

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

**“INFLUÊNCIA DO TIPO DE LIPÍDEO E PEPTÍDEO BETA
AMILOIDE SOBRE A PERTURBAÇÃO DA MEMBRANA E
CONSEQUÊNCIAS NA TOXICIDADE DE CÉLULAS
NEURONAIS OBSERVADAS PELAS RESPOSTAS
LUMINESCENTES DO COMPLEXO RUAPY”**

Maria Laura da Cruz Garcia*

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

Orientador(a): Prof. Dra. Rose Maria Carlos

***Bolsista FAPESP (Proc. 2021/02436-7)**

São Carlos – SP

2023



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 Maria Laura da Cruz Garcia, realizada em 28/08/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Wallance Moreira Pazin (UNESP)

Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira (USP)

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

DEDICATÓRIA

Para minha madrinha, que sempre foi uma mulher cheia de luz. Eu sempre quis ser igual a você, espero que onde quer que esteja agora, esteja orgulhosa de mim.

“Sempre que vocês começarem a duvidar de si mesmas, [...] sempre que sentirem medo, lembrem-se: a coragem é a raiz da mudança, e somos quimicamente programados para mudar.”

Elizabeth Zott, Uma Questão de Química

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu tenho que agradecer a minha família que mesmo nos momentos complicados pelos quais passamos nesses últimos anos nunca deixou de se apoiar. Obrigada por sempre me estenderem a mão sempre e me apoiarem na minha busca pelos meus objetivos. Em especial eu preciso agradecer os meus pais, que sempre me apoiaram, me incentivaram e me deram os meios para realizar as coisas que eu desejei durante toda a vida.

À minha mãe, Viviane, que é meu ponto de equilíbrio, obrigada por todos os empurrões, o apoio, o incentivo e paciência (eu sei que precisa de muita). Sem você eu não teria chegado até aqui.

À Prof. Rose Maria Carlos por ter me orientado desde a iniciação científica, obrigada por todos os ensinamentos durante essa jornada.

Aos meus colegas de laboratório, Marco, Rafaela, Lorena, Victoria, Denize, Bárbara, Mariana, Isabele e Rafinha, por toda ajuda, conselhos, risadas e comidinhas compartilhadas durante esses últimos anos. Em especial ao Marco que me ajudou muito nos experimentos, muito obrigada amigo, sem você esse trabalho não seria metade do que ele é. Também à Rafaela, que foi a melhor aluna de Iniciação Científica que eu poderia ter pedido, obrigada por me fazer companhia em tantos experimentos, eu sei que era minha função te ensinar, mas sem dúvidas também aprendi muito com você.

Aos meus amigos, obrigada por estarem sempre comigo e me dar força para encarar essa jornada com mais leveza. Em especial a Nathalia que mesmo mais de longe agora, sempre fez questão de estar presente em todos os momentos, você é muito especial migs. E à Bia que dividiu a casa comigo e foi a melhor companhia durante esses dois anos e meio, obrigada por sempre estar comigo, mesmo quando eu fui em pé no saco, obrigada pelos filmes, séries, os sorvetes no kartódromo, a feira de sábado de manhã, as risadas e as sessões de desabafo, sem você teria sido muito mais difícil.

Ao Prof. Dr. Paul Cremer que me recebeu para o meu período de mestrado sanduíche em seu laboratório na Penn State nos Estados Unidos. Ao Dr. Tinglu Yang, que ajudou e auxiliou nos experimentos. Aos colegas do laboratório, Ruofei, Olivia, Chris, Ryan M., Ryan Z., Shania, LG, Chang, Ying, Nicole, Andrew, Rahul, Sadia, Erica e Chun-Ting, que fizeram da minha passagem por lá uma das melhores experiências que eu já tive, obrigada pela companhia, a amizade, o acolhimento, as risadas e os ensinamentos durante os 6 meses de intercâmbio.

Aos amigos que fiz durante esses 6 meses nos Estados Unidos, que me acolheram e tornaram essa jornada muito mais divertida.

À Prof. Dra. Márcia Cominetti pelo auxílio nos experimentos de viabilidade celular que foram realizados em seu laboratório no Departamento de Gerontologia da UFSCar.

À Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo pelas medidas de dicroísmo circular realizadas em seu laboratório no Grupo de Biofísica Molecular no IFSC-São Carlos, Campus II da USP.

Ao Prof. Dr. Wallance Pazin e o Adriano Batista pelo auxílio nas medidas de tempo de vida e FLIM realizadas na FLAR-USP em Ribeirão Preto.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. pelas medidas das Isotermas π -A e PM-IRRAS realizados em seu laboratório no Grupo de Polímeros no IFSC-São Carlos e à Ellen pelo auxílio nas medidas.

À FAPESP pelo financiamento através da bolsa de mestrado (Proc. 2021/02436-7) e pela oportunidade de intercâmbio com a bolsa BEPE (Proc. 2022/03380-8).

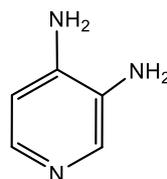
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3,4Apy	3,4-diaminopiridina
A β	Peptídeo Beta Amilóide
AFM	Microscopia de Força Atômica
APP	Proteína Precursora do Amilóide
DA	Doença de Alzheimer
DC	Dicroísmo Circular
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
FDA	Food and Drug Administration
FLIM	Microscopia por Imagem de Tempo de Vida de Fluorescência
FRET	Transferência de Energia por Ressonância de Förster
GM1	Gangliosídeo Monosialotetrahexosilgangliosídeo
GUV	Vesícula Unilamelar Gigante
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LUV	Vesícula Unilamelar Grande
MLV	Vesículas Multilamelares
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

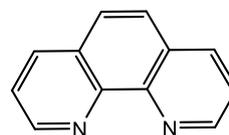
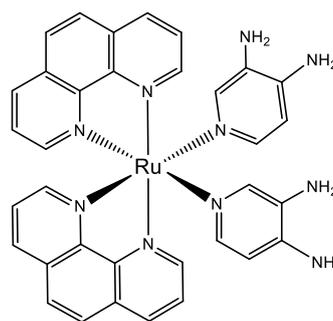
NBD-PC	1-oleoil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina
SNC	Sistema Nervoso Central
SUV	Vesícula Unilamelar Pequena
PDMS	Polidimetilsiloxano
PET	Tomografia por Emissão de Póstron
phen	1,10-fenantrolina
PM-IRRAS	Espectroscopia de Reflexão-absorção na Região do Infravermelho com Modulação da Polarização
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
POPS	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
PVA	Álcool polivinílico
RuApy	<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4-Apy) ₂] ²⁺
SLB	Bicamada Lipídica Suportada
SM	N-lauroyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine
TCSPC	Contagem de Fótons Únicos Correlacionados por Tempo
ThT	Tioflavina T
TR-DHPE	N-(TexasRedsulfonil)-1,2-dihexadecanoil-snglicero-3-fosfoetanolamina

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DE COMPOSTOS

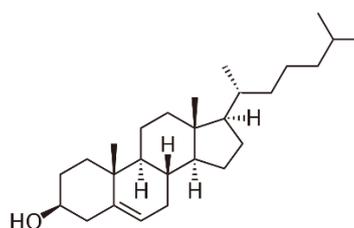
3,4-diaminopiridina



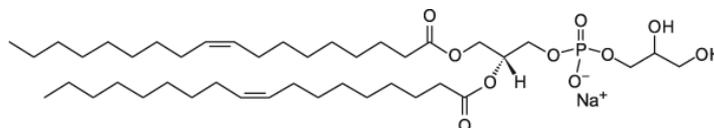
1,10-fenantrolina

 cis -[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺

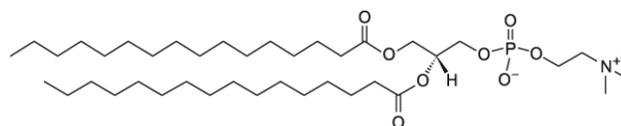
Colesterol



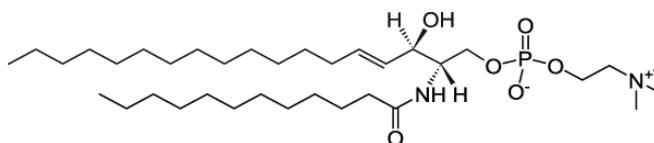
DOPG



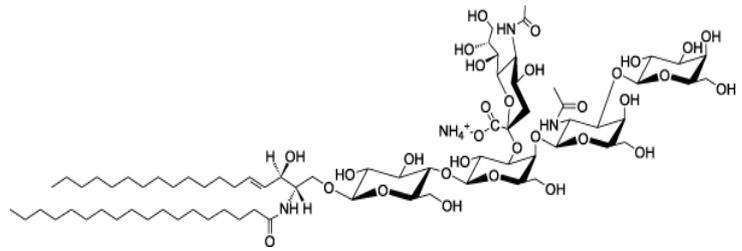
DPPC



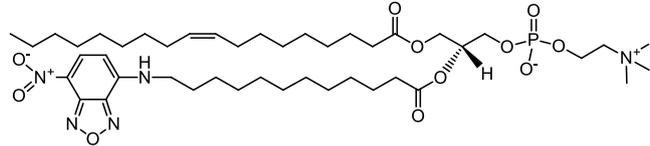
SM



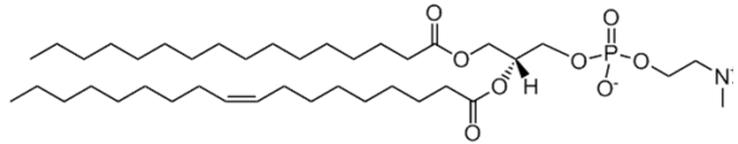
GM1



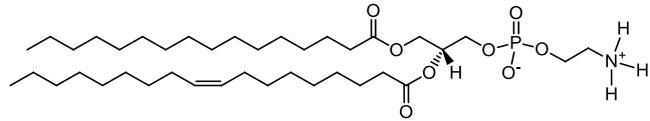
NBD-PC



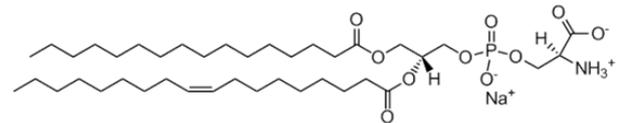
POPC



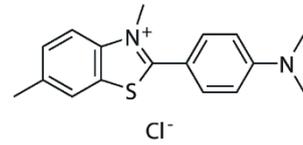
POPE



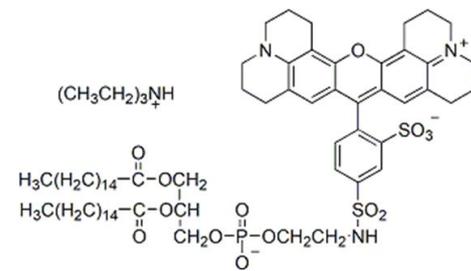
POPS



ThT



TR-DHPE



LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 - Deslocamentos químicos δH (ppm), multiplicidade e sinais de prótons para o espectro de 1H RMN (400 MHz) do RuApy em DMSO- d^6	42
TABELA 4.2 – Valores de K_d obtidos para o estudo do mecanismo de a interação entre o complexo RuApy e os modelo de membrana.....	86
TABELA 4.3 – Atribuições das bandas obtidas nos espectros de PM-IRRAS em cm^{-1} para as 3 diferentes composições lipídicas das monocamadas estudadas com a subfase de Tampão PBS pH 7,4 e de Tampão PBS na presença de $2\mu M$ do complexo RuApy.....	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Comparação de ressonâncias magnéticas de um cérebro saudável (à esquerda) e com doença de Alzheimer (à direita). Fonte Adaptada: FISH et al., 2019.....	2
FIGURA 1.2 - Representação do processamento proteolítico da APP pelas enzimas secretases α - β - e γ -. Fonte Adaptada: VARDY et al., 2005.....	6
FIGURA 1.3 - Exemplo de cinética de agregação regular e com a adição de fibrilas. Fonte Adaptada: KUMAR; WALTER, 2011.....	9
FIGURA 1.4 - Representação dos modelos miméticos de membrana celular (A) Lipossomo ou vesícula (B) Monocamadas de Langmuir e (C) Bicamadas suportadas (SLBs).....	12
FIGURA 1.5 - Ilustração das maneiras com que o A β pode interagir com a membrana celular (A) Se inserindo e formando poros e (B) se ligando à membrana quando em sua forma monomérica. Fonte Adaptada: NIU et al., 2018.....	13
FIGURA 1.6 - Diagrama de Jabloski mostrando as transições radiativas e não radiativas de um processo de absorção e emissão de luz no qual S ₀ é o estado fundamental singlete, S ₁ o estado excitado singlete e T ₁ o estado excitado tripleto.....	17
FIGURA 1.7 - Diferentes estruturas de complexos de rutênio que apresentaram modificações na agregação do peptídeo A β . Fonte Adaptada: WALL et al., 2021.....	18
FIGURA 3.1 - Esquema da síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂].....	24
FIGURA 3.2 - Esquema da síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂] ²⁺	25
FIGURA 3.3 - Esquema ilustrativo do protocolo estabelecido para a preparação e agregação do peptídeo A β ₁₋₄₂	29

FIGURA 3.4 - Reação de redução do sal amarelo MTT pelo NADH para a formação do sal violeta Formazan.....	30
FIGURA 3.5 - (A) Molde do formato dos canais que serão formados no PDMS e (B) Sistema dos dispositivos microfluídicos indicando onde ficam os canais em que as bicamadas serão formadas entre o PDMS e o vidro. Fonte Adaptada: YANG et al., 2000.....	35
FIGURA 3.6 - Figura representando o processo de fusão das LUVs para a formação das bicamadas suportadas (A) logo que as vesículas são inseridas no sistema (B) Quando as vesículas começam a entrar em contato com o vidro e passar pelo processo de fusão e (C) As bicamadas suportadas formadas no vidro.....	36
FIGURA 3.7 - Exemplo de uma Isoterma π -A indicando todas as fases que podem ser observadas e ilustrando o comportamento das moléculas lipídicas em cada uma dessas fases conforme há a compressão dos lipídeos e a monocamada está sendo formada.....	39
FIGURA 4.1 - Espectros de ^1H RMN (400 MHz) com a indicação dos sinais para cada hidrogênio da 1,10-fenantrolina (vermelho), 3,4-diaminopiridina (azul) e do complexo RuApy (verde) obtidos em DMSO- d^6	43
FIGURA 4.2 - Espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis para o complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4, destacando a banda proveniente da MLCT no espectro inserido.....	44
FIGURA 4.3. Espectros de absorção UV-Vis destacando a banda da MLCT do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ Cl $_2$] (preto) e do complexo RuApy (vermelho) em diclorometano.....	45
FIGURA 4.4 - Espectros de emissão para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ Cl $_2$] (preto, $\lambda_{\text{exc}} = 436$ nm) em diclorometano e para o complexo RuApy (vermelho, $\lambda_{\text{exc}}=480$ nm) em tampão PBS pH 7,4.....	46

- FIGURA 4.5 - (A) Espectro de emissão (preto) e de excitação (vermelho) do complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4 (B) Diagrama do tipo Jablonski indicando as transições radiativas e não radiativas provenientes da transição eletrônica de MLCT.....47
- FIGURA 4.6 - Gráfico apresentando o decaimento do tempo de vida e o resíduo para o complexo RuApy.....48
- FIGURA 4.7 - Curva de concentração para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ em solução tampão PBS pH 7,4.....49
- FIGURA 4.8 - Sequência dos 42 aminoácidos do peptídeo Aβ₁₋₄₂ com o aminoácido fluorescente tirosina (Tyr) em destaque (azul).....50
- FIGURA 4.9 – (A) Espectros de emissão do Aβ₁₋₄₂ (λ_{exc}=270 nm) nos diferentes tempos de incubação do peptídeo Aβ₁₋₄₂ durante as primeiras 8 horas de incubação e (B) Curva da cinética de agregação do peptídeo Aβ₁₋₄₂ em tampão PBS pH 7,4, 37 °C e sem agitação pela resposta de emissão intrínseca do peptídeo.....51
- FIGURA 4.10 - (A) Espectros de emissão da ThT (λ_{exc}=440nm) em relação ao tempo de incubação do peptídeo Aβ₁₋₄₂ e (B) Curva da cinética de agregação do peptídeo Aβ₁₋₄₂ em tampão PBS pH 7,4, 37 °C e sem agitação pela resposta de emissão da ThT.....52
- FIGURA 4.11 - Espectros de luminescência da emissão intrínseca do Aβ₁₋₄₂ (λ_{exc} = 270 nm) no tempo inicial (preto), após 8 horas (rosa) e após 24 horas (vermelho) de incubação.....52
- FIGURA 4.12 - Espectros de emissão para a emissão intrínseca (λ_{exc} =270 nm) do peptídeo Aβ₁₋₄₂ durante o processo de agregação sem irradiação (preto) e com irradiação de luz contínua em 254 nm (vermelho) para os tempos de (A) 1 hora e

(B) 7 horas de agregação em tampão PBS pH 7,4 a 37°C sem agitação.....54

FIGURA 4.13 - Espectros de dicroísmo circular para o A β ₁₋₄₂ durante o processo de agregação no tempo inicial (preto) e após 3 (azul), 6 (rosa) e 24 horas (vermelho).....55

FIGURA 4.14 - (A) Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 270$ nm) do A β ₁₋₄₂ na presença do complexo RuApy com o processo de agregação monitorado por 8 horas (preto ao rosa) e após 24 horas (vermelho) e (B) Curva e cinética de agregação do A β ₁₋₄₂ na presença do complexo RuApy pela resposta de emissão intrínseca do peptídeo.....57

FIGURA 4.15 - Espectros de dicroísmo circular para o A β ₁₋₄₂ na presença do complexo RuApy durante o processo de agregação no tempo inicial (preto) e após 3 (azul), 6 (rosa) e 24 horas (vermelho).....58

FIGURA 4.16 - Espectros de emissão para a resposta luminescente do complexo RuApy ($\lambda_{exc}=480$ nm) na ausência (rosa) e presença do peptídeo A β ₁₋₄₂ na forma monomérica, tempo inicial (preto), após 6 horas de incubação do peptídeo (azul) e após 24 horas de incubação (vermelho) em Tampão PBS pH 7,4, 37°C, sem agitação.....59

FIGURA 4.17 - Imagens de microscopia de fluorescência para duas estruturas fibrilares do peptídeo A β ₁₋₄₂ contidas numa mesma amostra em diferentes regiões observadas pela resposta luminescente do complexo RuApy.....60

FIGURA 4.18 - Imagens de FLIM para o A β ₁₋₄₂ monômero (tempo inicial) (A) sozinho em solução e (B) na presença do complexo RuApy e depois de 24 horas de incubação (C) sozinho em solução e (D) na presença do complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4. As imagens foram obtidas com excitação em 440 nm e leitura de emissão em 600 nm.....62

- FIGURA 4.19 - Gráfico de barras para a viabilidade celular após 24 horas de incubação das células com o complexo RuApy, $A\beta_{1-42}$, e o $A\beta_{1-42}$ com o RuApy.....63
- FIGURA 4.20 - Gráfico de barras para a viabilidade celular após 48 horas de incubação das células com o complexo RuApy, $A\beta_{1-42}$, e o $A\beta_{1-42}$ com o RuApy.....64
- FIGURA 4.21 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de POPC (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de POPC no meio.....66
- FIGURA 4.22 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs 95% POPC e 5% POPS (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de 95% POPC e 5% POPS no meio.....67
- FIGURA 4.23 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de DOPG (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de DOPG no meio.....68
- FIGURA 4.24 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de POPC:Chol (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de POPC:Chol no meio.....69

FIGURA 4.25 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 no meio.....	70
FIGURA 4.26 - Espectros de excitação do RuApy e emissão do NBD em tampão PBS pH 7,4 mostrando a sobreposição necessária para o mecanismo de FRET.....	71
FIGURA 4.27 - Imagens de microscópio para os canais contendo bicamadas suportadas com NBD-PC (A) quando apenas tampão estava fluindo pelos canais e (B) quando foram adicionadas diferentes concentrações do complexo RuApy aos canais.....	72
FIGURA 4.28 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC.....	73
FIGURA 4.29 - Representação simplificada do efeito de “loop” que ocorre para o corante NBD-PC.....	74
FIGURA 4.30 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 99,7% POPC e 0,3% TR-DHPE.....	75
FIGURA 4.31 - Espectros de excitação do RuApy e emissão do Texas Red em tampão PBS pH 7,4 mostrando que não há sobreposição entre os espectros.....	77
FIGURA 4.32 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC.....	78

- FIGURA 4.33 - (A) Interação do complexo RuApy dificultada pela presença de íons Na^+ devido ao efeito de blindagem e (B) Interação do complexo RuApy sem íons Na^+79
- FIGURA 4.34 - Curva para a determinação da constante de dissociação em tampão fosfato 10 mM entre o complexo RuApy e a bicamada composta por (A) 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC, (B) 99,7% POPC e 0,3% TR-DHPE e (C) 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC.....80
- FIGURA 4.35 - Representação do efeito de organização causado na bicamada pela adição de colesterol.....82
- FIGURA 4.36 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 69,7% POPC, 30% Chol e 0,3% TR-DHPE.....83
- FIGURA 4.37 - (A) Estrutura do POPE e (B) Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 94,5% POPE, 5% POPE e 0,5% NBD-PC.....84
- FIGURA 4.38 - Curva para a determinação da constante de dissociação em tampão PBS em D_2O entre o complexo RuApy e a bicamada composta por (A) 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC e (B) 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC.....85
- FIGURA 4.39 -. Isotermas π -A na ausência (preto) e na presença de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4 para monocamadas compostas por (A) 100% DPPC (B) 100% POPC (C) 95% POPC e 5% POPS.....88
- FIGURA 4.40 - Espectros de PM-IRRAS na região do grupo fosfato para as monocamadas compostas de (A) DPPC, (B) POPC e (C) 95% de POPC e 5% POPS no sistema sem (preto) e na presença de 2 μM de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4.....92

- FIGURA 4.41 - Espectros de PM-IRRAS na região dos grupos carbonila para as monocamadas compostas de (A) DPPC, (B) POPC e (C) 95% de POPC e 5% POPS no sistema sem (preto) e na presença de 2 mM de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4.....93
- FIGURA 4.42 - Espectros de PM-IRRAS na região da cadeia alquil para as monocamadas compostas de (A) DPPC, (B) POPC e (C) 95% de POPC e 5% POPS no sistema sem (preto) e na presença de 2 mM de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4.....95
- FIGURA 4.43 - (A) Espectros de emissão para o RuApy sem irradiação (preto) e depois de irradiar em 488 nm por 15 minutos (vermelho) e (B) Espectros de absorção para o RuApy sem irradiação (preto) e depois de irradiar em 488 nm por 15 minutos (vermelho) em solução de glicose 200 mM.....97
- FIGURA 4.44 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas unicamente do fosfolípídeo POPC no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.....98
- FIGURA 4.45 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm para vesículas de POPC.....99
- FIGURA 4.46 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas da mistura POPC:Chol no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.....100
- FIGURA 4.47 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm para vesículas da mistura POPC:Chol.....101
- FIGURA 4.48 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas unicamente do fosfolípídeo DOPG no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.....101

- FIGURA 4.49 - Sequência de imagens de microscopia mostrando o rompimento da bicamada das vesículas de DOPG na presença de 10 μ M de RuApy após 10 minutos de irradiação.....102
- FIGURA 4.50 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas da mistura DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.....103
- FIGURA 4.51 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm para vesículas compostas da mistura DPPC:POPC:SM:Chol:GM1.....104
- FIGURA 4.52 - Vesículas unilamelares gigantes compostas unicamente de DOPG sob observação durante 1 hora para (A) Controle (apenas a vesícula) e (B) Vesícula na presença de 20 μ M do peptídeo A β ₁₋₄₂.....105
- FIGURA 4.53 - Vesículas unilamelares gigantes compostas de uma mistura DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 sob observação durante 1 hora para (A) Controle (apenas a vesícula) e (B) Vesícula na presença de 20 μ M do peptídeo A β ₁₋₄₂.....106

RESUMO

INFLUÊNCIA DO TIPO DE LIPÍDEO E PEPTÍDEO BETA AMILOIDE SOBRE A PERTURBAÇÃO DA MEMBRANA E CONSEQUÊNCIAS NA TOXICIDADE DE CÉLULAS NEURONAIS OBSERVADAS PELAS RESPOSTAS LUMINESCENTES DO COMPLEXO RUAPY. Uma das hipóteses para a causa da Doença de Alzheimer é o acúmulo de agregados do peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) no cérebro que levam a disfunções sinápticas e cognitivas graves resultando na demência neurodegenerativa. Alguns estudos indicam que a formação de placas amiloides e toxicidade do peptídeo $A\beta$ está associada à sua interação com a membrana celular neuronal. Esta interação acelera o processo de agregação e gera poros na membrana celular com a formação de espécies oligoméricas do $A\beta$. Estudos do nosso laboratório demonstraram que o complexo luminescente *cis*- $[Ru(phen)_2(3,4Apy)_2]^{2+}$ (RuApy, phen = 1,10-fenantrolina, 3,4Apy = 3,4-diaminopiridina) protege as células PC12 contra a toxicidade de espécies oligoméricas semelhantes a poros do $A\beta_{1-40}$, alterando o mecanismo de agregação para uma via não tóxica, levando a formação de estruturas semelhantes a micelas. Estes resultados motivaram o estudo da influência do RuApy no processo de agregação e toxicidade do $A\beta_{1-42}$ e verificar a possibilidade de envolvimento do RuApy no mecanismo de ação do $A\beta_{1-42}$ frente à membrana celular. Os estudos realizados envolveram as técnicas espectroscópicas de absorção, emissão no estado estacionário e resolvido no tempo na região do UV-visível, microscopia de imagem fluorescente, dicroísmo circular e espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS). Neste projeto, foi demonstrado que o complexo RuApy tem efeito protetivo para a linhagem celular de neuroblastoma humana SH-SY5Y frente às espécies tóxicas do $A\beta_{1-42}$ corroborando com resultados anteriores que mostraram que o RuApy altera o processo de agregação do $A\beta$ levando a formação de fibrilas

não tóxicas. Para os estudos de interação entre o RuApy e a membrana celular utilizou-se modelos de membranas lipídicas neutras, carregadas negativamente, com colesterol, marcadas com corantes orgânicos NBD e Texas Red e em diferentes meios de forma a elucidar como o complexo interage com os modelos de membrana. A interação foi avaliada por ensaios de ligação utilizando fluorescência, bicamadas lipídicas suportadas (SLB) e dispositivos microfluídicos. Pelo mecanismo de transferência de energia ressonante de Forster (FRET) foi determinada a constante de dissociação (K_d) da interação entre o RuApy e a bicamada lipídica e, de acordo com a mudança na constante, observar a influência de fatores como carga, fluidez da membrana e ligações de hidrogênio na interação. Os resultados obtidos indicaram que o RuApy interage com modelos de membrana principalmente por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. As informações em nível molecular das interações RuApy com a membrana lipídica foram obtidas nos estudos com monocamadas Langmuir pelos gráficos obtidos pelas Isotermas π -A e experimentos de PM-IRRAS e estão coerentes com os dados de obtidos com as SLBs nos dispositivos de microfluídicos. Ao todo os resultados obtidos indicam que a interação da RuApy com os modelos de membrana testados envolve interações eletrostáticas e por ligação hidrogênio, e que esta interação depende da composição do lipídio. Ainda, que o RuApy altera a agregação e tem efeito inibitório da citotoxicidade do $A\beta_{1-42}$ frente a linhagem celular SH-SY5Y. Tais conclusões sugerem que o complexo RuApy pode ter papel importante nas interações entre o peptídeo $A\beta$ e a membrana celular.

ABSTRACT

INFLUENCE OF AMYLOID LIPID AND BETA PEPTIDE TYPE ON MEMBRANE DISTURBANCE AND CONSEQUENCES ON NEURONAL CELL TOXICITY AS OBSERVED BY LUMINESCENT RESPONSES OF THE RUAPY COMPLEX. One of the hypotheses for the cause of Alzheimer's disease is the accumulation of amyloid-beta peptide ($A\beta$) aggregates in the brain that lead to severe synaptic and cognitive dysfunctions resulting in neurodegenerative dementia. Some studies indicate that the formation of amyloid plaques and $A\beta$ peptide toxicity is associated with its interaction with the neuronal cell membrane. This interaction accelerates the aggregation process and generates pores in the cell membrane with the formation of oligomeric $A\beta$ species. Studies in our laboratory have shown that the luminescent complex *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ (RuApy, phen = 1,10-phenanthroline, 3,4Apy = 3,4-diaminopyridine) protects cells PC12 against the toxicity of pore-like oligomeric species of $A\beta_{1-40}$, changing the aggregation mechanism to a non-toxic pathway, leading to the formation of micelle-like structures. These results motivated the study of the influence of RuApy on the process of aggregation and toxicity of $A\beta_{1-42}$ and to verify the possibility of involvement of RuApy in the mechanism of action of $A\beta_{1-42}$ against the cell membrane. The studies carried out involved the spectroscopic techniques of absorption, steady-state emission and time-resolved in the UV-visible region, fluorescent image microscopy, circular dichroism and reflection-absorption spectroscopy in the infrared region with polarization modulation (PM-IRRAS). In this project, it was demonstrated that the RuApy complex has a protective effect for the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y against toxic $A\beta_{1-42}$ species, corroborating previous results that showed that RuApy alters the $A\beta$ aggregation process leading to the formation of non-toxic fibrils. For the interaction studies between RuApy and the cell membrane, models of neutral lipid membranes,

negatively charged, with cholesterol, marked with NBD and Texas Red organic dyes and in different media were used in order to elucidate how the complex interacts with the models of membrane. The interaction was evaluated by binding assays using fluorescence, supported lipid bilayers (SLB) and microfluidic devices. Using the Forster resonant energy transfer mechanism (FRET), the dissociation constant (K_d) of the interaction between RuApy and the lipid bilayer was determined and, according to the change in the constant, the influence of factors such as charge, fluidity of the membrane and hydrogen bonds in the interaction. The obtained results indicated that RuApy interacts with membrane models mainly through electrostatic interactions and hydrogen bonds. Molecular-level information on RuApy interactions with the lipid membrane was obtained in studies with Langmuir monolayers by π -A Isotherms and PM-IRRAS experiments and are consistent with the data obtained with SLBs in microfluidic devices. Altogether, the results indicate that the interaction of RuApy with the tested membrane models involves electrostatic and hydrogen bonding interactions, and that this interaction depends on the lipid composition. Also, that RuApy alters the aggregation and has an inhibitory effect on the cytotoxicity of $A\beta_{1-42}$ against the SH-SY5Y cell line. Such conclusions suggest that the RuApy complex may play an important role in the interactions between the $A\beta$ peptide and the cell membrane.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Doença de Alzheimer	1
1.1.1. O Tratamento da Doença de Alzheimer	2
1.1.2. O peptídeo beta-amiloide.....	5
1.1.3. O processo de agregação	7
1.2. Modelos Miméticos de Membrana Celular	10
1.3. Interação beta amiloide e membrana celular	12
1.4. Complexos de Rutênio	16
1.5. Proposta de Trabalho	19
1.6. Justificativa	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Gerais	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Síntese	23
3.2.1. Complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (Cl) ₂].....	23
3.2.2. Complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4-Apy) ₂] ²⁺	24
3.3. Equipamentos e Metodologia	25
3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	25
3.3.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV-Vis	25
3.3.3. Espectroscopia de Luminescência.....	25
3.3.3.1. Medidas de Luminescência no Estado Estacionário	25
3.3.3.2. Medidas de Luminescência Resolvida no Tempo.....	26
3.3.4. Dicroísmo Circular	26
3.3.5. Microscopia de Fluorescência.....	27
3.3.5.1. Para análise das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs).....	27

3.3.5.2. Para análise das bicamadas suportadas (SLBs)	27
3.3.6. Microscopia por Imagem de Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)	28
3.3.7. Processo de Preparação do Peptídeo A β ₁₋₄₂	28
3.3.8. Ensaios de Viabilidade Celular	30
3.3.9. Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs).....	32
3.3.9.1. LUVs para estudos de luminescência.....	32
3.3.9.2. LUVs para formação de bicamadas suportadas	32
3.3.10. Preparação de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs).....	33
3.3.11. Preparação dos Dispositivos Microfluídicos	34
3.3.12. Preparação das Bicamadas Suportadas Sólidas (SLBs) nos Dispositivos Microfluídicos	35
3.3.13. Determinação da Constante de Dissociação (K_d)	36
3.3.14. Monocamadas de Langmuir e Isotermas de Pressão Superficial pela Área (π -A).....	37
3.3.15. Espectroscopia de Reflexão-absorção na Região do Infravermelho com Modulação da Polarização (PM-IRRAS)	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Síntese e Caracterização do Complexo RuApy	41
4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H RMN)	41
4.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Vis	43
4.1.3. Espectroscopia de Luminescência.....	45
4.1.4. Tempo de Vida de Emissão	47
4.1.5. Concentração de Estudo para o Complexo RuApy	48
4.2. O Peptídeo Aβ₁₋₄₂	49
4.2.1. Propriedades Espectroscópicas e o Processo de Agregação.....	49
4.2.2. Dicroísmo Circular	54
4.2.3. Estudos do A β ₁₋₄₂ na Presença do <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4-Apy) ₂] ²⁺	56

4.2.3.1. Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM).....	60
4.2.3.2. Estudos da Viabilidade Celular	62
4.3. Interação RuApy/Modelos de Membrana.....	64
4.3.1. Espectroscopia de Fluorescência	64
4.3.2. Estudo do Mecanismo de Interação por Determinação da Constante de Dissociação (K_d).....	70
4.3.2.1. Experimentos Padrão com SLBs Neutras.....	73
4.3.2.2. Efeito da carga.....	77
4.3.2.3. Efeito da fluidez	81
4.3.2.4. Efeito de Ligações de Hidrogênio.....	83
4.3.3. Isotermas π -A.....	87
4.3.4. PM-IRRAS	90
4.3.5. Estudos de Estabilidade dos Modelos de Membrana com GUVs na Presença do RuApy	95
4.4. Interação $A\beta_{1-42}$/GUVs.....	104
5. CONCLUSÃO	107
6. REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada principalmente pelos danos progressivos na memória, linguagem e nas habilidades cognitivas e em seu estágio mais avançado pode comprometer inclusive funções básicas como andar, falar e engolir.^{1,2}

O primeiro registro da DA foi feito em 1906 pelo psiquiatra Alois Alzheimer, que relatou o caso de uma mulher de 50 anos, Auguste Deter, que apresentava distúrbios cognitivos, de memória, confusão e problemas com o sono e que foi acompanhada por ele desde sua internação até sua morte, 5 anos depois. Alzheimer reportou a observação de placas difusas, emaranhados neurofibrilares e atrofia cerebral difusa.^{3,4}

Hoje, a demência é a quinta principal causa de morte no mundo e a DA é considerada a causa mais comum de demência representando entre 60 e 80% dos casos.^{5,6} Em todo mundo mais de 50 milhões de pessoas sofrem com a DA, e há uma estimativa de que o número de pessoas com a doença atinja mais de 150 milhões até 2050.^{7,8,9}

No momento, porém, não há cura para a DA. E, apesar de não ser parte normal do envelhecimento, o maior fator de risco associado à doença é a idade, sendo a maior parte dos afetados pessoas com mais de 65 anos. A prevalência da doença é de cerca de 5% em indivíduos acima de 65 anos e de até 30% naqueles com mais de 85 anos.^{5,10,11}

No entanto, há indícios que sugerem que outros fatores de risco durante a vida podem afetar a ocorrência da DA, entre eles a educação, saúde cardiovascular, atividade física, obesidade e diabetes. O cuidado com relação a esses fatores pode diminuir a prevalência da doença.^{7,12}

Geralmente a doença se inicia com uma fase assintomática com alterações neuropatológicas como a deposição do peptídeo beta-amiloide (A β) e

da proteína tau. O estágio pré-clínico da doença pode levar mais de 20 a 30 anos e alguns pacientes podem até mesmo continuar nesse estágio durante toda vida.⁶ O comprometimento cognitivo dos pacientes com a DA difere, porém o sinal mais comum apresentado é a dificuldade de lembrar informações recentes e o estágio sintomático mais precoce no qual um domínio cognitivo é prejudicado, porém, as capacidades funcionais são preservadas é denominado como comprometimento cognitivo leve.¹³

Com o avanço da doença, o acúmulo do peptídeo A β e da proteína tau aumenta significativamente e ocorre também um encolhimento do cérebro por conta da atrofia neuronal, Figura 1.1, e, com isso há um comprometimento cognitivo que passa a prejudicar a independência e as atividades diárias das pessoas com a DA. Em seus estágios finais os pacientes ficam debilitados e precisam de cuidados constantes e a doença acaba sendo fatal.^{1, 13, 14}

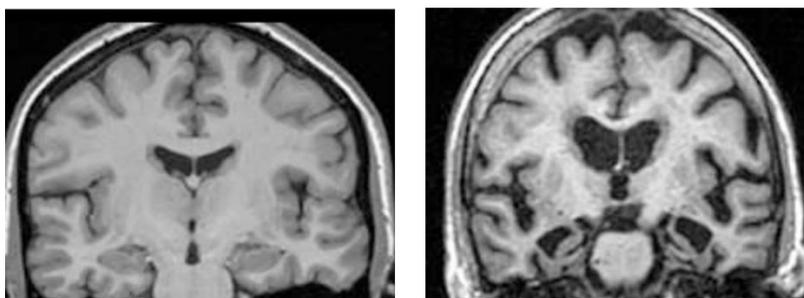


FIGURA 1.1 - Comparação de ressonâncias magnéticas de um cérebro saudável (à esquerda) e com doença de Alzheimer (à direita). Fonte Adaptada: FISH et al., 2019

1.1.1. O Tratamento da Doença de Alzheimer

Atualmente, não existe um único teste que dê o diagnóstico da Doença de Alzheimer. Entre esses testes, está a avaliação do histórico médico do paciente assim como avaliação de alterações cognitivas e comportamentais, muitas vezes feito junto à família e também pela avaliação por exames, como exames de sangue e imagens cerebrais que hoje são a ferramenta mais utilizada para determinar se o paciente apresenta altos níveis do peptídeo A β no cérebro e

é estimado na tomografia por emissão de pósitrons (PET) e também pela análise do nível de proteínas através no líquido cefalorraquidiano (LCR).^{1, 15, 16, 17}

A DA não tem cura. As terapias, como para a maioria das doenças degenerativas podem ser divididas em três categorias: sintomática, modificadora da doença e regenerativas.¹⁴

Atualmente, as terapias utilizadas e aprovadas para a DA são sintomáticas, que se baseiam na melhora cognitiva e controle dos sintomas. Ainda existe a necessidade de um tratamento sintomático que seja mais eficaz para melhorar o domínio cognitivo e outros sintomas como agitação, psicose e distúrbios do sono. A busca por novas terapias é de extrema importância e, para uma melhora significativa na DA, o tratamento deve se iniciar nos estágios extremamente iniciais da doença, uma vez que, se o início da doença puder ser retardado, os pacientes serão capazes de viver mais tempo com qualidade de vida.^{14, 18}

Os tratamentos modificadores são baseados na alteração da neuropatologia.¹⁹ A regeneração do cérebro doente, entretanto, é um passo muito grande considerando os avanços nas pesquisas relacionadas a DA no momento. Nenhuma das terapias utilizadas hoje retarda ou interrompe o dano causado aos neurônios que torna a DA fatal. Portanto, também não existem terapias regenerativas.^{1, 14}

Apesar de todos os esforços da comunidade científica e diversos fármacos em estágio avançado de desenvolvimento clínico, apenas 6 terapias com fármacos foram aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos até hoje: rivastigmina, galantamina, donepezil, memantina, memantina combinada com donepezil e tacrina, porém esse último foi descontinuado nos Estados Unidos por ter efeitos colaterais como a toxicidade para o fígado, entretanto, esses medicamentos melhoram os sintomas clínicos apenas por um tempo.^{1, 8, 20}

Dentre esses medicamentos, o donepazil, a galantamina e a rivastigma atuam como inibidores da acetilcolinesterase, uma enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina causando sua degradação e têm sido capazes de melhorar a função cognitiva de pacientes com DA leve a moderada e, embora esses tratamentos possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes, não tem efeito significativo no retardo da progressão da doença.^{19, 21, 22, 23, 24}

A memantina é o antagonista dos receptores N-metil-d-aspartato. Tais receptores induzem o aumento do cálcio intracelular, alterações mitocondriais e aumento de espécies reativas de oxigênio que contribuem para a morte neuronal, ou seja, a memantina bloqueia esse receptor de forma não competitiva, prevenindo a perda de neurônios, mostrando benefícios na DA moderada a grave.^{19, 22, 23, 24}

Além dos tratamentos farmacológicos, é de extrema importância o cuidado não farmacológico, que se baseia em uma parceria entre o clínico e a díade paciente-cuidador na qual busca-se a reabilitação cognitiva do paciente. É importante a estimulação constante do paciente com atividades físicas e mentais, participação em atividades sociais com outras pessoas, exercícios de memória e afazeres domésticos. Tais estratégias são de extrema importância para melhorar nos comportamentos como agitação, apatia, resistência ao cuidado, comportamentos obsessivo-compulsivos entre outros.^{21, 25}

Em 2021 o FDA aprovou uma nova terapia, a primeira baseada na modificação da doença: o aducanumabe, um anticorpo monoclonal que tem ação nas protofibrilas do A β , e se mostrou eficaz na diminuição dos depósitos amiloides e da demência em nível clínico, porém, ainda há muitas controvérsias com relação a sua eficácia e preço.¹⁹ O donanemab e o lecanemab também mostraram resultados promissores e estão em fase avançada de testes, porém ainda não tiveram a aprovação do FDA para a utilização no tratamento da DA.¹⁹

No Brasil, estimativas revelam que em 2025 haverá 32 milhões de pessoas acometidas com a Doença de Alzheimer. A maior incidência da doença é

em pessoas com mais de 80 anos, mulheres brancas, sendo a região sudeste a mais afetada.^{11, 26}

Atualmente, 73% dos idosos no Brasil são atendidos exclusivamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e o diagnóstico da DA geralmente ocorre pela observação de alterações cognitivas geralmente detectadas em consultas, por uma queixa do próprio paciente com relação à memória ou por conta de um exame geriátrico que inclui um teste cognitivo padronizado. Notando alterações, em seguida é realizada uma tomografia ou ressonância magnética para excluir outras possibilidades diagnósticas. Porém, esse diagnóstico usualmente é feito tardiamente ou nem é feito por conta da falta de treinamento e conhecimento sobre a demência pelos profissionais, e, desta forma, há um atraso médio de um ano e meio entre os primeiros sintomas de demência e o diagnóstico em si.^{11, 27, 28}

Os centros de referência do SUS no Brasil oferecem tratamento multidisciplinar integral e gratuito para pacientes com DA.²⁹ O SUS também oferece gratuitamente os medicamentos para a doença: a donepezila, galantamina, memantina e rivastigmina.^{30, 31} Além disso, é oferecido também o tratamento não farmacológico, que são planejados de acordo o paciente, ambiente e cuidador de forma a atenuar sintomas neuropsiquiátricos e comportamentos problemáticos. Tais terapias incluem: restabelecer memórias, redução de estresse e ansiedade com desenvolvimento motor e cognitivo, musicoterapia, abordagens multissensoriais, aromaterapia e horticultura.¹¹ Entretanto, dados mostraram que no SUS, apesar de serem feitos tratamentos e acompanhamentos, não há uma resolução eficaz para a DA.³²

1.1.2. O peptídeo beta-amiloide

A causa da Doença de Alzheimer ainda é motivo de estudo intenso no meio científico. Existem algumas hipóteses sugerindo qual pode ser o fator que leva ao desenvolvimento da doença.

