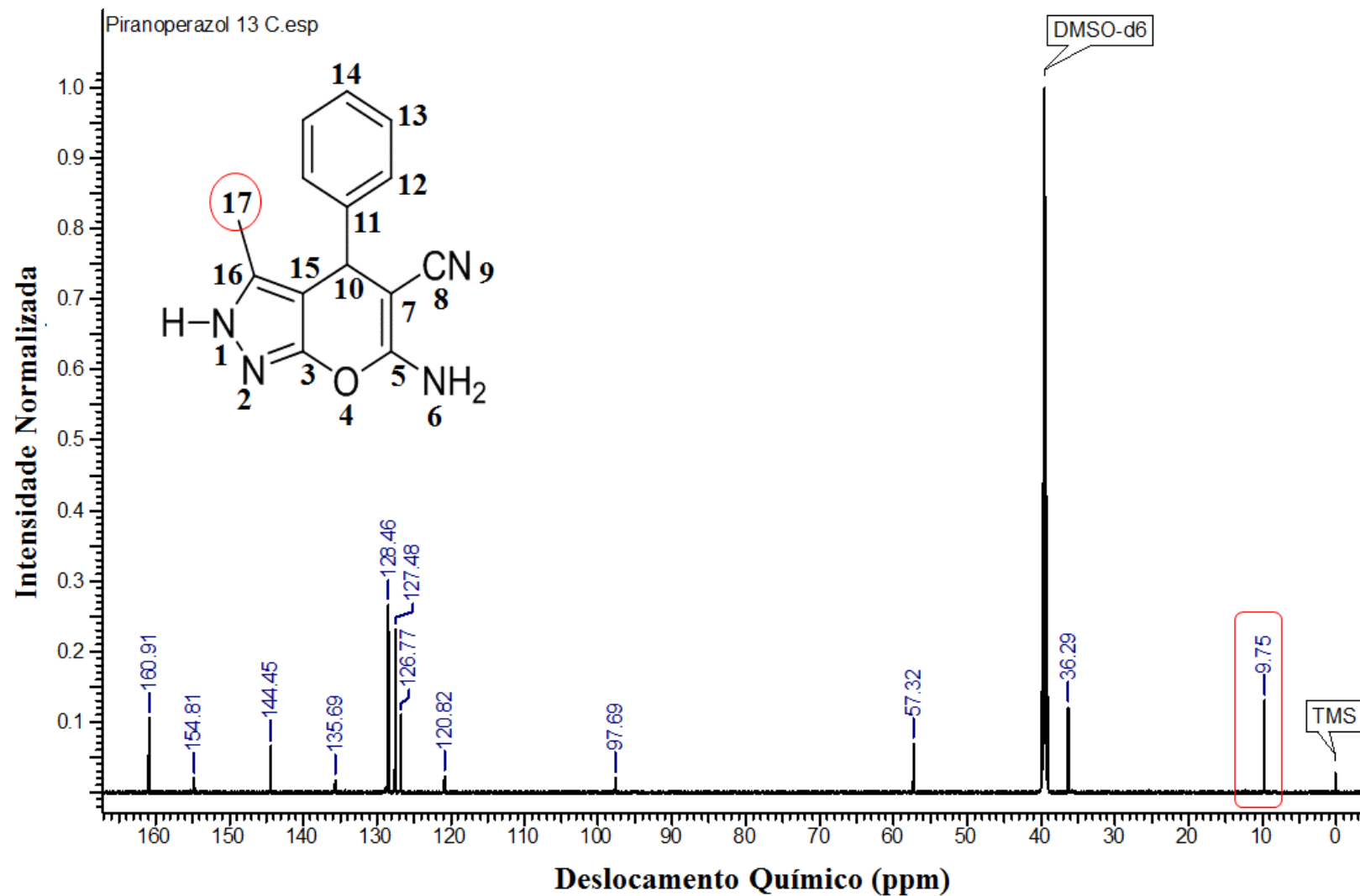


Figura 55. Espectro de <sup>13</sup>C do PPZ sintetizado nesse trabalho em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Os dados da atribuição dos deslocamentos químicos com os respectivos experimentos que possibilitaram a atribuição foram organizados em forma de tabela para melhor compreensão (Tabela 5). A Tabela 5 inclui dados dos experimentos de 2D que são apresentados na sequência.

**Tabela 5.** Deslocamentos químicos dos átomos que constituem o PPZ obtido nesse trabalho.

ÁTOMO	<sup>1</sup> H	INTEGRAÇÃO	<sup>13</sup> C (HSQC)	<sup>13</sup> C (HMBC)	<sup>15</sup> N (HSQC)
1	12,10 (singleto)	1 (0,87)	---	---	189,1
2	---	---	---	---	---
3	---	---	---	154	---
4	---	---	---	---	---
5	---	---	---	160	---
6	6,85 (singleto)	2 (1,91)	---	---	73,4
7	---	---	---	57	---
8	---	---	---	120	---
9	---	---	---	---	---
10	4,58 (singleto)	1 (0,95)	36,1	---	---
11	---	---	---	144	---
12	7,17 (dupleto)	2 (1,83)	127,3	---	---
13	7,32 (tripleto)	2 (2,05)	128,3	---	---
14	7,22 (tripleto)	1 (1,11)	126,5	---	---
15	---	---	---	97	---
16	---	---	---	135	---
17	1,78 (singleto)	3,00	9,6	---	---

O espectro 2D de HSQC (Figura 56) foi obtido para garantir que a atribuição de deslocamento dos carbonos ligados ao H já identificados anteriormente seja precisa. Analisando o espectro é possível observar um acoplamento entre o H10 e o C em 36,1 ppm, sendo assim foi atribuído o deslocamento de 36,1 ao C10. Foi observada um acoplamento entre o H12 e o C em 127,3 ppm, sendo assim esse carbono foi denominado C12. O H13 acopla com o C em 128,3 ppm, sendo assim, esse carbono foi denominado C13. O H14 acopla com o C de deslocamento 126,5 ppm, sendo assim, esse carbono foi denominado C14. O H17 acopla com o C com deslocamento 9,6 ppm, sendo assim, foi denominado C17. Como existem átomos de carbono na estrutura que não estão ligados a nenhum hidrogênio, não é possível terminar a atribuição dos sinais apenas com o espectro 2D de HSQC.

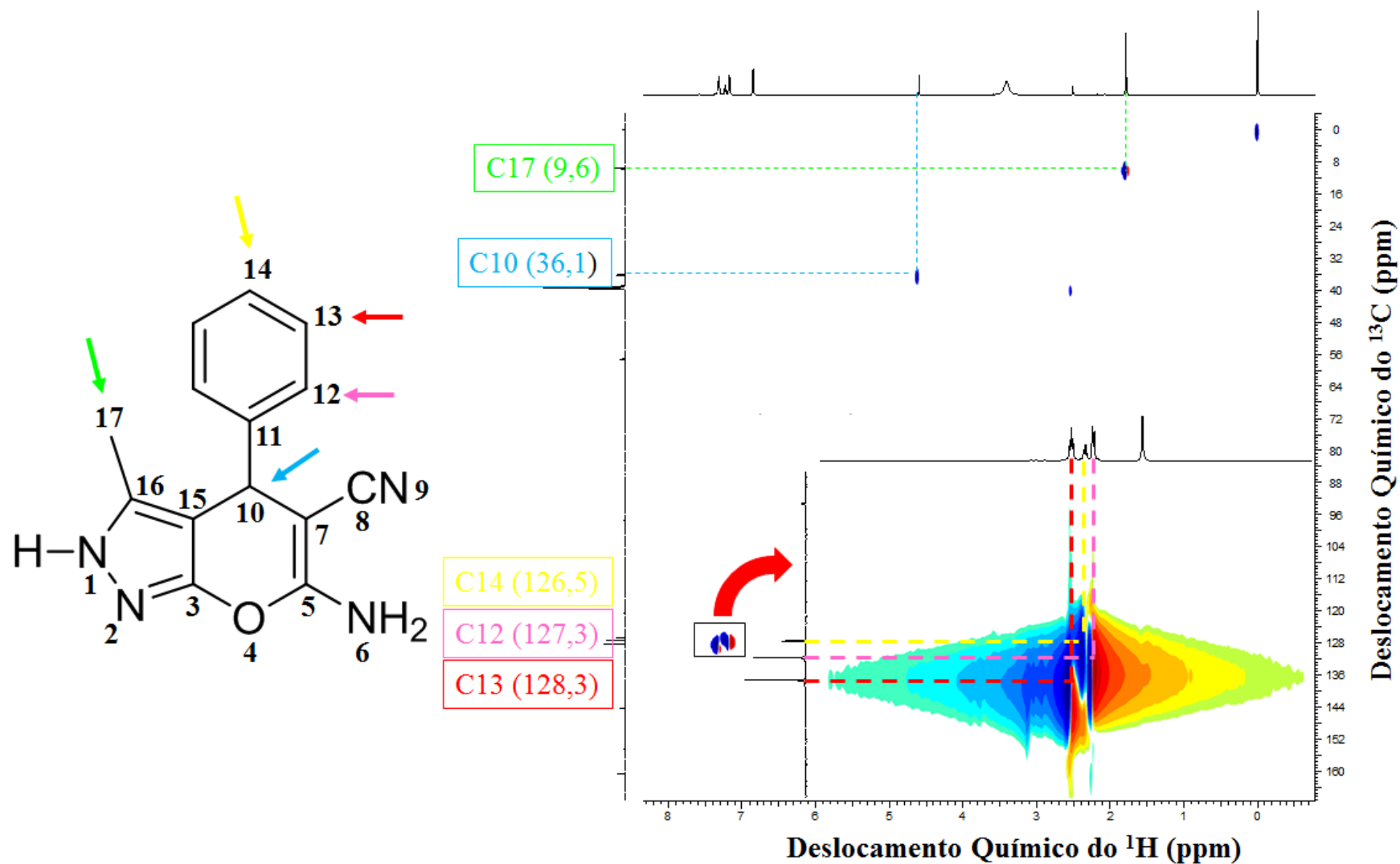
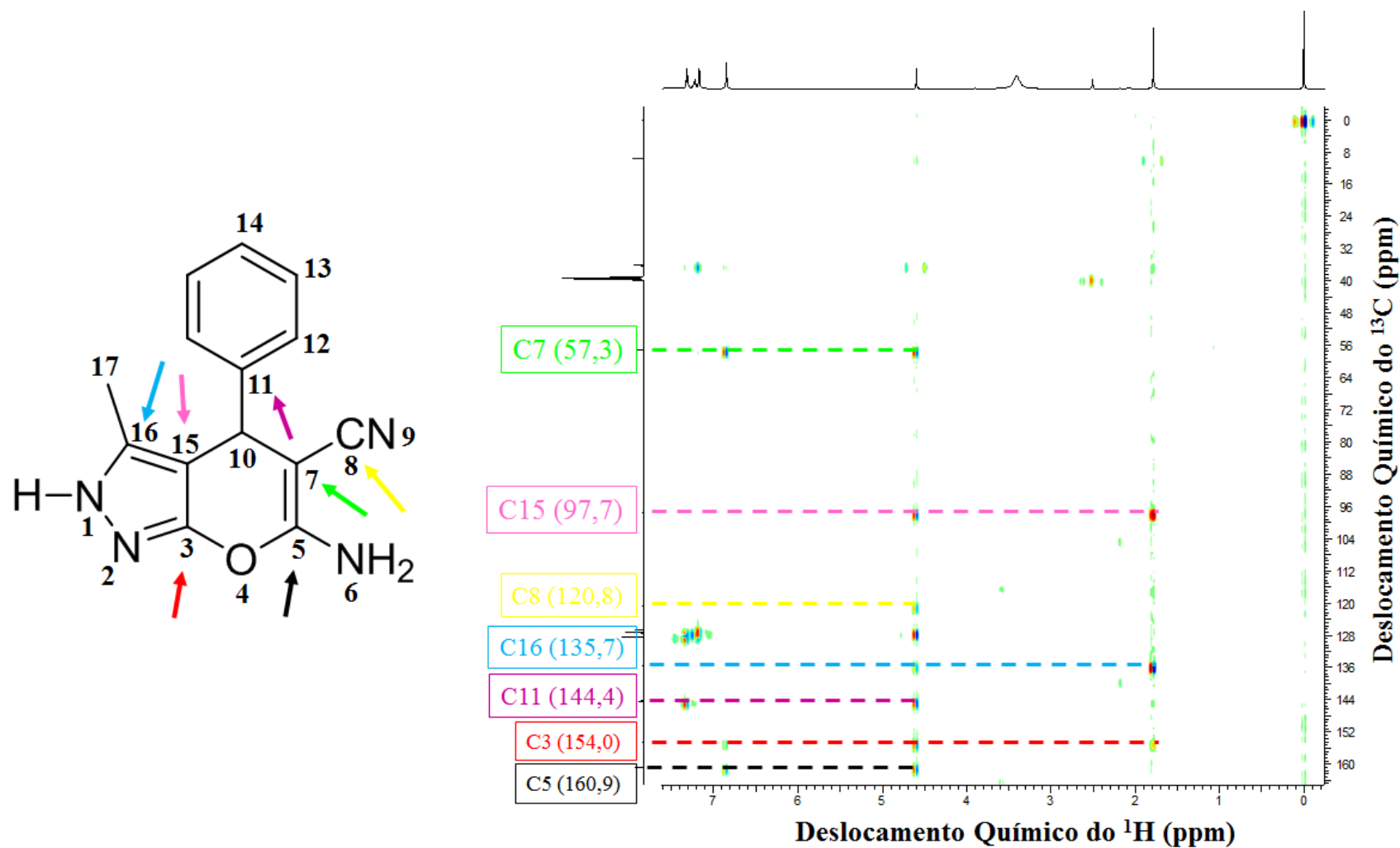


