

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**SONDAS FLUORESCENTES BASEADAS EM NOVOS HÍBRIDOS
BENZAZÓLICOS COM GRANDE DESLOCAMENTO DE STOKES
PARA MARCAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS**

NATÁLIA GOEDEL MEDEIROS

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch
Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

NATÁLIA GOEDEL MEDEIROS

**SONDAS FLUORESCENTES BASEADAS EM NOVOS HÍBRIDOS
BENZAZÓLICOS COM GRANDE DESLOCAMENTO DE STOKES
PARA MARCAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch
Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2023.

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros, Natália Goedel

Sondas fluorescentes baseadas em novos híbridos benzazólicos com grande deslocamento de Stokes para marcação de mitocôndrias / Natália Goedel Medeiros.

-- 2023.

209 f.

Orientador: Fabiano Severo Rodembusch.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. sondas fluorescentes. 2. benzazol. 3. marcadores de mitocôndrias. 4. bioimageamento. I. Rodembusch, Fabiano Severo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A presente tese foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (maio/2018) e (dezembro/2023), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Fabiano Severo Rodembusch. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela banca examinadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para superar tantos desafios e conseguir conquistar meus sonhos. Agradeço aos meus pais, Marquit e Marco, sem vocês eu não seria quem sou e não conseguiria chegar até onde cheguei, obrigada por todo apoio e amor. Meus agradecimentos à minha gatinha Zelda, que esteve nessa jornada comigo desde o início do doutorado, me fez companhia e foi suporte moral durante todas as horas, dias, noites e madrugadas de pesquisa no notebook. Obrigada por nunca ter saído do meu lado, literalmente e simbolicamente, e ter me dado forças pra superar a pior fase da minha vida. Agradeço também às minhas amigas que foram minha rede de apoio.

Agradeço ao meu orientador, Fabiano Rodembusch, por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos e principalmente por ter sido muito compreensivo, humano e ter criado uma relação acadêmica orientador-orientando de respeito que levo como exemplo a seguir. Agradeço pelos trabalhos desenvolvidos em parcerias com os professores: Dr. Tiago Espinosa de Oliveira (UFCSPA) pelos estudos de dinâmica molecular, Dra. Legna Colina (IQ-UFRGS) pelo estudo com HSA e Dra. Dinara Jaqueline Moura (UFCSPA) pelos ensaios biológicos.

Agradeço aos colegas de laboratório do E-208 e do LAMOCA que contribuíram com a minha formação como pesquisadora, em especial ao meu amigo Rodrigo dos Santos Fuscaldo que me ensinou tanto e deixa saudades. Agradecimentos especiais à Ianka Nunes, por ter sido tão generosa em compartilhar seus conhecimentos biológicos comigo numa área que eu queria tanto conhecer e, principalmente, por ser tão acolhedora e tão dedicada, este trabalho não seria completo sem a tua ajuda, você me ajudou a dar o *glow up* da tese. Agradeço à Manoela do Sacramento por ter me ajudado no grande desafio que foi a purificação de alguns compostos, obrigada pelo teu tempo, pela tua disposição e parceria. Agradeço ao colega Rafael Zink pela ajuda com as análises de RMN, obrigada pela tua disposição, parceria e generosidade. Agradeço à minha amiga Flávia Clemente pelas discussões, ensinamentos e ajuda. Agradeço ao Alex pelas análises de massas e por ter sido muito célere com elas. Agradeço a Joyce, a Luana e as bolsistas Gabriele e Helen, pela realização de várias análises de RMN. Agradeço ao Thiago Vidotto que por meio

do seu curso DZP e mídia social contribuiu para minha evolução na escrita científica.

Agradecimento sinceros também a todos os membros da banca examinadora por terem aceitado o convite para avaliar meu trabalho e pelas valiosas contribuições no exame de qualificação e na defesa da tese.

Agradeço ao Instituto de Química da UFRGS pela formação desde a graduação até a conclusão deste doutorado. Assim como pela excelente estrutura que permitiu uma formação acadêmica muito robusta da qual tenho orgulho.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado e à CAPES pela bolsa CAPES-PrInt de estágio doutorado sanduíche realizada em fev-jun/2020 na University of Akron. Agradecimentos ao Professor Dr. Pang por me receber em seu laboratório.

*Quem costuma vir de onde eu sou
Às vezes não tem motivos pra seguir
Então levanta e anda, vai, levanta e anda
Vai, levanta e anda
Mas eu sei que vai, que o sonho te traz
Coisas que te faz prosseguir
Vai, levanta e anda, vai, levanta e anda
Vai, levanta e anda, vai, levanta e anda*

*Irmão, você não percebeu
Que você é o único representante
Do seu sonho na face da terra
Se isso não fizer você correr, chapa
Eu não sei o que vai*

Somos maior, nos basta só sonhar, seguir

“Levanta e anda” – Canção de Emicida feat. Rael

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes para marcação de mitocôndrias baseada em derivados contendo o núcleo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol. Seis novos compostos fluorescentes foram sintetizados por métodos sintéticos simples e bem conhecidos com bons rendimentos. Os compostos apresentaram absorção na fronteira do UV e espectro visível e emissão de fluorescência na região do laranja do espectro visível com grande deslocamento de Stokes. O estudo fotofísico a baixas temperaturas evidenciou a ocorrência dos processos ESIPT e ICT acoplados, o que explica o grande deslocamento de Stokes observado. Os compostos apresentaram excelente habilidade de marcação de mitocôndrias *in vitro* e baixa citotoxicidade. O estudo de dinâmica molecular comprovou a alta afinidade dos compostos pela dupla membrana fosfolipídica, o que os caracteriza como lipofílicos e corrobora com os ensaios de bioimageamento. Todos os novos compostos apresentaram uma interação espontânea com a albumina do soro humano, observado a partir da supressão da fluorescência desta, indicando a probabilidade de ocorrer a distribuição das sondas em meio fisiológico. Além disso, os corantes benzotiazol piridínios apresentaram alta sensibilidade na detecção colorimétrica de compostos que apresentam caráter básico em solução. Por fim, os resultados evidenciam a potencial aplicação destes compostos como sondas fluorescentes para diversas aplicações.

Palavras-chave: benzazol, sondas fluorescentes, marcadores de mitocôndrias, bioimageamento.

ABSTRACT

The present study aimed the development of new mitochondria-targeted fluorescent probes based on derivatives of the 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole. Six new fluorescent compounds were synthesized using known simple synthetic methods with good yields. The compounds exhibited absorption at the UV-visible region and fluorescence emission in the orange region of the visible spectrum, with a large Stokes shift. The photophysical study at low temperature revealed the occurrence of coupled ESIPT and ICT processes, explaining the observed large Stokes shift. The compounds demonstrated excellent mitochondrial targeting ability *in vitro* and low cytotoxicity. Molecular dynamics studies confirmed the high affinity of the compounds for the bilayer membrane, characterizing them as lipophilic and corroborating with bioimaging assays. All new compounds exhibited a spontaneous interaction with the human serum albumin, as observed from the suppression of its fluorescence, indicating the potential distribution of probes in physiological environments. Additionally, the benzothiazole pyridinium dyes showed high sensitivity in the colorimetric detection of compounds with basic character in solution. Overall, the results highlight the potential application of these compounds as fluorescent probes for various purposes.

Keywords: benzazole, fluorescent probes, mitochondria-targeted, bioimaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das sondas fluorescentes comerciais para mitocôndrias.	22
Figura 2. Ilustração do processo de marcação de mitocôndrias com a estrutura química dos compostos desenvolvidos neste trabalho.	23
Figura 3. Tipos de transições eletrônicas de absorção em compostos orgânicos. (Adaptada de Pavia, 2016).....	27
Figura 4. Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração da posição dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência (Adaptado de Valeur, B.).	29
Figura 5. Espectros de emissão de Laurdan em etanol a -50°C (1), -60°C (2), -70°C (3), -80°C (4), -85°C (5), -90°C (6), -100°C (7), -110°C (8) e -190°C (9). (Adaptada de Lakowicz, 1999)	32
Figura 6. Ilustração do processo ESIPT em moléculas benzazólicas.	34
Figura 7. Efeitos dos campos eletrônicos e orientação na energia de um dipolo em meio dielétrico, $\mu_E > \mu_G$. Os círculos menores representam as moléculas do solvente e seus momentos de dipolo.	37
Figura 8. Ilustração do processo de transferência de carga de um elétron do iodeto para o íon piridínio durante a transição para o estado excitado.	40
Figura 9. Diagrama de Jablonski para relaxação do solvente.	42
Figura 10. Espectros de emissão do composto de Patman em várias temperaturas em propilenoglicol (parte superior) e em solventes de diferentes polaridades (parte inferior).	43
Figura 11. Estruturas químicas das sondas comerciais Mito-Tracker.	46
Figura 12. Estrutura da sonda ratiométrica para detecção de bissulfito em mitocôndrias proposta por Tang et. al. (Adaptada de Tang et. al., 2017).....	48
Figura 13. Sonda ratiométrica para detecção de HClO em mitocôndrias desenvolvida por Chen et. al. (Adaptada de Chen et. al., 2017).	49
Figura 14. Ilustração de uma das estratégias mais comuns para o design de sondas ESIPT off-on.	50
Figura 15. Estrutura da sonda para detecção de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias proposta por Tang et. al (Adaptada de Tang et. al., 2018).....	50

Figura 16. Sonda para mitocôndrias de células em estado de hipóxia. Imagens de microscopia de células com diferentes níveis de oxigênio (1%, 5%, 10%, 15%, 20% O ₂) tratadas com a sonda por 8 h (Adaptada de Yang et al., 2020).	51
Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 5 em CDCl ₃	68
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 8 em CDCl ₃	71
Figura 19. Espectro de absorção na região do infravermelho em modo ATR do composto 5 (linha preta) e do derivado formilado composto 8 (linha azul).	72
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto 14	73
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) do composto 15	74
Figura 22. Espectro de ¹ H RMN do composto 19 em CD ₃ OD (400 MHz).	77
Figura 23. Correlação dos hidrogênios alifáticos do composto 19 no espectro COSY ¹ H- ¹ H.	78
Figura 24. Correlação dos hidrogênios aromáticos do composto 19 no espectro COSY ¹ H- ¹ H.	78
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do composto 20 em CD ₃ OD com ampliações da região aromática.....	80
Figura 26. Correlação dos hidrogênios alifáticos do composto 20 no espectro COSY ¹ H- ¹ H em CD ₃ OD (400 MHz).....	81
Figura 27. Correlação dos hidrogênios aromáticos do composto 20 no espectro COSY ¹ H- ¹ H em CD ₃ OD (400 MHz).....	82
Figura 28. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 20 em CD ₃ OD (100 MHz).	83
Figura 29. Ampliação na região alifática do espectro de HSQC ¹ H- ¹³ C do composto 20 em CD ₃ OD (400 MHz).	83
Figura 30. Ampliação na região aromática do espectro de HSQC ¹ H- ¹³ C do composto 20 em CD ₃ OD (400 MHz).	84
Figura 31. Espectros normalizados de absorção na região do UV-Vis dos compostos 19 (A), 20 (B), 21 (C), 22 (D), 23 (E) e 24 (F) em solução com diferentes solventes (concentração 5,0 x 10 ⁻⁵ M).....	89
Figura 32. Espectros normalizados de emissão de fluorescência dos compostos 19-24 (A-F) na concentração de 5,0 x 10 ⁻⁵ M. Inserção da ampliação do pico de emissão de fluorescência dos solventes tolueno, AcOEt, THF, i-PrOH, EtOH, MeCN, DMSO.	94

Figura 33. (A) Espectros de absorção na região do UV-Vis dos compostos 19-24 em solução de PBS (concentração $5,0 \times 10^{-5}$ M). (B) Espectros normalizados de emissão de fluorescência dos compostos 19-24 na concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ M. Inserção da ampliação do pico de emissão de fluorescência dos compostos em PBS.	95
Figura 34. Gráficos de Lippert para bandas de absorção (A), bandas de emissão (B) e deslocamento de Stokes (C) dos compostos 19-24	103
Figura 35. Gráficos de Lippert para bandas de emissão dos compostos 19-24 (A-F).	104
Figura 36. Gráficos de Lippert para bandas de absorção (pontos pretos), bandas de emissão (pontos vermelhos) e deslocamento de Stokes (pontos azuis) doS composto 19 – 24 (A – F) em solventes não-DLH.....	107
Figura 37. Gráficos de Lippert para bandas de absorção (pontos pretos), bandas de emissão (pontos vermelhos) e deslocamento de Stokes (pontos azuis) doS composto 19 – 24 (A – F) em solventes DLH.....	109
Figura 38. Estruturas da merocianina de Brooker e seu efeito solvatocrômico reverso.	110
Figura 39. Gráficos das energias em número de onda (cm^{-1}) das bandas de absorção, emissão e o deslocamentos de Stokes em função da escala de polaridade de Dimroth-Reichardt $E_T(30)$. (A) Composto 19 , (B) composto 20 , (C) composto 21 , (D) composto 22 , (E) composto 23 e (F) composto 24	111
Figura 40. (Esquerda) Espectros de emissão de fluorescência do composto 23 ($10 \mu\text{M}$) em solução de etanol em diferentes temperaturas. (Direita) Resposta do comprimento de onda de emissão em função da temperatura do experimento com o composto 23	114
Figura 41. (A) Espectros de UV-Vis referentes a titulação espectrofotométrica da solução do composto 21 [$5,0 \times 10^{-5}$ M em etanol] com solução de hidróxido de amônio. (B) Curva da variação da absorbância em 533 nm da solução do composto 21 com o aumento da concentração de hidróxido de amônio. (C) Solução do composto 21 na ausência de NH_4OH (branco). (D) Solução do composto 21 na presença de $40 \mu\text{L}$ de NH_4OH concentrado.....	115
Figura 42. Curva de calibração espectrofotométrica do hidróxido de amônio na presença do composto 21	116

Figura 43. (A) Espectros de UV-Vis referentes a titulação espectrofotométrica da solução do composto 22 [$5,0 \times 10^{-5}$ M em etanol] com solução de hidróxido de amônio. (B) Curva da variação da absorbância em 528 nm da solução do composto 22 com o aumento da concentração de hidróxido de amônio. (C) Solução do composto 22 na ausência de NH_4OH (branco). (D) Solução do composto 22 na presença de 2 μL de NH_4OH concentrado.....	117
Figura 44. Curva de calibração espectrofotométrica do hidróxido de amônio na presença do composto 22	117
Figura 45. (A) Espectros de UV-Vis referentes a titulação espectrofotométrica da solução do composto 21 [$5,0 \times 10^{-5}$ M em acetato de etila] com trietilamina. (B) Curva da variação da absorbância em 621 nm da solução do composto 21 com o aumento da concentração de trietilamina. (C) Solução do composto 21 na ausência de Et_3N (branco). (D) Solução do composto 21 na presença de $5,4 \times 10^{-3}$ M de Et_3N	118
Figura 47. Curva de calibração espectrofotométrica da trietilamina na presença do composto 21	119
Figura 47. (A) Espectros de UV-Vis referentes a titulação espectrofotométrica da solução do composto 22 [$5,0 \times 10^{-5}$ M em acetato de etila] com trietilamina. (B) Curva da variação da absorbância em 613 nm da solução do composto 22 com o aumento da concentração de trietilamina. (C) Solução do composto 22 na ausência de Et_3N (branco). (D) Solução do composto 22 na presença de $4,6 \times 10^{-3}$ M de Et_3N	120
Figura 48. Curva de calibração espectrofotométrica da trietilamina na presença do composto 22	120
Figura 49. Estrutura cristalina tridimensional da HSA (retirada do arquivo PDB, 1AO6).....	122
Figura 50. Espectros de emissão de fluorescência da HSA em concentrações crescentes do composto 19 (A), composto 21 (C) e do composto 23 (E). Concentração da HSA = 5 μM , $\lambda_{\text{ex.}}$ = 280 nm, pH = 7,4 e T = 37°C. Gráficos de Stern-Volmer aplicados ao máximo de emissão da HSA em 330 nm na presença dos compostos: 19 (B), 21 (D) e 23 (F).....	123