A hipótese da cascata de amiloide é uma das mais amplamente aceitas e postula que o desenvolvimento da DA se dá por conta do acúmulo de

placas amiloides no cérebro. Tais placas são formadas por agregados do peptídeo beta amiloide ($A\beta$) fora dos neurônios por conta de um desequilíbrio entre a produção e eliminação desse peptídeo.^{1, 4, 9, 12}

O peptídeo $A\beta$ origina-se pela alteração da proteólise da proteína precursora do amiloide (APP), que é uma proteína transmembrana. Essa proteína é clivada por enzimas secretases e mutações nas β e γ -secretases podem levar a superprodução do $A\beta$.^{22, 33, 34} Normalmente, a APP é clivada sequencialmente pelas enzimas α e γ -secretase, levando a um peptídeo solúvel que não tem tendência a agregar (p3), esse caminho é denominado via não amiloidogênica. Quando a clivagem da APP acontece pela β e γ -secretase é que se produz o peptídeo $A\beta$, sendo essa a via amiloidogênica, Figura 1.2.^{20, 35, 36, 37}

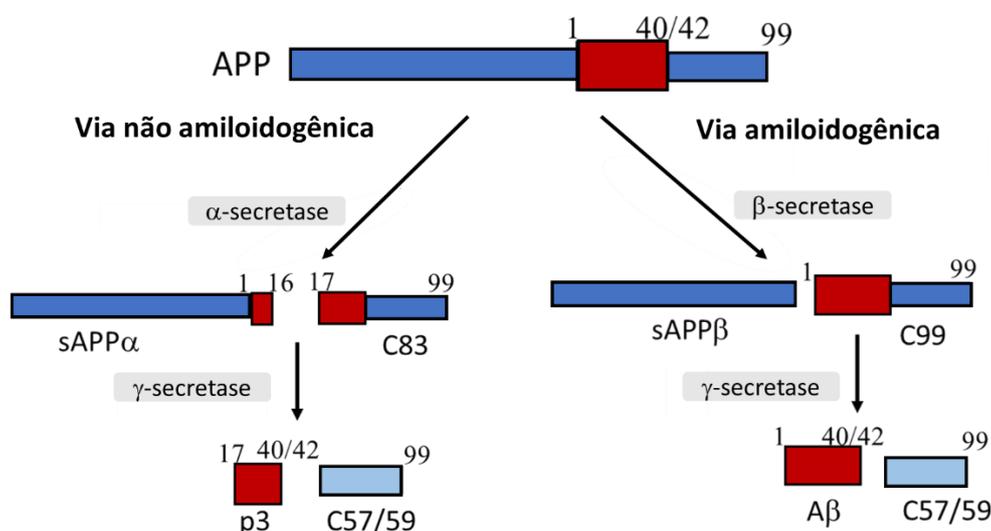


FIGURA 1.2 - Representação do processamento proteolítico da APP pelas enzimas secretases α - β - e γ -. Fonte Adaptada: VARDY et al., 2005

Desta forma, o $A\beta$ gerado no organismo pode ter um comprimento variável, mas é mais comumente encontrado no organismo com 40 ou 42 aminoácidos em sua estrutura.⁹ Esse peptídeo passa por um processo de agregação espontâneo a partir da sua forma monômero, passando então por intermediários, os oligômeros e as protofibrilas, até a formação de espécies fibrilares que se arranjam em folhas beta pregueadas que vêm a formar as placas amiloides,

também chamadas de placas senis, no cérebro.^{1, 38} Os monômeros do fragmento 1-42 do peptídeo beta-amiloide ($A\beta_{1-42}$), são as espécies mais propensas à agregação e, portanto, mais as que causam mais danos, tendo efeito tóxico para as células.¹⁰

Acredita-se que as placas amiloides interferem na comunicação entre os neurônios nas sinapses.¹ Sendo assim, o $A\beta$ tornou-se alvo de estudos para desenvolvimento de agentes diagnósticos e terapêuticos para a DA, os quais focam principalmente em atuar na alteração da formação dos agregados amiloides e, assim, evitar sua ação tóxica.¹⁶

É importante que o tratamento seja iniciado o mais cedo possível, de forma a atrasar ou interromper a progressão da doença, desta forma, os estágios de pré-demência da DA são importantes alvos dos estudos para o desenvolvimento de medidas preventivas frente a evolução da demência.⁶

1.1.3. O processo de agregação

O peptídeo $A\beta$ tem alta propensão a agregação e, embora uma característica da DA seja a formação das placas amiloide, elas não necessariamente são a principal causa da doença.

Como o peptídeo pode existir em várias formas durante seu processo de agregação, incluindo monômeros, dímeros, oligômeros, protofibrilas e as fibrilas que formam as placas senis, é de extrema importância conhecer o processo de agregação para o estudo do peptídeo de forma a melhorar a compreensão dos efeitos tóxicos do $A\beta$ e encontrar maneiras de impedir ou minimizar tais efeitos.³⁹

Além da toxicidade causada pela formação das placas amiloides por conta de acúmulo de agregados fibrilares, os monômeros e oligômeros, por exemplo, também podem contribuir para a toxicidade uma vez que podem ser incorporados na membrana celular e causar permeabilização. Muitos trabalhos hoje também indicam que as espécies oligoméricas do $A\beta$ são, na verdade, as mais tóxicas.³⁹

Um dos métodos mais comumente utilizado para monitorar o processo de agregação do peptídeo *in vitro* é por meio de um ensaio usando o corante orgânico Tioflavina T (ThT). Isso pois a estrutura da ThT consiste em dois anéis com uma ligação entre eles, que permite a rotação entre os anéis e, portanto, o composto não emite. Porém, ao entrar em contato com as fibrilas do A β , a interação restringe o movimento dos anéis, e a molécula passa a emitir em 480 nm, tendo um aumento de luminescência conforme as fibrilas vão se formando no processo de agregação.^{40, 41, 42, 43}

Mesmo sendo amplamente utilizado, este corante apresenta emissão em 480 nm, região onde biomoléculas, como algumas proteínas, colágeno e flavinas, absorvem luz. Além disso, é um corante orgânico que tem absorção e emissão em comprimentos de onda próximos, o que pode levar à molécula a absorver a própria luz e a uma resposta falsa de emissão e é um marcador apenas para as espécies fibrilares. Além disso, já foi reportado anteriormente que a ThT pode apresentar respostas luminescentes diferentes para diferentes amostras do peptídeo A β e mostrar resultados errôneos de emissão por influência de espécies em solução que possam ter efeito similar na restrição do movimento da molécula, levando a luminescência da ThT.^{43, 44}

O ensaio com a ThT resulta em uma curva sigmoide para a cinética de agregação do peptídeo A β . Através dessa curva é possível identificar os diferentes estágios da agregação: inicialmente, há uma fase lag de nucleação na qual há monômeros solúveis compostos majoritariamente por estruturas de alfa hélice, em seguida observa-se um rápido crescimento, ou alongamento, que é quando começa ocorrer a formação de espécies maiores como as protofibrilas e por fim há uma fase de saturação na qual as fibrilas já estão formadas, apresentando uma conformação de folhas beta nesse estágio, esses dois últimos estágios são denominados a fase de alongação.⁴⁵

O início do processo de agregação depende fortemente da fase de nucleação. Essa fase pode ocorrer por conta de uma interação entre os

monômeros, que é termodinamicamente desfavorável, o que resulta em uma fase lag mais lenta. Ou, pode haver sementes de agregação no meio, como metais ou até mesmo espécies maiores do próprio peptídeo, como protofibrilas, que vão favorecer o início do processo de agregação fazendo com que a nucleação seja mais rápida e reflète-se na curva em uma fase lag menor, e um processo de agregação mais rápido, Figura 1.3.⁴⁵

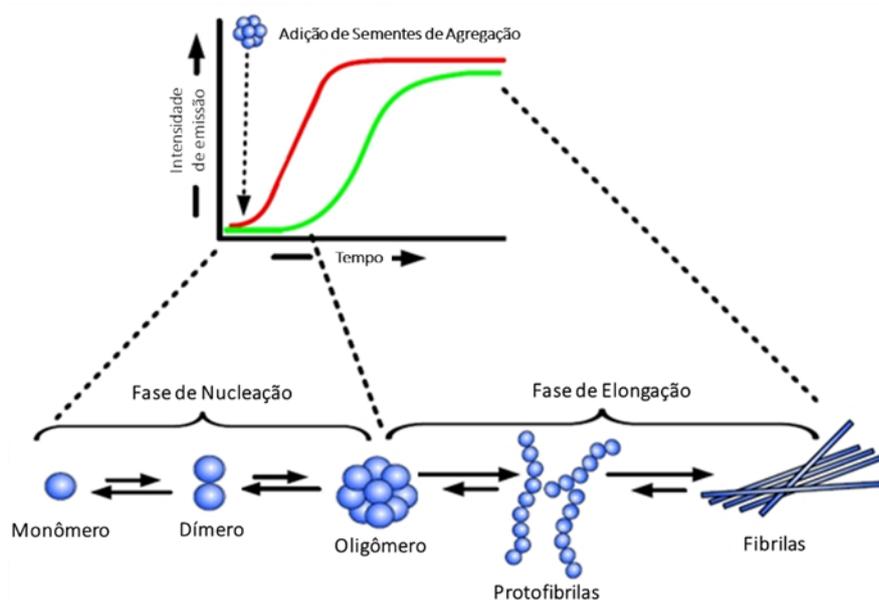


FIGURA 1.3 - Exemplo de cinética de agregação regular e com a adição de fibrilas. Fonte Adaptada: KUMAR; WALTER, 2011

A adição de espécies externas ao processo de agregação do A β podem atuar como semente de agregação, que acelera o processo ou atua como interferente atrasando o processo de agregação ou até mesmo o modificando. Estudos já mostraram que a adição de diferentes moléculas junto ao A β durante a agregação pode diminuir a toxicidade do peptídeo possivelmente por alterar o processo.^{46, 47, 48} Outros estudos mostram que quando a agregação do peptídeo A β ocorre na presença de outras proteínas amiloides, há alteração na formação das fibrilas, levando a formação de agregados mistos que não apresentam toxicidade, esse processo é denominado agregação cruzada.^{49, 50, 51}

A agregação do peptídeo A β depende de fatores como a concentração de sal no meio, pH e temperatura e o fragmento do peptídeo. O A β pode ser encontrado em diversos fragmentos, porém duas formas do peptídeo são mais abundantes e mais estudados, o A β_{1-40} e o A β_{1-42} . O fragmento A β_{1-40} é o mais abundante no organismo, porém o A β_{1-42} é o mais tóxico por conta dos dois resíduos de aminoácidos a mais na extremidade da estrutura do peptídeo, que têm caráter hidrofóbico e aumentam a propensão a agregação, e assim, os dois fragmentos apresentam características diferentes quanto ao caminho de agregação, toxicidade e permeabilidade da membrana.^{52, 53}

1.2. Modelos Miméticos de Membrana Celular

As membranas celulares são de extrema importância para as células, por separar o interior celular do ambiente externo e por controlar o fluxo do que entra e sai da célula.

Por conta disso, as membranas apresentam uma estrutura extremamente complexa já que esta pode ser composta de uma variedade de lipídeos com diferentes propriedades físicas, como carga, peso, área transversal, temperatura de transição, que afetam diretamente as propriedades da membrana, e, também diversas proteínas de membrana, com diversas funcionalidades, como por exemplo atuar como receptores que permitem a resposta da célula a sinais externos ou transporte de determinadas moléculas através da membrana, o que aumenta ainda mais a complexidade da membrana.^{54, 55, 56}

Apesar de seu funcionamento complexo, as membranas celulares em geral apresentam um componente estrutural comum sendo majoritariamente compostas de fosfolipídios que se arranjam em bicamadas por conta da sua característica anfífilica o que faz com que elas se mantenham juntas por interações hidrofóbicas das cadeias alquil.⁵⁴

Tendo isso em mente, uma maneira desenvolvida para superar as dificuldades de trabalhar com sistemas de membranas naturais, foi a utilização de

modelos de membrana que permitem mimetizar as propriedades estruturais e funcionais, como por exemplo as jangadas lipídicas, que são regiões ricas em colesterol e esfingolípídios, sob condições definidas e controladas de acordo com o que está sendo estudado e, desta forma, os modelos podem ser analisados e ter suas propriedades intrínsecas definidas a partir de uma variedade de técnicas biofísicas.^{57, 58, 59, 60}

Como a maior parte da bicamada que compõe a membrana celular é composta por lipídios, os sistemas modelo são formados com um lipídio ou uma mistura determinada deles que dará esse sistema modelo características específicas permitindo uma investigação biofísica sistemática para os processos relacionados à membrana.⁶¹ Exemplos de sistemas de modelo de membrana mais utilizados e que permitem análises são: vesículas ou lipossomos, que são sistemas que se formam pelo arranjo dos fosfolípídeos em bicamadas formando uma esfera com um compartimento interno aquoso, Figura 1.4 (A), monocamadas de Langmuir, é um dos modelos mais básicos que consiste em uma camada de lipídeos formada em uma interfase ar/subfase aquosa Figura 1.4 (B) e bicamadas lipídicas suportadas (SLBs), que são os modelos geralmente preferidos devido à sua capacidade de mimetizar sistemas complexos de membranas biológicas e são formadas em superfícies sólidas hidrofílicas como vidro ou mica, por exemplo, Figura 1.4 (C).^{62, 63, 64, 65}

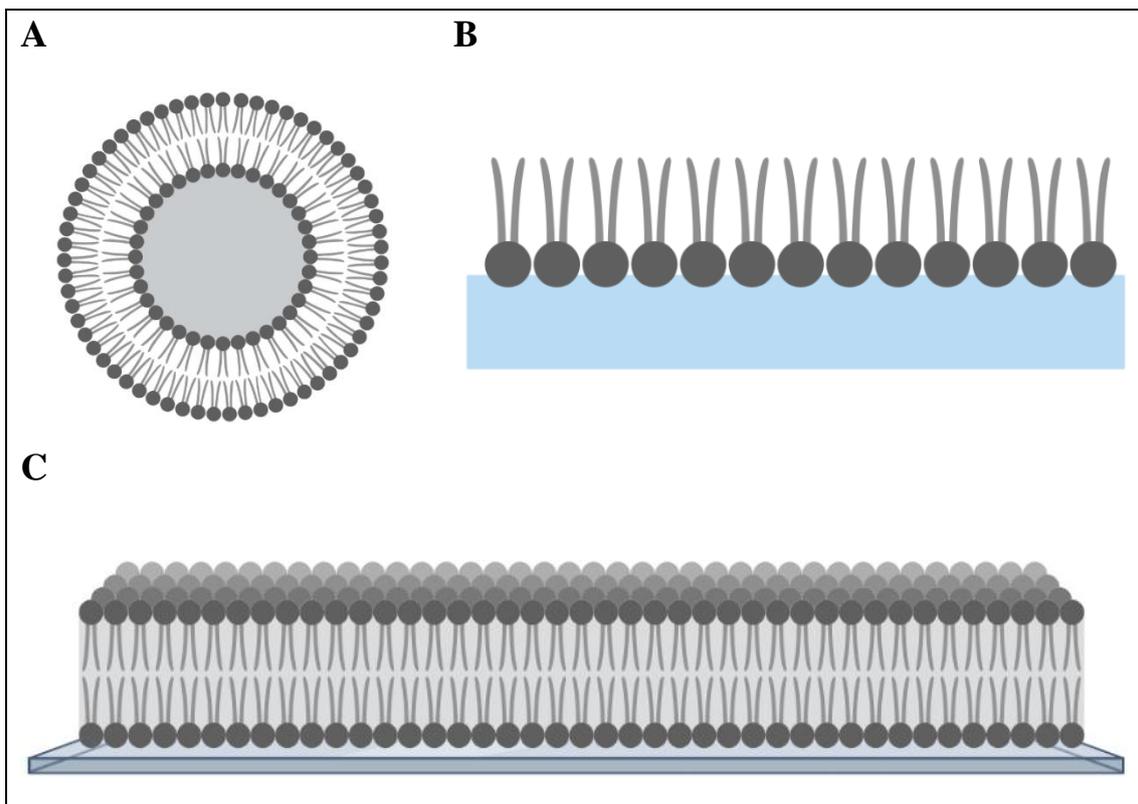


FIGURA 1.4 - Representação dos modelos miméticos de membrana celular (A) Lipossomo ou vesícula (B) Monocamadas de Langmuir e (C) Bicamadas lipídicas suportadas (SLBs).

Esses modelos são amplamente usados para o estudo da entrega e interações de fármacos com a membrana de forma a prever propriedades farmacocinéticas de medicamentos como transporte, biodistribuição e acumulação e seus efeitos nas propriedades estruturais uma vez que a bicamada lipídica mantém a integridade da célula.^{65, 66} Assim como interação com peptídeos, proteínas, polímeros, nanocarregadores e outras moléculas.^{60, 67}

1.3. Interação beta amiloide e membrana celular

Tendo em vista a utilização de modelos miméticos de membranas celulares para investigações de interações e, considerando uma hipótese que tem ganhado força no meio científico é de que os efeitos tóxicos do A β podem estar relacionados com a interação do peptídeo com a membrana das células neuronais, vários trabalhos na literatura são voltados para essa proposta.^{57, 68}

As interações entre o A β e a membrana podem acontecer de diferentes maneiras. O peptídeo A β pode se inserir na membrana e formar estruturas semelhantes a poros, Figura 1.5 (A), e aumentar a permeabilidade, o que faz com que ocorra o transporte de íons pela membrana levando à um aumento nos níveis do íon Ca²⁺ intracelular desestabilizando a homeostase celular, levando a célula a caminhos apoptóticos.^{69, 70, 71, 72} O A β também pode se ligar à superfície da membrana quando em sua forma monomérica, Figura 1.5 (B).⁷⁰

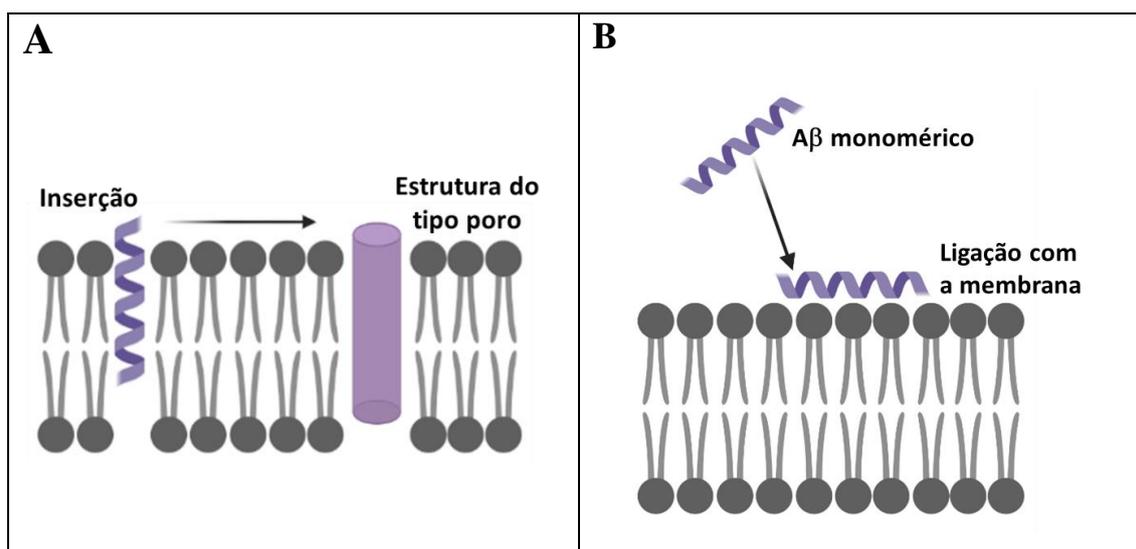


FIGURA 1.5 - Ilustração das maneiras com que o A β pode interagir com a membrana celular (A) Se inserindo e formando poros e (B) se ligando à membrana quando em sua forma monomérica. Fonte Adaptada: NIU et al., 2018.

É importante ressaltar que os tipos de interação não são completamente independentes, às vezes a interação vai depender da proporção lipídio/proteína.⁷⁰ Por exemplo, A β se liga à superfície da membrana quando em proporções mais altas e se insere na membrana à medida que a proporção diminui. Ainda, há evidências de que o mecanismo de interações entre o A β e a membrana está especialmente relacionado a interações eletrostáticas entre os aminoácidos carregados positivamente presentes no peptídeo e as cabeças polares dos lipídeos e a interações hidrofóbicas que normalmente ocorrem entre os aminoácidos

aromáticos e partes mais hidrofóbicas da sequência de aminoácidos do peptídeo e as cadeias carbônicas dos lipídios.^{70, 73}

Outro fator a considerar é que as diferentes conformações do peptídeo A β durante o processo de agregação podem interagir de forma a mudar as propriedades biofísicas do modelo de membrana.^{74, 75, 76, 77} Por exemplo, estudos de Peters e colaboradores⁷⁸ mostram que o A β reduz a fluidez da membrana e que, em sua forma oligomérica, acelera o processamento da APP pelo caminho amiloidogênico. Outro exemplo destaca que a ligação e incorporação de oligômeros e protofibrilas do A β_{1-42} às vesículas lipídicas leva a perda da integridade da membrana, enquanto os monômeros e fibrilas tem impacto menor.⁷⁹

Outros estudos apontam ainda que a interação do A β altera a sinalização de receptores de membrana.^{80, 81, 82} O distúrbio de íons Ca²⁺ anteriormente citado, também pode ser causado por conta da sinalização alterada de receptores e, ainda o acúmulo de espécies tóxicas do A β , pode ser responsável pela regulação negativa dos receptores neuronais de insulina.⁸³

Mais um fator que tem influência nas interações entre o A β e os modelos de membrana é a composição lipídica. A formação jangadas lipídicas, que são regiões ricas em colesterol e esfingolipídios, é um fator fundamental que pode regular o processo de agregação e a toxicidade dos peptídeos A β .^{84, 85}

A membrana neuronal pode, ainda, atuar como um núcleo de semente para a agregação do A β quando há a interação dos monômeros com a membrana, aumentando a taxa de nucleação secundária e alterando mecanismos da cinética de agregação.^{86, 87, 88} Estudos com dicroísmo circular indicaram que o A β_{1-42} apresentou maior formação de folhas beta quando incorporado em uma bicamada lipídica, causando também o rompimento mais severo da membrana.⁸⁹ Ainda, na presença de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) compostas de lipídeos neutros 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), o ensaio com Tioflavina T mostrou uma alteração no processo de agregação do A β_{1-42} ,

diminuindo o tempo de agregação, assim como na morfologia das fibrilas formadas analisadas por AFM.⁹⁰

Estudos computacionais indicam que a agregação ocorre em diferentes graus quando o A β está em contato com membranas de diferentes composições, e que, uma vez formados, os agregados tendem a permanecer no ambiente lipídico.^{91,92} Outro estudo indica que cerca de 20% dos monômeros de A β_{1-40} são rapidamente adsorvidos na superfície da membrana, e que diferentes segmentos na sequência hidrofóbica do A β iniciam a ligação à membrana e essas interações conduzem o processo de nucleação. Isso causa uma perturbação no arranjo lipídico e há uma diferença estrutural nas fibrilas formadas quando o A β está associado à membrana.⁹³

Interações eletrostáticas também tem influência na agregação do peptídeo. Para membranas lipídicas contendo maior quantidade de lipídios carregados negativamente há uma mudança na estrutura do peptídeo, o que pode ser um catalisador para uma mudança estrutural e agregação do A β quando em contato com a membrana.^{94,95}

O peptídeo A β também é capaz de interagir de forma específica com determinados componentes da membrana como o colesterol ou gangliosídeos. Em membranas de POPC contendo 10% mol do gangliosídeo GM1 ou do colesterol, a associação do A β_{1-42} foi favorecida e causou perturbações na membrana.⁹⁶

Muitos trabalhos indicam que o colesterol aumenta a interação entre o peptídeo A β e a membrana.^{90,97} Por exemplo, é reportado na literatura que em modelos de membranas contendo colesterol a agregação do peptídeo acontece mais rapidamente.⁹⁸

Habchi e colaboradores⁹⁹ mostraram que vesículas contendo o lipídio 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e colesterol promoveram um aumento na taxa de nucleação primária do A β_{1-42} em até 20 vezes, indicando que o colesterol contribui para no início da agregação do A β .

Alterações na composição lipídica da membrana destacam um papel significativo do gangliosídeo GM1, que forma clusters na membrana. O A β se liga especificamente a esses clusters promovendo as interações entre o A β e a membrana, e forma fibrilas com toxicidade significativa.^{100,101} Hu e colaboradores mostraram que em bicamadas contendo GM1 verificou-se que o A β_{1-40} interage com o anel galactose do gangliosídeo, o que leva a sua ligação na superfície da membrana e, desta forma, a agregação do peptídeo.¹⁰²

1.4. Complexos de Rutênio

Os complexos de rutênio, em especial os complexos polipiridínicos de Ru(II), são amplamente estudados por conta de suas propriedades fotoquímicas, fotofísicas e eletroquímicas que podem ser ajustadas de acordo com os ligantes coordenados ao rutênio e a aplicação desejada e, por conta disso, são interessantes para potenciais aplicações biológicas como sondas e compostos terapêuticos.^{103,104}

O interesse nesse tipo de complexo é grande pois eles apresentam uma combinação única de estabilidade química, propriedades redox, reatividade no estado excitado, emissão intensa e longos tempos de vida, além de usualmente absorverem luz na região do visível.¹⁰⁵ Essa estabilidade se dá pois nesses complexos o rutênio usualmente se encontra no estado de oxidação Ru²⁺ e é um sistema d⁶. Com a aproximação dos ligantes, os orbitais d que antes possuíam mesma energia, passam a se dividir nos orbitais d t_{2g}, de menor energia, e e_g, de maior energia, de forma que os 6 elétrons de valência ocupem os 3 orbitais de menor energia o que leva a uma distribuição eletrônica estável e permite que o centro metálico seja capaz de receber elétrons dos ligantes por ter orbitais vazios disponíveis e, com isso, os complexos de Ru(II) apresentam uma geometria octaédrica com seis sítios de coordenação.^{105,106}

Os ligantes polipiridínicos, como a 1,10-fenantrolina, podem atuar com um ligante σ doador através do par de elétrons não ligantes sobre o átomo de

nitrogênio e como π receptores por conta dos orbitais disponíveis dos anéis aromáticos. As características luminescentes desses complexos se dão por conta da promoção de um elétron de um orbital $d\pi$ do metal para um orbital do π^* vazio do ligante, o que dá origem a uma transição eletrônica de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT). Podem ocorrer também transferências de carga entre orbitais $d\pi$ e $d\sigma^*$ centrados no metal (MC) bem como as transições eletrônicas de transferência de carga interna do ligante (ILCT). Nesses estados excitados o elétron pode ter multiplicidade singlete ou tripleto, no caso do rutênio, por ser um átomo pesado com acoplamento spin-órbita, quando no estado excitado singlete, o elétron passa para um estado tripleto, por meio de uma transição não radiativa e é por conta disso que esses compostos normalmente apresentam longos tempos de vida de emissão, Figura 1.6.¹⁰⁵

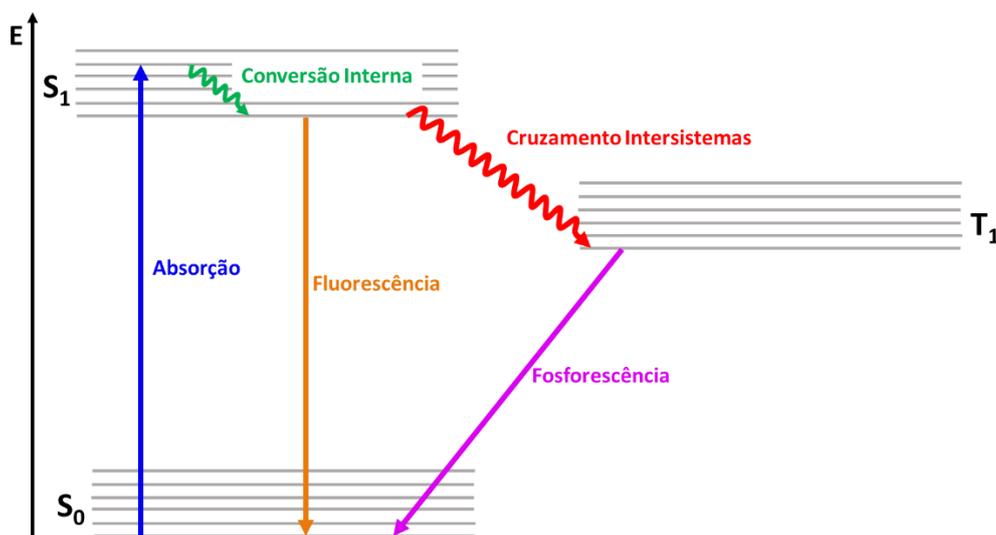


FIGURA 1.6 - Diagrama de Jablonski mostrando as transições radiativas e não radiativas de um processo de absorção e emissão de luz no qual S_0 é o estado fundamental singlete, S_1 o estado excitado singlete e T_1 o estado excitado tripleto.

No contexto biológico, os complexos de rutênio se destacam como potenciais agentes terapêuticos principalmente por sua baixa toxicidade.^{103, 107} Desta forma, esses complexos são também potenciais candidatos como terapia e sonda para o peptídeo $A\beta$. Por exemplo, os complexos PMRU20, NAMI-A e

KP1019 são candidatos como anticancerígenos, porém testes adicionais mostraram que eles também têm efeito frente ao A β Figura 1.7.^{108, 109} O PMRU20, por exemplo, retardou o processo de agregação do A β e protegeu os neurônios corticais de ratos da toxicidade do A β ₁₋₄₂, porém foi necessária uma incubação prévia com o peptídeo para surtir esse efeito.^{108, 110, 111}

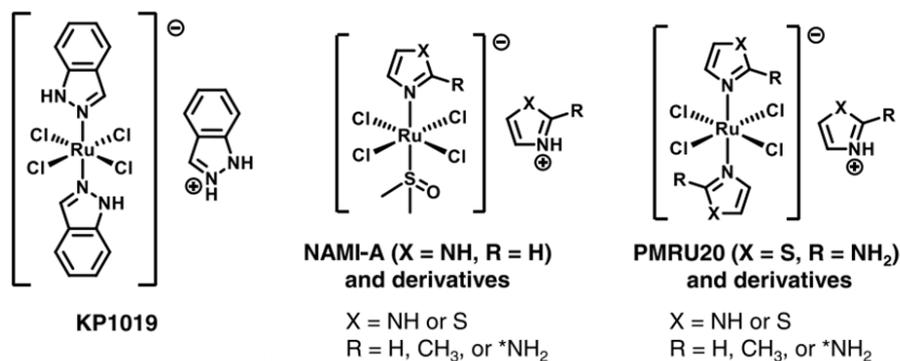


FIGURA 1.7 – Diferentes estruturas de complexos de rutênio que apresentaram modificações na agregação do peptídeo A β . Fonte Adaptada: WALL et al., 2021

Os complexos polipiridínicos de rutênio (II) podem ser uma boa alternativa pois podem ser ativados com a luz, ou seja, pode ocorrer a dissociação de ligantes, e desta forma disponibilizando sítios de ligação o que torna o complexo capaz de se ligar a alvos biológicos. Além disso, para complexos com ligantes quelantes como a 2,2-bipiridina ou a 1,10-fenantrolina, que são hidrofóbicos, podem favorecer interações com determinados aminoácidos do peptídeo. Além disso, já foi relatado que esse tipo de composto apresenta inibição significativa na agregação do A β .^{108, 112, 113}

Tais complexos de Ru(II) podem também atuar como sondas luminescentes, como por exemplo o [Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺, que tem um efeito de *photoswitch* quando em contato com o peptídeo, ou seja, a interação faz com que o composto passe a apresentar emissão, um efeito similar ao que ocorre com a ThT.^{108, 114, 115} Outros trabalhos também já apontaram que complexos contendo ligantes piridínicos capazes de fazer ligações de hidrogênio, como aminas

primárias por exemplo, tiveram maior impacto frente a agregação e a toxicidade do A β .¹¹¹ Desta forma, os complexos polipiridinicos de rutênio surgem como uma alternativa interessante para estudos biológicos e com o peptídeo A β .

1.5. Proposta de Trabalho

Considerando a relevância que a Doença de Alzheimer tem atualmente, a toxicidade do peptídeo A β e sua relação com a membrana neuronal, este trabalho buscou investigar como o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ (RuApy), phen = 1,10-fenantrolina e 3,4Apy = 3,4-diaminopiridina afeta a agregação do peptídeo A β ₁₋₄₂, utilizando técnicas espectroscópicas de luminescência, microscopia de luminescência, citotoxicidade celular e dicroísmo circular. Pretendeu-se também investigar o mecanismo de interação do complexo RuApy com modelos de membrana celular de variadas composições lipídicas por meio de microscopia por imagem fluorescente e espectroscopia de fluorescência e como isso poderia afetar a interação do peptídeo A β ₁₋₄₂ com a membrana.

1.6. Justificativa

A partir da hipótese de que o peptídeo A β está diretamente ligado a causa da DA, é de interesse desenvolver compostos que atuem como agentes terapêuticos ou como sondas luminescentes para monitorar a agregação do peptídeo. Outro fator altamente relevante nos estudos do peptídeo A β é com relação a interação do peptídeo com as membranas celulares, que desencadeia a toxicidade do A β .

As pesquisas do laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LaFIB) estão direcionadas para o desenvolvimento de complexos polipiridinicos de Ru(II) luminescentes para aplicação biológica principalmente para atuar no diagnóstico de doenças neurodegenerativas bem como doenças

ocasionadas por desordens sistêmicas como a Doença de Alzheimer e o Diabetes.^{116, 117, 118}

Os estudos realizados no laboratório com o complexo RuApy, mostram que o complexo é absorvido e acumula na região citoplasmática da célula neuronal Neuro2A sem toxicidade aparente e por conta de suas propriedades luminescentes, mostrou-se uma sonda sensível para obtenção imagens por microscopia de luminescência (FLIM), permitindo identificar as espécies geradas no curso da agregação pela marcação luminescente de diferentes conformações do peptídeo $A\beta_{1-40}$.^{118, 119} O complexo também reconhece o processo de agregação de outros fragmentos do peptídeo, $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{11-22}$ e $A\beta_{29-40}$, e apresentou propriedades terapêuticas, protegendo as células neuronais da linhagem PC-12 das espécies oligoméricas do $A\beta_{1-40}$ por meio da alteração do mecanismo de agregação para um caminho não tóxico.¹²⁰ Além disso, esse mesmo complexo foi também capaz de atuar como uma sonda luminescente para o processo de agregação da Insulina Bovina, que é uma proteína amiloide.¹²¹

O fato de os estudos prévios mostrarem que o complexo RuApy é uma potencial sonda luminescente além de inibir a toxicidade do $A\beta_{1-40}$ motivaram a investigação do efeito do complexo frente ao processo de agregação do fragmento $A\beta_{1-42}$ que além de ser um dos mais abundantes no organismo, é o considerado mais tóxico.

Considerando que a toxicidade do $A\beta_{1-42}$ pode causar danos e está associada a interação deste com a membrana celular, a influência e o efeito da interação do complexo RuApy com os modelos miméticos de membrana celular é relevante e será investigado nesse projeto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a influência do complexo RuApy no processo de agregação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ e avaliar a interação entre o complexo e os modelos de membrana de diferentes composições lipídicas e como isso poderia influenciar nas interações entre o peptídeo e membrana celular, além de verificar o efeito do RuApy na toxicidade do $A\beta_{1-42}$ frente as células neuronais. Estes estudos podem contribuir para o entendimento do mecanismo de patogênese da Doença de Alzheimer e, portanto, levar a descoberta de novos agentes teranósticos contra as espécies tóxicas do $A\beta_{1-42}$.

2.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar e caracterizar o complexo RuApy;
2. Investigar o processo de agregação do $A\beta_{1-42}$ em tempo real na ausência e presença do RuApy;
3. Efeito do complexo RuApy na toxicidade do peptídeo $A\beta_{1-42}$ para células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
4. Estudar o mecanismo de interação entre o complexo e os modelos de membrana com diferentes composições lipídicas;
5. Efeito do complexo sobre a interação do $A\beta_{1-42}$ com os modelos de membrana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os reagentes usados nas sínteses dos complexos foram cloreto de rutênio ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 1,10-fenantrolina (phen), cloreto de lítio (LiCl), 3,4-diaminopiridina (3,4Apy) e hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6), todos de procedência Sigma Aldrich. Na preparação das soluções tampão (PBS e tampão fosfato de sódio 10mM), foram utilizados os reagentes fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl) de procedência Êxodo Científica.

Os solventes orgânicos utilizados para a síntese (etanol) e para a preparação dos lipídios (clorofórmio) foram de grau de pureza HPLC. Para a síntese do complexo e a preparação das soluções tampão foi utilizada Água Milli-Q.

O peptídeo beta-amiloide 1-42 ($\text{A}\beta_{1-42}$) utilizado foi de procedência GenScript na forma liofilizada e com >95% de pureza. O Hexafluoro-2-propanol (HFIP) utilizado na preparação do peptídeo foi de procedência Sigma Aldrich e o hidróxido de sódio (NaOH) foi de procedência Êxodo Científica.

Os lipídios utilizados nas análises de interação foram: 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1-oleoil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina (NBD-PC), Esfingomiéline (SM), Gangliosídeo Monosialotetrahexosilgangliosídeo (GM1), todos de procedência Avanti Polar Lipids, Inc. O Colesterol (Chol) foi de procedência Sigma Aldrich e o N-

(TexasRedsulfonil)-1,2-dihexadecanoil-snglicero-3-fosfoetanolamina (Texas Red-DHPE ou TR-DHPE) foi de procedência Termo Fischer Scientific.

O álcool poli vinílico (PVA), a glicose e a sacarose utilizados na preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs) foram de procedência Sigma Aldrich.

O polímero polidimetilsiloxano (PDMS) utilizado na preparação dos dispositivos microfluídicos foi de procedência Dow Corning (SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit).

3.2. Síntese

3.2.1. Complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂(Cl)₂]

O complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂(Cl)₂] foi obtido seguindo um procedimento previamente descrito na literatura, com modificações.¹²²

Em um balão de fundo redondo de 50 mL com 15 mL de dimetilformamida (DMF) previamente destilado e desaerado, solubilizou-se 200 mg (0,76 mmol) de cloreto de rutênio (RuCl₃.3H₂O), 345 mg (1,90 mmol) de 1,10-fenantrolina e 259 mg (6,08 mmol) de cloreto de lítio (LiCl), nessa ordem. A mistura reacional, foi mantida sob refluxo por 8 horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação e aquecimento constantes. A rota sintética está apresentada na Figura 3.1.

