



**UnB**

Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**Bioimageamento in vitro e in vivo com um Sensor Fluorescente  
Derivado do Núcleo Benzotiadiazola Seletivo para Hidrazina**

CAMILA DE OLIVEIRA SANTOS

Prof. Dr. BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO  
(Orientador)

Prof. Dr. MARCELO OLIVEIRA RODRIGUES  
(Coorientador)

Brasília, DF  
2023



**UnB**

Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**Bioimageamento in vitro e in vivo com um Sensor Fluorescente  
Derivado do Núcleo Benzotiadiazola Seletivo para Hidrazina**

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

CAMILA DE OLIVEIRA SANTOS

BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO

(Orientador)

Prof. Dr. MARCELO OLIVEIRA RODRIGUES

(Coorientador)

Brasília, DF

2023

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

Salmo 46, V 10

## Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me agraciado com filhos incríveis, que me inspiram a buscar sempre o melhor e que são minha motivação diária para enfrentar os desafios da vida. Agradeço também a meu marido, que sempre me apoiou e encorajou, sendo meu companheiro nesses últimos anos.

Ao meu pai, por sempre me incentivar a seguir meus sonhos. E à minha mãe, que infelizmente não está mais presente fisicamente, mas que sempre será minha inspiração, por ser meu eterno exemplo de dedicação e resiliência. Sua memória sempre estará presente em meu coração.

Aos meus amigos e colegas de estudo, que me acompanharam nesta jornada e compartilharam comigo suas ideias e conhecimentos. Agradeço também aos professores e orientadores, que me guiaram com sabedoria e paciência. Especialmente ao professor Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto pela oportunidade e orientação deste trabalho, pela paciência, respeito, amizade, motivação e compreensão dedicados a mim. Ao meu coorientador o professor Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues o meu muito obrigada por todo o suporte oferecido. Agradeço, igualmente aos dois pelos momentos de aprendizado e oportunidade de pesquisa.

Por fim, agradeço à UnB e ao Instituto de Química (IQ-UnB), que me proporcionou as condições necessárias para desenvolver este trabalho e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos. Espero que este trabalho possa contribuir e inspirar outros pesquisadores a continuarem explorando novas possibilidades.

## Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado à minha mãe, que infelizmente não está mais presente fisicamente, mas que sempre estará comigo aonde quer que eu vá.

Mãe, você sempre foi minha maior incentivadora. Seu amor incondicional e sua força foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Você sempre acreditou em mim e me deu coragem me estimulando a enfrentar os desafios da vida.

Mesmo não estando mais presente ao meu lado, sei que você está olhando por mim lá do céu e que sua sabedoria e sua proteção continuam a me acompanhar. Sua memória sempre será uma inspiração para mim e me motivará a seguir em frente, mesmo diante das dificuldades.

Agradeço por todos os momentos que compartilhamos juntas, pelos conselhos sábios, pelo amor incondicional e por todo o carinho que sempre dedicou a mim.

Te amo pra sempre, mãe.

# Lista de Abreviaturas

BTD	2,1,3-benzotiadiazola
BTD-CHO	4-(7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol)-benzaldeído
BTD-HDZ	((Z)-4-(4-(hidrazinilidenometil)fenil)-7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol
DFT	Teoria de densidade funcional
ESI	Ionização por electrospray
EWG	Grupo retirador de elétrons ( <i>electron withdrawing group</i> )
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
HOMO	Energias do orbital molecular mais alto ocupado
ICT	Transferência de Carga Intramolecular ( <i>Intramolecular Charge Transfer</i> )
LDs	Gota Lipídica ou corpúsculo lipídico ( <i>Lipid droplets</i> )
LOD	Limite de detecção ( <i>limit of detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação ( <i>limit of quantification</i> )
LUMO	Energia do orbital molecular mais baixo desocupado
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NTOs	<i>Natural Transition Orbitals</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TOF	Analisador de tempo de voo ( <i>time of flight</i> )

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Esquemas .....	xi
Resumo .....	xii
Abstract.....	xii
Introdução e Objetivos.....	1
Objetivos Gerais .....	6
Objetivos Específicos .....	6
Capítulo 2 .....	8
Parte Experimental .....	8
Capítulo 3 .....	18
Resultados e discussão .....	18
Capítulo 4 .....	49
Conclusão e Perspectivas.....	49
Capítulo 5 .....	51
Referências Bibliográficas.....	51

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Exemplos de sensores de hidrazina mostrando suas cores emissivas. ....	4
<b>Figura 2.</b> $^1\text{H}$ RMN (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do sensor denominado <b>BTD-CHO</b> . ....	21
<b>Figura 3.</b> $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do sensor denominado <b>BTD-CHO</b> . ....	22
<b>Figura 4.</b> $^1\text{H}$ RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do corante denominado <b>BTD-HZN</b> . ....	22
<b>Figura 5.</b> $^{13}\text{C}$ RMN (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do corante denominado <b>BTD-HZN</b> . ....	23
<b>Figura 6.</b> ESI(+)-MS/MS do <b>BTD-CHO</b> protonado ( $m/z$ 347). Calculado para $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$ , 347,0854. Encontrado, 347,0846. Erro = -2,3 ppm. ....	23
<b>Figura 7.</b> ESI(+)-MS/MS do <b>BTD-HZN</b> protonado ( $m/z$ 361). Calculado para $[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}+\text{H}]^+$ , 361,1123. Encontrado, 361,1153. Erro = 6,9 ppm. ....	24
<b>Figura 8.</b> UV-Vis (esquerda), fluorescência (centro) e efeito solvatocrômico (parâmetros de Reichardt, direita) dos BTDs sintetizados ( <b>BTD-CHO</b> e <b>BTD-HZN</b> ). 10 $\mu\text{M}$ para todas as análises. ....	24
<b>Figura 9.</b> Fotoestabilidade dos corantes sintetizados (10 $\mu\text{M}$ ) adquiridos à temperatura ambiente mediante excitação a 254 nm enquanto monitora a emissão nos máximos de emissão de cada molécula em soluções aquosas. A dependência do tempo da intensidade da fotoluminescência foi realizada com uma lâmpada Xe (400 W). (Esquerda) <b>BTD-HZN</b> (Direita) <b>BTD-CHO</b> . ....	26
<b>Figura 10.</b> Efeito do pH sobre a emissão de fluorescência dos corantes <b>BTD-CHO</b> (preto) e <b>BTD-HZN</b> (vermelho). Concentração: 10 $\mu\text{M}$ . ....	26
<b>Figura 11.</b> <b>BTD-CHO</b> (10 $\mu\text{M}$ ) antes e depois da adição de SDS (CMC = 8 mM). A iluminação na intensidade de emissão do corante é 11 vezes maior quando comparada com a emissão na ausência de SDS. ....	27
<b>Figura 12.</b> <b>BTD-CHO</b> (10 $\mu\text{M}$ ) em soluções de tampão fosfato (pH = 7,0) antes e depois da adição de hidrazina (0-120 $\mu\text{M}$ ). A reação foi rápida, como esperado, e em poucos min notou-se o consumo total do corante resultando em <b>BTD-HZN</b> . (Esquerda) Adição de hidrazina (10 $\mu\text{M}$ ) e monitoramento rápido do consumo de <b>BTD-CHO</b> por um período de dez min. (Centro) Aumento da fluorescência após a adição do analito (hidrazina). (Direita) Intensidade de fluorescência em função da concentração do analito. Comprimento de onda de excitação a 340 nm ....	28
<b>Figura 13.</b> <b>BTD-CHO</b> (10 $\mu\text{M}$ ) em soluções de tampão fosfato (pH = 7,0) na presença de ambas as espécies interferentes (1 e 10 equivalentes, respectivamente) e hidrazina (10 $\mu\text{M}$ ). Observe que independente da presença de outros analitos, a formação de <b>BTD-HZN</b> é sempre favorecida e rápida. Comprimento de onda de excitação em 340 nm e monitoramento em 375 nm. ....	29
<b>Figura 14.</b> Curva de calibração (UV-Vis) de três experimentos independentes monitorados a 375 nm durante a titulação com hidrazina aquosa (50%) e uma solução de DMSO com o sensor <b>BTD-CHO</b> (1,0 $\mu\text{M}$ ). Concentração de $\text{H}_4\text{N}_2$ na faixa de 1 a 15 $\mu\text{M}$ . $R^2 = 0,997$ . ....	31
<b>Figura 15.</b> Experimentos de titulação de $^1\text{H}$ RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) foram conduzidos para monitorar a reação entre <b>BTD-CHO</b> (concentração inicial: 30 $\text{mg mL}^{-1}$ ) e hidrazina, resultando na formação do derivado fluorescente <b>BTD-</b>	

- HZN.** A hidrazina foi adicionada em quantidades crescentes de baixo para cima, com 0,0, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 equivalentes adicionados à solução do sensor... 32
- Figura 16.** Experimentos ESI(+)-MS foram conduzidos para monitorar a reação entre **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) e hidrazina, resultando na formação do derivado fluorescente **BTD-HZN**. Os dois derivados foram detectados como íons protonados com valores m/z de 347 e 361, respectivamente. .... 33
- Figura 17.** (A) Base ( $S_0$ ) e primeira ( $S_1$ ) estruturas otimizadas de **BTD-CHO** e **BTD-HZN** em água, comprimentos de ligação selecionados (em Å) e ângulos diedros de torção (em graus) em relação ao núcleo BTD. (B) CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) Orbitais de Transição Natural associados à transição eletrônica  $S_0 \rightarrow S_1$  para os corantes BTD em água (IEF-PCM). .... 36
- Figura 18.** Sobreposição das geometrias do estado fundamental ( $S_0$ ) e do primeiro estado excitado ( $S_1$ ) em diferentes solventes para **BTD-CHO** e **BTD-HZN**. .... 37
- Figura 19.** Espectros de absorção e emissão CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) dos corantes BTDs em acetonitrila (IEF-PCM) associados às transições eletrônicas  $S_0 \rightarrow S_1$  de menor energia. .... 38
- Figura 20.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24 h para o **BTD-CHO** (à esquerda) e **BTD-HZN** formado in situ (à direita). A barra gráfica não mostra efeito citotóxico estatisticamente significativo após 24 h de incubação para os compostos testados em soluções em diferentes concentrações (1-100  $\mu$ M). ... 39
- Figura 21.** Emissões de fluorescência (fotoestabilidades) dentro das diferentes linhagens de células. Amarelo é a solução de PBS sem corante fluorescente, vermelho e verde (**BTD-CHO** e **BTD-HZN**, respectivamente) são referidos a células vivas (exceto para a medição da solução que é uma solução de PBS contendo corante), azul e roxo (**BTD-CHO** e **BTD-HZN**, respectivamente) é referido como células fixas. .... 39
- Figura 22.** Análises de citometria de fluxo de **BTD-CHO** e **BTD-HZN** para representar a intensidade de fluorescência de ambos os corantes (10  $\mu$ M cada) dentro das diferentes linhagens de células em comparação com padrões comerciais. Azul e verde escuro (células vivas), laranja e verde (células fixas) e vermelho, roxo e rosa (controles). As análises referem-se a 10 mil eventos por canal utilizando os seguintes padrões: Amycian (canal verde), Pacific Blue (canal azul) e Qdot605 (canal vermelho). .... 40
- Figura 23.** Linhagens de células vivas (esquerda) e fixadas (direita) marcadas com **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) indicando sua seletividade de gotículas lipídicas. Barra de escala de 10  $\mu$ m. .... 41
- Figura 24.** Experimentos usando BODIPY (12  $\mu$ M) e **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) mostrando a intensidade relativa dos corantes (abaixo) e sua coloração de gotículas lipídicas (topo). Observe que o corante desenvolvido é muito mais intenso com uma concentração menor. .... 42
- Figura 25.** Imagem de células vivas (MDA-MB-231) usando **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) e hidrazina (10  $\mu$ M) para a detecção seletiva do analito nas estruturas de gotículas lipídicas. Canal azul: **BTD-HZN** formado in situ após adição de hidrazina. Canal verde: emissão brilhante e intensa de **BTD-CHO** e **BTD-HZN**

no interior de gotículas lipídicas. Canal vermelho: emissão de BTD-CHO dentro de organelas específicas (LDs). Barra de escala de 10 $\mu\text{m}$ . .....	42
<b>Figura 26.</b> Intensidade de fluorescência do canal vermelho antes e depois da adição de hidrazina em dois modelos celulares diferentes, ou seja, linhagens de células MDA-MB-231 e HUVEC. ....	43
<b>Figura 27.</b> Microalga ( <i>Chlorella sorokiniana</i> ) corada com <b>BTD-CHO</b> (10 $\mu\text{M}$ ). (Esquerda) Campo claro e (Direita) emissão de fluorescência no canal verde. Barra de escala de 2,5 $\mu\text{m}$ . ....	44
<b>Figura 28.</b> Estruturas de derivados de BTD fluorescentes lipofílicos previamente publicados <sup>100</sup> testados neste trabalho para microalgas e para coloração de <i>C. elegans</i> . ....	45
<b>Figura 29.</b> Experimentos de coloração de <i>C. elegans</i> (in vivo). (Esquerda) <b>BTD-CHO</b> (10 $\mu\text{M}$ ) monitorado no canal verde. (Direita) <b>BTD-HZN</b> formado in situ na presença de hidrazina (canal azul). Barra de escala de 25 $\mu\text{m}$ . ....	45
<b>Figura 30.</b> Análise bioortogonal de células MDA-MB-231 (parte superior), microalgas ( <i>Chlorella sorokiniana</i> , imagem do meio) e <i>C. elegans</i> (parte inferior) usando <b>BTD-CHO</b> (10 $\mu\text{M}$ ) para todos os experimentos. A projeção (à esquerda) e as imagens 3D renderizadas (à direita) da análise ortogonal mostram que o corante está presente dentro das estruturas. O iodeto de propídio (um corante comercial) é o emissor vermelho. ....	47
<b>Figura 31.</b> Detecção de hidrazina em modelos vivos (superior) e fixos (inferior) de peixe-zebra usando o marcador <b>BTD-CHO</b> desenvolvido (10 $\mu\text{M}$ ) formando <i>in situ</i> o derivado <b>BTD-HZN</b> (emissão azul). Visualizações de campo claro (esquerda) e canal azul (direita). Barra de escala de 200 $\mu\text{m}$ . ....	48

## Lista de Esquemas

- Esquema 1.** Estratégias tipicamente usadas para detectar hidrazina usando pequenas moléculas orgânicas fluorogênicas. Os sítios reativos são mostrados em azul. Observe que a maioria das estratégias fornece subprodutos tóxicos que podem interferir na análise biológica..... 4
- Esquema 2.** (A) Síntese e (B) Arquitetura molecular relacionada a um sensor de hidrazina baseado no heterociclo 2,1,3-benzotiadiazol (BTD) (em cinza). Observe que a água é o subproduto da reação usando hidrazina como reagente (analito). A estrutura cristalina de raios-X de **BTD-CHO** com elipsoides térmicos no nível de probabilidade de 50% (número de referência CCDC: 2064478) é mostrada. (C) Exemplos de estruturas baseadas em BTD conhecidas aplicadas como marcadores seletivos de gotículas lipídicas..... 20

## Resumo

Neste trabalho, apresentamos um estudo sobre a síntese, caracterização e aplicação de dois novos sensores fluorescentes de benzotiadiazola (BTD) para a detecção e quantificação de hidrazina ( $N_2H_4$ ) em níveis celulares e multicelulares (in vivo). O desenvolvimento desses sensores tem grande relevância, pois a detecção precisa de hidrazina é de extrema importância em várias áreas, incluindo a indústria química e biológica. Primeiramente, descrevemos o projeto e a síntese cuidadosa das duas sondas, denominadas BTD-CHO e BTD-HZN. A caracterização completa das sondas foi realizada, e suas propriedades fotofísicas foram minuciosamente avaliadas. Demonstramos que o BTD-CHO é um corante fluorogênico projetado para atuar como um sensor altamente seletivo para a detecção rápida e sensível de hidrazina. Quando em contato com  $N_2H_4$ , o BTD-CHO produz o derivado BTD-HZN, liberando água como único subproduto. Esse mecanismo de reação seletivo é fundamental para garantir a precisão e a especificidade do sensor. Uma das características mais interessantes observadas foi a afinidade do BTD-CHO por gotículas lipídicas (LDs) dentro das células. Essa propriedade permite que o sensor se acumule eficientemente dentro dessas organelas, tornando-o especialmente adequado para a detecção de hidrazina em um ambiente intracelular. Com base nisso, conseguimos visualizar com eficiência os lipídios em um modelo celular desafiador, as microalgas *Chlorella sorokiniana*, utilizando os sensores BTD.

A fim de avaliar o desempenho dos sensores em modelos multicelulares, conduzimos experimentos in vivo utilizando os organismos *C. elegans* e zebrafish (*Danio rerio*). Os resultados indicaram uma detecção rápida e eficiente do analito hidrazina em ambos os modelos multicelulares, demonstrando a aplicabilidade prática dos nossos sensores. Nossos achados representam uma importante contribuição para a área de sensores fluorescentes e abrem novas perspectivas para a detecção de hidrazina em diferentes contextos, com aplicações promissoras em pesquisas biológicas e aplicações industriais. Acreditamos que os sensores BTM têm o potencial de impulsionar estudos mais aprofundados sobre a detecção de hidrazina, facilitando a compreensão de seu papel em diversos processos celulares e permitindo sua monitoração em níveis intracelulares e multicelulares. Além disso, o desenvolvimento desses sensores representa um avanço significativo em direção a uma detecção mais precisa e sensível de hidrazina, abrindo caminho para a aplicação de novas tecnologias em diversas áreas.

## Abstract

In this work, we present a comprehensive study on the synthesis, characterization and application of two new benzothiadiazole (BTD) fluorescent sensors for detection and quantification of hydrazine ( $N_2H_4$ ) at cellular and multicellular levels (in vivo). The development of these sensors has a big voice, as the accurate detection of hydrazine is of utmost importance in several areas, including the chemical and biological industry. First, we describe the design and careful layout of the two probes, named BTD-CHO and BTD-HZN. The complete characterization of the probes was carried out, and their photophysical properties were thoroughly evaluated. We demonstrate that BTD-CHO is a fluorogenic dye designed to act as a highly selective sensor for the rapid and sensitive detection of hydrazine. When in contact with  $N_2H_4$ , BTD-CHO produces the BTD-HZN derivative, releasing water as the only by-product. This selective reaction mechanism is critical to ensure sensor accuracy and specificity. One of the most interesting features observed was the secretion of BTD-CHO by lipid droplets (LDs) inside cells. This property allows the sensor to efficiently accumulate within these organelles, making it especially suitable for detecting hydrazine in an intracellular environment. Based on this, I participated in efficiently visualizing lipids in a challenging cellular model, the microalgae *Chlorella sorokiniana*, using BTD sensors. In order to evaluate the performance of sensors in multicellular models, we conducted in vivo experiments using *C. elegans* and zebrafish (*Danio rerio*) organisms. The results indicated a fast and efficient detection of the hydrazine analyte in both multicellular models, demonstrating the practical applicability of our sensors. Our findings represent an important contribution to the field of fluorescent sensors and open new perspectives for the detection of

hydrazine in different contexts, with promising applications in biological research and industrial applications. We believe that BTD sensors have the potential for more in-depth studies on hydrazine detection, facilitating the understanding of its role in different cells and allowing its monitoring at levels of intracellular and multicellular processes. Furthermore, the development of these sensors represents a significant advance towards a more accurate and sensitive detection of hydrazine, paving the way for the application of new technologies in several areas.

# **Introdução e Objetivos**

A hidrazina ( $N_2H_4$ ) é um reagente de fundamental importância no mundo moderno, principalmente devido às suas aplicações industriais. Por exemplo, é usada para inibir a corrosão de metais devido à sua capacidade de eliminar o oxigênio em usinas nucleares e elétricas.<sup>1</sup> A alta entalpia de combustão e a falta de poluição envolvida nesse processo permitem que a hidrazina seja usada como propelente para mísseis e sistemas de propulsão de naves espaciais.<sup>2</sup> Além disso, muitos processos farmacêuticos industriais utilizam hidrazina como matéria-prima em seus procedimentos sintéticos para obter drogas antimicrobianas.<sup>3</sup> A indústria agroquímica também faz uso da  $N_2H_4$  em pesticidas e como reguladores de crescimento de plantas.<sup>4</sup> Estes são apenas alguns exemplos entre uma miríade de aplicações possíveis e atuais para esta pequena e simples molécula.<sup>5</sup>

No entanto, preocupações com a saúde surgiram como resultado da contaminação da hidrazina na água, alimentos e atmosfera. Um limite baixo de concentrações de  $N_2H_4$  (até 10 ppb)<sup>6</sup> é sugerido para evitar danos, especialmente à saúde humana. O potencial nocivo da hidrazina pode afetar gravemente os rins, pulmões, fígado e sistema nervoso, principalmente quando absorvida por inalação, contato com a pele ou ingestão, como evidenciado em um estudo recente<sup>7</sup> sobre exposição ocupacional à hidrazina. Embora não esteja totalmente confirmado, a hidrazina é reconhecida como uma substância cancerígena para humanos<sup>8</sup>, pois roedores expostos ao  $N_2H_4$  desenvolveram tumores.

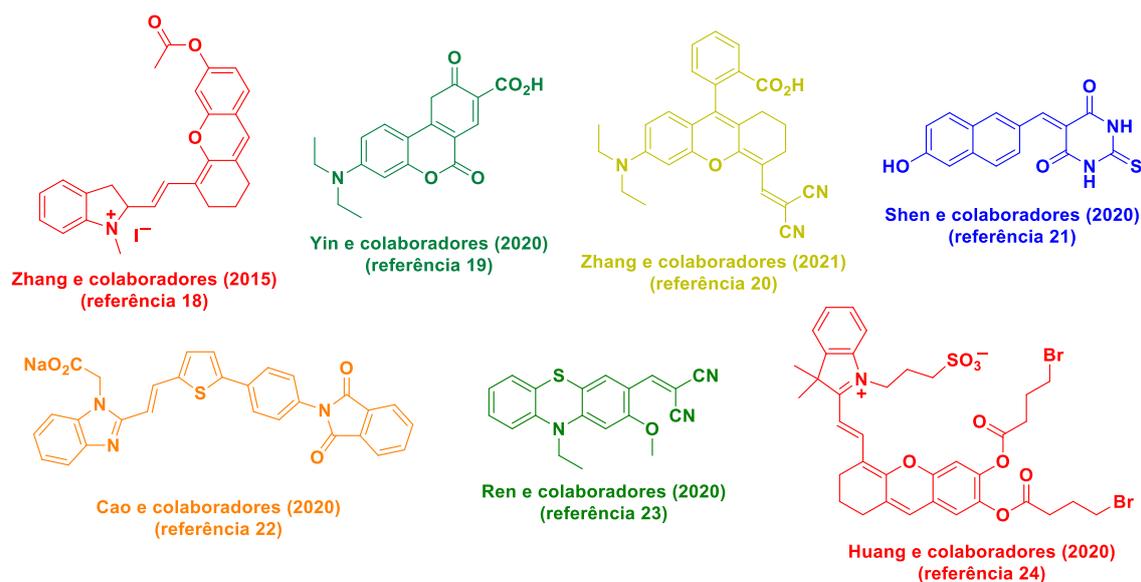
Nesse contexto, não é difícil imaginar que pequenos vazamentos durante o transporte e armazenamento de hidrazina, resíduos não queimados quando utilizada como combustível, partes destacadas de estágios de foguetes,

quantidades residuais de produtos não purificados de vários processos industriais e outras fontes potenciais de contaminação representem uma séria ameaça aos sistemas ecológicos naturais e à saúde humana.<sup>9</sup> Sabe-se que a hidrazina (e seus derivados) é relativamente escassa na natureza, conforme relatado na literatura científica,<sup>10</sup> e não é produzida endogenamente em nossas células. Portanto, a detecção de hidrazina em sistemas vivos é de suma importância para o diagnóstico e tratamento adequado em caso de intoxicação. Além disso, a detecção seletiva e a quantificação desse analito são cruciais para prevenir ou remediar qualquer contaminação.