Figura 56. Espectro de HSQC correlacionando os núcleos C e H. Nesse espectro observam-se as interações entre carbonos e hidrogênios ligados. Em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Para concluir a atribuição dos deslocamentos de cada carbono foi necessário realizar o experimento de HMBC (Figura 57). Com esse espectro é possível observar o acoplamento entre carbonos e hidrogênios distantes (no mínimo duas ligações de distância). Sinais com a coloração vermelha indicam que a intensidade do acoplamento é maior sinais verdes e azuis indicam que o acoplamento não é tão intenso. O carbono com deslocamento químico de 154 ppm acopla com os hidrogênios do  $\text{NH}_2$  (sinal fraco em 6,85 ppm), com o CH (sinal forte em 4,60 ppm) e com  $\text{CH}_3$  (sinal fraco em 1,79 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C3. O carbono com sinal de deslocamento químico de 160,9 ppm acopla com os hidrogênios do  $\text{NH}_2$  (sinal fraco em 6,85 ppm) e do CH (sinal fraco em 4,60 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C5. O carbono com sinal de deslocamento químico de 57,3 ppm acopla com os hidrogênios do  $\text{NH}_2$  (sinal fraco em 6,85 ppm) e do CH (sinal forte em 4,60 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C7. O carbono com sinal de deslocamento químico de 120,8 ppm acopla com o hidrogênio do CH (sinal fraco em 4,60 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C8. O carbono com sinal de deslocamento químico de 144,4 ppm acopla com os hidrogênios da posição meta no anel benzênico (sinal forte em 7,32 ppm) e do CH (sinal fraco em 4,60 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C11. O carbono com sinal de deslocamento químico de 97,7 ppm acopla com os hidrogênios do CH (sinal fraco em 4,60 ppm) e do  $\text{CH}_3$  (sinal forte em 1,79 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C15. O carbono com sinal de deslocamento químico de 135,7 ppm acopla com os hidrogênios do CH (sinal fraco em 4,60 ppm) e do  $\text{CH}_3$  (sinal forte em 1,79 ppm) por esse motivo foi atribuído ao C16.



**Figura 57.** HMBC correlacionando os núcleos C e H. Nesse espectro observam-se as interações entre carbonos e hidrogênios distantes (no mínimo duas ligações de distância). Em  $\text{DMSO-}d_6$ .

Também foram adquiridos os espectros de HSQC (Figura 58) e HMBC (Figura 59) relacionando os núcleos N e H. Com esse espectro foi possível se determinar os deslocamentos químicos de dois dos quatro nitrogênios presentes na composição da molécula, uma vez que o nitrogênio não é um núcleo sensível e sua visualização só é possível indiretamente, ou seja, quando está ligado a hidrogênios (ou a outros núcleos sensíveis). Mudanças na configuração da sonda também viabiliza a obtenção de sinais de nitrogênios, entretanto esse processo é mais complexo.

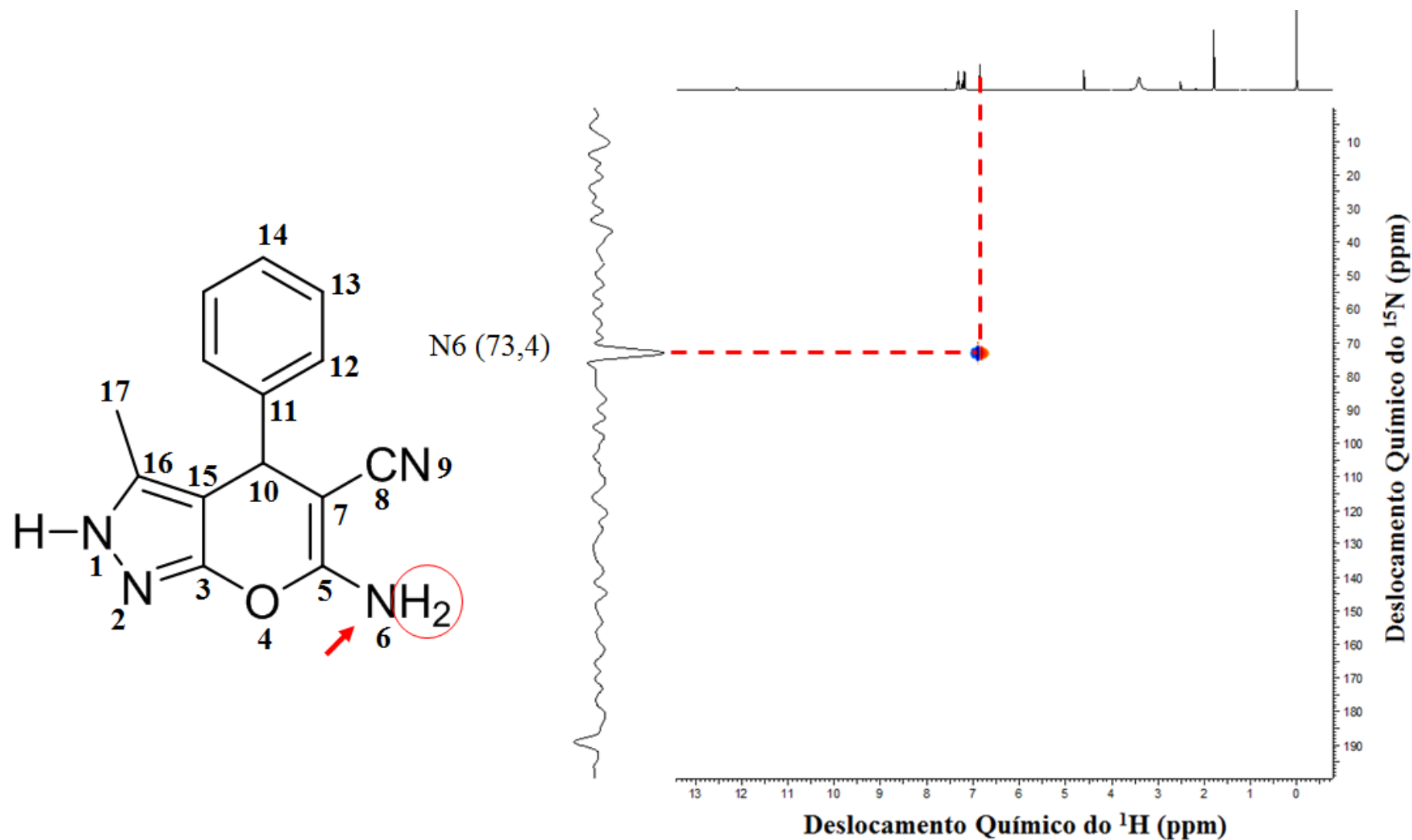
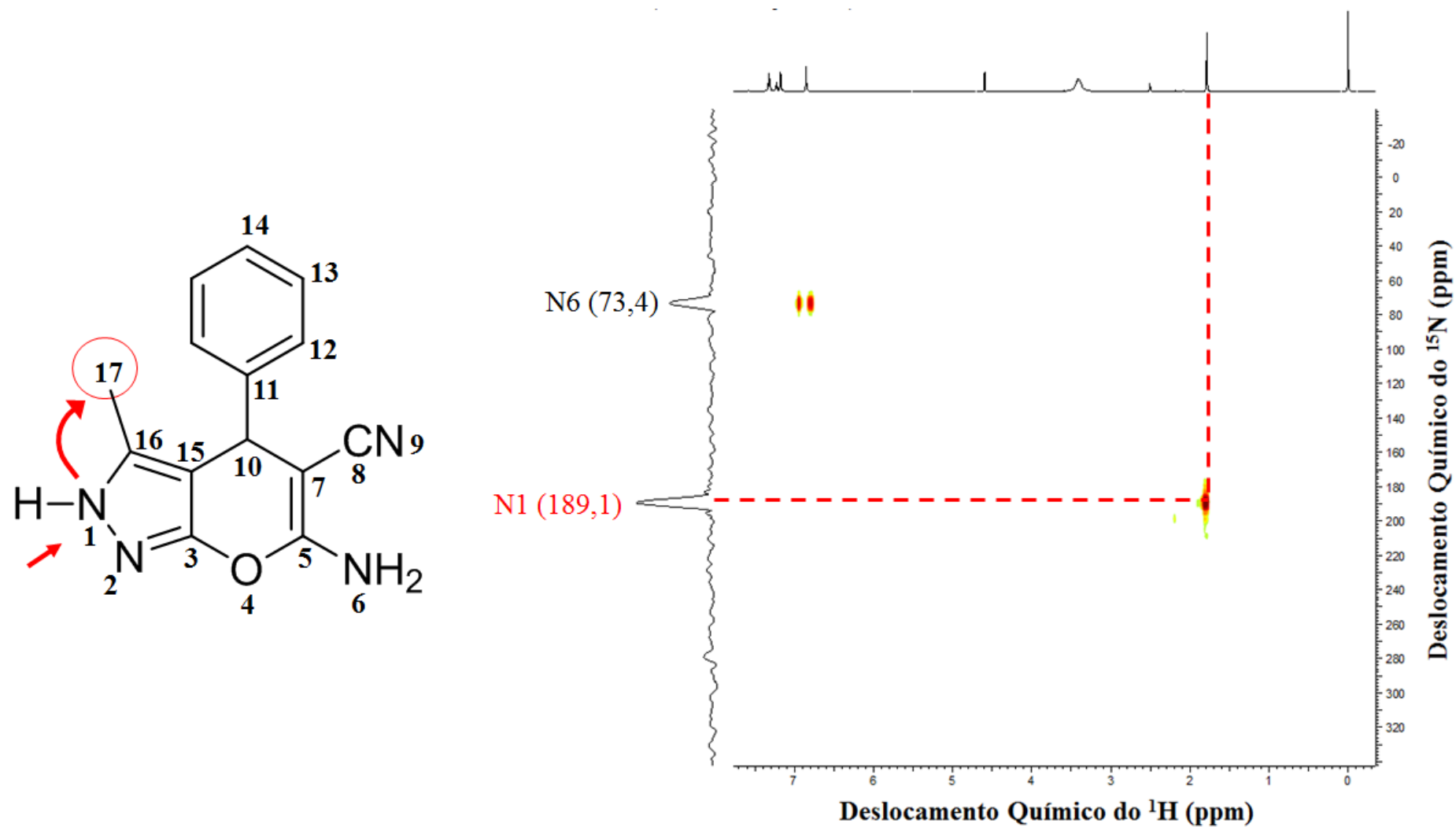


