



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018068090-0 A2



(22) Data do Depósito: 06/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2021

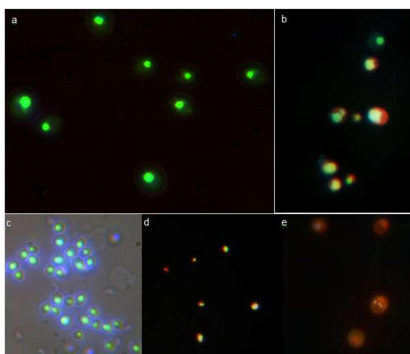
(54) Título: USO DO CORANTE 2-(1,3-BENZOTIAZOL-2-IL)-5-(N,N-DIETILAMINO)FENOL

(51) Int. Cl.: G01N 33/92; G01N 21/64.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) Inventor(es): MAURICIO RAMÍREZ CASTRILLÓN; HÉLIO LOPES BARBOSA BARROS; VICTORIA PATRICIA JARAMILLO GARCÍA; VALTER STEFANI; PATRICIA VALENTE DA SILVA; JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES.

(57) Resumo: USO DO CORANTE 2-(1,3-BENZOTIAZOL-2-IL)-5-(N,N-DIETILAMINO)FENOL. A presente invenção descreve o uso da molécula 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) para marcação de lipídeos em células de leveduras oleaginosas e em técnicas de análises de fluorescência. A presente invenção se situa nos campos da microbiologia, química e química instrumental.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

USO DO CORANTE 2-(1,3-BENZOTIAZOL-2-IL)-5-(N,N-DIETILAMINO)FENOL

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve o uso da molécula 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) para marcação de lipídeos em células de leveduras oleaginosas e em técnicas de análises de fluorescência. A presente a invenção se situa nos campos da microbiologia, química e química instrumental.

Histórico da Invenção

[0002] A triagem de fontes de óleo obtidos a partir de microrganismos unicelulares é uma tendência mundial para encontrar linhagens oleaginosas com habilidade para substituir óleos vegetais como matéria prima para produzir biodiesel (SITEPU et al., 2014).

[0003] O corante mais utilizado para marcar lipídios neutros em leveduras é o vermelho de Nilo. Este corante é também utilizado para marcar microalgas e outros micro-organismos oleaginosos. Porém, é bem documentado que este corante apresenta um efeito denominado “Photo-bleaching”, onde a molécula em presença de luz é rompida e a fluorescência diminui em questão de segundos. Outro corante utilizado é BODIPY, mas seu uso em leveduras é limitado.

[0004] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0005] O documento CN104568881 (A) “Method for screening microalgae unicells which grow fast and are high in grease content through fluorescence microscope” descreve um método para triagem de microalgas unicelulares utilizando o fluorocromo vermelho de Nilo em DMSO em microplacas de 96 poços. De acordo com a invenção, as linhagens podem ser avaliadas em aproximadamente 10min, o que melhora a eficiência de trabalho de triagem e reduz o tempo de trabalho e custos.

[0006] O documento WO2017023941 (A1) “Benzazole Compounds And Methods For Making And Using The Compounds” apresenta a descrição de novos compostos de tipo benzazol, com aplicação para tratar ou prevenir doenças associadas ao IRAK. O composto que é apresentado na invenção é do tipo benzazol, e se propõe aplicação na indústria de biodiesel.

[0007] O documento US2003162794 (A1) “Benzazole derivatives and their use as jnk modulators” apresenta a descrição de novos compostos de tipo benzazol com aplicação como bioativo farmacêutico e para prevenção de doenças associadas na rota metabólica do JNK. O composto apresentado na invenção é do tipo benzazol, e é proposta a aplicação na indústria de biodiesel.

[0008] O documento US5874431 (A) “Benzazole compounds” apresenta a descrição de novos compostos de tipo benzazol com aplicação como bioativo farmacêutico e para prevenção de doenças associadas ao câncer de mama. O composto apresentado na invenção é do tipo benzazol, e é proposta a aplicação na indústria de biodiesel.

[0009] O documento WO2011018184 (A1) “Fluorescence-Based Imaging And Analysis Of Cells And Cellular Components Using Lipophilic Dyes With Improved Specificity, Spectral Properties And Photostability” apresenta o uso de corantes BODIPY e derivados para análise de componentes celulares, entre eles corpos lipídicos. O BODIPY foi altamente estudado para microalgas e tem poucos relatos na literatura. O composto da invenção foi avaliado principalmente para leveduras oleaginosas e está dirigido especificamente para esse tipo de microrganismos, pelo que não afetaria a comercialização do produto.

[0010] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0011] Em resumo, a presente invenção vem resolver o problema constante do estado da técnica, isto é, a baixa foto-estabilidade de muitos dos corantes

utilizados para a técnica de visualização de gotas lipídicas produzidas por micro-organismos.

Sumário da Invenção

[0012] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas constantes no estado da técnica a partir da utilização da molécula 2- (1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol, denominada GD, que é um benzotiazol fluorescente por um mecanismo de transferência de prótons intra-molecular no estado excitado, para a marcação de células de leveduras oleaginosas em soluções biológicas e análises de fluorescências.

[0013] Em um primeiro aspecto, a presente invenção define o uso do corante 2- (1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) para marcação de gotas lipídicas em células de levedura.

[0014] Em um segundo aspecto, a presente invenção define o uso do corante GD em técnicas fluorimétricas.

[0015] Em um terceiro aspecto, as técnicas fluorimétricas são de microscopia de espectrofluorometria ou epifluorescência.

[0016] A invenção torna possível a utilização de corante em presença de luz. A foto-estabilidade do corante apresentado na invenção permite que o pesquisador consiga manipular o reagente em qualquer laboratório sem precisar usar nenhum tipo de adaptação ou ambiente escuro para a preparação do material. Além disso, permite que o pesquisador manipule muitas amostras (no caso de microplacas ou lâminas de fluorescência) sem fotodegradação. Isso permite ter confiabilidade dos experimentos realizados sem se preocupar com o tempo que leva em realizar experimentos seriados ou de grande magnitude, como no caso de coleções de culturas.

[0017] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0018] São apresentadas as seguintes figuras:

[0019] A figura 1 mostra a estrutura química de 2- (1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD).

[0020] A figura 2 mostra o espectro de absorção de GD através de um gráfico de Absorbância por comprimento de onda (nm). As duas bandas de interesse e de máxima absorbância tiveram comprimentos de onda de 372nm (luz Ultravioleta) e 400nm.

[0021] A figura 3 mostra o espectro de emissão do corante GD em diferentes solventes. A linha preta pontilhada corresponde à fluorescência basal (sem corante), a linha pontilhada colorida corresponde ao espectro sem células e a linha sólida corresponde à presença de células de *Y. lipolytica* QU21 ($DO_{600nm}=1$).

[0022] A figura 4 mostra o espectro de emissão do corante GD em diferentes solventes e em células de *M. guilliermondii* BI281A. A linha preta pontilhada corresponde à fluorescência basal (sem corante), a linha pontilhada colorida corresponde ao espectro sem células e a linha sólida corresponde à presença de células de *M. guilliermondii* BI281A ($DO_{600nm}=1$).

[0023] A figura 5 mostra o espectro de emissão do corante GD em diferentes solventes e em células de *S. cerevisiae* MRC164. A linha preta pontilhada corresponde à fluorescência basal (sem corante), a linha pontilhada colorida corresponde ao espectro sem células e a linha sólida corresponde à presença de células de *S. cerevisiae* MRC164 ($DO_{600nm}=1$).