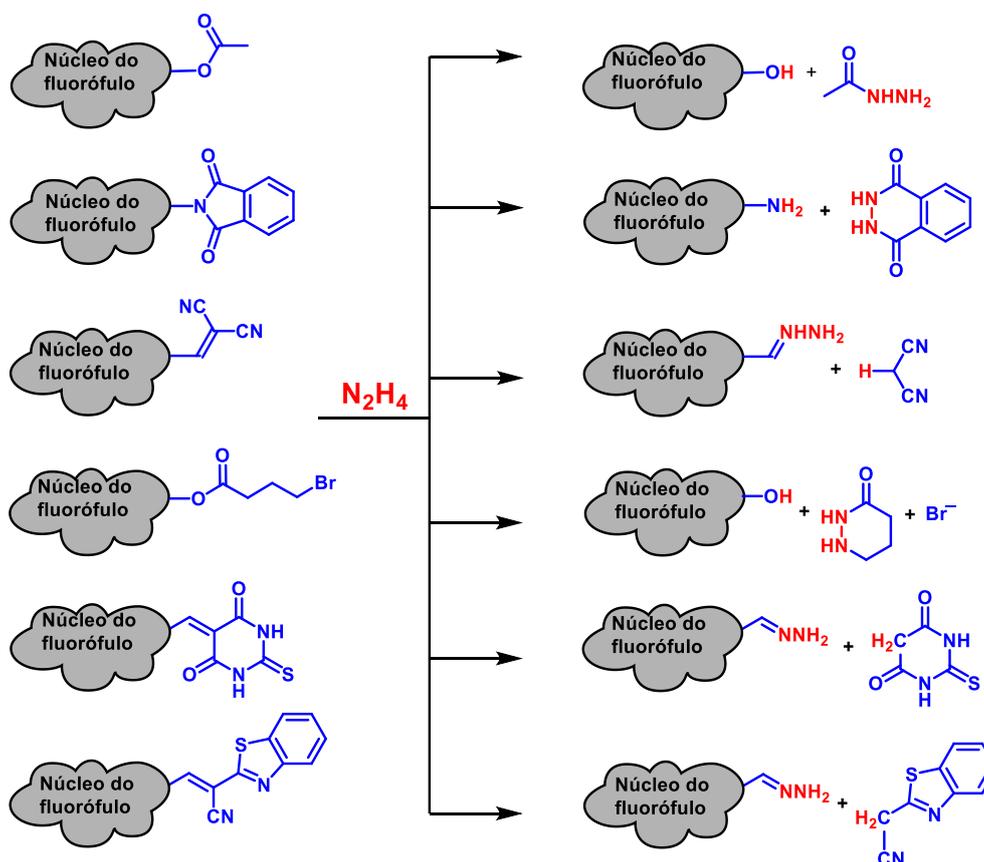
Existem várias metodologias disponíveis para a detecção e quantificação de hidrazina, conforme observado em revisões recentes sobre o assunto.<sup>11-17</sup> Embora cada um desses métodos tenha suas próprias vantagens e desvantagens, o uso de pequenos sensores fluorescentes orgânicos oferece inúmeros benefícios, incluindo alta sensibilidade, especificidade, seletividade e facilidade de operação. Moléculas fluorogênicas também podem ser usadas para imagens *in vitro* e *in vivo* em sistemas biológicos, tornando esses sensores ferramentas valiosas para a detecção e quantificação de hidrazina.

Embora o desenvolvimento de sensores de hidrazina seja importante, apenas algumas moléculas orgânicas fluorescentes obtiveram sucesso na detecção seletiva de hidrazina em células vivas e organismos vivos nos últimos anos (ver exemplos na Figura 1).<sup>18-25</sup> A maioria dos sensores fluorescentes desenvolvidos para detectar hidrazina é baseada em uma arquitetura molecular específica. Em outras palavras, essas moléculas contêm um sítio reativo e mudarão sua estrutura quando tratadas com hidrazina.<sup>2,22,26-34</sup> O resultado é geralmente a formação de um derivado mais emissivo capaz de indicar a

presença desse analito específico (ou seja,  $N_2H_4$ ), ou uma mudança no comprimento de onda de emissão (por exemplo, de vermelho para verde) ou mesmo supressão de fluorescência (sondas light-off).<sup>35-37</sup> Analisando as estruturas desenvolvidas mostradas na Figura 1, pode-se perceber que a maioria dessas moléculas orgânicas pequenas libera subprodutos tóxicos, e os resíduos estão longe de uma perspectiva verde, especialmente considerando a análise biológica. Portanto, é razoável considerar novos projetos com o mínimo de resíduos e subprodutos não tóxicos, especialmente em sistemas vivos, onde as avaliações nos níveis celular e multicelular são necessárias para evitar qualquer resposta biológica indesejada, efeito ou conclusões enganosas devido à formação de subprodutos. O Esquema 1 mostra algumas das estratégias sintéticas atualmente utilizadas para desenvolver novas sondas seletivas de hidrazina e a reação esperada com os respectivos subprodutos tóxicos. Conforme ilustrado no Esquema 1, essas estratégias são realmente eficientes na detecção de hidrazina, mas os subprodutos gerados durante essas reações podem prejudicar o sistema biológico, mascarando os resultados e podendo levar a conclusões dúbias.



**Figura 1.** Exemplos de sensores de hidrazina mostrando suas cores emissivas.



**Esquema 1.** Estratégias tipicamente usadas para detectar hidrazina usando pequenas moléculas orgânicas fluorogênicas. Os sítios reativos são mostrados em azul. Observe que a maioria das estratégias fornece subprodutos tóxicos que podem interferir na análise biológica.

Gotículas (ou gotas) lipídicas (LDs) são organelas esféricas essenciais para a homeostase celular e manutenção da vida.<sup>38-40</sup> No entanto, monitorar as mudanças dinâmicas associadas a essas estruturas celulares representa um verdadeiro desafio ao tentar observá-las dentro de células vivas.<sup>41-43</sup> Corantes fluorescentes seletivos capazes de colorir LDs são, portanto, ferramentas extremamente importantes para rastrear essas estruturas, conforme revisado na literatura científica.<sup>44-46</sup> Na última década, vários novos corantes fluorogênicos e estratégias de arquitetura molecular foram desenvolvidos para corar LDs.<sup>47-58</sup> Embora marcadores disponíveis comercialmente, como BODIPY e vermelho do Nilo, sejam usados para corar LDs, eles têm preferência por lipídios neutros, o que significa que muitos LDs podem escapar da detecção dentro das células. Conforme revisado recentemente, ambos os corantes comerciais exibem especificidades insatisfatórias dentro das células e fotopropriedades inadequadas.<sup>44</sup> A coloração seletiva de estruturas lipídicas em modelos multicelulares, como *C. elegans*, é particularmente desafiadora, e as limitações desses marcadores disponíveis foram discutidas em estudos anteriores.<sup>59</sup>

Os marcadores fluorescentes de 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) são uma nova classe de biossondas que foram aplicados com sucesso em experimentos de bioimagem, como revisado pelo grupo do professor Brenno A. D. Neto.<sup>60,61</sup> Vários grupos<sup>62-93</sup> também têm aplicado novos derivados BTD fluorescentes como sondas de bioimageamento de forma efetiva para estudar diferentes características biológicas. Embora as características físico-químicas desejáveis, fotopropriedades e estabilidades sejam normalmente notadas para derivados BTD fluorescentes,<sup>94-99</sup> até onde sabemos, nenhum BTD fluorogênico foi

aplicado como um sensor sensível e seletivo para detecção de hidrazina, especialmente em células vivas e modelos multicelulares (aplicações in vivo).

Com base em nosso interesse no desenvolvimento e aplicação em bioimagem de BTDs fluorescentes<sup>100-107</sup>, nesta Tese apresenta-se a síntese e detecção sensível de hidrazina em solução, células vivas e modelos multicelulares usando um sensor BTB fluorescente desenvolvido com estes objetivos em mente. Pela primeira vez, um corante BTB fluorogênico foi capaz de colorir seletivamente LDs e detectar hidrazina dentro dessas organelas.

### **Objetivos Gerais**

De modo geral, os objetivos do presente trabalho consistem em obter um novo marcador fluorescente baseado no núcleo 2,1,3-benzotiadiazola para marcar seletivamente hidrazina, com propriedades fotofísicas e de imagem específicas, que sejam úteis para consolidar o núcleo BTB em bioimagem, bem como servir como precursor para a arquitetura molecular de novos derivados fluorescentes.

A primeira etapa do trabalho consiste na síntese e caracterização do 7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol-4-carbaldeído a partir do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola. O produto será caracterizado quanto às suas propriedades térmicas e fotofísicas e, posteriormente, aplicado como marcador fluorescente para avaliar a eficiência em imageamento celular.

### **Objetivos Específicos**

- Sintetizar e caracterizar o 7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol-4-carbaldeído;

- Caracterizar estrutural e fotofisicamente o 7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol-4-carbaldeído obtido;
- Aplicar e avaliar o composto como marcador fluorescente em bioimagem;
- Estudar e avaliar o comportamento do marcador após a adição de hidrazina;
- Aplicar e avaliar o composto como marcador seletivo para hidrazina.

## **Capítulo 2**

### **Parte Experimental**

Os espectros de RMN foram registrados em um instrumento de RMN operando a 600 MHz para  $^1\text{H}$  e a 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os desvios químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados aos sinais dos átomos de hidrogênio residuais do solvente deuterado. Todos os reagentes e solventes foram adquiridos de fontes comerciais. Os espectros de massa de alta resolução (HRMS) foram registrados em um Triple Quad com o analisador acelerador TOF. As análises UV-Vis foram realizadas usando um espectrofotômetro UV-Vis-NIR com soluções recém-preparadas. Os experimentos de fluorescência foram realizados irradiando os máximos de absorção das bandas de menor energia (ou no comprimento de onda indicado) em diferentes solventes, usando soluções de 10  $\mu\text{M}$  dos corantes. Titulações fluorimétricas foram realizadas para retratar possíveis efeitos interferentes (10 e 100  $\mu\text{M}$ ), monitorando o comprimento de onda de emissão em 375 nm.

**Síntese de BTD-CHO - 4-(7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol)-benzaldeído.** 4-bromo-7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol (1,0 mmol, 321 mg), ácido (4-formilfenil)borônico (1,0 mmol, 150 mg),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,05 mmol, 12 mg),  $\text{PPh}_3$  (0,1 mmol, 23 mg) e  $^t\text{BuOK}$  (2,0 mmol, 56 mg) foram misturados em um tubo Schlenk com 4 mL de tolueno anidro. A mistura foi agitada por 24 h a 100 °C. Após 24 h a 100 °C, a mistura foi seca e concentrada. O sólido foi purificado por cromatografia em coluna (AcOEt:DCM 20:80 v/v). Obteve-se um sólido amarelo com ponto de fusão de 145-146 °C e rendimento de 82%.

$^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10,13 (s, 1 H), 8,18 (d,  $J = 7,7$  Hz, 2 H), 8,07 (d,  $J = 7,7$  Hz, 2 H), 7,97 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2 H), 7,87 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1 H), 7,79 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1 H), 7,11 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2 H), 3,92 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 191,9; 160,1; 154,2; 153,8; 143,5; 135,7; 130,5; 130,0; 129,8; 129,6; 129,0; 127,0; 114,2; 55,4.

ESI(+)-MS de alta resolução calculado para  $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$ : 347,0854.

Encontrado: 347,0846. Erro = -2,3 ppm.

**Síntese de BT-D-HZN - ((Z)-4-(4-(hidrazinilidenometil)fenil)-7-(4-metoxifenil)-2,1,3-benzotiadiazol.** Em uma solução de DMSO-*d*6 (0,5 mL) contendo 20 mg de **BT-D-CHO**, hidrazina (10 eq.) de uma solução aquosa a 50% v/v foi adicionada. A solução foi analisada in situ sem purificação. Após as análises de RMN, a mistura foi resfriada e um sólido laranja precipitou. O sólido foi filtrado, proporcionando o composto desejado em rendimento quase quantitativo. A síntese pode ser reproduzida em escala milimolar sem problemas. O composto foi obtido como um sólido laranja. Ponto de fusão: 113-114 °C. Rendimento: 99%.

$^1\text{H}$  RMN (600 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm): 8,02-7,97 (m, 3H), 7,97-7,93 (m, 2H), 7,93-7,88 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 7,66-7,59 (m, 2H), 7,15-7,10 (m, 2H), 6,91 (br, 2H), 3,84 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm): 159,7; 153,7; 138,2; 136,5; 136,0; 132,1; 131,4; 130,6; 129,4; 128,4; 127,7; 125,5; 114,3; 55,5.

ESI(+)-MS de alta resolução calculado para  $[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}+\text{H}]^+$ : 361.1123.

Encontrado: 361.1136. Erro: 3.6 ppm.

**LOD e LOQ.** Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados pelas seguintes equações:

$$LOD = \frac{3\sigma}{m}$$

e

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m}$$

Onde,  $\sigma$  é o erro padrão da interceptação y da linha de regressão, m é a inclinação da curva de calibração. Um valor de LOD e LOQ de  $3,4 \times 10^{-7}$  M e  $1,1 \times 10^{-6}$  M, respectivamente, foi estimado usando essas equações, o que corresponde a 10,9 ppb e 37,1 ppb de hidrazina, respectivamente.

**Cálculos DFT.** As estruturas dos dois corantes BTB foram otimizadas em estados eletrônicos excitados e terrestres, seguidas de cálculos de frequência vibracional no nível de teoria CAM-B3LYP/6-311+G(d) em equilíbrio implícito e na versão do Formalismo de Equação Integral de Resposta Linear de Continuum Polarizável Modelo (IEF-PCM) com acetonitrila como solvente. A ausência de frequências vibracionais imaginárias confirmou que as geometrias otimizadas correspondem a mínimos genuínos na superfície de energia potencial. Os cálculos adiabáticos da Teoria Funcional da Densidade dependente do tempo (TD-DFT) foram realizados empregando diferentes funcionais de correlação de troca (XC) (B3LYP, CAM-B3LYP, M06, M062X,  $\omega$ B97XD e LC- $\omega$ PBE) em acetonitrila modelada por meio do IEF-PCM para estimar a posição do maior comprimento de onda nos espectros de absorção e emissão, a fim de verificar qual funcional XC se correlaciona melhor com o  $\lambda_{\text{max}}$  experimental. Os Orbitais de Transição Natural (NTOs) correspondentes às transições eletrônicas  $S_0 \rightarrow S_1$  também foram determinados para esclarecer a natureza dessas transições.

Todos os cálculos foram realizados usando o pacote Gaussian09 Revisão D.01. Para as coordenadas Cartesianas e energias das estruturas calculadas, conforme expresso na Tabela 1.

**Tabela 1:** Coordenadas cartesianas das estruturas otimizadas BTD-CHO e BTD-HZN obtidas no nível de teoria CAM-B3LYP/6-311+G(d).

<b>BTD-CHO (S<sub>0</sub>)</b>		
Solvente: Acetobitrila Energia: -1428.414710 Eh	Solvente: Água Energia: -1428.294515 Eh	Solvente: Diclorometano Energia: -1428.291604 Eh
S -0.10509800 3.18634100 0.01255000	S -0.10518800 3.18604300 0.01270500	S -0.10564700 3.18862100 0.01163700
O 7.01936000 -0.43565200 -0.25382600	O 7.01925200 -0.43518700 -0.25452300	O 7.01933400 -0.43869700 -0.25357600
N -1.33454200 2.12764300 0.02460400	N -1.33464600 2.12704200 0.02468100	N -1.33515600 2.12967700 0.02799500
N 1.13870100 2.14649600 -0.01875700	N 1.13872600 2.14594800 -0.01864300	N 1.13852900 2.14912400 -0.02198400
C 2.86121300 -0.32669200 -0.07253900	C 2.86110200 -0.32710300 -0.07290200	C 2.86174900 -0.32454900 -0.07095100
C -3.01410800 -0.38028500 0.04407400	C -3.01397600 -0.38075400 0.04428700	C -3.01426800 -0.37890900 0.04525200
C 5.66650000 -0.45200800 -0.14858000	C 5.66647300 -0.45187900 -0.14917800	C 5.66675700 -0.45357000 -0.14760500
C -0.81003300 0.90614000 0.00936000	C -0.80995500 0.90549400 0.00914500	C -0.81012000 0.90847600 0.01170400
C 3.59994500 0.54242800 -0.88537400	C 3.59938900 0.54014500 -0.88817000	C 3.60211500 0.54959900 -0.87681000
H 3.08685100 1.27010200 -1.50053300	H 3.08590800 1.26578900 -1.50538900	H 3.09021000 1.28373300 -1.48496100
C 0.63338300 0.91665300 -0.02655800	C 0.63326600 0.91603200 -0.02640500	C 0.63337500 0.91932000 -0.02671700
C 1.38366200 -0.30610800 -0.05250700	C 1.38349900 -0.30656600 -0.05243700	C 1.38433700 -0.30313600 -0.05153200
C -1.53647000 -0.32946200 0.01291400	C -1.53632100 -0.32996800 0.01279800	C -1.53662900 -0.32706600 0.01579700
O -7.95716100 -1.40099700 -0.44871000	O -7.95736800 -1.39778600 -0.44998400	O -7.95443800 -1.40994700 -0.44839900
C -3.75233600 0.46454300 0.87583500	C -3.75184500 0.46275400 0.87780200	C -3.75481000 0.46989800 0.87064200
H -3.24284300 1.18903100 1.49647700	H -3.24196200 1.18559000 1.50002800	H -3.24692700 1.19990000 1.48595600
C -3.69731400 -1.31066200 -0.75046700	C -3.69752300 -1.30959200 -0.75168200	C -3.69560200 -1.31388800 -0.74520900
H -3.13883200 -1.95510600 -1.41900300	H -3.13930600 -1.95324800 -1.42115000	H -3.13539600 -1.95997000 -1.41082400
C -5.80499600 -0.55837300 0.12985700	C -5.80485800 -0.55806300 0.13018100	C -5.80510100 -0.56004600 0.12795000
C 4.97807500 0.47878000 -0.92850500	C 4.97752800 0.47675100 -0.93139900	C 4.97973300 0.48387400 -0.92046100
H 5.54459800 1.14614500 -1.56762900	H 5.54377400 1.14247100 -1.57248700	H 5.54827500 1.15499000 -1.55366700
C 3.56401000 -1.24751300 0.70006000	C 3.56430600 -1.24597800 0.70156100	C 3.56309000 -1.25106800 0.69561200
H 3.02391500 -1.91956900 1.35739200	H 3.02448900 -1.91682000 1.36037100	H 3.02175100 -1.92539700 1.34971900
C -0.77928400 -1.46617900 -0.01459400	C -0.77918300 -1.46679400 -0.01461800	C -0.77866900 -1.46333500 -0.01133900
H -1.27266900 -2.43108400 0.00156300	H -1.27263800 -2.43163300 0.00142500	H -1.27254800 -2.42803300 0.00625200
C -5.07489800 -1.40046400 -0.70956600	C -5.07513900 -1.39894600 -0.71074900	C -5.07304600 -1.40547100 -0.70575700
H -5.59832700 -1.21721700 -1.33113300	H -5.59878900 -1.21454700 -1.33344900	H -5.59630900 -1.22520900 -1.32399800
C 4.95225500 -1.31837200 0.67260000	C 4.95256700 -1.31653700 0.67409000	C 4.95108100 -1.32398500 0.66776000
H 5.45548500 -2.04334600 1.29774200	H 5.45614800 -2.03997600 1.30070400	H 5.45342100 -2.05327000 1.28865200
C -7.27331300 -0.63304000 0.19411600	C -7.27307800 -0.63218100 0.19440300	C -7.27398000 -0.63726500 0.18928000
H -7.75083000 0.07875800 0.89170200	H -7.75036400 0.07825200 0.89334600	H -7.75426100 0.07864900 0.88170700
C -5.13362100 0.37175400 0.92029400	C -5.13307900 0.37037600 0.92233800	C -5.13586100 0.37539300 0.91343900
H -5.69635800 1.02654600 1.57771700	H -5.69553900 1.02393000 1.58118800	H -5.70071400 1.03833600 1.56558800
C 0.64352800 -1.45502400 -0.04812600	C 0.64345400 -1.45560300 -0.04787600	C 0.64382900 -1.45193000 -0.04607300
H 1.15210500 -0.44125300 -0.08511300	H 1.15217100 -0.441175300 -0.08445200	H 1.15320500 -0.44077200 -0.08411400
C 7.76934900 -1.37005300 0.50740200	C 7.76959300 -1.36773000 0.50915300	C 7.76771900 -1.37857600 0.50031400
H 8.81259300 -1.18540800 0.26537500	H 8.81275600 -1.18313300 0.26687700	H 8.81106900 -1.19431600 0.25829100
H 7.51061900 -2.3965200 0.23764100	H 7.51122700 -2.39481100 0.24163300	H 7.50706800 -2.40316500 0.22437000
H 7.61436800 -1.22187100 1.57849900	H 7.61417700 -1.21709400 1.57979900	H 7.61452700 -1.23701800 1.57278300
<b>BTD-CHO (S<sub>1</sub>)</b>		
Solvente: Acetonitrila Energia: -1428.260356 Eh	Solvente: Água Energia: -1428.275526 Eh	Solvente: Diclorometano Energia: -1428.257879 Eh
C 0.61892900 -1.49799000 -0.11410700	C 0.64192300 -1.45091100 -0.04681200	C 0.62047800 -1.49288100 -0.10529600
C -0.76374800 -1.49513900 -0.10980700	C -0.78014000 -1.46078800 -0.00704200	C -0.76244500 -1.49151400 -0.10297300
C -1.53749100 -0.31525200 -0.04867400	C -1.54078600 -0.32402600 0.01963900	C -1.53757100 -0.31249700 -0.04547800
C -0.79749000 0.91184500 -0.01013200	C -0.80736500 0.90988100 0.01207800	C -0.79771400 0.91496200 -0.00794600
C 0.63510200 0.90890400 -0.01109900	C 0.63714300 0.91870100 -0.02384100	C 0.63392600 0.91516300 -0.00781600
C 1.36623300 -0.31134800 0.07318100	C 1.38583100 -0.30420100 -0.05141400	C 1.36741500 -0.30635400 0.06587800
N -1.32178200 -1.24335900 -0.02060300	N -1.32869200 2.13297100 0.02281600	N -1.32420400 2.14599100 -0.01935300
S -0.05368600 3.19853000 0.06673500	S -0.09805500 3.19062800 0.00910400	S -0.05891600 3.22274500 0.06579800
N 1.18761700 2.12854800 0.02343200	N 1.14471900 2.14779800 -0.01882400	N 1.18467800 2.13428000 0.02439400
H 1.13810300 -2.44703000 -0.16520200	H 1.14900800 -2.40820200 -0.08383600	H 1.13999600 -2.44181900 -0.15585800
H -1.26984700 -2.45174900 -0.11997400	H -1.27286900 -2.42582500 0.01559300	H -1.26795000 -2.44845100 -0.11183300
C -2.97958300 -0.37130000 0.00290300	C -3.01495100 -0.37099200 0.04592800	C -2.97936900 -0.37200100 0.00266500
C -3.74331200 0.63104600 0.65175900	C -3.76854300 0.50675900 0.84301400	C -3.74638400 0.63522400 0.64380000
C -3.68482300 -1.46136500 -0.57571900	C -3.70439700 -1.32783200 -0.70509200	C -3.68200400 -1.46449300 -0.57141500
C -5.11638800 0.54868800 0.70701100	C -5.14128200 0.42600700 0.89857600	C -5.11925100 0.55029900 0.69661300
H -3.23415900 1.45570800 1.12793000	H -3.26284600 1.25622700 1.43735900	H -3.23941300 1.46444700 1.11427000
C -5.05269900 -1.53309300 -0.52531100	C -5.08244400 -1.42226700 -0.67093500	C -5.04950800 -1.53864200 -0.52295000
H -3.14026700 -2.23298800 -1.10529400	H -3.15130700 -2.00294500 -1.34855100	H -3.13519700 -2.23719600 -1.09722700
C -5.79940700 -0.52701500 0.12180500	C -5.83051800 -0.54273300 0.13863000	C -5.79911700 -0.53030700 0.11735400
H -5.67908200 1.32219400 1.22004200	H -5.69698500 1.10823100 1.53180200	H -5.68459100 1.32626200 1.20313900
H -5.57568100 -2.36047700 -0.98960100	H -5.58958600 -2.16690900 -1.27301700	H -5.57181800 -2.36851900 -0.98352200
C 2.83022800 -0.33307800 -0.08229000	C 2.86370500 -0.32812300 -0.07308000	C 2.83107300 -0.32942500 -0.07617600
C 3.57894000 0.53532700 -0.90669900	C 3.60396600 0.53681400 -0.88906000	C 3.58114400 0.55389800 -0.88346200
C 3.53011800 -1.25773300 0.71571600	C 3.56616300 -1.24766900 0.70129800	C 3.53074900 -1.26971200 0.70344100
C 4.94725500 0.47091100 -0.93478300	C 4.98219100 0.47100200 -0.93282200	C 4.94941600 0.48764000 -0.91392900
H 3.06242700 1.25267000 -1.52823700	H 3.09164400 1.26346400 -1.50614000	H 3.06534800 1.28582200 -1.48878700
C 4.90591800 -1.33322000 0.69615500	C 4.95448100 -1.32168400 0.67254800	C 4.90660600 -1.34673000 0.68160700
H 2.97764900 -1.91982200 1.37125100	H 3.02545800 -1.91709900 1.36088300	H 4.97817600 -1.94209400 1.34835100
C 5.63046700 -0.46463800 -0.13424800	C 5.66982700 -0.45878000 -0.15105100	C 5.63184200 -0.46398800 -0.13278800
H 5.52767700 1.12092000 -1.56950400	H 5.54929800 1.13574900 -1.57424400	H 5.53060200 1.15735500 -1.53567200
H 5.40975800 -2.05516700 1.32338900	H 5.45679900 -2.04626300 1.29893500	H 5.40991100 -2.08019200 1.29577500
O 6.96112000 -0.45077500 -0.23069600	O 7.02316000 -0.44483200 -0.25713100	O 6.96306500 -0.45109700 -0.23105200
C 7.73602600 -1.37095600 0.53745200	C 7.77143800 -1.37815200 0.50725600	C 7.73611800 -1.38792200 0.51641900
H 7.48593500 -2.39908500 0.27264500	H 7.51105800 -2.40501500 0.24070400	H 7.48239500 -2.41029500 0.23242100
H 8.77104600 -1.16711300 0.28167600	H 8.81506600 -1.19600200 0.26501100	H 8.77139800 -1.18282900 0.26235500
H 7.58101900 -1.20811200 1.60460700	H 7.61628400 -1.22645000 1.57782100	H 7.58491900 -1.24601200 1.58733700
C -7.25154200 -0.58963300 0.19359500	C -7.25219100 -0.62247500 0.18986800	C -7.25186300 -0.59755000 0.18669800
H -7.73418000 0.24773400 0.72851100	H -7.84078800 0.06179200 0.81788100	H -7.73835800 0.24315300 0.71389800
O -7.94097400 -1.47918400 -0.28703800	O -7.95664200 -1.46734100 -0.46786100	O -7.93634500 -1.49294800 -0.28738200