Figura 58. Espectro de HSQC correlacionando os núcleos N e H. Nesse espectro observam-se as interações entre nitrogênios e hidrogênios ligados. Em DMSO-*d*<sub>6</sub>.



Analisando o espectro de HSQC (Figura 58) é possível observar um sinal que indica o acoplamento de um nitrogênio com deslocamento químico de 73,4 ppm com os H6. Como esse acoplamento indica interação entre átomos diretamente ligados, esse nitrogênio foi identificado com 6. Não foi possível observar o outro sinal referente a ligação N—H devido à natureza ácida do átomo de hidrogênio dessa ligação (pKa aproximadamente 19,8).



**Figura 59.** HMBC correlacionando os núcleos N e H. Nesse espectro observam-se as interações entre carbonos e hidrogênios distantes (no mínimo duas ligações de distância). Em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Analisando o espectro de HMBC (Figura 59) que correlaciona os núcleos N e H é possível observar uma forte interação entre o nitrogênio com deslocamento químico de 189,1 ppm e os hidrogênios da metila (identificados como 17). Essa interação possibilita a identificação desse nitrogênio como sendo N1 uma vez que não seria observada nenhuma interação entre N2 e H17. Além disso, a atribuição do deslocamento químico do N1 é possível quando se compra com valores tabelados. O N1 estabelecendo 3 ligações simples, sendo uma dessas ligações com outro nitrogênio deve apresentar deslocamento químico entre 150 e 190 ppm. Caso o N1 não estivesse ligado a nenhum hidrogênio e estabelecendo uma ligação dupla o sinal deveria apresentar deslocamento químico entre 305 e 375 ppm. Como não foram observados outros sinais nos espectros, é um indício de que os demais nitrogênios não estão ligados a nenhum hidrogênio. Sendo assim, é possível afirmar que o hidrogênio identificado como 1 está ligado ao N1 e não ao N2, como erroneamente apresentado em vários artigos. É importante ressaltar que todas as análises de RMN foram realizadas em DMSO- $d_6$  e que na presença de outros solventes existe a possibilidade de troca de posição do hidrogênio. Alguns desses artigos são citados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Relação de alguns grupos de pesquisa que apresentaram a estrutura correta e a estrutura errada.

<b>Artigos que apresentaram:</b>	<b>Grupo de pesquisa e ano de publicação</b>	<b>Referencia</b>
<b>Estrutura correta</b>	Evans e colaboradores, 2003.	329
	Vasuki e colaboradores, 2008.	284
	Adibi e colaboradores, 2013.	275
	Zhang e colaboradores, 2013.	330
	Jeong e colaboradores, 2014.	288
	Rangappa e colaboradores, 2014.	273
	El-Remaily e colaboradores, 2014.	331
	Ebrahimipour e colaboradores, 2015.	332
<b>Estrutura errada</b>	Kuo e colaboradores, 1992.	281
	Rashad e colaboradores, 2005.	274
	Song e colaboradores, 2006.	283
	Al-Matar e colaboradores, 2010.	286
	Pasha e colaboradores, 2011.	287
	Kiyani e colaboradores 2013.	333
	Paramasivan e colaboradores, 2014.	334
	Tamaddon e colaboradores, 2014.	327
	Shaterian e colaboradores, 2014.	335
	Heravi e colaboradores, 2014.	336
	Maleki e colaboradores, 2016.	337
Kaur e colaboradores, 2017.	279	
Tangeti e colaboradores, 2018.	289	

Após a caracterização do composto, foram realizados experimentos para o estabelecimento da condição experimental ideal dessa MCR. Inicialmente foram feitos testes para a determinação do melhor solvente para a reação. A reação modelo foi preparada sem solvente, com água, etanol e polietilenoglicol. Foram adicionados 2,5 mL dos respectivos solventes em cada uma das reações. A reação foi mantida a 60 °C por 2 horas, utilizando 10 mol% de NaOH como catalisador. Os dados de rendimento foram apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Rendimento obtido por meio da MCR modelo variando o solvente. O tempo reacional foi de 2 h e a temperatura foi de 60 °C utilizando 10 mol% de NaOH como catalisador.

Solvente	Rendimento (%)
Sem solvente	56
Água (H <sub>2</sub> O)	61
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	86
Polietilenoglicol	69

A reação utilizando etanol como solvente apresentou o maior rendimento, por esse motivo esse solvente foi escolhido como sendo o ideal para a metodologia. Em seguida foi realizada a variação da temperatura reacional de 30 a 60 °C de 10 em 10 graus, os dados obtidos foram dispostos na Tabela 8. A reação modelo foi preparada com etanol, 10 mol% de NaOH e com duração de 2h.

**Tabela 8.** Rendimentos obtidos por meio da variação da temperatura da reação. Foram realizadas 5 reações de 30 a 60 °C variando a temperatura 1m 10 °C.

Temperatura (°C)	Rendimento (%)
30	53
40	64
45	74
50	84
60	86

Foi observado um aumento linear do rendimento em relação ao aumento da temperatura até 50 °C. Não houve variação significativa do rendimento ao realizar a reação em 60 °C, sendo assim a temperatura considerada ideal para a reação foi de 50 °C. Também foi realizado o teste da variação do tempo reacional. As reações foram preparadas com etanol, 10 mol% de NaOH, submetidas a uma temperatura de 50 °C e o tempo foi variado de 30 a 120 minutos de 30 em 30 minutos. Os dados obtidos foram dispostos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Rendimentos obtidos por meio da variação do tempo reacional. Foram realizadas 4 reações com tempos de 30 até 120 min. variando de 30 em 30 min.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>30</b>	75
<b>60</b>	85
<b>90</b>	73
<b>120</b>	84

Foi observado que não houve variação significativa dos rendimentos reacionais nos diferentes tempos testados. Sendo assim o menor tempo (30 min.) foi estabelecido como sendo o ideal. Para finalizar, foi feito o teste do catalisador. Foram testados 3 catalisadores com características ácidas ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{HCl}$ ) e três com características básicas (DABCO, trietilamina e  $\text{NaOH}$ ). As reações foram preparadas com etanol, submetidas a uma temperatura de  $50\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min. e 10 mol% de cada um dos respectivos catalisadores testados. Os dados obtidos foram dispostos na Tabela 10.

**Tabela 10.** Rendimentos obtidos por meio da variação do catalisador. Foram testados 5 catalisadores diferentes do  $\text{NaOH}$ , todos com concentração de 10 mol%.

<b>Catalisador</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b><math>\text{CuCl}_2</math></b>	13
<b><math>\text{FeCl}_3</math></b>	Não formou
<b><math>\text{HCl}</math></b>	28
<b>DABCO</b>	75
<b>Trietilamina</b>	67
<b><math>\text{NaOH}</math></b>	87

É possível observar que o maior rendimento reacional foi proporcionado pela utilização de  $\text{NaOH}$  como catalisador. Também foram feitos testes utilizando 5 mol% de  $\text{NaOH}$ , entretanto a massa correspondente a essa quantidade do catalisador é muito pequena (aproximadamente 2 mg) e de difícil pesagem. Sendo assim, foi estabelecido como ideal a utilização de 10 mol% de  $\text{NaOH}$ . Os catalisadores com átomos de metais em sua estrutura apresentaram rendimentos muito insatisfatórios. Isso pode ser atribuído ao fato de os reagentes apresentarem natureza coordenante, o que prejudicaria o curso da reação.

Todos os testes foram realizados em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

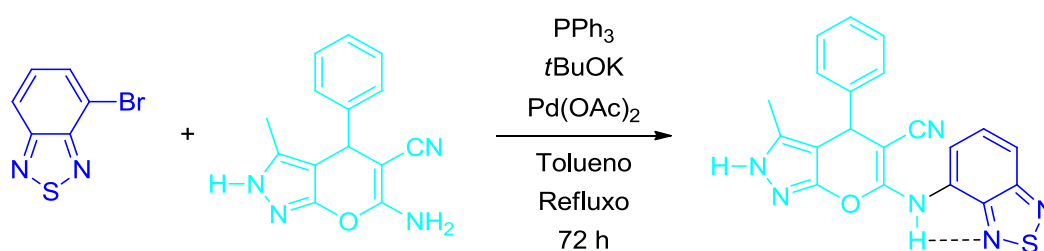
Estabelecida a condição ideal para a síntese, foi elaborada uma proposta de roteiro experimental a nível de graduação para a execução dessa prática no laboratório de ensino em química orgânica (Anexo 2).

# Conclusões & Perspectivas

## Conclusões e Perspectivas

O composto derivado do núcleo PPZ foi sintetizado e caracterizado com sucesso. Todas as técnicas de caracterização utilizadas podem ser apresentadas para os alunos após a prática para que eles possam se familiarizar com esse tipo de informação. A otimização da metodologia possibilitou a obtenção do derivado com um excelente rendimento (aproximadamente 87%).

Como perspectiva tem-se a síntese de outros derivados do PPZ modificando os grupos substituintes do núcleo principal. Além disso, serão realizadas reação de acoplamento desses novos compostos sintetizados ao fluoróforo BTB. Como as moléculas derivadas do PPZ apresentam várias atividades biológicas, espera-se que a junção desse núcleo com a BTB (Esquema 10) promova a obtenção de um fluoróforo com atividade biológica.



