

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

“Estudo da influência da díade Ru-naftalenodiimida no processo de agregação do peptídeo beta amiloide”

Bárbara Patrícia Neves Silva*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador (a): Dra. Rose Maria Carlos

*Bolsista FAPESP

São Carlos, SP

2025



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 Bárbara Patrícia Neves Silva, realizada em 28/08/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Angelica Ellen Graminha (UNESP)

Profa. Dra. Carolina Riverin Cardoso (IFSP)

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, à toda
minha família e à Isabela.

Cumpra o pequeno dever de cada momento: faz o que deves e está no que fazes.

- São Josemaria Escrivá

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter conduzido meus passos até este momento e por toda a providência e graça com que me sustentou ao longo desta caminhada.

Agradeço, com carinho, à minha família — meus pais e minha irmã, em especial — pelo apoio incondicional. Estendo esse agradecimento às minhas primas e primo, aos tios e tias, que sempre acreditaram em mim e no meu trabalho.

À Maria Isabela, sou profundamente grata pelo apoio constante, pelas conversas sobre o futuro, pela força nos momentos difíceis e na falta de clareza, por ser um sinal de Deus na minha vida, sempre me incentivando a não desistir do prêmio eterno.

Aos meus amigos, que sempre torceram por mim e pelo meu trabalho, agradeço de coração. De modo especial, à Simone, por todo o cuidado, pela escuta atenta, pelas orações e por nunca medir esforços para estar presente.

Ao padre Marcelo, agradeço a amizade sincera e por ter me fortalecido espiritualmente com suas palavras e os sacramentos. Ter superado muitas das dificuldades dos últimos anos seria quase impossível sem sua presença, oração e amizade.

Aos colegas do laboratório, sou grata pelo companheirismo no dia a dia, pelas conversas e discussões que tanto contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, professora Rose, agradeço pela acolhida desde a Iniciação Científica, pelas conversas, pelo incentivo constante e por todo o aprendizado compartilhado.

Ao professor Andreas Barth, da Universidade de Estocolmo, agradeço por ter me recebido em seu laboratório, por todo o apoio durante o período em que lá estive e pelos valiosos ensinamentos proporcionados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, agradeço pela infraestrutura oferecida e pela oportunidade de crescimento acadêmico.

Por fim, agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e, de modo especial, à FAPESP, pelo apoio financeiro por meio da bolsa concedida no país (Processo 2023/02083-2) e pela oportunidade de intercâmbio com a bolsa BEPE (Processo 2024/06040-9), essencial para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

β A – Peptídeo β -amiloide

AFM – Microscopia de Força Atômica

APP – Proteína precursora do amiloide

CD – Dicroísmo Circular

DA – Doença de Alzheimer

dppz – dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenazina

FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier

hIAPP – Polipeptídeo amiloide das ilhotas humanas

ILCT – Transferência de carga intra-ligante

MLCT – Transferência de carga do metal para o ligante

pNDIp - N,N'-bis-1,10-fenantrolina-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico
diimida

PBS – Tampão fosfato salino

PC12 – Células de feocromocitoma

phen – 1,10-fenantrolina

Phe – fenilalanina

RuApy – *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺

RuNDI – [Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂

ThT – Tioflavina T

Tyr – Tirosina

Val – Valina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tempo de vida de emissão do complexo [Ru(phen)₂(pNDIp)]²⁺ em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).....	27
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1 Mecanismo de clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) pela via (A) Não Amiloidogênica e (B) pela via Amiloidogênica.....	3
Figura 1.3.1 Etapas do processo de agregação do peptídeo β amiloide ilustrando as espécies geradas durante o processo.....	5
Figura 1.4.1(A) Estrutura Química da Tioflavina T. (B) Estrutura e eixo de rotação da ThT...6	6
Figura 1.4.2 Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$	7
Figura 1.4.3 Estrutura do complexo cis - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})_2]^{2+}$	9
Figura 1.5.1 Estrutura química da sequência da região hidrofóbica do peptídeo βA_1 - $_{42}(\text{KLVFF})$	10
Figura 1.6.1 Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDI}p)]^{2+}$	11
Figura 3.1.1.1 Esquema de síntese do ligante pNDI _p	14
Figura 3.1.2.1 Esquema de síntese do complexo precursor cis - $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$	15
Figura 3.1.3.1 Esquema de síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDI}p)]^{2+}$	16
Figura 3.2.1.1 Esquema ilustrando o protocolo para prepara dos filmes do peptídeo β - amiloide.	17
Figura 3.2.2.1 Esquema ilustrando o preparo de amostra para os experimentos de agregação com o βA	18
Figura 3.2.2.2 Esquema ilustrando o preparo de amostra para os experimentos de agregação com o βA na presença do complexo RuNDI in situ.	18
Figura 3.2.2.3 Esquema ilustrando o preparo de amostra para os experimentos de agregação com o βA na presença do complexo RuNDI ex situ.....	19
Figura 4.1.1.1 Espectro de RMN do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDI}p)](\text{PF}_6)_2$ atribuído por Lorena et al. com destaque para as regiões utilizadas para confirmar a obtenção do complexo após síntese. As regiões em amarelo na estrutura química destacam os prótons H1, H12, H1' e H12'. (Adaptado de LORENA et al., 2025).....	23
Figura 4.1.1.2 Espectro de RMN do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDI}p)](\text{PF}_6)_2$ sintetizado para este trabalho, com destaque para os prótons H1, H12, H1' e H12.	24
Figura 4.1.2.1 Espectros de absorção eletrônica do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).	25
Figura 4.1.3.1 Espectro de emissão do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).26	26
Figura 4.1.3.2 Espectros de excitação(azul) e emissão (vermelho) do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).	27
Figura 4.1.3.3 Janela de absorção das biomoléculas.	28
Figura 4.2.1 (A) Espectros de emissão do complexo RuNDI em várias concentrações (0- 100 μM) em tampão PBS (pH 7,4; 10mM). (B) Gráfico de Máximo de Intensidade de Emissão versus concentração.....	29
Figura 4.3.1.1 Espectros de absorção eletrônica dos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina. Adaptado de SERIANNI (s.d.).	30
Figura 4.3.1.2 Ilustração da sequência de aminoácidos do peptídeo β -amiloide 1-42.....	30
Figura 4.3.1.3 Espectro de emissão da tirosina em tampão PBS (pH7,4;10mM).....	31
Figura 4.3.1.4 Espectros de emissão em diferentes tempos de incubação do peptídeo βA na concentração de 20 μM em tampão PBS (pH 7,4;10mM) a 37°C.....	32
Figura 4.3.2.1 Ilustração de espectros de dicroísmo circular de estruturas α -hélice, folha- β e random coil.....	33

Figura 4.3.2.2 Espectros de dicroísmo circular em diferentes tempos de incubação do peptídeo (20 μ M) em PBS (10mM; pH7,4) a 37°C.....	34
Figura 4.3.3.1 Micrografias A (2 \times 2 μ m), B (0,5 \times 0,5 μ m) e C (0,5 \times 0,5 μ m em modo 3D) do peptídeo nos tempos 0h sem incubação e após 24h de incubação a 37°C.....	35
Figura 4.3.4.1 Espectro de emissão da tioflavina T (λ_{exc} = 440nm) na ausência (azul) e presença de agregados amiloides (verde).	36
Figura 4.3.4.2 (A) Espectros de emissão do corante ThT (20 μ M) em diferentes tempos de agregação do peptídeo β A (20 μ M) em tampão PBS (pH 7,4; 10mM). (B) Gráfico de intensidade máxima de emissão da ThT versus tempo de agregação em PBS (10mM, pH 7,4) a 37°C.	37
Figura 4.4.1.1.1 Espectros de emissão do complexo RuNDI (20 μ M) na ausência do β A (preto), na presença do β A (20 μ M) no início da agregação (vermelho) e ao término da agregação (verde), em tampão PBS (pH7,4;10mM).	38
Figura 4.4.1.1.2 Espectros de emissão do complexo RuNDI (20 μ M) nos (A) primeiros 10 minutos de incubação e (B) de 20min a 24h de incubação com o β A (20 μ M) em PBS (10mM, pH 7,4) a 37°C. A curva pontilhada representa o complexo RuNDI na ausência do peptídeo.	39
Figura 4.4.1.1.3 Gráfico de máximo de intensidade de emissão do RuNDI versus o tempo de incubação da cinética de agregação do peptídeo na presença complexo RuNDI na proporção 1:1 (β A:RuNDI).....	40
Figura 4.4.1.1.4 Estrutura de rotação do complexo RuNDI.	41
Figura 4.4.1.2.1 Imagens de microscopia de fluorescência do complexo RuNDI na ausência e presença das fibrilas amiloide do β A produzidas após 24h de agregação do peptídeo na temperatura de 37°C.	42
Figura 4.4.2.1 Espectros de emissão do complexo RuNDI (40 μ M) nos (A) primeiros 10 minutos de incubação, (B) de 20min a 11h de incubação e (C) de 12 a 24h de incubação com o β A (20 μ M) em PBS (10mM, pH 7,4) a 37°C.....	43
Figura 4.4.2.2 Gráfico de máximo de intensidade de emissão do RuNDI versus o tempo de incubação da cinética de agregação do peptídeo na presença complexo RuNDI na proporção 1:2 (β A:RuNDI).....	44
Figura 4.4.2.3 Micrografias A (2 \times 2 μ m), B (0,5 \times 0,5 μ m) e C (0,5 \times 0,5 μ m em modo 3D) do peptídeo nos tempos 0h sem incubação e após 24h de incubação com complexo RuNDI na proporção 1:3 (β A:RuNDI).	46
Figura 4.4.2.4 Micrografias A (2 \times 2 μ m), B (0,5 \times 0,5 μ m) e C (0,5 \times 0,5 μ m em modo 3D) do peptídeo nos tempos 0h sem incubação e após 24h de incubação a 37°C com complexo RuNDI na proporção 1:5 (β A:RuNDI).....	46
Figura 4.4.2.5 Espectros de dicroísmo circular do β A na ausência (20 μ M; preto) e presença do complexo nas proporções 1:3 (vermelho) e 1:5 (verde) após 24h de incubação na temperatura de 37°C.	47
Figura 4.4.2.6 Representação da vibração Amida I. Imagem retirada de KHAN et al. (2016)	48
Figura 4.4.2.7 Segunda derivada do espectro de absorvância IR do complexo em solução de PBS 10 mM pD 7,4 na concentração de 500 μ M.	49

RESUMO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA DÍADE RU-NAFTALENODIIMIDA NO PROCESSO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO BETA AMILOIDE. A Doença de Alzheimer (DA) é a enfermidade neurodegenerativa mais prevalente no mundo, afetando cerca de 50 milhões de pessoas, com sobrevida média de 5 a 10 anos após o início dos sintomas. Do ponto de vista neuropatológico, a principal marca da DA é a presença de placas senis formadas por agregados tóxicos do peptídeo β -amiloide (β A40/42), que comprometem a homeostase celular e causam danos neuronais. Evidências indicam que espécies oligoméricas solúveis de β A são as principais responsáveis pela toxicidade, antecedendo a formação de fibrilas maduras.

Diante disso, torna-se essencial investigar estratégias capazes de interferir na agregação do β A e permitir sua detecção em estágios iniciais. Neste contexto, complexos metálicos surgem como promissores tanto como inibidores do processo de agregação quanto como sondas luminescentes para diagnóstico precoce, superando as limitações de marcadores tradicionais como a Tioflavina T (ThT), que detecta apenas espécies fibrilares.

Neste trabalho, foi desenvolvido e caracterizado o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDpI})](\text{PF}_6)_2$ (RuNDI), com o objetivo de avaliar seu potencial como inibidor e marcador do processo de agregação do peptídeo β A₁₋₄₂. O complexo apresenta síntese em três etapas, alto rendimento e boa solubilidade em meio fisiológico e foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, UV-vis e luminescência no estado estacionário. As propriedades espectroscópicas do RuNDI — como absorção intensa no visível ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, $\epsilon = 13.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), emissão larga centrada em 610 nm e grande deslocamento de Stokes ($5,55 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) — demonstram seu potencial como sonda luminescente em sistemas biológicos, sem sobreposição com a absorção de biomoléculas nem reabsorção da luz emitida.

Os estudos de agregação do β A₁₋₄₂ foram conduzidos por meio de técnicas complementares, como fluorescência, dicroísmo circular, FTIR e microscopia de força atômica. As análises de interação com o complexo RuNDI evidenciaram seu potencial como sonda luminescente para a detecção de espécies intermediárias formadas durante a agregação do peptídeo β A₁₋₄₂. Comparações com a Tioflavina T (ThT) indicaram vantagens associadas às propriedades espectroscópicas do RuNDI, como maior deslocamento de Stokes e emissão em região de menor interferência por autofluorescência biológica. Ademais, em concentrações superiores à do peptídeo, o complexo demonstrou capacidade de modular a formação de folhas β , inibindo a progressão da agregação para fibrilas maduras. Esses resultados evidenciam o RuNDI como

uma ferramenta promissora para o estudo dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

STUDY OF THE INFLUENCE OF THE RU–NAPHTHALENEDIIMIDE DYAD ON THE AGGREGATION PROCESS OF THE BETA-AMYLOID PEPTIDE. Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder worldwide, affecting approximately 50 million people, with an average life expectancy of 5 to 10 years after symptom onset. As life expectancy increases, so does the incidence of AD, leading to significant social and economic burdens, especially on public healthcare systems. From a neuropathological perspective, the main hallmark of AD is the presence of senile plaques composed of toxic aggregates of the β -amyloid peptide (β A40/42), which disrupt cellular homeostasis and damage neuronal structures. Evidence suggests that soluble oligomeric species of β A are the primary agents of toxicity, preceding the formation of mature fibrils.

Given this context, it is essential to explore strategies that can interfere with β A aggregation and enable its detection at early stages. Metal complexes have emerged as promising tools, acting both as aggregation inhibitors and as luminescent probes for early diagnosis, overcoming the limitations of traditional markers such as Thioflavin T (ThT), which only detects fibrillar species.

In this work, the complex $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDpI})](\text{PF}_6)_2$ (RuNDI) was synthesized and characterized with the aim of evaluating its potential as an inhibitor and probe for the aggregation process of the β A_{1–42} peptide. The complex was characterized by mass spectrometry, UV-vis absorption, and steady-state luminescence spectroscopy. It features a straightforward three-step synthesis, high yield, and good solubility in physiological media. Spectroscopic properties—such as strong absorption in the visible region ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, $\epsilon = 13,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), broad emission centered at 610 nm, and a large Stokes shift ($5.55 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) — highlight its suitability as a luminescent probe for biological applications, with minimal interference from biomolecule absorption and negligible reabsorption of emitted light. β A_{1–42} aggregation studies were conducted using complementary techniques, including fluorescence, circular dichroism, FTIR, and atomic force microscopy. Interaction analyses with RuNDI demonstrated its potential as a luminescent probe for detecting intermediate species formed during peptide aggregation. Comparisons with ThT revealed similar interaction mechanisms, but with advantages linked to RuNDI's spectroscopic features, such as a larger Stokes shift and emission in regions with reduced biological autofluorescence. Furthermore, at concentrations higher than that of the peptide, the complex was able to modulate β -sheet formation and inhibit the progression toward mature fibrils. These findings position RuNDI as

a promising tool for investigating the molecular mechanisms underlying the development of Alzheimer's disease.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Doença de Alzheimer	1
1.2. Hipótese da cascata amiloide	2
1.3. Agregação do peptídeo β -amiloide	4
1.4. Monitoramento do processo de agregação	6
1.5. Modulação da agregação	9
1.6. Proposta de Trabalho	11
1.7. Justificativa	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Síntese do Ligante e dos Complexos	14
3.1.1. Síntese do Ligante Naftalenodiimida (NDI)	14
3.1.2. Síntese do Complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂]	15
3.1.3. Síntese do Complexo [Ru(phen) ₂ (NDI)](PF ₆) ₂ (RuNDI)	15
3.2. Estudos com o peptídeo Beta Amiloide 42	16
3.2.1. Preparo do filme do peptídeo β A ₄₂	16
3.2.2. Protocolo de Agregação do peptídeo	17
3.3. Técnicas e Equipamentos	19
3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	19
3.3.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis	19
3.3.3. Espectroscopia de Luminescência	20
3.3.4. Tempo de Vida de Emissão	20
3.3.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	21
3.3.6. Dicroísmo Circular (CD)	21
3.3.7. Microscopia de Fluorescência	22
3.3.8. Microscopia de Força Atômica (AFM)	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Caracterização do Complexo [Ru(phen) ₂ (NDI)](PF ₆) ₂	23
4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	23
4.1.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis	24
4.1.3. Espectroscopia de Luminescência e Tempo de Vida (τ)	25

4.2	Estudo de Concentração do Complexo [Ru(phen) ₂ (NDI)](PF ₆) ₂	28
4.3	Cinética de Agregação do peptídeo β-Amiloide	29
4.3.1	Estudos via Espectroscopia de Luminescência	29
4.3.2	Estudos via Dicroísmo Circular (CD)	32
4.3.3	Estudos via Microscopia de Força Atômica (AFM)	34
4.3.4	Cinética de Agregação do peptídeo β-Amiloide na presença de Tioflavina T ...	35
4.4	Estudos de interação do complexo [Ru(phen) ₂ (NDI)](PF ₆) ₂ com o peptídeo β-Amiloide.....	37
4.4.1	[Ru(phen) ₂ (NDI)](PF ₆) ₂ como sonda luminescente.....	38
4.4.1.1	Estudos via Espectroscopia de Luminescência	38
4.4.1.2	Estudos via Microscopia de Fluorescência	41
4.4.2	[Ru(phen) ₂ (NDI)](PF ₆) ₂ como modulador da agregação do βA	42
5.	CONCLUSÃO.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1.A Doença de Alzheimer

Entre as dez doenças que mais afetam a qualidade de vida da população mundial, destacam-se as de origem neurológica. (referência). Embora não constitua a condição de saúde responsável pelo maior número de óbitos a nível mundial, trata-se de uma das que mais afeta a qualidade de vida, e não só das pessoas que possuem a doença, como também das que convivem com os portadores dela. (REF)

De modo geral as doenças neurodegenerativas surgem quando determinadas condições comprometem a higidez neuronal, afetando seu funcionamento e, conseqüentemente, o sistema nervoso como um todo, causando desordens que prejudicam a capacidade motora, a memória, a respiração e a fala (SELKOE & HARDY, 2016; WANG et al., 2017; ASHRAFIAN et al., 2021).