<b>BTD-HZN (S<sub>0</sub>)</b>		
Solvente: Acetonitrila Energia: -1463.848083 Eh	Solvente: Água Energia: -1463.730077Eh	Solvente: Diclorometano Energia: -1463.726842 Eh
C 0.61892900 -1.49799000 -0.11410700 C -0.76374800 -1.49513900 -0.10980700 C -1.53749100 -0.31525200 -0.04867400 C -0.79749000 0.91184500 -0.01013200 C 0.63510200 0.90894000 -0.01109900 C 1.36623300 -0.31134800 -0.07318100 N -1.32178200 -1.43359000 -0.02060300 S -0.05368600 3.21985300 0.06673500 N 1.18761700 1.22854800 0.02343200 H 1.13810300 -2.44703000 -0.16520200 H -1.26984700 -2.45174900 -0.11997400 C -2.97958300 -0.37330000 0.00290300 C -3.74331200 0.63104600 0.65175900 C -3.68482300 -1.46136500 -0.57571900 C -5.11638800 -0.54868800 0.70701100 H -3.23415900 -1.45570800 1.12793000 C -5.05269900 -1.53309300 -0.52531100 H -3.14026700 -2.23298800 -1.10529400 C -5.79940700 -0.52701500 0.12180500 H -5.67908200 1.32219400 1.22004200 H -5.57568100 -2.36047700 -0.98960100 C 2.83022800 -0.33307800 -0.08229000 C 5.78940000 0.53532700 -0.90669900 C 3.53011800 -1.25773300 0.71571600 C 4.94725500 0.47091100 -0.93478300 H 3.06242700 1.25326700 -1.52823700 C 4.90591800 -1.33322200 0.69615500 D 2.97764900 -1.91982200 1.37125100 C 5.63046700 -0.46463800 -0.13424800 H 5.52767700 1.12902000 -1.56950400 H 5.40975800 -2.05516700 1.32338900 O 6.96112000 -0.45077500 -0.23069600 C 7.73602600 -1.37095600 0.53745200 H 7.48593500 -2.39908500 0.27264500 H 8.77104600 -1.16711300 0.28167600 H 7.58101900 -1.20811200 1.60460700 C -7.25154200 -0.58963300 0.19359500 H -7.73418500 0.24773400 0.72851100 O -7.94097400 -1.47918400 -0.28703800	C 1.01287300 -1.42277500 -0.02651100 C -0.40964300 -1.39126400 0.01790800 C -1.13438100 -0.23338300 0.03776600 C -0.36901200 0.97938100 0.01599500 C 1.07436400 0.94695800 -0.02713600 C 1.78764300 -0.29272800 -0.04632600 N -0.85637900 2.21658100 0.02128400 S 0.40380100 3.23850200 -0.00802300 N 1.61664200 2.16114300 -0.03478000 H 1.49275100 -2.39414400 -0.05680300 H -0.93143000 -2.34086100 0.04768800 C -2.61271900 -0.23778800 0.07399100 C -3.32863700 0.63099700 0.89796600 C -3.33302300 -1.15052900 -0.70557200 C -4.71325300 0.57884800 0.94851100 H -2.80066200 1.34754900 1.51336600 C -4.71393200 -1.19093900 -0.65973600 H -2.80135500 -1.82016500 -1.37217100 C -5.42823400 -0.33381200 0.17300000 H -5.24699900 1.25863600 1.60475000 H -5.25127700 1.90729900 -1.27852800 C 3.26419600 -0.36715600 -0.07533400 C 4.02224700 0.47287100 -0.90624200 C 3.94581900 -1.28976800 0.70726800 C 5.39798300 0.37013100 -0.95607500 H 3.52584400 1.20476100 -1.53011900 C 5.33159400 -1.40035200 0.67289700 H 3.39096800 -1.93640500 1.37776100 C 6.06490000 -0.56704300 -0.16527600 H 5.97873400 1.01144100 -1.60898900 H 5.81791400 -2.12975800 1.30621800 C -6.89248700 -0.35230100 0.25679900 H -7.35914300 0.38461300 0.91924000 O 7.41758500 -0.58967600 -0.27782500 C 8.14571100 -1.52998500 0.49752500 H 7.85894500 -2.55388700 0.24727800 H 9.19250100 -1.37739700 0.24856200 H 7.99888400 -1.35855200 1.56627300 N -7.60164400 -1.17648200 -0.40289200 N -8.96388800 -1.07585200 -0.31049300 H -9.39749200 -1.96925200 -0.49143900 H -9.30482900 -0.67004900 0.55755900	C 1.01090200 -1.41769100 -0.02633200 C -0.41139400 -1.38438500 0.01841200 C -1.13573600 -0.22581900 0.03746600 C -0.36834400 0.98577300 0.01671400 C 1.07546600 0.95149200 -0.02756400 C 1.78771400 -0.29362700 -0.04610200 N -0.85398100 2.22333800 0.02376700 S 0.40785700 3.24307800 -0.00699300 N 1.61945600 2.16455400 -0.03644600 H 1.48980500 -2.38955100 -0.05803200 H -0.93437500 -2.33330000 0.04943300 C -2.61402500 -0.23066500 0.07123800 C -3.33272000 0.64901300 0.88097200 C -2.61402500 -0.23066500 0.07123800 C -3.33272000 0.64901300 0.88097200 C -3.33214700 -1.15476500 -0.60766500 C -4.71711200 0.59463200 0.93039500 H -2.80681100 1.37686000 1.48448800 C -4.71266100 -1.20595400 -0.65203200 H -2.79860000 -1.83058800 -1.35592300 C -5.42926900 -0.33092300 0.16826800 H -5.25325700 1.28373400 1.57507100 H -5.24960700 -1.92218300 -1.26181900 C 3.26398500 -0.36076800 -0.07405500 C 4.02535200 0.47911700 -0.89665700 C 3.94248300 -1.29620300 0.70213800 C 5.40043100 0.37276600 -0.94617600 H 3.53147800 1.21884300 -1.51303300 C 5.32786100 -1.41042800 0.66809100 H 3.38520500 -1.94511400 1.36849300 C 6.06412900 -0.57286000 -0.16298500 H 5.98473800 1.01789600 -1.59203200 H 5.81197000 -2.14533300 1.29685300 C -6.89338500 -0.35339400 0.25075200 H -7.36382200 0.39559600 0.89741000 O 7.41663500 -0.59836000 -0.27524000 C 8.14147700 -1.54473900 0.49307000 H 7.85228300 -2.56672600 0.23659700 H 9.18881600 -1.39372600 0.24511500 H 7.99577000 -1.38019700 1.56334200 N -7.59843700 -1.19359300 -0.39226700 N -8.96048300 -1.09723500 -0.30312100 H -9.39078500 -1.99406000 -0.47341100 H -9.30553300 -0.67740400 0.55647400
<b>BTD-HZN (S<sub>1</sub>)</b>		
Solvente: Acetonitrila Energia: -1463.749434 Eh	Solvente: Água Energia: -1463.750069 Eh	Solvente: Diclorometano Energia: -1463.746255 Eh
C 0.97618600 -1.37712000 0.00988000 C -0.38601300 -1.34357600 -0.00364700 C -1.14654400 -0.13181300 0.00687200 C -0.37140000 -1.08040300 0.01235900 C 1.08694500 1.04173700 -0.00652200 C 1.79656300 -0.20573000 -0.00289000 N -0.85832840 2.21184900 0.01210500 S 0.41060300 3.37296900 0.00539500 N 1.63985100 2.24708100 -0.00264200 H 1.44779500 -2.34924700 -0.00584000 H -0.90471500 -2.29083500 0.01628200 C -2.58330100 -0.17320300 0.01901900 C -3.38250500 0.94104100 0.37781400 C -3.28229900 -1.36563100 -0.32188100 C -4.75698600 0.85755400 0.40856800 H -2.90132300 1.86800600 0.64490500 C -4.65143000 -1.43569600 -0.30526300 H -2.73656500 -2.24234900 -0.64194700 C -5.42729300 -0.32417700 0.06766800 H -5.33291600 1.72824500 0.70497400 H -5.14790400 -2.35512400 -0.58951600 C 3.23067300 -0.32091000 -0.01968500 C 4.08566200 0.74563000 -0.40676200 C 3.86840000 -1.53398900 0.34009700 C 5.44895800 0.59854300 -0.44300300 H 3.64926600 1.68976200 -0.69106300 C 5.23780100 -1.68388400 0.32155100 H 3.28244500 -2.37681300 0.67958500 C 6.04752100 -0.61497400 -0.07808200 H 6.08651200 1.41688400 -0.75888900 H 5.66887100 -2.62809800 0.62460100 C -6.87860700 -0.36224200 0.10780800 H -7.39722600 0.55868300 0.39155100 O 7.38708400 -0.65846000 -0.13923600 C 8.06129300 -1.86233100 0.21543600 H 7.76255400 -2.68294000 -0.43896400 H 9.11970200 -1.65797500 0.08343700 H 7.86655500 -2.12495100 1.25659800 N -7.53633800 -1.42195000 -0.17663600 N -8.88793100 -1.35694100 -0.17638400 H -9.30976100 -2.26217800 -0.03555900 H -9.30625600 -0.63016900 0.39794300	C 0.97630600 -1.37691000 0.01177800 C -0.38575700 -1.34328400 -0.00177400 C -1.14670500 -0.13174500 0.00802100 C -0.37152800 -1.08053200 0.01274900 C 1.08703200 1.04199900 -0.00583000 C 1.79695900 -0.20545100 -0.00178700 N -0.85833100 2.21193600 0.01143100 S 0.41032000 3.37330300 0.00466300 N 1.63957600 2.24706000 -0.00227600 H 1.44779100 -2.34908500 -0.00315400 H -0.90422600 -2.29086100 0.01506300 C -2.58329100 -0.17330400 0.02014400 C -3.38296400 0.94099900 0.37814200 C -3.28207900 -1.36614700 -0.32008400 C -4.75745000 0.85739600 0.40838000 H -2.90221400 1.86812800 0.64545100 C -4.65122700 -1.43242600 -0.30403000 H -2.73619600 -2.24314600 -0.63094000 C -5.42751800 -0.32459800 0.06769700 H -5.33362100 1.72807400 0.70432300 H -5.14720300 -2.35614500 -0.58775000 C 3.23082400 -0.32062600 -0.01908000 C 4.08595700 0.74612200 -0.40570800 C 3.86871000 -1.53415300 0.33958800 C 5.44921200 0.59869600 -0.44235100 H 3.64973900 1.69037800 -0.68983900 C 5.23802300 -1.68412200 0.32055400 H 3.28294300 -2.37734300 0.67841900 C 6.04780900 -0.61492900 -0.07842900 H 6.08646300 1.41746500 0.75603600 H 5.66802600 -2.62864900 0.62265100 C -6.87887500 -0.36246400 0.10691900 H -7.39751100 0.55848800 0.39027700 O 7.38721200 -0.65848100 -0.13999400 C 8.06164400 -1.86298600 0.21314100 H 7.76225600 -2.68281500 -0.44185200 H 9.11994700 -1.65855100 0.08055700 H 7.86753200 -2.12643400 1.25415900 N -7.53656500 -1.42214000 -0.17796900 N -8.88826800 -1.35678100 -0.17890000 H -9.31028600 -2.26181300 -0.03704600 H -9.30636000 -0.62967600 0.39500600	C 0.97565800 -1.37820300 0.00046600 C -0.38722200 -1.34394500 -0.01282000 C -1.14561400 -0.13225800 0.00141600 C -0.37078700 1.07967200 0.01028700 C 1.08641700 1.04046400 -0.01043800 C 1.79456900 -0.20707400 -0.00856200 N -0.85824400 2.21129500 0.01502800 S 0.42072900 3.37131400 0.00791300 N 1.64104200 2.24555800 -0.00557000 H 1.44795100 -2.35004500 -0.01900900 H -0.90712700 -2.29081300 0.00947000 C -2.58328000 -0.17286600 0.01410600 C -3.38001000 0.94050400 0.37878600 C -3.28330100 -1.36274500 -0.33164800 C -4.75447700 0.85751800 0.41233100 H -2.89660700 1.86620700 0.64626000 C -4.65237100 -1.43246500 -0.31213600 H -2.73827000 -2.23754900 -0.65827000 C -5.42599100 -0.32233800 0.06852200 H -5.32914600 1.72773900 0.71271000 H -5.15137200 -2.34933000 -0.60011900 C 3.22989000 -0.32225300 -0.02276900 C 4.08424400 0.74334500 -0.41170900 C 3.86678300 -1.53318600 0.34234600 C 5.44773400 0.59658300 -0.44581300 H 3.64700000 1.68688000 -0.69685800 C 5.23660400 -1.68274200 0.32634400 H 3.27985000 -2.37427000 0.68480100 C 6.04605900 -0.61515400 -0.07614900 H 6.08566500 1.41416500 -0.76036600 H 5.66788300 -2.62551500 0.63388000 C -6.87714800 -0.36133200 0.11309300 H -7.39551700 0.55902800 0.40039200 O 7.38641800 -0.65825000 -0.13517000 C 8.05961300 -1.85888000 0.22709100 H 7.76382100 -2.68352300 -0.42400600 H 9.11849100 -1.65493700 0.09746900 H 7.86224500 -2.11712400 1.26911400 N -7.53517400 -1.42053000 -0.17124900 N -8.88627300 -1.35708100 -0.16534800 H -9.30719400 -2.26352000 -0.03105600 H -9.30435000 -0.63298900 0.41237700

**Ensaio de células viáveis.** O ensaio padrão de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi realizado seguindo as recomendações do fabricante (R&D System Inc, MN, EUA). Resumidamente, foram semeadas  $3 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços, que foram

incubadas durante a noite a 37 °C com 150 µL de meio de cultura por poço. Após esse período, o meio de cultura foi removido e adicionado 150 µL de meio de cultura contendo o sensor fluorescente em concentrações variando de 0,1 a 100 µM. As células também foram incubadas com o solvente DMSO (até 0,1%) como controle positivo. Após 24 h, as amostras foram incubadas com 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) por 4 h, no escuro a 37 °C. A solução de MTT foi removida e os cristais dos corantes formazan foram solubilizados em 150 µL de DMSO. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro e o comprimento de onda ideal para a absorbância foi de 570 nm. O ensaio MTT foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte equação: % células viáveis = [(amostra teste – branco)/(amostra controle – branco)] x 100.

**Ensaio de bioimagem.** Células ( $3 \times 10^5$ ) de diferentes linhagens foram cultivadas em lamelas de vidro redondas de 13 mm, no fundo de uma placa de 24 poços. Foram deixadas aderir durante a noite e lavadas três vezes com meio isento de soro para remoção de células não aderentes. Após atingirem a confluência, as células foram separadas em duas amostras: amostras vivas e fixadas. As células fixadas foram incubadas com **BTD-CHO** fluorescente (10 µM) por 10 min, em concentrações de 0,1 a 10 µM, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em 3,7% de formaldeído por 20 min. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e montadas sobre lâminas de vidro com ProLong Gold Antifade. As células vivas foram pré-fixadas em formaldeído a 3,7% por 30 min em temperatura ambiente, lavadas três vezes em PBS e incubadas com o **BTD-CHO** também na concentração de 0,1 a 10 µM por 10 min em temperatura ambiente. Essas células foram, então, lavadas com PBS e as

lâminas foram montadas usando ProLong Gold Antifade. O procedimento com **BTD-HZN** foi realizado conforme descrito para **BTD-CHO**. Para o **BTD-HZN** formado *in situ*, as células foram tratadas com hidrazina (10  $\mu\text{M}$ ) após incubação com **BTD-CHO**, a fim de avaliar a capacidade deste derivado fluorescente em detectar este analito. Como controle negativo para autofluorescência celular, foram utilizadas amostras de células vivas e fixadas, incubadas apenas em seus respectivos meios de cultura. O ensaio foi realizado em triplicata, e as lâminas foram analisadas usando um microscópio confocal de varredura a laser.

**Ensaio BODIPY.** Resumidamente, foram semeadas  $3 \times 10^5$  células MDA-MB-231 sobre lamelas redondas em placas de 24 poços. As células foram fixadas em solução de formaldeído a 3,7%. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS à temperatura ambiente e incubadas com uma solução do marcador comercial de referência BODIPY (12  $\mu\text{M}$ ) por 30 min. Após esse período, as amostras foram lavadas mais três vezes com PBS e as lamelas foram montadas em lâminas de vidro com Prolong Gold Antifade. O ensaio foi realizado em triplicado e analisado usando um microscópio confocal de varredura a laser.

**Ensaio de microalgas (*Chlorella sorokiniana*).** Para o ensaio,  $5 \times 10^5$  microalgas foram colocadas em um Eppendorf e centrifugadas para remover o meio de cultura. Em seguida, foram incubadas durante a noite com solução de formalina a 3,7% e BTD-CHO (10  $\mu\text{M}$ ) por 30 min. Posteriormente, foram centrifugadas e lavadas uma vez com PBS. O pellet foi ressuspensão com 10  $\mu\text{L}$  de PBS e colocado em uma lâmina de vidro. Após a secagem, a amostra foi coberta com uma lamínula e analisada em um microscópio confocal de varredura a laser.

**Ensaio com *C. elegans*.** Os nematoides foram tratados vivos e pré-fixados. Para o grupo vivo, foram tratados com **BTD-CHO** (10  $\mu$ M), diluído em ágar NGM por 1 h, lavados e montados em lamínula. Já para o tratamento pré-fixado, os nematoides foram coletados da placa de cultura por lavagem superficial com 1,5 mL de tampão M9 e centrifugados. Este processo foi realizado três vezes. Após o último ciclo, os nematoides foram incubados com 1 mL de solução de paraformaldeído a 4% por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, o Eppendorf foi congelado, descongelado e lavado para retirar o paraformaldeído. O Eppendorf foi então incubado com o marcador BTD-CHO (10  $\mu$ M) por uma h. A lâmina foi montada com uma lamínula usando o Prolong Gold Antifade. Todas as amostras foram analisadas usando um microscópio confocal de varredura a laser. Imagens seriadas foram feitas no eixo Z para apoiar a reconstrução tridimensional da seção do corpo. O BODIPY comercialmente disponível também foi analisado pela mesma metodologia. Para **BTD-HZN**, 10  $\mu$ M de solução de hidrazina foram adicionados após incubação com **BTD-CHO**.

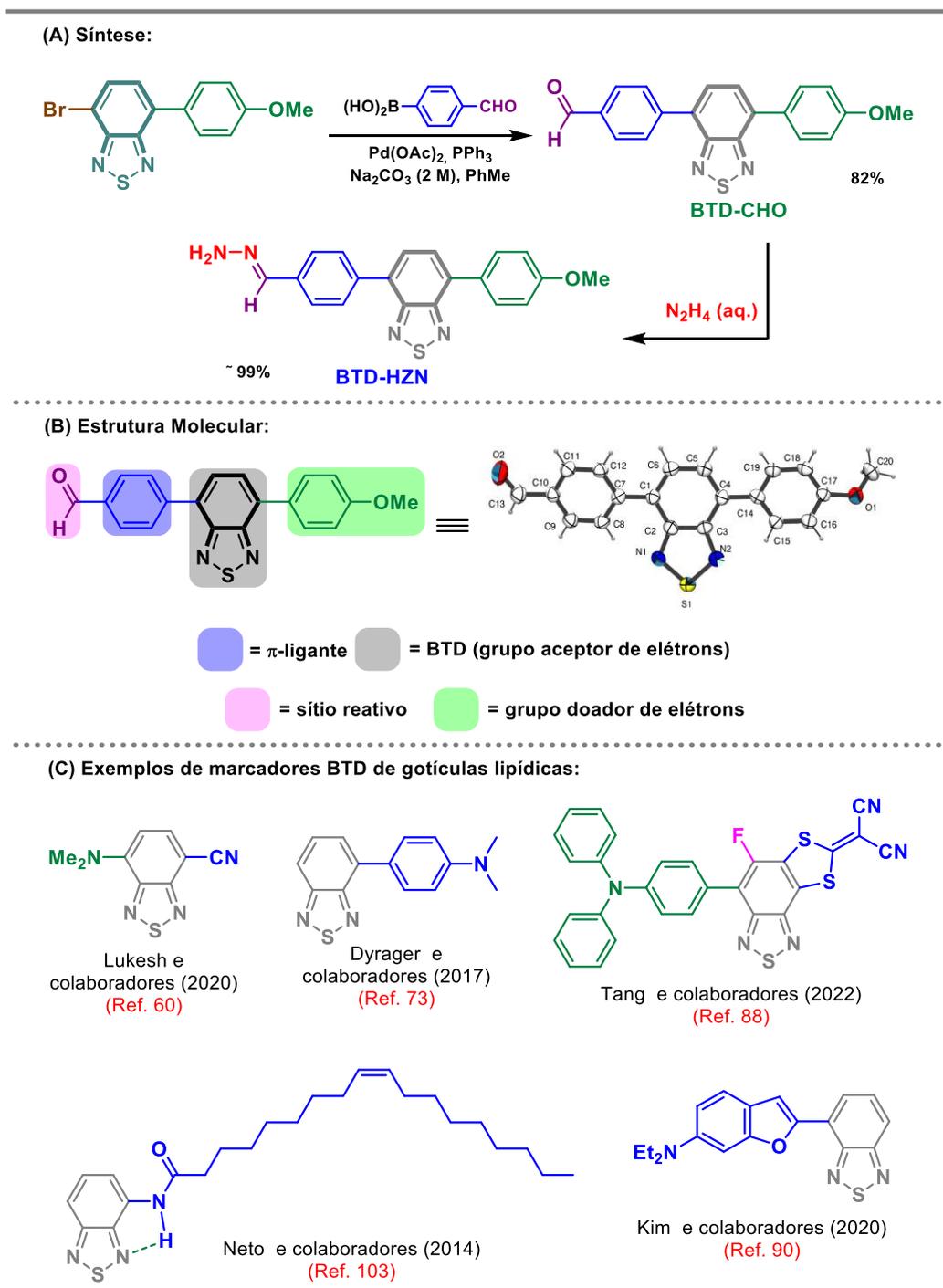
**Ensaio com peixe-zebra (*Danio rerio*).** Os experimentos com animais foram realizados de acordo com a política da Universidade de Brasília (UnB) sobre ética e uso de animais. Todos os estudos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (CEUA/UnB número 022/2020). Espécimes adultos foram mantidos em biotério (ZebTec – Tecniplast, Itália) na UnB com osmose reversa, água purificada com carvão ativado e fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro). Os parâmetros da água foram rigorosamente controlados: temperatura mantida em  $26,0 \pm 1$  °C, condutividade em  $650 \pm 100$   $\mu$ S  $\text{cm}^{-1}$ , pH em  $7,0 \pm 0,5$  e saturação de oxigênio  $\geq 95\%$ . Os embriões foram coletados e após a eclosão, foram colocados dentro de frascos Eppendorf e incubados com

o **BTD-CHO** (10  $\mu\text{M}$ ) por 3 h. Outro grupo de embriões foi pré-fixado em formaldeído a 3,7% por 1 h em temperatura ambiente, lavado três vezes com água e incubado com **BTD-CHO** (10  $\mu\text{M}$ ) por 3 h em temperatura ambiente. Para **BTD-HZN**, 10  $\mu\text{M}$  de solução de hidrazina foram adicionados após a incubação com **BTD-CHO**. Para experimentos de controle negativo, um grupo de amostras foi incubado apenas com água. O ensaio foi analisado usando um microscópio confocal de varredura a laser. O BODIPY comercialmente disponível também foi analisado pela mesma metodologia.

## **Capítulo 3**

### **Resultados e Discussão**

Conforme recente revisão,<sup>61</sup> as estruturas baseadas em BTD constituem uma nova classe de marcadores de LDs que são muito superiores aos corantes fluorogênicos típicos usados para colorir seletivamente essas organelas. Diferentes estratégias de arquitetura molecular foram aplicadas para gerar novos marcadores fluorescentes BTD capazes de colorir LDs, como visto nas estruturas já conhecidas e mostradas no Esquema 2. Em 2014, nosso grupo publicou o primeiro fluoróforo BTD com esse objetivo,<sup>106</sup> e desde então, muitos outros grupos desenvolveram e aplicaram com sucesso derivados BTD como marcadores fluorescentes para coloração específica de LDs (consulte as referências na referência 61 para mais exemplos). O conhecimento adquirido por esses trabalhos permitiu-nos projetar, sintetizar e aplicar uma nova estrutura BTD que é projetada especificamente para marcar LDs, conforme discutido aqui. No entanto, nenhuma das estruturas BTD descritas anteriormente poderia ser aplicada para marcar LDs e detectar hidrazina em soluções ou dentro de células, ou seja, uma nova sonda de dupla função. O novo corante fluorogênico, denominado **BTD-CHO**, foi projetado para ter um grupo doador de um lado do heterociclo receptor de elétrons BTD e um sítio reativo para detectar a hidrazina como um derivado fluorescente do outro lado, conforme ilustrado no Esquema 2.



