

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“IMAGENS ESPECTRAIS DO PROCESSO DE
AGREGAÇÃO DA INSULINA POR COMPLEXOS
METÁLICOS LUMINESCENTES”**

Lorena Maria Borges Pereira*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de MESTRA EM QUÍMICA,
área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador(a): Dra. Rose Maria Carlos

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lorena Maria Borges Pereira, realizada em 01/03/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Renata Zachi de Osti (UFMT)

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me concedeu apoio e proteção. Aos meus pais, Marco Aurélio e Elinalda, pelo incentivo e amor.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Temos que ter persistência e,
acima de tudo, confiança em nós mesmos”.

Marie Curie.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por tudo na minha vida.

Aos meus pais, Marco Aurélio e Elinalda, por todo amor, apoio e orações.

Ao meu irmão, Francisco Policarpo, pela ajuda e compreensão.

A minha orientadora, professora Dra. Rose Maria Carlos, pelas suas orientações, incentivo e confiança que contribuíram de maneira significativa para minha formação.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, Isabele Aparecida, Marco Tibúrcio, Marlon Profeta, Daniel Victor, Josenilton de Jesus, Maria Júlia, Maria Laura e Kárita pela companhia e ensinamentos. Agradeço de maneira especial a doutoranda, Mariana Cali, pelos ensinamentos, paciência e caronas. Ao doutorando, Rafael Marchi, pelos passeios, ensinamentos e toda ajuda.

A minha vó, Elba Maria, pelo apoio e carinho. As minhas tias, Maria Doroteia, Maria do Amparo e Dira pelo carinho e orações.

Ao Vagner da Silva, pela convivência e amizade durante o mestrado.

Agradeço ao prof. Dr. Márcio Daldin Teodoro pela infraestrutura do seu laboratório que permitiram a realização das medidas de tempo de vida.

Aos professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – *Campus Parnaíba*, em especial a professora Dra. Marcia Valéria Silva Lima, Dra. Maria de Fátima Cardoso Soares, Me. Vilma Dias de Araújo, Dra. Buana de Carvalho Almeida, Dra. Ana Maria Athayde Uchoa Thomaz, Dra. Simone Cristiane Gallani Rodrigues, Me. Evânia Carvalho dos Santos e ao professor Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho pelo incentivo e carinho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Federal de São Carlos pela infraestrutura oferecida e pela oportunidade de realizar o mestrado em química.

A todas as moças da limpeza que proporcionaram ambientes limpos e agradáveis.

Agradeço as agências de fomento FAPESP, CAPES (código de financiamento 001) e principalmente ao CNPq pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram e me ajudaram em São Carlos.

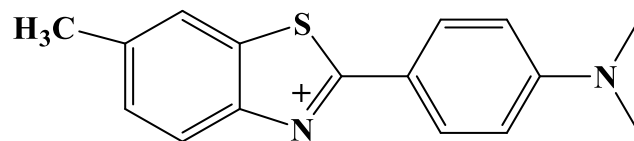
LISTA DE ABREVIATURAS

3,4-Apy	3,4-diaminopiridina
A β	Peptídeo Beta Amilóide
B _{máx}	Ligação específica máxima
DC	Dicroísmo Circular
DL	Limite de Detecção
DM	Diabetes Mellitus
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Deslocamento de Stokes
ϵ	Absortividade molar
IAPP	Peptídeo ilhota amiloide
ILCT	Transferência de carga do metal para ligante (do inglês, intra-ligand charge transfer)
K	Inclinação da curva analítica
K _d	Constante de Dissociação
MLCT	Transferência de carga do metal para ligante (do inglês, metal-ligand charge transfer)
ns	nanosegundos
Phe	Fenilalanina
phen	1,10-fenantrolina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Desvio padrão do branco
ThT	tioflavina T
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
δ	Deslocamento químico
χ^2	ki quadrado

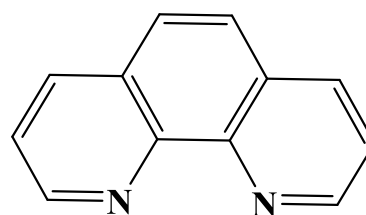
τ_{em} Tempo de vida de emissão

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DE COMPOSTOS

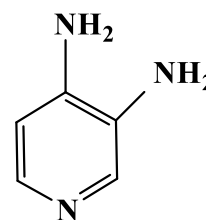
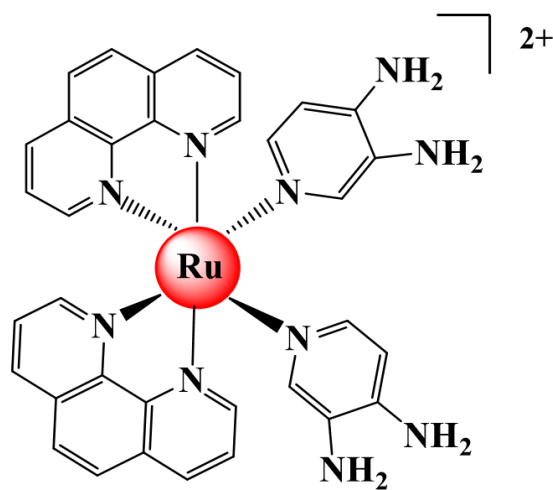
tioflavina T (ThT)



1,10-fenantrolina (phen)



3,4-diaminopiridina (3,4-Apy)

*cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1- Dados de deslocamento químico (ppm), multiplicidade e sinais de prótons para o espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em $\text{DMSO-}d_6$	25
TABELA 4.2 - Tempos de vida de emissão do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM).	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Esquema de obtenção da insulina endógena. Fonte adaptada: WEISS, M.; STEINER, D. F.; PHILIPSON, L. H., 2015.	3
FIGURA 1.2 - Ilustração da estrutura da insulina humana. Fonte Adaptada: JOSHI; et al, 2007.	4
FIGURA 1.3 - Diferentes conformações da insulina em solução. Fonte Adaptada: AKBARIAN, MOHSEN et al., 2018.	4
FIGURA 1.4 - Ilustração do receptor de insulina. Fonte adaptada: MOREIRA, R. O.; CAMPOS, S. C.; SOLDERA, A. L., 2013.	5
FIGURA 1.5 - Representação do processo de agregação da insulina. Fonte Adaptada: ZAPADKA, K. L et al., 2017.	7
FIGURA 1.6 - Ilustração da fibrila madura. Fonte adaptada: SCHMIDT, MATTHIAS et al., 2019.	8
FIGURA 1.7 - (A) Ilustração da estrutura química da tioflavina T. (B) Espectros de excitação e emissão da ThT com fibrilas de insulina.	11
FIGURA 3.1 - Esquema da síntese do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂].	16
FIGURA 3.2 - Esquema da síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4-Apy) ₂] ²⁺	17
FIGURA 3.3 - Esquema do procedimento utilizado para o preparo das soluções estoques de insulina.	19

FIGURA 3.4 - Ilustração da metodologia utilizada no processo de formação de agregados amiloides de insulina e subsequente adição de uma sonda luminescente.	20
FIGURA 4.1 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) da 1,10 -fenantrolina (azul), 3,4 - diaminopiridina (verde) e do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ obtidos em $\text{DMSO-}d_6$	26
FIGURA 4.2 - Espectro de absorção eletrônico do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM).	27
FIGURA 4.3 - Espectros eletrônicos de: excitação (azul), absorção (verde), e emissão (vermelho, $\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm) do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em solução tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) na concentração de 10 μM	29
FIGURA 4.4 - Ilustração do processo de absorção e decaimentos dos estados excitados para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$	30
FIGURA 4.5 - Espectros de luminescência do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) em diferentes λ_{exc} (400-480 nm).	31
FIGURA 4.6 - Janela de absorção das biomoléculas.	32
FIGURA 4.7 - (A) Espectros de emissão do complexo em diferentes concentrações (0 - 100 μM) em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM). (B) Gráfico da intensidade de emissão em 655 nm do complexo versus a concentração.	33
FIGURA 4.8 - Espectros eletrônicos de: absorção UV-vis da tirosina (verde), absorção UV-vis da insulina bovina (rosa) e emissão da insulina (preto, $\lambda_{\text{exc}} = 276$ nm) em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM).	35

- FIGURA 4.9 - (A) Espectros de emissão da insulina (10 μM) em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) em diferentes tempos de incubação. (B) Gráfico da intensidade de emissão em 305 nm da insulina contra o tempo de incubação. 36
- FIGURA 4.10 - (A) Espectros de emissão da ThT (10 μM) em diferentes tempos de incubação da insulina bovina (10 μM). (B) Gráfico de intensidade de emissão da ThT em 482 nm ($\lambda_{\text{exc}}=440$ nm) contra o tempo de incubação da insulina bovina. 38
- FIGURA 4.11 - Espectros de dicroísmo circular da insulina bovina em 0 minutos (verde) e com 180 minutos em 65° C (vermelho). 39
- FIGURA 4.12 - Espectros de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ sozinho (10 μM) e na presença de insulina nativa e fibras de insulina (10 μM). 40
- FIGURA 4.13 - (A) Espectros de emissão do complexo (10 μM) na presença de diferentes tempos de incubação da insulina bovina (10 μM). (B) Gráfico da intensidade de emissão do complexo (655 nm) contra o tempo de incubação da insulina bovina. 41
- FIGURA 4.14 - (A) Curvas sigmóides da insulina bovina (10 μM) e da tioflavina T (10 μM). (B) Curvas sigmóides da insulina bovina (10 μM) e do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ (10 μM). 42
- FIGURA 4.15 - (A) Espectros de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ com diferentes concentrações de fibrilas de insulina (0-30 μM). (B) Gráfico da intensidade de emissão do complexo em 655 nm em função da concentração de fibrilas de insulina (0-30 μM). 43

- FIGURA 4.16 - (A) Espectros de emissão do complexo em diferentes concentrações (0-70 μM) contendo uma concentração de 10 μM de fibrilas de insulina. (B) Gráfico do máximo de emissão do complexo em 655 nm contra a concentração (0-70 μM)..... 45
- FIGURA 4.17 - Gráfico de Job's plot obtido com espectros de luminescência do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ e fibrilas de insulina sob a concentração total de 15 μM 46
- FIGURA 4.18 - Gráfico de Job's plot obtido com espectros de luminescência do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ e fibrilas de insulina sob a concentração total de 20 μM 47
- FIGURA 4.19 - Imagens de campo claro e luminescência dos estágios iniciais de agregação da insulina bovina com o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ 49
- FIGURA 4.20 - Imagens de campo claro e de luminescência durante 90 minutos de incubação da insulina bovina com o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ 50
- FIGURA 4.21 - Imagens de campo claro e luminescência durante 120 e 150 minutos de incubação da insulina bovina com o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ 51
- FIGURA 4.22 - Imagens de campo claro e luminescência durante 180 a 240 minutos de incubação da insulina bovina com o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ 52

RESUMO

IMAGENS ESPECTRAIS DO PROCESSO DE AGREGAÇÃO DA INSULINA POR COMPLEXOS METÁLICOS LUMINESCENTES

A insulina é um hormônio proteico sintetizado pelas células β do pâncreas, que atua regulando o nível de glicose no sangue. Essa proteína foi o primeiro biofármaco produzido em escala industrial para o tratamento de pacientes diabéticos. Contudo, a formação de agregados amiloides de insulina é um dos processos mais comuns e problemáticos encontrados durante a produção, armazenamento e distribuição desse biofármaco, uma vez que esse processo reduz a absorção de insulina e, conseqüentemente, limita o tratamento de pacientes diabéticos. O presente trabalho tem como objetivo monitorar *in vitro* o processo de agregação da insulina bovina utilizando como sonda luminescente o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺. O espectro de absorção é caracterizado por uma banda intensa na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$, $\epsilon = 70200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) típica das transições internas de ligantes aromáticos insaturados (ILCT) e uma absorção larga na região do visível 400 a 800 nm ($\lambda_{\text{máx}} = 480 \text{ nm}$, $\epsilon = 9\ 650 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) atribuída a transições de transferência de carga do metal para ligante (MLCT, Ru,d π →phen, π^*). As propriedades luminescentes em tampão fosfato (pH = 7,4; 33 mM) são caracterizadas por um máximo de emissão em 655 nm, tempo de vida de emissão (τ_{em}) de 60,88 e 0,594 ns e deslocamento de Stokes na ordem de 4800 cm^{-1} . Essas propriedades espectroscópicas indicam o potencial deste complexo para aplicação como sonda luminescente no meio biológico. O processo de agregação da insulina foi investigado em função do tempo de incubação, na ausência e na presença do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺. Nestes estudos observou-se um aumento da intensidade de emissão do complexo com o processo de agregação da

insulina. A partir dos ensaios de luminescência foi possível observar que o complexo consegue monitorar a cinética de agregação da insulina. O limite de detecção para o complexo foi de $0,85 \mu\text{M}$, indicando que o complexo é uma sonda luminescente sensível para detecção de fibrilas amiloides. A afinidade de interação do complexo com as fibrilas amiloides foram avaliadas através da constante de dissociação (K_d) obtendo-se o valor de $13,50 \pm 1,84 \mu\text{M}$, que é comparável aos valores de marcadores amiloides da literatura. A estequiometria de ligação entre o complexo e as fibrilas foi de 1 complexo: 2 fibras de insulina. As imagens do processo de agregação da insulina obtidas por microscopia de fluorescência demonstram que o complexo consegue mapear a agregação da insulina por imagem luminescente. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o complexo é um potencial candidato a sonda luminescente no processo de agregação da insulina e pode ser usado para ensaios quantitativos de insulina fibrilar.

ABSTRACT**SPECTRAL IMAGES OF THE INSULIN AGGREGATION PROCESS BY LUMINESCENT METALLIC COMPLEXES**

Insulin is a protein hormone synthesized by β cells in the pancreas, which regulates the level of glucose in the blood. This protein was the first biopharmaceutical produced on an industrial scale for the treatment of diabetic patients. However, the formation of amyloid insulin aggregates is one of the most common and problematic processes found during the production, storage and distribution of drugs based on this hormone, since this process reduces the effectiveness of drugs and, consequently, limits treatment of diabetic patients. The present work aims to monitor in vitro the process of aggregation of bovine insulin using the *cis*- [Ru (phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ complex as a luminescent probe. The complex has an intense absorption band in the ultraviolet region ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$, $\epsilon = 70\,200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) typical of the transitions of unsaturated aromatic ligands (ILCT) and a wide absorption band in the region visible ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$, $\epsilon = 9\,650 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) attributed to the charge transfer transition from metal to ligand (MLCT, Ru, $d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$). The complex has a maximum emission at 655 nm, after being excited at 480 nm, an emission lifetime (τ_{em}) of 60.88 and 0.594 ns in phosphate buffer pH 7.0, with a Stokes shift of around $4\,800 \text{ cm}^{-1}$. These spectroscopic properties indicate the potential of this complex for application as a luminescent probe in a biological environment. The insulin aggregation process was investigated as a function of the incubation time, in the absence and presence of the *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ complex. From the luminescence assays it was possible to observe that the complex can monitor the insulin aggregation kinetics. The limit for insulin fiber detection was 0.85 μM . This low detection limit value indicates that the complex is efficient in detecting amyloid species. The interaction affinity of the complex with the

amyloid fibrils was evaluated through the dissociation constant (K_d), the calculated K_d value corresponds to $13.50 \pm 1.84 \mu\text{M}$. The stoichiometry of the ligand between complex and fibers was determined as 1 complex: 2 insulin fibers. Fluorescence microscopy images indicate that it can act as an amyloid marker. Based on these results, it can be concluded that the complex can act as an amyloid marker in the insulin aggregation process.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Diabetes Mellitus	1
1.2 - Insulina	2
1.2.1 - Processo de Agregação da Insulina.....	6
1.2.2 - Problemas Associados à Fibrilação da Insulina	8
1.3 - Monitorando o Processo de Agregação	11
1.4 - Proposta de Trabalho	12
1.5 - Justificativa	12
2 - OBJETIVOS	14
2.1 - Objetivo Geral	14
2.2 - Objetivos Específicos	14
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 - Reagentes	15
3.2 - Síntese dos Complexos	15
3.2.1 - Complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂].....	15
3.2.2 - Complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4-Apy)] ₂ PF ₆	16
3.3 - Equipamentos e Metodologia	17
3.3.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H. 17	
3.3.2 - Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-vis.....	17
3.3.3 - Espectroscopia de Luminescência	18
3.3.4 - Tempo de Vida de Emissão (τ_{em}).....	18
3.3.5 - Dicroísmo Circular (DC).....	18
3.3.6 - Preparo das soluções estoques de insulina bovina	19
3.3.7 - Processo de agregação da insulina bovina	19
3.3.8 - Ensaio de Cinética de Agregação.....	20
3.3.9 - Limite de Detecção (DL).....	21
3.4.10 - Constante de Dissociação (K _d).....	22

3.3.11 - Método das Variações Contínuas (Job's Plot)	22
3.3.12 - Microscopia de Fluorescência	23
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1- Caracterização do Complexo <i>cis</i>-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺	24
4.1.1 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H.....	24
4.1.2 - Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-vis.....	27
4.1.3 - Espectroscopia de Luminescência e Tempo de Vida de Emissão... ..	28
4.2 - Estudo de Concentração do Complexo	33
4.3 - Insulina Bovina.....	34
4.3.1 - Propriedades Espectroscópicas	34
4.3.2 - Cinética de Agregação.....	35
4.4 - Ensaio de Detecção de Agregados Amiloides	37
4.4.1 - Ensaio de Fluorescência com tioflavina T (ThT)	37
4.4.2 - Dicroísmo Circular (DC).....	38
4.5 - Interação do Complexo com a Insulina Bovina	40
4.5.1 - Monitorando a Formação de Agregados Amiloides com o Complexo <i>cis</i> – [Ru(phen) ₂ (3,4-Apy) ₂] ²⁺	40
4.5.3 - Ensaio de Ligação	44
4.5.3.1 - Constante de Dissociação (K _d).....	44
4.5.3.2 - Estequiometria de Ligação (Job's Plot)	46
4.6 - Imagens do Processo de Agregação da Insulina	48
5 - CONCLUSÃO	53
6 - REFERÊNCIAS.....	54

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Diabetes Mellitus

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo aumento do nível de glicose no sangue (hiperglicemia) resultante da produção insuficiente de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas ou quando as células do corpo apresentam resistência à ação da insulina ou ambas as condições.^{1,2,3}

Os indivíduos diagnosticados com DM apresentam alguns sintomas comuns, tais como excesso de urina, aumento do apetite e sede, cansaço, perda ou aumento de peso e turvação visual. À medida que a doença evolui, a mesma pode causar diversos danos, incluindo insuficiência renal, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, cegueira e eventualmente à amputação de membros inferiores e morte prematura.^{1, 4, 5}

Essa doença impacta significativamente a qualidade de vida do paciente e de seus familiares tornando o paciente dependente de assistência médica e social permanente acrescido de enorme custo financeiro para a sociedade. Este quadro grave faz da diabetes a causa direta da morte de 1,6 milhão de indivíduos a cada ano.¹ Esses dados fornecem uma estimativa da dimensão do problema que afeta mais de 170 milhões de pessoas no mundo, tendo ainda uma previsão de um aumento adicional de quase 50% para o ano de 2025.⁶ Além disso, as projeções indicam que em 2030 e 2040 existirão 439 e 642 milhões de pessoas com DM no mundo, respectivamente.^{7, 8}

Conforme os dados divulgados pela Federação Internacional de Diabetes em 2019, no Brasil há mais de 16,5 milhões de indivíduos diabéticos com estimativa de aumento 55% para 2045, isso corresponde a 49 milhões de novos casos.⁹ Os gastos com os pacientes diabéticos com está próximo de R\$ 100 bilhões por ano.¹⁰ Estima-se que o custo poderá chegar a US\$ 97 bilhões e em condições piores poderá atingir até US\$ 123 bilhões.¹¹

Apesar das complicações associadas a diabetes conseguirem ser evitadas ou retardadas com medicação e assistência médica regular, os gastos com medicamentos ainda são elevados. Consequentemente, a diabetes é mundialmente reconhecida como um dos problemas atuais mais necessitados de medidas urgentes tanto do ponto de vista de saúde pública quanto de assistência social.^{10,11,12}

A maioria dos casos de pacientes diabéticos está associado com duas categorias principais, conhecidas como Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).¹³ A DM1 está relacionada ao sistema autoimune e é identificada em geral na infância ou adolescência, sendo uma condição crônica, em que a destruição das células β do pâncreas, provoca a deficiência de insulina, nestes casos o paciente é dependente da insulina.¹⁴ Enquanto que a DM2 descreve cerca de 95% dos casos diagnosticados e geralmente ocorre em adultos quando o corpo se torna resistente à insulina ou produz pouca insulina para controlar a taxa de açúcar no sangue.¹⁵ Portanto, o acesso ao tratamento acessível, incluindo a utilização da insulina é fundamental para a terapia de pacientes diabéticos.