Figura 51. Gráficos de $\log((F_0-F)/F)$ em função do $\log[Q]$ para os compostos 19 (A), 21 (B) e 23 (C) em 296 K e 310 K. [HSA] = 5 μ M; pH = 7,4 tampão Tris, variando a concentração dos compostos de 2,5 a 30 μ M.	126
Figura 52. Imagens de microscopia de fluorescência confocal das células V79 marcadas com o composto 19 (3 μ M) por 30 min (A) e com ampliação de 3x (B). λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm.	128
Figura 53. Imagens de microscopia de fluorescência confocal das células V79 marcadas com o composto 20 (3 μ M) por 30 min (A) e com ampliação de 3x (B). λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm.	129
Figura 54. Imagens de microscopia de fluorescência confocal das células V79 marcadas com o composto 21 (3 μ M) por 30 min (A) e com ampliação de 3x (B). λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm.	129
Figura 55. Imagens de microscopia de fluorescência confocal das células V79 marcadas com o composto 22 (3 μ M) por 30 min (A) e com ampliação de 3x (B). λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm.	130
Figura 56. Imagens de microscopia de fluorescência confocal das células V79 marcadas com o composto 23 (3 μ M) por 30 min (A) e com ampliação de 3x (B). λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm.	130
Figura 57. Imagens de microscopia de fluorescência confocal das células V79 marcadas com o composto 24 (3 μ M) por 30 min (A) e com ampliação de 3x (B). λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm.	131
Figura 58. Experimento de colocalização em células V79 marcadas com MitoStatus Red TMRE (200 nM) por 15 min e com o composto 19 (A) em 3 μ M por 30 min e com o composto 20 (B) 3 μ M. Imagem fluorescente do MitoStatus no canal vermelho (λ_{ex} = 568 nm e λ_{em} = 570-670 nm). Imagem fluorescente dos compostos no canal verde (λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm). Sobreposição das imagens do canal verde e vermelho.	133
Figura 59. Experimento de colocalização em células V79 marcadas com MitoStatus Red TMRE (200 nM) por 15 min e com o composto 21 (A) em 3 μ M por 30 min e com o composto 22 (B) 3 μ M. Imagem fluorescente do MitoStatus no canal vermelho (λ_{ex} = 568 nm e λ_{em} = 570-670 nm). Imagem fluorescente dos compostos no canal verde (λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm). Sobreposição das imagens do canal verde e vermelho.	134

Figura 60. Experimento de colocalização em células V79 marcadas com MitoStatus Red TMRE (200 nM) por 15 min e com o composto 19 (A) em 3 μ M por 30 min e com o composto 20 (B) 3 μ M. Imagem fluorescente do MitoStatus no canal vermelho (λ_{ex} = 568 nm e λ_{em} = 570-670 nm). Imagem fluorescente dos compostos no canal verde (λ_{ex} = 405 nm e λ_{em} = 550-650 nm). Sobreposição das imagens do canal verde e vermelho.....	135
Figura 61. Gráficos de dispersão da intensidade do canal vermelho (MitoStatus Red TMRE) e do canal verde dos compostos 19 (A), 20 (B), 21 (C), 22 (D), 23 (E) e 24 (F).....	136
Figura 62. As células V79 foram tratadas com compostos durante 24 horas e a sobrevivência celular foi avaliada através do ensaio MTT. CN representa o controle negativo. Os gráficos representam a média \pm DP. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA Uma-via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett e $p < 0,05$ foi considerado significativo. (*) $p = 0,0217$, (**) $p = 0,0075$, (***) $p = 0,0008$ e (****) $p < 0,0001$ em relação à CN.	139
Figura 63. Estrutura química da DMPC.....	142
Figura 64. Perfis de ordem de parâmetro médios das cadeias acílicas sn-1 e sn-2 para o sistema contendo água (a), composto 19 (b), 20 (c), 21(d), 22 (e), 23 (f) e 24 (g).....	144
Figura 65. Perfis de densidade de massa local para diferentes grupos moleculares ao longo do lipídio normal para uma bicamada fluida de DMPC com os compostos 19-24	146
Figura 66. Captura instantânea das simulações de DM em todos os sistemas estudados. A bicamada de DMPC ao meio da caixa está representada completamente no sistema sem a sonda, apenas contendo água. Nos outros sistemas com presença da sonda as caudas foram ocultadas, somente a cabeça está visível (Esferas azul escuro representando os nitrogênios e esferas verde representando os átomos de fósforo). A parte superior e inferior à bicamada é composta por água (esferas azuis claras são os átomos de oxigênio das moléculas de água).....	147
Figura 67. Energia livre de interação calculada entre os compostos 19-24 e a bicamada de DMPC.	148

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese de 5-7	53
Esquema 2. Síntese de 8-10	55
Esquema 3. Síntese de 14-15	56
Esquema 4. Síntese dos corantes benzazol-piridínicos 19-24	58
Esquema 5. Esquema retrossintético dos corantes híbridos benzazol-piridínicos (19-24).....	65
Esquema 6. Síntese dos precursores benzazólicos (5-7).	66
Esquema 7. Proposta de mecanismo para a formação do benzazol.....	67
Esquema 8. Síntese dos precursores benzazólicos formilados (8-10).	69
Esquema 9. Proposta de mecanismo de formilação via reação de Duff modificada.....	70
Esquema 10. Síntese dos precursores N-quaternizados piridínicos 14-15	73
Esquema 11. Síntese dos corantes benzazol-piridínicos.....	75
Esquema 12. Mecanismo de síntese dos corantes híbridos benzazol piridínicos.	76
Esquema 13. Estruturas dos compostos 19-24 no estado excitado: forma enol, forma ceto e cianina. Ilustração do acoplamento do processo de ICT ao processo ESIPT.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades das reações realizadas para obtenção dos produtos (5-7).....	54
Tabela 2. Quantidades das reações realizadas para obtenção dos produtos (8-10).....	55
Tabela 3. Proposta de atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H do composto 14	73
Tabela 4. Proposta de atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H do composto 15	74
Tabela 5. Correlação entre os ^1H do composto 19 a partir do Espectro COSY ^1H - ^1H	79
Tabela 6. Correlação entre os ^1H – ^{13}C do composto 20 a partir do Espectro HSQC.....	84
Tabela 7. Características de polaridade dos solventes utilizados nas medidas espectroscópicas.....	86
Tabela 8. Dados obtidos por espectroscopia de absorção na região do UV-vis para os compostos 19-24 obtidos dos espectros de absorção UV-vis, onde ϵ é a absorvidade molar ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), f_e é a força do oscilador, k_e^0 é a constante de emissão radiativa (10^8 s^{-1}), τ^0 é o tempo de decaimento puramente radiativo (ns).....	91
Tabela 9. Dados fotofísicos relevantes para o composto 19 , onde λ_{abs} é o máximo de absorção (nm), ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), λ_{em} é o máximo de emissão (nm), Δ_{VST} é o deslocamento de Stokes (cm^{-1}) e Φ_f é o rendimento quântico.....	96
Tabela 10. Dados fotofísicos relevantes para o composto 20 , onde λ_{abs} é o máximo de absorção (nm), ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), λ_{em} é o máximo de emissão (nm), Δ_{VST} é o deslocamento de Stokes (cm^{-1}) e Φ_f é o rendimento quântico.....	97
Tabela 11. Dados fotofísicos relevantes para o composto 21 , onde λ_{abs} é o máximo de absorção (nm), ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).....	

$^1\text{.cm}^{-1}$), λ_{em} é o máximo de emissão (nm), $\Delta\nu_{\text{ST}}$ é o deslocamento de Stokes (cm^{-1}) e Φ_f é o rendimento quântico.....	98
Tabela 12. Dados fotofísicos relevantes para o composto 22 , onde λ_{abs} é o máximo de absorção (nm), ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$), λ_{em} é o máximo de emissão (nm), $\Delta\nu_{\text{ST}}$ é o deslocamento de Stokes (cm^{-1}) e Φ_f é o rendimento quântico.....	99
Tabela 13. Dados fotofísicos relevantes para o composto 23 , onde λ_{abs} é o máximo de absorção (nm), ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$), λ_{em} é o máximo de emissão (nm), $\Delta\nu_{\text{ST}}$ é o deslocamento de Stokes (cm^{-1}) e Φ_f é o rendimento quântico.....	100
Tabela 14. Dados fotofísicos relevantes para o composto 24 , onde λ_{abs} é o máximo de absorção (nm), ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$), λ_{em} é o máximo de emissão (nm), $\Delta\nu_{\text{ST}}$ é o deslocamento de Stokes (cm^{-1}) e Φ_f é o rendimento quântico.....	101
Tabela 15. Os parâmetros de ligação da HSA para as interações com os compostos 19 , 21 e 23 em solução de mistura tampão MeCN (10%)/Tris-HCl pH=7,4 por análise de emissão de fluorescência onde, K_{sv} (L mol^{-1}) é a constante de extinção de Stern-Volmer, k_q ($\text{L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) é a constante da taxa de extinção bimolecular, K_b (L mol^{-1}) é a constante de ligação, n é o número de sítios de ligação, ΔG° (KJ mol^{-1}) é a variação da energia livre de Gibbs, ΔH° (KJ mol^{-1}) é a variação de entalpia e ΔS° ($\text{KJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) é a variação de entropia.....	126
Tabela 16. Parâmetros estatísticos de correlação entre os componentes do canal vermelho (MitoStatus) e do canal verde (composto).	136
Tabela 17. Estruturas de sondas fluorescentes marcadores celulares publicados na literatura.	137
Tabela 18. IC_{50} dos compostos 19-24 (24 h).	140
Tabela 19. Propriedades estruturais da bicamada de DMPC em cada sistema.	145
Tabela 20. Energia livre das interações entre os compostos e a bicamada DMPC.	149

ABREVIATURAS

AcOEt - Acetato de etila

BODIPY - Dipirrometenos de boro

COSY ^1H - ^1H - *Correlated Spectroscopy*

DCM – Diclorometano

DM - Dinâmica Molecular

DMEM - Meio de cultura Eagle modificado de Dulbecco

DMF - *N,N*-Dimetilformamida

DMPC - 1,2-dimiristil-fosfatidil colina

DMSO - Dimetilsulfóxido

EPD/EPA - Interação do tipo doador de par de elétron (solvente)/aceptor de par de elétrons (soluto)

ESIPT - Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado

EtOH - Etanol

FTIR-ATR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada

HBA - Aceptor de ligação de hidrogênio

HBD - Doador de ligação de hidrogênio

HMTA - Hexametenotetramina

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*

HRMS - Espectro de Massas de Alta Resolução

HSA - *Human serum albumin*

HSQC ^1H - ^{13}C - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IC₅₀ – Concentração inibitória média

ICT - Transferência interna de carga

i-PrOH - Álcool isopropílico

J – Constante de acoplamento

LD - Limite de Detecção

LE - Estado localmente excitado

LQ - Limite de Quantificação

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol

MTT - Ensaio de Metiltiazol Tetrazólio

PBS - Tampão fosfato

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

S_n – Estado Singlete

Solventes DLH - Solventes doadores de ligação de hidrogênio

Solventes não-DLH - Solventes não doadores de ligação de hidrogênio

THF - Tetrahidrofurano

T_n – Estado Triplete

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS.....	24
1.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	<i>24</i>
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	PROCESSOS FOTOFÍSICOS.....	25
2.1.1	<i>Absorção molecular na região do UV-Vis.....</i>	<i>25</i>
2.1.2	<i>Processos de desativação do estado excitado.....</i>	<i>28</i>
2.1.3	<i>Fatores que afetam o espectro de emissão</i>	<i>31</i>
2.2	SONDAS FLUORESCENTES MARCADORAS DE MITOCÔNDRIAS	44
3	PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.2	SÍNTESE	53
3.2.1	<i>Procedimento geral para síntese dos precursores benzazólicos (5-7)</i>	<i>53</i>
3.2.2	<i>Procedimento geral para síntese de precursores formilados (8-10)</i>	<i>55</i>
3.2.3	<i>Procedimento geral para síntese de precursores piridínicos (14-15).....</i>	<i>56</i>
3.2.4	<i>Procedimento geral para a síntese dos corantes híbridos benzazol piridínios (19-24)</i>	<i>57</i>
3.3	ESTUDO FOTOFÍSICO	61
3.3.1	<i>Estudo da interação com a proteína HSA por supressão da fluorescência .</i>	<i>62</i>
3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS	62
3.4.1	<i>Metodologia para marcação das células e obtenção das imagens de microscopia de fluorescência confocal.....</i>	<i>62</i>
3.4.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	<i>63</i>
3.5	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS COMPOSTOS NA MEMBRANA FOSFOLIPÍDICA POR DINÂMICA MOLECULAR.....	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA	65
4.1.1	<i>Síntese dos precursores benzazólicos</i>	<i>65</i>
4.1.2	<i>Síntese dos derivados formilados.....</i>	<i>68</i>
4.1.3	<i>Síntese dos precursores N-quaternizados piridínicos</i>	<i>72</i>
4.1.4	<i>Síntese dos corantes híbridos derivados de benzazol piridínios.....</i>	<i>75</i>
4.2	ESTUDO FOTOFÍSICO	86

4.2.1	<i>Estudo do efeito da polaridade do solvente.....</i>	101
4.2.2	<i>Fluorescência sob baixas temperaturas</i>	112
4.3	QUIMIOSENSOR DE BASES	114
4.4	ESTUDO DA INTERAÇÃO COM HSA POR SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA	121
4.5	ESTUDOS DE MARCAÇÃO CELULAR POR BIOIMAGEAMENTO	127
4.5.1	<i>Avaliação da citotoxicidade.....</i>	138
4.6	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS COMPOSTOS NA MEMBRANA FOSFOLIPÍDICA POR DINÂMICA MOLECULAR.....	140
5	CONCLUSÃO	150
	REFERÊNCIAS.....	152
	ANEXOS	168

1 INTRODUÇÃO

Sondas fluorescentes são compostos que na presença de determinado íon, molécula ou estrutura celular, apresentam mudança em suas propriedades fotofísicas, resultando no aumento ou diminuição da intensidade de emissão de fluorescência ou no deslocamento do comprimento de onda de emissão, o que permite que o analito de interesse possa ser detectado e quantificado.¹ As sondas fluorescentes apresentam atualmente aplicações na química, no meio ambiente, no desenvolvimento de tecnologias, como uso em dispositivos e células solares, na medicina devido à sua alta sensibilidade e seletividade, e também aplicações únicas em imagens biológicas.^{2,3}

O bioimageamento celular é uma técnica que permite avaliar o estado celular *in vivo* em organismos de interesse por meio da utilização de sondas fluorescentes e microscopia confocal para estudar diversas funções celulares como quantificação específica de espécies, interações e eventos subcelulares que ocorrem em sistemas vivos.^{4,5}

Os corantes com grande deslocamento de Stokes têm como uma das principais vantagens não apresentar auto-supressão de fluorescência, o que minimiza erros de medição no processo de imageamento biológico.⁶⁻⁸ Além disso, estes corantes podem aumentar a sensibilidade de detecção, ampliando significativamente a sua aplicação em biologia celular.⁹ Corantes fluorescentes com pequeno deslocamento de Stokes muitas vezes são prejudiciais para o imageamento intracelular via emissão de fluorescência.^{1,10-12} A maioria dos corantes, incluindo as fluoresceínas,¹³ rodaminas,⁸ BODIPY¹⁴ e cianinas,¹⁵ exibe pequeno deslocamento de Stokes em solução. Esta característica diminui a sensibilidade de detecção dos corantes em aplicações práticas. Ainda, as sondas de comprimento de onda longo de absorção e emissão são de interesse por vários motivos. Geralmente a sensibilidade da detecção de fluorescência de amostras biológicas é limitada pela autofluorescência. À medida que o comprimento de onda de excitação se torna mais longo, a autofluorescência diminui e, assim aumenta a detectabilidade sobre o sinal de fundo.¹ Por estes motivos, o desenvolvimento de sondas fluorescentes com grande deslocamento

de Stokes e comprimento de onda de absorção e emissão mais longos é muito atraente para aplicações biológicas.

Disfunções mitocondriais podem levar a uma variedade de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer,¹⁶ câncer e diabetes.¹⁷⁻¹⁹ As mitocôndrias desempenham papel importante na fisiologia celular.²⁰⁻²² Estas estruturas estão associadas à sinalização celular via produção de espécies reativas de oxigênio, regulação de íons de cálcio e ao desencadeamento de morte celular.²³⁻²⁵ Portanto, para melhor compreender a função mitocondrial, é necessário observar estas estruturas *in vivo*.

Mais recentemente, é observado uma tendência crescente de desenvolvimentos de sondas para mitocôndrias.²⁶ Entretanto, pouca atenção tem sido dada à obtenção de sondas fluorescentes que apresentam grande deslocamento de Stokes. Por exemplo, os compostos comerciais utilizados para este fim, Mito Tracker Red (MTR) e Mito Tracker Green (MTG)^{27,28} (Figura 1), apresentam pequeno deslocamento de Stokes.

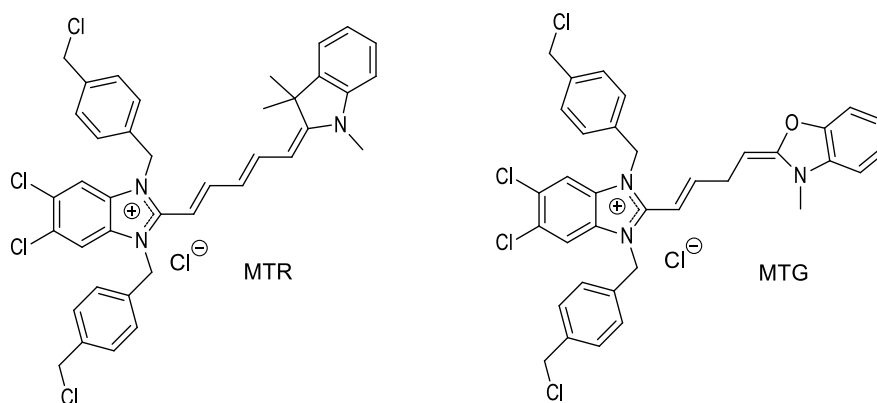


Figura 1. Estrutura química das sondas fluorescentes comerciais para mitocôndrias.

