



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

LORENA PEREIRA DE ANDRADE

MARCADORES CELULARES FLUORESCENTES BASEADOS NO
BENZOTIADIAZOL, PROVA DE CONCEITO E TENDÊNCIAS

Brasília

2016

LORENA PEREIRA DE ANDRADE

MARCADORES CELULARES FLUORESCENTES BASEADOS NO
BENZOTIADIAZOL, PROVA DE CONCEITO E TENDÊNCIAS

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

Orientador: Prof. Dr. José R. Corrêa

Brasília

2016

LORENA PEREIRA DE ANDRADE

MARCADORES CELULARES FLUORESCENTES BASEADOS NO
BENZOTIADIAZOL PROVA DE CONCEITO E TENDÊNCIAS

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

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Profa. Dra. Nadia Skorupa Parachin (Membro Titular)

Profa. Dra. Nadja Nitz Silva Lociks de Araújo (Membro Titular)

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

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AAN553m Andrade, Lorena Pereira
MARCADORES CELULARES FLUORESCENTES BASEADOS NO
BENZOTIADIAZOL, PROVA DE CONCEITO E TENDÊNCIAS / Lorena
Pereira Andrade; orientador José Raimundo Corrêa. --
Brasília, 2016.
58 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular)
- Universidade de Brasília, 2016.

1. Marcadores Fluorescentes. 2. Imagem Confocal. 3.
Benzotiadiazol . 4. C. elegans. 5. Lipídios. I. Corrêa,
José Raimundo, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força interior para superar as dificuldades e proteção para me amparar.

À minha família que tanto amo e que sempre me ensina lições de paciência e amor, me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios e limitações.

Ao professor e orientador Dr. José Raimundo Corrêa, pela paciência e orientação, respeito e profissionalismo, contribuindo para o meu crescimento profissional, me guiando no caminho da ciência.

Ao Professor Brenno Amaro daSilveira Neto, pelo apoio, colaboração e oportunidade de participar do desenvolvimento deste e de diversos outros trabalhos. Bem como paciência para as perguntas durante meu aprendizado. Meus sinceros agradecimentos ao laboratório de Química Medicinal e Tecnológico, e também aos colegas de laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, pelas colaborações, pela rica bagagem de informações e conhecimento compartilhado, principalmente pela paciência e prontidão.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa Felipe, Mírian, Núbia, Karen, Lídia, Fabíola e Samira pelas inúmeras ajudas e favores, pela oportunidade de ensinar e aprender todos os dias. Em especial ao Zé, querido! Muito obrigada por pacientemente permitir que eu encha de perguntas bem como por dividir risadas. À Dani, que dividiu comigo as ansiedades e felicidades durante esta caminhada, sendo sempre fofa e sincera em sua opinião. Ao Douglas, Ana Lu e Andressa, que sempre me remetem às lembranças de ternura e amizade, me apoiando e demonstrando prontidão em me ajudar.

Agradeço também aos demais colegas de laboratório, Ingrid, Brígida, Shaiane e Yasmin, por sempre ouvir nos momentos difíceis e partilhar das minhas piadas sem graça, ou do r puxado. Pelo enorme apoio durante todo o tempo, com conselhos com afagos ou puxões de orelha.

À todos do Laboratório Microscopia Eletrônica, que sempre estiveram me ensinando e ajudando a me adaptar num ambiente completamente novo para mim.

Às meninas do Laboratório de Baculovírus, que compraram minhas brigas e meu cansaço para fazer tudo isso acontecer. Meu eterno carinho May, Loes e Déh. Vocês são demais!

Ao Sr. Luan (rs), pessoa incrível que trabalhou comigo, me apoiou, estimulou a sempre seguir em frente, me ensina a ser uma pessoa melhor do que fui no dia anterior. Por me acompanhar em tantos momentos importantes da minha vida e no meu crescimento profissional e pessoal. Amo você.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste trabalho.

E à todos que estiveram nesses dias, e tardes, e noites, e madrugadas... que contribuíram para que eu chegasse até aqui. Os frutos colhidos são mais doces quando se compartilha entre amigos.

Resumo

Marcadores fluorescentes são amplamente empregados para a análise da biologia celular, permitindo investigar e monitorar biomoléculas e organelas durante os processos metabólicos relacionados à vida e a morte das células. Em particular a marcação de lipídios vem se tornando cada vez mais empregada, devido à importância destas moléculas na homeostase das células e dos organismos. Existem diversos marcadores comerciais disponíveis para atender esta demanda, no entanto esses marcadores apresentam uma série de desvantagens que tornam seu uso uma alternativa pouco atrativa. Nosso grupo de pesquisa tem buscado desenvolver novas moléculas fluorescentes visando seu emprego no imageamento celular, contornando as limitações impostas pelos agentes fluorescentes comerciais de referência atualmente empregados. Neste contexto, nosso grupo vem trabalhando com moléculas que apresentam o núcleo 2,1,3- benzotiadiazola (BTD) que possui um conjunto de características químicas desejáveis para o seu emprego na síntese de compostos fluorescentes. Este trabalho apresenta três moléculas inéditas derivadas do núcleo BTD (BJL16#unb1, BJL16#unb2 e BJL16#unb3), idealizadas para ter alta afinidade por lipídios sem perder sua propriedade de solubilidade em solução aquosa. Estas moléculas possuem estrutura molecular com características únicas e este trabalho procurou demonstrar a ótima relação entre a arquitetura molecular, sua solubilidade e seletividade ao alvo celular predito através de ensaios de imageamento celular *in vitro* e no modelo *C. elegans* N2 selvagem. Os resultados demonstraram a alta afinidade dos compostos por vesículas de lipídios, emitem um ótimo sinal fluorescente, no entanto apresentaram taxas de solubilidade variada. O composto BJL16#unb1 apesar de ser o de menor intensidade de fluorescência dentre os três compostos testados, foi o mais solúvel, com melhor desempenho de permeabilidade no ensaio com o modelo *C. elegans*. Comparados ao Bodipy® que é o marcador comercial de lipídios de referência, os compostos apresentaram melhor solubilidade, intensidade de fluorescência similar, sendo que o composto BJL16#unb3 apresentou maior intensidade e marcação mais ampla, uma vez que marcou estruturas não marcadas pelo Bodipy®. Além disso, foi demonstrado para os compostos testados, ausência de citotoxicidade, estabilidade durante armazenamento e fotoestabilidade durante o uso, características também superiores às do Bodipy®.

Palavras chave: *C. elegans*; Fluorescência; Benzotiadiazol; Lipídios, Imagem confocal.

Abstract

Fluorescent probes are widely used to cellular biology analysis, allowing the investigation and monitoring of biomolecules and organelles during metabolic processes related to life and death of cells. In particular the lipid probes have becoming increasingly employed because of the importance of these molecules in the homeostasis of cells and organisms. There are many commercial probes available to meet this demand; however these probes have a number of disadvantages that make its use an unattractive choice. Our research group has sought to develop new enhanced fluorescent molecules targeting its use in cellular imaging, bypassing the limitations imposed by commercial fluorescent agents currently employed as reference probes. In this context, our group has been working with molecules that have the core 2,1,3 benzotriazol (BTD) that has a set of chemical characteristics desirable for its use in the synthesis of fluorescent compounds. In this work, was evaluated three new molecules derived from BTD core (BJL16 # unb1, BJL16 # unb2 and BJL16 # unb3), idealized to have high affinity for lipids without losing their solubility properties in aqueous solution. These molecules have molecular structure with unique characteristics and this work will seek to show the relationship between the molecular architecture, its solubility and selectivity to the predicted target cell organelles through cell imaging assays *in vitro* and in *C. elegans* model. The results show that the compounds have high affinity for lipid vesicles, and an intense fluorescent signal. However, the solubility rates were not constant to all compounds. The BJL16 # unb1 molecule shows the lowest intensity of fluorescent signal from the three tested compounds, but also was the most soluble among them, with the better permeability performance in the *C. elegans* model test as compared with the Bodipy® which is the commercial reference probe to lipids staining. Furthermore, the three compounds had shown better solubility, a similar fluorescence intensity, but the BJL16unb#3 exhibited a better solubility and wider staining profile to those obtained with Bodipy® which failed to staining lots of lipids structures. Finally, it was shown that the tested compounds, lack of cytotoxicity, was stable in stock solution and shows high photostability during its use, all these characteristics also were higher than those found in Bodipy®.

Keywords: *C. elegans*; Fluorescence; Benzotriazol; Lipid; Confocal image.

Índice de Figuras

Figura 1. O poder da morfologia, diferenças fundamentais na arquitetura celular e distribuição das organelas.	5
Figura 2. Representação do espectro eletromagnético.....	7
Figura 3. Detecção de efluxo de cálcio em células T estimuladas com pervanadat.).	10
Figura 4. Fórmula estrutura do 2,1,3-benzotiadiazol (BTD).	15
Figura 5. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231 e não-tumoral HUVEC, incubadas com BTD-cA, BTD-qA, BTD-mO ou DMSO em concentração de 10 µM, por 24 horas de tratamento.....	24
Figura 6. Células MDA-MB-231 não tratadas. As células MDA-MB-231 incubadas com meio de diluição dos compostos por uma hora (Controle não tratado)..	26
Figura 7. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb1..	26
Figura 8. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb2..	27
Figura 9. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb3.	27
Figura 10. Células MCF7, DU 145, CACO2 e HUVEC tratadas com o composto BJJ16#unb1.....	28
Figura 11. Células MCF7, DU 145, CACO2 e HUVEC tratadas com o composto BJJ16#unb2.....	29
Figura 12. Células MCF7, DU 145, CACO2 e HUVEC tratadas com o composto BJJ16#unb3.....	30
Figura 13. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb1.	31
Figura 14. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb2..	32
Figura 15. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb3..	33
Figura 16. Análise de intensidade de fluorescência do composto BJJ16#unb1...	34
Figura 17. Análise de intensidade de fluorescência BJJ16#unb2..	35
Figura 18. Análise de intensidade de fluorescência BJJ16#unb3.	36

Figura 19. <i>C. elegans</i> não tratado e tratado com marcador de referência Bodipy®..	37
.....	
Figura 20. <i>C. elegans</i> tratados com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3.....	38
Figura 21. Renderização 3D e análise ortogonal das células MDA-MB-231 tratadas com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3..	39
.....	
Figura 22. Renderização 3D e análise ortogonal do <i>C. elegans</i> tratado com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3..	40
.....	

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	American Type Culture Collection
A-T	Adenosina-Timina
BJL16#unb1	Composto 1
BJL16#unb2	Composto 2
BJL16#unb3	Composto 3
BTD	Benzotiadiazol
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole, diidroclorida
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
PBS	Tampão fostato salino
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. Introdução.....	1
1.1. O processo de produção e o desenvolvimento de marcadores celulares fluorescentes	1
1.2. O estudo das células	4
1.3. A luz visível e a luminescência	5
1.4. Fluorescência, fluoróforos e microscopia	8
1.5. Moléculas fluorescentes e sua otimização.....	14
1.6. Marcadores fluorescentes de lipídeos.....	16
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos	18
3.1. 3.1 Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1. Manutenção de células normais e tumorais.....	19
4.2. Avaliação da Marcação Celular	19
4.2.1. Marcação com compostos fluorescentes derivados de Benzotiadiazol	19
4.2.2. Marcação de lipídios intracelular com marcador comercial Bodipy® e DAPI	20
4.2.3. Co-marcção do composto BJJ16#UnB3com DAPI e Bodipy®	20

4.3.	Avaliação da viabilidade celular	21
4.4.	Avaliação da marcação no modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
4.4.1.	Marcação de <i>C. elegans</i> com derivados fluorescentes de benzotiadiazol.....	21
4.4.2.	Marcação de <i>C. elegans</i> Bodipy®.....	22
4.5.	Análise de renderização 3D (Z-stack).....	22
4.6.	Quantificação de fluorescência	22
4.7.	Análises Estatísticas	23
5.	Resultados	24
5.1.	Viabilidade celular	24
5.2.	Marcação celular	25
5.3.	Confirmação de marcação específica.....	30
5.4.	Quantificação de fluorescência	33
5.5.	Marcação no modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
5.6.	Técnica de renderização 3D (Z-stack) e análise ortogonal	38
6.	Discussão	41
7.	Conclusões e Perspectivas.....	45
8.	Referências.....	46

1. Introdução

1.1. O processo de produção e o desenvolvimento de marcadores celulares fluorescentes

O processo de produção de materiais envolve variados mecanismos voltados para a transformação de materiais através dos quais valores irão sendo agregados a estes intermediários até se alcançar o produto final requerido pelo mercado (ROSENFELD *et al.*, 2006). Esta cadeia de transformação apresenta dois conjuntos principais de recursos: (1) os recursos de transformação que é composto pela infraestrutura e as pessoas que executam o processo de transformação; (2) os materiais brutos, componentes e reagentes que são transformados em produto (MORTELLA, 2008; CAPANEMA e PALMEIRA FILHO, 2016). Qualquer processo produtivo envolve uma série de links organizados em uma cadeia de produção. Cada estágio dentro desta cadeia é que tem como objetivo primário agregar valor ao produto no curso de sua produção. Agregar valor significa promover alterações no produto de forma que cada vez mais ele atenda a um padrão requerido pelo mercado e que desta forma seus consumidores estejam dispostos a pagar mais por este produto (BERTRAND, 2009; SANTOS e PINHO, 2012).

De forma geral qualquer produto deve passar por importantes etapas antes de saírem para o mercado, entre estas etapas podemos destacar o controle de qualidade e no caso de consumíveis rigorosos testes de segurança farmacológica e/ou nutricionais (PARASURAMAN, 2011; FDA, 2016). Estas etapas visam garantir que estes produtos atendam as indicações de uso com segurança para o consumidor e que apresentem uma vida útil apropriada se aplicadas às condições de uso e estocagem estabelecidas pelos fabricantes (BRASIL, 2010).

Como cada produto apresenta suas especificidades, aqui trataremos das especificidades das moléculas fluorescentes que são os produtos dos quais se trata esta dissertação de mestrado.

O processo de produção de uma molécula fluorescente não é diferente dos modelos clássicos de produção aplicados a outros materiais, quando consideramos sua produção pela indústria. No entanto o seu desenvolvimento pode envolver etapas adicionais totalmente desenvolvidas em instituições de ensino e pesquisa, antes de suas etapas de produção ser escalonadas e transferidas para uma planta de produção (CHIN-DUSTING, 2005; ALENCAR, 2007; MILNE e MALINS 2012). A produção de uma molécula fluorescente envolve extensos e elaborados exercícios mentais e computacionais objetivando adequar à estrutura atômica aos parâmetros físico-químicos próximos aos ideais no que diz respeito principalmente ao seu rendimento quântico, desvio de Stokes e comprimento de onda de emissão desejado (SONG *et al.*, 2012; ANTARIS, 2015; VAN DER VELDE, 2016). Outro ponto muito importante contido nesta etapa de planejamento e que é

essencial para a aplicabilidade da molécula, é o estudo das regiões da molécula que estarão livres para as reações intracelulares. Estas regiões é que serão responsáveis pela especificidade ou não dos agentes fluorescentes. E estas regiões são incluídas ou bloqueadas na molécula de acordo com o objetivo que o marcador deverá atender (NETO e CORREA, 2014).

Neste trabalho o processo intelectual envolvido na criação da molécula levou a idealização de uma estrutura plana, com cadeias carbônicas cíclicas e fechadas, arquitetura rígida, com características apolares de forma a maximizar a sua afinidade por lipídios. Estas especificações visaram atender o nosso objetivo central de produzir um marcador específico para corpúsculos lipídicos celulares de ampla aplicação. A partir deste ponto os processos de síntese e catálise foram pensados de forma a maximizar o rendimento, reduzir ao máximo o tempo de reação, viabilizar a reação em condições brandas como, por exemplo, a temperatura ambiente e eliminar rejeitos de forma a atender a tendência atual voltada para a química verde (BARAN *et al.*, 2016; ANNAMALAI e NALLAMUTHU, 2016; DASARI e GUTTENA, 2016; MARYAMABADI *et al.*, 2016). Esta fase também é utilizada para planejamento da reação de forma que o produto formado não necessite de etapas adicionais de separação e purificação. Não sendo possível evitar a fase de separação e purificação, busca-se o desenho racional da reação de forma que as fases de separação e purificação sejam fáceis, rápidas e de baixo custo (McVEY, TILLEY, 2014; ZONG *et al.*, 2015; BASHIR *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016).

Vencida esta fase, os componentes são colocados para reagir e o produto é formado, separado e/ou purificado e submetidos a uma série de análises para que sejam certificadas as suas características, desde a confirmação da estrutura atômica até o estudo fotofísico da molécula visando caracterizar as faixas da excitação luminosa, rendimento quântico, desvio de Stokes e emissão de fluorescência (FENG, 2012; MOTA *et al.*, 2015, NETO e CORREA 2014). Em seguida este produto deve passar pela fase de validação biológica da sua aplicação. Esta etapa é crucial para todo o processo de desenvolvimento, é nesta etapa que se terá a confirmação ou não de que todo o esforço intelectual, técnicas e práticas empregadas na produção da molécula geraram um produto que atende as diretrizes básicas que nortearam a sua própria criação. Esta fase é denominada de prova de conceito e a fase final do ciclo de produção do agente fluorescente em escala de laboratório (SHAN, 2015; NETO, 2015). Esta fase consiste em colocar os agentes fluorescentes em contato com células eucarióticas, células procarióticas, ambas ou com biomoléculas isoladas, dependendo da aplicação pretendida para o agente fluorescente (DEMAIN e VAISHNAV, 2009; WAGNER e HORN e DAIMS, 2003; GEORG, 2006). Esta etapa segue rigorosos padrões de ensaio com o uso de diferentes controles, experimentos geralmente realizados em triplicatas com no mínimo três repetições biológicas para se testar a reprodutibilidade do ensaio (KOSSATZ, 2013;

DA CRUZ, et al., 2014). Para o teste celular são empregadas células vivas e células prefixadas. O ensaio com células vivas mostrará a permeabilidade do agente fluorescente às membranas celulares íntegras (NETO e CORREA, 2014), e auxiliará na avaliação da retenção destes fluoróforos no citoplasma das células frente aos diversos sistemas biológicos de efluxo de moléculas, encontrados principalmente em células eucarióticas (LI, 2002). Outros aspectos importantes do teste com células vivas é a capacidade de o agente interagir ou não com o núcleo celular; isso porque a membrana nuclear contém diversos poros que hipoteticamente facilitariam a passagem passiva destas moléculas para o interior do núcleo. No entanto para que estas estruturas sejam retidas no interior do núcleo é necessário que a molécula em questão apresente afinidade química por ao menos um componente do conteúdo dos núcleos celulares. (OLIVEIRA *et al.*, 2010; RAOOF *et al.*, 2012). Com células vivas também se obterá o resultado da especificidade de associação do agente fluorescente com moléculas celulares ou com microrregiões das células. Isto porque nas células vivas todas as moléculas estão em seu estado original sem nenhuma modificação química o que é provocada pela adição de agentes fixadores (BLUNDELL, 1992; ROLLS, 2016).

As células fixadas serão empregadas para a confirmação de que mesmo após a fixação das moléculas biológicas o agente fluorescente ainda interage com sítios de ligação disponíveis nestas moléculas aos quais se associa e produz a sua marcação. Além da marcação das células com os agentes fluorescentes, na etapa de prova de conceito é avaliada também a citotoxicidade destas moléculas, a intensidade da emissão fluorescente no sistema biológico e o decaimento fluorescente dos fluoróforos no sistema biológico após condições extremas de excitação (MARX, 2015; ETHIRAJAN *et al.*, 2011).

Moléculas citotóxicas não são descartadas, apenas terão seu uso restrito a materiais biológicos pré- fixados. Moléculas com baixa permeabilidade a membranas celulares íntegras também não são descartadas, desde que apresentem especificidade de marcação, e da mesma forma terá o seu emprego restrito a materiais biológicos pré-fixados. Isto porque no caso a baixa permeabilidade é contornada pelo processo de fixação química das células que abre diversos poros nas membranas celulares permitindo que o agente fluorescente acesse o interior das células interaja com o seu alvo e produza a marcação de acordo com a sua potencial especificidade (GRIMM, *et al.*, 2015; MEHTA, 2011). Mesmo quando um agente fluorescente apresenta especificidade por moléculas muito abundantes como as proteínas ou ainda com regiões repetitivas de moléculas abundantes, o seu emprego biológico está assegurado. A marcação de moléculas abundantes, desde que o composto fluorescente utilizado não seja citotóxico, poderá ser empregada em ensaios de análise da taxa de proliferação celular (BANKS, *et al.*, 2012; NAKANJAKO, *et al.*, 2013).

Na prova de conceito muitas vezes não é possível demonstrar que a arquitetura da molécula é válida para o uso como marcador celular. Isto pode ser consequência, por exemplo, da ausência de emissão de fluorescência após o agente fluorescente interagir com o sistema biológico. Outros fatores como insolubilidade em água e rápido decaimento da emissão fluorescente são características ligadas à estrutura atômica das moléculas que indicam falhas incontornáveis na sua arquitetura e cuja resolução para estes problemas, obriga os desenvolvedores a voltar à fase de planejamento, para analisar a arquitetura atômica do fluoróforo e remodelar esta estrutura com vistas a superar os obstáculos encontrados na prova de conceito. Em seguida a nova estrutura deverá passar novamente por todas as etapas de produção, para então retornar a prova de conceito. Neste contexto, a prova de conceito é uma etapa crucial para o desenvolvimento, sobre a qual se assenta uma grande responsabilidade para a condução dos ensaios, cujos resultados serão a base para a validação das propriedades das moléculas e sua indicação para aplicações biológicas.

1.2. O estudo das células

A vida organizada em células apresenta sistemas moleculares intrincados e complexos por vezes compartimentalizados no interior de organelas e/ou dispersos pelo citoplasma destas células. Este micro ambiente encerra uma infinidade de moléculas e vias catabólicas e anabólicas que se inter-relacionam e sustentam a viabilidade das células. Todas estas interações instigam a busca por uma compreensão detalhada destes inúmeros processos celulares bem como o entendimento de sua relação com a homeostase celular, proliferação, envelhecimento e morte (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2013; GAVA e ZANONI, 2005). E apesar das inúmeras diferenças entre classes de seres vivos, de uma forma generalizada, todas as células eucarióticas e procarióticas apresentam diversos elementos extremamente conservados essenciais à sua organização estrutural e funcional (ALBERTS, *et al.*, 2014).

Investigar e compreender como se organiza e se mantém a estrutura celular e relacionar estes aspectos com a funcionalidade das biomoléculas que sustentam a vida, vem sendo o objetivo do homem através dos séculos. O conhecimento básico adquirido a cerca da estrutura e função das mais diferentes células, bem como dos tecidos e organismos por elas organizados vem sendo empregado em várias vertentes. Seja na compreensão de doenças aprimorando as intervenções clínicas ou aplicando este conhecimento em ações preventivas e para o aprimoramento de ferramentas utilizadas para o diagnóstico (FREEMAN, 2012). Quanto mais entendemos as células, mais próximos do entendimento da vida em nosso planeta nós também chegamos e assim começamos a cada vez mais este conhecimento nos permite manipular elementos básicos destas células em nosso benefício (HENRY, *et al.*, 1999; SOUZA, 2009). Este conhecimento que vem

crescendo a cada dia nos proporciona inclusive a possibilidade de aplicação de técnicas simplesmente para correções estéticas ou para auxiliar na adaptação a um determinado estilo de vida (PEREIRA, 2016; LUZ, *et al.*, 2014). No entanto, as células em geral são unidades microscópicas cujos elementos essenciais de seus mecanismos podem estar dispersos em diferentes compartimentos celulares podendo ainda em um dado momento e/ou condição da fisiologia celular, estar em trânsito pelo citoplasma (MUTHUSAMY, *et al.*, 2009; HUANG, *et al.*, 2012; VÖLGYI, *et al.*, 2016). A dimensão microscópica destes elementos e compartimentos demanda um grande esforço do homem para o desenvolvimento de novas tecnologias de investigação, incluindo equipamentos, materiais e metodologias, das quais aqui gostaríamos de destacar as tecnologias baseadas na aquisição de imagens celulares em especial a microscopia e a espectroscopia (KARP, 2005; QUEIROZ, *et al.*, 2012).