1.2 - Insulina

Em 1921, a insulina foi descoberta pelos cientistas Frederick Banting e Charles Best. Um ano depois, esses pesquisadores conseguiriam tratar a deficiência endócrina de insulina pela primeira vez em uma criança com DM1 a partir da insulina exógena. Essa descoberta foi um marco histórico para a terapia de pacientes diabéticos, tendo em vista que antes da insulina a única forma de tratamento era uma dieta rigorosa que provocava outros problemas, como desnutrição e por consequência morte.^{16,17}

A insulina é um hormônio proteico produzido pelas células β do pâncreas, que atua regulando o nível de glicose no sangue.¹⁸ No processo de biossíntese da insulina, a proteína precursora inativa, pré-pró-insulina, passa

por uma etapa de clivagem proteolítica que leva a formação do polipeptídeo pró-insulina, contendo as cadeias A e B unidas a um segmento intermediário, denominado de cadeia C. A proteólise da pró-insulina libera a forma madura da insulina e o peptídeo C ^{19,20}, a Figura 1.1 ilustra a obtenção da insulina endógena.

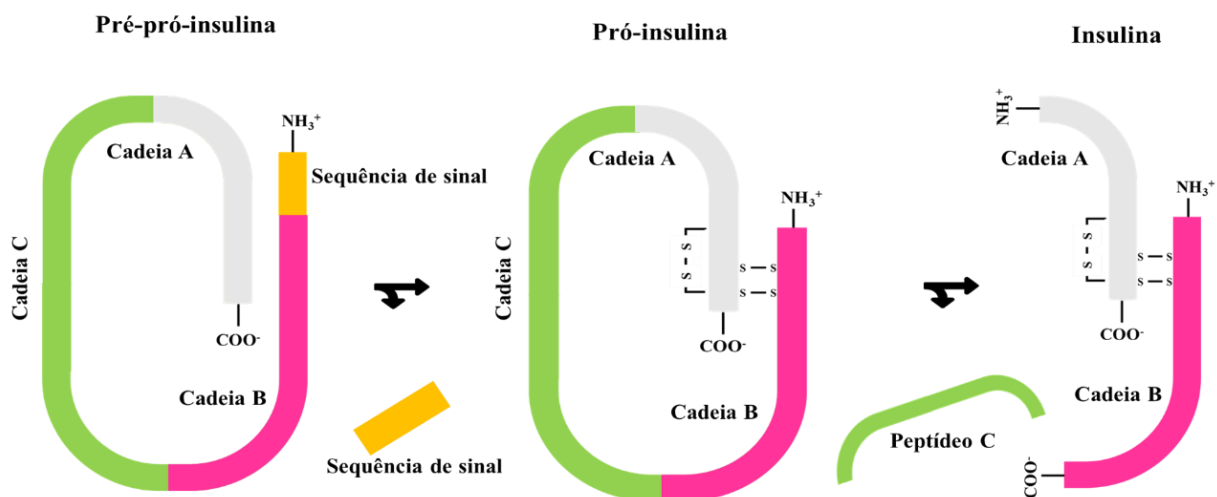


FIGURA 1.1 - Esquema de obtenção da insulina endógena. Fonte adaptada: WEISS, M.; STEINER, D. F.; PHILIPSON, L. H., 2015.

Na forma biologicamente ativa, a insulina monomérica é composta por 51 resíduos de aminoácidos (cerca de 5.808 Daltons), com duas cadeias polipeptídicas A e B de estrutura predominantemente α -helicoidal, com 21 e 30 resíduos, respectivamente. Essas cadeias polipeptídicas são unidas através de duas ligações de dissulfeto intercadeia (A7-B7 e A20-B19), apresentando uma terceira ligação dissulfeto intracadeia entre os resíduos 6 e 11 da cadeia A ^{21,22}, a Figura 1.2 ilustra a estrutura monomérica da insulina humana.

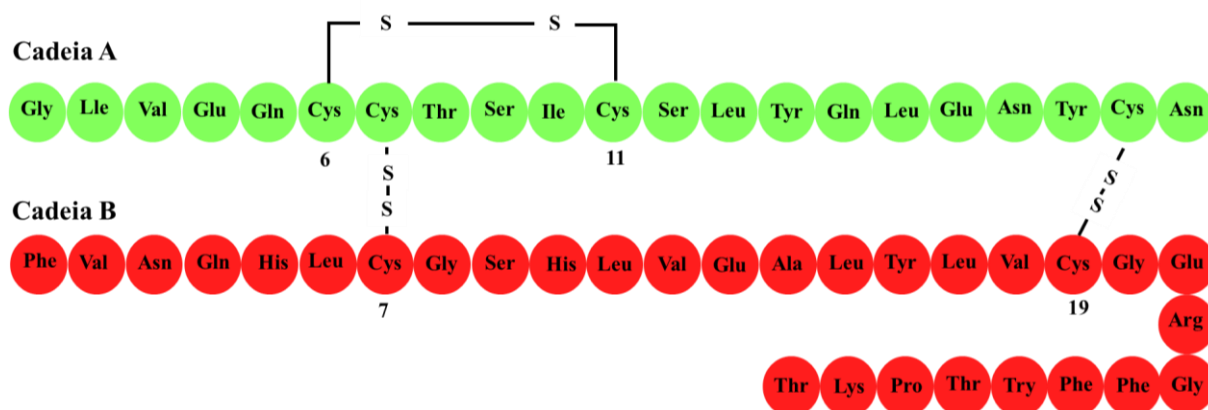


FIGURA 1.2 - Ilustração da estrutura da insulina humana. Fonte Adaptada: JOSHI; et al, 2007.

Em solução, a insulina existe como uma mistura de diferentes estruturas conformacionais em equilíbrio, incluindo monômeros, dímeros, tetrâmeros, hexâmeros e possivelmente espécies oligoméricas maiores,^{23, 24,25} conforme ilustra a Figura 1.3. A abundância de cada espécie depende das condições do meio: em ácido acético 20% (pH = 2,0) e em baixas concentrações a insulina é predominantemente monomérica^{20,24}, dimérica em HCl (pH =2,0)²⁴ e na forma de hexâmero em altas concentrações de insulina, na presença de íons Zn (II) e pH neutro.²⁶ Contudo, em meio fisiológico, a insulina é armazenada no pâncreas na forma de hexâmeros coordenados a íons Zn (II), formados pela associação de três dímeros.²⁷

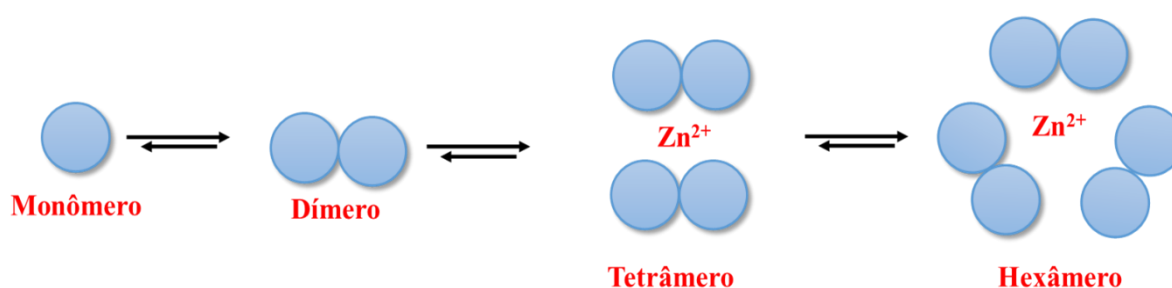


FIGURA 1.3 - Diferentes conformações da insulina em solução. Fonte Adaptada: AKBARIAN, MOHSEN et al., 2018.

Após a secreção da insulina pelas células β pancreáticas para a corrente sanguínea, a diluição e a repulsão eletrostática favorecem a dissociação da insulina em dímeros e, em seguida em monômeros, onde ocorre o transporte via corrente sanguínea e subsequente ligação com o seu receptor para regular a homeostase glicêmica.^{28,29}

Dessa maneira, o mecanismo de ação da insulina inicia-se através da ligação com o receptor da célula, que consiste em uma glicoproteína constituída por duas subunidades α e β de característica extracelular e transmembrana, respectivamente. A ligação da insulina ocorre especificamente na subunidade α (FIGURA 1.4) que permite a entrada da glicose na célula. Por isso, a insulina é frequentemente descrita como uma “chave”, uma vez que destrava a célula permitindo a entrada da glicose, assim a mesma pode ser usada como fonte energética.^{30,31}

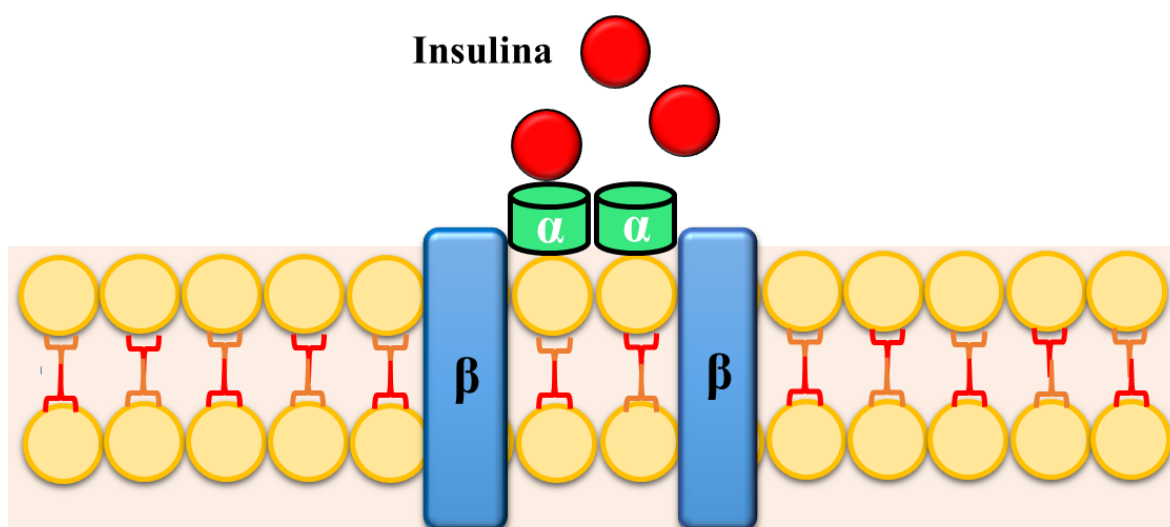


FIGURA 1.4 - Ilustração do receptor de insulina. Fonte adaptada: MOREIRA, R. O.; CAMPOS, S. C.; SOLDERA, A. L., 2013.

1.2.1 - Processo de Agregação da Insulina

Várias proteínas são conhecidas por formar agregados insolúveis altamente ordenados com estruturas ricas em folhas β , denominados de fibrilas amiloides.^{32,33} O acúmulo destes agregados conduz a danos celulares e disfunção de tecidos e órgãos.³⁴ Algumas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson estão associadas a agregação do peptídeo beta amiloide ($A\beta$) e da proteína α -sinucleína, respectivamente. Além disso, o acúmulo de fibrilas amiloides também está relacionado com doenças crônicas, como a DM2 comumente associada com a formação de agregados amiloides a partir do peptídeo das ilhotas pancreáticas (IAPP).^{35,36,37,38}

Assim como esses peptídeos e proteínas citados, a insulina é uma proteína amiloide que na forma monomérica e sob certas condições, como baixo pH, elevada temperatura, força iônica, agitação mecânica, exposição a superfícies hidrofóbicas e solventes orgânicos, possui alta propensão em sofrer o processo de auto-agregação, gerando espécies amiloidogênicas.³⁹

A formação de fibrilas de insulina consiste em um processo físico, na qual as moléculas de insulina interagem entre si formando agregados.⁴⁰ A Figura 1.5 demonstra a cinética de formação de fibrilas de insulina que incluem três fases: nucleação, alongamento e equilíbrio.⁴¹ O processo de formação das fibrilas inicia com a fase de nucleação caracterizada por monômeros solúveis desdobrados que evoluem para oligômeros e subsequente formação de um núcleo, enquanto a fase de alongamento consiste na adição de monômeros ou oligômeros de insulina aos núcleos que se alongam, formando as protofibrilas. Esse processo atinge a fase de equilíbrio quando a maioria dos monômeros solúveis são convertidos em fibrilas maduras.^{41,42}

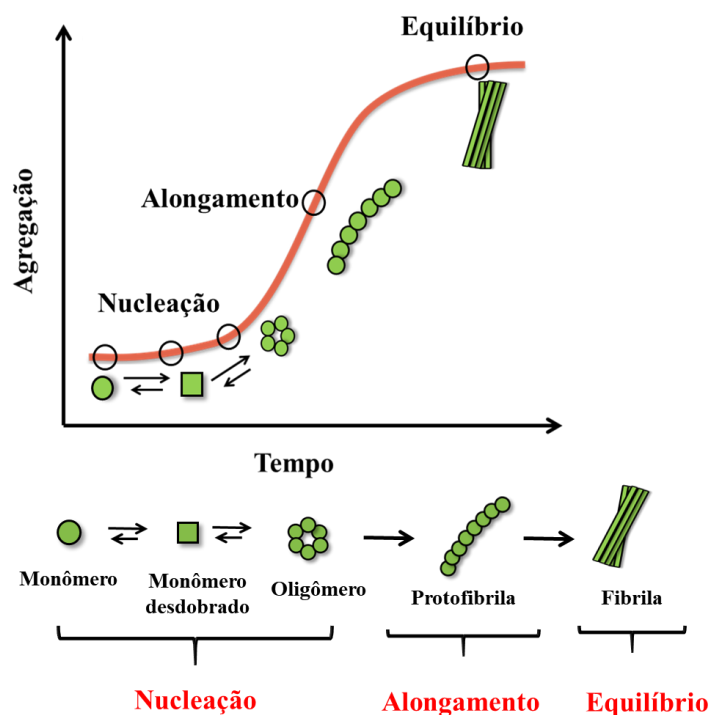


FIGURA 1.5 - Representação do processo de agregação da insulina. Fonte Adaptada: ZAPADKA, K. L et al., 2017.

As fibrilas maduras são espécies termodinamicamente estáveis, sendo caracterizadas por estruturas filamentosas não ramificadas e conformação predominantemente em folha β cruzada com ligações em torno do eixo da ligação, estabilizadas por ligações de hidrogênio,^{43,44} conforme ilustrado na Figura 1.6.

De acordo com as informações citadas anteriormente, a formação desses agregados organizados é descrita tipicamente por um mecanismo de agregação dependente da nucleação, onde o núcleo da fibrilação é a etapa limitante do processo, ou seja, uma vez que o núcleo está formado a agregação é ativada.⁴⁵ Portanto, o processo de nucleação é considerado o evento determinante para a fibrilação e o estudo detalhado desta etapa é indispensável para os avanços terapêuticos, bem como para

contribuir na elucidação da capacidade de proteínas em formar estruturas amiloides.

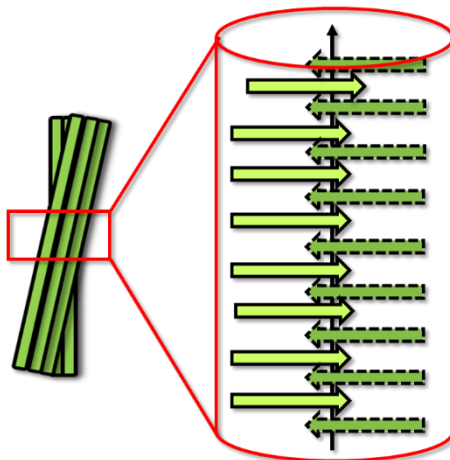


FIGURA 1.6 - Ilustração da fibrila madura. Fonte adaptada: SCHMIDT, MATTHIAS et al., 2019

A elucidação do mecanismo de formação de fibrilas amiloides na insulina, ainda não está totalmente esclarecido.⁴⁶ Apesar do vasto número de estudos sobre fibrilas e intermediários de agregação, a poucos trabalhos enfatizando as etapas iniciais da agregação. A principal razão é que o mecanismo de agregação consiste em várias etapas e o estado de transição limitante ainda é desconhecido.⁴⁷

1.2.2 - Problemas Associados à Fibrilação da Insulina

Apesar do processo de obtenção da insulina exógena ser conhecido e a insulina estar presente no mercado desde 1982, ela é uma das proteínas onde a amiloidegênese é muito preocupante, pois na forma de fibrilas amiloides não é biodisponível e qualquer grau de formação amiloide durante a sua fabricação limita a eficácia para o uso clínico.⁴⁸

A formação de fibrilas de insulina solúvel é um problema para a produção, armazenamento a longo prazo e transporte.⁴⁹ Por exemplo, o

processo de produção da insulina recombinante envolve várias condições que favorecem o processo de formação de fibrilas amiloides, incluindo as etapas de isolamento e purificação onde são necessárias várias etapas que envolvem uma variação de pH 1 a 3, agitação e exposição a solventes orgânicos.^{39,49} Além disso, a agitação da insulina durante o transporte e nos sistemas de disponibilização propiciam a agregação, bem como as variações na temperatura e força iônica do meio.^{50,51}

Nos casos em que o paciente necessita do uso de bomba de insulina para administração contínua, a formação de fibras amiloides podem causar oclusão do sistema e redução das taxas de entrega. A insulina também está associada a amiloidose nas áreas de injeção, observada em pacientes após repetidas injeções, o que pode levar a deficiência na absorção da insulina injetada e alterações na resposta imune. Essa deficiência também pode resultar na cetoacidose diabética que é uma complicação grave, podendo ocasionar coma ou até mesmo a morte do paciente.^{52,53,54}

Para evitar essas ocorrências, é necessário a manutenção da forma hexamérica, já que no estado monomérico a insulina é mais propensa a fibrilação. Para isso são adicionados excipientes, como íons Zn (II) nas preparações comerciais de insulina para manter sua conformação estável.^{55,56, 57}

Acredita-se que o íon Zn (II) é essencial na formação do arranjo estrutural, estabilidade e secreção da insulina. Por isso, desde sua introdução para o tratamento de pacientes com diabetes, toda formulação farmacêutica de insulina envolve a preparação do hexâmero com íons Zn (II).⁵⁸

A estabilidade do hexâmero define o tempo de armazenamento da insulina, atividade biológica, imunogenicidade e sensibilidade à potencial degradação proteolítica no espaço intersticial após injeção. Entretanto, estabilizar a forma hexamérica também apresenta desvantagens, uma vez que a insulina é mais ativa na forma monomérica. Portanto, alterar o equilíbrio

para a forma de hexâmero acaba retardando o início da atividade, sendo assim necessário a dissociação da forma hexamérica para a monomérica.^{59, 60, 61, 62,63}

Os primeiros análogos de ação rápida da insulina foram introduzidos no final da década de 90 com o objetivo de diminuir a tendência a formar hexâmeros, aumentando assim a viabilidade. A insulina lispro, que permanece no estado monomérico e difere da insulina humana pela troca de posição da prolina (B - 28) pela lisina (B - 29), foram criados para resolver o problema associado com a forma hexamérica, porém esse análogo apresenta problemas de agregação mais severos.^{27,64}

Os produtos atualmente disponíveis para uso clínico são desenvolvidos para aumentar o tempo de ação por vários mecanismos, incluindo alterar a solubilidade (insulina NPH), altas formulações de zinco (insulina Lente), promover a precipitação pela alteração no pH (insulina glargina) e presença de albumina (insulina detemir).⁶⁵

Apesar destas modificações prolongarem o tempo de ação destes produtos em comparação a insulina humana regular, nenhum deles apresenta um perfil de absorção ideal. Por isso as pesquisas para melhorar e aperfeiçoar o uso terapêutico da insulina continuam.⁶⁶ Neste contexto, um excipiente que permita vantagem da insulina monomérica de ação rápida, eliminando a desvantagem correspondente de agregação seria de maior interesse.

Diante disso, pesquisas por metodologias que contribuam para elucidar a cinética da agregação da insulina são de suma importância tanto para interferir no processo de amiloidegênese, como também para melhorar os sistemas de entrega de insulina para o tratamento do diabetes.

1.3 - Monitorando o Processo de Agregação

Atualmente, diversas técnicas vêm sendo utilizadas para monitorar e detectar a formação de agregados amiloides. Entre estas técnicas, a espectroscopia de fluorescência é considerada uma das melhores, visto a simplicidade, rapidez e sensibilidade que esse método oferece.^{67,68,69} Em particular, vários compostos apresentaram aprimorada intensidade de luminescência após a ligação com as fibrilas amiloides, essa característica tornou-os promissores candidatos para monitorar a formação de espécies amiloidogênicas *in vitro*.^{70,71,72}

Por exemplo, o corante orgânico tioflavina T (ThT) (FIGURA 1.7) compreende um padrão fluorescente, que após a ligação com fibrilas amiloides apresenta um aumento na intensidade de fluorescência com máximo de emissão em 482 nm.⁷⁰ Esse aumento no rendimento quântico de emissão é resultado do impedimento rotacional em torno da ligação C-C que conecta os anéis de benzotiazol e anilina,⁷³ favorecendo assim os processos radiativos (emissão de luz).