A Doença de Alzheimer (DA) é a enfermidade neurodegenerativa mais comum e representa a principal causa de demência, afetando predominantemente indivíduos idosos. De acordo com a Alzheimer's Disease International (ADI), em 2021 cerca de 55 milhões de pessoas viviam com algum tipo de demência no mundo. Estima-se que a DA seja responsável por aproximadamente 60% a 70% desses casos, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da própria ADI. Além das estatísticas atuais, as projeções indicam um crescimento expressivo no número de diagnósticos, podendo atingir cerca de 78 milhões de pessoas com demência até o ano de 2030, impulsionado principalmente pelo envelhecimento populacional global (WHO, 2021; Alzheimer's Disease International, 2021).

Para além do impacto na saúde, a DA tem grandes conseqüências sociais e econômicas, exigindo uma reestruturação no modo de viver por parte das famílias dos portadores da doença além da mobilização de recursos financeiros devido aos cuidados exigidos pelos pacientes. Os custos tendem a ficar ainda mais altos conforme ocorre o avanço da doença, se estendendo além dos familiares para os sistemas de saúde. Em 2019, estimou-se cerca de U\$1,3 trilhão em gastos relacionados a DA, sendo cerca de metade deste valor referente aos cuidados prestados por familiares. (WITTENBERG et al., 2019; Hospital Oswaldo Cruz, 2021; Alzheimer's Association Brasil, 2023).

À vista disso é que se dedicam os esforços nas diversas áreas que podem contribuir para evolucionar tanto o diagnóstico quanto o tratamento da doença.

1.2. Hipótese da cascata amiloide

Atualmente a causa mais estudada na busca de diagnóstico e tratamentos tem sido a hipótese do amiloide. Essa hipótese foi proposta no início da década de 1990 quando uma série de estudos *pós mortem* em pacientes portadores da doença revelaram a presença de placas senis constituídas principalmente do peptídeo beta amiloide, (WANG et al., 2017; SELKOE; HARDY, 2016; ASHRAFIAN et al., 2021) estando este desde então no centro das pesquisas relacionadas a DA.

Para compreender melhor a hipótese do amiloide e sua relevância no contexto da Doença de Alzheimer (DA), é necessário retornar à história e analisar os eventos que culminaram na descoberta dessa doença.

Em 1901, o médico Alois Alzheimer se deparou pela primeira vez com Auguste Deter, uma mulher de 51 anos que apresentava sintomas como perda de memória, confusão e dificuldades em realizar tarefas cotidianas. Auguste tinha dificuldade em reconhecer seu marido e não conseguia lembrar o nome de objetos comuns ou de seus próprios familiares. Os sintomas clínicos apresentados por ela eram inéditos para a medicina da época, e o rápido declínio cognitivo observado preocupou Alzheimer, levando-o a investigar o caso com mais profundidade (KATZMAN, 1989).

Em 1906, após a morte de Auguste Deter, Alois Alzheimer realizou a autópsia da paciente e encontrou estruturas anormais no tecido cerebral, como aglomerados densos e emaranhados acumulados dentro das células neuronais. Além disso, observou dano neuronal difuso e atrofia no cérebro, especialmente em áreas responsáveis pela memória e funções cognitivas (ALZHEIMER, 1907; KATZMAN, 1989).

Foi a partir dessa descoberta que a base da pesquisa sobre a Doença de Alzheimer foi estabelecida. Com a evolução da ciência e das técnicas laboratoriais, tornou-se possível realizar estudos mais aprofundados da doença, visando entender suas causas e consequências do ponto de vista bioquímico. Em 1984, Glenner e Wong publicaram a primeira descrição bem-sucedida da purificação e caracterização do peptídeo beta-amiloide (βA), com a sequência do peptídeo identificada (GLENNER; WONG, 1984). Com base nos resultados obtidos por Glenner e Wong, e em outros estudos da época que investigavam os fatores genéticos associados à DA, em abril de 1992, Hardy e Higgins propuseram a hipótese da cascata amiloide, na qual a agregação do peptídeo beta-amiloide foi discutida pela primeira vez como uma possível causa da doença (HARDY; HIGGINS, 1992).

A hipótese da cascata amiloide propõe que o peptídeo β -amiloide ($A\beta$) é produzido a partir da clivagem proteolítica da glicoproteína precursora amiloide (APP). Este processo pode ocorrer por duas vias distintas: a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica, Figura 1.2.1 (A) e (B), respectivamente.

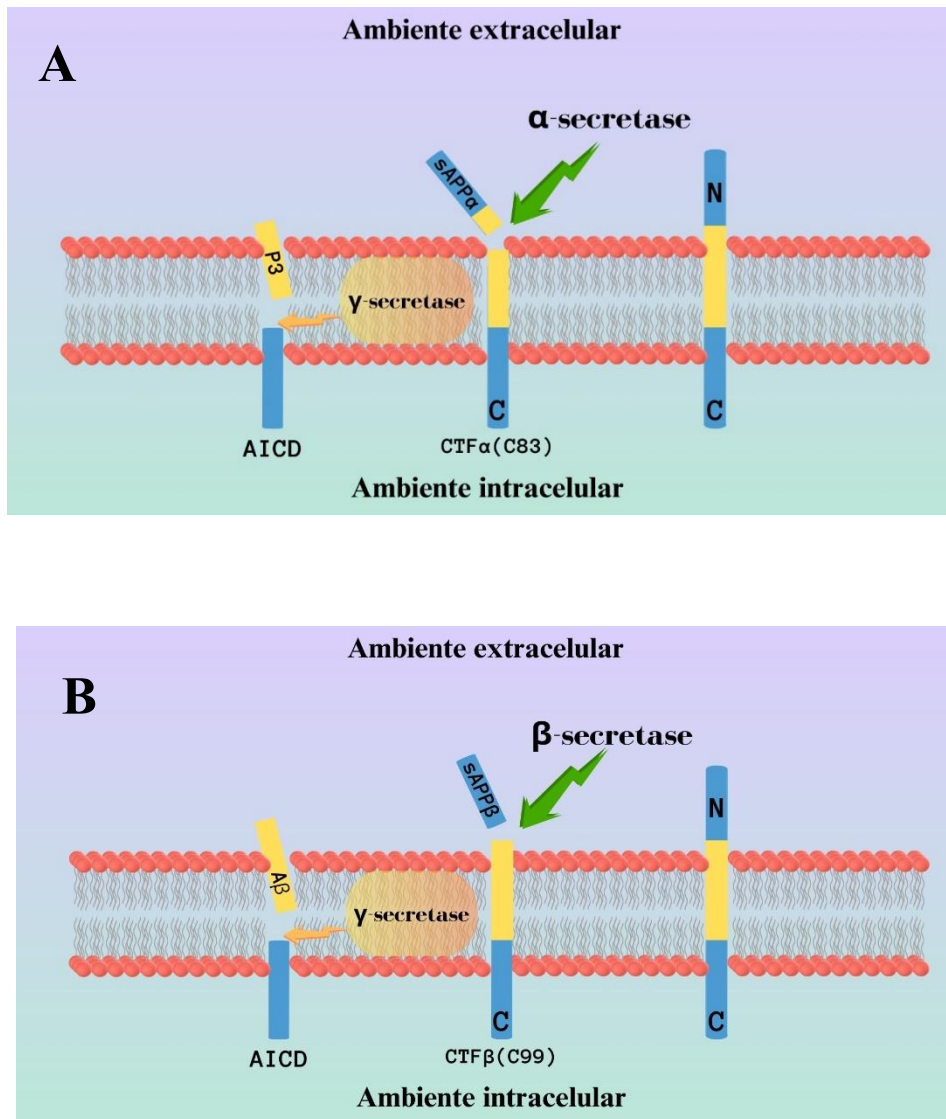


Figura 1.2.1 Mecanismo de clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) pela via (A) Não Amiloidogênica e (B) pela via Amiloidogênica.

A APP é uma proteína transmembrana com uma região N-terminal extracelular e uma região C-terminal intracelular. Na via não amiloidogênica, o processamento da APP ocorre em duas etapas principais: inicialmente a enzima α -secretase realiza a primeira clivagem, produzindo dois fragmentos, o sAPP α , fragmento extracelular N-terminal solúvel, e o CTF α (C83), fragmento C-terminal retido na membrana. Em seguida, a γ -secretase efetua a segunda

clivagem, gerando o P3, fragmento extracelular, e AICD, fragmento intracelular C-terminal (CHEN et al, 2017; SELKOE; HARDY, 2016).

Na via amiloidogênica, o processamento da APP também ocorre em duas etapas principais: inicialmente a enzima β -secretase (BACE1) realiza a primeira clivagem, produzindo o sAPP β , fragmento extracelular N-terminal solúvel, e CTF β (C99), fragmento C-terminal retido na membrana. Posteriormente, a γ -secretase efetua a segunda clivagem, gerando o β A, fragmento extracelular (peptídeo β -amiloide), e o AICD, fragmento intracelular C-terminal (CHEN et al, 2017; WANG et al., 2017; SELKOE; HARDY, 2016).

Embora os termos “via não amiloidogênica” e “via amiloidogênica” possa levar a interpretação de que em uma não há desenvolvimento de Alzheimer e na outra sim, é preciso ter cuidado e compreender bem os termos. Sim, deve haver maior probabilidade de desenvolvimento da DA pela via amiloidogênica uma vez que é por ela que o peptídeo β -amiloide é produzido, entretanto, por si só, o fato de ser produzido não garante o desenvolvimento da DA. Como já descrito antes, é uma doença complexa e vários fatores podem e devem estar correlacionados para que a doença evolua. Além disso, estudos indicam que, em condições normais e em baixas concentrações (pico a nanomolar), o peptídeo beta-amiloide pode desempenhar funções fisiológicas importantes, como neuroplasticidade, auxiliando na regulação da formação de sinapses; neuro proteção, uma vez que em concentrações adequadas pode ter efeitos protetores nos neurônios; e função antimicrobiana podendo ajudar na proteção contra infecções cerebrais (BRODSKI et al., 2019; SELKOE, 2019).

1.3. Agregação do peptídeo β -amiloide

Os fragmentos de β A produzidos através da clivagem do APP podem possuir diferentes comprimentos. As duas isoformas mais abundantes são β A40 e β A42, que diferem apenas por dois aminoácidos na extremidade C-terminal. Embora β A40 seja produzido em maior quantidade, β A42 é considerado mais tóxico e é o principal componente das placas amiloides encontradas nos cérebros de pacientes com Alzheimer. Isso se deve à maior propensão de β A42 para agregar e formar fibrilas amiloides (SELKOE; HARDY, 2016).

Uma vez que os níveis de β A se elevam, inicia-se o processo de agregação, levando à formação de oligômeros solúveis e, eventualmente, placas amiloides insolúveis. Esse acúmulo desencadeia uma cascata de eventos patológicos, incluindo disfunção sináptica, processos inflamatórios, estresse oxidativo e alterações no fluxo sanguíneo cerebral. A formação dessas

placas amiloides é um dos principais marcadores patológicos da doença de Alzheimer, juntamente com os emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína tau hiperfosforilada (SEHAR et al, 2022; JONES; SMITH, 2023).

A análise da agregação do peptídeo β A pode ser feita dividindo o processo em duas etapas principais, a nucleação e o alongamento (Figura 1.3.1). Na etapa de nucleação a aproximação dos monômeros dá origem a dímeros, estes podem interagir com outro monômero para formar trímeros ou entre si formando tetrâmeros. Essas interações seguem gerando oligômeros solúveis cada vez maiores. Na etapa de alongamento ocorre a formação de protofibrilas, espécies ainda solúveis, mas maiores e de maior peso molecular, que interagem entre si para formação das fibrilas insolúveis. Esse tipo de agregação é chamado de agregação primária, no qual, partindo-se do monômero, primeiro ocorre a nucleação que evolui para o alongamento das espécies. Porém há ainda um segundo tipo de agregação chamado agregação secundária, na qual a etapa de nucleação contém não apenas espécies monoméricas, mas já oligoméricas ou até mesmo protofibrilares que servem de suporte para o crescimento de fibrilas logo no início, esse tipo de agregação tende a acelerar o tempo de nucleação levando há uma maior concentração de fibrilas maduras — etapa final — em menor tempo comparado a agregação primária (KAWASAKI; TAKAHASHI, 2021).

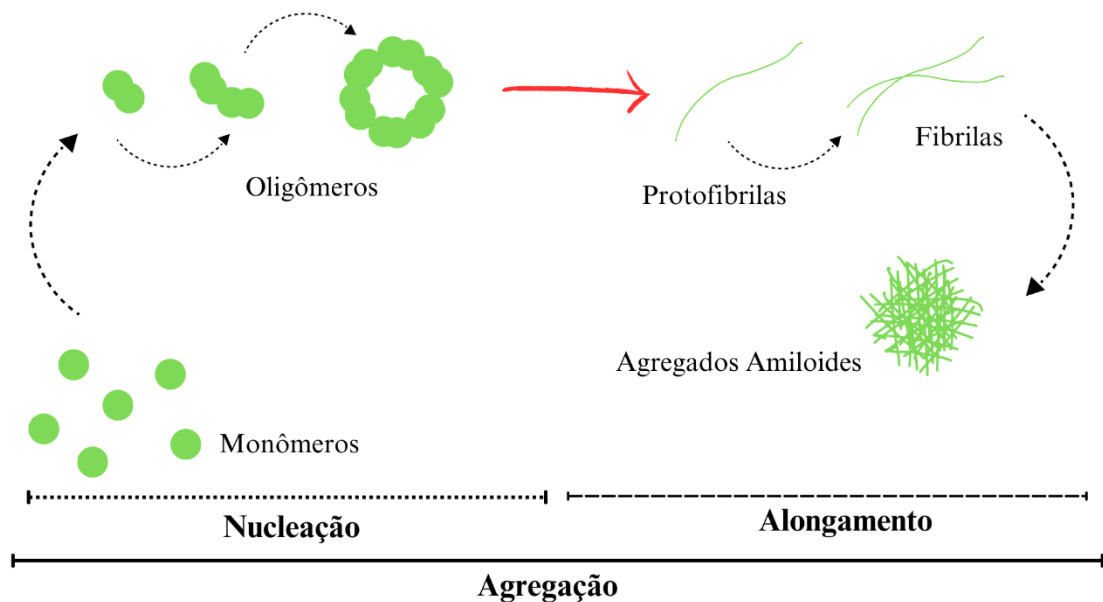


Figura 1.3.1 Etapas do processo de agregação do peptídeo β amiloide ilustrando as espécies geradas durante o processo.