[0024] A figura 6 mostra o espectro de emissão do corante GD com células de *M. guilliermondii* BI281A e meio de cultura A-Glicerol como solvente. Cada linha corresponde a diferentes tempos de crescimento da linhagem (12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 96h).

[0025] A figura 7 mostra o espectro de emissão do corante GD com diferentes solventes e em células de *P. flavescens* BI296 (esquerda) e BI283 (direita). A linha preta pontilhada corresponde à fluorescência basal (sem corante), a linha pontilhada colorida corresponde ao espectro sem células e a linha sólida com presença de células ($DO_{600nm}=1$).

[0026] A Figura 8 mostra células de leveduras marcadas com o corante GD e combinação do GD com brometo de etídio, respectivamente. Sendo (a) *Y. lipolytica* QU21 corado com GD. (b) *Y. lipolytica* QU21 corado com GD e Brometo de etídio (c) *M. guilliermondii* BI281A corado com GD. (b) *M. guilliermondii* BI281A corado com GD e Brometo de etídio (e) *S. cerevisiae* MRC164 corado com GD e Brometo de etídio.

[0027] A figura 9 mostra o efeito do tempo de incubação do corante GD e solventes sobre a intensidade da fluorescência. (a) Ausência de células, (b) Presença de células de *Y. lipolytica* QU21, (c) Presença de células de *M. guilliermondii* BI281A. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

[0028] A figura 10 mostra a razão de medida consecutiva (CMR) para os corantes GD (a, b, primeira linha) e vermelho de Nilo (c, d, linha inferior), na presença de células de *Y. lipolytica* QU21 (a, c) ou em ausência de células (b, d). Os CMR estimados entre tempos foram mostrados para cada solvente testado. Os valores são médias \pm desvio padrão (n=3).

[0029] A figura 11 mostra a razão de medida consecutiva (CMR) para os corantes GD (esquerda) e vermelho de Nilo (direita). Os CMR estimados entre tempos foram mostrados para cada solvente testado. Os valores são médias \pm desvio padrão (n=3).

Descrição Detalhada da Invenção

[0030] A invenção descreve a aplicação do corante 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) em marcação de lipídios em células de leveduras oleaginosas em soluções biológicas e o uso de (GD) em técnicas de análises de fluorescência como microscopia ou fluorimetria.

[0031] A invenção resolve um grande problema na visualização de gotas lipídicas produzidas por micro-organismos, que é a baixa foto-estabilidade, o que dificulta análises de fluorescência. O corante GD apresenta a vantagem de não ser degradado por luz facilitando o manuseio por não precisar ser utilizado em ambientes escuros.

[0032] O corante fluorescente 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol

(GD) tem afinidade lipofílica e marca gotas lipídicas que acumulam lipídios neutros em leveduras. Esta molécula quando comparada com vermelho de Nilo, apresenta maior foto-estabilidade. Portanto, a visualização de gotas lipídicas com GD permite que o pesquisador consiga observar com facilidade amostras em microscopia de epifluorescência sem que ocorra fotodegradação. Isto permite a preparação de lâminas de microscopia em forma seriada e não sequencial (ao contrário do que se faz com vermelho de Nilo), o que aceleraria o processamento de análise em metodologias que envolvam triagem ou de fazer acompanhamento em otimização da produção de lipídio. Além disso, permitiria a observação do momento no qual a célula muda de metabolismo de crescimento para acúmulo de lipídio, o que é de extrema importância em estudos de transcriptômica. Se for utilizado em equipamentos fluorométricos, a molécula GD permite a análise de placas ou multi-placas em metodologias de triagem ou otimização, o que permite padronização da adição de quantidades mais acuradas do corante e diminui o risco de ter valores subestimados de fluorescência por foto-degradação. Tudo isso, na presença de luz, o que facilita o trabalho do pesquisador.

[0033] Em um primeiro aspecto, a presente invenção define o uso do corante 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) para marcação de gotas lipídicas em células de leveduras.

[0034] Em uma concretização da presente invenção, o uso é em técnicas fluorimétricas.

[0035] Em uma concretização do uso, as ditas técnicas fluorimétricas compreendem microscopia de espectrofluorometria ou epifluorescência.

[0036] Em uma concretização do uso, o dito corante está em uma concentração de 10 μ M de corante em um solvente.

[0037] Em uma concretização do uso, o dito solvente é álcool isopropílico.

[0038] A invenção será de grande importância para a indústria de Biodiesel e óleos, uma vez que vai facilitar a triagem de novos organismos oleaginosos sem depender de adequações na infraestrutura nem ter cuidados com a

luminosidade para detectar gotas lipídicas. Espera-se que o aumento de pesquisas relacionadas com produção de Biodiesel de terceira geração incremente o campo de aplicação do corante na área científica e seja de amplo uso.

Exemplos - Concretizações

[0039] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Materiais e Métodos

Corantes utilizados

[0040] O corante GD, com nome IUPAC 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol e número CAS 55489-32-2 foi sintetizado, purificado e caracterizado no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos e Química Forense (LNMO-QF), no instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IQ-UFRGS), Brasil. O GD foi dissolvido com álcool isopropílico, e diluído serialmente a diferentes concentrações (1-1000 μ M) usando álcool isopropílico. Em uma concretização, foi utilizado uma concentração de 10 μ M de GD em álcool isopropílico. Finalmente, o GD foi armazenado a temperatura ambiente. O vermelho de Nilo (100 μ g/mL, Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em acetona e usado para comparação da estabilidade com GD.

Caracterização espectroscópica usando soluções biológicas

[0041] Diversas soluções foram testadas para caracterização espectroscópica do corante GD. Entre elas encontram-se soluções amplamente utilizadas em biologia e especificamente em leveduras oleaginosas, tais como:

PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, e 2 mM KH₂PO₄),

PBS 1X com álcool isopropílico 5% (v/v),

PBS 1X com álcool isopropílico (5% v/v) e Tween 20 (0,1% v/v),

Glicerol 50% (v/v em água destilada),

Meio de cultura A-gly (1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgCl₂-

6H₂O, e glicerol 15 % (v/v)), e

meio de cultura A-gly com Dimetil Sulfóxido (DMSO) 5% (v/v)

[0042] Para cada teste, 190µL de cada solução mencionada anteriormente (de forma independente) foram misturados com 10µL do corante GD (10 µM) em microplacas de 96 poços planos de fundo negro (Jet Biofil, China). Os espectros de excitação e emissão foram medidos usando um leitor de placas multifuncional (Perkin Elmer 2300), com 100 flashes por nanômetro de comprimento de onda testado. O pico de fluorescência máxima de excitação e a banda ESIPT de emissão foram escolhidos para análises posteriores.