Ainda há muito a ser aprendido sobre o ambiente celular altamente complexo, especialmente à nível molecular. Embora, haja um crescente desenvolvimento de pesquisas na área, ainda existem muitos processos a serem resolvidos em relação às funções das mitocôndrias e por isso a importância no desenvolvimento de novas sondas fluorescentes marcadoras para estas organelas.²⁹

Neste contexto, os núcleos 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos são uma família de corantes orgânicos bastante conhecida por apresentar um grande deslocamento de Stokes devido ao processo de Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (do inglês, ESIPT).^{30,31} Assim, os núcleos benzazólicos podem fornecer uma alternativa de sondas fluorescentes para bioimageamento celular se acoplados com outros núcleos fotoativos que possam deslocar o comprimento de onda do máximo de emissão para o vermelho, mantendo a característica principal de apresentar um grande deslocamento de Stokes. Desta forma, o *design* da série de compostos sintetizados neste estudo envolveu a união entre o núcleo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol, com a variação do heteroátomo desse núcleo, com o núcleo piridínio, mediante uma ligação vinílica entre o anel fenólico e o núcleo piridínio. A porção piridínica é catiônica e, portanto, funciona como guia alvo para direcionar o composto para a mitocôndria no ambiente intracelular através de forças eletrostáticas. Portanto, é esperado que os compostos desenvolvidos apresentem comportamento fotofísico interessante para esta aplicação, isto é, grande deslocamento de Stokes e emissão na região do visível menos energéticas, além da habilidade de localização nas mitocôndrias e emissão de fluorescência em ambiente celular, conforme ilustrado na Figura 2.

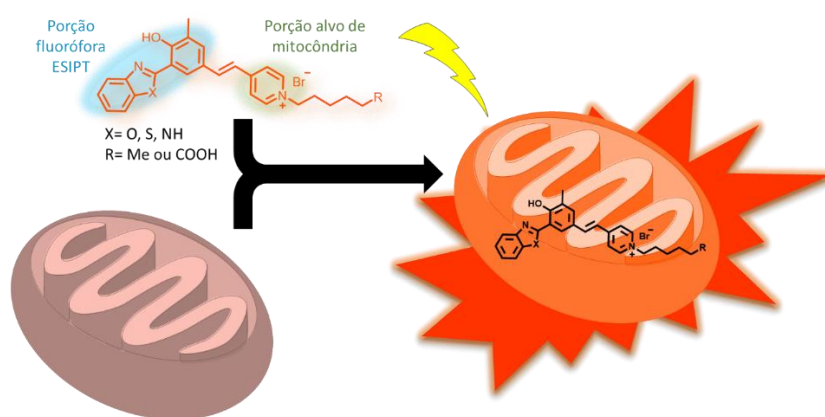


Figura 2. Ilustração do processo de marcação de mitocôndrias com a estrutura química dos compostos desenvolvidos neste trabalho.

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é o estudo e desenvolvimento de novos compostos orgânicos fotoativos derivados do núcleo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol para potencial aplicação como marcadores de mitocôndrias em meio celular e como sensores ópticos em solução.

1.1.1 *Objetivos específicos*

- a) Síntese dos precursores fotoluminescentes da família dos benzazóis;
- b) Síntese das piridinas quaternizadas;
- c) Síntese de compostos híbridos benzazol piridínios para obtenção de novas sondas fluorescentes;
- e) Estudo fotofísico dos novos compostos obtidos por meio de medidas de Absorção na região do UV-Vis e de Emissão de Fluorescência em solução;
- f) Avaliação dos compostos obtidos como sondas fluorescentes para bioimageamento na marcação de mitocôndrias;
- e) Explorar potenciais aplicações diversas destes compostos como sensores fluorescentes ou colorimétricos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processos fotofísicos

Os processos fotofísicos ocorrem a partir da absorção da radiação eletromagnética com a matéria gerando transições eletrônicas entre diferentes níveis energéticos das espécies químicas. Neste trabalho, abordaremos especificamente os processos fotofísicos que ocorrem em moléculas orgânicas. Antes da interação com a radiação eletromagnética, a molécula se encontra em seu estado eletrônico de mais baixa energia, chamado de estado fundamental. A interação da molécula com a radiação eletromagnética pode provocar uma transição para um estado eletrônico de maior energia, chamado de estado excitado. Por meio das medidas da radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou da quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação, é possível obter informações sobre as propriedades fotofísicas da molécula em estudo. Desta forma, duas técnicas podem ser utilizadas, a espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis para estudar os fenômenos que ocorrem entre o estado fundamental e o estado excitado e a espectroscopia de emissão de fluorescência para estudar os processos que ocorrem no estado excitado. Na espectroscopia de absorção, é medida a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda. Na espectroscopia de fluorescência, a emissão de fótons é medida após a absorção. Ambas as técnicas geram informações qualitativas e quantitativas sobre a molécula.³²

2.1.1 Absorção molecular na região do UV-Vis

O processo de absorção em soluções diluídas ($< 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) é regido pela lei de Beer. A lei de Beer informa quantitativamente que a magnitude da absorção da radiação eletromagnética incidida sobre a amostra depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho óptico sobre o qual ocorre a absorção. À medida que a luz atravessa um meio contendo um analito que absorve, um decréscimo de intensidade ocorre na proporção que o analito é excitado. Desta forma, quanto maior for a concentração do analito ou quanto mais longo for o comprimento do caminho do meio através do qual a luz

passa (caminho óptico) ou quanto maior a eficiência do analito em absorver luz, maior será a atenuação.³²

A atenuação da luz é chamada de transmitância (T) da solução que corresponde à fração da radiação incidente (P_0) que é transmitida pela solução (P) e pode ser definida matematicamente como $T = P/P_0$. A absorbância (A) de uma solução está relacionada com a transmitância de forma logarítmica:

$$A = -\log T = \log P_0/P = \varepsilon \times b \times c$$

Onde ε é constante de absorvidade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b é o caminho óptico em centímetros e c é a concentração da molécula em mols por litro.

2.1.1.1 *Transições em moléculas orgânicas*

A absorção de radiação eletromagnética nessa região do espectro pode gerar transições entre níveis de energia eletrônicos nas moléculas. A transição de absorção ocorre quando uma molécula absorve um fóton com energia necessária para promover um elétron de um orbital ocupado de mais baixa energia para um orbital desocupado de maior energia potencial. Em geral, a transição mais provável é do orbital ocupado de maior energia (HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Dependendo dos tipos de ligações presentes na molécula e da sua configuração eletrônica, diferentes tipos de transições envolvendo os orbitais σ , π e n podem ocorrer, conforme pode ser observado na ilustração da Figura 3.

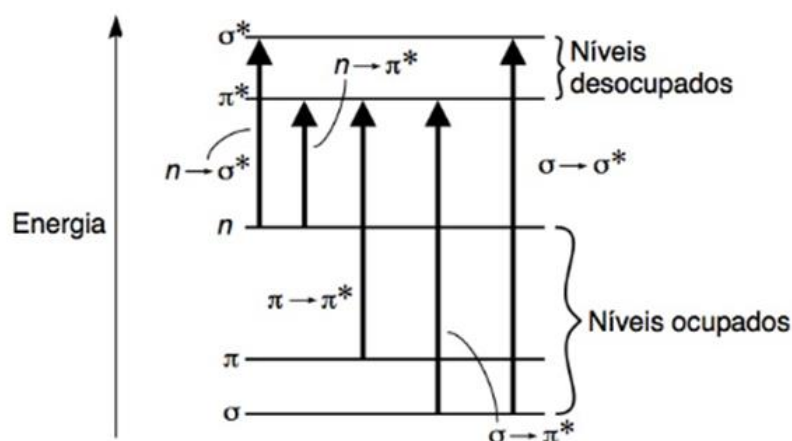


Figura 3. Tipos de transições eletrônicas de absorção em compostos orgânicos. (Adaptada de Pavia, 2016)³³

As transições ocorrem em cerca de 10^{-15} s, um tempo muito curto para deslocar o núcleo. Este é princípio de Franck-Condon.¹ Cada nível eletrônico possui uma variedade de níveis vibracionais e rotacionais possíveis, que geralmente são muito próximos. Em um grupo de moléculas, cada uma está em um determinado estado de excitação vibracional e rotacional, por isso, uma variedade muito grande de transições com energias muito próximas pode ocorrer. Como o espectrofotômetro não consegue defini-las, ao invés de enxergarmos linhas distintas, enxergamos uma banda de absorção larga centrada perto do comprimento de onda da transição principal.³²

Usualmente, o estado fundamental das moléculas orgânicas possui uma multiplicidade de *spin* igual a um, o que significa que este é um estado singleto, chamado de S_0 . No estado excitado existem tanto estados singletes (S_1, S_2, \dots) como tripletes (T_1, T_2, \dots). Os estados tripletes apresentam menor energia que os estados singletes. A tendência é que na transição do estado fundamental para o estado excitado, a multiplicidade de *spin* seja mantida. As transições são classificadas em permitidas e proibidas a partir das regras de seleção. Uma das regras de seleção diz que transições que envolvam uma alteração do número quântico de *spin* de um elétron durante a transição não são permitidas, e, por isso, são denominadas transições proibidas. Outras regras de seleção tratam sobre os números de elétrons que podem ser excitados de cada vez, as propriedades de simetria da molécula e dos estados eletrônicos, por exemplo. Contudo, em certos casos são observadas transições proibidas, porém suas

intensidades de absorção são muito menores do que para transições permitidas pelas regras de seleção. Assim sendo, transições do estado singlete para o estado triplete, por serem proibidas, podem ocorrer, mas são menos prováveis. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é o tipo mais comum de transição proibida.³³

2.1.2 Processos de desativação do estado excitado

Após a absorção da luz, a molécula se encontra no estado excitado que é menos estável, logo, a tendência é retornar ao estado fundamental. Muitos processos podem ocorrer no estado excitado até que a molécula retorne ao estado fundamental. Essa desativação pode ocorrer via processos não radiativos, como o relaxamento vibracional. Outra via de retorno ao estado fundamental é por meio de processos radiativos que é conhecido por luminescência. A luminescência compreende os fenômenos de fluorescência e fosforescência. Uma forma simples de entender esses processos é através do Diagrama de Perrin-Jablonski¹ conforme ilustrado na Figura 4.

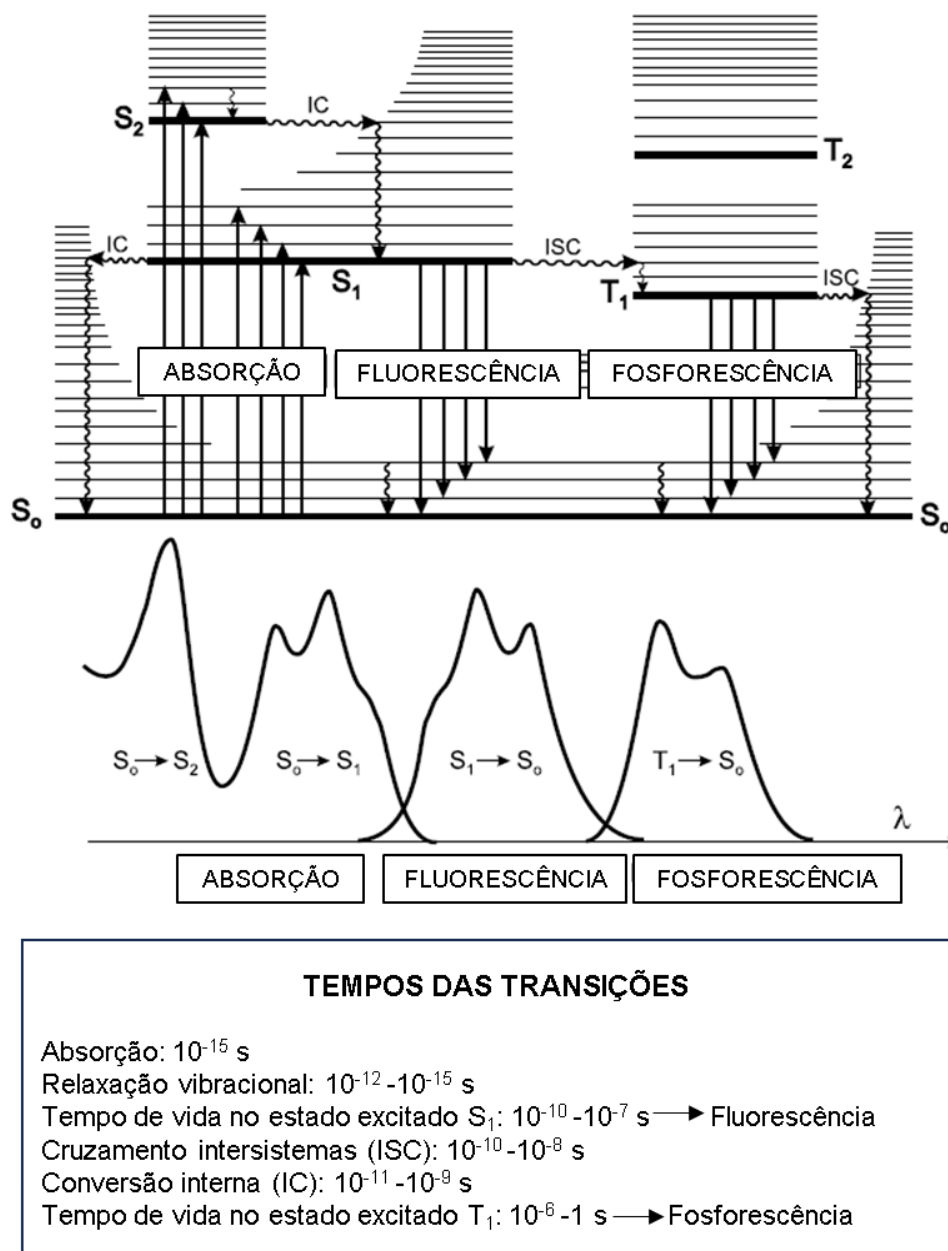


Figura 4. Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração da posição dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência (Adaptado de Valeur, B.)³⁴.

O relaxamento vibracional ocorre entre os níveis vibracionais dentro de um mesmo estado eletrônico até atingir o nível vibracional de menor energia, o que ocorre muito rapidamente (10⁻¹³ – 10⁻⁹ s) e a energia é dissipada em forma de calor. O fluoróforo pode ser excitado a um nível eletrônico mais energético que S₁. A relaxação para o nível excitado de mais baixa energia e mesma multiplicidade de *spin* é conhecido como conversão interna e ocorre entre 10⁻¹⁴ e 10⁻¹¹ s entre estados excitados e pode ocorrer do estado S₁ para S₀ entre 10⁻⁹

e 10^{-7} s. Por ser um processo muito rápido, para a maioria das moléculas, geralmente nenhum outro processo radiativo ou não radiativo ocorre de estados mais energéticos que o $S_1(v_0)$. A Regra de Kasha diz que qualquer processo de emissão de luminescência ou reação química de moléculas excitadas só ocorre no estado excitado de menor energia (S_1 ou T_1). Desta forma, ao atingir o estado $S_1(v_0)$, competem entre si os processos de emissão de fluorescência, cruzamento intersistema e emissão de fosforescência. O cruzamento intersistemas é uma transição proibida por *spin* entre estados de mesmo nível energético e diferentes multiplicidades de *spin*, como, por exemplo, de $S_1(v_0)$ para T_1 , que acontece em uma escala de tempo que varia de 10^{-11} e 10^{-8} s.³⁵

A emissão de um fóton do estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 de mesma multiplicidade de *spin* (transição permitida por *spin*) é chamado de fluorescência e ocorre entre 10^{-12} e 10^{-6} s. Enquanto a fosforescência é a emissão de um fóton entre estados de multiplicidades de *spin* diferentes, geralmente $T_1(v_0)$ para S_0 , uma transição proibida por *spin* que ocorre numa escala de tempo entre 10^{-3} e 10^2 s. Geralmente a emissão de fosforescência ocorre em maiores comprimentos de onda em relação a fluorescência.³⁵

Existem dois conceitos importantes que relacionam a absorção e a emissão de luz que são o deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$ ou $\Delta\nu_{ST}$) e o rendimento quântico (Φ_F)¹. O deslocamento de Stokes é a medida da diferença de energia do comprimento de onda do máximo de emissão em relação ao máximo de absorção. Isso ocorre devido ao fato de que a emissão geralmente ocorrerá em menores energias em relação a absorção. Como vimos, no estado excitado a molécula perde uma parte da energia absorvida ao relaxar para o estado $S_1(v_0)$ antes da emissão do fóton, que pode ocorrer para níveis vibracionais mais energéticos do estado fundamental. Além disso, uma série de processos que ocorrem no estado excitado podem diminuir a energia do estado excitado, como interações com solventes, reações no estado excitado, transferência de carga interna, formação de complexos, entre outros. Na prática, o deslocamento de Stokes pode ser observado a partir da área de sobreposição entre os espectros de absorção e emissão. Assim, a vantagem em ter um grande deslocamento de Stokes está na diminuição da interferência de fundo e maior facilidade na detecção de moléculas fluorescentes, por exemplo em bioimageamento.³⁶

O rendimento quântico representa a fração de moléculas excitadas que decaem por emissão de fluorescência e é dada pela fração de fótons emitidos por fótons absorvidos³⁵. O valor do rendimento quântico fica entre 0 e 1, sendo que 1 representaria a emissão de todos os fótons absorvidos, mas devido ao deslocamento de Stokes ele sempre será menor que 1. Uma das formas que pode se obter o valor do rendimento quântico é a partir da comparação com um padrão de rendimento quântico conhecido e que tenha o comprimento de onda do máximo de absorção próximo ao comprimento de onda do máximo de absorção da molécula que está sendo estudada. Desta forma, utiliza-se a seguinte equação para o cálculo do rendimento quântico da molécula:

$$\Phi_{FX} = \Phi_{F0} \left(\frac{F_X}{F_0} \right) \left(\frac{A_0}{A_X} \right) \left(\frac{n_X^2}{n_0^2} \right)$$

em que Φ_{FX} é o rendimento quântico da molécula, Φ_{F0} é o rendimento quântico do padrão, F_X e F_0 são as áreas integradas sob as curvas de emissão de fluorescência da molécula e do padrão, respectivamente. A_0 e A_X são as absorbâncias do padrão e da molécula, respectivamente. E n_X e n_0 são os índices de refração dos solventes das soluções da molécula e do padrão, respectivamente.