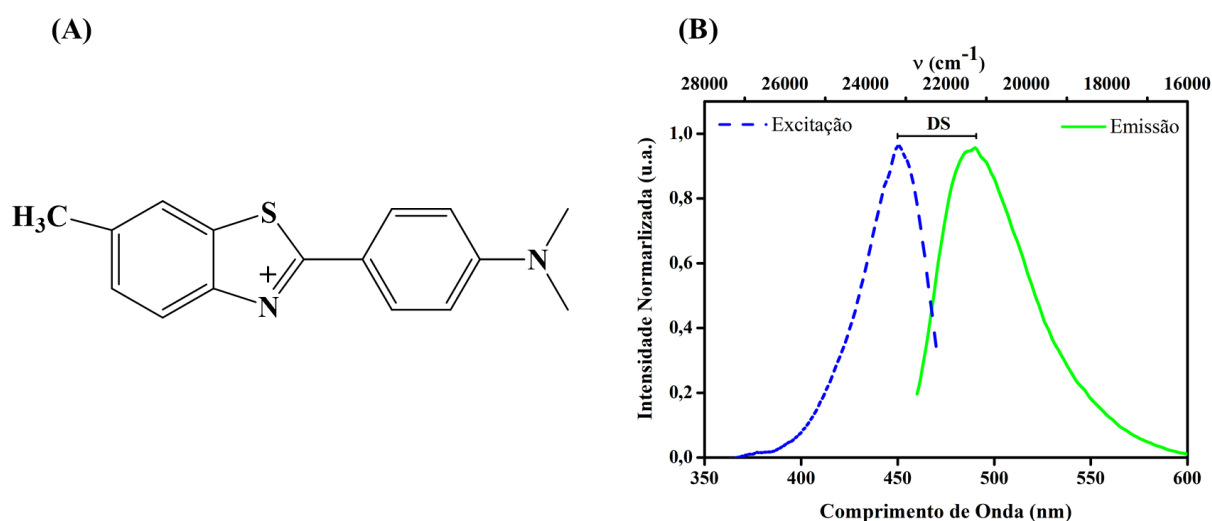


FIGURA 1.7- (A) Ilustração da estrutura química da tioflavina T. (B) Espectros de excitação e emissão da ThT com fibrilas de insulina.

Entretanto, esse corante apresenta baixa especificidade e sensibilidade, sendo incapaz de revelar as espécies formadas em estágios anteriores, como oligômeros intermediários.⁶⁸ Além disso, as propriedades espectroscópicas da ThT, como a emissão no azul, pequeno deslocamento de Stokes (DS), Figura 1.7 (B), e tempo de vida de emissão curto (cerca de 4 ns) são fatores limitantes para a aplicação como sonda biológica.^{74, 75}

Em razão dessas limitações, as pesquisas estão direcionadas para a investigação de novas sondas fluorescentes que apresentem alterações espectroscópicas mais específicas para agregados de proteínas.^{76, 77, 78}

1.4 - Proposta de Trabalho

Com base nos problemas relacionados com o processo de formação de agregados amiloides de insulina. A proposta desse trabalho é realizar um estudo *in vitro* do perfil de agregação da insulina bovina usando o complexo de *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ como sonda luminescente e as técnicas de espectroscopia de luminescência no estado estacionário e microscopia de fluorescência para mapear as diferentes fases de agregação da insulina pelas alterações na resposta luminescente do complexo.

1.5 - Justificativa

O Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LaFIB) vem trabalhando no desenvolvimento de complexos luminescentes para aplicação biológica.^{79, 80, 81, 82} Os trabalhos do grupo mostraram que o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ é absorvido por células neuronais (Neuro2A e PC12) alcançando a região citoplasmática sem toxicidade aparente.^{81,83,84} Esses estudos nos levaram a investigar o processo de agregação do peptídeo beta amiloide (A β) que sob condições ainda não

estabelecidas se acumulam no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer em diferentes formas de agregados, causando a perda das sinapses e danos ao sistema neurológico do paciente.⁸⁵

Recentemente, foi mostrado que o complexo luminescente, *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ é capaz de reconhecer o processo de agregação do peptídeo Aβ₁₋₄₀ e seus fragmentos (Aβ₁₋₂₈, Aβ₁₁₋₂₂ e Aβ₂₉₋₄₀) desde os estágios iniciais da agregação. Esse complexo é uma sonda sensível para obter imagens do Aβ pela técnica de fluorescência resolvida no tempo, uma vez que as imagens obtidas apresentaram tempo de vida de emissão (τ_{em}) longo sem alterar a emissão intrínseca do peptídeo. Além disso, os valores de τ_{em} obtidos foram característicos da interação Aβ /complexo: Aβ₁₋₂₈ (1,7 e 18,5 ns), Aβ₁₁₋₂₂ (1,8 e 22,8 ns) e Aβ₁₋₄₀ (2,8 e 7,4 ns), permitindo diferenciar os agregados. Observamos também, que o complexo protegeu as células neuronais PC12 da toxicidade do Aβ₁₋₄₀ alterando o mecanismo de agregação para um caminho não tóxico, gerando micelas e estruturas do tipo fita no lugar de oligômeros do tipo poros e fibrilas retorcidas, observadas nas imagens obtidas do processo de agregação destes peptídeos Aβ na ausência do complexo.^{82,84}

Esses resultados nos motivaram a estudar o processo de agregação da insulina bovina em *in vitro* usando o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ como sonda luminescente para detectar agregados amiloides.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral monitorar o processo de agregação da insulina bovina utilizando o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺.

2.2 - Objetivos Específicos

- Sintetizar o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺, que phen = 1,10-fenantrolina e 3,4-Apy = 3,4-diaminopiridina;
- Caracterizar o complexo obtido pelas técnicas espectroscópicas (RMN de ¹H, absorção eletrônica na região UV-vis e luminescência);
- Detectar a formação de fibrilas de insulina *in vitro* através do ensaio de fluorescência utilizando o padrão tioflavina T (ThT) e Dicroísmo Circular;
- Acompanhar *in vitro* o processo de agregação da insulina bovina através da técnica fluorescência no estado estacionário na presença e ausência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺;
- Quantificar o limite de detecção do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ com as fibrilas amiloides;
- Avaliar a constante de dissociação (K_d) da interação do complexo com as fibrilas amiloides;
- Determinar a estequiometria de ligação entre o complexo e as fibrilas de insulina;
- Mapear o processo de agregação da insulina pela técnica de microscopia de fluorescência utilizando o complexo como marcador amiloide.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Reagentes

Todos os reagentes $\text{RuCl}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, 1,10-fenantrolina (phen), cloreto de lítio (LiCl), 3,4- diaminopiridina (3,4-Apy) e hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6) utilizados para a síntese dos complexos são de procedência Sigma Aldrich. Os solventes dimetilformamida (DMF) e etanol utilizados na síntese foram de pureza HPLC.

Para o preparo das soluções tampão foram utilizados ácido clorídrico 37% (HCl), cloreto de sódio (NaCl) de procedência Qhemis, fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de procedência Synth dissolvidos em água MilliQ.

No processo de agregação proteica foi utilizada a insulina bovina (I5500) de procedência Sigma Aldrich.

3.2 - Síntese dos Complexos

A síntese do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})]2\text{PF}_6$ aconteceu em duas etapas que consistiram na síntese do complexo precursor $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Cl})_2]$ e do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})]2\text{PF}_6$.

3.2.1 - Complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$

O complexo precursor $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ foi obtido através do procedimento experimental descrito na literatura,⁸⁶ com algumas alterações. A síntese ocorreu a partir de 1,15 mmols de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, 2,52 mmols de 1,10-fenantrolina e 8,03 mmols de LiCl dissolvidos em 15 mL de DMF sob refluxo em atmosfera de nitrogênio, aquecimento e agitação contínua durante 8 horas, Figura 3.1. Em seguida, a solução de coloração roxa foi filtrada

quente e o composto obtido foi lavado com água destilada gelada até água-mãe sair incolor. O complexo foi seco a temperatura ambiente e o rendimento calculado foi de 56,95%.

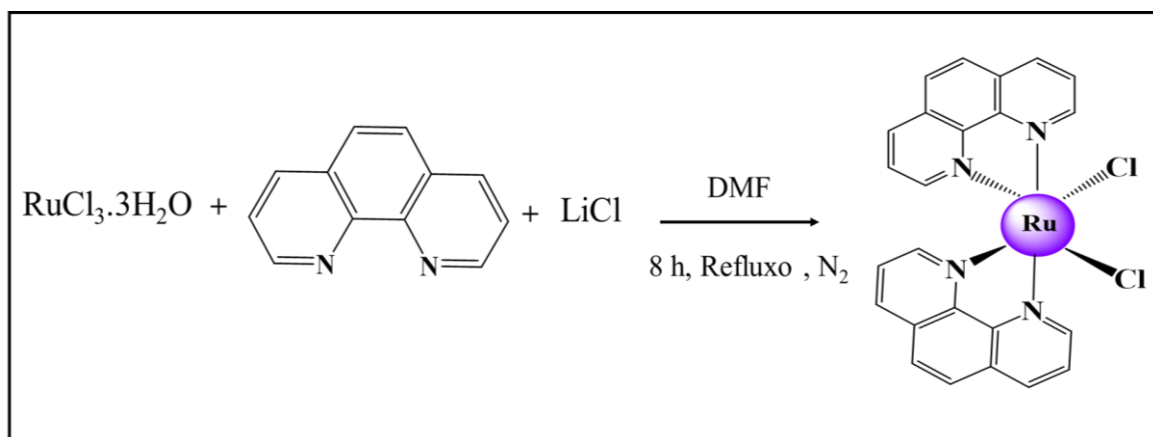


FIGURA 3.1- Esquema da síntese do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂].

3.2.2 - Complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)]₂PF₆

A síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)]₂²⁺ seguiu o procedimento descrito na literatura.⁸¹ O complexo foi obtido a partir de 0,2 mmols do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] e 0,44 mmols de 3,4-diaminopiridina dissolvidos em 10 mL de etanol/água (1:1). A reação permaneceu sob refluxo em atmosfera de nitrogênio, aquecimento, ausência de luz e agitação constante durante 8 horas, Figura 3.2. Em seguida, a solução foi filtrada quente e adicionado o contra-íon hexafluorofosfato de amônio. A solução permaneceu na geladeira durante uma noite para a completa precipitação do composto. Após isso, a solução foi filtrada e lavada com água destilada gelada. O composto foi seco a temperatura ambiente e o rendimento calculado foi de 54%.

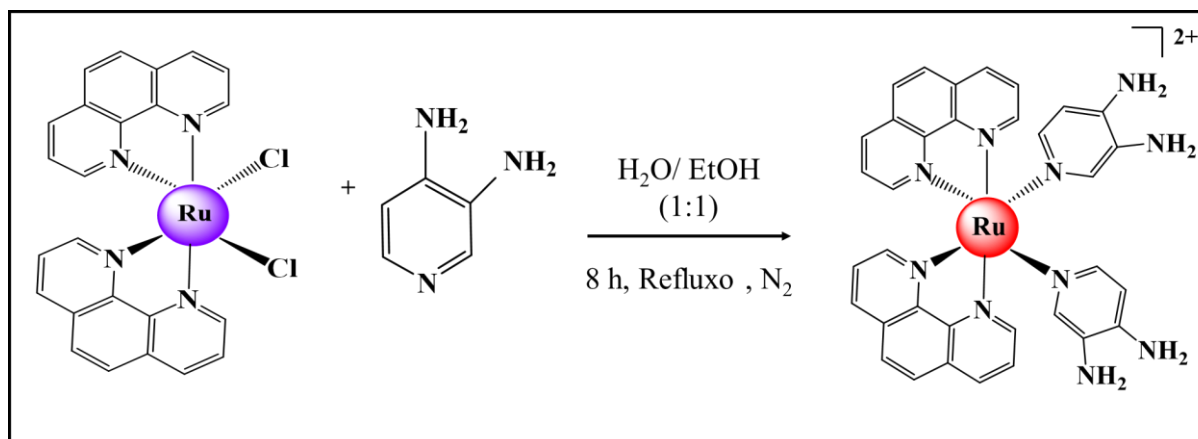


FIGURA 3.2 - Esquema da síntese do complexo cis -[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺.

3.3 - Equipamentos e Metodologia

3.3.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear dos ligantes livres e do complexo sintetizado cis -[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz pertencente ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. As amostras foram preparadas dissolvendo 3 mg das amostras em 600 uL de solvente DMSO-*d*₆.

3.3.2 - Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-vis

Os espectros de absorção eletrônica na região UV-vis foram obtidos utilizando um espectrofotômetro modelo Agilent 8453A. Para a caracterização do complexo e ensaios utilizando a insulina bovina foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho ótico 10 mm e volume 3,5 mL.

3.3.3 - Espectroscopia de Luminescência

Os espectros de emissão e excitação foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC - lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928. Foram utilizadas cubetas de quartzo de quatro lados de caminho ótico 10 mm e volume 3,5 mL.

3.3.4 - Tempo de Vida de Emissão (τ_{em})

As medidas de tempo de vida de emissão do complexo foram realizadas no Grupo de Nanoestruturas Semicondutoras de Física pertencente ao Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos. As medidas foram realizadas utilizando uma concentração 10 μ M do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ em solução tampão fosfato (pH = 7; 33 mM). Os dados foram adquiridos através do software da PicoQuant a partir do ajuste biexponencial, a qualidade do ajuste foi avaliada pelo parâmetro χ^2 .

3.3.5 - Dicroísmo Circular (DC)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados utilizando o espectrômetro Jasco J-815 pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Departamento de Física da Universidade de São Paulo – Campus II São Carlos. Para as medidas foram utilizadas insulina bovina (5 μ M) em solução de HCl (pH = 2,0; 100 mM NaCl) no tempo inicial de agregação (0 min) e em seguida no estágio final de fibrilação (180 min) sob as condições de agregação, as soluções foram medidas em uma cubeta despolarizada de caminho ótico 5 mm e volume 500 μ L.

3.3.6 - Preparo das soluções estoques de insulina bovina

As soluções estoques de insulina foram preparadas dissolvendo 50 mg de insulina bovina em 2,5 mL de HCl (pH = 2,0; 100 mM NaCl). Em seguida, a solução de insulina foi centrifugada, a insulina que não foi completamente dissolvida foi solubilizada com mais 2,5 mL de solução ácida e, em seguida, a solução de insulina foi homogeneizada via vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, alíquotas de 170 μ L da solução estoque foram transferidas para eppendorfs e armazenadas no congelador para posterior utilização. A Figura 3.3 ilustra o procedimento de preparação das soluções estoques de insulina.

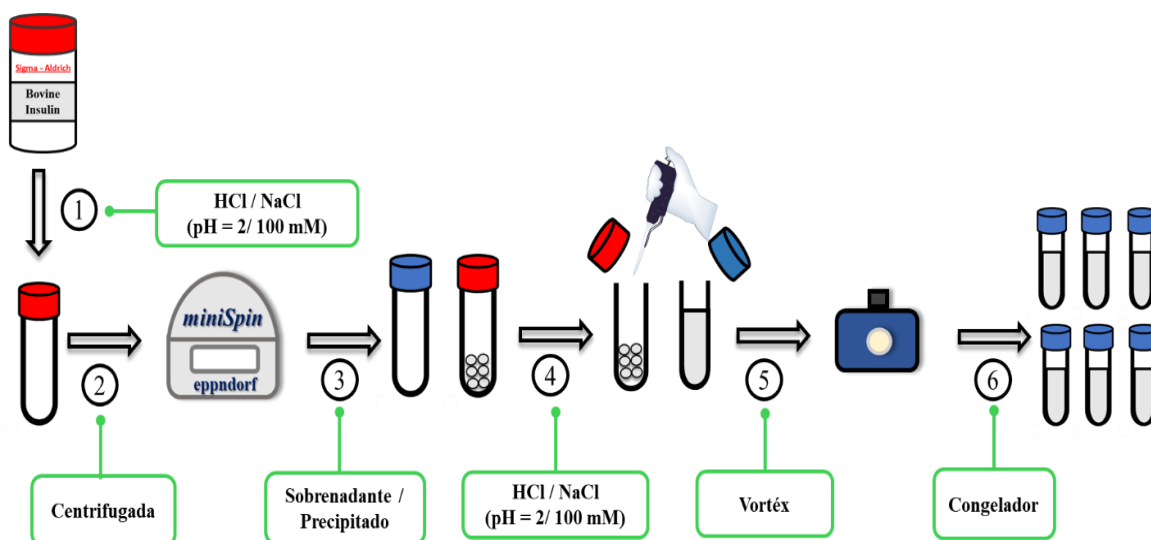


FIGURA 3.3 - Esquema do procedimento utilizado para o preparo das soluções estoques de insulina.

3.3.7 - Processo de agregação da insulina bovina

O procedimento utilizado para agregação da insulina foi adaptado da literatura.^{75,87} Essa etapa consistiu em diluir a solução estoque de insulina (170 μ L) com aproximadamente 1630 μ L de solução de HCl (pH= 2,0; 100 mM NaCl) e a concentração final foi ajustada para 125 μ M

utilizando a absorvidade molar ($\epsilon_{278} = 6080 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).⁸⁸ Os agregados amiloides de insulina foram formados incubando a solução de insulina durante 240 minutos a 65 °C.

3.3.8 - Ensaio de Cinética de Agregação

Para os estudos de cinética de agregação foram retirados em intervalos de 30 minutos alíquotas de 160 μL da solução de insulina incubada a 65 °C em solução ácida e, em seguida, resfriadas em temperatura ambiente, ajustando o pH da solução com tampão fosfato (pH = 7; 33 mM), a fim de se obter uma concentração final de 10 μM de insulina para as medidas. Nos ensaios de cinética de fibrilação utilizando ThT e complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ como sondas luminescentes, foi realizado o preparo das soluções estoques para os compostos. Posteriormente, o mesmo procedimento descrito acima foi seguido e, em seguida, adicionado a sonda luminescente na solução de insulina bovina utilizando uma concentração final para as medidas de 10 μM de insulina e 10 μM de sonda luminescente. A Figura 3.4 ilustra o procedimento experimental seguido para a formação de agregados amiloides e subsequente adição da sonda luminescente.

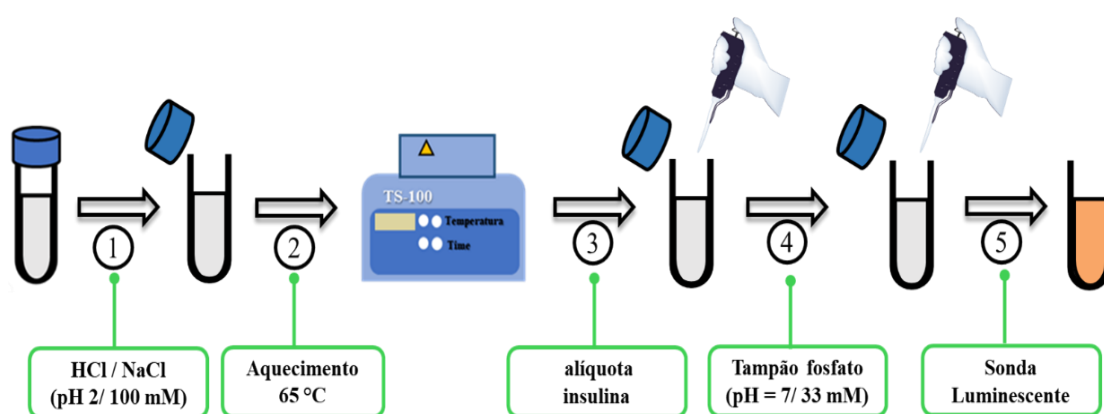


FIGURA 3.4 - Ilustração da metodologia utilizada no processo de formação de agregados amiloides de insulina e subsequente adição de uma sonda luminescente.

3.3.9 - Limite de Detecção (DL)

Os ensaios para determinar o limite de detecção do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ seguiram o procedimento descrito na literatura.

⁸⁹ A primeira etapa para determinação do valor do limite de detecção consistiu na medição de dez espectros de emissão do complexo com a concentração de 10 μM, onde a partir dessas medidas o desvio padrão do branco foi calculado. Em seguida, foram preparadas amostras do complexo contendo diferentes concentração de fibras de insulina (0-30 μM). Para obtenção do valor de inclinação da curva analítica foi plotado o gráfico do máximo da intensidade emissão do complexo em 655 nm contra a concentração de fibrilas de insulina. O limite de detecção foi calculado como 3 vezes o desvio padrão das amostras do branco dividido pela inclinação da curva analítica, conforme demonstra a Equação 1. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média.

$$DL = \frac{3S}{K} \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo:

DL= Limite de detecção;

S= Desvio padrão do branco;

K= inclinação da curva analítica.

3.4.10 - Constante de Dissociação (Kd)

Para determinação da constante de dissociação foi utilizado o procedimento descrito na literatura,⁹⁰ utilizando uma concentração fixa de fibras de insulina (10 μM) e variando a concentração do complexo (0-70 μM). A curva de saturação do ensaio foi obtida através do gráfico do máximo de emissão do complexo em 655 nm contra a concentração do complexo, a partir disso o valor de Kd foi determinado utilizando a equação 2. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média do máximo de emissão.

$$Y = \frac{B_{\text{máx}} \cdot X}{(K_d + X)} \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo:

Y= intensidade de emissão;

$B_{\text{máx}}$ = ligação específica máxima;

X= concentração do complexo;

Kd= constante de ligação.