Após 8 horas de reação, a mistura reacional foi filtrada à quente. O precipitado foi lavado com água gelada até que o filtrado, inicialmente de coloração amarela, ficasse incolor. Tal procedimento é feito para remover qualquer resquício do produto secundário que é formado durante a síntese como o complexo [Ru(phen)₃]²⁺ que tem coloração característica amarela e é solúvel em água.

Após esta etapa, o sólido de coloração escura obtido foi seco sob vácuo. O rendimento foi de 42%.

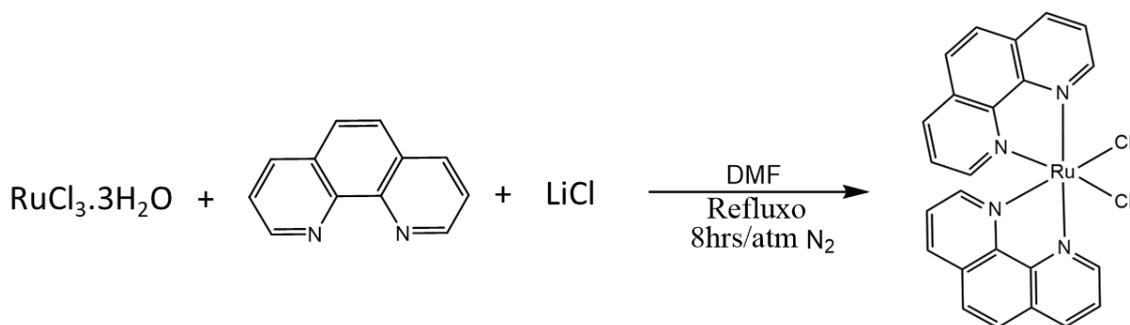


FIGURA 3.1 - Esquema da síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂].

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

A síntese do complexo RuApy foi feita de acordo com procedimento previamente descrito na literatura.¹¹⁸

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram colocados 6 mL de etanol e 6 mL de água. A mistura foi mantida sob agitação contínua e o sistema foi desaerado por cerca de 15 minutos. Na sequência adicionou-se 150 mg (0,28 mmol) do complexo *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] e 61,5 mg (0,57 mmol) do ligante 3,4-diaminopiridina (3,4Apy). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 8 horas sob atmosfera inerte de nitrogênio, agitação e aquecimento constantes. A rota sintética está apresentada na Figura 3.2.

Após este período, resfriou-se a solução e adicionou-se 92 mg (0,57 mmol) de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆) para a precipitação do complexo. A mistura foi mantida sob refrigeração por uma noite para a precipitação completa do composto. O sólido obtido foi filtrado à vácuo e lavado com água gelada. Após secar, o rendimento obtido para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ foi de 60%.

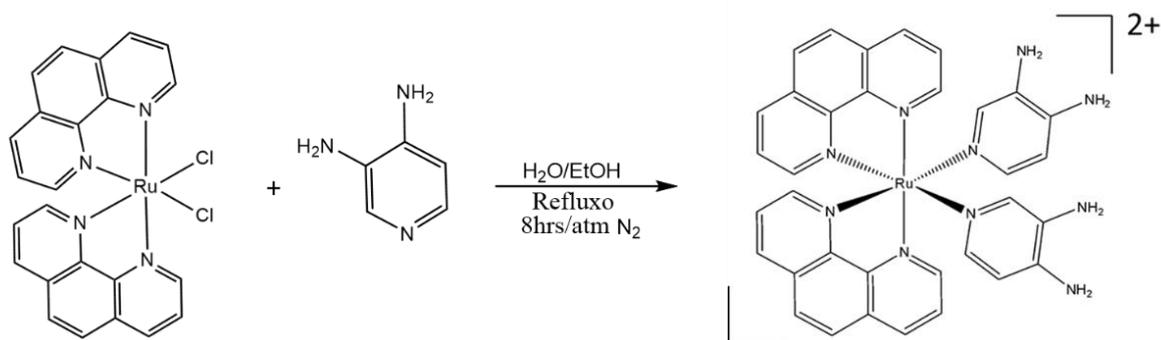


FIGURA 3.2 - Esquema da síntese do complexo cis - $[Ru(phen)_2(3,4Apy)_2]^{2+}$.

3.3. Equipamentos e Metodologia

3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de 1H

O espectro de RMN para caracterização do complexo foi realizado no espectrofotômetro BRUKER DRX 400 MHz no laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar. Para tal, uma amostra foi preparada solubilizando 3 mg do complexo cis - $[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$ em 600 μ L do solvente DMSO- d_6 .

3.3.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica na Região do UV-Vis

Os espectros de absorção no UV-Vis para estudos espectroscópicos foram realizados com o espectrofotômetro Agilent 8453. Para todas as medidas para obtenção e espectros de absorção foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho ótico 1 cm e volume 3,5 mL.

3.3.3. Espectroscopia de Luminescência

3.3.3.1. Medidas de Luminescência no Estado Estacionário

Os espectros de emissão foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC com lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928. Para as análises de caracterização do complexo cis - $[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$ e do complexo junto a vesículas unilamelares

grandes (LUVs) em diferentes concentrações utilizou-se uma cubeta hellma de quartzo de 4 janelas, caminho óptico de 1 cm e volume de 3,5 mL. Para os ensaios realizados com o peptídeo A β ₁₋₄₂, na presença e ausência do complexo RuApy, todos na concentração de 20 μ M, sempre mantendo a proporção 1:1, utilizou-se uma cubeta hellma de quartzo de 4 janelas, caminho óptico de 1 cm e volume de 700 μ L.

3.3.3.2. Medidas de Luminescência Resolvida no Tempo

As medidas de tempo de vida de emissão (τ_{em}) foram baseadas no método de contagem de fótons únicos correlacionados com o tempo (TCSPC) com eletrônica fornecida por Becker & Hickl, Alemanha. A fonte de excitação foi um laser pulsado de 450 nm (série PicoQuant-LDH) na frequência de 20 MHz. O sinal de fluorescência foi disperso por um espectrômetro de 19,3 cm (Andor-Kymera) e detectado no modo resolvido no tempo por um detector Híbrido PMT (fotomultiplicador) (PicoQuant) acionado com o laser por TCSPC (PicoQuant-PicoHarp 300). O comprimento de onda de emissão foi selecionado por um monocromador, sendo 655 nm para o complexo RuApy e os fótons emitidos foram detectados por um fotomultiplicador de placas de microcanais Hamamatsu R3809U refrigerado. Para a análise do tempo de vida do complexo, as medidas foram realizadas em uma cubeta hellma de quartzo de 4 janelas, caminho óptico de 1 cm e volume de 3,5 mL e os resultados foram analisados por um software (Fluofit) fornecido pela PicoQuant e o ajuste das curvas de decaimento multiexponencial foi feito usando como parâmetros os gráficos de resíduos ponderados e pelo parâmetro estatístico como qui-quadrado (χ^2).

3.3.4. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos pelo espectrômetro JASCO 7 do Grupo de Biofísica Molecular do Departamento de Física da Universidade de São Paulo no Campus II São Carlos. Para a análise do processo

de agregação do peptídeo A β ₁₋₄₂, no tempo inicial, após 3 horas, 6 horas e 24 horas de incubação nas condições de agregação definidas, utilizou-se soluções de 20 μ M do peptídeo A β ₁₋₄₂ na ausência e presença do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ também na concentração de 20 μ M, mantendo sempre uma proporção 1:1. As medidas foram realizadas em uma cubeta despolarizada de caminho ótico 0,5 cm e volume de 500 μ L.

3.3.5. Microscopia de Fluorescência

3.3.5.1. Para análise das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

As imagens de microscopia de fluorescência e no campo claro para análise das GUVs foram realizadas no microscópio de fluorescência invertido Carl Zeiss modelo Axio Observer 7 utilizando o filtro AlexaFluor 488 para os experimentos em que o complexo RuApy estava presente no meio.

3.3.5.2. Para análise das bicamadas suportadas (SLBs)

As imagens de microscopia de fluorescência das SLBs para análise das interações RuApy/membrana foram obtidas com um Microscópio de Fluorescência Nikon Eclipse Ti-U (Tóquio, Japão) com objetivas de 10X. A diferença na fluorescência dos corantes incorporados na bicamada suportada foi observada usando diferentes conjuntos de filtros, uma vez que eles absorvem e emitem luz em diferentes comprimentos de onda: Para o corante Texas Red DHPE (λ_{exc} =595 nm; λ_{emi} =615 nm), e para o NBD-PC (λ_{exc} =470 nm; λ_{emi} = 530 nm). Os tempos de exposição à luz foram configurados em 500 ms para minimizar o *photobleaching* (do inglês, fotobranqueamento) dos corantes orgânicos, mas ao mesmo tempo fornecer uma boa resposta de intensidade de fluorescência. Além disso, para evitar as reações fotoquímicas do complexo RuApy colocado nos canais para as análises, as medições foram feitas no escuro e apenas uma foto foi tirada para cada condição estudada.

3.3.6. Microscopia por Imagem de Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)

As imagens por tempo de vida de fluorescência foram obtidas em um sistema de medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal MT-200 - PicoQuant, microscópio invertido de detecção Olympus junto ao laboratório de Fotobiofísica na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) da USP. A amostra foi excitada por um laser de diodo pulsado (PicoQuant, 40MHz) de 440 nm (LDH-D-C440) e a emissão foi lida em 600 nm. As amostras, em solução, foram analisadas em lamínulas Deckgläser 20x20 mm. As imagens foram adquiridas e processadas pelo software operacional do microscópio, SymPhoTime.

3.3.7. Processo de Preparação do Peptídeo A β ₁₋₄₂

Trabalhos prévios do grupo de pesquisa da Professora Rose com o peptídeo A β ₁₋₄₀ seguiam um protocolo pré-estabelecido para a agregação do peptídeo.^{120, 123} Porém tal procedimento não foi ideal para a preparação do peptídeo A β ₁₋₄₂ para os experimentos planejados. Desta forma, tendo como referência alguns protocolos já estabelecidos na literatura, foi desenvolvido um novo procedimento para a preparação do peptídeo A β ₁₋₄₂ de forma a obter sua forma monomérica, assim como sua forma fibrilar após passar pelo processo de agregação.^{124, 125, 126} O protocolo estabelecido seguiu as etapas que serão descritas a seguir e está ilustrado na Figura 3.3.

Com isso, para a obtenção da forma monomérica do peptídeo A β ₁₋₄₂, 1 mg do peptídeo liofilizado obtido comercialmente foi dissolvido em 221 μ L de hexafluoro-2-propanol (HFIP), um solvente que funciona como um desagregador, de forma a obter uma solução de peptídeo com concentração final igual a 1 mM. Esta foi colocada em um sonicador por 10 min para total dissolução da amostra e na sequência distribuiu-se alíquotas em tubos de vidro de 1,5 mL. As amostras

foram mantidas sob atmosfera de N_2 para evaporar todo HFIP e formar um filme do peptídeo nos frascos. Os filmes secos foram imediatamente guardados em freezer a -20°C até posterior utilização para experimentos, não ultrapassando um mês de armazenamento.

Para realização dos experimentos, dissolveu-se o filme formado anteriormente adicionando-se $25\ \mu\text{L}$ de uma solução de NaOH $2\ \text{mM}$, $10\ \mu\text{L}$ de uma solução de NaOH $100\ \text{mM}$ e a amostra foi sonicada por cerca de 10 minutos para garantir que todo o peptídeo estivesse desagregado e, portanto, a solução contivesse apenas de monômeros. Adicionou-se então tampão fosfato salino (PBS) $10\ \text{mM}$ de pH $7,4$, de forma a obter uma solução de concentração $20\ \mu\text{M}$ e essa concentração foi confirmada pela medida do espectro de absorção do $A\beta_{1-42}$ em $280\ \text{nm}$ no espectrofotômetro NanoDrop a partir da absorvidade molar ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1490\ \text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{L}$) e a massa molar do peptídeo ($MM = 4514,1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).¹²⁷

Para os experimentos com monômero a medida é feita imediatamente após a adição do tampão. Para obtenção das fibrilas do $A\beta_{1-42}$ a solução de monômeros passou pelo processo de agregação ao ser mantida sob aquecimento constante de $37\ ^\circ\text{C}$, sem agitação. O pH final da solução ficou próxima de 8 por conta da adição das soluções de NaOH utilizadas para dissolução do filme, que tem também um efeito desagregador.

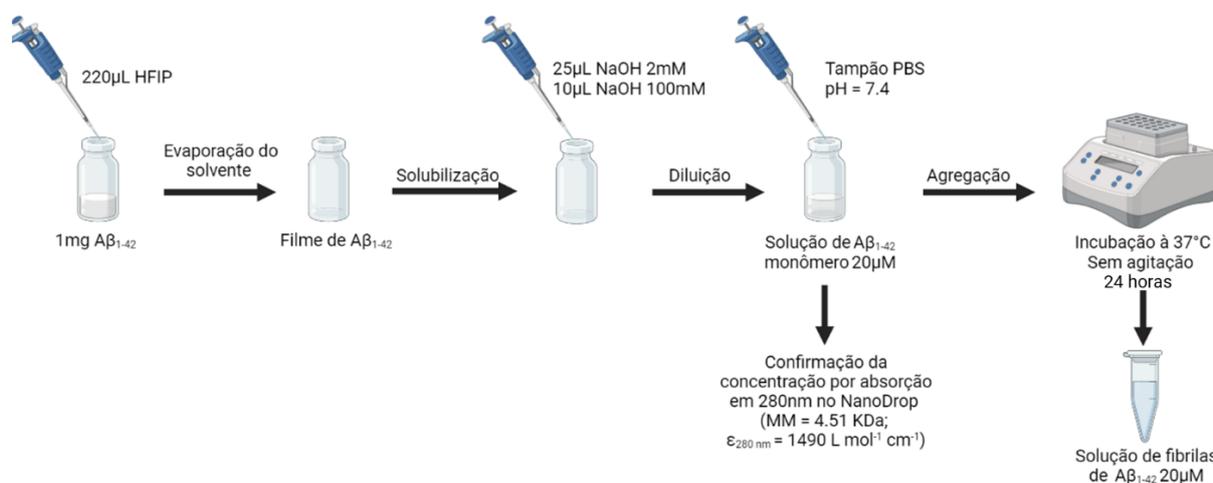


FIGURA 3.3 - Esquema ilustrativo do protocolo estabelecido para a preparação e agregação do peptídeo $A\beta_{1-42}$.

3.3.8. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada a partir do ensaio de MTT, que consiste em uma técnica colorimétrica que utiliza o metabolismo das células saudáveis para avaliar a viabilidade celular. Para isso, utilizou-se o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) que apresenta coloração amarela. Este composto, ao entrar em contato com a enzima redutimétrica NADH produzida pela mitocôndria de células saudáveis, é reduzido metabolicamente para formar um segundo sal formazan (E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan) de coloração violeta, Figura 3.4. Este sal violeta é insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser facilmente solubilizado em solventes orgânicos resultando em uma solução cuja absorbância é proporcional ao número de células viáveis.¹²⁸

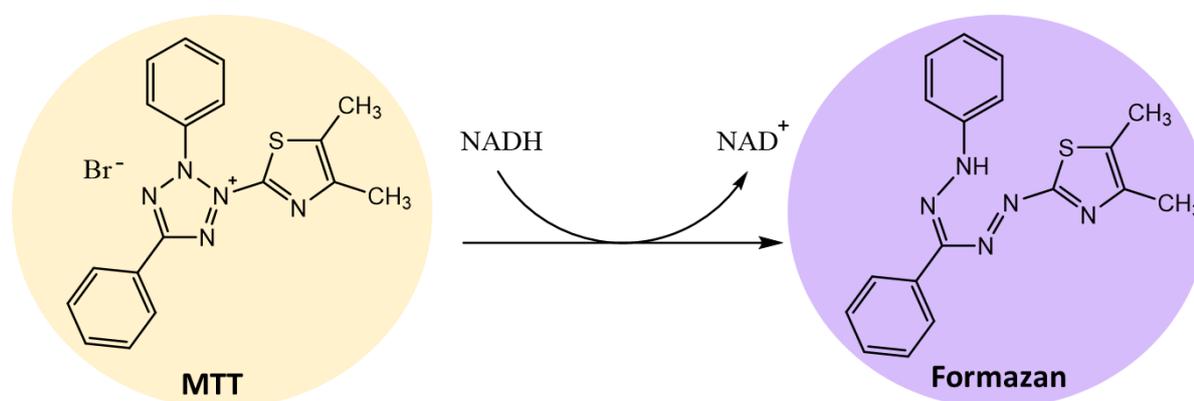


FIGURA 3.4 - Reação de redução do sal amarelo MTT pelo NADH para a formação do sal violeta Formazan.

Neste procedimento, a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi cultivada em meio de cultura DMEM/DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco.) suplementado com 1% Piruvato, aminoácidos 100 α e 10% ATB (antibiótico). Durante o crescimento as células foram mantidas em garrafas de cultivo de 75 mL à 37 °C na estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Quando as células atingiram o crescimento necessário (80% de confluência), o meio de cultura foi removido da garrafa e as células foram tratadas com 2 mL de

uma solução 10% de tripsina/EDTA deixando reagir por 2 minutos. A tripsina é a enzima responsável pela quebra das ligações covalentes que permite que as células se soltem das garrafas. A tripsina foi neutralizada utilizando 2 mL do meio de cultura e a suspensão resultante foi transferida para um tubo cônico e centrifugada à 1200 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi suspenso novamente em um novo meio DMEM/DMEM-F12. Por fim, a suspensão foi semeada em uma placa de 96 poços com concentração final de $2,0 \times 10^4$ células/poço e deixou-se as células aderirem por 24 horas.

Desta forma, para a análise da linhagem SH-SY5Y junto ao complexo RuApy e o peptídeo $A\beta_{1-42}$, dependendo da condição que estava sendo estudada adicionou-se apenas um desses componentes ou mais de um, sendo sempre uma quantidade de 10 μ L de cada um deles.

Para o ensaio com MTT, as placas tratadas com o complexo e o peptídeo foram mantidas em estufa à 37 °C e atmosfera 5% de CO_2 por 24 e 48 horas. Ao final da incubação as placas foram tratadas com uma solução 0,75 mg/mL de MTT e deixadas por no mínimo 3 horas em estufa. O meio de cultura foi retirado dos poços e adicionou-se 100 μ L de DMSO em cada poço, que estoura as células e solubiliza os cristais de formazan formados. A leitura de absorbância da solução resultante foi realizada em um leitor de placas multipoços com filtro em 540 nm. A porcentagem de viabilidade celular calculada de acordo com a Equação 3.1.

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{DO experimento}/\text{DO controle}).100\% \quad \text{Eq. 3.1}$$

Na qual DO é a densidade ótica, medida de transmitância da luz em suspensões biológicas, equivalente à absorbância.

3.3.9. Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)

3.3.9.1. LUVs para estudos de luminescência

As vesículas unilamelares grandes (LUVs) para os ensaios de fluorescência foram preparadas de acordo com o procedimento descrito na literatura.¹²⁹

A partir da concentração final desejada para a solução estoque de vesículas, os lipídios foram pesados, dissolvidos em clorofórmio ou em uma mistura clorofórmio:metanol 2:1 e misturados na composição molar desejada para a composição da vesícula.

Em seguida, o solvente foi evaporado em fluxo de N₂ para formar um filme de lipídeos no fundo do frasco. Para garantir que todo solvente fosse evaporado, esse filme mantido sob vácuo por 2 horas.

O filme seco foi suspenso em 1 mL de solução tampão PBS pH 7,4 e deixado em repouso por cerca de 30 minutos para garantir o equilíbrio da solução. Então, agitou-se o tubo em vórtex por cerca de 2 minutos para obter as vesículas multilamelares (MLV).

Em seguida, para obter as vesículas do tipo unilamelares uniformes foi preciso realizar a extrusão, passando a solução de vesículas multilamelares por uma membrana de policarbonato de 100 nm da Whatman inserida no extrusor Mini-Extruder da Avanti. Essa passagem foi feita por 21 vezes para uniformizar o tamanho das LUVs. Os experimentos de luminescência foram realizados com a solução de vesículas resultantes desse processo, a partir de uma solução estoque, que foi diluída de acordo com as concentrações desejadas para o experimento.

3.3.9.2. LUVs para formação de bicamadas suportadas

O procedimento experimental usado para a preparação das LUVs para a formação das bicamadas suportadas, foi similar ao método de preparação descrito na literatura^{130, 131} que é o procedimento estabelecido e utilizado no

laboratório do Prof. Dr. Paul Cremer na Penn State. Neste método, para uma concentração final de 1 mg/mL, volumes determinados dos lipídios na composição molar desejada foram misturados em clorofórmio e depois secos sob uma corrente de N₂ para remover todo solvente orgânico. Para remover o solvente residual, os lipídios foram colocados sob vácuo por no mínimo 2 horas.

O filme lipídico foi reidratado com um determinado volume de tampão PBS pH 7,4 de forma a obter a concentração final de 1 mg/mL. Em seguida, as suspensões foram submetidas a 10 ciclos de congelamento-descongelamento utilizando nitrogênio líquido e um banho de água morna para que o filme lipídico desgrudasse do fundo do frasco e assim formasse as MLV. Depois disso, a mesma solução passou por um processo de extrusão no extrusor LIPEX Extruder, 10 mL, Northern Lipids Inc., Vancouver, Canadá por 10 vezes através de uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm (Whatman, Florham Park, NJ) para a obtenção de vesículas unilamelares uniformes e as soluções de LUVs resultantes foram armazenadas em 4°C para posterior utilização na formação das bicamadas suportadas nas lâminas de vidro.

3.3.10. Preparação de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

A preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) para análises de microscopia eletrônica de fluorescência foi realizada por formação em gel de um polímero denominado Álcool Polivinílico (PVA).¹³²

Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de PVA diluindo 5 mg de PVA em 100 mL de água MilliQ e mantendo sob aquecimento de 90 °C e agitação manual até a total solubilização do polímero. Na sequência, 300 µL da solução de PVA foram espalhadas de forma homogênea no fundo de um béquer de 5 mL e este foi mantido na estufa a 60 °C para formar um filme de PVA no fundo do béquer. O lipídio ou a mistura de lipídios escolhidos para constituição das GUVs foram dissolvidos em uma quantidade de clorofórmio ou da mistura clorofórmio:metanol 2:1 de forma que essa solução ficasse com concentração

final de 1 mM. Ao filme de PVA seco no fundo do béquer espalhou-se 16 μL da solução de lipídios uniformemente. Para remover o solvente orgânico residual, o béquer foi colocado em um dessecador sob vácuo por 1 hora. Após esse tempo, as vesículas foram hidratadas ao adicionar 1 mL de uma solução de sacarose de 200 mM. Após repouso por uma hora para a formação das GUVs, o sobrenadante foi transferido com cuidado para um tubo Eppendorf de forma a não levar o filme de PVA junto na transferência.

Para a observação das GUVs no microscópio, utilizou-se uma placa Thermo Scientific™ Nunc™ Glass Bottom Dishes de 35 mm com fundo de vidro de 12 mm. Nestas placas foram adicionados 200 μL de uma solução de glicose 200 mM e 50 μL da solução preparada das GUVs. Para as análises com o RuApy, adicionou-se um volume da solução estoque do complexo de maneira que este estivesse em uma concentração de 10 μM na solução final na placa. Para todas as análises o volume final de solução na placa foi de 250 μL .

As soluções de sacarose no meio interno da GUV e de glicose na parte externa permite que sejam feitas as medidas de contraste de fase em campo claro. Isso pois essas duas soluções permitem que ocorra uma diferença mínima do índice de refração do meio interno e externo permitindo a observação clara dos limites das vesículas, as membranas, e portanto sua observação em microscópio.

3.3.11. Preparação dos Dispositivos Microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos foram preparados seguindo um procedimento previamente estabelecido.^{133, 134}

Os dispositivos foram obtidos utilizando o polímero PDMS e um molde para os canais, Figura 3.5 (A). Para tal, o PDMS foi bem misturado em uma proporção de massa de 10 partes da base do polímero para 1 parte de um agente reticulante e colocado sob vácuo por 2 horas para eliminar as bolhas que se formaram na mistura dos dois componentes. O PDMS foi derramado sobre a lâmina utilizada como molde para a formação dos canais no polímero e colocado

em um forno a 52 °C e deixado durante toda noite de forma a endurecer o PDMS. A saída e as entradas de cada canal foram perfuradas no molde feito com o PDMS usando uma agulha oca.

O PDMS e a lâmina de vidro passaram então por um processo de *plasma cleaning* (do inglês, limpeza por plasma), esse processo é realizado para que seja possível grudar o polímero moldado à lâmina de vidro. Para tal, foram colocados juntos em um *Plasma Cleaner* PDC-32G da Harrick e tratados a 25 W com 53,2 Pa O₂ por 45 segundos e logo após esse processo, a lâmina de vidro e o bloco de PDMS foram imediatamente pressionados juntos fazendo com que o PDMS colasse nas lâminas de vidro limpas obtendo o dispositivo microfluídico, Figura 3.5 (B).

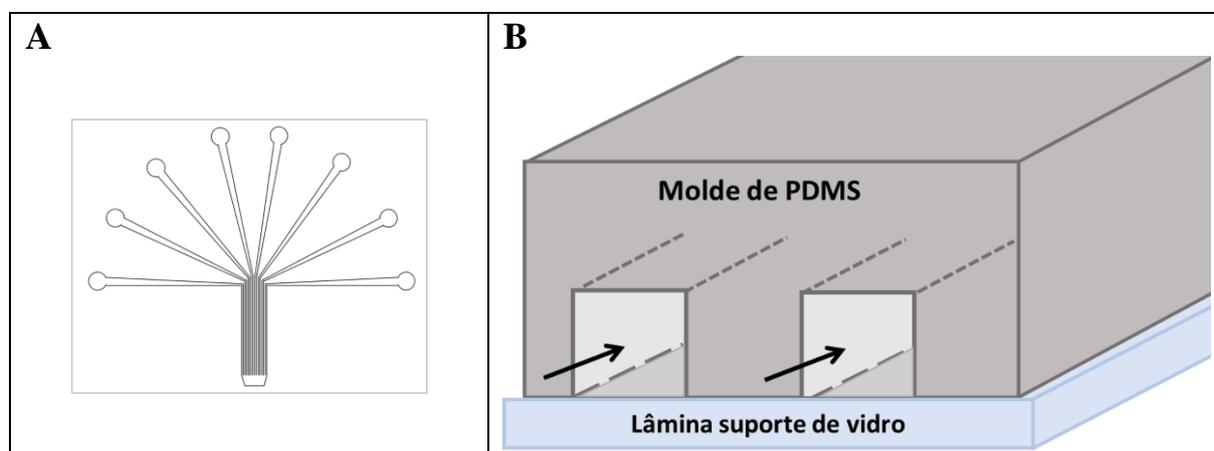


FIGURA 3.5 - (A) Molde do formato dos canais que serão formados no PDMS e (B) Sistema dos dispositivos microfluídicos indicando onde ficam os canais em que as bicamadas serão formadas entre o PDMS e o vidro. Fonte Adaptada: YANG et al., 2000

3.3.12. Preparação das Bicamadas Suportadas Sólidas (SLBs) nos Dispositivos Microfluídicos

As SLBs foram formadas nos canais dos dispositivos microfluídicos por meio de uma fusão espontânea das vesículas LUVs, Figura 3.6. Para isso, 10 µL de uma mistura na proporção 1:1 da solução de vesículas e de uma solução de

NaCl 500mM foram injetados na saída dos canais o que faz com que a solução se espalhe pelos oito canais. Essa mistura das LUVs com a solução de NaCl é feita para facilitar a adesão das vesículas à superfície do vidro em temperatura ambiente de aproximadamente 22 °C. O sistema foi incubado por cerca de 10 minutos e depois enxaguou-se por mais 10 minutos com tampão PBS pH 7,4 para remover todas as vesículas em excesso que não passaram pela fusão. Após tal procedimento, as bicamadas dentro dos canais dos dispositivos microfluídicos estão prontas para os experimentos.

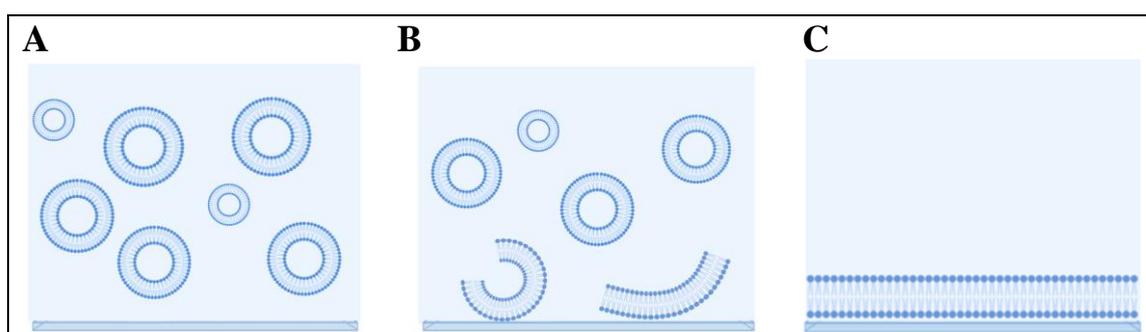


FIGURA 3.6 - Figura representando o processo de fusão das LUVs para a formação das bicamadas suportadas (A) logo que as vesículas são inseridas no sistema (B) Quando as vesículas começam a entrar em contato com o vidro e passar pelo processo de fusão e (C) As bicamadas suportadas formadas no vidro.

3.3.13. Determinação da Constante de Dissociação (K_d)

Para esses experimentos, os corantes NBD-PC ou Texas Red-DHPE foram incorporados em bicamadas suportadas com diferentes composições lipídicas. As porcentagens molares utilizadas para os corantes foram 0,5% de NBD-PC e 0,3% de TR-DHPE. Por exemplo, em porcentagens molares, 99,5% de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) com 0,5% de NBD-PC foi uma das composições lipídicas das SLBs utilizadas para os experimentos.

Em seguida, soluções em diferentes concentrações de RuApy foram introduzidas nos diferentes canais do dispositivo microfluídico. As concentrações utilizadas foram geralmente de 1 nM a 1 mM, para estas concentrações é possível

atingir a saturação da mudança na resposta luminescente do NBD-PC e TR-DHPE. Desta forma, foi possível obter uma curva de ligação para a interação entre o RuApy e o modelo de membrana e este dado foi ajustado às Isotermas de Langmuir, Equação 3.2, de forma a obter a constante de dissociação (K_d) dessa interação.¹³⁵

$$\Delta F = \frac{F}{F_0 - 1} = \frac{-a[RuApy]}{(K_d + [RuApy])} \quad \text{Eq. 3.2}$$

F = Intensidade de fluorescência do corante na presença do RuApy

F_0 = Intensidade de fluorescência do corante na ausência do RuApy

Todas as medidas para obtenção da constante de dissociação foram realizadas em tampão PBS pH 7,4 137mM NaCl, que é o pH mais próximo das condições fisiológicas, além de ser o tampão e pH utilizados para a agregação do peptídeo $A\beta_{1-42}$. Alguns experimentos também foram realizados em tampão fosfato 10 mM sem sal para verificar o efeito eletrostático no sistema. Além disso, 1 μ M de EDTA foi adicionado ao tampão para todas as medições, uma vez que o POPS foi utilizado para a análise das interações, e conforme relatado anteriormente pelo grupo de Cremer, esse lipídio tem uma alta afinidade para se ligar aos íons de cobre em concentrações ínfimas por conta de sua estrutura.¹³⁶ Portanto, EDTA foi adicionado com o objetivo de coordenar com o cobre que pode estar presente em solução, evitando resultados errôneos. Para manter o padrão dos experimentos, todos foram realizados adicionando 1 μ M de EDTA a solução tampão.

3.3.14. Monocamadas de Langmuir e Isotermas de Pressão Superficial pela Área (π -A)

As monocamadas de Langmuir foram formadas em uma cuba de Langmuir mini-KSV (KSV Instruments, Helsinki, Finlândia) com área de

aproximadamente 242 cm² e capacidade próxima de 250 mL equipada com um sensor de Wilhelmy (papel de filtro (10x20 mm²)) para medir a pressão de superfície. Essas medidas foram realizadas em parceria com o laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no IFSC da USP - São Carlos.

Os lipídios utilizados foram dissolvidos em clorofórmio de forma a obter uma solução com concentração final de 1mg/mL. Na sequência, a cuba de Langmuir foi preenchida com solução tampão PBS pH 7,4 na ausência e presença de 2μM do complexo RuApy de forma a ter uma interface ar/água na qual vai se formar uma monocamada lipídica. Com isso, cerca de 20 μL das soluções de lipídeos foram espalhadas na superfície aquosa da cuba com uma microsseringa Hamilton e o sistema ficou em repouso por 10 minutos para completa evaporação do clorofórmio antes de começar a compressão. Na sequência, foi realizada a compressão do sistema com duas barreiras móveis na velocidade de 10 mm/s e um sensor de Wilhelmy, que monitora a pressão de superfície (π) à medida que as barreiras vão se fechando, a área (A) vai diminuindo e os lipídeos são comprimidos. A medida da pressão superficial é feita pelo sensor tendo como referência a pressão superficial da água, 72 mN/m, que é zerada no início da medida. Ou seja, pela diferença na tensão superficial entre a água e o filme lipídico que está sendo formado, e desta forma, a diferença de pressão está relacionada a resistência dos lipídios à compressão

Conforme ocorre o fechamento das barreiras e a compressão da monocamada, os lipídios se organizam de forma a sempre manter a cabeça polar, que é hidrofílica voltada para a interface da água e a parte apolar para a interface do ar, o que permite a formação de uma monocamada. Desta forma obtêm-se uma curva que relaciona a diferença da pressão superficial conforme há a mudança área ocupada pelos lipídeos, tal curva é a chamada Isoterma pressão superficial-área (π -A), e está ilustrada na Figura 3.7. Ou seja, com o aumento da pressão superficial e a diminuição da área, os lipídios passam por transições de fase que são representados na curva.

A monocamada passa por uma transição da fase gasosa (G), na qual as moléculas lipídicas estão mais espalhadas na subfase e não tem grande interação entre si devido à grande distância molecular. Em seguida, passa para uma fase mais condensada, chamada de fase líquida, que pode ser dividida em líquido expandida (LE), quando as moléculas já estão mais próximas, e líquido condensada (LC), na qual as moléculas de lipídios já estão mais organizadas em uma monocamada, dependendo da natureza do lipídio, geralmente lipídios saturados apresentam as duas fases, enquanto insaturados usualmente não apresentam diferença entre as duas fases na curva. Em alguns casos, pode-se ocorrer ainda uma fase gel, na qual os lipídios atingem o maior nível de organização e proximidade na monocamada antes do colapso.¹³⁷ Para as medidas feitas com o complexo RuApy na subfase aquosa, antes de espalhar os lipídios na subfase, as barreiras foram fechadas para garantir que a presença do complexo não alterava a pressão superficial do sistema. Todas as medidas foram obtidas em triplicata para confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

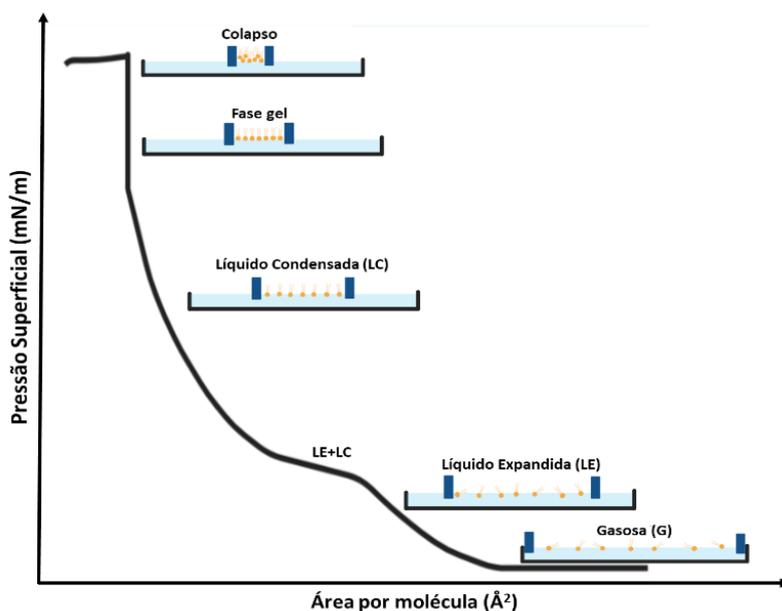


FIGURA 3.7 - Exemplo de uma Isoterma π -A indicando todas as fases que podem ser observadas e ilustrando o comportamento das moléculas lipídicas em cada uma dessas fases conforme há a compressão dos lipídeos e a monocamada está sendo formada.

3.3.15. Espectroscopia de Reflexão-absorção na Região do Infravermelho com Modulação da Polarização (PM-IRRAS)

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas em parceria com o laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no IFSC da USP –São Carlos.

Os espectros do PM-IRRAS foram feitos no instrumento KSV PMI 550 (KSV Instrument, Ltd.) que conta com uma lâmpada de carbeto de silício como fonte de luz IV, um modulador de polarização fotoelástico de ZnSe, e um detector de HgCdTe (MCT) modelo PCI-3TE-10.6, alocado sob uma cuba de Langmuir mini-KSV, na qual foram formadas as monocamadas pela compressão dos lipídeos até a pressão de 30 mN/m e das quais foram tirados os espectros. Todas as medidas foram feitas com ângulo da luz incidente de 80°, à temperatura de 22 ± 1 °C. As monocamadas foram formadas em uma subfase aquosa composta de tampão PBS 7,4 na ausência e presença de 2 μ M do complexo RuApy.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e Caracterização do Complexo RuApy

4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN)

No espectro de RMN de hidrogênio para o ligante 1,10-fenantrolina, a 3,4-diaminopiridina e para o complexo RuApy sintetizado obtidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d^6) estão apresentados na Figura 4.1. Os hidrogênios estão indicados nas estruturas do complexo e dos ligantes e nos seus respectivos sinais nos espectros. A partir disso, observa-se que os sinais obtidos entre, 7,4 e 9,5 ppm (indicados por números em vermelho na Figura 4.1) são referentes aos hidrogênios do ligante 1,10-fenantrolina. Observa-se também os prótons referentes aos grupos amino (indicados por letras em azul na Figura 4.1) na região entre 4,6 e 7,5 ppm aproximadamente. Os sinais que aparecem como singletos largos (d, d' e c, c') em 4,7 e 5,9 ppm respectivamente são característicos da ligação polarizada N-H, que apresenta tempo de troca curto com o solvente deuterado. Os prótons aromáticos se encontram na região esperada, entre 6 e 8 ppm. É importante ressaltar que ocorrem deslocamentos dos sinais dos prótons no complexo em relação ao espectro do ligante livre devido a coordenação ao centro de Ru(II) evidenciando a formação das ligações que originam o complexo. Na Tabela 4.1 estão atribuídos todos os sinais de próton para o complexo sintetizado e suas multiplicidades.

TABELA 4.1 - Deslocamentos químicos δH (ppm), multiplicidade e sinais de prótons para o espectro de 1H RMN (400 MHz) do RuApy em DMSO- d^6 .