2.1.3 Fatores que afetam o espectro de emissão

2.1.3.1 Estado de transferência interna de carga (ICT)

O estado inicialmente excitado é chamado de estado localmente excitado (LE). Para algumas moléculas que possuem uma estrutura de grupo doador e grupo aceptor (D- π -A) após a absorção de um fóton podem ter seu momento de dipolo aumentado e/ou alterado de sentido, o que é chamado de processo de transferência interna de carga. A formação de estados ICT indica que a distribuição de elétrons pode ser diferente para um fluoróforo nos estados fundamental ou excitado. Isso pode resultar em mudanças na ionização no estado excitado. O processo de transferência de carga interna pode ser observado ao analisar os espectros em diferentes solventes. Com o aumento da polaridade do solvente, se houver o surgimento de um ombro de emissão em comprimentos de ondas maiores, esse é um indício de que está ocorrendo o processo ICT na molécula no estado excitado. Tais mudanças na forma espectral

frequentemente indicam a presença de outro estado. A presença de mais de um estado excitado pode ser mais facilmente observado em etanol em baixas temperaturas, como no exemplo apresentado na Figura 5. À medida que a temperatura é reduzida, o pico de emissão se desloca de cerca de 490 para 455 nm. À medida que a temperatura é reduzida para -190°C , uma nova emissão aparece com um pico próximo de 420 nm.¹

Os espectros dependentes da temperatura exibidos por Laurdan foram explicados pela presença da emissão do estado localmente excitado (LE) e do estado de transferência interna de carga (ICT). No estado LE, a excitação está localizada no anel naftaleno, de modo que a molécula não é muito polar. Nesse estado LE, os grupos amino e carbonila não fazem parte do sistema de elétrons deslocalizados. Em temperaturas mais altas, o estado ICT se forma, com transferência de carga completa do grupo amino para o grupo carbonila. O ponto a destacar desse exemplo é que os deslocamentos espectrais devido à formação de estados ICT não são explicados pela equação de Lippert.¹

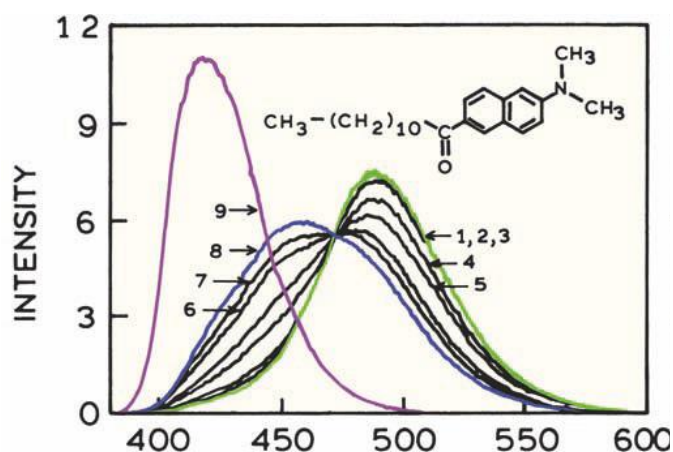


Figura 5. Espectros de emissão de Laurdan em etanol a -50°C (1), -60°C (2), -70°C (3), -80°C (4), -85°C (5), -90°C (6), -100°C (7), -110°C (8) e -190°C (9). (Adaptada de Lakowicz, 1999)¹

2.1.3.2 Transferência de prótons intramolecular no estado excitado (ESIPT)

A transferência de próton intramolecular no estado excitado, conhecida como ESIPT, é um processo que ocorre somente em moléculas que apresentam um hidrogênio intercambiável entre dois átomos, um doador ($-\text{OH}$ e NH_2) e outro

acceptor (=N⁻ e C=O). Esse processo é ilustrado na Figura 6 para as sondas benzazólicas, por exemplo. O processo fotoquímico consiste em quatro níveis. No estado fundamental este sensor geralmente se encontra na forma normal ou enólica (E). Após a absorção do fóton, a configuração eletrônica pode sofrer mudanças no estado excitado tornando o hidrogênio do grupo doador mais ácido e aumentando a basicidade do grupo acceptor na forma enólica. Essa mudança provoca a tautomerização da forma enol para forma ceto (K^{*}). O processo de ESIPT pode ser muito rápido ($k_{\text{ESIPT}} > 10^{12} \text{ s}^{-1}$)³⁷ porque o próton em transferência já está próximo do acceptor de prótons no momento da excitação. Após a emissão de fluorescência ocorre uma transferência de próton reversa (RPT) no estado fundamental, retomando a forma enol (E).¹

Devido ao processo de fototautomerização no estado excitado, uma quantidade considerável da energia absorvida é perdida de forma não radiativa, causando grandes deslocamento de Stokes, na faixa de 200 nm ou de 8000 à 10000 cm^{-1} , quando comparado a outros fluoróforos como fluoresceína, rodamina, entre outros.³⁷ Essa propriedade fotofísica é muito interessante, pois, por diminuir a sobreposição entre os espectros de absorção e emissão, resulta em uma forte diminuição da autoabsorção e efeitos de filtro interno. Contudo, existem alguns fatores que podem favorecer ou inibir o processo de ocorrer, e, ainda, ambas espécies coexistirem no estado excitado e podem decair, gerando uma dupla banda de emissão. As intensidades relativas da emissão E^{*} e K^{*} podem depender da carga, da polaridade e da habilidade de doar ligações de hidrogênio do solvente ao redor do fluoróforo.¹

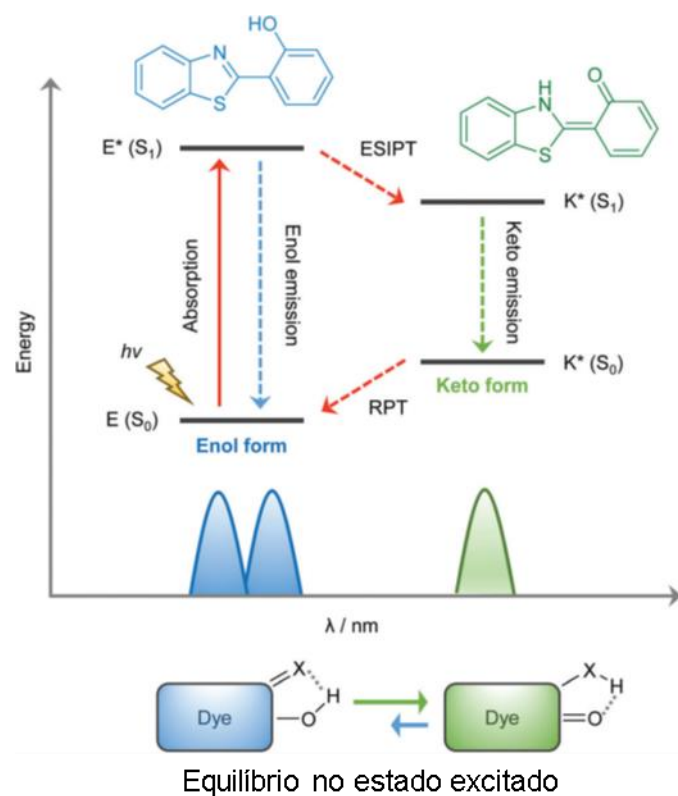


Figura 6. Ilustração do processo ESIPT em moléculas benzazólicas.³⁷

2.1.3.3 Estudo do efeito da polaridade do solvente

O efeito do solvente pode reduzir ou aumentar a energia da luz emitida por um fluoróforo. Quando ocorre a estabilização do estado excitado pelas moléculas de solvente é observada a redução do nível energético deste estado. Normalmente, quando um fluoróforo é excitado, seu estado excitado tem um momento dipolar (μ_E) maior do que seu estado fundamental (μ_G). Após a excitação, os dipolos do solvente podem se reorganizar ao redor do μ_E , diminuindo sua energia. À medida que a polaridade do solvente aumenta, esse efeito se torna mais pronunciado, resultando em emissões de luz com energias menores ou comprimentos de onda maiores.¹ Geralmente, apenas fluoróforos naturalmente polares são sensíveis à polaridade do solvente. Moléculas não polares, como hidrocarbonetos aromáticos não substituídos, são muito menos afetadas por essa polaridade.

Os tempos de vida da fluorescência (1 - 10 ns) geralmente são mais longos do que o tempo de relaxação do solvente fluido à temperatura ambiente,

cerca de 10 - 100 ps. Por isso, os espectros de emissão dos fluoróforos representam o estado relaxado do solvente. A absorção de luz acontece muito rápido (cerca de 10^{-15} s), o fluoróforo ou o solvente não têm tempo de se movimentar. Os espectros de absorção são menos sensíveis à polaridade do solvente porque a molécula fica no mesmo ambiente nos estados fundamental e excitado, enquanto nos espectros de emissão, o fluoróforo se encontra em um ambiente relaxado, com moléculas de solvente organizadas ao redor do momento dipolar do estado excitado.¹

A interpretação dos espectros de emissão dependentes do solvente é um tema complexo devido às várias interações que podem causar mudanças nos espectros. A equação de Lippert (eq. 1 apresentada na próxima seção) é um método importante usado para interpretar essas mudanças, ela descreve o deslocamento de Stokes em função das mudanças no momento dipolar após a excitação e a energia do dipolo em diferentes solventes com diferentes constantes dielétricas (ϵ) ou índices de refração (n).¹ No entanto, a teoria geral do efeito do solvente nem sempre é capaz de explicar completamente o comportamento detalhado dos fluoróforos, já que eles têm múltiplas interações complexas com o ambiente.

Além disso, alguns fluoróforos podem formar um estado de transferência de carga interna (ICT) após a excitação, em que há a separação de carga. Em um solvente polar, esse estado ICT pode ser o de menor energia, enquanto em um solvente não polar, o LE pode ser mais estável. Portanto, a polaridade do solvente não apenas afeta a energia do estado excitado, mas também determina qual estado é mais favorável.¹

O rendimento quântico pode mudar devido a diferentes taxas de decaimento não radiativo de energia (k_{nr}) ou devido a mudanças conformacionais na estrutura da molécula. Não há uma única teoria que explique completamente como o ambiente afeta a fluorescência.¹ A interpretação depende da polaridade do solvente, da estrutura do fluoróforo e das interações químicas com outras moléculas próximas. Portanto, mesmo que seja observado uma tendência com polaridade do solvente segundo a teoria geral do efeito do solvente, a influência da polaridade do solvente é apenas um dos vários fatores que afetam a emissão de luz por um fluoróforo.

Uma descrição quantitativa dos efeitos do ambiente nos espectros de emissão de fluorescência é talvez o tópico mais desafiador na espectroscopia de fluorescência. Nenhuma teoria única ou tipo de interação pode ser usada em todas as circunstâncias, por exemplo:

- Efeitos gerais do solvente devido às interações do dipolo do fluoróforo com seu ambiente.
- Efeitos específicos do solvente devido às interações entre o fluoróforo e o solvente.
- Formação de estados ICT ou ES IPT, dependendo da estrutura da sonda e do solvente circundante.

Mesmo se apenas um tipo de interação estivesse presente, os efeitos ainda seriam complexos e além dos limites da maioria dos modelos. Em relação a efeitos específicos, não existe uma teoria geral para prever o deslocamento nos espectros de emissão devido à formação de ligações de hidrogênio. Comportamentos incomuns podem ser devidos à presença de mais de um tipo de interação.^{1,38} A seguir serão apresentados com maiores detalhes estes modelos.

2.1.3.3.1 Teoria geral do efeito do solvente: Equação de Lippert-Mataga

O modelo proposto pela equação de Lippert-Mataga não inclui quaisquer interações químicas e, portanto, não pode ser utilizado para explicar as outras interações que afetam a emissão. Essas outras interações específicas, como a formação de ligações de hidrogênio ou a formação de estados de transferência de carga interna (ICT) ou de troca protônica interna no estado excitado (ES IPT), às vezes são observadas como desvios em relação à teoria geral. As interações entre o solvente e o fluoróforo afetam a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado como pode ser observado na Figura 7. Como primeira aproximação, essa diferença de energia (em cm^{-1}) é uma propriedade do índice de refração (η) e da constante dielétrica (ϵ) do solvente, e é descrita pela equação de Lippert-Mataga¹:

$$\nu_A - \nu_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{\eta^2 - 1}{2\eta^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_F)^2}{a^3} + \text{constante} \quad \text{Equação 1}$$

Onde h ($= 6,6256 \times 10^{-27}$ ergs) é a constante de Planck, c ($= 2,9979 \times 10^{10}$ cm/s) é a velocidade da luz, e a é o raio da cavidade que o fluoróforo ocupa no solvente. ν_A e ν_F são os números de onda (cm^{-1}) de absorção e emissão, respectivamente. A expressão dentro dos parênteses grandes na equação 1 é chamada de orientação de polarizabilidade (Δf). O primeiro termo $(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)$ considera os deslocamentos espectrais devido tanto à reorientação dos dipolos do solvente quanto à redistribuição dos elétrons nas moléculas do solvente. O segundo termo $(n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$ considera apenas a redistribuição dos elétrons. A diferença entre esses dois termos leva em conta os deslocamentos espectrais devido à reorientação das moléculas do solvente e, portanto, o termo orientação de polarizabilidade. De acordo com esse modelo simples, espera-se que apenas a reorientação do solvente resulte em deslocamentos de Stokes significativos. A redistribuição de elétrons ocorre instantaneamente, e tanto o estado fundamental quanto excitado são estabilizados por esse processo. Como resultado, o índice de refração e a redistribuição eletrônica têm um efeito comparativamente menor no deslocamento de Stokes.¹

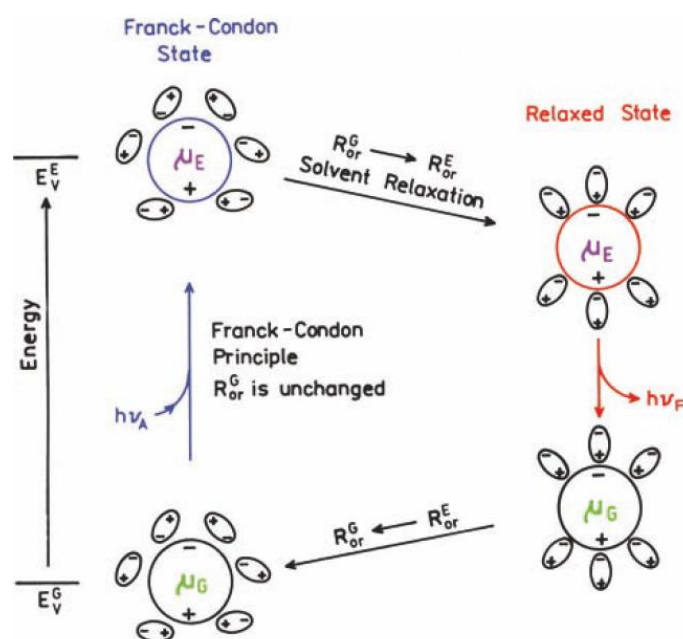


Figura 7. Efeitos dos campos eletrônicos e orientação na energia de um dipolo em meio dielétrico, $\mu_E > \mu_G$. Os círculos menores representam as moléculas do solvente e seus momentos de dipolo.¹

A Equação 2 é apenas uma aproximação, mas há uma correlação razoável entre as perdas de energia observadas e calculadas em solventes não-protônicos. Por solventes não-protônicos, referimo-nos àqueles que não possuem grupos hidroxila ou outros grupos capazes de formar ligações de hidrogênio. A equação de Lippert é uma aproximação na qual a polarizabilidade do fluoróforo e termos de ordem superior são negligenciados. Esses termos considerariam efeitos de segunda ordem, como os momentos dipolares induzidos nas moléculas do solvente resultantes do fluoróforo excitado, e vice-versa. O deslocamento de Stokes é influenciado pelas mudanças no índice de refração e na constante dielétrica do solvente, porém de forma inversa, um aumento em n diminuirá essa perda de energia, enquanto um aumento em ϵ resultará em uma diferença maior entre ν_A e ν_F .