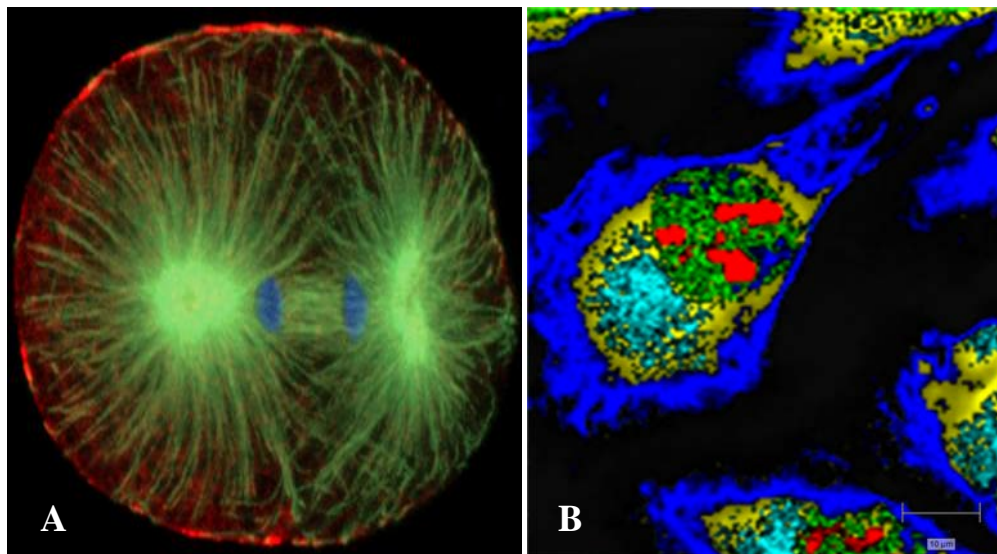


Figura 1. O poder da morfologia, diferenças fundamentais na arquitetura celular e distribuição das organelas. **A.** Fotomicrografia fluorescente de célula embrionária de *Caenorhabditis elegans* durante o processo de divisão celular (anáfase). Microtúbulos do fuso mitótico (verde), cromossomos (azul), microfilamentos (vermelho) agrupado imediatamente abaixo da membrana plasmática. **B.** Imagem por espectroscopia de Raman, células do osteosarcoma humano. Núcleo (verde), nucléolo (vermelho), organelas membranosas (ciano), citoplasma amarelo e membrana plasmática azul (Fonte da imagem, empresa Renishaw Apply InnovationTM, 2016).

1.3. A luz visível e a luminescência

Entender o fenômeno da emissão de luz sempre foi do interesse humano, desde a antiguidade, observando diversos aspectos relacionados à dispersão luminosa em diferentes meios e posteriormente abordando a luz por meio da física e da matemática caracterizando as propriedades dos fótons e dos feixes luminosos (HECKLER, 2004). Quando a matéria é iluminada, a interação entre os fótons e a estrutura atômica das mais diferentes moléculas pode promover a ocorrência de

diversas reações na matéria. Reações sutis como uma simples variação de spin em alguns elétrons ou do spin total dos átomos que estejam interagindo com os fótons. E macro reações, como o desencadear de processos que, por exemplo, promovem modificações do padrão de compactação da cromatina em amostras biológicas (VAREJÃO-SILVA, 2006).

A espectroscopia é uma técnica baseada na produção e interpretação dos espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas (HECKLER, 2004). Esta técnica tem suas origens nos estudos da dispersão da luz visível através de um prisma, com registros nos trabalhos de Isaac Newton, em 1665 (BLUNDELL, 1992). Com isso introduziu-se o termo “espectro” na física se referindo a gama de cores observadas nesta dispersão. Cabe dizer que a luz é uma pequena fração do espectro eletromagnético, sendo que o termo luz visível refere-se à faixa de comprimento de onda de radiação composta por fótons que vai de 400 a 700nm aproximadamente, e que são capazes de sensibilizar o olho humano de uma pessoa normal (TAIZ e ZEIGER, 2009). Esta faixa é limitada pelas faixas de radiação luminosa de alta frequência, a ultravioleta (com comprimento de onda menor que 400nm) pela radiação luminosa infravermelha que é a de mais baixa frequência (com comprimento de onda maior que 700nm) (LAKOWICZ, 2006; HOLLER, *et al.*, 2009). Estas faixas de radiação luminosas são invisíveis para os olhos humanos.

O conceito de espectroscopia então se expandiu, englobando qualquer interação da energia radioativa em função do comprimento de onda e/ou de sua frequência, sejam elétrons, prótons, íons ou mesmo energia liberada em função da colisão destas estruturas com outras partículas (NUNES, 2013). Definida como uma técnica analítica, empreende meios para explorar propriedades específicas da matéria como a geometria molecular e a natureza das ligações, distinção de grupos funcionais presentes ou mesmo identificação dos átomos das moléculas analisadas, mensurando a intensidade de radiação emitida em função de seu comprimento de onda, englobando o estudo da interação entre a matéria e a radiação eletromagnética (SKOOG, *et al.*, 2006; HAGE e CARR, 2012).

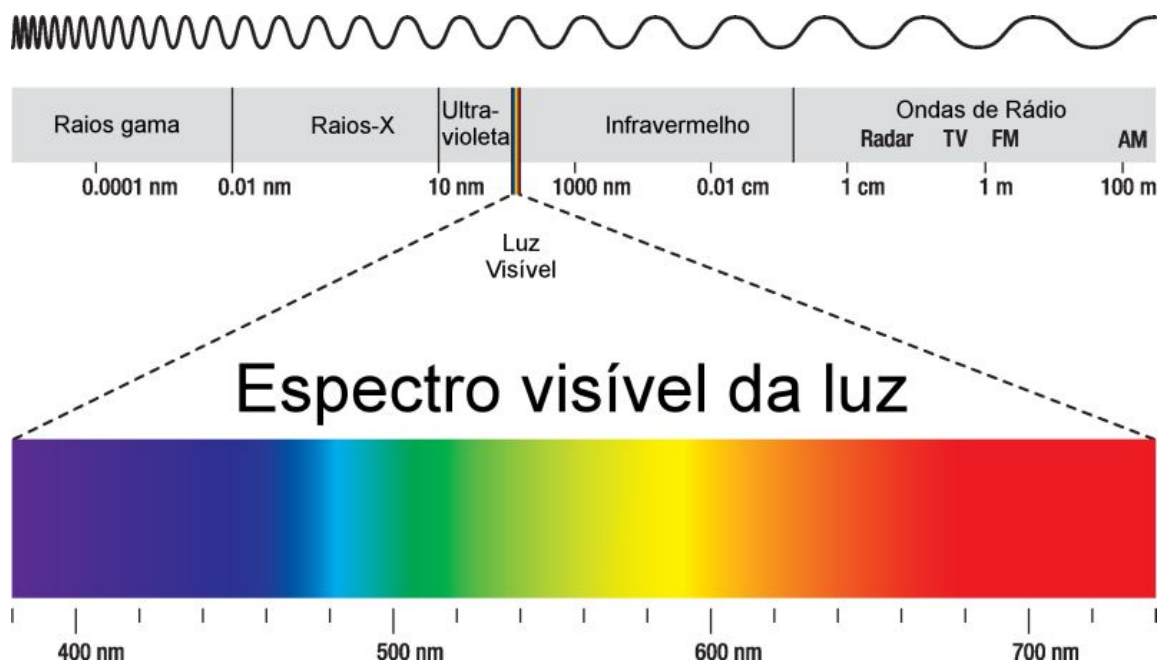


Figura 2. Representação do espectro eletromagnético. Espectro eletromagnético com destaque para a faixa de comprimentos de onda de luz visível.

Estudos de espectroscopia foram fundamentais para o desenvolvimento de várias áreas da física e da química, visto que os átomos apresentam espectros característicos e originais, ou seja, seus comprimentos de onda associados à absorção e/ou emissão óptica são definidos e individuais (TAIZ e ZEIGER, 2009; LAKOWICZ, 2006). E com este tipo de informação, tornou-se possível a detecção de átomos e moléculas, bem como sua identificação e quantificação pelos espectros obtidos em técnicas espectroscópicas (HOLLER *et al.*, 2009, HAGE e CARR, 2012).

Este vasto campo investigativo dispõe de inúmeras aplicações, que depende do processo envolvido e da informação a que se pretende obter. Os dados coletados pelos espectrômetros são exibidos de forma digital ou mediante imagens de alta resolução espacial ou espectral (HOLLER *et al.*, 2009; ANDO, 2005). Existe ainda a espectroscopia de emissão atômica, que mensura a luz emitida pelos átomos de uma amostra que passaram por uma fonte de calor de uma chama (PAVIA *et al.*, 2010), e os métodos de espectroscopia vibracional, infravermelho e Raman, que são técnicas que dão a mesma informação e se complementam, ou seja, investigam as transições vibracionais, com objetivo de obter informações a respeito da geometria molecular, bem como da natureza das ligações químicas presentes na molécula (ANDO, 2005; LI *et al.*, 2014). Por fim, cabe-nos citar também a espectroscopia de fluorescência molecular, um processo de fotoluminescência em que átomos e moléculas excitados por absorção de radiação eletromagnética, após voltar para o seu estado de relaxamento emitem luz, de acordo com sua natureza, permitindo identificá-las (FREJ, 2010; ANDO, 2005).

Dentre as várias contribuições, as técnicas de espectroscopia possibilitaram a descoberta de inúmeros elementos químicos, além do seu emprego em análise e identificação de substâncias em exames clínicos e toxicológicos, composição de soluções, teste analíticos de controle de qualidade no desenvolvimento e produção de inúmeros insumos médicos, farmacêuticos e alimentícios (CASTRO *et al.*, 2012; DEGANI, 2001) dentre muitos outros produtos.

Nos mais variados processos de emissão de luz que acontecem na natureza, diferente de muitos daqueles dependentes de um estímulo de alta temperatura, como a incandescência (luz emitida como resultado obtido após estímulo de calor) (ANDO, 2005) a luminescência é emissão de fótons por uma substância de forma independente da sua variação de sua temperatura, mas relacionada a outras causas como exposição à radiação eletromagnética, bombardeamento com elétrons ou reações químicas a temperatura ordinária (HIMMELREICH *et al.*, 2003). A luminescência é, portanto, considerada uma radiação de corpo frio (SCHOTT, 2012). O comprimento de onda luminosa emitido é característico de cada material luminescente (FURETTA *et al.*, 2004, KIND e FIEHN, 2010).

Segundo McKeever (1997), a luminescência apresenta subclasses de acordo com o estímulo de excitação das moléculas que provoca emissão de luz, as radiações nucleares e o raio X, são denominadas radioluminescência. Quando o estímulo é dado através do bombardeamento da substância por elétrons o processo é chamado de catodoluminescência. A quimiluminescência é o processo de emissão de fótons gerado por reações químicas. A termoluminescência é dada pelo aquecimento de minerais após absorção de energia por fontes ionizantes. A capacidade de um material emitir luz através de reações eletroquímicas em solução e denominada de eletroquimioluminescência. Na natureza encontramos diversos organismos vivos capazes de emitirem luz, fenômeno este classificado como bioluminescência. Por fim, mas não menos importante, o estímulo dado por meio de luz ultravioleta, visível ou infravermelha é denominado fotoluminescência, que engloba a fosforescência e a fluorescência (BOTTER-JENSEN, 1997; LAKOWICZ, 2006, WU, *et al.*, 2013), sendo que a emissão de fluorescência é o objeto central de nosso interesse neste trabalho.

1.4. Fluorescência, fluoróforos e microscopia

A fluorescência como citada anteriormente, é um processo de fotoluminescência no qual os átomos das moléculas constituintes do material são excitados por radiação eletromagnética (radiação luminosa), gerando mudança do estado energético dos elétrons presentes nestes materiais

o que promove a emissão de luz (TAKANARA, 2006; MOTA, *et al.*, 2015). A explicação para esse fenômeno é que, no processo de absorção da radiação por uma molécula, o seu estado eletrônico formado por um conjunto de níveis de energia passa por uma transição eletrônica onde o elétron é promovido para orbital de maior energia do que quando em seu estado de relaxamento (normal, não estimulado). Após o estímulo, a tendência é que aquele elétron promovido passe por um processo de relaxamento para o nível vibracional fundamental do estado excitado através da conversão interna (processo não reativo) e, em seguida o retorno para o estado eletrônico fundamental com emissão de luz (TAKANARA, 2006, SKOOG, *et al.*, 2006). Entretanto, segundo Kemp (1932) uma característica que define fluorescência é que ao ser interrompido o fornecimento de radiação luminosa, interrompe-se a emissão da fluorescência. Sendo este aspecto um dos principais marcos para esta classificação.

Mas primeiramente, para que uma substância orgânica torne o fenômeno de fotoluminescente possível, é necessário que algumas condições da natureza de sua estrutura química estejam presentes. Dentre estas características cabe destacar a rigidez estrutural, planaridade e ligações π -conjugadas, que geralmente formam grupos funcionais aromáticos e/ou anéis condensados (MOTA, *et al.*, 2015, VALEUR, 2001). Por outro lado, a emissão de fluorescência também depende de todo o ambiente em que o espectro é mensurado, e mesmo a forma que o composto fluorescente é armazenado. Pois as condições de acondicionamento ou manipulação podem interferir diretamente com a capacidade do fluoróforo de emitir fluorescência (MARQUEZIN, 2008). O tempo de vida da excitação das espécies fluorescentes é breve, devido às várias formas que um átomo excitado pode ceder seu excesso de energia até o estado fundamental (VALEUR, 2001; SHANER, *et al.*, 2005).

Porém, no fenômeno de fluorescência, o processo de emissão de fótons pelos agentes fluorescentes se mantém por cerca de 10^{-5} segundos que, comparado aos demais processos de relaxamento como o vibracional levando cerca de 10^{-15} segundos ou menos, ou de conversão interna que leva de 10^{-6} a 10^{-9} segundos, o tempo de emissão de fótons na fluorescência é um tempo favorável com eventos relacionados à interação com o meio circundante, tomando as técnicas de fluorescência atraentes para estudos relacionados às propriedades biofísicas de moléculas biológicas (SKOOG *et al.*, 2006; MARQUEZIN, 2008).

As aplicações de fluoróforos são várias e abrangem inúmeras e importantes áreas da ciência. Como ferramentas de detecção empregada para o estudo de materiais biológicos possibilitam a investigação de vários parâmetros simultaneamente que podem ser relacionados com as mais diferentes condições experimentais ou ainda comparações das diferenças estruturais e funcionais encontradas nos estados de saúde e doença (RESCH-GENGER, *et al.*, 2008; MOTA, *et al.*, 2015; VALEUR, 2001). Além disso, as informações que são obtidas por este meio, podem complementar,

justificar ou mesmo refutar conclusões, com aplicabilidade em diversas outras áreas; como a de produtos alimentícios, farmacêutico, análises clínicas e produtos naturais. A fluorescência incrementou e aumentou a sensibilidade de técnicas empregadas para a verificação da viscosidade de soluções (WU, *et al.*, 2013), o pH (CHAN, *et al.*, 2013), determinação de concentração iônica (LU, *et al.*, 2007), detecção de biomoléculas (FERAPONTOVA, 2004), análise de conformação de proteínas (MURPHY, *et al.*, 2004), monitoramento e detecção específica de organelas, dentre muitas outras aplicações.

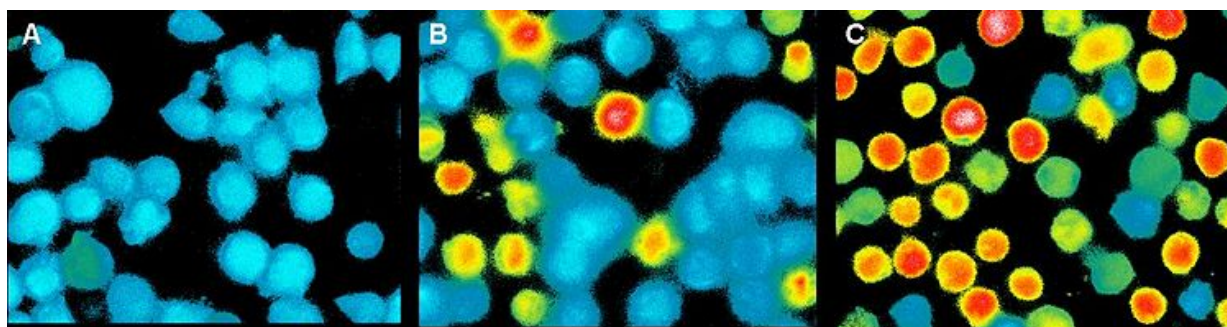


Figura 3. Detecção de efluxo de cálcio em células T estimuladas com pervanadat. A. 1 segundo antes do estímulo. B. 100 segundo após o estímulo. C. 200 segundos após o estímulo. Amarelo para o laranja indica crescente liberação de cálcio. Detecção feita pelo traçador de cálcio Fura-2 (Fonte Team: Freiburg Calcium Imaging, 2016).

As vantagens de aplicação de técnicas de fluorescência estão relacionadas principalmente à possibilidade da utilização de vários tipos de fluoróforos livres ou associados a outras biomoléculas. Os compostos livres podem se ligar virtualmente a qualquer classe de moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Além disso, existe uma grande variedade de agentes fluorescentes que apresentam afinidade específica por organelas celulares, como mitocôndrias, endossomos, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisossomos dentre outros. Assim de forma específica indicam a localização e distribuição espacial destas organelas dentro das células nas mais diferentes condições experimentais (SHANER, *et al.*, 2005; TSIEN, *et al.*, 2006; NETO, *et al.*, 2015). As estruturas atômicas dos fluoróforo bem como a sua organização espacial depois de solubilizado interferem e direcionam a intensidade da fluorescência bem como o comprimento de onda da radiação emitida. A quantidade de fluorescência também pode ser influenciada diretamente por grandes variações ligadas a concentração empregada (NIU, *et al.*, 2007), quantidade do alvo que está sendo investigado (TSIEN, *et al.*, 2006), as propriedades do solvente em que se encontram solubilizados os agentes fluorescentes (LAKOWICZ, 2006) e o pH do meio (CHAN, *et al.*, 2013).

Direcionando o raciocínio para o processo inicial do desenvolvimento de novos marcadores fluorescentes, o ideal é pensar além de suas características fotofísicas de luminescência. Para o

agente fluorescente ser considerado um bom marcador fluorescente, é necessária uma alta solubilidade em água, permeabilidade nas membranas celulares, especificidade por microambientes celulares ou por moléculas específicas. Outro ponto a ser considerado de grande importância é ausência de atividade citotóxica (DA CRUZ, *et al.*, 2014; NETO, *et al.*, 2015; NETO, *et al.*, 2007). Estas características são importantes, pois permitem uma ampliação da utilização desses fluoróforos, visando o seu emprego não só em aplicações *in vitro*, mas também *in vivo*, sem o viés de gerar interferência nas características fisiológicas normais ou mesmo impossibilitar seu uso. Há atualmente algumas classes de fluoróforos, que se diferenciam principalmente pelos grupos substituintes ou pelo núcleo da molécula que, livres ou conjugadas a outras biomoléculas produzem bons resultados quanto à emissão de fluorescência e versatilidade de emprego.

A começar por um grupo mais velho de marcadores fluorescentes denominados Cianinas: Cy2, Cy3, Cy5 e Cy7, que foram e continuam sendo a base para o desenvolvimento e otimização de diversos novos marcadores fluorescentes utilizados nas técnicas de imunofluorescência (KRETSCHY, 2014; WESSENDORF e BREIJE, 1992). A grande maioria destes marcadores são anticorpos conjugados as cianinas e que podem ser empregados em uma ampla diversidade de técnicas de detecção.

As técnicas microscopia baseadas na fluorescência também são amplamente utilizadas para a análise de ácidos nucléicos. Este método pode ser empregado nos mais diversos contextos, como análise morfológica do núcleo (sua posição e volume), avaliação do estado de ploidia celular, análise do estado de fragmentação do material genético associado à morte celular por apoptose, dentre muitos outros. O agente fluorescente mais amplamente utilizado para a marcação do material genético para análise por microscopia baseada em fluorescência é o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), composto altamente permeável a membrana plasmática, que se liga em regiões ricas em adenina-timina (A-T) do DNA dupla fita, e que pode ser utilizado tanto em células vivas (curtos períodos de tempo) quanto em células pré-fixadas (GOMES, *et al.*, 2013; JOHNSON e CRISS, 2013). Outro marcador amplamente empregado para a detecção de material genético são os pertencentes a família Hoechst (Hoechst33258, Hoechst33342 e Hoechst34580) que são bis-benzamidas com tendência a intercalação do material genético em regiões ricas em A-T, e são muito similares ao DAPI (WOLF, *et al.*, 1993; KAPUSCINSKI, 1995).

Outro marcador amplamente utilizado para a detecção de material genético é o iodeto de propídio. Embora este marcador tenha propriedade de intercalar o material genético, produzindo uma boa marcação (FRANCH, *et al.*, 2012), este composto não é permeável às membranas celulares intactas das células vivas (CHENG, 2007). Esta característica valida a sua segunda aplicação. Este marcador é também amplamente utilizado como um indicador de viabilidade

celular. Uma vez que células mortas perdem a integridade de membrana apresentam o núcleo corado pelo iodeto de propídio (FRANCH, *et al.*, 2012). Além disso, este composto pode ser empregado em combinação com outros marcadores para a diferenciação entre a morte celular por necrose e a morte celular por apoptose. Isto porque na morte celular por apoptose não ocorre a perda da integridade da membrana plasmática das células (PAROLIN e REASON, 2001) Porém, por ser um potente intercalante de DNA é também altamente citotóxico (KERR, 1972).

Como mencionado anteriormente, muitas das vezes organelas e compartimentos celulares não são possíveis de serem identificados pela microscopia de luz devido as suas reduzidas dimensões, fazendo necessário o emprego de outras metodologias e suporte tecnológico. Neste contexto, a microscopia de fluorescência permite a identificação de organelas que estão abaixo da resolução da microscopia de luz, permitindo que as mesmas sejam visualizadas. O estudo das mitocôndrias ilustra bem estes casos. A utilização de marcadores que se acumulam nas mitocôndrias de forma específica como MitoTracker® ou Splendor (CARVALHO *et al.*, 2014). O MitoTracker® é um marcador de mitocôndria comercial de referência que permeia a célula e se liga a matriz de proteínas covalentes, através de reação de grupos de cisteína livres de resíduos de tiol. Um ponto importante é que o mesmo não é removido/lavado após a destituição da membrana celular, que ocorre no processo de fixação. Já o Splendor é uma molécula com o núcleo benzotiadiazol que se liga à abertura citosólica do ANT (translocase de nucleotídeo de adenina), produzindo resultados semelhantes aos obtidos com o marcador de referência MitoTracker®. Ainda quanto a marcação de mitocôndrias existem outros marcadores com diferentes mecanismos de associação a esta organela dentre os quais podemos citar a rhodamina 123 e tetrametilrodamina (WOLF, *et al.*, 1993; WESSENDORF e BREIJE, 1992).

Com o mesmo propósito de prover marcação e visualização de organelas citoplasmáticas o marcador comercial LysoTracker® também é um marcador de referência para lisossomos. No entanto, a sua afinidade por compartimentos ácidos leva a sua protonação, fazendo que o mesmo na condição protonada seja impermeável a membranas lipídicas e se acumule no interior dos lisossomos e endossomos tardios, permitindo a visualização destas organelas (SONG *et al.*, 2008; FOGEL, TEIN E MARIANI, 2012). Tanto MitoTracker® quanto LysoTracker® são comercializados em diferentes epi-cores (faixas de emissão diferentes) (BIEHL, 2012).

Seguindo esta tendência, diferentes fabricantes produziram ao longo dos anos marcadores para todas as organelas celulares e classes de moléculas biológicas. Aqui podemos destacar o marcador com afinidade para retículo endoplasmático, DiOC6(3), no entanto ele também marca mitocôndria, simultaneamente (POSSIK, 2003). Os marcadores com afinidade pelo retículo endoplasmático ER-Tracker Green e ER-TrackerRed (BIEHL, 2012). E finalmente a classe de

marcadores com afinidade para lipídios neutros Bodipy® (boron-dipyrromethene). Bodipy® é um grupo de *dyes* não influenciáveis pelo pH e com baixa solubilidade em água amplamente utilizado para a marcação de acúmulos de lipídios intracelulares (YOSHINA, *et al.*, 2012).

Segundo Neto *et al.* (2015), várias sondas amplamente empregadas não apresentam fotoestabilidade, como Bodipy®, fluoresceínas e cianinas. Além disso, outro problema comum encontrado na maioria dos agentes fluorescentes comerciais é apresentarem intervalos de emissão desfavorável a utilização em comarcações ou multimarcações, dificultando a obtenção de resultados favoráveis em ensaios multiparamétricos. Somado a isso ainda tem os efeitos citotóxicos dos agentes fluorescentes que limitam sua aplicação *in vivo* e em células vivas e a baixa solubilidade em água.

Paralelamente as novas descobertas no campo da biologia celular e molecular, as exigências pelo avanço tecnológico e científico aumentaram, e com isso a necessidade de prover novas ferramentas de investigação. Dessa forma acompanhando os avanços da microscopia de luz, uma ferramenta que vem se desenvolvendo há mais de oito séculos, desde a produção das primeiras lentes de aumento por Fiorentino Salvino d'Amato, em 1285. Os avanços tecnológicos na produção de materiais como lentes, espelhos e filtros contribuíram de forma decisiva para que a microscopia e outras técnicas baseadas na de luz alcançasse posição de destaque no estudo das células (MERTZ, 2009; OKENGA, 2016; WANG e XU, 2015).

