



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
E FARMACOLOGIA

VANESSA GOBBI AMORIM

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
SONDAS FLUORESCENTES DERIVADAS DE
BODIPY PARA APLICAÇÃO EM BIOCONJUGAÇÃO
COM PROTEÍNAS**

VITÓRIA, ES

2020

Vanessa Gobbi Amorim

Desenvolvimento e caracterização de sondas fluorescentes derivadas de BODIPY para aplicação em bioconjugação com proteínas

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador (a): Dr Lucas Cunha Dias de Rezende

Coorientador (a): Dr^a Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A524d Amorim, Vanessa Gobbi, 1989-
Desenvolvimento e caracterização de sondas fluorescentes derivadas de BODIPY para aplicação em bioconjugação com proteínas / Vanessa Gobbi Amorim. - 2020.
101 f. : il.

Orientador: Lucas Cunha Dias de Rezende.

Coorientadora: Juliana Barbosa Coitinho.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. BODIPY. 2. Fluoróforo. 3. Isotiocianato. 4. Tiouréia. 5. Proteína. I. Rezende, Lucas Cunha Dias de. II. Coitinho, Juliana Barbosa. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Vanessa Gobbi Amorim

“Desenvolvimento e caracterização de sondas fluorescentes derivadas de BODIPY para aplicação em bioconjugação com proteínas”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 9 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende – Orientador

Prof. Dr. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Coorientadora

Prof. Dr. André Romero da Silva – Examinador Interno

Prof. Dr. Bianca Prandi Campagner – Examinador Externo

Vitória/ES
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LUCAS CUNHA DIAS DE REZENDE - SIAPE 2424052
Departamento de Ciências Naturais - DCN/CEUNES
Em 11/12/2020 às 09:47

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/108649?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.209 de 30/08/2018, por
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 10/12/2020 às 12:04

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/107839?tipoArquivo=0>

Dedico à minha mãe e irmã, ao Maggus, familiares, a todos que me apoiaram e *in memoriam* pai e avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço a minha mãe, irmã e Maggus por me darem apoio em todos os momentos e escolhas de minha vida.

Aos Lucas e Juliana, pelas orientações e coorientações, aprendi muito com vocês! E a Rita por embarcar na ideia de testar meus compostos com as proteínas dela.

Aos meus amigos e familiares que me acompanharam e incentivaram no decurso dessa caminhada.

Aos Laboratório de Bioquímica e Biofísica Molecular de Proteínas, Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Laboratório de Neurobiologia Molecular, Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular e Laboratório de Sistema de Liberação Controlada, pela disponibilização do espaço, equipamento e materiais para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Aos técnicos Caroline Maia, Natércia Alves e Flávio Cunha pela ajuda nos momentos de experimentos.

Agradeço aos alunos e colegas, Renan, Paulo Arthur, Sarah, Barbara e tantos outros, que me ajudaram nos experimentos ou durante as aulas.

Agradeço aos professores que passaram por minha vida e deixaram um pouco do conhecimento deles.

Aos colaboradores de Ribeirão Preto, por terem sintetizado, em conjunto com meu orientador, os compostos que utilizei.

A UFES e ao IFES, por me possibilitarem o andamento do projeto, juntamente a CAPES e FAPES (projeto 038/2019) pelo apoio financeiro.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”.

Albert Einstein

RESUMO

A fluorescência faz parte de um fenômeno de emissão de luz por corpos frios, conhecido como luminescência, sendo muito utilizada na análise e detecção de substâncias, doenças e outros processos. A sua aplicação demanda a utilização de compostos capazes de absorver a luz e emití-la na forma de fluorescência em comprimentos de ondas diversos. No entanto, apenas poucos compostos possuem fluorescência natural sendo que em muitas análises por fluorescência se faz necessária a adição de sondas fluorescentes. Dependendo da aplicação específica da sonda fluorescente, grupos funcionais podem ser inseridos na sua estrutura. Neste trabalho, visando o desenvolvimento de sondas fluorescentes para bioconjugação com proteínas, foram utilizados dois compostos da classe dos borodipirrometenos (BODIPY), funcionalizados com o grupo isotiocianato. Para tanto, foram realizados experimentos de espectrofotometria e espectrofluorimetria para avaliar as propriedades fotofísicas das sondas fluorescentes desenvolvidas. A aplicabilidade das sondas fluorescentes em bioconjugação foi testada utilizando a albumina bovina sérica como proteínas modelo. Os produtos da bioconjugação foram caracterizados por espectrofotometria, espectrofluorimetria e SDS-PAGE. Além disso, foi realizado um teste preliminar para avaliar uma possível aplicação do fluoróforo com a conjugação em um anticorpo primário em um ensaio imunofluorescente por *Western Blotting*. Os resultados de bioconjugação se mostraram promissores, no qual verificou-se que os dois compostos usados no estudo possuem capacidade de se conjugar com a proteína e emitirem fluorescência. Além disso, foi verificada a interferência da ligação tiouréia formada após conjugação de cada composto com a albumina bovina sérica na intensidade de fluorescência, levando a redução da mesma. No ensaio *Western Blotting* foi observado que houve conjugação com o anticorpo e marcação da proteína escolhida, todavia se tratou de um teste inicial que deve ser padronizado. Os resultados do presente trabalho representam um avanço na aplicação funcional de BODIPY gerando perspectivas de novas prospecções quanto a sua utilização molecular.

Palavras chave: BODIPY, fluorimetria, isotiocianato, tiouréia, albumina.

ABSTRACT

Fluorescence is part of a phenomenon of light emission by cold bodies, known as luminescence. Fluorescence is widely used in the analyses and detection of substances, diseases and other processes. Its application requires the use of compounds capable of absorbing light and emitting it in the form of fluorescence at different wavelengths. However, only a few compounds have natural fluorescence and, in many fluorescence analyzes it is necessary to add fluorescent probes. Depending on the specific application of the fluorescent probe, functional groups can be inserted into its structure. In this work, aiming at the development of fluorescent probes for bioconjugation with proteins, two compounds of the borondipyrrometene class (BODIPY) were used, functionalized with the isothiocyanate group. These compounds were tested by spectrophotometry and spectrofluorimetric analyses to evaluate the photophysical properties of the developed fluorescent probes. The applicability of fluorescent probes in bioconjugation was tested using a serum bovine albumin as model protein. The bioconjugation product was characterized by spectrophotometry, spectrofluorimetric and SDS-PAGE. In addition, an initial test was performed to evaluate a possible fluorophore application with conjugation to a primary antibody in an immunofluorescent assay by Western Blotting. The results of bioconjugation are promising, where it was found that the two compounds used in the study showed the ability to conjugate with the protein and emit fluorescence. It was also verified the interference of the thiourea bond formed after conjugation of each compound with the serum bovine albumin in the fluorescence intensity, observing its reduction. In the Western Blotting assay, it was observed that there was conjugation with the primary antibody and recognition of the chosen protein. However new analyses need to be carried out to standardize their applicability. The results of the present study represent an advance in the functional applications of BODIPY, generating perspectives for new prospects regarding its molecular uses.

Keywords: BODIPY, fluorimetry, isothiocyanate, thiourea, albumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de Jablonski, no qual à esquerda está representado o processo de absorção e excitação aos níveis S1 (laranja) e S2 (azul) e à direita está representado sua consequente emissão fosforescente	25
Figura 2 – Diagrama de Jablonski, no qual à esquerda está representado o processo de absorção e excitação aos níveis S1 (laranja) e S2 (azul) e à direita está representado sua consequente emissão fluorescente	26
Figura 3 – Relação entre espectros de absorção, espectro de emissão e desvio de Stokes	29
Figura 4 – Estrutura de aminoácidos que apresentam fluorescência intrínseca. Os anéis aromáticos fenil e indol, responsáveis pela fluorescência dessas moléculas, estão indicados em vermelho.....	30
Figura 5 – Estrutura das coenzimas FAD e NAD que apresentam fluorescência intrínseca. Os anéis flavina e nicotinamida responsáveis pela fluorescência dessas moléculas estão indicados em vermelho.....	30
Figura 6 – Alguns grupos reativos possíveis de serem adicionados aos fluoróforos	32
Figura 7 - Estrutura química de alguns fluoróforos orgânicos	33
Figura 8 - Síntese proposta por Treibs e Kreuzer para acetilação do pirrol	34
Figura 9 - Diferenças estruturais entre o BODIPY e a dipirrinas	34
Figura 10 - Sondas derivadas de BODIPY comercialmente utilizadas e suas absorções e emissões	36
Figura 11 - Visão geral da síntese e da modificação química de BODIPYs.....	38
Figura 12 - A: Grupo amino reativo; B: Grupo tiol reativo.....	39
Figura 13 - Funções orgânicas tiol reativo	39
Figura 14 – Reação da maleimida com uma sulfidrilas	40

Figura 15 – Reação do iodoacetil com sulfidrina	41
Figura 16 – Reação do dissulfeto de piridila com sulfidrina.....	41
Figura 17 – Reação de um agente arilante com a sulfidrina	42
Figura 18 – Exemplos de fluoróforos tio reativos comerciais com os grupos reativos destacados em vermelho. Acima: exemplos de Alexa Fluor® maleimida, onde o da direita é usado para conjugações in vivo e a esquerda para imuno detecções. Abaixo: exemplos de BODIPYs funcionalizados com maleimida e iodoacetamida.....	43
Figura 19 – Exemplos de ligações formadas após reação com amina	44
Figura 20 – Tipos de grupos reativos a aminas.....	44
Figura 21 – Reação de formação do grupo amino reativo azida de acila.....	45
Figura 22 – A: Reação de aldeídos e cetonas com aminas parte 1; B: reação de formação de aminas secundárias.....	45
Figura 23 – A: Reação de formação de carbamato a partir de fosgênio; B: Reação com amina	46
Figura 24 – A: Reação de formação do intermediário o-acilisourea; B: Reação de carbodiimida com amina	46
Figura 25 – A: Reação de formação dos anidros ácidos; B: Reação com aminas	47
Figura 26 – Reação do cloreto de sulfonila com amina.....	48
Figura 27 – Derivados do grupo cloreto de sulfonila	48
Figura 28 – Reação dos ésteres fluorofenílicos com aminas	49
Figura 29 – Alexa fluor 488 TFP éster, um exemplo comercial	49
Figura 30 – A: Reação de formação do éster sulfo NHS; B: Reação de conjugação com amina.....	50
Figura 31 – Exemplos de BODIPYs com a função succinimidil éster.....	51

Figura 32 – Reação de halogenetos de arila com aminas	51
Figura 33 – Reação do grupo Imidoéster com aminas.....	52
Figura 34 – Reação entre epóxidos com amina, hidroxilas do ácido carboxílico e sulfidrilas	52
Figura 35 – Reação dos derivados de hidroximetil com amina	53
Figura 36 – Reação de formação de isoureia a partir do isocianato com amina.....	53
Figura 37 – Estrutura química do grupo isotiocianato	55
Figura 38 – Formação do grupo isotiocianato a partir da reação do glicosinolato com a enzima mirosinase	56
Figura 39 – Reação entre fluoróforo isotiocianato e amina na bioconjugação com proteínas	57
Figura 40 – A: Primeira parte da reação de degradação de Edman; B: Segunda parte da reação de degradação de Edman	58
Figura 41 – Exemplos de fluoróforos com isotiocianato disponíveis comercialmente	59
Figura 42 – Exemplos de BODIPYs isotiocianato funcionalizados.....	59
Figura 43 - Estrutura química dos compostos 1 e 2 utilizados neste trabalho, com a descrição do delineamento da estrutura.	62
Figura 44 - Visão geral da rota de modificação química utilizada para preparação dos compostos 1 e 2 . a) Arilação; b) redução; c) formação do isotiocianato	63
Figura 45 – A: Composto 1 espectros de absorção UV-Vis normalizados nos sete solventes orgânicos; B: Composto 1 espectros de fluorescência normalizados nos sete solventes orgânicos; C: Composto 2 espectros de absorção UV-Vis normalizados nos sete solventes orgânicos; D: Composto 2 espectros de fluorescência normalizados nos sete solventes orgânicos	72

Figura 46 - Reações de teste entre os compostos **1** e **2** com dietilamina para a formação de tiouréia BODIPYs **TU1** e **TU2**.....73

Figura 47- A: CCD do composto **1** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz branca; B: CCD composto **1** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz negra; C: CCD composto **2** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz branca; D: CCD composto **2** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz negra74

Figura 48 – A: Composto **1** livre sob luz branca; B: composto **1** após reação com amina orgânica (dietilamina), sob luz branca; C: Composto **1** livre sob luz negra; D: Composto **1** após reação com dietilamina, sob luz negra; E: Composto **2** livre, sob luz branca; F: Composto **2** após reação com dietilamina, sob luz branca; G: Composto **2** livre, sob luz negra; H: Composto **2** após reação com dietilamina, sob luz negra75

Figura 49 - Espectros de absorção e emissão dos BODIPYs contendo tiouréia, **TU1** e **TU2** em metanol. Linha preta completa: espectros de absorção de **TU1**. Linha cinza completa: espectros de absorção de **TU2**. Linha preta pontilhada: espectros de emissão de **TU1**. Linha cinza pontilhada: espectros de emissão de **TU2**76

Figura 50 – A: Tubos eppendorf mostrando as reações 1 a 4 (0,15 mM para reações 1 e 2, 0,375 Mm para reações 3 e 4) antes da purificação por diálise. B: Exemplo de diálise com água. Observar ausência de cor no dialisado77

Figura 51 – A: Dialisado com água do composto **1** a 10 eq; B: Dialisado com água do composto **1** a 25eq; C: Dialisado com água do composto **2** a 10 eq; D: Dialisado com água do composto **2** a 25 eq. Observar a formação de um agregado insolúvel77

Figura 52 - A e B: Composto **1** conjugado com BSA e purificado com 1 etapa de etanol 70%; A1: Composto **1** retido na membrana (analito); A2: Dialisado contendo etanol e solvente; B: Composto **1** conjugado para análise78

Figura 53 – A: Diálise da reação do composto **1** conjugado a 25 eq e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%. Observar presença de cor no dialisado; B: Diálise da reação do composto **2** conjugado a 25 eq e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%. Observar presença de cor no dialisado; C: Solução aquosa do produto conjugado obtido em uma reação com 25 eq do composto **1** e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%; D: Solução aquosa do produto conjugado obtido em uma reação com 25 eq do composto **2** e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%78

Figura 54 – Espectros com excitação em 530 nm. A: Espectros de absorção dos conjugados obtidos com o composto **1**; B: Espectros de emissão dos conjugados obtidos com o composto **1**; C: Espectros de absorção dos conjugados obtidos com o composto **2**; D: Espectros de emissão dos conjugados obtidos com o composto **2**. Linha preta cheia: Reação com 10 eq do fluoróforo seguida de dialise com água. Linha cinza cheia: Reação com 25 eq do fluoróforo seguida de dialise com água. Linha preta tracejada: Reação com 10 eq do fluoróforo seguida de dialise com etanol (1 ciclo). Linha preta pontilhada: Reação com 10 eq do fluoróforo seguida de dialise com etanol (3 ciclos). Linha cinza pontilhada: Reação com 25 eq do fluoróforo seguida de dialise com etanol (3 ciclos). Seta preta é referente ao pico do BSA em 280 nm e seta cinza, pico dos compostos.....80

Figura 55 - Gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições desnaturante 1. A: Composto **1** a 10 eq em H₂O; B: Composto **1** a 25 eq em H₂O; C: Composto **2** a 10 eq em H₂O; D: Composto **2** a 25eq em H₂O; E: BSA.....82

Figura 56 - Gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições desnaturante 2. A: Composto **1** a 10 eq etanol 1x; B: Composto **1** a 10 eq etanol 3x; C: Composto **2** a 10 eq etanol 1x; D: Composto **2** a 10 eq etanol 3x; E: BSA82

Figura 57 - Gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições desnaturante 3. A: Composto **1** a 25 eq etanol 3x; B: Composto **2** a 25 eq etanol 3x; C: BSA.....83

Figura 58 - Purificação do conjugado anti-canabinoide CB₁ com Composto **2** (BODIPY)83

Figura 59 - Membrana PVDF após incubação com antiCB1 conjugado com Composto **2**, sendo evidenciado o excesso de fluoróforo no quadro vermelho.....84

Figura 60 - Revelação da membrana usando filtro Alexa Fluor 488, quadro A bandas de 180KDa e quadro B, bandas de 75KDa85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das reações e suas concentrações.....	65
Tabela 2 - Caracterização dos compostos 1 e 2 em diferentes solventes.....	70
Tabela 3 - Aplicação dos compostos 1 e 2 na conjugação com BSA.....	81

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - A e B: Composto 1 livre de conjugação diluído em água e DMSO, onde pode ser visto particulado (demarcado em vermelho); C e D: Composto 2 livre de conjugação homogeneizado e diluído em água e DMSO, podendo ser visualizada a formação de particulado ao fundo (demarcado em vermelho)	100
Anexo 2 - Alguns dos equipamentos utilizados; A: Centrifuga Hitachi Rx series refrigerada; B: Espectro fotômetro Varian Cary 50 (Agilent)	100
Anexo 3 - A e B: Compostos livres de albumina utilizados como estoque para conjugações com BSA; A: Composto 1 ; B: Composto 2	100
Anexo 4 - Membrana de dialise (Sartorius) utilizada para purificações.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

BODIPY: Borodipirrometeno

Ep: Éter de petróleo

DCM: Diclorometano

CCD: Cromatografia de coluna delgada

TU1: Tiouréia 1

TU2: Tiouréia 2

Eq: Equivalência/equivalente

BSA: Albumina serica bovina

H₂O: Agua

NHS: N-hidroxisuccinimida

DMSO: Dimetil sulfóxido

NADH: Nicotinamida

FAD: Flavina

GFP: Proteína verde fluorescente

TRITC: Isotiocianato da rodamina

FITC: Isotiocianato da fluoresceína

S₀, S₁ e S₂: Níveis energéticos fundamental, primeiro e segundo

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	18
LISTA DE ANEXOS	19
LISTA DE ABREVIATURAS	20
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 FLUORESCÊNCIA E SUAS APLICAÇÕES.....	23
1.2 FLUORÓFOROS ORGÂNICOS.....	29
1.3 BODIPYs.....	33
1.4 BIOCONJUGAÇÃO E GRUPOS REATIVOS.....	38
1.4.1 Grupos reativos a sulfidrina e suas bioconjugações.....	39
1.4.2 Grupos amino reativos e bioconjugações.....	43
1.4.3 Procedimento de bioconjugação.....	54
1.5 O ISOTIOCIANATO E BIOCONJUGAÇÃO.....	55
2 OBJETIVOS	61
2.1 OBJETIVO.....	61
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
3 MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1 DESENHO E CARACTERIZAÇÃO DE BODIPYS PARA BIOCONJUGAÇÃO.....	62
3.2 REAÇÃO DOS BODIPYS COM DIETILAMINA.....	64
3.3 BIOCONJUGAÇÃO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA).....	64
3.3.1 Diálise em água destilada.....	65
3.3.2 Diálise com etanol 70%.....	66
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO.....	67
3.5 ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	68
3.6 APLICAÇÃO DO BODIPY EM WESTERN BLOTTING.....	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUORÓFOROS.....	70
4.2 REAÇÃO COM DIETILAMINA.....	73
4.3 REAÇÕES DE BIOCONJUGAÇÃO.....	76
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONJUGADOS.....	79
4.5 WESTERN BLOTTING.....	83
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86

BIBLIOGRAFIA	87
APÊNDICES	98
APÊNDICE A - 1. RESUMO APRESENTADO NO ENCAQUI DE 2019	98
APÊNDICE A - 2. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA DYES AND PIGMENTS	99
ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 FLUORESCÊNCIA E SUAS APLICAÇÕES

A luminescência, um fenômeno físico caracterizado pela emissão luminosa por corpos frios, ocorre após excitação eletrônica (LAKOWICZ, 2006; REZENDE, 2016) e classifica-se de acordo com os estímulos que causam a excitação eletrônica. Na quimioluminescência, a excitação ocorre devido a reações químicas; na eletroluminescência, a excitação decorre de correntes elétricas; na triboluminescência, ocorre um processo mecânico de atrito entre superfícies; na termoluminescência, a excitação eletrônica ocorre após aquecimento; já a radioluminescência é causada por radiação ionizante (VALEUR, 2001; ACUÑA *et al.*, 2008).

Por fim, temos o fenômeno da fotoluminescência, que se trata da emissão de fótons após excitação luminosa (VALEUR, 2001; ACUÑA *et al.*, 2008). A rocha fluorita serve de exemplo para este último fenômeno. A fotoluminescência pode ser dividida em fosforescência e fluorescência, os quais se diferem no tipo de estado excitado, a partir do qual ocorre a emissão (JABLONSKI, 1931; JABLONSKI, 1933; REZENDE *et al.*, 2013). O estado singlete é relacionado à fluorescência, o triplete, à fosforescência e seus respectivos tempos de vida (média de tempo que ele passa no seu estado excitado, antes de retornar ao estado fundamental) ocorrem na faixa de nanossegundos e milissegundos (JABLONSKI, 1931; JABLONSKI, 1933; REZENDE *et al.*, 2013; LAKOWICZ, 2013).

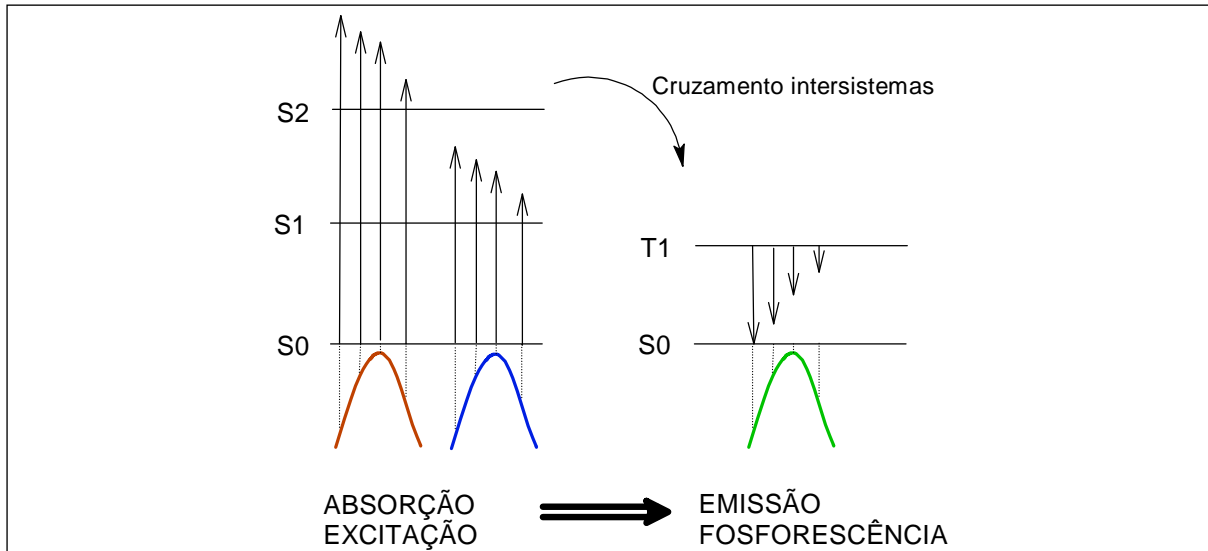
A fluorescência foi descrita, pela primeira vez, em 1565 por Nicolas Monardes, ao observar que um extrato vegetal, conhecido como *Lignum Nephriticus*, emitia uma luz de cor azulada. Nos séculos seguintes, outros relatos de fenômenos semelhantes foram registrados tanto em soluções quanto em minerais e deram suporte ao estudo desse fenômeno, principalmente a partir do século XIX (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2006; ACUÑA *et al.*, 2008). O estudo por Brewster, em 1833, da fluorita, um mineral de fluoreto de cálcio também conhecido como *fluorspar*, é um bom exemplo. Ao usar lentes para condensar a luz solar e incidir-la sobre a rocha, o cientista verificou a emissão de um brilho azulado (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2006; ACUÑA *et al.*,

2008; REZENDE, 2016). Pouco depois, em 1845, John Herschel relatou que, ao visualizar uma solução transparente de sulfato de quinino, era possível identificar uma luz superficial de cor azul celeste (HERSCHEL, 1845; VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2006; ACUÑA *et al.*, 2008; REZENDE, 2016;). O fenômeno subjacente a essas observações foi comumente descrito como “dispersão interna” da luz, que seria um caso peculiar de fenômenos de reflexão e dispersão luminosa (HERSCHEL, 1845; ACUÑA *et al.*, 2008).

No entanto, apenas em 1852, Sir George Gabriel Stokes, ao analisar as observações de Herschel e Brewster e fazer mais experimentos com soluções de quinino, sugeriu uma explicação para o que John Herschel havia visto. Este fenômeno seria a emissão após estímulo luminoso de solução de quinino, mediante refrangibilidade da luz, em diferentes processos (STOKES, 1852; ACUÑA *et al.*, 2008). Nos seus experimentos, ele trocou o líquido e o frasco estudado, e chamou de epipólicos os processos de difração luminosa, além de sugerir que raios invisíveis ao olho humano atuam aumentando a dispersão interna. Ao notar as peculiaridades do fenômeno em questão, Stokes propõe o termo “fluorescência” para descrevê-lo (STOKES, 1852; ACUÑA *et al.*, 2008). Esse termo deriva do mineral *fluorspar*, da mesma forma que o termo “opalescência” deriva do mineral “opala”, e passou a ser globalmente aceito (STOKES, 1852; LAKOWICZ, 2006; REZENDE, 2016; ACUÑA *et al.*, 2008).

Em um artigo publicado em 1933, Alexander Jablonski, ao estudar a fotoluminescência, propõe um diagrama que explica as transições eletrônicas que ocorrem nos fenômenos de fotoluminescência. Até hoje, o diagrama de Jablonski é a ferramenta utilizada na representação das transições eletrônicas em processos fotofísicos e fotoquímicos (JABLONSKI, 1933). Na fosforescência, a emissão da luz ocorre a partir do estado excitado tripleto, havendo mudança de orientação do *spin* e emparelhamento do elétron, antes do retorno ao estado fundamental (JABLONSKI, 1933; LAKOWICZ, 2006; REZENDE, 2016). Em outras palavras, o elétron, uma vez excitado, ascende às camadas superiores de energia e seu retorno ao estado fundamental (camada de menor energia) só ocorre após o processo de cruzamento intersistemas (Figura 1) (JABLONSKI, 1933; LUIZ, 2009).

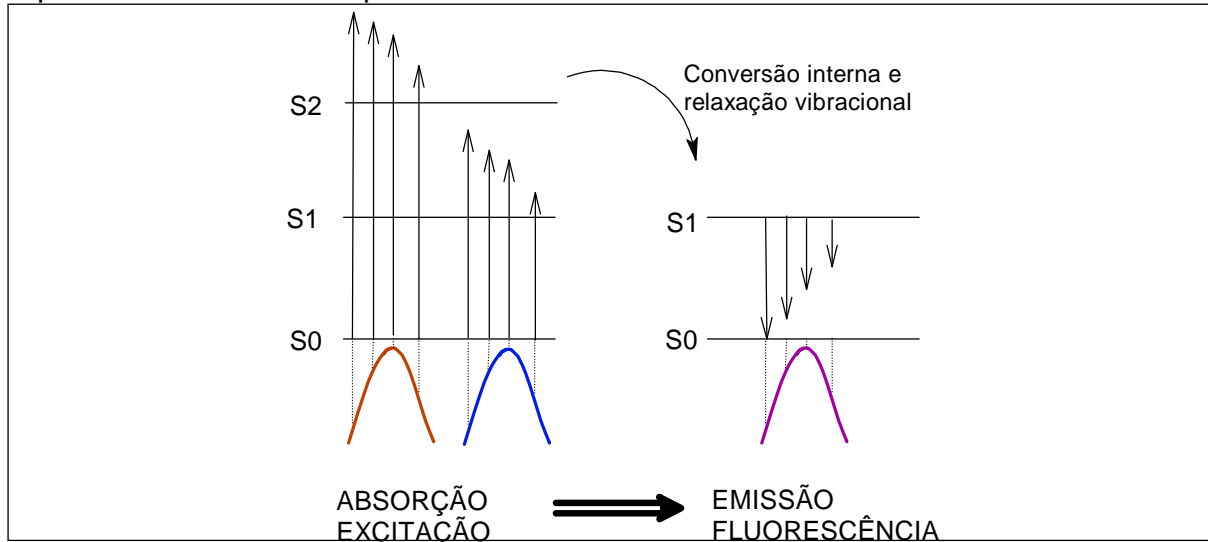
Figura 1 – Diagrama de Jablonski, no qual à esquerda está representado o processo de absorção e excitação aos níveis S1 (laranja) e S2 (azul) e à direita está representado sua consequente emissão fosforescente



Fonte: JABLONSKI (1933), adaptado pela autora.

O fenômeno de fluorescência ocorre de maneira diferente. Após o estímulo luminoso, a molécula absorve a energia, excitando seus elétrons, que irão sair do estado de menor energia, conhecido de estado fundamental (S0), passando para níveis energéticos maiores (S1 ou S2) (JABLONSKI, 1933; REZENDE, 2016). O retorno ao estado fundamental (S0) ocorre devido à conversão interna (processo que envolve estados eletrônicos diferentes e de mesma multiplicidade de *spin*, ou seja, sem mudança de orientação do *spin*) e relaxação vibracional (ocorre a partir de um nível vibracional de maior energia, S2 ou S1, para outro de menor energia (S0), em um mesmo estado eletrônico emitem fluorescência) (Figura 2) (JABLONSKI, 1933; JABLONSKI, 2006; DIAS, 2014; REZENDE, 2016).

Figura 2 – Diagrama de Jablonski, no qual à esquerda está representado o processo de absorção e excitação aos níveis S1 (laranja) e S2 (azul) e à direita está representado sua consequente emissão fluorescente



Fonte: JABLONSKI (1933), adaptado pela autora.

Após o estabelecimento das bases teóricas do fenômeno da fluorescência a sua utilização teve uma relevância crescente durante o século XX, em diversas áreas do conhecimento, inclusive na bioquímica e na biologia molecular. Na área de bioquímica e imunologia, ensaios imunofluorimétricos, nos quais anticorpos são ligados a fluoróforos, têm sido usados para detecção ou visualização de antígenos específicos, e exemplificam a utilização bem estabelecida de técnicas laboratoriais baseadas em fluorescência (COONS *et al.*, 1950). Outro exemplo pertinente da utilização de fluorescência é a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, no qual a amplificação do ácido nucleico é monitorada a partir da emissão de uma substância fluorescente (HEID *et al.*, 1996).

A medição do fenômeno de fluorescência pode ser realizada de forma estacionária ou resolvida no tempo e ambas são importantes na aplicação laboratorial da fluorescência (LUIZ, 2009). A medida da fluorescência estacionária é mais comum e é realizada utilizando-se o processo de excitação luminosa, seguido de observação, sob condições constantes (LUIZ, 2009). Na fluorescência estacionária, a amostra é iluminada com um feixe contínuo de luz e o espectro de intensidade da emissão, em diferentes comprimentos de onda, é registrado (LUIZ, 2009).