**Esquema 2.** (A) Síntese e (B) Arquitetura molecular relacionada a um sensor de hidrazina baseado no heterociclo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) (em cinza). Observe que a água é o subproduto da reação usando hidrazina como reagente (analito). A estrutura cristalina de raios-X de **BTD-CHO** com elipsoides térmicos no nível de probabilidade de 50% (número de referência CCDC: 2064478) é mostrada. (C) Exemplos de estruturas baseadas em BTD conhecidas aplicadas como marcadores seletivos de gotículas lipídicas.

A reação de acoplamento de Suzuki produziu o corante fluorogênico desejado (**BTD-CHO**) com rendimento de 82% após purificação. O grupo doador MeOPh foi incorporado para facilitar a transferência de carga intramolecular (ICT) do primeiro estado excitado,<sup>108-111</sup> resultando em uma estrutura típica D-A (doador-aceptor). Por outro lado, a reação com ácido 4-formilfenilborônico permitiu a incorporação de um ligante  $\pi$  (ou seja, um anel fenil como espaçador) e o sítio reativo (aldeído) além do núcleo BTD (Esquema 2). Ao tratar o **BTD-CHO** com solução aquosa de hidrazina, o derivado denominado **BTD-HZN** foi obtido com rendimento quase quantitativo, sendo a água o único subproduto desta reação. A síntese deste derivado de hidrazona foi realizada principalmente para permitir a comparação fotofísica básica entre essas duas estruturas.

A confirmação da formação dos compostos **BTD-CHO** e **BTD-HZN** foi realizada através de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e espectrometria de massas de alta resolução. Os resultados são apresentados nas Figuras 2-7.

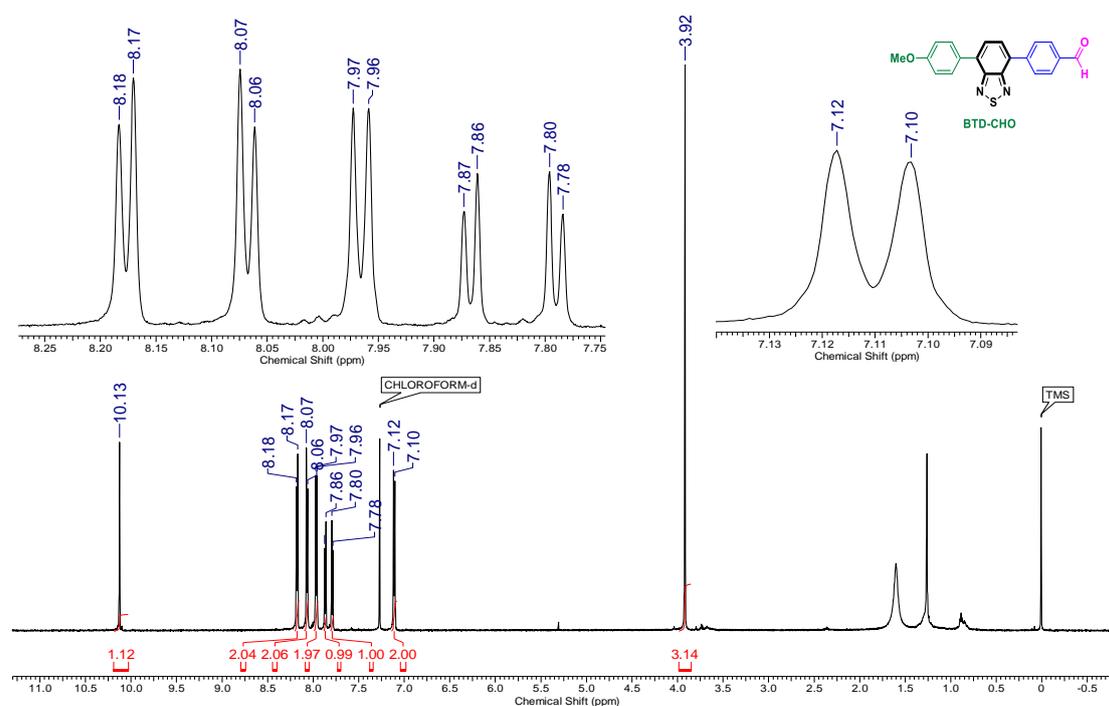


Figura 2.  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do sensor denominado **BTD-CHO**.

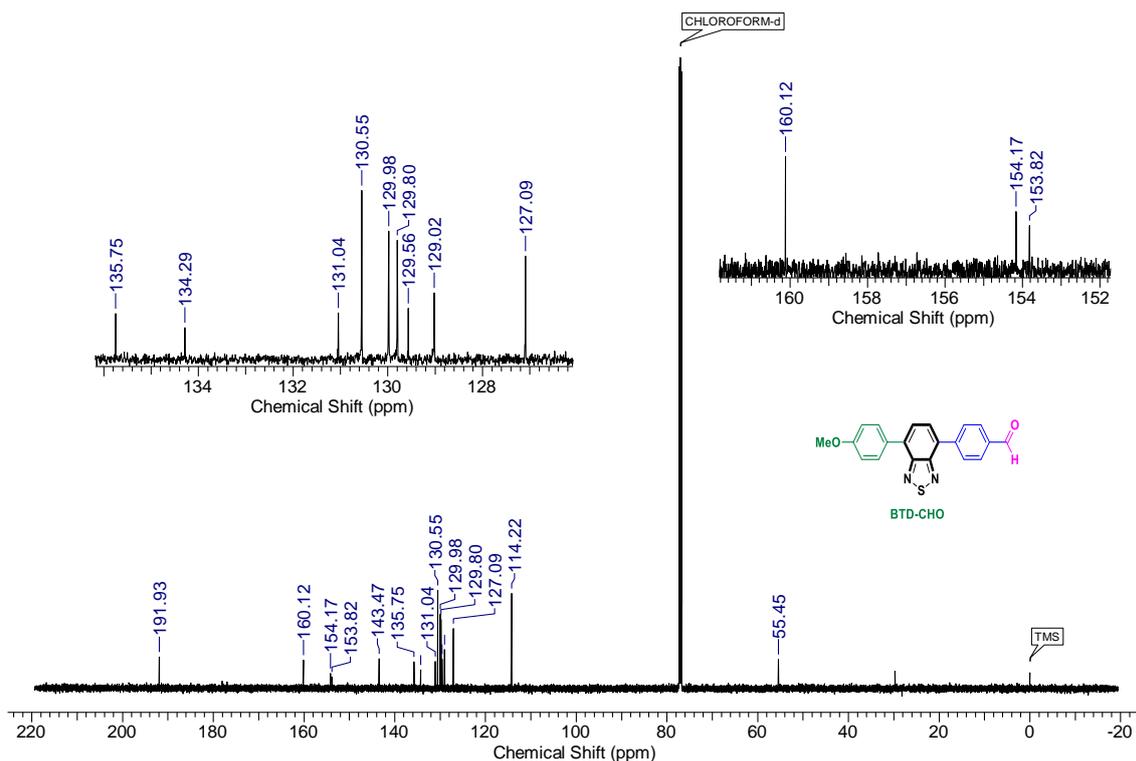


Figura 3. <sup>13</sup>C RMN (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do sensor denominado **BTD-CHO**.

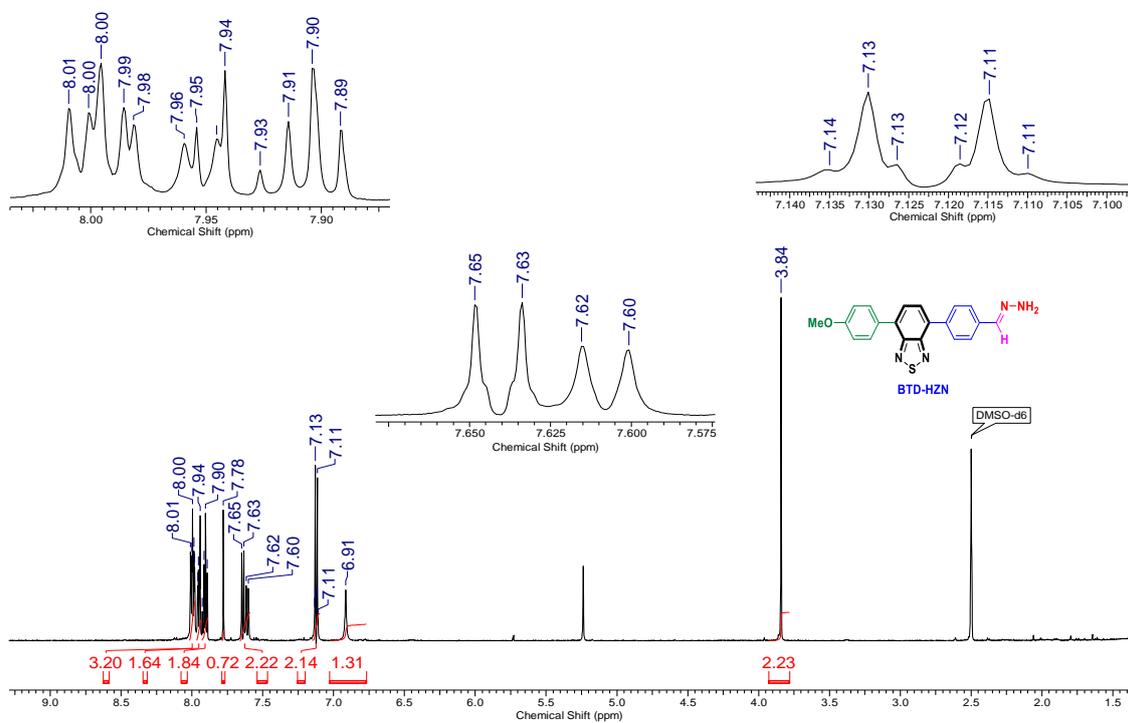


Figura 4. <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do corante denominado **BTD-HZN**.

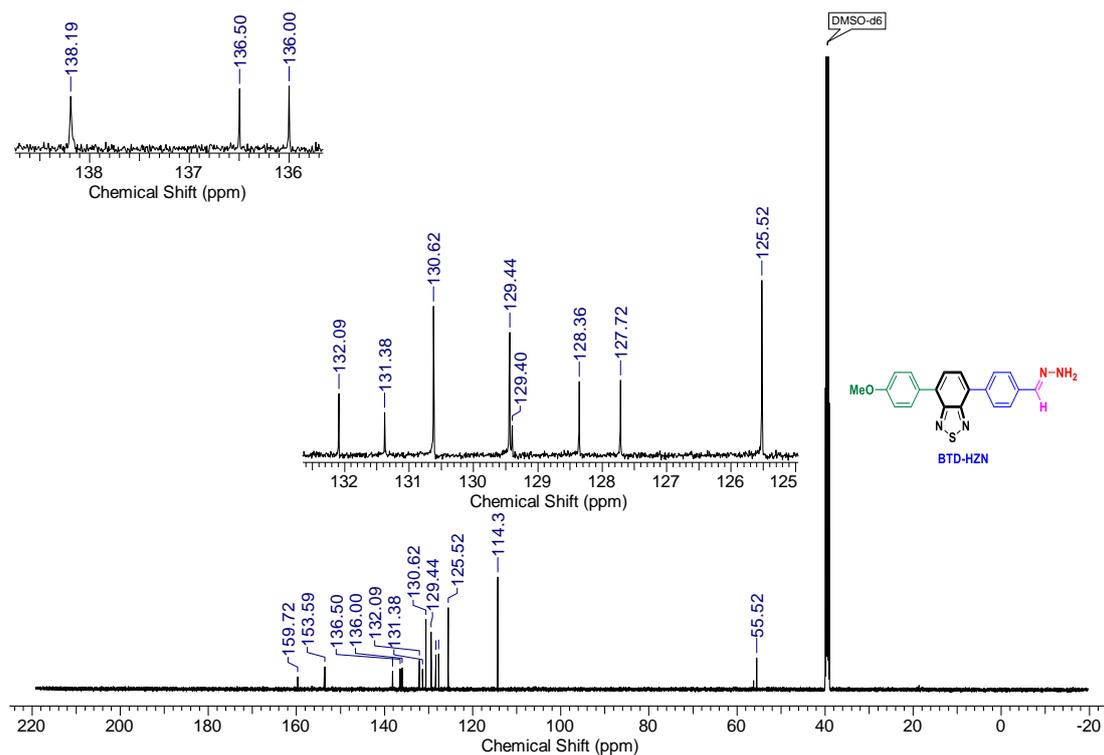


Figura 5.  $^{13}\text{C}$  RMN (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do corante denominado BTD-HZN.

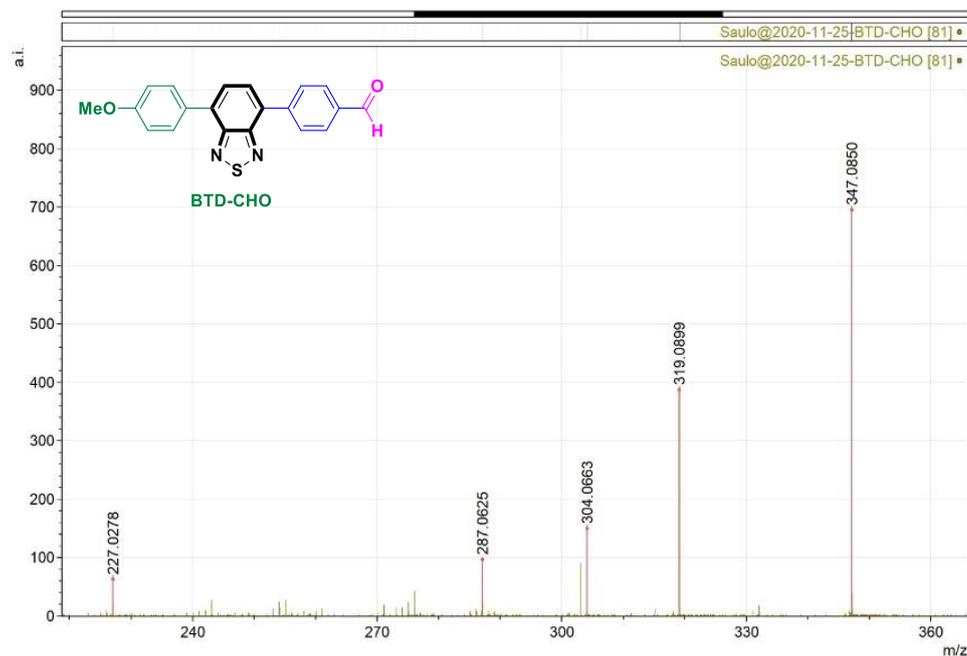
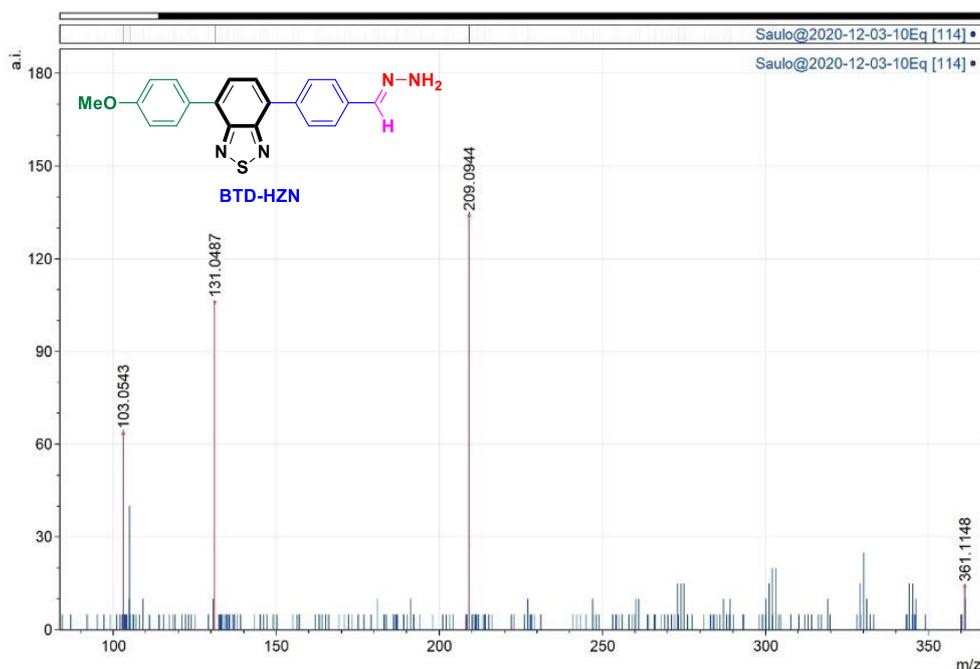
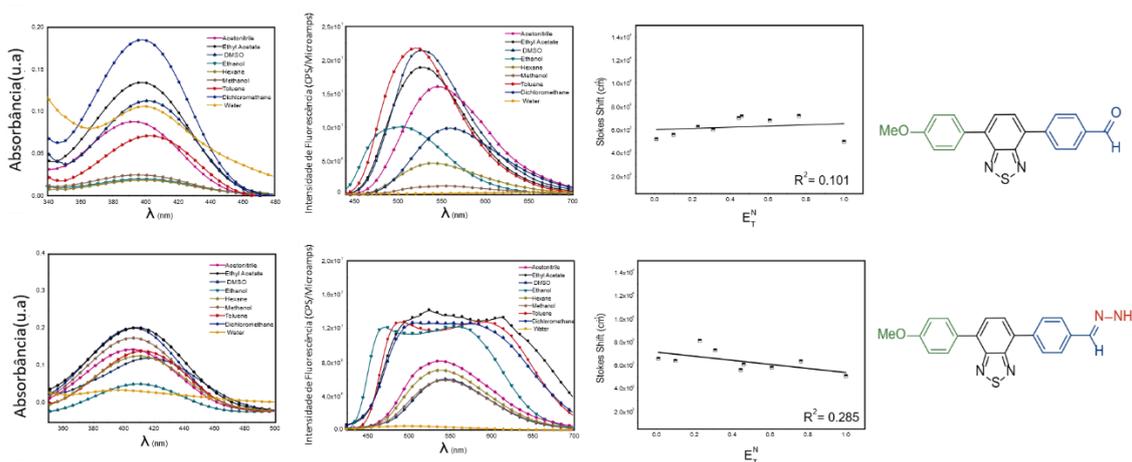


Figura 6. ESI(+)-MS/MS da estrutura BTD-CHO protonada ( $m/z$  347). Calculado para  $[\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$ , 347,0854. Encontrado, 347.0846. Erro = -2,3 ppm.



**Figura 7.** ESI(+)-MS/MS do **BTD-HZN** protonado ( $m/z$  361). Calculado para  $[C_{20}H_{16}N_4OS+H]^+$ , 361,1123. Encontrado, 361,1153. Erro = 6,9 ppm.

Após uma caracterização completa de ambas as estruturas, suas propriedades fotofísicas foram avaliadas e comparadas (Figura 8 e Tabela 2).



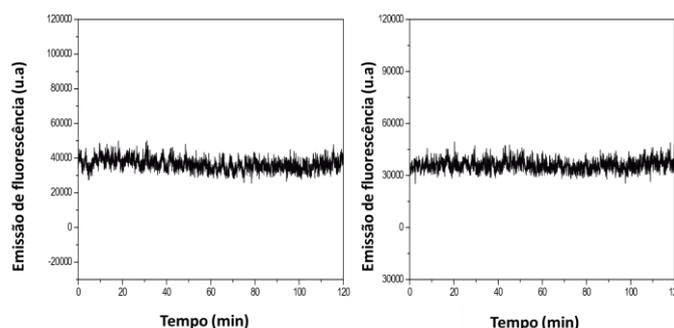
**Figura 8.** UV-Vis (esquerda), fluorescência (centro) e efeito solvatocrômico (parâmetros de Reichardt, direita) das BTDs sintetizados (**BTD-CHO** e **BTD-HZN**). 10  $\mu$ M para todas as análises.

Ambas as estruturas exibiram efeitos solvatocrômicos, particularmente em seus comprimentos de onda de emissão. De forma geral, os dois corantes apresentaram grandes deslocamentos de Stokes e coeficientes de extinção (expressos como  $\log \epsilon$ ), indicando eficiente transferência de carga intramolecular (ICT) e absorção de luz, respectivamente. Adicionalmente, deslocamentos de Stokes com valores elevados ( $> 100$  nm) mostram-se vantajosos ao evitar qualquer perda de luminosidade proveniente da fonte de excitação. Valores maiores de rendimentos quânticos fluorescentes foram observados em solventes menos polares (como tolueno) e apolares (como hexano), enquanto solventes polares (próticos e apróticos) apresentaram valores semelhantes. Ambos os corantes exibiram emissão dependente do solvente, indicando o efeito solvatocrômico em suas estruturas, principalmente no estado excitado. Em solventes polares, as emissões sofreram um desvio para o vermelho, especialmente para o derivado **BTD-CHO**.

**Tabela 2.** Dados de UV-Vis e fluorescência coletados para **BTD-CHO** e **BTD-HZN**. Todas as análises foram realizadas usando soluções de concentração 10  $\mu$ M.

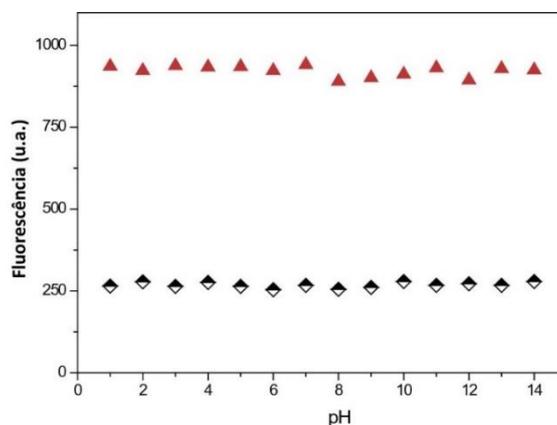
	Solvente	$\lambda_{\max}$ abs (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{\max}$ em (nm)	Deslocamentos de Stokes (nm/cm <sup>-1</sup> )	Rend. quântico (%)
<b>BTD-CHO</b>	AcOEt	398	4.13	530	132/6258	12
	Acetonitrila	392	3.94	545	153/7162	10
	DMSO	402	4.05	560	158/7018	16
	Diclorometano	399	4.27	525	126/6015	11
	Etanol	395	3.29	540	145/6798	12
	Hexano	400	3.27	505	105/5198	20
	Metanol	394	3.39	550	156/7199	15
	Água	401	4.02	501	100/4978	02
	Tolueno	403	3.85	520	117/5583	30
<b>BTD-HZN</b>	AcOEt	409	4.31	612	203/8110	13
	Acetonitrila	405	4.16	537	132/6069	05
	DMSO	417	4.09	544	127/5598	05
	Diclorometano	405	4.31	575	170/7300	12
	Etanol	410	4.11	538	128/5803	04
	Hexano	410	3.72	561	151/6565	34
	Metanol	406	4.24	543	141/6349	04
	Água	397	3.56	497	100/5068	01
	Tolueno	412	4.14	559	147/6383	18

A fotoestabilidade de ambas as sondas foi investigada sob irradiação de luz constante (254 nm), e os corantes planejados mostraram-se muito estáveis (Figura 9).



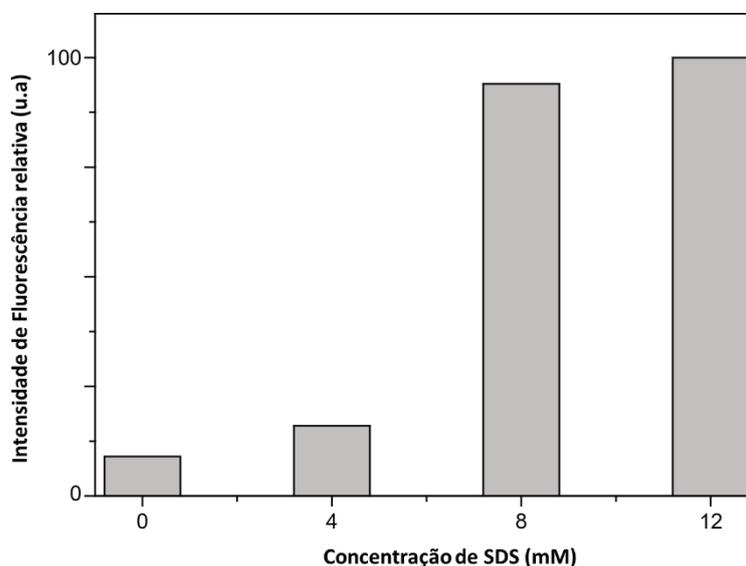
**Figura 9.** Fotoestabilidade dos corantes sintetizados ( $10 \mu\text{M}$ ) adquiridos à temperatura ambiente mediante excitação a 254 nm enquanto monitora a emissão nos máximos de emissão de cada molécula em soluções aquosas. A dependência do tempo da intensidade da fotoluminescência foi realizada com uma lâmpada Xe (400 W). (Esquerda) **BT-D-HZN** (Direita) **BT-D-CHO**.