3.3.11 - Método da Variações Contínuas (Job's Plot)

Para determinar a estequiometria de ligação entre o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ e as fibrilas de insulina foi utilizado o método de variações contínuas seguindo o procedimento descrito na literatura.⁹¹ O ensaio consistiu na obtenção dos espectros de emissão com diferentes razões molares de complexo e fibras, mantendo fixa a concentração total de 15 μM e 20 μM . A estequiometria de ligação foi determinada através do gráfico da fração molar em função do Δ de luminescência do complexo (subtração da luminescência do complexo sozinho e da luminescência do complexo na

presença de fibrilas de insulina), sendo o máximo da fração molar correspondente a estequiometria da ligação.

3.3.12 - Microscopia de Fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas no microscópio invertido Carl Zeiss modelo Axio Observer 7 utilizando o filtro Set20 (Rodamina) - emissão: 575-640 nm. As medidas foram realizadas utilizando uma alíquota de 15 μL das soluções de insulina bovina retiradas em intervalos de 30 minutos de incubação a 65°C contendo o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ como sonda luminescente.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Caracterização do Complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺

As propriedades espectroscópicas do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ já foram estudadas anteriormente pelo Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LaFIB).^{81,82} Desse modo, a caracterização pelas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Absorção Eletrônica na região do UV-Visível e Luminescência foram realizadas com o objetivo de constatar a obtenção e pureza do complexo sintetizado.

4.1.1 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H

A Figura 4.1 apresenta os espectros de RMN de ¹H dos ligantes livres e do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ obtidos em DMSO-*d*₆. Para o ligante livre 1,10-fenantrolina os sinais dos prótons aparecem na região de 7,78 a 9,10 ppm, enquanto para a 3,4-diaminopiridina estão na região de 4,47 a 7,63 ppm, esses dados estão em conformidade com a literatura.^{81,82} Pode-se observar no espectro do complexo que os sinais dos prótons referentes a 1,10-fenantrolina e 3,4-diaminopiridina aparecem deslocados, quando comparados com os sinais dos ligantes livres, confirmando a formação do complexo proposto. Além disso, a ausência de sinais referentes aos ligantes livres no espectro do complexo indica a ausência de impurezas no composto. Na Tabela 4.1 estão atribuídos todos os sinais de próton e a multiplicidade para o complexo sintetizado.

TABELA 4.1- Dados de deslocamento químico (ppm), multiplicidade e sinais de prótons para o espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do complexo *cis*-[Ru(phen) $_2$ (3,4-Apy) $_2$] $^{2+}$ em DMSO- d_6 .

H	$\delta\text{H}(\text{ppm}); \text{mult. (J em Hz); H}$
d,d'	4,68; s; 4
c,c'	5,88; s; 4
b,b'	6,25; d (6,2); 2
a,a'	7,31; d (6,2); 2
e,e'	7,48; s; 2
7,7'	7,58; m; 2
8,8'	7,97; dd (5,3/ 1,2); 2
5,5'	8,20; d (8,8); 2
2,2'	8,27; m; 2
4,4'	8,31; d (8,8); 2
6,6'	8,48; dd (8,2/1,2); 2
3,3'	8,85; dd (8,2/1,2); 2
1,1'	9,45; dd (5,3/1,2); 2

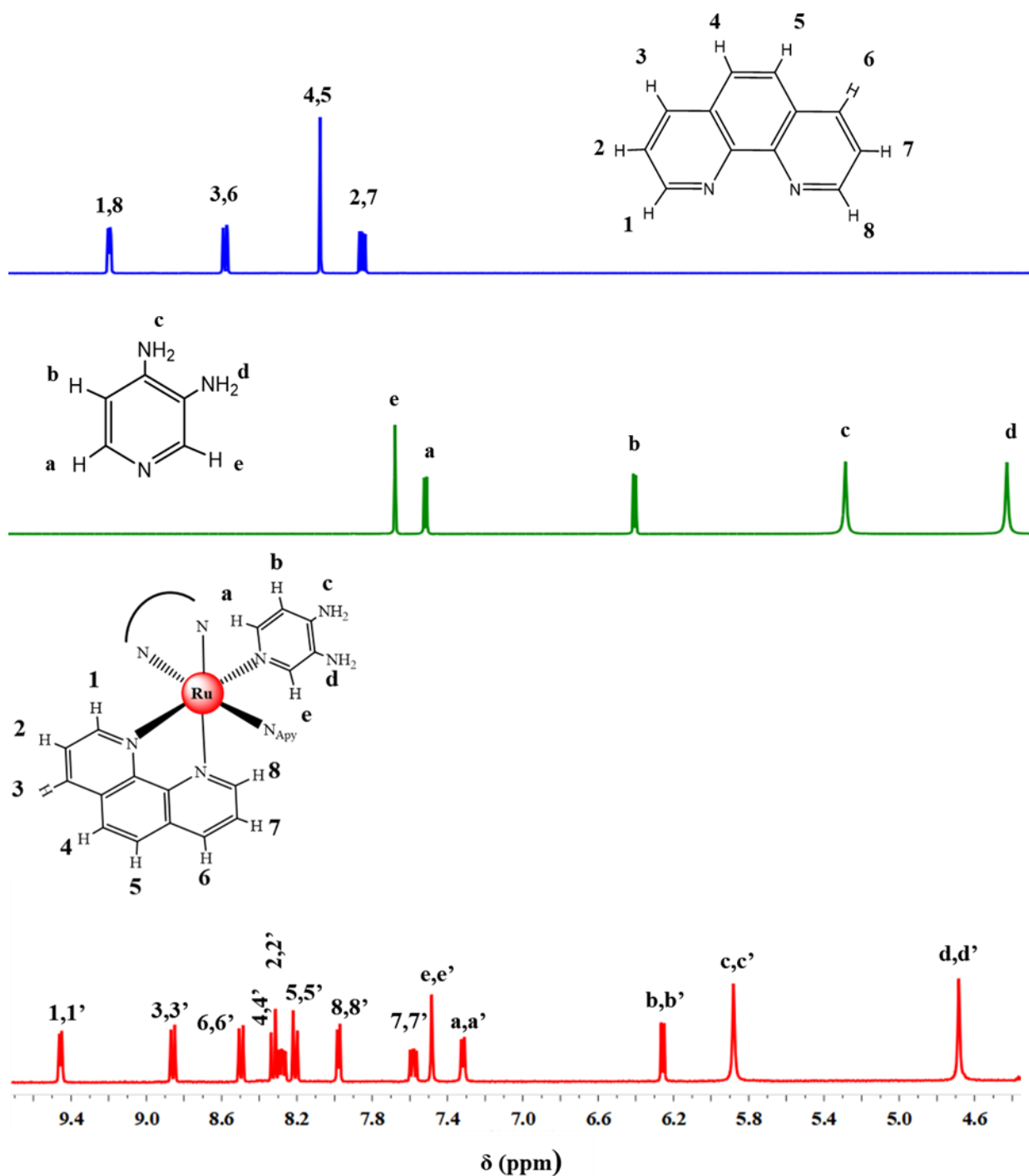


FIGURA 4.1 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) da 1,10 -fenantrolina (azul), 3,4 - diaminopiridina (verde) e do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ obtidos em $\text{DMSO-}d_6$.

4.1.2 - Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-vis

A técnica de espectroscopia de absorção foi utilizada para caracterização do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺. A Figura 4.2 mostra o espectro de absorção eletrônico para o complexo em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) na região do UV-vis. O complexo apresenta uma banda intensa na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$, $\epsilon = 70\,200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) típica das transições de transferência de carga de ligantes aromáticos insaturados (ILCT, phen, $\pi \rightarrow$ phen, π^*) e uma banda de absorção larga que compreende a região do visível ($\lambda_{\text{máx}} = 480 \text{ nm}$, $\epsilon = 9\,650 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) atribuída as transições de transferência de carga do metal para ligante (MLCT, Ru, $d\pi \rightarrow$ phen, π^*).^{92, 93}

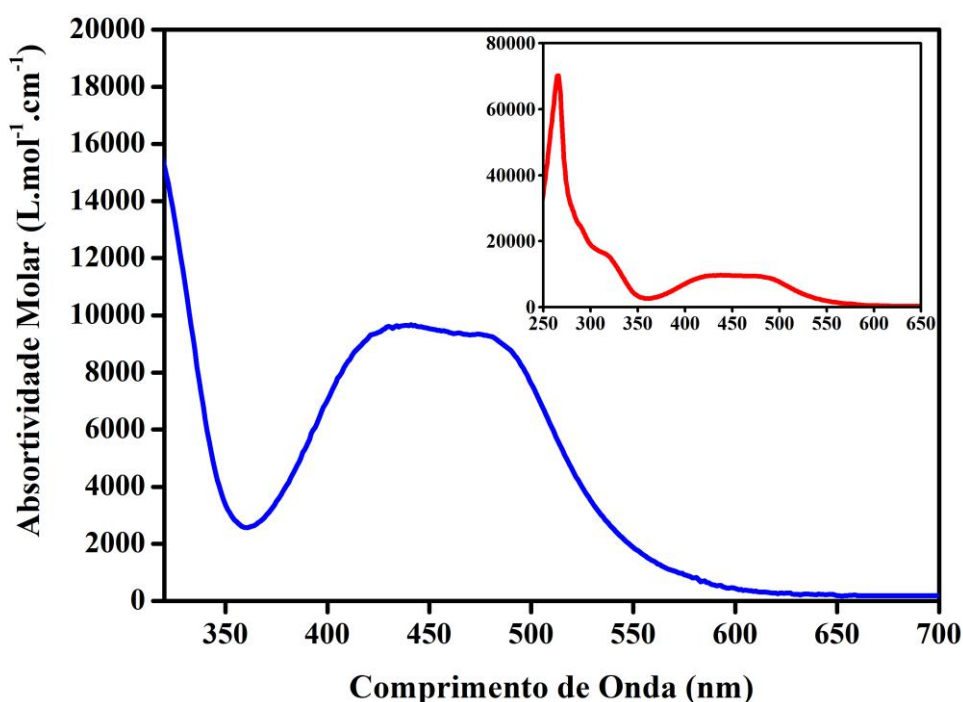


FIGURA 4.2 - Espectro de absorção eletrônico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM).

Os ligantes 1,10-fenantrolina por terem natureza σ doadora se coordenam ao centro metálico através dos pares de elétrons não ligantes do nitrogênio. A presença do anel aromático confere a este ligante característica π receptora, o que permite que o metal transfira densidade eletrônica dos orbitais $Ru, d\pi \rightarrow phen, \pi^*$, fazendo com que o metal e o ligante aromático estejam envolvidos em um processo de retrodoação que fortalece a ligação.

O mesmo comportamento é esperado para a interação entre o centro metálico de Ru(II) e o ligante 3,4-diaminopiridina. A diferença está na capacidade π receptora e efeito quelato da 1,10-fenantrolina. O maior caráter π -receptor da 1,10-fenantrolina, ocorre devido a maior insaturação quando comparado aos grupos aminos da 3,4-Apy, isso confere maior interação sigma, diminuindo o caráter π do anel aromático da 3,4-Apy, resultando em uma maior interação por retrodoação da 1,10-fenantrolina com o metal Ru(II). Isto pode ser observado, por exemplo, no espectro de absorção eletrônica e nas propriedades luminescentes do complexo, descritas abaixo, que ocorrem na região do visível devido à forte interação Ru(II)-(phen).

4.1.3 - Espectroscopia de Luminescência e Tempo de Vida de Emissão

Os espectros de luminescência do complexo foram obtidos em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) na região de 500 a 850 nm. A Figura 4.3 exhibe o espectro de emissão do complexo caracterizado por uma banda de emissão larga com comprimento de onda máximo em 655 nm. Após a absorção de um fóton, um elétron do orbital $d\pi$ do centro metálico Ru(II) é promovido para o orbital π^* localizado no ligante 1,10-fenantrolina. Em razão do grande acoplamento spin-orbita favorecido pelo Ru(II), ocorre o decaimento via cruzamento intersistemas do estado excitado singlete

(1 *MLCT) para o estado excitado tripleto (3 *MLCT). O decaimento do estado excitado 3 *MLCT para estado fundamental ocorre através de processos radiativos (emissão de luz) e processos não radiativos, via transferência de energia por calor (colisões moleculares). Assim, a emissão do complexo é resultante do decaimento radiativo (fosforescência) do estado 3 *MLCT para o estado fundamental. A Figura 4.4 ilustra o processo de absorção e decaimentos dos estados excitados para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺.

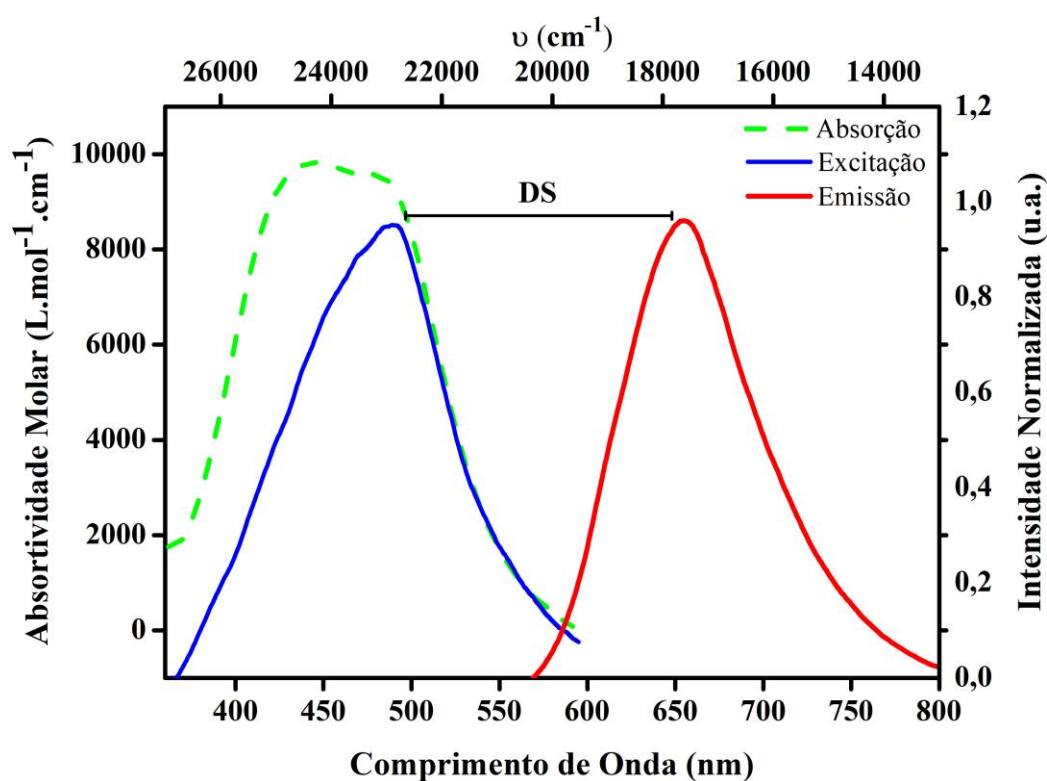


FIGURA 4.3 - Espectros eletrônicos de: excitação (azul), absorção (verde), e emissão (vermelho, $\lambda_{exc} = 480$ nm) do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ em solução tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) na concentração de 10 μ M.

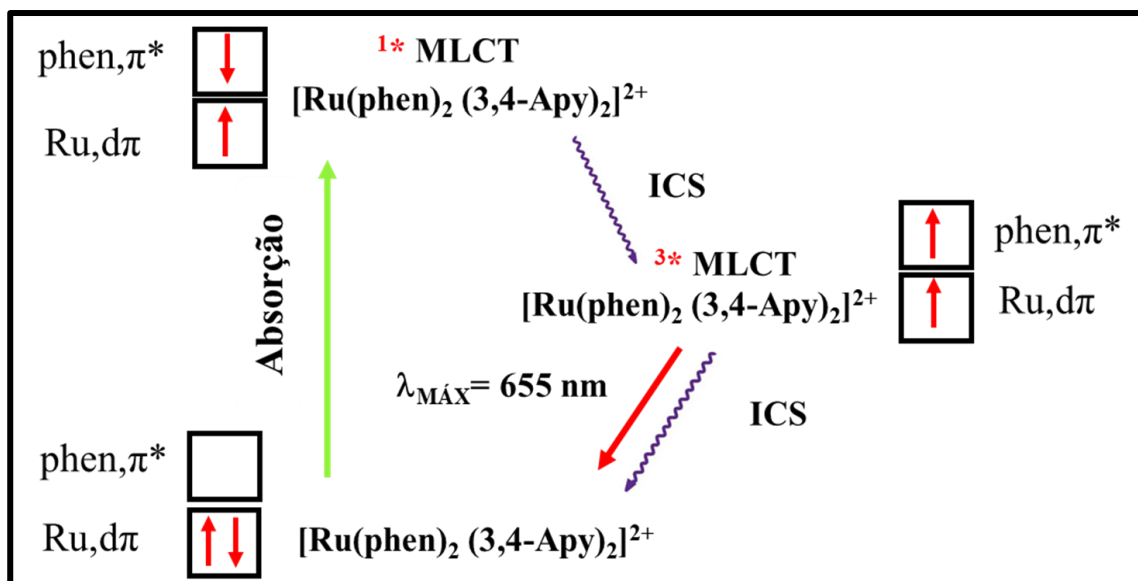


FIGURA 4.4 - Ilustração do processo de absorção e decaimentos dos estados excitados para o complexo cis -[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺.

Para avaliar a presença de outros processos competitivos, o complexo foi excitado em diferentes comprimentos de onda ($\lambda_{exc} = 400 - 480$ nm). Conforme demonstra a Figura 4.5, o espectro de emissão é independente do comprimento de onda de excitação, porém em maiores comprimentos de onda de excitação observa-se o aumento na intensidade de emissão, confirmando que a emissão ocorre do estado excitado de menor energia com maior probabilidade absorção.

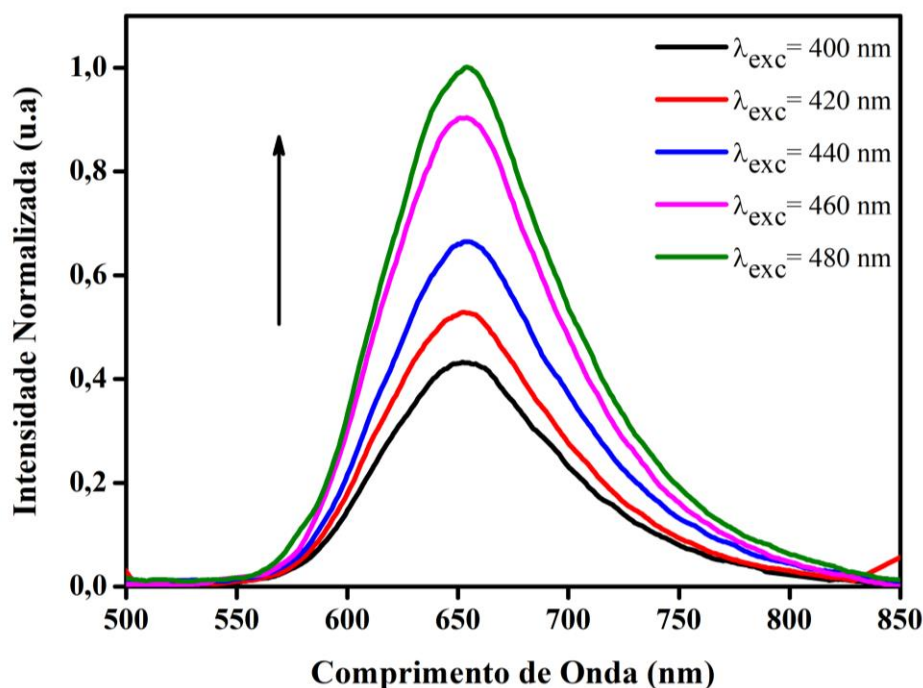


FIGURA 4.5 - Espectros de luminescência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM) em diferentes λ_{exc} (400-480 nm).

O tempo de vida da emissão (τ_{em}) representa uma característica importante para as moléculas luminescentes e é definido como o tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental.^{94,95} As medidas de tempo de vida de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ foram realizadas em tampão fosfato aerado (pH = 7; 33 mM). A partir do ajuste biexponencial foram obtidos dois tempos de vida de emissão, um de caráter predominante longo de 60, 88 ns e um curto de 0,594 ns, Tabela 4.2. O τ_{em} mais longo é característico da emissão proveniente do excitado ³*MLCT, tendo em vista que para o elétron retornar ao estado fundamental é necessário a inversão do spin, sendo necessário τ_{em} mais longo. Esses dados são consistentes com processos de emissão de luz por fosforescência.