Embora a DA seja caracterizada pela presença dos agregados amiloides, os oligômeros gerados durante o processo de agregação são as espécies consideradas mais tóxicas (LAZAR; THOMAS, 2022). Estudos sugerem que enquanto pequenos oligômeros estão relacionados a permeação e rompimento da integridade da membrana celular, oligômeros maiores e até mesmo protofibrilas podem estar relacionadas a ativação inflamatória (BOTELLA LUCENA et al, 2024; MARTINS et al., 2024).

Do ponto de vista estrutural, a toxicidade produzida pelos oligômeros, pode estar relacionada a maior exposição das superfícies hidrofóbicas do peptídeo nestas espécies. Essa exposição viabiliza as interações com a membrana celular e demais biomoléculas presentes, levando a uma desordem nos mecanismos e eventual morte celular. (SANTOS; LIMA, 2020; HUANG; LIU, 2020)

Dessa forma, muitos esforços têm sido direcionados ao estudo das espécies oligoméricas, uma vez que estas parecem desempenhar um papel central na toxicidade associada ao β A. No entanto, por se tratar de intermediários do processo de agregação e apresentarem heterogeneidade em termos de tamanho, forma e estrutura, torna-se fundamental desenvolver estratégias que permitam mapear esse processo, de modo a identificar as espécies envolvidas e os possíveis sítios responsáveis por sua formação.

1.4. Monitoramento do processo de agregação

A tioflavina T (ThT, Figura 1.4.1 A) tem sido o padrão ouro da literatura para o estudo de processos nos quais ocorre a formação de agregados amiloides desde 1989.

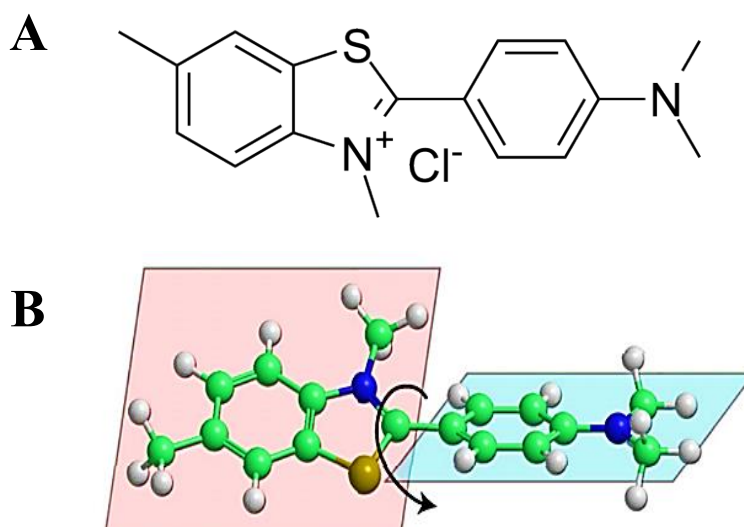


Figura 1.4.1(A) Estrutura Química da Tioflavina T. (B) Estrutura e eixo de rotação da ThT.

No estado excitado, a tioflavina T (ThT) exibe movimento de torção não radiativo e baixa emissão de fluorescência, pois, em solução, a presença de uma barreira de baixa energia permite que os anéis de dimetilaniolina e benzotiazol girem livremente em torno da ligação carbono-carbono que os conecta (Figura 1.4.1 B). No entanto, quando esse movimento de torção é restringido, tornam-se favorecidas as vias de decaimento radiativo, resultando em uma emissão fluorescente intensa, com máximo em 482 nm após excitação em 440 nm (XUE et al., 2017) Essa propriedade é a base do amplo uso da ThT na detecção de agregados amiloides, uma vez que, ao interagir com estruturas ricas em folhas β — características desses agregados —, a ThT tem seu movimento conformacional limitado, passando a emitir fortemente e de forma específica para essas estruturas (BIANCALANA et al., 2010).

Embora, por muito tempo, a detecção específica de agregados fibrilares tenha sido considerada uma importante vantagem do uso da ThT como padrão, atualmente reconhece-se a necessidade de desenvolver alternativas que também permitam a identificação de espécies intermediárias, como oligômeros e protofibrilas. A detecção dessas formas é essencial para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos envolvidos no processo de agregação do peptídeo β -amiloide. Além disso, a ThT apresenta limitações espectroscópicas importantes. Seu baixo deslocamento de Stokes — apenas ~ 70 nm entre a absorção (412 nm) e a emissão (482 nm) — favorece processos de reabsorção de luz, reduzindo a eficiência da detecção. Outro ponto crítico é que esses comprimentos de onda se sobrepõem à janela de absorção de biomoléculas relevantes, como flavinas e bilirrubina, que participam de processos redox essenciais. Essa sobreposição pode causar interferências e comprometer a especificidade das medições. (KIM; LEE, 2019)

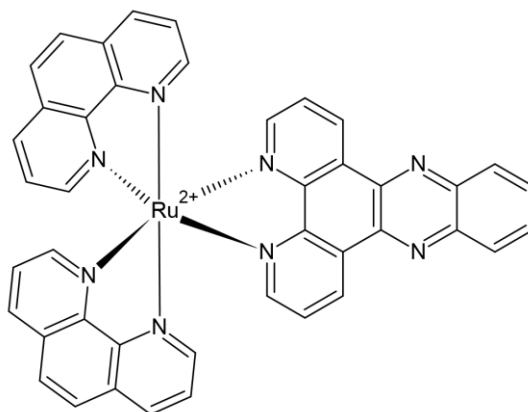


Figura 1.4.2 Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$.

Diante destas limitações os complexos de metais de transição têm se apresentado como uma alternativa para uso como sonda molecular, de modo especial os complexos polipiridínicos de rutênio (II) têm sido amplamente investigados como sondas luminescentes para a detecção de diversas biomoléculas, devido às suas propriedades espectroscópicas favoráveis, como o alto deslocamento de Stokes — que minimiza problemas de reabsorção de luz — e os longos tempos de vida de emissão, permitindo sua observação direta em meio biológico. Além disso, a emissão deslocada para a região do vermelho reduz a interferência com a absorção intrínseca das biomoléculas celulares. Um exemplo notável é o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (sendo dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina; Figura 1.4.2), cujos estudos conduzidos pelo grupo de Martí demonstraram um comportamento de 'photoswitching' ao interagir com fibrilas de βA_{1-40} , exibindo emissão intensa em função do ambiente hidrofóbico proporcionado pelas fibrilas. (MEI et al., 2015; JIANG; MARTÍ, 2021; LIU, 2018).

Entretanto, embora o complexo Ru-dppz apresente vantagens em relação à tioflavina T (ThT) — como seu longo tempo de vida de emissão (~350 ns), significativamente superior ao da ThT (4–5 ns) —, persiste a limitação quanto à especificidade para as diferentes espécies agregadas (LIU et al., 2018). Assim como a ThT, o Ru-dppz demonstra seletividade preferencial por fibrilas amiloides, não sendo eficaz na detecção de espécies intermediárias, como oligômeros solúveis ou protofibrilas.

Em vista disso, o grupo de pesquisa do Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LAFIB), sob a liderança e orientação da Prof.^a Dr.^a Rose Maria Carlos, tem se dedicado ao desenvolvimento de complexos polipiridínicos de rutênio(II) aplicados como sondas luminescentes em processos de agregação de proteínas amiloides. Destaca-se, entre esses sistemas, o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ (RuApy, sendo phen = 1,10 fenantrolina e $3,4\text{Apy}$ = 3,4 diaminopiridina; Figura 1.4.3), que apresentou resultados promissores como sonda luminescente sendo capaz de detectar não apenas espécies fibrilares, mas também formas iniciais do processo de agregação. (CARLOS et al., 2024)

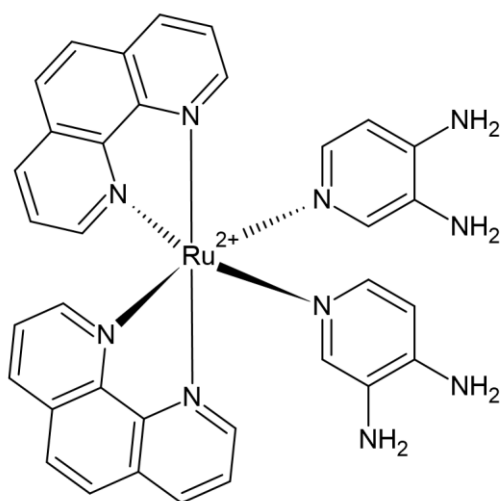


Figura 1.4.3 Estrutura do complexo *cis* - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})_2]^{2+}$.

1.5. Modulação da agregação

Para além da importância em identificar as espécies geradas durante o processo de agregação, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de compostos capazes de interferir ativamente nesse processo, impedindo a formação de espécies tóxicas e revelando os sítios de interação do peptídeo que são cruciais para a progressão da agregação. Compreender a natureza das interações intermoleculares envolvidas na agregação do peptídeo β -amiloide (βA) pode representar um caminho promissor para o desenvolvimento de fármacos direcionados a esse alvo molecular.

Nesse contexto, diversos esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de moléculas que atuam redirecionando a via de agregação para a formação de espécies não tóxicas, ou mesmo inibindo a agregação desde os estágios iniciais. Estudos recentes conduzidos pelo grupo da Prof.^a Rose Maria Carlos demonstraram que o complexo RuApy (*cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})_2]^{2+}$), além de atuar como uma sonda luminescente, foi capaz de modular a via de agregação do peptídeo $\text{A}\beta_{40}$, promovendo um efeito protetor em células PC12 (CARLOS et al., 2024).

Diversas evidências apontam que a região hidrofóbica central do peptídeo βA , composta pelos resíduos 16–20 (sequência KLVFF, Figura 1.5.1), exerce um papel crítico na agregação, sendo responsável por interações intermoleculares que promovem o alinhamento em folhas β . Estudos demonstraram que a substituição de resíduos como Val18, Phe19 ou Phe20 resulta em

uma redução drástica na formação de fibrilas, evidenciando o papel estrutural dessa região (SÁNCHEZ DE GROOT et al., 2006; TJERNBERG et al., 1996). Acredita-se que a hidrofobicidade dessa porção favoreça interações do tipo empilhamento π - π , particularmente entre os resíduos de fenilalanina, o que contribui para a estabilização dos protofilamentos e propagação das estruturas fibrilares (NGUYEN et al., 2007; GAZIT, 2002; PROFIT et al., 2013).

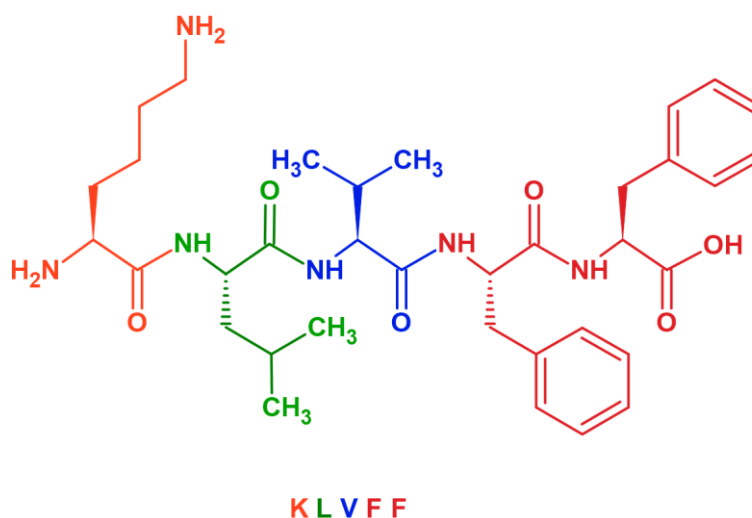


Figura 1.5.1 Estrutura química da sequência da região hidrofóbica do peptídeo βA_{1-42} (KLVFF).

Diante disso, torna-se de extrema relevância o desenvolvimento de compostos com afinidade específica por essa região hidrofóbica, a fim de permitir uma investigação mais aprofundada sobre seus mecanismos de interação e, potencialmente, bloquear ou redirecionar a agregação de forma controlada.

1.6 Proposta de Trabalho

Diante dos desafios envolvidos na identificação de compostos capazes de contribuir para a elucidação dos sítios de interação responsáveis pela agregação do peptídeo β -amiloide 1–42, propõe-se, neste trabalho, a investigação do potencial do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})](\text{PF}_6)_2$ (RuNDI, sendo phen = 1,10-fenantrolina e pNDIp um grupo naftalenil funcionalizado ligado a uma das fenantrolinas coordenadas). A estrutura do complexo encontra-se representada na Figura 1.6.1. Este estudo busca avaliar o comportamento do RuNDI tanto como sonda molecular, quanto como modulador do processo de agregação do βA , com o objetivo de mapear possíveis regiões de interação que estejam diretamente envolvidas na formação de espécies agregadas.

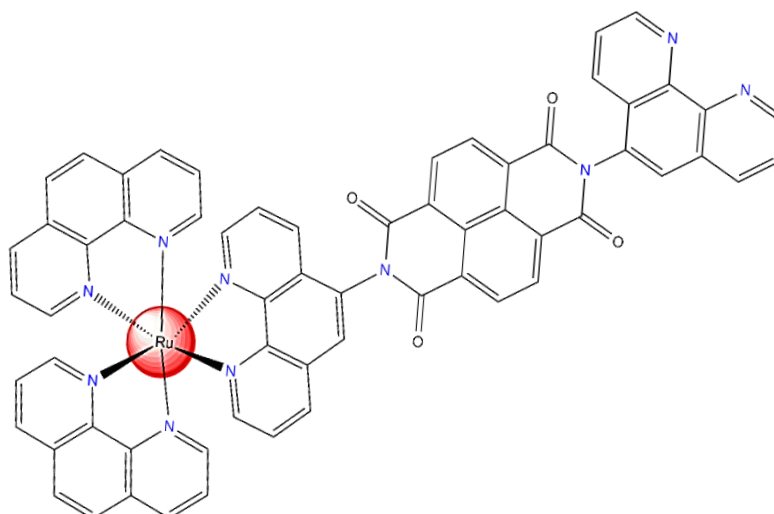


Figura 1.6.1 Estrutura do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$.

1.7 Justificativa

Como descrito anteriormente, o grupo de pesquisa LAFIB tem se dedicado ao desenvolvimento de complexos polipiridínicos de rutênio (II) voltados para o estudo do processo de agregação de proteínas amiloides, tais como βA , insulina e o peptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas (hIAPP). As propriedades espectroscópicas desses complexos já demonstraram elevado potencial para serem utilizadas no monitoramento da agregação dessas biomoléculas. Além disso, o complexo RuApy também se mostrou capaz de modular a agregação do peptídeo βA , conforme previamente relatado.

Diante disso, propôs-se a modificação da estrutura do complexo por meio da troca de ligantes, incorporando ao novo sistema um ligante altamente hidrofóbico e com extenso sistema π -conjugado, com o objetivo de favorecer uma maior interação com as regiões hidrofóbicas do peptídeo, reconhecidas como fatores determinantes na progressão do processo de agregação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})](\text{PF}_6)_2$ (RuNDI) em atuar como uma sonda luminescente e interferir no processo de agregação do peptídeo β -amiloide 1-42.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Sintetizar o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})](\text{PF}_6)_2$ (RuNDI, sendo phen = 1,10-fenantrolina e pNDIp um grupo naftalenil funcionalizado ligado a uma das fenantrolinas coordenadas);
- II. Caracterizar o complexo obtido pelas técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H , absorção eletrônica na região UV-vis e luminescência);
- III. Acompanhar *in vitro* a cinética de agregação do peptídeo β -amiloide 1-42 na ausência do complexo através do ensaio de fluorescência utilizando a fluorescência intrínseca do peptídeo;
- IV. Realizar a detecção das espécies fibrilares do peptídeo β -amiloide 1-42 *in vitro* através do ensaio de fluorescência utilizando o padrão tioflavina T (ThT), a técnica de Dicroísmo Circular (CD) e de microscopia de força atômica (AFM);
- V. Acompanhar *in vitro* o processo de agregação do peptídeo na presença do complexo *ex situ* através da técnica fluorescência e microscopia de fluorescência;
- VI. Acompanhar *in vitro* o processo de agregação do peptídeo na presença do complexo *in situ* através das técnicas fluorescência, dicroísmo circular, microscopia de fluorescência e de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese do Ligante e dos Complexos

Os reagentes $\text{RuCl}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, 1,10-fenantrolina (phen), cloreto de lítio (LiCl), 1, 4, 5, 8 naftalenotetracarboxílico, 1,10-fenantrolina-5-amina e hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6), utilizados na síntese dos complexos, são de procedência Sigma Aldrich. Os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona, utilizados na síntese e purificação dos complexos, foram de pureza HPLC.