A eficiência de emissão de fluorescência por uma substância ou material é definida pelo seu rendimento quântico de fluorescência. Essa propriedade se trata de uma estimativa da proporção de fótons absorvidos que resultam na emissão de fluorescência e é amplamente estudada para diferentes materiais. Para a aplicação de materiais e substâncias fluorescentes, é importante que eles possuam alta eficiência, medida que traduz exatamente a eficiência de uma substância em emitir fluorescência (VALEUR,2001; BOENS *et al.*, 2012). O rendimento quântico é relatado na forma de valores entre 0 e 1, sendo que um rendimento quântico de fluorescência de 1 indica que 100% dos fótons absorvidos levam à formação de estados excitados, cujo retorno ao estado fundamental ocorre através da emissão de fluorescência (VALEUR,2001; JOHNSON, 2010; BOENS *et al.*, 2012). Logo, quanto mais próximo de 1 está o rendimento quântico de fluorescência de um material, mais eficientemente ele emite fluorescência (VALEUR,2001; JOHNSON, 2010; BOENS *et al.*, 2012).

Por outro lado, a medida da fluorescência resolvida no tempo se trata da avaliação temporal do decaimento do estado excitado, com emissão de fluorescência. Para esse tipo de análise, a amostra recebe um pulso luminoso muito curto e o intervalo de tempo até emissão da fluorescência é avaliado (LAKOWICZ, 2009). Pelo fato de o decaimento de fluorescência ocorrer na ordem de nanossegundos (ns), o aparato necessário para análises resolvidas no tempo é mais custoso, conseqüentemente, o estudo da fluorescência estacionária é mais acessível e comumente utilizado. Cabe salientar, todavia, que a fluorescência resolvida no tempo também tem suas aplicações em bioquímica e biologia celular (LAKOWICZ, 2009; REZENDE, 2016).

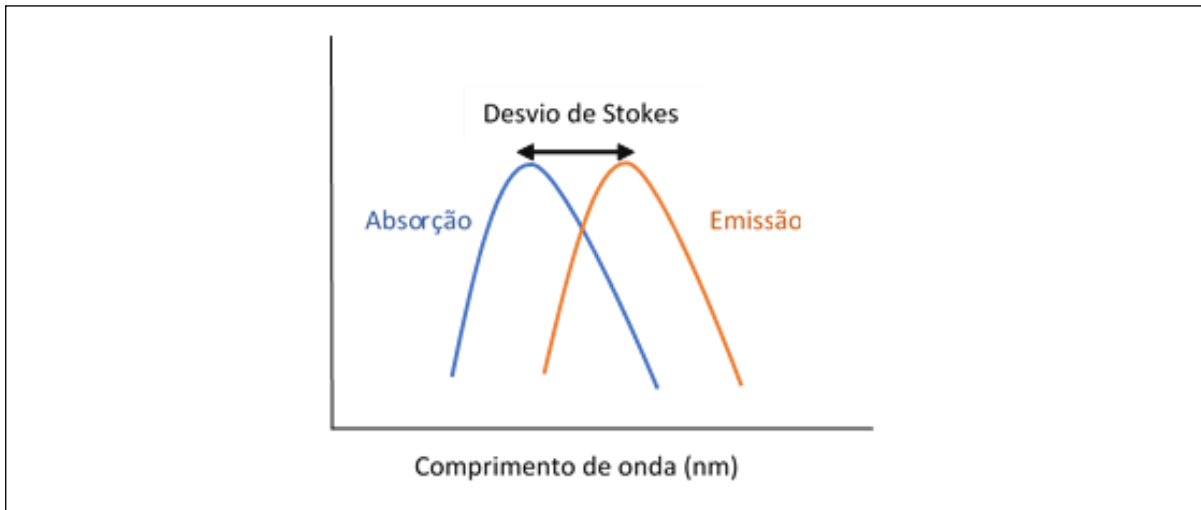
Nesse contexto, a medida do tempo de vida de fluorescência determina o tempo médio que um material fluorescente permanece no estado excitado antes de emitir fluorescência (LUIZ, 2009). O tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico de fluorescência estão intimamente relacionados e podem ser modificados por fatores que afetam a emissão do fluoróforo ou decaimento não radiativo para estado fundamental (LUIZ, 2009). Por exemplo, a molécula pode ser não fluorescente como resultado de uma grande taxa de conversão interna ou baixa taxa de emissão (LAKOWICZ, 2009; LUIZ, 2009; REZENDE, 2016).

Muitas aplicações laboratoriais da fluorescência estão relacionadas com a interação entre o material fluorescente e o meio. Nesse contexto, destaca-se o fenômeno de supressão de fluorescência (também conhecido como *quenching*), no qual a fluorescência de um material é suprimida por uma substância supressora (também conhecida como “*quencher*”), que pode acontecer em diferentes condições e situações (LUIZ, 2009). Esse fenômeno pode ocorrer por meio de três processos distintos: o *quenching* colisional, que acontece quando o fluoróforo no estado excitado é desativado, após contato (colisão) com alguma molécula *quencher* em solução; o *quenching* por formação de complexos não fluorescentes entre fluoróforo e *quencher* que vai ocorrer no estado fundamental e não depende de difusão ou colisões moleculares (LUIZ, 2009; LAKOWICZ, 2009; JOHNSON, 2010); o terceiro tipo de *quenching* é o que ocorre por mecanismos triviais não moleculares, ou seja, por atenuação da luz incidente pelo próprio fluoróforo ou por outras espécies que agem absorvendo a luz (LAKOWICZ, 2009; LUIZ, 2009).

No processo de emissão de fluorescência, parte da energia absorvida é perdida por processos de conversão interna e relaxação vibracional. Por esse motivo, a energia do fóton absorvido é sempre superior à energia do fóton emitido, ou seja, o comprimento de onda de absorção é inferior ao comprimento de onda de emissão (MALATESTI *et al.*, 2006; REZENDE, 2016). Por isso é comum que o espectro de emissão de uma substância fluorescente se assemelhe a uma imagem especular do espectro de absorção (Figura 3).

Nesse contexto, é importante citar o desvio de Stokes, uma propriedade fotofísica dada pela diferença entre o comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) e o de máxima emissão (λ_{max}). O desvio de Stokes está relacionado à sobreposição dos espectros de absorção e emissão, sendo que um desvio de Stokes curto pode aumentar a chance do fluoróforo sofrer auto supressão (MALATESTI *et al.*, 2006; REZENDE, 2016).

Figura 3 – Relação entre espectros de absorção, espectro de emissão e desvio de Stokes



Fonte: LAKOWICZ (2006), adaptado pela autora.

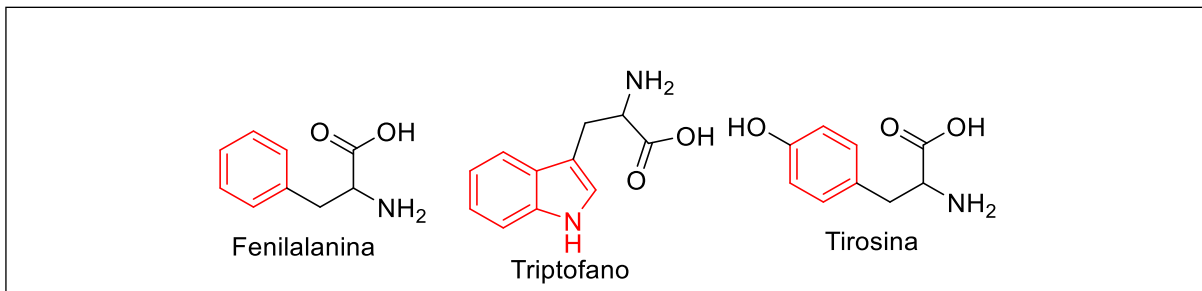
A fluorescência não é um fenômeno corriqueiro, por isso, a aplicação de técnicas laboratoriais baseadas em fluorescência, em geral, demanda a utilização de substâncias fluorescentes exógenas. Essas substâncias fluorescentes, também conhecidas como fluoróforos ou fluorocromos, são desenvolvidas para aplicações específicas, de acordo com suas propriedades físico-químicas e fotofísicas (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; REZENDE, 2016). Dessa maneira, fica clara a relevância das substâncias fluorescentes na área de bioquímica, tema abordado no próximo tópico desta introdução.

1.2 FLUORÓFOROS ORGÂNICOS

Diversos materiais e substâncias têm a capacidade de emitir fluorescência, inclusive algumas biomoléculas que apresentam a capacidade de emitirem fluorescência naturalmente (REZENDE, 2016). Alguns aminoácidos aromáticos são exemplos de biomoléculas com capacidade intrínseca de emitir fluorescência (REZENDE, 2016). O triptofano absorve luz com pico em 295 nm e emite fluorescência com pico em 353 nm, devido à presença de um anel indol (LUIZ, 2009; REZENDE, 2016). A fenilalanina absorve com pico em 260 nm, emite fluorescência com pico em 282 nm, enquanto a tirosina, com pico em 275 nm, emite, com pico em 304 nm, sendo que ambos possuem um fenil (Figura 4) (LUIZ, 2009; REZENDE, 2016). Cabe citar, todavia, que a utilização da fluorescência dos aminoácidos em ensaios biológicos é atrapalhada pelas suas

propriedades fotofísicas desfavoráveis, como baixo absorptividade molar e rendimento quântico de fluorescência (CHENG *et al.*, 2020).

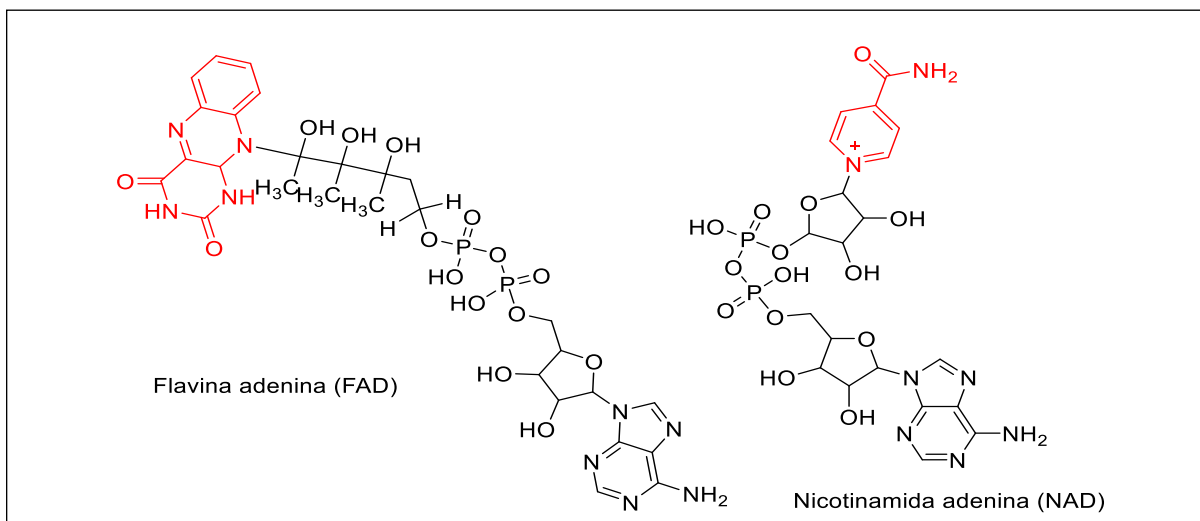
Figura 4 – Estrutura de aminoácidos que apresentam fluorescência intrínseca. Os anéis aromáticos fenil e indol, responsáveis pela fluorescência dessas moléculas, estão indicados em vermelho



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Outras biomoléculas fluorescentes que merecem ser citadas são as coenzimas flavina adenina (FAD) e nicotinamida adenina (NADH) (Figura 5). O grupo flavina permite que o FAD absorva luz em 450 nm, com emissão de fluorescência próximo a 525 nm. No caso do NADH, a presença da nicotinamida está relacionada com a sua absorção em 340 nm e emissão em 460 nm. A fluorescência intrínseca dessas coenzimas pode ser explorada em ensaios fluorimétricos, por exemplo, como biomarcadores de atividade mitocondrial (HEIKAL, 2010).

Figura 5 – Estrutura das coenzimas FAD e NAD que apresentam fluorescência intrínseca. Os anéis flavina e nicotinamida responsáveis pela fluorescência dessas moléculas estão indicados em vermelho



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

A fluorescência intrínseca do triptofano pode ser explorada em alguns ensaios analíticos com proteínas, apesar de as suas propriedades fotofísicas não serem muito atraentes (LUIZ, 2009; REZENDE, 2016). Existem proteínas específicas que são fluorescentes devido a modificações na sua estrutura química, como a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein – GFP*). Essa proteína foi inicialmente isolada de algumas espécies marinhas, como *Aequorea victoria* e, posteriormente, foi descoberta na *Anemonia sulcata* (SHIMOMURA *et al.*, 1962; PATTERSON *et al.*, 2004; SHIMOMURA, 2005; OLSSON *et al.*, 2011).

As GFP são proteínas compactas compostas por barris β com modificações químicas em resíduos de aminoácidos consecutivos (PATTERSON *et al.*, 2004; OLSSON *et al.*, 2011). Essas proteínas absorvem e emitem luz na faixa do visível, possuem boa fotoestabilidade e exibem altos rendimentos quânticos de fluorescência (HARTING *et al.*, 2009). São utilizadas na bioquímica, biologia molecular e para diagnóstico de várias doenças, além de atuarem como sonda fluorescente não invasiva, em conjunto com a técnica de iluminação de proteínas, permitindo observar em um espaço de tempo, o deslocamento do sinalizador dentro da célula (PATTERSON *et al.*, 2004; ACUÑA *et al.*, 2008; HARTING *et al.*, 2009; OLSSON *et al.*, 2011).

As biomoléculas citadas anteriormente são exceções, uma vez que em sua maioria elas não possuem fluorescência intrínseca (LUIZ, 2009; REZENDE, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). A clorofila, ou pigmento fotossintetizante, é um outro tipo de corante que apresenta fluorescência intrínseca presente nas plantas, com capacidade de absorver a luz e emitir fluorescência (STREIT, *et al.* 2005). Nesse contexto, materiais fluorescentes extrínsecos são comumente aplicados em técnicas fluorimétricas em bioquímica. Tais materiais são substâncias que, adicionados ao meio, irão atuar como sondas fluorescentes. A seguir serão tratados alguns desses materiais.

Iniciando, existem os íons lantanídeos, ou terras raras, que são compostos metálicos e exemplificam a classe de materiais que emitem fluorescência (REZENDE, 2016). Sua utilização é vasta, desde traçar o percurso de medicamentos, processos bioquímicos biomoleculares, e usos como sondas espectroscópicas no estudo de biomoléculas, onde o lantanídeo pode se ligar substituindo o cálcio no sistema biológico (MARTINS *et al.*, 2005). No entanto, não apresentam absorptividades

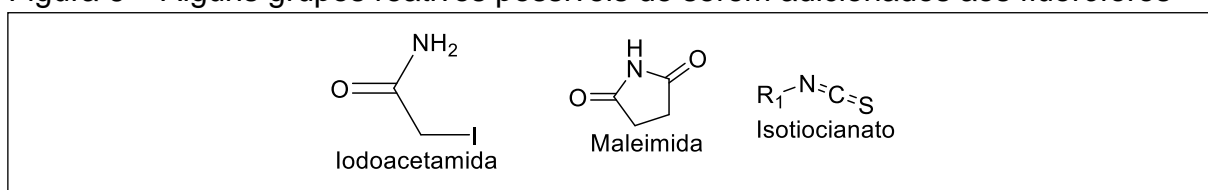
molares altas, razão pela qual não são usados diretamente, necessitando de um ligante que absorva luz e transfira energia para o íon lantanídeo (MARTINS *et al.*, 2005; REZENDE, 2016).

Outra classe de material fluorescente interessante são os *quantum dots*, nanocristais semicondutores, capazes de emitir fluorescência, muito utilizados na nanotecnologia como marcadores biológicos para detecção de tumores, atuando como biossensores (AZZAZY *et al.*, 2006). Outra aplicação é como aceptores em sistemas de transferência de energia (MEDINTZ *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006). Eles apresentam banda de emissão estreita e são manipuláveis, sendo possível adicionar características de emissão desejadas com modificações pontuais durante a síntese (MEDINTZ *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006; REZENDE, 2016).

Apesar da importância de lantanídeos, *quantum dots* e proteínas fluorescentes, grande parte dos materiais fluorescentes utilizados em técnicas laboratoriais são pequenas moléculas orgânicas. As pequenas moléculas fluorescentes, em geral, são substâncias com insaturações conjugadas, em um sistema planar, comumente cíclico, e podem ser classificadas de acordo com os seus padrões estruturais (FU *et al.*, 2008; HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; REZENDE 2013; REZENDE, 2016).

Por exemplo, a rodamina e a fluoresceína possuem um anel xanteno e se diferenciam estruturalmente pela presença de nitrogênio ou oxigênio ligados ao anel, respectivamente (REZENDE, 2016). Além de não possuírem sensibilidade à polaridade do solvente, apresentam altos rendimentos quânticos de fluorescência e podem ter adição de uma variedade de grupos reativos, como iodoacetamida ou maleimida, que marcam o grupo sulfidril ou isotiocianato, marcando aminas (Figura 6) (SMYTHE, 1936; HERMANSON, 2008; LAKOWICZ, 2009; JOHNSON, 2010; REZENDE, 2016).

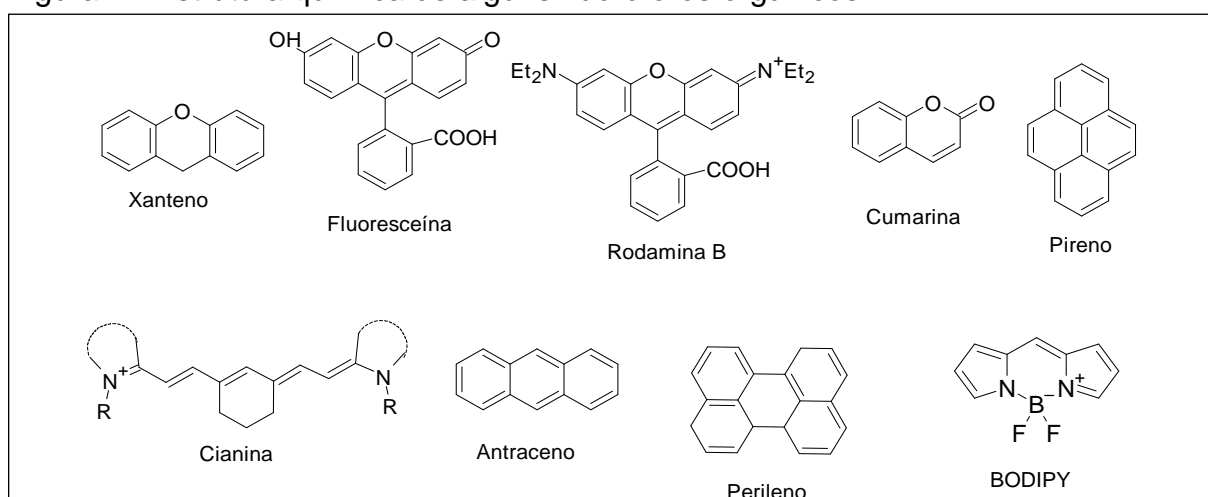
Figura 6 – Alguns grupos reativos possíveis de serem adicionados aos fluoróforos



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Outro exemplo são os derivados da cumarina, caracterizados por um anel α -benzopirona, os quais possuem longos comprimentos de onda, pequeno desvio de Stokes e são amplamente utilizados para coloração de células e ensaios biológicos (SETHNA *et al.*, 1945; REZENDE 2016). Outras pequenas moléculas orgânicas fluorescentes notáveis são as cianinas, que apesar de não possuírem estrutura cíclica, são capazes de emitir fluorescência, os hidrocarbonetos aromáticos (antraceno e perileno) (LUIZ, 2009), os compostos derivados indólicos e os borodipirrimetenos (BODIPYs), sendo este o foco deste trabalho (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura química de alguns fluoróforos orgânicos

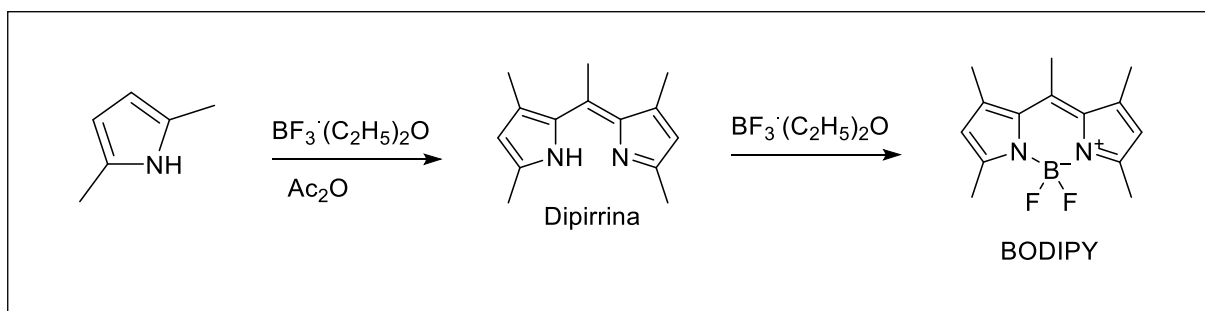


Fonte: REZENDE (2016), adaptado pela autora.

1.3 BODIPYs

Os BODIPYs possuem um anel borodipirrometeno (formalmente, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno), descoberto, ao acaso, em 1968 por Treibs e Kreuzer, que, ao reagirem 2,4-dimetil pirrol com anidrido acético e trifluoroboril eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), na tentativa de realizar acetilação do composto, obtiveram um produto fluorescente (Figura 8). Inicialmente, esse composto (BODIPY) foi desenvolvido como alternativo à fluoresceína e a rodamina e, dependendo da estrutura, o seu comprimento de onda de emissão varia entre 510 e 675 nm (TREIBS *et al.*, 1968; JOHNSON, 2010; ER, 2013; REZENDE *et al.*, 2013; VERBELEN *et al.*, 2015; REZENDE, 2016).

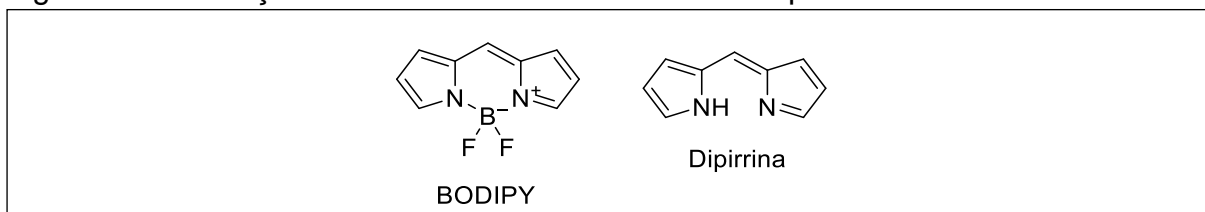
Figura 8 - Síntese proposta por Treibs e Kreuzer para acetilação do pirrol



Fonte: TREIBS e KREUZER (1968), adaptado pela autora.

O núcleo BODIPY é formado por duas unidades pirrólicas, ligadas por uma ponte metino complexada com um átomo de boro de um grupo difluoroboril (BF_2). Estruturalmente, os BODIPYs são semelhantes a dipirinas (Figura 9), entretanto as dipirinas não emitem fluorescência naturalmente, pois sua molécula possui a capacidade de se mover em seus eixos de ligação, fazendo com que a molécula perca energia de forma não radiativa (TREIBS *et al.*, 1968; JOHNSON, 2010; REZENDE, 2016).

Figura 9 - Diferenças estruturais entre o BODIPY e a dipirinas



Fonte: REZENDE (2016), adaptado pela autora

Nos BODIPYs, o átomo de boro atua de maneira semelhante aos íons metálicos, formando um complexo que torna a molécula rígida, proporcionando a perda de energia de forma luminosa, o que resulta nos altos rendimentos quânticos descritos na literatura (ULRICH *et al.*, 2008; HOOGENDOORN *et al.*, 2011; ULRICH *et al.*, 2012; REZENDE, 2016). A utilização dos BODIPYs como sensores fluorescentes cresceu vertiginosamente a partir do final da década de 1980, quando a Molecular Probes® (atualmente uma subsidiária da Thermo Fisher Scientific®), patenteou a aplicação das diferentes substâncias fluorescentes dessa classe (HAUGLAND *et al.*, 1988).

Essa classe de fluoróforos (BODIPY) apresenta o núcleo com alta versatilidade química, permitindo a diversificação fotofísica a partir de modificações químicas

pontuais, gerando especificidade (REZENDE, 2016). No entanto, sua desvantagem é o desvio de Stokes ser pequeno, o que pode favorecer a auto supressão (MALATESTI, 2006; REZENDE, 2016). Apresentam alto rendimento quântico de fluorescência, próximo à unidade, alto coeficiente de absorptividade molar e de rendimento quântico de fluorescência. As bandas são finas, no espectro de fluorescência (baixa chance de sobreposição de espectros), o coeficiente de extinção molar próximo de $80.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pouca sensibilidade à polaridade e pH do solvente, resistência a *photobleaching* e emissão próxima a 500 nm (LOUDET *et al.*, 2007; ULRICH *et al.*, 2008; HERMANSON, 2008; LAKOWICZ, 2009; HOOGENDOORN *et al.*, 2011; BOENS *et al.*, 2012).

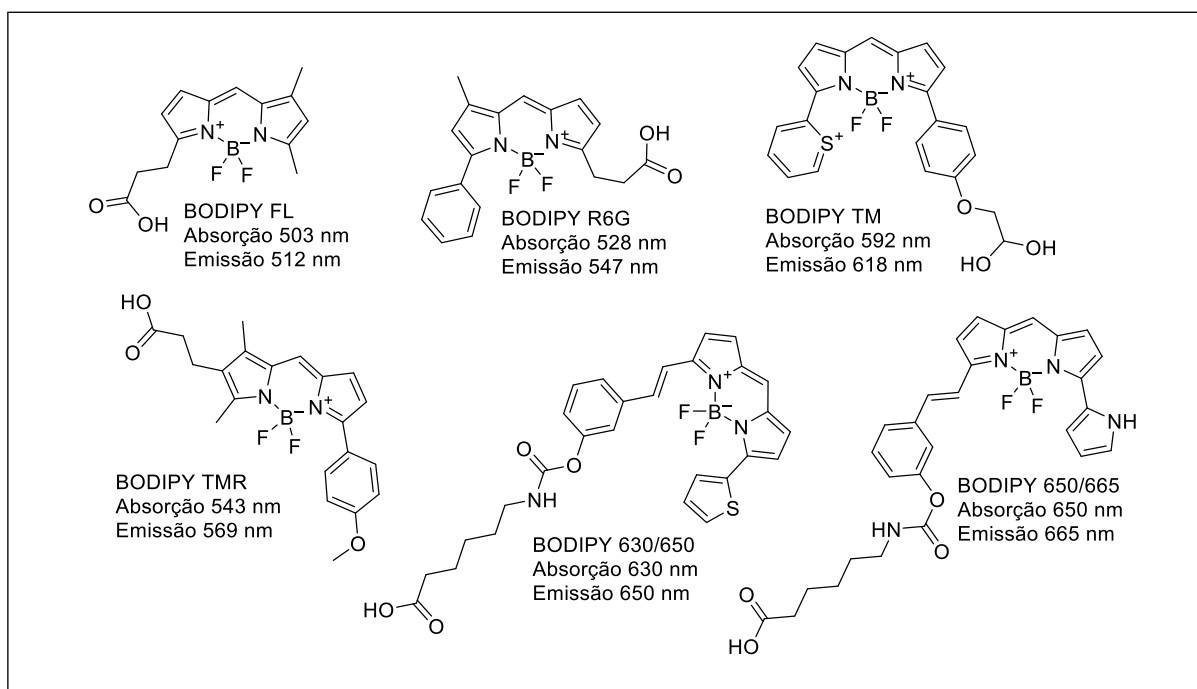
Segundo a Thermo Fisher Scientific®, os BODIPYs apresentam características incomuns, devido ao fato de serem relativamente não polares e eletricamente neutros. Os usos são comuns na marcação de nucleotídeos, aminoácidos e outros ligantes de baixo peso molecular. Atualmente existem no mercado BODIPYs com inúmeras funções (JOHNSON, 2010; THERMO FISCHER, s.d.).

Os BODIPYs disponíveis comercialmente podem ter, em seus grupos substituintes, funções que os deixem mais específicos, ou seja, que tenham a capacidade de se ligarem a um alvo. Por exemplo, o grupo tiol reativo atua nos grupos sulfidrilas dos aminoácidos das proteínas, há outros grupos, como os aldeídos, as cetonas, os ácidos carboxílicos e outras funções que atuam como amino reativos (ANDERSON *et al.*, 1964; WU *et al.*, 2008; JOHNSON, 2010; REZENDE *et al.*, 2013).

As sondas derivadas do BODIPY comerciais que podemos citar são BODIPY FL® (Figura 9), que atua como alternativo da fluoresceína, possui alto coeficiente de extinção molar (maior que $80.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), alto rendimento quântico de fluorescência, largura da banda estreita e intensidade de picos mais altas que a fluoresceína (JOHNSON, 2010). Uma característica pertinente é que se a concentração deste fluoróforo for elevada, no meio, será observado um desvio batocrômico, no espectro de emissão, além do fato de não sofrer sobreposição espectral, com corantes de comprimento de onda maior, como tetrametilrodamina e Texas Red® (YANG *et al.*, 2007; JOHNSON, 2010).

Os outros exemplos comerciais são os BODIPY R6G®, BODIPY TMR® e BODIPY TR® (Figura 10), fluoróforos com comprimentos de onda mais longos, com absorções e emissões em 528 e 547 nm, 543 e 569 nm, 592 e 618 nm respectivamente, eles foram desenvolvidos para agirem como alternativos das rodamina, tetrametilrodamina e Texas Red®, nessa ordem (JOHNSON, 2010; REZENDE *et al.*, 2013). Entretanto, os fluoróforos com maiores comprimentos de excitação e emissão são os BODIPY 630/650-X e BODIPY 650/665-X (Figura 10), que têm seus comprimentos de onda no próprio nome, sendo o primeiro valor a absorção e o segundo, a emissão (JOHNSON, 2010).

Figura 10 - Sondas derivadas de BODIPY comercialmente utilizadas e suas absorções e emissões



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Além dos derivados disponíveis comercialmente, diversos grupos de pesquisa vêm desenvolvendo métodos para modificar os BODIPYs quimicamente e produzir fluoróforos com características e propriedades específicas. BODIPYs funcionalizados podem ser sintetizados a partir da reação do pirrol com compostos carbonílicos, que acontece em três etapas (WAN *et al.*, 2003; REZENDE *et al.*, 2013; REZENDE, 2016). A produção do BODIPYs funcionalizado pode ser por pré-funcionalização, que se baseia na inserção de funções no material de partida. Alguns compostos como o BODIPY FL, o BODIPY R6G e BODIPY TMR possuem grupos carboxílicos e fenílicos,

que foram adicionados ao pirrol, posteriormente usado na síntese dos compostos (JOHNSON, 2010; REZENDE *et al.*, 2013; REZENDE, 2016).

Além da pré-funcionalização há a pós-funcionalização do BODIPY, chamada de modificação direta. A Figura 11 a seguir exemplifica algumas dessas estratégias. A reação de halogenação se trata da inserção de halogênios como bromo, cloro e iodo na estrutura do BODIPY. Alguns trabalhos já estabeleceram diversos métodos distintos de halogenação (WORIES *et al.*, 1985; JIAO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; LEEN *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). Os BODIPYs halogenados podem ser utilizados como materiais de partida para obtenção de compostos com outros substituintes (LEEN *et al.*, 2011; LEEN *et al.*, 2012; REZENDE, 2016).