Algumas das características importantes para que uma molécula possa atuar como marcador luminescente no meio biológico são a solubilidade em solução aquosa, estabilidade e as propriedades fotofísicas. O complexo é solúvel em meio fisiológico (pH = 7; tampão fosfato), mantendo suas propriedades espectroscópicas e estabilidade no escuro. Como apresentado anteriormente, o complexo apresenta grande deslocamento de Stokes e tempo vida de emissão longo quando comparados a cromóforos orgânicos, como a ThT.^{96,97} Além disso, absorve luz na região do visível e emite luz com comprimento máximo em 655 nm, não existindo sobreposição com a janela de absorção da maioria das biomoléculas, Figura 4.6. Essas propriedades espectroscópicas indicam o potencial deste complexo para aplicação como sonda luminescente no meio biológico.

TABELA 4.2 - Tempos de vida de emissão do complexo *cis*- [Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM).

Solvente	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
Tampão fosfato	60,88 (97,20%)	0,594 (2,80%)	1,034

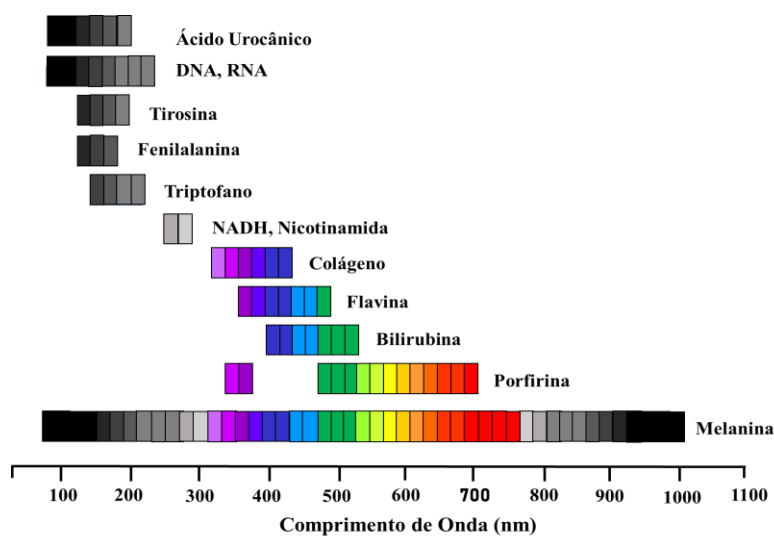


FIGURA 4.6 - Janela de absorção das biomoléculas.

4.2 - Estudo de Concentração do Complexo

A determinação do limite de concentração é um dos parâmetros importantes para que um composto possa ser aplicado em estudos envolvendo emissão, tendo em vista que isso evita processos de autosupressão. Para determinar a faixa de concentração adequada do complexo para os ensaios de luminescência foram obtidos espectros de emissão em diferentes concentrações (0-100 μM) em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM), Figura 4.7 (A). Este estudo é importante para minimizar efeitos de supressão de emissão do complexo por reabsorção da luz e/ou supressão por decaimento não radiativo (colisões moleculares).

A Figura 4.7 (B) exibe gráfico de intensidade de emissão a 655 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) em função da concentração de complexo. Observa-se que acima de 70 μM a emissão do complexo aproxima-se da saturação, devido a perda da emissão por colisão molecular. Desse modo, para minimizar os efeitos de supressão de emissão pela concentração do complexo todos os estudos de luminescência com o complexo foram realizados com concentrações abaixo de 70 μM .

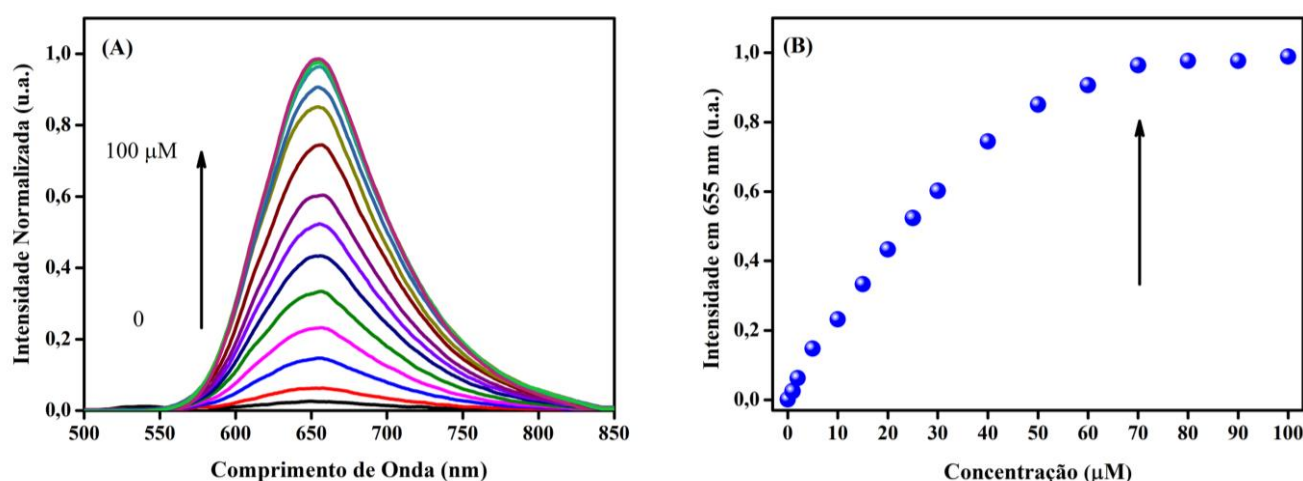


FIGURA 4.7 - (A) Espectros de emissão do complexo em diferentes concentrações (0 - 100 μM) em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM). (B) Gráfico da intensidade de emissão em 655 nm do complexo versus a concentração.

4.3 - Insulina Bovina

4.3.1 - Propriedades Espectroscópicas

Algumas proteínas são caracterizadas pela presença de uma banda de absorção eletrônica na região de 240 a 300 nm. Essa propriedade é resultante da presença dos resíduos de aminoácidos aromáticos, triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) na estrutura da proteína.⁹⁸ Entre esses resíduos de aminoácidos, a Phe ($195 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) apresenta menor valor de absorvidade molar quando comparado com os resíduos de Trp ($5\,579 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) e Tyr ($1\,405 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).^{99, 100}

Diante disso, o espectro de uma proteína entre 240 e 300 nm é atribuído as contribuições dos resíduos Trp e Tyr.¹⁰¹ Para esse trabalho foi utilizado a insulina bovina como proteína amiloide, tendo em vista que a insulina bovina difere da humana apenas em três resíduos de aminoácidos (8A, 10A e 30A), exercendo função semelhante a insulina humana em relação ao controle glicêmico.²⁵ No sentido de caracterizar as propriedades espectroscópicas da insulina bovina foram obtidos os espectros eletrônico de absorção e emissão em tampão fosfato (pH = 7,0; 33 mM), Figura 4.8.

Devido à ausência de resíduos de Trp na estrutura da insulina bovina, o espectro de absorção é resultante dos quatro resíduos de Tyr, isso é confirmado observando a semelhança entre o espectro de absorção da insulina com o espectro da tirosina (FIGURA 4.8). Após a excitação por um fóton, a insulina bovina apresenta uma fluorescência intrínseca caracterizada por uma banda de emissão com comprimento de onda máximo em 305 nm.

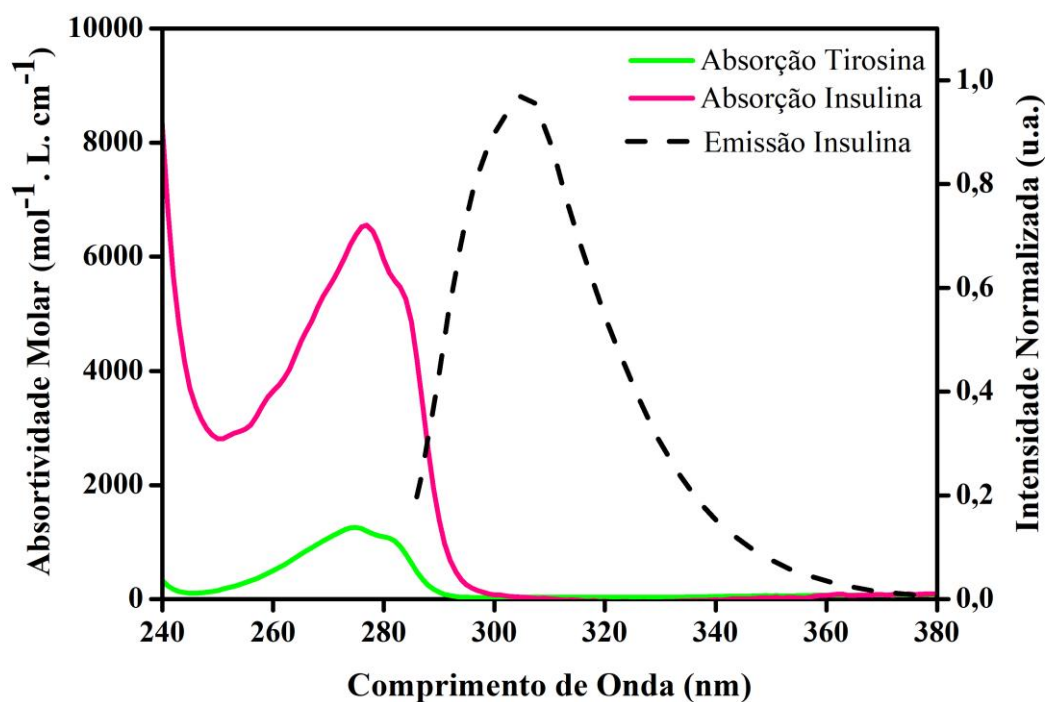


FIGURA 4.8 - Espectros eletrônicos de: absorção UV-vis da tirosina (verde), absorção UV-vis da insulina bovina (rosa) e emissão da insulina (preto, $\lambda_{exc} = 276$ nm) em tampão fosfato (pH = 7; 33 mM).

4.3.2 - Cinética de Agregação

A espectroscopia de fluorescência intrínseca de resíduos aromáticos permite obter informações sobre o mecanismo de agregação de proteínas, tendo em vista que esse processo resulta na supressão da emissão.^{102,103} Com base nessa informação, o ensaio de fluorescência com a insulina bovina foi realizado com o propósito de monitorar a cinética de agregação através da mudança na intensidade de emissão durante o período de incubação. A Figura 4.9 (A) mostra a diminuição da intensidade de emissão à medida que aumenta o tempo de incubação.

Observa-se na Figura 4.9 (B), a curva sigmoide obtida a partir do máximo de emissão da proteína em 305 nm em função do tempo de

incubação. Através da análise dessa curva é possível verificar três fases distintas. A primeira fase compreende o período de 0 a 60 minutos de incubação é caracterizada por uma pequena diminuição da intensidade de emissão, essa supressão deve estar relacionada com o início da modificação da proteína nativa necessária para a formação das fibrilas amiloides. No período de 60 a 120 minutos ocorre uma rápida supressão da emissão, atingindo a fase de equilíbrio após 120 minutos, essa última fase é caracterizada por uma maior concentração de fibras amiloides. Os dados obtidos são consistentes com a mudança na estrutura nativa associado com formação de espécies amiloides e correspondem com ensaios semelhantes da literatura.^{101, 104}

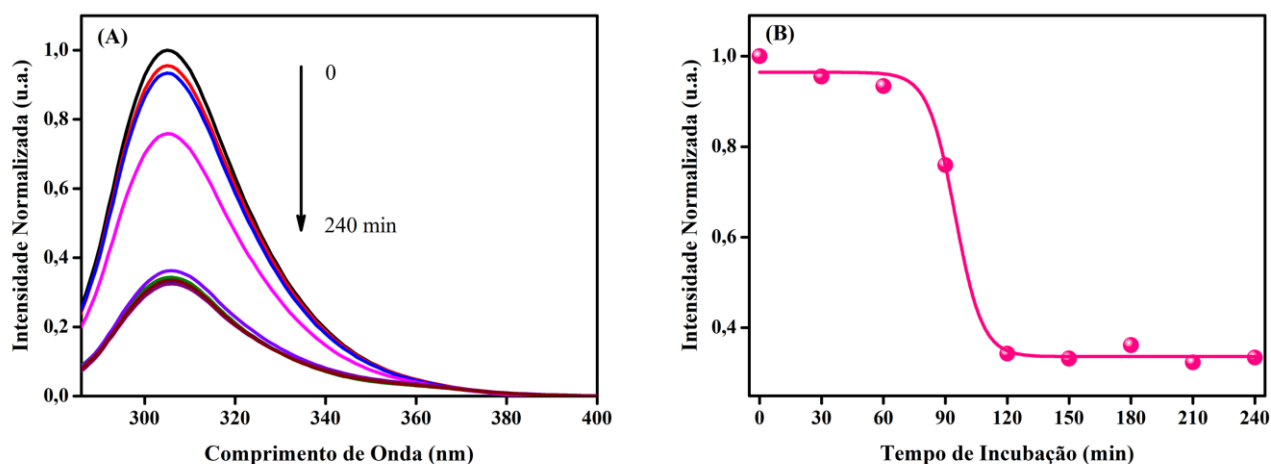


FIGURA 4.9 - (A) Espectros de emissão da insulina ($10 \mu\text{M}$) em tampão fosfato ($\text{pH} = 7$; 33 mM) em diferentes tempos de incubação. (B) Gráfico da intensidade de emissão em 305 nm da insulina contra o tempo de incubação.

4.4 - Ensaios de Detecção de Agregados Amiloides

4.4.1 - Ensaio de Fluorescência com tioflavina T (ThT)

Os ensaios de detecção de estruturas em folha β característica de espécies tipo amiloide são determinantes para compreender o mecanismo de agregação.¹⁰⁵ Para monitorar a formação de espécies amiloides de insulina bovina foi realizado o ensaio de emissão com o corante fluorescente tioflavina T (ThT), considerado um padrão para a identificação *in vitro* de fibrilas amiloides. Este corante que não é luminescente em solução aquosa ou na presença de proteínas nativas, apresenta emissão fluorescente intensa em 482 nm na presença de agregados amiloides quando excitado em 440 nm, essa aumento na intensidade de emissão deve-se a especificidade de ligação com as espécies amiloides^{73, 106}

A Figura 4.10 (A) mostra o aumento na intensidade de fluorescência da ThT em função do tempo de incubação da insulina bovina quando submetida as condições de agregação. A partir desse ensaio foi obtido o gráfico de intensidade de fluorescência versus tempo de incubação da insulina caracterizado por uma curva sigmoide, representado na Figura 4.10 (B).

A curva sigmoide obtida é consistente com a cinética de agregação de proteínas amiloides.¹⁰⁷ No estágio inicial de agregação (0 a 60 minutos) conhecido como fase de nucleação, a ThT apresenta baixa intensidade de emissão devido a rotação da ligação C-C entre os anéis benzotiazol e anilina em solução. Essa rotação permite que ocorra perda de energia através de processos não radiativos.¹⁰⁶ Após 60 minutos ocorre um rápido aumento na intensidade de emissão do composto, essa fase é denominada como alongamento e ocorre pelo impedimento rotacional quando a ThT se liga as espécies amiloidogênicas. A última fase de 120 a

240 minutos é caracterizada pelo equilíbrio, quando a maioria da insulina nativa é convertida em fibrilas maduras.

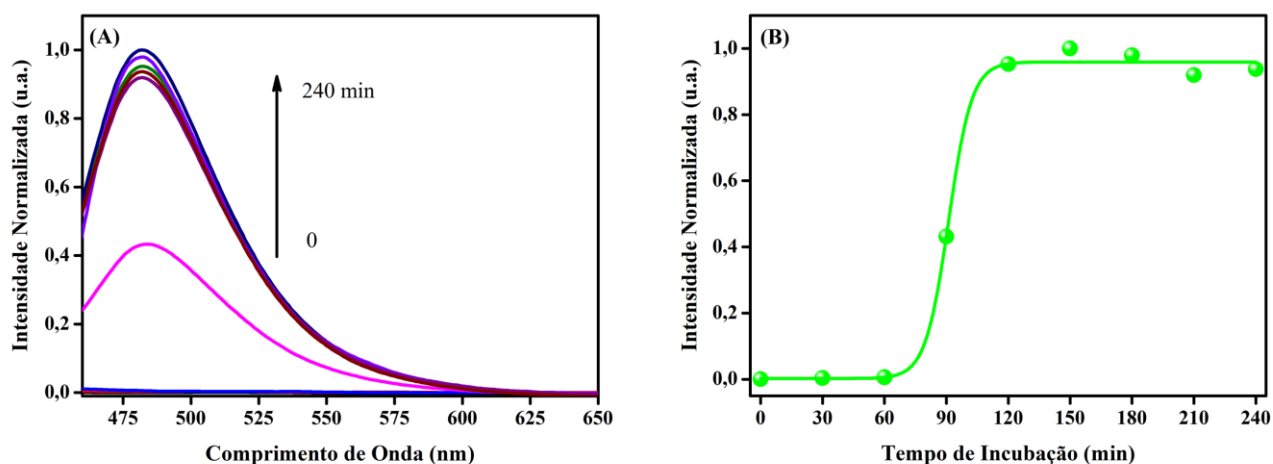


FIGURA 4.10 - (A) Espectros de emissão da ThT ($10 \mu\text{M}$) em diferentes tempos de incubação da insulina bovina ($10 \mu\text{M}$). (B) Gráfico de intensidade de emissão da ThT em 482 nm ($\lambda_{\text{exc}}=440 \text{ nm}$) contra o tempo de incubação da insulina bovina.

4.4.2 - Dicroísmo Circular (DC)

O Dicroísmo Circular (DC) é uma técnica espectroscópica que permite avaliar a modificação na estrutura secundária de proteínas através da mudança dos espectros de DC.¹⁰⁸ No sentido de confirmar a modificação da estrutura secundária da insulina bovina de α -hélice para folha β foram obtidos espectros de DC durante o estágio inicial (0 minutos) e final de agregação (180 minutos).

Observa-se na Figura 4.11, que durante o início da agregação, o espectro da insulina bovina é caracterizado pela presença de dois mínimos negativos em 222 nm e 208 nm , consistente com a presença de uma conformação α -hélice característica da estrutura nativa da proteína. Diferentemente, o espectro obtido após 180 minutos de incubação sob as

condições de agregação é definido pela presença de um mínimo negativo em 218 nm indicativo de estruturas ricas de folha β associada a formação de fibrila amiloide.^{109,110} Estes dados confirmam que a insulina sofre modificação na estrutura secundária de α -hélice para folha β sob as condições de agregação utilizadas nesse trabalho.

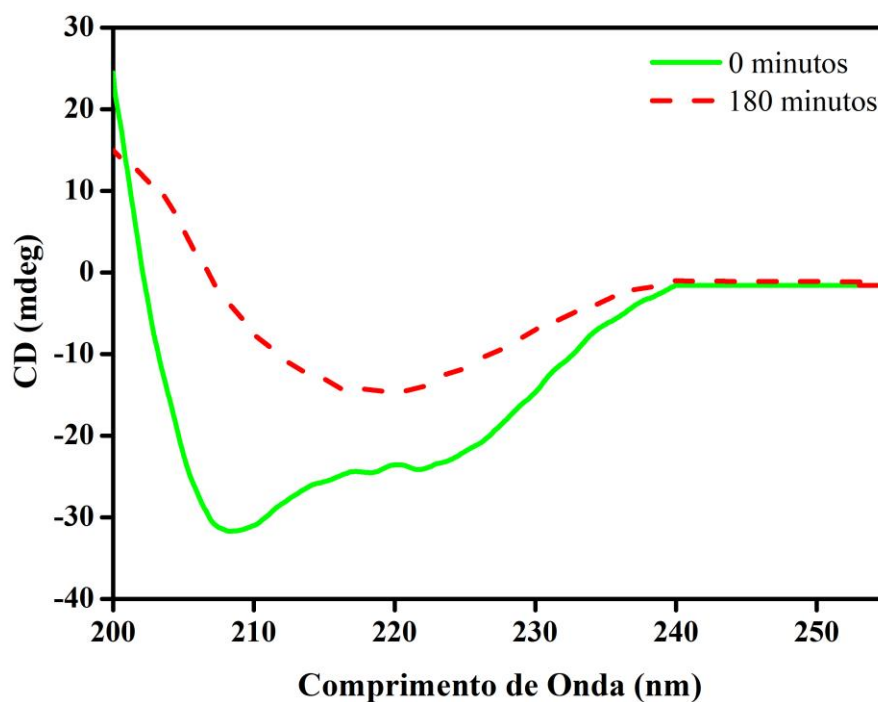


FIGURA 4.11 - Espectros de dicroísmo circular da insulina bovina em 0 minutos (verde) e com 180 minutos em 65° C (vermelho).

4.5 - Interação do Complexo com a Insulina Bovina

4.5.1 - Monitorando a Formação de Agregados Amiloides com o Complexo *cis* – $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$

Para investigar o efeito da insulina nativa e na forma de agregados sobre a resposta luminescente do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ foram obtidos os espectros de emissão do complexo sozinho e do complexo após adição da proteína nativa e fibrilas de insulina. Como mostrado na Figura 4.12, a presença da insulina nativa resulta em um pequeno aumento na intensidade de luminescência e maior aumento na presença de agregados amiloides. Esse resultado confirma que o complexo não apenas interage com a forma amiloide da insulina, mas também com a proteína nativa, embora a mudança na resposta do complexo seja menos significativa.