Os efeitos do pH também foram avaliados, e os dois BT-Ds mostraram pouca ou nenhuma mudança significativa em uma ampla faixa de valores de pH (Figura 10).



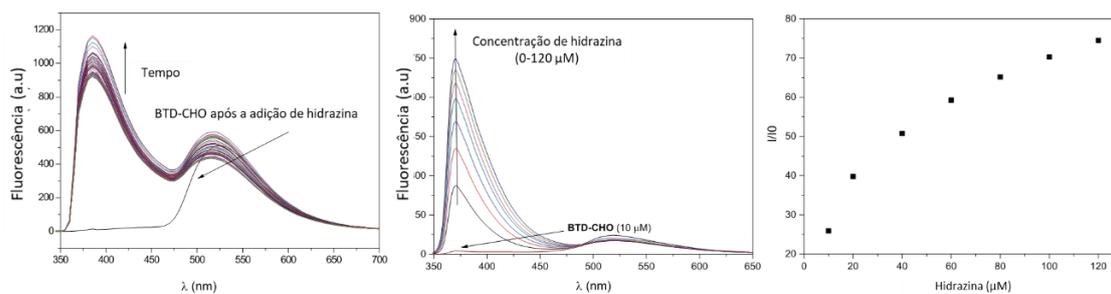
**Figura 10.** Efeito do pH sobre a emissão de fluorescência dos corantes **BT-D-CHO** (preto) e **BT-D-HZN** (vermelho). Concentração:  $10 \mu\text{M}$ .

Esse comportamento é semelhante as BTDs fluorescentes relatadas anteriormente por nós<sup>107</sup> e por outros.<sup>76,79</sup> Dado o caráter lipofílico do sensor químico (**BTD-CHO**), a biossonda foi submetida ao teste SDS,<sup>63,89,103,106,112</sup> para verificar o efeito conhecido como *light-up* (aumento da intensidade de emissão) em meios lipofílicos (Figura 11), como um prelúdio para o comportamento celular. Ao atingir a CMC (concentração micelar crítica) do SDS ( $\approx 8$  mM), foi observado um aumento de 11 vezes na intensidade da emissão, indicando uma resposta eficiente dentro dos sistemas biológicos.



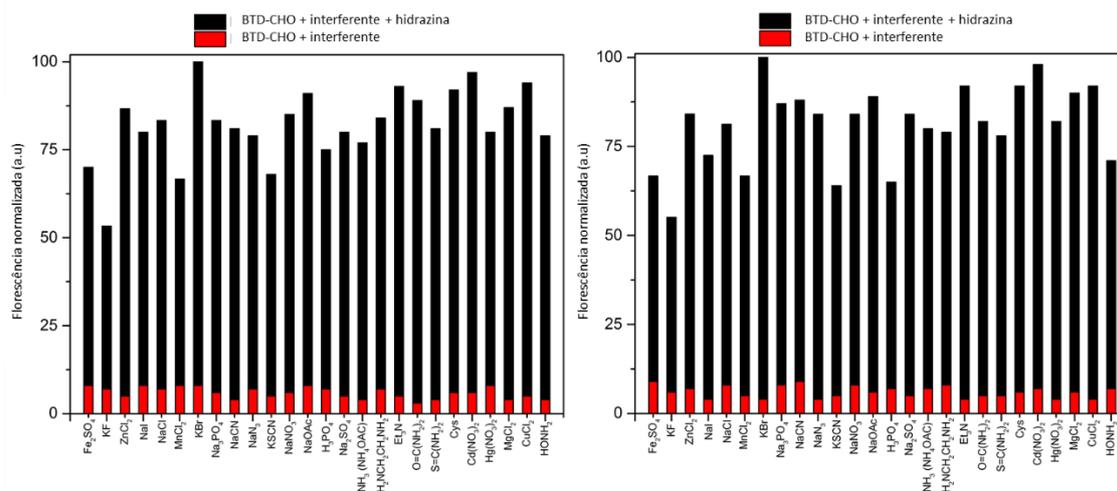
**Figura 11.** **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) antes e depois da adição de SDS (CMC = 8 mM). A intensidade de emissão do corante é 11 vezes maior quando comparada com a emissão na ausência de SDS.

Na presença de hidrazina, observa-se o comportamento esperado e uma rápida reação ocorre (Figura 12). É claramente observada a formação rápida de **BTD-HZN** após adição de uma solução de hidrazina (10  $\mu$ M). Ao aumentar a concentração do analito de 0 a 120  $\mu$ M, a fluorescência exibe um crescimento exponencial em sua intensidade de emissão (Figura 12).



**Figura 12.** BTD-CHO (10  $\mu\text{M}$ ) em soluções de tampão fosfato (pH = 7,0) antes e depois da adição de hidrazina (0-120  $\mu\text{M}$ ). A reação foi rápida, como esperado, e em poucos minutos ( $\approx$  30 min) notou-se o consumo total do corante resultando em **BTD-HZN**. (Esquerda) Adição de hidrazina (10  $\mu\text{M}$ ) e monitoramento rápido do consumo de BTD-CHO por um período de dez min. (Centro) Aumento da fluorescência após a adição do analito (hidrazina). (Direita) Intensidade de fluorescência em função da concentração do analito. Comprimento de onda de excitação a 340 nm.

A seletividade de **BTD-CHO** para a detecção de hidrazina foi verificada na presença de possíveis íons interferentes comumente usados para verificar essa tendência (Figura 13). É observada uma resposta específica e rápida para o analito desejado, indicando uma detecção rápida e eficiente de hidrazina, mesmo na presença de outras espécies interferentes (Figura 13). O experimento foi realizado utilizando 1 e 10 equivalentes de outras espécies químicas para garantir a preferência pela detecção do analito ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ). Todas essas espécies são comumente observadas em ambientes biológicos, indicando que o sensor desenvolvido é provavelmente útil como uma sonda fluorescente no ambiente celular ou em condições in vivo de modelos multicelulares.



**Figura 13.** BTD-CHO (10  $\mu$ M) em soluções de tampão fosfato (pH = 7,0) na presença de ambas as espécies interferentes (1 e 10 equivalentes, respectivamente) e hidrazina (10  $\mu$ M). Observe que independente da presença de outros analitos, a formação de **BTD-HZN** é sempre favorecida e rápida. Comprimento de onda de excitação em 340 nm e monitoramento em 375 nm.

Se espera que a reação com o analito seja rápida, já que a hidrazina é geralmente um nucleófilo forte. Conforme observado na Figura 12, o derivado de hidrazona é detectado com uma concentração considerável em solução após alguns minutos. Algumas informações adicionais, contudo, devem ser apresentadas sobre a hidroxilamina como um possível interferente. Embora essa informação não seja evidente na Figura 13, monitoramos a reação com esse nucleófilo na ausência de hidrazina. A formação de oxima foi observada, mas a reação foi consideravelmente mais lenta em comparação com a formação de hidrazona. Assim, a presença de hidroxilamina não é, em princípio, um problema para monitorar a hidrazina. Esse resultado não é surpreendente, considerando a maior nucleofilicidade da hidrazina em comparação com a da hidroxilamina, conforme discutido na literatura.<sup>113</sup> Muitos sensores seletivos de hidrazina anteriormente relatados (como exemplos, consulte as referências 2,18,24,26)

não discutem a interferência da hidroxilamina, e a reação lenta com esse possível interferente pode ser a principal razão.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) para o sensor desenvolvido foram determinados usando um procedimento padrão previamente descrito<sup>114-116</sup> (Figura 14) e determinados pelas seguintes equações:

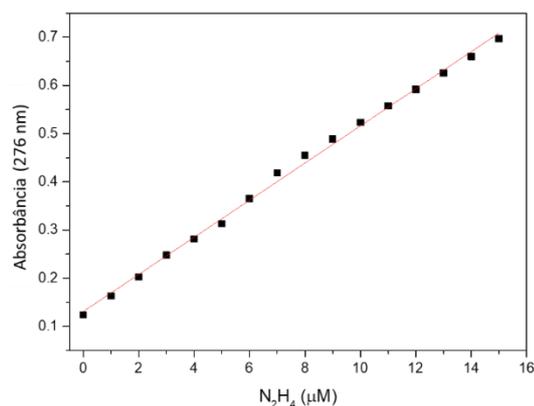
$$LOD = \frac{3\sigma}{m} = \frac{3(4.5 \times 10^{-3})}{3.9 \times 10^4} = 3.4 \times 10^{-7} M = 10 \text{ ppb}$$

e

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} = \frac{10(4.5 \times 10^{-3})}{3.9 \times 10^4} = 1.1 \times 10^{-6} M = 37 \text{ ppb}$$

Onde,  $\sigma$  é o erro padrão da interceptação y da linha de regressão, m é a inclinação da curva de calibração. Um valor de LOD e LOQ de  $3,4 \times 10^{-7} M$  e  $1,1 \times 10^{-6} M$ , respectivamente, foi estimado usando essas equações, o que corresponde a 10,9 ppb e 37,1 ppb de hidrazina, respectivamente.

Conforme ilustrado na Tabela 3, a sonda projetada está entre as mais sensíveis sintetizadas até agora e pode detectar com eficiência até 10 ppb. Esses resultados também sugerem uma aplicação promissora do **BTD-CHO** como sensor de bioimagem onde baixas concentrações são detectadas.



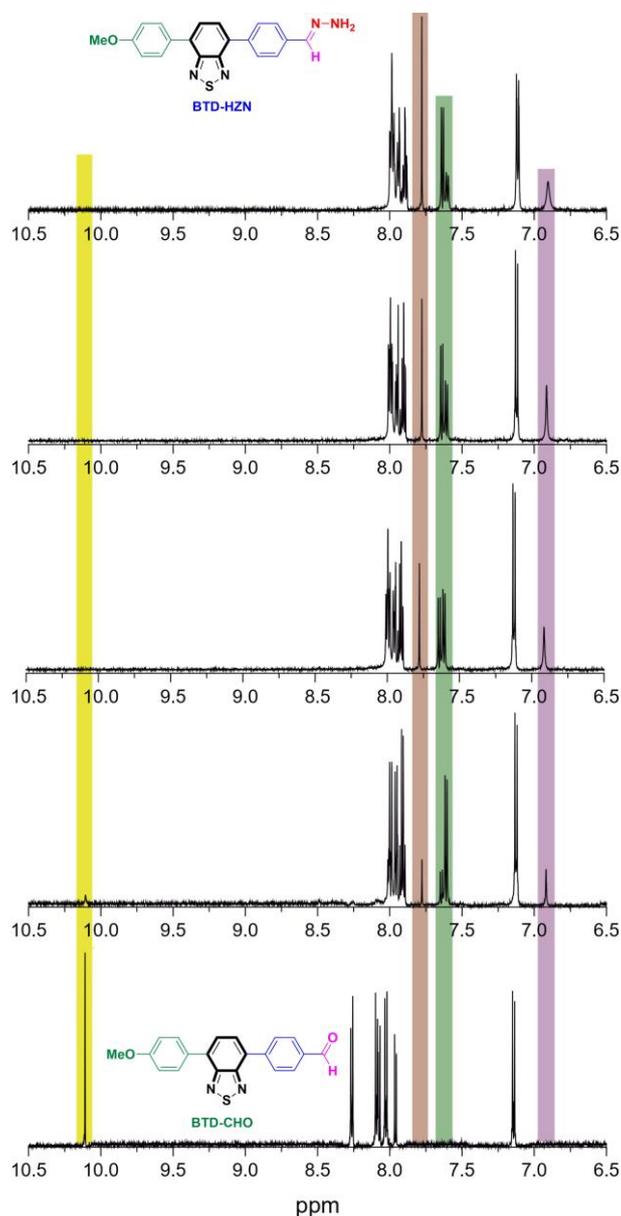
**Figura 14.** Curva de calibração (UV-Vis) monitorada a 276 nm durante a titulação com hidrazina aquosa (50%) e uma solução de DMSO com o sensor **BTD-CHO** (1,0 µM). Concentração de N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> na faixa de 1 a 15 µM. R<sup>2</sup> = 0,997.

**Tabela 3.** Limite de detecção de alguns sensores seletivos de N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> disponíveis e deste trabalho.

Sensor	LOD	Referência
Sensor derivado de cumarina	≈ 3 ppb	111
Sonda a base de naftalimida	10 ppb	30
Derivado de 4 <i>H</i> -cromeno	≈ 6 ppb	31
Derivado de 1,8-naftaleno imida	9,40 nM	29
UiO-66 MOF à base de ftalimida	≈ 9 ppb	111
Sonda à base de benzimidazol	≈ 2 ppb	22
Sonda à base de cumarina	69 nM	19
Derivados de <i>Carbon dots</i>	≈ 16 ppb	111
Sensor à base de 2,3-dihidro-1 <i>H</i> -xanteno	≈ 5 ppb	18
Sensor à base de benzotiadiazola	≈ 10 ppb	Este trabalho

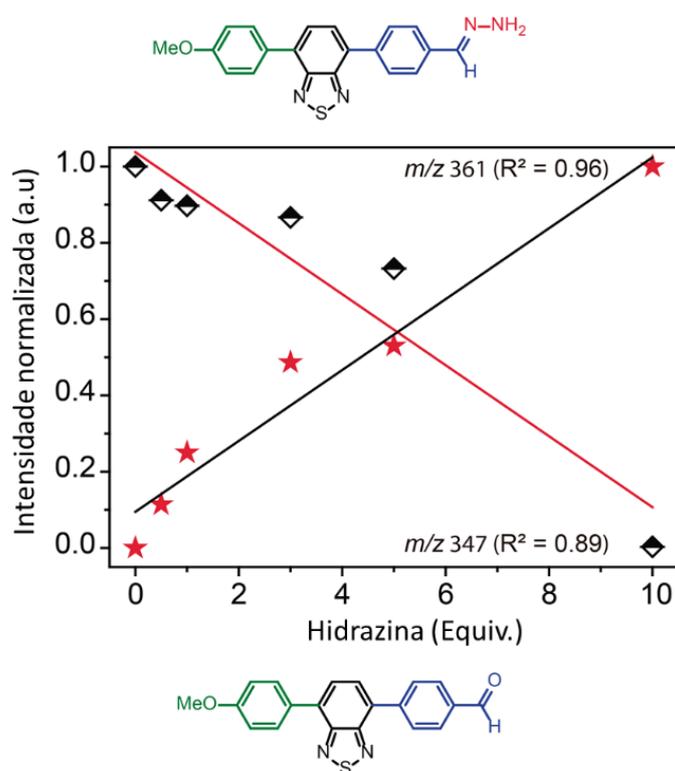
A espectroscopia de RMN foi empregada para monitorar a reação entre o sensor **BTD-CHO** e o analito, resultando no derivado fluorescente **BTD-HZN**. O isolamento prévio desses dois corantes BTD permitiu uma atribuição inequívoca de seus deslocamentos e sinais químicos (conforme a Figura 15). As titulações de RMN foram realizadas tratando o sensor **BTD-CHO** com 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 equivalentes de hidrazina (50% em solução aquosa) em DMSO-*d*<sub>6</sub> como solvente, a fim de acompanhar a formação do derivado (**BTD-HZN**). A partir da Figura 15, pode-se observar que há rápida formação do analito derivado logo

após a primeira adição de hidrazina (1,0 equivalente). Um sinal característico é o singlete a 10,2 ppm (hidrogênio do aldeído), que é consumido na reação. No final, apenas o derivado fluorogênico **BTD-HZN** é encontrado na solução analisada.



**Figura 15.** Experimentos de titulação de <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) foram conduzidos para monitorar a reação entre **BTD-CHO** (concentração inicial: 30 mg mL<sup>-1</sup>) e hidrazina, resultando na formação do derivado fluorescente **BTD-HZN**. A hidrazina foi adicionada à solução do sensor em quantidades crescentes (de baixo para cima) de 0,0, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 equivalentes.

A técnica ESI(+)-MS(/MS) é amplamente utilizada para monitorar mecanismos de reação devido à sua capacidade de transferir suavemente íons da solução para a fase gasosa, permitindo assim, a determinação precisa de espécies químicas em solução.<sup>117-119</sup> Além disso, intermediários transientes de reação também podem ser detectados e caracterizados, indicando a eficiência, robustez e rapidez da detecção por ESI.<sup>120-123</sup> Ao monitorar a reação, foi obtido um perfil claro, e ambos os sinais dos derivados protonados ( $[\text{BTD-CHO}+\text{H}]^+$  e  $[\text{BTD-HZN}+\text{H}]^+$ ) foram eficientemente acompanhados por ESI(+)-MS (conforme a Figura 16).



**Figura 16.** Experimentos de ESI(+)-MS foram conduzidos para monitorar a reação entre o sensor **BTD-CHO** (10  $\mu\text{M}$ ) e hidrazina, resultando na formação do derivado **BTD-HZN**. Os dois derivados foram detectados como íons protonados com valores de  $m/z$  347 e 361, respectivamente.

A reatividade e seletividade do **BTD-CHO** em relação à hidrazina não é surpreendente, considerando a alta atividade do  $N_2H_4$  em reações com derivados carbonilados (aldeídos e cetonas) em ambientes celulares ou com biomoléculas.<sup>124-126</sup> É bem conhecido que a hidrazina pode reagir rapidamente com biomoléculas carboniladas e metabólitos, formando derivados de hidrazona na presença de  $N_2H_4$ .<sup>127-129</sup> Como resultado, foram desenvolvidas algumas sondas fluorescentes baseadas nesta estratégia de se incorporar hidrazina em sua estrutura (ou seja, formar um  $R-NHNH_2$ , onde R é parte da estrutura básica do fluoróforo) para monitorar a presença de derivados de carbonila nas células.<sup>130-132</sup>

Cálculos DFT foram empregados neste estudo para esclarecer as propriedades fotofísicas dos dois corantes sintetizados. Os dados experimentais obtidos foram então investigados teoricamente por meio de cálculos DFT para uma melhor compreensão da fotofísica observada após otimizações geométricas nos estados fundamental ( $S_0$ ) e primeiro excitado ( $S_1$ ). Foram realizados cálculos TD-DFT para as energias de transição eletrônica  $S_0 \rightarrow S_1$  mais baixas dos fluoróforos BTD para selecionar o melhor DFT, que fosse mais funcional, para descrever os resultados experimentais. O funcional de troca-correlação híbrida separada por intervalo CAM-B3LYP retornou a melhor correlação com  $\lambda_{max}$  experimental. Funcionais corrigidos de longo alcance, como LC- $\omega$ HPBE, CAM-B3LYP ou  $\omega$ B97XD, também foram testados, mas apresentaram erros de superestimação mais elevados. Apesar de algumas imprecisões quantitativas (conforme a Tabela 4) esperadas, o TD-DFT foi capaz de reproduzir a tendência geral das energias de transição com boa concordância. Os resultados revelaram que o funcional CAM-B3LYP previu valores com desvios reduzidos dos

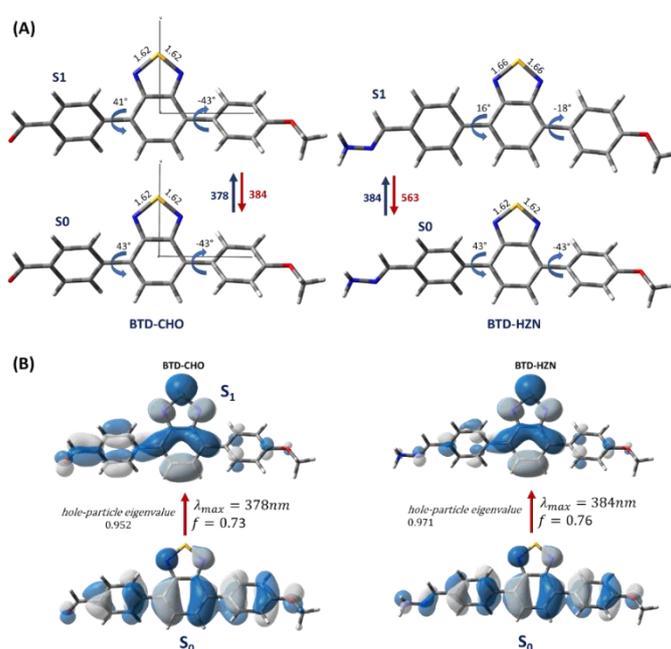
comprimentos de onda de absorção relatados experimentalmente e foi, portanto, adotado para discussões posteriores.

**Tabela 4.** Comparação dos resultados de TD-DFT empregando diferentes funcionais de Correlação de Troca (XC) associados à menor energia de absorção. A linha vermelha horizontal representa o  $\lambda_{max}$  determinado experimentalmente em acetonitrila.

<b>BTD-CHO</b>			
<b>XC-Funcional</b>	<b><math>S_0 \rightarrow S_1</math> energia de excitação (eV)</b>	<b><math>\lambda_{max}</math> absorção Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Força do oscilador (<i>f</i>)</b>
B3LYP	2,69	461	0,54
CAM-B3LYP	3,25	381	0,75
LC- $\omega$ PBE	3,63	341	0,90
M06	2,81	441	0,60
M062X	3,31	375	0,79
M11	3,56	348	0,89
PBE1PBE	2,82	439	0,59
$\omega$ B97XD	3,30	375	0,77
<b>BTD-HZN</b>			
B3LYP	2,59	478	0,52
CAM-B3LYP	3,19	389	0,78
LC- $\omega$ PBE	3,59	346	0,98
M06	2,73	455	0,60
M062X	3,24	382	0,84
M11	3,51	353	1,00
PBE1PBE	2,73	454	0,59
$\omega$ B97XD	3,28	378	0,82

Na Figura 17(A), é ilustrada a estrutura molecular de ambos os corantes BTD em seus estados eletrônicos  $S_0$  e  $S_1$ , juntamente com os comprimentos de onda máximos de absorção e emissão correspondentes, derivados dos cálculos CAM-B3LYP/6-311+G(d,p). Em seus estados fundamentais, ambos os corantes exibem geometrias semelhantes, conforme observado nos ângulos de torção de diedro selecionados na Figura 17(A). No entanto, após a excitação para o estado  $S_1$ , o derivado **BTD-HZN** apresenta uma tendência para uma geometria mais planarizada em relação à torção dos anéis capeados no núcleo BTD, explicando a emissão de fluorescência mais intensa observada para este derivado. Na Figura 18, comparamos as geometrias fundamentais e do primeiro estado

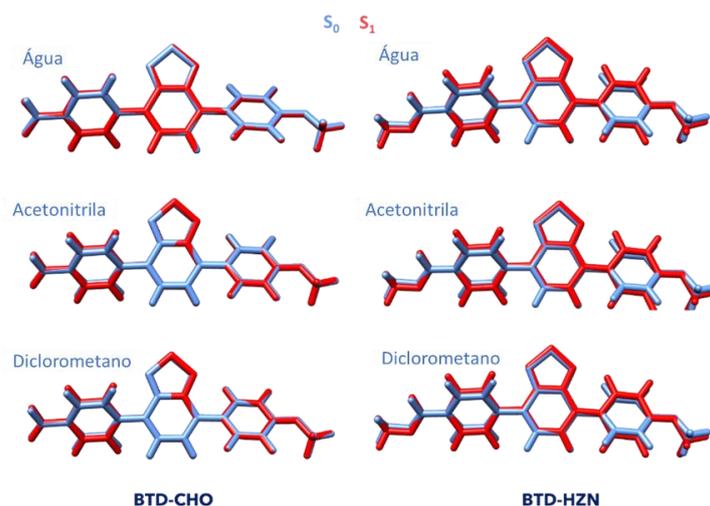
excitado dos corantes em diferentes solventes. O **BTD-CHO** em água não apresenta relaxamento de geometria, enquanto em meios menos polares, como acetonitrila e diclorometano, esse efeito foi observado. O **BTD-HZN** exhibe relaxação da geometria do estado excitado em todos os solventes, resultando em uma estrutura menos torcida devido a um efeito ICT mais forte. Esses achados podem ser associados aos menores deslocamentos de Stokes observados nas medições fotofísicas em meios polares próticos.



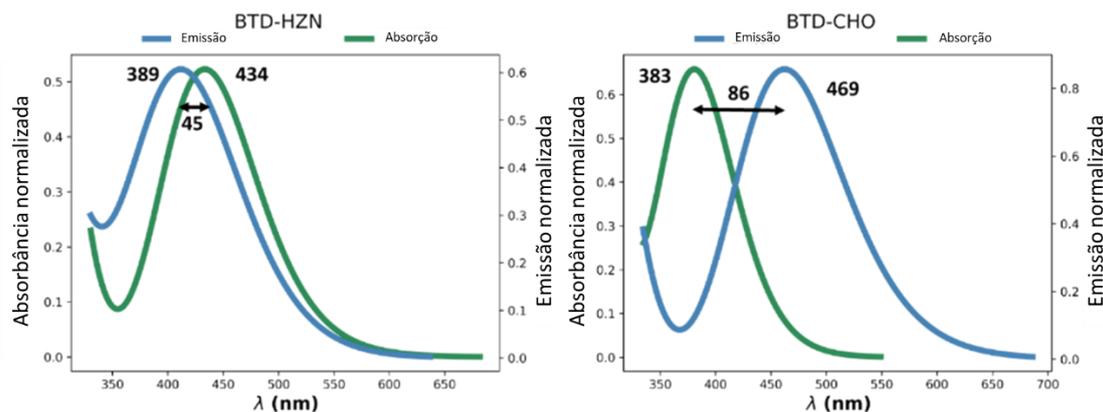
**Figura 17.** (A) Base ( $S_0$ ) e primeira ( $S_1$ ) estruturas otimizadas de **BTD-CHO** e **BTD-HZN** em água, comprimentos de ligação selecionados (em Å) e ângulos diedros de torção (em graus) em relação ao núcleo BTD. (B) CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) Orbitais de Transição Natural associados à transição eletrônica  $S_0 \rightarrow S_1$  para os corantes BTD em água (IEF-PCM).