H	δH (ppm); <i>mult.</i> (J em Hz); H
d, d'	4,70; s; 4
c, c'	5,89; s; 4
b, b'	6,25; d (6,2); 2
a, a'	7,31; d (6,2); 2
e, e'	7,47; 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'	8,28; m; 2
4, 4'	8,32; d (8,8); 2
6, 6'	8,49; 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

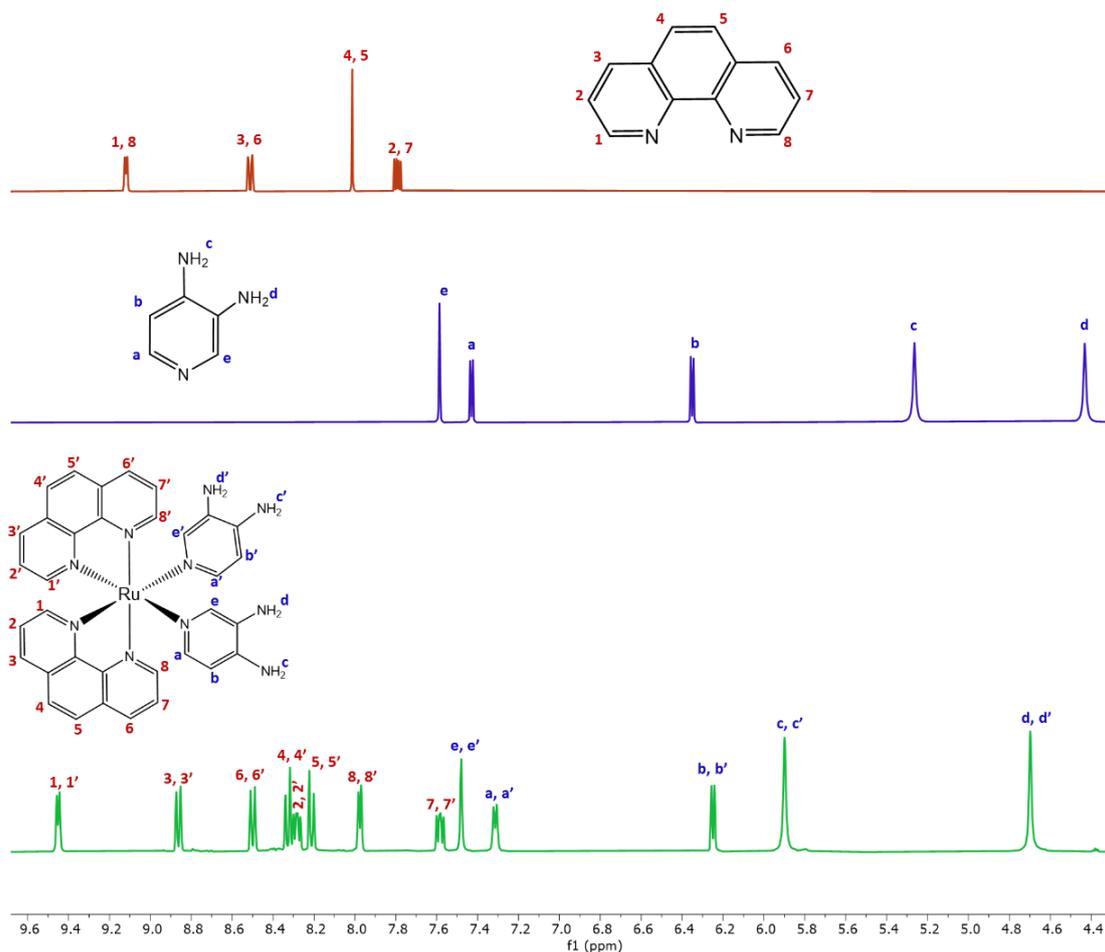


FIGURA 4.1 - Espectros de ^1H RMN (400 MHz) com a indicação dos sinais para cada hidrogênio da 1,10-fenantrolina (vermelho), 3,4-diaminopiridina (azul) e do complexo RuApy (verde) obtidos em DMSO-d^6 .

4.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Vis

O espectro de absorção UV-Vis do complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4 está apresentado na Figura 4.2. A absorção intensa observada na região do ultravioleta em aproximadamente 260 nm é atribuída a transição eletrônica de transferência de carga interna dos ligantes (ILCT) que indica transições entre os orbitais $\pi-\pi^*$ dos ligantes aromáticos (phen, $\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$). A banda larga com máximo entre 450 e 480 nm é atribuída principalmente a uma transição de transferência de carga do metal para o ligante, MLCT ($\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$) sendo o valor de absorvidade molar em 480 nm igual à $10300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.¹¹⁸ O valor

alto está de acordo com o esperado para uma transição eletrônica de MLCT, e indica que este complexo tem a capacidade de absorver luz significativa.

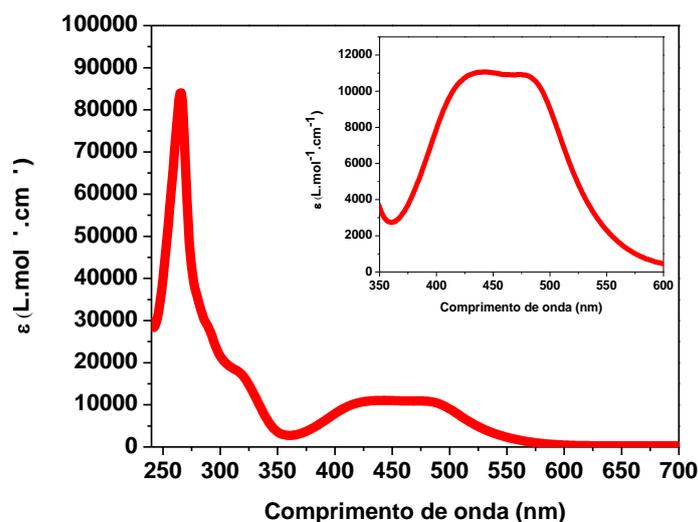


FIGURA 4.2 - Espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis para o complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4, destacando a banda proveniente da MLCT no espectro inserido.

Ainda, é possível fazer uma análise com relação às alterações na banda MLCT com a mudança dos ligantes que estão coordenados ao centro metálico de Ru(II). Pode-se comparar as propriedades do RuApy, por exemplo, com complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] em que ocorre a substituição dos ligantes Cl⁻ pelos ligantes 3,4-diaminopiridina. A comparação entre as bandas de MLCT dos dois complexos pode ser observada na Figura 4.3. Para o complexo precursor, a banda referente à MLCT (Ru, dπ→phen, π*) tem o máximo deslocado para 545 nm com $\epsilon_{545 \text{ nm}} = 8950 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.¹³⁸

O alargamento da banda do complexo RuApy com relação à banda do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] deve-se a possíveis transições entre o metal e o ligante 3,4Apy na mesma região em que ocorrem as transições entre o metal e o ligante 1,10-fenantrolina.

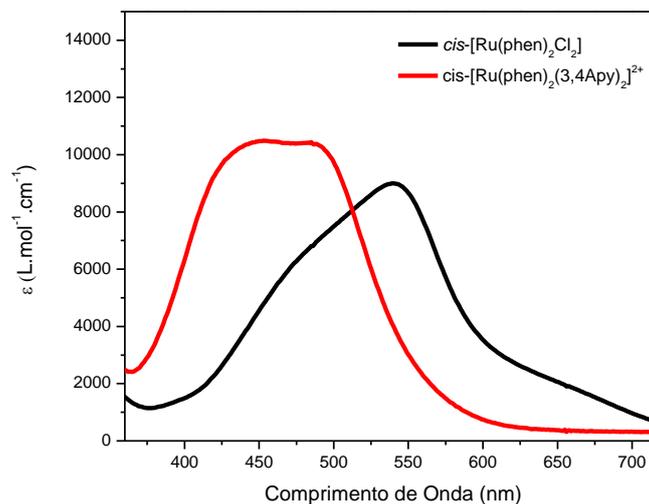


FIGURA 4.3. Espectros de absorção UV-Vis destacando a banda da MLCT do complexo precursor cis -[Ru(phen)₂Cl₂] (preto) e do complexo RuApy (vermelho) em diclorometano.

Ao comparar os espectros de absorção do complexo precursor e do RuApy, pode-se observar que ocorre um deslocamento no máximo de absorção do complexo RuApy para um menor comprimento de onda, 480 nm, com relação ao complexo precursor cis -[Ru(phen)₂Cl₂], 545 nm. Isso ocorre porque os ligantes 3,4-diaminopiridina coordenam ao Ru(II) por ligação σ , na qual o par de elétrons não ligante do N presente no anel aromático atua como σ -doador, e por ligação π , na qual o anel aromático atua como receptor de elétrons π .

4.1.3. Espectroscopia de Luminescência

Na síntese do complexo precursor um dos produtos secundários que pode ser formado durante a reação é o complexo [Ru(phen)₃]²⁺. Este complexo apresenta uma emissão intensa com máximo em aproximadamente 600 nm sob excitação com luz UV-vis, em particular, a emissão de maior intensidade ocorre quando este complexo é excitado com luz de 436 nm. Já o complexo precursor cis -[Ru(phen)₂Cl₂] não emite luz quando excitado na região do UV-vis. Portanto, o espectro de emissão pode ser usado para identificar de maneira simples a presença do complexo [Ru(phen)₃]²⁺ na síntese do complexo precursor

[Ru(phen)₂Cl₂]. A Figura 4.4 apresenta os espectros de emissão obtidos para o complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] (em preto) em diclorometano com luz de excitação de 436 nm e para o RuApy (em vermelho) em tampão PBS pH 7,4 porém com luz de excitação em 480 nm, máximo de absorção desse complexo.

Observa-se que somente o complexo RuApy apresenta emissão com máximo em 655 nm. A indicação de que complexo [Ru(phen)₃]²⁺ não foi produzido durante a síntese do complexo precursor é o fato de não ter sido observada nenhuma banda quando o *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] foi excitado em 436 nm.

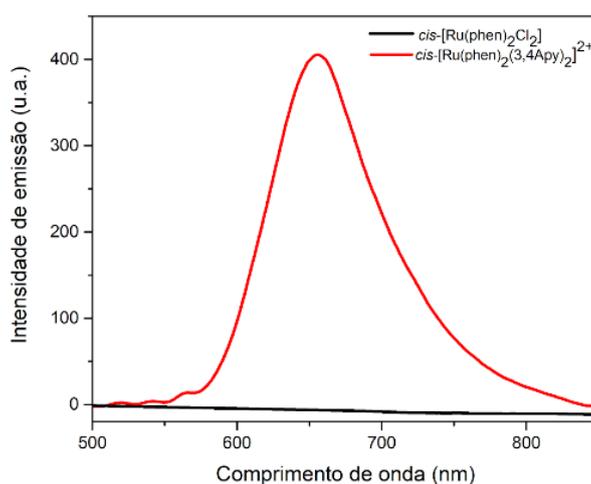


FIGURA 4.4 - Espectros de emissão para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] (preto, $\lambda_{\text{exc}} = 436$ nm) em diclorometano e para o complexo RuApy (vermelho, $\lambda_{\text{exc}}=480$ nm) em tampão PBS pH 7,4.

A Figura 4.5 (A) mostra os espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}}=480$ nm) e de excitação ($\lambda_{\text{em}}= 650$ nm) para o complexo RuApy. Observa-se que o espectro de excitação apresenta uma banda com o máximo comprimento de onda em aproximadamente 490 nm, que é semelhante ao que é observado no espectro de absorção do complexo, em 480 nm. Além disso, o espectro de emissão do complexo RuApy é sensível a presença do oxigênio molecular. Nestas condições observa-se uma diminuição da intensidade de emissão. Estas observações indicam que a emissão observada é originária do estado excitado tripleto da transferência de carga do metal para o ligante, ^{3*}MLCT, como indicado na Figura 4.5 (B).

A diferença obtida entre o máximo de excitação e de emissão é definido como deslocamento de Stokes, com valor de 4975 cm^{-1} para o complexo em estudo. Tal valor é considerado alto, e nesse contexto significa que o complexo não reabsorve sua própria luz, sendo interessante para utilização em meio biológico por não levar a respostas errôneas nos resultados dependentes da resposta luminescente.

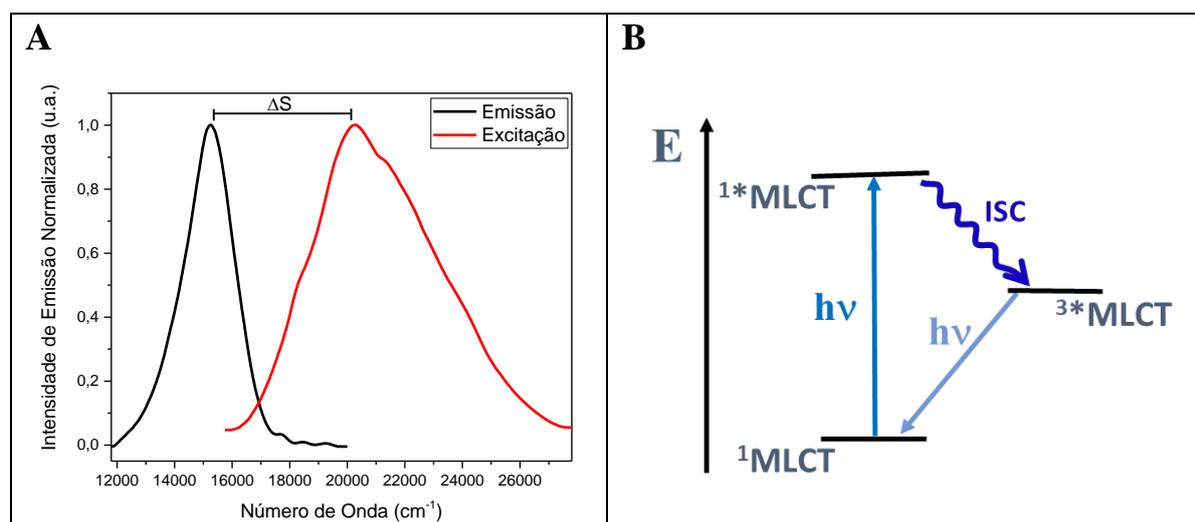


FIGURA 4.5 - (A) Espectro de emissão (preto) e de excitação (vermelho) do complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4 (B) Diagrama do tipo Jablonski indicando as transições radiativas e não radiativas provenientes da transição eletrônica de MLCT

4.1.4. Tempo de Vida de Emissão

O complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4 apresenta um tempo de vida de emissão relativamente longo de 146,4 ns. Esse tempo de vida é proveniente da emissão da 3^*MLCT , como esperado, já que para retornar ao estado fundamental é necessária a inversão de spin, de um estado tripleto para um singlete, o que confere à transição eletrônica um tempo de vida de emissão mais longo. O decaimento obtido para determinação do tempo de vida está apresentado na Figura 4.6.

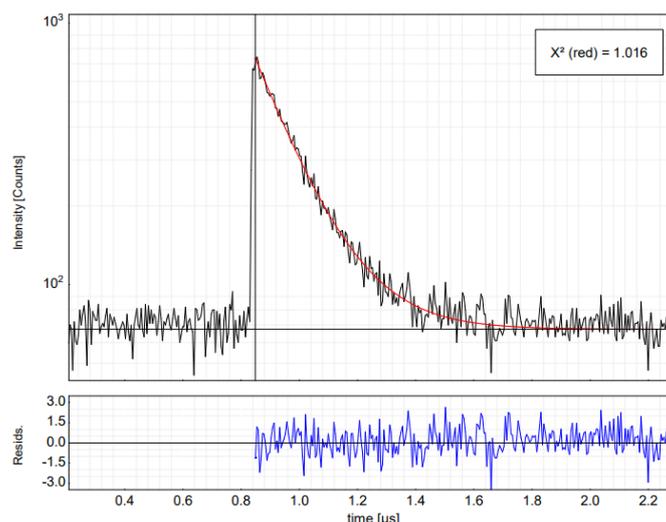


FIGURA 4.6 - Gráfico apresentando o decaimento do tempo de vida e o resíduo para o complexo RuApy.

4.1.5. Concentração de Estudo para o Complexo RuApy

O estudo da concentração de trabalho foi feito por meio da variação da concentração do complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4 até a estabilização da intensidade de emissão. Desta forma é possível determinar os limites de concentração nos quais não ocorre uma auto supressão da emissão do complexo por conta de colisões entre as moléculas que causam perda de energia por meios não-radiativos. A curva resultante obtida para concentrações de 5 a 100 μM está apresentada na Figura 4.7. Observa-se que acima de 50 μM há uma saturação e estabilização na intensidade de emissão. Portanto, a melhor faixa de concentração de trabalho para este complexo em tampão PBS abaixo de 50 μM .

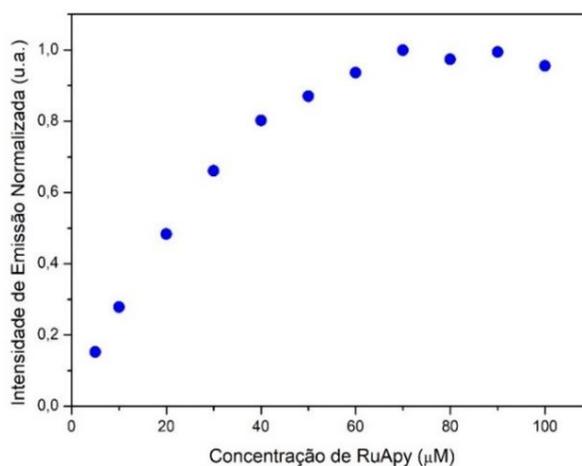


FIGURA 4.7 - Curva de concentração para o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ em solução tampão PBS pH 7,4.

4.2. O Peptídeo Aβ₁₋₄₂

4.2.1. Propriedades Espectroscópicas e o Processo de Agregação

O Aβ₁₋₄₂ é formado por uma cadeia de 42 aminoácidos, Figura 4.8. Considerando a variedade de aminoácidos, pode-se considerar que o peptídeo tem um caráter anfipático e que as regiões mais hidrofóbicas são indicadas como as regiões que propiciam o processo de agregação. Nessas regiões geralmente estão presentes aminoácidos aromáticos, os quais muitos estudos indicam como sendo um dos fatores que influencia a automontagem e agregação de proteínas amiloides por facilitar a formação de folhas β antiparalelas características de fibrilas.^{139, 140}

Dentro da sequência de aminoácidos do Aβ₁₋₄₂, há uma única tirosina, um aminoácido aromático fluorescente que apresenta absorção em 280 nm e emissão em aproximadamente 300 nm, o que permite monitorar mudanças das propriedades luminescentes do peptídeo por meio dessa emissão, sem a necessidade de corantes extrínsecos. Além disso, muitos estudos apontam a tirosina como um dos aminoácidos que apresentam grande influência no processo de agregação e toxicidade do peptídeo Aβ por conta de interações aromáticas e hidrofóbicas, por ser relatado como ativo na ligação de íons metálicos e por seu papel central na nitração e fosforilação do peptídeo Aβ.^{141, 142}



FIGURA 4.8 - Sequência dos 42 aminoácidos do peptídeo $A\beta_{1-42}$ com o aminoácido fluorescente tirosina (Tyr) em destaque (azul).

Com isso, o processo de agregação foi monitorado a partir da emissão intrínseca do peptídeo em 300 nm em tampão PBS pH 7,4 a 37 °C sem agitação monitorado por 8 horas com o peptídeo $A\beta_{1-42}$ na concentração de 20 μ M. Pelos espectros obtidos nos diferentes tempos de agregação apresentados na Figura 4.9 (A) nota-se que a banda de emissão em 300 nm perde intensidade de emissão rapidamente conforme ocorre o processo de agregação, e ainda, que há uma banda de emissão em aproximadamente 340 nm que aumenta em intensidade com o tempo de incubação do peptídeo.

Ainda, considerando essa alteração na intensidade de emissão como um indicativo das mudanças conformacionais que estão ocorrendo durante o processo de agregação, obteve-se a curva da cinética de agregação de acordo com a mudança de intensidade de emissão em 300 nm, Figura 4.9 (B). Pode-se observar que a curva obtida é decrescente e não apresentou o comportamento sigmoide característico da fibrilação de proteínas amiloides por não tem uma fase lag aparente. Pela curva, nota-se que a estabilização da emissão ocorre aproximadamente 2 horas após o início da incubação, o que indica que após essas 2 horas já há espécies fibrilares do $A\beta_{1-42}$ em solução.

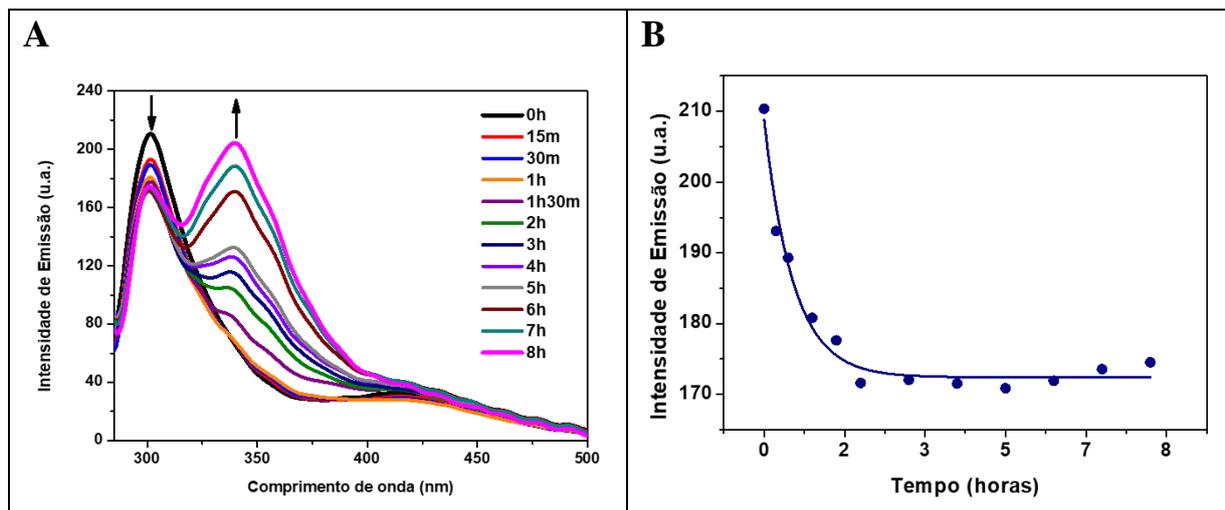


FIGURA 4.9 - (A) Espectros de emissão do $A\beta_{1-42}$ ($\lambda_{exc}=270$ nm) nos diferentes tempos de incubação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ durante as primeiras 8 horas de incubação e (B) Curva da cinética de agregação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ em tampão PBS pH 7,4, 37 °C e sem agitação pela resposta de emissão intrínseca do peptídeo.

A partir desse primeiro experimento, para garantir a veracidade da cinética de agregação monitorada pela emissão intrínseca do peptídeo $A\beta_{1-42}$ o processo de agregação, nas mesmas condições de tampão e temperatura, também foi monitorado através da emissão da Tioflavina T (ThT), já que o corante funciona como um padrão para monitoramento da fibrilação de proteínas amiloides. As medidas foram feitas numa proporção 1:4 $A\beta_{1-42}$:ThT e os resultados estão apresentados na Figura 4.10.

Os resultados obtidos com a ThT são similares aos observados pela emissão intrínseca da tirosina em 300 nm, confirmando a formação de espécies fibrilares durante a agregação. O tempo em que houve a estabilização da intensidade de emissão também foi a mesma, confirmando os resultados previamente. Após 2 horas de incubação, as conformações fibrilares do peptídeo $A\beta_{1-42}$ já estavam formadas, o que era esperado, considerando a concentração e condições utilizadas no processo e resultados prévios já relatados na literatura para o $A\beta_{1-42}$.^{143, 144, 145}

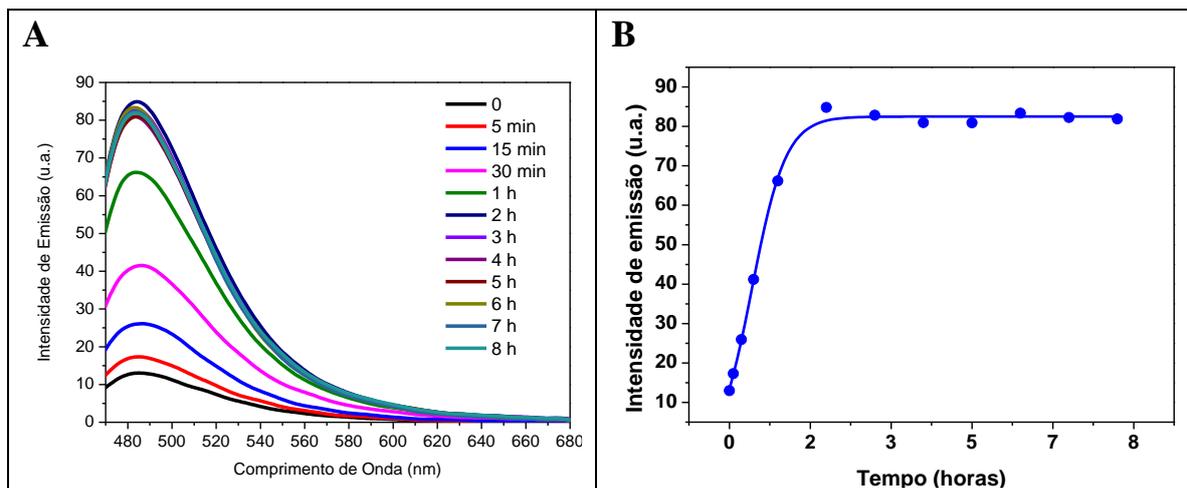


FIGURA 4.10 - (A) Espectros de emissão da ThT ($\lambda_{exc}=440\text{nm}$) em relação ao tempo de incubação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ e (B) Curva da cinética de agregação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ em tampão PBS pH 7,4, 37 °C e sem agitação pela resposta de emissão da ThT.

Ainda considerando os espectros obtidos pela emissão intrínseca do peptídeo $A\beta_{1-42}$, por conta da formação de uma segunda banda de emissão em 340 nm com o tempo de agregação, e considerando que dentro de 8 horas ela parecia ainda não estar completamente formada, foi feita a incubação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ durante 24 horas e o espectro obtido na Figura 4.11 em vermelho mostra a formação completa de uma banda de emissão intensa em 340 nm.

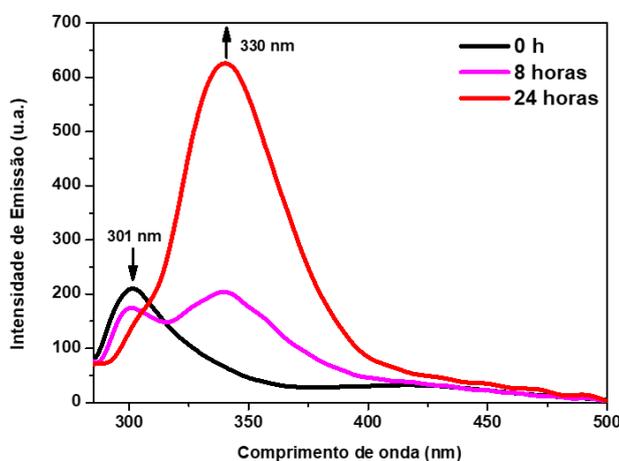


FIGURA 4.11 - Espectros de luminescência da emissão intrínseca do $A\beta_{1-42}$ ($\lambda_{exc} = 270 \text{ nm}$) no tempo inicial (preto), após 8 horas (rosa) e após 24 horas (vermelho) de incubação

As hipóteses levantadas para a formação dessa banda apontam essa emissão provavelmente está associada à tirosina presente na estrutura do peptídeo que pode levar a formação de uma ditirosina, já que esta está associada a interação intermolecular e a formação das fibrilas tóxicas do $A\beta_{1-42}$ e é uma espécie importante uma vez que já foi observada em placas amilóides de pacientes com DA.¹⁴⁶

A ditirosina é formada por ligação entre dois resíduos de tirosina próximos que passaram por um processo de oxidação de modo a formar radicais e dentro do contexto de estudo da agregação do $A\beta_{1-42}$, essa ditirosina poderia ser formada por conta da geração de espécies reativas de oxigênio e uma das maneiras em que essas espécies são formadas é pela irradiação de luz ultravioleta.¹⁴⁷

A irradiação de luz ultravioleta pode atuar como um agente oxidante, e relata-se que pode ser um dos fatores que leva a formação da ditirosina.^{147, 148,}
¹⁴⁹ Desta forma, considerando que durante as medidas para a obtenção dos espectros de emissão, estava havendo a irradiação de luz no ultravioleta ($\lambda_{exc} = 270$) na solução que estava sendo analisada, existe a possibilidade da formação da ditirosina ter ocorrido por um processo de foto-oxidação, que poderia ter acelerado a formação dessa espécie.

Para verificar esta possibilidade, o processo de agregação foi realizado nas mesmas condições, mas mantendo a solução sob irradiação contínua com luz de 254 nm, com lâmpada de 4 W e intensidade de $1,17 \times 10^{-9} \text{ E.s}^{-1}$, e o mesmo processo de formação dessa banda em 340 nm foi observado. Para as medidas feitas no escuro, sem irradiação contínua de luz, também se observa a formação da banda em 340 nm. Entretanto, nota-se que para a amostra que foi irradiada continuamente a formação da banda em questão ocorre mais rapidamente do que para a amostra que permaneceu no escuro. Já em 1 hora do processo de agregação é possível ver a banda em 340 nm bastante intensa para a amostra que está sendo irradiada, enquanto para a amostra sem irradiação a banda já começa aparecer, mas pouco intensa Figura 4.12 (A). Após 7 horas de

incubação o comportamento das intensidades se repete, Figura 4.12 (B), ou seja, para a amostra irradiada continuamente em 254 nm a formação da espécie que gera a banda em 340 nm acontece mais rapidamente. Assim, estes experimentos indicam que a luz favorece o processo de formação da banda em 340 nm possivelmente por conta de um processo de foto-oxidação, mas não é dependente da irradiação da amostra com luz.

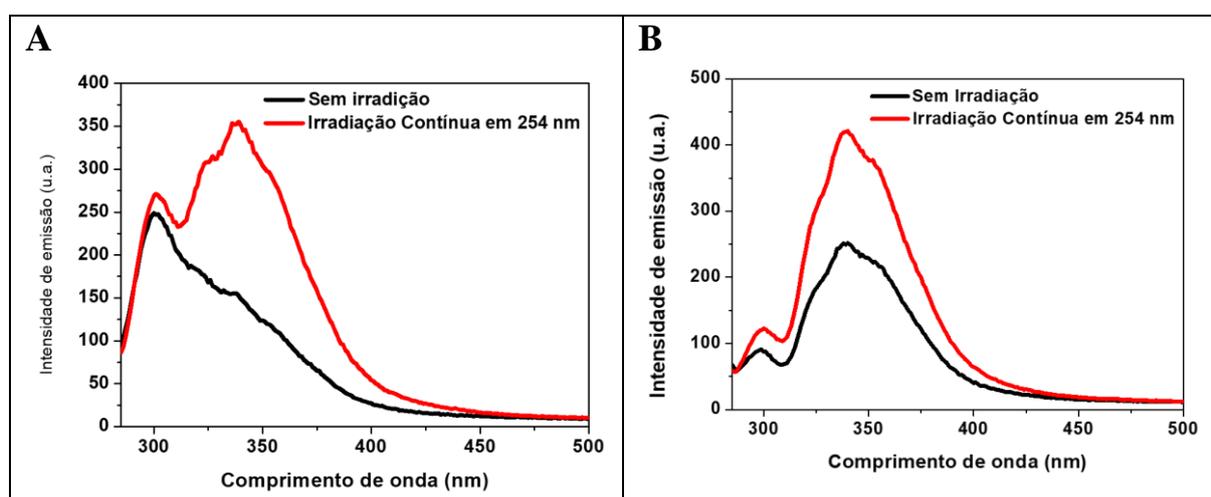


FIGURA 4.12 - Espectros de emissão para a emissão intrínseca ($\lambda_{exc} = 270$ nm) do peptídeo $A\beta_{1-42}$ durante o processo de agregação sem irradiação (preto) e com irradiação de luz contínua em 254 nm (vermelho) para os tempos de (A) 1 hora e (B) 7 horas de agregação em tampão PBS pH 7,4 a 37°C sem agitação.

Tais resultados indicam que a formação da ditirosina por conta da formação de espécies radiculares durante o processo de agregação não é dependente de estímulos luminosos. Por conta disso, tais estudos requerem um maior aprofundamento para chegar a uma conclusão concreta.

4.2.2. Dicroísmo Circular

Pelas medidas de dicroísmo é possível determinar a conformação de uma proteína ou peptídeo através do perfil do espectro. Por exemplo, no processo de agregação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ há a formação de fibrilas com estrutura ricas em folhas β e essa conformação específica apresenta uma banda negativa em 220

nm.¹⁵⁰ As medidas de dicroísmo circular para diferentes tempos de agregação do $A\beta_{1-42}$ estão apresentadas na Figura 4.13.

A partir dos espectros obtidos nota-se que em 3 horas de incubação é possível observar a formação da banda característica de folhas beta em 220 nm, indicando que para esse tempo já há fibrilas formadas em solução. Ainda, tal resultado está de acordo com o resultado obtido para o ensaio da cinética de agregação feita com a emissão intrínseca do peptídeo e com a ThT apresentadas na seção 4.3.1. que mostraram que, de fato, em 3 horas já havia sido atingido o estágio de saturação da curva de agregação, indicando a presença de fibrilas em solução. Depois de 24 horas de incubação, é possível notar uma maior intensidade da banda assim como um leve deslocamento do comprimento de onda para 222 nm e essa diferença pode ser atribuída ao fato de que nesse tempo, já havia grande quantidade de fibrilas e possivelmente, estavam ocorrendo interações entre elas.

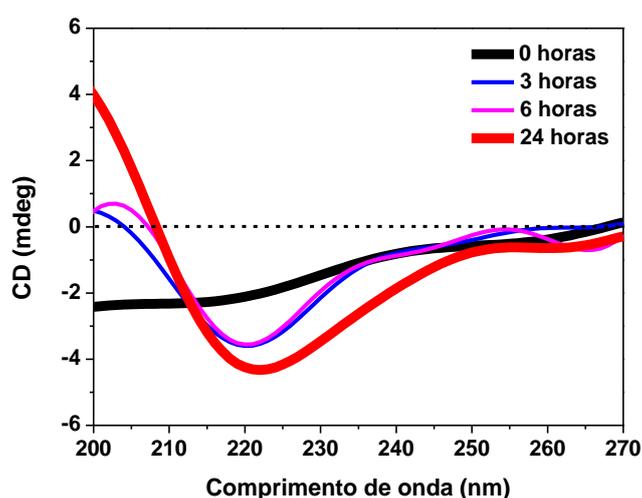


FIGURA 4.13 - Espectros de dicroísmo circular para o $A\beta_{1-42}$ durante o processo de agregação no tempo inicial (preto) e após 3 (azul), 6 (rosa) e 24 horas (vermelho).

4.2.3. Estudos do A β ₁₋₄₂ na Presença do *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺

Dado os estudos prévios realizados com o A β ₁₋₄₂ na presença do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4-Apy)₂]²⁺ que indicaram que o complexo pode alterar o caminho de agregação para formação de espécies menos tóxicas, foram realizados os experimentos para monitorar o processo de agregação dentro das mesmas condições estudadas anteriormente, porém agora com o RuApy presente no meio. Os espectros de emissão obtidos para o processo de agregação monitorado pela emissão intrínseca do peptídeo, Figura 4.14 (A), mostram que, não só a presença do complexo RuApy leva a uma diminuição considerável da intensidade de emissão da banda em 300 nm quando comparado aos espectros do A β ₁₋₄₂ sozinho em solução, assim como a diminuição da intensidade é dependente do tempo de incubação do peptídeo, indicando que também é possível obter uma curva de cinética de agregação para o A β ₁₋₄₂ na presença do RuApy numa proporção 1:1 e que está apresentada na Figura 4.14 (B). Pela curva de cinética de agregação, nota-se que a intensidade de emissão só começa a mostrar sinais de estabilização depois de 8 horas de incubação, o que mostra que a presença do complexo atrasa a formação das fibrilas do A β ₁₋₄₂.

Observa-se também a inibição da formação da banda observada anteriormente em 340 nm. Considerando a hipótese da banda de emissão em 340 nm estar associada à formação da ditirosina por conta de fatores oxidativos, a inibição dessa banda pode se dar pelo fato do complexo RuApy ter ação antioxidante, e desta forma poderia estar evitando a formação da espécie em 340 nm, caso esta formação esteja sendo favorecida por processos de oxidação.^{118, 143} Como possivelmente a formação dessa banda está associada à toxicidade do peptídeo e ao tipo de fibrila que se forma, o fato do complexo inibir a formação dessa banda pode ser um indicativo de que o RuApy está de alguma forma alterando o processo de agregação e possivelmente o tipo de fibrila que está sendo formada, como o que já foi anteriormente relatado em trabalhos do grupo para outros fragmentos do peptídeo A β .¹⁵¹

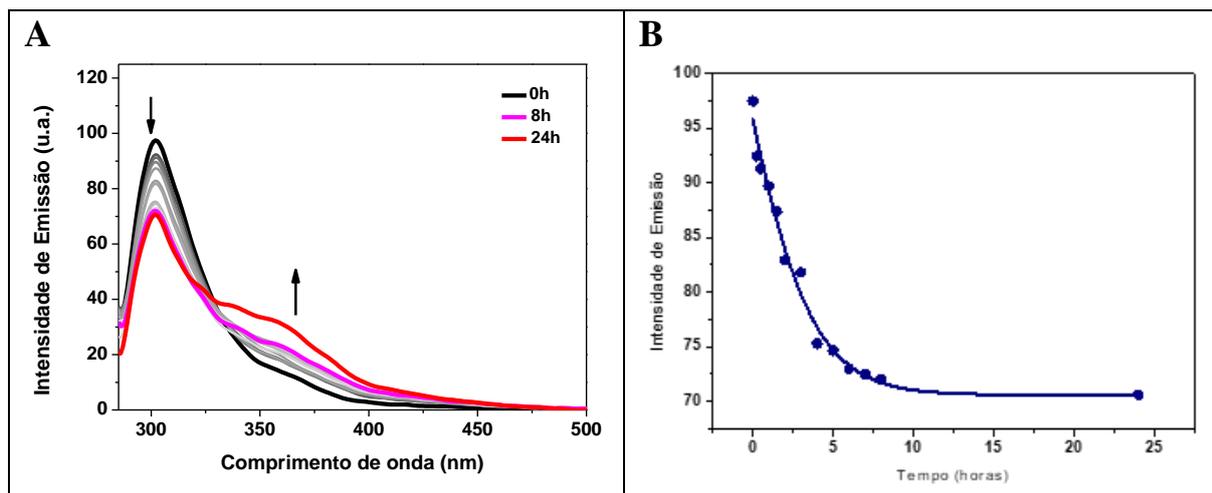


FIGURA 4.14 - (A) Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 270$ nm) do A β_{1-42} na presença do complexo RuApy com o processo de agregação monitorado por 8 horas (preto ao rosa) e após 24 horas (vermelho) e (B) Curva e cinética de agregação do A β_{1-42} na presença do complexo RuApy pela resposta de emissão intrínseca do peptídeo.

No dicroísmo circular apresentado na Figura 4.15 só há o aparecimento de uma banda em 220 nm depois de passadas 24 horas de incubação do A β_{1-42} com o complexo RuApy, indicando que, de fato as espécies fibrilares demoram mais para se formar quando há complexo no meio, mas se formam e apresentam a conformação de folhas β . Além disso a intensidade da banda é muito menor do que para o A β_{1-42} sozinho. Isso também corrobora com a hipótese de que de alguma forma o complexo atrasa ou, como ainda é possível ver o sinal de folha β indicando que há a formação das fibrilas mesmo com o RuApy no meio, muda o processo agregação do peptídeo A β_{1-42} , possivelmente por conta da formação de um tipo diferente de fibrila.

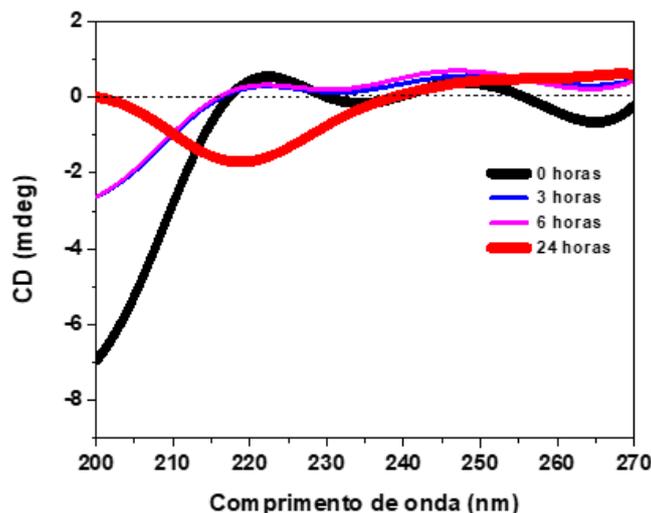


FIGURA 4.15 - Espectros de dicroísmo circular para o A β_{1-42} na presença do complexo RuApy durante o processo de agregação no tempo inicial (preto) e após 3 (azul), 6 (rosa) e 24 horas (vermelho).

A resposta luminescente do próprio complexo RuApy pode mudar de acordo com o estágio de agregação em que se encontra o A β_{1-42} . Os espectros de emissão para o RuApy junto do peptídeo A β_{1-42} estão apresentados na Figura 4.16.

Nota-se que há uma queda na intensidade no decorrer do tempo de agregação do A β_{1-42} , desde a adição de monômeros no meio e continua a decair no decorrer do tempo conforme fibrilas são formadas, o que pode indicar o RuApy como um marcador luminescente para o peptídeo A β_{1-42} , uma vez que a resposta luminescente do complexo é sensível à presença do peptídeo.

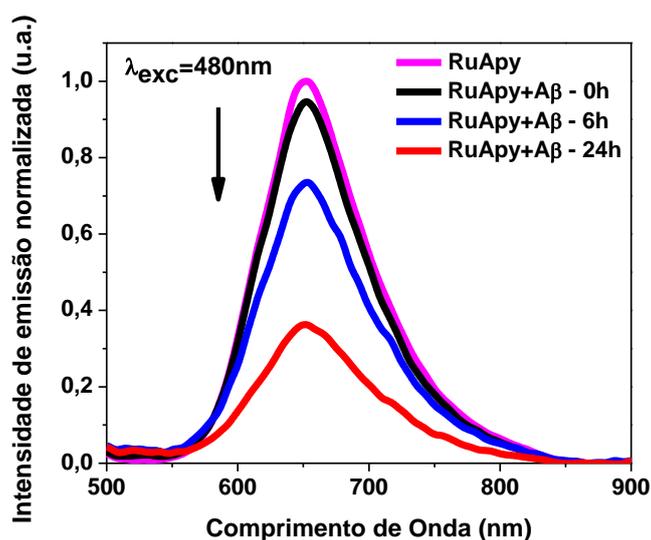


FIGURA 4.16 - Espectros de emissão para a resposta luminescente do complexo RuApy ($\lambda_{exc}=480$ nm) na ausência (rosa) e presença do peptídeo $A\beta_{1-42}$ na forma monomérica, tempo inicial (preto), após 6 horas de incubação do peptídeo (azul) e após 24 horas de incubação (vermelho) em Tampão PBS pH 7,4, 37°C, sem agitação.