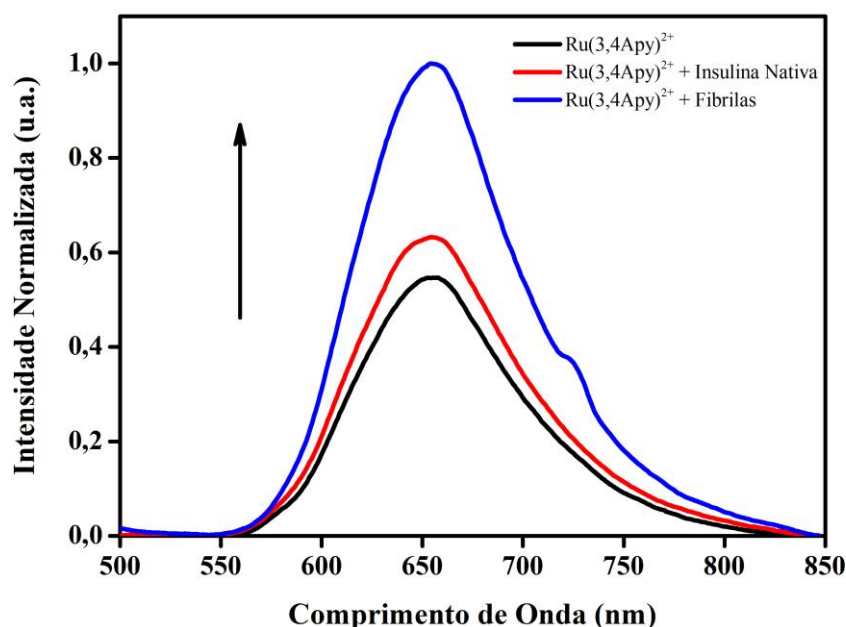


FIGURA 4.12 - Espectros de emissão do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ sozinho (10 μM) e na presença de insulina nativa e fibras de insulina (10 μM).

Diante desses resultados, foi avaliado a capacidade do complexo em monitorar a cinética de fibrilação da insulina. Para isso, foram obtidos espectros de emissão do complexo após a adição de uma alíquota definida de insulina em intervalos de 30 minutos de incubação sob as condições de agregação.

Conforme exibe a Figura 4.13 (A), durante os estágios iniciais de 0 a 60 minutos de agregação o complexo não apresentou um aumento significativo na intensidade de emissão. No segundo estágio entre 90 a 120 minutos observou-se um aumento rápido na intensidade de emissão, indicando a formação de espécies amiloidogênicas. A última fase de 120 a 240 minutos foi caracterizada por uma variação pequena na intensidade de emissão atingindo a fase de equilíbrio, indicando que a maioria da insulina nativa foi convertida em fibrilas maduras. Esses resultados tornam-se mais aparentes a partir da análise da curva sigmoide obtida pelo variação da intensidade de emissão do complexo (655 nm) em função do tempo de incubação, Figura 4.13 (B).

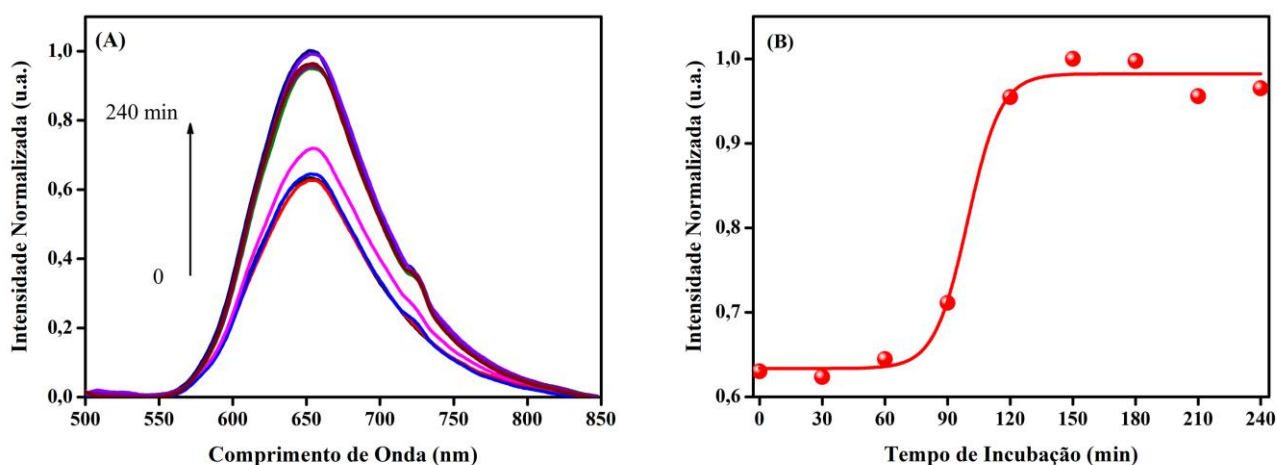


FIGURA 4.13 - (A) Espectros de emissão do complexo (10 μ M) na presença de diferentes tempos de incubação da insulina bovina (10 μ M). (B) Gráfico da intensidade de emissão do complexo (655 nm) contra o tempo de incubação da insulina bovina.

A curva de agregação sigmoide do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ seguiu o mesmo padrão visto para ThT, Figura 4.14 (A), indicando que complexo não interfere na agregação de insulina após a interação. A diminuição na luminescência intrínseca da proteína, que indica agregação, corresponde ao aumento na luminescência do complexo, confirmando ainda que a presença do complexo não interfere com os agregados formados e é, portanto, uma sonda eficaz para monitorar a cinética de fibrilação da insulina, Figura 4.14 (B).

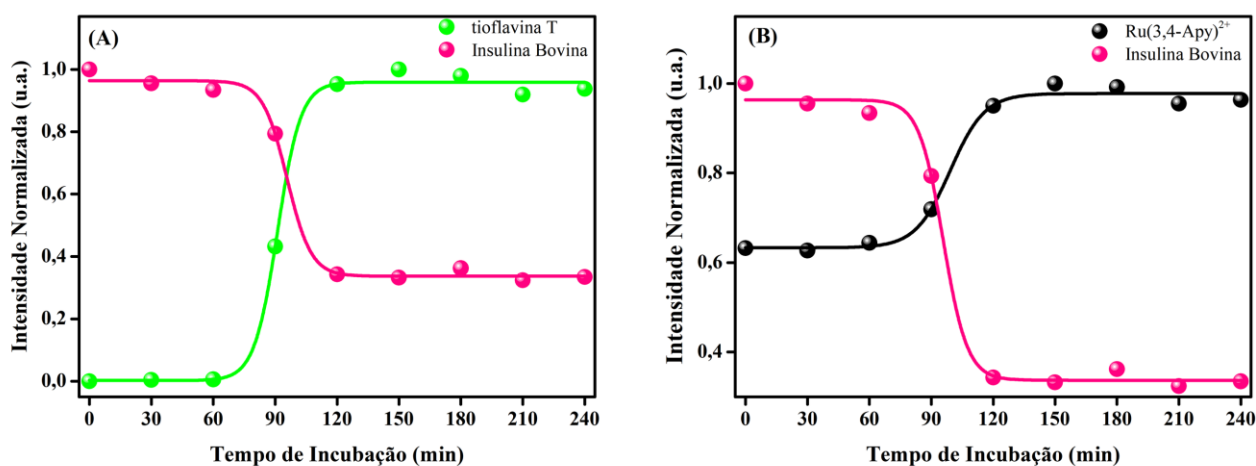


FIGURA 4.14 - (A) Curvas sigmóides da insulina bovina (10 μM) e da Tioflavina T (10 μM). (B) Curvas sigmóides da insulina bovina (10 μM) e do complexo *cis*- [Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ (10 μM).

4.5.2 - Limite de Detecção (DL)

O limite de detecção compreende um parâmetro importante para avaliar o desempenho de uma sonda luminescente, já que esse método é capaz de determinar a quantidade mínima de analito que pode ser identificada por um determinado composto.^{111,112}

Para avaliar a quantidade mínima de fibrilas amiloides de insulina que o complexo consegue detectar foram realizados ensaios de titulação de luminescência com complexo em diferentes concentrações de fibras de insulina (0-30 μM), Figura 4.15 (A). Conforme demonstrado na Figura 4.15 (B), o aumento da concentração de fibras de insulina proporcionou aumento linear da intensidade de emissão do complexo, a partir do valor da inclinação da reta o limite de detecção foi calculado como 0,85 μM , tendo um valor de desvio padrão do branco correspondente a $S=0,788$ e coeficiente de linearidade igual a $R^2=0,99688$.

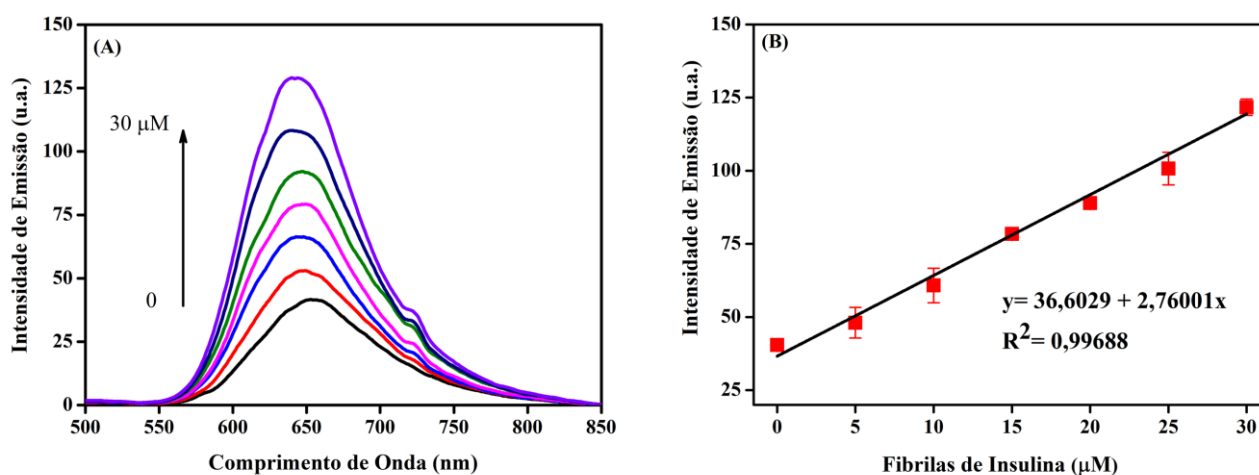


FIGURA 4.15 - (A) Espectros de emissão do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ com diferentes concentrações de fibrilas de insulina (0-30 μM). (B) Gráfico da intensidade de emissão do complexo em 655 nm em função da concentração de fibrilas de insulina (0-30 μM).

Quando comparado o valor do DL alcançado para o complexo de *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ na presença de fibrilas amiloides de insulina com outros sensores da literatura em ensaios semelhantes, incluindo o corante orgânico azul de bromofenol (DL= 0,12 μM) observa-se que o complexo apresenta um valor maior.¹¹³ Apesar disso, o valor do limite de detecção na ordem de micromolar ainda demonstra a eficiência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ na detecção de espécies amiloides de insulina.

4.5.3 - Ensaios de Ligação

4.5.3.1 - Constante de Dissociação (Kd)

Um das importantes propriedades para uma sonda biológica é apresentar alta afinidade de ligação com o alvo. Essa afinidade de ligação é geralmente expressa a partir dos valores da constante de dissociação (Kd), que representa um tipo constante de equilíbrio comumente utilizada para definir a interação entre duas espécies de modo que quanto menor o valor de Kd, maior a afinidade de ligação entre elas.¹¹⁴ Os valores de Kd podem ser calculados através de ensaios de titulações utilizando técnicas espectroscópicas, como absorção UV-vis e intensidade de luminescência.¹¹⁵

Nesse sentido, a quantificação da interação entre o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ e as fibrilas de insulina foi determinada a partir de medidas de luminescência. Para isso obtidos espectros de emissão do complexo em diferentes concentrações (0-70 μM) na presença de uma concentração de 10 μM de fibrilas de insulina, Figura 4.16 (A). A partir desse ensaio foi possível obter a curva de saturação e o valor de Kd determinado como 13,50 ± 1.84 μM.

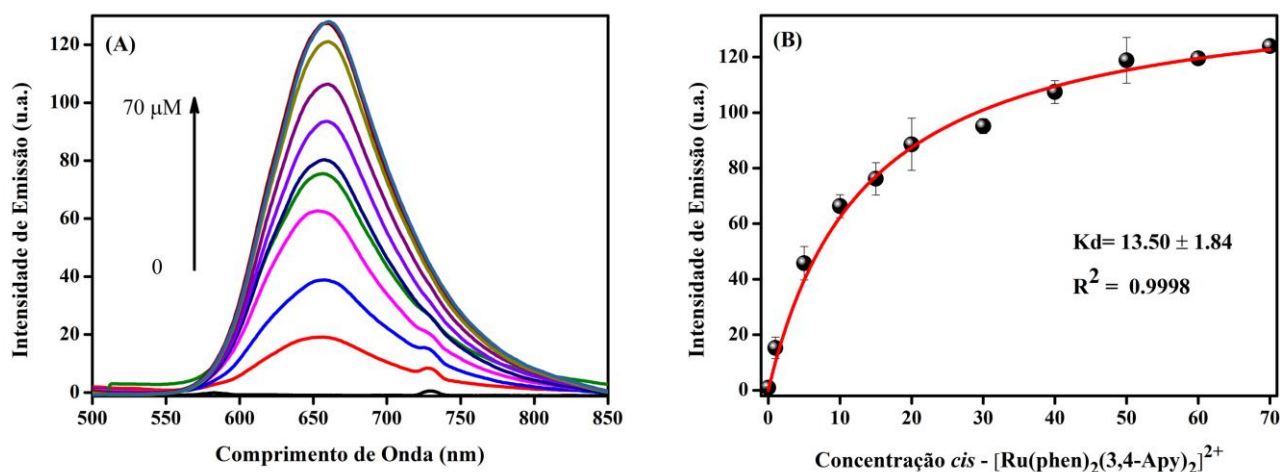


FIGURA 4.16 - (A) Espectros de emissão do complexo em diferentes concentrações (0-70 μM) contendo uma concentração de 10 μM de fibrilas de insulina. (B) Gráfico do máximo de emissão do complexo em 655 nm contra a concentração (0-70 μM).

Quando o valor de K_d obtido para a interação entre o complexo e as fibrilas de insulina é comparado com outras sondas luminescentes para detecção de espécies amiloides de insulina, como o corante orgânico ThT ($K_d = 16 \mu\text{M}$)¹¹⁶ e o complexo de Pt(II) contendo ligantes do tipo aminopiridina ($K_d = 18, 31$)⁸⁷ observa-se que valor de K_d está próximo ao dessas sondas luminescentes em condições de ensaio semelhantes,^{72,82} demonstrando que complexo interage com as fibrilas de insulina e apresenta maior interação.

4.5.3.2 - Estequiometria de Ligação (Job's Plot)

A determinação da estequiometria de ligação é um parâmetro importante no estudo da interação de uma proteína com determinado ligante.

¹¹⁷ Para determinar a estequiometria de ligação entre o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ e as fibrilas de insulina foi utilizado o método de variações contínuas ou Job's Plot.

Para isso foram obtidos os espectros de emissão com diferentes razões molares de complexo e fibrilas sob uma concentração total fixa de 15 e 20 μM. A partir desses ensaios foram obtido um gráfico da fração molar em função do Δ de emissão, que representa a subtração da luminescência do *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ em tampão fosfato e luminescência *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ na presença das fibrilas de insulina, Figura 4.17 e Figura 4.18.

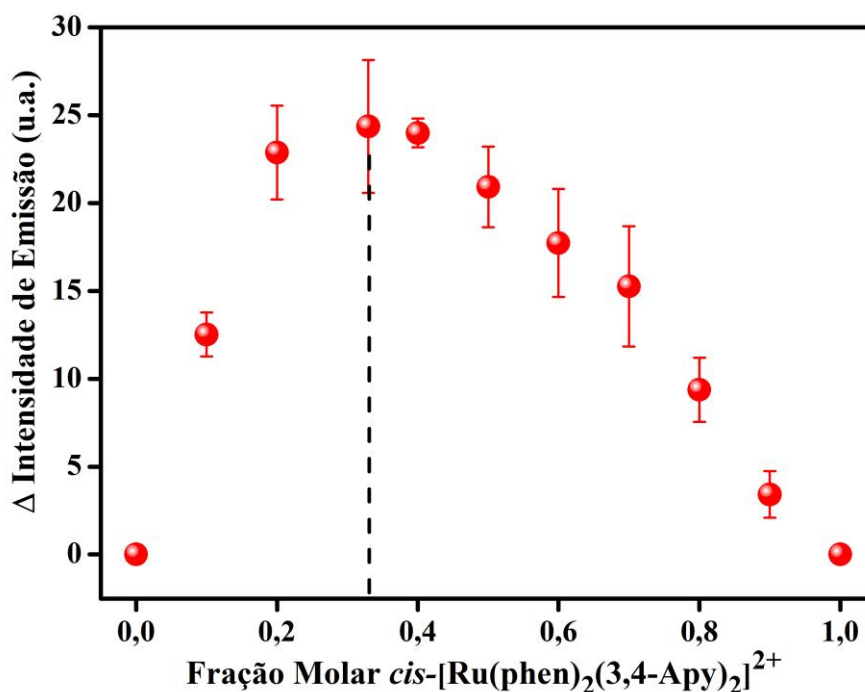


FIGURA 4.17 - Gráfico de Job's plot obtido com espectros de luminescência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ e fibrilas de insulina sob a concentração total de 15μM.

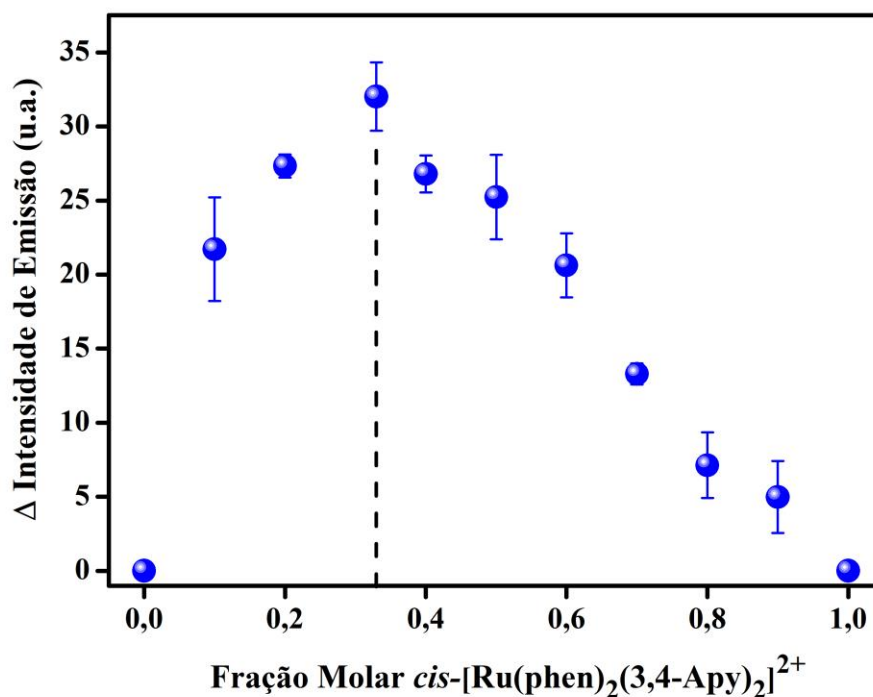


FIGURA 4.18 - Gráfico de Job's plot obtido com espectros de luminescência do complexo $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$ e fibrilas de insulina sob a concentração total de 20 μ M.

O número de fibrilas amiloides de insulina por complexo $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$ é obtido pela razão molar das fibrilas e a razão molar do complexo. O valor máximo no gráfico de Job's Plot foi obtido quando a fração molar foi igual a 0,33, observado na Figura 4.17 e Figura 4.18. Esse valor indica a estequiometria de ligação entre o complexo e as fibras de insulina, sugerindo uma razão de 1 complexo: 2 fibras de insulina.

4.6 - Imagens do Processo de Agregação da Insulina

A microscopia de fluorescência é um instrumento importante para obtenção de imagens em estudos biológicos. Essa técnica utiliza um feixe luminoso com filtros apropriados para excitar a amostra que contém uma molécula luminescente e assim obter as imagens.^{119, 120} A propriedade do complexo em emitir luz na região do infravermelho próximo (650 – 900 nm) apresenta vantagens para aplicação como sonda de imagem por luminescência, tendo em visto que minimiza os efeitos de autofluorescência das moléculas biológicas.

Com base nessas informações, imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas no sentido de avaliar a capacidade do complexo em atuar como marcador luminescente durante a formação das espécies amiloides de insulina bovina. Para isso as imagens de microscopia de fluorescência foram adquiridas em intervalos de 30 minutos de incubação da insulina. As imagens foram obtidas usando um filtro de emissão entre 575-640 nm, conseqüentemente fazendo uso da emissão MLCT do complexo e, portanto, reduzindo a interferência de fluorescência de outros substratos comumente encontrados em meios biológicos.