Caracterização usando leveduras oleaginosas

[0043] Três linhagens de leveduras foram testadas com o propósito de avaliar a habilidade de marcação de lipídios com GD: duas linhagens ascomicéticas oleaginosas (*Yarrowia lipolytica* QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281A), e uma linhagem controle negativo (*Saccharomyces cerevisiae* MRC164). Para obter células ativas metabolicamente, cada linhagem foi crescida em meio de cultura GYP (10 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 20 g/L glicose), ou meio de cultura YM (3 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 10 g/L peptona, 20 g/L glicose) por 48h a 28°C. A partir dessas culturas, foram inoculadas 1mL de 7×10^7 células/mL de *Y. lipolytica* QU21 e *M. guilliermondii* BI281A, estimado por contagem usando câmara de Neubauer, em 75mL de meio de cultura A-gly em frascos de 250mL (para manter uma razão 2/3 de volume livre como mencionado por POLI et al., 2014a) por sete dias, 26°C e 150rpm no agitador. A densidade ótica foi medida e ajustada a 1,0 ($DO_{600nm}=1,0$) antes da re-suspensão com cada solvente testado (ver subtítulo anterior). As bandas de emissão foram obtidas de acordo com o subtítulo anterior e o comprimento de onda da banda ESIPT foi ajustado à emissão máxima.

Microscopia de fluorescência

[0044] Para visualizar lipídeos marcados nas células com o corante GD, 10 µL de solução de células crescidas em meio de cultura A-gly foram misturadas

com 1 μL de corante GD (10 μM) em uma lâmina de vidro para visualização em luz UV com uma lâmpada de mercúrio em um microscópio de epifluorescência (Bel Photonics®, B – UV filter). Foram observadas células marcadas nos tempos 0, 10, 30 e 60min após o contato com o corante GD na presença de luz visível e fluorescência. Também, foram observadas células com 1 μL de vermelho de Nilo (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na escuridão para comparar gotas lipídicas com ambos corantes. Para observar o núcleo, foram marcadas células com brometo de etídio (EtBr, 100mg/mL) nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

Estabilidade das leituras de fluorescência

[0045] Misturas de corante foram testadas em cada um dos solventes preparados na ausência ou presença de células. 190 μL de cada solvente ou 190 μL de células dissolvidas em cada solvente (*Y. lipolytica* QU21, *M. guilliermondii* BI281A ou *S. cerevisiae* MRC164; OD_{600nm}=1), foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo plano e preto (Jet Biofil, China). A fluorescência relativa foi medida em um leitor de placas multifuncional (Perkin Elmer Enspire 2300) com excitação a 370nm e apresentou emissão a 510nm. Após a medida da intensidade de fluorescência basal em cada poço sem adição do corante fluorescente (autofluorescência), foram adicionados 10 μL do GD (10 μM) na solução, misturado com agitação dentro do equipamento por 5s e medida a fluorescência do corante em cada poço. Cada medida foi precedida por agitação de 5s das células para homogeneizar a solução. A fluorescência relativa foi expressa como RFU (Unidades de Fluorescência Relativa) e foi obtida após a diferença da autofluorescência das amostras, a fluorescência do solvente em presença do GD (branco) e a leitura da fluorescência com células.

[0046] Também, a razão entre o RFU das duas medidas obtidas em tempos de incubação consecutivas ($\text{RFU}_{t+1 \text{ (min)}}/\text{RFU}_{t \text{ (min)}}$) foi expresso como a Razão de Medidas Consecutivas (CMR), onde os valores que tendem a “um” indicam pouca variação entre as medidas dos tempos t e t+1, e, portanto, estabilidade

da fluorescência. Cada amostra foi medida para o GD e vermelho de Nilo com triplicata técnica.

Análise estatística

[0047] Para avaliar o efeito da intensidade de fluorescência contra o tempo de incubação em presença de células ($DO_{600nm}=1$), independente do solvente, foi construído um “box-plot” para visualizar intervalos de confiança, detectar “outliers” e determinar diferenças estatísticas usando o teste Kruskal-Wallis (não paramétrico). As comparações múltiplas dos valores p entre tempos podem ser usadas como uma estimativa das médias para o tempo avaliado. Um teste qui-quadrado foi usado para avaliar Razões de Medidas Consecutivas (CMR) diferentes estatisticamente (valor esperado = 1, $p=0.05$). Cada experimento foi feito em triplicata.

Propriedades fluorescentes do corante

[0048] 2- (1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol, ou GD, foi previamente sintetizado, purificado e caracterizado. As propriedades fotoquímicas e de fluorescência foram caracterizadas por Padalkar et al. (2012) e Barros (2015). A Figura 1 mostra a estrutura química do GD.

[0049] O espectro de absorção do corante GD é mostrado na Figura 2. As medidas revelaram duas bandas de máxima absorção, a 372nm e 400nm (espectro ultravioleta). Este resultado foi independente do solvente utilizado, ou na presença ou ausência de células. Foi escolhido 372nm como comprimento de onda de excitação para todos os testes posteriores. Posteriormente foi avaliado o espectro de emissão, onde foram obtidas duas bandas de máxima fluorescência, que mudaram sua intensidade dependendo do solvente usado e do tempo de crescimento da célula avaliada. Esse resultado era esperado pela natureza da molécula, onde o mecanismo ESIPT foi observado graficamente como duas bandas com comprimentos de onda diferentes (PADALKAR et al., 2012, BARRIOS e STEFANI, 2016, BARROS et al., 2016). A primeira banda de emissão correspondeu a um comprimento de onda de 430nm e esteve presente em todos os experimentos realizados, sendo independente do

solvente ou presença ou ausência de células (Figura 3). A segunda banda de emissão apresentou um comprimento de onda de 510nm e apareceu com maior intensidade na presença de células de *Yarrowia lipolytica* QU21, crescidas por sete dias no meio indutor de acúmulo de lipídios (A-glicerol), e avaliadas no próprio meio de cultura como solvente (Figura 3).

[0050] De acordo com Barros (2015), esta segunda banda sugeriu uma mudança ampla no comprimento de onda (até 200nm) entre o pico de absorção e emissão, e confirmou a presença do mecanismo ESIPT quando o corante foi excitado. Para confirmar a especificidade da segunda banda com leveduras oleaginosas, determinamos o espectro de emissão com a levedura oleaginosa *M. guilliermondii* BI281A (Figura 4). Neste caso, o mecanismo de ESIPT foi observado de forma semelhante, com duas bandas de emissão. Porém, a segunda banda (maior comprimento de onda) apresentou menor intensidade quando comparada com *Y. lipolytica* QU21. Finalmente, o espectro de emissão foi repetido para *S. cerevisiae* MRC164 (controle negativo, Figura 5), onde não foi detectada a segunda banda de emissão (510nm), sugerindo que a conformação da molécula que emitia fluorescência na segunda banda não foi detectada e que estaria sendo específico para ambientes lipofílicos.

[0051] O espectro de emissão foi repetido para as leveduras oleaginosas *P. flavescens* BI283 e *P. flavescens* BI296 no sétimo dia de crescimento em meio indutor de acúmulo de lipídios (Figura 6) e foram observadas as duas bandas de fluorescência, sugerindo coerência com os resultados anteriores. Também, foi repetido o espectro de emissão para *M. guilliermondii* BI281A em várias fases de crescimento diferentes (entre 12 e 96h) no meio indutor de acúmulo de lipídios (Figura 7), conseguindo acompanhar o incremento de intensidade na segunda banda de fluorescência, associado com o ambiente lipofílico. Também, é sugerida a possibilidade de usar o próprio meio de cultura A-glicerol (indutor de acúmulo de lipídios) como o solvente. Isso sugere a redução dos passos de preparação de células antes de realizar as medidas de fluorescência.