A microscopia se tornou uma das técnicas de estudo de células que mais incorpora avanços tecnológicos em outras áreas; como a incorporação da microeletrônica, dos chips capazes de gerar imagens digitais, fotomultiplicadores e principalmente tem se beneficiado grandemente dos avanços da informática e do poder de processamento dos computadores (OKENGA, 2016; CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2013). A microscopia de luz que era limitada por parâmetros físicos ligados a dispersão da luz, hoje é aplicada em associação a novos modos de iluminação, como por exemplo, a microscopia de campo próximo que se utiliza de nanoponteiras especialmente desenvolvidas, para detecção de estruturas da superfície com alta resolução lateral e vertical, onde seu princípio é a aproximação da fonte de radiação submicroscópica através da nanoponteira à distância de poucos nanômetros, num movimento de varredura pela superfície amostral (BETZIG e TRAUTMAN, 1992; WANG e XU, 2015), e principalmente a programas de computador com algoritmos de deconvolução e detecção de imagem em resolução na escala de nanômetros através de técnicas estocásticas que possibilita o mapeamento individual de moléculas fluorescente, e sua organização espacial através de imageamento representativo, obtendo ultra resolução e detalhes mais fidedignos das imagem (WILT, *et al.*, 2010; MONTGOMERY e HOI, 2015).

Os microscópios capazes de captar imagens fluorescentes e todas as metodologias em torno desta técnica permitiram inúmeros progressos nas ciências biológicas, nas aplicações médicas e em muitas outras áreas (LICHTMAN e CONCHELLO, 2005; MÉRIAN, *et al.*, 2012, WANG, *et al.*, 2013). Hoje graças à aplicação do princípio da confocalidade podemos fazer reconstruções tridimensionais de amostras biológicas, sem a necessidade de cortes físicos, o que nos permite estudar a estrutura e a distribuição das células em tecidos e organismos complexo (MÜLLER, 2006; MURPHY, 2013).

1.5. Moléculas fluorescentes e sua otimização

Com toda essa versatilidade de emprego, seletividade e sensibilidade, a otimização dos marcadores celulares fluorescentes tem ganhado espaço na busca da síntese de moléculas com maior fotoestabilidade, solubilidade em água, maior rendimento quântico e estreita faixa de emissão de forma a possibilitar comarcações com diversas combinações de agentes fluorescentes simultaneamente, a fim de contemplar os ensaios multiparamétricos. Segundo Jiang et al. (2013) a fluorescência por poder apresentar a alta sensibilidade, especificidade, pode ser um método menos invasivo, utiliza-se de instrumentos já validados, além da possibilidade de modulação do sinal fluorescente. Porém como os a maioria dos agentes fluorescentes comerciais apresentam algum tipo de limitação de seu emprego, se faz necessário o desenvolvimento de novas moléculas fluorescentes que apresentem estabilidade e aplicações viáveis como marcadores celulares. A facilidade de acesso, síntese e reprodução também deve ser algo a se considerar quanto ao desenvolvimento de uma molécula fluorescente para emprego como marcador celular.

Neste contexto, dentre as várias moléculas abordadas nos últimos anos, os derivados de 2,1,3-benzothiadiazole (BTD) tem se tornado um dos heterocíclicos sintéticos que vem apresentando excelentes resultados e ótimas perspectivas de aplicação. É uma nova classe de biomarcadores que começaram a ter seu potencial explorado recentemente e apresentam dentre outras características: (a) estabilidade da molécula em solução ou mesmo pura durante armazenamento, (b) são excitadas na região da luz-visível, (c) reduzido foto decaimento, (d) de fácil produção e baixo custo e (E) reação facilmente escalonável (NETO, *et al.*, 2015).

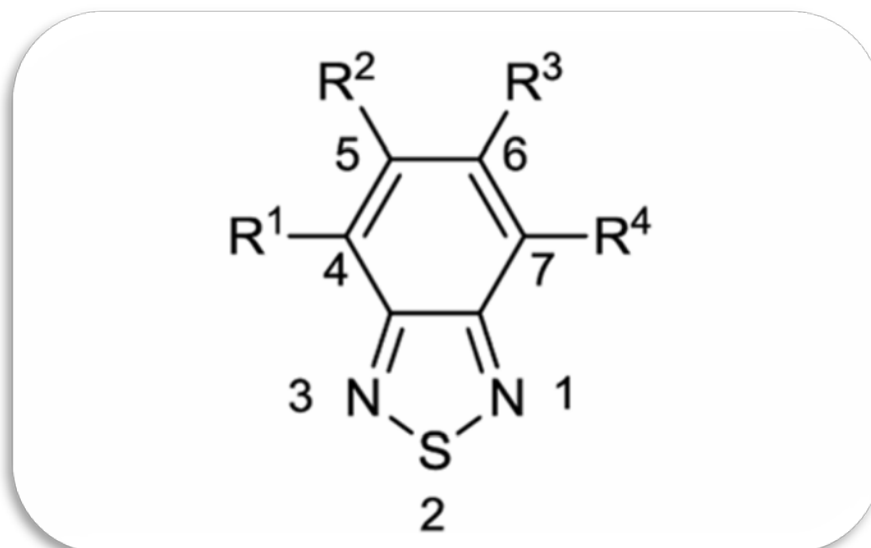


Figura 4. Fórmula estrutural do 2,1,3-benzotriazol (BTD).

Diversos trabalhos do nosso grupo confirmam estas moléculas podem preencher as lacunas encontradas nos marcadores de referência empregados atualmente (NETO, *et al.*, 2007; NETO, *et al.*, 2010; NETO, *et al.*, 2012; NETO, *et al.*, 2015). Dentre as aplicações dos derivados da BTD podemos destacar a afinidade para DNA dupla-fita empregada na detecção e quantificação de DNA em gel, e com a primeira aplicação biológica datada de 2007 (NETO, *et al.*, 2007). Derivados poliméricos contendo BTD também demonstraram eficiência na determinação da concentração de DNA (CHI, 2007). Em seguida, o nosso grupo demonstrou que algumas BTDs são eficientes fluoróforos para emprego em análises por PCR tempo-real (Neto *et al.*, 2009).

Em 2010, foram sintetizados pelo nosso grupo dois compostos derivados de BTDs (BTDBT e BTDBI) os quais apresentaram alta seletividade pelo DNA nuclear em experimentos de imageamento celular (OLIVEIRA, *et al.*, 2010). Nosso grupo continuou no aprimoramento da molécula e seguiu com os testes de validação biológica dos novos derivados. Foi produzido pelo nosso grupo em 2012 o derivado BTDPyMe, que demonstrou seletividade para mitocôndria com sinal fluorescente de baixa intensidade. Esta molécula passou por reestruturação e diversos novos derivados foram produzidos aos longos dos anos, BTDShiny (NETO, *et al.*, 2012), os derivados BTDH e BTDBr (NETO *et al.*, 2012) e finalmente um derivado que apresentou melhores resultados do que o comercial de referência (MitoTracker) que foi denominado Splendor (CARVALHO, *et al.*, 2014).

1.6. Marcadores fluorescentes de lipídios

A membrana celular é constituída por uma fina camada de lipídios anfipáticos e esteróis que se arranjam espontaneamente em suas regiões hidrofóbicas voltadas uma para a outra, isolando essa região dos fluidos polares presente nos meios internos e externos as células (VANCE e VANCE, 2008). Por conseguinte, os ácidos graxos de cadeia longa são componentes fundamentais das membranas celulares. Além disso, os lipídios atuam também como fonte de energia para o metabolismo celular, e como moléculas de sinalização celular e desta forma as células mantêm estoques em seus citoplasmas que são mobilizados para atender demandas específicas daquele tipo celular (KEIGHRON, *et al.*, 2012; CORREA, *et al.*, 2011). Normalmente nos metazoários os ácidos graxos trafegam associados a proteínas, ao chegar às células são conduzidos por translocases nas membranas e no citoplasma destas células votam a se associar a proteínas ligadoras de lipídio até chegar ao seu destino final (VANMEER, *et al.*, 2008). Outras classes de lipídios são captadas pelas células por endocitose mediada por receptor e conduzidas diretamente aos lisossomos onde são esterificadas e liberadas para o citoplasma (VANCE e VANCE, 2008). Por sua interação direta ou indireta com transportadores, os ácidos graxos estão envolvidos em diferentes mecanismos da célula, participando da composição de canais iônicos, enzimas, receptores hormonais (PRZYBYLO *et al.*, 2010; LAVIS e RAINES, 2014). Devido a suas composições e às funções vitais no metabolismo das células, vem se buscando ao longo dos anos produzir marcadores para lipídios, no entanto devido a natureza apolar destes marcadores diversas limitações são impostas ao seu uso sendo a principal delas a baixa solubilidade destas moléculas em água (ULRICH, *et al.*, 2008).

Atualmente existem algumas sondas fluorescentes que são utilizadas como marcadores específicos para lipídios. Contudo, devido a natureza das membranas celulares o uso destes marcadores produz uma imagem contendo muito ruído devido a marcação das membranas celulares, reduzindo a qualidade das imagens adquiridas. Os marcadores da família Bodipy®, os fluoróforos nitrobenzoxadiazol (NBD) e o 5-(DimetilAmino)Naftaleno-1-Sulfonil chloreto (Dansyl) são os marcadores de lipídios mais amplamente utilizados (SPANGENBURG, *et al.*, 2011; ZHAI, *et al.*, 2014; SANKARANARAYANAN, 2011). Os marcadores Bodipy® são sugeridos como sondas seletivas para lipídios, embora a sua aplicação seja geralmente bem sucedida apenas para a coloração de gotículas lipídicas ricas em lipídios neutros, a seletividade observada pode não ser satisfatória devido a presença dos mesmos lipídios neutros nas membranas celulares (MOTA, *et al.*, 2014; NETO, *et al.*, 2014).

Já os NBDs possuem um tempo de vida muito inferior ao Bodipy®, quando diluídos em solventes aquosos. Esta característica reduz a aplicação deste fluoróforo principalmente para ensaios cujas aquisições de imagem sejam pretendidas a partir de modelos vivos. A sonda Dansyl se

associa com a cabeça polar dos fosfolípidos da bicamada lipídica das membranas celulares. Devido a esta afinidade, este marcador pode se ligar também a proteínas e, apesar deste atributo poder ser explorado para analisar proteínas de ligação a ácidos graxos, a seletividade desse marcador é bastante comprometida gerando imagens com uma relação pobre entre sinal e ruído e por consequência produzindo imagens de baixa qualidade (NETO, *et al.*, 2014).. Esta limitação é ainda mais acentuada quando de sua aplicação em modelos celulares vivos; células eucarióticas apresentam uma grande quantidade de proteínas de ligação a lipídios no citoplasma, as quais são marcadas por esta sonda comprometendo sua especificidade.

Neste contexto, os estudos sobre a incorporação lipídica e o seu metabolismo são comprometidos por limitações dos marcadores disponíveis. Com o objetivo de superar estas limitações, nosso grupo inicialmente desenvolveu um marcador fluorescente para imageamento celular que é um análogo fluorescente do ácido oleico que foi denominado BTD-AO (NETO, *et al.*, 2014; LAURENT, *et al.*, 2014). Posteriormente nosso grupo produziu um análogo fluorescente do ácido docosaexaenoico (DHA) (dados não publicados). A natureza lipofílica destes análogos fluorescentes foi o princípio para o design estrutural desses compostos, o que permitiu um maior conhecimento prático do nosso grupo a cerca destas estruturas além de ter sido gerado uma nova alternativa para o estudo da absorção e da dinâmica destes ácidos graxos e seus derivados em células vivas (NETO, *et al.*, 2014).

A marcação fluorescente em lipídios ainda hoje é insatisfatória e necessita de moléculas que apresentem ótima especificidade, estabilidade e acima de tudo solubilidade em soluções aquosas, de forma a manter-se disponíveis tanto em estoque quanto durante a sua interação com os compartimentos celulares. Finalmente este marcador deve ainda apresentar elevado rendimento quântico e foto estabilidade. Buscando atender todas estas demandas este trabalho foi realizado para avaliar e validar biologicamente através de prova de conceito marcadores fluorescentes derivados de benzotriazol, com afinidade predita para moléculas lipídicas, produzidos para aplicação *in vitro* e *in vivo*.

2. Justificativa

O estudo da captação e do metabolismo de lipídio vem se tornando uma demanda crescente com o reconhecimento do envolvimento destas moléculas com inúmeras vias essenciais à vida e à homeostase das células. Os lipídios estão envolvidos em diversos processos de elevada importância biológica que vão desde a manutenção das membranas celulares até a produção de moléculas que atuam como segundo mensageiros envolvidos nos processos de sinalização celular e nas cascatas inflamatórias. Sendo assim entender o metabolismo de lipídios tem implicações clínicas muito relevantes, pois hoje é amplamente reconhecido o seu envolvimento em uma série de doenças graves como as cardíacas, imunes, metabólicas, neurodegenerativas e no câncer. Devido às limitações impostas à marcação de lipídios pelos marcadores fluorescentes comerciais é urgente que se pense em novas estruturas fluorescentes com a propriedade de marcar lipídios e que não apresentem as mesmas limitações encontradas nos marcadores comercialmente disponíveis. Com este propósito este trabalho foi realizado para fazer a validação biológica do uso de três marcadores com características químicas distintas, mas com a seletividade para lipídios conservada nos três.

3. Objetivos

3.1. 3.1 Objetivo Geral

Realizar a prova de conceito (validação biológica) de agentes fluorescentes produzidos como marcadores de lipídios de aplicação no imageamento celular.

3.2. Objetivos Específicos

- Investigar o potencial de marcação celular específica de derivados produzidos para a detecção de lipídios intracelulares.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos derivados aqui testados
- Determinar a especificidade de marcação dos compostos aqui testados frente ao agente fluorescente comercial de referência para detecção de lipídios neutros Bodipy®.
- Comparar os perfis de fluorescência obtida com compostos aqui testados frente ao agente fluorescente comercial de referência para detecção de lipídios neutros Bodipy®.
- Investigar o potencial da marcação de lipídios intracelulares no modelo *Caenorhabditis elegans* frente ao agente fluorescente comercial de referência para detecção de lipídios neutros Bodipy®.

4. Materiais e Métodos

4.1. Manutenção de células normais e tumorais

As linhagens de células trabalhadas foram cedidas pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília ou adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas segundo recomendações da ATCC, sendo MCF-7, CACO-2, DU 145 cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e mantidas à 37 °C com 5 % de CO₂. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio Leibovitz L15 à 37 °C na ausência de CO₂. As células HUVEC foram cultivadas em meio DMEM e F12 (1:1) à 37 °C com 5 % de CO₂. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1 % antibiótico/antifúngico.

4.2. Avaliação da Marcação Celular

4.2.1. Marcação com compostos fluorescentes derivados de Benzotiadiazol

Para avaliar o perfil das marcações fluorescentes dos compostos derivados do benzotiadiazol, 3 x 10⁵ células MDA-MB-231, MCF-7, DU 145, CACO-2 e HUVEC foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2, BJJ16#unb3, individualmente por uma hora na concentração de 10 µM por poço, acondicionadas à 37 °C e 5 % CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com tampão salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7 % por 20 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas com *Prolong Gold Antifade* sobre as lâminas de vidro, devidamente identificadas.

Outro grupo de amostras pré-fixadas em formaldeído 3,7 % por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com os compostos também na concentração 10 µM por poço por uma hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com PBS e as lamínulas montadas sobre lâminas de vidro com *Prolong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas nas lâminas de vidro, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

O controle negativo desta etapa fora realizado para analisar autofluorescência das células utilizadas, 10⁵ células MDA-MB-231, MCF-7, DU 145, CACO-2 e HUVEC foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com o meio de cultivo respectivo de cada cultura contendo Dimetilsulfóxido (DMSO) na

mesma concentração usada na diluição do agente fluorescente em teste sem a presença do composto. As amostras foram separadas em dois grupos, um com células vivas e outro com células fixadas. O grupo de amostras com células vivas foi primeiramente incubado com o seu respectivo meio mais DMSO na concentração correspondente por uma hora. Em seguida estas amostras foram lavadas três vezes em PBS e fixadas em solução de 3,7 % de formaldeído por 20 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas novamente três vezes em PBS e as lamínulas montadas sobre lâminas de vidro com *Prolong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas nas lâminas de vidro, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

4.2.2. Marcação de lipídios intracelular com marcador comercial Bodipy® e DAPI

Para a marcação com Bodipy® foram utilizadas 10^5 células MDA-MB-231 semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram fixadas em solução de formaldeído 3,7 %. Em seguida as amostras foram lavadas três vezes em PBS a temperatura ambiente e incubadas com solução de Bodipy® 1 µg/mL em cada poço por 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavagens novamente três vezes em PBS, e então as amostras foram incubadas com o marcador DAPI, 300 nM por 5 minutos. Após esta incubação as amostras foram novamente lavadas três vezes em PBS e as lamínulas montadas sobre lâmina de vidro com *Prolong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas nas lâminas de vidro, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

4.2.3. Comarcação do composto BJJ16 com DAPI e Bodipy®

Para a comarcação do composto testado BJJ16, com DAPI e Bodipy®, foram utilizadas 10^5 células MDA-MB-231 semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram fixadas em solução de formaldeído 3,7% em seguida as amostras foram lavadas três vezes em PBS a temperatura ambiente. Após a incubação com o composto BJJ16 por uma hora na concentração de 10 µM por poço, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e incubadas em solução de Bodipy® 1 µg/mL por poço por 30 minutos. Em seguida as amostras foram novamente lavadas três vezes em PBS e incubadas com o marcador DAPI, 300 nM por 5 minutos, seguida novamente de três lavagens com PBS. As lamínulas foram montadas sobre lâmina de vidro com *Prolong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas nas lâminas de vidro, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

4.3. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células MDA-MB-231 e HUVEC tratadas com os compostos foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. 3×10^3 células por poço, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas *overnight* a 37 °C. Após sua adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de cada derivado de benzothiadiazol ou DMSO na concentração usada para a diluição dos agentes fluorescentes. Após o período de tratamento de 24h, os poços foram incubados por 4h, no escuro e a 37 °C, com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e em seguida esta solução foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados à cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada composto e concentração utilizada e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de inibição foi determinada comparando a densidade celular das células tratadas com as células controle no mesmo período de incubação [porcentagem de inibição = $(1 - \text{densidade da célula do grupo tratado}) / \text{densidade da célula do grupo controle}$]. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA no software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA) com pos teste de Dunnett.

4.4. Avaliação da marcação no modelo *Caenorhabditis elegans*

4.4.1. Marcação de *C. elegans* com derivados fluorescentes de benzotiadiazol

Fora utilizado uma solução estoque de Bodipy® (1mg/mL) em DMSO, para preparo de solução de uso na concentração 1 µg/mL em tampão M9. Os nemátodos mantidos em placa de NGM Agar contendo *E. coli* a 22 °C. Os nemátodos foram coletados da placa de cultivo fazendo lavagem superficial com 1,5 mL de tampão M9. O coletado fora transferido para um eppendorf de 1,5 mL e centrifugado por 2 minutos a 300 G. Fora preservado o precipitado, e descartado o sobrenadante, restituindo o volume com o tampão M9, ressuspendendo o precipitado e realizando novamente a centrifugação (passo realizado três vezes para lavagem dos nemátodos e retirada das bactérias). Após o último ciclo de lavagem, os nemátodos foram incubados com 1 mL de solução de paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o eppendorf fora congelado e descongelado (banho de nitrogênio líquido x água 37 °C) em três ciclos de congelamento e descongelamento. Depois foi repetido o processo de lavagem por 3 vezes em tampão M9 para a remoção de paraformaldeído. Ao final do ciclo de lavagem, o eppendorf fora incubado com marcadores BJJ16#unb1, BJJ16#unb2, BJJ16#unb3 por uma hora. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em tampão M9, sendo o recíitado ressuspendo e coletado o

volume de 25 μL para dispensar na lâmina preparada com solução de poli-L-lisina a 0.1 %. Este volume foi espalhado sobre a lâmina de vidro com o uso da porção lateral de uma ponteira de plástico. A lâmina fora montada com *Prolong Gold Antifade* sobre a qual se colocou uma lamínula retangular. O excesso de líquido foi retirado das bordas com papel de filtro comum e a lamínula foi selada sobre a lâmina de vidro com o uso de esmalte. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes independentes para checar a reprodutibilidade do protocolo de marcação. As lâminas foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica Microsystems) seguindo as configurações de excitação e emissão de fluorescência padronizadas nos métodos de análise de fluorescência em imageamento celular que estão descritos no item 4.4 desta sessão.

4.4.2. Marcação de *C. elegans* Bodipy®

Para análise de marcação de lipídios com marcador comercial Bodipy®, fora utilizado a mesma metodologia de manutenção e coleta já descrita acima. Após a fixação dos nemátodos e efetuar as respectivas lavagens em tampão M9, o precipitado fora incubado com 500 μL da solução de Bodipy® (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida fora centrifugado e realizado o passo de lavagens com meio M9, e demais procedimentos foram idênticos aos já descritos acima realizados no ensaio com os compostos testados neste trabalho.

4.5. Análise de renderização 3D (Z-stack)

Para as análises de renderização 3D do volume celular das células MDA-MB231 e do *C. elegans*, foram adquiridas quarenta imagens das células aderidas e sessenta imagens do nemátodo. Estas imagens são imagens 2D em sequência no eixo Z de observação da amostra através do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). A sequência de imagens foi dispostas em sobreposição pelo software Leica Application Suite Advanced Fluorescence o qual fez a reconstrução através de uma projeção 3D de todas as imagens adquiridas para cada amostra. Foram utilizados os campos de fluorescências e omitido o campo claro (imagem por contraste de fase) para possibilitar uma melhor representação e visualização da distribuição dos corpúsculos lipídicos no interior das células e nos tecidos do *C. elegans*. Foi também realizada análises ortogonais a partir da pilha de imagens adquiridas no eixo Z a fim de se demonstrar o posicionamento espacial das marcações no interior das células e do nemátodo.

4.6. Quantificação de fluorescência

Para comparação das diferenças de sinal entre as imagens de fluorescência, fora utilizado o método Ratiométrico, através do software ImageJ (Rasband et al, 1997) com o uso do plugin Ratio

Profiler. O *background* de ambas imagens comparadas foram corrigidos previamente a partir de ajustes no níveis dos pixels para possibilitar análise quantitativa. A análise de intensidade de fluorescência foi realizada utilizando o software ImageJ (Fiji). Todas as imagens foram convertidas para escala de cinza (16-bit) para uniformização dos canais e posteriormente analisadas pela ferramenta "Plot Profile" e pelos plugins "Interactive 3D Surface Plot" e "HeatMap Histogram".

A edição de imagens foi realizada no software Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe). As alterações feitas se referem aos níveis de cores, contraste e sobreposição de imagens.

4.7. Análises Estatísticas

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

5. Resultados

5.1. Viabilidade celular

A princípio, foi realizada uma triagem com objetivo de verificar se os compostos derivados de Benzotiadiazol apresentavam atividade citotóxica contra as linhagens celulares empregadas neste trabalho. A atividade citotóxica dos três marcadores fluorescentes BJT16#unb1, BJT16#unb2 e BJT16#unb3, foi testada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT utilizando-se as células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231, e células endoteliais de veia umbilical HUVEC, no tempo de 24h de tratamento em concentrações de 100 nM à 1 mM, com ênfase em 10µM (concentração de uso das moléculas para marcação fluorescentes). Ao analisar os resultados foi possível observar que após 24h de tratamento, as células MDA-MB-231 e HUVEC (**Figura 6**) apresentaram viabilidade > 85 % na concentração de uso, o que demonstra a baixa citotoxicidade dos compostos tanto para células tumorais quanto para células normais. Este resultado é altamente relevante considerando que o tempo de uso do agente fluorescente para produzir a marcação desejada é de uma hora e a análise de citotoxicidade foi realizada para um período de vinte e quatro horas de incubação das células com os agentes fluorescentes.