A Figura 4.19 exhibe as imagens de campo claro (*Brightfield*) e por luminescência adquiridas durante a fase inicial de agregação da insulina (0 a 60 minutos). Observa-se uma pequena luminescência do complexo durante esse estágio, isso pode estar associado com uma quantidade pequena de fibrilas. Este é um resultado importante, uma vez que o complexo não interage apenas com as fibrilas, como visto em os ensaios de luminescência, mas também podem detectar com eficiência agregados pré-amiloides menores por meio de imagens de microscopia.

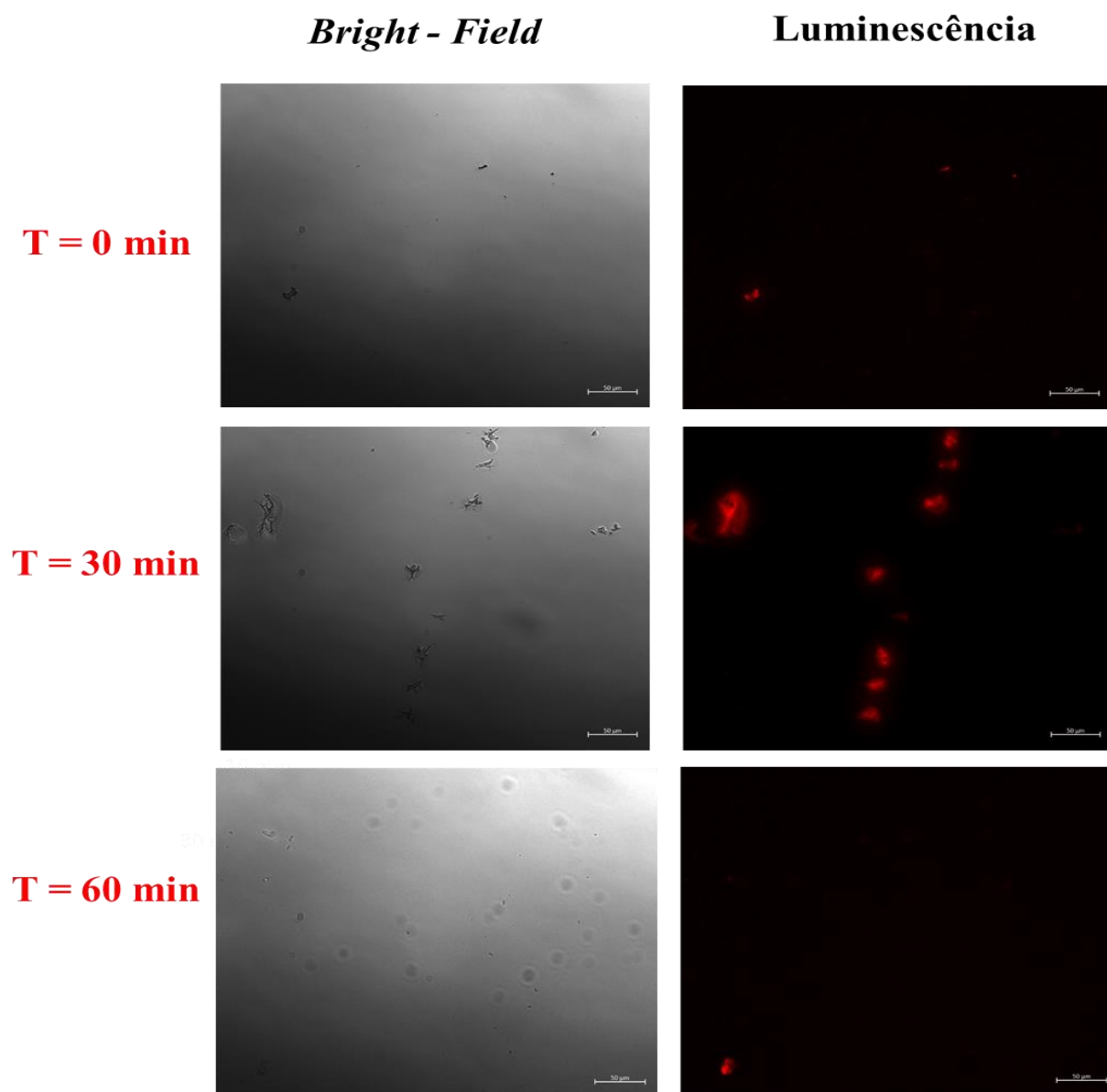


FIGURA 4.19 - Imagens de campo claro e luminescência dos estágios iniciais de agregação da insulina bovina com o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺.

As imagens obtidas durante a fase de alongamento (90 minutos de incubação) são apresentadas na Figura 4.20. Essa fase é caracterizada pela presença de estruturas maiores e aumento do conteúdo de espécies amiloides.

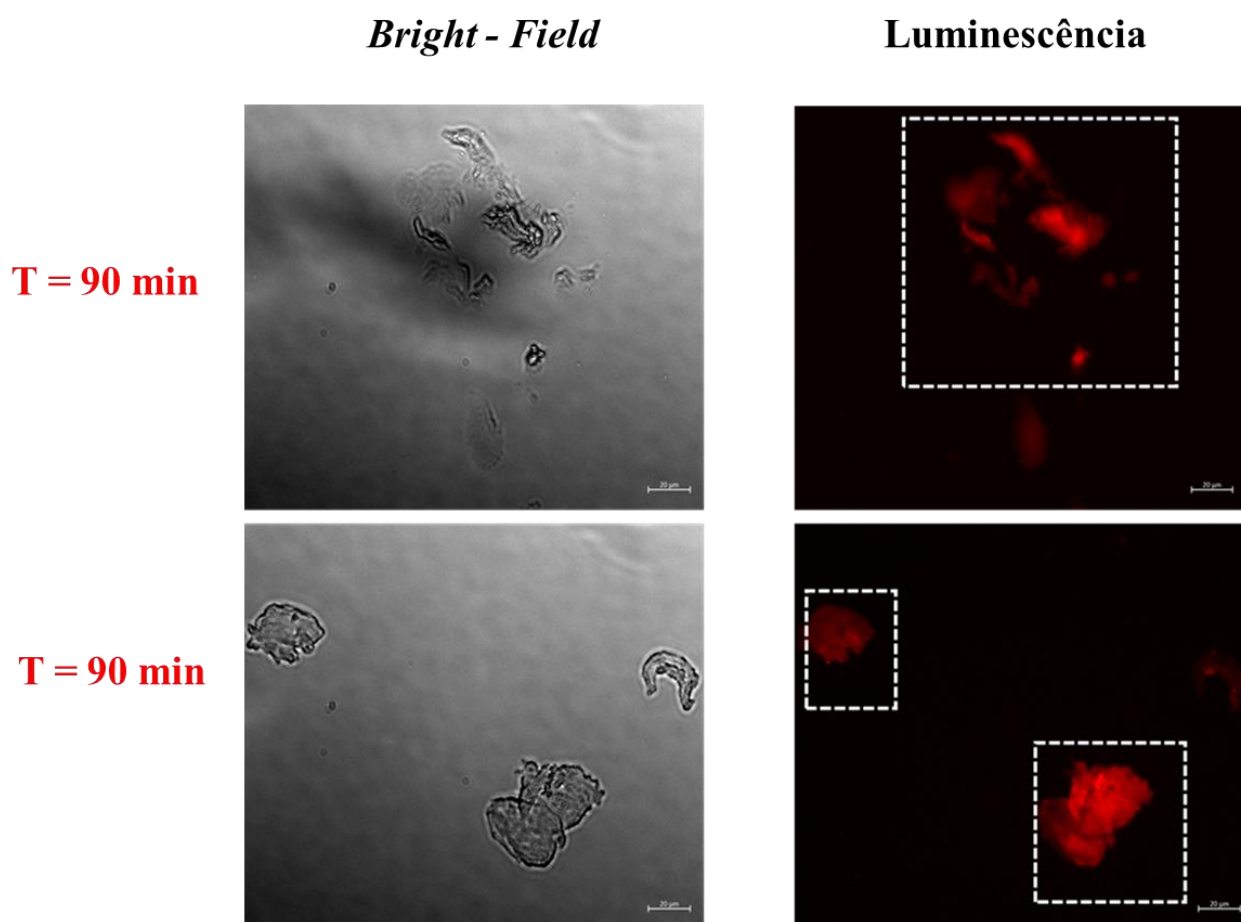


FIGURA 4.20 - Imagens de campo claro e de luminescência durante 90 minutos de agregação da insulina com o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$.

As Figuras 4.21 e 4.22 exibem as imagens da fase de equilíbrio (120 a 240 minutos). Nesse estágio existe uma quantidade significativa de estruturas de folhas β , em razão disso observa-se nessas imagens espécies maiores quando comparadas as imagens anteriores. O complexo foi capaz de mapear o processo de agregação da insulina por meio de imagens, de agregados pequenos a maiores, e tem se mostrado uma ferramenta promissora como sonda biológica para agregação de insulina, especialmente para fibrilação amiloide.

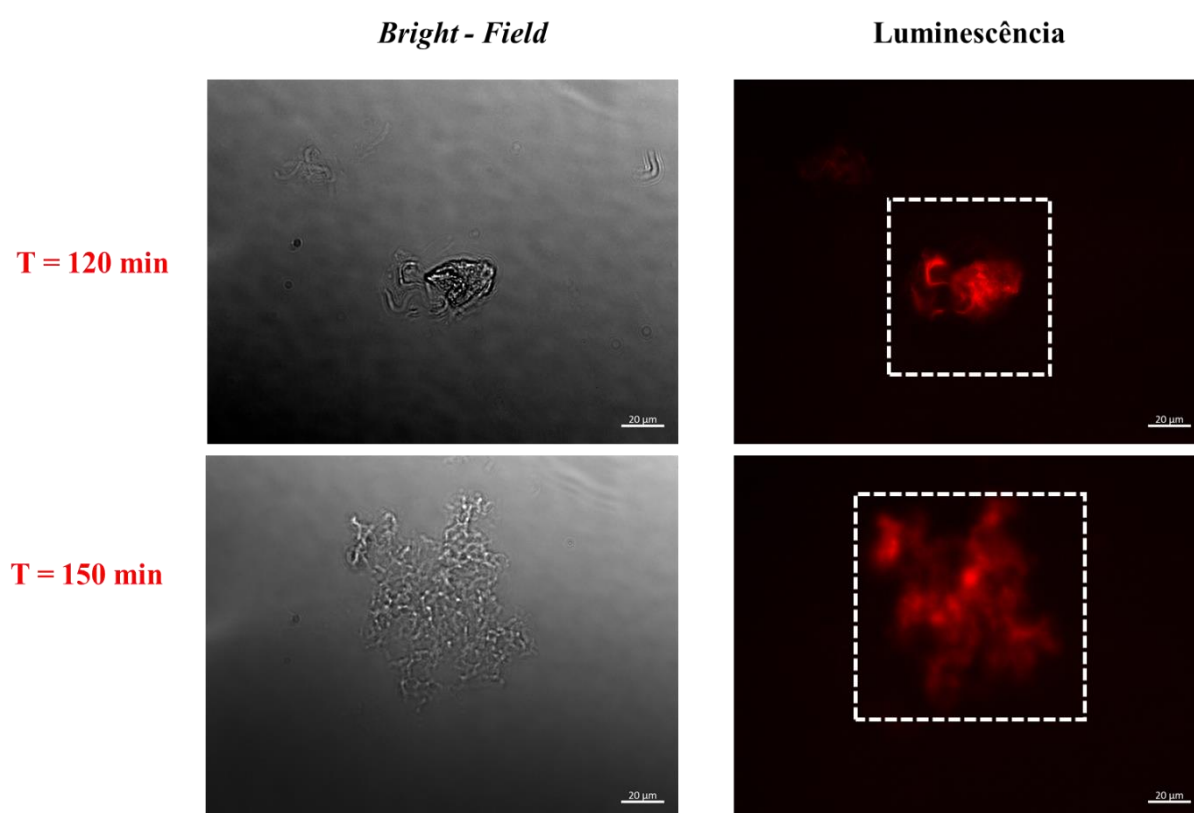


FIGURA 4.21 - Imagens de campo claro e luminescência durante 120 e 150 minutos de incubação da insulina bovina com o complexo cis - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$.

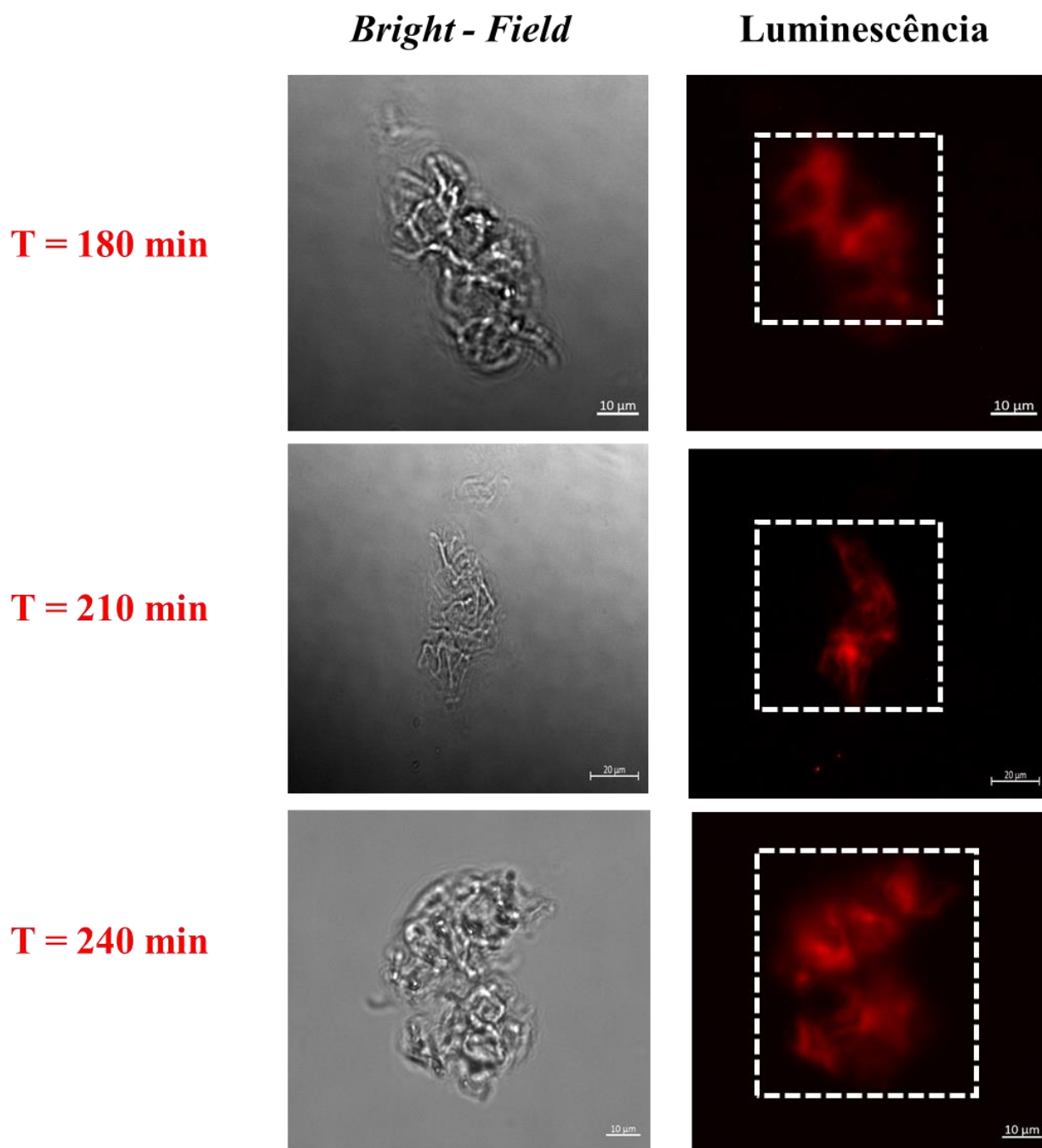


FIGURA 4.22 - Imagens de campo claro e luminescência durante 180 a 240 minutos de incubação da insulina bovina com o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$.

5 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ é facilmente sintetizado e exhibe propriedades interessantes para aplicação como sonda luminescente, incluindo solubilidade em meio fisiológico, mantendo suas propriedades espectroscópicas. O complexo absorve luz na região do visível e emite luz na região do infravermelho próximo, apresentando grande deslocamento de Stokes e tempo vida de emissão longo quando comparado com a tioflavina T. Essas propriedades fotofísicas são importantes porque minimizam tanto os processos de autofluorescência de biomoléculas, quanto efeitos de auto-absorção do complexo.

O aumento da intensidade de emissão na presença de espécies amiloides demonstram que o complexo consegue interagir com essas estruturas e produzir mudanças na intensidade de emissão. O valor do limite de detecção igual a 0,85 µM indica que o complexo é eficiente na detecção de espécies amiloides. A constante de dissociação foi determinada como 13,50 ± 1,84 µM, esse valor está próximo de outras sondas amiloides relatadas na literatura, demonstrando que complexo apresenta afinidade com as fibrilas amiloides.

Os gráficos de Job's Plot com valor de fração molar máximo em torno de 0,33 indica uma estequiometria de ligação que interage na proporção de 1 complexo: 2 fibrilas de insulina. Além disso, as imagens de microscopia de fluorescência do processo de agregação da insulina demonstram a capacidade do complexo em monitorar a formação de fibras amiloides na região do infravermelho próximo, facilitando a detecção dessas espécies sem a interferência de outras moléculas biológicas presentes no mesmo ambiente.

6 - REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. **Diabetes**. Disponível em: <<https://www.who.int/diabetes/en/03/2018>>. Acesso em: abr. 2019.
2. Sociedade Brasileira de Diabetes. O que é diabetes? Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/oque-e-diabetes>>. Acesso em: jun. 2020.
3. KAHN, S. E. “The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes”. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 3-19, 2003.
4. Ministério da Saúde. Diabetes: o que é, sintomas e tratamento. Disponível em: <<https://saude.gov.br/component/content/article/746-saude-de-a-a-z/44609-diabetes-tipos-causas-sintomas-tratamento-e-prevencao>>. Acesso em: jun. 2020.
5. SKYLER, J. S. “Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies”. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 17, p. 4113-4117, 2004.
6. ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. “Global and societal implications of the diabetes epidemic”. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001.
7. GUARIGUATA, L.; WHITING, D. R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J. E. “Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035”. **Diabetes research and clinical practice**, v. 103, n. 2, p.137-149, 2014.
8. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. 2. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes care**, v. 38, n. Supplement 1, p. S8-S16, 2015.
9. FEDERATION, I. D. IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2019. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, **Belgium: International Diabetes Federation**, 2019.
10. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Qual a situação da diabetes no Brasil? Disponível em: <<http://www.sbac.org.br/blog/2018/11/26/qual-a-situacao-da-diabetes-no-brasil/>> Acesso em: jun. 2020.

11. BEM ESTAR. **Gastos do Brasil com diabetes podem dobrar na próxima década, diz estudo britânico**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/bemestar/noticia/gastos-do-brasil-com-diabetes-podem-dobrar-na-proxima-decada-diz-estudo-britanico.ghtml>>. Acesso em: abr. 2019.
12. PRATLEY, R. E.; MATFIN, G. “Pre-diabetes: clinical relevance and therapeutic approach”. **The British Journal of Diabetes & Vascular Disease**, v. 7, n. 3, p. 120-129, 2007.
13. Centers for Disease Control and Prevention. **National diabetes fact sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States**. Atlanta, GA: U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.
14. BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. “Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1”. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 175-180, 1999.
15. NAZARETH, A. M. “Type 2 diabetes mellitus in the pathophysiology of Alzheimer's disease”. **Dementia & neuropsychologia**, v. 11, n. 2, p. 105-113, 2017.
16. BANTING, F. G.; BEST, C. H.; COLLIP, J. B.; CAMPBELL, W. R. & FLETCHER, A. A. “Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus”. **Canadian Medical Association Journal**, v. 12, n. 3, p. 141, 1922.
17. QUIANZON, C. C.; CHEIKH, I. “History of insulin”. **Journal of community hospital internal medicine perspectives**, v. 2, n. 2, p. 18701, 2012.
18. JOSHI, S. R.; PARIKH, R. M.; DAS, A. K. “Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology”. **Journal-association of physicians of India**, v. 55, n.L, p. 9, 2007.
19. WEISS, M. A. “Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus”. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19159-19163, 2009.