Ainda, foram feitas duas imagens, ambas de espécies fibrilares do $A\beta_{1-42}$ na presença do RuApy, por microscopia de fluorescência utilizando o filtro de excitação Alexa 488 que estão apresentadas na Figura 4.17. As imagens mostram que é possível ver uma resposta luminescente intensa do complexo marcando as espécies fibrilares formadas após 24 horas de incubação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ o que indica que o complexo interage com as fibrilas do peptídeo e pode funcionar como um marcador para obtenção de imagens dessas fibrilas do $A\beta_{1-42}$. Não foram feitas imagens para o tempo inicial de incubação pois as espécies monoméricas do peptídeo $A\beta_{1-42}$ são muito pequenas e não é possível observá-las no microscópio.

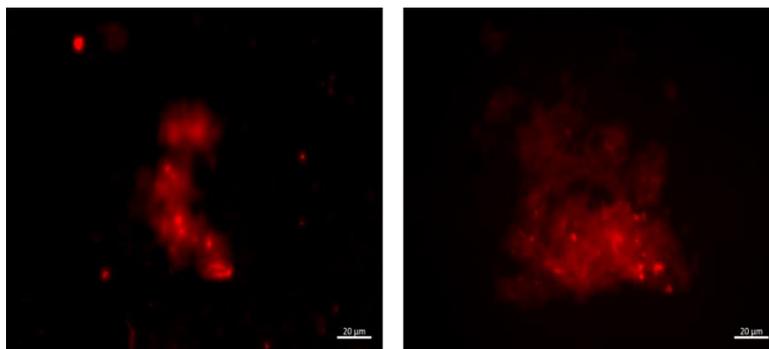


FIGURA 4.17 - Imagens de microscopia de fluorescência para duas estruturas fibrilares do peptídeo $A\beta_{1-42}$ contidas numa mesma amostra em diferentes regiões observadas pela resposta luminescente do complexo RuApy.

4.2.3.1. Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)

De forma a avaliar as espécies monoméricas iniciais e fibrilares e fazer uma comparação entre os agregados formados quando o $A\beta_{1-42}$ passa pela incubação sozinho em solução ou quando o RuApy está presente no processo em uma proporção 1:1 com o peptídeo, foram feitas medidas de microscopia de fluorescência por tempo de vida que estão apresentadas na Figura 4.18.

Para o $A\beta_{1-42}$, nota-se que para o tempo inicial, Figura 4.18 (A), são observados dois tempos de vida, sendo $\tau_1 = 3,44 \text{ ns} \pm 0,076$ e $\tau_2 = 4,88 \text{ ns} \pm 0,072$. Quando o peptídeo passa pelo processo de incubação por 24 horas, Figura 4.18 (C), de modo a obter a espécies fibrilares, primeiramente observa-se que não há mais dois tempos de vida de emissão para a espécie fibrilar, e sim apenas um, $\tau_1 = 1,890 \text{ ns} \pm 0,068$. Outro fator importante é a diminuição no tempo de vida de emissão para as fibrilas presentes no meio. Isso ocorre possivelmente em decorrência das interações intermoleculares resultantes da formação das fibrilas.

Quando o processo de agregação ocorre na presença do complexo RuApy, Figura 4.18 (B), já no tempo inicial em que há apenas espécies monoméricas os tempos de vida de emissão foram: $\tau_1 = 3,20 \text{ ns} \pm 0,30$ e $\tau_2 = 37,00 \text{ ns} \pm 0,92$. Nota-se, portanto, que o segundo tempo de vida tem um aumento

significativo com relação à amostra contendo apenas o $A\beta_{1-42}$, de 4,88 para 37 ns. Esse aumento pode ser um indicativo de que estão ocorrendo interações entre o complexo e o peptídeo $A\beta_{1-42}$ já nos estágios iniciais de agregação

Seguindo o padrão da amostra contendo unicamente o $A\beta_{1-42}$, após 24 horas de incubação com o RuApy, Figura 4.18 (D) há uma queda nos valores de tempos de vida. O primeiro tempo de vida observado, $\tau_1 = 1,390 \text{ ns} \pm 0,085$, mantém-se um muito próximo ao obtido para o $A\beta_{1-42}$ sozinho e diminui em relação ao primeiro tempo de vida observado para a forma monomérica na presença do RuApy, novamente tal redução possivelmente se dá por conta de interações intermoleculares devido a formação das fibrilas. O segundo tempo de vida de emissão, $\tau_2 = 11,00 \text{ ns} \pm 0,84$, também sofre uma redução quando comparado com o tempo obtido para o tempo inicial de incubação, de 37,00 ns cai para 11,00 ns. Essa queda provavelmente também ocorre por conta de interações decorrentes do processo de fibrilação. Neste caso ainda ocorre a interferência do complexo RuApy, que não evita a formação de fibrilas do peptídeo, mas é possível considerar a hipótese de que uma interação entre o complexo RuApy e o peptídeo $A\beta_{1-42}$ pode mudar a espécie fibrilar formada por conta da alteração do processo de agregação, ainda mais considerando que esse segundo tempo de vida não aparece quando o $A\beta_{1-42}$ passa pelo processo de agregação sem interferentes no meio.

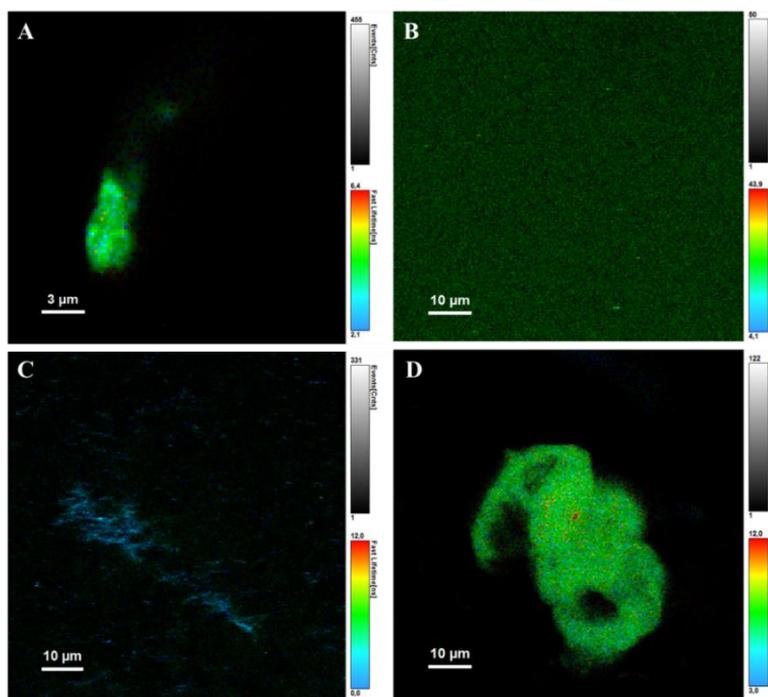


FIGURA 4.18 - Imagens de FLIM para o $A\beta_{1-42}$ monômero (tempo inicial) (A) sozinho em solução e (B) na presença do complexo RuApy e depois de 24 horas de incubação (C) sozinho em solução e (D) na presença do complexo RuApy em tampão PBS pH 7,4. As imagens foram obtidas com excitação em 440 nm e leitura de emissão em 600 nm.

4.2.3.2. Estudos da Viabilidade Celular

Os ensaios de viabilidade celular com a linhagem SH-SY5Y de neuroblastoma humano foram feitos de forma a avaliar se a adição do complexo RuApy no meio em que é feita a agregação do $A\beta_{1-42}$ e o fato de inibir a banda que se forma em 340 nm e levar à possível formação de um outro tipo de fibrilas do peptídeo tem alguma influência frente à toxicidade do $A\beta_{1-42}$ para as células.

Desta forma, a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas de incubação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ ou do $A\beta_{1-42}$ com o complexo RuApy junto das células, Figura 4.19. Em 24 horas a viabilidade celular se manteve, sem mostrar uma diminuição estatisticamente significativa para nenhuma das condições analisadas. O complexo RuApy não foi tóxico para as células, sendo um bom sinal considerando seu potencial uso em meios biológicos. Por outro lado, não foi

observada toxicidade para o peptídeo $A\beta_{1-42}$, mesmo considerando que em 24 horas de agregação já há as fibrilas consideradas tóxicas formadas no meio. Isso pode estar ocorrendo possivelmente por conta do próprio metabolismo celular, em que primeiro há uma sinalização e só após um tempo a célula entra em apoptose, por isso seria necessário um tempo maior de incubação para que seja possível observar mudanças na viabilidade celular.

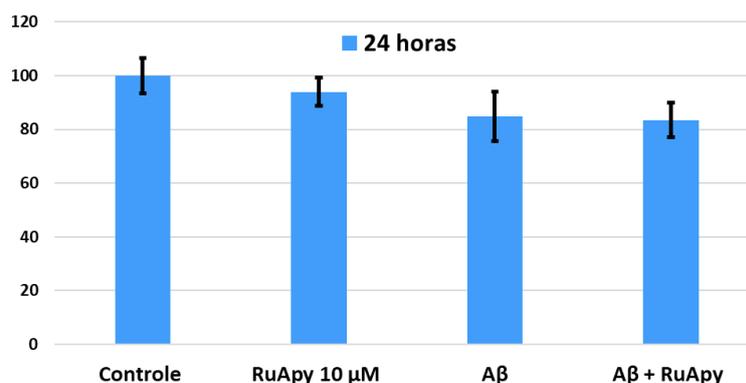


FIGURA 4.19 - Gráfico de barras para a viabilidade celular após 24 horas de incubação das células com o complexo RuApy, $A\beta_{1-42}$, e o $A\beta_{1-42}$ com o RuApy.

Assim, foram realizados os mesmos experimentos, porém com um tempo de incubação de 48 horas, e os resultados estão apresentados na Figura 4.20. Há uma redução da viabilidade para cerca de 60% quando há apenas $A\beta_{1-42}$ junto da linhagem celular SH-SY5Y. Observa-se ainda uma queda estatisticamente significativa, para cerca de 80%, na viabilidade celular na presença apenas do complexo RuApy, isso pode estar ocorrendo devido a degradação do complexo no meio por conta do longo tempo de incubação, que pode levar à hidrólise do complexo, por exemplo. Porém, ainda assim, o complexo tem efeito protetivo frente a toxicidade do $A\beta_{1-42}$.

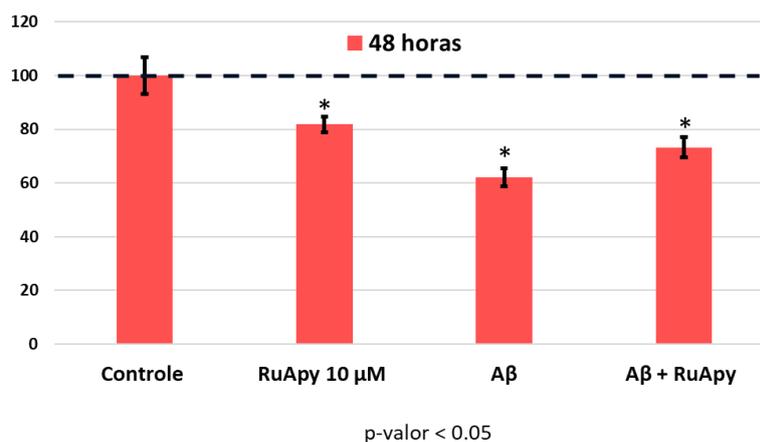


FIGURA 4.20 - Gráfico de barras para a viabilidade celular após 48 horas de incubação das células com o complexo RuApy, A β_{1-42} , e o A β_{1-42} com o RuApy.

4.3. Interação RuApy/Modelos de Membrana

4.3.1. Espectroscopia de Fluorescência

Como a hipótese de que a membrana celular tem grande influência na agregação e toxicidade do A β quando há a interação e considerando o papel do complexo RuApy frente à agregação do peptídeo, é importante estudar como o complexo interage com os modelos de membrana celulares antes de estudar um sistema mais complexo contendo os 3 componentes.

O experimento inicial para a análise da interação do complexo com modelos de membrana foi feito por meio da observação de eventuais diferenças da intensidade de emissão do complexo quando vesículas unilamelares grandes (LUVs) de diferentes composições lipídicas são adicionadas ao meio.

Desta maneira, primeiramente foram feitos experimentos com LUVs compostas 100% de lipídios neutros, também denominados zwitteriônicos, pois na cabeça polar possuem uma carga positiva e uma carga negativa que se cancelam, apresentando assim um balanço de carga igual a zero. Tal composição é importante como um padrão para meios de comparação com vesículas com outras composições lipídicas que virão a ser analisadas e o lipídio utilizado para essas análises foi o POPC.

No experimento, manteve-se a concentração fixa do complexo RuApy em $10\mu\text{M}$ e a concentração dos lipídeos variando de 0 a $200\mu\text{M}$, Figura 4.21. Ao analisar os espectros de luminescência, as intensidades de emissão permanecem praticamente inalteradas. A comparação das intensidades foi feita também por gráficos de barra para facilitar a visualização, e é possível ver que não há variação significativa nas intensidades de emissão mesmo em concentrações altas de vesículas no meio.

Isso pode ser um indicativo de que não está ocorrendo interação entre o complexo e a membrana da vesícula. Porém, por outro lado, é importante considerar que caso a interação não seja suficientemente forte, como a uma ligação covalente, pode ser que não seja possível observar diferenças na fluorescência, ainda que esteja havendo interação. Ainda, dadas as características do complexo, uma molécula luminescente, e dos lipídios, moléculas que não apresentam nem absorção nem emissão, não está ocorrendo um mecanismo de transferência de energia, como FRET ou Dexter, que permitiria ver uma mudança por conta de uma alteração na emissão. Outro fator que permitiria ver uma alteração nos espectros de emissão seria se a luminescência do complexo fosse sensível ao meio, ou seja, se a característica do espectro mudasse de um meio mais polar para um meio mais apolar, uma vez que a presença de lipídios muda o ambiente químico, mas experimentos com solventes de diferentes polaridades mostraram que o complexo não apresenta alteração no comportamento da emissão com a mudança da polaridade do meio, sendo assim mesmo que estivesse ocorrendo uma interação entre o RuApy e as vesículas e com isso uma mudança da polaridade do meio em que o complexo está inserido, não seria possível observar uma mudança nos espectros. Então, a possibilidade da interação não pode ser descartada mesmo não havendo alteração na intensidade de emissão do RuApy.

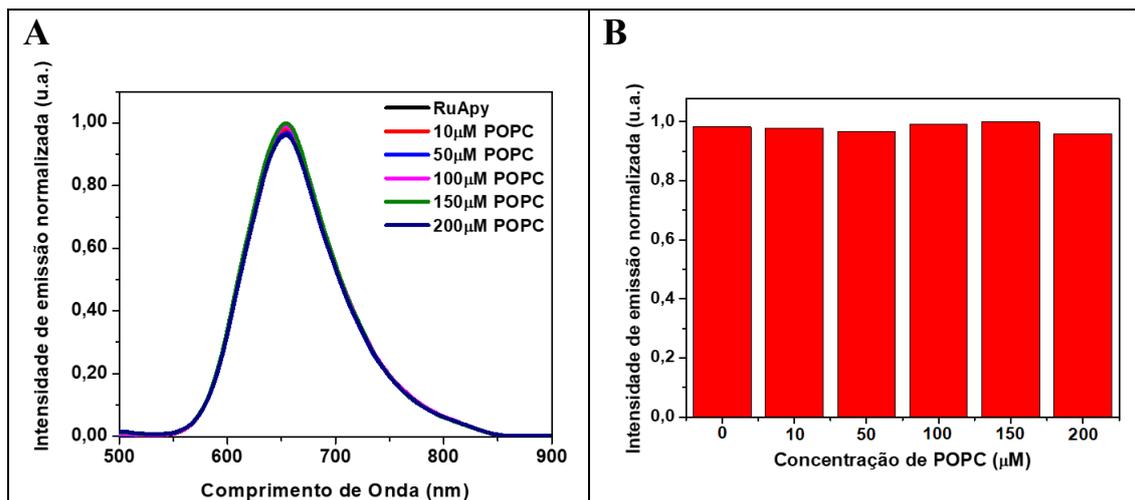


FIGURA 4.21 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de POPC (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de POPC no meio.

Uma das hipóteses mais disseminadas na literatura relacionada a interação do peptídeo A β e as membranas está associada as cargas presentes na membrana, indicando que a interação e toxicidade do peptídeo aumenta significativamente quando a carga negativa das membranas aumenta.^{95, 152}

Assim, foram realizados os mesmos experimentos anteriores, porém adicionando uma porcentagem molar de 5% de POPS na composição das LUVs, ou seja 95% de POPC e 5% de POPS (POPC:POPS), os resultados estão na Figura 4.22. O lipídio POPS tem carga negativa e é amplamente encontrado em células eucarióticas e geralmente é encontrado nas bicamadas de uma célula em porcentagens de aproximadamente 5 % mol, além disso, está presente em maior quantidade na parte interna da bicamada e sua mobilidade para a parte externa da bicamada pode ser uma sinalização de apoptose da célula.^{153, 154} Além disso lipídios contendo a cabeça polar PS também desempenham papel importante frente à agregação do peptídeo A β , acelerando o processo.^{155, 156}

Os resultados obtidos mostram que há um pequeno aumento na intensidade de emissão em concentrações mais altas de vesículas, o que pode ser

um indicativo de que caso esteja havendo algum tipo de interação, esta é mais significativa quando há cargas negativas presentes nas vesículas do que para vesículas inteiramente neutras, e, talvez não tenha ocorrido uma grande diferença por conta da baixa porcentagem de lipídios negativos que foi adicionada.

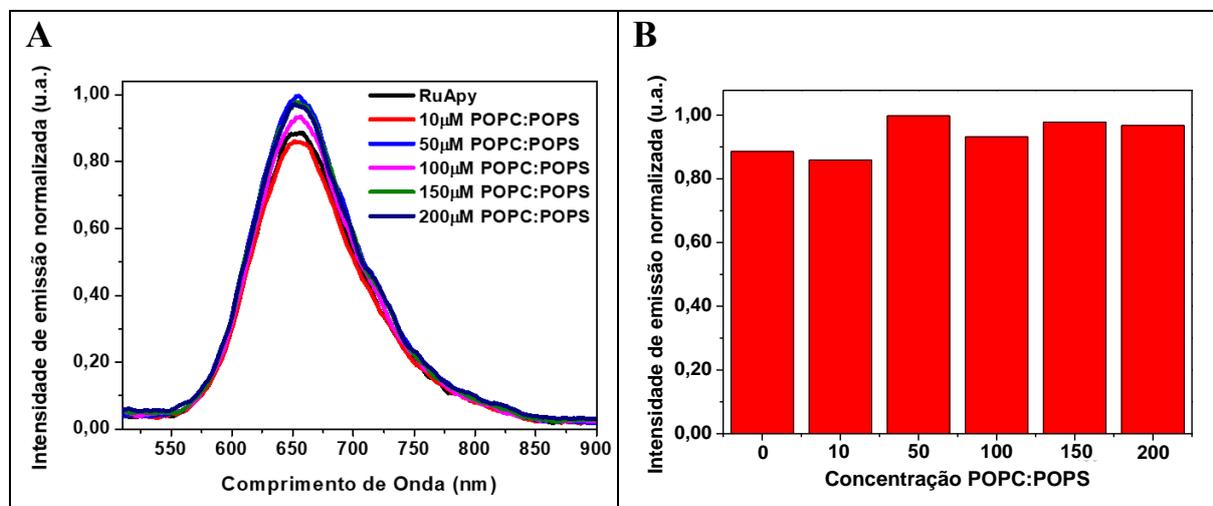


FIGURA 4.22 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs 95% POPC e 5% POPS (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de 95% POPC e 5% POPS no meio.

De forma a forçar uma situação extrema, o experimento foi realizado apenas com cargas negativas, ou seja, vesículas compostas 100% de fosfolipídios com carga negativa, nesse caso o DOPG, para avaliar se o comportamento da emissão sofria uma mudança significativa por conta de interações eletrostáticas, já que o complexo tem carga positiva.

Desta forma, repetiu-se os experimentos para avaliar a intensidade de emissão Figura 4.23. A partir dos resultados nota-se que há uma mudança significativa na intensidade de emissão quando a proporção de vesículas com relação ao complexo aumenta para uma proporção de 1:15 complexo:LUVs. Essa queda de emissão pode ser um indicativo de que há algum tipo de interação,

possivelmente eletrostática, ocorrendo entre as vesículas e o complexo, mas é necessária uma condição extrema, já que no meio biológico não existem membranas que sejam compostas inteiramente de lipídios carregados negativamente.

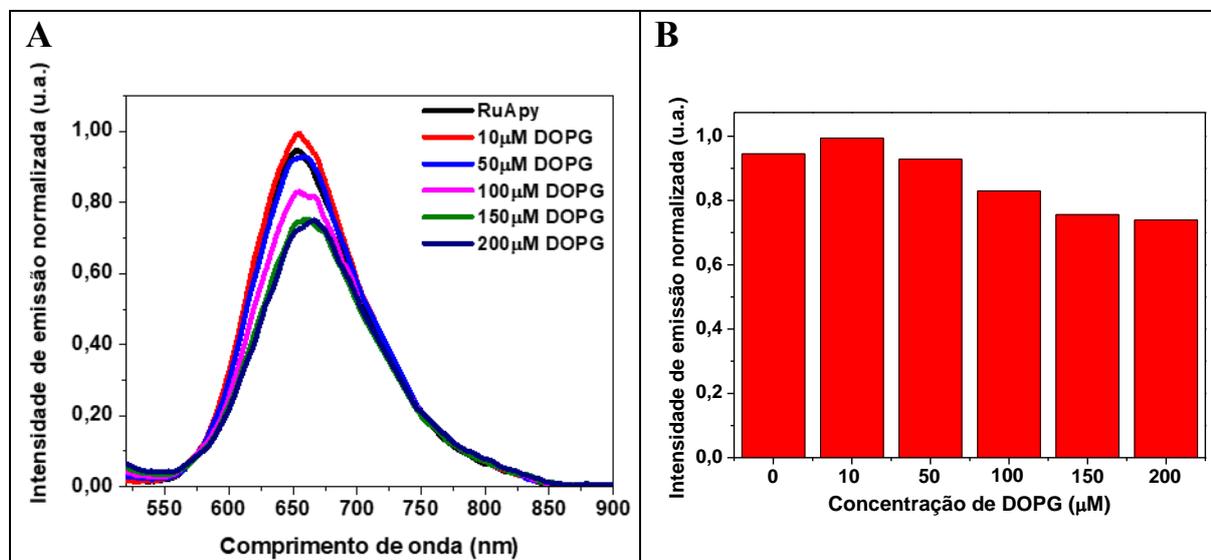


FIGURA 4.23 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de DOPG (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de DOPG no meio.

Considerando que o Colesterol tem implicações na interação entre o peptídeo A β e o modelo membrana, foram realizados experimentos utilizando uma combinação de 80% mol de POPC com 20% mol de Colesterol (POPC:Chol), Figura 4.24.^{70, 157} Há um pequeno aumento da intensidade de emissão, principalmente em concentrações de vesículas elevadas, principalmente acima de 100 μM . Isso pode ser um indicativo que pode estar ocorrendo uma interação, porém ela provavelmente é bem fraca, considerando a mudança de intensidade de emissão observada.

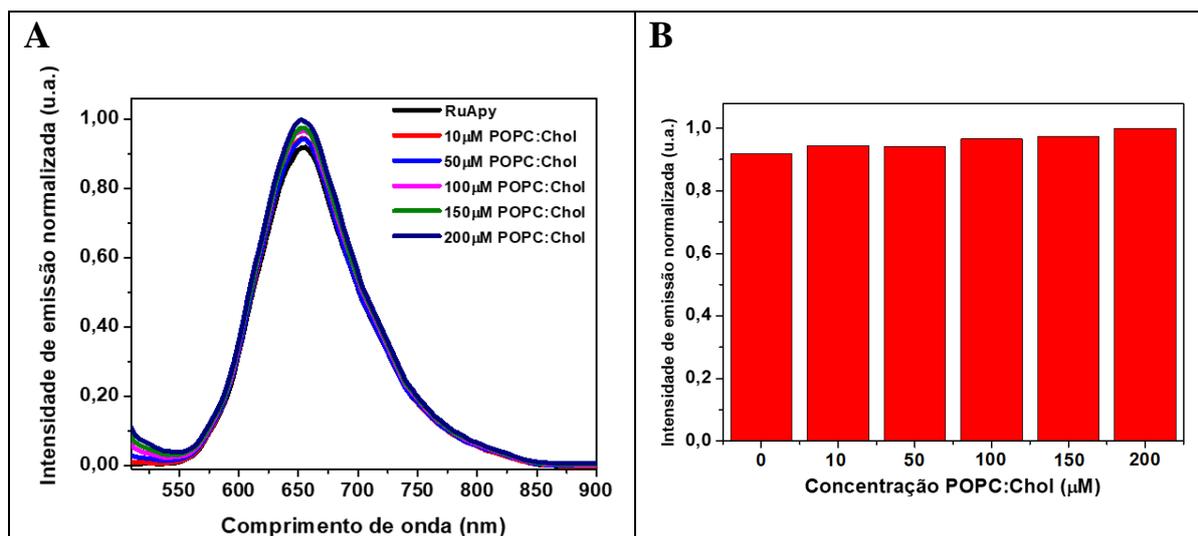


FIGURA 4.24 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de POPC:Chol (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de POPC:Chol no meio.

Outra composição lipídica analisada foi com os lipídios que de acordo com a literatura mimetizam uma célula neuronal saudável.¹⁵⁸ Desta forma, as vesículas foram formadas utilizando uma combinação determinada de lipídios e componentes de membrana em determinadas porcentagens molares: DPPC 35,5% mol, POPC 34,1% mol, SM 9,8% mol, Colesterol 18,1% mol e o GM1 2,7% mol. Os resultados apresentados na Figura 4.25 mostram que não há alteração na intensidade de emissão do RuApy na presença das vesículas no meio, desta forma, isso indica que ou não há interação entre o complexo RuApy e as vesículas, ou a interação não causa uma mudança da intensidade de emissão semelhante ao que foi observado para as LUVs de POPC.

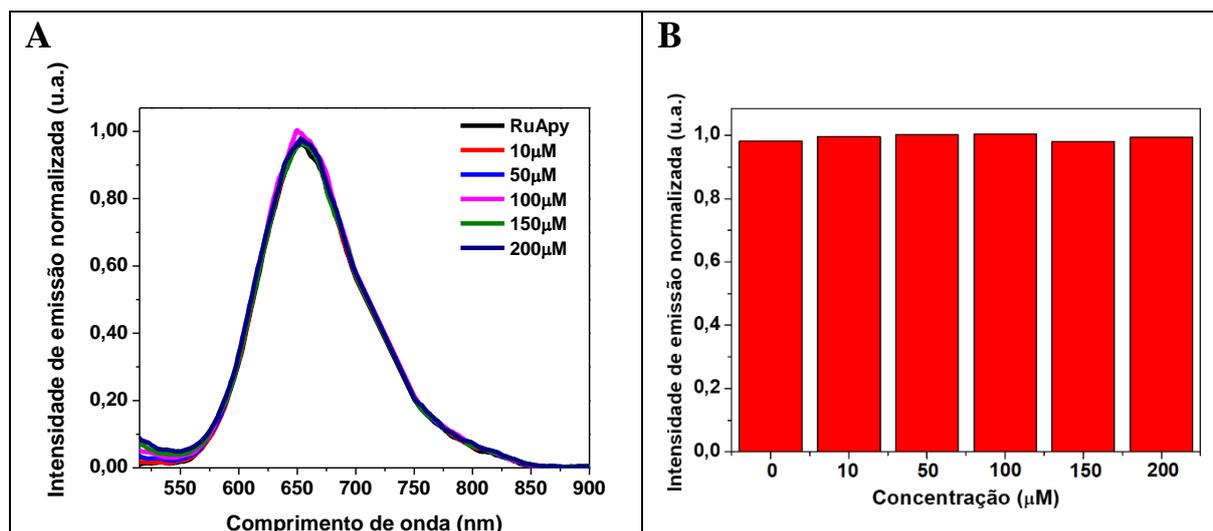


FIGURA 4.25 - (A) Espectros de emissão para 10 μM de RuApy (preto) e para 10 μM RuApy na presença de diferentes concentrações (10 a 200 μM) das LUVs de DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 (demais) (B) Comparação das intensidades de emissão de 10 μM complexo RuApy com a variação da concentração de vesículas de DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 no meio.

4.3.2. Estudo do Mecanismo de Interação por Determinação da Constante de Dissociação (K_d)

Dado que não foram observadas mudanças na resposta luminescente do complexo frente às soluções de vesículas avaliando a interação pela alteração na intensidade de emissão do complexo, buscou-se uma metodologia que fosse capaz de determinar a interação por alterações nos modelos de membrana. Dessa forma, foram realizados experimentos usando bicamadas suportadas marcadas com lipídios luminescentes em dispositivos microfluídicos analisadas por microscopia de fluorescência.

O experimento para determinação do K_d se baseia na diferença de fluorescência do corante presente na bicamada suportada quando há a interação do analito de interesse com a bicamada. Portanto, considerando que o complexo RuApy é luminescente e o método utiliza um lipídeo fluorescente buscou-se um corante de membrana que possibilitava analisar a interação por um mecanismo de

transferência de energia, como por exemplo Forster ou Dexter, entre as espécies fluorescentes o que resultaria em uma alteração na fluorescência dos cromóforos envolvidos.

Desta forma, o lipídio fluorescente utilizado na bicamada foi o NBD-PC, isso porque o corante apresenta excitação com máximo em 460 nm e excitação com máximo em 545 nm enquanto o RuApy tem excitação com máximo em 480 nm e emissão em 655nm. Isso significa que os espectros de emissão do NBD-PC e de absorção/excitação do RuApy tem uma alta sobreposição espectral, ou seja, alta sobreposição entre o espectro de emissão do doador (NBD-PC) e o espectro de excitação do receptor (RuApy), Figura 4.26, o que é um dos requisitos para a ocorrência do mecanismo de transferência de energia de Forster (FRET).

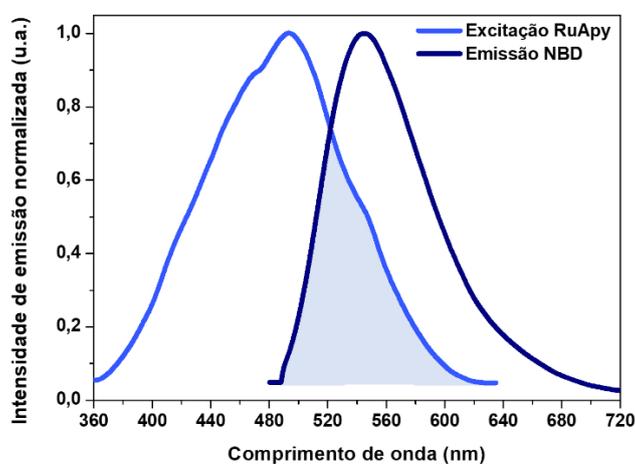


FIGURA 4.26 - Espectros de excitação do RuApy e emissão do NBD em tampão PBS pH 7,4 mostrando a sobreposição necessária para o mecanismo de FRET.

O FRET é a transferência de energia entre um cromóforo doador e um cromóforo aceptor. Quando se incide luz no sistema no comprimento de onda de máxima absorção do doador e ele é excitado, quando o elétron atinge o estado excitado, a energia é transferida para o receptor, que então emite esse fóton.¹⁵⁹ No caso do sistema estudado, O NBD é um doador de energia, assim quando observam-se os canais do dispositivo microfluídico no microscópio é possível ver a diferença na intensidade de emissão do sistema inicial em que só tampão PBS

está passando no sistema, Figura 4.27 (A), para o sistema quando há adição nos canais das soluções de RuApy em diferentes concentrações, Figura 4.27 (B). A partir dessa diferença da intensidade de emissão é possível determinar o valor da constante de dissociação para cada uma das composições lipídicas utilizadas nas bicamadas que foram analisadas.

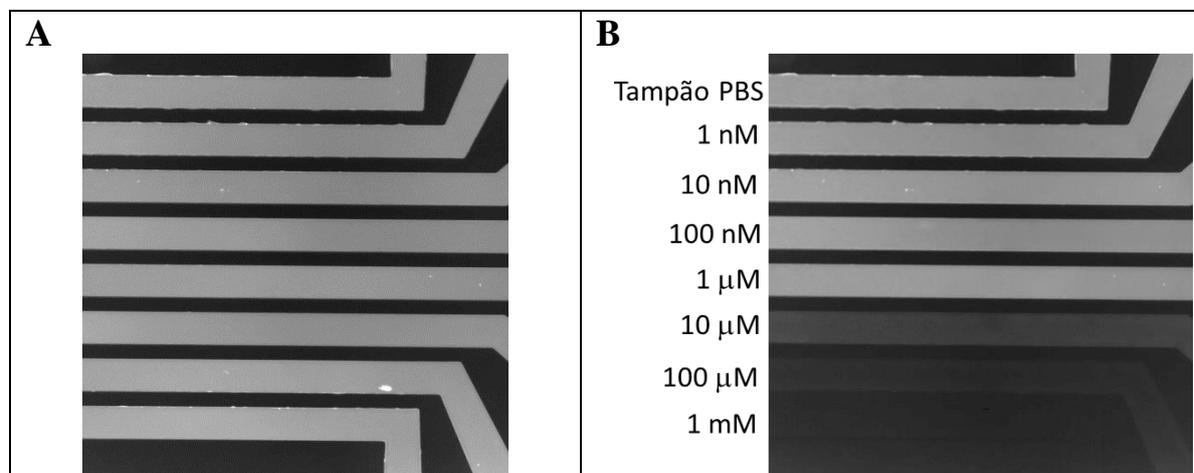


FIGURA 4.27 - Imagens de microscópio para os canais contendo bicamadas suportadas com NBD-PC (A) quando apenas tampão estava fluindo pelos canais e (B) quando foram adicionadas diferentes concentrações do complexo RuApy aos canais.

Para estudar o mecanismo de interação entre o complexo RuApy e o modelo de membrana, algumas suposições foram feitas considerando como essa interação poderia estar ocorrendo com base na estrutura molecular do complexo. Dessa forma, considerou-se que as interações poderiam ocorrer por meio de interações eletrostáticas uma vez que o complexo tem carga positiva. Por meio de interações hidrofóbicas entre as fenantrolinas coordenadas ao centro metálico e a cadeia carbônica dos lipídios presentes na bicamada. Ou, ainda, por ligações de hidrogênio devido ao dos ligantes 3,4-diaminopiridina e a cabeça polar dos lipídios.

4.3.2.1. Experimentos Padrão com SLBs Neutras

Primeiramente, realizou-se a determinação do K_d para o RuApy frente a bicamadas compostas apenas de POPC e o NBD-PC com o corante marcando a cadeia carbônica, de forma a manter a superfície o mais neutra possível. Os valores obtidos para o lipídio neutro são importantes para a comparação e análises que virão a ser feitas com outras composições lipídicas para a determinação do mecanismo de interação entre o RuApy e o modelo de membrana.

Com a curva obtida da interação entre a SLB neutra e o RuApy, Figura 4.28, obteve-se um valor de constante de dissociação de $3,11 \mu\text{M} \pm 1,11$. Com isso pode-se concluir que há uma interação entre o complexo e a bicamada, e que tal interação ocorre a partir da adição do complexo na concentração de $3,11 \mu\text{M}$. Isso vai na contramão dos resultados obtidos nos espectros de fluorescência, o que corrobora para a hipótese de que não havia uma mudança da intensidade de fluorescência por conta das características do complexo e do lipídio, que não permitiam um mecanismo de transferência de energia por exemplo, e não porque não estava ocorrendo uma interação entre os componentes em solução.

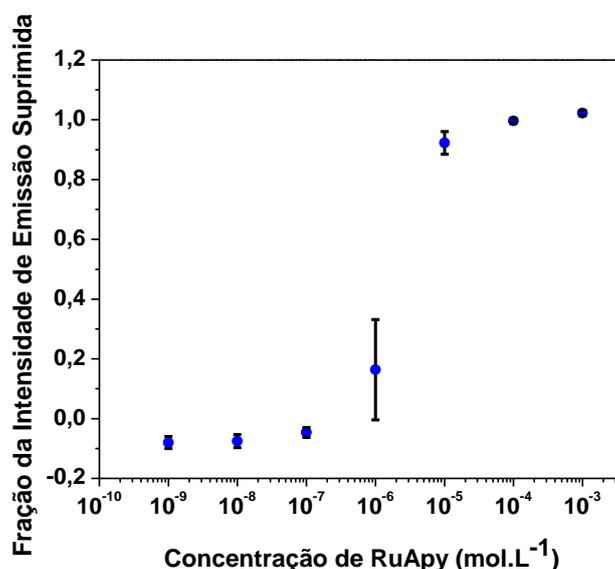


FIGURA 4.28 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC.

Porém, levantou-se a possibilidade de que a interação não estivesse ocorrendo com a bicamada em si e sim unicamente com o corante utilizado na análise, e desta forma, o valor de K_d obtido seria unicamente referente à interação do RuApy com o NBD. Dois fatores colaboraram para o surgimento dessa hipótese: primeiro, o fato de não ter sido observada uma mudança na intensidade de emissão nos experimentos anteriores utilizando da espectroscopia de fluorescência. Segundo, por conta da natureza do corante utilizado nas análises.

O NBD-PC tem uma estrutura em que a molécula de corante está marcando a cadeia acil do lipídeo, de maneira que, em teoria este ficaria na parte apolar interna da bicamada sem alterar a neutralidade da parte externa da bicamada na qual haveria uma primeira interação direta do complexo com o modelo de membrana. Porém, é preciso considerar que a molécula do NBD é polar e tem tendência de buscar um ambiente também polar, que, no caso, seria a interface água/lipídio na superfície. Com isso, pode estar ocorrendo um efeito “*snorkeling*”, ou também chamado de efeito de “*loop up*” do lipídio fluorescente NBD-PC, que consiste no fato de que, como o NBD está no final da cadeia alquil e é uma molécula polar, está propensa a se voltar para a parte polar em um *loop* por conta da flexibilidade da cadeia lipídica hidrofóbica, principalmente em membranas fluidas, como é o caso das bicamadas compostas de POPC e desta forma, facilitaria a interação do RuApy unicamente com o corante.^{160, 161} O efeito está ilustrado de forma simples na Figura 4.29.

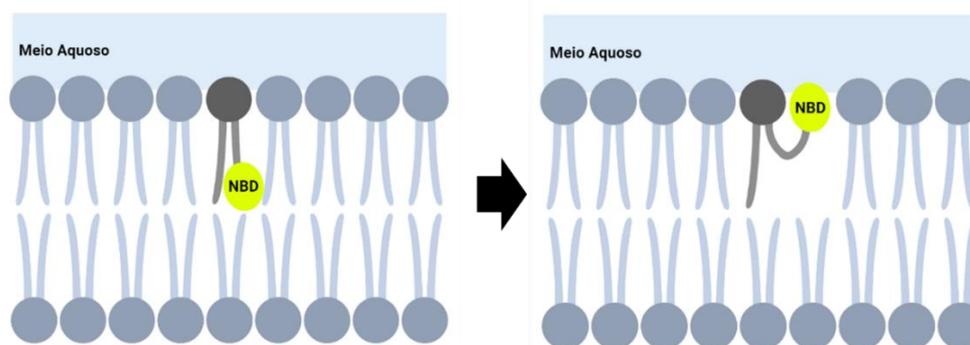


FIGURA 4.29 - Representação simplificada do efeito de “*loop*” que ocorre para o corante NBD-PC.

Para descartar tal hipótese, o mesmo experimento foi realizado usando um corante diferente, neste caso o Texas Red-DHPE. Essas medições foram possíveis apenas para a concentração do complexo RuApy até 300 μM , pois há uma resposta de emissão do complexo de rutênio em concentrações mais altas no filtro que é usado para a fluorescência do TR-DHPE, causando um erro nas medições. O valor de K_d obtido a partir da curva apresentada na Figura 4.30 foi de $3,6 \mu\text{M} \pm 0,40$.

Ao comparar os valores da constante de dissociação obtidos para a bicamada composta por POPC e NBD-PC e a bicamada composta por POPC e TR-DHPE, nota-se que os valores obtidos são muito próximos e isso é uma forte evidência de que o complexo está interagindo com o modelo de membrana e não exclusivamente com o corante levando a resultados constantes de dissociação errôneos. Essa evidência é forte porque os corantes utilizados possuem estruturas muito diferentes e se a interação fosse apenas com o corante, o valor de K_d mudaria drasticamente.