**Esquema 11.** Proposta de síntese para futura obtenção de novos fluoróforos derivados dos núcleos BTB e PPZ.

# Referências



## Referências

- (1) Schubert, E. F.; Gessmann, T.; Kim, J. K. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Inc.: 2000.
- (2) Ye, S.; Xiao, F.; Pan, Y. X.; Ma, Y. Y.; Zhang, Q. Y. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2010**, *71*, 1.
- (3) Reineke, S.; Lindner, F.; Schwartz, G.; Seidler, N.; Walzer, K.; Lüssem, B.; Leo, K. *Nature* **2009**, *459*, 234.
- (4) Kulkarni, A. P.; Tonzola, C. J.; Babel, A.; Jenekhe, S. A. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4556.
- (5) Sekitani, T.; Nakajima, H.; Maeda, H.; Fukushima, T.; Aida, T.; Hata, K.; Someya, T. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 494.
- (6) Geffroy, B.; le Roy, P.; Prat, C. *Polym. Int.* **2006**, *55*, 572.
- (7) Zhang, Z.; Guo, K.; Li, Y.; Li, X.; Guan, G.; Li, H.; Luo, Y.; Zhao, F.; Zhang, Q.; Wei, B.; Pei, Q.; Peng, H. *Nature Photonics* **2015**, *9*, 233.
- (8) Armaroli, N.; Accorsi, G.; Holler, M.; Moudam, O.; Nierengarten, J. F.; Zhou, Z.; Wegh, R. T.; Welter, R. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1313.
- (9) Slinker, J. D.; DeFranco, J. A.; Jaquith, M. J.; Silveira, W. R.; Zhong, Y.-W.; Moran-Mirabal, J. M.; Craighead, H. G.; Abruña, H. D.; Marohn, J. A.; Malliaras, G. G. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 894.
- (10) Brancalion, L.; Moseley, H. *Lasers in Medical Science* **2002**, *17*, 173.
- (11) Qian, P.; Asta, J.; Jiyao, C.; Lars, O. S.; Trond, W.; Karl-Erik, G.; Johan, M. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, *71*, 056701.
- (12) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; de Vasconcelos, N. M.; Corrêa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524.
- (13) Hemmer, E.; Benayas, A.; Legare, F.; Vetrone, F. *Nanoscale Horizons* **2016**, *1*, 168.
- (14) Yu, Y.; Feng, C.; Hong, Y.; Liu, J.; Chen, S.; Ng, K. M.; Luo, K. Q.; Tang, B. Z. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3298.
- (15) Hong, Y.; Xiong, H.; Lam, J. W. Y.; Häußler, M.; Liu, J.; Yu, Y.; Zhong, Y.; Sung, H. H. Y.; Williams, I. D.; Wong, K. S.; Tang, B. Z. *Chem.-Eur. J.* **2010**, *16*, 1232.
- (16) Bazylińska, U.; Wawrzyńczyk, D.; Kulbacka, J.; Frąckowiak, R.; Cichy, B.; Bednarkiewicz, A.; Samoć, M.; Wilk, K. A. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29746.
- (17) He, Y.; He, J.; Zhang, H.; Liu, Y.; Lei, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *496*, 8.
- (18) Shishkin, I.; Alon, T.; Dagan, R.; Ginzburg, P. *MRS Advances* **2017**, *2*, 2391.
- (19) Feng, J.; Xiong, L.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. *Adv. Funct. Mat.* **2013**, *23*, 340.
- (20) Vetrone, F.; Naccache, R.; Zamarrón, A.; Juarranz de la Fuente, A.; Sanz-Rodríguez, F.; Martínez Maestro, L.; Martín Rodríguez, E.; Jaque, D.; García Solé, J.; Capobianco, J. A. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3254.
- (21) Jin, X.; Sun, X.; Chen, G.; Ding, L.; Li, Y.; Liu, Z.; Wang, Z.; Pan, W.; Hu, C.; Wang, J. *Carbon* **2015**, *81*, 388.
- (22) Aigner, D.; Ungerböck, B.; Mayr, T.; Saf, R.; Klimant, I.; Borisov, S. M. *Journal of Materials Chemistry. C, Materials for Optical and Electronic Devices* **2013**, *1*, 5685.
- (23) Qi, J.; Liu, D.; Liu, X.; Guan, S.; Shi, F.; Chang, H.; He, H.; Yang, G. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5897.
- (24) Huang, J.; Ying, L.; Yang, X.; Yang, Y.; Quan, K.; Wang, H.; Xie, N.; Ou, M.; Zhou, Q.; Wang, K. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 8724.

- (25) Cui, X.; Wang, Y.; Liu, J.; Yang, Q.; Zhang, B.; Gao, Y.; Wang, Y.; Lu, G. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *242*, 1272.
- (26) Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564.
- (27) Zhang, J.; Cheng, F.; Li, J.; Zhu, J.-J.; Lu, Y. *Nano Today* **2016**, *11*, 309.
- (28) Terai, T.; Nagano, T. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2013**, *465*, 347.
- (29) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 545.
- (30) Weissleder, R.; Mahmood, U. *Radiology* **2001**, *219*, 316.
- (31) Levin, C. S. In *Molecular Imaging Probes for Cancer Research*; WORLD SCIENTIFIC: 2012, p 29.
- (32) Gambhir, S. S. *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 683.
- (33) Weissleder, R. *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 11.
- (34) Weissleder, R. *Science* **2006**, *312*, 1168.
- (35) Carvalho, P. H. P. R. Arquitetura molecular de derivados Benzotiadiazolas para a marcação de mitocôndrias. Dissertação de Mestrado. UnB. Brasília novembro de 2014.
- (36) Wiederschain, G. Y. *Biochemistry (Moscow)* **2011**, *76*, 1276.
- (37) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1560.
- (38) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Vasconcelos, I. B.; Thum, C.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4001.
- (39) da Cruz, E. H. G.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Silva, D. A. C.; Diogo, E. B. T.; de Souza Filho, J. D.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; de Oliveira, H. C. B.; Guido, B. C.; da Silva Filho, D. A.; Neto, B. A. D.; da Silva Junior, E. N. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 2569.
- (40) Shao, Q.; Yang, Y. M.; Xing, B. G. In *Molecular Imaging Probes for Cancer Research*; WORLD SCIENTIFIC: 2012, p 419.
- (41) Hola, K.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Giannelis, E. P.; Zboril, R.; Rogach, A. L. *Nano Today* **2014**, *9*, 590.
- (42) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855.
- (43) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Dupont, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 228.
- (44) Neto, B. A. D.; Lopes, A. S. A.; Ebeling, G.; Goncalves, R. S.; Costa, V. E. U.; Quina, F. H.; Dupont, J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10975.
- (45) Nadler, A.; Schultz, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408.
- (46) Lopes, T. O.; da Silva Filho, D. A.; Lapis, A. A. M.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27*, 303.
- (47) A. R. Mota, A.; R. Corrêa, J.; Lopes, T.; De Oliveira, H.; A. D. Neto, B. *Theoretical Photophysics (DFT) of Fluorescent Benzothiadiazole Probes*, 2015; Vol. 7.
- (48) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Batista, E. L.; Netz, P. A.; Rominger, F.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 967.
- (49) 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001.
- (50) Mota, A. A. R.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; de Sousa, N. M. P.; de Oliveira, H. C. B.; Gatto, C. C.; da Silva Filho, D. A.; de Oliveira, A. L.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2958.
- (51) 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. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3995.
- (52) Reed, M. A. *Sci. Am.* **1993**, *268*, 118.
- (53) Masumoto, Y. Takagahara, T. (2009) *Semiconductor Quantum Dots: Physics, Spectroscopy and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- (54) Dingle, R. In *Festkörperprobleme 15: Plenary Lectures of the Divisions "Semiconductor Physics", "Low Temperature Physics", "Metal Physics" of the German Physical Society Münster, March 17–21, 1975*; Queisser, H. J., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1975, p 21.
- (55) Ekimov, A. I.; Onushchenko, A. A. *Jetp Lett.* **1981**, *34*, 345.
- (56) Chang, L. L.; Esaki, L.; Tsu, R. *Appl. Phys. Lett.* **1974**, *24*, 593.
- (57) Dingle, R.; Wiegmann, W.; Henry, C. H. *Phys. Rev. Lett.* **1974**, *33*, 827.
- (58) Petroff, P. M.; Gossard, A. C.; Logan, R. A.; Wiegmann, W. *Appl. Phys. Lett.* **1982**, *41*, 635.
- (59) Roy, A. K. *Mod. Phys. Lett. A* **2015**, *30*, 1550176.
- (60) Reed, M. A.; Bate, R. T.; Bradshaw, K.; Duncan, W. M.; Frensley, W. R.; Lee, J. W.; Shih, H. D. *Journal of Vacuum Science & Technology B* **1986**, *4*, 358.
- (61) Reed, M. A.; Randall, J. N.; Aggarwal, R. J.; Matyi, R. J.; Moore, T. M.; Wetsel, A. E. *Phys. Rev. Lett.* **1988**, *60*, 535.
- (62) Miller, D. A. B.; Chemla, D. S.; Damen, T. C.; Gossard, A. C.; Wiegmann, W.; Wood, T. H.; Burrus, C. A. *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *53*, 2173.
- (63) Zh, I. A. *Russ. Chem. Rev.* **2013**, *82*, 587.
- (64) Tarucha, S.; Austing, D. G.; Honda, T.; van der Hage, R. J.; Kouwenhoven, L. P. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3613.
- (65) Kastner, M. A. *Phys. Today* **1993**, *46*, 24.
- (66) Rafailov, E. U.; Cataluna, M. A.; Sibbett, W. *Nat Photon* **2007**, *1*, 395.
- (67) Paola, B.; Stephan, S.; Wolfgang, L.; Dieter, B. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **2006**, *8*, S33.
- (68) Borri, P.; Langbein, W. 2011; Vol. 7937, p 793704.
- (69) Frecker, T.; Bailey, D.; Arzeta-Ferrer, X.; McBride, J.; Rosenthal, S. J. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* **2016**, *5*, R3019.
- (70) Kim, N. H.; Jeong, J.; Chae, H. *Applied Science and Convergence Technology* **2016**, *25*, 1.
- (71) Vu Thi Kim, L.; Chu Viet, H.; Le Tien, H.; Nguyen Nhu, D. *Journal of Physics: Conference Series* **2009**, *187*, 012028.
- (72) Wei, C.; Li, J.; Gao, F.; Guo, S.; Zhou, Y.; Zhao, D. *Journal of Spectroscopy* **2015**, *2015*, 7.
- (73) Liu, X.; Jiang, Y.; Wang, C.; Li, S.; Lan, X.; Chen, Y.; Zhong, H. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 2656.
- (74) Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706.
- (75) Lovrić, J.; Cho, S. J.; Winnik, F. M.; Maysinger, D. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1227.
- (76) Hardman, R. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 165.
- (77) Poliandri, A. H. B.; Cabilla, J. P.; Velardez, M. O.; Bodo, C. C. A.; Duvilanski, B. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *190*, 17.
- (78) Contreras, E. Q.; Cho, M.; Zhu, H.; Puppala, H. L.; Escalera, G.; Zhong, W.; Colvin, V. L. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 1148.
- (79) Ambrosone, A.; Mattera, L.; Marchesano, V.; Quarta, A.; Susa, A. S.; Tino, A.; Rogach, A. L.; Tortiglione, C. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1991.
- (80) Chia-Hua, L.; Louis, W. C.; Han, C.; Mo-Hsiung, Y.; Chung-Shi, Y.; Wan-Hau, L.; Wan-Hsuan, C.; Pinpin, L. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 215101.
- (81) Reiss, P.; Bleuse, J.; Pron, A. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 781.
- (82) Zhao, D.; He, Z.; Chan, W. H.; Choi, M. M. F. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 1293.
- (83) Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi, M. G. *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 9463.