Conforme ilustrado na Figura 17(B), a transição responsável pelos máximos de absorção ocorre entre os níveis HOMO e LUMO, levando a autovalores buraco-partícula próximos da unidade quando associados aos NTOs (*Natural Transition Orbitals*, do inglês). Os NTOs destacaram a forte participação

do heterociclo aceitador BTB como o grupo retirador de elétrons (EWG), acumulando a densidade de carga principalmente no lado aldeído do fluoróforo. É importante observar que, na Figura 17(B), para o **BTB-HZN**, ambos os substituintes BTB doam densidade de carga para o núcleo BTB, aumentando assim o caráter ICT de **BTB-HZN** em comparação com o **BTB-CHO**. Isso explica a transição  $S_0 \rightarrow S_1$ . A excitação de ambos os corantes confere uma perda parcial do caráter quinoide BTB pelo alongamento das ligações N-S no estado excitado devido ao papel EWG desempenhado pela estrutura heterocíclica BTB (ver Figura 17(A)). A Figura 19 mostra que o modelo químico empregado explica os deslocamentos teóricos de Stokes seguindo as tendências observadas nos experimentos. A absorção teórica e as formas de banda de emissão se sobrepõem menos significativamente para o derivado de hidrazina **BTB-HZN** do que para o sensor **BTB-CHO**, o que pode ser atribuído aos efeitos ICT mais fortes do primeiro.

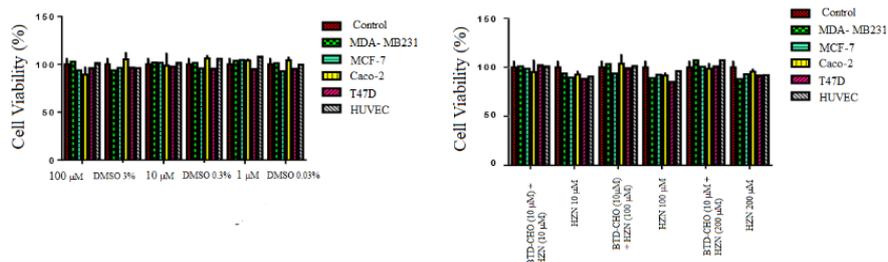


**Figura 18.** Sobreposição das geometrias do estado fundamental ( $S_0$ ) e do primeiro estado excitado ( $S_1$ ) em diferentes solventes para **BTB-CHO** e **BTB-HZN**.

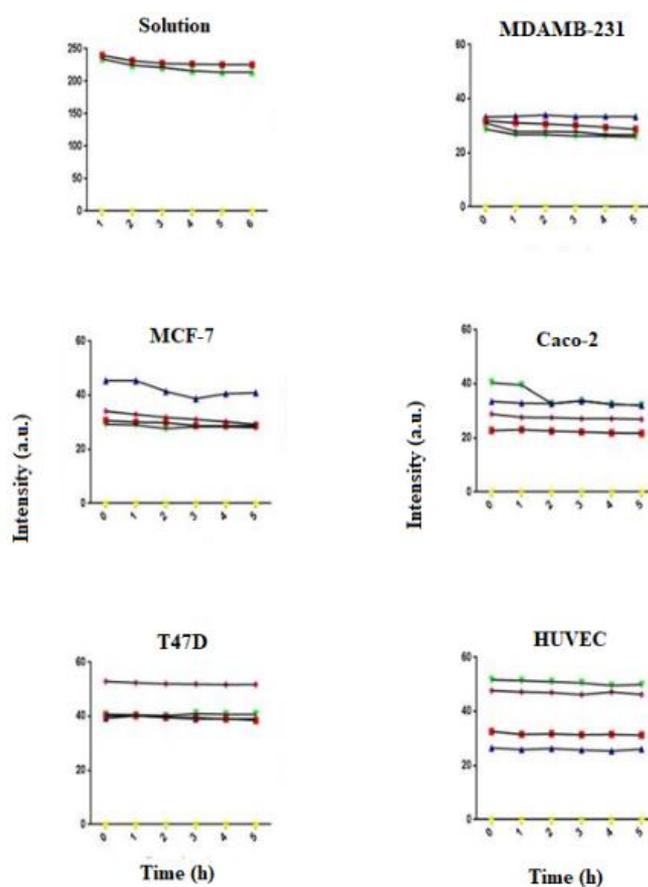


**Figura 19.** Espectros de absorção e emissão CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) dos corantes BTDs em acetonitrila (IEF-PCM) associados às transições eletrônicas  $S_0 \rightarrow S_1$  de menor energia.

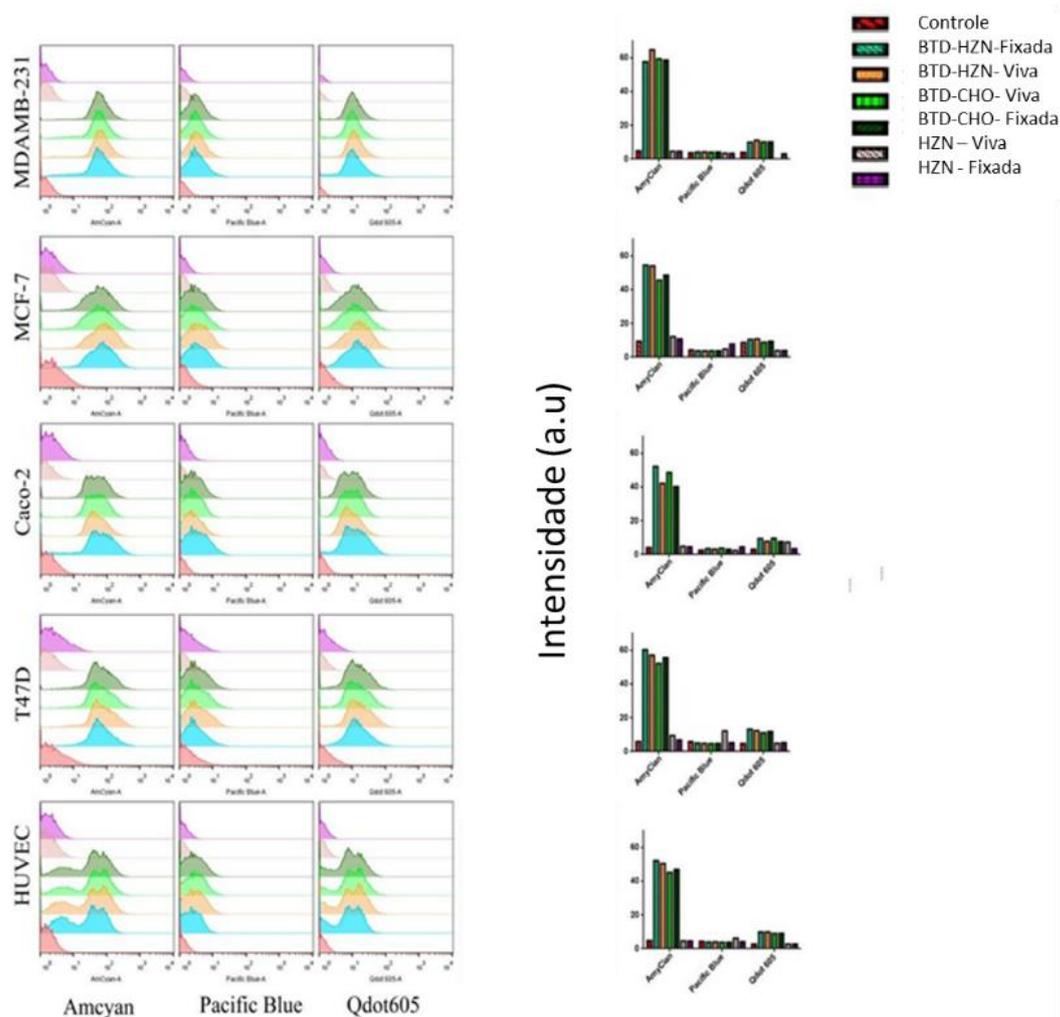
Antes de aplicar os sensores de bioimagem em células vivas e modelos in vivo, foram realizados ensaios de citotoxicidade MTT (do inglês, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) para avaliar o potencial de toxicidade das sondas (Figura 20). Os ensaios mostraram que ambas as sondas não apresentaram efeitos deletérios nas células em várias concentrações e em várias linhagens celulares. Também foram realizados ensaios de fotoestabilidade para verificar a possibilidade de realizar experimentos de bioimagem sem desvanecimento ou fotobranqueamento dos sensores desenvolvidos por longos períodos de irradiação (Figura 21). As estruturas fluorogênicas desenvolvidas apresentaram rápida internalização celular (analisada durante 30 min) e sua boa emissão celular foi medida por experimentos de citometria de fluxo (Figura 22). Ambos os corantes emitiram sinais intensos quando comparados a três padrões disponíveis comercialmente, indicando que os corantes desenvolvidos têm aplicações práticas promissoras devido às suas excelentes relações sinal-ruído. Esses resultados também estão em total concordância com os dados fotofísicos experimentais e calculados discutidos anteriormente.



**Figura 20.** Ensaios de viabilidade celular (MTT) após 24 h para o **BTD-CHO** (à esquerda) e **BTD-HZN** formado in situ (à direita). A barra gráfica não mostra efeito citotóxico estatisticamente significativo após 24 h de incubação para os compostos testados em soluções em diferentes concentrações (1-100  $\mu$ M).



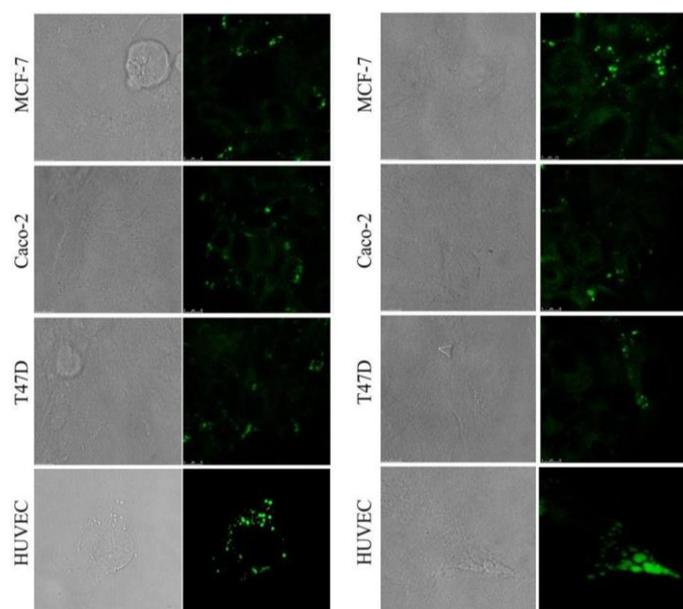
**Figura 21.** Emissões de fluorescência (fotoestabilidades) dentro das diferentes linhagens de células. Amarelo é a solução de PBS sem corante fluorescente, vermelho e verde (**BTD-CHO** e **BTD-HZN**, respectivamente) são referidos a células vivas (exceto para a medição da solução que é uma solução de PBS contendo corante), azul e roxo (**BTD-CHO** e **BTD-HZN**, respectivamente) é referido como células fixas.



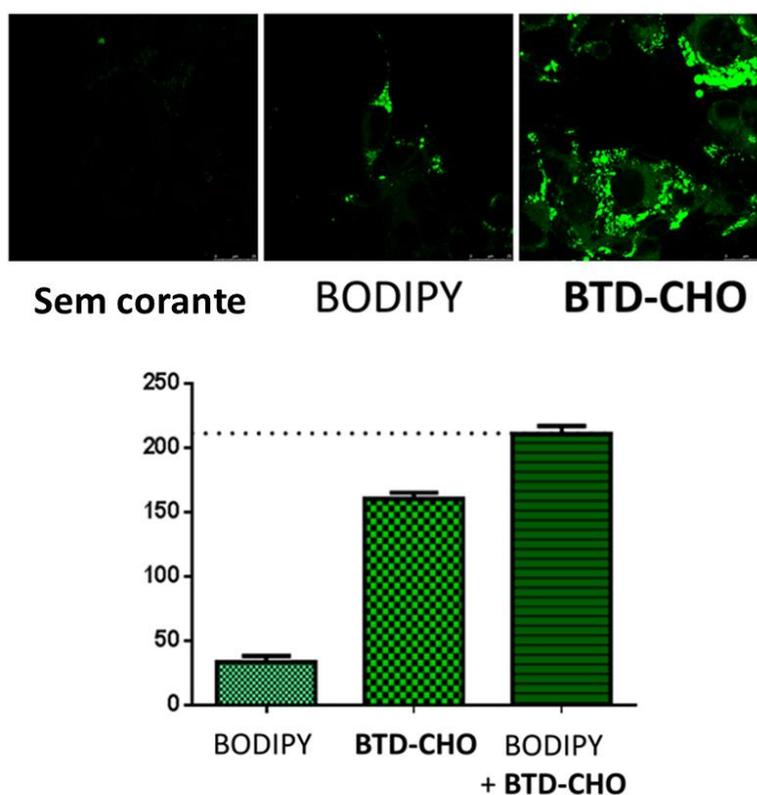
**Figura 22.** Análises de citometria de fluxo de **BTD-CHO** e **BTD-HZN** para representar a intensidade de fluorescência de ambos os corantes (10  $\mu\text{M}$  cada) dentro das diferentes linhagens de células em comparação com padrões comerciais. Azul e verde escuro (células vivas), laranja e verde (células fixas) e vermelho, roxo e rosa (controles). As análises referem-se a 10 mil eventos por canal utilizando os seguintes padrões: Amcyan (canal verde), Pacific Blue (canal azul) e Qdot605 (canal vermelho).

Verificou-se que o marcador **BTD-CHO** recém-projetado é seletivo para coloração de LDs em células vivas e fixadas de várias linhagens celulares (Figura 23 e 24). Experimentos utilizando BODIPY comercialmente disponível (12  $\mu\text{M}$ ) e **BTD-CHO** (10  $\mu\text{M}$ ) demonstraram que o corante desenvolvido exibiu

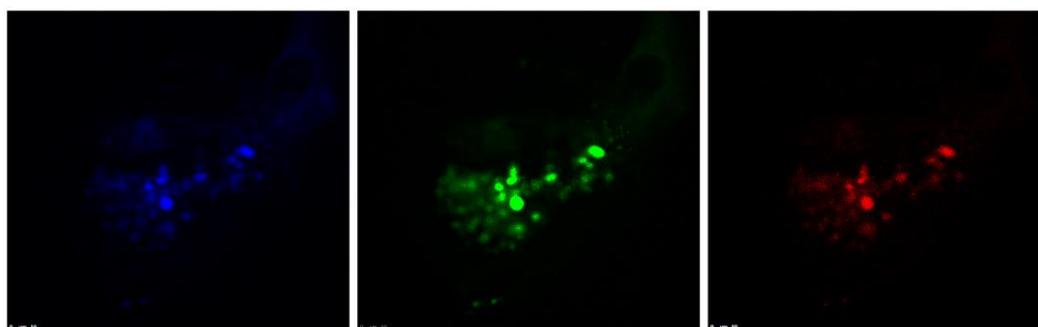
uma intensidade fluorescente significativamente maior e seletividade para LDs em comparação com o corante comercial (ver Figura 24). Esses resultados foram consistentes com as previsões feitas durante os testes SDS (Figura 9). **BTD-CHO** pode ser visualizado no canal de leitura (Figura 25), mas após a formação *in situ* de **BTD-HZN** com a adição de hidrazina, nenhuma emissão vermelha foi observada. Este efeito foi quantificado em diferentes modelos celulares (Figura 26). Ambos os BTDs emitiram no canal verde, mas somente o derivado de hidrazina (**BTD-HZN**) emitiu no canal azul, característica não observada para o sensor projetado (**BTD-CHO**). Assim, o canal azul foi utilizado para monitorar a formação de **BTD-HZN** (Figura 25), enquanto o canal vermelho foi utilizado para rastrear a emissão (consumo) de **BTD-CHO**. A coloração dos núcleos das células com iodeto de propídio (um emissor vermelho disponível comercialmente) não interferiu nos experimentos, sugerindo a possibilidade de experimentos de coloração multicoloridos, como será mostrado oportunamente.



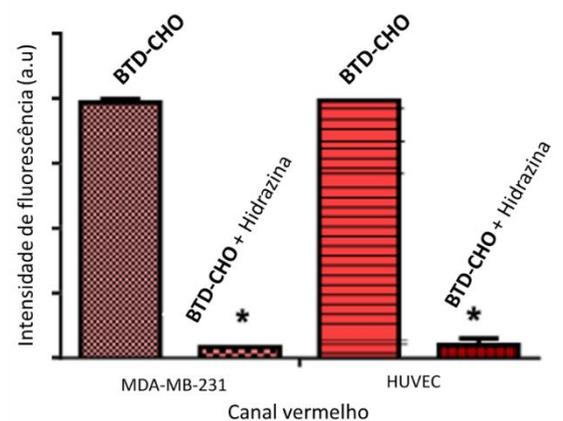
**Figura 23.** Linhagens de células vivas (esquerda) e fixadas (direita) marcadas com **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) indicando sua seletividade de gotículas lipídicas. Barra de escala de 10  $\mu$ m.



**Figura 24.** Experimentos usando BODIPY (12  $\mu\text{M}$ ) e **BTD-CHO** (10  $\mu\text{M}$ ) mostrando a intensidade relativa dos corantes (abaixo) e sua coloração de gotículas lipídicas (topo). Observe que o corante desenvolvido é muito mais intenso com uma concentração menor.



**Figura 25.** Imagem de células vivas (MDA-MB-231) usando **BTD-CHO** (10  $\mu\text{M}$ ) e hidrazina (10  $\mu\text{M}$ ) para a detecção seletiva do analito nas estruturas de gotículas lipídicas. Canal azul: **BTD-HZN** formado in situ após adição de hidrazina. Canal verde: emissão brilhante e intensa de **BTD-CHO** e **BTD-HZN** no interior de gotículas lipídicas. Canal vermelho: emissão de BTD-CHO dentro de organelas específicas (LDs). Barra de escala de 10  $\mu\text{m}$ .

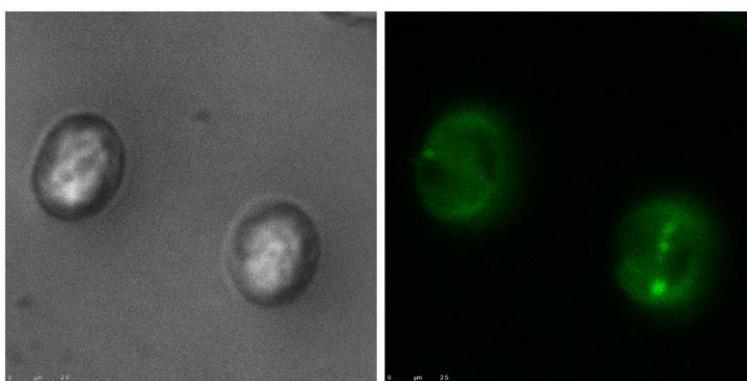


**Figura 26.** Intensidade de fluorescência do canal vermelho antes e depois da adição de hidrazina em dois modelos celulares diferentes, ou seja, linhagens de células MDA-MB-231 e HUVEC.

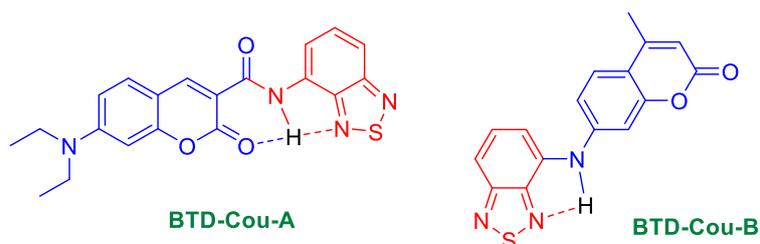
O deslocamento para o azul observado na formação do **BTD-HZN** é esperado, e os dados fotofísicos já indicaram esse efeito. A formação de hidrazona resulta na presença de pares de elétrons livres que sofrem transições eletrônicas  $n \rightarrow \pi^*$  (maior energia) em solução.<sup>133</sup> O efeito de solvatação depende da natureza do solvente, mas, em geral, são observados deslocamentos para o azul. Um modelo dielétrico foi anteriormente desenvolvido para explicar as diferenças nos efeitos observados com diferentes classes de solventes.<sup>133</sup> Um efeito semelhante ao que observamos neste trabalho foi observado para um sensor de hidrazina previamente descrito que tinha um aldeído como local reativo.<sup>36</sup> Após a formação do derivado hidrazona em solução, o emissor verde (sensor) transformou-se em um fluoróforo emissor azul (derivado hidrazona da reação com hidrazina).<sup>36</sup>

A resposta positiva obtida ao usar o sensor **BTD-CHO** desenvolvido levou-nos a tentar um modelo celular mais complicado para a coloração de LDs. Nesse contexto, consideramos o uso de microalgas, mais especificamente a

*Chlorella sorokiniana*<sup>134-136</sup> que é utilizada para produção de biodiesel.<sup>137-139</sup> O BODIPY e o Nile Red já foram utilizados anteriormente para quantificar lipídios nessas microalgas<sup>140</sup>, mas suas limitações são bem conhecidas, especialmente quando aplicados para a coloração de microalgas.<sup>141</sup> A presença de alta autofluorescência de vários pigmentos fotossintéticos nas células de microalgas<sup>142</sup> representa um grande desafio para a coloração desses organismos. Para superar essas desvantagens, são necessárias sondas altamente luminescentes, o que torna o **BTD-CHO** uma excelente alternativa para a coloração de LDs em microalgas, especialmente considerando sua excelente relação sinal-ruído durante experimentos de bioimagem. Como mostrado na Figura 27, o fluoróforo baseado em BTD foi usado com sucesso para essa finalidade. Além disso, para comparação, também tentamos aplicar duas BTDs lipofílicas conhecidas (Figura 28)<sup>100</sup> que usamos anteriormente como sondas de imagem celular para células cancerígenas, para manchar o modelo de microalgas, mas não obtivemos resultados promissores (dados não mostrados).

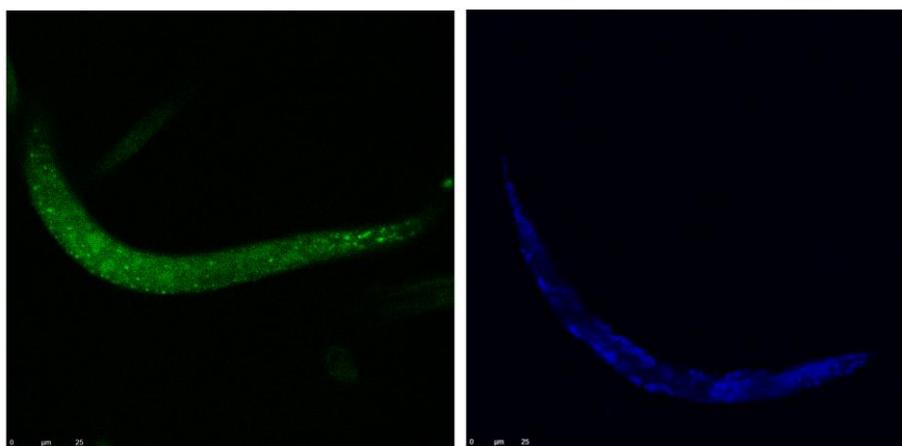


**Figura 27.** Microalga (*Chlorella sorokiniana*) marcada com **BTD-CHO** (10  $\mu$ M). (Esquerda) Campo claro e (Direita) emissão de fluorescência no canal verde. Barra de escala de 2,5  $\mu$ m.