Microscopia de fluorescência

[0052] A Figura 8 mostra células de leveduras marcadas com o corante GD e combinação do GD com brometo de etídio, respectivamente. Como era esperado, as gotas lipídicas foram visualizadas especificamente e com coloração azul-verde, correspondente ao comprimento de onda detectado por espectrofluorometria para *Y. lipolytica* QU21 (Figura 8a) e *M. guilliermondii* BI281A (Figura 8c). Para descartar co-localização com o núcleo, foram coradas todas as células com GD e brometo de etídio (Figuras 8b, 8d, 8e). Os resultados mostraram uma localização não específica do núcleo com o corante brometo de etídio para as células de *Y. lipolytica* QU21 (Figura 8b) e *M. guilliermondii* BI281A (Figura 8d). Portanto, foi observada sobreposição de ambos corantes devido a que o brometo de etídio marcou o citoplasma das células. Entretanto, foi possível observar o núcleo em células de *S. cerevisiae* MRC164 (Figura 8e) e o corante GD marcou pontos específicos no citoplasma, o que demonstra a não co-localização do corante GD com o núcleo.

[0053] As preparações de lâminas para cada linhagem e combinação de corantes foram observadas novamente em 30 e 60min sem decréscimo da intensidade de fluorescência. PADALKAR et al. (2012) e BARROS (2015) reportaram que moléculas que apresentam o mecanismo de ESIPT apresentam estabilidade térmica e fotoquímica, e os resultados confirmaram essa estabilidade. Este resultado apresenta uma grande vantagem comparada com o vermelho de Nilo, onde o “photobleaching” (ou foto branqueamento) é um grande problema nesse tipo de experimentos (LAMPRECHT e BENOIT, 2003, ELSEY et al., 2007).

Estabilidade da fluorescência

[0054] A estabilidade da fluorescência do corante GD foi avaliada em diferentes tempos de incubação com os solventes e em presença/ausência de células de leveduras. Como indica a Figura 9, depois de 120min de incubação com luz, a intensidade de fluorescência não mostrou diferenças significativas em qualquer tempo testado, independente do solvente (Figura 9a, $P > 0,05$) ou

células (Figuras 9b, 9c, $P > 0,05$). Os resultados sugeriram alta fotoestabilidade, onde as medidas podem ser obtidas de 10 a 90min de incubação sem diferenças estatísticas.

[0055] Para comparar a variabilidade de intensidade de fluorescências dos corantes GD e vermelho de Nilo, foi estimada a Razão de Medidas Consecutivas (CMR), onde valores próximos a 1 (a.u.) indicam estabilidade da intensidade de fluorescência. A Figura 10 sugere que os valores do CMR para o corante GD tende a 1 em todos os solventes com células de *Y. lipolytica* QU21 (Figura 10a, $P > 0,05$), *M. guilliermondii* BI281A (Figura 11a) ou sem células (Figura 10b). Quando foram comparados os valores CMR obtidos para experimentos sem células (Figura 10b, 10d), observou-se valores mais próximos a 1 e menor desvio padrão quando foi adicionado o corante GD. As medidas de CMR estáveis nos brancos permitem cálculos mais acurados da intensidade de fluorescência, já que o valor de intensidade de fluorescência final inclui a diferença entre a intensidade de fluorescência com células e sem células, dando resultado à intensidade de fluorescência obtida unicamente pela presença de células. Os valores de CMR para o vermelho de Nilo apresentaram alta variação (mostrado por valores diferentes a 1 e desvios padrão grandes, Figura 10c, 10d), principalmente em medidas sem células (Figura 10d), sugerindo alta variabilidade no cálculo da intensidade de fluorescência e, portanto, possível viés no cálculo. Para confirmar os resultados anteriores, foi calculado o CMR para *M. guilliermondii* BI281A (Figura 11), com resultados semelhantes de alta estabilidade.

[0056] Em conclusão, é proposto o corante GD, uma molécula lipofílica e fluorescente que apresenta o mecanismo de ESIPT, como um ótimo corante para marcação de gotas lipídicas em células de leveduras oleaginosas. As propriedades fotofísicas do corante GD são dependentes do solvente utilizado. As duas bandas de emissão, correspondentes a dois estados de conformação da molécula excitada (mecanismo ESIPT), foram evidenciadas claramente em meio de células de leveduras oleaginosas e o meio de cultura A-gly como

solvente, com deslocamento de Stokes de 140nm. Também, o GD mostrou fotoestabilidade tanto no espectro de luz visível e ultravioleta usando duas técnicas: microscopia de epifluorescência, ou espectrofluorometria. Esse corante permite fazer triagens de leveduras para testar habilidade para acumular lipídios usando uma aproximação “high-throughput”.

Referências

1. BARROS, H.L. 2015. Síntese e caracterização de novos derivados benzazólicos fluorescentes por ESIPT e sua aplicação na ciência forense como reveladores de impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,
2. BARROS, H. L., Stefani, V. 2016. A new methodology for the visualization of latent fingerprints on the sticky side of adhesive tapes using novel fluorescent dyes. *Forensic Science International*, 263, 83-91.
3. BARROS, H. L., Marques, S. M., Stefani, V. 2016. The use of epifluorescence microscopy and fluorescent dyes for visualization of *Oxyuris equi* eggs. *Veterinary Parasitology*, 226, 162-166.
4. ELSEY, D., Jameson, D., Raleigh, B., Cooney, M. J. 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, 68(3), 639-642.
5. GOVENDER, T., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource technology*, 114, 507-511.
6. LAMPRECHT, A., Benoit, J.P. 2003. Simple liquid-chromatographic method for Nile Red quantification in cell culture in spite of photobleaching. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 787(2), 415-419.
7. PADALKAR, V. S., Tathe, A., Gupta, V. D., Patil, V. S., Phatangare, K., Sekar, N. 2012. Synthesis and photo-physical characteristics of ESIPT inspired 2-substituted benzimidazole, benzoxazole and benzothiazole fluorescent derivatives. *Journal of fluorescence*, 22(1), 311-322.

Reivindicações

1. Uso do corante 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) **caracterizado** por ser para marcação de gotas lipídicas em células de leveduras.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser em técnicas fluorimétricas.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelas ditas técnicas fluorimétricas compreenderem microscopia de espectrofluorometria ou epifluorescência.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo dito corante estar em uma concentração de 10 μ M de corante em um solvente.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo dito solvente ser álcool isopropílico.