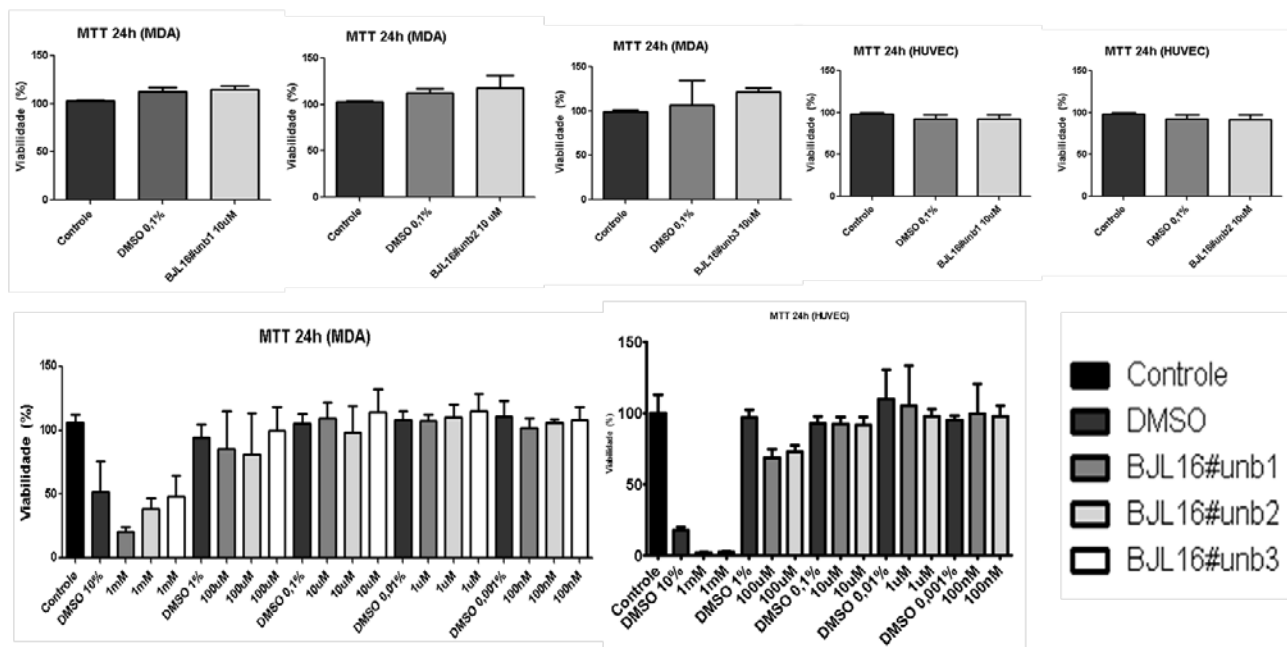


Figura 5. Viabilidade de células de linhagem tumoral MDA-MB-231 e não-tumoral HUVEC, incubadas com BJT16#unb1, BJT16#unb2, BJT16#unb3 ou DMSO em concentração de 100 nM a 1 mM, por 24 horas de tratamento. Gráfico de três experimentos independentes demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnet. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NT controle negativo.

5.2. Marcação celular

Experimentos de bioimagem foram realizados em células de câncer MDA-MB-231, HUVEC, MCF-7, CACO-2 e DU 145, tratadas vivas e pré-fixadas com os compostos BJJL16#unb1, BJJL16#unb2 e BJJL16#unb3. O resultado da marcação foi altamente significativo, onde pode ser observada uma alta especificidade dos agentes fluorescentes por corpúsculos lipídicos encontrados no citoplasma das células. Devido aos aspectos morfológicos de volume das organelas, distribuição e quantidade mesmo sem o teste com marcador comercial específico, já é possível determinar pelas imagens que se trata de marcação de lipídios intracelulares. O controle negativo foi feito a partir da avaliação de células incubadas apenas com DMSO que foi o diluente dos compostos. Embora haja um fraco sinal fluorescente no canal da cor verde, não foi possível observar nenhuma especificidade deste sinal, ficando fracamente disperso pelo citoplasma quando visualizado pelo olho humano diretamente no microscópio, indicando uma reduzida autofluorescência dos modelos celulares empregados. No entanto no momento da aquisição da imagem este sinal não é detectado pelo equipamento tendo então nenhuma das linhagens utilizadas no experimento apresentado autofluorescência quando excitada com o LASER de comprimento de onda 488nm. A **Figura 6** mostra uma das linhagens utilizadas no experimento, MDA-MB-231 não tratadas, demonstrando que a residual autofluorescência da célula não pode ser captada pelo equipamento durante o processo de aquisição de imagens, tanto para amostras vivas quanto para as pré-fixadas quando recebem o meio de diluição da droga.

A partir de estudos prévios com sondas fluorescentes desenvolvidos em trabalhos do nosso grupo, o tempo de incubação com os compostos foi estabelecido em uma hora e as sondas estudadas apresentaram resultados consistentes quanto à sua cinética. Os compostos BJJL16#unb1 e BJJL16#unb2, apresentaram uma forte emissão de fluorescência verde, e fraca emissão azul e vermelha, enquanto que BJJL16#unb3 apresentou intensa fluorescência vermelha e fraca emissão de fluorescência azul. Nenhum sinal fora detectado no verde para este composto. Todos os compostos foram excitados na faixa de 405-488 nm, sendo que BJJL16#unb1 (**Figuras 7**) e o BJJL16#unb2 (**Figuras 8**), emitiram fluorescência entre 500 à 570 nm, ao passo que BJJL16#unb3 (**Figura 9**) emitiu fluorescência na faixa de 630 à 750 nm. Todos os compostos foram empregados no tratamento das demais linhagens, observando a repetição do padrão de concentração e distribuição de fluorescência (**Figuras 10-12**). Notavelmente, não foi observada modificação morfológica das células vivas incubadas com os compostos, indicando ausência de efeito citotóxico para este tempo de incubação e determinados por parâmetros morfológicos. O que pode ser claramente identificado nas imagens obtidas por contraste de fase, as quais mostram as células não vacuolizadas, núcleo de aspecto normal, e pontos de adesão focal presentes e preservados. A marcação fluorescente está

confinada em vesículas dispersas no espaço citoplasmático sendo consistente com corpúsculos lipídicos conforme já descrito acima. A marcação permite não apenas a identificação dos corpúsculos lipídicos, mas também a sua quantificação, análise de volume unitário e total e distribuição nas células.



Figura 6. Células MDA-MB-231 não tratadas. As células MDA-MB-231 incubadas com meio de diluição dos compostos por uma hora (Controle não tratado). As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que não apresentaram emissão de fluorescência nos quatro canais de aquisição, tanto quando recebem o meio de diluição viva quando pós fixação.

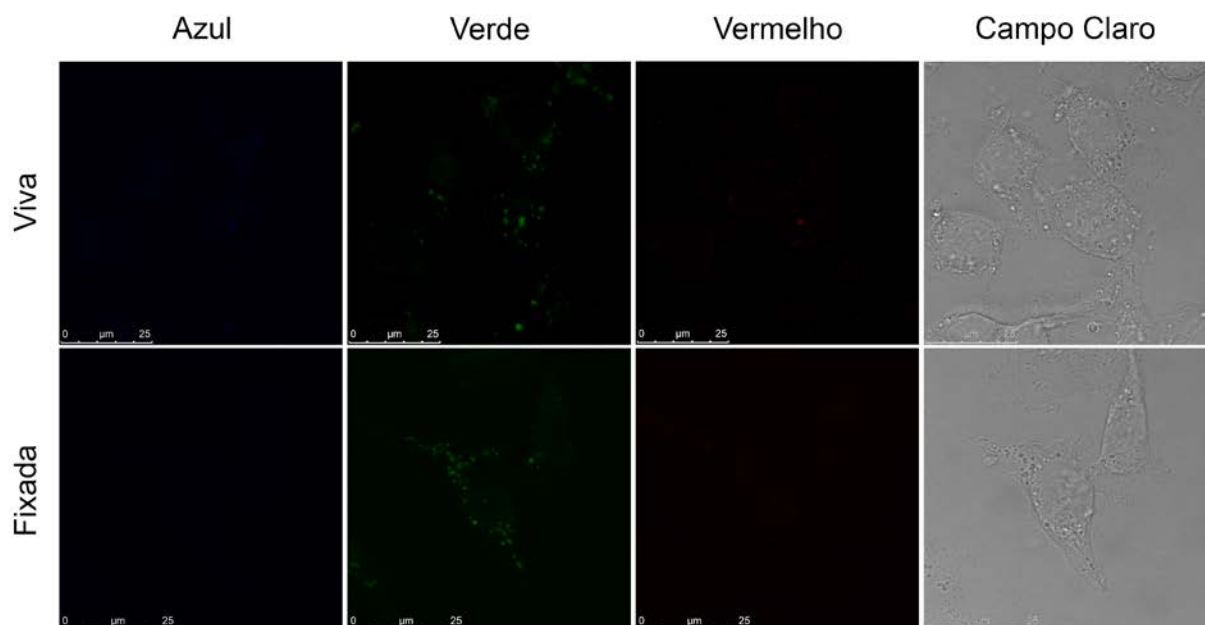


Figura 7. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb1. As células MDA-MB-231 incubadas com o composto BJJ16#unb1 por uma hora. As análises foram realizadas em microscópio confocal de

varredura a laser, mostrando que apresentaram emissão de fluorescência no canal de aquisição verde, e um fraco sinal nos canais vermelho e azul, em que as células recebem o tratamento tanto vivas quanto pós fixação.

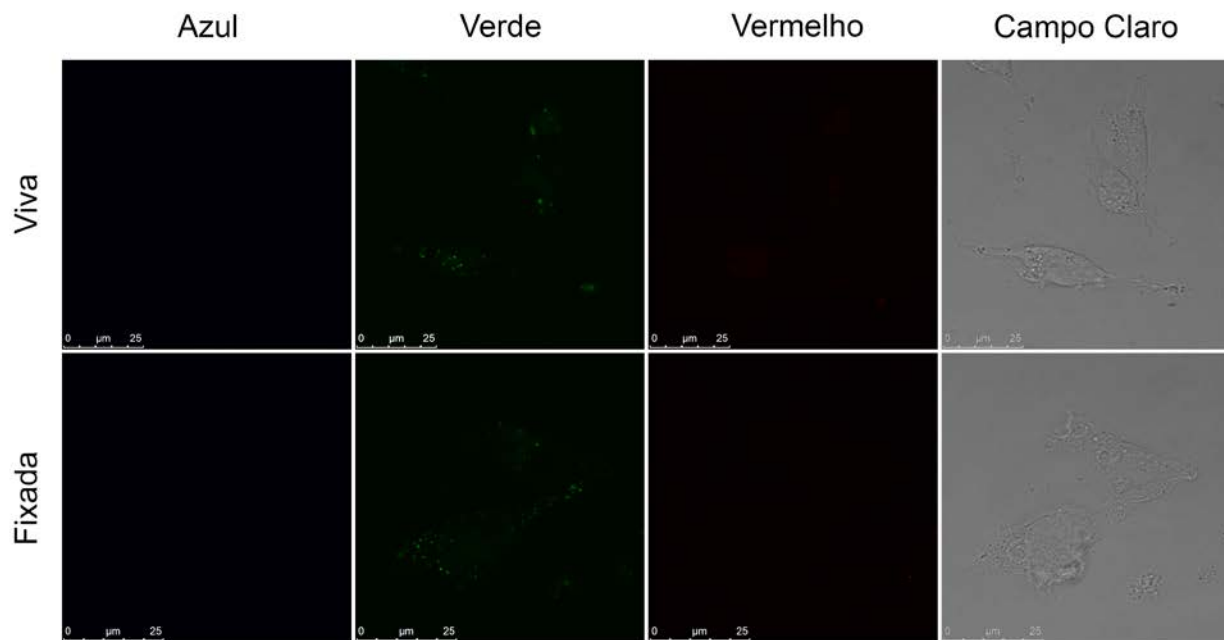


Figura 8. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb2. As células MDA-MB-231 incubadas com o composto BJJ16#unb2 por uma hora. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que apresentaram emissão de fluorescência no canal de aquisição verde, e um fraco sinal nos canais vermelho e azul, em que as células recebem o tratamento tanto vivas quanto pós fixação.

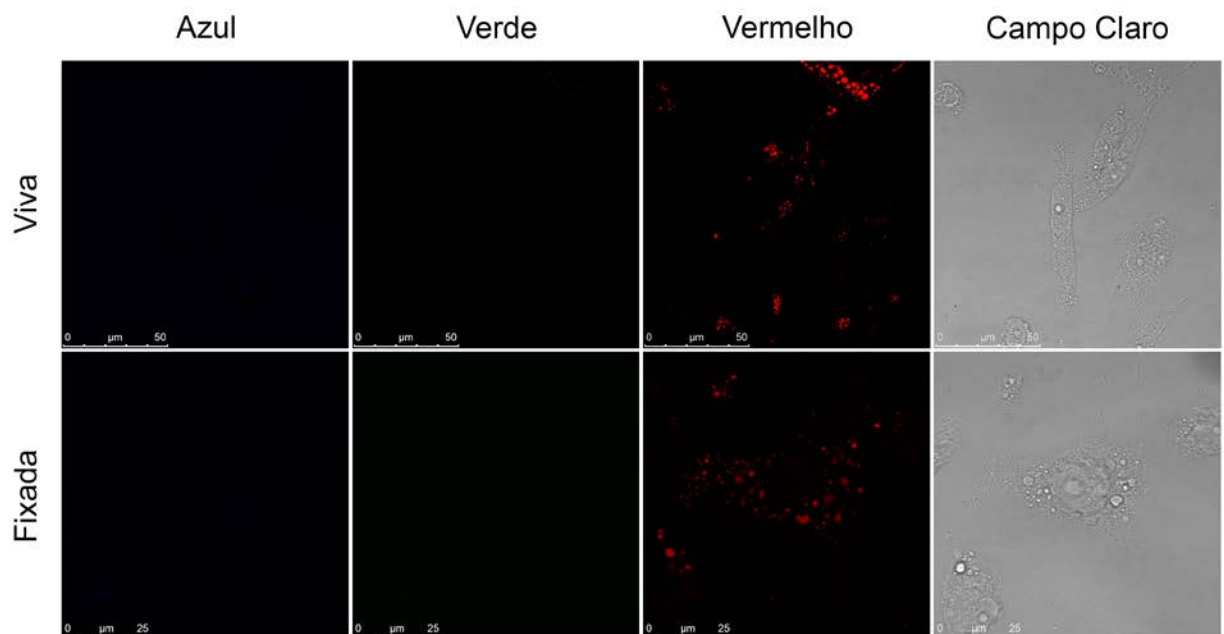


Figura 9. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJJ16#unb3. As células MDA-MB-231 incubadas com o composto BJJ16#unb3 por uma hora. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que apresentaram acentuada emissão de fluorescência no canal de aquisição vermelho, e um fraco sinal no azul em que as células recebem o tratamento tanto vivas quanto pós fixação.

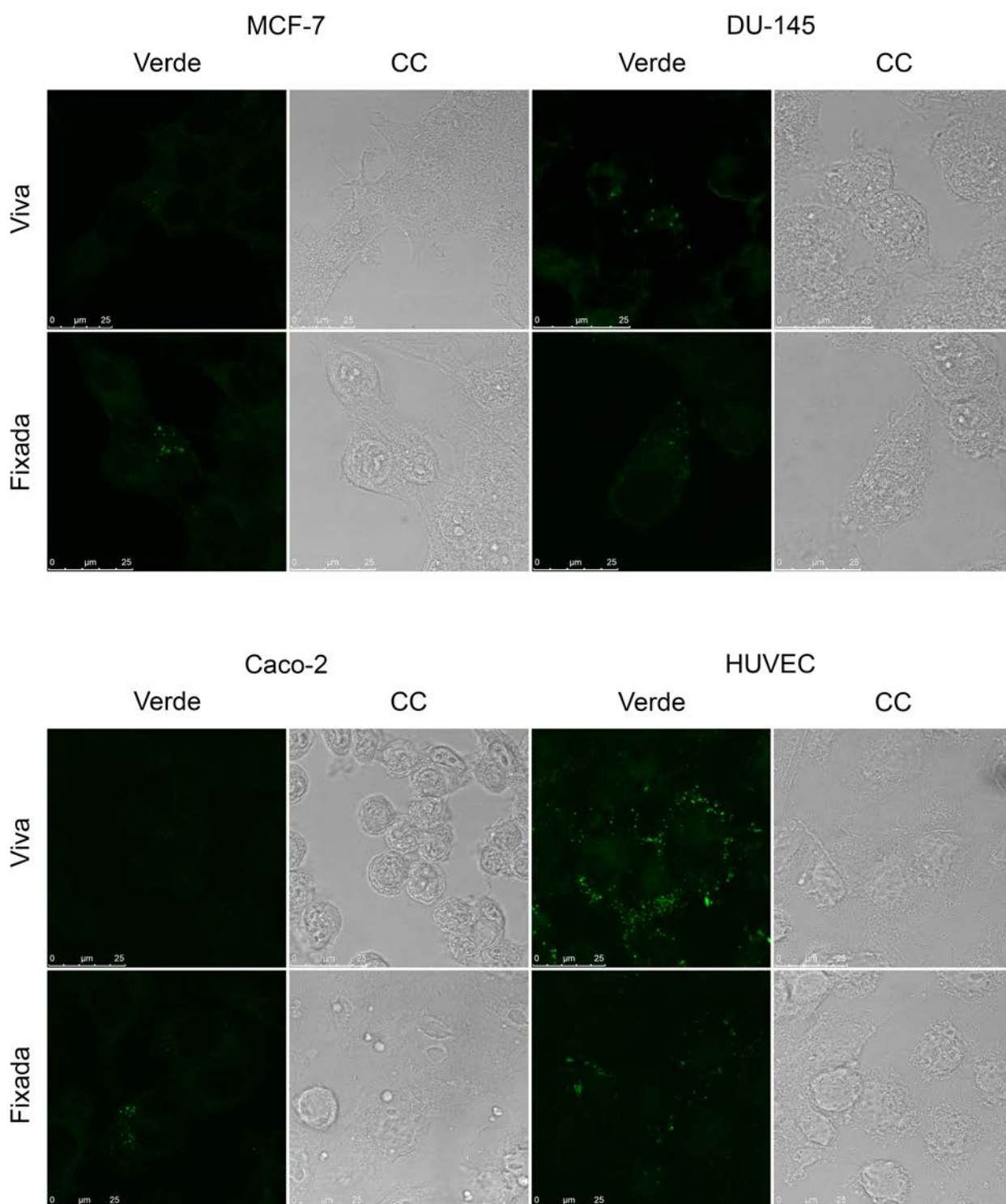


Figura 10. Células MCF7, DU 145, CACO2 e HUVEC tratadas com o composto B JL16#unb1. As células foram incubadas com o composto B JL16#unb1 por uma hora. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que apresentaram emissão de fluorescência no canal de aquisição verde, como mencionado anteriormente.

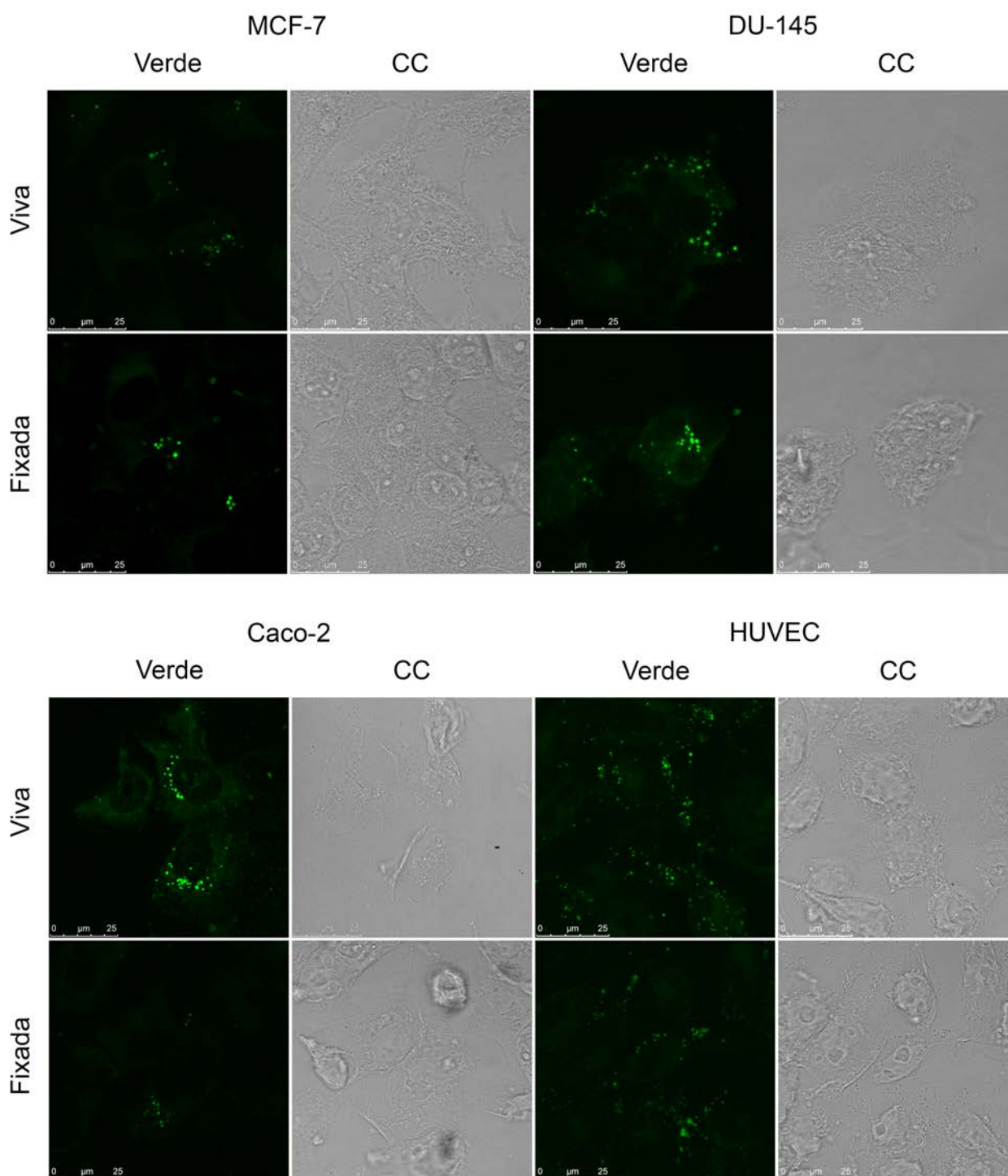


Figura 11. Células MCF7, DU 145, CACO2 e HUVEC tratadas com o composto BJL16#unb2. As células foram incubadas com o composto BJL16#unb2 por uma hora. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que apresentaram emissão de fluorescência no canal de aquisição verde, como mencionado anteriormente, tanto em células vivas quanto fixadas.

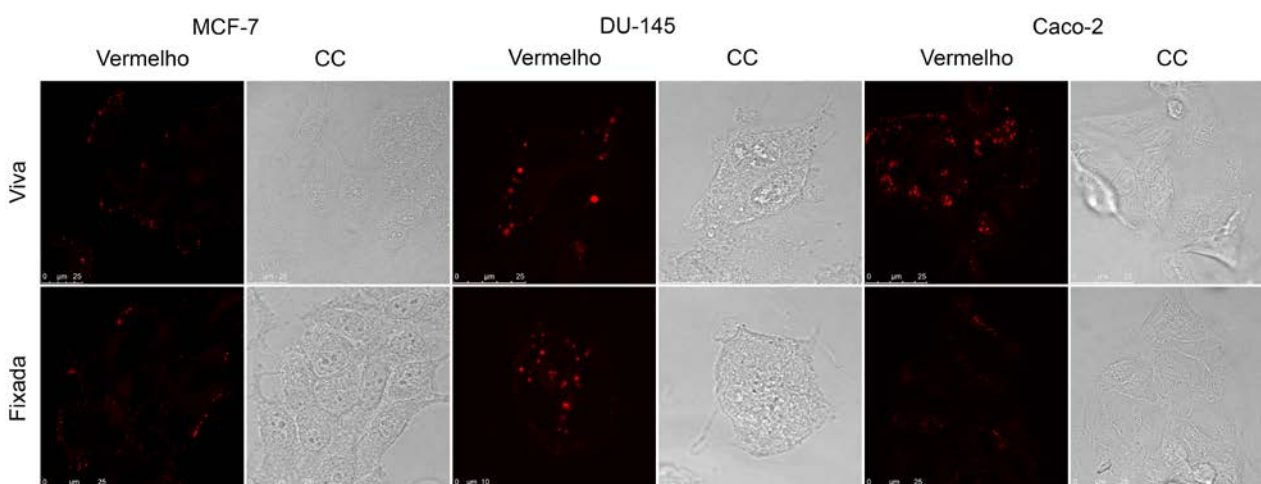


Figura 12. Células MCF7, DU 145, CACO2 e HUVEC tratadas com o composto BJJ16#unb3. As células foram incubadas com o composto BJJ16#unb3 por uma hora. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que apresentaram emissão de fluorescência no canal de aquisição vermelho, como mencionado anteriormente, tanto em células vivas quanto fixadas.

5.3. Confirmação de marcação específica

Conforme já descrito, após uma hora de incubação, foi observado que os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3 se acumularam em vesículas distribuídas por todo o citoplasma das células. Todas as sondas analisadas exibem também uma tênue marcação inespecífica no citoplasma, o que reforça o reconhecimento desta marcação a lipídios devido à presença massiva de membranas celulares no interior das células. (**Figura 7-12**). Para a confirmação de que as vesículas marcadas contêm lipídio foi feito um ensaio com o marcador fluorescente de lipídios, de referência denominado Bodipy®. Este marcador apresenta pico ótimo de emissão de fluorescência no intervalo de 500-530 nm. Comparado o perfil de marcação e emissão de fluorescência do Bodipy® aos perfis de marcação fluorescente obtidos com os compostos testados neste trabalho (BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3), ficou demonstrado que a marcação produzida pelos compostos é especificamente nos corpúsculos lipídicos (**Figura 13 e 14**). Outro dado importante obtido neste ensaio foi a verificação que os compostos teste apresentam provavelmente afinidade por classes de lipídios não marcadas pelo Bodipy®. As imagens com os compostos testes mostram uma quantidade superior de vesículas marcadas quando comparadas com as imagens obtidas com a marcação com Bodipy®. Na análise das imagens foram feitas sobreposições entre a marcação com Bodipy® e com os compostos, em particular com o composto BJJ16#unb3 (que fluoresce no vermelho) cuja sobreposição produz a cor amarela para a colocalização de marcação. A sobreposição da imagem não deixa dúvidas quanto à especificidade dos compostos para lipídios e também demonstra a marcação de corpúsculos lipídicos não detectados pelo Bodipy® (**Figura 15**).