- (84) Peng, X.; Schlamp, M. C.; Kadavanich, A. V.; Alivisatos, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7019.
- (85) Kirchner, C.; Liedl, T.; Kudera, S.; Pellegrino, T.; Muñoz Javier, A.; Gaub, H. E.; Stölzle, S.; Fertig, N.; Parak, W. J. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331.
- (86) Geys, J.; Nemmar, A.; Verbeken, E.; Smolders, E.; Ratoi, M.; Hoylaerts, M. F.; Nemery, B.; Hoet, P. H. M. *Environ. Health Perspect.* **2008**, *116*, 1607.
- (87) Peng, L.; He, M.; Chen, B.; Wu, Q.; Zhang, Z.; Pang, D.; Zhu, Y.; Hu, B. *Biomaterials* **2013**, *34*, 9545.
- (88) Kouki, F.; Masaki, H.; Keisuke, S.; Noriyoshi, M.; Ryosuke, M.; Sanshiro, H.; Akiyoshi, H.; Richard, D. T.; Yoshinobu, M.; Kenji, H.; Kenji, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 415102.
- (89) Wang, J. L.; Qiu, J. J. *J. Mater. Sci.* **2016**, *51*, 4728.
- (90) Xu, X. Y.; Ray, R.; Gu, Y. L.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736.
- (91) Sun, Y. P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Pathak, P.; Meziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H. F.; Luo, P. J. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B. L.; Veca, L. M.; Xie, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7756.
- (92) Liu, H. P.; Ye, T.; Mao, C. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6473.
- (93) Baker, S. N.; Baker, G. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6726.
- (94) Hu, S. L. *Chemical Record* **2016**, *16*, 219.
- (95) Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y.; Lee, S.-T. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 24230.
- (96) Wang, Y.; Hu, A. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 6921.
- (97) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Georgakilas, V.; Giannelis, E. P. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4539.
- (98) Hu, S.-L.; Niu, K.-Y.; Sun, J.; Yang, J.; Zhao, N.-Q.; Du, X.-W. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 484.
- (99) Zuo, P. L.; Lu, X. H.; Sun, Z. G.; Guo, Y. H.; He, H. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 519.
- (100) Yang, S.-T.; Cao, L.; Luo, P. G.; Lu, F.; Wang, X.; Wang, H.; Meziani, M. J.; Liu, Y.; Qi, G.; Sun, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11308.
- (101) Shen, J.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3686.
- (102) Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 362.
- (103) Ke, J.; Li, X.; Zhao, Q.; Liu, B.; Liu, S.; Wang, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *496*, 425.
- (104) Jia, X.; Li, J.; Wang, E. *Nanoscale* **2012**, *4*, 5572.
- (105) Zhu, S.; Zhang, J.; Tang, S.; Qiao, C.; Wang, L.; Wang, H.; Liu, X.; Li, B.; Li, Y.; Yu, W.; Wang, X.; Sun, H.; Yang, B. *Adv. Funct. Mat.* **2012**, *22*, 4732.
- (106) Wang, H.; Yi, J.; Yu, Y.; Zhou, S. *Nanoscale* **2017**, *9*, 509.
- (107) Li, X.; Zhang, S.; Kulinich, S. A.; Liu, Y.; Zeng, H. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4976.
- (108) Shen, J.; Zhu, Y.; Chen, C.; Yang, X.; Li, C. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2580.
- (109) Wen, X.; Yu, P.; Toh, Y.-R.; Ma, X.; Tang, J. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4703.
- (110) Sun, Y.-P.; Wang, X.; Lu, F.; Cao, L.; Meziani, M. J.; Luo, P. G.; Gu, L.; Veca, L. M. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18295.
- (111) Zhou, J. G.; Booker, C.; Li, R. Y.; Zhou, X. T.; Sham, T. K.; Sun, X. L.; Ding, Z. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 744.
- (112) Zhou, J.; Booker, C.; Li, R.; Sun, X.; Sham, T.-K.; Ding, Z. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *493*, 296.
- (113) Pan, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Wu, C.; Yan, X.; Wu, M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3681.
- (114) Liu, H.; Ye, T.; Mao, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6473.

- (115) Tian, L.; Ghosh, D.; Chen, W.; Pradhan, S.; Chang, X.; Chen, S. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2803.
- (116) Zhu, H.; Wang, X.; Li, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Yang, X. *Chem. Commun.* **2009**, 5118.
- (117) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. *Small* **2008**, *4*, 455.
- (118) Peng, H.; Travas-Sejdic, J. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 5563.
- (119) Li, H.; He, X.; Liu, Y.; Huang, H.; Lian, S.; Lee, S.-T.; Kang, Z. *Carbon* **2011**, *49*, 605.
- (120) Liu, R.; Wu, D.; Liu, S.; Koynov, K.; Knoll, W.; Li, Q. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4598.
- (121) Dong, X.; Su, Y.; Geng, H.; Li, Z.; Yang, C.; Li, X.; Zhang, Y. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 7477.
- (122) Wang, X.; Qu, K.; Xu, B.; Ren, J.; Qu, X. *Nano Research* **2011**, *4*, 908.
- (123) Tetsuka, H.; Asahi, R.; Nagoya, A.; Okamoto, K.; Tajima, I.; Ohta, R.; Okamoto, A. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 5333.
- (124) Jin, S. H.; Kim, D. H.; Jun, G. H.; Hong, S. H.; Jeon, S. *ACS Nano* **2013**, *7*, 1239.
- (125) Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3953.
- (126) Jiang, K.; Sun, S.; Zhang, L.; Lu, Y.; Wu, A.; Cai, C.; Lin, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 5360.
- (127) Wei, W.; Xu, C.; Wu, L.; Wang, J.; Ren, J.; Qu, X. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3564.
- (128) Hsu, P.-C.; Chen, P.-C.; Ou, C.-M.; Chang, H.-Y.; Chang, H.-T. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1774.
- (129) Hu, L.; Sun, Y.; Li, S.; Wang, X.; Hu, K.; Wang, L.; Liang, X.-j.; Wu, Y. *Carbon* **2014**, *67*, 508.
- (130) Fowley, C.; McCaughan, B.; Devlin, A.; Yildiz, I.; Raymo, F. M.; Callan, J. F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9361.
- (131) Wang, Y.; Anilkumar, P.; Cao, L.; Liu, J.-H.; Luo, P. G.; Tackett, K. N.; Sahu, S.; Wang, P.; Wang, X.; Sun, Y.-P. *Experimental Biology and Medicine* **2011**, *236*, 1231.
- (132) Hsu, P.-C.; Shih, Z.-Y.; Lee, C.-H.; Chang, H.-T. *Green Chem.* **2012**, *14*, 917.
- (133) Yang, Y.; Cui, J.; Zheng, M.; Hu, C.; Tan, S.; Xiao, Y.; Yang, Q.; Liu, Y. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 380.
- (134) Liu, X.; Zhang, N.; Bing, T.; Shangguan, D. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2289.
- (135) Yu, C.; Li, X.; Zeng, F.; Zheng, F.; Wu, S. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 403.
- (136) Li, L.; Rose, P.; Moore, P. K. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2011**, *51*, 169.
- (137) D'Angelis do E. S. Barbosa, C.; Corrêa, J. R.; Medeiros, G. A.; Barreto, G.; Magalhães, K. G.; de Oliveira, A. L.; Spencer, J.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D. *Chem.-Eur. J.* **2015**, *21*, 5055.
- (138) Devi, S.; Kaur, A.; Sarkar, S.; Vohra, S.; Tyagi, S. *Integrated Ferroelectrics* **2018**, *186*, 32.
- (139) Zhi, B.; Gallagher, M. J.; Frank, B. P.; Lyons, T. Y.; Qiu, T. A.; Da, J.; Mensch, A. C.; Hamers, R. J.; Rosenzweig, Z.; Fairbrother, D. H.; Haynes, C. L. *Carbon* **2018**, *129*, 438.
- (140) Szelke, H.; Schubel, S.; Harenberg, J.; Kramer, R. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1667.
- (141) Kong, W.; Liu, R.; Li, H.; Liu, J.; Huang, H.; Liu, Y.; Kang, Z. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5077.
- (142) Hu, Y.; Yang, J.; Tian, J.; Jia, L.; Yu, J.-S. *Carbon* **2014**, *77*, 775.

- (143) Szelke, H.; Schübel, S.; Harenberg, J.; Krämer, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1445.
- (144) Bao, L.; Zhang, Z.-L.; Tian, Z.-Q.; Zhang, L.; Liu, C.; Lin, Y.; Qi, B.; Pang, D.-W. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5801.
- (145) He, Y.; Lu, H.-T.; Sai, L.-M.; Su, Y.-Y.; Hu, M.; Fan, C.-H.; Huang, W.; Wang, L.-H. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3416.
- (146) Eun-Pyo, J.; Woo-Seuk, S.; Ki-Heon, L.; Heesun, Y. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 045607.
- (147) Nani, R. R.; Shaum, J. B.; Gorka, A. P.; Schnermann, M. J. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 302.
- (148) Samanta, A.; Vendrell, M.; Das, R.; Chang, Y.-T. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7406.
- (149) Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *21*, 41.
- (150) Zrazhevskiy, P.; Gao, X. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1619.
- (151) Chen, X.; Peng, X.; Cui, A.; Wang, B.; Wang, L.; Zhang, R. *J. Photochem. Photobiol., A* **2006**, *181*, 79.
- (152) Shi, W.; Li, X.; Ma, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 6432.
- (153) Li, H.; Ming, H.; Liu, Y.; Yu, H.; He, X.; Huang, H.; Pan, K.; Kang, Z.; Lee, S.-T. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 2666.
- (154) Wang, C.; Xu, Z.; Cheng, H.; Lin, H.; Humphrey, M. G.; Zhang, C. *Carbon* **2015**, *82*, 87.
- (155) Mukherjee, S.; Prasad, E.; Chadha, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 7288.
- (156) Liu, W.; Xu, S.; Li, Z.; Liang, R.; Wei, M.; Evans, D. G.; Duan, X. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 5426.
- (157) Feng, J.-f.; Gao, S.-y.; Shi, J.; Liu, T.-f.; Cao, R. *Inorg. Chem.* **2018**.
- (158) Liu, J.; Ren, X.; Yan, Y.; Wang, N.; Wang, S.; Zhang, H.; Li, J.; Yu, J. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2018**, *5*, 139.
- (159) Zhang, Z.; Liu, Y.; Yan, Z.; Chen, J. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *255*, 986.
- (160) Yu, P.; Wen, X.; Toh, Y.-R.; Tang, J. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 25552.
- (161) Lei, B.; Li, W.; Zhang, H.; Wang, J.; Liu, Y.; Zhuang, J.; Chen, S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 89238.
- (162) Zhang, Y.; Yang, M.; Portney, N. G.; Cui, D.; Budak, G.; Ozbay, E.; Ozkan, M.; Ozkan, C. S. *Biomedical Microdevices* **2008**, *10*, 321.
- (163) Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4218.
- (164) Thompson, D. B.; Villaseñor, R.; Dorr, B. M.; Zerial, M.; Liu, D. R. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 831.
- (165) Zhou, N.; Zhu, S.; Maharjan, S.; Hao, Z.; Song, Y.; Zhao, X.; Jiang, Y.; Yang, B.; Lu, L. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 62086.
- (166) Arvizo, R. R.; Miranda, O. R.; Thompson, M. A.; Pabelick, C. M.; Bhattacharya, R.; Robertson, J. D.; Rotello, V. M.; Prakash, Y. S.; Mukherjee, P. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2543.
- (167) Goh, E. J.; Kim, K. S.; Kim, Y. R.; Jung, H. S.; Beack, S.; Kong, W. H.; Scarcelli, G.; Yun, S. H.; Hahn, S. K. *Biomacromol.* **2012**, *13*, 2554.
- (168) Herschel, J. F. W. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1845**, *135*, 143.