3.1.1. Síntese do Ligante Naftalenodiimida (NDI)

A síntese do ligante naftalenodiimida (NDI) foi realizada seguindo procedimento desenvolvido pelo grupo de pesquisa. (PEREIRA et al., 2025) Desta forma, o ligante NDI foi obtido reagindo-se 0,37 mmols de 1, 4, 5, 8 naftalenotetracarboxílico, 1,15 mmols de 1,10-fenantrolina-5-amina e 215uL de trietilamina dissolvidos em 7mL de DMF sob refluxo em atmosfera de nitrogênio e agitação contínua durante 2h. Após o tempo de reação o precipitado produto da síntese foi filtrado gota a gota, lavado com etanol e seco à vácuo. Posteriormente o ligante foi recristalizado para purificação. O rendimento obtido foi de 46%. O esquema referente a reação desta segunda etapa da síntese está descrita na Figura 3.1.1.1.

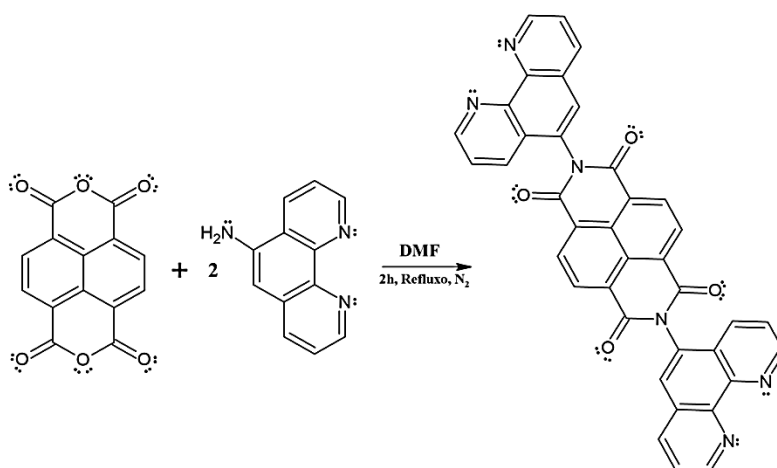


Figura 3.1.1.1 Esquema de síntese do ligante pNDIp.

3.1.2. Síntese do Complexo *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

A síntese do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂(Cl)₂] foi realizada seguindo procedimento descrito na literatura. (SULLIVAN et al.; 1978) Desta forma, o complexo foi obtido reagindo-se 1,15 mmols de RuCl₃.XH₂O, 2,52 mmols de 1,10-fenantrolina e 8,0 mmols de LiCl dissolvidos em 15mL de DMF sob refluxo em atmosfera de nitrogênio e agitação contínua durante 8h. Após o tempo de síntese foi adicionado à mistura reacional 200 ml de acetona previamente destilada. A mistura resultante foi mantida sob refrigeração por uma noite, para a completa precipitação do complexo. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada gelada e seco a vácuo. O rendimento obtido foi de 43%. O esquema referente a reação está descrita na Figura 3.1.2.1

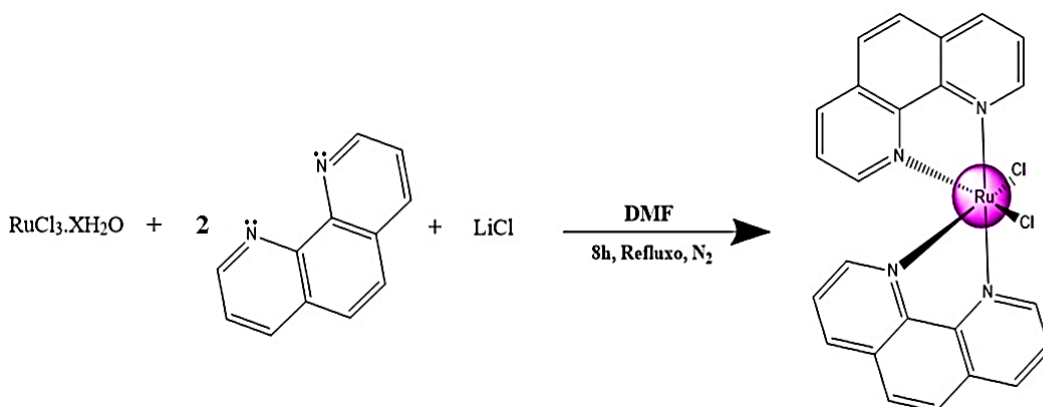


Figura 3.1.2.1 Esquema de síntese do complexo precursor *cis* - [Ru(phen)₂Cl₂].

3.1.3. Síntese do Complexo [Ru(phen)₂(NDI)](PF₆)₂ (RuNDI)

A síntese do complexo de interesse RuNDI, foi realizada seguindo procedimento desenvolvido pelo grupo de pesquisa. (PEREIRA et al., 2025) Desta forma, o complexo RuNDI foi obtido reagindo-se 0,19 mmols do precursor [Ru(phen)₂Cl₂] e 0,23 mmols do ligante NDI dissolvidos em 15mL de DMF sob refluxo em atmosfera de nitrogênio e agitação contínua durante 24h. Após o tempo de reação foi adicionado à síntese 0,38 mmol de NH₄PF₆ para precipitação do complexo, que foi realizada pela adição de dietil éter. O precipitado produto da síntese foi filtrado e purificado em acetona. O rendimento obtido foi de 70%. O esquema referente a reação desta terceira etapa da síntese está descrito na Figura 3.1.3.1.

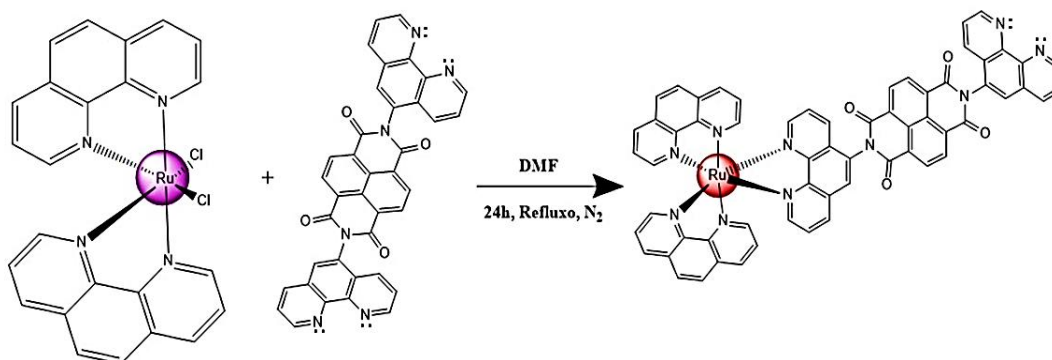


Figura 3.1.3.1 Esquema de síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$.

3.2. Estudos com o peptídeo Beta Amiloide 42

Foram utilizados para o preparo das soluções tampão os reagentes cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), todos de procedência Exôdo Científica.

3.2.1. Preparo do filme do peptídeo βA_{42}

Para realização dos ensaios biológicos com o beta amiloide inicialmente realizou-se o preparo de filmes do peptídeo para posterior uso nos experimentos. O protocolo utilizado neste estudo foi uma adaptação da literatura e consistiu inicialmente na solubilização de 1 mg de βA (GenScript, EUA) em 150 μL de 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma Aldrich). A solução estoque foi levada ao sonificador por 10 minutos e, em seguida, o volume da solução foi distribuído em vials de vidro, de modo que cada frasco recebeu um volume previamente calculado, conforme a concentração final desejada para os ensaios. Os vials foram secos com fluxo intenso de N_2 , para total remoção do solvente, tampados e armazenados à -20°C até o uso. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo, do início ao fim, visando evitar a agregação do peptídeo (DA CRUZ GARCIA et al.; 2024). Um esquema referente a este processo está descrito na Figura 3.2.1.1.

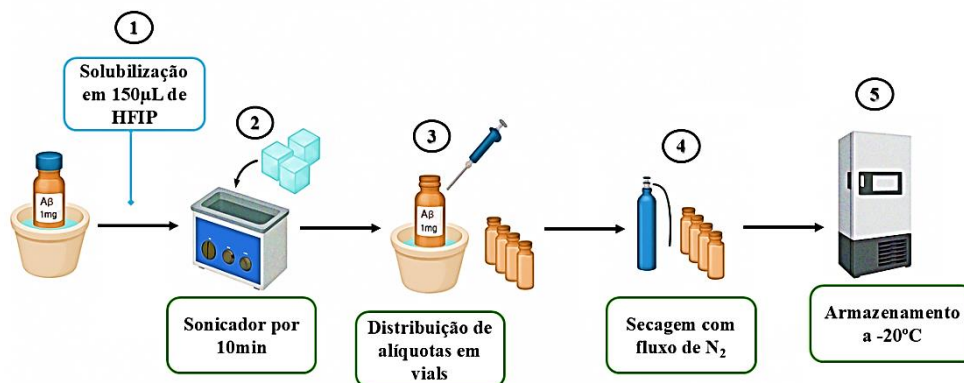


Figura 3.2.1.1 Esquema ilustrando o protocolo para prepara dos filmes do peptídeo β -amiloide.

3.2.2. Protocolo de Agregação do peptídeo

Com os filmes prontos, seguiu-se um segundo protocolo para o preparo das soluções de β A para o desenvolvimento dos experimentos. Este protocolo foi uma adaptação do protocolo previamente estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa e consiste na suspensão do filme de β A em tampão PBS (pH 7,4; 10mM). O volume de tampão utilizado foi de 500µL, de forma a manter uma concentração final de 20µM de peptídeo em solução. Uma vez suspensa, a solução foi filtrada em filtro de 0,22µm. A concentração foi verificada através da medição da absorção do peptídeo utilizando espectrofotômetro Nanodrop One (ThermoFisher). O peptídeo foi mantido em banho de gelo do início deste protocolo até o momento de início da agregação, que ocorreu mediante a incubação do peptídeo à 37°C (DA CRUZ GARCIA et al.; 2024). Um esquema referente a este processo está descrito na figura 3.2.2.1.

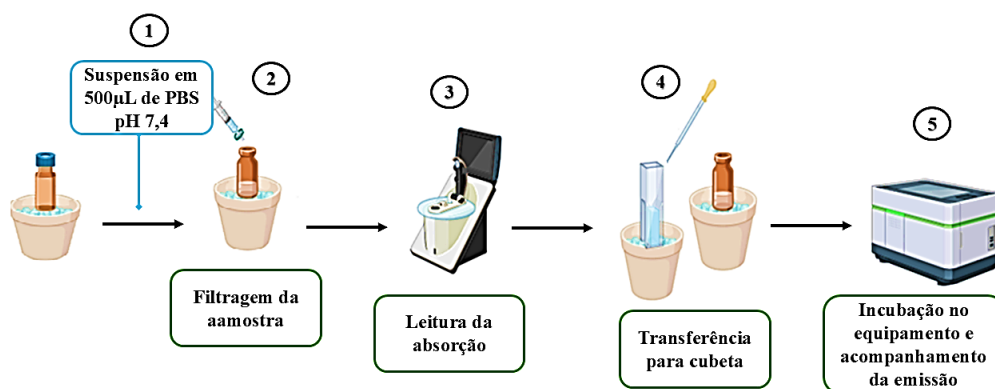


Figura 3.2.2.1 Esquema ilustrando o preparo de amostra para os experimentos de agregação com o β A.

Para os estudos de agregação do peptídeo na presença do complexo RuNDI, foi preparada uma solução-estoque concentrada (2 mM) do complexo em DMSO. Nos experimentos *in situ*, o complexo foi incubado junto com o peptídeo de forma que todo o processo de agregação — desde o início até o término — foi conduzido na presença do complexo. Para isso, a solução-estoque foi diluída no tampão contendo o peptídeo **antes** do início da incubação a 37 °C (Figura 3.2.2.2).

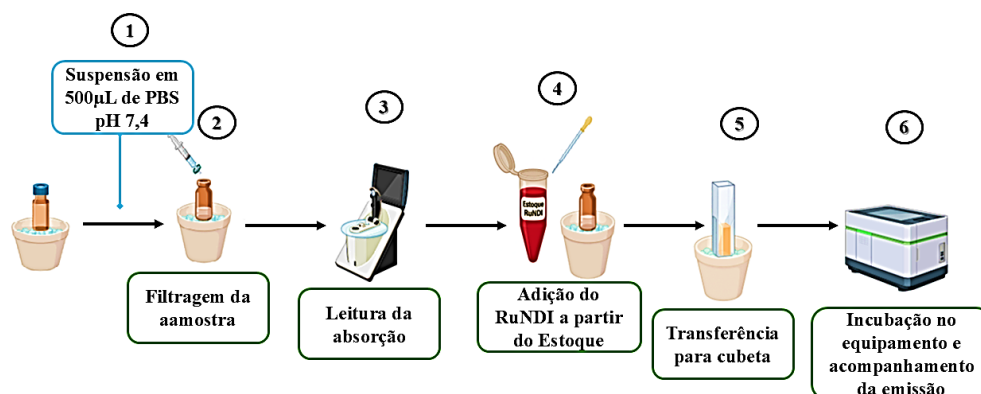


Figura 3.2.2.2 Esquema ilustrando o preparo de amostra para os experimentos de agregação com o β A na presença do complexo RuNDI *in situ*.

Em contrapartida, nos experimentos *ex situ*, o peptídeo foi primeiro submetido à incubação a 37 °C e, após um intervalo de tempo previamente definido, o complexo foi adicionado (Figura 3.2.2.3).

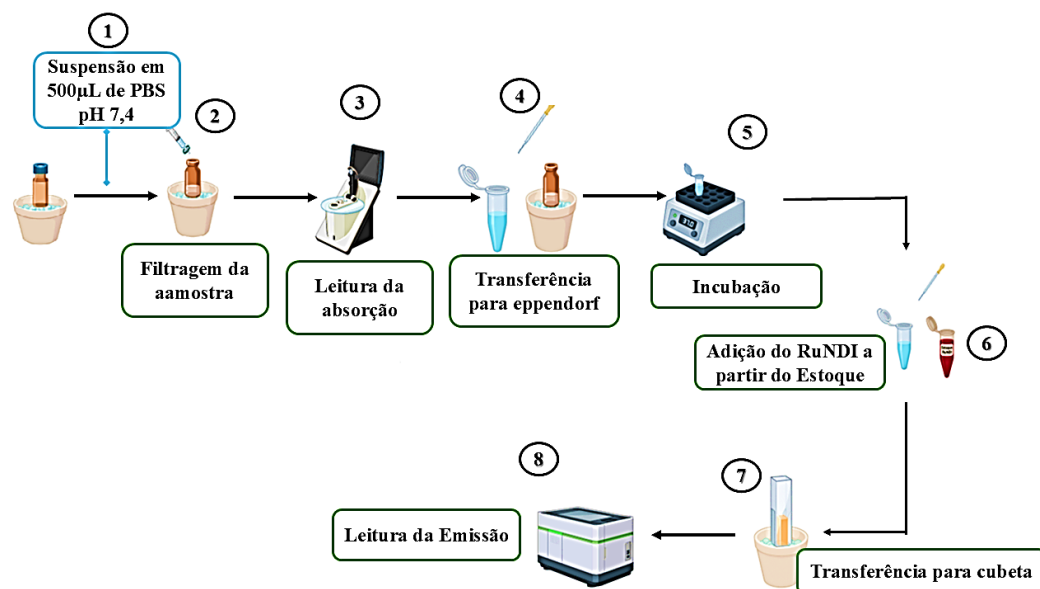


Figura 3.2.2.3 Esquema ilustrando o preparo de amostra para os experimentos de agregação com o βA na presença do complexo RuNDI *ex situ*.

3.3. Técnicas e Equipamentos

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 isto, uma amostra foi preparada solubilizando 3 mg do complexo $[Ru(phen)_2(pNDIp)](PF_6)_2$ em 450 μL do solvente DMSO- d_6 .