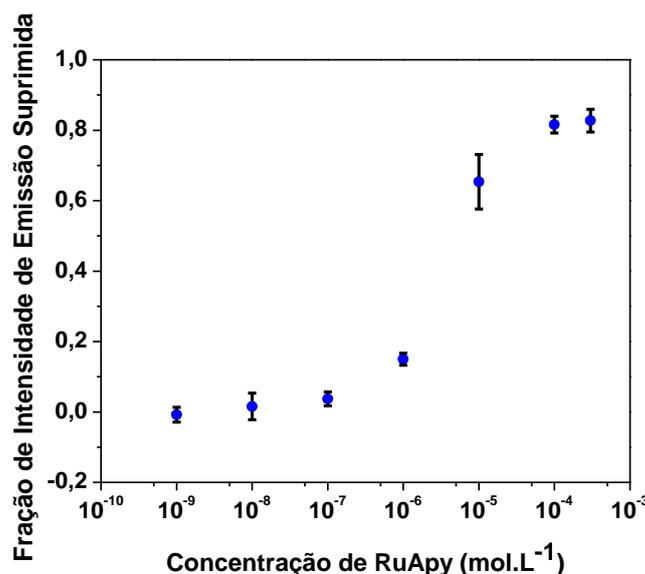


FIGURA 4.30 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 99,7% POPC e 0,3% TR-DHPE.

Outros fatores também que corroboram para a afirmação de que a interação do complexo com a bicamada e não unicamente com os corantes é que o Texas Red é uma molécula grande com um sistema de anéis aromáticos muito maior do que o NBD, o que favorecia interações de empilhamento π - π com as fenantrolinas do complexo levando a uma interação mais forte entre o Texas Red e o complexo. Ainda, o TR-DHPE também tem uma carga negativa, o que favoreceria uma interação com o RuApy frente ao NBD, mesmo considerando o efeito de *loop*, já que o complexo possui carga positiva. Portanto, se a interação fosse unicamente com o corante, o valor de K_d teria a tendência a diminuir para o sistema contendo o TR-DHPE, porém o que se observa é um pequeno aumento no valor da constante e ela continua muito próxima do que foi obtido para o a bicamada contendo o NBD-PC. Ainda, é preciso considerar o fato de que a quantidade desses corantes na bicamada é muito pequena para ter um efeito significativo no valor da constante de dissociação.

Por último, outra diferença entre os corantes é quanto ao mecanismo pelo qual ocorre a perda de emissão do corante para obtenção do K_d . O TR-DHPE apresenta emissão com uma banda fina em aproximadamente 615 nm, sendo assim a sobreposição entre a emissão do TR-DHPE a excitação do RuApy não é efetiva, Figura 4.31, o que indica que a perda de emissão não é devido a um processo de FRET como ocorre para o NBD, e sim por algum outro tipo de mecanismo, como colisões entre as moléculas, que leva a perda de emissão do TR-DHPE quando em contato com diferentes concentrações do complexo.

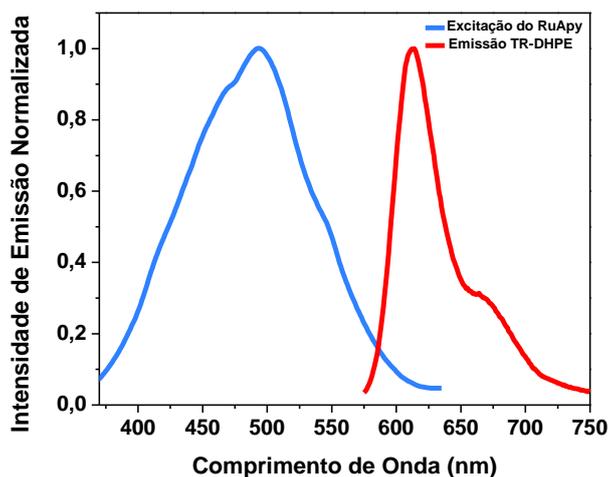


FIGURA 4.31 - Espectros de excitação do RuApy e emissão do Texas Red em tampão PBS pH 7,4 mostrando que não há sobreposição entre os espectros.

Desta forma, pode-se concluir que a interação que ocorre é por conta de uma interação entre o complexo e a bicamada e a diferença da intensidade de emissão se dá por conta da proximidade entre os cromóforos quando o RuApy interage com o modelo de membrana, então, pode-se utilizar tal ensaio para obtenção do K_d e elucidação do mecanismo de interação.

4.3.2.2. Efeito da carga

Considerando que o complexo RuApy tem carga positiva $2+$, uma das possibilidades levantadas é de que a interação entre o complexo e os modelos de membrana poderia ser de natureza eletrostática. Desta forma, as medições foram feitas usando 5% de um lipídio carregado negativamente, o POPS, por conta das razões já citadas anteriormente. Foi obtida a curva para a interação do complexo RuApy com a bicamada composta por 94,5% de POPC, 5% de POPS e 0,5% de NBD-PC, Figura 4.32, e o valor de K_d obtido foi de $1,99 \mu\text{M} \pm 0,29$.

O valor de K_d obtido foi menor que os valores obtidos com as bicamadas contendo apenas lipídeos neutros, porém, como o valor está dentro da mesma ordem de grandeza, não configura uma diferença significativa. Portanto, pode-se dizer que o fato de 5% dos lipídios da bicamada serem carregados

negativamente não tem grande influência na interação entre o complexo e o modelo de membrana.

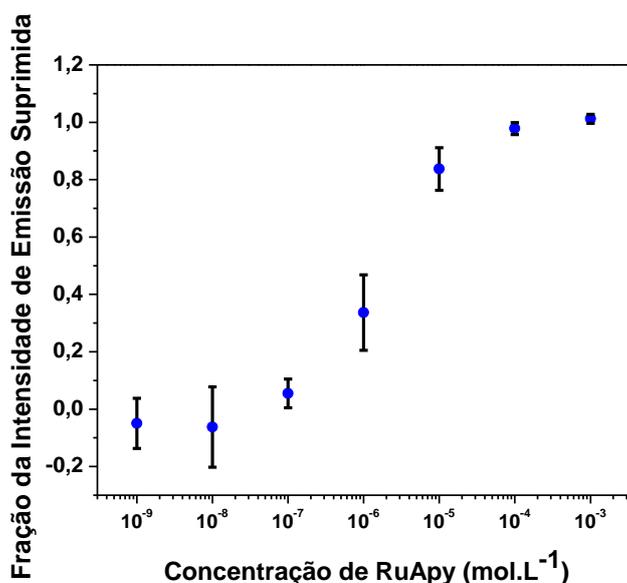


FIGURA 4.32 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC.

Outra maneira de avaliar o efeito da carga na interação entre o complexo e a membrana, é por meio do efeito da quantidade de sal, cloreto de sódio (NaCl), presente na solução tampão utilizada nas medidas. Isso porque, quando há uma concentração elevada de sal em solução é preciso considerar um efeito de blindagem na superfície de análise, no caso, as SLBs. Desta forma, este efeito ocorre porque o tampão utilizado nos experimentos foi o tampão PBS 10 mM que contém 137 mM de NaCl, e esta quantidade de sal faz com que os íons de sódio formem uma camada próxima à superfície da bicamada suportada alterando a carga líquida na superfície, evitando assim que o complexo interaja eletrostaticamente com a bicamada já que o íon Na^+ é pequeno, o que facilita seu acesso a superfície, Figura 4.33 (A). Na ausência de NaCl no meio, o caminho fica livre para a interação do complexo RuApy com a superfície da bicamada lipídica, Figura 4.33 (B).

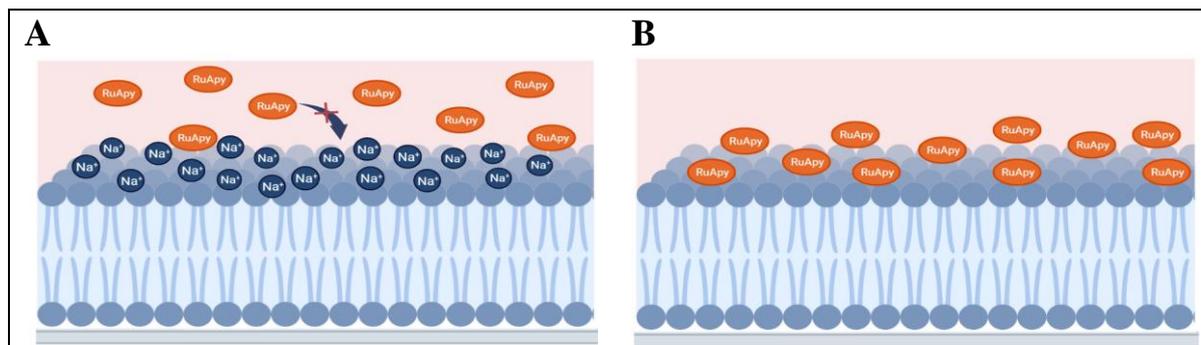


FIGURA 4.33 - (A) Interação do complexo RuApy dificultada pela presença de íons Na^+ devido ao efeito de blindagem e (B) Interação do complexo RuApy sem íons Na^+

Assim, a influência do sal na interação RuApy/membrana foi verificada realizando as medidas em tampão fosfato 10mM pH 7,4 sem adição de NaCl. Os gráficos com as curvas de determinação de K_d são apresentados na Figura 4.34 e os valores de K_d obtidos para as bicamadas com as composições de lipídios já estudadas anteriormente foram: $0,22 \mu\text{M} \pm 0,04$ para as bicamadas compostas de 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC; $0,68 \mu\text{M} \pm 0,12$ para as bicamadas com 99,7% POPC e 0,3% TR-DHPE e $0,089 \mu\text{M} \pm 0,009$ para as SLBs com 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC.

A partir dos dados apresentados, quando o sal é removido do sistema, a constante de dissociação diminui por um fator de aproximadamente 10 vezes para todas as composições de membrana analisadas, indicando uma maior interação entre o complexo RuApy e os modelos de membrana estudadas.

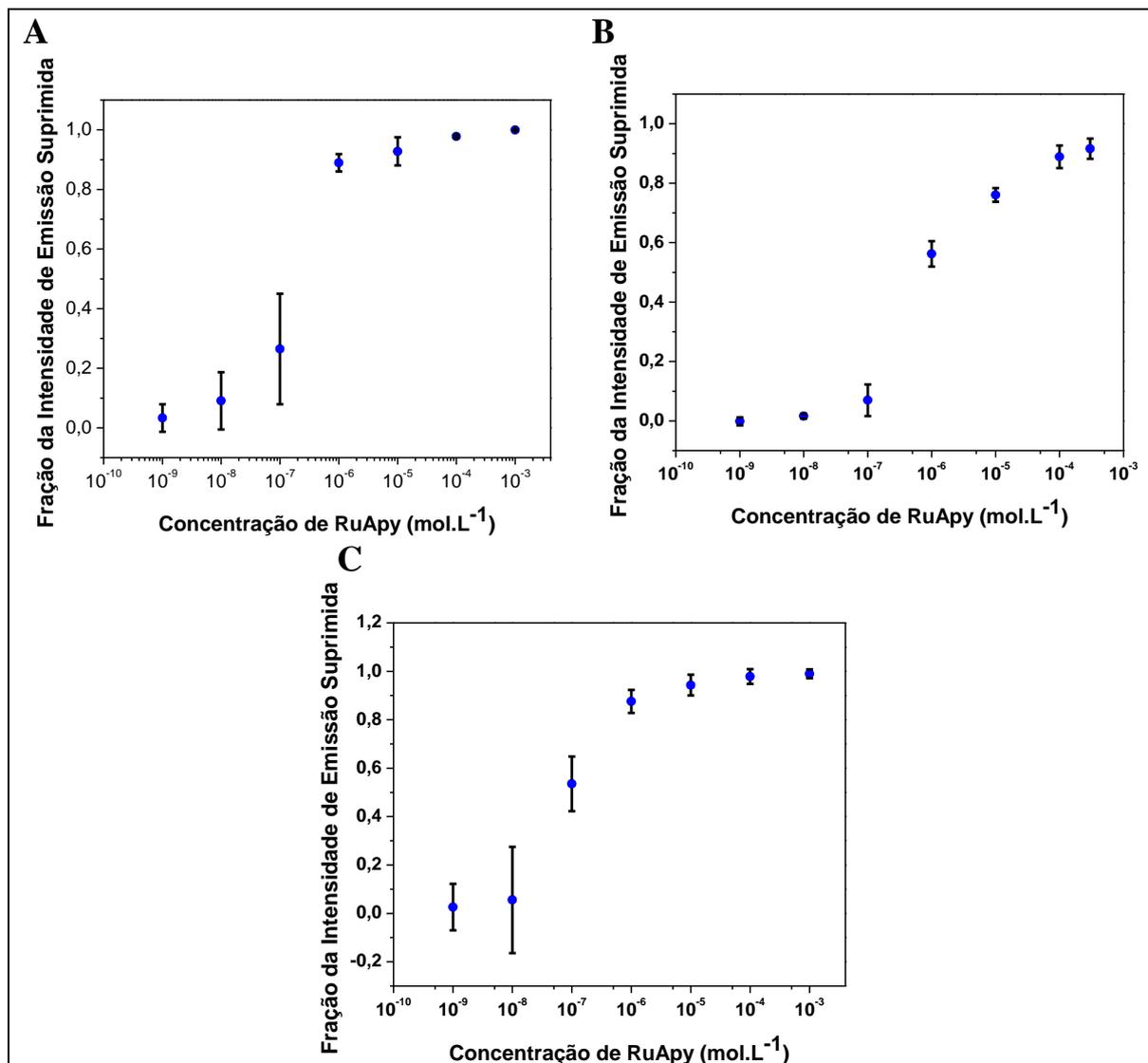


FIGURA 4.34 - Curva para a determinação da constante de dissociação em tampão fosfato 10 mM entre o complexo RuApy e a bicamada composta por (A) 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC, (B) 99,7% POPC e 0,3% TR-DHPE e (C) 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC.

Esperava-se, entretanto, que para as SLBs contendo apenas lipídios neutros, a diminuição do valor de K_d , ou seja, o aumento da força da interação, não seria tão significativa quanto para a composição da membrana contendo lipídios negativos. Isso pode estar ocorrendo porque mesmo sendo neutros os lipídios apresentam um potencial de dipolo na cabeça polar, que podem ter influência na interação do complexo com a membrana neutra, e desta forma, a interação com esses dipolos seria também facilitada na condição sem NaCl no

meio.^{162, 163} A constante de dissociação obtida para a bicamada contendo 5% de POPS e sem sal, ou seja, sem o efeito de blindagem, foi menor do que para as bicamadas contendo apenas lipídeos neutros, indicando uma maior interação quando há lipídios negativamente carregados no meio.

Assim, considerando esses resultados pode-se concluir que existe um componente eletrostático que contribui para a interação do complexo RuApy com a membrana, mas isso não é tão significativo, pois com a adição de 5% de lipídios carregados negativamente não há grande diferença na constante em relação às bicamadas contendo apenas lipídios neutros.

4.3.2.3. Efeito da fluidez

A interação entre o complexo e a membrana poderia ocorrer entre os dois ligantes 1,10-fenantrolina presentes na estrutura do complexo, que são moléculas orgânicas hidrofóbicas e que teriam alto potencial de interação com a cadeia carbônica dos lipídios caso se incorporassem na bicamada. Para verificar a influência desse tipo de interação e qual era a sua influência no mecanismo de interação entre o complexo e o modelo de membrana, 30% mol de Colesterol foi adicionado ao modelo de membrana. Isso porque o colesterol é um modulador, que modifica a fluidez do modelo de membrana, tornando a membrana composta por POPC mais rígida, Figura 4.35.¹⁶⁴

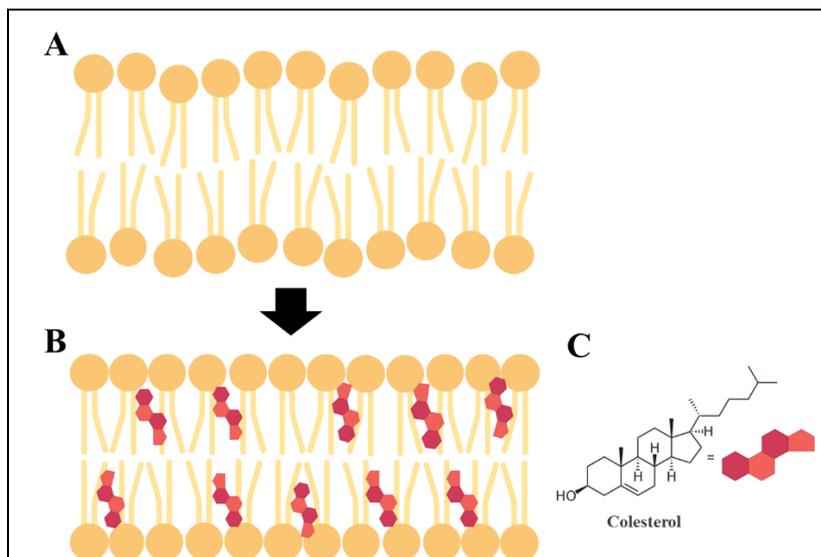


FIGURA 4.35 - Representação do efeito de organização causado na bicamada pela adição de colesterol.

Assim, modulando a fluidez, caso interações com a cadeia hidrofóbica do lipídio fossem significativas para o sistema, com o aumento da rigidez da membrana, a interação do rutênio com a cadeia carbônica lipídica seria dificultada por conta de uma redução da permeabilidade do complexo na bicamada, fazendo com que o valor de K_d aumentasse.^{57, 165}

Desta forma, a partir da curva para a interação do RuApy com a bicamada composta por 69,7% de POPC, 30% Chol e 0,3% TR-DHPE em tampão PBS, Figura 4.36, o valor de K_d de $2,85 \mu\text{M} \pm 0,70$ foi obtido. Este valor é muito próximo e na mesma ordem de grandeza do valor de K_d obtido para a bicamada apenas com POPC e TR-DHPE, sem a presença de colesterol. Assim, pode-se concluir que a fluidez não influencia no tipo de interação que ocorre e portanto, sua contribuição para o mecanismo desta interação é mínima.

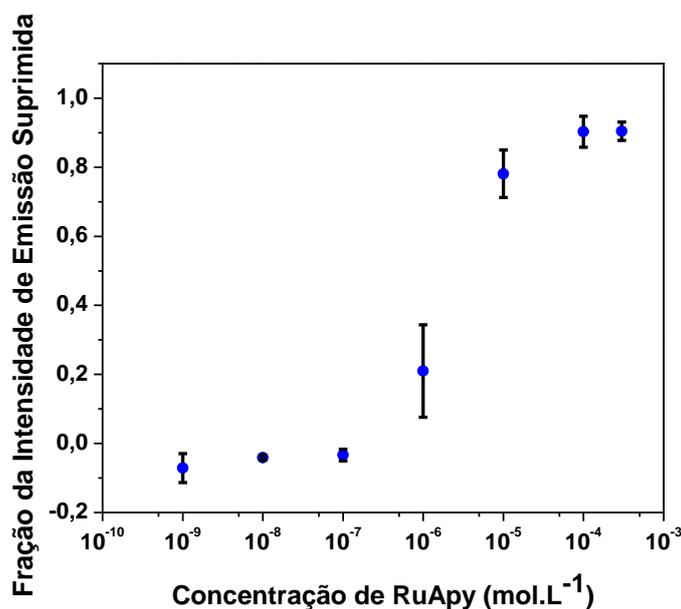


FIGURA 4.36 - Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 69,7% POPC, 30% Chol e 0,3% TR-DHPE.

4.3.2.4. Efeito de Ligações de Hidrogênio

Outro fator que poderia contribuir no mecanismo de interação são as ligações de hidrogênio que podem ocorrer devido aos ligantes 3,4-diaminopiridinas coordenadas ao rutênio. Desta forma, as ligações de hidrogênio podem ocorrer entre os hidrogênios disponíveis desses ligantes e o grupo fosfato presente na cabeça dos lipídeos.

Com isso, um primeiro experimento para verificar se houve contribuição de ligações de hidrogênio foi feito com a adição de 5% do lipídeo POPE na composição das bicamadas suportadas, sendo assim as bicamadas analisadas tinham 94,5% POPC, 5% POPE e 0,5% NBD-PC. Isso porque na cabeça polar desses lipídios, há apenas hidrogênios ligados ao nitrogênio presente na cabeça polar, o que facilitaria a interação por ser menos volumoso, diferente POPC que possui grupos metil ligados ao nitrogênio. Desta forma, através das medições e da curva, Figura 4.37, obteve-se um K_d de $0,81 \mu\text{M} \pm 0,05$, mostrando

que há uma diminuição do valor quando comparado a bicamadas compostas apenas por POPC.

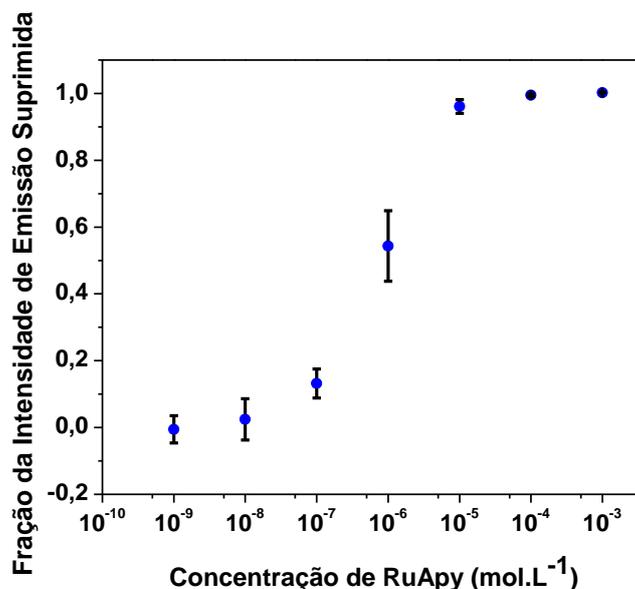


FIGURA 4.37 - (A) Estrutura do POPE e (B) Curva para a determinação da constante de dissociação entre o complexo RuApy e a bicamada composta por 94,5% POPE, 5% POPE e 0,5% NBD-PC.

Sendo assim, a interação é mais forte quando há 5% de POPE na composição das bicamadas e então pode-se dizer que há uma contribuição da ligação do hidrogênio para a interação. As ligações que ocorrem entre os hidrogênios das diaminopiridinas com o oxigênio do grupo fosfato presente na cabeça polar dos lipídios, sendo facilitadas na presença dos lipídios POPE, pois como há apenas hidrogênios ligados ao nitrogênio presentes na cabeça polar, não há tanto efeito estérico como pode ocorrer no caso de POPC porque os grupos metil têm volume especial maior que os hidrogênios do POPE.

Para garantir a contribuição das ligações de hidrogênio na interação entre o RuApy e o modelo de membrana, foram feitas medidas também em água deuterada (D₂O). Ao trocar o meio por um tampão PBS preparado em D₂O, ocorre a troca dos hidrogênios dos ligantes 3,4-diaminopiridina por deutério e isso leva a um aumento na força da ligação de hidrogênio por causa de um efeito isotópico,

já que o deutério é mais pesado que o hidrogênio e desta forma há uma ligação mais forte e mais curta, e desta forma, é mais difícil de quebrá-la.¹⁶⁶ Com isso, caso o mecanismo de interação tenha contribuição de ligações de hidrogênio, ao ocorrer a troca por deutério, a interação entre o complexo e a bicamada seria mais forte levando a um valor de K_d menor.

Desta forma, as medidas foram realizadas preparando o tampão PBS contendo 137 mM de NaCl em D_2O e repetiu-se as medidas utilizando esse tampão para as bicamadas compostas de 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC e as bicamadas de 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC. A partir das curvas, Figura 4.38, as constantes de dissociação obtidas foram $0,83 \mu M \pm 0,23$ para a bicamada contendo apenas lipídios neutros e $0,84 \mu M \pm 0,17$ para a membrana contendo 5% POPS. É possível notar que em comparação com as medidas feitas em H_2O , os valores da constante de dissociação diminuem por um fator de 3 via efeito do isótopo deutério, concluindo-se que há uma interação mais forte como era esperado.

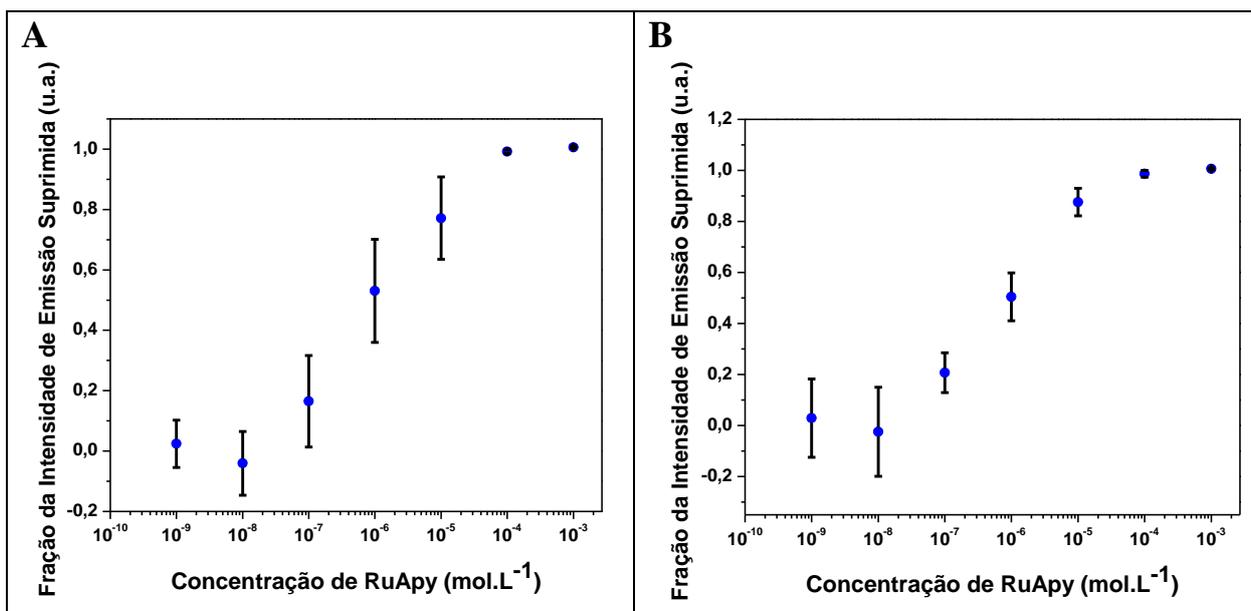


FIGURA 4.38 - Curva para a determinação da constante de dissociação em tampão PBS em D_2O entre o complexo RuApy e a bicamada composta por (A) 99,5% POPC e 0,5% NBD-PC e (B) 94,5% POPC, 5% POPS e 0,5% NBD-PC

A Tabela 4.2 sumariza os dados de K_d obtidos nos estudos para elucidação do mecanismo de interação RuApy/modelos de membrana lipídica.

TABELA 4.2 - Valores de K_d obtidos para o estudo do mecanismo de a interação entre o complexo RuApy e os modelo de membrana.

Composição da SLB (%mol)	Condição do meio (tampão, pH 7,4)	K_d (μM)
	PBS; 137 mM NaCl	3.11 ± 1.11
99,5% POPC e 0,5% NBD-PC	Fosfato 10 mM; sem NaCl	0.22 ± 0.04
	PBS em D₂O ; 137 mM NaCl	0.83 ± 0.23
99,7% POPC e 0,3% TR-	PBS; 137 mM NaCl	3.6 ± 0.40
DHPE	Fosfato 10 mM; sem NaCl	$0,68 \pm 0,12$
94,5% POPC, 5% POPS e	PBS; 137 mM NaCl	1.99 ± 0.29
0,5% NBD-PC	Fosfato 10 mM; sem NaCl	0.089 ± 0.009
	PBS em D₂O ; 137 mM NaCl	0.84 ± 0.17
69,7% POPC, 30%	PBS; 137 mM NaCl	2.85 ± 0.70
Colesterol e 0,3% TR-DHPE		
94,5% POPC, 5% POPE e	PBS; 137 mM NaCl	0.81 ± 0.05
0,5% NBD-PC		

Desta maneira, considerando todos os valores de K_d nas condições estudadas e fazendo a comparação com o padrão, que é a bicamada composta apenas por lipídios neutros (99,5% POPC e 0,5% NBD-PC em tampão PBS), pode-se concluir que o mecanismo de interação do complexo RuApy com o modelo de membrana tem contribuições principalmente eletrostáticas e de ligações de hidrogênio, e que possivelmente a interação se dá na superfície da bicamada, com a cabeça polar dos lipídeos, sem se inserir no meio hidrofóbico da bicamada.

4.3.3. Isotermas π -A

As monocamadas de Langmuir são amplamente utilizadas para estudar a ordenação das moléculas e com isso para avaliar interações de moléculas externas com os lipídios componentes das monocamadas. Desta forma, por meio das monocamadas de Langmuir ao analisar o perfil das Isotermas π -A, pode-se avaliar as interações entre o complexo RuApy e os modelos de membrana já que caso uma molécula esteja interagindo com essa monocamada, a curva da Isoterma vai mudar.¹⁶⁷ Além disso, tal técnica permite avaliar as interações sem o uso de um corante na monocamada, e desta forma confirmar com certeza a interação entre o RuApy e os modelos de membrana sem a dúvida anteriormente levantada sobre o complexo talvez estar interagindo apenas com o corante de membrana.

As Isotermas π -A foram feitas com monocamadas em 3 composições lipídicas: 100% DPPC apresentada na Figura 4.39 (A), 100% POPC na Figura 4.39 (B) e a mistura 95% POPC e 5% POPS na Figura 4.39 (C), a escolha dessas composições foi baseada nas diferentes características que podem influenciar na interação do complexo com a monocamada, como a organização, já que o DPPC apresenta uma fase líquido condensada mais ordenada, e a carga, com a adição do POPS que possui uma carga negativa. As isotermas para as monocamadas DPPC e POPC estão de acordo com a literatura¹⁶⁸ e observa-se um deslocamento da curva para maiores áreas quando há a adição do RuApy no sistema para todos os casos, o deslocamento da curva é um indicativo de que o composto está interagindo com a monocamada pois quando analisando uma mesma pressão superficial há um aumento da área por molécula, assim, conclui-se que a molécula adicionada está modificando o sistema lipídico, já que, se não houvesse nenhum tipo de interação e a molécula permanecesse apenas na subfase aquosa sem interagir, a curva não teria se deslocado.

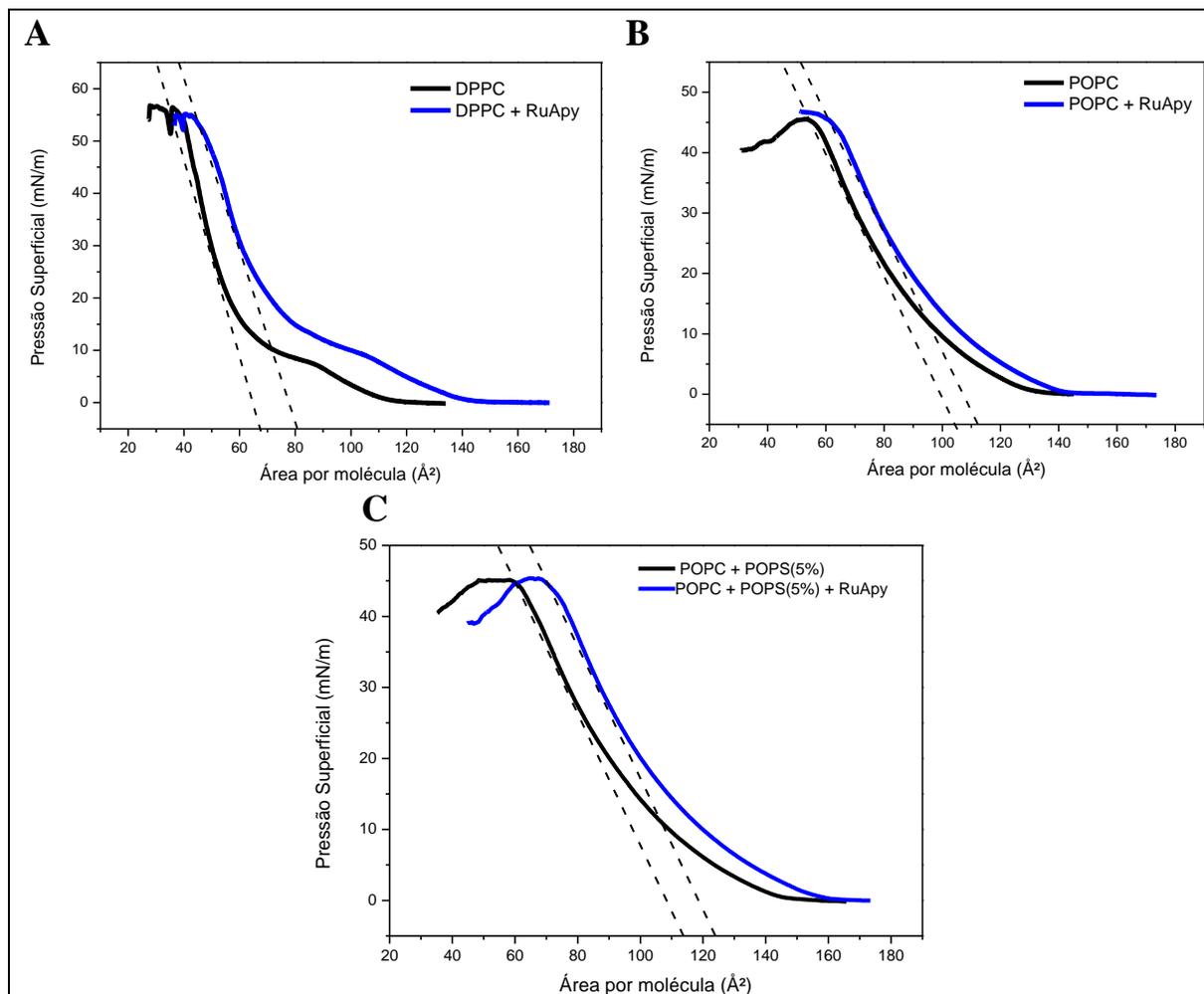


FIGURA 4.39 - Isotermas π -A na ausência (preto) e na presença de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4 para monocamadas compostas por (A) 100% DPPC (B) 100% POPC (C) 95% POPC e 5% POPS

Ainda, para determinar qual foi o aumento da área por molécula para cada uma das composições lipídicas estudados na presença do RuApy, a análise é feita tendo como referência a pressão 30mN/m pois a pressão superficial que melhor mimetiza um sistema biológico, e, assim extrapola-se uma reta desse ponto no eixo da abcissa para determinar a área por molécula do sistema naquela pressão superficial.¹⁶⁹ Pode-se observar que o deslocamento foi maior para o DPPC, 13Å², do que para o POPC, 7 Å².

Como o POPC possui uma insaturação em sua cadeia carbônica e apresenta uma desorganização maior, fazendo com que a monocamada esteja em uma fase que permite maior mobilidade na interface lipídica, o deslocamento

observado não é tão grande. Isso ocorre, pois, cada unidade de molécula lipídica ocupa um maior espaço e por isso há mais espaço, ou seja, maiores áreas disponíveis para a interação do RuApy com a monocamada e por isso o deslocamento é menor do que quando comparado com o DPPC.

Para o caso do DPPC, em que por ser um lipídio que não possui insaturações e apresentar uma conformação mais ordenada na fase líquido condensada na pressão analisada, a área ocupada pelos lipídios para formação da monocamada é menor a interação do RuApy demanda um espaço maior nas monocamadas, e assim observa-se um maior deslocamento da curva. Isso também pode ser um indício de que a interação ocorre com a parte polar da molécula, já que a ordenação facilitaria a interação com a cabeça polar do lipídio.

Ainda, o fato de o deslocamento da curva continuar o mesmo até pressões superficiais próximas à região de colapso, indica que a interação do complexo é relativamente forte, uma vez que se as moléculas estivessem sendo expulsas do sistema conforme a compressão, as curvas teriam a tendência a convergir, diminuindo o deslocamento da área com o aumento da pressão superficial.¹⁷⁰

Outro indício qualitativo de que a interação é apenas com a cabeça polar dos lipídios, independente da composição lipídica, é o fato de que o perfil da curva não muda, indicando que na compressão os lipídios continuam se ordenando de forma a passar por todas as fases da mesma maneira como é observado na curva contendo apenas o lipídio.

Para o sistema contendo 5% do lipídeo negativo POPS na composição da monocamada, o deslocamento também foi maior, 10 \AA^2 , com relação ao observado para o POPC, indicando que possivelmente a interação é maior pois causa uma perturbação maior no sistema, já que a área aumenta mais e isso corrobora para o fato de que um dos mecanismos principais de interação é por conta de contribuições eletrostáticas.¹⁶⁹

4.3.4. PM-IRRAS

Os efeitos do complexo RuApy nas monocamadas formadas de DPPC, POPC e 95% POPC e 5% POPS na pressão superficial de 30 mN/m foram investigados usando a técnica PM-IRRAS. As atribuições das bandas observadas estão apresentadas na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 – Atribuições das bandas obtidas nos espectros de PM-IRRAS em cm^{-1} para as 3 diferentes composições lipídicas das monocamadas estudadas com a subfase de Tampão PBS pH 7,4 e de Tampão PBS na presença de $2\mu\text{M}$ do complexo RuApy.

Atribuições	DPPC		POPC		95%POPC/5%POPS	
	Tampão PBS	$2\mu\text{M}$ RuApy	Tampão PBS	$2\mu\text{M}$ RuApy	Tampão PBS	$2\mu\text{M}$ RuApy
$\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$	963	970	947	955	970	965
$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2)$	1096	-	1122	-	1145	-
$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$	1230	1233	1227	1243	1229	1219
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1730	1727/1747	1740	1719/1745	1736	1720/1748
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2850	2850	2855	2851	1854	1847
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2916	2916	2927	2917	1925	1920

Primeiramente, os espectros obtidos para a região que indica os estiramentos do fosfato e colina característicos da região da cabeça polar dos lipídios que foram analisados estão apresentados na Figura 4.40. É possível observar claramente que há uma mudança do perfil dos sinais observados quando há a adição de $2\mu\text{M}$ de RuApy na subfase aquosa. Essa concentração foi escolhida por estar dentro dos valores de constante de dissociação que foram obtidos anteriormente.

Para as monocamadas de DPPC com RuApy na subfase aquosa, as bandas atribuídas à colina presente na cabeça polar, $\nu(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3) = 912\text{ cm}^{-1}$ não

foram alteradas de maneira significativa, portanto, eles parecem ser pouco afetados pelo complexo, o mesmo perfil é observado para a monocamada composta de POPC.¹⁷¹ Não é possível observar com clareza essas bandas no sistema contendo 5% de POPS, pois a presença desse lipídio que tem o grupo serina na cabeça polar modifica os sinais geralmente observados para a colina, porém, as bandas nessa região parecem não apresentar deslocamentos significativos.

Em contraste, mudanças significativas são observadas em outras bandas características da cabeça polar, por exemplo, o $\nu_s(\text{PO}_2)$ em 1100 cm^{-1} praticamente desaparece para todas as condições estudadas, o que pode ser um indicativo de uma interação eletrostática entre RuApy e o grupo fosfato e/ou uma ligação de hidrogênio entre o fosfato e o grupo amino de RuApy, como já observado anteriormente através das constantes de dissociação obtidas.^{170, 172, 173}

Não há nenhuma evidência de hidratação do grupo fosfato para as monocamadas compostas de DPPC e 95% de POPC com 5% de POPS quando RuApy é adicionado à subfase, uma vez que a indicação disso seria a observação de um sinal $\nu_{as}(\text{PO}_2)$ em 1220 cm^{-1} e, caso desidratado, em 1240 cm^{-1} . No entanto, o espectro para as monocamadas de POPC, Figura 4.40 (B), indica que a interação do RuApy ao grupo polar do POPC induz uma desidratação do grupo fosfato presente na cabeça polar, indicando uma interação do RuApy com a parte polar do lipídio.¹⁷⁴

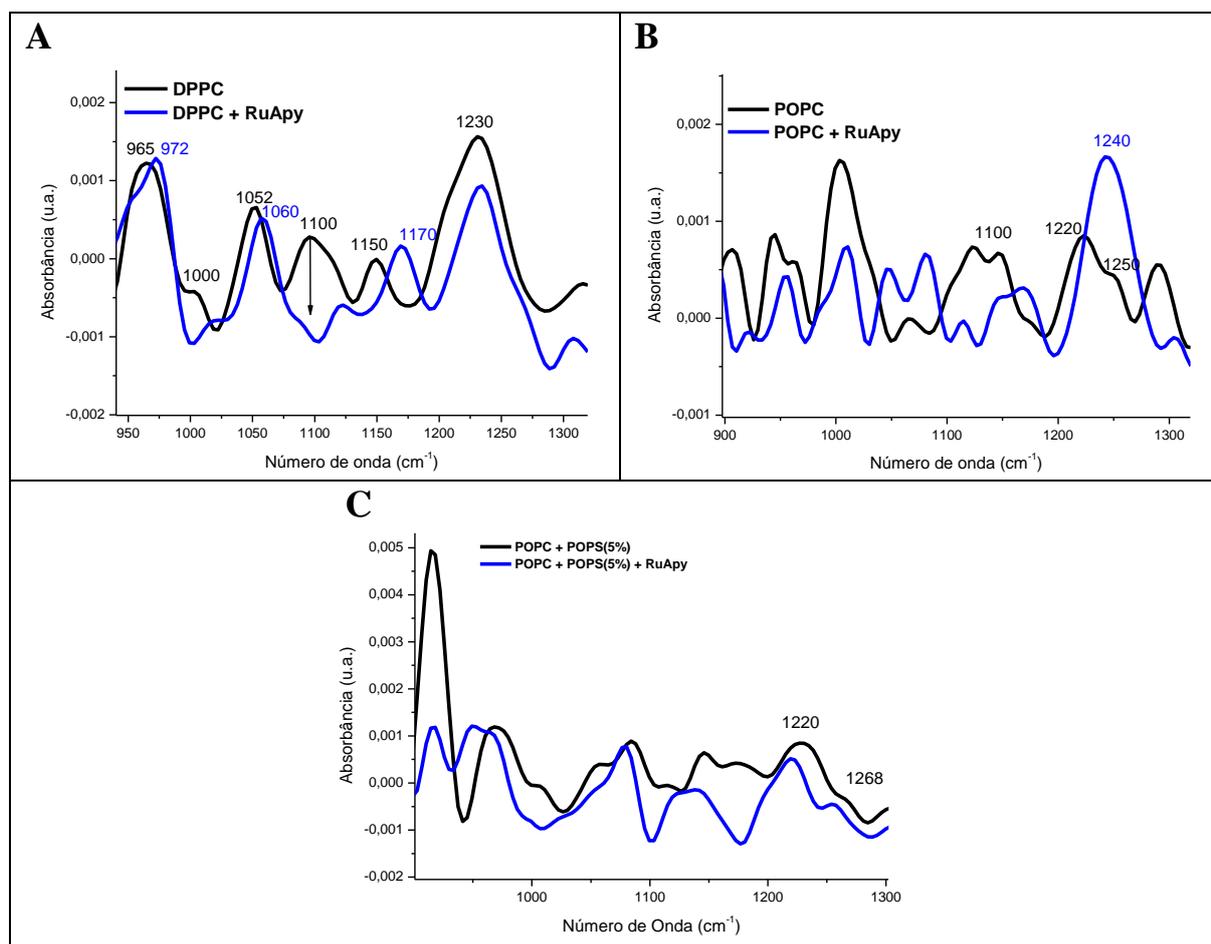


FIGURA 4.40 - Espectros de PM-IRRAS na região do grupo fosfato para as monocamadas compostas de (A) DPPC, (B) POPC e (C) 95% de POPC e 5% POPS no sistema sem (preto) e na presença de 2 μM de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4.