FIGURAS

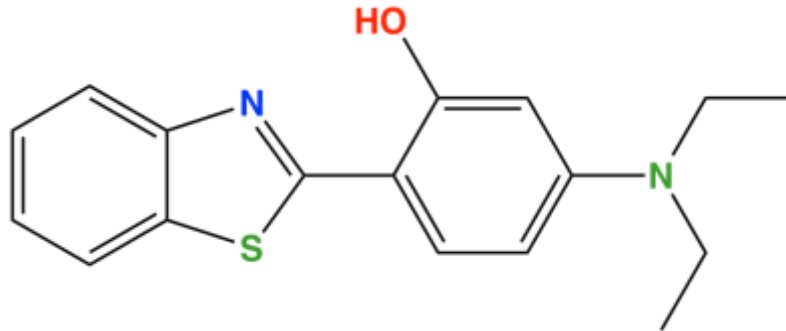


Figura 1

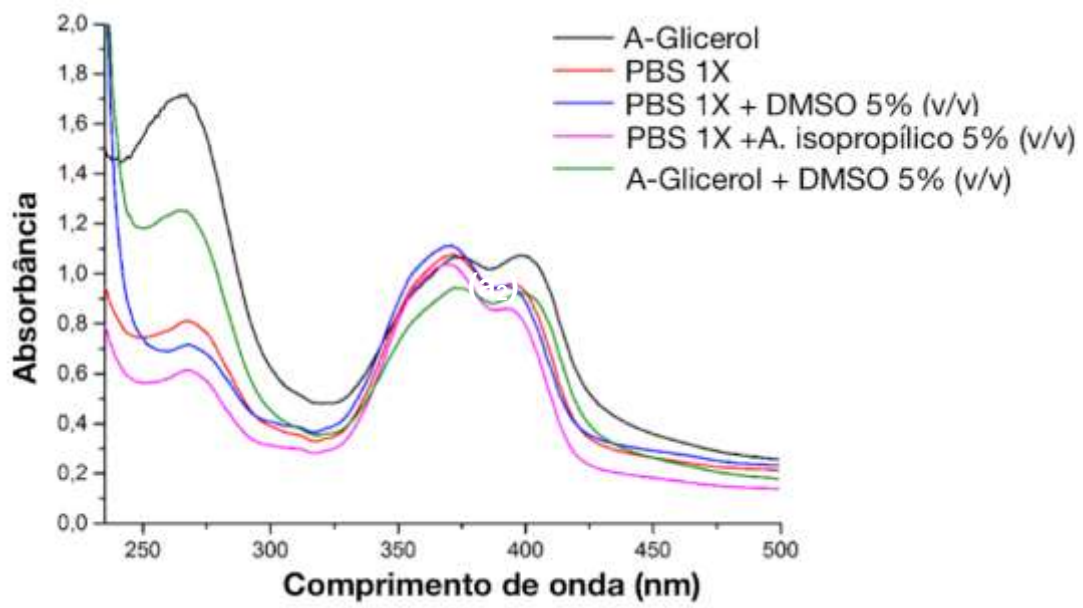


Figura 2

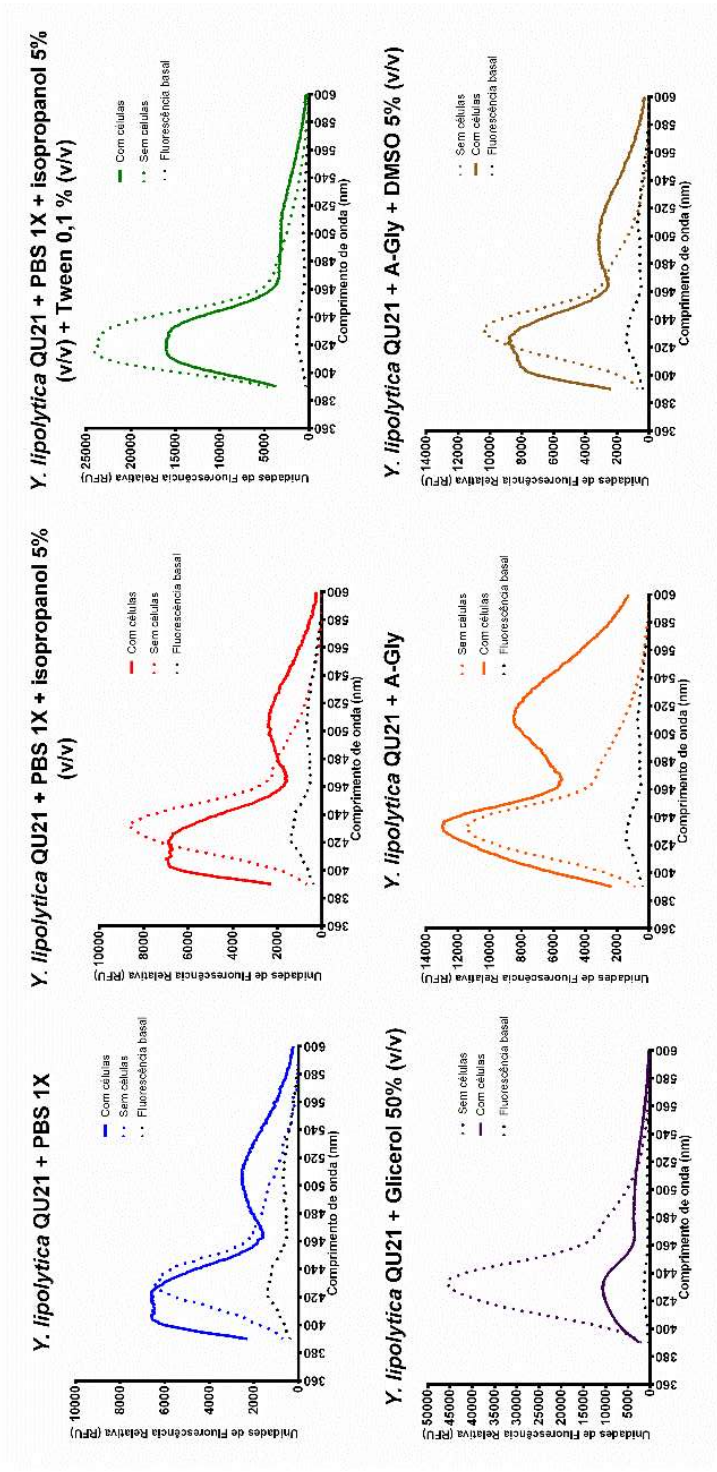


Figura 3

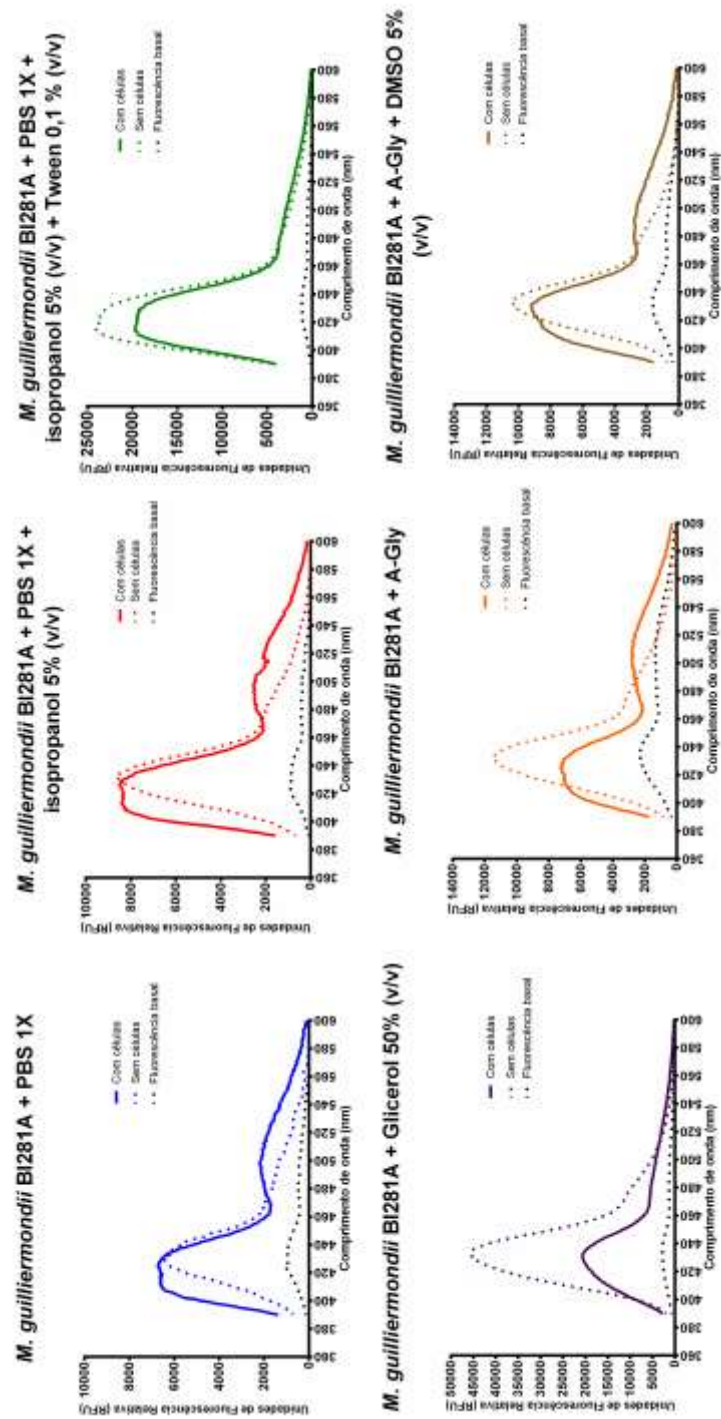


Figura 4

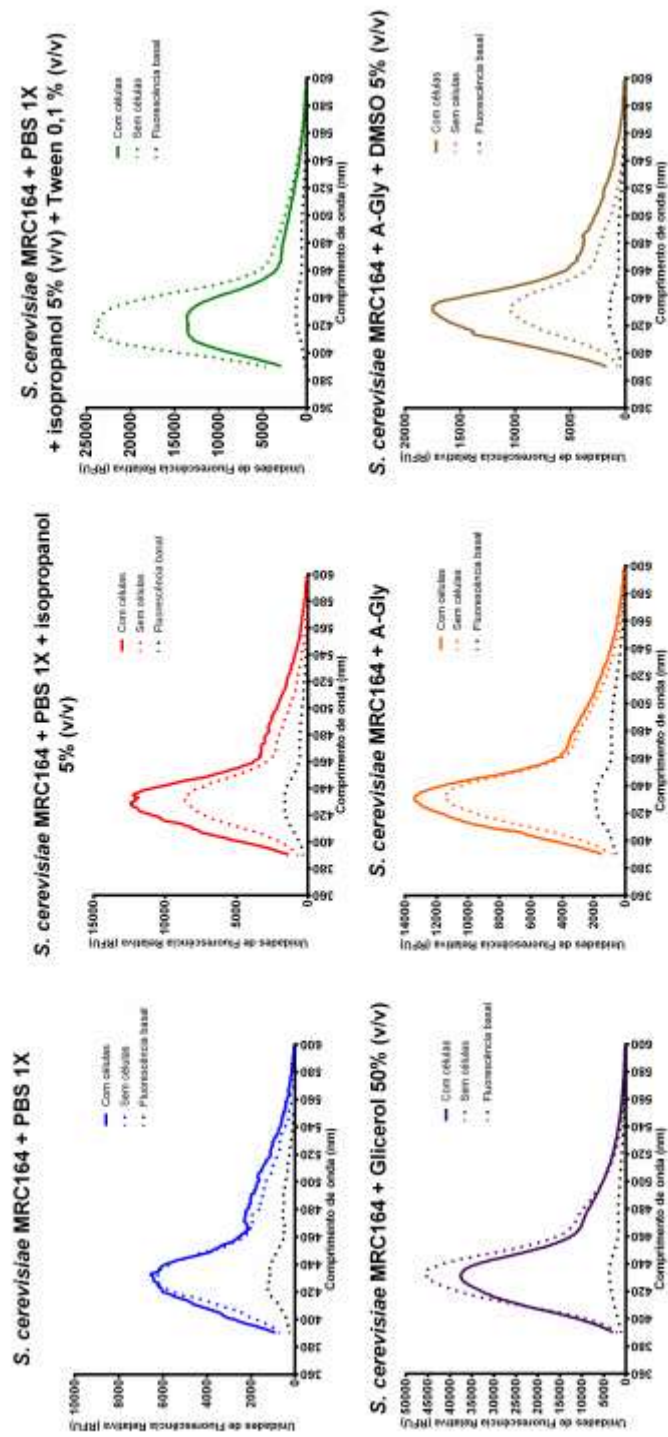