3.3.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica na região UV-vis foram obtidos utilizando um espectrofotômetro modelo Agilent 8453A. Para a caracterização do complexo foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho ótico 10 mm e volume 3,5 mL. As soluções do complexo RuNDI para os estudos de caracterização foram preparadas a partir de um estoque concentrado em DMSO (2mM), em seguida realizou-se uma diluição em tampão PBS pH7,4 obtendo-se uma solução com concentração final de 20 μM .

3.3.3. Espectroscopia de Luminescência

Os espectros de emissão e excitação foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-6000 lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928. Foi utilizada cubeta de quartzo de quatro lados de caminho ótico 10 mm e volume de 3,5 mL para os estudos de caracterização do complexo. As soluções do complexo RuNDI para os estudos de caracterização foram preparadas a partir de um estoque concentrado em DMSO (2mM), em seguida realizou-se diluições em tampão PBS (pH7,4; 10mM) visando obter uma solução com concentração final desejada para os estudos. Quanto aos ensaios com o peptídeo utilizou-se cubeta de quartzo Hellma com caminho ótico de 10mm e volume de 700 μ L. As amostras foram preparadas de acordo com o item 3.2.2. Os experimentos com o peptídeo na presença do complexo *in situ* foram realizados na proporção molar de 1:1 (20 μ M:20 μ M) e 1:2 (20 μ M:40 μ M) entre β A e RuNDI.

Os espectros dos experimentos com o peptídeo na presença do complexo *ex situ* foram adquiridos usando um laser diodo pulsado de 440nm (PicoQuant-LDH-series) como fonte de excitação a uma frequência de \sim 80 MHz e a emissão de fluorescência foi detectada utilizando um fotomultiplicador da Thorlabs. A proporção molar entre o peptídeo e o complexo foi de 1:1 (20 μ M:20 μ M) e as medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho ótico 1 mm e volume 500 μ L.

3.3.4. Tempo de Vida de Emissão

As medidas de luminescência resolvida no tempo para obtenção dos tempos de vida de emissão e espectros de emissão por contagem de fótons foram obtidas no equipamento de fluorescência resolvida no tempo usando um laser diodo pulsado de 440nm (PicoQuant-LDH-series) como fonte de excitação a uma frequência de \sim 10 MHz. O sinal de fluorescência foi disperso no espectrômetro (Andor-Kymera) e detectado pelo modo resolvido no tempo por um detector (PicoQuant).

3.3.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os experimentos de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizados na Universidade de Estocolmo, na Suécia, no laboratório do professor Andreas Barth durante o intercâmbio com bolsa BEPE.

Para o preparo de amostra dos experimentos de interação entre o peptídeo A β 42 e o complexo RuNDI, 0,5 μ L da solução estoque 30 mM de RuNDI foi adicionada ao tampão PBS (5 \times concentrado; pD 7,4). Em seguida, 20 μ L de A β ₁₋₄₂ a 140 μ M (pD 12) foi adicionado para alcançar uma mistura final contendo 100 μ M de peptídeo e 0,5 mM do complexo, em um volume total de 25 μ L (pD 7,4).

Após isso, um total de 10 μ L da solução foi colocado no centro de uma janela plana de CaF₂, cercada por um espaçador plástico recoberto com graxa de vácuo em ambos os lados. Outra janela de CaF₂ foi colocada por cima para completar o conjunto, formando uma cubeta para IR acoplada ao suporte de amostras.

As análises foram realizadas em um espectrômetro Tensor 37 FTIR (Bruker Optics, Alemanha), previamente resfriado a 0 °C, utilizando um banho termostático externo para controle de temperatura.

Os espectros de transmissão no IV foram registrados em intervalos ao longo dos períodos de incubação: inicialmente a 0 °C e, em seguida, em temperaturas crescentes (25 °C e incubação prolongada a 37 °C durante a noite). Os espectros foram analisados utilizando o software OPUS da Bruker.

3.3.6. Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados utilizando o espectrômetro Jasco J-815 pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Departamento de Física da Universidade de São Paulo – Campus II São Carlos. Para as medidas foram utilizadas as amostras contendo o peptídeo β A em diferentes tempos de incubação, na ausência e presença do complexo. As soluções foram preparadas segundo o item 3.2.2. Nos estudos na ausência do complexo realizou-se medidas em intervalos de tempos de 0min, 5min, 10min, 30min, 2h e 24h de incubação. Os estudos na presença do complexo RuNDI foram realizados *in situ* mantendo uma proporção molar de 1:3 e 1:5 (β A:RuNDI) entre peptídeo e complexo, 20 μ M de β A e 60 e 100 μ M de RuNDI, neste caso realizou-se medidas no tempo

0min e após 24h de incubação. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com caminho ótico 1 mm e volume 500 μL .

3.3.7. Microscopia de Fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas no microscópio invertido Carl Zeiss modelo Axio Observer 7 utilizando o filtro Set20 (Rodamina) - emissão: 575-640 nm. As medidas foram realizadas utilizando uma alíquota de 10 μL das soluções de βA preparada segundo o item 3.2.2, na ausência e presença do complexo RuNDI *ex situ*, mantendo a proporção molar de 1:1 (βA :RuNDI), ou seja, 20 μM de βA e 20 μM de RuNDI.

3.3.8. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas no Laboratório de AFM da Divisão de Nanomateriais do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), que integra o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, SP. As imagens foram adquiridas com o equipamento Bruker MultiMode 8, operado principalmente no modo Tapping. A aquisição foi realizada em ambiente de ar ambiente, com controle de força assegurado por *feedback* dinâmico.

O preparo de amostras para as análises consistiu na adição de cerca de 20 μL de solução de peptídeo, preparada segundo o item 3.2.2, em substrato de mica. O peptídeo β -amiloide (βA) foi incubado a uma concentração final de 20 μM , tanto na ausência quanto na presença do complexo RuNDI. Na condição *in situ*, o complexo foi adicionado simultaneamente ao peptídeo, na proporção molar de 1:3 e 1:5 (βA :RuNDI), resultando em uma concentração final de 60 e 100 μM de RuNDI, respectivamente. Esperou-se de 2 a 3 minutos para aderência da amostra ao substrato e em seguida lavou-se o mesmo com água destilada para retirada do excesso do sal presente no tampão. As amostras foram secas por 1h em um armário dessecador com fluxo de nitrogênio antes do início da aquisição das imagens.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do Complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NDI})](\text{PF}_6)_2$

4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})](\text{PF}_6)_2$ já foi previamente sintetizado e bem caracterizado no grupo (PEREIRA et al., 2025), sendo assim, para este trabalho, a análise do espectro de RMN de hidrogênio foi utilizada para confirmação da obtenção do complexo após síntese.

Diante disso, como forma de confirmar a integridade estrutural do complexo, foram analisados os prótons terminais H1, H12, H1' e H12' do ligante pNDIp, de acordo com os dados da literatura, Figura 4.1.1.1 (adaptado de LORENA et al. 2025).

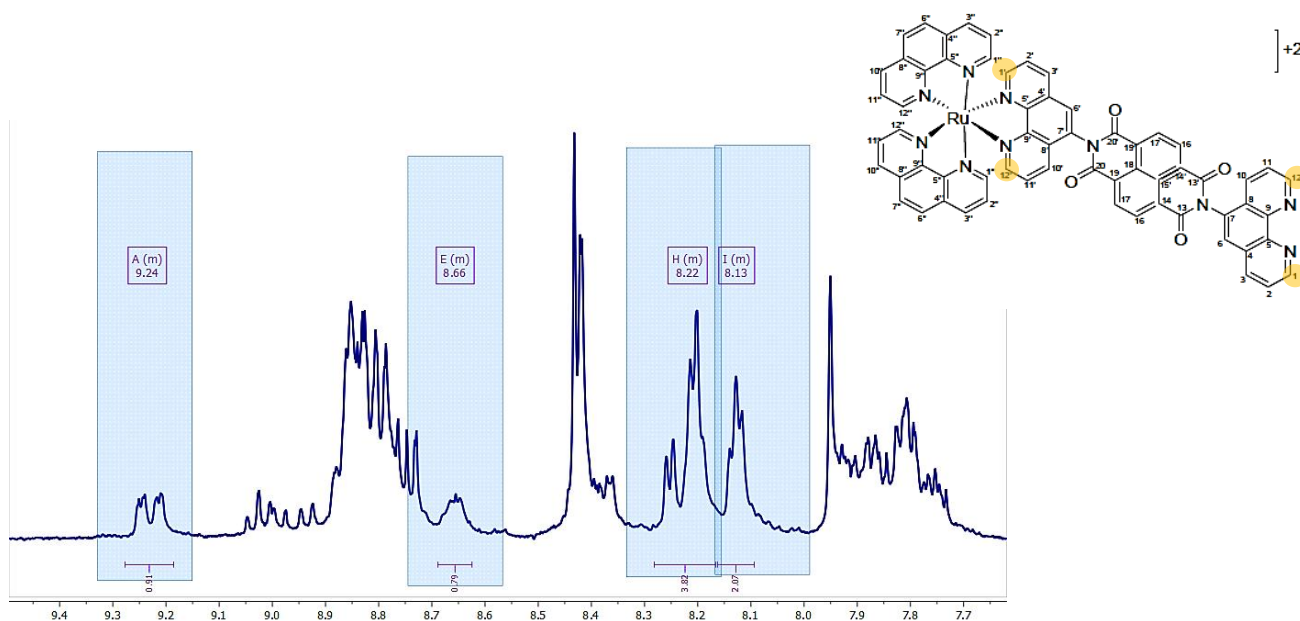


Figura 4.1.1.1 Espectro de RMN do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})](\text{PF}_6)_2$ atribuído por Lorena et al. com destaque para as regiões utilizadas para confirmar a obtenção do complexo após síntese. As regiões em amarelo na estrutura química destacam os prótons H1, H12, H1' e H12'. (Adaptado de LORENA et al., 2025)

A Figura 4.1.1.2 apresenta o espectro de RMN obtido para o complexo aqui sintetizado, de forma que os sinais observados em δ 8.63, 9.23, 8.21 e 8.10 ppm foram atribuídos, respectivamente, a H1, H12, H1' e H12', apresentando boa concordância aos valores relatados na literatura (δ 8.66, 9.24, 8.22 e 8.13 ppm) (PEREIRA et al., 2025). Essas atribuições reforçam a correta coordenação dos ligantes ao centro metálico rutênio.

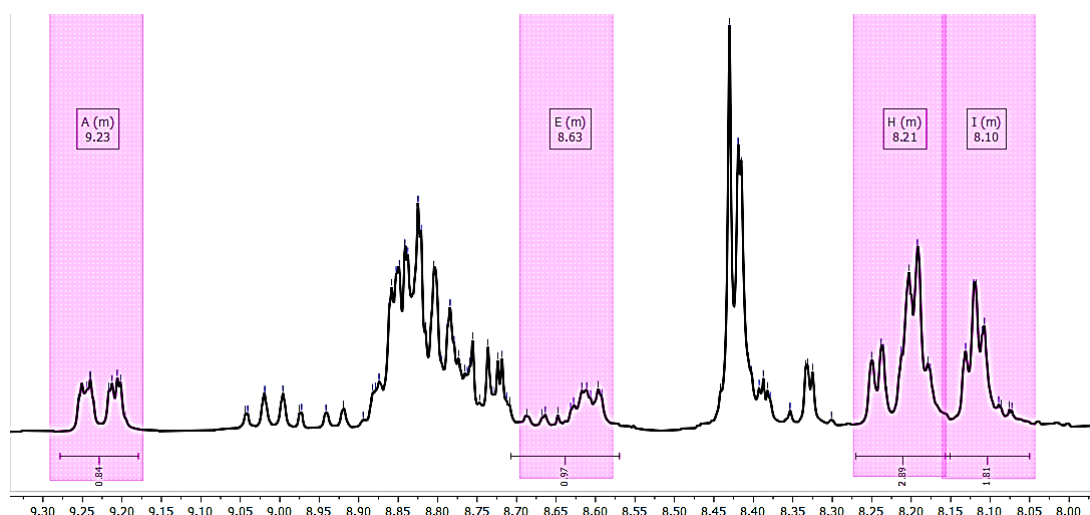


Figura 4.1.1.2 Espectro de RMN do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIip})](\text{PF}_6)_2$ sintetizado para este trabalho, com destaque para os prótons H1, H12, H1' e H12'.

4.1.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis

A Figura 4.1.2.1 apresenta o espectro de absorção eletrônica do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM). O espectro de absorção é caracterizado por uma série de transições sobrepostas na região do UV-Visível (260–700 nm).

Na região do ultravioleta (UV), observa-se uma banda de absorção em 260 nm, atribuída às transições de transferência de carga interna dos ligantes fenantrolina (ILCT $\pi \rightarrow \pi^*$, phen). As bandas de absorção entre 340 e 400 nm são atribuídas às transições de transferência de carga interna do ligante NDI (ILCT $\pi \rightarrow \pi^*$, NDI). Já na região do visível, destaca-se uma banda larga de absorção (400–550 nm), atribuída às transições de transferência de carga metal-ligante (MLCT $d\pi, \text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \pi^*$, phen) (GLAZER et al., 2007; VERMA et al., 2011).

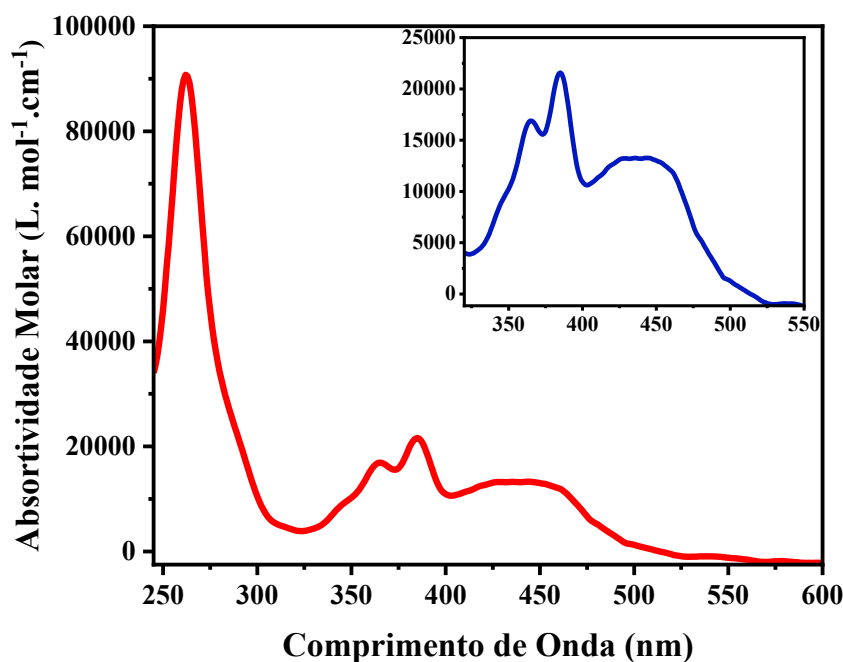


Figura 4.1.2.1 Espectros de absorção eletrônica do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).

O ligante fenantrolina (*phen*) apresenta dois átomos de nitrogênio com pares de elétrons disponíveis para coordenar ao Ru (II). A coordenação do ligante ao íon Ru (II) resulta em modificações eletrônicas importantes que influenciam as propriedades espectroscópicas e fotofísicas do complexo formado. Além disso, uma vez que a coordenação ocorre de forma bidentada, o complexo apresenta estabilidade química devido ao efeito quelato.

O ligante *phen* apresenta um sistema conjugado extenso formado por seus orbitais π e π^* , possibilitando interações π aceptoras com os orbitais $d\pi$ do centro metálico. Ocorrida a coordenação, observa-se a absorção do tipo MLCT descrita anteriormente, na qual os elétrons $d\pi$ do metal são excitados aos orbitais π^* da fenantrolina.

4.1.3 Espectroscopia de Luminescência e Tempo de Vida (τ)

Os espectros de luminescência do complexo RuNDI foram obtidos em tampão PBS (pH 7,4; 10mM) com comprimento de onda de excitação em 450nm. A Figura 4.1.3.1 apresenta o espectro de emissão do complexo que é caracterizado por uma banda larga de emissão com intensidade máxima em 610 nm.