- (169) Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, 142, 463.
- (170) Ellinger, P. *Biological Reviews* **1940**, 15, 323.
- (171) H. Coons, A.; J. Creech, H.; Norman Jones, R.; Berliner, E. *The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody*, 1942; Vol. 45.
- (172) Kapuscinski, J. *Biotech. Histochem.* **1995**, 70, 220.
- (173) Latt, S. A.; Stetten, G. *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, 24, 24.
- (174) Miura, T.; Urano, Y.; Tanaka, K.; Nagano, T.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8666.
- (175) Ceresole, M. Production of new red coloring matter. U.S. Patent 377,349, January 31, 1888.
- (176) Green, A. G. *Nature* **1911**, 88, 271.
- (177) Butkevich, A. N.; Mitronova, G. Y.; Sidenstein, S. C.; Klocke, J. L.; Kamin, D.; Meineke, D. N. H.; D'Este, E.; Kraemer, P.-T.; Danzl, J. G.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 3290.
- (178) Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 600.
- (179) Grimm, J. B.; Sung, A. J.; Legant, W. R.; Hulamm, P.; Matlosz, S. M.; Betzig, E.; Lavis, L. D. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1303.
- (180) Gee, K. R.; Sun, W.-C.; Bhalgat, M. K.; Upson, R. H.; Klaubert, D. H.; Latham, K. A.; Haugland, R. P. *Anal. Biochem.* **1999**, 273, 41.
- (181) Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1151.
- (182) Jin, X.; Uttamapinant, C.; Ting, A. Y. *ChemBioChem* **2011**, 12, 65.
- (183) Nizamov, S.; Willig, K. I.; Sednev, M. V.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Chem.-Eur. J.* **2012**, 18, 16339.
- (184) Thompson, V. F.; Saldaña, S.; Cong, J.; Goll, D. E. *Anal. Biochem.* **2000**, 279, 170.
- (185) Martinić, I.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S. *J. Lumin.* **2017**, 189, 19.
- (186) Luo, S.; Zhang, E.; Su, Y.; Cheng, T.; Shi, C. *Biomaterials* **2011**, 32, 7127.
- (187) Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891.
- (188) Waggoner, A. S. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1979**, 8, 47.
- (189) Rye, H. S.; Yue, S.; Wemmer, D. E.; Quesada, M. A.; Haugland, R. P.; Mathies, R. A.; Glazer, A. N. *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 2803.
- (190) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 105.
- (191) Waggoner, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 62.
- (192) Grimm, J. B.; Heckman, L. M.; Lavis, L. D. In *Prog Mol Biol Transl Sci*; Morris, M. C., Ed.; Academic Press: 2013; Vol. 113, p 1.
- (193) Levitus, M.; Ranjit, S. *Cyanine dyes in biophysical research: The photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments*, 2011; Vol. 44.
- (194) Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 76, 385.
- (195) Burke, M. D.; Thompson, S.; Weaver, R. J.; Wolf, C. R.; Mayers, R. T. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 923.
- (196) Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 162.
- (197) Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006**, 62, 11021.
- (198) Greenspan, P.; Fowler, S. D. *J. Lipid Res.* **1985**, 26, 781.
- (199) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, 59, 223.

- (200) Tsien, R. Y. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509.
- (201) Sankaranarayanan, S.; Kellner-Weibel, G.; de la Llera-Moya, M.; Phillips, M. C.; Asztalos, B. F.; Bittman, R.; Rothblat, G. H. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 2332.
- (202) Spangenburg, E. E.; Pratt, S. J. P.; Wohlers, L. M.; Lovering, R. M. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, *2011*, 8.
- (203) Rumin, J.; Bonnefond, H.; Saint-Jean, B.; Rouxel, C.; Sciandra, A.; Bernard, O.; Cadoret, J.-P.; Bougaran, G. *Biotechnology for Biofuels* **2015**, *8*, 42.
- (204) Lin, S.; Struve, W. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 361.
- (205) Amaro, M.; Filipe, H. A. L.; Prates Ramalho, J. P.; Hof, M.; Loura, L. M. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 7042.
- (206) Naylor, B. L.; Picardo, M.; Homan, R.; Pownall, H. J. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *58*, 111.
- (207) Asuncion-Punzalan, E.; Kachel, K.; London, E. *Biochemistry* **1998**, *37*, 4603.
- (208) Prior, A.; Jones, J. T.; Blok, V. C.; Beauchamp, J.; McDermott, L.; Cooper, A.; Kennedy, M. W. *Biochem. J.* **2001**, *356*, 387.
- (209) Davies, J. K.; Thumser, A. E. A.; Wilton, D. C. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16932.
- (210) Morgan, C. G.; Hudson, B.; Wolber, P. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77*, 26.
- (211) Narayanaswami, V.; McNamee, M. G. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12420.
- (212) Ben-Yashar, V.; Barenholz, Y. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *60*, 1.
- (213) Kennedy, M. W.; Scott, J. C.; Lo, S.; Beauchamp, J.; McManus, D. P. *Biochem. J.* **2000**, *349*, 377.
- (214) Frolov, A.; Miller, K.; Billheimer, J. T.; Cho, T.-H.; Schroeder, F. *Lipids* **1997**, *32*, 1201.
- (215) Cadigan, K. M.; Chang, C. C.; Chang, T. Y. *The Journal of Cell Biology* **1989**, *108*, 2201.
- (216) Deye, J. F.; Berger, T. A.; Anderson, A. G. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 615.
- (217) Greenspan, P.; Mayer, E. P.; Fowler, S. D. *The Journal of Cell Biology* **1985**, *100*, 965.
- (218) Finkelstein, J.; Heemels, M.-T.; Shadan, S.; Weiss, U. *Nature* **2014**, *510*, 47.
- (219) Holthuis, J. C. M.; Menon, A. K. *Nature* **2014**, *510*, 48.
- (220) Maceyka, M.; Spiegel, S. *Nature* **2014**, *510*, 58.
- (221) Spiegel, S.; Milstien, S. *Nature Reviews. Immunology* **2011**, *11*, 403.
- (222) Peirce, V.; Carobbio, S.; Vidal-Puig, A. *Nature* **2014**, *510*, 76.
- (223) Fernandes Filho, J.; Shapiro, B. E. *Archives of Neurology* **2004**, *61*, 1466.
- (224) Platt, F. M. *Nature* **2014**, *510*, 68.
- (225) Krishnamoorthy, S.; Honn, K. V. In *Lipids in Health and Disease*; Quinn, P. J., Wang, X., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008, p 145.
- (226) Adibhatla, R. M.; Hatcher, J. F. In *Lipids in Health and Disease*; Quinn, P. J., Wang, X., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008, p 241.
- (227) Chi, C.; Mikhailovsky, A.; Bazan, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11134.
- (228) Oliveira, F. F. D.; Santos, D. C. B. D.; Lapis, A. A. M.; Corrêa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001.
- (229) Yadav, D. K.; Rai, R.; Kumar, N.; Singh, S.; Misra, S.; Sharma, P.; Shaw, P.; Pérez-Sánchez, H.; Mancera, R. L.; Choi, E. H.; Kim, M.-h.; Pratap, R. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38128.
- (230) Dubé, D.; Blouin, M.; Brideau, C.; Chan, C.-C.; Desmarais, S.; Ethier, D.; Falguyret, J.-P.; Friesen, R. W.; Girard, M.; Girard, Y.; Guay, J.; Riendeau, D.; Tagari, P.; Young, R. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1255.



- (231) Kidwai, M.; Bhushan, K. R.; Sapra, P.; Saxena, R. K.; Gupta, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 69.
- (232) Naik, H. R. P.; Naik, H. S. B.; Naik, T. R. R.; Naika, H. R.; Gouthamchandra, K.; Mahmood, R.; Ahamed, B. M. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 981.
- (233) Raynes, K. *International Journal for Parasitology* **1999**, *29*, 367.
- (234) Chauhan, P. M. S.; Sanjay, K. S. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1535.
- (235) Tewari, S.; Chauhan, P. M. S.; Bhaduri, A. P.; Fatima, N.; Chatterjee, R. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1409.
- (236) de Souza, I. O. P.; Schrekker, C. M. L.; Lopes, W.; Orru, R. V. A.; Hranjec, M.; Perin, N.; Machado, M.; Oliveira, L. F.; Donato, R. K.; Stefani, V.; Fuentesfria, A. M.; Schrekker, H. S. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2016**, *163*, 319.
- (237) Dave, S. S.; Rahatgaonkar, A. M. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, *9*, S451.
- (238) Musonda, C. C.; Little, S.; Yardley, V.; Chibale, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4733.
- (239) Bray, P. G.; Hawley, S. R.; Ward, S. A. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 1551.
- (240) Strekowski, L.; Mokrosz, J. L.; Honkan, V. A.; Czarny, A.; Cegla, M. T.; Wydra, R. L.; Patterson, S. E.; Schinazi, R. F. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1739.
- (241) Shi, Z.; Han, Q.; Yang, L.; Yang, H.; Tang, X.; Dou, W.; Li, Z.; Zhang, Y.; Shao, Y.; Guan, L.; Liu, W. *Chem.-Eur. J.* **2015**, *21*, 290.
- (242) Li, P.; Zhou, X.; Huang, R.; Yang, L.; Tang, X.; Dou, W.; Zhao, Q.; Liu, W. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 706.
- (243) Wang, J.; Zong, Q. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *216*, 572.
- (244) Kumar, H.; Devaraji, V.; Prasath, R.; Jadhao, M.; Joshi, R.; Bhavana, P.; Ghosh, S. K. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *151*, 605.
- (245) Kwon, S.; Kwon, D. I.; Jung, Y.; Kim, J. H.; Lee, Y.; Lim, B.; Kim, I.; Lee, J. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *252*, 340.
- (246) Czaplinska, B.; Maron, A.; Malecki, J. G.; Szafraniec-Gorol, G.; Matussek, M.; Malarz, K.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Danikiewicz, W.; Musiol, R.; Slodek, A. *Dyes Pigment.* **2017**, *144*, 119.
- (247) Thigulla, Y.; Akula, M.; Trivedi, P.; Ghosh, B.; Jha, M.; Bhattacharya, A. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 876.
- (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. Wallingford CT, 2009.
- (249) Fonseca, T. L.; de Oliveira, H. C. B.; Castro, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *457*, 119.
- (250) Marana, N. L.; Longo, V. M.; Longo, E.; Martins, J. B. L.; Sambrano, J. R. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 8958.
- (251) Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117.