Os espectros também indicam a contribuição da ligação de hidrogênio na interação do RuApy com a membrana lipídica. As bandas das carbonilas presentes na cabeça polar dos lipídios não hidratadas C=O em 1733 cm^{-1} são sensíveis à hidratação da interface lipídica, à polaridade do meio e às ligações de hidrogênio.¹⁷⁵ Em geral, em amostras hidratadas apenas um contorno de banda larga é encontrado para as vibrações de estiramento C=O na região de 1750-1700 cm^{-1} .^{176, 177, 178, 179}

A região dos estiramentos das carbonilas estão apresentados na Figura 4.41. Nos espectros para as monocamadas compostas de DPPC, POPC e 95% POPC com 5% POPS, a banda de estiramento C=O mais forte é encontrada

como uma ampla absorção atribuída a dois componentes próximos de 1740 cm^{-1} , sem ligação de hidrogênio, e 1727 cm^{-1} , com ligação de hidrogênio.^{175, 177} Na presença do RuApy na subfase essas absorções perdem intensidade e se dividem em dois ombros com máximo em torno de 1727 e 1747 cm^{-1} para a monocamada composta de DPPC com o RuApy no meio, 1719 e 1747 cm^{-1} para o sistema com POPC e RuApy e também para o sistema 95% de POPC e 5% de POPS com o RuApy, indicando uma forte ligação de hidrogênio entre o complexo e o grupo carbonila C=O presente na cabeça polar do lipídio.

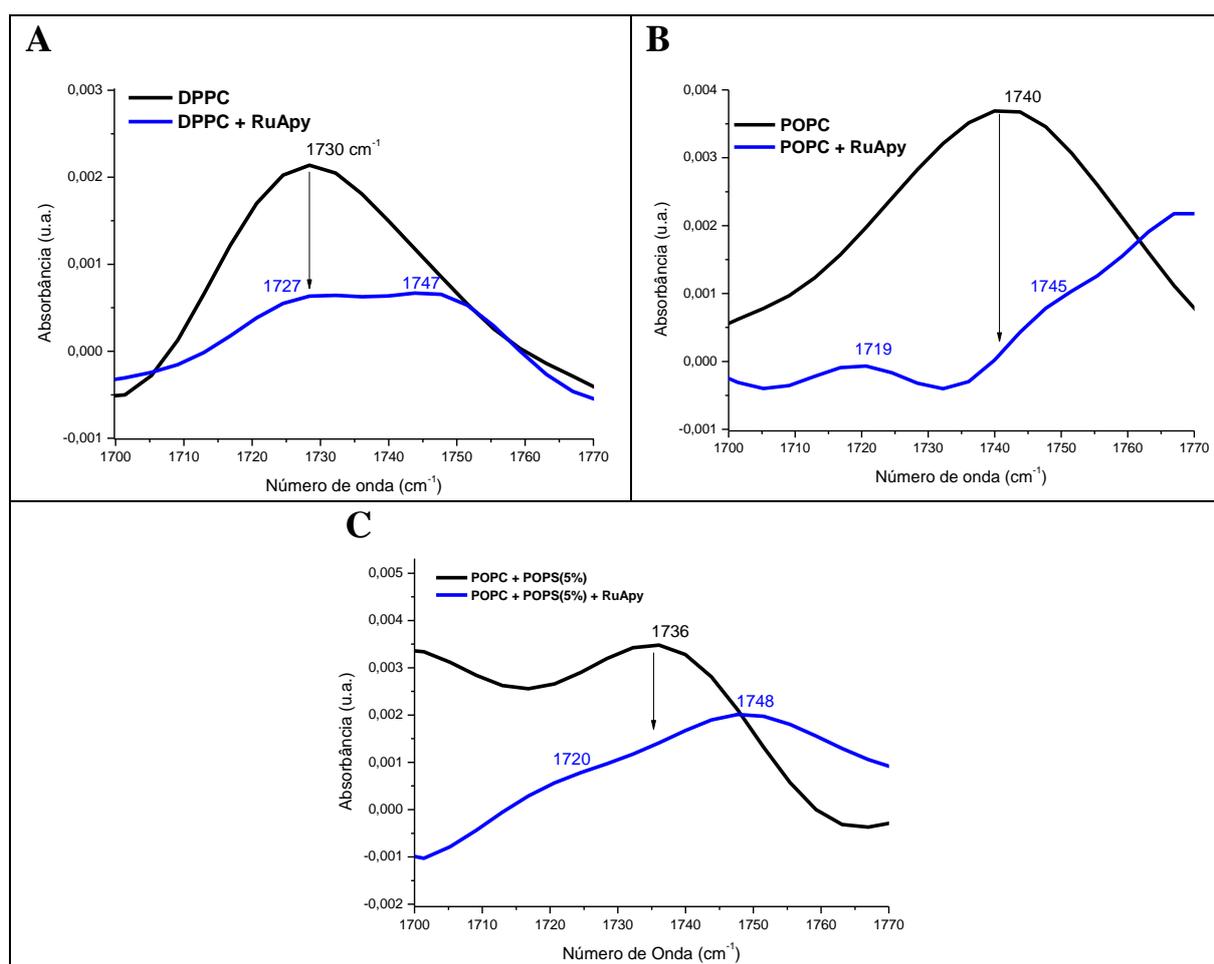


FIGURA 4.41 - Espectros de PM-IRRAS na região dos grupos carbonila para as monocamadas compostas de (A) DPPC, (B) POPC e (C) 95% de POPC e 5% POPS no sistema sem (preto) e na presença de $2\text{ }\mu\text{M}$ de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4.

Para explorar ainda mais o efeito de RuApy na organização das cadeias de alquil, a razão entre a intensidade do alongamento simétrico que aparece em aproximadamente 2850 cm^{-1} e antisimétrico, em 2920 cm^{-1} do grupo CH_2 foi avaliada ($I_{v_s}/I_{v_{as}}$).^{180, 181} Pela Figura 4.42 é possível notar um aumento da razão da intensidade relativa de 0,56 para o sistema com apenas tampão PBS na subfase para 0,66 para a monocamada de DPPC na presença de RuApy na subfase, indicando certa desordem e, com isso uma mudança na orientação das cadeias alifáticas de DPPC, uma vez que quanto menor a razão das intensidades, maior a ordem das cadeias alquílicas.¹⁷¹ Para a composição 95% POPC e 5% POPS a variação da razão $I_{v_s}/I_{v_{as}}$ foi semelhante à de DPPC, de 0,57 para 0,66, indicando também certa desordem quando o RuApy é adicionado ao sistema.

Entretanto, um efeito de desordem significativo foi observado para adição de RuApy na subfase para as monocamadas compostas unicamente de POPC, de 0,86 para 2,98 com RuApy na subfase aquosa, possivelmente por conta da maior fluidez da monocamada que permite que o RuApy cause maior distúrbio no sistema lipídico ao interagir na parte polar. Essas mudanças observadas nos sinais da cadeia carbônica polar podem ter ocorrido devido à interação do RuApy com a parte polar, que causa uma desordem em todo sistema lipídico, alterando também os sinais das cadeias apolares.

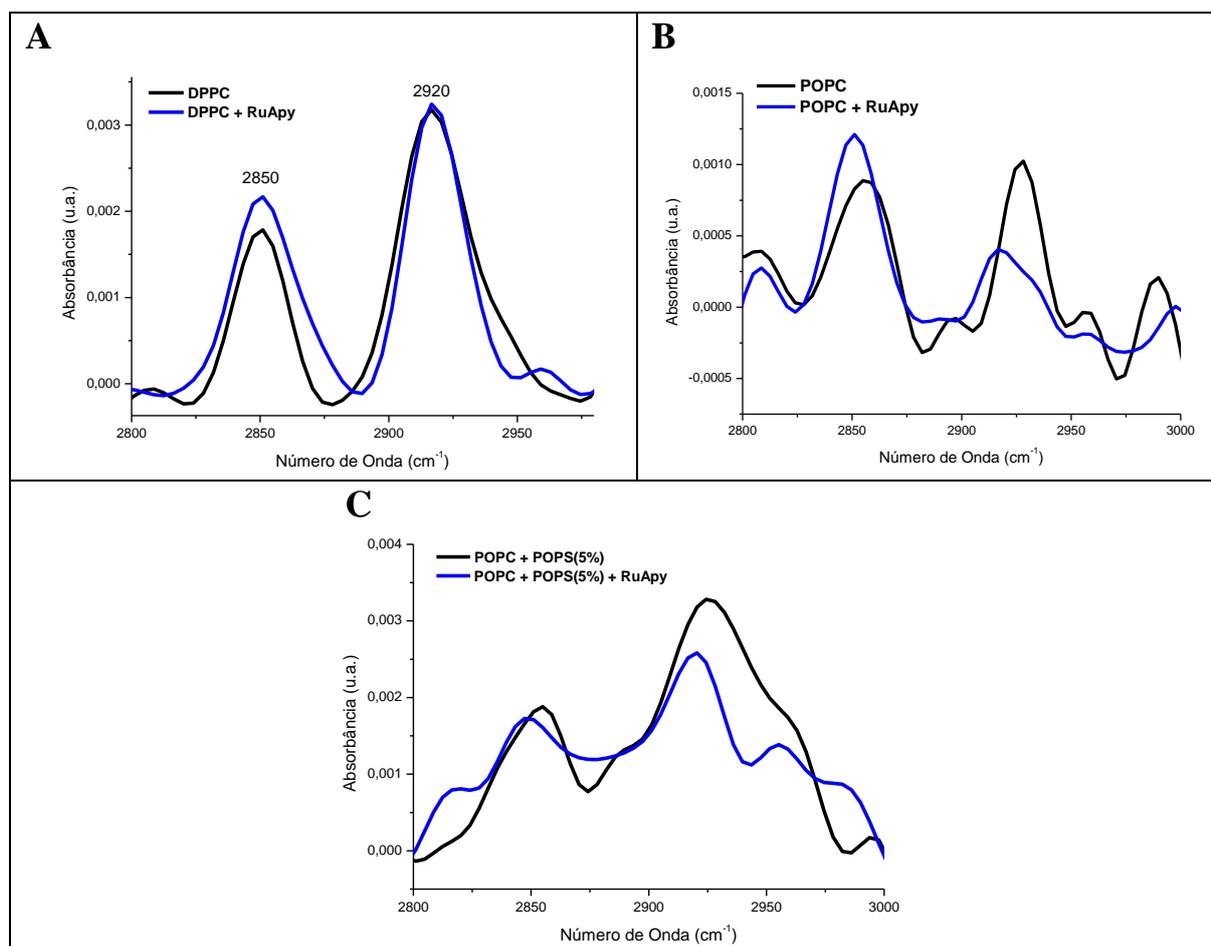


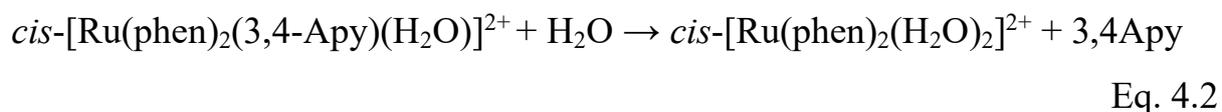
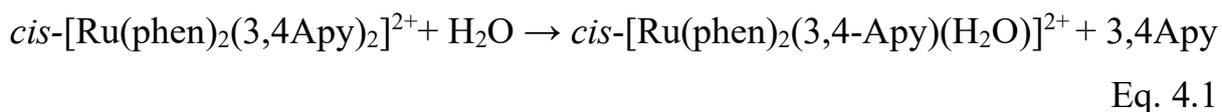
FIGURA 4.42 - Espectros de PM-IRRAS na região da cadeia alquil para as monocamadas compostas de (A) DPPC, (B) POPC e (C) 95% de POPC e 5% POPS no sistema sem (preto) e na presença de 2 μM de RuApy (azul) na subfase aquosa de tampão PBS pH 7,4.

Tais resultados corroboram com a hipótese levantada anteriormente de que o mecanismo de interação ocorre principalmente por conta de contribuição eletrostática e de ligações de hidrogênio e provavelmente ocorre com a parte da cabeça polar dos lipídios que compõem a monocamada.

4.3.5. Estudos de Estabilidade dos Modelos de Membrana com GUVs na Presença do RuApy

As imagens de microscopia de fluorescência com vesículas unilamelares gigantes foram realizadas de modo a avaliar se o complexo comprometia a integridade da vesícula ao interagir, e se era possível visualizar a

interação do complexo com as bicamadas das GUVs por meio da fluorescência do complexo, utilizando o filtro Alexa 488 no microscópio. Desta forma, para cada uma das composições lipídicas estudadas, primeiro foi feita a medida sem complexo no meio para garantir que as vesículas mantinham sua integridade durante o experimento e se o complexo alteraria o comportamento. Desta forma, as vesículas foram avaliadas no escuro e após 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm em solução de 200 mM de glicose, que é o meio que são feitas as medidas de microscopia com as GUVs. Isso leva o complexo RuApy a uma reação fotoquímica em meio aquoso, de forma a gerar o *cis*-[Ru(phen)₂(H₂O)₂]²⁺ como fotoproduto (Equação 4.1 e 4.2). Tal reação leva a perda da emissão do complexo RuApy com a formação do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(H₂O)₂]²⁺ como mostrado na Figura 4.43 (A), o que indica que em 15 minutos de irradiação o processo fotoquímico está ocorrendo. Nos espectros de absorção não se observa alteração na banda de MLCT, Figura 4.43 (B), pois o complexo aquo apresenta absorção no mesmo comprimento de onda do RuApy.



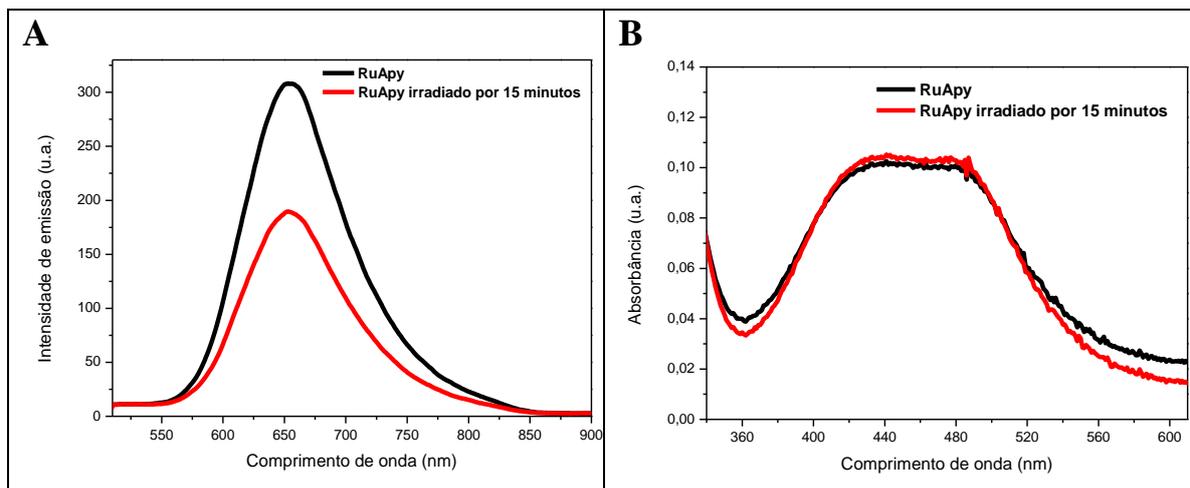


FIGURA 4.43 - (A) Espectros de emissão para o RuApy sem irradiação (preto) e depois de irradiar em 488 nm por 15 minutos (vermelho) e (B) Espectros de absorção para o RuApy sem irradiação (preto) e depois de irradiar em 488 nm por 15 minutos (vermelho) em solução de glicose 200 mM.

Desta forma, o primeiro experimento foi feito com GUVs compostas apenas de POPC estavam presentes no meio, como controle. Nota-se que não há mudança estrutural da vesícula após 15 minutos de irradiação de luz, Figura 4.44 e que não há luminescência aparente nas imagens de fluorescência, como o esperado.

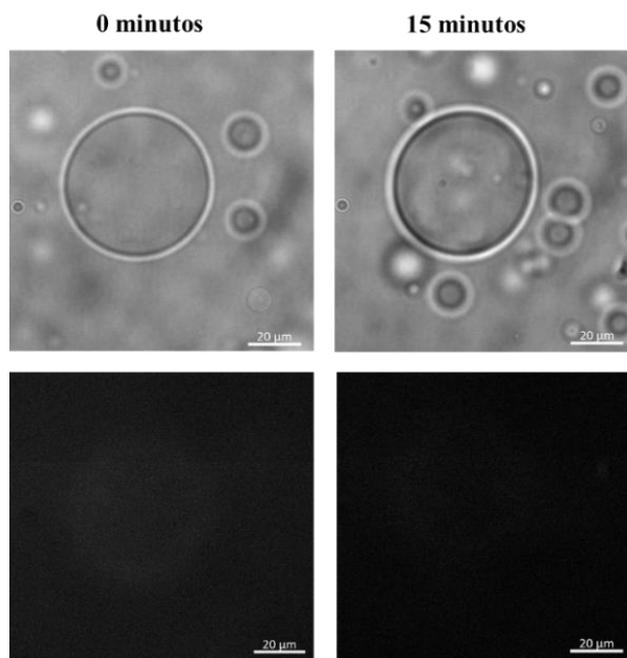


FIGURA 4.44 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas unicamente do fosfolípídeo POPC no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.

Com a adição de 10 μM de RuApy observa-se primeiramente que as GUVs mantêm sua forma e não sofre alterações estruturais ou perturbações na bicamada mesmo depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm como apresentado na Figura 4.45. Nas imagens de fluorescência nota-se que a emissão do complexo está espalhada no meio e é levemente mais intensa ao redor da vesícula onde o complexo interage com a bicamada que forma a vesícula, o que corrobora com os resultados de espectroscopia de fluorescência na qual não se observou mudança na fluorescência do complexo RuApy na presença das vesículas unilamelares grandes.

Além disso, a fluorescência do complexo não é tão intensa quanto de um corante orgânico, ainda mais em uma concentração como a que foi utilizada, por isso a emissão do complexo não aparece nas imagens de fluorescência quando feita a excitação com o filtro Alexa 488. Desta forma, pode-se afirmar que não é possível analisar a interação do complexo com as vesículas visualmente. Ainda, depois dos 15 minutos de irradiação é possível ver que a fluorescência diminui,

sendo quase imperceptível, o que faz sentido considerando que o complexo perde intensidade de emissão quando passa por um processo fotoquímico.

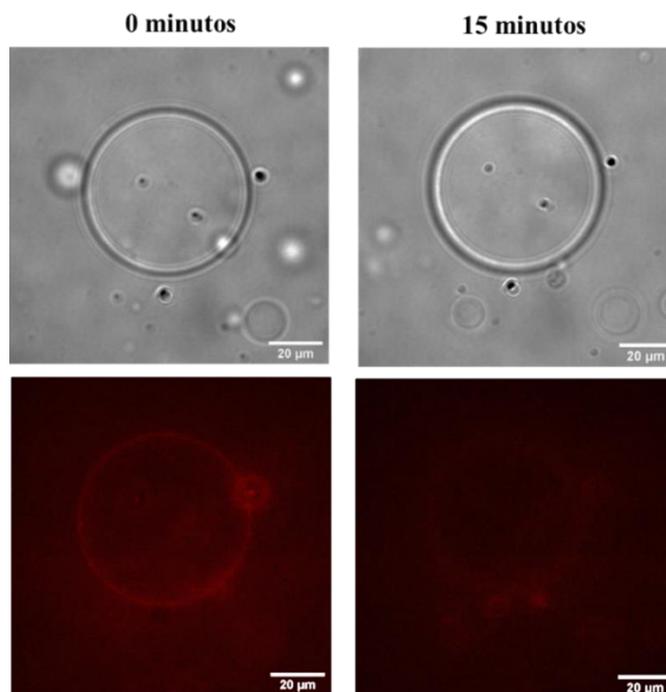


FIGURA 4.45 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm para vesículas de POPC.

Seguindo o padrão dos experimentos anteriores, foram feitas imagens de microscópio para as GUVs compostas de POPC e 20% mol de Colesterol, por conta da importância do colesterol frente à interação do peptídeo $A\beta_{1-42}$ e as membranas. Nas imagens de microscopia ótica para o controle contendo apenas as GUVs, Figura 4.46, não há alteração estrutural aparente nas vesículas com 15 minutos de irradiação de luz e as imagens de fluorescência não mostraram nenhum indício de fluorescência.

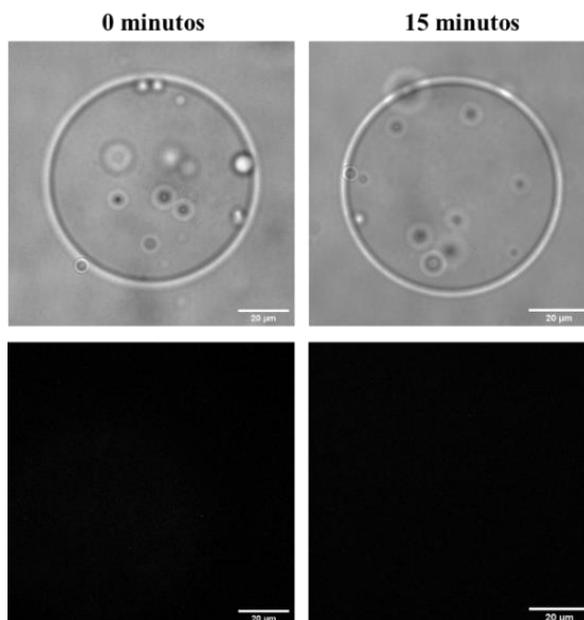


FIGURA 4.46 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas da mistura POPC:Chol no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.

As imagens obtidas por microscopia ótica na presença de 10 μM do complexo RuApy, Figura 4.47, corroboram com os resultados obtidos anteriormente com os espectros de emissão. Pelas imagens de fluorescência nota-se que a fluorescência do complexo parece estar espalhada ao redor da vesícula, aparentemente no meio externo da GUV, ou seja, possivelmente o complexo não ultrapassou a bicamada e não há sinal visual aparente de uma interação forte com a bicamada da GUV. Ainda, com a irradiação de luz em 488 nm durante 15 minutos não foi observada nenhuma alteração estrutural da vesícula.

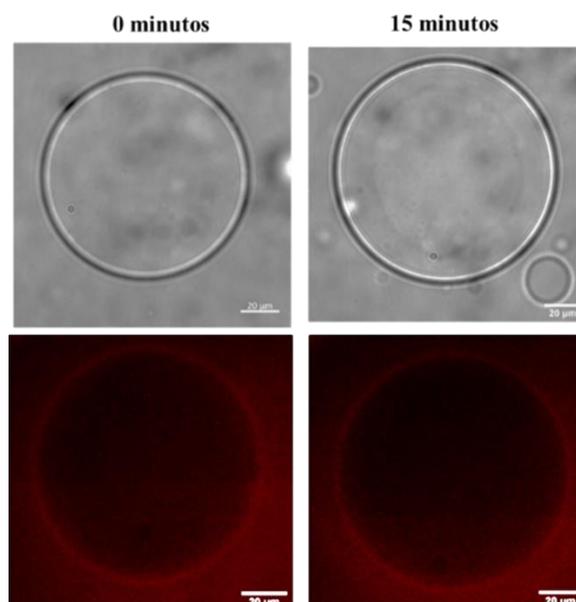


FIGURA 4.47 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm para vesículas da mistura POPC:Chol.

No caso das vesículas compostas 100% de lipídios negativos DOPG, o controle mostra que não há perda de estabilidade das vesículas quando estas são irradiadas com luz em 488 nm na ausência do complexo, Figura 4.48.

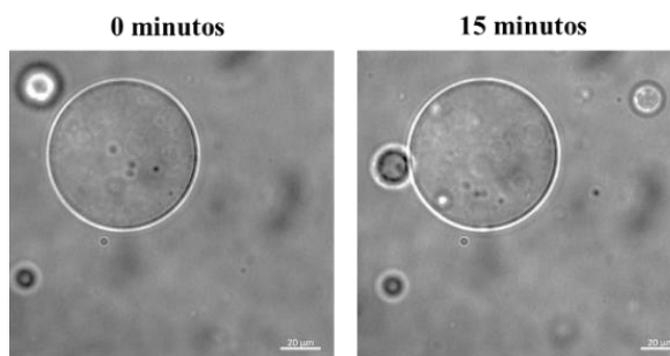


FIGURA 4.48 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas unicamente do fosfolipídeo DOPG no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.

No entanto, há uma perda de estabilidade da membrana da vesícula na presença de 10 μM de RuApy após irradiação de luz em 488 nm por 10 minutos,

como pode-se observar na sequência de imagens na Figura 4.49. Isso pode ser um indicativo está ocorrendo uma interação entre o complexo e a vesícula de DOPG, provavelmente de natureza eletrostática, e pelos resultados de K_d já foi demonstrado que há contribuição de desse tipo de interação com apenas 5% de lipídeos negativos na membrana. Desta forma, para uma vesícula composta apenas de lipídeos carregados negativamente, a interação seria ainda mais pronunciada. Sob irradiação de luz, frente a reação fotoquímica que está ocorrendo com o RuApy, a bicamada da vesícula perde estabilidade e acaba se rompendo.

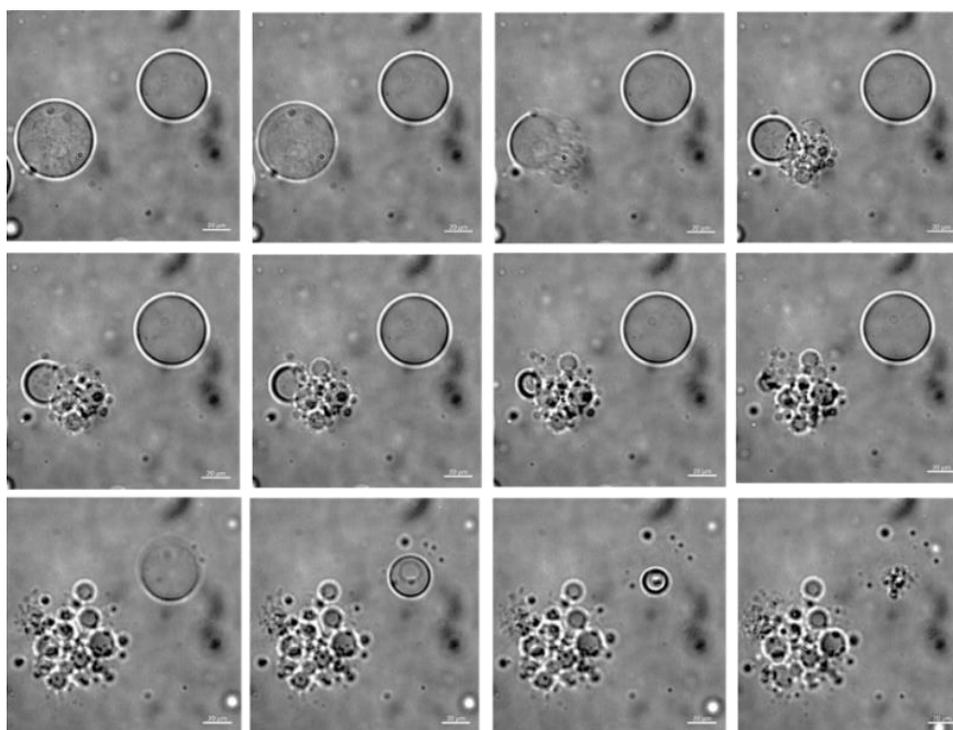


FIGURA 4.49 - Sequência de imagens de microscopia mostrando o rompimento da bicamada das vesículas de DOPG na presença de $10\mu\text{M}$ de RuApy após 10 minutos de irradiação.

A última condição analisada foi com as GUVs compostas de DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 que mimetizam uma célula neuronal saudável.¹⁵⁸ As imagens de controle estão apresentadas na Figura 4.50. Não há perturbação

aparente na bicamada das vesículas depois de 15 minutos de irradiação de luz de 488 nm. E não há luminescência aparente para as vesículas sozinhas.

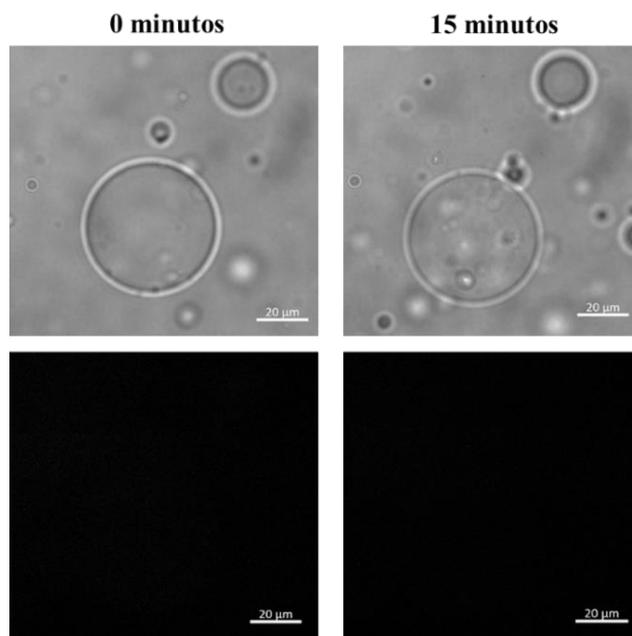


FIGURA 4.50 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) para vesículas compostas da mistura DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm.

Com a adição de 10 μM de RuApy ao sistema, Figura 4.51, mais uma vez observa-se que nas imagens de fluorescência o RuApy está emitindo fracamente e sua luminescência aparece espalhada no meio externo da vesícula, sem indícios visuais de que o complexo está de alguma forma interagindo com a bicamada lipídica da vesícula. Durante 15 minutos de irradiação a vesícula se manteve íntegra, sem perturbações aparentes, porém na imagem de fluorescência, a emissão do complexo não aparece mais delimitando a vesícula e sim espalhado no meio, então, possivelmente o complexo perdeu emissão suficiente durante o processo de irradiação de forma a não ser possível mais ver claramente as delimitações da vesícula.

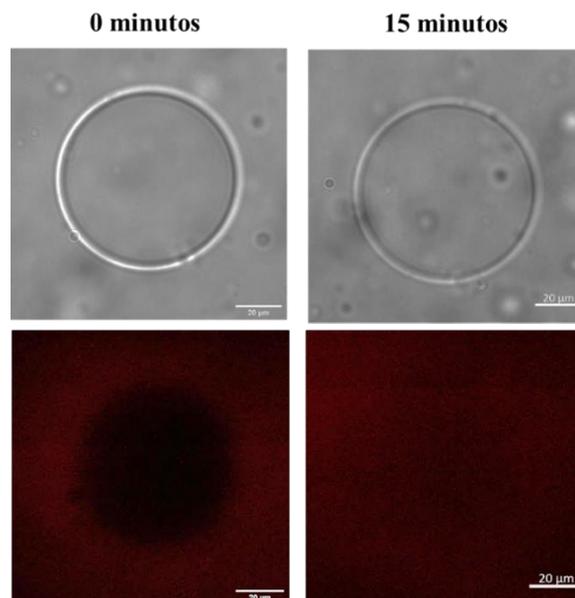


FIGURA 4.51 - Imagens de microscopia ótica para campo claro (acima) e de fluorescência (abaixo) no tempo 0 e depois de 15 minutos de irradiação de luz em 488 nm para vesículas compostas da mistura DPPC:POPC:SM:Chol:GM1.

4.4. Interação $A\beta_{1-42}$ /GUVs

Foram realizados experimentos com as vesículas unilamelares gigantes para observar se a toxicidade do $A\beta_{1-42}$ estava associada também a danos que ele eventualmente poderia causar à membrana celular. Para tal foram feitos experimentos colocando o $A\beta_{1-42}$ em sua forma monomérica junto as GUVs para observar através da microscopia ótica se este causaria algum dano à membrana.

Primeiramente, foram realizados experimentos com GUVs compostas 100% dos lipídios negativos DOPG, que é a situação mais extrema de cargas negativas no sistema, já que é dito na literatura que cargas negativas aumentam a interação do peptídeo com as membranas das GUVs e com a mistura de lipídeos que mimetiza uma membrana neuronal saudável (DPPC:POPC:SM:Chol:GM1).^{152, 158}

As amostras de GUVs com 20 μ M $A\beta_{1-42}$ adicionados na forma monomérica foram deixadas incubando nas condições do $A\beta_{1-42}$ (37°C, tampão PBS) por 1 hora antes da análise no microscópio e ainda foram deixadas no

microscópio sob observação da mesma vesícula por 1 hora, o que completa 2 horas.¹⁸² Para o controle (amostra sem $A\beta_{1-42}$) seguiu-se o mesmo padrão de experimento. Os resultados para a vesícula composta unicamente do lipídeo negativo DOPG estão apresentados na Figura 4.52 e mostram que não houve alterações visuais na integridade ou forma das vesículas.

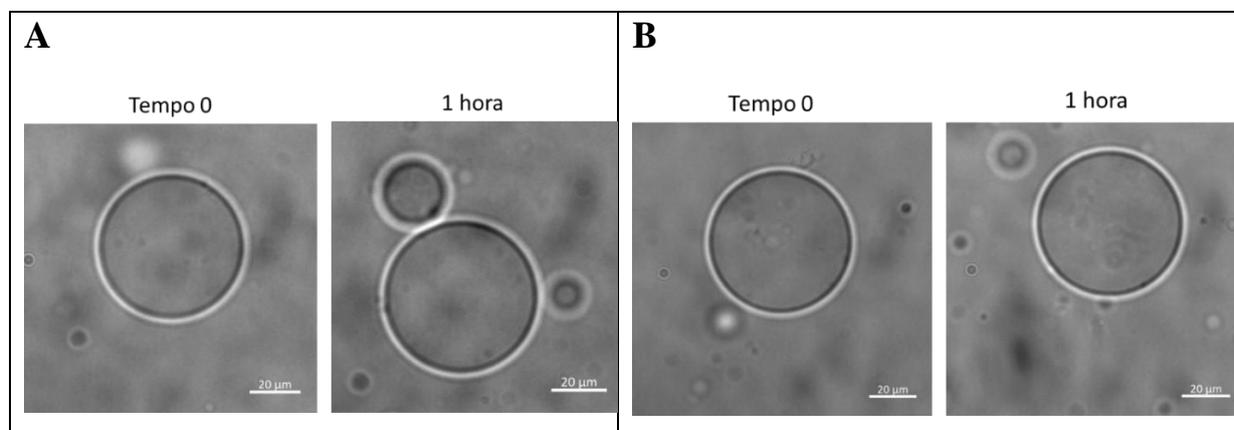


FIGURA 4.52 - Vesículas unilamelares gigantes compostas unicamente de DOPG sob observação durante 1 hora para (A) Controle (apenas a vesícula) e (B) Vesícula na presença de 20 μM de $A\beta_{1-42}$.

Posteriormente, com as GUVs mimetizando a membrana neuronal saudável para as quais os resultados estão apresentados na Figura 4.53, seria possível avaliar se a presença de componentes de membrana como gangliosídeos e colesterol alteravam a resposta visual quando o $A\beta_{1-42}$ é adicionado ao meio. No entanto, as imagens mais uma vez não mostraram nenhuma modificação aparente na estrutura e integridade da vesícula estudada.

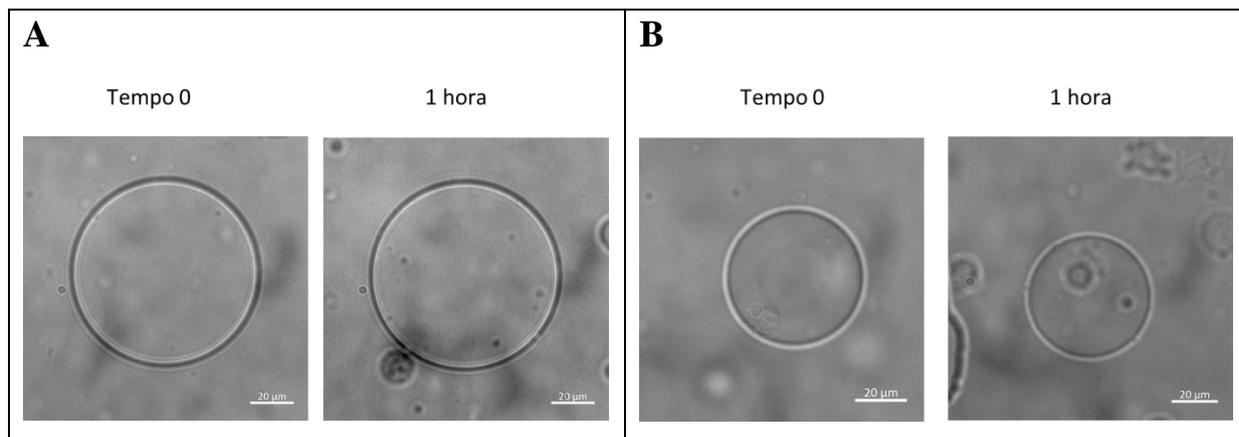


FIGURA 4.53 - Vesículas unilamelares gigantes compostas de uma mistura DPPC:POPC:SM:Chol:GM1 sob observação durante 1 hora para (A) Controle (apenas a vesícula) e (B) Vesícula na presença de 20 μM do peptídeo Aβ₁₋₄₂.

É difícil afirmar se há uma interação do Aβ₁₋₄₂ em sua forma monomérica pois a técnica permite apenas a avaliação visual, e não houve, para os dois casos testados, quaisquer sinais visuais que indicassem com certeza que a interação ocorreu, assim não é possível concluir com certeza que a interação de fato aconteceu. Ainda, mesmo realizando a incubação antes de realizar as medidas, e, em teoria, de acordo com a cinética, o Aβ₁₋₄₂ já estaria agregado, ou seja, passado pelo processo de agregação junto à GUV, não se pode afirmar que isso causaria danos à integridade das vesículas. Além disso para os resultados com células foram necessárias 48 de incubação para que o peptídeo apresentasse uma toxicidade significativa, então, talvez, fosse necessário mais tempo de incubação das GUVs junto ao peptídeo para que fosse possível observar visivelmente danos ou modificações nas vesículas em questão, seja qual for a composição dela.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que o complexo luminescente *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ desempenha um papel importante na agregação do peptídeo Aβ₁₋₄₂, isso porque há a indicação de que o complexo atuar como um agente que pode mudar ou atrasar a formação de espécies tóxicas do peptídeo Aβ₁₋₄₂, já que observa-se que não há a formação da banda de emissão em 340 nm, possivelmente proveniente da formação da ditirosina, quando o complexo está presente no meio, além de atrasar a formação de fibrilas, o que foi observado pelos espectros de dicroísmo circular e, ainda, proteger as células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Nas análises da interação do complexo com os modelos de membrana foi possível concluir que o RuApy interage com os modelos de membrana, possivelmente de forma majoritária na parte polar da membrana por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio e, desta forma, poderia afetar a interação do Aβ₁₋₄₂ com as membranas ou por conta da mudança que ele promove no processo de agregação para um caminho menos tóxico que não causaria danos na membrana, ou ao interagir com a membrana evitando a interação do Aβ e assim, sua toxicidade frente à membrana celular.