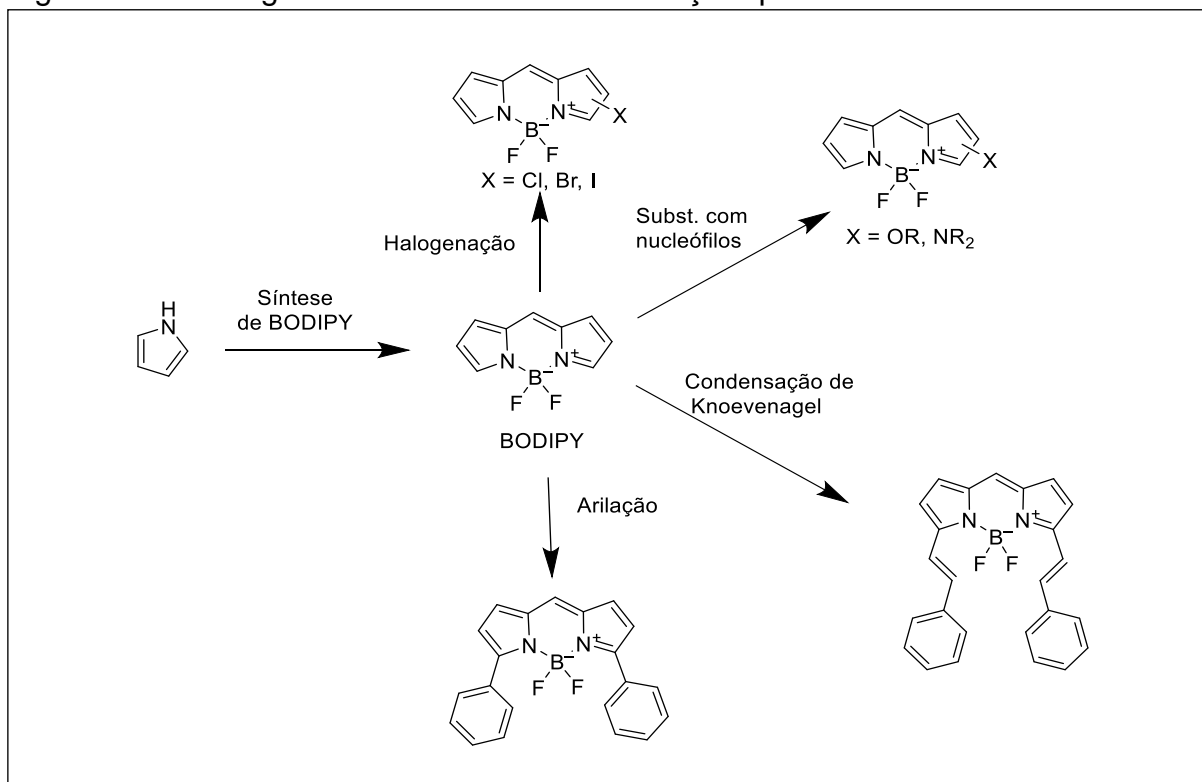
Outra modificação interessante é a substituição nucleofílica, em que há inserção de grupos nucleófilos de N, O, S ou C, como, por exemplo, amina, álcool e tióis (ROHAND *et al.*, 2006; LEEN *et al.*, 2011; LEEN *et al.*, 2011; LEEN *et al.*, 2012; REZENDE *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2013). A substituição nucleofílica é comumente feita utilizando compostos halogenados, mas existem descritos, na literatura, substituições nucleofílicas diretas, sem a necessidade de halogenação (LEEN *et al.*, 2010; LEEN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; KNIGHT *et al.*, 2015). Esta modificação pode promover alterações nos comprimentos de onda de absorção e emissão, aumentar ou reduzir o rendimento quântico de fluorescência e a fotoestabilidade (JIAO *et al.*, 2011; LEEN *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2012).

Algumas reações de pós-funcionalização permitem a alteração das propriedades fotofísicas. Um dos métodos mais estabelecido é a condensação Knoevenagel, na qual as metilas podem ser modificadas, sendo adicionado grupo estiril (BARUAH *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009; HOOGENDOORN *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2012; UMEZAWA *et al.*, 2014; REZENDE, 2016). Os produtos da reação de Knoevenagel têm desvio batocrômico e hipsocrômico, na absorção e emissão (ZHU *et al.*, 2012; REZENDE, 2016).

Outro método importante é a arilação, uma técnica desenvolvida mais recentemente que se baseia na inserção de grupo aromático diretamente no núcleo BODIPY (HAUGLAND *et al.*, 1993; REZENDE *et al.*, 2013; VERBELEN *et al.*, 2015; REZENDE,

2016). Os produtos dessa reação são característicos pelo desvio batocrômico, no comprimento de onda de absorção e emissão, podendo ou não alterar o rendimento quântico de fluorescência (CHEN *et al.*, 2000; LAKSHIMI *et al.*, 2014; UMEZAWA *et al.*, 2014; VERBELEN *et al.*, 2015).

Figura 11 - Visão geral da síntese e da modificação química de BODIPYs

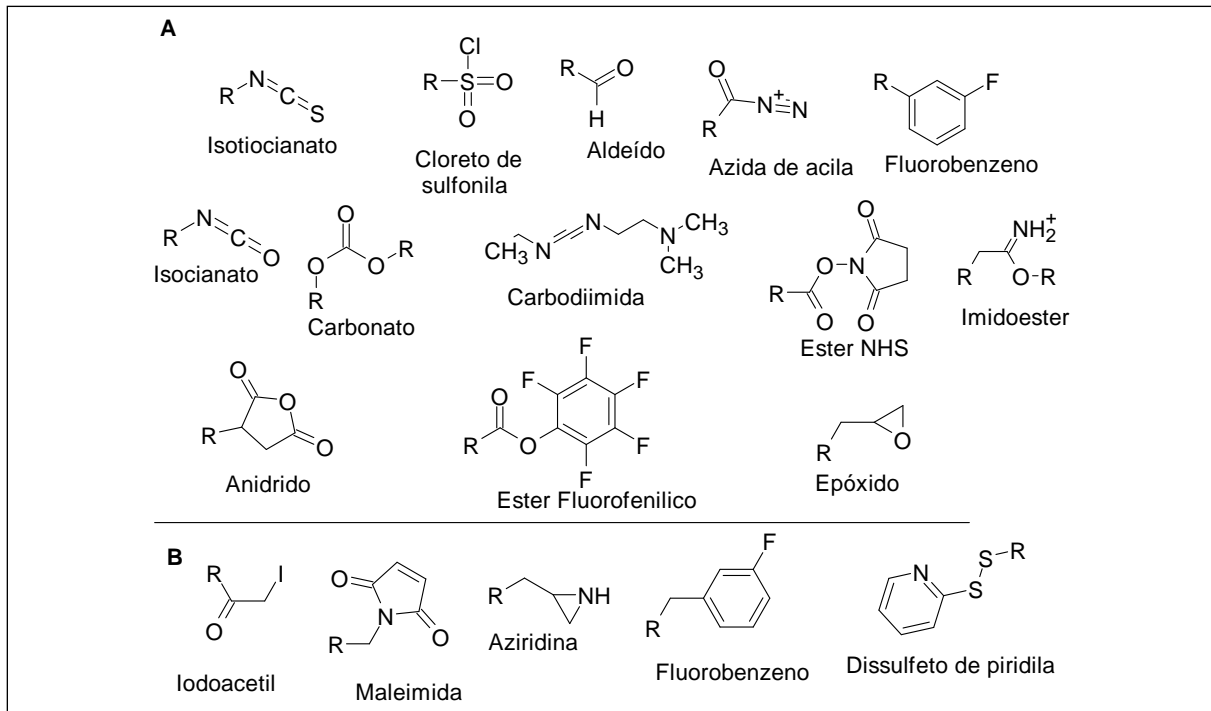


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

1.4 BIOCONJUGAÇÃO E GRUPOS REATIVOS

A conjugação de fluoróforos com proteínas é um processo importante em diversos experimentos em bioquímica. Em geral, utilizam-se fluoróforos funcionalizados com grupos reativos eletrofílicos (como amino reativos ou tiol reativos), a fim de reagir com nucleófilos livres presentes nas proteínas (REZENDE, 2016). Nesse contexto, foi proposta a divisão em dois grupos reativos principais que estão mostrados na Figura 12, na parte superior estão demonstrados os grupos amino reativos (Figura 12A) e abaixo estão os exemplos de tiol reativos (Figura 12B) (SMYTHE, 1936; ANDERSON *et al.*, 1964; ERNST *et al.*, 1988; RANA *et al.*, 1990; REZENDE *et al.*, 2013). Os grupos reativos a aminas das proteínas serão melhor abordados nas próximas seções.

Figura 12 - A: Grupo amino reativo; B: Grupo tiol reativo

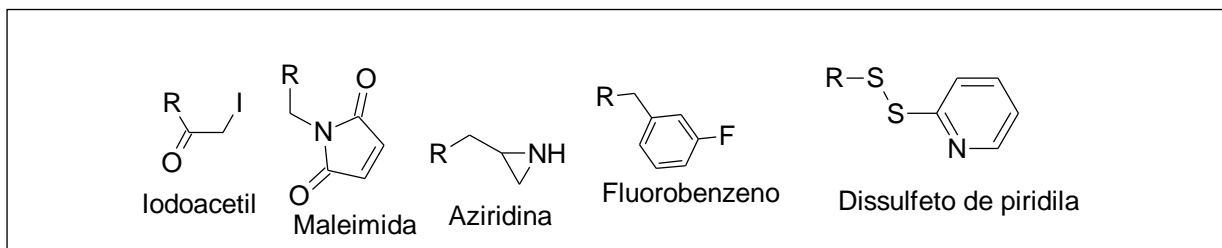


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

1.4.1 Grupos reativos a sulfidril e suas bioconjugações

Quanto aos compostos tióis reativos, estes atuam no enxofre das cadeias laterais do aminoácido cisteína, fazendo ligação tioéter, ponte de dissulfeto ou outra ligação química (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). As reações de conjugação para modificação de sulfidrilas ocorrem por uma das duas vias: alquilação ou intercâmbio de dissulfeto (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). Entre os grupos tiol-reativo, podemos citar algumas funções específicas, por exemplo, maleimida, haloacetil, dissulfeto de piridila, azidinas e agentes arilantes (Figura 13) (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013; REZENDE *et al.*, 2013).

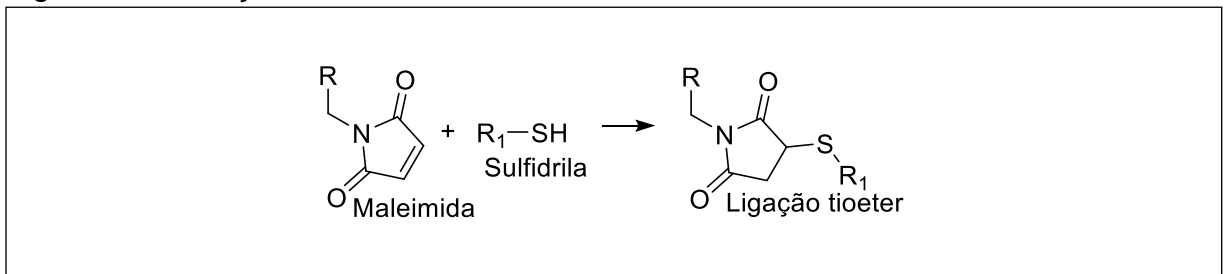
Figura 13 - Funções orgânicas tiol reativo



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O grupo maleimida deriva da reação do anidrido maleico com amônia ou amina e para que haja reação com a maleimida, as pontes de dissulfeto das proteínas precisam ser reduzidas, permitindo que as sulfidrilas estejam disponíveis para a maleimida atuar (MATSUMOTO *et al.*, 2007; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). As ligações da maleimida podem sofrer reação de alquilação nas sulfidrilas e formarem tioéter, o que ocorre a partir do ataque nucleofílico do carbono adjacente à ligação do carbono maleimida, pelo ânion tiolato (Figura 14) (MATSUMOTO *et al.*, 2007; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013; REZENDE *et al.*, 2013).

Figura 14 – Reação da maleimida com uma sulfidrilas

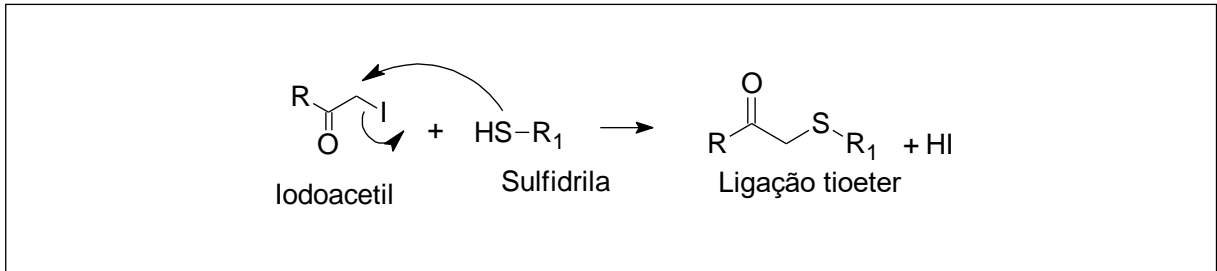


Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

No grupo dos derivados de halogênio, existem compostos que reagem à sulfidrilas como o haloacetil (iodoacetil ou bromoacetil) e haleto de benzila, que sofre ativação pelo processo de ressonância com o anel do benzeno próximo (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). A reação dos haletos é do tipo substituição nucleofílica, na qual o halogênio é deslocado pelo nucleófilo e forma ligação tioéter entre um derivado alquilado, liberando HX (H= hidrogênio e X= halogênio) (Figura 15) (HERMANSON, 2013).

Usualmente, o iodoacetil é usado para conectar ligantes para serem usados na cromatografia de afinidade, além de ser capaz de reagir com a sulfidrilas da cisteína (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). Em pH 7, eles podem reagir com a sulfidrilas da cisteína, o nitrogênio dos imidazolil das histidinas, o tioéter da metionina e aminas das lisinas (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). A histidina pode ser modificada no átomo de nitrogênio da imidazolila, gerando compostos monossustituídos ou dissustituídos, já a lisina gera amina secundária e terciária (monocarboxilisina e dicarboxilisina respectivamente) (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013;).

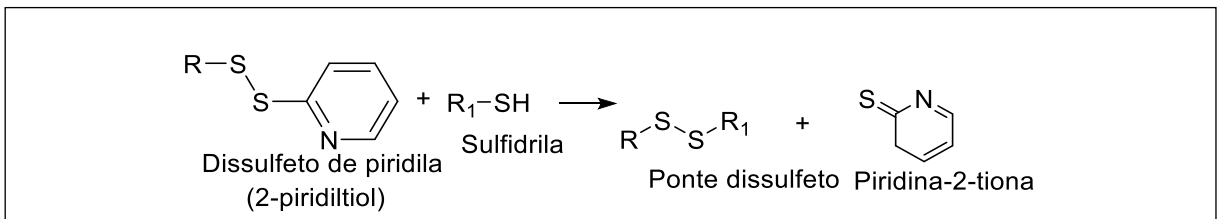
Figura 15 – Reação do iodoacetil com sulfidril



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

O grupo dos dissulfetos de piridila reage com grupos sulfidrilas, em uma faixa de pH ampla, por intercâmbio de sulfidrilas livres por pontes de dissulfeto (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). Durante a reação, há troca do grupo dissulfeto de piridila (2-piridiltiol) que reage com a sulfidrilas livre e forma piridina-2-tiona, que é isento de tiol livre (Figura 16), além de este ter características únicas como os espectros (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). Esse grupo é comumente utilizado para troca de tiol por dissulfetos na proteína (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013).

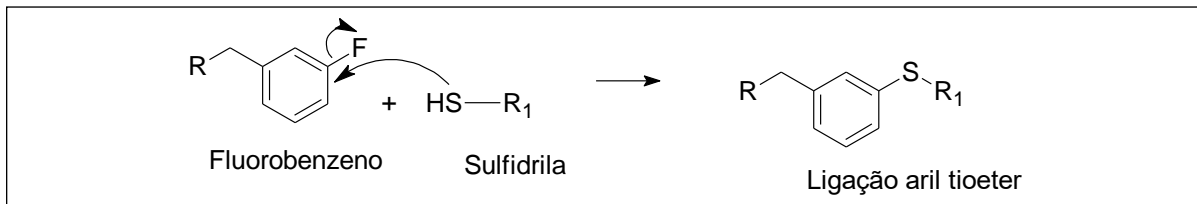
Figura 16 – Reação do dissulfeto de piridila com sulfidril



Fonte: JOHNSON (2010), adaptado pela autora.

Os agentes arilantes são compostos aromáticos reativos que possuem, pelo menos, um substituinte no anel que pode sofrer substituição nucleofílica (JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013). Os agentes de arilação mais comuns são os derivados do benzeno com grupos halogênio ou sulfonato. Um exemplo é o fluorobenzeno, que faz com que a reação ocorra com substituição do átomo de flúor pela sulfidrilas e, assim, a ligação formada é um aril tioéter (Figura 17) (HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013).

Figura 17 – Reação de um agente arilante com a sulfidrina

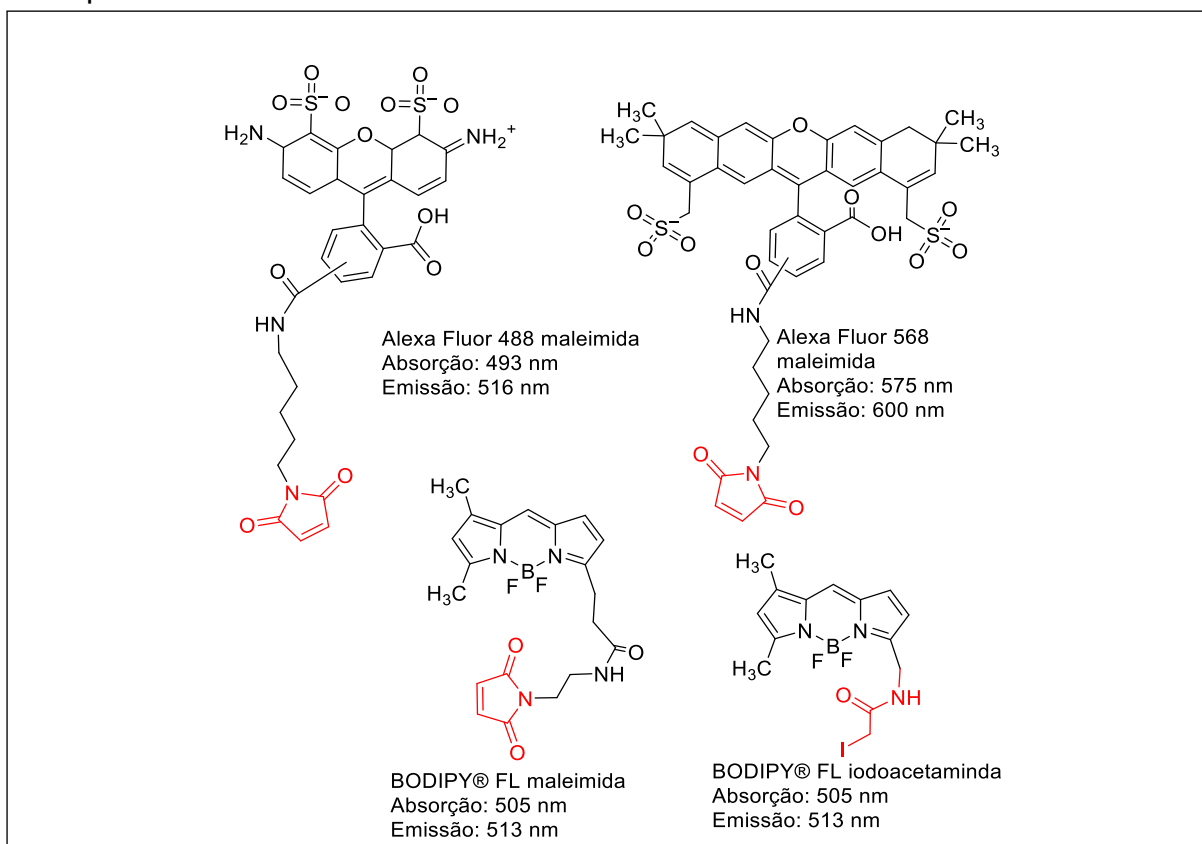


Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

Comercialmente, existem marcadores que são sintetizados com grupos tiol reativos, entre os quais há a classe dos Alexa Fluor® e BODIPYs. A classe dos Alexa Fluor® pode ser exemplificada pelo Alexa Fluor® maleimida (Figura 18), que exibe absorção elevada, coeficientes de extinção molar maiores que $65.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, excelente fotoestabilidade, não sofrem influência do pH e a fluorescência, após conjugado de proteína, é mais elevada (THERMO FISCHER, s.d.).

Já na classe dos BODIPY® FL, temos funcionalização com a maleimida, iodoacetamida e brometo de metila, este último teve sua produção descontinuada (Figura 18). As características dessa classe incluem coeficientes de extinção maiores que $60.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, altos rendimentos quânticos de fluorescência (próximo de 1), larguras de banda de emissão estreitas, boa fotoestabilidade e os espectros são pouco influenciados pela polaridade do solvente e ao pH do meio, são carentes de carga iônica (útil na preparação de sondas de membrana e reagentes que entram em células) (THERMO FISCHER s.d.; KAROLIN *et al.*, 1994; BERGSTRÖM *et al.*, 2002; HINDKELDEY, 2008). O próximo grupo, amino reativos, é de nosso interesse e será melhor detalhado.

Figura 18 – Exemplos de fluoróforos tio reativos comerciais com os grupos reativos destacados em vermelho. Acima: exemplos de Alexa Fluor® maleimida, onde o da direita é usado para conjugações in vivo e a esquerda para imuno detecções. Abaixo: exemplos de BODIPYs funcionalizados com maleimida e iodoacetamida

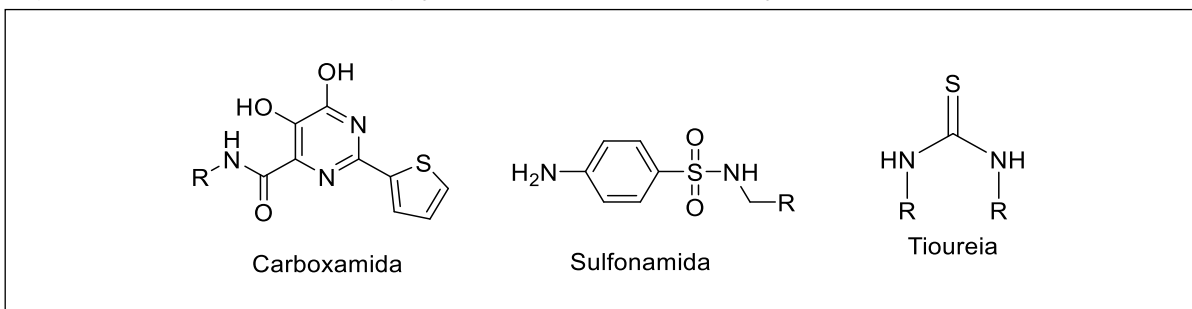


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

1.4.2 Grupos amino reativos e bioconjugações

O grupo amino reativo é composto por funções orgânicas que reagem às amins contidas nas proteínas e as reações de conexão podem ocorrer de duas formas, pela acilação ou alquilação. Ambas possuem a característica de serem reações que ocorrem rapidamente, com altos rendimentos, além de formarem amina estável (MELTOLA *et al.*, 2004; HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010). Caso sejam reagentes de acilação, eles irão formar ligações carboxâmidas, sulfonâmidas ou tiouréias, após a conjugação com amins, sendo que a cinética da reação depende da reatividade, concentração do reagente e da amina (WORIES *et al.*, 1985; MELTOLA *et al.*, 2004; HERMANSON, 2008; WU *et al.*, 2008; JOHNSON, 2010; ZHAO *et al.*, 2013).

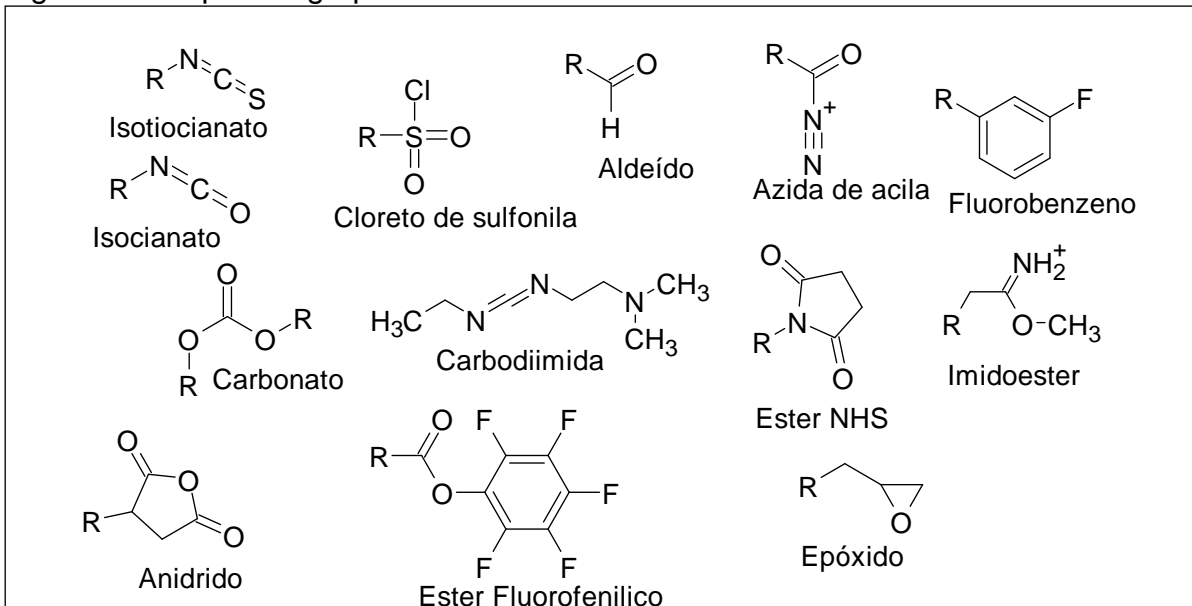
Figura 19 – Exemplos de ligações formadas após reação com amina



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Alguns fatores agem sobre a reatividade de uma amina, como sua classe alifática ou aromática e sua basicidade. Por exemplo, as aminas alifáticas (grupo amino da lisina), são básicas e reagem com reagentes de acilação. A cinética da acilação de amina por isotiocianatos, ésteres de succinimidil ou outros reagentes é fortemente dependente do pH (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; WIRTZ *et al.*, 2014). Nesse contexto, o tipo de grupo reativo que pode ser usado são éster, ácido carboxílico, aldeídos, isotiocianato e outros (Figura 20).

Figura 20 – Tipos de grupos reativos a aminas

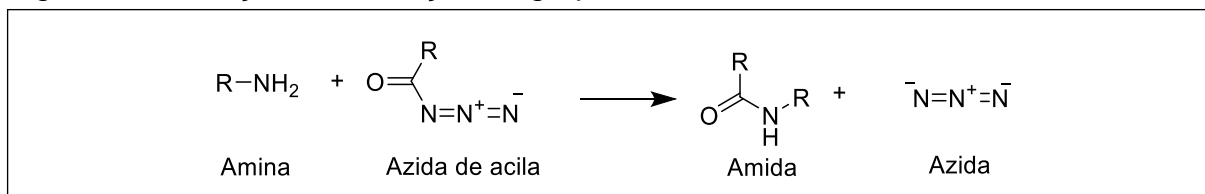


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O grupo amino reativo azida de acila faz parte do grupo carboxilato ativado que reage com aminas primárias, formando ligação do tipo amida (ANDERSON *et al.*, 1964; WANG *et al.*, 2012; HERMANSON, 2013). A azida de acila pode ser formada pelo tratamento da hidrazida com nitrito de sódio. A reação que liga a amina ocorre por

ataque nucleofílico ao grupo carbonil, que é pobre em elétrons, liberando a azida como um grupo de saída (Figura 21) (ANDERSON *et al.*, 1964; HERMANSON, 2008; MELTOLA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012; HERMANSON, 2013).

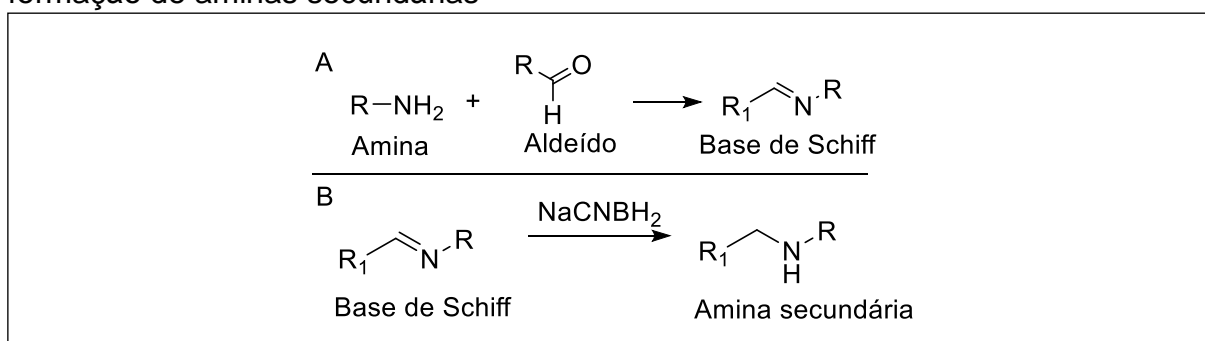
Figura 21 – Reação de formação do grupo amino reativo azida de acila



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

Grupos das carbonila (aldeídos e cetonas) podem reagir com aminas e formar intermediários imina (base Schiff) que estão em equilíbrio com suas formas livres (Figura 22A). Para a reação ocorrer, depende do pH e de alguns compostos como alguns açúcares redutores, que podem sofrer um rearranjo, após a formação da base de Schiff em uma estrutura estável de cetoamina. O intermediário é instável e, após a adição de borohidreto ou cianoborohidreto de sódio em meio com aldeído, sofre redução, formando ligação covalente de amina secundária entre os compostos (Figura 22B) (HERMANSON, 2008; WU *et al.*, 2008; XIONG *et al.*, 2010; HERMANSON 2013).

Figura 22 – A: Reação de aldeídos e cetonas com aminas parte 1; B: reação de formação de aminas secundárias

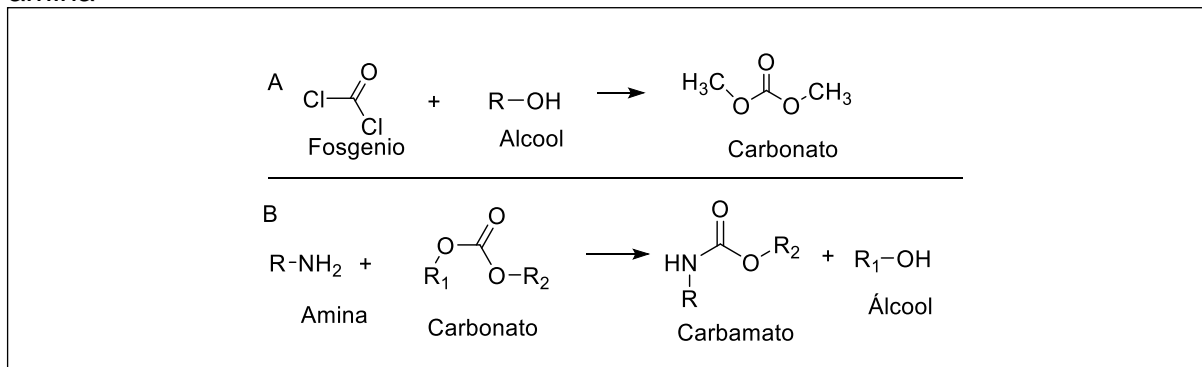


Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

No grupo dos carbonatos, derivados diéster do ácido carbônico, são formados a partir de sua condensação com compostos contendo hidroxila (Figura 23A). Ou seja, são criados a partir da reação de um derivado ativo de ácido carbônico (fosgênio ou carbonildiimidazol (CDI) com dois álcoois (WANG *et al.*, 1993, 1998). Os carbonatos

reagem rapidamente com nucleófilos e formam ligações de carbamato estáveis (Figura 23B).