Como descrito anteriormente, após a absorção de um fóton um elétron do orbital $d\pi$ do centro metálico Ru (II) é promovido para o orbital π^* localizado no ligante fenantrolina. Devido

ao grande acoplamento spin- orbita favorecido pelo Ru (II), ocorre o decaimento via cruzamento intersistemas do estado excitado singlete (1MLCT) para o estado excitado tripleto (3MLCT). O decaimento do estado excitado 3MLCT para estado fundamental ocorre através de processos radiativos (emissão de luz) e processos não radiativos, via transferência de energia por calor (colisões moleculares). Desta forma, a emissão do complexo é resultante do decaimento radiativo (fosforescência) do estado 3MLCT para o estado fundamental.

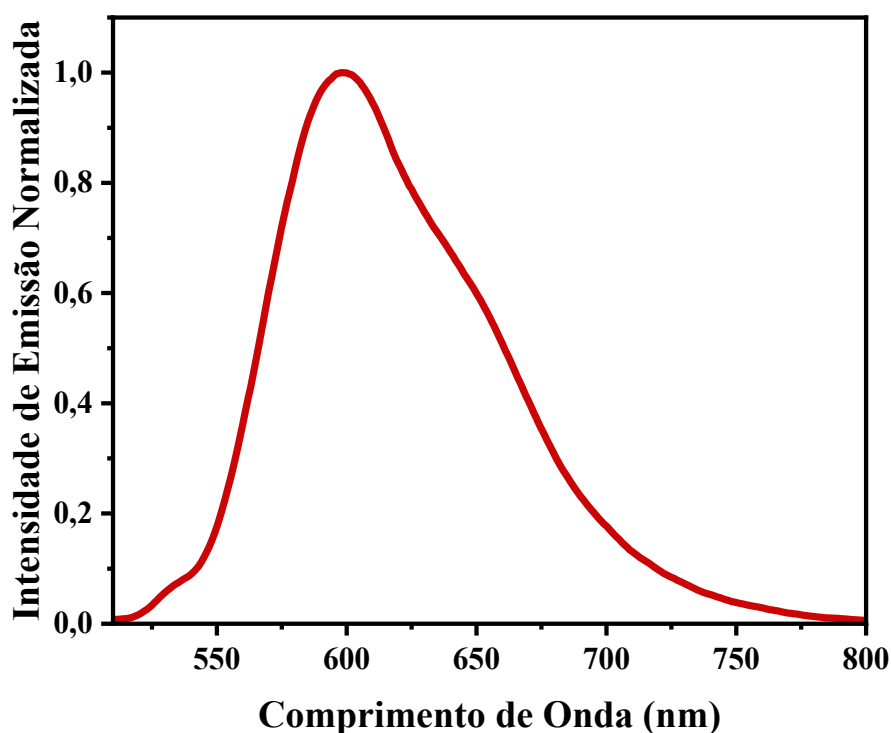


Figura 4.1.3.1 Espectro de emissão do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).

A formação de um estado excitado do tipo tripleto resulta em emissão em comprimentos de onda mais longos, na região do vermelho. Essa é uma característica importante deste complexo, uma vez que isso confere a ele um alto valor de deslocamento de Stokes ($\Delta S = 5.610 \text{ cm}^{-1}$; Figura 4.1.3.2), evitando que ocorra processos de reabsorção de luz.

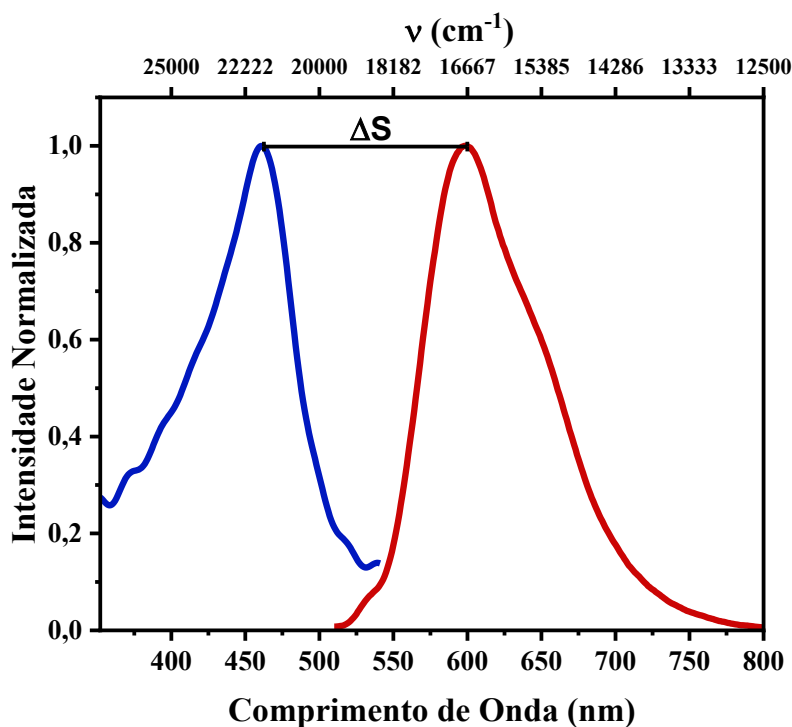


Figura 4.1.3.2 Espectros de excitação (azul) e emissão (vermelho) do complexo RuNDI em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).

O tempo de vida da emissão do complexo RuNDI em PBS (pH 7,4; 10mM) foi analisado usando um ajuste tri exponencial, Tabela 1. O ajuste apresentou um valor de χ^2 reduzido igual a 1,225, indicando boa qualidade de fit e distribuição adequada dos resíduos.

Tabela 1 Tempo de vida de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDI}p)]^{2+}$ em tampão PBS (pH 7,4; 10mM).

τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
2,567 (0,47%)	468,21 (99,08%)	10,357 (0,50%)	1,225

Entre os três tempos de vida encontrados, o principal foi de 468,2 ns, responsável por cerca de 99% da intensidade total da emissão, mostrando que este é o tempo de vida mais relevante do sistema. As outras duas componentes foram bem menores (2,57 ns e 10,36 ns) e contribuíram pouco para a emissão total.

O tempo de vida longo é atribuído ao estado excitado do tipo $^3\text{MLCT}$, já que o retorno ao estado fundamental requer uma inversão de spin. Dessa forma, a emissão de luz ocorre por fosforescência.

Como descrito até o momento, o complexo RuNDI apresenta propriedades espectroscópicas relevantes para os objetivos de aplicação propostos. A absorção na região do visível (400–550 nm) e a emissão na região do vermelho do espectro, em 610 nm, posicionam esse complexo fora da janela de absorção das principais biomoléculas (Figura 4.1.3.3), evitando competição pela absorção de luz e prevenindo que sua emissão seja reabsorvida por essas moléculas.

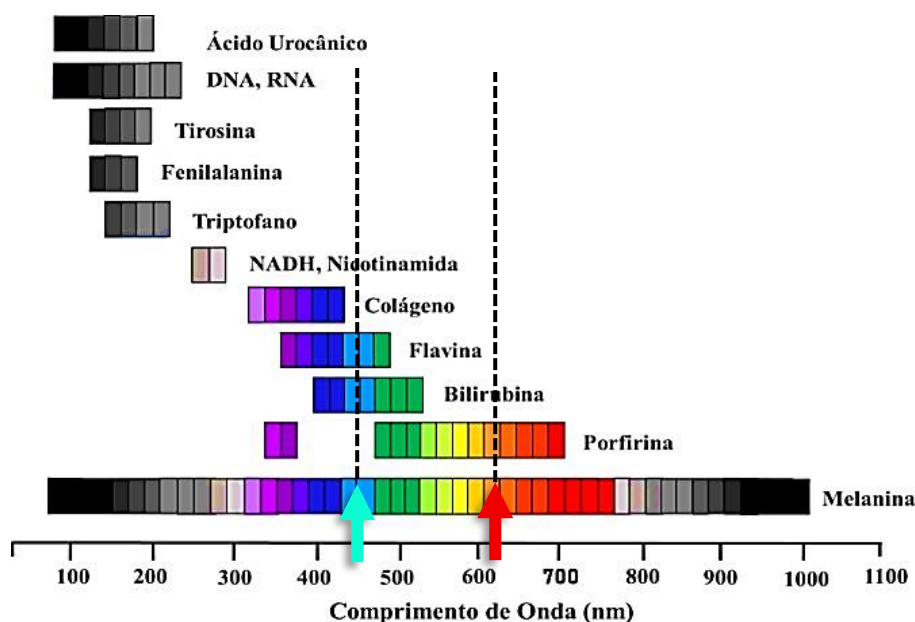


Figura 4.1.3.3 Janela de absorção das biomoléculas.

Além disso, a existência de um estado excitado tripleto garante um alto deslocamento de Stokes, o que, além de minimizar reabsorção interna, confere ao complexo um tempo de vida de emissão prolongado.

Conjuntamente, essas características tornam o RuNDI um candidato promissor para aplicação como sonda luminescente no estudo da agregação do peptídeo β -amiloide.

4.2 Estudo de Concentração do Complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NDI})](\text{PF}_6)_2$

A determinação do limite de concentração é um dos parâmetros importantes para que um composto possa ser aplicado em estudos envolvendo emissão, tendo em vista que isso evita processos de autosupressão. Como forma de determinar a faixa de concentração adequada do complexo para os ensaios de luminescência foram obtidos espectros de emissão em diferentes concentrações (0-100 μM) em tampão PBS (pH = 7,4;10mM), Figura 4.2.1 A. Este estudo é importante para minimizar efeitos de supressão de emissão do complexo por reabsorção da luz e/ou supressão por decaimento não radiativo (colisões moleculares) (VALEUR;

BERBERAN-SANTOS, 2012; LAKOWICZ, 2006).

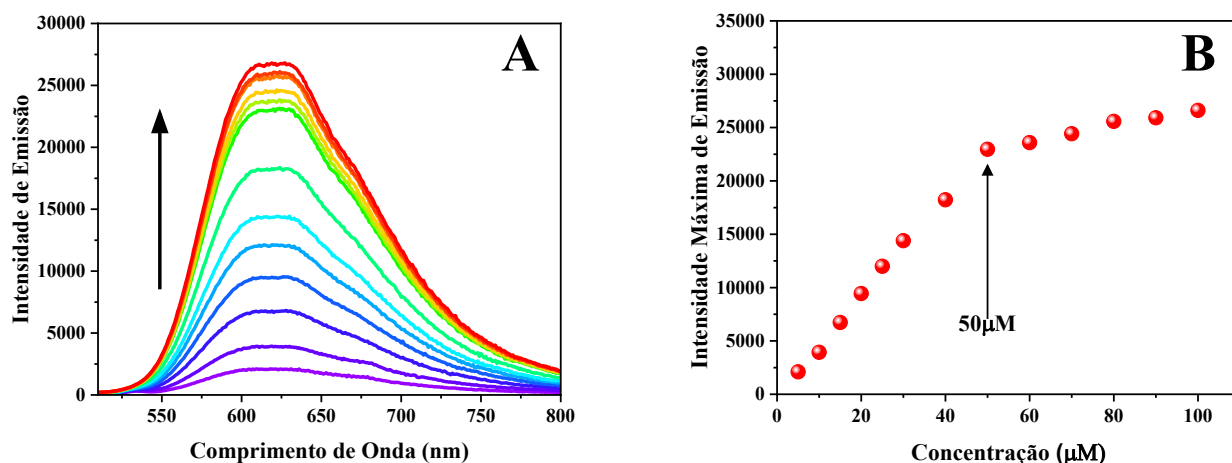


Figura 4.2.1 (A) Espectros de emissão do complexo RuNDI em várias concentrações (0-100 μ M) em tampão PBS (pH 7,4; 10mM). (B) Gráfico de Máximo de Intensidade de Emissão *versus* concentração.

A Figura 4.2.1 B exibe gráfico de intensidade de emissão a 610 nm ($\lambda_{exc}=450$ nm) em função da concentração de complexo. Observa-se que acima de 50 μ M a emissão do complexo aproxima-se da saturação, devido a perda da emissão por colisão molecular. Desse modo, para minimizar os efeitos de supressão de emissão pela concentração do complexo todos os estudos de luminescência com o complexo foram realizados com concentrações abaixo de 50 μ M.

4.3 Cinética de Agregação do peptídeo β -Amiloide

4.3.1 Estudos via Espectroscopia de Luminescência

Diversos peptídeos e proteínas apresentam uma banda de absorção eletrônica na região de 240 a 300 nm, atribuída à presença de resíduos de aminoácidos aromáticos, como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), em suas estruturas (Figura 4.3.1.1). (ANTOSIEWICZ; SHUGAR, 2016) Entre esses, a fenilalanina apresenta a menor absorvidade molar (195 $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$), quando comparada à tirosina (1.491 $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$) e ao triptofano (5.579 $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$) (MICHAELIAN et al., 2015; TEALE, 1960; BEKARD; DUNSTAN, 2009).

Dessa forma, o espectro de absorção de proteínas nessa faixa espectral é dominado pelas contribuições de Trp e Tyr (BEKARD; DUNSTAN, 2009). Com base nesse conhecimento, os estudos iniciais de agregação, realizados na ausência do complexo, exploraram as propriedades espectroscópicas decorrentes da presença desses aminoácidos.

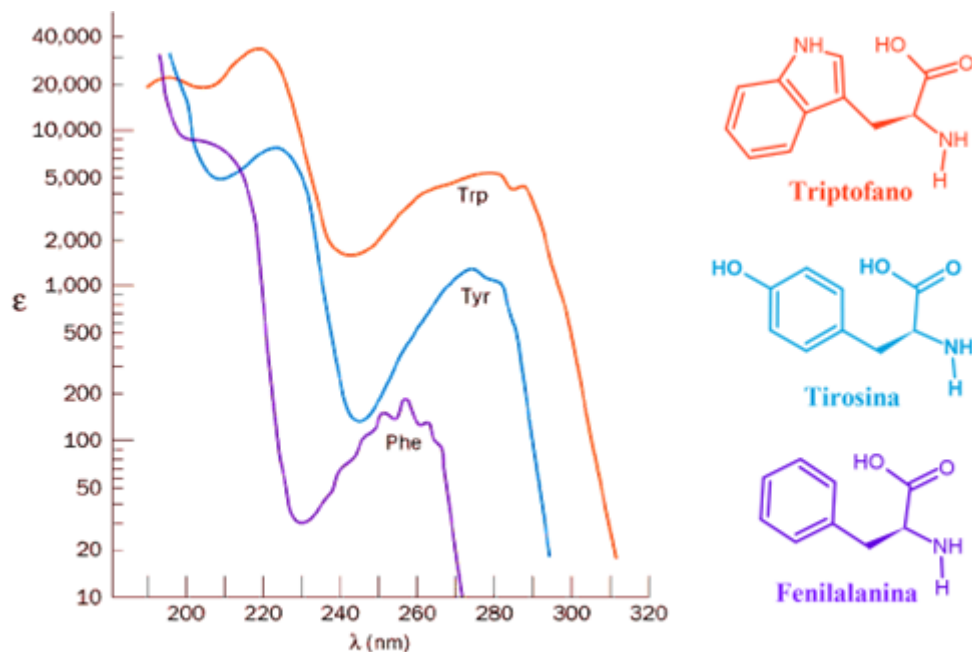


Figura 4.3.1.1 Espectros de absorção eletrônica dos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina. Adaptado de SERIANNI (s.d.).

No caso do peptídeo β -amiloide, a tirosina (Tyr10; Figura 4.3.1.2) é o principal resíduo responsável pelas propriedades espectroscópicas observadas, apresentando emissão máxima em 303 nm quando excitada a 278 nm (Figura 4.3.1.3).

Com isso, os estudos de luminescência envolvendo o peptídeo tiveram como objetivo avaliar possíveis alterações nos espectros de emissão ao longo do processo de agregação, uma vez que tais mudanças podem refletir modificações no microambiente ao redor da tirosina.