A equação de Lippert contém várias suposições e por isso é apenas uma aproximação. Assume-se que o volume do fluoróforo é esférico, como na Figura 7, e que ele não possui interações específicas com o solvente. Além disso, ignora a polarizabilidade do fluoróforo e assume que os momentos dipolares nos estados fundamental e excitado apontam na mesma direção.¹ Desvios do comportamento previsto podem indicar a presença de interações adicionais.

A sensibilidade do solvente de um fluoróforo pode ser estimada por meio de um gráfico de Lippert. Este é um gráfico do deslocamento de Stokes em número de onda ($\nu_A - \nu_F$) em função da orientação de polarizabilidade (Δf). Os fluoróforos mais sensíveis são aqueles com a maior mudança no momento dipolar após a excitação. A linearidade desses gráficos é frequentemente considerada como evidência para a importância dominante dos efeitos gerais do solvente nos deslocamentos espectrais. Efeitos específicos do solvente resultam em gráficos de Lippert não lineares.¹

2.1.3.3.2 Efeitos específicos do solvente

Interações específicas são produzidas por uma ou algumas moléculas vizinhas e são determinadas pelas propriedades químicas específicas tanto do fluoróforo quanto do solvente.¹ Esses efeitos podem ser resultado de ligações de hidrogênio, solvatação preferencial, química ácido-base ou interações de transferência de carga, entre outros. As interações específicas solvente-

fluoróforo podem ser identificadas examinando os espectros de emissão em diferentes solventes.

Essas interações podem ocorrer tanto no estado fundamental quanto no estado excitado. Se a interação ocorrer apenas no estado excitado, um aditivo polar não afetará os espectros de absorção. Se a interação ocorrer no estado fundamental, espera-se alguma mudança no espectro de absorção. Se o fluoróforo e o solvente polar já estiverem interagindo no estado fundamental, espera-se um deslocamento espectral imediato após a excitação. Se a interação entre o fluoróforo e o solvente polar ocorrer apenas no estado excitado, a manifestação do efeito específico do solvente dependerá das taxas de difusão do fluoróforo e do solvente polar.¹

2.1.3.3.3 Escala de polaridade de Dimroth-Reichardt $E_T(30)$

Os parâmetros espectroscópicos da polaridade do solvente têm sido derivados de compostos padrões sensíveis ao solvente que absorvem radiação em determinadas faixas espectrais no UV-Vis. A primeira sugestão de que corantes solvatocrômicos deveriam ser utilizados como indicadores da polaridade do solvente foi feita por Brooker e colaboradores³⁹ em 1951. Kosower⁴⁰ em 1958 foi o primeiro a estabelecer uma escala abrangente de solventes e definiu seu parâmetro de polaridade, Z , como a energia de transição molar, E_T , expressa em kcal/mol, para a banda de absorção de transferência de carga do composto modelo iodeto de 1-etil-4-(metoxicarbonil)piridínio (Figura 8) em determinado solvente de acordo com a equação 3:

$$E_T = h \cdot c \cdot \nu \cdot N_A = 2,589 \times 10^3 \cdot \nu = Z \quad \text{Equação 2}$$

Onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, ν (cm^{-1}) é o número de onda do fóton que produz a excitação eletrônica e N_A é o número de Avogadro. O valor Z de significa determinada quantidade em kcal é necessária para promover um mol do corante padrão, dissolvido em determinado solvente, do seu estado eletrônico fundamental para o seu primeiro estado excitado. Quanto mais forte for o efeito estabilizante do solvente no par iônico do estado fundamental em comparação com o par radical menos polar no estado excitado, maior será essa energia de transição e, portanto, o valor Z . Um valor Z elevado

corresponde a uma alta polaridade do solvente. Contudo, existem algumas limitações na determinação dos valores Z , mas não iremos aprofundar neste quesito.³⁸

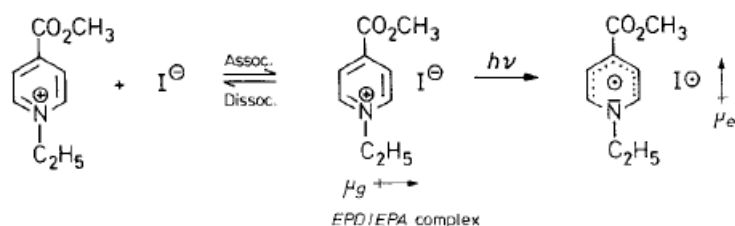


Figura 8. Ilustração do processo de transferência de carga de um elétron do iodeto para o íon piridínio durante a transição para o estado excitado.³⁸

A fim de superar as limitações práticas na abordagem do valor Z , Dimroth e Reichardt propuseram um parâmetro de polaridade do solvente, $E_T(30)$, com base na energia de transição para a banda de absorção solvatocrômica de maior comprimento de onda do corante betaína piridínio N-fenolato (corante nº 30 na referência original⁴¹) como molécula sonda padrão. O corante em questão exibe uma banda de absorção $\pi \rightarrow \pi^*$ negativamente solvatocrômica com caráter de transferência de carga intramolecular. Conforme a equação 2, o valor $E_T(30)$ para um solvente é definido como a energia de transição do corante betaína (30) dissolvido, medida em kcal/mol. A principal vantagem dessa abordagem é que a banda de absorção solvatocrômica está em comprimentos de onda mais longos para (30) do que para o corante de Kosower, gerando uma faixa extraordinariamente ampla para o comportamento solvatocrômico: de $\lambda = 810$ nm, $E_T(30) = 35,3$ kcal/mol, para éter difenílico, a $\lambda = 453$ nm, $E_T(30) = 63,1$ kcal/mol, para água. No caso da betaína (30) é até possível fazer uma estimativa da polaridade do solvente a olho nu. Por exemplo, a cor da solução de (30) é vermelha em metanol, violeta em etanol, verde em acetona, azul em álcool isoamílico e esverdeado-amarelado em anisol. Uma característica notável dessas mudanças de cor da solução é que quase todas as cores do espectro visível podem ser obtidas utilizando misturas binárias adequadas de solventes de polaridade diferente.³⁸

Os valores de $E_T(30)$ foram determinados para mais de 360 solventes orgânicos puros e para várias misturas binárias de solventes. A escala de $E_T(30)$ é a escala de polaridade de solventes empírica mais abrangente conhecida até

agora.^{42,43} Devido à carga negativa relativamente localizada no átomo de oxigênio fenólico, o corante padrão (30) é capaz de interações específicas de doador de ligação de hidrogênio (HBD)/aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) e interações ácido/base de Lewis. Por isso, mais uma característica que torna o uso desta escala extremamente vantajoso é que além das interações não específicas entre o corante e o solvente, o corante betaína (30) mede predominantemente a capacidade específica de doador de ligação de hidrogênio (HBD) e acidez de Lewis dos solventes orgânicos.⁴³

2.1.3.4 Efeitos da temperatura

Até então, presumimos que a relaxação do solvente estava completa antes da emissão, o que é verdade para solventes fluidos. Em baixas temperaturas, o solvente pode se tornar mais viscoso, e o tempo de reorientação do solvente aumenta. A relaxação do solvente ocorre com uma taxa k_s . Se essa taxa for muito mais lenta do que a taxa de decaimento ($\gamma = 1/\tau$), então espera-se observar o espectro de emissão do estado não relaxado (F). Se a relaxação do solvente for muito mais rápida do que a taxa de emissão ($k_s \gg \gamma$), então a emissão do estado relaxado (R) será observada. Em temperaturas intermediárias, onde $k_s \approx \gamma$, a emissão e a relaxação ocorrerão simultaneamente. Nessas condições, um espectro de emissão intermediário será observado. Frequentemente, esse espectro intermediário (---) é mais amplo na escala de comprimento de onda devido às contribuições tanto do estado F quanto do estado R.¹

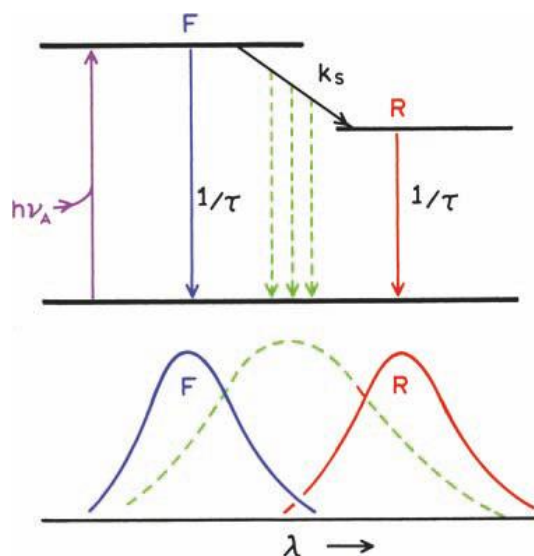


Figura 9. Diagrama de Jablonski para relaxação do solvente.¹

Um exemplo de espectros dependentes da temperatura é fornecido por Patman (Figura 10). Este fluoróforo foi desenvolvido para ser uma sonda altamente sensível à polaridade do solvente. A ideia principal é que o grupo amino seja o grupo doador de elétrons e a carbonila atue como receptor. No estado excitado, espera-se um grande momento dipolar devido à transferência de carga, resultando em alta sensibilidade à polaridade do solvente. Conforme a temperatura do propilenoglicol é reduzida, os espectros de emissão do Patman sofrem uma mudança drástica para comprimentos de onda mais curtos (Figura 10). Os efeitos da baixa temperatura são semelhantes aos dos solventes de baixa polaridade. Devido à redução da taxa de movimento do solvente, a emissão ocorre a partir do estado não relaxado em baixas temperaturas.

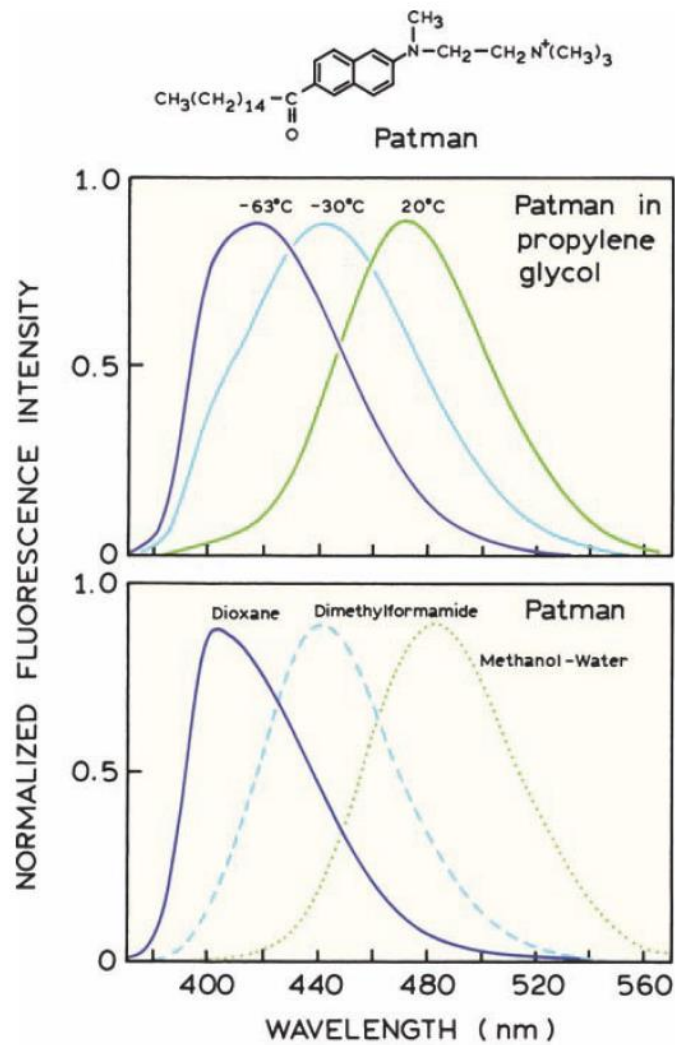


Figura 10. Espectros de emissão do composto de Patman em várias temperaturas em propilenoglicol (parte superior) e em solventes de diferentes polaridades (parte inferior).¹

2.2 Sondas fluorescentes marcadoras de mitocôndrias

A compreensão dos eventos biológicos que ocorrem nas organelas subcelulares é importante para combater distúrbios fisiológicos críticos e, assim, avançar em pesquisas que possam prevenir a causa de doenças e/ou permitir a criação de novos tratamentos a fim de promover melhorias na saúde da humanidade. Nesse sentido, a bioimagem por fluorescência permitiu o estudo aprofundado da biologia celular. Disfunções no funcionamento das mitocôndrias estão associadas à morte celular por apoptose e a causa de várias doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, câncer e diabetes^{16,18,44}. No entanto, organelas subcelulares como as mitocôndrias, que desempenham inúmeras funções importantes no contexto celular, não podem ser estudadas em detalhes devido ao seu tamanho muito pequeno, que está abaixo do limite de difração. Para superar esse problema, várias técnicas de microscopia de alta resolução surgiram e vêm se desenvolvendo recentemente e, ao serem combinadas com fluoróforos apropriados, podem facilitar o estudo da estrutura e dos processos dinâmicos dentro das mitocôndrias.⁵

As mitocôndrias desempenham várias funções essenciais para a vida celular além de possuírem um papel central na produção trifosfato de adenosina (ATP). As mitocôndrias, popularmente conhecidas como "usinas" da célula, por serem responsáveis pela geração de energia celular, são um dos constituintes mais importantes das células eucarióticas. No entanto, as funções mitocondriais podem variar em diferentes células eucarióticas. As mitocôndrias apresentam características estruturais típicas, como uma dupla membrana e uma conformação semi-isolada. As funções de organelas como as mitocôndrias podem ser resolvidas mecanisticamente estudando sua composição molecular e estrutural, bem como os arranjos espaciais em grande escala, e monitorando de perto as alterações dinâmicas que ocorrem nas células.⁵

A fluorescência é o modo de leitura óptica mais importante na microscopia confocal de amostras biológicas, pois pode ser muito mais sensível e específica do que a absorbância ou a reflectância, além de simplificar o design do scanner. Essas vantagens da fluorescência dependem criticamente de fluoróforos adequados que podem ser marcados em macromoléculas biológicas para

mostrar sua localização, ou cujas propriedades ópticas são sensíveis ao ambiente local. O conceito de microscopia confocal tem evoluído muito rapidamente há apenas algumas décadas e quase todos os componentes ópticos, eletrônicos e computacionais para suportá-lo foram desenvolvidos ou redesenhados nos últimos anos a fim de obter maior resolução nas imagens. Por outro lado, os fluoróforos mais populares foram desenvolvidos há mais de um século como as fluoresceínas e rodaminas.⁴⁵

A escolha de marcadores e sondas fluorescentes apropriados desempenha um papel crucial na obtenção de uma imagem de boa qualidade. Sem o uso de um fluoróforo projetado de maneira racional, é difícil obter entendimento de processos biológicos em matrizes subcelulares.⁵ No entanto, nos últimos anos, as sondas fluorescentes baseadas em pequenas moléculas orgânicas têm atraído grande atenção devido aos seus atributos benéficos na marcação tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O potencial negativo da membrana das mitocôndrias tem servido como chave para o design de várias sondas direcionadas às mitocôndrias baseadas em pequenas moléculas.⁵ Portanto, a maioria das sondas desenvolvidas para marcar mitocôndrias possui natureza catiônica, de modo que possam se acumular facilmente no ambiente mitocondrial, que possui potencial de membrana negativo. As sondas lipofílicas catiônicas direcionadas às mitocôndrias também podem ser frequentemente utilizadas para monitorar as alterações no potencial de membrana mitocondrial. No entanto, deve-se considerar que as sondas catiônicas, que se acumulam principalmente nas mitocôndrias através da membrana, podem migrar de volta para o citosol, bem como para o meio extracelular quando o potencial de membrana é alterado. Por outro lado, sondas fluorescentes direcionadas às mitocôndrias, responsivas ao potencial de membrana mitocondrial, que geralmente se ligam fortemente a proteínas mitocondriais e formam ligações covalentes estáveis, podem oferecer coloração e marcação mais confiáveis.