6. REFERÊNCIAS

1. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's and Dementia**, v. 14, n. 3, p. 367–429, 2018.
2. GAO, S.; LIMA, D. A review of the application of deep learning in the detection of Alzheimer's disease. **International Journal of Cognitive Computing in Engineering**, v. 3, p. 1–8, 2022.
3. HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2003.
4. SORIA LOPEZ, J. A.; GONZÁLEZ, H. M.; LÉGER, G. C. Alzheimer's disease. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 167, p. 231–255, 2019.
5. **What is Alzheimer's Disease? Symptoms & Causes | alz.org**. Disponível em: <<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>>. Acesso em: 20 maio. 2023.
6. GUSTAVSSON, A; NORTON, N.; FAST, T.; FRÖLICH, L.; GEORGES, J.; HOLZAPFEL, D.; KIRABALI, T.; KROLAK-SALMON, P.; ROSSINI, P. M.; FERRETTI, M. T.; LANMAN, L.; CHADHA, A.S.; VAN DER FLIER, W. M. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association**, v. 19, n. 2, p. 658–670, 2023.
7. BRENOWITZ, W. D.; YAFFE, K. Observational studies in Alzheimer disease: bridging preclinical studies and clinical trials. **Nature reviews. Neurology**, v. 18, n. 12, p. 747–757, 2022.
8. HAMPEL, H.; AU, R.; MATTKE, S.; VAN DER FLIER, W. M.; AISEN, P.; APOSTOLOVA, L.; CHEN, C.; CHO, M.; DE SANTI, S.; GAO, P.; IWATA, A.;

KURZMAN, R.; SAYKIN, A. J.; TEIPEL, S.; VELLAS, B.; VERGALLO, A.; WANG, H.; CUMMINGS, J. Designing the next-generation clinical care pathway for Alzheimer's disease. **Nature Aging**, v. 2, n. 8, p. 692–703, 2022

9. TATULIAN, S. A. Challenges and hopes for Alzheimer's disease. **Drug discovery today**, v. 27, n. 4, p. 1027–1043, 2022.

10. QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 4, p. 329–344, 2010.

11. TOBBIN, I.; GOLÇALVES, G. H. P.; COSTA, K. M.; KUCMANSKI, D.; COSTA, J. P. G.; NUNES, P. L. P.; CERANTO, D. C. F. B. Doença de Alzheimer: uma revisão de literatura/Alzheimer's Disease: a literature review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 14232–14244, 2021.

12. ALONSO, R.; PISA, D.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A. M.; CARRASCO, L. Infection of Fungi and Bacteria in Brain Tissue From Elderly Persons and Patients With Alzheimer's Disease. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 10, 2018.

13. KNOPMAN, D. S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R. C.; CHÉTELAT, G.; HOLTZMAN, D. M.; HYMAN, B. T.; NIXON, R. A.; JONES, D. T. Alzheimer disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 7, n. 1, 2021.

14. FISH, P. V.; STEADMAN, D.; BAYLE, E. D.; WHITING, P. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 2, p. 125–133, 2019.

15. Medical Tests for Diagnosing Alzheimer's & Dementia | alz.org. Disponível em: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/diagnosis/medical_tests>. Acesso em: 24 maio. 2023.

16. GOLDE, T. E.; DEKOSKY, S. T.; GALASKO, D. Alzheimer's disease: The right drug, the right time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 362, n. 6420, p. 1250–1251, 2018.
17. SCHELTENS, P.; DE STROOPER, B.; KIVIPELTO, M.; HOLSTEGE, H.; CHÉTELAT, G.; TEUNISSEN, C. E.; CUMMINGS, J.; VAN DER FLIER, W. M. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 397, n. 10284, p. 1577, 4 abr. 2021.
18. AISEN, P. S.; JIMENEZ-MAGGIORA, G. A.; RAFIL, M. S.; WALTER, S. RAMAN, R. Early-stage Alzheimer disease: getting trial-ready. **Nature Reviews Neurology** 2022 18:7, v. 18, n. 7, p. 389–399, 2022.
19. OLLOQUEQUI, J.; ETTCHETO, M.; CANO, A.; SANCHEZ-LÓPEZ, E.; CARRASCO, M.; ESPINOSA, T.; BEAS-ZARATE, C.; GUDIÑO-CABRERA, G.; UREÑA-GUERRERO, M. E.; VERDAGUER, E.; FOLCH, J.; AULADELL, C.; CAMINS, A. Impact of New Drugs for Therapeutic Intervention in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 27, n. 5, p. 146, 2022.
20. VAZ, M.; SILVESTRE, S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. **European journal of pharmacology**, v. 887, 2020.
21. ATRI, A. Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. **Seminars in neurology**, v. 39, n. 2, p. 227–240, 2019.
22. BRIGGS, R.; KENNELLY, S. P.; O'NEILL, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. **Clinical medicine (London, England)**, v. 16, n. 3, p. 247–253, 2016.
23. ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Tratamento da doença de

Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104–1112, 2005.

24. MENDIOLA-PRECOMA, J.; BERUMEN, L. C.; PADILLA, K.; GARCIA-ALCOCER, G. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

25. CARVALHO, P. D. P.; MAGALHÃES, C. M. C.; PEDROSO, J. D. S. Tratamentos não farmacológicos que melhoram a qualidade de vida de idosos com doença de Alzheimer: uma revisão sistemática. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 65, n. 4, p. 334–339, 2016.

26. ARAÚJO, S. R. M.; CUNHA, E. R.; MARQUES, I. L.; PAIXÃO, S. A.; DIAS, A. F. G.; SOUSA, P. M. DE; SOARES, N. DE K. P.; SOUSA, M. O.; LOBATO, R. M.; SOUZA, M. T. P. Alzheimer's disease in Brazil: an epidemiological analysis between 2013 and 2022. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. e29412240345–e29412240345, 2023.

27. MATTKE, S.; FILHO, O. C. S.; HANSON, M.; MATEUS, E. F.; NETO, J. P. R.; SOUZA, L. C. DE; RIZEK SCHULTZ, R.; PEREIRA, R. P. Preparedness of the Brazilian health-care system to provide access to a disease-modifying Alzheimer's disease treatment. *Alzheimer's & Dementia*, v. 19, n. 1, p. 375–381, 2023.

28. SCHILLING, L. P. BALTHAZAR, M. L. F.; RADANOVIC, M.; FORLENZA, O. V.; SILAGI, M. L.; SMID, J.; BARBOSA, B. J. A. P.; FROTA, N. A. F.; DE SOUZA, L. C.; VALE, F. A. C.; CARAMELLI, P.; BERTOLUCCI, P. H. F.; CHAVES, M. L. F.; BRUCKI, S. M. D.; DAMASCENO, B. P.; NITRINI, R. Diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the Scientific

Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 16, n. 3, p. 25–39, 2022.

29. **Alzheimer** — **Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/alzheimer>>. Acesso em: 2 jul. 2023.

30. SILVA, E. C. Tratamento de Alzheimer Oferecido pelo SUS: Uma Análise da Qualidade do Serviço Público Oferecido ao Idoso. Volta Redonda, Universidade Federal Fluminense, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso, 10 p.

31. SOUSA, T. R.; GALVÃO, V. S. Tratamento farmacológico para a doença de Alzheimer no sistema único de saúde. São Bernardo do Campo, Universidade São Judas, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso, 19 p.

32. BORGES, A. P. A.; SOBRINHO, E. G. S.; ESPÍNOLA, F. O.; SILVA, M. S. S.; MAIOR, V. G. M. S.; SOUSA, D. H. A. V.; SOUZA, A. K. P. DE; ARRUDA, I. T. S. DE. Dificuldades no tratamento de pacientes disfágicos em decorrência de Alzheimer no Sistema Único de Saúde (SUS). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 3001–3009, 2023.

33. HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353–356, 2002.

34. TAN, J. Z. A.; GLEESON, P. A. The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1861, n. 4, p. 697–712, 2019.

35. GANDY, S. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1121, 2005.
36. ZHANG, Y. W.; THOMPSON, R.; ZHANG, H.; XU, H. APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2011.
37. VARDY, E. R. L. C.; CATTO, A. J.; HOOPER, N. M. Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: Therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 11, n. 10, p. 464–472, 2005.
38. MURPHY, M. P.; LEVINE, H. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 19, n. 1, p. 311–323, 2010.
39. URBAN, A. S.; PAVLOV, K. V.; KAMYNNINA, A. V.; OKHRIMENKO, I. S.; ARSENIIEV, A. S.; BOCHAROV, E. V. Structural Studies Providing Insights into Production and Conformational Behavior of Amyloid- β Peptide Associated with Alzheimer's Disease Development. **Molecules**, v. 26, n. 10, 2021.
40. BRUGGINK, K. A.; MÜLLER, M.; KUIPERIJ, H. B.; VERBEEK, M. M. Methods for Analysis of Amyloid- β Aggregates. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28, n. 4, p. 735–758, 2012.
41. GADE MALMOS, K.; BLANCAS-MEJIA, L. M.; WEBER, B.; BUCHNER, J.; RAMIREZ-ALVARADO, M.; NAIKI, H.; OTZEN, D. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. **Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis**, v. 24, n. 1, p. 1–16, 2017.

42. GROENNING, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. **Journal of chemical biology**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 2010.
43. HUDSON, S. A.; ECROYD, H.; KEE, T. W.; CARVER, J. A. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5960–5972, 2009.
44. ADLER, J.; SCHEIDT, H. A.; KRÜGER, M.; THOMAS, L.; HUSTER, D. Local interactions influence the fibrillation kinetics, structure and dynamics of A β (1–40) but leave the general fibril structure unchanged. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 16, p. 7461–7471, 2014.
45. KUMAR, S.; WALTER, J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. **Aging**, v. 3, n. 8, p. 803–812, 2011.
46. DOIG, A. J.; DERREUMAUX, P. Inhibition of protein aggregation and amyloid formation by small molecules. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 30, p. 50–56, 2015.
47. LIU, H.; QIAN, C.; YANG, T.; WANG, Y.; LUO, J.; ZHANG, C.; WANG, XIAOHUI; WANG, XIAOYONG; GUO, Z. Small molecule-mediated co-assembly of amyloid- β oligomers reduces neurotoxicity through promoting non-fibrillar aggregation. **Chemical Science**, v. 11, n. 27, p. 7158–7169, 2020.
48. SHAROAR, M. G.; THAPA, A.; SHAHNAWAZ, M.; RAMASAMY, V. S.; WOO, E. R.; SHIN, S. Y.; PARK, I. S. Keampferol-3-O-rhamnoside abrogates amyloid beta toxicity by modulating monomers and remodeling oligomers and fibrils to non-toxic aggregates. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2012.

49. IVANOVA, M. I.; LIN, Y.; LEE, Y. H.; ZHENG, J.; RAMAMOORTHY, A. Biophysical processes underlying cross-seeding in amyloid aggregation and implications in amyloid pathology. **Biophysical chemistry**, v. 269, 2021.
50. LONG, K.; WILLIAMS, T. L.; URBANC, B. Insulin Inhibits A β 42 Aggregation and Prevents A β 42-Induced Membrane Disruption. **Biochemistry**, v. 58, n. 45, p. 4519–4529, 2019.
51. REN, B.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; LIU, Y.; ZHANG, D.; GONG, X.; FENG, Z.; TANG, J.; CHANG, Y.; ZHENG, J. Fundamentals of cross-seeding of amyloid proteins: an introduction. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 46, p. 7267–7282, 2019.
52. COALIER, K. A.; PARANJAPE, G. S.; KARKI, S.; NICHOLS, M. R. Stability of early-stage amyloid- β (1-42) aggregation species. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 1, p. 65–70, 2013.
53. BARZ, B.; URBANC, B. Dimer Formation Enhances Structural Differences between Amyloid β -Protein (1–40) and (1–42): An Explicit-Solvent Molecular Dynamics Study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
54. COOPER, G. M. Cell Membranes. 2000.
55. ESCRIBÁ, P. V.; GONZÁLEZ-ROS, J. M.; GOÑI, F. M.; KINNUNEN, P. K. J.; VIGH, L.; SÁNCHEZ-MAGRANER, L.; FERNÁNDEZ, A. M.; BUSQUETS, X.; HORVÁTH, I.; BARCELÓ-COBLIJN, G. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 3, p. 829–875, 2008.

56. MOURITSEN, O. G.; BAGATOLLI, L. A. Lipid domains in model membranes: A brief historical perspective. **Essays in Biochemistry**, v. 57, p. 1–19, 2015.
57. ANDRADE, S.; RAMALHO, MARIA JOÃO; LOUREIRO, J. A.; PEREIRA, M. C. The biophysical interaction of ferulic acid with liposomes as biological membrane model: The effect of the lipid bilayer composition. **Journal of Molecular Liquids**, v. 324, p. 114689, 2021
58. BROWN, R. E. Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science*, v. 111, n. 1, p. 1–9, 1998.
59. LITMAN, B. J. Lipid Model Membranes. Characterization of Mixed Phospholipid Vesicles. **Biochemistry**, v. 12, n. 13, p. 2545–2554, 1 jun. 1973.
60. PEETLA, C.; LABHASETWAR, V. Biophysical characterization of nanoparticle endothelial model cell membrane interactions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 418–429, maio 2008.
61. DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? **Annual review of biochemistry**, v. 66, p. 199–232, 1997.
62. EYTAN, G. D. Use of liposomes for reconstitution of biological functions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 694, n. 2, p. 185–202, 1982.
63. MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1462, n. 1–2, p. 109–140, 1999.

64. TAMM, L. K.; MCCONNELL, H. M. Supported phospholipid bilayers. **Biophysical journal**, v. 47, n. 1, p. 105–113, 1985.
65. BILGINER, R.; ARSLAN YILDIZ, A. Biomimetic Model Membranes as Drug Screening Platform. **Biomimetic Lipid Membranes: Fundamentals, Applications, and Commercialization**, p. 225–247, 2019.
66. PEETLA, C.; STINE, A.; LABHASETWAR, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. **Molecular pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1264–1276, 2009.
67. CHAN, Y. H. M.; BOXER, S. G. Model membrane systems and their applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 6, p. 581–587, 2007.
68. BUTTERFIELD, S. M.; LASHUEL, H. A. Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 33, p. 5628–5654, 2010.
69. KAYED, R.; SOKOLOV, Y.; EDMONDS, B.; MCINTIRE, T. M.; MILTON, S. C.; HALL, J. E.; GLABE, C. G. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46363–46366, 2004.
70. NIU, Z.; ZHANG, Z.; ZHAO, W.; YANG, J. Interactions between amyloid β peptide and lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1860, n. 9, p. 1663–1669, 2018.
71. QUIST, A.; DOUDEVSKI, I.; LIN, H.; AZIMOVA, R.; NG, D.; FRANGIONE, B.; KAGAN, B.; GHISO, J.; LAL, R. Amyloid ion channels: a

common structural link for protein-misfolding disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10427–10432, 2005.

72. SEPULVEDA, F. J.; PARODI, J.; PEOPLES, R. W.; OPAZO, C.; AGUAYO, L. G. Synaptotoxicity of Alzheimer Beta Amyloid Can Be Explained by Its Membrane Perforating Property. **PLOS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11820, 2010.

73. KIM, S.; KLIMOV, D. K. Binding to the lipid monolayer induces conformational transition in A β monomer. **Journal of molecular modeling**, v. 19, n. 2, p. 737–750, 2013.

74. ECKERT, G. P.; WOOD, W. G.; MULLER, W. E. Lipid membranes and beta-amyloid: a harmful connection. **Current protein & peptide science**, v. 11, n. 5, p. 319–325, 2010.

75. KREMER, J. J.; PALLITTO, M. M.; SKLANSKY, D. J.; MURPHY, R. M. Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. **Biochemistry**, v. 39, n. 33, p. 10309–10318, 2000.

76. LI, Y.; WANG, J. J.; CAI, J. X. Aniracetam restores the effects of amyloid-beta protein or ageing on membrane fluidity and intracellular calcium concentration in mice synaptosomes. **Journal of neural transmission**, v. 114, n. 11, p. 1407–1411, 2007.

77. MRDENOVIC, D.; SU, Z.; KUTNER, W.; LIPKOWSKI, J.; PIETA, P. Alzheimer's disease-related amyloid β peptide causes structural disordering of lipids and changes the electric properties of a floating bilayer lipid membrane. **Nanoscale Advances**, v. 2, n. 8, p. 3467–3480, 2020.

78. PETERS, I.; IGBAVBOA, U.; SCHÜTT, T.; HAIDARI, S.; HARTIG, U.; ROSELLO, X.; BÖTTNER, S.; COPANAKI, E.; DELLER, T.; KÖGEL, D.; WOOD, W. G.; MÜLLER, W. E.; ECKERT, G. P. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1788, n. 5, p. 964–972, 2009.

79. TIAN, Y.; LIANG, R.; KUMAR, A.; SZWEDZIAK, P.; VILES, J. H. 3D-visualization of amyloid- β oligomer interactions with lipid membranes by cryo-electron tomography. **Chemical Science**, v. 12, n. 20, p. 6896–6907, 2021.

80. DEMURO, A.; PARKER, I.; STUTZMANN, G. E. Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12463, 2010.

81. XIE, C. W. Calcium-regulated signaling pathways: role in amyloid beta-induced synaptic dysfunction. **Neuromolecular medicine**, v. 6, n. 1, p. 53–64, 2004.

82. YAMIN, G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. **Journal of neuroscience research**, v. 87, n. 8, p. 1729–1736, 2009.

83. GIUFFRIDA, M. L.; TOMASELLO, F.; CARACI, F.; CHIECHIO, S.; NICOLETTI, F.; COPANI, A. Beta-amyloid monomer and insulin/IGF-1 signaling in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 46, n. 3, p. 605–613, 2012.

84. KHONDKER, A.; ALSOP, R. J.; RHEINSTÄDTER, M. C. Membrane-Accelerated Amyloid- β Aggregation and Formation of Cross- β Sheets. **Membranes**, v. 7, n. 3, p. 49, 31 ago. 2017.

85. YIP, C. M.; DARABIE, A. A.; MCLAURIN, J. A. Abeta42-peptide assembly on lipid bilayers. **Journal of molecular biology**, v. 318, n. 1, p. 97–107, 2002.
86. LINDBERG, D. J.; WESÉN, E.; BJÖRKEROTH, J.; ROCHA, S.; ESBJÖRNER, E. K. Lipid membranes catalyse the fibril formation of the amyloid- β (1-42) peptide through lipid-fibril interactions that reinforce secondary pathways. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1859, n. 10, p. 1921–1929, 2017.
87. RUIZ-ARIAS, Á.; PAREDES, J. M.; BIASE, C. DI; CUERVA, J. M.; GIRON, M. D.; SALTO, R.; GONZÁLEZ-VERA, J. A.; ORTE, A. Seeding and Growth of β -Amyloid Aggregates upon Interaction with Neuronal Cell Membranes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–19, 2020.
88. ZHANG, Y. J.; SHI, J. M.; BAI, C. J.; WANG, H.; LI, H. Y.; WU, Y.; JI, S. R. Intra-membrane Oligomerization and Extra-membrane Oligomerization of Amyloid- β Peptide Are Competing Processes as a Result of Distinct Patterns of Motif Interplay. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 748, 2012.
89. LAU, T. L.; AMBROGGIO, E. E.; TEW, D. J.; CAPPAL, R.; MASTERS, C. L.; FIDELIO, G. D.; BARNHAM, K. J.; SEPAROVIC, F. et al. Amyloid- β Peptide Disruption of Lipid Membranes and the Effect of Metal Ions. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 3, p. 759–770, 2006.
90. KINOSHITA, M.; KAKIMOTO, E.; TERAOKAWA, M. S.; LIN, Y.; IKENOUE, T.; SO, M.; SUGIKI, T.; RAMAMOORTHY, A.; GOTO, Y.; LEE, Y. H. Model membrane size-dependent amyloidogenesis of Alzheimer's amyloid- β peptides. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 24, p. 16257–16266, 2017.

91. LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. Aggregation of alzheimer's amyloid β -peptide in biological membranes: A molecular dynamics study. **Biochemistry**, v. 52, n. 29, p. 4971–4980, 2013.
92. ZHAO, L. N.; CHIU, S. W.; BENOIT, J.; CHEW, L. Y.; MU, Y. Amyloid β peptides aggregation in a mixed membrane bilayer: A molecular dynamics study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 42, p. 12247–12256, 2011.
93. KENYAGA, J. M.; CHENG, Q.; QIANG, W. Early stage β -amyloid-membrane interactions modulate lipid dynamics and influence structural interfaces and fibrillation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 10, p. 102491, 2022.
94. BOKVIST, M.; LINDSTRÖM, F.; WATTS, A.; GRÖBNER, G. Two Types of Alzheimer's β -Amyloid (1–40) Peptide Membrane Interactions: Aggregation Preventing Transmembrane Anchoring Versus Accelerated Surface Fibril Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 4, p. 1039–1049, 2004.
95. SAHOO, A.; XU, H.; MATYSIAK, S. Pathways of amyloid-beta absorption and aggregation in a membranous environment. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 16, p. 8559–8568, 2019.
96. AZOUZ, M.; CULLIN, C.; LECOMTE, S.; LAFLEUR, M. Membrane domain modulation of A β 1-42 oligomer interactions with supported lipid bilayers: an atomic force microscopy investigation. **Nanoscale**, v. 11, n. 43, p. 20857–20867, 2019.
97. DIES, H.; TOPPOZINI, L.; RHEINSTÄDTER, M. C. The Interaction between Amyloid- β Peptides and Anionic Lipid Membranes Containing Cholesterol and Melatonin. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99124, 2014.

98. JAMASBI, E.; HOSSAIN, M. A.; TAN, M.; SEPAROVIC, F.; CICCOTOSTO, G. D. Fluorescence imaging of the interaction of amyloid beta 40 peptides with live cells and model membrane. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1860, n. 9, p. 1609–1615, 2018.

99. HABCHI, J.; CHIA, S.; GALVAGNION, C.; MICHAELS, T. C. T.; BELLAICHE, M. M. J.; RUGGERI, F. S.; SANGUANINI, M.; IDINI, I.; KUMITA, J. R.; SPARR, E.; LINSE, S.; DOBSON, C. M.; KNOWLES, T. P. J.; VENDRUSCOLO, M. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. **Nature Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 673–683, 2018.

100. MATSUZAKI, K. How do membranes initiate Alzheimer's Disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β -protein on ganglioside clusters. **Accounts of chemical research**, v. 47, n. 8, p. 2397–2404, 2014.

101. WEBER, D. K.; GEHMAN, J. D.; SEPAROVIC, F.; SANI, M.-A.; WEBER, D. K.; GEHMAN, J. D.; SEPAROVIC, F.; SANI, M. A. Copper Modulation of Amyloid Beta 42 Interactions with Model Membranes. **Australian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 5, p. 472–479, 2012.

102. HU, Z.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, Z.; GAO, H.; MAO, Y. Raman spectroscopy for detecting supported planar lipid bilayers composed of ganglioside-GM1/sphingomyelin/cholesterol in the presence of amyloid- β . **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 35, p. 22711–22720, 2015.

103. MITAL, M.; ZIORA, Z. Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 375, p. 434–458, 2018.

104. VOS, J. G.; KELLY, J. M. Ruthenium polypyridyl chemistry; from basic research to applications and back again. **Dalton Transactions**, n. 41, p. 4869–4883, 2006.
105. CAMPAGNA, S.; PUNTORIERO, F.; NASTASI, F.; BERGAMINI, G.; BALZANI, V. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium. **Topics in Current Chemistry**, v. 280, p. 117–214, 2007.
106. KANAOUJIYA, R.; SRIVASTAVA, S. Coordination Chemistry of Ruthenium. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 25, n. 9, p. 103–106, 2021.
107. DRAGUTAN, I.; DRAGUTAN, V.; DEMONCEAU, A. Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes. **Molecules** **2015, Vol. 20, Pages 17244-17274**, v. 20, n. 9, p. 17244–17274, 2015.
108. GOMES, L. M. F.; BATAGLIOLI, J. C.; STORR, T. Metal complexes that bind to the amyloid- β peptide of relevance to Alzheimer's disease. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 412, p. 213255, 2020.
109. HUFFMAN, S. E.; YAWSON, G. K.; FISHER, S. S.; BOTHWELL, P. J.; PLATT, D. C.; JONES, M. A.; HAMAKER, C. G.; WEBB, M. I. Ruthenium(III) complexes containing thiazole-based ligands that modulate amyloid- β aggregation. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 12, n. 4, p. 491–503, 2020.
110. YAWSON, G. K.; HUFFMAN, S. E.; FISHER, S. S.; BOTHWELL, P. J.; PLATT, D. C.; JONES, M. A.; FERRENCE, G. M.; HAMAKER, C. G.; WEBB, M. I. Ruthenium(III) complexes with imidazole ligands that modulate the

aggregation of the amyloid- β peptide via hydrophobic interactions. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 214, 2021.

111. WALL, B. J.; WILL, M. F.; YAWSON, G. K.; BOTHWELL, P. J.; PLATT, D. C.; APUZZO, C. F.; JONES, M. A.; FERRENCE, G. M.; WEBB, M. I. Importance of Hydrogen Bonding: Structure-Activity Relationships of Ruthenium(III) Complexes with Pyridine-Based Ligands for Alzheimer's Disease Therapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 64, n. 14, p. 10124–10138, 2021

112. CHAN, S.; LU, L.; LAM, T.; YAN, S. C.; LEUNG, C. H.; MA, D. L. A Novel Tetradentate Ruthenium(II) Complex Containing Tris(2-Pyridylmethyl)amine (tpa) As An Inhibitor Of Beta-amyloid Fibrillation. **Current Alzheimer research**, v. 12, n. 5, p. 434–438, 2015.

113. SINGH, S.; NAVALE, G. R.; AGRAWAL, S.; SINGH, H. K.; SINGLA, L.; SARKAR, D.; SARMA, M.; CHOUDHURY, A. R.; GHOSH, K. Design and synthesis of piano-stool ruthenium(II) complexes and their studies on the inhibition of amyloid β (1-42) peptide aggregation. **International journal of biological macromolecules**, v. 239, p. 124197, 2023.

114. COOK, N. P.; TORRES, V.; JAIN, D.; MARTÍ, A. A. Sensing amyloid- β aggregation using luminescent dipyrrophenazine ruthenium(II) complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 29, p. 11121–11123, 2011.

115. LI, G.; SUN, L.; JI, L.; CHAO, H. Ruthenium(II) complexes with dppz: from molecular photoswitch to biological applications. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 34, p. 13261–13276, 2016.

116. CAMILO, M. R.; CARDOSO, C. R.; CARLOS, R. M.; LEVER, A. B. P. Photosolvolytic of cis $[\text{Ru}(\alpha\text{-diimine})_2(4\text{-aminopyridine})_2]^{2+}$ complexes:

Photophysical, spectroscopic, and density functional theory analysis. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 3694–3708, 2014.

117. CARDOSO, C. R.; AGUIAR, I. DE; CAMILO, M. R.; LIMA, M. V. S.; ITO, A. S.; BAPTISTA, M. S.; PAVANI, C.; VENÂNCIO, T.; CARLOS, R. M. Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bidentate histamine ligand. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 22, p. 6726–6734, 2012.

118. SILVA, D. E. S.; CALI, M. P.; PAZIN, W. M.; CARLOS-LIMA, E.; SALLES TREVISAN, M. T.; VENÂNCIO, T.; ARCISIO-MIRANDA, M.; ITO, A. S.; 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.

119. CALI, M. P.; PAZIN, W. M.; ITO, A. S.; CARLOS, R. M. A ruthenium-based luminescent probe for differentiating amyloid beta aggregates through emission lifetime. **Trends in Photochemistry & Photobiology**, v. 18, p. 29–39, 2019.

120. CALI, M. P.; PEREIRA, L. M. B.; 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. 215, p. 111314, 2021.

121. PEREIRA, L. M. B.; CALI, M. P.; MARCHI, R. C.; PAZIN, W. M.; CARLOS, R. M. Luminescent imaging of insulin amyloid aggregation using a sensitive ruthenium-based probe in the red region. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 224, p. 111585, 2021.

122. SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. Mixed Phosphine 2,2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium. **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 3334–3341, 1978.
123. 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.
124. GHOSH, S.; VERMA, S. Carvedilol inhibits A β 25-35 fibrillation by intervening the early stage helical intermediate formation: A biophysical investigation. **International journal of biological macromolecules**, v. 188, p. 263–271, 2021.
125. KAO, P. Y.; GREEN, E.; PEREIRA, C.; EKIMURA, S.; JUAREZ, D.; WHYTE, T.; ARHAR, T.; MALASPINA, B.; NOGAJ, L. A.; MOFFET, D. A. Inhibition of Toxic IAPP Amyloid by Extracts of Common Fruits. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 450, 2015.
126. STINE, W. B.; JUNGBAUER, L.; YU, C.; LADU, M. J. Preparing synthetic A β in different aggregation states. **Methods in molecular biology**, v. 670, p. 13–32, 2011.
127. MARSHALL, K. E.; VADUKUL, D. M.; DAHAL, L.; THEISEN, A.; FOWLER, M. W.; AL-HILALY, Y.; FORD, L.; KEMENES, G.; DAY, I. J.; STARAS, K.; SERPELL, L. C. A critical role for the self-assembly of Amyloid- β 1-42 in neurodegeneration. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.
128. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

129. OLSON, F.; HUNT, C. A.; SZOKA, F. C.; VAIL, W. J.; PAPAHDJOPOULOS, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 557, n. 1, p. 9–23, 1979.

130. HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; WEBB, G.; CULLIS, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et biophysica acta**, v. 812, n. 1, p. 55–65, 1985.

131. MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 858, n. 1, p. 161–168, 1986.

132. STEIN, H.; SPINDLER, S.; BONAKDAR, N.; WANG, C.; SANDOGHDAR, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. **Frontiers in physiology**, v. 8, n. FEB, 2017.

133. POYTON, M. F.; PULLANCHERY, S.; SUN, S.; YANG, T.; CREMER, P. S. Zn²⁺ binds to phosphatidylserine and induces membrane blebbing. *Journal of the American Chemical Society*, v. 142, n. 43, p. 18679–18686, 2020.

134. YANG, T.; JUNG, S. Y.; MAO, H.; CREMER, P. S. Fabrication of Phospholipid Bilayer-Coated Microchannels for On-Chip Immunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 165–169, 2000.

135. SUN, S.; SENDECKI, A. M.; PULLANCHERY, S.; HUANG, D.; YANG, T.; CREMER, P. S. Multistep Interactions between Ibuprofen and Lipid Membranes. **Langmuir**, v. 34, n. 36, p. 10782–10792, 2018.

136. CONG, X.; POYTON, M. F.; BAXTER, A. J.; PULLANCHERY, S.; CREMER, P. S. Unquenchable Surface Potential Dramatically Enhances Cu²⁺ Binding to Phosphatidylserine Lipids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 24, p. 7785–7792, 2015.
137. SHEN, C. Molecular Effectors at the Headgroup-Chain Interfaces of Lipids. Department of Physics, Chemistry and Pharmacy, University of Southern Denmark, 2012. Thesis, 140 p.
138. PINNICK, D. V.; DURHAM, B. Photosubstitution reactions of Ru(bpy)₂XYⁿ⁺ complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1440–1445, 1984
139. LEE, N. R.; BOWERMAN, C. J.; NILSSON, B. L. Effects of varied sequence pattern on the self-assembly of amphipathic peptides. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 3267–3277, 2013.
140. STANKOVIĆ, I. M.; NIU, S.; HALL, M. B.; ZARIĆ, S. D. Role of aromatic amino acids in amyloid self-assembly. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 949–959, 2020.
141. COSKUNER, O.; UVERSKY, V. N. Tyrosine Regulates β -Sheet Structure Formation in Amyloid- β 42: A New Clustering Algorithm for Disordered Proteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 6, p. 1342–1358, 2017.
142. TU, L. H.; RALEIGH, D. P. Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide. **Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 333–342, 2013.

143. CALI, M. P. Influência de Complexos Polipiridínicos de Ru(II) No Processo de Agregação do Peptídeo Beta Amiloide. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2023. Tese de doutorado, 170 p.
144. HELLSTRAND, E.; BOLAND, B.; WALSH, D. M.; LINSE, S. Amyloid β -protein aggregation produces highly reproducible kinetic data and occurs by a two-phase process. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 13–18, 2010.
145. ZHONG, X.; KUMAR, R.; WANG, Y.; BIVERSTÅL, H.; INGEBORG JEGERSCHÖLD, C.; J B KOECK, P.; JOHANSSON, J.; ABELEIN, A.; CHEN, G. Amyloid Fibril Formation of Arctic Amyloid- β 1-42 Peptide is Efficiently Inhibited by the BRICHOS Domain. **ACS Chemical Biology**, v. 17, n. 8, p. 2201–2211, 2022.
146. AL-HILALY, Y. K.; WILLIAMS, T. L.; STEWART-PARKER, M.; FORD, L.; SKARIA, E.; COLE, M.; BUCHER, W. G.; MORRIS, K. L.; SADA, A. A.; THORPE, J. R.; SERPELL, L. C. A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid- β in Alzheimer’s disease. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2014.
147. MALENCIK, D. A.; ANDERSON, S. R. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. **Amino acids**, v. 25, n. 3–4, p. 233–247, 2003.
148. FRICANO, A.; LIBRIZZI, F.; RAO, E.; ALFANO, C.; VETRI, V. Blue autofluorescence in protein aggregates “lighted on” by UV induced oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 11, p. 140258, 2019.
149. LEHRER, S. S.; FASMAN, G. D. Ultraviolet Irradiation Effects in Poly-L-tyrosine and Model Compounds. Identification of Bityrosine as a Photoproduct. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 757–767, 1967.

150. GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876, 2006.

151. CALI, M. P. Mapeamento Do Processo de Nucleação e Crescimento do Peptídeo Beta Amiloide 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.

152. AHYAYAUCH, H.; RAAB, M.; BUSTO, J. V.; ANDRAKA, N.; ARRONDO, J. L. R.; MASSERINI, M.; TVAROSKA, I.; GOÑI, F. M. Binding of β -Amyloid (1–42) Peptide to Negatively Charged Phospholipid Membranes in the Liquid-Ordered State: Modeling and Experimental Studies. **Biophysical Journal**, v. 103, n. 3, p. 453, 2012.

153. LEVENTIS, P. A.; GRINSTEIN, S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. **Annu Ver Biophys**, v. 39, n. 1, p. 407–427, 2010.

154. MONSON, C. F.; CONG, X.; ROBISON, A. D.; PACE, H. P.; LIU, C.; POYTON, M. F.; CREMER, P. S. Phosphatidylserine reversibly binds Cu²⁺ with extremely high affinity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 18, p. 7773–7779, 2012.

155. HEO, C. E.; PARK, C. R.; KIM, H. I. Effect of packing density of lipid vesicles on the A β 42 fibril polymorphism. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 236, p. 105073, 2021.

156. ROBINSON, J.; SARANGI, N. K.; KEYES, T. E. Role of phosphatidylserine in amyloid-beta oligomerization at asymmetric phospholipid bilayers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 25, n. 11, p. 7648–7661, 2023

157. AMBROGGIO, E. E.; KIM, D. H.; SEPAROVIC, F.; BARROW, C. J.; BARNHAM, K. J.; BAGATOLLI, L. A.; FIDELIO, G. D. Surface Behavior and Lipid Interaction of Alzheimer β -Amyloid Peptide 1–42: A Membrane-Disrupting Peptide. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 4, p. 2706, 2005.

158. DROLLE, E.; NEGODA, A.; HAMMOND, K.; PAVLOV, E.; LEONENKO, Z. Changes in lipid membranes may trigger amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182194, 2017.

159. TURRO, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. 1st ed. University Science Books, 2010. p 389-399

160. RAGHURAMAN, H.; SHRIVASTAVA, S.; CHATTOPADHYAY, A. Monitoring the looping up of acyl chain labeled NBD lipids in membranes as a function of membrane phase state. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 5, p. 1258–1267, 2007.

161. TSUKANOVA, V.; GRAINGER, D. W.; SALESSE, C. Monolayer Behavior of NBD-Labeled Phospholipids at the Air/Water Interface. **Langmuir**, v. 18, n. 14, p. 5539–5550, 2002.

162. DREIER, L. B.; WOLDE-KIDAN, A.; BONTHUIS, D. J.; NETZ, R. R.; BACKUS, E. H. G.; BONN, M. Unraveling the Origin of the Apparent Charge of Zwitterionic Lipid Layers. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 10, n. 20, p. 6355–6359, 2019.

163. HAUGEN, A.; MAY, S. The influence of zwitterionic lipids on the electrostatic adsorption of macroions onto mixed lipid membranes. **Journal of Chemical Physics**, v. 127, n. 21, 2007.

164. ZHANG, Y.; LI, Q.; DONG, M.; HAN, X. Effect of cholesterol on the fluidity of supported lipid bilayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 196, p. 111353, 2020.
165. KADDAH, S.; KHREICH, N.; KADDAH, F.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 40–48, 2018.
166. SCHEINER, S.; ČUMA, M. Relative Stability of Hydrogen and Deuterium Bonds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 6, p. 1511–1521, 1996.
167. KAGANER, V. M.; MÖHWALD, H.; DUTTA, P. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. **Reviews of Modern Physics**, v. 71, n. 3, p. 779, 1999.
168. KLOPFER, K. J.; VANDERLICK, T. K.; KLOPFER, K. J.; VANDERLICK, T. K. Isotherms of Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Monolayers: Features Revealed and Features Obscured. **JCIS**, v. 182, n. 1, p. 220–229, 1996.
169. GENG, Y.; CAO, Y.; LI, Y.; ZHAO, Q.; LIU, D.; FAN, G.; TIAN, S. A Deeper Insight into the Interfacial Behavior and Structural Properties of Mixed DPPC/POPC Monolayers: Implications for Respiratory Health. **Membranes**, v. 13, n. 1, 2022.
170. STUNGES, G. M. Estudo De Interação Entre Um Hormônio Estrógeno E Modelos Simples De Membrana Biológica. Presidente Prudente, Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – UNESP, 2015. Dissertação de mestrado, 66 p.

171. MORATO, L. F. C.; RUIZ, G. C. M.; PAZIN, W. M.; GOMES, O. P.; OLIVEIRA, O. N.; BATAGIN-NETO, A.; CONSTANTINO, C. J. L. Effects of insecticide acephate on membrane mimetic systems: The role played by electrostatic interactions with lipid polar headgroups. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, p. 115868, 2021.

172. MOREIRA, L. G.; ALMEIDA, A. M.; CAMACHO, S. A.; ESTEVÃO, B. M.; OLIVEIRA, O. N.; AOKI, P. H. B. Chain Cleavage of Bioinspired Bacterial Membranes Photoinduced by Eosin Decyl Ester. **Langmuir**, v. 36, n. 32, p. 9578–9585, 2020.

173. ZABOROWSKA, M.; BRONIATOWSKI, M.; WYDRO, P.; MATYSZEWSKA, D.; BILEWICZ, R. Structural modifications of lipid membranes exposed to statins – Langmuir monolayer and PM-IRRAS study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 113570, 2020.

174. MAXIMINO, M. D.; CONSTANTINO, C. J. L.; OLIVEIRA, O. N.; ALESSIO, P. Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers. **Applied Surface Science**, v. 476, p. 493–500, 2019.

175. HÜBNER, W.; BLUME, A. Interactions at the lipid–water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1–2, p. 99–123, 1998.

176. BLUME, A. Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 1, p. 64–77, 1996.

177. BLUME, A.; HIBNER, W.; MESSNER, G. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ -labeled Phospholipids Hydrogen Bonding To Carbonyl Groups. **Biochemistry**, v. 27, n. 21, p. 8239–8249, 1988.

178. GARIDEL, P.; BLUME, A.; HÜBNER, W. A Fourier transform infrared spectroscopic study of the interaction of alkaline earth cations with the negatively charged phospholipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1466, n. 1–2, p. 245–259, 2000.
179. ZHANG, Y. P.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of the n-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. **Biophysical journal**, v. 72, n. 2 Pt 1, p. 779–793, 1997.
180. HUANG, C. HSIEN; LAPIDES, J. R.; LEVIN, I. W. Phase-Transition Behavior of Saturated, Symmetric Chain Phospholipid Bilayer Dispersions Determined by Raman Spectroscopy: Correlation between Spectral and Thermodynamic Parameters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 22, p. 5926–5930, 1982
181. YELLIN, N.; LEVIN, I. W. Hydrocarbon chain disorder in lipid bilayers: Temperature dependent ram an spectra of 1,2-diacyl phosphatidylcholine-water gels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 489, n. 2, p. 177–190, 1977.
182. JIN, S. Membrane Interaction of Amyloid–Beta (1–42) Peptide Induces Membrane Remodeling and Benefits the Conversion of Non–toxic A β Species into Cytotoxic Aggregate. Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät - Humboldt-Universität zu Berlin, 2016. Dissertation, 146 p.