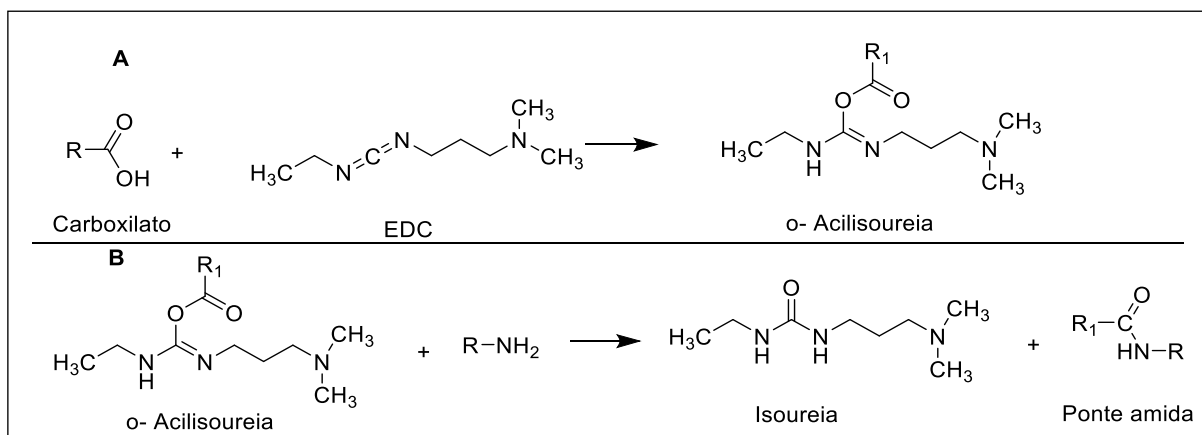
Figura 23 – A: Reação de formação de carbamato a partir de fosgênio; B: Reação com amina



Fonte: HERMANSON (2013) e JOHNSON (2010), adaptado pela autora.

As carbodiimidas são comumente usadas para mediar a formação de uma ligação amida ou fosforamidata entre um grupo carboxilato e uma amina ou um fosfato e uma amina, respectivamente (HERMANSON, 2013). A reação que ocorre entre uma carbodiimida N-substituída e ácido carboxílico forma um intermediário de o-acilisoureira, de tempo de vida curto (Figura 24A), que reage com nucleófilo (aminas ou sulfidrilas) formando ponte amida ou ligação tioéster, respectivamente (Figura 24B) (GHOSH *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1998; HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013).

Figura 24 – A: Reação de formação do intermediário o-acilisoureira; B: Reação de carbodiimida com amina

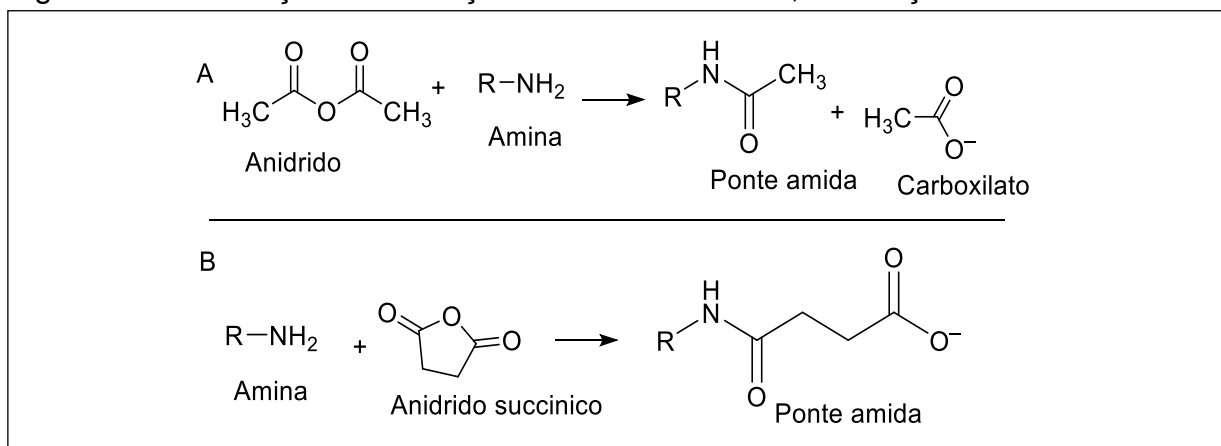


Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

O grupo dos anidridos carboxílico, formados a partir da reação de desidratação de dois grupos de ácidos carboxílicos, reage aos nucleófilos e são capazes de acilar vários grupos funcionais de proteínas e outras macromoléculas (HERMANSON, 2013). A reação ocorre com ataque à amina, produzindo um ácido carboxílico para cada produto acilado (Figura 25A), exceto quando reage com anidrido succínico, pois ele abre seu anel no processo e o carboxilato é incorporado a ele (Figura 25B) (HERMANSON, 2013).

Os reagentes anidridos são geralmente usados no bloqueio de grupos funcionais e para converter um grupo funcional existente em um ácido carboxílico (HERMANSON, 2013; JOHNSON, 2010). Os grupos funcionais de proteínas que reagem com ele incluem as aminas da lisina, grupo sulfidril da cisteína, o íon fenolato dos resíduos de tirosina e o anel imidazol das histidinas (ANDERSON *et al.*, 1964; MALATESTI *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007; HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010).

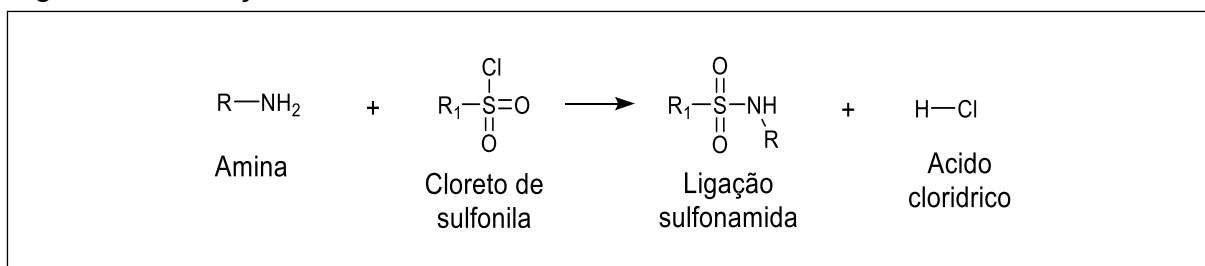
Figura 25 – A: Reação de formação dos anidros ácidos; B: Reação com aminas



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

O grupo cloreto de sulfonila, derivado do ácido sulfônico reativo, são semelhantes em propriedades e reatividade aos cloretos ácidos dos carboxilato (HERMANSON, 2013). Duas características interessantes podem ser citadas, o ataque nucleofílico do grupo a uma amina primária ocorrer com a perda do átomo de cloro, tendo a formação de uma ligação de sulfonamida, e um intermediário pentavalente instável, em pH entre 9 - 10 e o cloreto de sulfonila ser tetra substituído (Figura 26) (WORIES *et al.*, 1985; HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013; REZENDE, 2015).

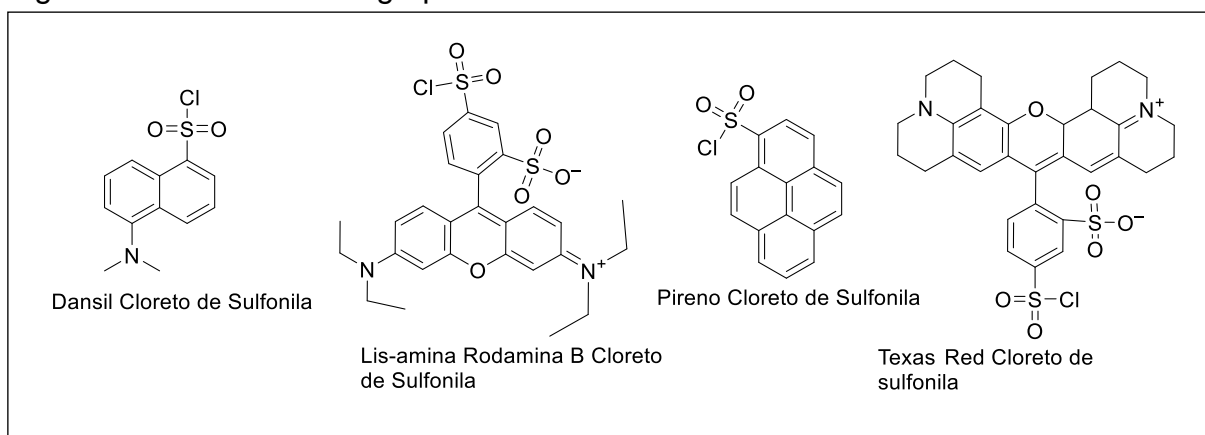
Figura 26 – Reação do cloreto de sulfonila com amina



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

Nesse grupo, temos como representantes os derivados de dansil, pireno, Lis-amina rodamina B e Texas Red® (Figura 27), que são altamente reativos, instáveis em água e demandam um pH mais alto para que haja reação com aminas alifáticas (ULRICH *et al.*, 2008; JOHNSON, 2010; ZHAO *et al.*, 2013). Mesmo não sendo comum as reações com proteínas ou solução aquosa, os cloretos de sulfonila também podem reagir com fenóis da tirosina, tióis de cisteínas e imidazóis das histidinas (JOHNSON, 2010).

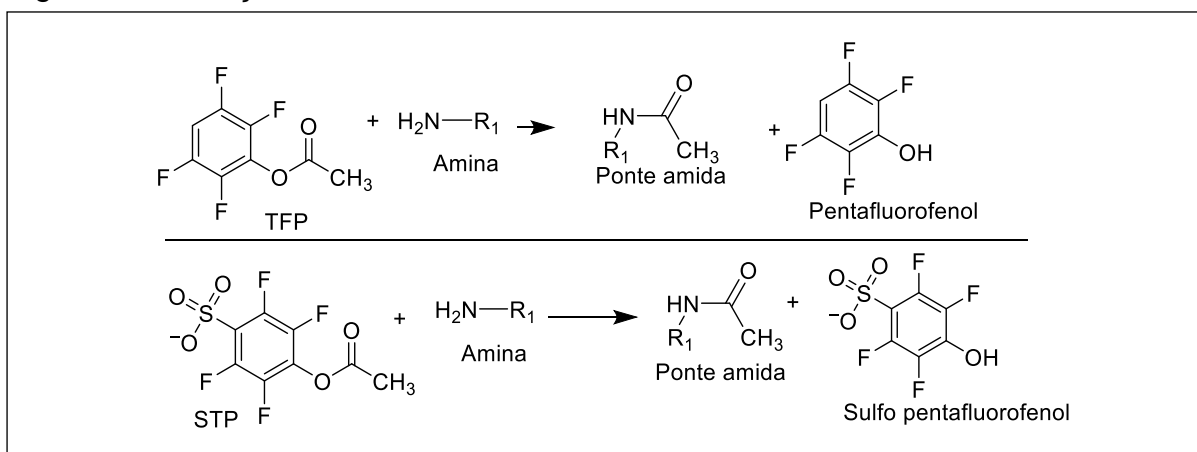
Figura 27 – Derivados do grupo cloreto de sulfonila



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O grupo dos ésteres fluorofenílicos é um tipo de derivado do ácido carboxílico que reage com as aminas e é capaz de formar ligações amidas com proteínas e outras moléculas (Figura 28). Há descrito, na literatura, alguns tipos de ésteres de fluorofenílicos comumente utilizados como grupos reativos. Por exemplo, o éster de tetrafluorofenil (TFP) e o éster de sulfo-tetrafluorofenil (STP) reagem com moléculas contendo amina para formar a ligação amida (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013).

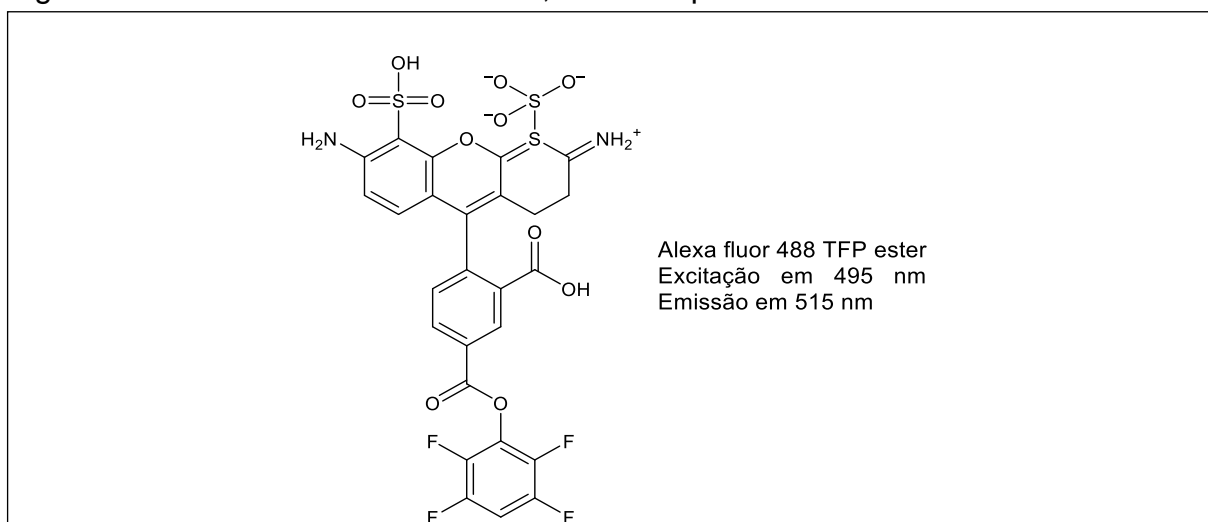
Figura 28 – Reação dos ésteres fluorofenílicos com aminas



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

Os ésteres STP têm maior solubilidade em água do que os ésteres succínicos (SE). Estes não precisam de solventes orgânicos para a reação de conjugação, por serem mais polares que os outros ésteres, o que os tornam menos propensos a reagir com aminas ocultas em proteínas ou a penetrar nas membranas celulares (JOHNSON, 2010). O TFP é mais reativo que o STP, o exemplo disponível comercialmente é o Alexa Fluor® 488 (Figura 29) (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013).

Figura 29 – Alexa fluor 488 TFP éster, um exemplo comercial



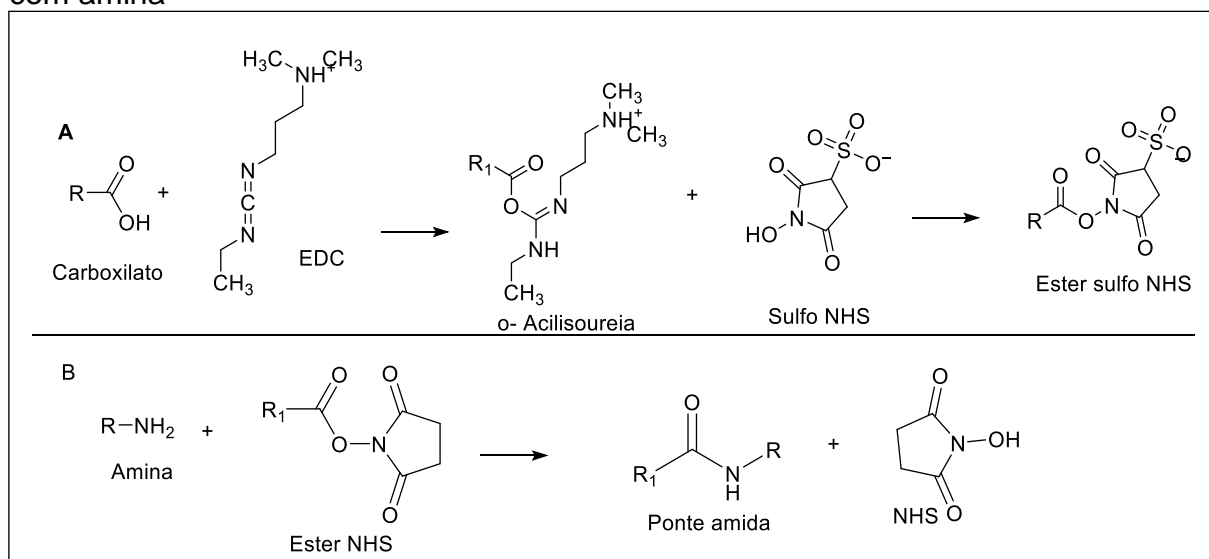
Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O éster de N-hidroxissuccinimida (NHS) é usado como reagente para criar compostos acilados reativos. Além disso, ésteres de succinimidila são reagentes confiáveis para a modificação de aminas, porque as ligações de amida que eles formam são tão

estáveis quanto as ligações de peptídeos (ANDERSON *et al.*, 1964; JOHNSON, 2010). Um éster de NHS pode ser formado pela reação de um carboxilato com NHS, na presença de carbodiimida (Figura 30A) (WANG *et al.*, 1998; MELTOLA *et al.*, 2004; LORTHIOIS *et al.*, 2008; HERMANSON, 2013).

O sulfo NHS é um derivado sulfonilado do NHS, desenvolvido como uma versão mais hidrossolúvel. Na conjugação, ambos, éster NHS e éster sulfo NHS, reagem com nucleófilos amina, formando ligação do tipo tioéster e liberado o grupo NHS ou sulfo-NHS (Figura 30B) (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013).

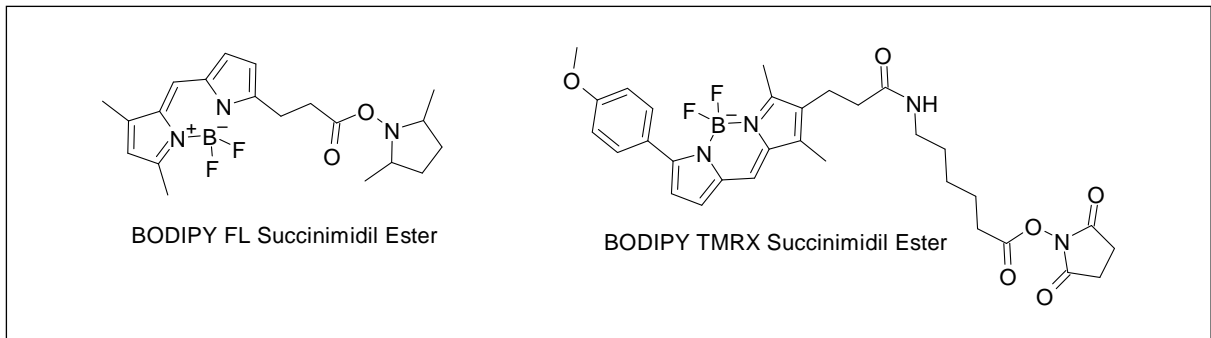
Figura 30 – A: Reação de formação do éster sulfo NHS; B: Reação de conjugação com amina



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

Pensando acerca dos BODIPYs amino reativos comerciais, existem os succinimidil éster BODIPY, dentro desse grupo, temos o BODIPY X, que possui 7 átomos entre o fluoróforo e o éster succinimidil, que atua como redutor parcial da interação da molécula conjugada com o fluoróforo e, assim, facilitando a detecção de reagentes, além de outras modificações onde o SE esteja incluso. Como exemplos adicionais, citamos os BODIPY® FL SE, BODIPY® TMRX SE (Figura 31) e demais compostos dessa classe, descritos na Thermo Fisher (THERMO FISHER s.d.; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013; REZENDE 2013;).

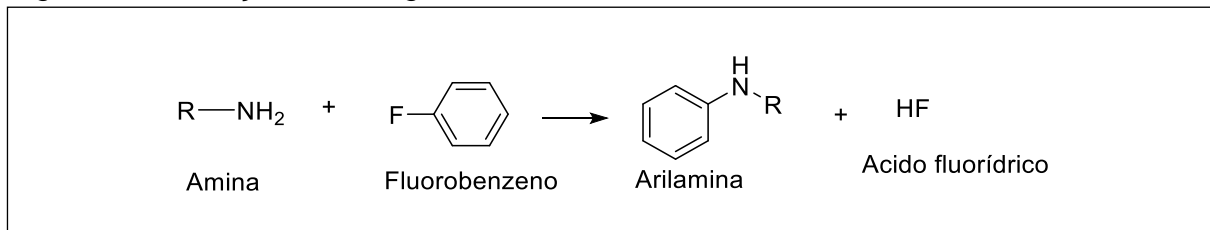
Figura 31 – Exemplos de BODIPYs com a função succinimidil éster



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O grupo dos agentes arilantes é representado pelo haleto de arila, como fluorobenzeno, e são usados para formar ligações covalentes com amina das proteínas. No entanto, eles não são exclusivos para as aminas, outros grupos como tiol, imidazolil e fenolato das cadeias laterais de aminoácidos também podem reagir (ZAHN *et al.*, 1958; BURGESS *et al.*, 2000; HERMANSON, 2013). A reação dos fluorobenzeno com as aminas envolve o deslocamento do átomo de flúor com a amina, criando ligação arilamina (Figura 32) (BURGESS *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2008; HERMANSON, 2008, 2013; VERBELEN *et al.*, 2015).

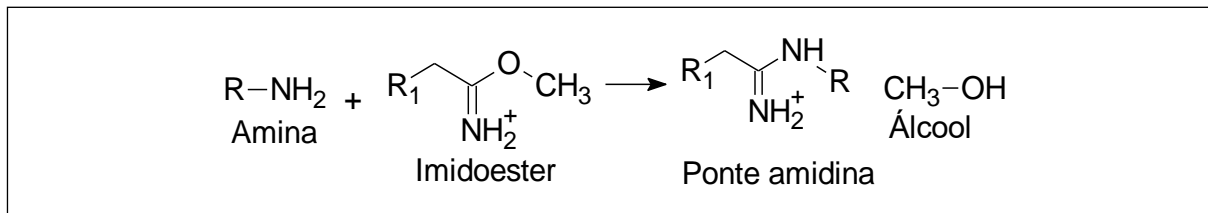
Figura 32 – Reação de halogenetos de arila com aminas



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

O grupo Imidoéster (ou imidato) é um dos agentes acilantes específicos para reação com aminas primárias. Os imidoésteres possuem reatividade cruzada com outros grupos nucleofílicos nas proteínas. As aminas das proteínas podem reagir com imidoésteres entre pH 7 a 10 e seu produto seria uma imidoamida (amidina) protonada em pH fisiológico (Figura 33) (HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013). A ligação amidina é estável em pH ácido e sofre hidrólise e clivagem em pH básico (HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013).

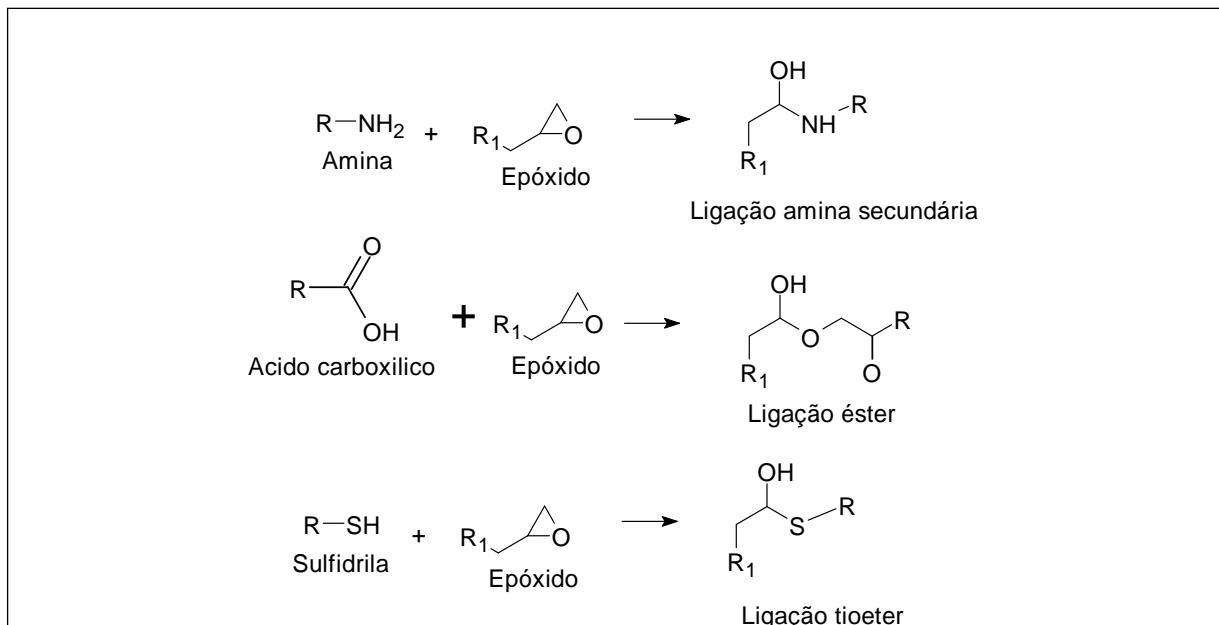
Figura 33 – Reação do grupo Imidoéster com aminas



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

Os epóxidos são éteres cíclicos muito reativos devido à tensão de seu anel (TRZESNIAK, 2002). A reação ocorre com nucleófilos e há abertura do anel formando um grupo β-hidroxi, na porção epóxido, ou seja, a reação ocorre entre epóxido e amina, sulfidrilas e carboxilas (HERMANSON, 2013; DENISSEN *et al.*, 2015). Onde é formada a ligação amina secundária, tioéter ou éster, respectivamente, esta reação de adição nucleofílica ocorre no carbono menos substituído do anel (Figura 34) (HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013).

Figura 34 – Reação entre epóxidos com amina, hidroxilas do ácido carboxílico e sulfidrilas

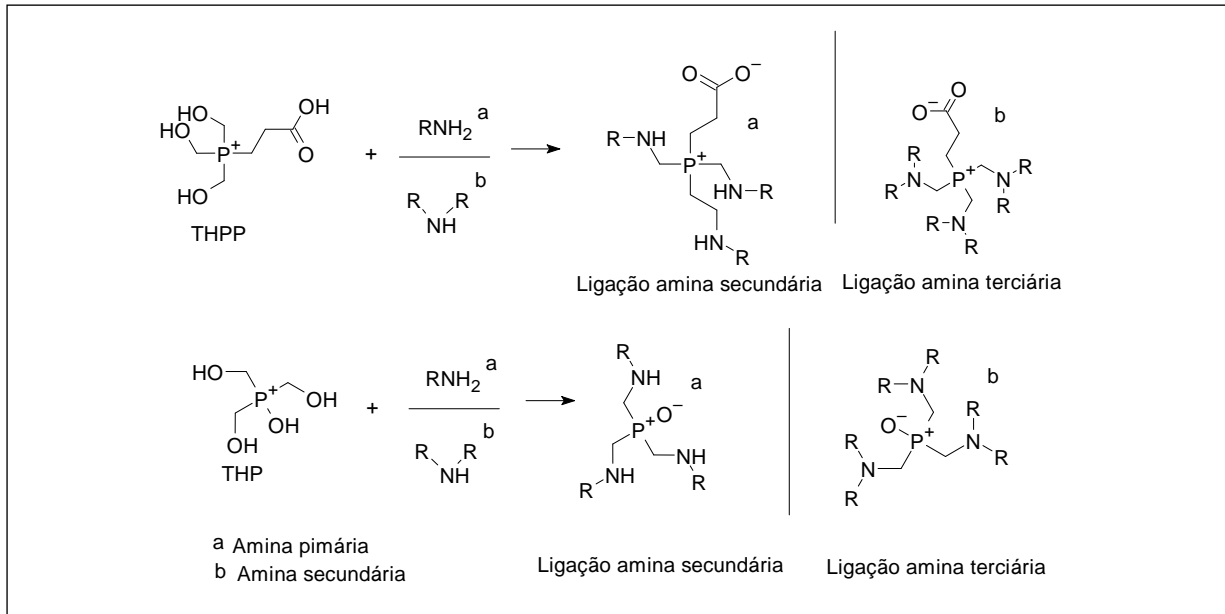


Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O grupo dos derivados de hidroximetil fosfina tem propriedades redutoras, no qual derivados de fosfina com hidroximetil são empregados na bioconjugação com proteínas e biomoléculas. Tais derivados são o Tris(hidroximetil)fosfina (THP) e β-[tris](hidroximetil)fosfina]propiónica (THPP) que reagem com aminas, formam ligação

covalente do tipo amina secundária ou terciária, atacando o carbono próximo ao oxigênio, liberando água (Figura 35) (HERMANSON, 2008; HERMANSON, 2013).

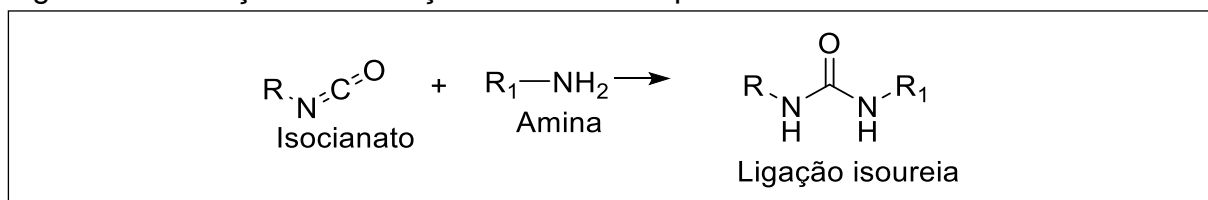
Figura 35 – Reação dos derivados de hidroximetil com amina



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

O grupo isocianato é formado pela reação de amina aromática com fosgênio, o qual é semelhante ao isotiocianato. A diferença desses grupos está na substituição do átomo de oxigênio (NCO), que substitui o enxofre no isotiocianato. Ele pode ser sintetizado também a partir da azida de acila, na presença de álcool, que se rearranja formando o isocianato (RIFAI *et al.*, 1986; HERMANSON, 2008, 2013). Sua reação com as aminas presentes nas proteínas formam uma ligação estável do tipo isourea, entretanto o composto é instável, sofre hidrólise e se decompõe, liberando gás carbônico (Figura 36) (HERMANSON, 2008).

Figura 36 – Reação de formação de isourea a partir do isocianato com amina



Fonte: HERMANSON (2013), adaptado pela autora.

1.4.3 Procedimento de bioconjugação

O uso das sondas reativas vai desde marcação de biomoléculas, onde as sondas reativas são utilizadas para modificar proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos sintéticos e outras biomoléculas, ao uso na preparação de bioconjugados para imunofluorescência, hibridização por fluorescência *in situ* (FISH), rastreamento de células, marcação de receptores e histoquímica fluorescente (SCHADE *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 2007; JOHNSON, 2010; RAYO *et al.*, 2011). Tais usos exigem uma série de processos e reações, o que pode afetar a integridade do bioconjugado, o qual deve ser mantido após os processos (PODHRASKÝ *et al.*, 1979).