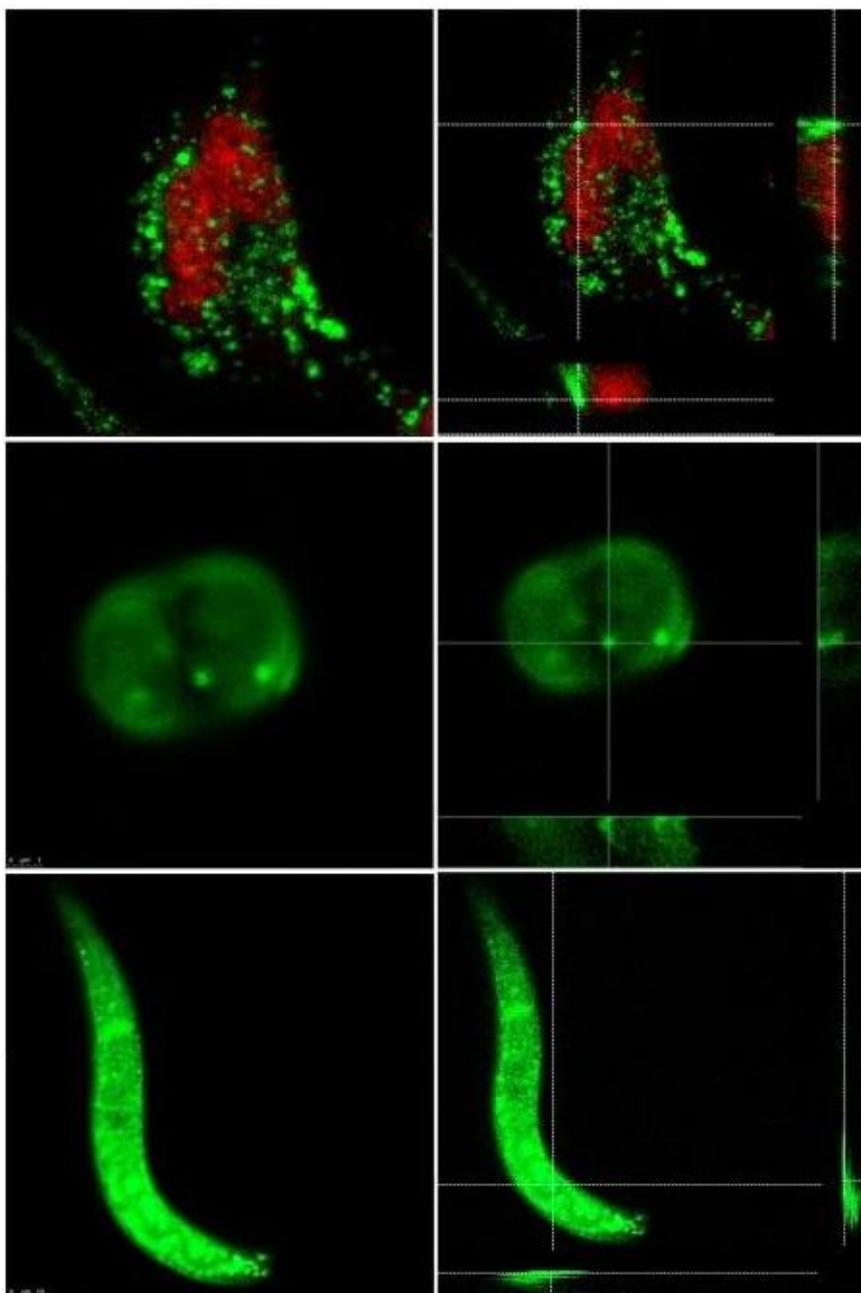
**Figura 28.** Estruturas de derivados de BTD fluorescentes lipofílicos previamente publicados (veja a referência 100) testados neste trabalho para marcação em microalgas.

A aplicação do marcador fluorescente **BTD-CHO** permitiu a coloração de um modelo multicelular *in vivo* (*C. elegans*) com bons resultados (Figura 29), apresentando uma intensa emissão verde. O verme foi eficientemente monitorado no canal azul após a adição de hidrazina, e a rápida formação *in situ* de **BTD-HZN** também proporcionou bons resultados. Para comparação, testamos mais uma vez dois fluoróforos BTDs lipofílicos publicados anteriormente (Figura 28) para coloração do verme,<sup>100</sup> mas não obtivemos resultados significativos (dados não mostrados).



**Figura 29.** Experimentos de coloração de *C. elegans* (*in vivo*). (Esquerda) **BTD-CHO** (10 µM) monitorado no canal verde. (Direita) **BTD-HZN** formado *in situ* na presença de hidrazina (canal azul). Barra de escala de 25 µm

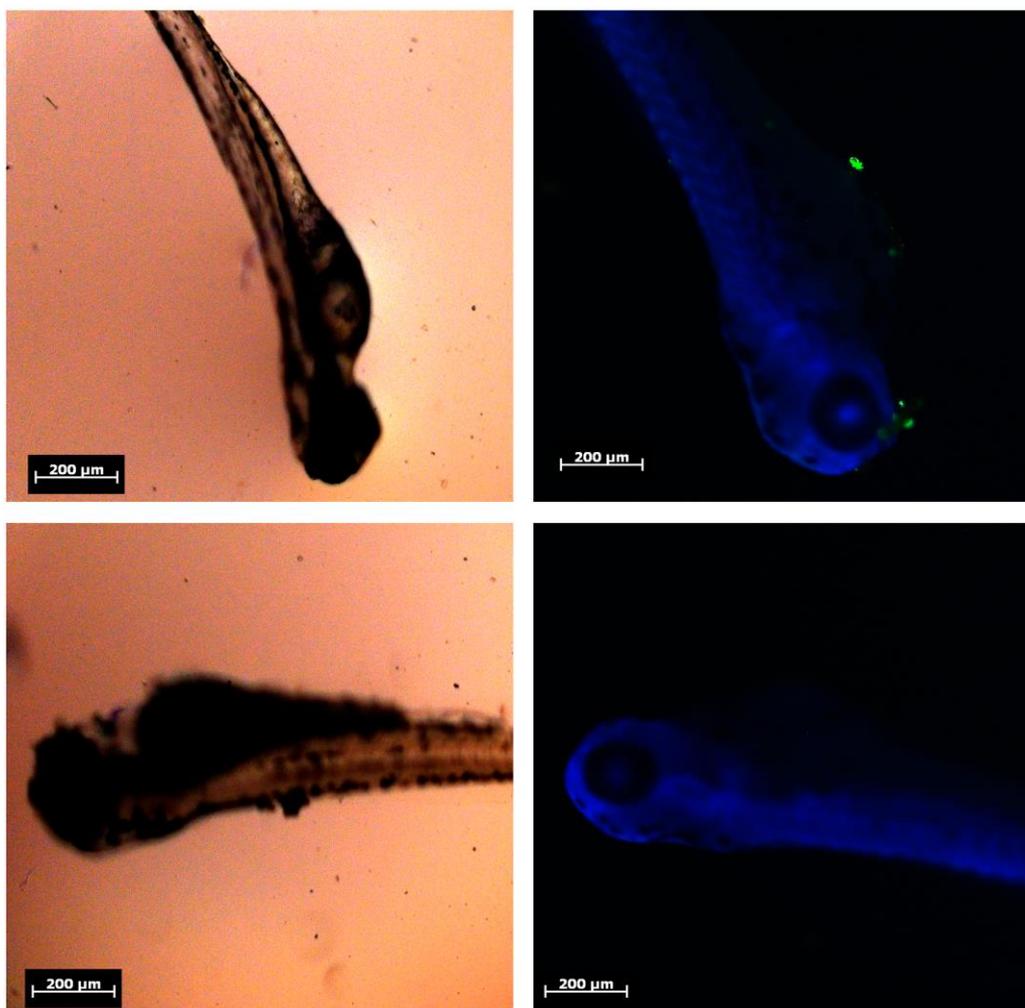
Para garantir a eficiência do corante BTD projetado e a possibilidade de coloração multicolorida, foram realizadas análises bioortogonais (Figura 30). Essa análise também permitiu a localização inequívoca do fluoróforo dentro das células e do modelo multicelular. A Figura 30 indica que o sensor **BTD-CHO** pode ser usado em conjunto com outros marcadores, como o iodeto de propídio (um emissor vermelho seletivo para coloração de núcleos), e mostrou a internalização do derivado fluorogênico derivado da BTD.



**Figura 30.** Análise bioortogonal de células MDA-MB-231 (parte superior), microalgas (*Chlorella sorokiniana*, imagem do meio) e *C. elegans* (parte inferior) usando **BTD-CHO** (10  $\mu$ M) para todos os experimentos. A projeção (à esquerda) e as imagens 3D renderizadas (à direita) da análise ortogonal mostram que o corante está presente dentro das estruturas. O iodeto de propídio (um corante comercial) é o emissor vermelho.

Incentivados pela aplicação bem-sucedida em níveis celulares e multicelulares, decidimos realizar uma aplicação final *in vivo* usando o peixe-

zebra (*Danio rerio*) como modelo. A detecção de um analito específico em peixe-zebra com sensores fluorescentes provou ser uma tarefa desafiadora,<sup>143-148</sup> especialmente ao usar um analito tóxico como a hidrazina. Portanto, a detecção rápida foi necessária como prova final de conceito para a eficiência do sensor desenvolvido. Ao aplicar **BTD-CHO** na presença do analito  $N_2H_4$ , observamos a distribuição de **BTD-HZN** em regiões ricas em lipídeos do peixe (Figura 31).



**Figura 31.** Detecção de hidrazina em modelos vivos (superior) e fixos (inferior) de peixe-zebra usando o marcador **BTD-CHO** desenvolvido ( $10 \mu M$ ) formando *in situ* o derivado **BTD-HZN** (emissão azul). Visualizações de campo claro (esquerda) e canal azul (direita). Barra de escala de  $200 \mu m$ .

## **Capítulo 4**

### **Conclusão e Perspectivas**

Em resumo, descrevemos um sensor fluorescente baseado no núcleo BTM projetado para colorir seletivamente LDs em células vivas (e fixas) e modelos multicelulares in vivo (*C. elegans* e peixe-zebra). A detecção in vivo do analito tóxico hidrazina foi realizada com sucesso, e pela primeira vez, uma sonda fluorescente foi usada para monitorar a hidrazina dentro dos LDs. Experimentos in vivo apontam firmemente para a detecção rápida, sensível e seletiva da hidrazina, indicando que a sonda desenvolvida pode ser aplicada como um sensor promissor em futuras avaliações biológicas dos efeitos da hidrazina. As fotopropriedades de ambos os corantes fluorogênicos sintetizados foram investigadas, e os cálculos DFT lançaram alguma luz sobre suas propriedades. Experimentos de titulação (análises de RMN e ESI-MS(/MS)) indicaram a rápida reação entre **BTM-CHO** e  $N_2H_4$ , fornecendo **BTM-HZN** como um derivado fluorescente brilhante. A estrutura projetada também gera água como único subproduto quando tratada com o analito tóxico (hidrazina), evitando assim quaisquer conclusões enganosas como consequência de subprodutos tóxicos liberados em modelos biológicos.

A principal perspectiva do trabalho é que com o design apresentado e validado para o novo derivado **BTM-CHO**, pode-se sintetizar uma nova família de marcadores BTMs onde de um lado do núcleo deve conter o grupo 4-CHO-fenil, responsável pela detecção da hidrazina, e do outro lado se explorar substituintes que permitam se ajustar propriedades de cores dos novos marcadores.

## **Capítulo 5**

### **Referências Bibliográficas**

- (1) Gu, X.; Camden, J. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Approach for Ultrasensitive and Selective Detection of Hydrazine. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6460-6464.
- (2) Cui, L.; Peng, Z. X.; Ji, C. F.; Huang, J. H.; Huang, D. T.; Ma, J.; Zhang, S. P.; Qian, X. H.; Xu, Y. F. Hydrazine detection in the gas state and aqueous solution based on the Gabriel mechanism and its imaging in living cells. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1485-1487.
- (3) Balsamo, A.; Macchia, B.; Macchia, F.; Rossello, A.; Giani, R.; Pifferi, G.; Pinza, M.; Broccali, G. Synthesis and Anti-Bacterial Activities of New (Alpha-Hydrazinobenzyl)Cephalosporins. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1648-1650.
- (4) Li, J.; Lin, X. Electrocatalytic oxidation of hydrazine and hydroxylamine at gold nanoparticle-polypyrrole nanowire modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuator B-Chem.* **2007**, *126*, 527-535.
- (5) Oliveira, V. G.; de Oliveira, P. H. R.; Tolentino, N. M. C. Hydrazine (CAS 302-01-2). *Rev. Virtual Quim.* **2015**, *7*, 1570-1578.
- (6) Umar, A.; Rahman, M. M.; Kim, S. H.; Hahn, Y.-B. Zinc oxide nanonail based chemical sensor for hydrazine detection. *Chem. Commun.* **2008**, 166-168.
- (7) Morris, J. K.; Wald, N. J.; Springett, A. L. Occupational Exposure to Hydrazine and Subsequent Risk of Lung Cancer: 50-Year Follow-Up. *Plos One* **2015**, *10*, e0138884.
- (8) Zhang, F.; Li, D.; Liang, X.; Guo, K.; Li, B.; Xu, H.; Li, J.; Zhang, Z.; Wang, S.; Fan, F.; Sun, Y. Forming luminescent oligomer nanoparticles via condensation polymerization: A strategy for real-time visualized detection of hydrazine in solution and gas phase. *Dyes Pigment.* **2021**, *185*, 108931.

- (9) Choudhary, G.; Hansen, H. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: A review. *Chemosphere* **1998**, *37*, 801-843.
- (10) Le Goff, G.; Ouazzani, J. Natural hydrazine-containing compounds: Biosynthesis, isolation, biological activities and synthesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6529-6544.
- (11) Tajik, S.; Beitollahi, H.; Mohammadi, S. Z.; Azimzadeh, M.; Zhang, K.; Quyet Van, L.; Yamauchi, Y.; Jang, H. W.; Shokouhimehr, M. Recent developments in electrochemical sensors for detecting hydrazine with different modified electrodes. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 30481-30498.
- (12) Zhang, X. Y.; Yang, Y. S.; Wang, W.; Jiao, Q. C.; Zhu, H. L. Fluorescent sensors for the detection of hydrazine in environmental and biological systems: Recent advances and future prospects. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *417*, 213367.
- (13) Ramachandran, R.; Chen, T. W.; Chen, S. M.; Baskar, T.; Kannan, R.; Elumalai, P.; Raja, P.; Jeyapragasam, T.; Dinakaran, K.; Kumar, G. P. G. A review of the advanced developments of electrochemical sensors for the detection of toxic and bioactive molecules. *Inorg. Chem. Front.* **2019**, *6*, 3418-3439.
- (14) Gupta, A. Aggregation-Induced Emission: A Tool for Sensitive Detection of Amines. *Chemistryselect* **2019**, *4*, 12848-12860.
- (15) Manna, S. K.; Gangopadhyay, A.; Maiti, K.; Mondal, S.; Mahapatra, A. K. Recent Developments in Fluorometric and Colorimetric Chemodosimeters Targeted towards Hydrazine Sensing: Present Success and Future Possibilities. *Chemistryselect* **2019**, *4*, 7219-7245.

- (16) Nguyen, K. H.; Hao, Y. Q.; Chen, W. S.; Zhang, Y. T.; Xu, M. T.; Yang, M. H.; Liu, Y. N. Recent progress in the development of fluorescent probes for hydrazine. *Luminescence* **2018**, *33*, 816-836.
- (17) Roy, B.; Bandyopadhyay, S. The design strategies and mechanisms of fluorogenic and chromogenic probes for the detection of hydrazine. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 1117-1139.
- (18) Zhang, J. J.; Ning, L. L.; Liu, J. T.; Wang, J. X.; Yu, B. F.; Liu, X. Y.; Yao, X. J.; Zhang, Z. P.; Zhang, H. X. Naked-Eye and Near-Infrared Fluorescence Probe for Hydrazine and Its Applications in In Vitro and In Vivo Bioimaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9101-9107.
- (19) Yan, H.; Huo, F.; Yue, Y.; Chao, J.; Yin, C. A practical pH-compatible fluorescent sensor for hydrazine in soil, water and living cells. *Analyst* **2020**, *145*, 7380-7387.
- (20) Mu, S.; Gao, H.; Li, C.; Li, S.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Ma, C.; Zhang, H.; Liu, X. A dual-response fluorescent probe for detection and bioimaging of hydrazine and cyanide with different fluorescence signals. *Talanta* **2021**, *221*, 121606.
- (21) He, X.; Deng, Z.; Xu, W.; Li, Y.; Xu, C.; Chen, H.; Shen, J. A novel dual-response chemosensor for bioimaging of Exogenous/ Endogenous hypochlorite and hydrazine in living cells, *Pseudomonas aeruginosa* and zebrafish. *Sens. Actuator B-Chem.* **2020**, *321*, 128450.
- (22) Teng, M. G.; Zhou, Z. X.; Qin, Y. M.; Zhao, Y. L.; Zhao, C. S.; Cao, J. X. A water-soluble fluorescence sensor with high specificity for detecting hydrazine in river water detection and A549 cell imaging. *Sens. Actuator B-Chem.* **2020**, *311*, 127914.

- (23) Hou, J. T.; Wang, B. Y.; Wang, S.; Wu, Y. Q.; Liao, Y. X.; Ren, W. X. Detection of hydrazine via a highly selective fluorescent probe: A case study on the reactivity of cyano-substituted C=C bond. *Dyes Pigment.* **2020**, *178*, 108366.
- (24) Wang, S.; Liu, J.; Song, L.; Qi, Q.; Li, Z.; Huang, W. A selective and sensitive near-infrared fluorescent probe for in vivo real time tracking of exogenous and metabolized hydrazine, a genotoxic impurity. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 10353-10359.
- (25) Zhang, T. T.; Lai, Y. B.; Lin, W. Y. Design of a ratiometric near-infrared fluorescent probe with double excitation for hydrazine detection in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* **2022**, *837*, 155462.
- (26) Liu, Y.; Ren, D.; Zhang, J.; Li, H.; Yang, X.-F. A fluorescent probe for hydrazine based on a newly developed 1-indanone-fused coumarin scaffold. *Dyes Pigment.* **2019**, *162*, 112-119.
- (27) Goswami, S.; Das, S.; Aich, K.; Pakhira, B.; Panja, S.; Mukherjee, S. K.; Sarkar, S. A Chemodosimeter for the Ratiometric Detection of Hydrazine Based on Return of ESIPT and Its Application in Live-Cell Imaging. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5412-5415.
- (28) Liu, B.; Liu, Q.; Shah, M.; Wang, J. F.; Zhang, G.; Pang, Y. Fluorescence monitor of hydrazine in vivo by selective deprotection of flavonoid. *Sens. Actuator B-Chem.* **2014**, *202*, 194-200.
- (29) Sun, Y.; Zhao, D.; Fan, S. W.; Duan, L. A 4-hydroxynaphthalimide-derived ratiometric fluorescent probe for hydrazine and its in vivo applications. *Sens. Actuator B-Chem.* **2015**, *208*, 512-517.

- (30) Xia, X. T.; Zeng, F.; Zhang, P. S.; Lyu, J.; Huang, Y.; Wu, S. Z. An ICT-based ratiometric fluorescent probe for hydrazine detection and its application in living cells and in vivo. *Sens. Actuator B-Chem.* **2016**, *227*, 411-418.
- (31) Hao, Y. Q.; Zhang, Y. T.; Ruan, K. H.; Chen, W. S.; Zhou, B. B.; Tan, X. J.; Wang, Y.; Zhao, L. Q.; Zhang, G.; Qu, P.; Xu, M. T. A naphthalimide-based chemodosimetric probe for ratiometric detection of hydrazine. *Sens. Actuator B-Chem.* **2017**, *244*, 417-424.
- (32) Yang, X. P.; Liu, Y. X.; Wu, Y. Y.; Ren, X. L.; Zhang, D.; Ye, Y. A NIR ratiometric probe for hydrazine "naked eye" detection and its imaging in living cell. *Sens. Actuator B-Chem.* **2017**, *253*, 488-494.
- (33) Wang, X.; Ding, G.; Duan, Y.; Zhu, Y.; Zhu, G.; Wang, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Qin, X.; Hung, C.-H. A novel triphenylamine-based bis-Schiff bases fluorophores with AIE-Activity as the hydrazine fluorescence turn-off probes and cell imaging in live cells. *Talanta* **2020**, *217*, 121029.
- (34) Wei, Y.-F.; Wu, M.-X.; Wei, X.-R.; Sun, R.; Xu, Y.-J.; Ge, J.-F. The fluorescent probe based on methyltetrahydroxanthylum skeleton for the detection of hydrazine. *Talanta* **2020**, *218*, 121164.
- (35) Sun, M.; Guo, J.; Yang, Q.; Xiao, N.; Li, Y. A new fluorescent and colorimetric sensor for hydrazine and its application in biological systems. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1846-1851.
- (36) Jung, Y.; Ju, I. G.; Choe, Y. H.; Kim, Y.; Park, S.; Hyun, Y.-M.; Oh, M. S.; Kim, D. Hydrazine Exposé: The Next-Generation Fluorescent Probe. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 441-449.

- (37) Wang, J. P.; Wang, C. R.; Jiang, S.; Ma, W. Y.; Xu, B.; Liu, L. J.; Tian, W. J. A covalent organic polymer for turn-on fluorescence sensing of hydrazine. *J. Mater. Chem. C* **2022**, *10*, 2807-2813.
- (38) Thiam, A. R.; Ikonen, E. Lipid Droplet Nucleation. *Trends Cell Biol.* **2021**, *31*, 108-118.
- (39) Guo, Y.; Cordes, K. R.; Farese, R. V., Jr.; Walther, T. C. Lipid droplets at a glance. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 749-752.
- (40) Farese, R. V., Jr.; Walther, T. C. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **2009**, *139*, 855-860.
- (41) Olzmann, J. A.; Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 137-155.
- (42) Yang, L.; Ding, Y.; Chen, Y.; Zhang, S.; Huo, C.; Wang, Y.; Yu, J.; Zhang, P.; Na, H.; Zhang, H.; Ma, Y.; Liu, P. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1245-1253.
- (43) Sturley, S. L.; Hussain, M. M. Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1800-1810.
- (44) Zhao, Y. Y.; Shi, W.; Li, X. H.; Ma, H. M. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 1495-1509.
- (45) Tian, H.; Sedgwick, A. C.; Han, H. H.; Sen, S.; Chen, G. R.; Zang, Y.; Sessler, J. L.; James, T. D.; Li, J.; He, X. P. Fluorescent probes for the imaging of lipid droplets in live cells. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *427*, 213577.

- (46) Fam, T. K.; Klymchenko, A. S.; Collot, M. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* **2018**, *11*, 1768.
- (47) Wu, X.; Wang, X. X.; Li, Y.; Kong, F. P.; Xu, K. H.; Li, L.; Tang, B. A Near-Infrared Probe for Specific Imaging of Lipid Droplets in Living Cells. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 4881-4888.
- (48) Long, L. L.; Liu, W. G.; Ruan, P.; Yang, X. R.; Chen, X. D.; Li, L. L.; Yuan, F.; He, D.; Huang, P.; Gong, A. H.; Wang, K. Visualizing the Interplay of Lipid Droplets and Protein Aggregates During Aging via a Dual-Functional Fluorescent Probe. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 2803-2811.
- (49) Zhu, L.; Huang, L.; Su, W. T.; Liang, X.; Lin, W. Y. A Fluorescent Probe Targeting Mitochondria and Lipid Droplets for Visualization of Cell Death. *Chem. Asian J.* **2022**, *17*, e202101304.
- (50) Bai, Q. Q.; Yang, C. J.; Yang, M. J.; Pei, Z. Q.; Zhou, X. B.; Liu, J. X.; Ji, H. W.; Li, G.; Wu, M. M.; Qin, Y. L.; Wang, Q.; Wu, L. pH-Dominated Selective Imaging of Lipid Droplets and Mitochondria via a Polarity-Reversible Ratiometric Fluorescent Probe. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 2901-2911.
- (51) Zhuang, W. H.; Tan, P.; Li, S. F.; Li, C. M.; Zhang, J. P.; Ai, J. Z.; Yang, L.; Li, G. C.; Wei, Q.; Chen, M.; Wang, Y. B. A lipid droplet specific fluorescent probe for image-guided photodynamic therapy under hypoxia. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 9553-9560.
- (52) Ren, W.; Wang, D.; Huang, W.; Li, J. J.; Tian, X. H.; Liu, Z. J.; Han, G. M.; Liu, B. H.; Han, M. Y.; Zhang, Z. P.; Zhang, R. L. Real-time tracking of lipid droplets interactions with other organelles by a high signal/noise probe. *Dyes Pigment.* **2021**, *191*, 109366.

- (53) Ni, J. Y.; Weng, X. F.; Sun, R.; Xu, Y. J.; Ge, J. F. Convenient construction of fluorescent markers for lipid droplets with 1,8-naphthalimide unit. *Dyes Pigment.* **2021**, *186*, 109003.
- (54) Meng, F. F.; Niu, J.; Zhang, H. M.; Yang, R.; Lu, Q.; Yu, Y.; Liu, Z. Q.; Niu, G. L.; Yu, X. Q. Simultaneous visualization of lipid droplets and lysosomes using a single fluorescent probe. *Sens. Actuator B-Chem.* **2021**, *329*, 129148.
- (55) Guo, L. F.; Tian, M. G.; Zhang, Z. Y.; Lu, Q.; Liu, Z. Q.; Niu, G. L.; Yu, X. Q. Simultaneous Two-Color Visualization of Lipid Droplets and Endoplasmic Reticulum and Their Interplay by Single Fluorescent Probes in Lambda Mode. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 3169-3179.
- (56) Dai, Y. P.; Zhang, P.; Zhao, X. X.; Zhang, D. D.; Xue, K.; Misal, S.; Zhu, H. Y.; Qi, Z. J. A family of lipotropic AIEgens for high-fidelity dynamic tracking of lipid droplets in living cells. *Dyes Pigment.* **2021**, *188*, 109167.
- (57) Colas, K.; Holmberg, K. O.; Chiang, L.; Doloczki, S.; Swartling, F. J.; Dyrager, C. Indolylbenzothiadiazoles as highly tunable fluorophores for imaging lipid droplet accumulation in astrocytes and glioblastoma cells. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 23960-23967.
- (58) Zhang, X.; Yuan, L.; Jiang, J.; Hu, J.; Du Rietz, A.; Cao, H.; Zhang, R.; Tian, X.; Zhang, F.; Ma, Y.; Zhang, Z.; Uvdal, K.; Hu, Z. Light-Up Lipid Droplets Dynamic Behaviors Using a Red-Emitting Fluorogenic Probe. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 3613-3619.
- (59) Yen, K.; Le, T. T.; Bansal, A.; Narasimhan, D.; Cheng, J.-X.; Tissenbaum, H. A. A Comparative Study of Fat Storage Quantitation in Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Label and Label-Free Methods. *Plos One* **2010**, *5*, e12810.