O padrão de marcação e distribuição dos corpúsculos lipídicos não foi idêntico para os diferentes compostos empregados. O composto BJL16#unb1 apresentou uma marcação de vesículas de forma mais concentrada com baixa distribuição pelo espaço citoplasmático tanto no tratamento de células vivas quanto nas células pré-fixadas. O composto BJL16#unb2 apresentou marcação similar ao Bodipy®, tanto no tratamento de células vivas como fixadas, mantendo o perfil de distribuição concentrada em vesículas no espaço citoplasmático. O composto BJL16#unb3 apresentou um perfil de uma marcação similar ao Bodipy®, no entanto, este composto marcou diversas outras organelas que não foram identificadas pelo Bodipy® (**Figura 15 A**). O que é evidente tanto no resultado de suas marcações isoladas (**Figura 9,12**) quanto na dupla marcação com sobreposição de imagens (**Figura 15 A e B**).

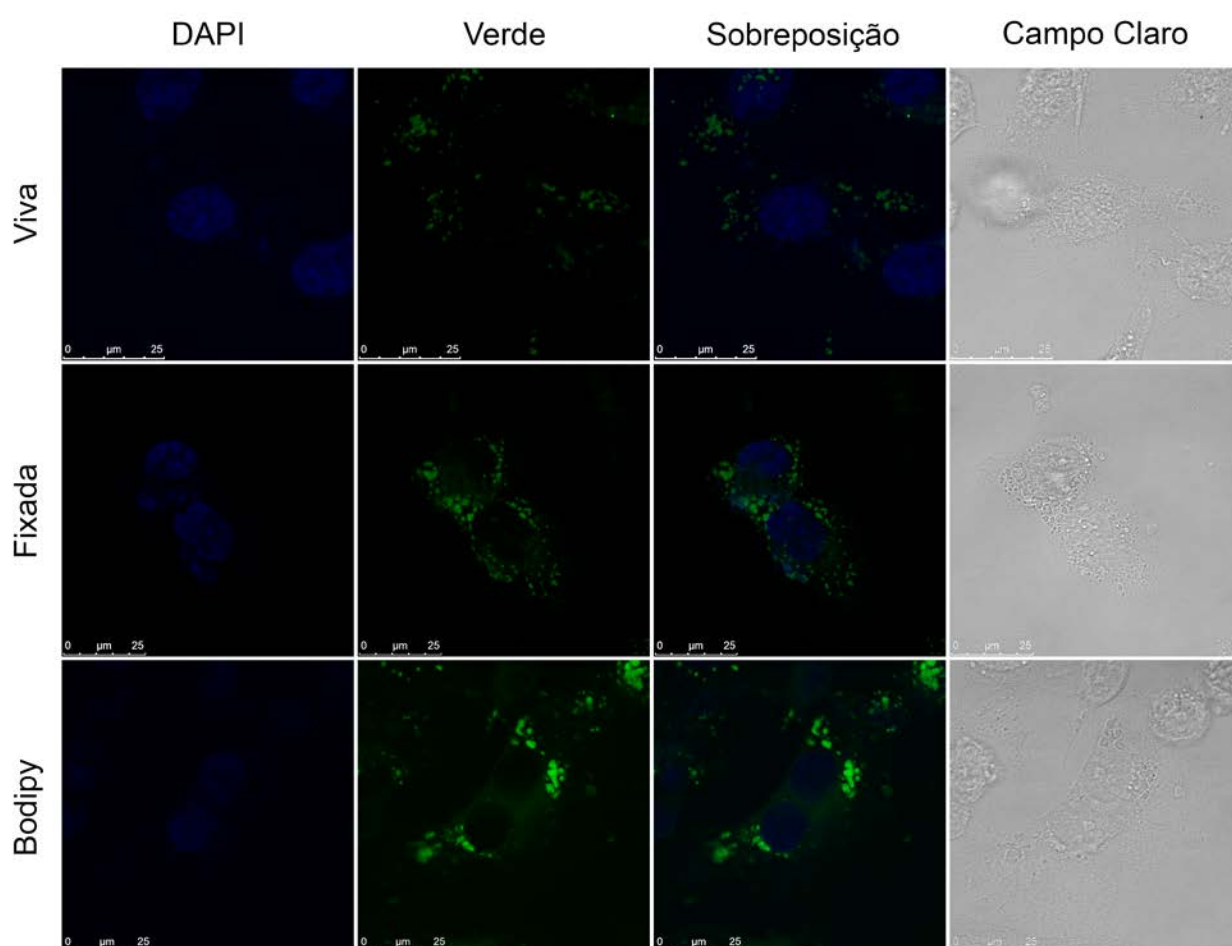


Figura 13. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto BJL16#unb1. As células MDA-MB-231 incubadas com o composto BJL16#unb1. Outra amostra foi marcada com Bodipy® com emissão em verde e o núcleo evidenciado com marcador DAPI, em azul. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando as células tratadas com o composto BJL16#unb1 que apresentaram acentuada emissão de fluorescência no canal de aquisição verde, com baixa distribuição pelo citoplasma tanto vivas quanto pós fixação. O canal de contraste de fases permite observar a morfologia normal das células.

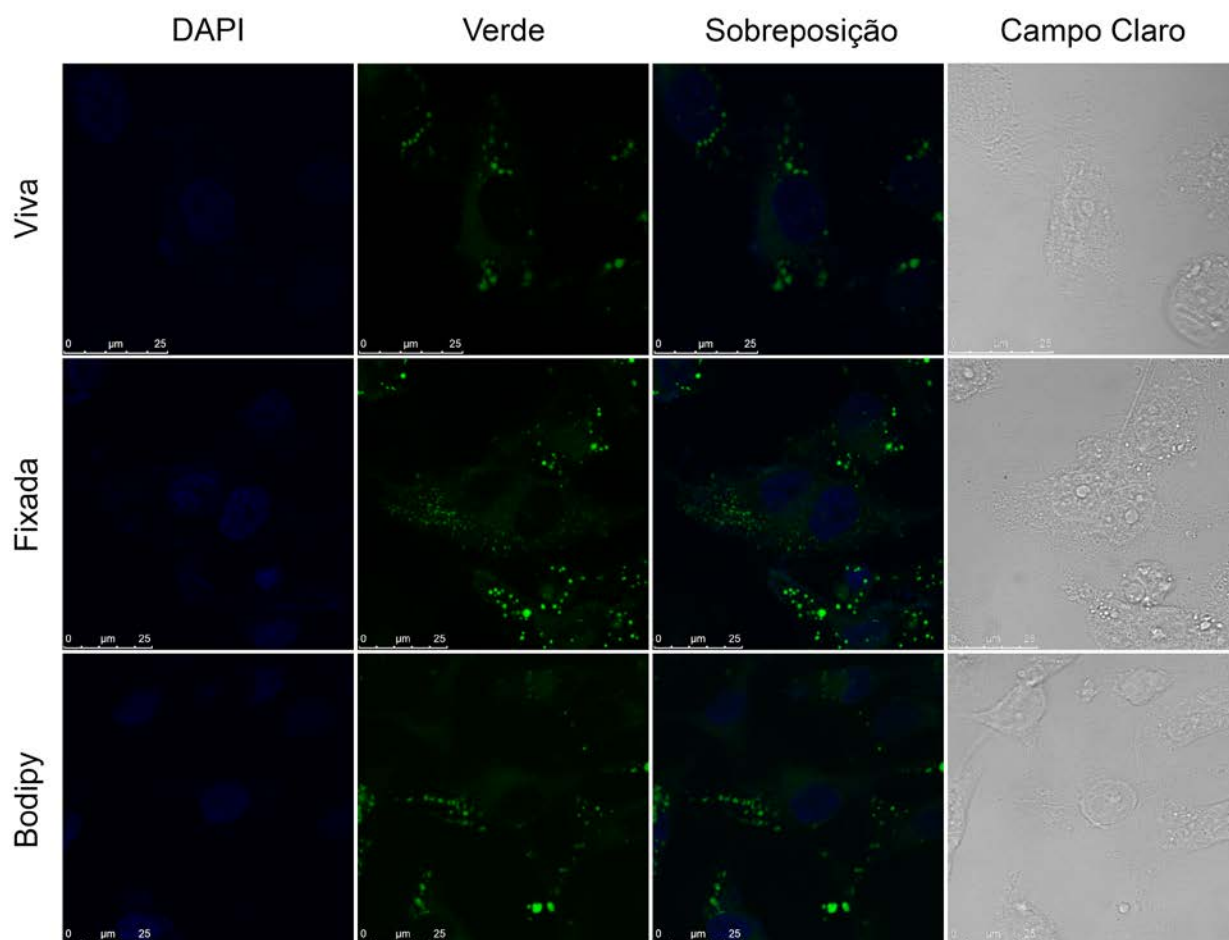


Figura 14. Células MDA-MB-231 tratadas com o composto B JL16#unb2. As células MDA-MB-231 incubadas com o composto B JL16#unb2 por uma hora. Outra amostra foi marcada com Bodipy®, com emissão em verde e o núcleo evidenciado com marcador DAPI, em azul. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando que as células tratadas com o composto B JL16#unb2 apresentaram acentuada emissão de fluorescência no canal de aquisição verde, similar ao Bodipy®, mantendo o perfil de concentração em vesículas e sua distribuição no citoplasma, tanto vivas quanto pós fixação. O canal de contraste de fases permite observar a morfologia normal das células.

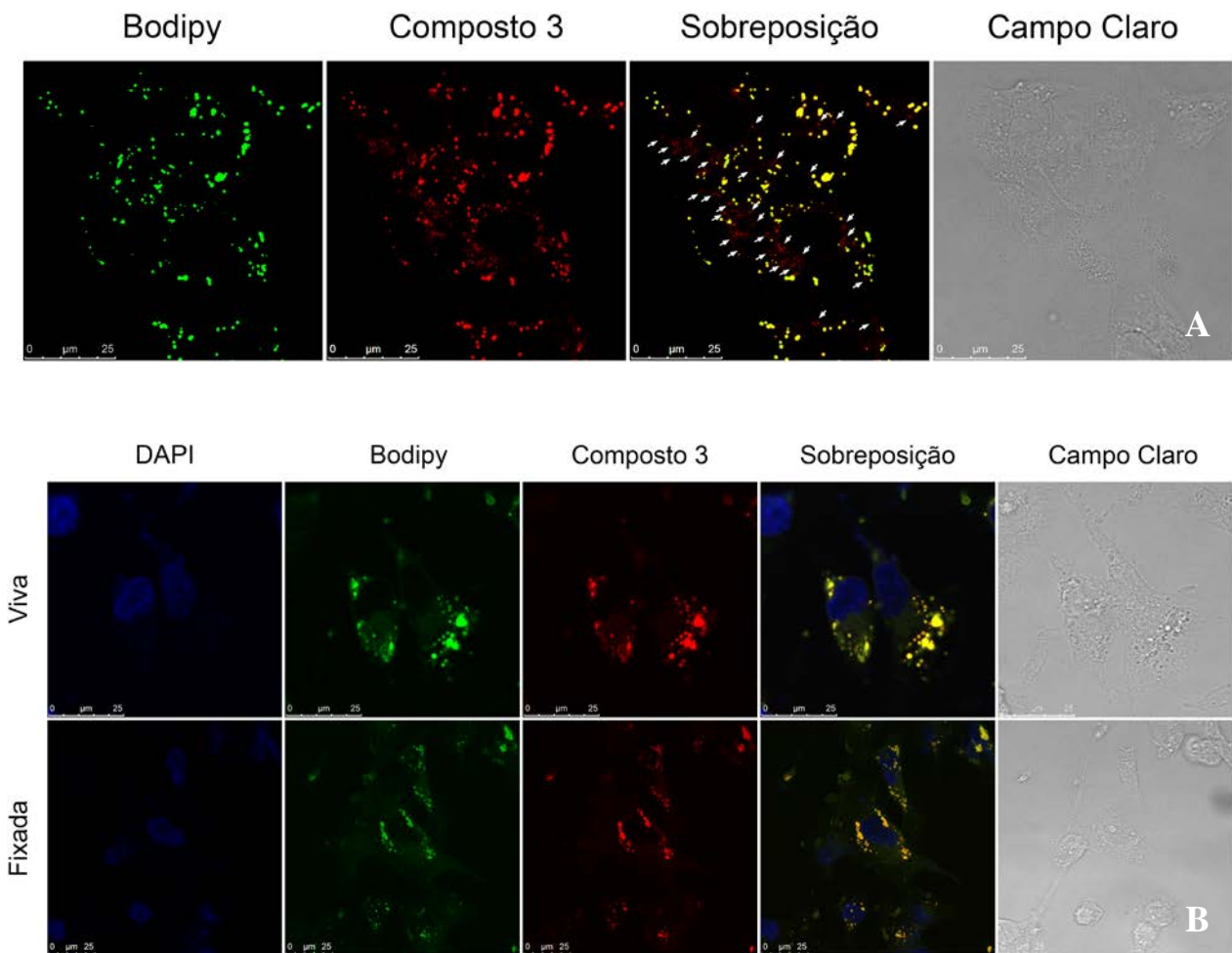


Figura 15. Células CACO2 (A) e MDA-MB-231 (B) tratadas com o composto B JL16#unb3. A. Imagem obtidas através do microscópio confocal, das células Caco2 tratadas com B JL16#unb3. O campo de fluorescência verde (Bodipy®) e vermelho (compsoto B JL16#unb3), seguido da sobreposição dos dois canais. As setas são indicações de organelas que não foram identificadas pelo Bodipy®, evidenciando a fluorescência vermelha. O canal de contraste de fases indica a morfologia da célula. **B.** As células MDA-MB-231 incubadas com o composto B JL16#unb3 por uma hora. Outra amostra foi marcada com marcador Bodipy® com emissão em verde e o núcleo evidenciado com marcador DAPI, em azul. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser, mostrando as células tratadas com o composto B JL16#unb3 apresentando intensa emissão de fluorescência no canal de aquisição vermelho, com perfil similar ao Bodipy®, contudo há apresentação de diversas outras organelas não identificadas pelo Bodipy®, tanto vivas quanto pós fixação. O canal de contraste de fases permite observar a morfologia normal das células.

5.4. Quantificação de fluorescência

Com o objetivo de obter dados quantitativos para a comparação entre as intensidades de fluorescência emitida pelos compostos derivados de BTB e pelo Bodipy®, foram feitas análises das medias da intensidade fluorescente adquirida pelo equipamento através do software de licença livre ImageJ. Nesta análise foi quantificada a intensidade de fluorescência por célula, permitindo uma estimativa do valor de fluorescência da marcação específica do composto. A intensidade do sinal de fluorescência apresentado pelos compostos B JL16#unb1, B JL16#unb2 e B JL16#unb3 comparadas às imagens adquiridas de células tratadas com Bodipy® revelam que o marcador comercial emite

um sinal fluorescente de maior intensidade do que aquele obtido com o composto BJJ16#unb1 (**Figura 16**). O resultado da mesma análise indicou que o BJJ16#unb2 e agente fluorescente comercial Bodipy® apresentam intensidade de fluorescência bastante semelhante (**Figura 17**). Finalmente o resultado obtido neste mesmo tipo de análise demonstrou de forma inequívoca que o BJJ16#unb3 emite fluorescência com intensidade muito superior ao sinal fluorescente emitido pelo marcador comercial de referência para marcação de lipídios Bodipy® (**Figura 18**).

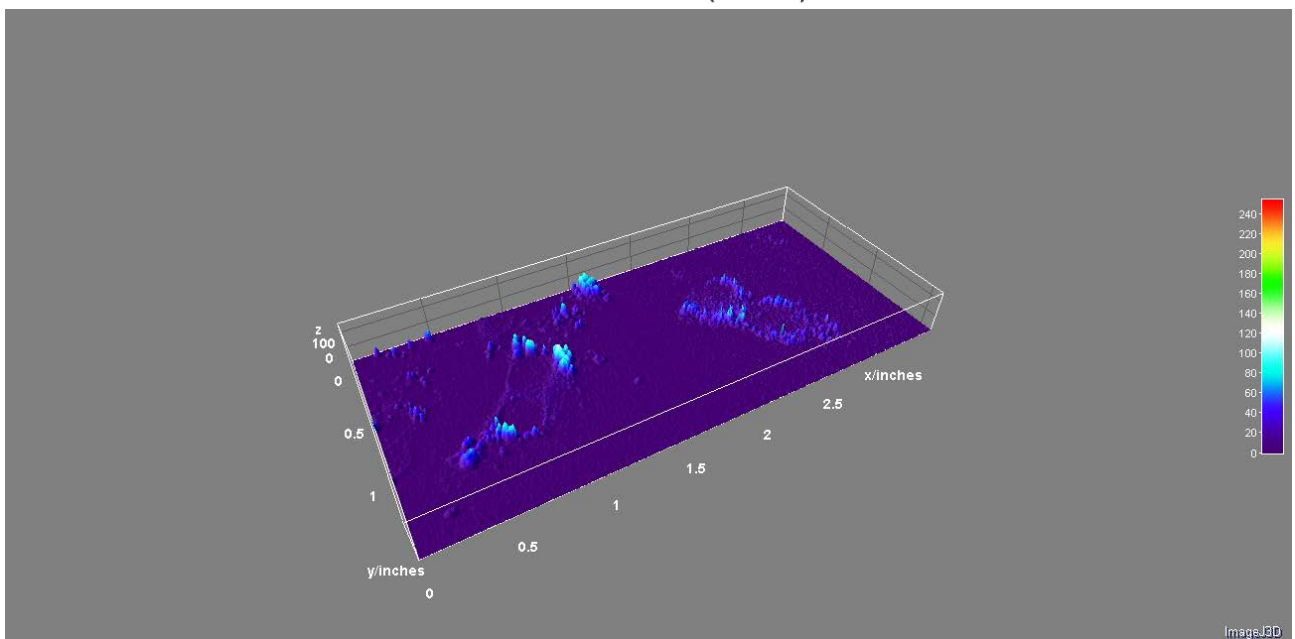
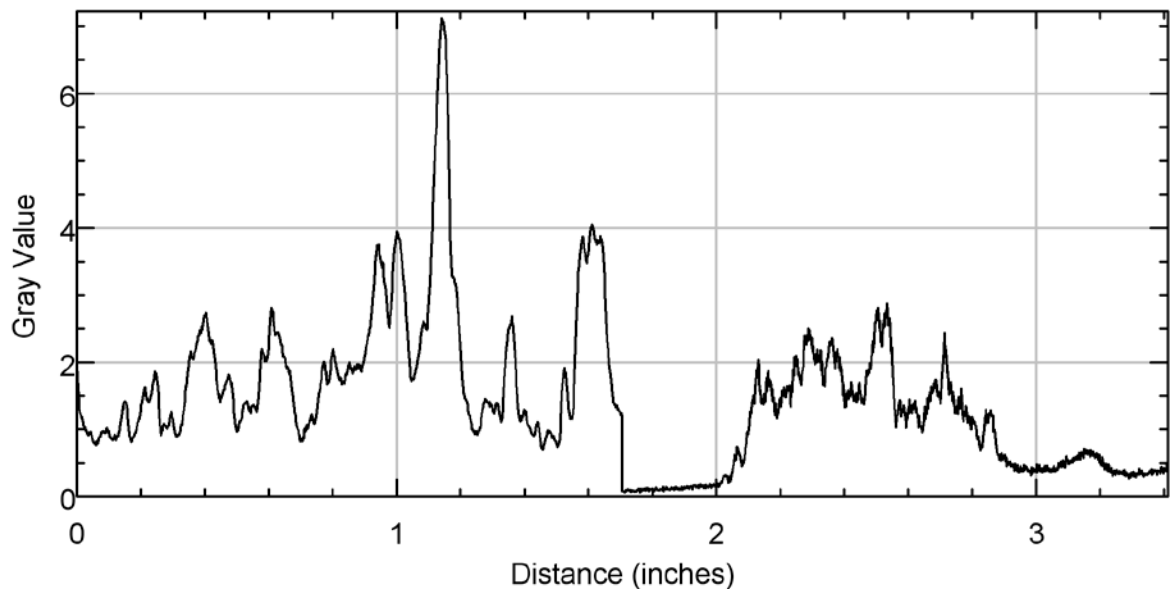


Figura 16. Análise de intensidade de fluorescência do composto BJJ16#unb1. As células MDA-MB-231 foram incubadas com Bodipy® ou com o composto BJJ16#unb1. A intensidade de fluorescência foi realizada através da análise ratiométrica das imagens adquiridas no microscópio confocal, utilizando software ImageJ. As áreas de maior intensidade de fluorescência são apresentadas no gráfico de linhas através de picos e na projeção 3D através da escala, revelando maior intensidade de emissão de sinal fluorescente do marcador comercial comparado aos picos do composto BJJ16#unb1.

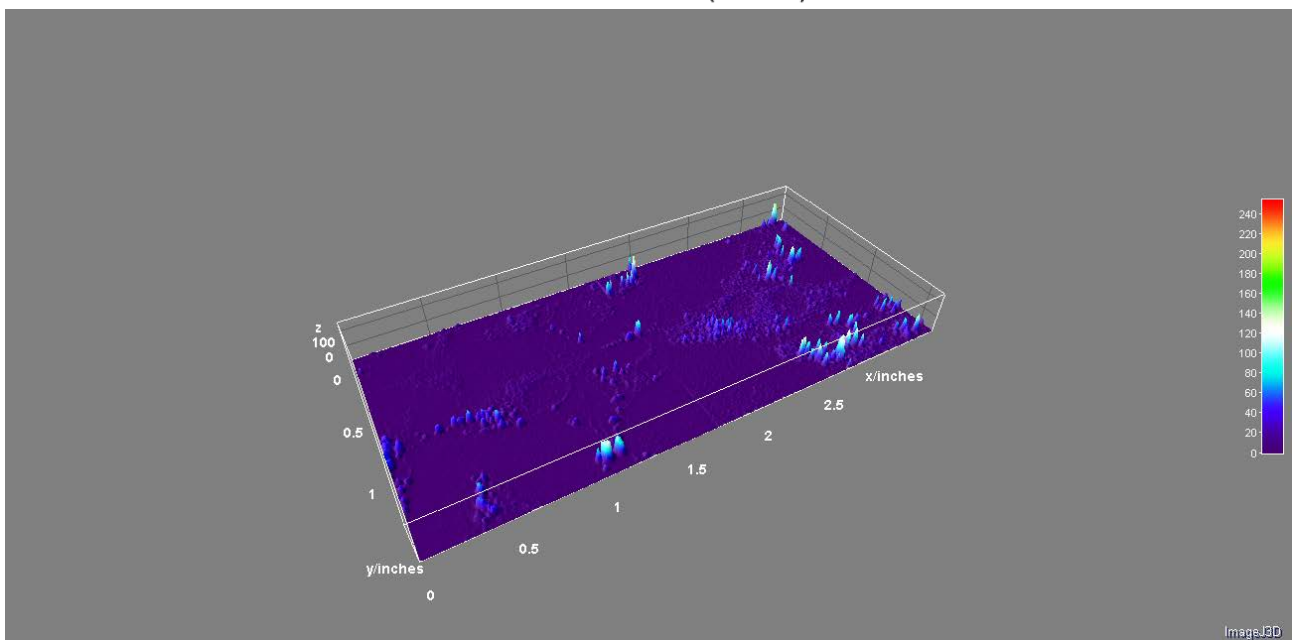
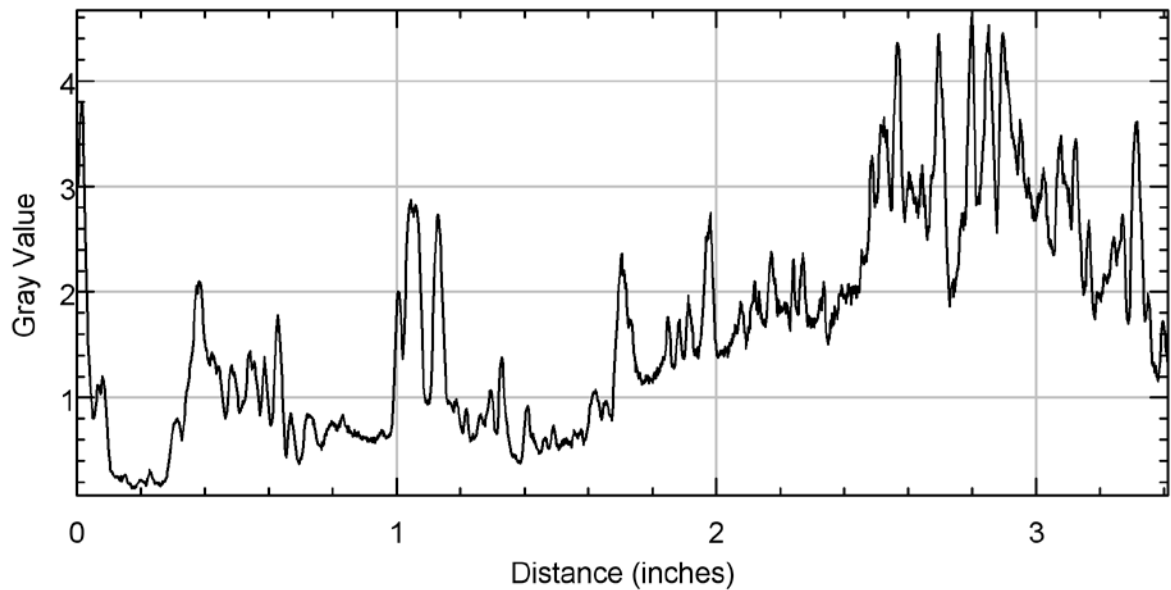


Figura 17. Análise de intensidade de fluorescência B JL16#unb2. As células MDA-MB-231 foram incubadas com Bodipy® ou com o composto B JL16#unb2. A intensidade de fluorescência fora realizada através da análise ratiométrica das imagens adquiridas no microscópio confocal, utilizando software ImageJ. As áreas de maior intensidade de fluorescência são apresentadas no gráfico de linhas através de picos e na projeção 3D através da escala, indicando que a semelhança na intensidade de fluorescência entre o composto B JL16#unb2 e o marcador Bodipy®.