Pensando nos tantos grupos reativos e para que se tenha um bioconjugado ideal, estes devem ter algumas características como fluorescência elevada, boa solubilidade, ligação seletiva a um receptor, ativação ou inibição de uma enzima específica ou a capacidade de ser incorporado à membrana biológica (THOMPSON *et al.*, 2000; WISCHKE *et al.*, 2006). No entanto, podem ocorrer inconvenientes e para evitar que aconteçam, como precipitação ou ligação inespecífica, é preciso que se faça a otimização experimental. Esse procedimento é feito adicionando maiores concentrações de algum composto que se quer analisar ou reagente, ou modificando algum produto (alteração estrutural ou substituição do composto), ou deixando em incubação prolongada (deixando por mais tempo reagindo) (JOHNSON, 2010).

Após a conjugação, é muito importante fazer a purificação, que objetiva remover o máximo possível de reagente não conjugado e obter uma amostra mais limpa. A purificação pode ser por filtração em gel, membrana de diálise ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), pois esse excesso de corante livre pode vir a prejudicar a leitura (HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; BOENS *et al.*, 2012; MACIEL, 2018).

A gel filtração possui o princípio que se baseia na partição das moléculas em duas fases, nessa técnica, a fase estacionária tem o efeito de seleção molecular, separando, de acordo com o tamanho e forma molecular. Essa técnica é composta por redes porosas tridimensionais em cadeia linear de polímeros entrecruzados,

formando a matriz do gel. A gel filtração é usada para separação de misturas de macromoléculas de massa molares diferentes (BALDASSO, 2008).

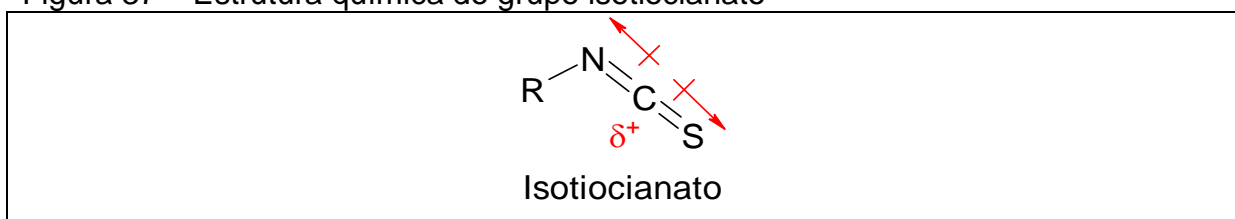
Na membrana de diálise, a solução contendo dois ou mais compostos é colocada em contato com a membrana, que permite a passagem seletiva de compostos de forma mais rápida que os outros. Nesta técnica, o tamanho do poro determina o peso molecular de corte, ou seja, a separação e passagem da molécula por entre a trama da matriz. A vantagem dessa técnica está na possibilidade de recuperação de bioprodutos, apresenta elevada estabilidade, facilidade de escalonamento do equipamento, permite a concentração do composto retido e a purificação em etapa única (ZUÑIGA *et al.*, 2003).

Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a separação dos compostos da mistura a ser analisada acontece devido a diferentes interações do analito e as fases. As vantagens de usar o HPLC estão no fato de que as amostras podem ser analisadas com baixo nível de manipulação, a faixa de ebulição não interfere na leitura, o tempo de análise é, em minutos, e o método pode ser adaptado para análise linear (LANÇAS, 2009; RAMOS, 2014).

1.5 O ISOTIOCIANATO E BIOCONJUGAÇÃO

O grupo funcional isotiocianato é um análogo do isocianato com um átomo de enxofre substituindo o átomo oxigênio. Dessa maneira, o isotiocianato é caracterizado por um carbono central com hibridização sp formando uma ligação dupla com um átomo de nitrogênio e uma outra ligação dupla com um átomo de enxofre (Figura 37) (IUPAC, 1997).

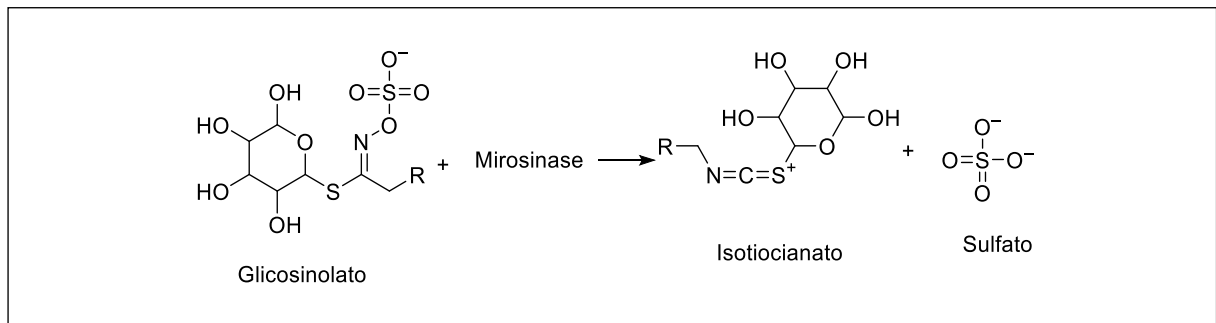
Figura 37 – Estrutura química do grupo isotiocianato



Fonte: IUPAC (1997)

Estudos com plantas demonstram que o isotiocianato tem potencial contra doenças e se explora isso desde os primórdios. Devido a seus metabolitos atuarem como antimicrobianos, estimuladores de defesa corporal, preservação de alimento, o tornam de grande importância para o homem, uma vez que, nos dias atuais, já são encontradas bactérias resistentes ao antibiótico e o uso do isotiocianato poderia auxiliar no desenvolvimento de fármacos. Ele é produzido após hidrólise do glicosinolatos (GLs), que é um metabolito da quebra por meio da enzima mirosinase presente na planta e, após sofrer estresse ou dano, libera a enzima que age sobre os GLs, que por sua vez é hidrolisada a isotiocianato (Figura 38) (ROMEIO *et al.*, 2018).

Figura 38 – Formação do grupo isotiocianato a partir da reação do glicosinolato com a enzima mirosinase



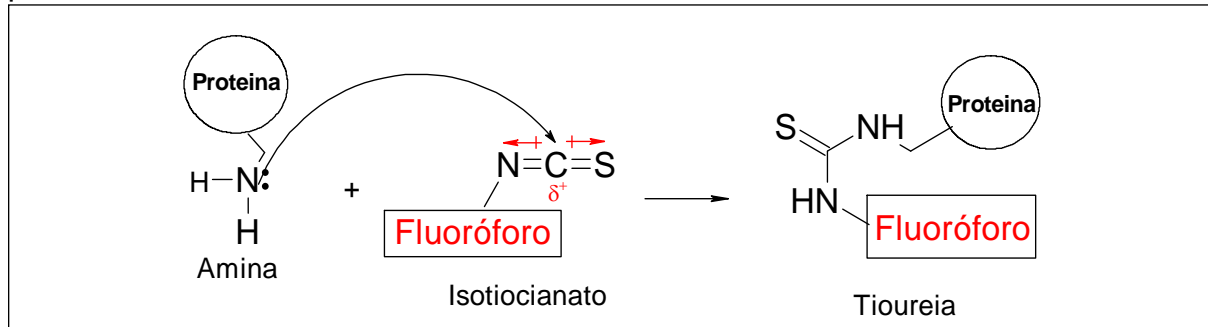
Fonte: ROMEIO (2018), adaptado pela autora.

Os isotiocianatos estão presentes em plantas do grupo das couves, brócolis, agrião e mostarda e esse mecanismo de conversão é uma forma de proteção da planta. O metabolismo a absorção da GLs e do isotiocianato ocorrem no intestino. No entanto, ao passar pelo fígado o isotiocianato se conjuga à glutathione e são excretados na urina, podendo ser um marcador de glutathione. Além disso, podem ser marcadores bioquímicos para o câncer, diabetes e outras doenças (ROMEIO *et al.*, 2018; PALLIYAGURU *et al.*, 2018).

O grupo amino reativo isotiocianato também é explorado na bioquímica, o qual pode ser formado pela reação de amina aromática com tiosulfênio semelhante ao isocianato (RIFAI *et al.*, 1986; HERMANSON, 2008). A reação dos isotiocianatos com aminas de proteínas, ou cadeias polipeptídicas, envolve ataque do nucleófilo ao carbono central do grupo isotiocianato (NCS), o que provoca o deslocamento de elétrons e cria ligação do tipo tiouréia entre a amina da proteína e o grupo isotiocianato, o composto produzido após formação da tiouréia é estável (Figura 39)

(ZIESSEL *et al.*, 2006; HERMANSON, 2008; JOHNSON, 2010; HERMANSON, 2013; REZENDE, 2016).

Figura 39 – Reação entre fluoróforo isotiocianato e amina na bioconjugação com proteínas



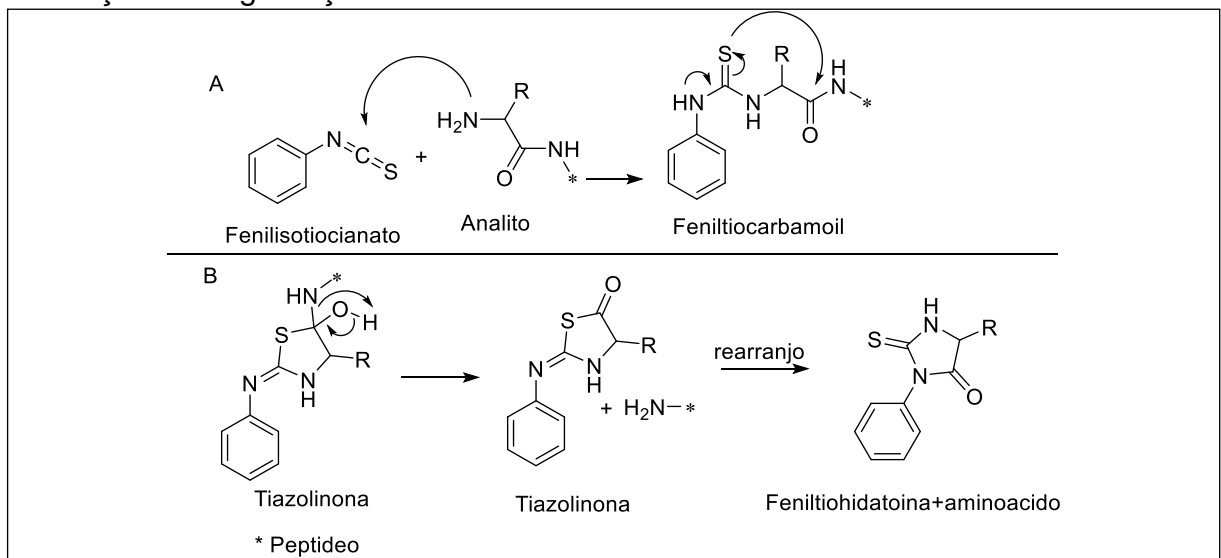
Fonte: Elaborada pela autora (2020)

O uso do isotiocianato é bem difundido e diverso, havendo diversos usos, como conjugação com carbonos *dots*, que são nano tubos de carbono ocos, onde o isotiocianato está presente e pode ser usado como carreador de fármacos para diversas células (TANG *et al.*, 2008). Outros usos são como marcadores de proteínas e, assim, traçam o percurso de algum medicamento sem que haja necessidade de injeções, podendo ser usado via parenteral (WISCHKE *et al.*, 2006). O isotiocianato pode reagir com as sulfidrilas e íon fenolato de cadeias laterais de tirosinas, no entanto, são seletivos para aminas contidas nas cadeias laterais de lisinas e porção amino terminal de aminas em proteínas (JOBAGY *et al.*, 1966; PODHRADSKY, 1979; HERMANSON, 2008).

Para que se possa analisar quais aminoácidos estão presentes na sequência da proteína, é necessário proceder à reação de degradação de Edman, na qual o grupo amino terminal do aminoácido atua como doador de elétron, enquanto o carbono do grupo isotiocianato é o aceptor. Essa reação ocorre em três etapas, sendo que na primeira etapa, há o ataque do nucleófilo (NH₂) ao eletrófilo que, no caso, é o isotiocianato de fenila (R-N=C=S) e os elétrons da ligação entre o carbono e nitrogênio do isotiocianato são deslocados para o átomo de nitrogênio do peptídeo que retira próton do meio para estabilizar carga (Figura 40A) (EDMAN, 1950; RANA *et al.*, 1990).

Na segunda etapa, o nitrogênio do grupo isotiocianato conjuga seu par de elétrons com o carbono atacado, formando uma dupla ligação nitrogênio com carbono e há o deslocamento dos elétrons da ligação carbono com enxofre para o átomo de enxofre, formando um tiolato, que vai atacar a carbonila da ligação peptídica em uma reação intramolecular. Por fim, ocorre a substituição nucleofílica na carbonila, fazendo com que o grupo amino, que está ligado ao restante da cadeia peptídica, seja protonado e isso promove a sua expulsão. Isso faz com que um par de elétrons do oxigênio seja restabelecido, restaurando a carbonila, sofrendo rearranjo e formando feniltiohidantoína, que está ligada ao aminoácido da sequência (Figura 40B) (EDMAN, 1950; PODHRADSKÝ, 1978; RANA *et al.*, 1990).

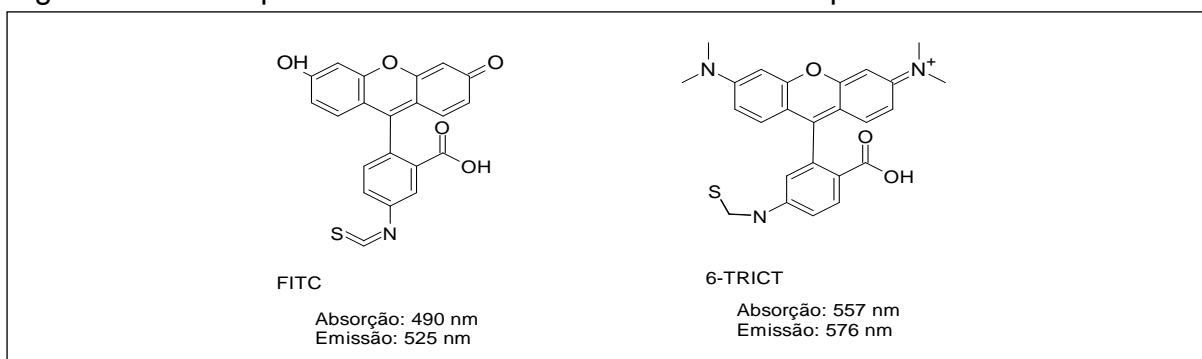
Figura 40 – A: Primeira parte da reação de degradação de Edman; B: Segunda parte da reação de degradação de Edman



Fonte: EDMAN (1950), adaptado pela autora.

Apesar do crescente número de opções sintetizadas de fluoróforos reativos à amina, os isotiocianatos de fluoresceína (FITC) e de tetrametilrodamina (TRITC) (Figura 41) ainda são corantes reativos muito utilizados na bioconjugação com compostos fluorescentes. Os BODIPYs têm feito parte desses compostos por serem passíveis de adição de grupos funcionais (RIGGS *et al.*, 1958; MALATESTI *et al.*, 2006; JOHNSON, 2010; REZENDE *et al.*, 2013; FREDY *et al.*, 2019). Outra substância disponível comercialmente e amplamente utilizada em bioconjugação é o isotiocianato da rodamina B.

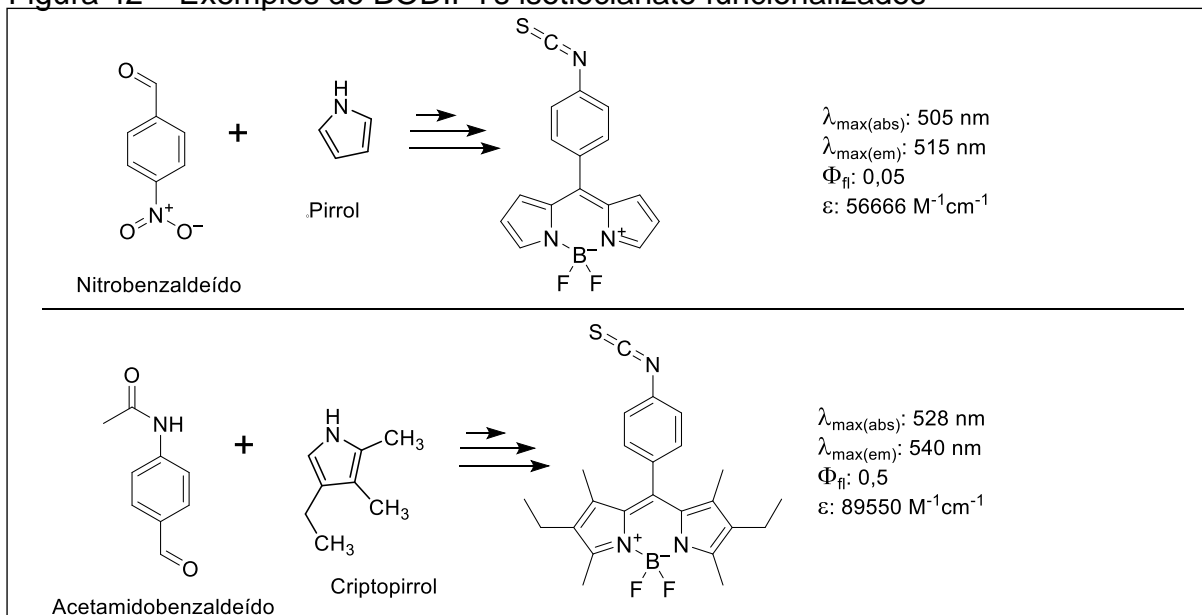
Figura 41 – Exemplos de fluoróforos com isotiocianato disponíveis comercialmente



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Existem alguns BODIPYs funcionalizados com o grupo isotiocianato descrito na literatura, cuja preparação, estrutura e propriedades estão sumarizadas na Figura 42 (MALATESTI *et al.*, 2006; ZIESSEL *et al.*, 2006; REZENDE *et al.*, 2013). Os compostos ilustrados na Figura 42 se tratam de BODIPYs com anel aromático, na posição meso, o que faz com que tenham características fotofísicas semelhantes. Nesta pesquisa, propomos dois novos BODIPYs funcionalizados com o grupo isotiocianato, desenhados de maneira que tenham propriedades fotofísicas singulares, distintas dos compostos já citados.

Figura 42 – Exemplos de BODIPYs isotiocianato funcionalizados



Fonte: Elaborada pela autora (2020)

Nesse contexto, é de grande importância o desenvolvimento de novos materiais fluorescentes orgânicos com propriedades e aplicações específicas para serem

utilizados em análise fluorimétricas (VALEUR *et al.*, 2012; REZENDE, 2016). Portanto, nosso grupo de pesquisa possui interesse na funcionalização dos BODIPYs para marcação de proteínas em bioquímica por meio de reações de bioconjugação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e caracterizar novas substâncias fluorescentes baseadas no fluoróforo BODIPY, bem como sua aplicação em bioconjugação com proteínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Projetar a estrutura de novos fluoróforos derivados de BODIPY funcionalizados com o grupo isotiocianato;
- Caracterizar as propriedades fotofísicas dos novos fluoróforos derivados de BODIPY produzidos;
- Estudar a aplicação dos fluoróforos BODIPY produzidos como ferramenta na bioconjugação com proteínas e ensaios imunofluorescentes.

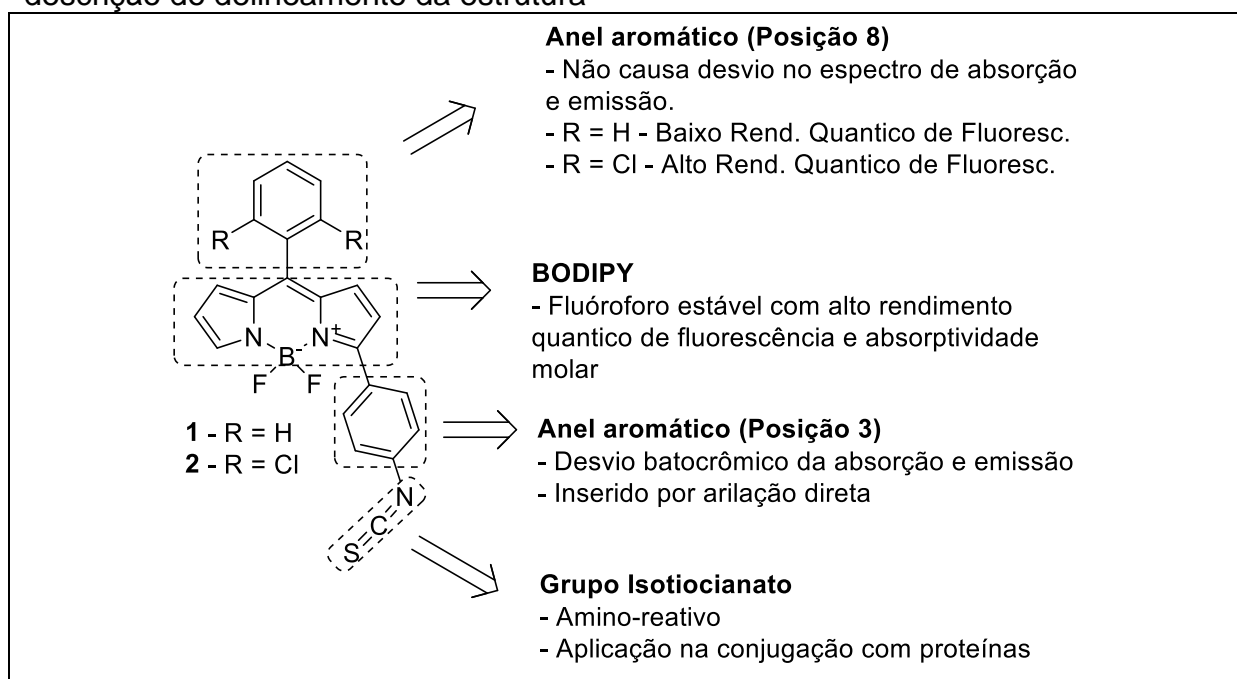
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO E CARACTERIZAÇÃO DE BODIPYS PARA BIOCONJUGAÇÃO

Neste trabalho foram delineadas a estrutura química de dois fluoróforos inéditos derivados do BODIPY (Figura 43 – compostos **1** e **2**). Ambos possuem o grupo isotiocianato a fim de serem aplicados na conjugação com proteínas, baseado na conhecida reatividade dessa função com aminas. As estruturas propostas levaram em conta a viabilidade sintética, considerando a experiência prévia do grupo de pesquisa e de seus colaboradores. Outro ponto chave para a proposta dessas moléculas foi a inserção de um anel aromático na posição 3 do BODIPY, que resulta no desvio batocrômico da absorção e emissão desse fluoróforo.

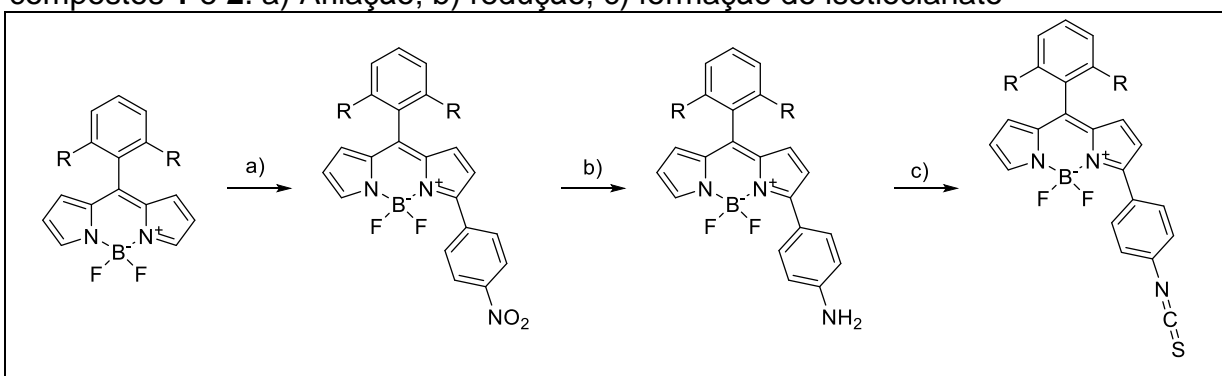
Dessa maneira, os compostos **1** e **2** se tratam dos primeiros exemplos de BODIPYS isotiocianato com fluorescência e absorção desviada para o vermelho. Por fim, cabe salientar a diferença entre os dois compostos, que se trata da presença de átomos de cloro no anel aromático central (posição 8). Essa alteração estrutural influencia no rendimento quântico de fluorescência, que, em geral é mais alto para o anel clorado.

Figura 43 - Estrutura química dos compostos **1** e **2** utilizados neste trabalho, com a descrição do delineamento da estrutura



Uma vez delineada a estrutura dos compostos, a síntese foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa em Química Heterocíclica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. O procedimento de síntese não será detalhado neste documento. Em termos gerais, o fluoróforo BODIPY foi funcionalizado com um anel nitrobenzeno via reação de arilação, seguido de redução do grupo nitro e conversão do grupo funcional amina ao grupo isotiocianato (Figura 44) (VERBELEN *et al.*, 2012; REZENDE, 2016).

Figura 44 - Visão geral da rota de modificação química utilizada para preparação dos compostos **1** e **2**. a) Arilação; b) redução; c) formação do isotiocianato



As propriedades fotofísicas dos dois compostos foram caracterizadas nos seguintes solventes orgânicos, cujas polaridades (representadas pelos valores de constante dielétricas) são diversas: pentano (C_5H_{12} , $K= 1,84$), diclorometano (DCM, $K= 9,1$), clorofórmio ($CHCl_3$, $K= 4,81$), acetato de etila (EtOAc, $K= 6,02$), acetona (CH_3COCH_3 , $K= 21$), metanol (MeOH, $K= 33$) e dimetilsulfóxido (DMSO, $K= 46,7$). Os espectros de absorção foram obtidos no espectrofotômetro Varian Cary 50 (Agilent), enquanto os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent). O desvio de Stokes, foi calculado a partir da diferença entre o comprimento de onda (nm) do pico de absorção e emissão. Os dados foram transferidos no formato .csv e os softwares Spekwin32 versão 1.72.2 e Microsoft Excel versão 1911 foram utilizados para a análise, processamento e preparação dos espectros.

O rendimento quântico de fluorescência foi obtido através de um método comparativo, no qual utiliza-se o valor do rendimento quântico de um composto referência. Neste trabalho a referência utilizada foi a Rodamina-101 em metanol acidificado ($\phi = 0,96$) com excitação em 535 nm para referência do composto **1** e em 550 nm para referência do composto **2** (BROUWER, 2011). Para essa análise, soluções diluídas de cada

composto (absorbância entre 0,1 e 0,01) foram preparadas e analisadas quanto à absorbância (535 nm para **1** e 550 nm para **2**) e área sob pico de fluorescência (excitação em 535 nm para o composto **1** e em 550 nm para o composto **2**). Os dados foram plotados e a partir do coeficiente angular da reta de regressão linear utilizando a fórmula a seguir:

$$\phi_x = \phi_{st} \left[\frac{m_x}{m_{st}} \right] \left[\frac{n_x}{n_{st}} \right]^2$$

Nessa fórmula, ϕ_x e ϕ_{st} são os valores de rendimento quântico de fluorescência da substância estudada e da substância referência, respectivamente. Os termos m_{st} e m_x são o valor do coeficiente angular das retas preparadas conforme o descrito anteriormente. Por fim, n_x e n_{st} se referem aos índices de refração dos solventes.

3.2 REAÇÃO DOS BODIPYS COM DIETILAMINA

Para testar a reatividade dos compostos com aminas, 1 mg dos compostos **1** e **2** (aproximadamente 2 μ mol) foram transferidos para dois balões de fundo redondo distintos (capacidade de 5 mL), aos quais foram adicionados 1 mL de acetona. A solução formada, foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética e então adicionou-se 50 μ L (35 mg, 0,5 mmol) de dietilamina. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) em placa de alumínio com sílica gel (para a fase móvel foi usada solução contendo éter de petróleo/diclorometano na proporção 1:1). Ao final da reação a solução foi transferida para um vial de vidro e evaporada. O produto bruto de cada reação foi solubilizado em metanol e caracterizado por espectrofotometria e espectrofluorimetria, conforme descrito anteriormente.

3.3 BIOCONJUGAÇÃO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Inicialmente, foram pesados 1,2 mg do composto **1** e 1,4 mg do composto **2** e, posteriormente dissolvidos em 0,1 mL de DMSO, para preparação de soluções estoque do composto **1** (12 mg/mL, 30 mM) e **2** (14 mg/mL, 30 mM) acondicionados em tubos eppendorf de 2mL a -12 °C. Para realização da bioconjugação, preparou-se

1,9 mL de solução contendo BSA (2 mg) em tampão bicarbonato de sódio (0,5 M, pH 9,2) em quadruplicata.

Realizou-se a conjugação da albumina com 10 e 25 equivalentes (em mol) de cada um dos dois fluoróforos separadamente. Para o experimento com 10 eq, a duas soluções distintas de BSA (1,9 mL) adicionou-se 90 μ L de DMSO e 10 μ L da solução estoque dos fluoróforos **1** (reação 1) e **2** (reação 2). Para o experimento com 25 eq, a duas soluções distintas de BSA (1,9 mL) adicionou-se 75 μ L de DMSO e 25 μ L da solução estoque dos fluoróforos **1** (reação 3) e **2** (reação 4). Ao final, todas as reações continham o cossolventes DMSO (5% v/v), a proteína BSA (1 mg/mL, 0,015 mM) e os fluoróforos, conforme indicado na Tabela 1. As conjugações foram realizadas em tubo eppendorf de 2 mL, por 1 hora a 38°C.

Tabela 1 - Relação das reações e suas concentrações

	Fluoróforo	Concentração
<i>Reação 1</i>	1	0,15 mM
<i>Reação 2</i>	2	0,15 mM
<i>Reação 3</i>	1	0,375 mM
<i>Reação 4</i>	2	0,375 mM

Ao fim de reação de bioconjugação, foram testados alguns protocolos para purificação da proteína conjugada por diálise. A diálise possibilitaria a retirada dos fluoróforos não conjugado presentes na solução, pois eles possuem baixa massa molecular e com isso passariam pelos poros da membrana que possui ponto de corte molecular menor que a proteína modelo.

3.3.1 Diálise em água destilada

Para essa purificação, foi utilizada membrana de dialise Vivaspin turbo 15 (Sartorius), com peso molecular de corte (MWCO) de 30 KDa, suficiente para reter proteínas com massa molecular maior que 30 KDa e a proteína modelo (BSA) possui a massa molecular de 66,5 KDa, portanto ficaria retida na solução, enquanto os fluoróforos não conjugados são dialisados devido ao baixo peso molecular (inferior a 0,5 KDa).

Os produtos das reações 1 a 4 (tabela 1) foram inicialmente centrifugados na centrífuga refrigerada Hitachi Rx series, a 4000 RPM por 10 minutos, com rotor número 60 e 25°C. Após essa etapa, o volume dialisado foi descartado. Adicionou-se 4 mL de água à amostra e o processo de centrifugação foi realizado novamente. A solução aquosa final obtida após diálise foi submetida ao Liofilizador L101 (Liotop) do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (Labiom).

3.3.2 Diálise com etanol 70%

Nesta purificação também foi utilizada membrana de dialise Vivaspin turbo 15 (Sartorius), com peso molecular de corte (MWCO) de 30 KDa, como descrito anteriormente. Foram testados dois protocolos de diálise com etanol, que diferiram na quantidade de etapas de diálise realizadas.