- (60) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R. Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1560-1569.
- (61) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Spencer, J. Fluorescent Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Dyes: A Decade of New Generation Probes. *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202103262.
- (62) Park, S. J.; Juvekar, V.; Jo, J. H.; Kim, H. M. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 596-601.
- (63) Suarez, S. I.; Warner, C. C.; Brown-Harding, H.; Thooft, A. M.; VanVeller, B.; Lukesh, J. C. Highly selective staining and quantification of intracellular lipid droplets with a compact push-pull fluorophore based on benzothiadiazole. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 495-499.
- (64) Toscani, A.; Marín-Hernández, C.; Robson, J. A.; Chua, E.; Dingwall, P.; White, A. J. P.; Sancenón, F.; de la Torre, C.; Martínez-Máñez, R.; Wilton-Ely, J. D. E. T. Highly Sensitive and Selective Molecular Probes for Chromo-Fluorogenic Sensing of Carbon Monoxide in Air, Aqueous Solution and Cells. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 2069-2081.
- (65) Sun, J.; Li, X.; Cao, J.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Wang, X.; Wu, T.; Hu, X.; Feng, F. Mitochondria Targeting Fluorescent Probes Based on through Bond-Energy Transfer for Mutually Imaging Signaling Molecules H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 9164-9169.

- (66) Jung, K. H.; Kim, S. F.; Liu, Y.; Zhang, X. A Fluorogenic AggTag Method Based on Halo- and SNAP-Tags to Simultaneously Detect Aggregation of Two Proteins in Live Cells. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1078-1087.
- (67) Zhang, J.; Konsmo, A.; Sandberg, A.; Wu, X.; Nyström, S.; Obermüller, U.; Wegenast-Braun, B. M.; Konradsson, P.; Lindgren, M.; Hammarström, P. Phenolic Bis-styrylbenzo[ c]-1,2,5-thiadiazoles as Probes for Fluorescence Microscopy Mapping of A $\beta$  Plaque Heterogeneity. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2038-2048.
- (68) Tian, X.-M.; Yao, S.-L.; Wu, J.; Xie, H.; Zheng, T.-F.; Jiang, X.-J.; Wu, Y.; Mao, J.; Liu, S.-J. Two benzothiadiazole-based fluorescent sensors for selective detection of Cu<sup>2+</sup> and OH<sup>-</sup> ions. *Polyhedron* **2019**, *171*, 523-529.
- (69) Wu, S.; Su, F.; Magee, H. Y.; Meldrum, D. R.; Tian, Y. cRGD functionalized 2,1,3-benzothiadiazole (BTD)-containing two-photon absorbing red-emitter-conjugated amphiphilic poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) for targeted bioimaging. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 34235-34243.
- (70) Boucard, J.; Linot, C.; Blondy, T.; Nedellec, S.; Hulin, P.; Blanquart, C.; Lartigue, L.; Ishow, E. Small Molecule-Based Fluorescent Organic Nanoassemblies with Strong Hydrogen Bonding Networks for Fine Tuning and Monitoring Drug Delivery in Cancer Cells. *Small* **2018**, *14*, 1802307.
- (71) Chen, F. Z.; Zhang, J.; Qu, W. B.; Zhong, X. X.; Liu, H.; Ren, J.; He, H. P.; Zhang, X. H.; Wang, S. F. Development of a novel benzothiadiazole-based fluorescent turn-on probe for highly selective detection of glutathione over cysteine/homocysteine. *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *266*, 528-533.

- (72) Wang, S. C.; Li, Z.; Liu, Y. B.; Feng, G.; Zheng, J.; Yuan, Z.; Zhang, X. J. Activatable photoacoustic and fluorescent probe of nitric oxide for cellular and in vivo imaging. *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *267*, 403-411.
- (73) Wang, R.; Hou, M.; Xu, Z.; Tan, L.; Zhong, C.; Zhu, L. A new red fluorophore with aggregation enhanced emission by an unexpected "One-step" protocol. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 18327-18333.
- (74) Lu, N.; Jiang, T.; Tan, H.; Hang, Y.; Yang, J.; Wang, J.; Qu, X.; Hua, J. A red fluorescent turn-on chemosensor for Al<sup>3+</sup> based on a dimethoxy triphenylamine benzothiadiazole derivative with aggregation-induced emission. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 2689-2695.
- (75) Liu, Y.; Miao, K.; Dunham, N. P.; Liu, H.; Fares, M.; Boal, A. K.; Li, X.; Zhang, X. The Cation- $\pi$  Interaction Enables a Halo-Tag Fluorogenic Probe for Fast No-Wash Live Cell Imaging and Gel-Free Protein Quantification. *Biochemistry* **2017**, *56*, 1585-1595.
- (76) Appelqvist, H.; Stranius, K.; Borjesson, K.; Nilsson, K. P. R.; Dyrager, C. Specific Imaging of Intracellular Lipid Droplets Using a Benzothiadiazole Derivative with Solvatochromic Properties. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1363-1370.
- (77) Yang, D.; Wang, H.; Sun, C.; Zhao, H.; Hu, K.; Qin, W.; Ma, R.; Yin, F.; Qin, X.; Zhang, Q.; Liang, Y.; Li, Z. Development of a high quantum yield dye for tumour imaging. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6322-6326.
- (78) Han, X.; Wang, Z. R.; Cheng, Q.; Meng, X. R.; Wei, D. H.; Zheng, Y. C.; Ding, J.; Hou, H. W. Mitochondria-dependent benzothiadiazole-based molecule probe for quantitatively intracellular pH imaging. *Dyes Pigment.* **2017**, *145*, 576-583.

- (79) Dyrager, C.; Vieira, R. P.; Nystrom, S.; Nilsson, K. P. R.; Storr, T. Synthesis and evaluation of benzothiazole-triazole and benzothiadiazole- triazole scaffolds as potential molecular probes for amyloid-beta aggregation. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 1566-1573.
- (80) Huang, Y.; Qiu, F.; Chen, D.; Shen, L.; Xu, S.; Guo, D.; Su, Y.; Yan, D.; Zhu, X. Color-Convertible, Unimolecular, Micelle-Based, Activatable Fluorescent Probe for Tumor-Specific Detection and Imaging In Vitro and In Vivo. *Small* **2017**, *13*, 1604062.
- (81) Chen, C.; Hua, Y.; Hu, Y.; Fang, Y.; Ji, S.; Yang, Z.; Ou, C.; Kong, D.; Ding, D. Far-red/near-infrared fluorescence light-up probes for specific in vitro and in vivo imaging of a tumour-related protein. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23190.
- (82) Yao, S.; Kim, B.; Yue, X.; Gomez, M. Y. C.; Bondar, M. V.; Belfield, K. D. Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Two-Photon-Absorbing Fluorenyl Benzothiadiazole and Benzoselenadiazole Derivatives. *ACS Omega* **2016**, *1*, 1149-1156.
- (83) Jiang, Q.; Zhang, Z.; Lu, J.; Huang, Y.; Lu, Z.; Tan, Y.; Jiang, Q. A Novel Nitro-Substituted Benzothiadiazole as Fluorescent Probe for Tumor Cells under Hypoxic Condition. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7735-7741.
- (84) Garcia, L.; Lazzaretti, M.; Diguet, A.; Mussi, F.; Bisceglie, F.; Xie, J.; Pelosi, G.; Buschini, A.; Baigl, D.; Policar, C. An Intrinsically Fluorescent Glycoligand for Direct Imaging of Ligand Trafficking in Artificial and Living Cell Systems. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 3030-3034.
- (85) Liu, B.; Liu, J.; He, J.; Zhang, J.; Zhou, H.; Gao, C. A novel red-emitting fluorescent probe for the highly selective detection of Hg<sup>2+</sup> ion with AIE mechanism. *Chem. Phys.* **2020**, *539*, 110944

- (86) Qin, X.; Si, Y.; Wu, Z.; Zhang, K.; Li, J.; Yin, Y. Alkyne/Ruthenium(II) Complex-Based Ratiometric Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoprobe for In Vitro and Ex Vivo Tracking of Carbon Monoxide. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 924-931.
- (87) Pandey, V.; Raza, M. K.; Sonowal, M.; Gupta, I. BODIPY based red emitters: Synthesis, computational and biological studies. *Bioorg. Chem.* **2021**, *106*, 104467.
- (88) Li, L. L.; Xiong, Z.; Dang, Y. J.; Li, Y.; Zhang, A.; Ding, C. Y.; Xu, Z. A.; Zhang, W. A red-emissive D-A-D type fluorescent probe for lysosomal pH imaging. *Anal. Methods* **2020**, *12*, 2978-2984.
- (89) Doloczki, S.; Holmberg, K. O.; Galvan, I. F.; Swartling, F. J.; Dyrager, C. Photophysical characterization and fluorescence cell imaging applications of 4-N-substituted benzothiadiazoles. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 14544-14550.
- (90) Colas, K.; Doloczki, S.; Kesidou, A.; Sainero-Alcolado, L.; Rodriguez-Garcia, A.; Arsenian-Henriksson, M.; Dyrager, C. Photophysical Characteristics of Polarity-Sensitive and Lipid Droplet-Specific Phenylbenzothiadiazoles. *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 632-643.
- (91) Yu, Y.; Xing, H.; Park, H.; Zhang, R. Y.; Peng, C.; Sung, H. H. Y.; Williams, I. D.; Ma, C.; Wong, K. S.; Li, S. J.; Xiong, Q. P.; Li, M. H.; Zhao, Z.; Tang, B. Z. Deep-Red Aggregation-Induced Emission Luminogen Based on Dithiofuvaleine-Fused Benzothiadiazole for Lipid Droplet-Specific Imaging. *ACS Materials Lett.* **2022**, *4*, 159-164.
- (92) Wang, L.; Zhang, R.; Bu, Y. C.; Huang, Z.; Kong, L.; Yang, J. X. Two novel "turn on" fluorescent probes for monitoring hypochlorite in living HeLa cells. *Dyes Pigment.* **2021**, *196*, 109749.

- (93) Cho, M. K.; Seo, M. J.; Juvekar, V.; Jo, J. H.; Kim, W.; Choi, K. S.; Kim, H. M. Screening of Drug-Induced Steatosis and Phospholipidosis Using Lipid Droplet-Selective Two-Photon Probes. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 11223-11231.
- (94) Sukhikh, T. S.; Khisamov, R. M.; Bashirov, D. A.; Komarov, V. Y.; Molokeyev, M. S.; Ryadun, A. A.; Benassi, E.; Konchenko, S. N. Tuning of the coordination and emission properties of 4-amino-2,1,3-benzothiadiazole by introduction of diphenylphosphine group. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20*, 5796-5807.
- (95) Zhao, Y.; Ding, J.; Han, X.; Geng, T.; Zhou, X.; Hu, C.; Wang, Y.; Xiao, G.; Zou, B.; Hou, H. Tuning the optical properties of N-aryl benzothiadiazole via Cu(II)-catalyzed intramolecular C-H amination: the impact of the molecular structure on aggregation and solid state luminescence. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7*, 3853-3861.
- (96) Silva Wakabayashi, P. S.; Duarte, R. d. C.; Teixeira Alves Duarte, L. G.; Santos, F. d. S.; Cercena, R.; Zapp, E.; Rodembusch, F. S.; Dal-Bo, A. G. Synthesis and thermal, electrochemical, and photophysical investigation of carbazole/diphenyl benzothiadiazole-based fluorophores. *Dyes Pigment.* **2020**, *182*, 108668.
- (97) Pazini, A.; Maqueira, L.; da Silveira Santos, F.; Jardim Barreto, A. R.; Carvalho, R. D. S.; Valente, F. M.; Back, D.; Aucélio, R. Q.; Cremona, M.; Rodembusch, F. S.; Limberger, J. Designing highly luminescent aryloxy-benzothiadiazole derivatives with aggregation-induced enhanced emission. *Dyes Pigment.* **2020**, *178*, 108377.
- (98) Paczkowski, I. M.; Coelho, F. L.; Campo, L. F. 2,1,3-Benzothiadiazole dyes conjugated with benzothiazole and benzoxazole: Synthesis, solvatochromism and solid-state properties. *J. Mol. Liquid.* **2020**, *319*, 114277.
- (99) Isoppo, V. G.; Gil, E. S.; Bruno Goncalves, P. F.; Rodembusch, F. S.; Moro, A. V. Highly fluorescent lipophilic 2,1,3-benzothiadiazole fluorophores as optical

sensors for tagging material and gasoline adulteration with ethanol. *Sens. Actuator B-Chem.* **2020**, *309*, 127701.

- (100) Passos, S. T. A.; Souza, G. C.; Brandao, D. C.; Machado, D. F. S.; Grisolia, C. K.; Correa, J. R.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. Plasma membrane staining with fluorescent hybrid benzothiadiazole and coumarin derivatives: Tuning the cellular selection by molecular design. *Dyes Pigment.* **2021**, *186*, 109005.
- (101) Medeiros, G. A.; Correa, J. R.; de Andrade, L. P.; Lopes, T. O.; de Oliveira, H. C. B.; Diniz, A. B.; Menezes, G. B.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D. A benzothiadiazole-quinoline hybrid sensor for specific bioimaging and surgery procedures in mice. *Sens. Actuator B-Chem.* **2021**, *328*, 128998.
- (102) Souza, V. S.; Correa, J. R.; Carvalho, P.; Zanotto, G. M.; Matiello, G. I.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Ebeling, G.; Goncalves, P. F. B.; Dupont, J.; Neto, B. A. D. Appending ionic liquids to fluorescent benzothiadiazole derivatives: Light up and selective lysosome staining. *Sens. Actuator B-Chem.* **2020**, *321*, 128530.
- (103) Sodre, E. R.; Guido, B. C.; de Souza, P. E. N.; Machado, D. F. S.; Carvalho-Silva, V. H.; Chaker, J. A.; Gatto, C. C.; Correa, J. R.; Fernandes, T. d. A.; Neto, B. A. D. Deciphering the Dynamics of Organic Nanoaggregates with AIEE Effect and Excited States: Lipophilic Benzothiadiazole Derivatives as Selective Cell Imaging Probes. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 12614-12634.
- (104) Carvalho, T. O.; Carvalho, P.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Medeiros, G. A.; Eberlin, M. N.; Coelho, S. E.; Domingos, J. B.; Neto, B. A. D. Palladium Catalyst with Task-Specific Ionic Liquid Ligands: Intracellular Reactions and Mitochondrial Imaging with Benzothiadiazole Derivatives. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 5118-5128.

- (105) Carvalho, P.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Baril, M.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; de Souza, P. E. N.; Veiga-Souza, F. H.; Spencer, J.; Neto, B. A. D. When the strategies for cellular selectivity fail. Challenges and surprises in the design and application of fluorescent benzothiadiazole derivatives for mitochondrial staining. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2371-2384.
- (106) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. Bioimaging, Cellular Uptake and Dynamics in Living Cells of a Lipophilic Fluorescent Benzothiadiazole at Low Temperature (4 °C). *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3995-4003.
- (107) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. Designed Benzothiadiazole Fluorophores for Selective Mitochondrial Imaging and Dynamics. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15360-15374.
- (108) Pop, F.; Seifert, S.; Hankache, J.; Ding, J.; Hauser, A.; Avarvari, N. Modulation of the charge transfer and photophysical properties in non-fused tetrathiafulvalene-benzothiadiazole derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1040-1047.
- (109) Kawashima, H.; Kawabata, K.; Goto, H. Intramolecular charge transfer (ICT) of a chiroptically active conjugated polymer showing green colour. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 1126-1133.
- (110) Wiethaus, G.; Toldo, J. M.; Santos, F. d. S.; Duarte, R. d. C.; Bruno Goncalves, P. F.; Rodembusch, F. S. Experimental and theoretical investigation of long-wavelength fluorescence emission in push-pull benzazoles: intramolecular proton transfer or charge transfer in the excited state? *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 4408-4420.

- (111) Gilabert, A.; Fajari, L.; Sires, I.; Reig, M.; Brillas, E.; Velasco, D.; Anglada, J. M.; Julia, L. Twisted intramolecular charge transfer in a carbazole-based chromophore: the stable (4-N-carbazolyl)-2,3,5,6-tetrachlorophenyl bis(2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methyl radical. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 8422-8430.
- (112) Kroetz, T.; dos Santos, M. C.; Beal, R.; Zanotto, G. M.; Santos, F. S.; Giacomelli, F. C.; Goncalves, P. F. B.; de Lima, V. R.; Dal-Bo, A. G.; Rodembusch, F. S. Proton transfer in fluorescent secondary amines: synthesis, photophysics, theoretical calculation and preparation of photoactive phosphatidylcholine-based liposomes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1171-1184.
- (113) Nigst, T. A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the alpha-Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8142-8155.
- (114) Kruger, R.; Larroza, A.; Fronza, M. G.; Tisoco, I.; Savegnago, L.; Reis, J. S.; Back, D. F.; Iglesias, B. A.; Alves, D. Bis-triazolylchalcogenium-Functionalized Benzothiadiazole Derivatives as Light-up Sensors for DNA and BSA. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 17866-17883.
- (115) Kaur, B.; Raza, R.; Branda, N. R. A dual-mode visual detector for toxic hydrazine. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 22835-22841.
- (116) Parsons, M. L. The definition of detection limits. *J. Chem. Educ.* **1969**, *46*, 290-292.
- (117) Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Romao, W.; Lalli, P. M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 265-294.

- (118) Eberlin, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2007**, *13*, 19-28.
- (119) Limberger, J.; Leal, B. C.; Monteiro, A. L.; Dupont, J. Charge-tagged ligands: useful tools for immobilising complexes and detecting reaction species during catalysis. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 77-94.
- (120) Santos, L. S. What do We Know about Reaction Mechanism? The Electrospray Ionization Mass Spectrometry Approach. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1827-1840.
- (121) Santos, L. S. Online mechanistic investigations of catalyzed reactions by electrospray ionization mass spectrometry: A tool to intercept transient species in solution. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 235-253.
- (122) Vikse, K. L.; McIndoe, J. S. Mechanistic insights from mass spectrometry: examination of the elementary steps of catalytic reactions in the gas phase. *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 361-377.
- (123) Chisholm, D. M.; McIndoe, J. S. Charged ligands for catalyst immobilisation and analysis. *Dalton Trans.* **2008**, 3933-3945.
- (124) Mukherjee, K.; Chio, T. I.; Gu, H.; Sackett, D. L.; Bane, S. L.; Sever, S. A Novel Fluorogenic Assay for the Detection of Nephrotoxin-Induced Oxidative Stress in Live Cells and Renal Tissue. *ACS Sens.* **2021**, *6*, 2523-2528.
- (125) Erkan, H.; Telci, D.; Dilek, O. Design of Fluorescent Probes for Bioorthogonal Labeling of Carbonylation in Live Cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7668.
- (126) Reeves, A. G.; Subbarao, M.; Lippert, A. R. Imaging acetaldehyde formation during ethanol metabolism in living cells using a hydrazinyl naphthalimide fluorescent probe. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 3418-3421.

- (127) Mukherjee, K.; Chio, T. I.; Sackett, D. L.; Bane, S. L. Detection of oxidative stress-induced carbonylation in live mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *84*, 11-21.
- (128) O'Donovan, L.; De Bank, P. A. A hydrazide-anchored dendron scaffold for chemoselective ligation strategies. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7290-7296.
- (129) Key, J. A.; Li, C. S.; Cairo, C. W. Detection of Cellular Sialic Acid Content Using Nitrobenzoxadiazole Carbonyl-Reactive Chromophores. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 363-371.
- (130) Vemula, V.; Ni, Z.; Fedorova, M. Fluorescence labeling of carbonylated lipids and proteins in cells using coumarin-hydrazide. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 195-204.
- (131) Chen, H.-W.; Li, H.; Song, Q.-H. BODIPY-Substituted Hydrazine as a Fluorescent Probe for Rapid and Sensitive Detection of Formaldehyde in Aqueous Solutions and in Live Cells. *ACS Omega* **2018**, *3*, 18189-18195.
- (132) Huang, S. M.; Li, Z. J.; Liu, M. H.; Zhou, M. J.; Weng, J. T.; He, Y.; Jiang, Y.; Zhang, H. T.; Sun, H. Y. Reaction-based fluorescent and chemiluminescent probes for formaldehyde detection and imaging. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 1442-1453.
- (133) Karelson, M.; Zerner, M. C. On the  $n-\pi^*$  Blue Shift Accompanying Solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9405-9406.
- (134) Li, T. T.; Zheng, Y. B.; Yu, L.; Chen, S. L. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 60-67.
- (135) Li, T. T.; Zheng, Y. B.; Yu, L.; Chen, S. L. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass Bioenergy* **2014**, *66*, 204-213.

- (136) Qiu, R.; Gao, S.; Lopez, P. A.; Ogden, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* **2017**, *28*, 192-199.
- (137) Ennaceri, H.; Fischer, K.; Schulze, A.; Moheimani, N. R. Membrane fouling control for sustainable microalgal biodiesel production: A review. *Ren. Sust. Energ. Rev.* **2022**, *161*, 112335.
- (138) Dong, T.; Knoshaug, E. P.; Pienkos, P. T.; Laurens, L. M. L. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Appl. Energy* **2016**, *177*, 879-895.
- (139) Adams, C.; Godfrey, V.; Wahlen, B.; Seefeldt, L.; Bugbee, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid Cross Mark content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 188-194.
- (140) Rumin, J.; Bonnefond, H.; Saint-Jean, B.; Rouxel, C.; Sciandra, A.; Bernard, O.; Cadoret, J.-P.; Bougaran, G. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 42.
- (141) Lee, Y.; Na, S.; Lee, S.; Jeon, N. L.; Park, S. B. Optimization of Seoul-Fluor-based lipid droplet bioprobes and their application in microalgae for bio-fuel study. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 952-956.
- (142) Dashkova, V.; Segev, E.; Malashenkov, D.; Kolter, R.; Vorobjev, I.; Barteneva, N. S. Microalgal cytometric analysis in the presence of endogenous autofluorescent pigments. *Algal Res.* **2016**, *19*, 370-380.
- (143) Zhou, Z. L.; Li, P. J.; Liu, Z. H.; Wu, C. Y.; Zhang, Y. Y.; Li, H. T. Construction of a unique fluorescent probe for rapid and highly sensitive detection of glutathione in living cells and zebrafish. *Talanta* **2022**, *243*, 123364.

- (144) Kong, X. Y.; Shuang, S. M.; Zhang, Y. T.; Wang, Y.; Dong, C. Dicyanoisophorone-based fluorescent probe with large Stokes shift for ratiometric detection and imaging of exogenous/endogenous hypochlorite in cell and zebrafish. *Talanta* **2022**, *242*, 123293.
- (145) Gan, Y. B.; Yin, G. X.; Wang, J. H.; Yin, P. A novel AIE fluorescent probe for the monitoring of aluminum ions in living cells and zebrafish. *Analyst* **2022**, *147*, 2828-2833.
- (146) Su, M. J.; Liu, C. Y.; Liang, Y. Y.; Zhang, Y.; Rong, X. D.; Wang, X.; Li, X. W.; Wang, K.; Zhu, H. C.; Yu, M. H.; Sheng, W. L.; Zhu, B. C. A novel water-soluble naphthalimide-based turn-on fluorescent probe for mercury ion detection in living cells and zebrafish. *New J. Chem.* **2022**, *46*, 10951-10956.
- (147) Ding, G. W.; Gai, F. Q.; Gou, Z. M.; Zuo, Y. J. A fluorescent probe based on POSS for facilitating the visualization of HClO and NO in living cells and zebrafish. *Anal. Methods* **2022**, *14*, 2035-2042.
- (148) Zhao, Z. H.; Xing, L. T.; Feng, Q. L.; Han, L. A novel colorimetric fluorescent probe for detecting hydrazine in living cells and zebrafish. *Luminescence* **2022**, *37*, 995-1000.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: \_\_\_\_\_

Programa: PPGA

Nome completo: Camila de Oliveira Santos

Título do Trabalho: Bioimagemento in vitro e in vivo com um sensor fluorescente derivado do núcleo Benzotriazolol relativo para hidrazina

Nível: ( ) Mestrado (X) Doutorado

Orientador/a: Bruno Amaro da Silveira Neto