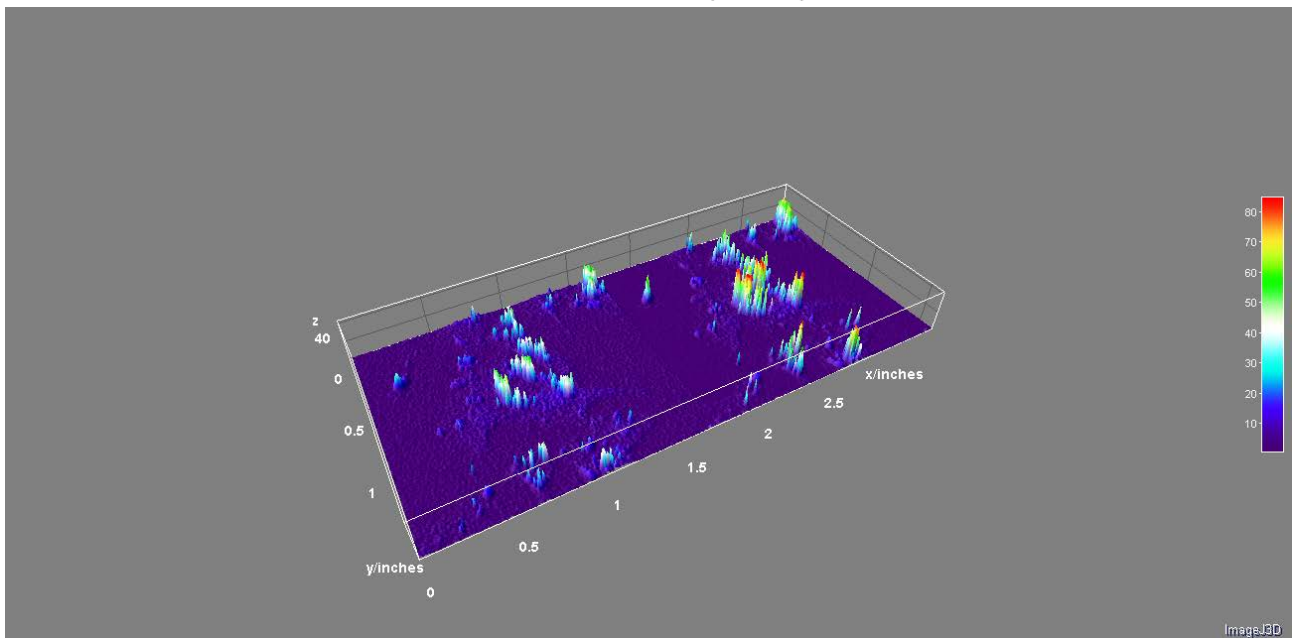
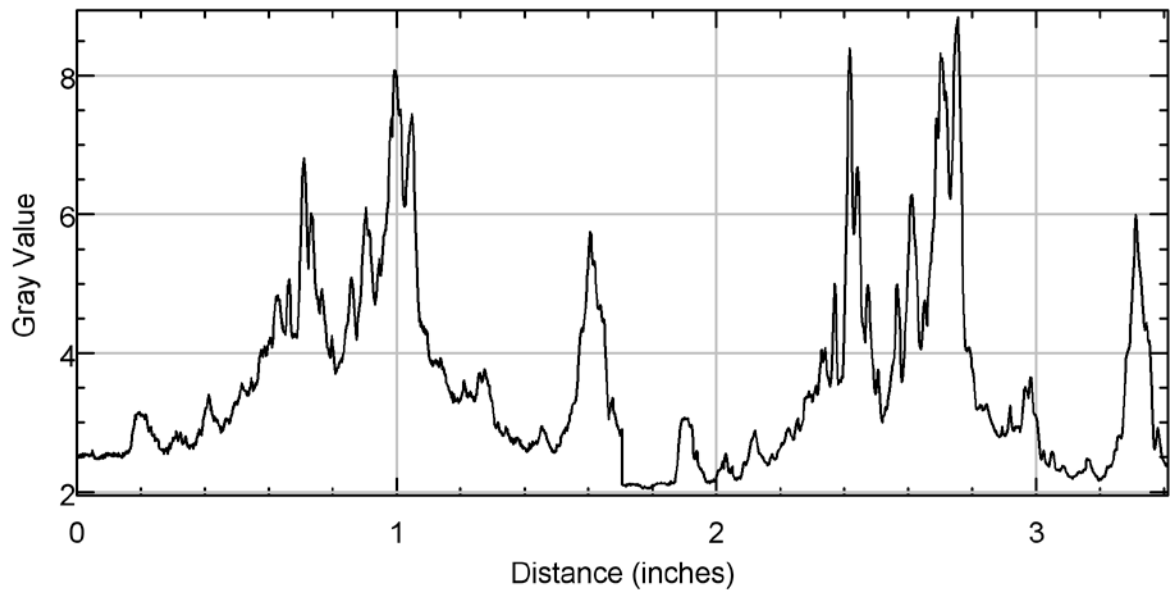


Figura 18. Análise de intensidade de fluorescência B JL16#unb3. As células MDA-MB-231 foram incubadas com Bodipy® e outra amostra com o composto B JL16#unb3. A intensidade de fluorescência fora realizada através da análise ratiométrica das imagens adquiridas no microscópio confocal, utilizando software ImageJ. As áreas de maior intensidade de fluorescência são apresentadas no gráfico de linhas através de picos e na projeção 3D através da escala. Notavelmente pode-se observar os elevados picos e projeções provenientes do composto B JL16#unb3, evidenciando ainda a emite fluorescência com intensidade muito superior a ao sinal fluorescente emitido pelo marcador comercial de referência para marcação de lipídios Bodipy®.

5.5. Marcação no modelo *Caenorhabditis elegans*

Com intuito de demonstrar a aplicabilidade na marcação de lipídios contidos em células inseridas na estrutura tecidual, foi utilizado o modelo *C. elegans* em ensaio de marcação em etapa

curta de fixação, sem desidratação dos nemátodos, empregando o Bodipy® e os marcadores BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3. O controle negativo para autofluorescência foi realizado incubando os nemátodos apenas com a solução de diluição dos agentes fluorescentes e seguindo com o protocolo de fixação, lavagem e montagem do espécime. Os resultados obtidos com o controle negativo demonstraram que este nemátodo apresenta uma leve autofluorescência com emissão no azul, verde e vermelho. No entanto, o padrão de autofluorescência é de uma marcação difusa por todo o corpo do *C. elegans* com exclusão apenas do lúmen do sistema digestório (**Figura 19**). Contudo, não houve qualquer tipo de alteração morfológica nos nemátodos após os procedimentos experimentais, com qualquer dos agentes fluorescentes empregados nos ensaios, conforme pode ser observado na imagem de contraste de fase da **figura 20**. O perfil de marcação específica de lipídios obtida com a sonda de referência Bodipy® mostrou acúmulo de fluorescência verde em estruturas esféricas no intestino e na hipoderme dos nemátodos. A captura da emissão de fluorescência deste marcador seguiu a mesma configuração de aquisição para as células, (excitação luminosa com 488nm de comprimento de onda). Os compostos testados reproduziram o seu perfil de emissão dentro destes nematódeos, sendo que o BJJ16#unb1 e o BJJ16#unb2, emitiram fluorescência na faixa de 500 à 570 nm (verde) e o composto BJJ16#unb3 emitiu fluorescência na faixa de 630 à 750 nm (vermelho). (**Figura 20**).

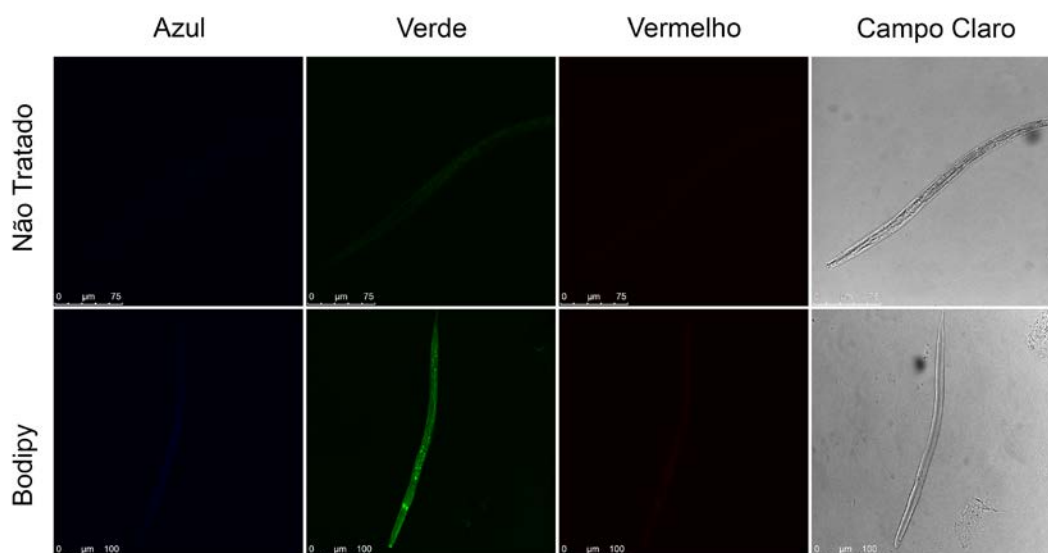


Figura 19. *C. elegans* não tratado e tratado com marcador de referência Bodipy®. Os *C. elegans* foram analisados por microscopia confocal pós fixação, porém sem tratamento, para avaliar perfis de auto fluorescência no nemátodo. Os resultados obtidos apresentaram uma leve autofluorescência com emissão no azul, verde e vermelho, de forma difusa no corpo do nemátodo. Análise de fluorescência dos *C. elegans* tratados com Bodipy® mostrou acúmulo de fluorescência verde em estruturas esféricas no intestino e na hipoderme dos nemátodo. O canal de contraste de fases permite observar a morfologia normal dos nematódos.

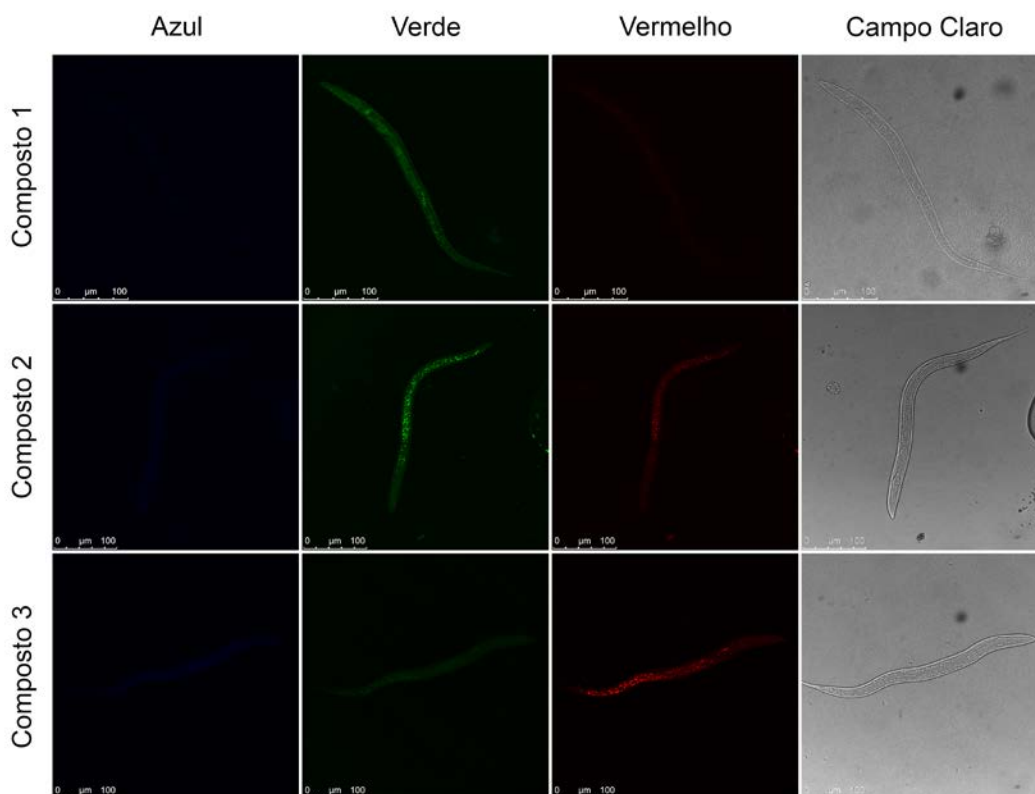


Figura 20. *C. elegans* tratados com os compostos BJL16#unb1, BJL16#unb2 e BJL16#unb3. Os *C. elegans* foram analisados por microscopia confocal após tratamento com os compostos BJL16#unb1, BJL16#unb2 e BJL16#unb13. Os três canais de fluorescência foram analisados. Apresentou perfis de fluorescência similar aos encontrados nas células de linhagem tratadas. O composto BJL16#unb1 apresentou marcação esférica verde com baixa distribuição no corpo do nemátodo. BJL16#unb2 apresentou intensa marcação esférica verde bem distribuída e BJL16#unb3 apresentou intensa fluorescência vermelha, bem distribuída por todo o corpo no *C. elegans*. O canal de contraste de fases permite observar a morfologia normal dos nemátodos.

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

A fim de confirmar a localização intracelular e intratecidual da marcação obtida pelos compostos derivados de Benzotiadiazol, BJL16#unb1, BJL16#unb2 e BJL16#unb3, de forma a evitar interpretação errada nas imagens em duas dimensões que poderiam sugerir adsorção dos marcadores a superfície celular; foi feita utilizada a técnica de renderização 3D seguida de análise ortogonal das amostras celulares. Da mesma forma e com o intuito de demonstrar a marcação intratecidual no modelo *C. elegans* o mesmo tipo de técnica e análise foi realizado nas imagens adquiridas dos nemátodos. O resultado da análise ortogonal a partir da renderizações 3D demonstrou de forma conclusiva que a as vesículas fluorescentes estão contidas no interior das células, não havendo nenhuma marcação por adsorção na superfície das membranas plasmáticas das amostras celulares (**Figura 21**). Os resultados obtidos com *C. elegans* (**Figura 22**), também demonstraram de forma inequívoca que os agentes fluorescentes foram capazes de penetrar diversas camadas de tecido do nemátodo sem retenção, ultrapassar as membranas celulares e marcar de

forma específica os corpúsculos lipídicos nestes animais. Para uma demonstração extra destas localizações foram preparados vídeos de curta duração onde as amostras são rotacionadas 360° sobre o seu eixo Y. Esta técnica permite a visualização da arquitetura celular e tecidual em três dimensões e a localização e distribuição dos corpúsculos lipídicos marcados no interior tanto das células isoladas quanto dentro das células dispostas no tecido dos nemátodos.

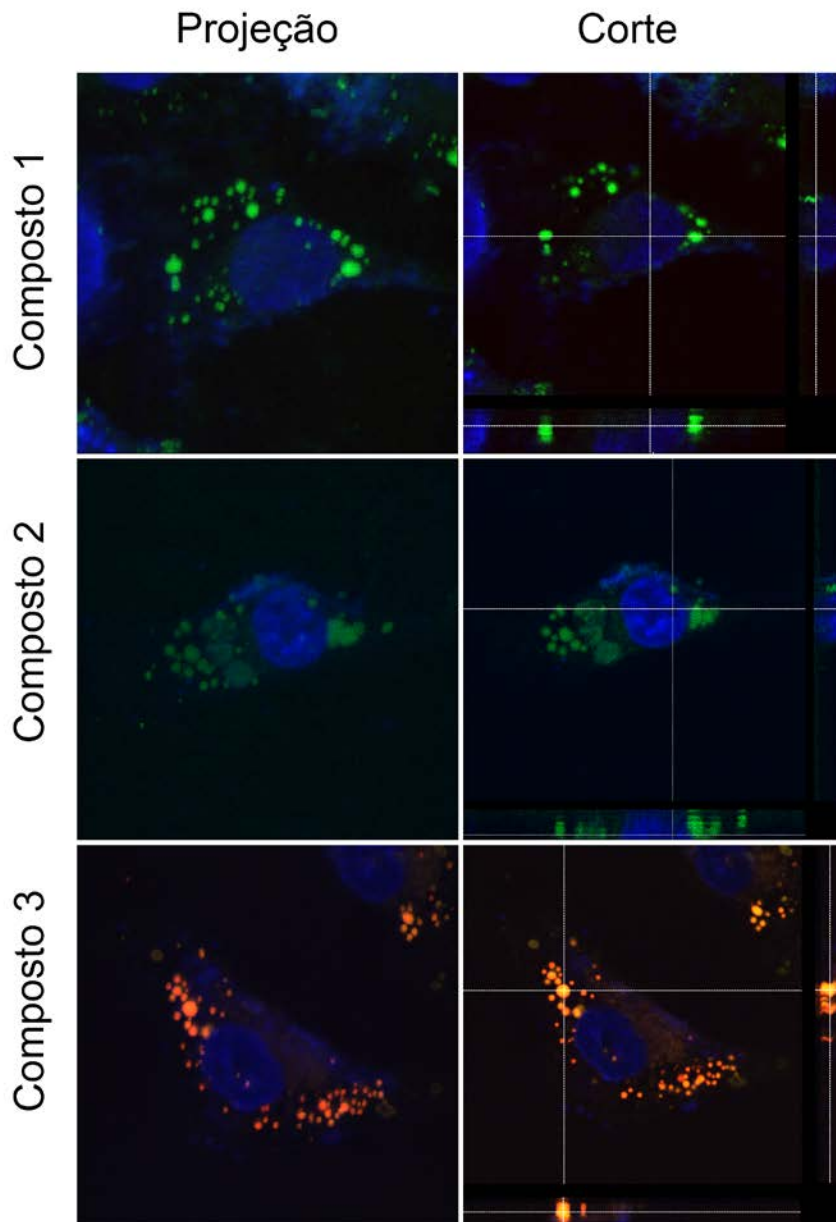


Figura 21. Renderização 3D e análise ortogonal das células MDA-MB-231 tratadas com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3. As células foram adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser após tratamento com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3. Os três canais de fluorescência foram analisados. Foi realizada a projeção da sequência de imagens adquiridas. Através dos cortes pode-se observar a localização dimensional entre o núcleo e os corpúsculos lipídicos nos compostos BJJ16#unb1 e BJJ16#unb2. Foi feito a análise ortogonal da sobreposição de fluorescência dos canais verdes (referente ao Bodipy®) e vermelho. Pode observar a cor laranja nas regiões de corpúsculos lipídicos.

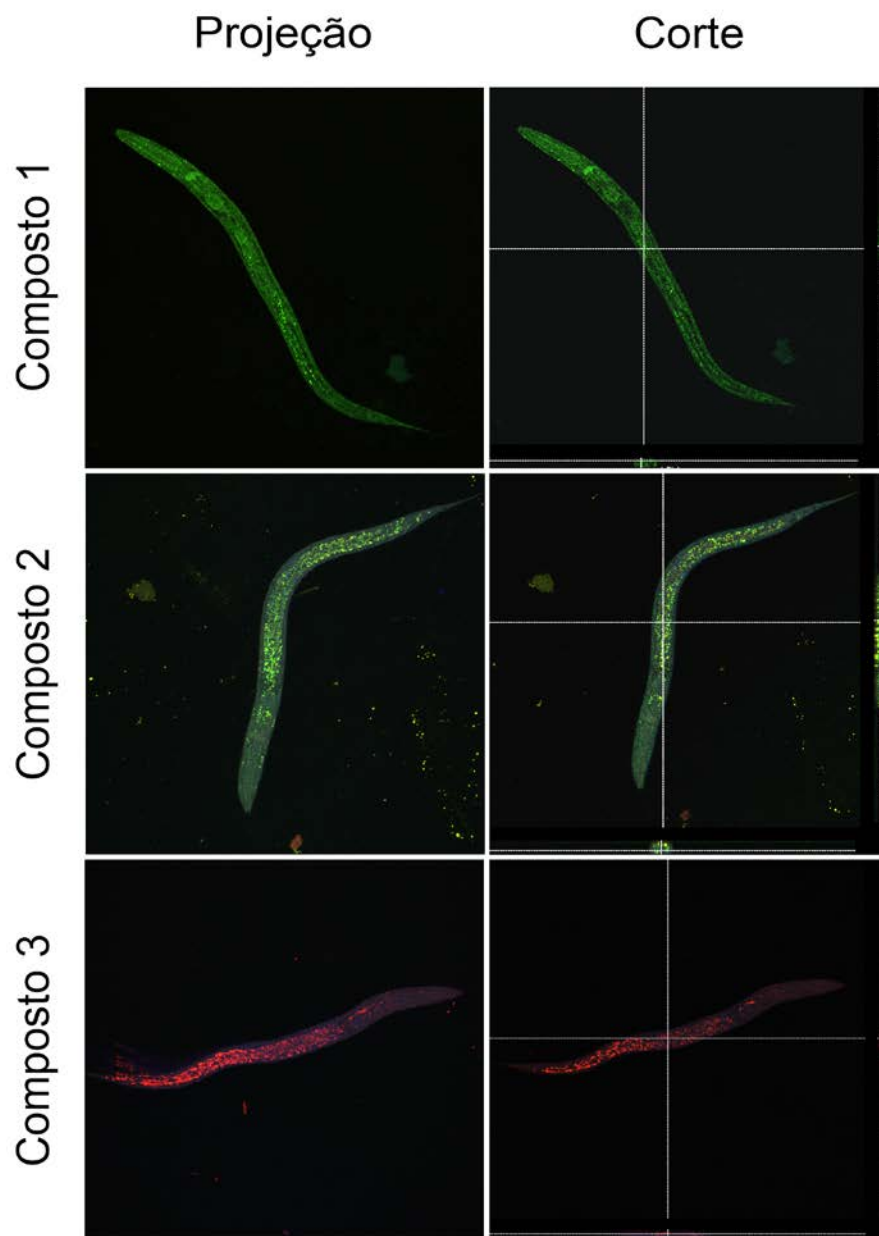


Figura 22. Renderização 3D e análise ortogonal do *C. elegans* tratado com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser após tratamento com os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3. Os três canais de fluorescência foram analisados. Foi realizada a projeção da sequência de imagens adquiridas. Através dos cortes pode-se observar a localização dimensional das esferas lipídicas dispersadas pelo corpo do nemátodo com os tratamentos dos compostos BJJ16#unb1 e BJJ16#unb2.

6. Discussão

As moléculas testadas pertencem a família de BTDs (benzotiadiazol), usualmente sintetizada a partir do derivado 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazol por meio de reações de acoplamentos (Oliveira et al., 2010; Neto et al., 2012). Este processo de síntese produz um ótimo rendimento na formação dos compostos além de ser realizado a condições amenas e sem rejeitos do processo reacional (WANG *et al.*, 2012; NETO *et. al.*, 2013). Estas características contribuem de forma a facilitar a produção em larga escala destes compostos, atendendo as tendências atuais da química verde que visam à redução ou a eliminação de resíduos potencialmente danosos ao meio ambiente. Além disso este tipo de reação pode ser realizada em infraestruturas de baixo custo o que teria impacto positivo no preço final por quilo dos compostos.