Figura 5

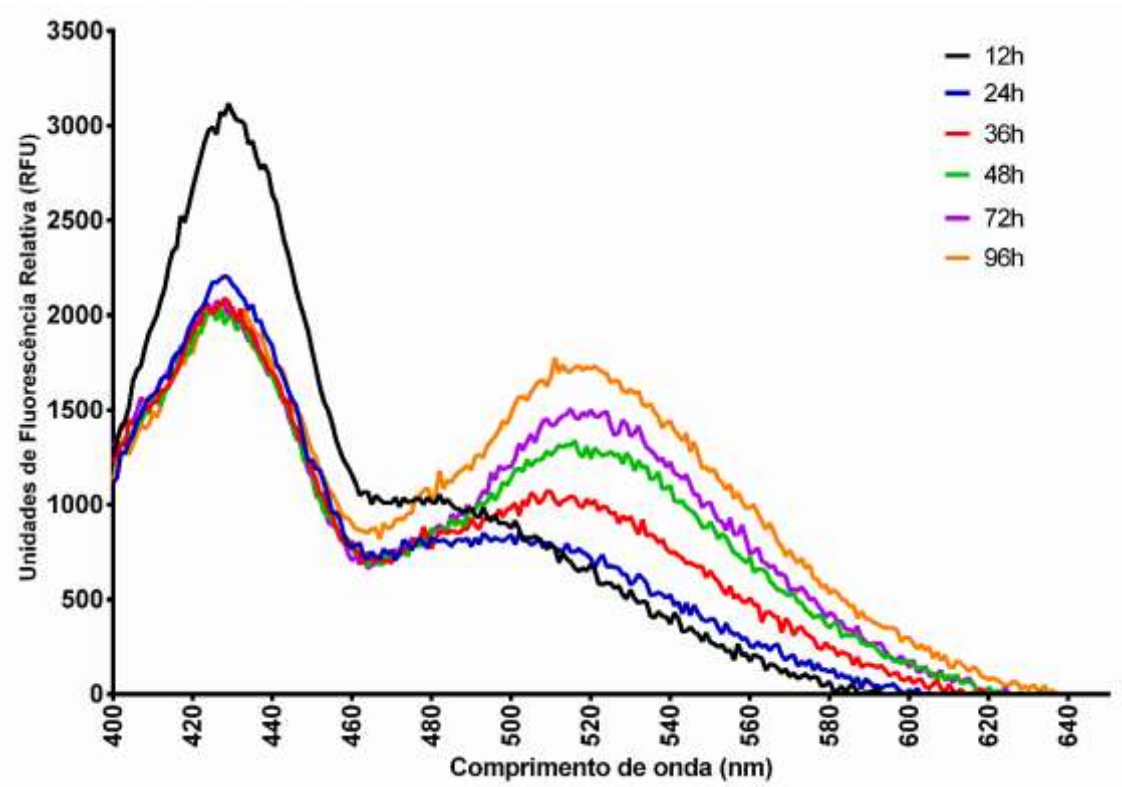


Figura 6

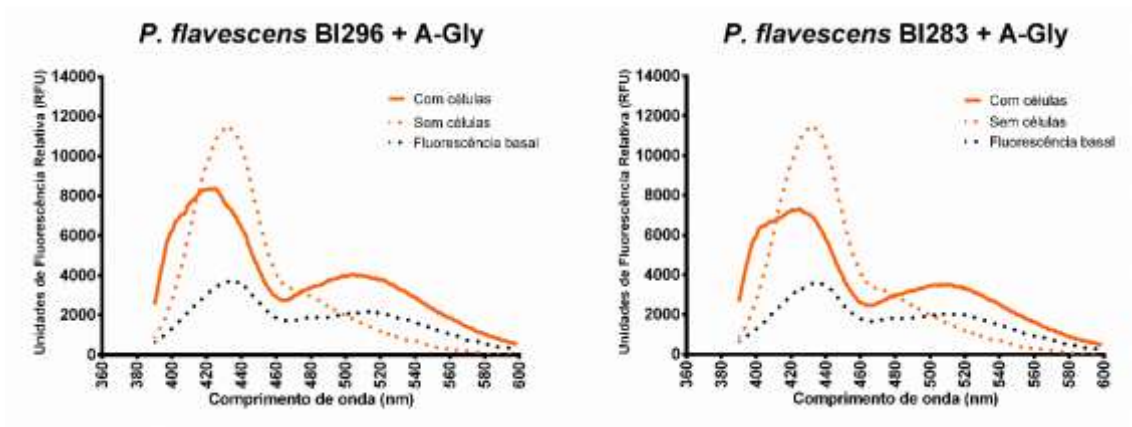


Figura 7

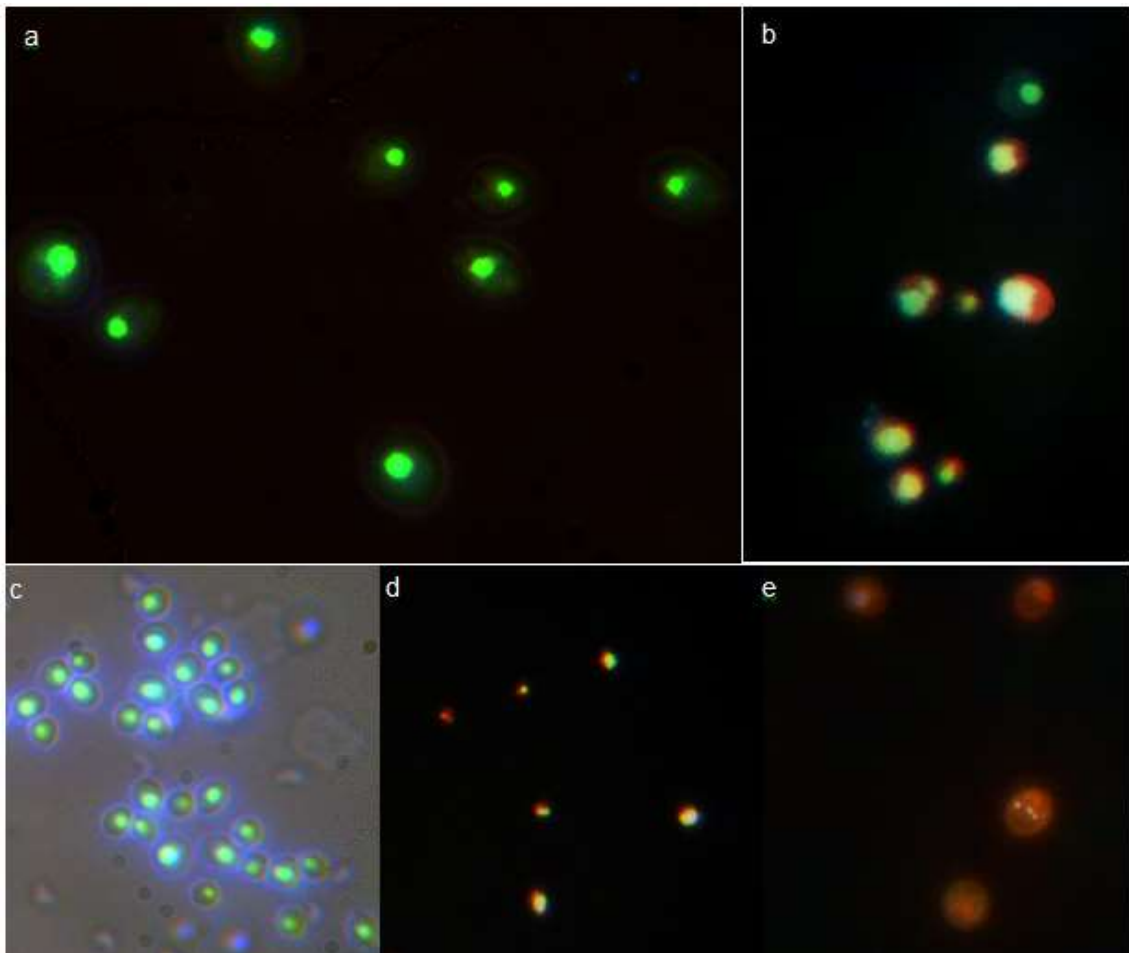


Figura 8

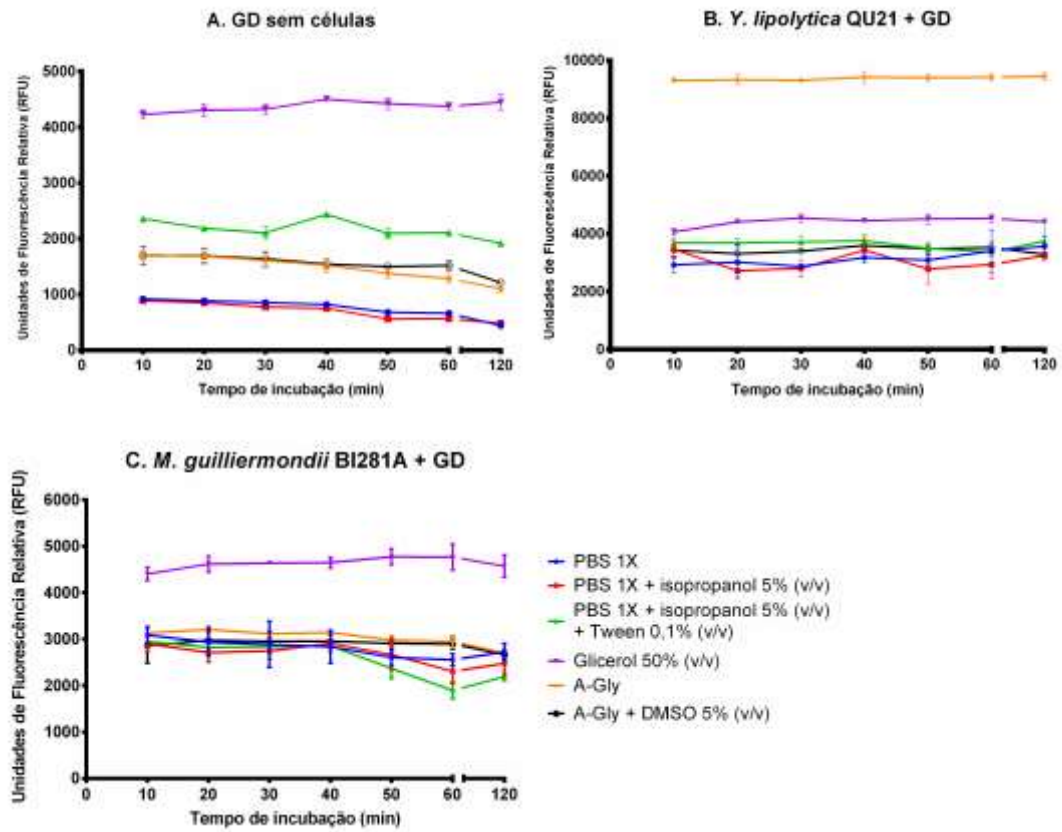


Figura 9