A Figura 11 representa as estruturas químicas das sondas disponíveis comercialmente comumente usadas, conhecidas como corantes MitoTracker, que são direcionadas às mitocôndrias com base no potencial de membrana. A série das sondas MitoTracker são baseadas em estruturas de rodamina e

cianina, contendo um grupo clorometil reativo à tióis que funcionam como âncora nas proteínas presentes nas membranas mitocondriais.⁴⁶ Contudo, esses marcadores mitocondriais que se ligam às proteínas mitocondriais têm algumas desvantagens. Algumas dessas sondas mostram atividade inibitória da respiração com incubação prolongada e em concentrações mais elevadas.⁵ Um exemplo é o MitoTracker Orange, que causa uma alteração na permeabilidade mitocondrial e inibição do complexo I mesmo em concentrações muito baixas (5 μM)⁴⁷. Desta forma, se for necessário um mínimo de mudança fisiológica ao estudar as características das mitocôndrias, deve-se escolher uma sonda fluorescente em que a especificidade de ligação às mitocôndrias seja governada exclusivamente pelo potencial de membrana, em vez da ligação covalente da sonda a qualquer proteína.

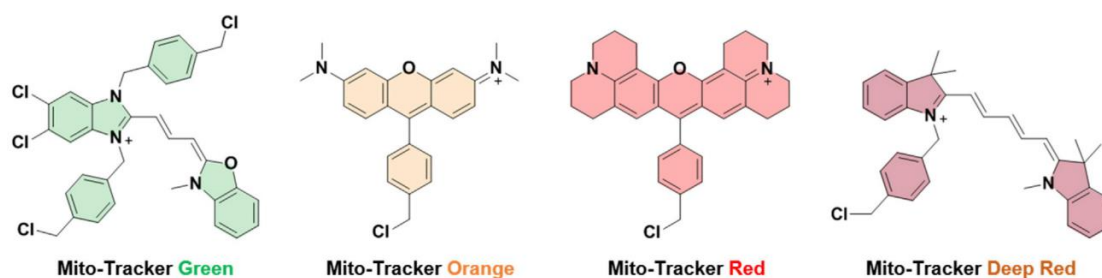


Figura 11. Estruturas químicas das sondas comerciais Mito-Tracker.⁵

Tipicamente, concentrações baixas (μM) das sondas devem ser usadas e seu efeito na viabilidade celular deve ser avaliado. A fototoxicidade das sondas fluorescentes também deve ser considerada. Mesmo em uma concentração de 100 nM, o MitoTracker Red demonstrou significativa fototoxicidade em células de osteossarcoma.⁴⁶ A fototoxicidade refere-se à capacidade de uma substância, como um corante fluorescente ou uma sonda, de causar danos celulares quando exposta à luz, especialmente luz visível ou luz ultravioleta. Este fenômeno ocorre quando a substância absorve a luz e, em seguida, transfere essa energia para as moléculas circundantes, resultando em reações prejudiciais.

No contexto de corantes e sondas utilizados em experimentos de fluorescência, a fototoxicidade pode afetar a viabilidade e o comportamento das células ou organismos estudados. A exposição prolongada à luz pode levar a danos celulares, morte celular prematura ou outros efeitos adversos. Portanto, ao utilizar substâncias fluorescentes em experimentos, é importante considerar

e controlar os níveis de exposição à luz para minimizar a fototoxicidade e garantir resultados confiáveis. No entanto, diversos cátions lipofílicos foram utilizados como inibidores metabólicos em estratégias anticâncer. A partir deste conceito muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para criação de sondas fluorescentes que permitam a marcação à mitocôndria e o tratamento de câncer por meio de terapias fotodinâmicas, chamadas de sondas teranósticas⁴⁸. Tendo isso em vista, dependendo de cada característica e propriedades das sondas para mitocôndrias podem ter uma aplicação com finalidades distintas.

Neste contexto, muitos esforços têm sido voltados ao desenvolvimento de sondas para mitocôndrias com diversas finalidades, conforme apresentado anteriormente, como marcação para estudos *in vitro* e *in vivo*, detecção de analitos dentro das mitocôndrias, como espécies reativas de oxigênio, entre outros, assim como diagnóstico e terapêuticas de diversas doenças. Assim, por ser um vasto campo de pesquisa é possível encontrar sondas com estruturas diversas. Muitos estudos sobre o desenvolvimento de sondas baseadas em cianinas, rodaminas, fluoresceínas, são encontrados na literatura.^{37,46,49} Contudo, muitas sondas desenvolvidas apresentam pequeno deslocamento de Stokes, propriedade fotofísica que gera erros de fundo em imagens biológicas.

Uma possível estratégia para o *design* de sondas fluorescentes com grande deslocamento de Stokes é a utilização de fluoróforos que apresentam o processo ESIPT. De posse do conhecimento consolidado e adquirido pelo grupo de pesquisa sobre as propriedades dos compostos 2-(2-hidróxifenil)benzazóis, imaginamos que estes núcleos teriam grande potencial como marcadores de mitocôndrias, principalmente devido ao seu grande deslocamento de Stokes. Visando a marcação das mitocôndrias dirigida por uma força eletrostática de afinidade com a membrana, foi escolhido a inclusão de um grupo catiônico piridínio na estrutura dos compostos.⁴⁹

Estruturas derivadas de 2-(2-hidróxifenil)benzazóis já vêm sendo estudadas na arquitetura de algumas sondas para marcação de mitocôndrias. Tang e colaboradores⁵⁰ desenvolveram uma sonda fluorescente ratiométrica baseada no núcleo 2-(2-hidróxifenil)benzotiazol capaz de detectar bissulfito em solução e em células vivas (Figura 12), porém a especificidade na marcação de mitocôndrias foi moderada, necessitando melhorias nesse aspecto. Uma sonda

fluorescente ratiométrica refere-se a um composto fluorescente que é utilizado para medir mudanças em uma amostra com base na alteração da razão entre duas emissões de luz em diferentes comprimentos de onda. Em vez de depender apenas da intensidade absoluta da fluorescência, as sondas fluorescentes ratiométricas medem a proporção entre duas emissões, o que pode oferecer benefícios em termos de precisão e robustez.

Essas sondas são frequentemente empregadas em aplicações de bioimagem e ensaios em biologia molecular. O termo "ratiométrico" refere-se à relação ou razão que é medida, e a fluorescência é usada como uma ferramenta para indicar mudanças em parâmetros específicos da amostra, como concentração de íons, pH, ou outras propriedades, dependendo da sonda utilizada. Essa abordagem pode proporcionar uma leitura mais confiável e menos suscetível a variações experimentais do que as medições de fluorescência simples.

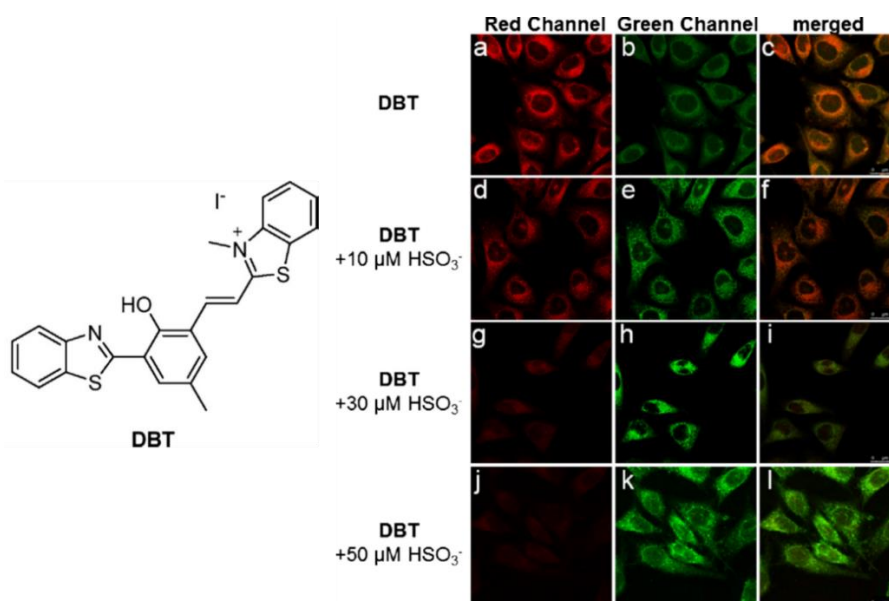


Figura 12. Estrutura da sonda ratiométrica para detecção de bissulfito em mitocôndrias proposta por Tang *et. al.* (Adaptada de Tang *et. al.*, 2017).⁵⁰

A detecção de hipoclorito, uma espécie de oxigênio reativa, é útil para entender as funções do ácido hipocloroso dentro das mitocôndrias. O hipoclorito é derivado do ácido hipocloroso formado da reação entre o peróxido de hidrogênio e o íon cloreto catalisado pela enzima mieloperoxidase. A detecção dessa espécie e simultânea marcação da mitocôndria foi reportado por Chen e colaboradores⁵¹, conforme pode ser observado na Figura 13. A sonda mostrou-

se seletiva na detecção de hipoclorito e apresentou um comportamento ratiométrico com o surgimento de uma banda deslocada para o azul.

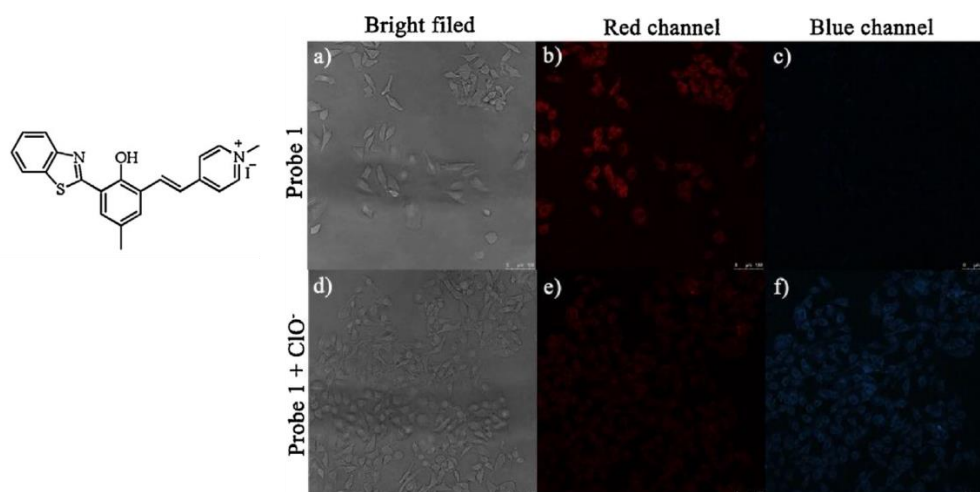


Figura 13. Sonda ratiométrica para detecção de HClO em mitocôndrias desenvolvida por Chen *et. al.* (Adaptada de Chen *et. al.*, 2017).⁵¹

A estratégia geral para o desenvolvimento de sondas fluorescentes baseadas em ESIPT para detecção de algum analito específico é fundamentada em um *design* que envolve o bloqueio do doador de ligação de hidrogênio do fluoróforo ESIPT com um grupo reativo específico (P) que impede o processo ESIPT. Desta forma, apenas a emissão da espécie bloqueada é observada, pois não há prótons intercambiáveis disponíveis. No entanto, um analito específico é capaz de reagir com o grupo reativo (P) na sonda gerando o fluoróforo na forma enol capaz de sofrer a tautomerização para a forma ceto no estado excitado. Desta forma é possível desenvolver um fluoróforo do tipo ESIPT *off-on* como pode ser observado na Figura 14.³⁷

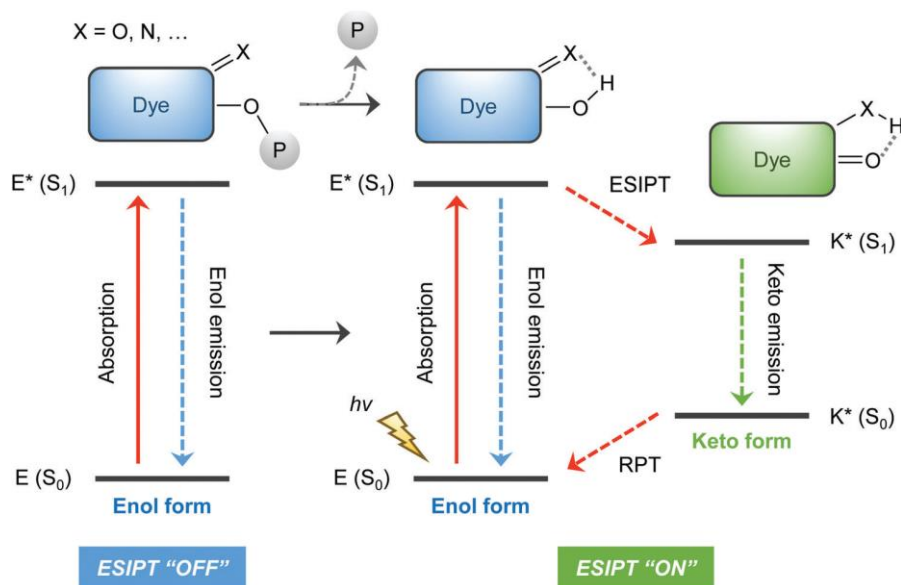


Figura 14. Ilustração de uma das estratégias mais comuns para o *design* de sondas ES IPT *off-on*.³⁷

Por exemplo, em outro estudo publicado por Tang e colaboradores, eles apresentam uma sonda marcadora de mitocôndria que detecta peróxido de hidrogênio dentro da organela (Figura 15). A detecção ocorre a partir de uma reação de oxidação do grupo boronato à álcool seguido da reação de eliminação 1,6 que libera o fluoróforo benzotiazol, capaz de realizar o processo ES IPT acoplado ao processo de ICT apresentando grande deslocamento de Stokes.⁵²

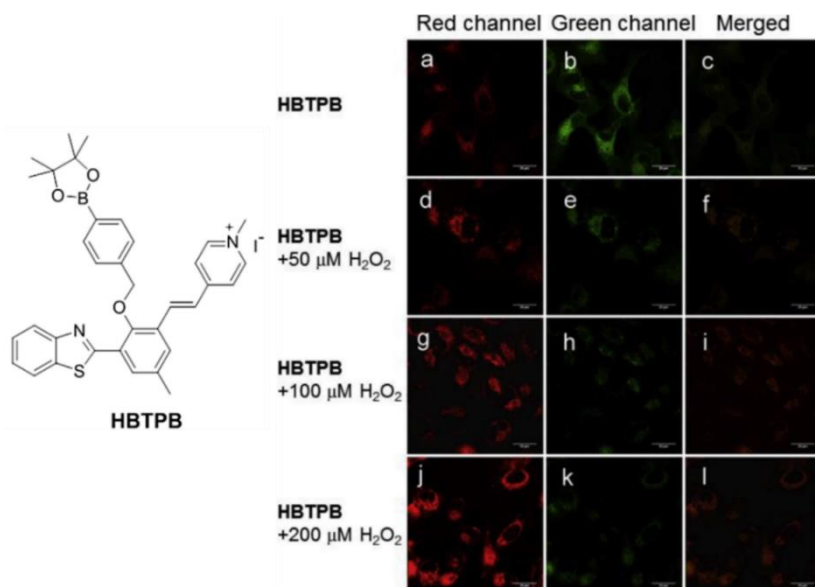


Figura 15. Estrutura da sonda para detecção de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias proposta por Tang *et. al* (Adaptada de Tang *et. al.*, 2018).⁵²

Utilizando essa estratégia de reação com a sonda para liberação do fluoróforo, Yang e colaboradores⁵³ desenvolveram uma sonda capaz de detectar o estado de hipóxia presente em células cancerosas a partir da reação com a nitroreductase. Além disso, a capacidade de marcação da mitocôndria foi avaliada como excelente (Figura 16). O que torna essa sonda com grande potencial na identificação de células cancerosas mediante bioimageamento.

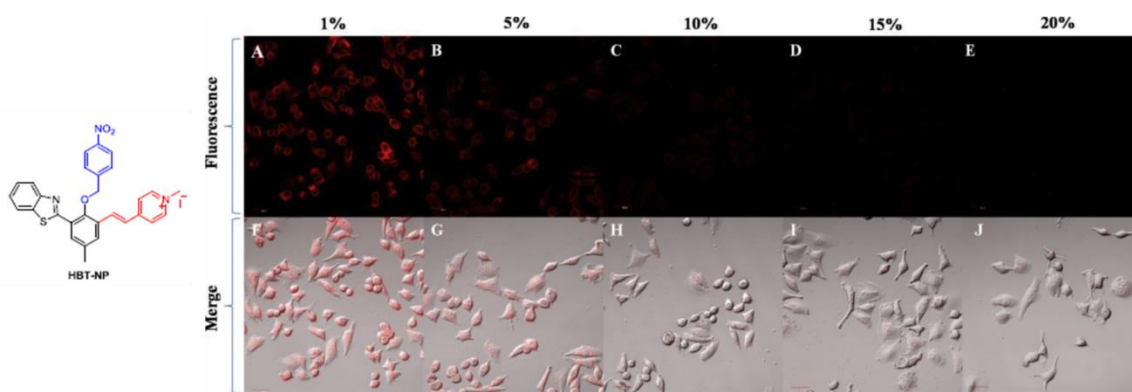


Figura 16. Sonda para mitocôndrias de células em estado de hipóxia. Imagens de microscopia de células com diferentes níveis de oxigênio (1%, 5%, 10%, 15%, 20% O₂) tratadas com a sonda por 8 h (Adaptada de Yang *et al.*, 2020).⁵³

Apesar dos desafios, estes estudos vão além dos “limites” formais de cada disciplina, sendo considerado parte de uma ciência translacional, a qual está evoluindo rapidamente e promove aplicações na medicina, biologia molecular e celular, química, química biológica e outras ciências interdisciplinares. A pesquisa na síntese e a compreensão do efeito da estrutura molecular de novos marcadores fluorescentes específicos para mitocôndrias abrange avanços na ciência básica com potencial imediato para aplicação, tendo assim impacto econômico e tecnológico direto.²⁹ Muitos processos ainda precisam ser compreendidos e resolvidos em relação às funções mitocondriais e por isso a importância no desenvolvimento de novas sondas fluorescentes marcadoras desta organela específica.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho possui um caráter multidisciplinar, pois foi realizado mediante a utilização de conceitos e métodos de diversas áreas da ciência, envolvendo a química orgânica, fotofísica orgânica, química analítica, química teórica e biologia celular. Essa característica permitiu o enriquecimento na compreensão dos fenômenos estudados. Contudo, por se tratar de um assunto com alto grau de complexidade e muitas variáveis, apresentou diversos desafios, desde a purificação dos compostos sintetizados até a obtenção das imagens biológicas por microscopia de fluorescência confocal.