- (252) Cammi, R.; Tomasi, J. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1449.
- (253) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999.
- (254) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
- (255) Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 73.
- (256) Deshayes, S.; Divita, G. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2013**, *113*, 109.
- (257) Pathak, A.; Justin Thomas, K. R.; Singh, M.; Jou, J.-H. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 11512.
- (258) Wu, J.; Lai, G.; Li, Z.; Lu, Y.; Leng, T.; Shen, Y.; Wang, C. *Dyes Pigment.* **2016**, *124*, 268.
- (259) Westrup, J. L.; Oenning, L. W.; da Silva Paula, M. M.; da Costa Duarte, R.; Rodembusch, F. S.; Frizon, T. E. A.; da Silva, L.; Dal-Bó, A. G. *Dyes Pigment.* **2016**, *126*, 209.
- (260) Bardi, B.; Dall'Agnes, C.; Moineau-Chane Ching, K. I.; Painelli, A.; Terenziani, F. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 17466.
- (261) Lee, K.; Kunjappu, J.; Jockusch, S.; Turro, N. J.; Widerschpan, T.; Zhou, J.; Smith, B. W.; Zimmerman, P.; Conley, W. In *Microlithography 2005*; SPIE: 2005; Vol. 5753, p 17.
- (262) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. *Nature methods* **2012**, *9*, 10.1038/nmeth.2019.
- (263) Hulme, S. E.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 4774.
- (264) Hellerer, T.; Axaeng, C.; Brackmann, C.; Hillertz, P.; Pilon, M.; Enejder, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 14658.
- (265) Goel, A.; Sharma, A.; Kathuria, M.; Bhattacharjee, A.; Verma, A.; Mishra, P. R.; Nazir, A.; Mitra, K. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 756.
- (266) Yen, K.; Le, T. T.; Bansal, A.; Narasimhan, D.; Cheng, J.-X.; Tissenbaum, H. A. *Plos One* **2010**, *5*, e12810.
- (267) Wree, A.; Kahraman, A.; Gerken, G.; Canbay, A. *Digestion* **2011**, *83*, 124.
- (268) Lounis, M. A.; Lalonde, S.; Rial, S. A.; Bergeron, K.-F.; Ralston, J. C.; Mutch, D. M.; Mounier, C. *Lipids* **2017**, *52*, 129.
- (269) Dechandt, C. R. P.; Zuccolotto-dos-Reis, F. H.; Teodoro, B. G.; Fernandes, A. M. A. P.; Eberlin, M. N.; Kettelhut, I. C.; Curti, C.; Alberici, L. C. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2017**, *49*, 399.
- (270) Wobser, H.; Dorn, C.; Weiss, T. S.; Amann, T.; Bollheimer, C.; Buettner, R.; Schoelmerich, J.; Hellerbrand, C. *Cell Res.* **2009**, *19*, 996.
- (271) Lagrutta, L. C.; Montero-Villegas, S.; Layerenza, J. P.; Sisti, M. S.; Garcia de Bravo, M. M.; Ves-Losada, A. *Plos One* **2017**, *12*, e0170608.
- (272) Cortez-Pinto, H.; Lin, H. Z.; Yang, S. Q.; Da Costa, S. O.; Diehl, A. M. *Gastroenterology* **1999**, *116*, 1184.
- (273) Swaroop, T. R.; Kumar, K. S. S.; Palanivelu, M.; Chaitanya, S.; Rangappa, K. S. *J. Heterocycl. Chem.* **2014**, *51*, 1866.
- (274) Zaki, M.; Soliman, H.; A Hiekal, O.; Rashad, A. *Pyrazolopyranopyrimidines as a Class of Anti-Inflammatory Agents*, 2006; Vol. 61.
- (275) Hosseinzadeh, L.; Adibia, H.; Hosseinzadeha, L.; Farhadib, S.; Ahmadi, F. *Synthesis and Cytotoxic Evaluation of 6-Amino-4-Aryl-3-Methyl-2,4-Dihydropyrano[2,3-C]Pyrazole-Carbonitrile Derivatives Using Borax with Potential Anticancer Effects*, 2013; Vol. 2.
- (276) Abdelrazek, F. M.; Metz, P.; Kataeva, O.; Jäger, A.; El-Mahrouky, S. F. *Archiv der Pharmazie* **2007**, *340*, 543.

- (277) Kuo, S. C.; Huang, L. J.; Nakamura, H. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 539.
- (278) Foloppe, N.; Fisher, L. M.; Howes, R.; Potter, A.; Robertson, A. G. S.; Surgenor, A. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4792.
- (279) Kaur, M.; Sohal, H. *SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL STUDIES OF NEW PYRANOPYRAZOLE BASED BENZOXAZOLE DERIVATIVES*, 2017; Vol. 9.
- (280) Turan-Zitouni, G.; Chevillet, P.; Kiliç, F. S.; Erol, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 635.
- (281) Huang, L.-J.; Hour, M.-J.; Teng, C.-M.; Kuo, S.-C. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1992**, *40*, 2547.
- (282) Shestopalov, A. M.; Emeliyanova, Y. M.; Shestopalov, A. A.; Rodinovskaya, L. A.; Niazimbetova, Z. I.; Evans, D. H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7491.
- (283) Peng, Y.; Song, G.; Dou, R. *Green Chem.* **2006**, *8*, 573.
- (284) Vasuki, G.; Kumaravel, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5636.
- (285) Alvim, H. G. O.; da Silva Junior, E. N.; Neto, B. A. D. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 54282.
- (286) Al-Matar, H. M.; Khalil, K. D.; Adam, A. Y.; Elnagdi, M. H. *Molecules* **2010**, *15*, 6619.
- (287) Siddekha, A.; Nizam, A.; Pasha, M. A. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *81*, 431.
- (288) Atar, A. B.; Kim, J. T.; Lim, K. T.; Jeong, Y. T. *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2679.
- (289) Tangeti, V. S.; Babu, K. R.; Siva Prasad, G. V.; Ramu, T.; Venkata Rao, C. J. *Iran Chem. Soc.* **2018**, *15*, 823.
- (290) Dömling, A.; Wang, W.; Wang, K. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3083.
- (291) Isambert, N.; Duque, M. d. M. S.; Plaquevent, J.-C.; Genisson, Y.; Rodriguez, J.; Constantieux, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1347.
- (292) Singh, M. S.; Chowdhury, S. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 4547.
- (293) Simon, C.; Constantieux, T.; Rodriguez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 4957.
- (294) Cioc, R. C.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2958.
- (295) Siva, S. P.; Pankaj, K.; Leena, K. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 507.
- (296) Strübing, D.; Neumann, H.; Klaus, S.; Hübner, S.; Beller, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11333.
- (297) Alvim, H. G. O. REAÇÕES MULTICOMPONENTES: INVESTIGAÇÕES MECANÍSTICAS, ATIVIDADE BIOLÓGICA E BIOIMAGEAMENTO. Tese de Doutorado. UnB. Brasília agosto de 2017.
- (298) Biggs-Houck, J. E.; Younai, A.; Shaw, J. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 371.
- (299) Gu, Y. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2091.
- (300) Kumaravel, K.; Vasuki, G. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1820.
- (301) Ruijter, E.; Orru, R. V. A. *Drug Discovery Today: Technologies* **2013**, *10*, e15.
- (302) Koszytkowska-Stawińska, M.; Buchowicz, W. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1706.
- (303) Teague, S. J.; Davis, A. M.; Leeson, P. D.; Oprea, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 3743.
- (304) Zarganes-Tzitzikas, T.; Domling, A. *Organic Chemistry Frontiers* **2014**, *1*, 834.
- (305) Christopher, H.; Vijay, G. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 51.
- (306) Slobbe, P.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1189.
- (307) Lutz, W. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2085.
- (308) Hall, D. G.; Rybak, T.; Verdelet, T. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 2489.
- (309) Strecker, A. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1850**, *75*, 27.
- (310) Merino, P.; Marqués-López, E.; Tejero, T.; Herrera, R. P. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1219.

- (311) Wang, J.; Liu, X.; Feng, X. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6947.
- (312) Hantzsch, A. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1881**, *14*, 1637.
- (313) Ugi, I.; Dömling, A.; Hörl, W. *Endeavour* **1994**, *18*, 115.
- (314) Papeo, G.; Pulici, M. *Molecules* **2013**, *18*, 10870.
- (315) Biginelli, P. *Gazz. Chim. Ital.* 1891, *21*, 337.
- (316) Ugi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1959**, *71*, 386.
- (317) Wender, P. A.; Verma, V. A.; Paxton, T. J.; Pillow, T. H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 40.
- (318) Giordan, M. *Quím. Nova na Esc.*, 1999, *10*, 43.
- (319) Duita, R.; Teschb, M. On the role of the experiment in science teaching and learning – Visions and the reality of instructional practice. Proceeding of the 7th International Conference on Hands-on Science. 23-31 July, 2010, Rethymno – Crete, p 17-30.
- (320) Gabel, D. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 548.
- (321) Talanquer, V. *International Journal of Science Education* **2011**, *33*, 179.
- (322) Teruya, L. C.; Marson, G. A.; Ferreira, C. R.; Arroio, A. *Química Nova* 2013, *36*, 561
- (323) Johnstone, A. H. *International Journal of Science Education* **2009**, *31*, 2271.
- (324) Johnstone, A. Macro and microchemistry. *The School Science Review*, v. 64, n. 227, p. 377-379, 1982.
- (325) Köller, H.; Olufsen, M.; Stojanovska, M.; Petruševski, V. Practical Work in Chemistry, its goals and effects. November, 2015
- (326) Hofstein, A.; Lunetta, V. N. *Review of Educational Research* **1982**, *52*, 201.
- (327) Tamaddon, F.; Alizadeh, M. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3588.
- (328) Reddy, M. B. M.; Jayashankara, V. P.; Pasha, M. A. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 2930.
- (329) Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Tyler, P. C.; Schramm, V. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3639.
- (330) Guo, R.-Y.; An, Z.-M.; Mo, L.-P.; Yang, S.-T.; Liu, H.-X.; Wang, S.-X.; Zhang, Z.-H. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 9931.
- (331) El-Remaily, M. A. E. A. A. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2971.
- (332) Ebrahimipour, S. Y.; Ranjabr, Z. R.; Kermani, E. T.; Amiri, B. P.; Rudbari, H. A.; Saccá, A.; Hoseinzade, F. *Trans. Met. Chem.* **2015**, *40*, 39.
- (333) Kiyani, H., Samimi, H., Ghorbani, F & Esmaili, S. *Current Chemistry Letters*, 2013, *2*(4), 197-206.
- (334) Jayabal, K.; Paramasivan, T. P. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2010.
- (335) Shaterian, H. R.; Kangani, M. *Res. Chem. Interm.* **2014**, *40*, 1997.
- (336) Heravi, M. M.; Mousavizadeh, F.; Ghobadi, N.; Tajbakhsh, M. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 1226.
- (337) Maleki, B.; Nasiri, N.; Tayebee, R.; Khojastehnezhad, A.; Akhlaghi, H. A. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 79128.