Os agentes fluorescentes derivados de Benzotiadiazol, BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3 são solúveis em soluções aquosas, podem ser empregados com células vivas ou pré-fixadas e se associam de forma específica ao conteúdo lipídico encontrado nos corpúsculos lipídicos no interior das células estando estas livres ou organizadas em tecidos dentro de um organismo conforme foi demonstrado neste trabalho **Figuras 18,19**. A marcação de lipídios intracelulares passou a ser uma ferramenta extremamente importante para o estudo de condições fisiológicas em diversos organismos (QUEHENBERGER *et al.*, 2010; HALLAMAA *et al.*, 2016; LIAW *et al.*, 2016; EL-BAHR *et al.*, 2016) e principalmente no homem, como suporte ao entendimento do metabolismo dos lipídios em estados de saúde e doença (SHARRETT *et al.*, 2001; PISCHON *et al.*, 2005; SNIDERMAN *et al.*, 2011). O metabolismo e a captação de lipídios desempenham atividades vitais nos organismos, estando no homem relacionado com doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas, câncer, obesidade, doenças inflamatórias crônicas (WENK, 2005; WATSON, 2006; SANJOO *et al.*, 2013; ANAND *et al.*, 2016; FARIAS *et al.*, 2016). Além disso, a captação e a distribuição de lipídios durante o desenvolvimento embrionário e fetal é decisiva para a formação do sistema nervoso central normal (STURMEY *et al.*, 2009; MCKEEGAN *et al.*, 2011). Sendo assim ao propormos novas ferramentas para a análise de lipídios estamos indiretamente contribuindo com todas as áreas que necessitam cada vez mais de meios para o estudo da captação, estoque e do metabolismo dos lipídios. Além disso diversas outras áreas tem voltado seus esforços para a produção em larga escala de lipídios de origem biológica, a partir de fazendas de microalgas, para fins de utilização na produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011). Este setor utiliza dos marcadores de lipídios comerciais para analisar a massa de lipídios produzidas nestas algas de forma a aperfeiçoar as suas metodologias de manutenção destes organismos para melhorar o rendimento de lipídios durante os processos de purificação (HUANG *et al.*, 2009; RUMIN *et al.*, 2015). Neste sentido, a produção de marcadores

de lipídios mais eficientes do que os comercialmente disponíveis, como foi demonstrado neste trabalho para o composto BJJ16#unb3 pode contribuir positivamente também nestas aplicações que são desvinculadas da área da saúde.

O marcador de lipídio de referência Bodipy® apresenta diversas limitações que vão desde a baixa solubilidade em soluções aquosas o que impõe a sua diluição em altas concentrações de solventes orgânicos que são tóxicos para as células, até uma acentuada marcação de fundo o que reduz de forma significativa a qualidade das imagens obtidas com estes marcadores dependendo do tipo celular utilizado (HERMANSON, 2013; NETO, *et al.*, 2014; RUMIN *et al.*, 2015,). No entanto neste trabalho pudemos identificar a mais extrema limitação do uso deste marcador comercial, que foi a não identificação de diversos corpúsculos lipídicos que estão presentes nas células e não puderam ser marcados com Bodipy®. Este fato provavelmente se deve a especificidade do marcador Bodipy® por lipídios neutros (GOCZE ET. AL., 1994; HARRIS ET. AL., 2013; SPANGENBURG ET. AL., 2011). Sendo assim apenas os estoques de lipídios celulares que são ricos em lipídios neutros são marcados eficientemente com o Bodipy®. Mas esta limitação insere um viés nas análises apontando para uma sublocalização do estoque real de lipídios nas células, como pode ser vista na **figura 18** através da qual demonstramos que o marcador BJJ16#unb3 é mais eficiente não apenas na emissão de fluorescência, mas principalmente na sua capacidade de se associar a corpúsculos lipídicos não identificados pelo Bodipy®. Nossos resultados sugerem que os agentes fluorescentes aqui validados podem ser empregados para fazer a quantificação total de lipídios intracelulares com base em parâmetros de emissão de fluorescência. Esta quantificação fica prejudicada quando se emprega o marcador de lipídio Bodipy®, pelos motivos acima expostos. Em particular a molécula BJJ16#unb3 se empregada para este propósito geraria dados muito mais precisos a cerca da composição lipídica de células e tecidos.

Neste trabalho validamos três agentes fluorescentes, com diferente eficiência na emissão de fluorescência e na marcação de lipídios. A produção de marcadores fluorescentes para lipídios é também uma área que vem crescendo nos últimos anos, com diversas publicações propondo novas moléculas para esta finalidade (KUTAM ET. AL., 2015; SEZGIN ET. AL., 2011; SPANDL ET. AL., 2009). No entanto, o composto BJJ16#unb3 está entre as melhores propostas encontradas na literatura em termos de emissão de sinal fluorescente, estabilidade em solução aquosa e foto estabilidade. O que destaca o composto BJJ16#unb3 dentre os vários outros marcadores com afinidade para lipídios encontrados na literatura científica (KLEUSCH, ET AL., 2012; ERDINC e ASHFARI, 2011) é o fato deste composto marcar lipídios diferentes daqueles marcados pelo Bodipy® e esta característica ainda não ter sido demonstrada para outros marcadores. Ou se

existem outros marcadores com a mesma característica este aspecto não foi explorado pelos autores em suas publicações.

A eficiência da marcação intracelular obtida com o composto BJJ16#unb3 pode dar novos direcionamentos a estudos clássicos que associam lipídios intracelulares com processos inflamatórios (MELO, et al., 2011 ; PARKER, 1987), infecção por parasitos (CHARRON e SIBLEY, 2002) dentre muitos outros. Como muitos destes estudos se basearam em imagens obtidas com marcações feitas com Bodipy®, a distribuição dos corpúsculos lipídicos nas mais diversas condições experimentais foi subestimada, o que é em particular grave para os controles negativos utilizados nestes experimentos. Nestes detalhes sutis de nossos resultados reside a maior vantagem do emprego do composto BJJ16#unb3 para a detecção e quantificação de lipídios intracelulares.

O modelo *C. elegans* para estudos do metabolismo de lipídio vem sendo amplamente empregado, incluindo uma série de metodologias baseadas em fluorescência para estudos a respeito da captação, estoque e mobilização de massa gordurosa (MULLANEY e ASHRAFI, 2009; BARROS, et al., 2012). Este modelo também vem sendo empregado para se estabelecer metodologias para a avaliação de índices de gordura nos tecidos (MCKAY *et al.*, 2003, CRITTENDEN e KIMBLE, 2009). O modelo *C. elegans* para estudo do metabolismo de lipídio também faz intersecção com análises de longevidade relacionada a diferentes dietas (LEMIEUX e ASHRAFI, 2014) e aos processos de envelhecimento (ALCKERMAN e GEMS, 2012). Neste contexto pequenos desvios na identificação de lipídios podem exercer um papel relevante que podem levar ao erro de interpretação de dados importantes que poderiam ser a chave para o entendimento de um conjunto multifatorial de funções complexas como é o processo de envelhecimento por exemplo. Desta forma nossos ensaios baseados no modelo *C. elegans* demonstraram que os compostos aqui testados, apresentam a capacidade de marcar os corpúsculos lipídicos contidos dentro das diversas células mesmo quando estas células estão inseridas nos tecidos dos órgãos deste nemátodos (**Figuras 17, 19**). De forma similar ao já foi descrito como vantagens para o emprego, em particular do composto BJJ16#unb3, em cultivo celular, o mesmo pode ser aplicado para o modelo *C. elegans*. Neste modelo também foi demonstrado através de nossos diversos resultados não haver perda de especificidade e nem de sinal fluorescente após a marcação nas condições estabelecidas por nós para as análises.

Finalmente do ponto de vista da emissão fluorescente, diversos autores vem propondo agentes fluorescentes para marcação de biomoléculas (KIMURA, *et al.*, 2009; ZHANG, *et al.*, 2004) incluindo marcações com de lipídios (GREENSPAN, MAYER e FOWLER, 1985; ZHANG, *et al.*, 2010; MEHLEM *et al.*, 2013). No entanto, muitas destas propostas continuam apresentando as

mesmas limitações observadas com o uso do Bodipy®. Como durante este trabalho nos foi possível apenas analisar as imagens e quantificações obtidas e publicadas com o uso destes outros compostos (KIMURA, *et al.*, 2009; ZHANG, *et al.*, 2004; ZHANG, *et al.*, 2010), então nosso ponto de vista está limitado a estes dados publicados. Nossas observações indicam que estes marcadores alternativos de lipídio marcam cruzadamente outras estruturas celulares gerando um grande sinal de ruído nas imagens adquiridas o que comprometendo a qualidade destas imagens. Como não foram encontrados por nós outros trabalhos que analisassem as diferenças entre as marcações do agente fluorescente comercial de referência e os agentes fluorescentes aqui testados, não é possível para nós determinar se outro agente apresenta as mesmas propriedades do composto BJJ16#unb3 validado aqui. Outro aspecto importante é que normalmente os agentes fluorescentes que emitem sinal fluorescente no comprimento de onda do vermelho são fortemente afetados por foto decaimento (SAUER, *et al.*, 2011). Nas condições experimentais usadas por nós não foi observado foto decaimento de nenhum dos três compostos aqui testados. Sendo ainda observado emissão de fluorescência em outros comprimentos, no entanto esta característica também foi observada no agente fluorescente de referência para marcação de lipídios. Em particular o agente fluorescente BJJ16#unb3 também apresenta um desvio de Stokes que consideramos muito satisfatório sendo o mesmo excitado no comprimento de onda 488 e emitindo na faixa 630 à 750nm. Um amplo desvio de Stoke é uma característica buscada por desenvolvedores de agentes fluorescentes. Bons intervalos de desvio de Stoke associados a picos fechados de excitação e emissão fluorescentes contribuem de forma positiva para o emprego do agente fluorescente (KUMBHAR, *et al.*, 2015; ZHU, *et al.*, 1997), uma vez que reduzem a probabilidade de sobreposição de sinais facilitando o seu emprego em conjunto com outros marcadores fluorescentes em análises multiparamétricas.

7. Conclusões e Perspectivas

Os compostos BJJ16#unb1, BJJ16#unb2 e BJJ16#unb3 estudados neste trabalho apresentam características bastante otimizadas para seu emprego como sondas fluorescentes. Quanto às características físico-químicas são solúveis em soluções aquosas, apresentam ótima estabilidade em meio solubilizado e apresentam fotoestabilidade durante a aquisição de imagens. Sua síntese é baseada em um processo que atende as tendências atuais, dito como química verde, onde sua produção visa reduzir resíduos poluentes e de fácil obtenção em maior escala, o que também chama bastante atenção no meio comercial. Os resultados de fluorescência analisados são ainda mais favoráveis, mostrando a afinidade dos compostos por corpúsculos lipídicos em células vivas fixadas, ou mesmo empregadas em organismos multicelulares como *C. elegans*.

A análise desses compostos revelou semelhanças ao perfil de fluorescência do marcador comercial de referência para lipídios Bodipy®, como foi o caso do BJJ16#unb2. Mas o que chama atenção é a apresentação de resultados do composto BJJ16#unb3, demonstrando maior intensidade de fluorescência e a capacidade de marcar demais moléculas não evidenciadas pelo composto comercial. Esta notável individualidade do composto BJJ16#unb3 possibilita seu emprego em uma ampla área, seja na pesquisa de biomoléculas ou mesmo em investigações e aplicações em áreas tecnológicas como o de biocombustíveis.

É com esta busca por desenvolvimento de novas sondas, demonstrando especificidade nos perfis de marcação que possibilitam melhorar a aquisição de imagens com maior seletividade, menor interferências, obtendo uma efetividade dos métodos utilizados. É também um passo importante quando se permite o emprego na área biomédica, enriquecendo o conhecimento a respeito da complexidade dos sistemas vivos, bem como se aproximar de novos desenvolvimentos tecnológicos.

Este trabalho levantou diversas questões, que serão aqui apresentadas como perspectivas de continuidade:

- Possibilidade do emprego destes marcadores fluorescentes em teste *in vivo* no modelo de *C. elegans*,
- A análise de estabilidade dos compostos à longo prazo para estabelecimento de validade estável das sondas,
- Aplicação dos marcadores em células para análise em citômetro de fluxo,
- Utilizar molécula como base para atingir melhoramento de outras moléculas químicas com caráter fluorescente.

8. Referências

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 6^a ed. Garland Science, U.S.A., 2014.
- ALENCAR, R. S. M. Medicamentos no Brasil: uma análise crítica da dinâmica técnica-setorial (1996-2006). **Dissertação** (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável), Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- ANDO, R. A. Eespectroscopia vibracional, Raman ressonante e eletrônica de nitroderivados em sistema conjugados. **Dissertação** (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ANAND, S.; YOUNG, S.; ESPLIN, S. M.; PEADEN, B.; TOLLEY, D. H.; PORTER, F. T.; VARNER, M. W.; D'ALTON, M. E; JACKSON, B.; GRAVES, S. W. Detection and Confirmation of Serum Lipid Biomarkers for Preeclampsia Using Direct Infusion Mass Spectrometry. **Journal of Lipid Research**, p. 1-38, 2016.
- ANDO, R. A. Eespectroscopia vibracional, Raman ressonante e eletrônica de nitroderivados em sistema conjugados. **Dissertação** (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ANNAMALAI, J.; NALLAMUTHU, T. Green synthesis of silver nanoparticles: characterization and determination of antibacterial potency. **Applied Nanoscience**, vol 6, p. 259-265, 2016.
- ANTARIS, A. L.; CHEN, H.; CHENG, K.; SUN, Y.; HONG, G.; QU, C.; DIAO, S.; DENG, Z.; HU, X.; ZHANG, B.; ZHANG, X.; YAGHI, O. K.; ALAMPARAMBIL, Z. R.; HONG, X.; CHENG, Z.; DAI, H. A small-molecule dye for NIR-II imaging. **Nature Materials**, vol. 15, p. 235-242, 2016.
- BANKS, H. T.; SUTTON, K. L.; THOMPSON, W. C.; BOCHAROV, G.; DOUMIC M.; SCHENKEL, T.; ARGILAGUET, J.; GIEST, S.; PELIGERO, C.; MEYERHANS, A. A new model for the estimation of cell proliferation Dynamics using CFSE data. **Journal of Immunology Methods**, vol. 373, p. 143-160, 2012.
- BARAN, T.; AÇIKSÖZ, E.; MENTES, A. Highly efficient, quick and green synthesis of biaryl with chitosan supported catalyst using microwave irradiation in the absence of solvent. **Carbohydrate Polymers**. vol. 20, p. 189-198, 2016.
- BARROS, A. G.; LIU, J.; LEMIEUX, G. A.; MULLANEY, B. C.; ASHRAFI, K. Analyses of *C. elegans* fat metabolic pathways. **Methods in Cell Biology**. vol. 107, p. 383 - 407, 2012.
- BASHIR, H.; AHMED, N.; KHAN, M.; ZAFAR, A.; TAHIR, S.; KHAN, MI.; KHAN, F.; HUSNAIN, T. Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. DOI: 10.1002/bab.1426, 2015.
- BRASIL. Resolução RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil, 2010.

- BERTRAND, O. Effects of foreign acquisitions on R&D activity: evidence from firm-level data for France. **Research Policy**. vol. 38, p. 1021-1031, 2009.
- BETZIG E., TRAUTMAN, J. K. Near-field optics: microscopy, spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit. **Science**. vol. 257, p. 189-195, 1992.
- BIEHL, B. H. Implantação de Técnicas para Avaliação da Dinâmica Mitocondrial por Microscopia Confocal no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. **Trabalho de conclusão de curso** (graduação em ciencias biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2012.
- BLUNDELL, S. A. MBPT and Coupled Cluster Approaches to Parity Nonconservation in Atoms, A Survey of Recent Developments. **Plenum Press**, DOI 10.1007/978-1-4757-9256-0, 1992.
- BOTTER-JENSEN, L. Luminescence techniques: instrumentation and methods. **Radiation Measurements**. vol. 27, p. 749-768, 1997.
- CAPENA, L. X. L.; PALMEIRA FILHO, P. L. Indústria farmacêutica brasileira: reflexão sobre sua estrutura e potencial de investimento. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Nacional (BNDS). Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/liv_perspectivas/06.pdf> Acessado em: Fev. 2016.
- CARVALHO, H. F. RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 3ª ed. Manole, São Paulo, 590 p. 2013.
- CARVALHO, P. H. P. R.; CORRÊA, J. R.; GUIDO, B. C.; GATTO, C. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; SOARES, T. A.; NETO, B. A. D. Designed benzothiadiazole fluorophores for selective mitochondrial imaging and dynamics. **European Journal of Chemistry**. vol. 20, p. 15360-15374, 2014.
- CASTRO, A. L.; TARELHO, S.; SILVESTRE, A.; TEIXEIRA, H. M. Simultaneous analysis of some club drugs in whole blood using solid phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Forensic and Legal Medicine**. Oxford, vol.19, p. 77-82, 2012.
- CHAN, Y.-P.; FRAN, L.; YOU, Q.; CHAN, W.-H.; LEE, A. W. M.; SUANG, S. Ratiometric pH responsive fluorescent probes operative on ES IPT. **Tetrahedron**. vol. 69, p. 5874-5879.
- CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**. vol. 115, 3049-3059, 2002.
- CHENG, H.; SCOTT, K.; LOVELL, K.V.; HORSFALL, J.A.; WARING, S.C. Evaluation of new ion exchange membranes for direct borohydride fuel cells. **Journal of Membrane Science**. vol. 288, p. 168-174, 2007.
- CHI, C.; MIKHAILOVSKY, A.; BAZAN, G. C. Design of cationic conjugated polyelectrolytes for dna concentration determination. **Journal of the American Chemical Society**. vol. 129, p. 11134-11145, 2007.
- CHIN-DUSTING, J.; MIZRAHI, J.; JENNINGS G.; FITZGERALD, D.; Finding improved medicines: the role of academic-industrial collaboration. **Nature Reviews Drug Discovery**. vol. 4, p. 891-897, 2005.

- CORREIA, S. C.; CARDOSO, S.; SANTOS, R. X.; CARVALHO, C.; SANTOS, M. S.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; MOREIRA, P. I. New Insights into the Mechanisms of Mitochondrial Preconditioning-Triggered Neuroprotection. **Current Pharmaceutical Design**. vol. 17, p. 3381–3389, 2011.
- CRITTENDEN, S.; KIMBLE, J. Preparation and immunolabeling of *C. elegans*. **Cold Spring Harb. Protocol**. 2009.
- DA CRUZ, E. H. G.; CARVALHO, P. H. P. R.; CORREA, J. R.; SILVA, D. A. C.; DIOGO, E. B. T.; SOUZA FILHO, J. D.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, H. C. B.; GUIDO, B. C.; SOLVA FILHO, D. A.; NETO, B. A. D.; SILVA JUNIOR, E. N. Design, synthesis and application of fluorescent 2,1,3-benzothiadiazole-triazole-linked active lapachone derivatives. **New Journal of Chemistry**. vol. 38, p. 2569-2580.
- DASARI, A.; GUTTENA, V. Green synthesis, characterization, photocatalytic, fluorescence and antimicrobial activities of Cochlospermum gossypium capped Ag₂S nanoparticles, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. vol. 157, p. 57-69, 2016.
- DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio, **Química nova na escola**. São Paulo, n.7, p. 21-25, 2001.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, **Biotechnology Advances**. vol. 27, p. 297–306, 2009.
- EL-BAHR, S. M.; EL-DEEB, W. M. Trypanosoma evansi in naturally infected Dromedary Camels: lipid profile, oxidative stress parameters, acute phase proteins and proinflammatory cytokines. **Parasitology**. v. 18, p. 1-5, 2016.
- ERDINC, S.; SCHWILLE, P. Fluorescence Techniques to Study Lipid Dynamics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. doi: 10.1101/cshperspect.a009803, 2011.
- ETHIRAJAN, M. CHEN, Y. JOSHI, P. PANDEY, RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Review**. vol. 40, p. 340–362, 2011.
- FARIAS DE, C. C.; MAES, M.; BONIFACIO, K. L.; BORTOLASCI, C. C.; DE SOUZA NOGUEIRA, A.; BRINHOLI, F. F.; MATSUMOTO, A. K.; DO NASCIMENTO, M. A.; DE MELO, L. B.; NIXDORF, S. L.; LAVADO, E. L.; MOREIRA, E. G.; BARBOSA, D. S. Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. **Neuroscience Letters**. vol. 6, n. 617, p. 66-71, 2016
- FDA. Development and Approval Process (Drugs). **U. S. Food and Drug Administration**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/default.htm>>. Acessado em: Fev. 2016.
- FENG, G.; DING, D.; LIU, B. Fluorescence bioimaging with conjugated polyelectrolytes. **Nanoscale**. Vol. 4, p. 6150-6165, 2012.
- FERAPONTOVA, E. E. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes, **Electrochimica Acta**. vol. 49, p. 1751–1759, 2004.

- FOGEL, J. L.; THEIN, T. Z. T.; MARIANI, F. V. Use of LysoTracker to Detect Programmed Cell Death in Embryos and Differentiating Embryonic Stem Cells. **Journal of Visualized Experiments**. vol. 68, p. 4254.
- FRANCHIL, P.; SANTOSR. P.; MATSUBARA, E. Y.; LIMA, J. C.; ROSOLEN, J. M.; TAKAHASHI, J. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Química Nova**. vol. 35 no.3 São Paulo 2012.
- FREEMAN, W. H. **Molecular Cell Biology**, 7 ed, United States: Washington, 2012.
- FREJ, M. L. Fotoluminescência Stokes e anti-Stokes em vidros calcogenetos. **Dissertação** (Mestrado em Física), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- FURETTA, C.; KITIS, G. Models in Thermoluminescence, **Journal of Materials Science**. vol. 39, p. 2277-2294, 2004.
- GAVA, A. A.; ZANONI, J. N. Envelhecimento celular. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**. Umuarama, vol. 9, p. 41-46, 2005.
- GEORG, H. C. Efeitos do meio em propriedades conformacionais e eletrônicas de moléculas. **Tese** (doutorado em ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- GOCZE, P. M.; FREEMAN, D. A. Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. **Cytometry**. v. 17, n. 2, p. 151-158, 1994.
- GOMES, F. M.; RAMOS, I. B.; WENDT, C.; GIRARD-DIAS, W.; SOUZA, W.; MACHADO, E. A.; MIRANDA, E. A. K. New Insights into the in situ Microscopic Visualization and Qualification of Inorganic Polyphosphate Stores by 4'6-Diamidino-2-Phenylindone (DAPI)-Staining. **European Journal of Histochemistry**. vol. 4, 2013.
- GREENSPAN, P.; MAYER E. P.; FOWLER, S. D. Nile red a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **Journal of Cell Biology**. vol. 100, n.3, p.965-973, 1985.
- GRIMM, J. B.; ENGLISH, B. P.; CHEN, J.; SLAUGHTER, J.; ZHANG, Z.; REVYAKIN, A.; PATEL, R.; MACKLING, J. J.; NORMANNO, D.; SINGER, R. H.; LIONNET, T.; LAVIS, L. D. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. **Nature Methods**. DOI: 10.1038, 2015.
- HAGE, D. S.; CARR, J. D. **Química Analítica e Análises Quantitativas**. 1ª ed. Editora Pearson Prentice Hall, São Paulo, 2012.
- HALLAMAA, R.; BATCHU, K. Phospholipid analysis in sera of horses with allergic dermatitis and in matched healthy controls. **Lipids health Dis**. v. 1, n. 45, p. 2-15, 2016.
- HARRIS, L. A. L. S.; SKINNER, J. R.; WOLINS, N. E. Imaging of neutral lipids and neutral lipid associated proteins. **Methods Cell Biol**. v. 116, 2014.
- HECKLER, V. Uso de simuladores e imagens como ferramentas auxiliares no ensino/aprendizagem de ótica. **Dissertação** (mestrado em física), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

- HENRY, J. **Diagnosticos clinicos e tratamento por metodos laboratoriais**. 19^a ed. Manole, São Paulo, 1999.
- HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 3 ed. Academic Press, 2013.
- HIMMELREICH, U.; SOMORJAI, R.; DOLENKO, B.; LEE, O. C.; DANIEL, H.-M.; MURRAY, R.; MOUNTFORD, C. E.; SORRELL, T. C. Rapid identification of *Candida* species by using nuclear magnetic resonance spectroscopy and a statistical classification strategy. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 69, p. 4566-4574, 2003.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. Editora Bookman, Porto Alegre, 2009.
- HUANG, C.; FRÉTER CARL. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. vol. 16, p. 924-949, 2015.
- JIANG, Q.; ZHANG, Z.; LU, J.; HUANG, Y.; TAN, Y.; JIANG, Q. A novel nitro-substituted benzothiadiazole as fluorescent probe for tumor under hypoxic condition. **Jornal of Bioorganic & Medicinal Chemistry**. p. 7735-7741, 2013.
- JOHNSON, M. B.; CRISS, A. K. Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells. **Journal of Visualized Experiments**. vol. 79, 50729, 2013.
- KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotechnic Histochemistry**. vol. 70, p. 220-33, 1995.
- KARP, G. **Cell and Molecular Biology**. John Wiley & Sons: New Jersey, 2005.
- KEIGHRON, J. D.; EWING, A. G.; CANS, A. S. Analytical Tools To Monitor Exocytosis: A Focus on New Fluorescent Probes and Methods. **Analyst**, vol. 137, p.1755–1763, 2012.
- KEMP, W. **Organic spectroscopy**. 3^a edição, 1932.
- KIMURA, Y.; SUGIURA, Y.; HAYASAKA, T.; SETOU, M. Visualizing the spatial distribution of biomolecules in *C. elegans* by imaging mass Spectrometry. **The Worm Breeder's Gazette**. vol. 18, p.4, 2009.
- KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical Reviews**. vol. 2, p. 23-60, 2010.
- KLEUSCH, C.; HERSCH, N.; HOFFMANN, B.; MERKEL, R.; CSISZÁR, A. Fluorescent Lipids: Functional Parts of Fusogenic Liposomes and Tools for Cell Membrane Labeling and Visualization. **Molecules**. vol. 17, p. 1055-1073, 2012.
- KOSSATZ, S.; BÉHÉ, M.; MANSI, R.; SAUR, D.; CZERNEY, R.; KAISER, W. A.; HILGER, I. Multifactorial diagnostic NIR imaging of CCK2R expressing tumors. **Biomaterials**. vol. 34, n.21, p. 5172-5180, 2013.