Foram sintetizados seis novos compostos híbridos derivados do núcleo benzazol e suas estruturas foram confirmadas através de técnicas de caracterização molecular. O estudo fotofísico dos compostos mostrou que não há uma tendência clara que possa ser estabelecida entre as propriedades fotofísicas e a mudança do heteroátomo do núcleo 2-(2-hidróxifenil)benzazol. Os compostos apresentam propriedades fotofísicas de grande deslocamento de Stokes e absorção e emissão no espectro visível, que são muito atraentes para diversas aplicações. Os modelos matemáticos teóricos tradicionais para investigar os processos de transferência de carga interna, como Lippert-Mattaga e a escala de polaridade de Dimroth-Reichardt $E_T(30)$, não foram eficazes para explicar o comportamento fotofísico dos compostos em diferentes solventes. Tendo em vista, que muitas aproximações são estabelecidas e vários fatores são ignorados por esses métodos, conclui-se que os compostos apresentam importantes interações específicas com o meio que não foram possíveis de serem elucidadas. Entretanto, através do método de emissão de fluorescência a baixas temperaturas foi observado um comportamento que nos permite sugerir fortemente que ocorre o processo de ESIPT e ICT nessas estruturas. Esse resultado está de acordo com o que é descrito para estruturas similares reportado na literatura.

Os compostos **21** e **22**, derivados do núcleo benzotiazol, apresentaram alta sensibilidade na detecção de bases. Essa característica pode ser mais explorada, pois os compostos apresentam grande potencial como sondas

colorimétricas para esses analitos bastante relevantes, principalmente na indústria alimentícia.

Uma forma de avaliar a interação com enzimas e obter maiores entendimentos sobre a interação dos compostos em meio biológico é a partir do estudo da supressão de fluorescência da HSA. Este ensaio é importante para compostos que possam vir a ser utilizados em organismos vivos, como fármacos, por exemplo, mas também são úteis para sondas. O estudo realizado mostrou uma interação moderada e espontânea causada tanto pelo mecanismo estático quanto dinâmico. Esse resultado sugere que os compostos estudados podem ser carregados por proteínas, como a albumina, pela corrente sanguínea e, por consequência, distribuídos.

Por fim, excelentes marcações de mitocôndrias foram obtidas mediante bioimageamento. A análise de colocação evidenciou a altíssima seletividade das sondas nas mitocôndrias. Este resultado encontrado é superior à vários estudos reportados na literatura. Além disso, a citotoxicidade apresentada é pelo menos três vezes maior do que a concentração utilizada nos ensaios de marcação, o que torna esses compostos seguros para utilização sem prejuízos ao funcionamento celular. O estudo de dinâmica molecular comprovou a alta afinidade dos compostos pela dupla membrana fosfolipídica, corroborando com os ensaios de bioimageamento. Estes resultados demonstram que o *design* da estrutura foi bem-sucedido para a finalidade de marcação da mitocôndria via afinidade com a membrana da organela. Tendo em vista que a ciência nunca tem fim, o potencial desses compostos pode ser explorado muito mais em outras aplicações, como na detecção de analitos no ambiente intracelular, no estudo de diagnóstico e terapêutica de diversos distúrbios, entre outras infinitas ideias.

REFERÊNCIAS

- (1) Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* **1999**. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6>.
- (2) Tong, H.; Zheng, Y.; Zhou, L.; Li, X.; Qian, R.; Wang, R.; Zhao, J.; Lou, K.; Wang, W. Enzymatic Cleavage and Subsequent Facile Intramolecular Transcyclization for in Situ Fluorescence Detection of γ -Glutamyltranspeptidase Activities. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (22), 10816–10820.
https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B03448/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2016-03448Y_0002.JPEG.
- (3) He, L.; Dong, B.; Liu, Y.; Lin, W. Fluorescent Chemosensors Manipulated by Dual/Triple Interplaying Sensing Mechanisms. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (23), 6449–6461. <https://doi.org/10.1039/C6CS00413J>.
- (4) Yang, Z.; Sharma, A.; Qi, J.; Peng, X.; Lee, D. Y.; Hu, R.; Lin, D.; Qu, J.; Kim, J. S. Super-Resolution Fluorescent Materials: An Insight into Design and Bioimaging Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (17), 4651–4667. <https://doi.org/10.1039/C5CS00875A>.
- (5) Samanta, S.; He, Y.; Sharma, A.; Kim, J.; Pan, W.; Yang, Z.; Li, J.; Yan, W.; Liu, L.; Qu, J.; Kim, J. S. Fluorescent Probes for Nanoscopic Imaging of Mitochondria. *Chem* **2019**, *5* (7), 1697–1726. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.03.011>.
- (6) Lin, W.; Yuan, L.; Cao, Z.; Feng, Y.; Song, J. Through-Bond Energy Transfer Cassettes with Minimal Spectral Overlap between the Donor Emission and Acceptor Absorption: Coumarin–Rhodamine Dyads with Large Pseudo-Stokes Shifts and Emission Shifts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (2), 375–379. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200904515>.
- (7) Zhang, Z.; Achilefu, S. Synthesis and Evaluation of Polyhydroxylated Near-Infrared Carbocyanine Molecular Probes. *Org. Lett.* **2004**, *6* (12), 2067–

2070.

https://doi.org/10.1021/OL049258A/SUPPL_FILE/OL049258ASI20040504_011313.PDF.

- (8) Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. Synthesis and Applications of Rhodamine Derivatives as Fluorescent Probes. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (8), 2410–2433. <https://doi.org/10.1039/B901612K>.
- (9) Tsien, R. Y.; Waggoner, A. Fluorophores for Confocal Microscopy. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* **1995**, 267–279. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5348-6_16.
- (10) Yang, L.; Liu, Y.; Ma, C.; Liu, W.; Li, Y.; Li, L. Naphthalene-Fused BODIPY with Large Stokes Shift as Saturated-Red Fluorescent Dye for Living Cell Imaging. *Dyes Pigm.* **2015**, *122*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2015.06.006>.
- (11) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Ed.* **2012**. <https://doi.org/10.1002/9783527650002>.
- (12) Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. Fluorescent Indicators Based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (3), 1130–1172. <https://doi.org/10.1039/C1CS15132K>.
- (13) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim. Acta A* **1995**, *51* (6), L7–L21. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01421-P](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-P).
- (14) Cui, A.; Peng, X.; Fan, J.; Chen, X.; Wu, Y.; Guo, B. Synthesis, Spectral Properties and Photostability of Novel Boron-Dipyrromethene Dyes. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2007**, *186* (1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2006.07.015>.
- (15) Benson, R. C.; Kues, H. A. Absorption and Fluorescence Properties of Cyanine Dyes. *J. Chem. Eng. Data* **1977**, *22* (4), 379–383.

https://doi.org/10.1021/JE60075A020/ASSET/JE60075A020.FP.PNG_V03.

- (16) Eckert, A.; Keil, U.; Marques, C. A.; Bonert, A.; Frey, C.; Schüssel, K.; Müller, W. E. Mitochondrial Dysfunction, Apoptotic Cell Death, and Alzheimer's Disease. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66* (8), 1627–1634. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00534-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00534-3).
- (17) Lesnefsky, E. J.; Moghaddas, S.; Tandler, B.; Kerner, J.; Hoppel, C. L. Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia–Reperfusion, Aging, and Heart Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2001**, *33* (6), 1065–1089. <https://doi.org/10.1006/JMCC.2001.1378>.
- (18) Lowell, B. B.; Shulman, G. I. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. *Science* **2005**, *307* (5708), 384–387. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1104343>.
- (19) Kang, D.; Hamasaki, N. Alterations of Mitochondrial DNA in Common Diseases and Disease States: Aging, Neurodegeneration, Heart Failure, Diabetes and Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *12* (4), 429–441. <https://doi.org/10.2174/0929867053363081>.
- (20) Chan, D. C. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*. Elsevier B.V. June 30, 2006, pp 1241–1252. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.010>.
- (21) McBride, H. M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* **2006**, *16* (14), R551–R560. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.06.054/ATTACHMENT/6A09F887-1EE7-4129-99E1-2074EDCF7E6B/MMC1.PDF>.
- (22) Nunnari, J.; Suomalainen, A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* **2012**, *148* (6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.035>.
- (23) Hamanaka, R. B.; Chandel, N. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Cellular Signaling and Dictate Biological Outcomes. *Trends*

- Biochem. Sci.* **2010**, *35* (9), 505–513.
<https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2010.04.002>.
- (24) Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of Cell Death: The Calcium–Apoptosis Link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (7), 552–565. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>.
- (25) Tan, S.; Sagara, Y.; Liu, Y.; Maher, P.; Schubert, D. The Regulation of Reactive Oxygen Species Production during Programmed Cell Death. *J. Cell Biol.* **1998**, *141* (6), 1423–1432. <https://doi.org/10.1083/JCB.141.6.1423>.
- (26) Xu, Z.; Xu, L. Fluorescent Probes for the Selective Detection of Chemical Species inside Mitochondria. *Chem. Comm.* **2016**, *52* (6), 1094–1119. <https://doi.org/10.1039/C5CC09248E>.
- (27) Liu, S. Di; Zhang, L. W.; Liu, X. A Highly Sensitive and Selective Fluorescent Probe for Fe³⁺ Based on 2-(2-Hydroxyphenyl)Benzothiazole. *New J. Chem.* **2013**, *37* (3), 821–826. <https://doi.org/10.1039/C2NJ40978J>.
- (28) Tong, H.; Zhou, G.; Wang, L.; Jing, X.; Wang, F.; Zhang, J. Novel Highly Selective Anion Chemosensors Based on 2,5-Bis(2-Hydroxyphenyl)-1,3,4-Oxadiazole. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (1), 131–134. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02504-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02504-2).
- (29) Neto, B. A. D.; Corrêa, J. R.; Silva, R. G. Selective Mitochondrial Staining with Small Fluorescent Probes: Importance, Design, Synthesis, Challenges and Trends for New Markers. *RSC Adv.* **2013**, 5291–5301. <https://doi.org/10.1039/c2ra21995f>.
- (30) Acuña, A. U.; Amat, F.; Catalán, J.; Costela, A.; Figuera, J. M.; Muñoz, J. M. Pulsed Liquid Lasers from Proton Transfer in the Excited State. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132* (6), 567–569. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(86\)87126-3](https://doi.org/10.1016/0009-2614(86)87126-3).

- (31) Costela, A.; Amat, F.; Catalán, J.; Douhal, A.; Figuera, J. M.; Muñoz, J. M.; Acuña, A. U. Phenylbenzimidazole Proton-Transfer Laser Dyes: Spectral and Operational Properties. *Opt. Commun.* **1987**, *64* (5), 457–460. [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(87\)90318-X](https://doi.org/10.1016/0030-4018(87)90318-X).
- (32) SKOOG, D. A.; W. D. M.; H. F. J.; C. S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, 8a ed.; Thomson: São Paulo, 2006.
- (33) PAVIA, D. L.; L. G. M.; K. G. S.; V. J. R. *Introdução à Espectroscopia.*, 2 ed.; Cengage Learning Brasil: São Paulo, 2016.
- (34) Valeur, B. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*; 2001.
- (35) Wardle, Brian. *Principles and Applications of Photochemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- (36) He, T.; Wang, Y.; Tian, X.; Gao, Y.; Zhao, X.; Grimsdale, A. C.; Lin, X.; Sun, H. An Organic Dye with Very Large Stokes-Shift and Broad Tunability of Fluorescence: Potential Two-Photon Probe for Bioimaging and Ultra-Sensitive Solid-State Gas Sensor. *Appl. Phys. Lett.* **2016**, *108* (1). <https://doi.org/10.1063/1.4939232/30888>.
- (37) Sedgwick, A. C.; Wu, L.; Han, H. H.; Bull, S. D.; He, X. P.; James, T. D.; Sessler, J. L.; Tang, B. Z.; Tian, H.; Yoon, J. Excited-State Intramolecular Proton-Transfer (ESIPT) Based Fluorescence Sensors and Imaging Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (23), 8842–8880. <https://doi.org/10.1039/c8cs00185e>.
- (38) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3 ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
- (39) Brooker, L. G. S.; Keyes, G. H.; Heseltine, D. W. Color and Constitution. XI.1 Anhydronium Bases of p-Hydroxystyryl Dyes as Solvent Polarity Indicators. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (11), 5350–5356. https://doi.org/10.1021/JA01155A097/ASSET/JA01155A097.FP.PNG_V03.

- (40) Kosower, E. M. The Effect of Solvent on Spectra. I. A New Empirical Measure of Solvent Polarity: Z-Values. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (13), 3253–3260.
https://doi.org/10.1021/JA01546A020/ASSET/JA01546A020.FP.PNG_V03.
- (41) Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F. Über Pyridinium-N-Phenol-Betaine Und Ihre Verwendung Zur Charakterisierung Der Polarität von Lösungsmitteln. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *661* (1), 1–37. <https://doi.org/10.1002/JLAC.19636610102>.
- (42) Cerón-Carrasco, J. P.; Jacquemin, D.; Laurence, C.; Planchat, A.; Reichardt, C.; Sraïdi, K. Solvent Polarity Scales: Determination of New ET(30) Values for 84 Organic Solvents. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27* (6), 512–518. <https://doi.org/10.1002/POC.3293>.
- (43) Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2319–2358.
https://doi.org/10.1021/CR00032A005/ASSET/CR00032A005.FP.PNG_V03.
- (44) Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Nature* *2006* *443*:7113 **2006**, *443* (7113), 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>.
- (45) Pawley, J. B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3 ed.; Springer Science+Business Media, LLC: New York, 2006.
- (46) Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10043–10120.
https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00042/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2017-00042Z_0036.GIF.

- (47) Scorrano, L.; Petronilli, V.; Colonna, R.; Di Lisa, F.; Bernardi, P. Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker OrangeTM) Induces the Mitochondrial Permeability Transition and Inhibits Respiratory Complex I: IMPLICATIONS FOR THE MECHANISM OF CYTOCHROME c RELEASE. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (35), 24657–24663. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.35.24657>.
- (48) Guo, X.; Yang, N.; Ji, W.; Zhang, H.; Dong, X.; Zhou, Z.; Li, L.; Shen, H. M.; Yao, S. Q.; Huang, W. Mito-Bomb: Targeting Mitochondria for Cancer Therapy. *Advanced Materials*. John Wiley and Sons Inc October 1, 2021. <https://doi.org/10.1002/adma.202007778>.
- (49) Ning, P.; Wang, W.; Chen, M.; Feng, Y.; Meng, X. Recent Advances in Mitochondria- and Lysosomes-Targeted Small-Molecule Two-Photon Fluorescent Probes. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, *28* (10), 1943–1951. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2017.09.026>.
- (50) Tang, L.; He, P.; Yan, X.; Sun, J.; Zhong, K.; Hou, S.; Bian, Y. A Mitochondria-Targetable Fluorescent Probe for Ratiometric Detection of SO₂ Derivatives and Its Application in Live Cell Imaging. *Sens Actuators B Chem.* **2017**, *247*, 421–427. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2017.03.032>.
- (51) Chen, Y.; Wei, T.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Lv, J.; Chen, T.; Chi, B.; Wang, F.; Chen, X. A Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe for Ratiometric Detection of Hypochlorite in Living Cells. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, *28* (10), 1957–1960. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2017.05.010>.
- (52) Tang, L.; Tian, M.; Chen, H.; Yan, X.; Zhong, K.; Bian, Y. An ES IPT-Based Mitochondria-Targeted Ratiometric and NIR-Emitting Fluorescent Probe for Hydrogen Peroxide and Its Bioimaging in Living Cells. *Dyes Pigm.* **2018**, *158*, 482–489. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2017.12.028>.
- (53) Yang, Q.; Wang, S.; Li, D.; Yuan, J.; Xu, J.; Shao, S. A Mitochondria-Targeting Nitroreductase Fluorescent Probe with Large Stokes Shift and Long-Wavelength Emission for Imaging Hypoxic Status in Tumor Cells.