No protocolo 1, foram adicionados 4 mL do etanol ao produto não dialisado e seguiu-se com uma etapa de diálise por centrifugação na centrífuga Hitachi Rx series refrigerada, a 4000 RPM por 20 minutos, com rotor número 60 e 25°C. Após essa etapa, realizou-se a troca de solvente, na qual o produto retido foi dissolvido em 4 mL de água destilada e centrifugado. Esse processo foi repetido por cinco vezes e o produto final foi seco no Liofilizador L101 (Liotop). Esse protocolo foi aplicado a produtos de conjugação realizada com 10 eq de cada fluoróforo (reações 1 e 2 da Tabela 1), preparados em reações independentes.

No protocolo 2, foram adicionados 4 mL do etanol ao produto não dialisado e seguiu-se com uma etapa de diálise por centrifugação na centrífuga Hitachi Rx series refrigerada, a 4000 RPM por 20 minutos, com rotor número 60 e 25°C. Esse procedimento foi repetido três vezes, antes da troca de solvente. Após essa etapa realizou-se a troca de solvente, na qual o produto retido foi dissolvido em 4 mL de água destilada e centrifugado. Esse processo foi repetido por cinco vezes e o produto final foi seco no Liofilizador L101 (Liotop). Esse protocolo foi aplicado a produtos de conjugação realizada com 10 eq e 25 eq de cada fluoróforo (reações 1 a 4 da Tabela 1), preparados em reações independentes.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO

Os produtos obtidos na bioconjugação foram caracterizados por espectrofotometria UV-Vis no equipamento espectrofotômetro Varian Cary 50 (Agilent) e por espectroscopia de fluorescência no equipamento Cary Eclipse (Agilent).

A partir da relação entre o pico de absorção do BODIPY (A_{max}) e o pico de absorção da proteína (A_{280}) é possível estimar o grau de marcação da proteína, ou seja, a relação média de fluoróforos por molécula de proteína (relação F/P). Para isso foi necessário calcular o coeficiente de absorptividade molar (ϵ) de cada fluoróforo. Idealmente, essa propriedade seria calculada em meio aquoso, todavia, devido à baixa solubilidade dos fluoróforos, o experimento foi realizado em DMSO. Uma solução de concentração conhecida de cada fluoróforo em DMSO foi preparada e submetida a uma diluição seriada.

Os dados de absorção e concentração foram plotados, e o valor de coeficiente angular da regressão linear é numericamente igual ao valor de ϵ . Além disso, foi calculado o fator de correção (CF) para os compostos 1 (CF_1 , equação 1) e 2 (CF_2 , equação 2). Como pode ser visto na equação, o cálculo é feito a partir do quociente entre a absorbância do fluoróforo em 280 nm, e no pico de absorção (542 nm para o composto 1 - A_{542} - e 560 nm para o composto 2 - A_{560}), de um espectro obtido em meio aquoso com 40% de DMSO. A relação F/P foi calculada pela fórmula a seguir (VIRA *et al.*, 2010).

$$CF_1 = \frac{A_{280}}{A_{542}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$CF_2 = \frac{A_{280}}{A_{560}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\frac{A_{max} \times \epsilon_{prot}}{(A_{280} - A_{max}CF) \times \epsilon_{fluor}} \quad (\text{Equação 3})$$

3.5 ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A preparação do gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida seguiu o protocolo descrito por Laemmli (1970), sendo realizado no sistema Mini-Protean Tetra Cell (BioRad). O gel de separação continha 12% (p.v⁻¹) de acrilamida, 0,3% (p.v⁻¹) de bis-acrilamida e 0,1% (p.v⁻¹) de SDS em 0,375 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 8,8 (volume final de 5 ml). O gel de empilhamento continha 3% (p.v⁻¹) de acrilamida, 0,3% (p.v⁻¹) de bis-acrilamida e 0,1% (p.v⁻¹) de SDS em 0,125 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 6,8 (volume final de 3 mL). Para a polimerização adicionou-se 0,1 % (p.v⁻¹) de persulfato de amônio (PSA) e 1:2000, (v.v⁻¹) de tetrametiletilenodiamina (TEMED).

As amostras purificadas das reações de bioconjugação, que estavam secas, foram ressuspensas em 500 µL de água destilada fazendo com que a concentração aproximada em cada eppendorf fosse de 4 mg/mL de proteína conjugada. Um volume de 5 µL de cada amostra foi diluído em 10 µL de água destilada e 5 µL de tampão contendo 0,2% (p.v⁻¹) de SDS; 50% (v.v⁻¹) de glicerol; 0,01% (p.v⁻¹) de azul de bromofenol em 0,31 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 6,8, seguido de aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Após aquecimento, 20 µL de cada amostra foi aplicada ao gel, e uma solução aquosa de mesma concentração de BSA não conjugada foi aplicada para comparação. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 120 volts durante 2 horas.

Para a visualização das bandas no gel de eletroforese, foi utilizado o ChemiDoc XRS+ System (BioRad) com o filtro 1 do aparelho e filtro QDOTS 525 do software ImageLab versão 5.0. Após visualização, o gel foi submetido à coloração através da incubação incubado overnight em solução de 15% (v.v⁻¹) de metanol, 7% (v.v⁻¹) de ácido acético e 0,25% (p.v⁻¹) "Coomassie Brilliant Blue" R250. No dia seguinte, o gel foi incubado por 2 horas em solução descolorante forte, preparada com 10% (v.v⁻¹) de ácido acético, 50% (v.v⁻¹) de metanol e qsp 75mL de água destilada. Em seguida, o gel foi passado para a solução de descolorante fraco, com 5% (v.v⁻¹) de ácido acético, 10% (v.v⁻¹) de metanol e qsp 85mL de água destilada, sendo feitas 2 lavagens, de 2 horas em cada. Após lavagens em descolorante fraco, foram feitos registros fotográficos.

3.6 APLICAÇÃO DO BODIPY EM WESTERN BLOTTING

Para avaliar a aplicação da conjugação do anticorpo com o BODIPY, 25 μ L de um homogenato de hipocampo de camundongo (onde a proteína Canabinoide CB₁ é mais expressa), gentilmente cedido pelo Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, seguindo protocolo de preparo do gel descrito no item 3.5. Após a corrida eletroforética por 3 horas, a 300 volts, foi realizada a transferência molhada das proteínas previamente separadas pelo SDS-PAGE para uma membrana de fluoreto de polivinilidieno (PVDF).

Inicialmente, a membrana foi submersa em metanol por 10 minutos e, em seguida, em tampão de transferência (25mM de Tris base, 182mM de glicina, SDS 10%, metanol puro 20%) por 20 minutos. A transferência foi realizada com amperagem de 250mA por 18 horas. Para preparação do anticorpo primário, 5 μ L do composto 2 foi dissolvido em 45 μ L de DMSO e adicionado a 5 μ L do anticorpo policlonal de coelho anti-receptor canabinoide CB₁ previamente dissolvido em 445 μ L de tampão carbonato a pH 9,2. Essa mistura foi incubada em banho seco por 1 hora a 37 °C.

Após a reação, o conjugado foi diluído em 1,8 mL de PBS e 200 μ L de DMSO e purificado em membrana de dialise Vivaspin turbo 15, sob centrifugação a 25°C, 4000 RPM por 10 minutos. O produto da purificação (anticorpo primário conjugado com BODIPY) foi adicionado em 5 mL de PBS sendo utilizado na incubação da membrana de PVDF, colocado no agitador gangorra e acondicionando sob refrigeração por 18 horas. Por fim, foi realizada a revelação, lavando-se a membrana com quatro vezes com PBST (tampão PBS com Tween® 20) por 5 minutos, seguido de lavagem com metanol por 30 minutos. A membrana foi analisada no ChemiDoc e utilizando o filtro 1 do aparelho e o filtro Alexa Fluor 488 do software.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FLUORÓFOROS

Inicialmente, foi realizada a caracterização fotofísica dos compostos **1** e **2**, cujos resultados estão mostrados na Tabela 2. Foram caracterizados os espectros de absorção, espectro de emissão e o rendimento quântico de fluorescência nos seguintes solventes orgânicos: pentano (C₅H₁₂), diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (EtOAc), acetona (CH₃COCH₃), metanol (MeOH) e dimetilsulfóxido (DMSO). Na Tabela 2 estão descritos os seguintes parâmetros: comprimento de onda dos picos de absorção e emissão (λ_{\max}), largura a meia altura dos picos de absorção e emissão (FWHM), desvio de Stokes e rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{fl}).

Tabela 2 - Caracterização dos compostos **1** e **2** em diferentes solventes.

Compostos e solventes	Absorção		Emissão		Desvio de Stokes ^a	ϕ_{fl}
	λ_{\max}^a	FWHM ^a	λ_{\max}^a	FWHM ^a		
1						
C ₅ H ₁₂	538	44,1	561	32,5	23	0,08
CH ₂ Cl ₂	539	47,1	566	35,2	27	0,09
CHCl ₃	540	47,4	567	34,2	27	0,13
EtOAc	537	46,3	562	33,8	25	0,07
CH ₃ COCH ₃	536	46,7	561	34,4	25	0,05
MeOH	534	47,5	561	34,1	27	0,05
DMSO	543	49,4	572	35,7	29	0,10
2						
C ₅ H ₁₂	551	42,6	573	29,6	22	0,99
CH ₂ Cl ₂	552	45,6	578	31,3	26	0,96
CHCl ₃	554	46,5	578	31,7	24	0,93
EtOAc	550	46	573	30,4	23	0,85
CH ₃ COCH ₃	550	47,7	576	29,5	26	0,88
MeOH	547	46,9	571	30,5	24	0,92
DMSO	557	47,4	583	30,2	26	0,98

^a dados mostrados em nm

Observou-se para o composto **2** um valor de λ_{\max} entre 547 e 557 nm para absorção e entre 571 e 583 nm para emissão, que estão desviados para o vermelho quando comparados ao composto **1**, que mostrou λ_{\max} entre 534 e 543 nm para absorção e entre 561 e 572 nm para emissão (Tabela 2). Esses dados mostram que a presença dos dois átomos de cloro no anel 2,6-diclorofenil na posição 8, estariam causando um

leve desvio batocrômico no composto **2**, o que condiz com observações anteriores em compostos semelhantes (VERBELEN *et al.*, 2015; VERBELEN *et al.*, 2015). Interessante ressaltar que o valor de λ_{\max} de absorção e emissão desses dois compostos estão desviados para o vermelho, quando comparados aos BODIPY isotiocianato descritos na literatura e disponíveis comercialmente (MALATESTI, 2006; ZIESSEL *et al.*, 2006; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, CID=45038425).

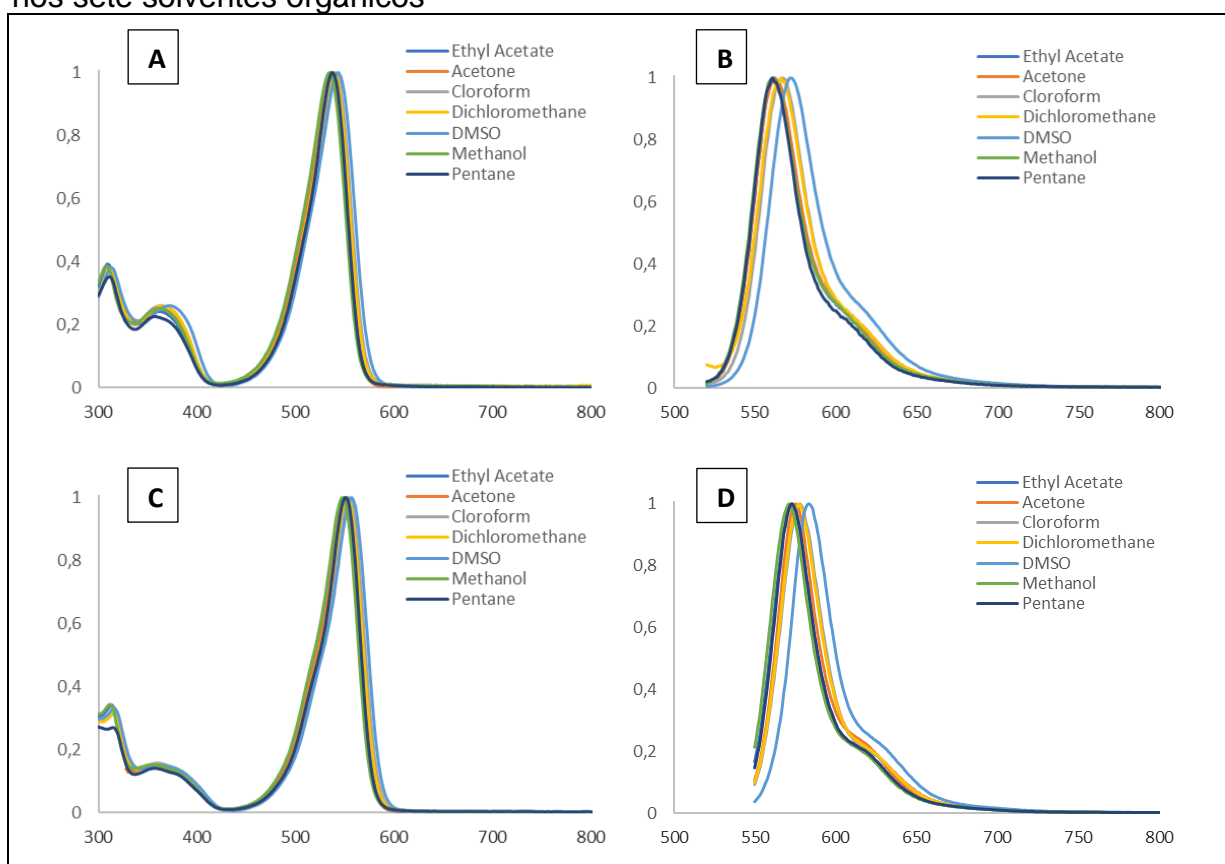
Essa observação era esperada, uma vez que os compostos foram projetados para mostrarem absorção e emissão com desvio batocrômico, devido a presença do grupo aril na posição 3 do núcleo BODIPY (REZENDE, 2013; VERBELEN *et al.*, 2015). No que tange o solvatocromismo desses compostos, pouco desvio do λ_{\max} de absorção e emissão foi observado para os diferentes solventes, o que fica claro observando os espectros (Figura 45). Interessante notar que a fluorescência em DMSO mostrou um desvio batocrômico mais relevante em relação aos demais solventes, possivelmente devido à sua alta polaridade ou viscosidade (REZENDE *et al.*, 2014).

O FWHM, é uma propriedade que reflete a largura de um pico, estimada pela largura de um pico à meia altura, mostrada na Tabela 2. Em geral, os BODIPYs possuem picos finos, e essa característica foi mantida nos dois compostos, independentemente do solvente utilizado. A importância desse pico fino está no fato de poder usar outros fluoróforos e não haver sobreposição do espectro, além do fato de se apresentar picos pontuais o que favorece a análise.

O desvio de Stokes é a diferença entre o comprimento de onda dos picos de absorção e emissão, e são geralmente pequenos para os BODIPYs. Existe interesse em preparar compostos com desvios de Stokes mais acentuados, pois um desvio de Stokes pequeno gera limitação nas medidas dos espectros dos fluoróforos devido a auto supressão da fluorescência. Alguns exemplos de BODIPYs com desvios maiores estão relatados na literatura, como um triazolil-BODIPY que apresenta desvio de Stokes próximo a 160 nm (ER, 2013), e um composto publicado pelo nosso grupo que alcançou desvios próximos a 100 nm (REZENDE, 2015).

Os compostos **1** e **2**, relatados neste documento não apresentaram desvios de Stokes tão elevados. Observou-se desvios entre 23 e 29 nm para o composto **1** e para o composto **2** a variação foi entre 22 e 26 nm, que, apesar de curtos, foram um pouco maiores do que os relatados para outros BODIPY isotiocianato, que foram próximos a 15 nm (MALATESTI, 2005).

Figura 45 – A: Composto **1** espectros de absorção UV-Vis normalizados nos sete solventes orgânicos; B: Composto **1** espectros de fluorescência normalizados nos sete solventes orgânicos; C: Composto **2** espectros de absorção UV-Vis normalizados nos sete solventes orgânicos; D: Composto **2** espectros de fluorescência normalizados nos sete solventes orgânicos



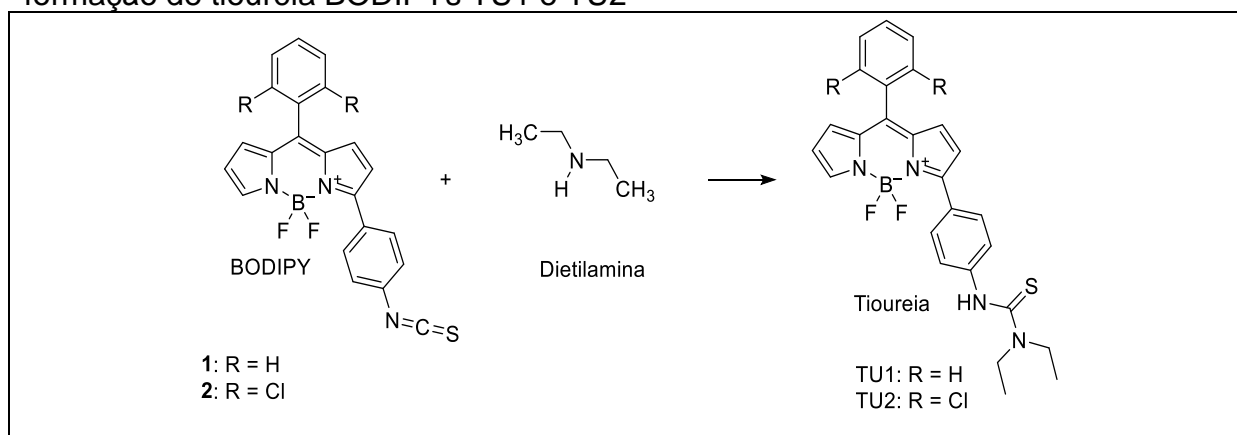
Outro dado de grande interesse para a pesquisa é o rendimento quântico de fluorescência, que reflete a eficiência de emissão dos fótons absorvidos. Essa propriedade variou pouco com os diferentes solventes (entre 0,05 e 0,13 para o composto **1** e entre 0,85 e 0,99 para o composto **2**), sabendo-se que quanto mais próximo de 1, mais eficiente é a emissão de fluorescência do composto (REZENDE, 2016).

Observou-se que os valores foram superiores para o composto **2** (próximo a 0,9) em relação ao composto **1** (inferior a 0,1), fato este esperado devido a presença dos dois átomos de cloro ligados ao anel da posição 8. Esses átomos de cloro proporcionam impedimento estérico e diminuem o relaxamento não radiativo no composto **2** (KEE *et al.*, 2005). Já foi relatado que a adição de anel aromático na posição meso (posição 8) com livre rotação acarreta em perda de energia por vias não radiativas (relaxação não radiativa) (BURGHART *et al.*, 1999; PRIETO *et al.*, 2004; KEE *et al.*, 2005) e neste trabalho pode-se verificar que o composto **1** apresentou menor rendimento quântico de fluorescência (CHEN, 2000; BOENS, 2012; REZENDE, 2013; VERBELEN *et al.*, 2015).

4.2 REAÇÃO COM DIETILAMINA

Um estudo inicial da reatividade dos compostos **1** e **2** frente a aminas orgânicas foi realizado utilizando a dietilamina. Neste experimento o grupo isotiocianato presente nos dois compostos reagiria com a amina secundária presente na dietilamina formando os derivados com o grupo tiouréia TU1 e TU2, de acordo com a reação mostrada na Figura 46. Com essa reação almejamos avaliar a reatividade das sondas fluorescentes com a dietilamina através da avaliação do produto da reação por cromatografia em camada delgada (CCD).

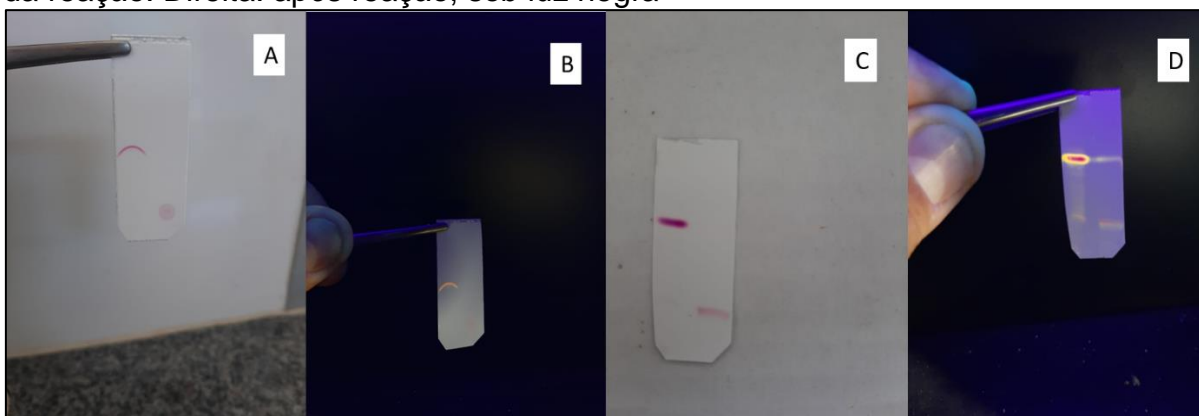
Figura 46 - Reações de teste entre os compostos **1** e **2** com dietilamina para a formação de tiouréia BODIPYs TU1 e TU2



Imediatamente após a adição da dietilamina aos balões contendo os compostos **1** e **2** foi possível observar uma alteração na aparência da solução da reação, o que é um

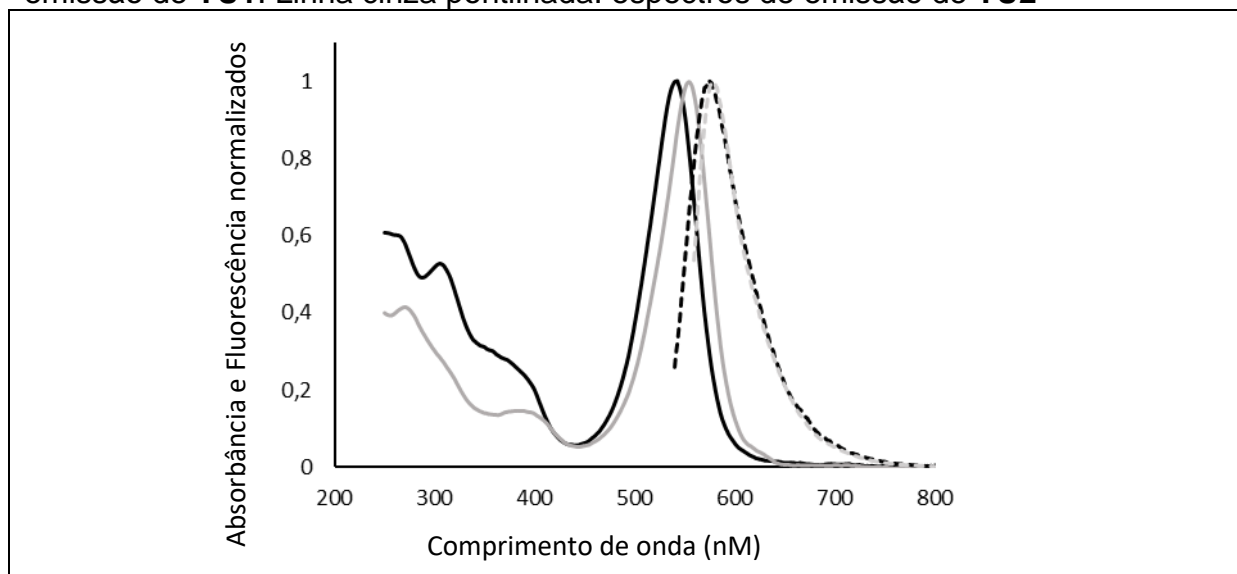
forte indicativo da ocorrência de uma reação química. Para avaliar se alguma reação química havia de fato acontecido foi feito um teste de CCD, que mostrou consumo total do material de partida em menos de 5 minutos de reação (Figura 47). A menor mobilidade do produto da reação na CCD indicou que foi formado um produto mais polar do que o material de partida, o que era esperado, dada a presença do grupo polar tiouréia nos produtos TU1 e TU2 esperados para essa reação. O resultado da CCD também indicou que os produtos da reação possuem brilho menos intenso do que os respectivos materiais de partida.

Figura 47- A: CCD do composto **1** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz branca; B: CCD composto **1** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz negra; C: CCD composto **2** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz branca; D: CCD composto **2** (ep/DCM50%) indicou conversão total em menos de 5 minutos após adição de dietilamina. Esquerda: antes da reação. Direita: após reação, sob luz negra



A menor intensidade de fluorescência observada nos experimentos de CCD foi corroborada pela avaliação visual sob luz negra das propriedades de soluções dos compostos **1** e **2** antes e depois da reação com dietilamina (Figura 48). Para o composto **1** a coloração observada sob luz branca não foi muito diferente entre ele livre e após a reação com dietilamina (Figuras 48A e 48B, respectivamente), todavia a visualização sob luz negra mostra uma óbvia redução da emissão de fluorescência do composto livre com ele após a reação com dietilamina (Figuras 48C e 48D, respectivamente). No caso do composto **2**, a alteração nas propriedades fotofísicas após a reação são claras entre ele livre e conjugado, quando os compostos são observados sob luz branca (Figuras 48E e 48F, respectivamente) e sob luz negra

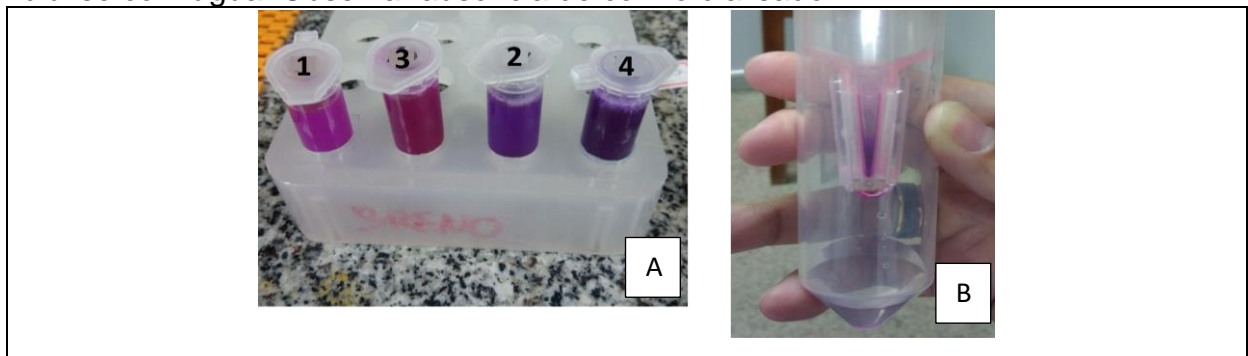
Figura 49 - Espectros de absorção e emissão dos BODIPYs contendo tiouréia, **TU1** e **TU2** em metanol. Linha preta completa: espectros de absorção de **TU1**. Linha cinza completa: espectros de absorção de **TU2**. Linha preta pontilhada: espectros de emissão de **TU1**. Linha cinza pontilhada: espectros de emissão de **TU2**



4.3 REAÇÕES DE BIOCONJUGAÇÃO

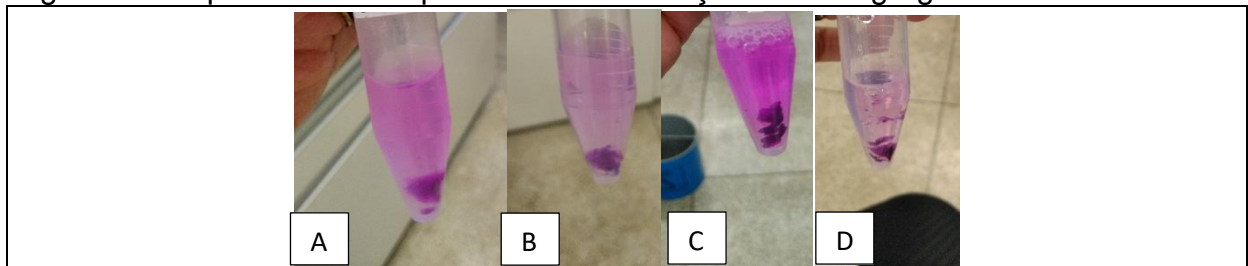
Para este trabalho, cada composto foi utilizado em reações de bioconjugação independentes com duas razões molares diferentes de fluoróforo/BSA (Tabela 1), seguidos das purificações por diálise descritas nos materiais e métodos. Inicialmente, foram realizadas as reações 1 a 4 descritas na Tabela 1, seguidas da purificação de cada uma por diálise com água destilada. Observamos que, apesar da baixa solubilidade dos fluoróforos em água, foi possível preparar soluções homogêneas com 5% do co-solvente DMSO para realização da bioconjugação (figura 50A). Todavia, a purificação por diálise pareceu pouco eficiente, uma vez que não foi possível observar a presença dos corantes fluorescentes no dialisado (figura 50B). Essa observação se deu provavelmente pela baixa solubilidade dos fluoróforos não conjugados em água, de maneira que eles permaneceram retidos, devido a formação de agregados moleculares que impediram a passagem pelos poros da membrana de diálise ou que tenham ficadas retidas na própria membrana de diálise.

Figura 50 – A: Tubos eppendorf mostrando as reações 1 a 4 (0,15 mM para reações 1 e 2, 0,375 Mm para reações 3 e 4) antes da purificação por diálise. B: Exemplo de diálise com água. Observar ausência de cor no dialisado



Após a diálise em água, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em água destilada para posterior caracterização. Mais uma vez, observamos a baixa solubilidade do produto, com a formação de um agregado insolúvel, mesmo após o uso de um banho ultrassônico (Figura 51). Essa observação pode estar relacionada com a presença de fluoróforo não conjugado na solução dos conjugados, o que reforça a hipótese de que a diálise não foi eficiente.

Figura 51 – A: Dialisado com água do composto 1 a 10 eq; B: Dialisado com água do composto 1 a 25eq; C: Dialisado com água do composto 2 a 10 eq; D: Dialisado com água do composto 2 a 25 eq. Observar a formação de um agregado insolúvel



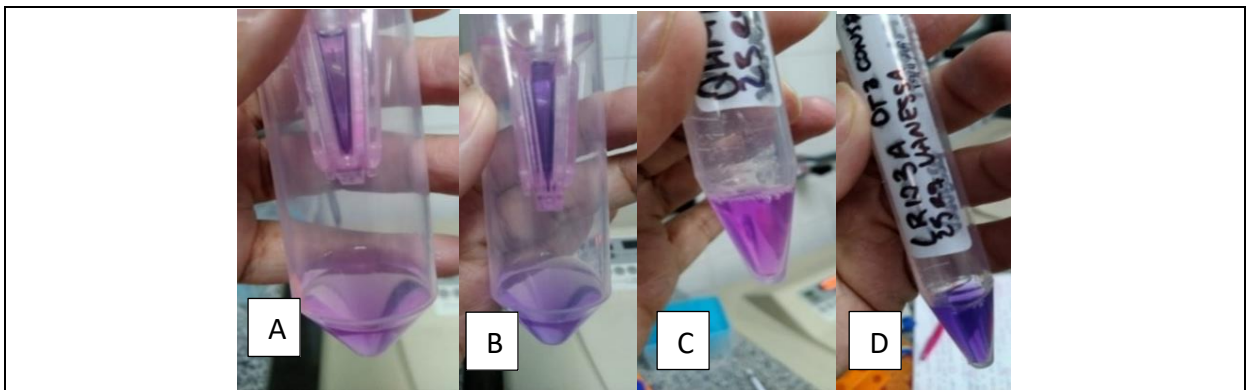
Os resultados com diálise em água nos levaram a testar protocolos de purificação utilizando etanol 70%, que solubiliza melhor o fluoróforo sem prejudicar a integridade da membrana de diálise. Inicialmente, repetiu-se as reações 1 e 2 para preparação de novos conjugados que foram dialisados com etanol 70% (Protocolo 1). Esse protocolo de diálise se mostrou mais eficiente na retirada de fluoróforos não conjugados, que pode ser observado pela presença de cor no dialisado (Figura 52A).