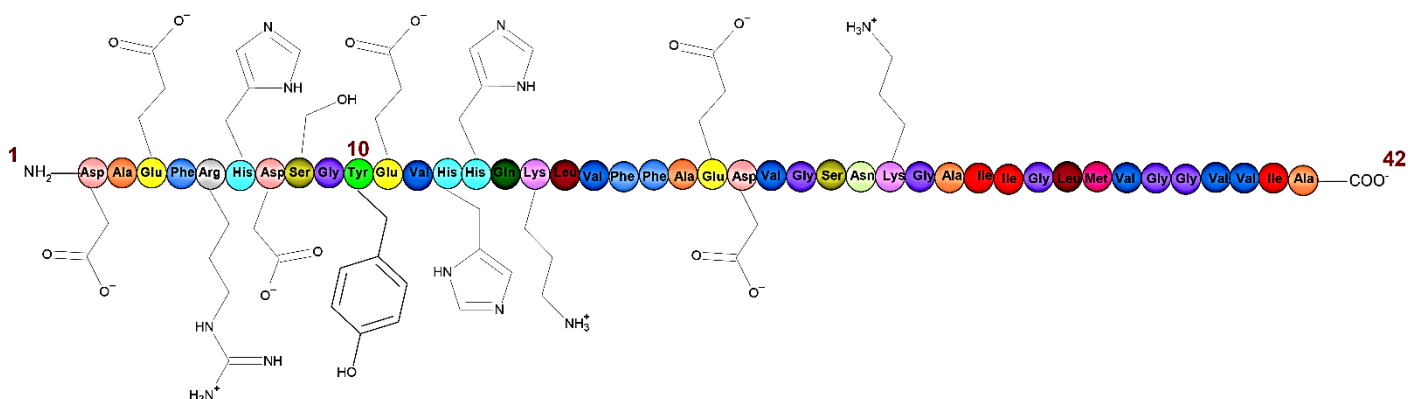


Figura 4.3.1.2 Ilustração da sequência de aminoácidos do peptídeo β -amiloide 1-42.

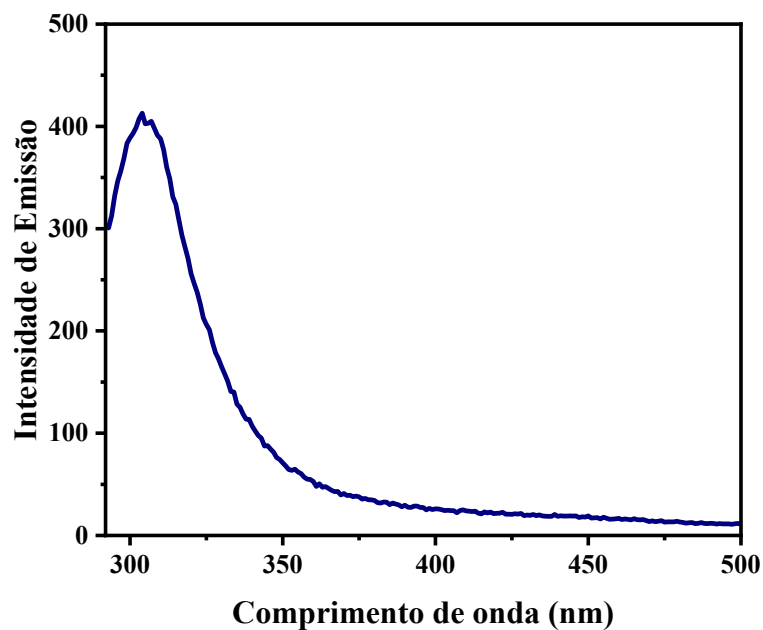


Figura 4.3.1.3 Espectro de emissão da tirosina em tampão PBS (pH7,4;10mM)

A Figura 4.3.1.4 apresenta os espectros de emissão obtidos ao longo do estudo de cinética de agregação do peptídeo. Observa-se uma supressão gradual da emissão, acompanhada de um alargamento da banda espectral, o que indica que o microambiente ao redor da tirosina sofre alterações significativas durante o processo de agregação.

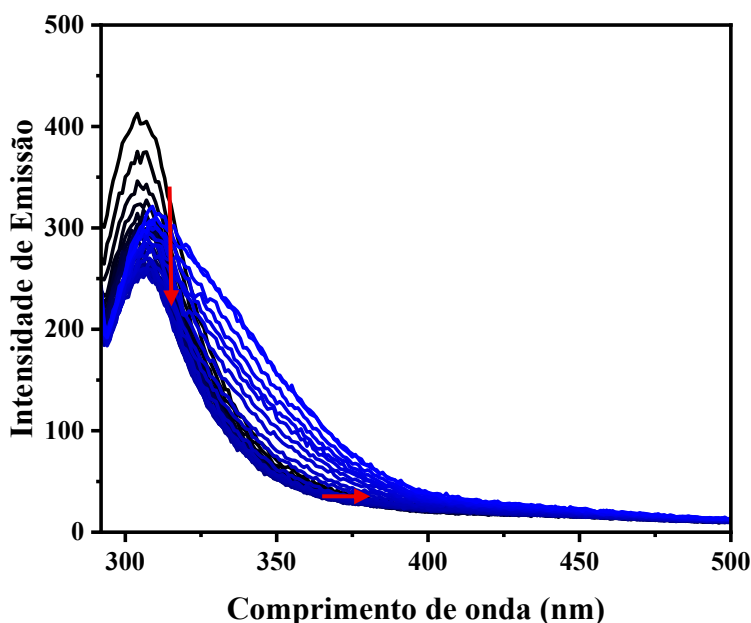


Figura 4.3.1.4 Espectros de emissão em diferentes tempos de incubação do peptídeo β A na concentração de $20\mu\text{M}$ em tampão PBS (pH 7,4;10mM) a 37°C .

Quando o β A se encontra predominantemente na forma monomérica, o resíduo Tyr10 permanece exposto ao solvente. No entanto, à medida que o processo de agregação avança, levando à formação de estruturas maiores como oligômeros, protofibrilas e fibrilas, ocorre o reposicionamento da Tyr10 para o interior dos agregados. Esse movimento resulta na supressão da emissão em 303 nm e no alargamento da banda espectral, efeitos que podem ser atribuídos às novas interações entre a Tyr10 e os resíduos vizinhos no interior das estruturas agregadas (AMARO et al., 2011; ROLINSKI et al., 2015; MANCINI et al., 2018; AALGHAMDI, 2022).

4.3.2 Estudos via Dicroísmo Circular (CD)

Além da luminescência, o dicroísmo circular (CD) também pode ser empregado na análise da agregação de peptídeos e proteínas, por se tratar de uma técnica espectroscópica sensível à estrutura secundária dessas biomoléculas. O CD baseia-se na medição da diferença de absorvância entre as radiações de luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, quando interagem com moléculas quirais. A Figura 4.3.2.1 apresenta os espectros típicos de dicroísmo circular correspondentes às principais estruturas secundárias — *random coil*, α -hélice e folhas β

—, destacando suas assinaturas espectrais características.

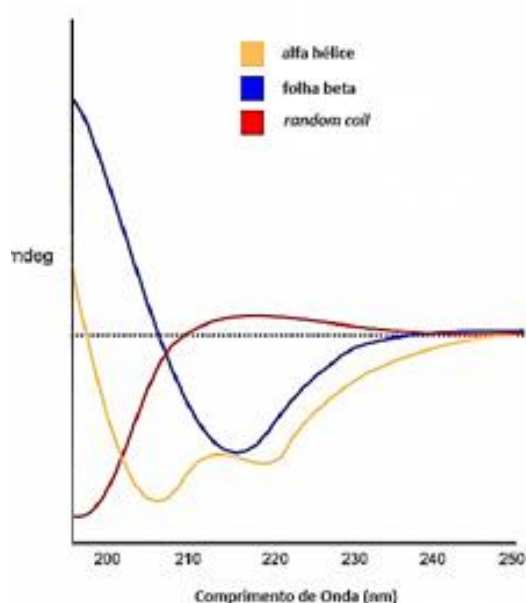


Figura 4.3.2.1 Ilustração de espectros de dicroísmo circular de estruturas α -hélice, folha- β e *random coil*.

No caso do peptídeo β -amiloide, sua estrutura monomérica apresenta conformação do tipo *random coil*, caracterizada por um mínimo de absorbância entre 190 e 200 nm. À medida que ocorre a agregação e se formam fibrilas amiloides, a estrutura secundária evolui para folhas β , cujo espectro de CD apresenta um mínimo próximo a 218 nm (CHEN et al., 2006; GURSKY; ALESHKOV, 2000) Dessa forma, é possível monitorar as mudanças conformacionais durante o processo de agregação por meio dessa técnica.

A Figura 4.3.2.2 apresenta os espectros de CD obtidos em diferentes tempos de incubação, mostrando a formação de folhas β característica de agregados fibrilares. Observa-se que, entre 0 e 10 minutos, o mínimo principal permanece em torno de 190 nm, sugerindo predominância da estrutura *random coil*. Após 30 minutos, há um deslocamento espectral, com a atenuação do sinal em 190 nm e a intensificação do mínimo em 218 nm, indicando o aumento da população de estruturas ricas em folhas β , típicas de espécies oligoméricas e fibrilares.

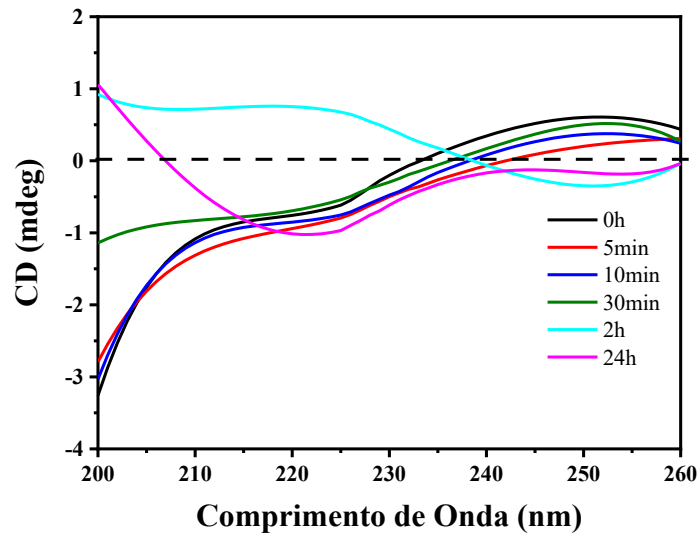


Figura 4.3.2.2 Espectros de dicroísmo circular em diferentes tempos de incubação do peptídeo (20 μ M) em PBS (10mM; pH7,4) a 37°C.

4.3.3 Estudos via Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os estudos de microscopia de força atômica (AFM) permitiram a análise morfológica das espécies geradas ao final da agregação, corroborando os dados obtidos por outras técnicas na identificação de agregados amiloides. Nas imagens apresentadas na Figura 4.3.3.1, as micrografias A ($2 \times 2 \mu\text{m}$), B ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$) e C ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ em modo 3D) correspondem ao tempo zero, ou seja, ao início do processo de agregação. Nessas etapas iniciais, observa-se predominantemente a presença de espécies pequenas, com alturas máximas em torno de **2–7 nm**, típicas de oligômeros iniciais (STINE et al., 1996).

Após 24 horas de incubação, as imagens D, E e F mostram a formação de agregados muito maiores, incluindo fibrilas bem definidas, cujas alturas atingem até **14 nm**, aproximadamente o dobro dos valores iniciais — consistente com a progressão natural da agregação até a formação de fibrilas maduras (STINE et al., 1996; MAURSTAD et al., 2009).

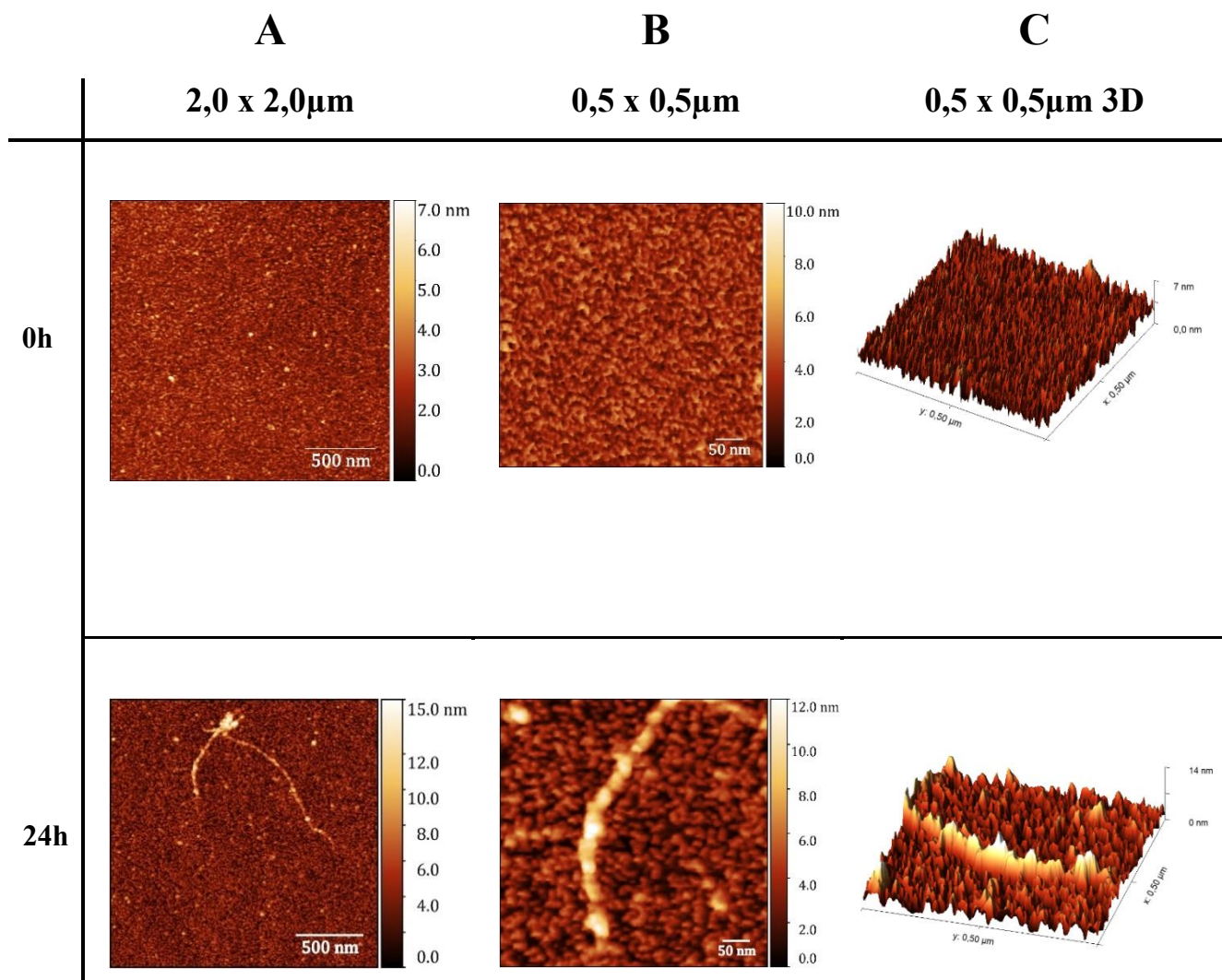


Figura 4.3.3.1 Micrografias A ($2 \times 2 \mu\text{m}$), B ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$) e C ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ em modo 3D) do peptídeo nos tempos 0h sem incubação e após 24h de incubação a 37°C .

4.3.4 Cinética de Agregação do peptídeo β -Amiloide na presença de Tioflavina T

Um dos padrões utilizados para estudos de agregação através da luminescência é a Tioflavina T (ThT). Em seu estado excitado a ThT exibe movimento de torção não radiativo e emissão de fluorescência limitada uma vez que, em solução, uma barreira de baixa energia permite que os anéis de dimetilnilina e benzotiazol da ThT girem livremente em torno de sua ligação carbono-carbono compartilhada (figura 1.4.1). Quando o movimento de torção é impedido, ocorrem vias de decaimento radiativo, resultando em forte emissão de fluorescência com máximo de intensidade em 482nm após excitação em 440nm (BIANCALANA et al., 2010; VOROPAI et al, 2003)

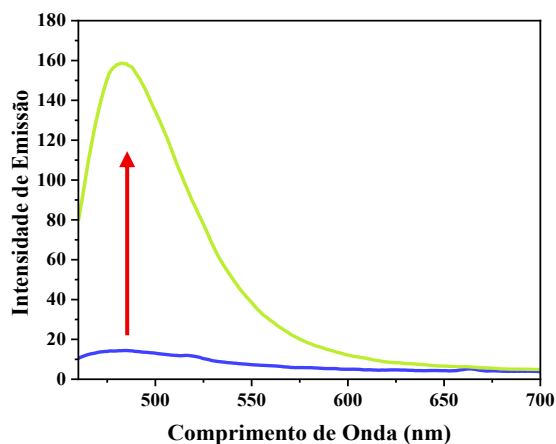


Figura 4.3.4.1 Espectro de emissão da tioflavina T ($\lambda_{exc}= 440nm$) na ausência (azul) e presença de agregados amiloides (verde).