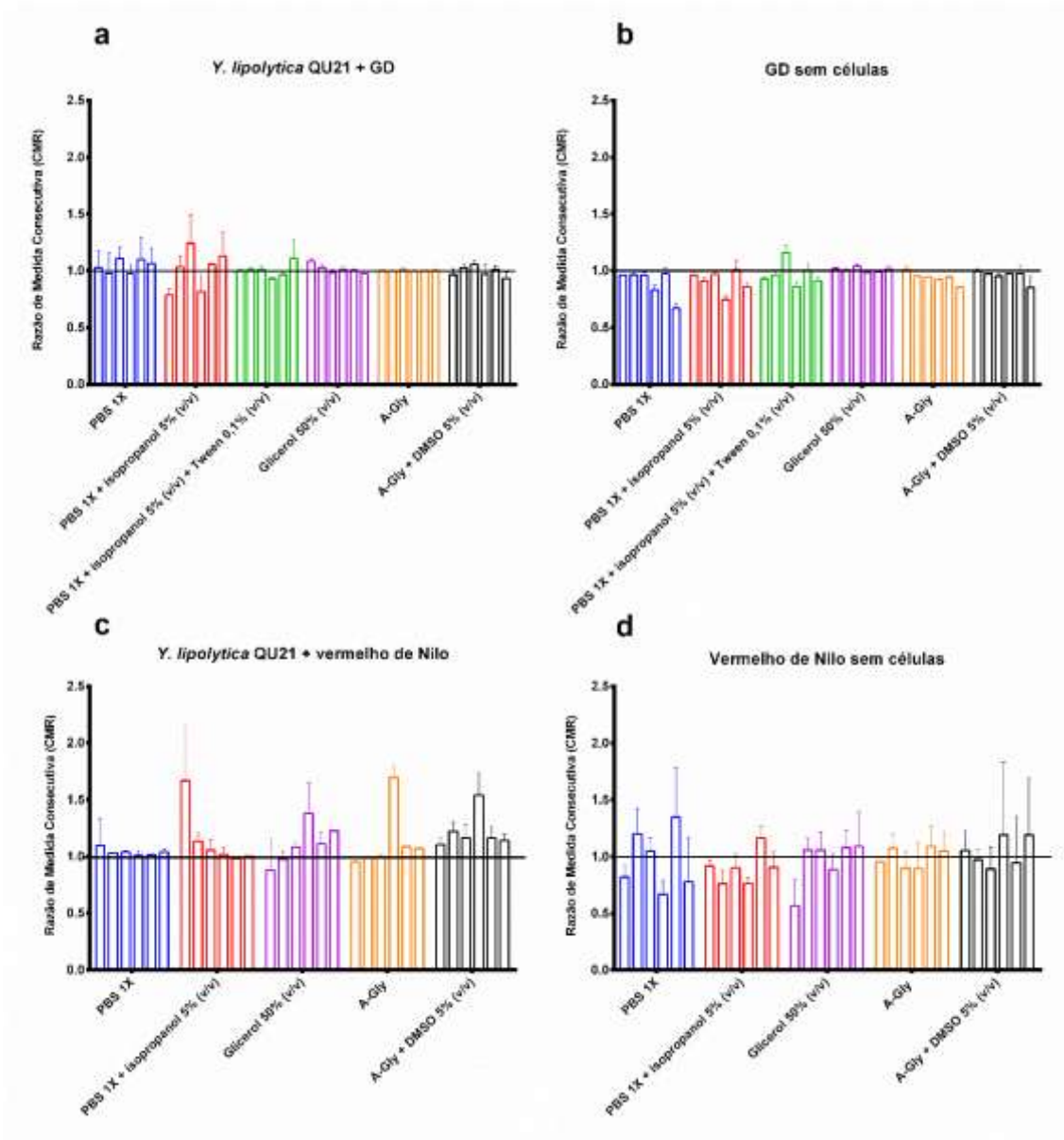


Figura 10

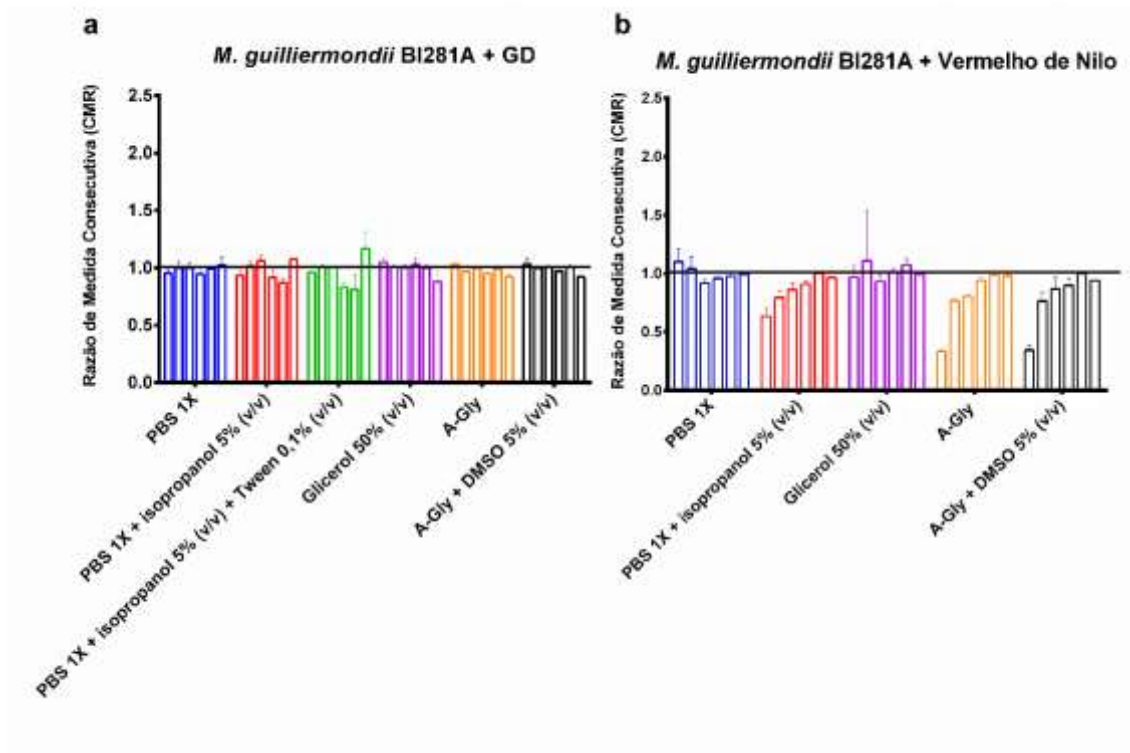


Figura 11

Resumo

USO DO CORANTE 2-(1,3-BENZOTIAZOL-2-IL)-5-(N,N-DIETILAMINO)FENOL

A presente invenção descreve o uso da molécula 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-(N,N-dietilamino)fenol (GD) para marcação de lipídeos em células de leveduras oleaginosas e em técnicas de análises de fluorescência. A presente invenção se situa nos campos da microbiologia, química e química instrumental.