Figura 52 - A e B: Composto 1 conjugado com BSA e purificado com 1 etapa de etanol 70%; A1: Composto 1 retido na membrana (analito); A2: Dialisado contendo etanol e solvente; B: Composto 1 conjugado para análise



A fim de testar outro protocolo de purificação, as reações 1 a 4 foram repetidas e submetidas a três ciclos de diálise com etanol 70% (Protocolo 2). Mais uma vez pudemos observar a retirada eficiente dos fluoróforos não conjugados pela presença de cor do dialisado (Figura 53 A e B). Além disso, após liofilizadas, as amostras foram facilmente solubilizadas em água destilada, diferindo das reações submetidas a diálise em água (Figura 53 C e D). Essa observação parece mostrar que a diálise com etanol 70% possibilitou a obtenção de uma proteína marcada mais pura, sem a presença de fluoróforos não conjugados.

Figura 53 – A: Diálise da reação do composto 1 conjugado a 25 eq e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%. Observar presença de cor no dialisado; B: Diálise da reação do composto 2 conjugado a 25 eq e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%. Observar presença de cor no dialisado; C: Solução aquosa do produto conjugado obtido em uma reação com 25 eq do composto 1 e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%; D: Solução aquosa do produto conjugado obtido em uma reação com 25 eq do composto 2 e purificado com 3 etapas de lavagem com etanol 70%



4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONJUGADOS

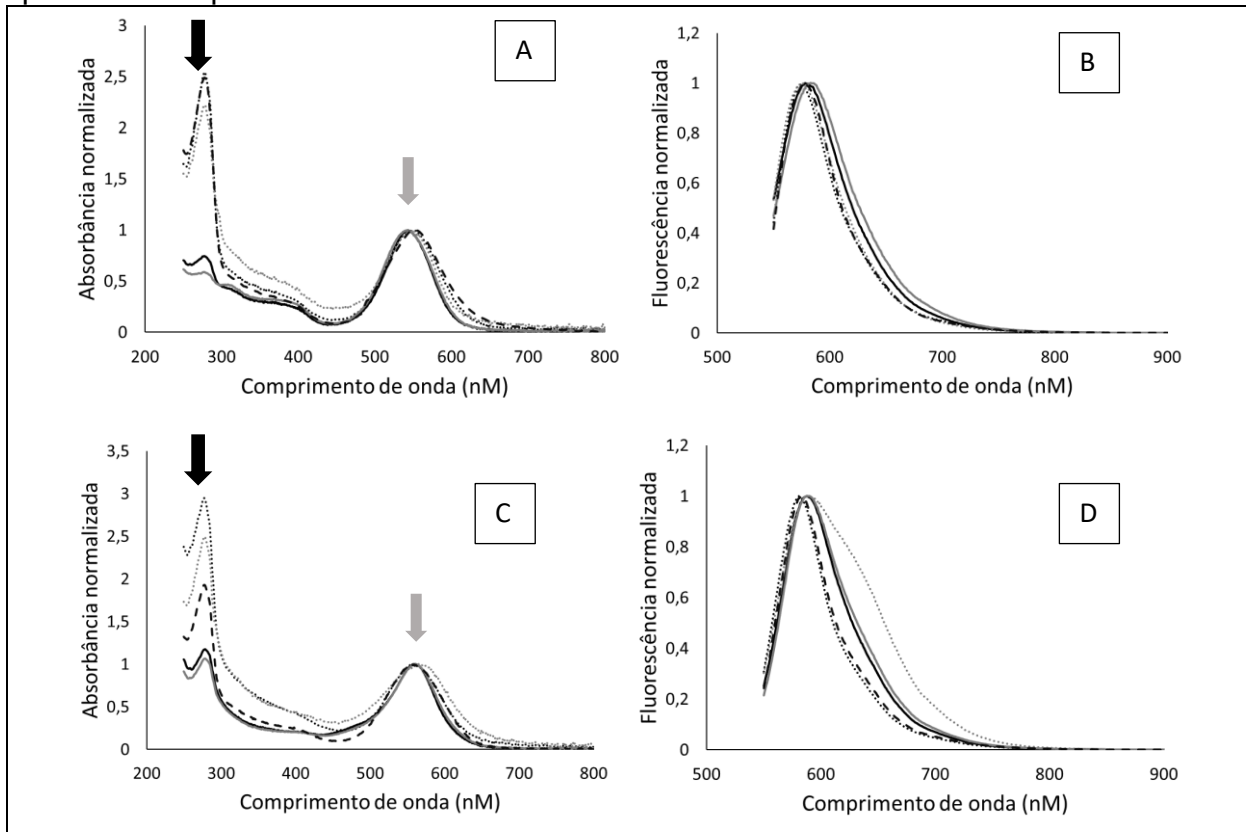
A absorção e a emissão de fluorescência dos produtos das reações de bioconjugação foram caracterizados por espectrofotometria e por espectrofluorimetria. Na figura 54 estão mostrados os espectros de absorção e emissão dos conjugados preparados com o composto **1** (Figuras 54A e 54B) e com o composto **2** (Figura 54C e 54D). Nos espectros de absorção foi possível observar a presença de uma banda em 280 nm (Figuras 54A e 54C, seta preta), referentes à proteína BSA dos conjugados. Além de uma banda referente ao BSA, observamos também a absorção dos fluoróforos conjugados, indicados nas mesmas figuras pela seta cinza. O pico dessa banda de absorção está entre 541 e 552 nm para os conjugados do composto **1** (Figura 54A, seta cinza) e entre 558 e 565 nm para os conjugados do composto **2** (Figura 54C, seta cinza). Este gráfico reforça a ocorrência da conjugação e nos permite inferir que o grupo amino-reativo serviu com o propósito ao qual foi projetado. Ao comparar a absorção dos conjugados com a dos fluoróforos livres percebe-se um leve desvio batocrômico após a conjugação, o que pode estar relacionado com a formação de tiouréia ou com os solventes utilizados para análise.

Nos espectros de emissão, foi possível observar picos entre 574 e 583 nm para os conjugados do composto **1** (Figura 54B) e entre 581 e 589 nm para os conjugados do composto **2** (Figura 54D). Semelhante ao relatado para o espectro de absorção, pode-se perceber que a conjugação resultou em leve desvio batocrômico do espectro de emissão. Como tanto absorção quanto emissão se mostraram desviadas para a direita, nenhum efeito significativo da conjugação sobre o desvio de Stokes foi notado. Os produtos da conjugação mostraram desvios de Stokes geralmente entre 25 e 35 nm, o que está dentro do esperado.

Quanto à intensidade da fluorescência, apesar de não ter se calculado o rendimento quântico de fluorescência para os conjugados BSA-BODIPY, a fluorescência foi aparentemente menos intensa quando comparada aos corantes não conjugados, uma vez que foi necessária maior abertura das fendas para registrar os espectros de fluorescência dos conjugados BSA-BODIPY. Essa intensidade menor pode estar

relacionada com interações dos BODIPYs com as proteínas ou com meio aquoso ou ainda resultar da formação da tiouréia. Mais estudos serão realizados para elucidar essa hipótese.

Figura 54 – Espectros com excitação em 530 nm. A: Espectros de absorção dos conjugados obtidos com o composto 1; B: Espectros de emissão dos conjugados obtidos com o composto 1; C: Espectros de absorção dos conjugados obtidos com o composto 2; D: Espectros de emissão dos conjugados obtidos com o composto 2. Linha preta cheia: Reação com 10 eq do fluoróforo seguida de dialise com água. Linha cinza cheia: Reação com 25 eq do fluoróforo seguida de dialise com água. Linha preta tracejada: Reação com 10 eq do fluoróforo seguida de dialise com etanol (1 ciclo). Linha preta pontilhada: Reação com 10 eq do fluoróforo seguida de dialise com etanol (3 ciclos). Linha cinza pontilhada: Reação com 25 eq do fluoróforo seguida de dialise com etanol (3 ciclos). Seta preta é referente ao pico do BSA em 280 nm e seta cinza, pico dos compostos



Na Tabela 3 estão mostrados dados referentes ao grau de marcação das proteínas com cada fluoróforo em diferentes condições e métodos de purificação. Estão relatados o coeficiente de absorptividade molar (ϵ), fator de correção (CF), o excesso de fluoróforo aplicado na reação de bioconjugação, o método de diálise utilizado para purificação e relação média de fluoróforos por molécula de proteína (relação F/P).

Tabela 3 - Aplicação dos compostos **1** e **2** na conjugação com BSA

Composto	ϵ^a	CF ^b	Excesso fluoróforo	Purificação	Relação F/P
1	36000	0,36	10 eq	Dialise água	3,24
			10 eq	Dialise álcool 1x	0,57
			10 eq	Dialise álcool 3x	0,56
			25 eq	Dialise água	5,31
			25 eq	Dialise álcool 3x	0,67
2	28000	0,44	10 eq	Dialise água	2,19
			10 eq	Dialise álcool 1x	1,07
			10 eq	Dialise álcool 3x	0,64
			25 eq	Dialise água	2,54
			25 eq	Dialise álcool 3x	0,81

^aCoefficiente de extinção molar em DMSO ($M^{-1} cm^{-1}$) ^b Fator de correção calculado a partir dos espectros de absorção dos corantes não conjugados em solução aquosa (DMSO como co-solvente).

Em geral, um grau um pouco mais elevado de marcação de proteínas foi observado quando a bioconjugação foi realizada com 25 equivalentes do fluoróforo, em comparação à conjugação com 10 eq (Tabela 3). Interessante notar que foi observada uma relação F/P mais baixa para produtos de conjugação submetidos à diálise com etanol, reforçando a hipótese de que esse processo purificação seja mais apropriado para eliminar as moléculas de fluoróforos não conjugadas. Essa hipótese está de acordo com o que foi observado durante a solubilização dos conjugados, relatado na seção 4.3.

Embora não tenha sido calculado o rendimento quântico de fluorescência para o conjugado BSA-BODIPY, foi possível observar, visualmente, uma aparente redução da intensidade de fluorescência quando comparada aos corantes não conjugados (livres). Tal fato foi confirmado ao observar a necessidade de uma maior abertura da fenda do equipamento para registrar os espectros de fluorescência dos conjugados BSA-BODIPY, não sendo necessário esta ação, quando se analisa as soluções dos corantes não conjugados com absorbância semelhante. Os resultados da reação entre os compostos **1** e **2** com dietilamina apresentados anteriormente parecem indicar que a redução da intensidade da fluorescência resultaria da alteração química do isotiocianato com formação de tiouréia, mas essa diminuição de fluorescência não se torna impedimento para a utilização dos compostos em protocolos de bioconjugação.

Os produtos de bioconjugação foram submetidos a análises de eletroforese para confirmar a ocorrência das conjugações. Em todos os géis (Figuras 55 a 57), foi possível observar as bandas fluorescentes dos conjugados de BODIPY-BSA (branco pontilhado), quando analisada no ChemiDoc sob excitação em 525 nm. Como esperado, amostras de BSA não conjugadas não mostraram banda fluorescentes no gel, apenas sendo observada após coloração do gel com Coomassie Blue. Esses resultados reforçam a conclusão de que houve conjugação entre os fluoróforos e a proteína modelo.

Figura 55 - Gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições desnaturante 1. A: Composto 1 a 10 eq em H₂O; B: Composto 1 a 25 eq em H₂O; C: Composto 2 a 10 eq em H₂O; D: Composto 2 a 25eq em H₂O; E: BSA

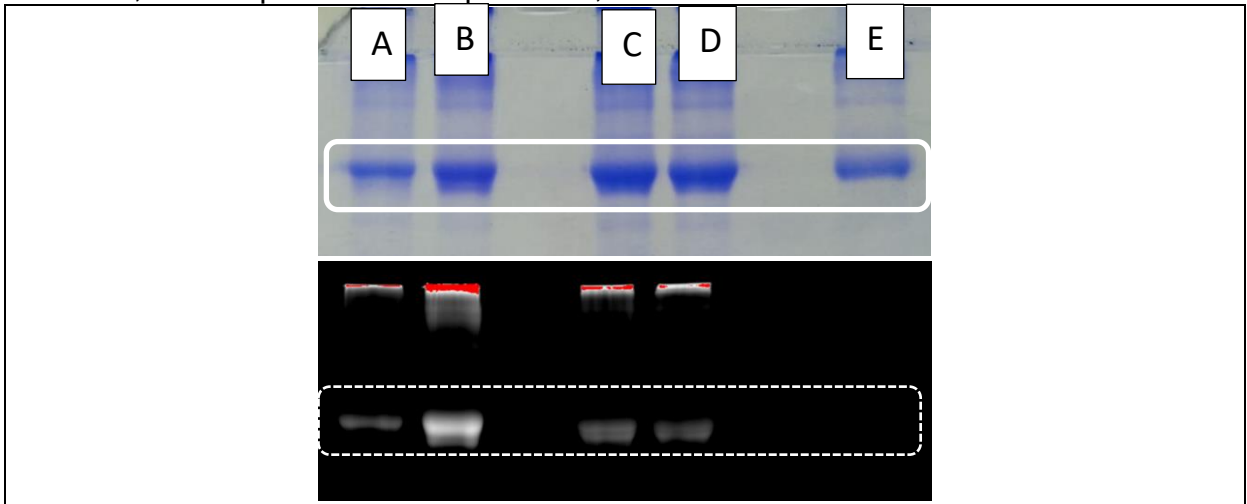


Figura 56 - Gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições desnaturante 2. A: Composto 1 a 10 eq etanol 1x; B: Composto 1 a 10 eq etanol 3x; C: Composto 2 a 10 eq etanol 1x; D: Composto 2 a 10 eq etanol 3x; E: BSA

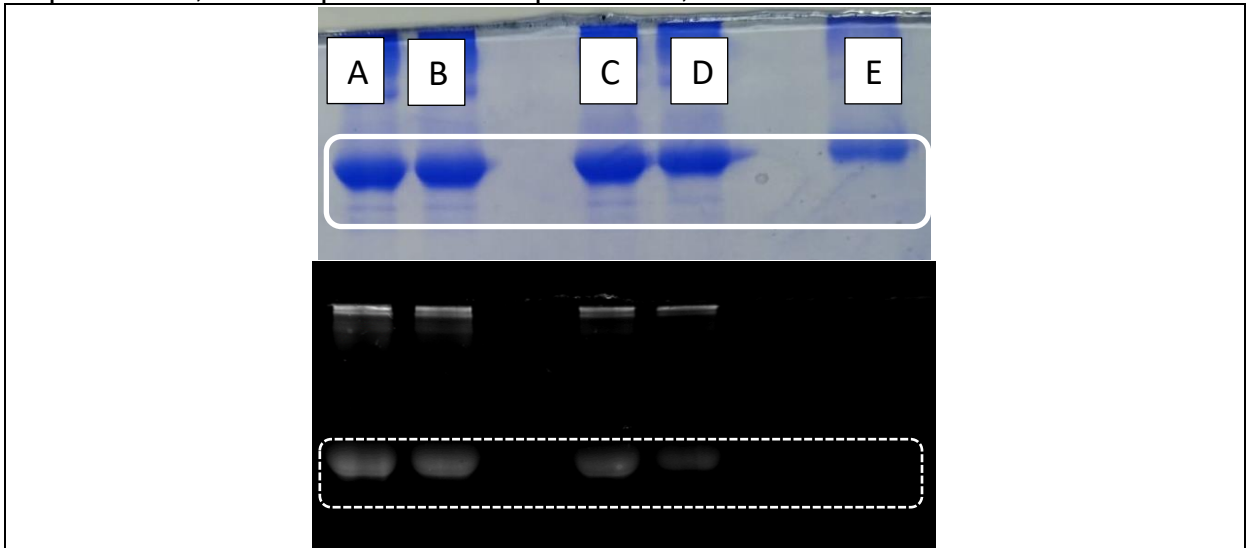
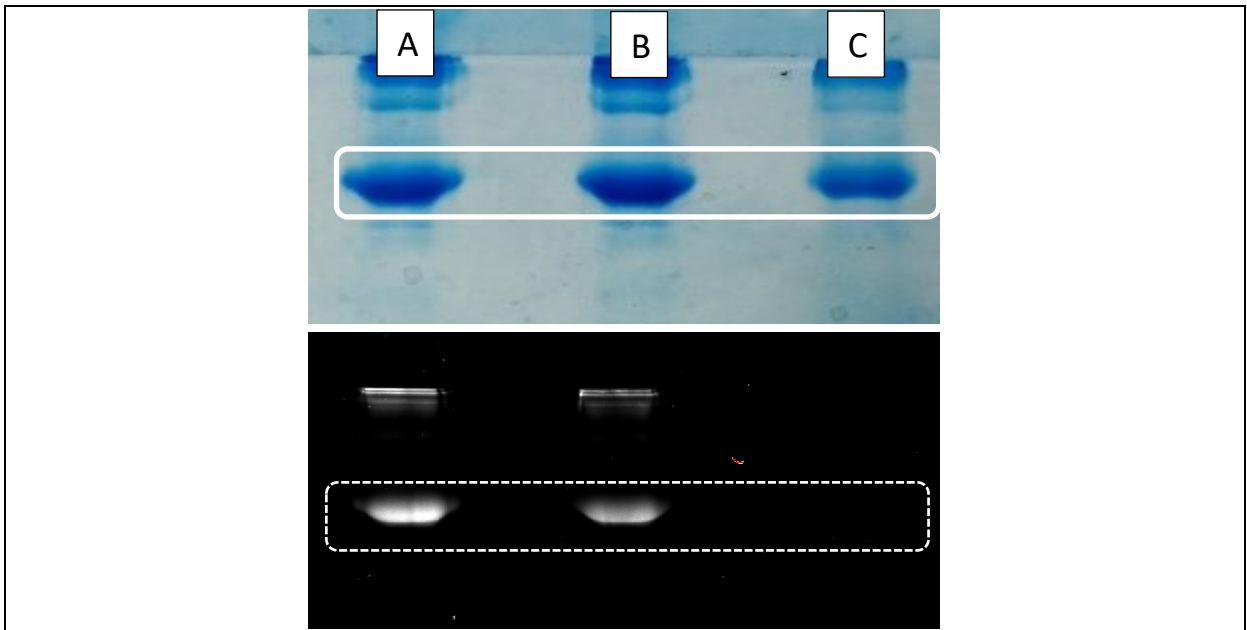


Figura 57 - Gel SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições desnaturante 3. A: Composto 1 a 25 eq etanol 3x; B: Composto 2 a 25 eq etanol 3x; C: BSA



4.5 WESTERN BLOTTING

Para avaliar a utilização do composto 2 deste trabalho como marcador de proteína em outros ensaios, o BODIPY foi previamente conjugado com o anticorpo anti-canabinoide CB₁ e purificado para eliminar moléculas de BODIPY não ligadas. A purificação do conjugado foi realizada em PBS, e a ausência de cor no dialisado (círculo vermelho na Figura 58) pode indicar que purificação não ocorreu corretamente, indicando que o fluoróforo não ligado não foi dialisado, possivelmente devido à baixa solubilidade no meio aquoso. A bioconjugação e purificação do anticorpo marcado deve ser melhor otimizada em laboratório.

Figura 58 - Purificação do conjugado anti-canabinoide CB₁ com Composto 2 (BODIPY)



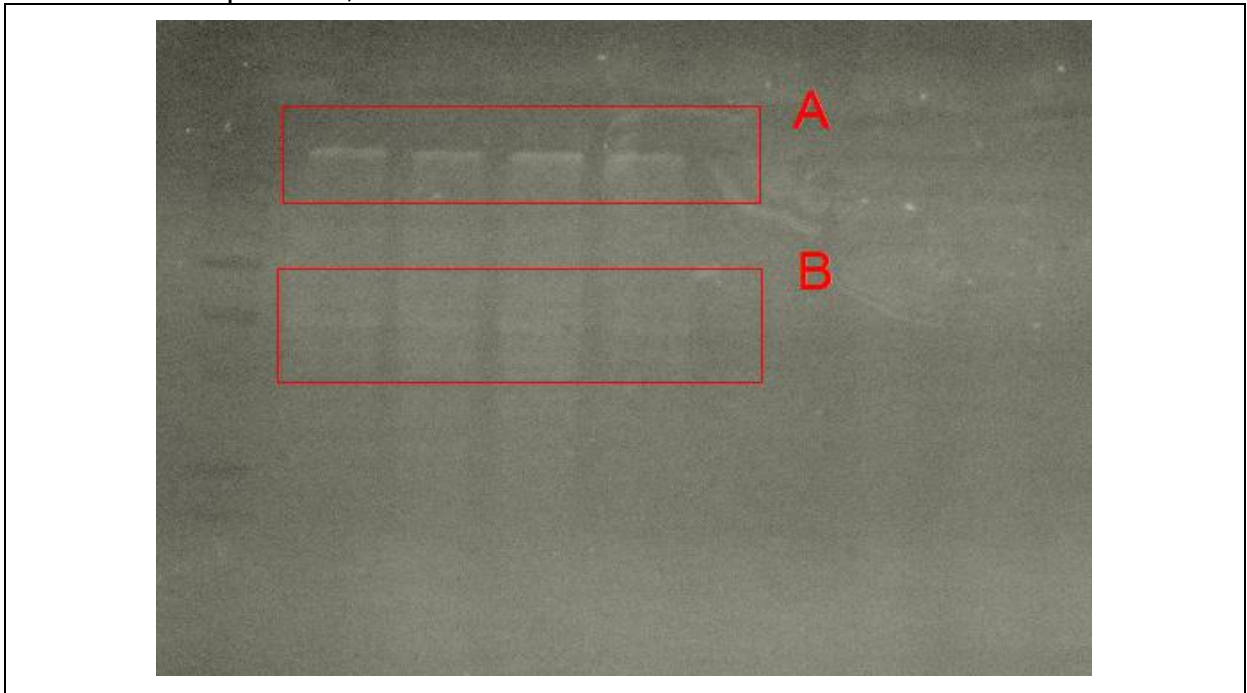
Após uma tentativa inicial de incubação da solução do BODIPY-anticorpo com a membrana, observou-se ligação inespecífica (quadro vermelho na Figura 59). Assim, realizou-se uma lavagem prévia da membrana com o metanol para que pudéssemos eliminar o excesso de fluoróforo. Essa ligação inespecífica observada na membrana pode ser resultado da presença de fluoróforo não conjugado que não foi eliminado durante a diálise, devido baixa solubilidade deles em meio aquoso.

Figura 59 - Membrana PVDF após incubação com antiCB1 conjugado com Composto 2, sendo evidenciado o excesso de fluoróforo no quadro vermelho



Após a lavagem prévia com metanol pode-se visualizar, durante a revelação do ChemiDoc, que há presença do conjugado anti-canabinoide CB₁ com BODIPY ligado a proteína canabinoide CB₁, sendo possível observar duas bandas esperadas para esta proteína (Figura 60, quadro em vermelho A com a banda de 180KDa e o quadro B a banda de 75KDa). Uma observação pertinente é a presença de *background* ou arraste, tal fato pode ser devido ao uso de um *pool* de proteínas ou por problemas durante o bloqueio da membrana ou ainda no aparato de transferência. Esse problema também poderia estar associado à baixa solubilidade do BODIPY em meio aquoso acarretando uma diálise imperfeita e formação de ligações inespecíficas.

Figura 60 - Revelação da membrana usando filtro Alexa Fluor 488, quadro A bandas de 180KDa e quadro B, bandas de 75KDa



O experimento realizado foi um teste inicial, no qual foi utilizada solução de anticorpo de concentração desconhecida. Diante disso, a conjugação foi realizada sem conhecer a relação molar fluoróforo-anticorpo, impossibilitando a padronização da bioconjugação. Para a padronização do Western Blotting, idealmente, seria necessário realizar testes de bioconjugação com soluções estoque contendo concentrações conhecidas do anticorpo, para reagir com fluoróforo em diferentes condições. Uma vez estabelecido o método de conjugação fluoróforo-anticorpo seria possível otimizar de maneira racional o experimento de Western Blotting.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho concluímos que o método de síntese proposto, resultou em dois fluoróforos que possuem espectros de absorção e emissão desviados para o vermelho quando comparados a outro fluoróforos da mesma classe funcionalizados com o grupo isotiocianato. Outra observação pertinente é a confirmação da reatividade dos BODIPYs com aminas após funcionalização com o grupo isotiocianato na posição proposta. Porém, verificou-se que a reação com aminas e formação do grupo tiouréia reduz a intensidade da fluorescência, no entanto, não elimina a fluorescência. Obtivemos êxito nos experimentos onde os compostos foram usados na conjugação com proteína, de maneira que esses dois compostos podem encontrar aplicações em diferentes áreas. No entanto, para a utilização com conjugação para Western Blotting ainda serão necessários mais estudos. O grupo de pesquisa continuará realizando testes de aplicação destes e de outro fluoróforos visando o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes.

Para os dois compostos apresentados nessa dissertação de mestrado ainda planejamos realizar estudos visando otimizar a sua aplicação em ensaios de imunofluorescência. Cabe salientar que um dos principais problemas enfrentados neste trabalho foi a baixa solubilidade dos dois compostos em soluções aquosas, o que dificulta a utilização em bioconjugação e sua purificação, ainda que não impossibilite seu uso. Nesse contexto, outra perspectiva do grupo de pesquisa para dar continuidade nessa linha de pesquisa é inserir grupos funcionais com cargas a fim de aumentar a hidrossolubilidade dos compostos, dentre os quais podemos citar sulfonatos, sais quaternários de amônio (NIU *et al.*, 2009)

BIBLIOGRAFIA

- ACUÑA, A. U.; AMAT-GUERRI, F. Early history of solution fluorescence: the Lignum nephriticum of Nicolás Monardes. In: **Fluorescence of supermolecules, polymers, and nanosystems**. Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 3-20.
- ANDERSON, G. W.; ZIMMERMAN, J. E.; CALLAHAN, F. M. The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 86, n. 9, pp. 1839-1842, 1964.
- AZZAZY, H. M. E.; MANSOUR, M. M.H.; KAZMIERCZAK, S. C. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, pp. 1238-1246, 2006.
- BALDASSO, Camila. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13453/000640939.pdf?>. Acesso em: 15 ago. 2019.
- BARUAH, M.; QIN, W.; FLORS, C.; HOFKENS, J.; VALLE´E, R. A. L.; BELJONNE, D.; VAN DER AUWERAER, M.; DE BORGGRAEVE, W. M.; BOENS, N. Solvent and pH dependent fluorescent properties of a dimethylaminostyryl borondipyrromethene dye in solution. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 18, pp. 5998-6009, 2006.
- BERGSTRÖM, F.; MIKHALYOV, I.; HÄGGLÖF, P.; WORTMANN, R.; NY, T.; JOHANSSON, L. B. Å. Dimers of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) with light spectroscopic applications in chemistry and biology. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 124, n. 2, pp. 196-204, 2002.
- BOENS, N.; LEEN, V.; DEHAEN, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 3, pp. 1130–1172, 2012. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cs/c1cs15132k#!divAbstract>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- BREWSTER, D. On the decomposition and dispersion of light within solid and fluid bodies. **Trans Roy Soc Edinburg**, v. 16, n. II, pp. 111–121, 1846.
- BROUWER, A.M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution. **Pure Appl. Chem.**, v. 83, n. 12, pp. 2213–2228, 2011.
- BURGESS, K. *et al.* New chemistry of BODIPY dyes and BODIPY dye cassettes featuring through-bond energy transfer. In: **Advances in nucleic acid and protein analyses, manipulation, and sequencing**. International Society for Optics and Photonics, 2000, pp. 95-105.

BURGHART, A.; KIM, H.; WELCH, M. B., THORESEN, L. H.; REIBENSPIES, J.; BURGESS, K. 3, 5-Diaryl-4, 4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes: synthesis, spectroscopic, electrochemical, and structural properties. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 64, n. 21, pp. 7813-7819, 1999.

CHEN, J.; BURGHART, A.; DERECSKEI-KOVACS, A.; BURGESS, K. 4, 4-Difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes modified for extended conjugation and restricted bond rotations. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 65, n. 10, pp. 2900-2906, 2000.

CHENG, Z., KURU, E., SACHDEVA, A., & VENDRELL, M. Fluorescent amino acids as versatile building blocks for chemical biology. **Nature Reviews Chemistry**, v. 4, pp. 275-290, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41570-020-0186-z>. Acesso em: 29 jun. 2020.

COONS, A. H.; KAPLAN, M. H. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 91, n. 1, pp. 1-13, 1950.

DENISSEN, W.; WINNE, J. M.; DU PREZ, F. E. Vitrimers: permanent organic networks with glass-like fluidity. **Chemical science**, v. 7, n. 1, pp. 30-38, 2016.

DIAS, D. L. **Espectroscopia de fluorescência aplicada ao estudo das interações de formação de nanoestruturas de peptídeos contendo maguemita**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/3954/2/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Diogo%20Lopes%20Dias%20-%202014.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2020

EDMAN, P. Preparation of Phenyl Thiohydantoins from Some Natural Amino Acids. **Acta Chem. Scand**, v. 4, pp.277-282, 1950. Disponível em: http://actachemscand.org/pdf/acta_vol_04_p0277-0282.pdf. Acesso em: 12 out. 2019.

ER, J. C.; TANG, M. K.; CHIA, C. G.; LIEW, H.; VENDRELL, M.; CHANG, Y.T. MegaStokes BODIPY-triazoles as environmentally sensitive turn-on fluorescent dyes. **Chemical Science**, v. 4, n. 5, p. 2168, 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/sc/c3sc22166k#!divAbstract>. Acesso em: 30 ago. 2019.

ERNST, L. A.; GUPTA, R. K.; MUJUMDAR, R. B.; WAGGONER, A.S. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. **Cytometry**, v. 10, n. 1, pp. 3-10, 1989.

FREDY, J. W. *et al.* Diverted Natural Lossen-type Rearrangement for Bioconjugation through in Situ Myrosinase-Triggered Isothiocyanate Synthesis. **Bioconjugate chemistry**, v. 30, n. 5, pp. 1385-1394, 2019.

FU, Y.; ZHANG, J.; LAKOWICZ, J. R. Metal-enhanced fluorescence of single green fluorescent protein (GFP). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 4, pp. 712-717, 2008

GHOSH, S. S.; KAO, P. M.; MCCUE, A. W.; CHAPPELLE, H. L. Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide– enzyme conjugate hybridization probes. **Bioconjug. Chem.**, v. 1, n. a, pp. 71-76, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2128871/>. Acesso em: 14 jan. 2020.

HARTING, M. T.; JIMENEZ, F.; COX, C. S. Isolation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Green Fluorescent Protein Positive (GFP+) Transgenic Rodents: the grass is not always green(er). **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 1, pp. 127-136, 2009.

HAUGLAND, R. P.; KANG, H.C. Chemically reactive Dipyrromethene boron Difluoride Dyes. **U.S. Patent**, n. 4, pp. 774,339, 1988.

HAUGLAND, R. P.; KANG, H. C. Long wavelength heteroaryl-substituted dipyrrometheneboron difluoride dyes. **U.S. Patent**, n. 5, 1993. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US5248782A/en>. Acesso em: 12 ago. 2019.