# Anexos

## Anexo 1:

Dados dos cálculos teóricos realizados.

**Tabela 11.** Dados teóricos calculados para a **BTD-QN** obtidos empregando correlação de troca (XC) de diferentes funções (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE,  $\omega$ B97XD) combinados com o conjunto de bases de valência dividida de Pople 6-311+g(2d, p). Todos os resultados foram obtidos usando as geometrias totalmente otimizadas no nível de cálculo CAM-B3LYP/6-311g(d, p).

XC	$\mu(\text{D})$		HOMO(eV)		LUMO(eV)		$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}(\text{eV})$	
	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água
<b>B3LYP</b>	11.58	16.38	-5.51	-5.59	-2.41	-2.56	3.10	3.03
<b>CAM-B3LYP</b>	9.62	13.52	-6.74	-6.83	-1.30	-1.45	5.44	4.14
<b>M062X</b>	9.43	13.16	-6.22	-6.75	-1.52	-1.68	4.70	3.91
<b>PBE1PBE</b>	11.24	15.84	-5.69	-5.80	-2.27	-2.43	3.42	3.16
<b><math>\omega</math>B97XD</b>	9.15	12.87	-7.28	-7.39	-0.68	-0.84	6.60	4.75

**Tabela 12.** Propriedades de absorção calculadas para a **BTD-QN** por meio de TD-DFT obtidas empregando correlação de troca (XC) de diferentes funções (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE,  $\omega$ B97XD) combinados com o conjunto de bases de valência dividida de Pople 6-311+g(2d, p). Todos os resultados foram obtidos usando as geometrias totalmente otimizadas no nível de cálculo CAM-B3LYP/6-311g(d, p).

<i>XC</i>		<b>Orbital Composition (Major contributions)</b>	<b>Oscillator Strength</b>	<b>Wavelength (nm)</b>
<b>B3LYP</b>	<b>Gás</b>	HOMO → LUMO (98.8%)	0.18	474.39
	<b>Água</b>	HOMO → LUMO (99.4%)	0.29	508.10
<b>CAM- B3LYP</b>	<b>Gás</b>	HOMO → LUMO (93.8%)	0.27	396.60
	<b>Água</b>	HOMO → LUMO (92.6%)	0.42	419.83
<b>M062X</b>	<b>Gás</b>	HOMO → LUMO (95.3%)	0.29	391.48
	<b>Água</b>	HOMO → LUMO (94.3%)	0.45	412.27
<b>PBE1PBE</b>	<b>Gás</b>	HOMO → LUMO (98.7%)	0.20	452.91
	<b>Água</b>	HOMO → LUMO (99.0%)	0.32	482.89
<b><math>\omega</math>B97XD</b>	<b>Gás</b>	HOMO → LUMO (91.7%)	0.29	388.85
	<b>Água</b>	HOMO → LUMO (90.4%)	0.44	410.89

**Coordenadas cartesianas, correções térmicas e energéticas para BTD-QN****Fase gasosa**

C	-4.9885290	5.2719130	-1.2418160
C	-3.7939000	5.1609330	-2.0050640
C	-2.5350320	5.5561400	-1.4344550
C	-2.4467950	6.0670470	-0.0897370
C	-3.6241470	6.1348010	0.6094800
C	-4.8674190	5.7431210	0.0259010
H	-5.9360010	4.9802620	-1.6719330
H	-3.6316860	6.4527840	1.6395010
H	-5.7526580	5.8286460	0.6452720
N	-3.6724140	4.7096110	-3.2475740
N	-1.5057390	5.3933650	-2.2484840
S	-2.0954860	4.7831040	-3.6373720
H	-0.4211010	6.0291180	-0.2295240
C	-0.7433290	7.0623870	1.4595550
C	-1.5054240	7.8520770	2.2904950
C	0.6649640	6.9445540	1.7287780
C	-0.9261170	8.4999120	3.4013510
H	-2.5504390	8.0181970	2.0830740
C	1.2265670	7.6009400	2.8465720
C	0.4007170	8.3799360	3.6922720
H	-1.5637950	9.1102050	4.0297830



---

C	2.6149650	7.4395540	3.0504470
C	2.6870180	6.0831690	1.0881740
H	0.8352300	8.8776450	4.5506520
C	3.3458350	6.6842770	2.1789350
H	3.0843370	7.9241750	3.8993730
H	3.2470630	5.4841110	0.3762160
H	4.4113430	6.5440320	2.3083890
N	-1.1821080	6.3920140	0.3367120
N	1.4029730	6.2036630	0.8699340

**Água como solvente**

C	-4.9856870	5.2623090	-1.2507930
C	-3.7850150	5.1429300	-2.0027200
C	-2.5320090	5.5492730	-1.4296700
C	-2.4539300	6.0796020	-0.0915990
C	-3.6372340	6.1589150	0.5976200
C	-4.8750830	5.7558310	0.0108200
H	-5.9317950	4.9630310	-1.6794180
H	-3.6589240	6.5006560	1.6195600
H	-5.7647820	5.8515910	0.6217710
N	-3.6507350	4.6750930	-3.2398210
N	-1.4972180	5.3786190	-2.2373360
S	-2.0716870	4.7484570	-3.6228540

---

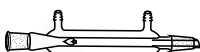
H	-0.4302400	6.0469770	-0.2253140
C	-0.7485400	7.0733640	1.4665270
C	-1.5074970	7.8536240	2.3086190
C	0.6610250	6.9504100	1.7263390
C	-0.9222940	8.4906840	3.4241290
H	-2.5550980	8.0196820	2.1148380
C	1.2287250	7.5966610	2.8467760
C	0.4071960	8.3683440	3.7047500
H	-1.5575110	9.0927090	4.0625480
C	2.6188750	7.4345130	3.0452410
C	2.6832150	6.0925700	1.0720090
H	0.8478560	8.8573400	4.5648170
C	3.3460500	6.6857500	2.1646790
H	3.0915010	7.9122440	3.8957850
H	3.2437240	5.4991780	0.3561990
H	4.4116580	6.5438800	2.2879140
N	-1.1920990	6.4131740	0.3358870
N	1.3964470	6.2142820	0.8576030

**Anexo 2:****Roteiro Experimental****Materiais:**

- Balão de fundo redondo de 25 mL (ou Schilenck selado);



- Condensador;



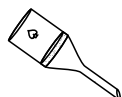
- Espátula;



- Barra de agitação magnética;



- Funil de Buchner;



- Papel filtro;

- Kitassato;



- Placa de Petri;



- Proveta;



- Pipeta Pasteur.

**Reagentes:**

- Acetoacetato de etila;

- Hidróxido de sódio;

- Benzaldeído

- Etanol;

- Hidrato de hidrazina

- Acetato de etila;

- Malononitrila;

- Éter de petróleo;

**Equipamentos:**

- Balança analítica;

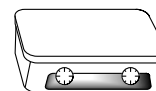


- Estufa;



- Sistema de vácuo para filtragem;

- Placa de aquecimento e agitação.

**Procedimento**

Para calcular a quantidade de que deverá ser pesada de cada reagente e do catalisador encontre primeiramente suas respectivas massas molares. De posse dessas informações:

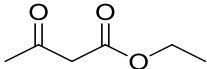
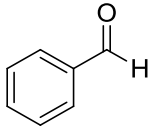
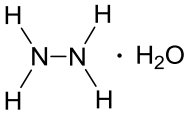
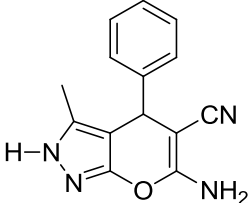
1. Ajuste a temperatura de aquecimento da placa para que o banho (de terra ou silicone) atinja a temperatura de 50 °C.
2. Em seguida pese e anote a massa correspondente a 1 mmol de cada um dos seguintes reagentes: acetoacetato de etila, benzaldeído, hidrato de hidrazina e malononitrila.

3. Transfira-os para o recipiente reacional (balão de fundo redondo de 25 mL ou Schlenck selado).

4. Pese o correspondente a 10 mol% de NaOH e em seguida transfira para o recipiente reacional. Essa etapa deve ser realizada com rapidez, pois o NaOH é higroscópico e em contato com o ambiente absorve água com facilidade, dificultando o processo de pesagem.

5. Adicione 2,5 mL de etanol, a barra de agitação magnética, feche o sistema e introduza o recipiente reacional no banho previamente aquecido. Caso seja utilizado o balão de fundo redondo, é necessário acoplar um condensador à boca do balão e fechar o sistema com um septo.

6. Preencha a tabela com as informações pedidas.

Reagente	MM (g.mol <sup>-1</sup> )	mmol	m (g)	v (mL)	Informações toxicológicas
				---	
				---	
NC-CH2-CN				---	
				---	
<b>NaOH</b>				---	
<b>Etanol</b>		---	---		
				---	

7. Após 30 min retire o recipiente reacional do aquecimento.

8. Prepare 10 mL de uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila (8:2). Em seguida adicione a mistura de solventes no recipiente reacional. \*É importante que a mistura reacional já esteja fria.
9. Separe o sólido precipitado por meio de uma filtração a vácuo. Para isso corte e anote a massa do papel que será utilizado na filtração. Em seguida encaixe-o no funil de Buchner. Posicione o funil em cima do kitassato com a borracha de vedação e conecte a mangueira com a saída de vácuo ao kitassato.
10. Molhe o papel com etanol gelado e adicione lentamente a mistura reacional ao kitassato. Deixe a amostra secar totalmente e depois remova o papel filtro com o sólido obtido em uma placa de Petri.
11. Leve a placa de Petri para uma estufa aquecida a 40 °C e deixe a amostra secando até a aula seguinte. Após secagem, pese o produto obtido, desconte a massa do papel filtro e calcule o rendimento da reação.



**Disposição dos resíduos:** Os resíduos gerados no processo de filtragem devem ser coletados em um frasco específico designado pelo técnico, pois serão encaminhadas para tratamento.

#### **Perguntas:**

1. Com base em conhecimentos prévios e na literatura, sugira um mecanismo plausível para a reação.
2. Defina o que é uma reação multicomponente e com base na reação previamente realizada demonstre as vantagens em utilizar esse tipo de metodologia.
3. Porque mudanças nas condições experimentais afetam o rendimento reacional?