Anal. Chim. Acta **2020**, *1103*, 202–211.
<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.12.063>.

- (54) Da Silveira Santos, F.; Medeiros, N. G.; Affeldt, R. F.; Da Costa Duarte, R.; Moura, S.; Rodembusch, F. S. Small Heterocycles as Highly Luminescent Building Blocks in the Solid State for Organic Synthesis. *New J. Chem.* **2016**, *40* (3), 2785–2791. <https://doi.org/10.1039/c5nj02943k>.
- (55) Bhattacharya, S.; Samanta, S. K. Unusual Salt-Induced Color Modulation through Aggregation-Induced Emission Switching of a Bis-Cationic Phenylenedivynylene-Based π Hydrogelator. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (52), 16632–16641. <https://doi.org/10.1002/chem.201201940>.
- (56) Dey, N.; Samanta, S. K.; Bhattacharya, S. Heparin Triggered Dose Dependent Multi-Color Emission Switching in Water: A Convenient Protocol for Heparinase I Estimation in Real-Life Biological Fluids. *Chem. Comm.* **2017**, *53* (9), 1486–1489. <https://doi.org/10.1039/c6cc08657h>.
- (57) Sastry, N. v.; Ravalji, I. R. Densities, Speeds of Sound, and Excess and Partial Excess Properties of Room Temperature Ionic Liquids of Type [C_npy][X] or [C_n4mpy][X] (Where n = 6 or 8, [X] = Cl⁻ or Br⁻) + Water Binary Mixtures at T = (308.15 and 318.15) K. *J. Chem. Eng. Data* **2016**, *61* (11), 3834–3848. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.6b00460>.
- (58) Niu, J.; Liu, Y.; Wang, W.; Lin, W. Development of Triphenylamine-Based Fluorescent Probe with a Large Stokes' Shift Suitable for Locating Mitochondria. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2018**, *352*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.10.044>.
- (59) Juskowiak, B.; Ohba, M.; Sato, M.; Takenaka, S.; Takagi, M.; Kondo, H. Photoisomerizable DNA Ligands. Spectral and Electrochemical Properties and Base-Pair Selectivity of Binding of Bis[2-(1-Alkylpyridinium-4-Yl)Vinyl]Benzene Dyes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72* (2), 265–277. <https://doi.org/10.1246/bcsj.72.265>.

- (60) Du, H.; Fuh, R. C. A.; Li, J.; Corkan, L. A.; Lindsey, J. S. PhotochemCAD \ddagger : A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68* (2), 141–142. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1998.TB02480.X>.
- (61) Bolte, S.; Cordelières, F. P. A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224* (3), 213–232. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.2006.01706.X>.
- (62) Kim, S.; Lee, J.; Jo, S.; Brooks, C. L.; Lee, H. S.; Im, W. CHARMM-GUI Ligand Reader and Modeler for CHARMM Force Field Generation of Small Molecules. *J. Comput. Chem.* **2017**, *38* (21), 1879–1886. <https://doi.org/10.1002/JCC.24829>.
- (63) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/JCC.20945>.
- (64) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory. Comput.* **2016**, *12* (1), 405–413. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.5B00935/ASSET/IMAGES/LARGE/CT-2015-00935E_0005.JPEG.
- (65) Wu, E. L.; Cheng, X.; Jo, S.; Rui, H.; Song, K. C.; Dávila-Contreras, E. M.; Qi, Y.; Lee, J.; Monje-Galvan, V.; Venable, R. M.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Membrane Builder toward Realistic Biological Membrane Simulations. *J. Comput. Chem.* **2014**, *35* (27), 1997–2004. <https://doi.org/10.1002/JCC.23702>.

- (66) Mackerell, A. D. Empirical Force Fields for Biological Macromolecules: Overview and Issues. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1584–1604. <https://doi.org/10.1002/JCC.20082>.
- (67) Klauda, J. B.; Venable, R. M.; Freites, J. A.; O'Connor, J. W.; Tobias, D. J.; Mondragon-Ramirez, C.; Vorobyov, I.; MacKerell, A. D.; Pastor, R. W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (23), 7830–7843. https://doi.org/10.1021/JP101759Q/SUPPL_FILE/JP101759Q_SI_001.PDF.
- (68) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (69) Severo Rodembusch, F. Síntese, Caracterização e Estudo Fotofísico de Heterociclos Fluorescentes Por ES IPT e Suas Aplicações Na Preparação de Novos Materiais., UFRGS, Porto Alegre, 2005.
- (70) Duff, J. C.; Bills, E. J. 273. Reactions between Hexamethylenetetramine and Phenolic Compounds. Part I. A New Method for the Preparation of 3- and 5-Aldehydosalicylic Acids. *J. Chem. Soc.* **1932**, No. 0, 1987–1988. <https://doi.org/10.1039/JR9320001987>.
- (71) Duff, J. C.; Bills, E. J. 282. Reactions between Hexamethylenetetramine and Phenolic Compounds. Part II. Formation of Phenolic Aldehydes. Distinctive Behaviour of p-Nitrophenol. *J. Chem. Soc.* **1934**, No. 0, 1305–1308. <https://doi.org/10.1039/JR9340001305>.
- (72) Duff, J. C. 96. A New General Method for the Preparation of o-Hydroxyaldehydes from Phenols and Hexamethylenetetramine. *J. Chem. Soc.* **1941**, No. 0, 547–550. <https://doi.org/10.1039/JR9410000547>.

- (73) Duff, J. C. 71. A New Method for the Preparation of p-Dialkylaminobenzaldehydes. *J. Chem. Soc.* **1945**, No. 0, 276–277. <https://doi.org/10.1039/JR9450000276>.
- (74) Smith, W. E. Formylation of Aromatic Compounds with Hexamethylenetetramine and Trifluoroacetic Acid. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (24), 3972–3973. <https://doi.org/10.1021/jo00797a057>.
- (75) Lindoy, L. F.; Meehan, G. V.; Svenstrup, N. Mono- and Diformylation of 4-Substituted Phenols: A New Application of the Duff. *Synthesis (Stuttg)* **1998**, *7*, 1029–1032. <https://doi.org/10.1055/s-1998-2110>.
- (76) Aldabbagh, F. Aldehydes: Aryl and Heteroaryl Aldehydes. *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II* **2005**, *3*, 99–133. <https://doi.org/10.1016/B0-08-044655-8/00048-9>.
- (77) Affeldt, R. F.; De Amorim Borges, A. C.; Russowsky, D.; Severo Rodembusch, F. Synthesis and Fluorescence Properties of Benzoxazole-1,4-Dihydropyridine Dyads Achieved by a Multicomponent Reaction. *New J. Chem.* **2014**, *38* (9), 4607–4614. <https://doi.org/10.1039/C4NJ00777H>.
- (78) Protti, S.; Mezzetti, A. Solvent Effects on the Photophysics and Photoreactivity of 3-Hydroxyflavone: A Combined Spectroscopic and Kinetic Study. *J. Mol. Liq.* **2015**, *205*, 110–114. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2014.12.001>.
- (79) Protti, S.; Mezzetti, A.; Cornard, J. P.; Lapouge, C.; Fagnoni, M. Hydrogen Bonding Properties of DMSO in Ground-State Formation and Optical Spectra of 3-Hydroxyflavone Anion. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *467* (1–3), 88–93. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2008.11.005>.
- (80) Megha; Kumar, V.; Kaur, P.; Singh, K. Julolidine Based Red Emitting ESIPT/AIE Active Material Showing Luminescence beyond Excimer Emission: An “on-off” Emission Response to Cu²⁺. *Spectrochim. Acta A* **2023**, *290*, 122239. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2022.122239>.

- (81) Vetrova, E. V.; Metelitsa, A. V.; Tupaeva, I. O.; Chernishev, A. V.; Sayapin, Y. A.; Minkin, V. I.; Dorogan, I. V. Insights into the Photo- and Thermal Induced Intramolecular Processes of 2-(Hydroxyphenyl)Benzoxazoles: Experimental and Theoretical Aspects. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2023**, *442*, 114769. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2023.114769>.
- (82) Bhattacharyya, A.; Makhal, S. C.; Guchhait, N. Simple Chloro Substituted HBT Derivative Portraying Coupling of AIE and ESIPT Phenomenon: Ratiometric Detection of S²⁻ and CN⁻ in 100% Aqueous Medium. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2020**, *388*, 112177. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2019.112177>.
- (83) Da Silveira Santos, F.; Medeiros, N. G.; Affeldt, R. F.; Da Costa Duarte, R.; Moura, S.; Rodembusch, F. S. Small Heterocycles as Highly Luminescent Building Blocks in the Solid State for Organic Synthesis. *New J. Chem.* **2016**, *40* (3), 2785–2791. <https://doi.org/10.1039/c5nj02943k>.
- (84) Das, K.; Sarkar, N.; Kumar, A.; Devashis Majumdar, G. /; Nath, D. N.; Bhattacharyya, K. Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 2-(2'-Hydroxyphenyl)Benzimidazole and-Benzoxazole: Effect of Rotamerism and Hydrogen Bonding. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9126–9132. [https://doi.org/0022-3654/94/2098-9126\\$04.50/0](https://doi.org/0022-3654/94/2098-9126$04.50/0).
- (85) Abeywickrama, C. S.; Bertman, K. A.; McDonald, L. J.; Alexander, N.; Dahal, D.; Baumann, H. J.; Salmon, C. R.; Wesdemiotis, C.; Konopka, M.; Tessier, C. A.; Pang, Y. Synthesis of Highly Selective Lysosomal Markers by Coupling 2-(2'-Hydroxyphenyl)Benzothiazole (HBT) with Benzothiazolium Cyanine (Cy): The Impact of Substituents on Selectivity and Optical Properties. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (47), 7502–7514. <https://doi.org/10.1039/c9tb01672d>.
- (86) Dahal, D.; McDonald, L.; Bi, X.; Abeywickrama, C.; Gombedza, F.; Konopka, M.; Paruchuri, S.; Pang, Y. An NIR-Emitting Lysosome-Targeting Probe with Large Stokes Shift: Via Coupling Cyanine and Excited-State

- Intramolecular Proton Transfer. *Chem. Comm.* **2017**, 53 (26), 3697–3700. <https://doi.org/10.1039/c7cc00700k>.
- (87) Dahal, D.; Ojha, K. R.; Alexander, N.; Konopka, M.; Pang, Y. An NIR-Emitting ESIPT Dye with Large Stokes Shift for Plasma Membrane of Prokaryotic (E. Coli) Cells. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, 259, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.041>.
- (88) Gomes, M. B.; Pires, B. A. D.; Fracalanza, S. A. P.; Marin, V. A. O Risco Das Aminas Biogênicas Nos Alimentos. *Cien. Saude Colet.* **2014**, 19 (4), 1123–1134. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014194.18672012>.
- (89) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. *Protein Eng. Des. Sel.* **1999**, 12 (6), 439–446. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/12.6.439>.
- (90) Elzoghby, A. O.; Samy, W. M.; Elgindy, N. A. Albumin-Based Nanoparticles as Potential Controlled Release Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2012**, 157 (2), 168–182. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2011.07.031>.
- (91) Murray, C. W.; Hartshorn, M. J. New Applications for Structure-Based Drug Design. *Comprehensive Medicinal Chemistry II* **2007**, 4, 775–806. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00277-7>.
- (92) Trujillo, M.; Alvarez, B.; Souza, J. M.; Romero, N.; Castro, L.; Thomson, L.; Radi, R. Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* **2010**, 61–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373866-0.00003-4>.
- (93) Chaves, O. A.; de Barros, L. S.; de Oliveira, M. C. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, A. B. B.; da Silva, F. A.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C. Biological Interactions of Fluorinated Chalcones: Stimulation of Tyrosinase Activity and Binding to Bovine Serum Albumin. *J. Fluor. Chem.* **2017**, 199, 30–38. <https://doi.org/10.1016/J.JFLUCHEM.2017.04.007>.

- (94) Suryawanshi, V. D.; Walekar, L. S.; Gore, A. H.; Anbhule, P. V.; Kolekar, G. B. Spectroscopic Analysis on the Binding Interaction of Biologically Active Pyrimidine Derivative with Bovine Serum Albumin. *J. Pharm. Anal.* **2016**, 6 (1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.07.001>.
- (95) Ganeshpandian, M.; Loganathan, R.; Suresh, E.; Riyasdeen, A.; Akbarsha, M. A.; Palaniandavar, M. New Ruthenium(II) Arene Complexes of Anthracenyl-Appended Diazacycloalkanes: Effect of Ligand Intercalation and Hydrophobicity on DNA and Protein Binding and Cleavage and Cytotoxicity. *Dalton Trans.* **2013**, 43 (3), 1203–1219. <https://doi.org/10.1039/C3DT51641E>.
- (96) Paul, B. K.; Guchhait, N.; Bhattacharya, S. C. Binding of Ciprofloxacin to Bovine Serum Albumin: Photophysical and Thermodynamic Aspects. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2017**, 172, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOLOG.2017.04.026>.
- (97) Chaves, O. A.; Menezes, L. B.; Iglesias, B. A. Multiple Spectroscopic and Theoretical Investigation of Meso-Tetra-(4-Pyridyl)Porphyrin-ruthenium(II) Complexes in HSA-Binding Studies. Effect of Zn(II) in Protein Binding. *J. Mol. Liq.* **2019**, 294, 111581. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111581>.
- (98) Tabassum, S.; Al-Asbahy, W. M.; Afzal, M.; Arjmand, F. Synthesis, Characterization and Interaction Studies of Copper Based Drug with Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and Molecular Docking Investigations. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2012**, 114, 132–139. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOLOG.2012.05.021>.
- (99) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochem.* **1981**, 20 (11), 3096–3102.
- (100) Manders, E. M.; Stap, J.; Brakenhoff, G. J.; Van Driel, R.; Aten, J. A. Dynamics of Three-Dimensional Replication Patterns during the s-Phase,

- Analysed by Double Labelling of Dna and Confocal Microscopy. *J. Cell Sci.* **1992**, *103* (3), 857–862. <https://doi.org/10.1242/JCS.103.3.857>.
- (101) MANDERS, E. M. M.; VERBEEK, F. J.; ATEN, J. A. Measurement of Co-Localization of Objects in Dual-Colour Confocal Images. *J. Microsc.* **1993**, *169* (3), 375–382. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.1993.TB03313.X>.
- (102) Tang, L.; Tian, M.; Chen, H.; Yan, X.; Zhong, K.; Bian, Y. An ES IPT-Based Mitochondria-Targeted Ratiometric and NIR-Emitting Fluorescent Probe for Hydrogen Peroxide and Its Bioimaging in Living Cells. *Dyes Pigm.* **2018**, *158*, 482–489. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2017.12.028>.
- (103) Yang, K.; Hou, L.; Li, Z.; Lin, T.; Tian, J.; Zhao, S. A Mitochondria-Targeted Ratiometric Fluorescent Nanoprobe for Imaging of Peroxynitrite in Living Cells. *Talanta* **2021**, *231*, 122421. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2021.122421>.
- (104) Kong, Q.; Wang, J.; Chen, Y.; Zheng, S.; Chen, X.; Wang, Y.; Wang, F. The Visualized Fluorescent Probes Based on Benzothiazole Used to Detect Esterase. *Dyes Pigm.* **2021**, *191*, 109349. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2021.109349>.
- (105) Bacanlı, M.; Anlar, H. G.; Başaran, A. A.; Başaran, N. Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. *Turk. J. Pharm. Sci.* **2017**, *14* (2), 95. <https://doi.org/10.4274/TJPS.07078>.
- (106) Karplus, M.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>.
- (107) Martinez-Seara, H.; Róg, T. Molecular Dynamics Simulations of Lipid Bilayers: Simple Recipe of How to Do It. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 407–429. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_15/COVER.

- (108) Schenkel, L. C.; Bakovic, M. Formation and Regulation of Mitochondrial Membranes. *Int. J. Cell Biol.* **2014**. <https://doi.org/10.1155/2014/709828>.
- (109) Nademi, Y.; Amjad Iranagh, S.; Yousefpour, A.; Mousavi, S. Z.; Modarress, H. Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Profile of Paracetamol in DPPC and DMPC Lipid Bilayers. *J. Chem. Sci.* **2014**, *126* (3), 637–647. <https://doi.org/10.1007/S12039-013-0556-X/FIGURES/8>.
- (110) Mojumdar, E. H.; Lyubartsev, A. P. Molecular Dynamics Simulations of Local Anesthetic Articaine in a Lipid Bilayer. *Biophys. Chem.* **2010**, *153* (1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2010.10.001>.
- (111) Miller, B. R.; McGee, T. D.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. MMPBSA.Py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory. Comput.* **2012**, *8* (9), 3314–3321. <https://doi.org/10.1021/CT300418H>.
- (112) Valdés-Tresanco, M. S.; Valdés-Tresanco, M. E.; Valiente, P. A.; Moreno, E. Gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J. Chem. Theory. Comput.* **2021**, *17* (10), 6281–6291. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.1C00645/SUPPL_FILE/CT1C00645_SI_001.PDF.