HEID, C. A.; STEVENS, J; LIVAK, K. J; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, pp. 986-994, 1996. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/01da/2a478dc9d5399c13785cd077f130b430e8.pdf>. Acesso em: 29 ago 2019.

HEIKAL, A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. **Biomark Med.**, v. 4, n. 2, pp. 241-63, 2010.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 2. ed. Waltham: Academic Press, 2008.

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

HERSCHEL, J. F. W. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 1845, pp. 143-145.

HINKELDEY, B.; SCHMITT, A.; JUNG, G. Comparative photostability studies of BODIPY and fluorescein dyes by using fluorescence correlation spectroscopy. **ChemPhysChem**, v. 9, n. 14, pp. 2019-2027, 2008.

HOOGENDOORN, S. *et al.* Synthesis of pH-activatable red fluorescent BODIPY dyes with distinct functionalities. **Organic letters**, v. 13, n. 20, pp. 5656-5659, 2011.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/goldbook>. Acesso em: 01 nov. 2020.

JABLONSKI, A. Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes. **Nature**, v. 131, pp. 839-840, 1933. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/131839b0>. Acesso em: 12 set. 2019.

JABLONSKI, A. Über die Stoßverbreiterung der Spektrallinien und den Energieaustausch bei Zusammenstößen. **Zeitschrift für Physik**, v. 70, n. 11-12, pp. 723-732, 1931.

JIAO, L.; PANG, W.; ZHOU, J.; WEI, Y.; MU, X.; BAI, G.; HAO, E. Regioselective stepwise bromination of boron dipyrromethene (BODIPY) dyes. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 76, n. 24, pp. 9988-9996, 2011.

JOBAGY, A.; KIRALY, K. Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate–protein conjugates. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 124, n. 1, pp. 166-175, 1966. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304416566903254>. Acesso em: 14 out. 2019.

JOHNSON, I.D. **Molecular Probes Handbook**: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 11. ed. Life Technologies Corporation: 2010.

KAROLIN, J.; JOHANSSON, L. B. A.; STRANDBERG, L.; NY, T. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, n. 17, pp. 7801-7806, 1994. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00096a042>. Acesso em: 14 set. 2019.

KEE, H. L.; KIRMAIER, C.; YU, L.; THAMYONGKIT, P.; YOUNGBLOOD, W.J.; CALDER, M.E.; RAMOS, L.; NOLL, B.C.; BOCIAN, D.F.; SCHEIDT, W.R.; BIRGE, R.R.; LINDSEY, J.S.; HOLTEN, Dewey (2005). Structural Control of the Photodynamics of Boron–Dipyrin Complexes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 43, pp. 20433–20443, 2005.

KNIGHT, J. G.; ALNOMAN, R. B.; WADDELL, P. G. Synthesis of 3-aminoBODIPY dyes via copper-catalyzed vicarious nucleophilic substitution of 2-halogeno derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 12, pp. 3819-3829, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, pp. 680-685, 1970.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Springer Science & Business Media: 2006.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer Science & Business Media: 2013.

LAKOWICZ, J. R. Long wavelength long lifetime luminophores. **U.S. Patent n. 7**, 2009. Disponível em: <https://patents.justia.com/patent/7566783>. Acesso em: 12 nov. 2019.

LAKSHMI, V.; RAVIKANTH, M. Polyarylated boron-dipyrromethenes containing three different types of aryl groups. **RSC Advances**, v. 4, n. 84, pp. 44327-44336, 2014.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente compatíveis? **Scientia Chromatographica**, Jardim Paraíso, v. 1, n. 2, pp.

35-61, 2009. Disponível em: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a4.pdf>. Acesso em: 14 out. 2019.

LEEN, V. *et al.* 1,7-Disubstituted boron dipyrromethene (BODIPY) dyes: synthesis and spectroscopic properties. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 76, n. 20, pp. 8168-8176, 2011.

LEEN, V. *et al.* 2-and 3-Monohalogenated BODIPY Dyes and Their Functionalized Analogues: Synthesis and Spectroscopy. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2011, n. 23, pp. 4386-4396, 2011.

LEEN, V. *et al.* Direct functionalization of BODIPY dyes by oxidative nucleophilic hydrogen substitution at the 3-or 3, 5-positions. **Chemical Communications**, v. 46, n. 27, pp. 4908-4910, 2010.

LEEN, V.; VAN DER AUWERAER, M.; BOENS, N.; DEHAEN, W. Vicarious nucleophilic substitution of α -Hydrogen of BODIPY and its extension to direct ethenylation. **Org Lett**, v. 13, pp. 1470-1473, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol200148u>. Acesso em: 5 dez. 2019.

LEEN, V.; YUAN, P.; WANG, L.; BOENS, N.; DEHAEN, W. Synthesis of meso-halogenated BODIPYs and access to meso-substituted analogues. **Organic Letters**, v. 14, n. 24, pp. 6150-6153, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ol3028225>. Acesso em: 5 fev. 2020.

LI, L. *et al.* Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 73, n. 5, pp. 1963-1970, 2008.

LI, X.; HUANG, S.; HU, Y. Diversity-oriented derivatization of BODIPY based on regioselective bromination. **Organic & Biomolecular Chemistry**, UK, v. 10, n. 12, pp. 2369-2372, 2012. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/OB/c2ob07004a#!divAbstract>. Acesso em: 5 fev. 2020.

LORTHIOIS, Ana Paula de Almeida Aranha. **Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b com toxóide tetânico**. 2008. 152 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05012009-132129/publico/AnaPaulaAlmeidaAranhaLorthiois_Doutorado.pdf. Acesso em: 15 jan. 2020.

LOUDET, A.; BURGESS, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, pp. 4891-4932, 2007.

LUIZ, F. C. L. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2009.

MACIEL, K. M. **Estudos químicos de extratos bioativos de piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.)**. 2018. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018. Disponível em: https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/6665/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Karen%20Maciel%20PPGQ. Acesso em: 4 nov. 2019.

MALATESTI, N.; HUDSON, R.; SMITH, K.; SAVOIE, H.; WELHAM, K.; BOYLE, R.W. Isothiocyanato Boron Dipyrromethenes: the first BODIPY analogues of fluorescein isothiocyanate. **Photochem Photobiol**, v. 82, n. 3, pp. 746-749, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16789844/>. Acesso em: 22 ago. 2019.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, pp. 111-117, 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 22 jan. 2020.

MATSUMOTO, T. *et al.* A thiol-reactive fluorescence probe based on donor-excited photoinduced electron transfer: key role of ortho substitution. **Organic letters**, v. 9, n. 17, pp. 3375-3377, 2007.

MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nat. Mater.**, v. 4, pp. 435-446, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmat1390>. Acesso em: 18 out. 2019.

MELTOLA, N. J.; SOINI, Aleksi E.; HÄNNINEN, Pekka E. Syntheses of novel dipyrromethene-BF 2 dyes and their performance as labels in two-photon excited fluoroimmunoassay. **Journal of Fluorescence**, v. 14, n. 2, pp. 129-138, 2004.

MELTOLA, N. J.; WAHLROOS, Rina; SOINI, Aleksi E. Hydrophilic labeling reagents of dipyrromethene-BF 2 dyes for two-photon excited fluorometry: Syntheses and photophysical characterization. **Journal of fluorescence**, v. 14, n. 5, pp. 635-647, 2004.

MONARDES, Nicolas. **Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en medicina**. Sevilla, 1565 (edición de 1574).

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Database**. BODIPY Isothiocyanate, CID=45038425. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bodipy-Isothiocyanate>. Acesso em: 18 fev. 2020.

NIU, S. L. *et al.* Water-soluble BODIPY derivatives. **Organic letters**, v. 11, n. 10, p. 2049-2052, 2009.

OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; de OLIVEIRA, G. K; TREICHEL, T. L. E.; SALBEGO, F. Z. Marcadores fluorescentes coloidais: conceitos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, pp. 1043–1050, 2011.

ORTIZ, M. J.; AGARRABEITIA, A. R.; DURAN-SAMPEDRO, G.; PRIETO, J. B.; LOPEZ, T. A.; MASSAD, W. A.; MONTEJANO, H. A.; GARCÍA, N.A.; ARBELOA, I. L. Synthesis and functionalization of new polyhalogenated BODIPY dyes. Study of their photophysical properties and singlet oxygen generation. **Tetrahedron**, v. 68, n. 4, pp. 1153-1162, 2012.

PALLIYAGURU, Dushani L. *et al.* Isothiocyanates: Translating the power of plants to people. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 18, p. 1700965, 2018.

PATTERSON, G.H.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Selective photolabeling of proteins using photoactivatable GFP. **Methods**, v. 32, pp. 445-450, 2004.

PODHRADSKÝ, D.; DROBNICA, Ľ.; KRISTIAN, P. Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione, coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. **Experientia**, v. 35, n. 2, pp. 154-155, 1979.

PRIETO, J. B.; ARBELOA, F. L.; MARTINEZ, V. M.; LOPEZ, T. A.; AMAT-GUERRI, F.; LIRAS, M.; ARBELOA, I. L. Photophysical properties of a new 8-phenyl analogue of the laser dye PM567 in different solvents: internal conversion mechanisms. **Chem Phys Lett**, v. 385, n.1–2, pp. 29–35, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.076>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

RAMOS, Rodrigo Ricardo. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo.** 2014. 84 f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-30122014-111737/publico/DISS_Rodrigo_Ricardo_Ramos.pdf. Acesso em: 15 fev. 2020.

RANA, T. M.; MEARES, C. F. Specific cleavage of a protein by an attached iron chelate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 6, pp. 2457-2458, 1990.

RAYO, J. *et al.* Live cell labeling of native intracellular bacterial receptors using aniline-catalyzed oxime ligation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 19, pp. 7469-7475, 2011.

REZENDE, L.C.D.; EMERY, F.S. A Review of the Synthetic Strategies for the Development of BODIPY Dyes for Conjugation with Proteins. **Orbital: Electron. J. Chem.**, v. 5, n. 1, pp. 62-83, 2013.

REZENDE, Lucas Cunha Dias *et al.* Synthesis, photophysical properties and solvatochromism of meso-substituted tetramethyl BODIPY dyes. **Journal of fluorescence**, v. 24, n. 1, p. 257-266, 2014.

REZENDE, L. C. D. **Síntese caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY.** 2016. 172 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-23052016-103608/publico/Tese_Completa_corrigeida.pdf. Acesso em: 29 set. 2018.

RIFAI, A.; WONG, S. S. Preparation of phosphorylcholine-conjugated antigens. **Journal of immunological methods**, v. 94, n. 1-2, pp. 25-30, 1986.

RIGGS, J. L. *et al.* Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. **The American journal of pathology**, v. 34, n. 6, p. 1081, 1958.

ROHAND, T. *et al.* Functionalization of fluorescent BODIPY dyes by nucleophilic substitution. **Chemical Communications**, n. 3, pp. 266-268, 2006.

ROMEO, Letizia *et al.* Isothiocyanates: An overview of their antimicrobial activity against human infections. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 624, 2018.

SANTOS, N. V. *et al.* Avaliação de proteínas fluorescentes por espectrofluorescência tridimensional (3D). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 38, 2017.

SCHADE, S. Z. *et al.* BODIPY- α -Casein, a pH-independent protein substrate for protease assays using fluorescence polarization. **Analytical biochemistry**, v. 243, n. 1, pp. 1-7, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8954519/>. Acesso em: 12 out. 2019.

SETHNA, S. M.; SHAH, N. M. The Chemistry of Coumarins. **Chemical Reviews**, v. 36, n. 1, pp. 1-62, 1945.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea, **Journal of Cell and Comparative Physiology**, v. 59, pp. 223-229, 1962.

SHIMOMURA, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein, **Journal of Microscopy-Oxford**, v. 2017, pp. 3-15, 2005.

SMITH, A. M.; DAVE, S.; NIE, S.; TRUE, L.; GAO, X. **Expert Rev. Mol. Diagn**, v. 6, pp. 231-234, 2006. Acesso em: 10 jan. 2020.

SMYTHE, C. V. The reaction of iodoacetate and of iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 114, n. 3, pp. 601-612, 1936.

STREIT, Nivia Maria *et al.* As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

STOKES, G. G. On the change of refrangibility of light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, Londres, v. 142, pp. 463-562, 1852. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstl.1852.0022>. Acesso em: 20 nov. 2019.

TANG, M.; TENG, P.; LONG, Y. *et al.* Hollow carbon dots labeled with FITC or TRITC for use in fluorescent cellular imaging. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 4, p. 223, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-018-2761-2>. Acesso em: 15 dez. 2019.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Bioconjugation technical handbook**: reagents for crosslinking, immobilization, modification, biotinylation, and fluorescent labeling of proteins and peptides. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/COL06007-Bioconjugation-Handbook-Global.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2020.

THOMPSON, V. F. *et al.* A BODIPY fluorescent microplate assay for measuring activity of calpains and other proteases. **Analytical biochemistry**, v. 279, n. 2, pp. 170-178, 2000.

TREIBS, A.; KREUZER, F. H. Difluorboryl-Komplexe von Di-und Tripyrrylmethenen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 718, n. 1, pp. 208-223, 1968. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jlac.19687180119>. Acesso em: 18 jan. 2020.

TRZESNIAK, D. R. F. **Modelagem quântica de inibidores enzimáticos**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física, USP, São Paulo, 2002. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-26062002-143722/pt-br.php>. Acesso em: 2 fev. 2020.

ULRICH, G.; ZIESSEL, R.; HAEFELE, A. A general synthetic route to 3, 5-substituted boron dipyrromethenes: applications and properties. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 77, n. 9, pp. 4298-4311, 2012.

ULRICH, G.; ZIESSEL, R.; HARRIMAN, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 7, pp. 1184-1201, 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200702070>. Acesso em: 20 fev. 2020.

UMEZAWA, K.; CITTERIO, D.; SUZUKI, K. New trends in near-infrared fluorophores for bioimaging. **Analytical Sciences**, v. 30, n. 3, pp. 327-349, 2014.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular fluorescence**: principles and applications. John Wiley & Sons, 2012.

VALEUR, Bernard. **Molecular Fluorescence**: principles and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.

VERBELEN, B.; BOODTS, S.; HOFKENS, J.; BOENS, N.; DEHAEN W. Radical C-H Arylation of the BODIPY Core with Aryldiazonium Salts: Synthesis of Highly Fluorescent Red-Shifted Dyes. **Angew Chem Int Ed**, Frankfurt, v. 54, n. 15, pp. 4612-46169, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/anie.201410853>>. Acesso em: 18 out. 2019.

VERBELEN, B.; Leen, V.; Wang, L.; Boens, N.; Dehaen, W. Direct palladium-catalysed C-H arylation of BODIPY dyes at the 3-and 3, 5-positions. **Chemical Communications**, v. 48, n. 73, pp. 9129-9131, 2012. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cc/c2cc34549h#!divAbstract>. Acesso em: 18 out. 2019.

VERBELEN, B.; REZENDE, L. C. D.; BOODTS, S.; JACOBS, J.; VAN MEERVELT, L.; HOFKENS, J.; DEHAEN, W. Radical C–H Alkylation of BODIPY Dyes Using Potassium Trifluoroborates or Boronic Acids. **Chemistry A European Journal**, UK, v. 21, n. 36, pp. 12667–12675, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/chem.201500938>>. Acesso em: 19 out. 2019.

VIRA, S.; MEKHEDOV, E.; HUMPHREY, G.; BLANK, P. S. Fluorescent-labeled antibodies: balancing functionality and degree of labeling. **Analytical Biochemistry**, v. 402, n. 2, pp.146–150, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269710002046>. Acesso em: 11 dez. 2019.

WAN, C. W.; BURGHART, A.; CHEN, J.; BERGSTRÖM, F.; JOHANSSON, L. B. Å.; WOLFORD, M. F.; BURGESS, K. Anthracene–BODIPY cassettes: syntheses and energy transfer. **Chemistry A European Journal**, UK, v. 9, n. 18, pp. 4430-4441, 2003.

WANG, C. *et al.* Tuning the optical properties of BODIPY dye through Cu (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction. **Science China Chemistry**, v. 55, n. 1, pp. 125-130, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11426-011-4452-2>. Acesso em: 13 dez. 2019.

WANG, D.; Fan, J.; Gao, X.; Wang, B.; Sun, S.; Peng, X. Carboxyl BODIPY dyes from bicarboxylic anhydrides: one-pot preparation, spectral properties, photostability, and biolabeling. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 74, n. 20, p. 7675-7683, 2009. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo901149y>. Acesso em: 15 jan. 2020.

WANG, L. *et al.* Regioselective 2, 6-dihalogenation of BODIPYs in 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol and preparation of novel meso-alkyl polymeric BODIPY dyes. **RSC Advances**, v. 3, n. 24, pp. 9219-9222, 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/ra/c3ra41298a#!divAbstract>. Acesso em: 12 jan. 2020.

WANG, P.; GIESE, R. W. Phosphate-specific fluorescence labeling with BO-IMI: reaction details. **Journal of Chromatography A**, v. 809, n. 1-2, pp. 211-218, 1998.

WANG, P.; GIESE, R. W. Phosphate-specific fluorescence labeling under aqueous conditions. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 23, pp. 3518-3520, 1993.

WIRTZ, M.; GRÛTER, A. A.; REBMANN, P.; DIER, T.; VOLMER, D. A.; HUCHC, V.; JUNG, G. Two-color emissive probes for click reactions. **Chemical Communications**, v. 50, n. 84, pp. 12694-12697, 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/cc/c4cc05288a#!divAbstract>. Acesso em: 25 jan. 2020.

WISCHKE, C.; BORCHERT, H.-H. Fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) as a model protein drug: opportunities and drawbacks. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 9, pp. 770-774, 2006. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/17020153>. Acesso em: 12 fev. 2020.

WORIES, H. J.; KOEK, J. H.; LODDER, G.; LUGTENBURG, J. A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3, 3', 5, 5'-tetramethyl-2, 2'-pyrromethen-1, 1'-BF₂ complex. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 104, n. 11, pp. 288-291, 1985. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/recl.19851041104>. Acesso em: 5 mar. 2020.

WU, L.; BURGESS, K. A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes. **Chemical Communications**, n. 40, pp. 4933-4935, 2008. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/cc/b810503k#!divAbstract>. Acesso em: 2 jan. 2020.

XIONG, Xu-Jie *et al.* 1, 3, 5, 7-Tetramethyl-8-aminozide-difluoroboradiaza-s-indacene as a new fluorescent labeling reagent for the determination of aliphatic aldehydes in serum with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, pp. 49-56, 2010.

YANG, J. *et al.* Characterization of the pH of folate receptor-containing endosomes and the rate of hydrolysis of internalized acid-labile folate-drug conjugates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 2, pp. 462-468, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289839/>. Acesso em: 5 fev. 2020.

ZAHN, H.; MEINHOFFER, J. Reactions of 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene with insulin. **Makromol. Chem.** v. 26, n. 153, 1958.

ZHANG, M. *et al.* Synthesis of pyrrolyldipyrrinato BF₂ complexes by oxidative nucleophilic substitution of boron dipyrromethene with pyrrole. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 10, pp. 2139-2145, 2012.

ZHAO, C.; WANG, X.; CAO, J.; FENG, P.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; YANG, Y. BODIPY-based sulfoxide: synthesis, photophysical characterization and response to benzenethiols. **Dyes and Pigments**, v. 96, n. 2, pp. 328-332, 2013. Disponível em: <http://pdf.xuebalib.com:1262/xuebalib.com.35066.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2020.

ZHU, S. *et al.* Controlled Knoevenagel reactions of methyl groups of 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY dyes for unique BODIPY dyes. **RSC Advances**, v. 2, n. 2, pp. 404-407, 2012. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/ra/c1ra00678a#!divAbstract>. Acesso em: 28 out. 2019.

ZIESEL, R.; BONARDI, L.; RETAILLEAU, P.; ULRICH, G. Isocyanate-, Isothiocyanate-, Urea-, and Thiourea-Substituted Boron Dipyrromethene Dyes as Fluorescent Probes. **J Org Chem**, v. 71, n. 8, pp. 3093-3102, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jo0600151>. Acesso em: 20 jan. 2020.

ZUÑIGA, A. D. G. *et al.* Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, pp. 61-82, 2003. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1149/950>. Acesso em: 4 jan. 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A - 1. RESUMO APRESENTADO NO ENCAQUI DE 2019

VII Encontro Capixaba de Química - SBQ / ES – ENCAQUI

2019

Caracterização de dois novos fluoróforos derivados do BODIPY e sua aplicação em bioconjugação.

Vanessa G. Amorim^{1*}, Shaiani M. G. Melo⁴, Ruan F. Leite², Paulo Arthur Coutinho¹, André R. Silva³, Fernanda G. Amorim³, Juliana B. C. Gonçalves³, Flavio S. Emery⁴, Lucas C. D. Rezende³.

*nessa.gobbi@gmail.com

¹ Universidade Federal do Espírito Santo (PG)

² Universidade Federal do Espírito Santo (IC)

³ Universidade Federal do Espírito Santo (PQ)

⁴ Universidade de São Paulo (PQ)

Palavras Chave: Caracterização, aplicação, compostos fluorescentes, BODIPY

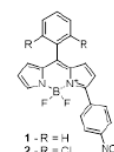
Introdução

O fenômeno da fluorescência é a emissão de fótons a partir do relaxamento de um estado eletrônico excitado singlete obtido após excitação luminosa (LAKOWICZ, 2013). A fluorescência é amplamente explorada em diversas áreas do conhecimento, inclusive na bioquímica, o que gera uma demanda de substâncias fluorescentes, os fluoróforos. Grande parte dos fluoróforos utilizados na área da bioquímica se tratam de pequenas moléculas orgânicas aromáticas ou heteroaromáticas com um amplo sistema π -delocalizado (VALEUR, 2012). Dentre as classes de fluoróforos orgânicos sintéticos nosso grupo de pesquisa tem interesse no desenvolvimento e caracterização de derivados boro-dipirrometenos, mais conhecidos pelo acrônimo BODIPY. Essa classe de compostos está normalmente associada com características fotofísicas positivas, bem como facilidade de preparação e funcionalização (REZENDE, 2016). Neste trabalho dois novos derivados BODIPY funcionalizados com o grupo isotiocianato foram caracterizados. A caracterização foi feita por espectroscopia de absorção UV-Vis e de fluorescência. O grupo funcional isotiocianato foi inserido com intuito de aplicar os compostos em reações de bioconjugação. Essa aplicação foi testada utilizando a albumina como proteína modelo, sendo confirmado com uma eletroforese de SDS PAGE.

Resultados e Discussão

A estrutura dos compostos 1 e 2 estão mostradas na figura a seguir. A caracterização fotofísica em sete solventes orgânicos demonstrou que o composto 1, teve o pico de absorção entre 534 e 543 nm, e emissão entre 561 e 572nm. A presença dos dois átomos de cloro causa um pequeno desvio nas propriedades do composto 2, onde o pico de absorção variou entre 547 e 557 nm, e emissão entre 571 e 583nm. Outra diferença marcante é o rendimento quântico de fluorescência que foi muito superior para o composto 2 (próximo a 0,9) quando comparado ao composto 1 (inferior a 0,1). Essa observação era esperada pois os dois átomos de cloro ligados ao anel, causam impedimento espacial e diminuem o relaxamento não radiativo no composto 2.

O experimento de bioconjugação foi realizada com albumina bovina sérica pelo período de 1 hora em tampão carbonato contendo DMSO como co-solvente. O produto da conjugação foi dialisado e a conjugação foi confirmada com a eletroforese SDS PAGE em 12% de acrilamida, onde pode ser verificada sob luz negra a presença da banda uma banda de proteína com emissão de fluorescência.



Conclusões

Os dados demonstram que os compostos possuem propriedades fotofísicas positivas, principalmente para o composto 2. Além disso ficou demonstrado que esses compostos podem ser utilizados na marcação de amins livres em proteínas, logo, estes compostos possuem grande potencial em bioconjugação.

Agradecimentos

O grupo de pesquisa agradece à FAPES (projeto 038/2019), ao CNPq, à CAPES e à FAPESP.


VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. John Wiley & Sons, 2012.

LAKOWICZ, J. R. (Ed.). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science & Business Media, 2013.

REZENDE, L.C.D. Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

APÊNDICE A - 2. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA DYES AND PIGMENTS

Dyes and Pigments 182 (2020) 108646





ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Dyes and Pigments

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/dyepig>





Synthesis and characterization of two novel red-shifted isothiocyanate BODIPYs and their application in protein conjugation

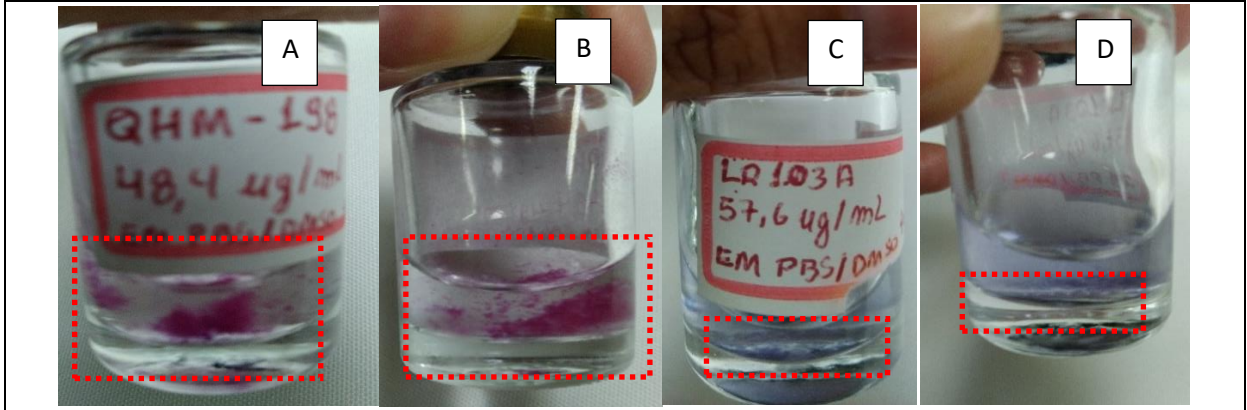
Vanessa G. Amorim ^a, Shaiani M.G. Melo ^b, Ruan F. Leite ^c, Paulo Arthur Coutinho ^a, Sarah M. P. da Silva ^{a,d}, André R. Silva ^{a,e}, Fernanda G. Amorim ^f, Rita G.W. Pires ^{a,d}, Juliana B. Coitinho ^a, Flavio S. Emery ^b, Lucas C.D. Rezende ^{a,c,*}

^a Graduate Program in Biochemistry, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil
^b Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FCFRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil
^c Department of Natural Sciences, Federal University of Espírito Santo, São Mateus, ES, Brazil
^d Graduate Program in Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
^e Federal Institute of Espírito Santo, Campus Aracruz, Aracruz, ES, Brazil
^f Vila Velha University, Vila Velha, ES, Brazil

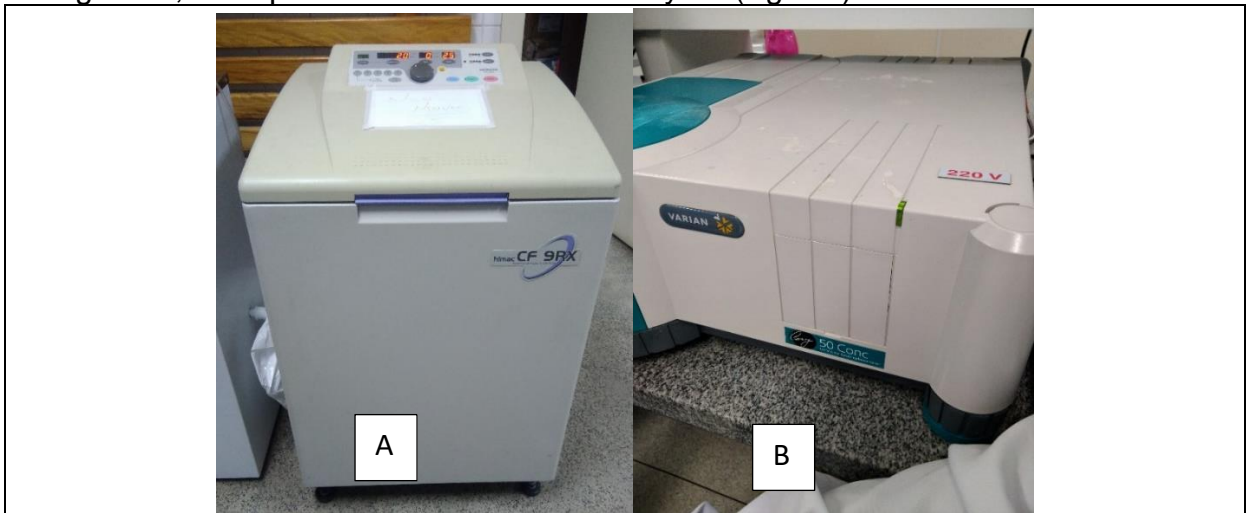
ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Keywords:</i> BODIPY Bioconjugation Isothiocyanate Protein Fluorescence</p>	<p>Fluorescent organic small molecules are very important tools for researchers in the fields of biochemistry and biotechnology, and boron-dipyrromethene (BODIPY) class of organic fluorophores gained much attention in recent years due to their remarkable photophysical properties and chemical versatility. Their application often involves conjugation with biomolecules, which can be accomplished by inserting a reactive functionality to the fluorescent dye. In this paper we present the preparation and characterization of two unpublished BODIPYs</p>

ANEXOS

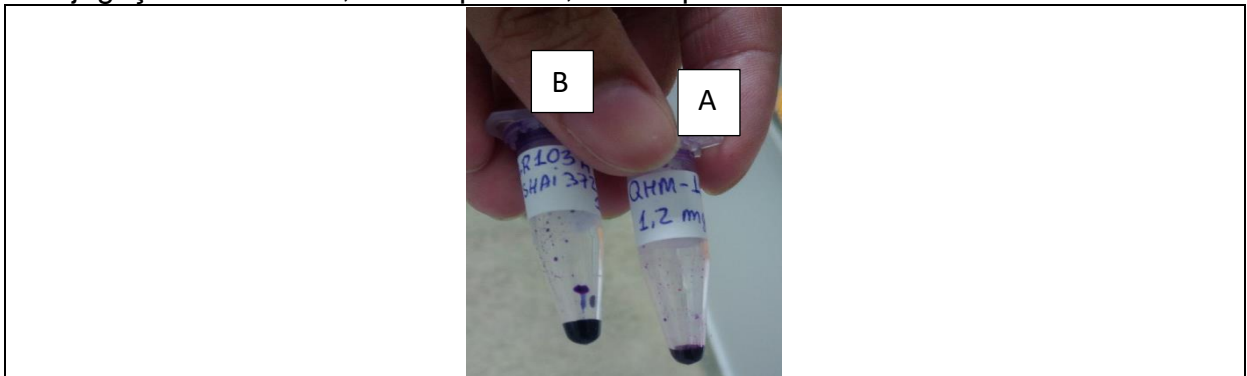
Anexo 1 - A e B: composto 1 livre de conjugação diluído em água e DMSO, onde pode ser visto particulado (demarcado em vermelho); C e D: composto 2 livre de conjugação homogeneizado e diluído em água e DMSO, podendo ser visualizada a formação de particulado ao fundo (demarcado em vermelho)



Anexo 2 - Alguns dos equipamentos utilizados; A: Centrifuga Hitachi Rx series refrigerada; B: Espectro fotômetro Varian Cary 50 (Agilent)



Anexo 3 - A e B: Compostos livres de albumina utilizados como estoque para conjugações com BSA; A: composto 1; B: composto 2



Anexo 4 - Membrana de dialise (Sartorius) utilizada para purificações