20. WEISS, Michael; STEINER, Donald F.; PHILIPSON, Louis H. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. In: **Endotext [Internet]**. MDText. com, Inc., 2014.
21. BLUNDELL, T. L.; CUTFIELD, J. F.; DODSON, G. G.; DODSON, E.; HODGKIN, D. C. & MERCOLA, D. "The structure and biology of insulin". **Biochemical Journal**, v. 125, n. 3, p. 50, 1971.
22. CHANG, X.; JORGENSEN, A. M. M.; BARDRUM, P.; LED, J.J. "Solution structures of the R6 human insulin hexamer". **Biochemistry**, v. 36, n. 31, p. 9409-9422, 1997.
23. BRANGE, J.; ANDERSEN, L.; LAURSEN, E. D.; MEYN, G. & RASMUSSEN, E. "Toward understanding insulin fibrillation". **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 5, p. 517-525, 1997.
24. AHMAD, A.; MILLETT, I. S.; DONIACH, S.; UVERSKY, V. N. & FINK, A. L. "Stimulation of insulin fibrillation by urea-induced intermediates". **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14999-15013, 2004.
25. AKBARIAN, M.; GHASEMI, Y.; UVERSKY, V. N. & YOUSEFI, R. "Chemical modifications of insulin: Finding a compromise between stability and pharmaceutical performance". **International journal of pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p. 450-468, 2018.
26. BAKER, E. N.; BLUNDELL, T. L.; CUTFIELD, J. F.; DODSON, E. J.; DODSON, G. G.; HODGKIN, D. M. C. & VIJAYAN, N. M. "The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution". **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 319, n. 1195, p. 369-456, 1988.
27. NIELSEN, L.; FROKJAER, S.; BRANGE, J.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. "Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants". **Biochemistry**, v. 40, n. 28, p. 8397-8409, 2001.
28. DUNN, M. F. "Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer—a review". **Biometals**, v. 18, n. 4, p.295-303, 2005.
29. ORCI, L.; RAVAZZOLA, M.; AMHERDT, M.; MADSEN, O.; VASSALLI, J. D. & PERRELET, A. "Direct identification of prohormone

conversion site in insulin-secreting cells". **Cell**, v. 42, n. 2, p. 671-681, 1985.

30. HUBBARD, S. R. "The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase". **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 3, p.a008946, 2013.

31. PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. "Mechanisms of insulin action and insulin resistance". **Physiological reviews**, v. 98, n. 4, p. 2133-2223, 2018.

32. RIEK, R.; EISENBERG, D. S. "The activities of amyloids from a structural perspective". **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 227-235, 2016.

33. ZAPADKA, K. L.; BECHER, F. J.; GOMES DOS SANTOS, A. L. & JACKSON, S. E. "Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics". **Interface Focus**, v. 7, n. 6, p. 20170030, 2017.

34. BUCCIANTINI, M.; GIANNONI, E.; CHITI, F.; BARONI, F.; FORMIGLI, L.; ZURDO, J.; STEFANI, M. "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases". **nature**, v. 416, n. 6880, p. 507-511, 2002.

35. THOMAS, P. J.; QU, BAO-HE; PEDERSEN, P. L. "Defective protein folding as a basis of human disease". **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 11, p. 456-459, 1995.

36. MEISL, G.; YANG, X.; FROHM, B.; KNOWLES, T. P. & LINSE, S. "Quantitative analysis of intrinsic and extrinsic factors in the aggregation mechanism of Alzheimer-associated A β -peptide". **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

37. IYER, A.; ROETERS, S. J.; SCHILDERINK, N.; HOMMERSOM, B.; HEEREN, R. M.; WOUTERSEN, S. & SUBRAMANIAM, V. "The impact of N-terminal acetylation of α -synuclein on phospholipid membrane binding and fibril structure". **Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 40, p. 21110-21122, 2016.

38. BUCHANAN, L. E.; DUNKELBERGER, E. B.; TRAN, H. Q.; CHENG, P. N.; CHIU, C. C.; CAO, P. & ZANNI, M. T. "Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient β -sheet". **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19285-19290, 2013.

39. NIELSEN, L.; KHURANA, R.; ALISA, C.; FRONKJAER, S.; BRANGE, J.; VYAS, S.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. "Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism". **Biochemistry**, v. 40, n. 20, p. 6036-6046, 2001.
40. BRANGE, J.; ANDERSEN, L.; LAURSEN, E. D.; MEYN, G. & RASMUSSEN, E. "Toward understanding insulin fibrillation". **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 5, p. 517-525, 1997.
41. LI, S.; LEBLANC, R.M. "Aggregation of insulin at the interface". **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 5, p. 1181-1188, 2014.
42. NAYAK, A.; DUTTA, A. K.; BELFORT, G. "Surface-enhanced nucleation of insulin amyloid fibrillation". **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, n. 2, p. 303-307, 2008.
43. SHOFFNER, S. K.; SCHNELL, S. "Estimation of the lag time in a subsequent monomer addition model for fibril elongation". **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 31, p. 21259-21268, 2016.
44. LI, D.; LIU, C. "Structural diversity of amyloid fibrils and advances in their structure determination". **Biochemistry**, v. 59, n. 5, p. 639-646, 2020.
45. MORRIS, A. M.; WATZKY, M. A.; FINKE, R. G. "Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature". **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 3, p. 375-397, 2009.
46. KOTLER, S. A.; WALSH, P.; BRENDER, J. R.; RAMAMOORTHY, A. "Differences between amyloid- β aggregation in solution and on the membrane: insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease". **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 19, p. 6692-6700, 2014.
47. HAAS, J.; VÖHRINGER- MARTINEZ, E.; BÖGEHOLD, A.; MATTHES, D.; HENSEN, U.; PELAH, A.; GRUBMÜLLER, H. "Primary steps of pH- dependent insulin aggregation kinetics are governed by conformational flexibility". **ChemBioChem**, v. 10, n. 11, p. 1816-1822, 2009.

48. WOODS, R. J.; ALARCÓN, J.; MCVEY, E. “Intrinsic fibrillation of fast-acting insulin analogs”. **Journal of diabetes science and technology**, v. 6, n. 2, p. 265-276, 2012.
49. HONG, D-P.; AHMAD, A.; FINK, A. L. “Fibrillation of human insulin A and B chains”. **Biochemistry**, v. 45, n. 30, p. 9342-9353, 2006.
50. SLUZKY, V.; TAMADA, J.A.; KLIBANOV, A.M.; LANGER, R. “Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 21, p. 9377-9381, 1991.
51. FROKJAER, S.; OTZEN, D. E. “Protein drug stability: a formulation challenge”. **Nature reviews drug discovery**, v. 4, n. 4, p. 298, 2005.
52. GUILHEM, I.; LEGUERRIER, A. M.; LECORDIER, F.; POIRIER, J. Y.; MAUGENDRE, D. “Technical risks with subcutaneous insulin infusion”. **Diabetes & metabolism**, v. 32, n. 3, p. 279-284, 2006.
53. NAGASE, T.; IWAYA, K.; IWAKI, Y.; KOTABE, F.; UCHIDA, R.; OH-I, T.; SEKINE, H.; MIWA, K.; MURAKAMI, S.; ODAKA, T.; KURE, M.; NEMOTO, Y.; NORIKATE, M.; KATSURA, Y. “Insulin-derived amyloidosis and poor glycemic control: a case series”. **The American journal of medicine**, v. 127, n. 5, p. 450-454, 2014.
54. GUPTA, Y.; SINGLA, G.; SINGLA, R. “Insulin-derived amyloidosis”. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 19, n. 1, p. 174, 2015.
55. DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z.; DODSON, E. J.; DODSON, G. G.; REYNOLDS, C. D.; SMITH, G. D.; SWENSON, D. “Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer”. **Nature**, v. 338, n. 6216, p. 594, 1989.
56. RAHUEL-CLERMONT, S.; FRENCH, C. A.; KAARSHOLM, N. C.; DUNN, M. F. “Mechanisms of stabilization of the insulin hexamer through allosteric ligand interactions”. **Biochemistry**, v. 36, n. 19, p. 5837-5845, 1997.
57. AHMAD, A.; MILLETT, I. S.; DONIACH, S.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. “Partially folded intermediates in insulin fibrillation”. **Biochemistry**, v. 42, n. 39, p. 11404-11416, 2003.

58. BANTING, F. G.; BEST, C. H. "Pancreatic extracts". **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 7, n. 8, p. 464-472, 1922.
59. CISZAK, E.; BEALS, J. M.; FRANK, B. H.; BAKER, J. C.; CARTER, N. D.; SMITH, G. D. "Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin". **Structure**, v. 3, n. 6, p. 615-622, 1995.
60. DODSON, G.; STEINER, D. "The role of assembly in insulin's biosynthesis". **Current opinion in structural biology**, v. 8, n. 2, p. 189-194, 1998.
61. OLSEN, H. B.; LUDVIGSEN, S.; KAARSHOLM, N. C. "The relationship between insulin bioactivity and structure in the NH₂-terminal A-chain helix". **Journal of molecular biology**, v. 284, n. 2, p. 477-488, 1998.
62. GIBSON, T. J.; MURPHY, R. M. "Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides". **Protein Science**, v. 15, n. 5, p. 1133-1141, 2006.
63. GROENNING, M.; FROKJAER, S.; VESTERGAARD, B. "Formation mechanism of insulin fibrils and structural aspects of the insulin fibrillation process". **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, n. 5, p. 509-528, 2009.
64. NIELSEN, L.; FROKJAER, S.; CARPENTER, J. F.; BRANGE, J. "Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy". **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 1, p. 29-37, 2001.
65. WEISS, M. A. "Design of ultra-stable insulin analogues for the developing world". **Journal of Health Specialties**, v. 1, n. 2, p. 59, 2013.
66. PATTON, J. S.; BYRON, P. R. "Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs". **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 67, 2007.
67. SMITH, M. I.; SHARP, J. S.; ROBERTS, C. J. "Insulin fibril nucleation: the role of prefibrillar aggregates". **Biophysical journal**, v. 95, n. 7, p. 3400-3406, 2008.
68. KUBÁNKOVÁ, M.; LÓPEZ-DUARTE, I.; BULL, J. A.; VADUKUL, D. M.; SERPELL, L. C.; DE SAINT VICTOR, M.; KUIMOVA, M. K.

“Probing supramolecular protein assembly using covalently attached fluorescent molecular rotors”. **Biomaterials**, v. 139, p. 195-201, 2017.

69. METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, A.; MURUGESAN, R.; GIRIGOSWAMI, K. “In vitro and in vivo insulin amyloid degradation mediated by Serratiopeptidase”. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 728-735, 2017.

70. HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT, W. “Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization”. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 7, p. 1487-1499, 2008.

71. BABU, E.; MAREESWARAN, P. M.; SATHISH, V.; SINGARAVADIVEL, S.; RAJAGOPAL, S. “Sensing and inhibition of amyloid- β based on the simple luminescent aptamer–ruthenium complex system”. **Talanta**, v. 134, p. 348-353, 2015.

72. SUN, H., LENG, H. X., LIU, J. S., ROY, G., YAN, J. W., & ZHANG, L. “A novel fluorescent protein chromophore analogue to simultaneously probe lysosome viscosity and β -amyloid fibrils”. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 305, p. 127509, 2020.

73. VOROPAI, E. S., SAMTSOV, M. P., KAPLEVSKII, K. N., MASKEVICH, A. A., STEPURO, V. I., POVAROVA, O. I. & UVERSKII, V. N. “Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils”. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 70, n. 6, p. 868-874, 2003.

74. GABR, M. T.; PIGGE, F. C. “Rhenium complexes of bis (benzothiazole)-based tetraarylethylenes as selective luminescent probes for amyloid fibrils”. **Chem. Eur. J**, v. 24, p. 11729-11737, 2018.

75. HONG, Y.; MENG, L.; CHEN, S.; LEUNG, C. W. T.; DA, L. T.; FAISAL, M.; TANG, B. Z. “Monitoring and inhibition of insulin fibrillation by a small organic fluorogen with aggregation-induced emission characteristics”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1680-1689, 2012.

76. CHAN, F. T.; SCHIERLE, G. S. K.; KUMITA, J. R.; BERTONCINI, C. W., DOBSON, C. M.; KAMINSKI, C. F. “Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation”. **Analyst**, v. 138, n. 7, p. 2156-2162, 2013.

77. AMARO, M.; BIRCH, D. JS.; ROLINSKI, O. J. "Beta-amyloid oligomerisation monitored by intrinsic tyrosine fluorescence". **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 14, p. 6434-6441, 2011.
78. STSIAPURA, V. I.; MASKEVICH, A. A.; KUZMITSKY, V. A.; UVERSKY, V. N.; KUZNETSOVA, I. M.; TUROVEROV, K. K. "Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity". **The Journal of Physical Chemistry B**, v.112, n. 49, p. 15893-15902, 2008.
79. CAMILO, M. R.; CARDOSO, C. R.; CARLOS, R. M.; LEVER, A. B. P. "Photosolvolytic of *cis*-[Ru (α -diimine)₂ (4-aminopyridine)₂]²⁺ complexes: photophysical, spectroscopic, and density functional theory analysis". **Inorganic chemistry**, v. 53, n. 7, p. 3694-3708, 2014.
80. LIMA, M. V. S. Complexos de Metais de Transição: Aplicações no Tratamento e Diagnóstico da Doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2014. Tese de doutorado, 126 p.
81. SILVA, D. E. S. Complexos de metais de transição multifuncionais para o tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2016. Dissertação de mestrado, 103 p.
82. CALI, M. P. Mapeamento do Processo de Nucleação e Crescimento do peptídeo beta amilóide pelo Complexo Luminescente *cis*-[Ru (phen)₂(Apy)₂]²⁺. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2018. Dissertação de mestrado, 126 p.
83. SILVA, D. E.; CALI, M. P.; PAZIN, W. M.; CARLOS-LIMA, E.; SALLES TREVISAN, M. T.; VENÂNCIO, T.; CARLOS, R. M. "Luminescent Ru (II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of A β self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer's disease". **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 19, p. 9215-9227, 2016.
84. CALI, M. P.; PEREIRA, L. M.; TEODORO, M. D.; SELLANI, T. A.; RODRIGUES, E. G.; CARLOS, R. M. "Comparison of A β (1-40, 1-28, 11-22, and 29-40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex". **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.111314, 2020.

85. KOLLMER, M.; CLOSE, W.; FUNK, L.; RASMUSSEN, J.; BSOUL, A.; SCHIERHORN, A.; FÄNDRICH, M. “Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer’s brain tissue”. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2019.
86. SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. “Mixed phosphine 2,2’- bipyridine complexes of ruthenium”. **Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 3334–3341, 1978.
87. LAW, A. S. Y.; LEE, L. C. C.; YEUNG, M. C. L.; LO, K. K. W. & YAM, V. W. W. “Amyloid Protein-Induced Supramolecular Self-Assembly of water-soluble platinum (II) complexes: a luminescence assay for amyloid fibrillation detection and inhibitor screening”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 46, p. 18570-18577, 2019.
88. WEIL, L., SEIBLES, T. S. & HERSKOVITS, T. T. “Photooxidation of bovine insulin sensitized by methylene blue”. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 111, p. 308–320, 1965.
89. LI, Z.; WANG, H.; CHEN, Z. “Monitoring and modulation of insulin fibers by a protein isomerization targeting dye bromophenol blue”. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 287, p. 496-502, 2019.
90. GABR, M.T.; PIGGE, F. C. “Rhenium complexes of bis (benzothiazole)-based tetraarylethylenes as selective luminescent probes for amyloid fibrils”. **Chem. Eur. J**, v. 24, p. 11729-11737, 2018.
91. COOK, N. P.; OZBIL, M.; KATSAMPES, C.; PRABHAKAR, R. & MARTÍ, A. A. “Unraveling the photoluminescence response of light-switching ruthenium (II) complexes bound to amyloid- β ”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 29, p. 10810-10816, 2013.
92. GLAZER, E. C.; MAGDE, D.; TOR, Y. “Ruthenium complexes that break the rules: structural features controlling dual emission”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 27, p. 8544-8551, 2007.
93. VERMA, S.; KAR, P.; DAS, A. & GHOSH, H. N. “Photophysical properties of ligand localized excited state in ruthenium (ii) polypyridyl complexes: a combined effect of electron donor–acceptor ligand”. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 38, p. 9765-9773, 2011.
94. LAKOWICZ, Joseph R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer science & business media, 2013.

95. Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. F., & Miró, M. **Encyclopedia of analytical science**. Elsevier, 2019.
96. VOROPAL, E. S.; SAMTSOV, M. P.; KAPLEVSKII, K. N.; MASKEVICH, A. A.; STEPURO, V. I.; POVAROVA, O. I.; UVERSKII, V. N. "Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils". **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 70, n. 6, p. 868-874, 2003.
97. BIANCALANA, M.; KOIDE, S. "Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils". **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 7, p. 1405-1412, 2010.
98. ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. "UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. part 2: selected applications". **Biophysical reviews**, v. 8, n. 2, p. 163-177, 2016.
99. TEALE, F. W. J. "The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution". **Biochemical journal**, v. 76, n. 2, p. 381, 1960.
100. MICHAELIAN, K.; SIMEONOV, A. "Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum". **Biogeosciences**, v. 12, n. 16, p. 4913-4937, 2015.
101. BEKARD, I. B.; DUNSTAN, Dave E. "Tyrosine autofluorescence as a measure of bovine insulin fibrillation". **Biophysical journal**, v. 97, n. 9, p. 2521-2531, 2009.
102. ZHDANOVA, N. G.; MAKSIMOV, E. G.; ARUTYUNYAN, A. M.; FADEEV, V. V. & SHIRSHIN, E. A. "Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins". **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 174, p. 223-229, 2017.
103. ZHDANOVA, N. G.; SHIRSHIN, E. A.; MAKSIMOV, E. G.; PANCHISHIN, I. M.; SALETSKY, A. M. & FADEEV, V. V. "Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin". **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 5, p. 897-908, 2015.

104. LEE, C. C.; NAYAK, A.; SETHURAMAN, A.; BELFORT, G. & MCRAE, G. J. “A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation”. **Biophysical journal**, v. 92, n. 10, p. 3448-3458, 2007.
105. ZIAUNYS, M.; SNEIDERIS, T.; SMIRNOVAS, V. “Exploring the potential of deep-blue autofluorescence for monitoring amyloid fibril formation and dissociation”. **PeerJ**, v. 7, p. e7554, 2019.
106. MOHANTY, J.; CHOUDHURY, S. D.; PAL, H.; BHASIKUTTAN, A. C. “ Early detection of insulin fibrillation: a fluorescence lifetime assay to probe the pre-fibrillar regime”. **Chemical Communications**, v. 48, n. 18, p. 2403-2405, 2012.
107. XUE, C.; LIN, T. Y.; CHANG, D.; GUO, Z. “Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation”. **Royal Society open science**, v. 4, n. 1, p. 160696, 2017.
108. GREENFIELD, N.J. “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure”. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876, 2006.
109. SIRANGELO, I.; BORRIELLO, M.; VILASI, S. & IANNUZZI, C. “Hydroxytyrosol inhibits protein oligomerization and amyloid aggregation in human insulin”. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4636, 2020.
110. IANNUZZI, C.; BORRIELLO, M.; PORTACCIO, M.; IRACE, G.; SIRANGELO, I. “Insights into insulin fibril assembly at physiological and acidic pH and related amyloid intrinsic Fluorescence”. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2551, 2017.
111. MEI, Q. B.; GUO, Y. H.; TONG, B. H.; WENG, J. N.; ZHANG, B. & HUANG, W. “Phosphorescent chemosensor for Hg²⁺ and acetonitrile based on iridium (iii) complex”. **Analyst**, v. 137, n. 22, p. 5398-5402, 2012.
112. MEI, Q.; SHI, Y.; TONG, B. “Phosphorescent chemosensor for Hg²⁺ based on iridium (III) complex coordinated with 4-phenylquinazoline and sodium carbazole dithiocarbamate”. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 74924-74931, 2015.
113. LI, Z.; WANG, H.; CHEN, Z. “Monitoring and modulation of insulin fibers by a protein isomerization targeting dye bromophenol blue”. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 287, p. 496-502, 2019.

114. WANG, Y.; YAN, J.; GOULT, B.T. “Force-dependent binding constants”. **Biochemistry**, v. 58, n. 47, p. 4696-4709, 2019.
115. MOHANTY, J.; CHOUDHURY, S. D.; BAROOAH, N.; PAL, H.; BHASIKUTTAN, A. C. “Mechanistic Aspects of Host–Guest Binding in Cucurbiturils: Physicochemical Properties”. 2017.
116. GROENNING, M., NORRMAN, M., FLINK, J. M., VAN DE WEERT, M., BUKRINSKY, J. T., SCHLUCKEBIER, G., & FROKJAER, S. “Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils”. **Journal of structural biology**, v. 159, n. 3, p. 483-497, 2007.
117. Huang, C. Y.; Zhou, R.; Yang, D. C.; Chock, P. B. “Application of the continuous variation method to cooperative interactions: mechanism of Fe (II)–ferrozine chelation and conditions leading to anomalous binding ratios”. **Biophysical chemistry**, v. 100 (1-3), p. 143-149, 2002.
108. SANDERSON, M. J.; SMITH, I.; PARKER, I.; & BOOTMAN, M. D. “Fluorescence microscopy”. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 10, p. pdb. top071795, 2014.
119. SANDERSON, M. J.; SMITH, I.; PARKER, I.; & BOOTMAN, M. D. “Fluorescence microscopy”. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 10, p. pdb. top071795, 2014.
120. DUNST, S.; TOMANCAK, P.. Imaging flies by fluorescence microscopy: principles, technologies, and applications. **Genetics**, v. 211, n. 1, p. 15-34, 2019.