- KRETSCHY, N.; SOMOZA, M. M. Comparison of the Sequence-Dependent Fluorescence of the Cyanine Dyes Cy3, Cy5, DyLight DY547 and DyLight DY647 on Single-Stranded DNA. **PLOS One**. vol. 9 e85605, 2014.
- KUMBHAR, H. S.; GADILOHAR, B. L.; SHANKARLING, G. S. Synthesis and spectroscopic study of highly fluorescent β -enaminone based boron complexes. **Spectrochimica Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. vol. 146, p. 80-87, 2015.
- KUNTAM, S.; PUSKAS, L. G.; AYAYDIN, F. Characterization of a new class of blue-fluorescent lipid droplet markers for live-cell imaging in plants. **Plant Cell Reports**. v. 34, n. 4, p. 55-65, 2015.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3^a. ed.; Springer, 2006.
- LAURENT, A. D.; HOUARI, Y. ; CARVALHO, P. H. P. R.; NETO, B. A. D.; JACQUEMIN, D. **Royal Society of Chemistry Advances**, vol. 4, p. 14189–14192, 2014.
- LAVIS, L. D.; RAINES, R. T. Bright Building Blocks for Chemical Biology. **American Chemical Society Chemical Biology**. vol. 9, p. 855–866, 2014.
- LEMIEUX, G. A.; ASHRAFI, K. Insights and challenges in using *C. elegans* for investigation of fat metabolism. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. vol. 50, p. 69 - 84, 2014.
- LI X. Z, Zhang L, Poole K. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. vol. 46, p. 333-343, 2002.
- LI, Z.; DEEN, M. J.; KUMAR, S.; SELVAGANAPATHY, P. R. Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring – instrumentation and potential. **Sensors**. vol. 14, p. 17275-17303, 2014.
- LIAW L.; PRUDOVSKY I.; KOZA R. A.; ANUNCIADO-KOZA, R. V.; SIVISKI, M. E.; LINDNER, V.; FRIESEL R. E.; ROSEN C. J.; BAKER, P. R.; SIMONS, B.; VARY C. P. Lipid Profiling of In Vitro Cell Models of Adipogenic Differentiation: Relationships with Mouse Adipose Tissues. **J Cell Biochem**. 2016.
- LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J.-A. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**. vol. 2, p. 910-919, 2005.
- LIU, A-Y.; CHEN, W.; ZHENG, L-L.; SONG, LI-R. Identification of high-lipid producers for biodiesel production from forty-three green algal isolates in China. **Progress in Natural Science: Materials International**. v. 21, n. 4, p. 269-276, 2011.
- LU, C.; XU, Z.; CUI, J.; ZHANG R.; QJAN, X. J. Ratiometric and highly selective fluorescent sensor for cadmium under physiological pH range: a new strategy to discriminate cadmium from zinc. **Journal of Organic chemistry**. vol. 72, 3554-3557, 2004.
- LUZ, L. L.; SANTOS, S. L.; PARTATA, AK. Vitiligo e seu tratamento. **Revista Científica do ITPAC**. vol. 7, n.3, 2014.

- MARQUEZIN, C. A. Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo, **Tese de Doutorado** (doutorado em ciencias), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.
- MARX, V. Probes: paths to photostability. **Nature Methods**, vol. 12 n.3, 187-190, 2015.
- MARYAMABADI, A.; HASANINEJAD, A.; NOWROUZI, N.; MOHEBBI, G.; ASGHARI, B. Application of PEG-400 as a green biodegradable polymeric medium for the catalyst-free synthesis of spiro-dihydropyridines and their use as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorg Med Chem**, vol. 24, p. 1408-1417, 2016.
- MCKAY, R. M.; MCKAY, J. P.; AVERY, L.; GRAFF, J. M. C elegans: a model for exploring the genetics of fat storage. **Developmental Cell**. vol. 4, p. 131-142, 2003.
- McKEEVER, S. W. S.; CHEN, R. Luminescence models. **Radiation Measurements**. vol. 27, p. 625-661, 1997.
- McVEY, B. F. P.; TILLEY, R. D. Solution synthesis, optical properties and bioimaging applications of silicon nanocrystals. **Accounts of Chemical Research**. vol. 47, n.10, p. 3045-3051, 2014.
- MEHLEM, A.; HAGBER, C. E.; MUHL, L.; ERIKSSON, U.; FALKEVALL, A. Imaging of neurotral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature Protocols**. vol. 8, p. 1149-1154, 2013.
- MEHTA, M. P.; CHANG, S. M.; GUHA, A.; NEWTON, H. B.; VOGELBAUM, M. A. **Principles and Practice of Neuro-Oncology, A Multidisciplinary Approach**. United States: New York, 2011.
- MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid Bodies in Inflammatory Cells Structure, Function and Current Imaging Techniques, **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. vol. 59, p. 540-556, 2011.
- MÉRIAN, J.; GRAVIER, J.; NAVARRO, F.; TEXIER, I. Fluorescent nanoprobe dedicated to *in vivo* imaging: from preclinical validations to clinical translation. **Molecules**, vol. 17, p. 5564-5591, 2012.
- MERTZ, J. **Introduction to Optical Microscopy**. Ed. 1 W. H. Freeman, 432p. 2009.
- MILNE, C.-P.; MALINS, A. Academic-industry partnerships for biopharmaceutical research and development: advancing medical science in the U.S. **Tufts Center for the Study of Drug Development** – Boston. 26 p. 2012.
- MONTGOMERY, P. C.; HOI, A. L. Emerging optical nanoscopy techniques. **Nanotechnology Science and Applications**. vol. 8, p. 31-44, 2015
- MORTELLA, C.; GADELHA, C. A. G.; CONSIDERA, C. M. et al. **Saúde E Indústria Farmacêutica Em Debate**. Cubzac, São Paulo, 217 p. 2008.
- MOTA, A. R. A.; CARVALHO, P. H. P. R.; GUIDO, B. C.; OLIVEIRA, H. C. B.; SOARES, T. A.; CORRÊA, J. R.; NETO, B. A. D. Bioimaging, cellular uptake and dynamics in living cells

- of a lipophilic fluorescent benzothiadiazole at low temperatura. **Royal Society of Chemistry**. vol. 5, p.3995-4003, 2014.
- MOTA, A. A. R.; CORREA, J. R.; LOPES, R. O.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; NETO, B. A. D. Fotofísica Teórica (DFT) de sondas fluorescentes benzotiadiazólicas. **Revista Virtual de Química**. vol. 7, n. 1, p. 357-389, 2015.
- MULLANEY, B. C. ; ASHRAFI, K. C. *C. elegans* Fat Storage and Metabolic Regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**. vol. 1791, p. 474 - 478, 2009.
- MÜLLER, M. **Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy**. 2 ed. SPIE, Washington, 2006.
- MURPHY, D. B. **Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging**. Wiley-Blackwell: New Jersey, p. 357, 2013.
- MURPHY, M. C.; RASNIK, I.; CHENG, W.; LOHMAN, T. M.; HA, T. Probing single-stranded dna conformational flexibility using fluorescence spectroscopy. **Biophysical Journal**. 86, 2530-2537, 2004.
- MUTHUSAMY, B.-P.; RAYCHAUDHURI, S.; NATARAJAN, P.; ABE, F.; LIU, K.; PRINZ, W. A.; GRAHAM, T. R. Control of protein and sterol trafficking by antagonistic activities of a type IV P-type ATPase and oxysterol binding protein homologue. **Molecular Biology of the Cell**. vol. 20, p. 2920-2931, 2009.
- NAKANJAKO, D.; SSEWANYANA, I.; NABATANZI, R.; KIRAGGA, A.; KAMYA, M. R.; CAO, H.; MAYANJA-KIZZA, H. Impaired T-cell proliferation among HAART-treated adults with suboptimal CD4 recovery in an African cohort. **BMC Immunology**. vol. 14, p. 1471, 2013.
- NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M.; JÚNIOR, E. N. S.; DUPONT, J. 2,1,3-Benzothiadiazole and Derivatives: Synthesis, Properties, Reactions, and Applications in Light Technology of Small Molecules. **European Journal of Organic Chemistry**. vol. 2013, p. 228-255, 2013.
- NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M.; MANCILHA, F. S.; VASCONCELOS, I. B.; THUM, C.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DUPONT, J. New sensitive fluorophores for selective dna detection. **Organic Letters**. vol. 9 n.20, p. 4001-4004, 2007.
- NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M.; MANCILHA, F. S.; BATISTA, E. L.; NETZ, P. A.; ROMINGER, F.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DUPONT, J. On the selective detection of duplex deoxyribonucleic acids by 2,1,3-benzothiadiazole fluorophores. **Molecular BioSystems**. vol. 6, p. 967-975, 2010.
- NETO, B. A. D.; CORRÊA, J. R.; CARVALHO, P. H. P. R.; SANTOS, D. C.B. D.; GUIDO, B. C.; GATTO, C. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; FASCIOTTI, M.; EBERLIN, M. N.; DA SILVA JUNIOR, E. N. Selective and efficient mitochondrial staining with designed 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as live cell fluorescence imaging probe. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. vol. 23 n.4, p. 770-781, 2012.
- NETO, B. A. D.; CARVALHO, P. H. P. R.; SANTOS, D. C.B. D.; GATTO, C. C.; RAMOS, L. M.; VASCONCELOS, N. M.; CORRÊA, J. R.; COSTA, M. B.; OLIVEIRA, H. C. B.; SILVA, R. G. Synthesis, properties and highly selective mitochondria staining with novel, stable and

- superior benzothiadiazole fluorescent probes. **Royal Society of Chemistry Advances**. vol. 2 p. 1524-1532, 2012.
- NETO, B. A. D.; CARVALHO, P. H. P. R.; CORREA, J. R. Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. **Accounts of Chemical Research**. DOI: 10.1021/ar500468p, 2014.
- NIU, Q.; XU, Y; JIANG, J.; PENG, J.; CAO, Y. Efficient polymer white-light-emitting diodes with a single-emission layer of fluorescent polymer blend. **Journal of Luminescence**. vol. 126, n.2, p. 531-535, 2007.
- NUNES, S. F. Intensidades de sombreamento e cores de telas no desenvolvimento de espécies de Myrtaceae, **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia Ênfase Horticultura), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- OLIVEIRA, F. F. D.; LAPIS, A. A. M.; DA SILVA JUNIOR, E. N.; DUPONT, J. On the use of 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as selective live cel fluorescense imaging probes, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. vol, 20, p. 6001-6007, 2010.
- OKENGA, W. A brief history of light microscopy – from the medieval reading stone to super-resolution. Leica-Microsystems website. **Science Lab**. 2015. Disponível em <<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/history/a-brief-history-of-light-microscopy-from-the-medieval-reading-stone-to-super-resolution/>> Acessado em: Fev. 2016.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. **Introduction to Spectroscopy**. 5ª Ed. Editora Cengage Learning, Belmont, CA, 2010.
- PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**. vol. 2, n 2, p. 74-79, 2011.
- PARKER, C. Various roles of lipids and lipid metabolizing enzymes in inflammatory processes and their possible implications for therapy. **The American Review of Respiratory Disease**. vol. 135, p.22-25, 1987
- PAROLIN, M. B; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares, **Arquivo de Gastroenterologia**, vol. 38 no.2, 2001.
- PEREIRA, L. P. Beleza e envelhecimento: uma visão de um grupo de dermatologistas sobre seus pacientes e os produtos anti- idade. **Dissertação** (Mestrado em Administração), Instituto COPPEAD, Rio de Janeiro, 2011.
- POSSIK, P. A. Localização subcelular da DSCR2, uma proteína relacionada à síndrome de Down, **Dissertação** (mestrado em genética e evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- PRZYBYLO, M.; BOROWIK, T.; LANGNER, M. Fluorescence Techniques for Determination of the Membrane Potentials in High Throughput Screening, **J. Fluoresc.**Vol.20, p.1139–1157, 2010.
- PISCHON, T.; GIRMAN, C. J.; SACKS, F. M.; RIFAI, N.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E. B. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. **Circulation**. vol. 112, p. 3375-83, 2005.

- QUEHENBERGER, O.; ARMANDO, A. M.; BROWN, A. H.; MILNE, S. B.; MYERS, D. S.; MERRILL, A. H.; BANDYOPADHYAY, S.; JONES, K. N.; KELLY, S.; SHANER, R. L.; SULLARDS, C. M.; WANG, E.; MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; LEIKER, T. J.; RAETZ, C. R.; GUAN, Z.; LAIRD, G. M.; SIX, D. A.; RUSSELL, D.W.; MCDONALD, J. G.; SUBRAMANIAM, S.; FAHY, E.; DENNIS, E. A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. **Jornal of Lipid Research**. v. 51, n. 11, p. 299-305, 2010.
- QUEIROZ, J.R.C; MAROCHO, S.S; BENETTI, P; TANGO, R. N; JUNIOR, L. N. Métodos de caracterização de materiais para pesquisa em odontologia. **RFO**. vol. 17, n. 1, p. 106-112, jan./abr. 2012.
- RAOOF, M.; MACKEYEV, Y.; CHENEY, M. A.; WILSON, L. J.; CURLEY, S. A. Internalization of C60 fullerenes into cancer cells with accumulation in the nucleus via the nuclear pore complex. **Biomaterials**. vol. 33, n. 10, p. 2952-2960, 2012.
- RENISHAW APPLY INNOVATION, <<http://www.renishaw.com/en/renishaw-enhancing-efficiency-in-manufacturing-and-healthcare--1030>> Acessado em: Fev. 2016.
- RESCH-GENGER, U.; GRABOLLE, M.; CAVALIERE-JARICOT, S.; NITSCHKE, R.; NANN, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Nature Methods**. vol. 5, p. 763-775, 2008.
- ROLLS, G. **Process of fixation and the nature of fixatives**. Leica Biosystems. Disponível em: <<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>> Acessado em: Fev. 2016.
- ROSENFELD, H.; FORCELLINI, F. A.; AMARAL, D. C.; TOLEDO, J. C.; SILVA, S. L.; ALLIPRANDINI, D. H.; SCALICE, R. K. **Gestão de desenvolvimento de produtos: uma referência para a melhoria do processo**. São Paulo; Editora Saraiva, 2006.
- RUMIN, J.; BONNEFOND, H.; SAINT-JEAN, B.; ROUXEL, C.; SCIANDRA, A.; BERNARD, O.; CADORET, J-P.; BOUGARAN, G. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. **Biotechnology for biofuels**. v. 8, n. 42, 2015.
- SAUER, M.; HOFKENS, J. ENDERLEIN, J. **Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging**, WILEY-VCH, Weinhein, 2011.
- SAMJOO, I. A.; SAFDAR, HAMADEH, M. J.; MOCELLIN, N. J.; SANTANA, J.; LITTLE, J. P.; STEINBERG, G. R.; RAHA, S.; TARNOPOLSKY, M. A. Markers of Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Lipid Accumulation Are Moderately Associated with the Homeostasis Model Assessment Index of Insulin Resistance in Obese Men. **Plos One**. v. 8, n. 6, p. 1-13, 2013.
- SANKARANARAYANAN, S.; KELLNER-WEILBEL, G.; LLERA-MOYA, M.; PHILLIPS, M. C.; ASZTALOS, B. F.; BITTMAN, R.; ROTHBLAT, G. H. A sensitive assay for ABCA1-mediated cholesterol efflux using BODIPY-cholesterol, **The Journal of Lipid Research**. vol. 52, p. 2332 – 2340, 2011.
- SANTOS, C. R.; SCHULZE, A. Lipid metabolism in cancer, **The FEBS Journal**. vol. 279, p. 2610-2623, 2012.

- SCHOTT, S.; HAHN, J.; KURBACHER, C.; MOKA, D. P e H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of blood plasma in female patients with preeclampsia. **International Journal of Biomedical Science**. vol. 8, p. 258-263, 2012.
- SEZGIN, E.; SCHWILLE, P. Fluorescence Techniques to Study Lipid Dynamics. **Cold Spring Harbor Perspectives in biology**. v. 8, n. 3, p. 1-33, 2016.
- SHAN, L.; LIU, M.; WU, C.; ZHAO, L.; LI, S.; XU, L.; CAO, W.; GAO, G.; GU, Y. Multi-small molecule conjugations as new targeted delivery carriers for tumor therapy. **International Journal of Nanomedicine**. vol. 10, p. 5571-5591, 2015.
- SHANER, N.; STEINBACH, P. A.; TSIEN, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. **Nature Methods**. vol.2 , n. 12, p. 905-909, 2005.
- SHARRETT, A. R.; BALLANTYNE, C. M.; COADY, S. A.; HEISS, G.; SORLIE, P. D.; CATELLIER, D.; PATSCH, W.; ATHEROSCLEROSIS RISK IN COMMUNITIES STUDY GROUP. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Circulation**. vol. 104, p. 1108-13, 2001.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.
- SNIDERMAN, A. D.; WILLIAMS, K.; CONTOIS, J. H.; MONROE, H. M.; MCQUEEN, M. J.; JACQUELINE DE GRAAF, J.; CURT D. FURBERG, C. D. A Meta-Analysis of Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol, and Apolipoprotein B as Markers of Cardiovascular Risk. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**. Vol. 4, p. 337-345, 2011.
- SONG, H.O.; LEE, B.; BHUSAL, R. P.; PARK, B.; YU, K.; CHONG, C.-K.; et al. Development of a novel fluorophore for real-time biomonitoring system. **PLOS One**. vol. 7 n. 11, 2012.
- SONG, J. W.; MISGELD, T.; KANG, H.; KNECHT, S.; LU, J.; CAO, Y.; COTMAN, S. L.; BISHOP, D. L.; LICHTMAN, J. W. Lysosomal Activity Associated with Developmental Axon Pruning, **Neuroscience**. vol. 28, p. 8993-9001, 2008.
- SOUZA, P. J. Organismos geneticamente modificados: impacto ambiental, legislação e bioética, 2009.
- SPANDI, J.; WHITE, D. J.; PEYCHL, J.; THIELE, C. Live Cell Multicolor Imaging of Lipid Droplets with a New Dye, LD540. **Traffic**. v. 10, n. 11, p. 1579-1584, 2009.
- SPANGENBURG, E. E.; PRATT, S. J. P.; WOHLERS, L. M.; LOVERING, R. M. Use of BODIPY (493/503) To Visualize Intramuscular Lipid Droplets in Skeletal Muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. vol. 2011, p. 8, 2011.
- STURMEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; McEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 44, p. 50-58, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 819 p. 2009.

TAKANARA, M. Propriedades ópticas de absorção e emissão fluorescente do Ácido orto-Aminobenzóico e seus derivados em meio solvente, **Tese** (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

TEAM: FREIBURG CALCIUM IMAGING,
<http://2008.igem.org/File:CalciumImaging_teamfreiburg2008.jpg> Acessado em: Jan. 2016.

TSIEN, R. Y.; WAGGONER, A.; ERNST, L. et al. (Ed.). Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and photochemistry. In: PAWLEY, JAMES B. **Handbook of Biological Confocal Microscopy**. 3. ed. New York - USA: Springer Science, Cap. 16, p. 338-352, 2006.

ULRICH, G.; NASTASI, F.; RETAILLEAU, P.; PUNTORIERO, F.; ZIESSEL, R.; CAMPAGNA, S. *Chem.–Eur. J.* vol.14, p.4381–4392, , 2008.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.

VAN DER VELDE, J. H. M.; OELERICH, J.; HUANG, J.; SMIT, J.; JAZI, A. A.; et al. A simple and versatile design concept for fluorophore derivatives with intramolecular photoostabilization. **Nature Communications**. vol. 7 n. 10144, 2016.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 5^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.

VANMEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON G. W. Membrane lipids: where they ar and how they behave. **Nature Review of Molecular Cell Biology**. vol. 9, p. 112-124, 2008.

VÖLGYI, K.; HÁDEN, K.; KIS, V.; GULYÁSSY, P.; BADICS, K.; GYÖRFFY, B. A.; SIMOR, A.; SZABÓ, Z.; JANÁKY, T.; DRAHOS, L.; DOBOLYI, A.; PENKE, B.; JUHASZ, G.; KÉKESI, K. A. Mitochondrial proteome canges correlating with beta-amyloid accumulation. **Molecular Neurobiology**. vol. 53, p 1-19, 2016.

VAREJÃO-SILVA, M. A. Meteorologia e climatologia, ed. 2, Recife, 2006.

WAGNER, M. HORN, M. DAIMS, H. Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. **Current Opnion in Microbiology**. vol.6, p. 302-309, 2003.

WANG, Y.; HUANG, J.; ZHOU, H.; MA, G.; QIAN, S.; ZHU, X. Synthesis, optical properties and ultrafast dynamics of a 2,1,3-benzothiadiazole-based red emitter with intense fluorescence and large two-photon absorption cross-section. **Dyes and Pigments**. vol. 92, p. 573-579, 2012.

WANG, L.; XU, X. G. Scattering-type scanning near-field optical microscopy with reconstruction of vertical interaction. **Nature Communications**. vol. 6, p. 8973, 2015.

WANG Y.; LIU Y.; LUEHMANN H.; XIA, X.; WAN, D.; CUTLER, C.; XIA, Y. Radioluminescent gold nanocages with controlled radioactivity for real-time *in vivo* imaging. **Nano letters**. vol. 13, p. 581-585, 2013.

WATSON, A. D. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. **J. Lipid Res**, v. 47, n. 10, p. 1-11, 2006.

- WENK, M. R. The emerging field of lipidomics. **Nature Review of Drug Discovery**. v. 4, n. 7, p. 594-610, 2005
- WESSENDORF, M.W.; BRELJE, T. C. Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red and cyanine 3.18. **Histochemistry and Cell Biology**. vol. 98, p. 81-85, 1992.
- WILT, B. A.; BURNS, L. D.; HO, E. T. W. H.; GHOSH, K. K.; MUKAMEL, E. A.; SCHNITZER, M. J. Advances in light microscopy for neuroscience. **Annual Review of Neuroscience**. vol. 32, p. 435-506, 2010.
- WOLF N. S.; KONÉ A.; PRIETSLEY G.V.; BARTELMEZ S.H. In Vivo and In Vitro Characterization of Long-Term Repopulating Primitive Hematopoietic Cells Isolated by Sequential Hoechst 33342-Rhodamine 123 FACS Selection. **Experimental Hematology**. vol. 21, p. 614-622, 1993.
- WU, Z.; CUI, J.; QIAN, X.; Rational design of fluorescent viscosity sensors by the principle of photoinduced electron transfer. **Tetrahedron Letters**. vol. 54, p. 2575-2578, 2013.
- WU, C.; DILL, A. L.; EBERLIN, L. S.; COOKS, R. G.; IFA, D. R. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. **Mass Spectrometry Review**. vol. 32, p. 218-243, 2013.
- YOSHINA, S.; SAKAKI, K.; YONEZUMI-HAYASHI, A.; GENGYO-ANDO, K.; INOUE, H.; MITANI, S. Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi. **Molecular Biology of the Cell**. vol. 23, p. 1728-1741, 2012.
- ZHAI, X.; BOLDYREV, I. A.; MIZUNO, N. K.; MOMSEN, M. M.; MOLOTKOVSKY, J. G.; BROCKMAN, H. L.; BROWN, R. E. Nanoscale Packing Differences in Sphingomyelin and Phosphatidylcholine Revealed by BODIPY Fluorescence in Monolayers: Physiological Implications. **ACS Publications**. vol. 30, p. 3154-3164, 2014.
- ZHANG, S.; MA, C.; CHALFIE, M. Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent preteins. **Cell**. vol. 119, p. 137-144, 2004.
- ZHANG, S.; TRIMBLE, R.; GUO, F.; MAK, H. Y. Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*. **BMC Cell Biology**. doi: 10.1186/1471-2121-11-96, 2010.
- ZHAO, C.; DWYER, M.; YU, A.; WU, Y.; FANG, S.; MIDDELBERG, A.P. A simple and low-cost platform technology for producing pexiganan antimicrobial peptide in *E. coli*. **Biotechnology and Bioengineering**. vol. 112, p. 957-64, 2015.
- ZHU, Q.-Z.; LI, F.; GUO, X.-Q.; XU, J.-G.; LI, W.-Y. Application of a novel fluorescence probe in the determination of nucleic acids. **Analyst**. vol. 122, p. 937-940, 1997.
- ZONG, L.; ZHU, B.; LU, Z.; TAN, Y.; JIN, Y.; LIU, N.; HU, Y.; GU, S.; ZHU, J.; CUI, Y. Nanopurification of silicon from 84% to 99.999% purity with a simple and scalable process. **National Academy of Sciences U S A**. vol. 112, p. 13473-13477, 2015.