No caso deste trabalho, essa rotação restrita ocorre quando a ThT se encontra em um sítio de ligação apresentado pelas fibrilas amiloides que impede a livre rotação do corante ligado (Figura 4.3.4.1), levando assim a um aumento da fluorescência da ThT e tornando possível a sua utilização como um sensor no estudo da cinética de agregação do βA .

A Figura 4.3.4.2 A mostra os espectros de emissão obtidos durante o processo de agregação do peptídeo na presença do marcador Tioflavina T. Observa-se um aumento gradual na intensidade de emissão da ThT ao longo das 24 horas de incubação, o que indica a formação progressiva de espécies fibrilares nesse intervalo de tempo. O gráfico de Máxima Intensidade de Emissão *versus* Tempo apresentado na figura 4.3.4.2 B mostra o perfil do aumento da intensidade de emissão da ThT ao longo do tempo de incubação.

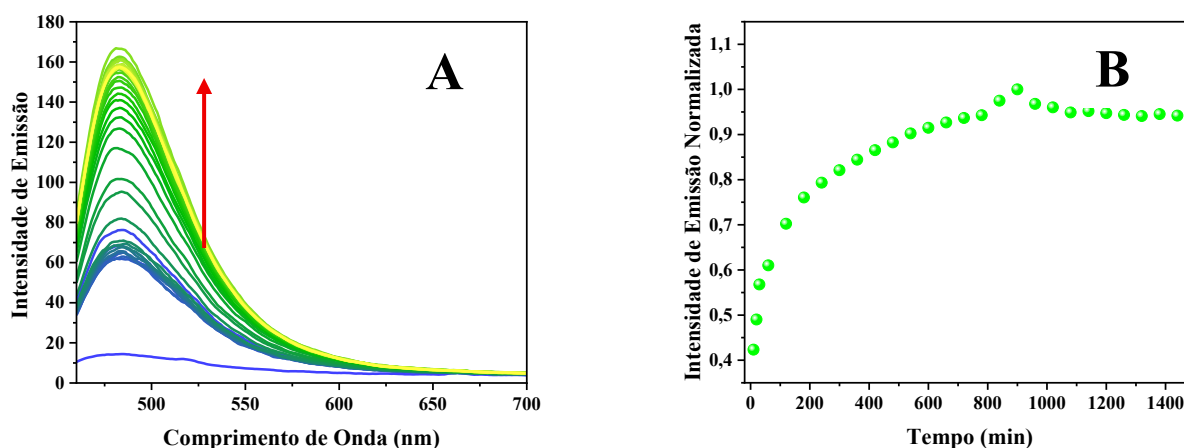


Figura 4.3.4.2 (A) Espectros de emissão do corante ThT ($20\mu\text{M}$) em diferentes tempos de agregação do peptídeo βA ($20\mu\text{M}$) em tampão PBS (pH 7,4; 10mM). **(B)** Gráfico de intensidade máxima de emissão da ThT *versus* tempo de agregação em PBS (10mM, pH 7,4) a 37°C .

Os estudos até aqui realizados permitiram a validação do protocolo de agregação do peptídeo β - amiloide 1-42. O conjunto de dados obtidos através das técnicas de fluorescência, dicroísmo circular e microscopia de força atômica revela que o peptídeo de fato agrega nas condições aqui propostas e através das técnicas foi possível identificar as mudanças estruturais ocorridas durante este processo de agregação. Desta forma, uma vez sob as condições de agregação, a saber, solução tampão PBS (pH 7,4, 10mM) e temperatura de 37°C , o βA sofre mudanças estruturais que o levam a um estado de desdobramento, alterando sua conformação de *random coil* para folha β , essa modificação conformacional pôde ser verificada diretamente por CD, mas também através dos estudos de luminescência, uma vez que a fluorescência produzida pelo resíduo Tyr10 sofreu alterações significativas como supressão e alargamento de banda. Somado a isto, os estudos com o padrão ThT confirmaram a formação das estruturas fibrilares através do aumento de emissão observado e estas estruturas foram também observadas por imagens de microscopia de força atômica, confirmando a viabilidade do protocolo e permitindo uma compreensão aprofundada do processo de agregação.

4.4 Estudos de interação do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NDI})](\text{PF}_6)_2$ com o peptídeo β -Amiloide

4.4.1 [Ru(phen)₂(NDI)](PF₆)₂ como sonda luminescente

4.4.1.1 Estudos via Espectroscopia de Luminescência

Para investigar o potencial do complexo RuNDI em atuar como uma sonda luminescente realizou-se ensaios de fluorescência do complexo na presença do peptídeo beta amiloide.

Inicialmente a interação entre complexo e peptídeo foi analisada apenas nos tempos inicial, antes da agregação, e final, após 24h de incubação com o complexo *ex situ*, como apresentado na Figura 4.4.1.1. Observa-se que, já nos tempos iniciais — quando se espera uma maior concentração de espécies monoméricas em solução, conforme demonstrado nos estudos de agregação na ausência do complexo — há um aumento na intensidade de emissão do RuNDI, sugerindo que a interação entre o complexo e o peptídeo ocorre logo nas fases iniciais. Após 24 horas de incubação, a intensidade de emissão aumenta ainda mais, indicando também a interação com as espécies fibrilares, sendo esta interação mais eficaz, o que se reflete em um incremento mais acentuado da emissão.

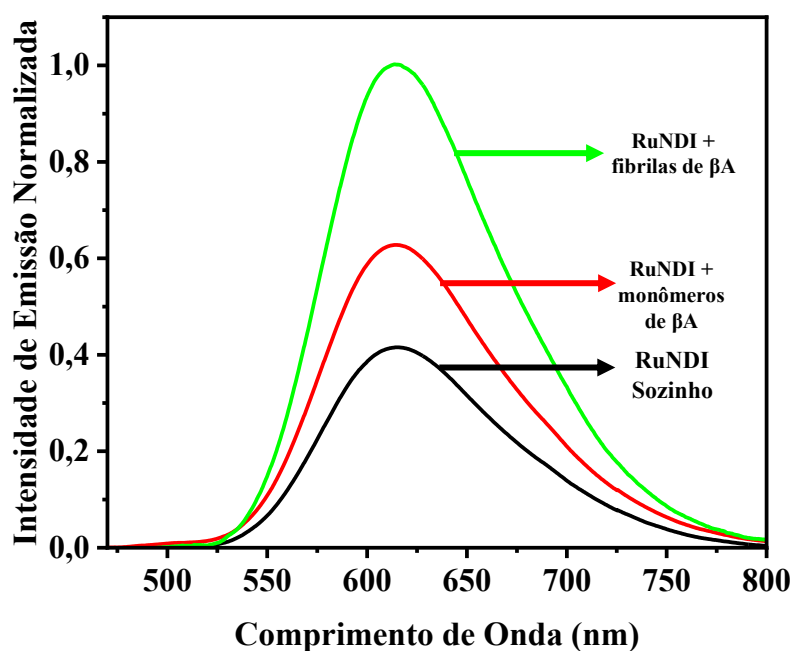


Figura 4.4.1.1.1 Espectros de emissão do complexo RuNDI (20μM) na ausência do βA (preto), na presença do βA (20μM) no início da agregação (vermelho) e ao término da agregação (verde), em tampão PBS (pH7,4;10mM).

Diante destes resultados foram conduzidos estudos de cinética de agregação do peptídeo na presença do complexo buscando investigar a capacidade do mesmo em monitorar todo processo de agregação ao longo das 24h.

Para isso, os experimentos com o complexo foram conduzidos *in situ*, com a adição do mesmo no início do estudo e incubação da solução a 37 °C. Os espectros de emissão foram adquiridos nos seguintes intervalos de tempo: minuto a minuto durante os primeiros 10 minutos (Figura 4.4.1.1.2 A); em seguida, aos 20 e 30 minutos; e, posteriormente, cada hora, até completar 24 horas de incubação. Os resultados estão apresentados na Figura 4.4.1.1.2 B.

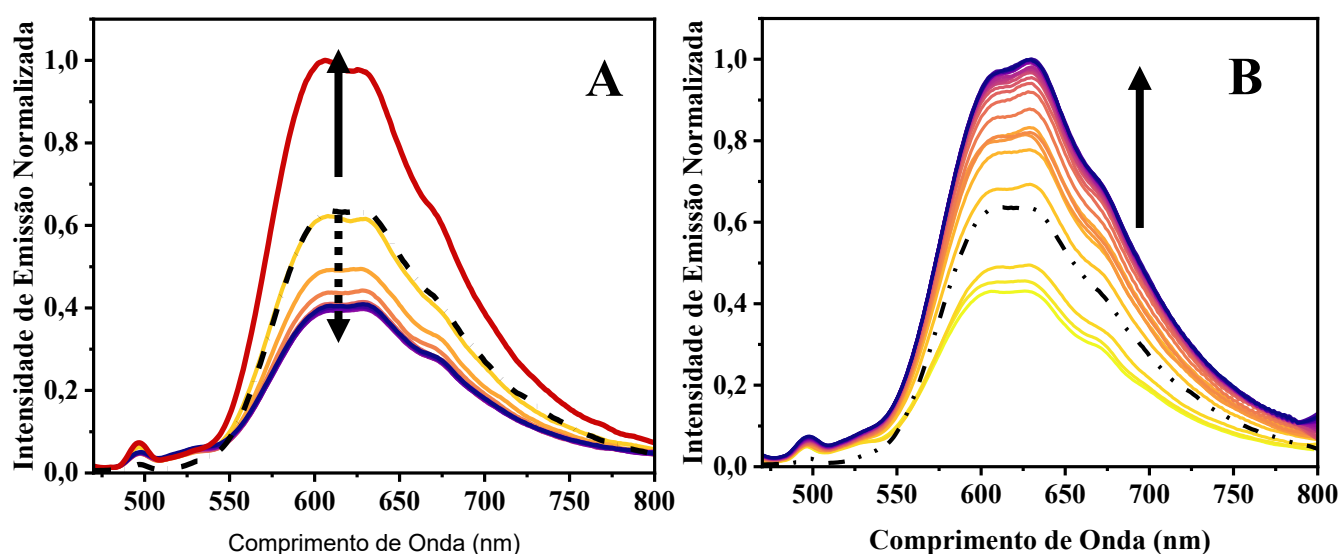


Figura 4.4.1.1.2 Espectros de emissão do complexo RuNDI (20 μ M) nos (A) primeiros 10 minutos de incubação e (B) de 20min a 24h de incubação com o β A (20 μ M) em PBS (10mM, pH 7,4) a 37°C. A curva pontilhada representa o complexo RuNDI na ausência do peptídeo.

Em ambos os espectros, a curva pontilhada representa o complexo RuNDI na ausência do peptídeo. No primeiro minuto de incubação, observa-se um aumento expressivo na intensidade de emissão (curva vermelha), seguido, já no segundo minuto, por uma queda acentuada, que continua de forma gradual até cerca de 4 minutos de agregação (curvas em laranja). A partir desse ponto, a emissão se mantém relativamente estável, conforme ilustrado pelas curvas em roxo.

Esse comportamento é observado apenas quando o experimento é conduzido *in situ* e é atribuído à variação de temperatura no início da incubação. A solução contendo o complexo é inicialmente mantida em gelo, a uma temperatura próxima de 0 °C. Nessa condição, a baixa temperatura reduz as perdas de energia por colisões, o que contribui para o aumento inicial da emissão. Ao ser transferida para o equipamento estabilizado a 37 °C, a solução passa por um aquecimento gradual. Com o aumento da temperatura, intensificam-se as colisões moleculares,

o que promove maiores perdas de energia não-radiativas e, conseqüentemente, a redução na intensidade de emissão observada nesse intervalo. Uma vez atingido o equilíbrio térmico a intensidade de emissão se mantém constante.

A partir dos 20 minutos de incubação, verifica-se um novo aumento gradual da emissão que se mantém até o final do processo de agregação (Figura 4.4.1.2 B). Este aumento é atribuído a interação do complexo com as espécies geradas durante o processo de agregação. O gráfico de intensidade de emissão *versus* tempo da Figura 4.4.1.1.3 apresenta com mais clareza o aumento de emissão ao longo do tempo.

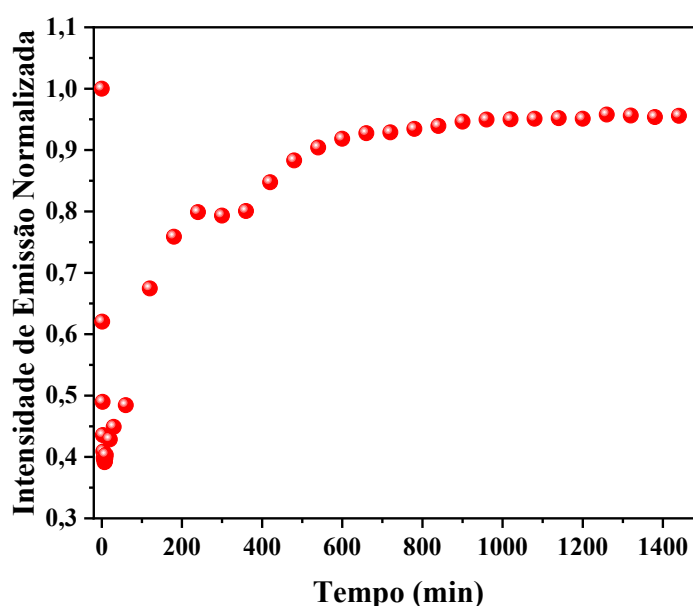


Figura 4.4.1.1.3 Gráfico de máximo de intensidade de emissão do RuNDI *versus* o tempo de incubação da cinética de agregação do peptídeo na presença complexo RuNDI na proporção 1:1 (β A:RuNDI)..

Um dos questionamentos que motivaram a proposta de aplicação deste complexo na detecção de agregados amiloides diz respeito à presença dos dois sítios de rotação do ligante NDI, representados na Figura 4.4.1.1.4. A hipótese considerada foi a de que essas rotações poderiam ser restringidas ao interagir com espécies agregadas, de modo semelhante ao comportamento observado para a ThT, resultando em um aumento dos decaimentos radiativos. Entretanto, embora o comportamento seja semelhante, o complexo se demonstra superior a ThT, uma vez que a interação com o peptídeo parece acontecer desde os estágios iniciais da agregação.

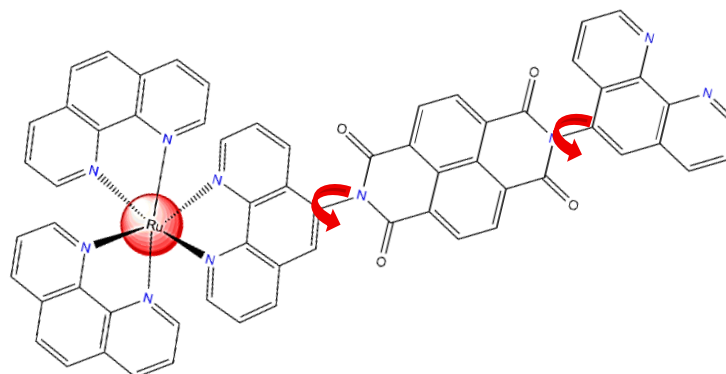


Figura 4.4.1.1.4 Estrutura de rotação do complexo RuNDI.

4.4.1.2 Estudos via Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma ferramenta fundamental para a análise de moléculas fluorescentes, pois permite a detecção e visualização de estruturas com alta especificidade. Nessa técnica, a amostra é iluminada com um feixe de luz em um comprimento de onda específico, que excita os fluoróforos presentes. A luz emitida pelos fluoróforos, em um comprimento de onda maior, é então captada após passar por filtros apropriados, possibilitando a visualização seletiva das estruturas luminescentes (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005; LAKOWICZ, 2006).

Diante disso, foram obtidas imagens de microscopia de fluorescência ao fim da agregação para confirmar a capacidade do complexo em marcar os agregados fibrilares formados (Figura 4.4.1.2.1). Como as espécies formadas durante os tempos iniciais e intermediários não possuem tamanho suficiente para serem analisadas por essa técnica, apenas o tempo final de 24h foi investigado. A imagem controle com o complexo foi realizada para garantir de que a fluorescência observada na presença das fibrilas era resultante da interação com o RuNDI. Como observado, o complexo foi capaz de identificar os agregados amiloides gerados na agregação do β A, evidenciando mais uma vez o seu potencial em atuar como uma sonda luminescente.

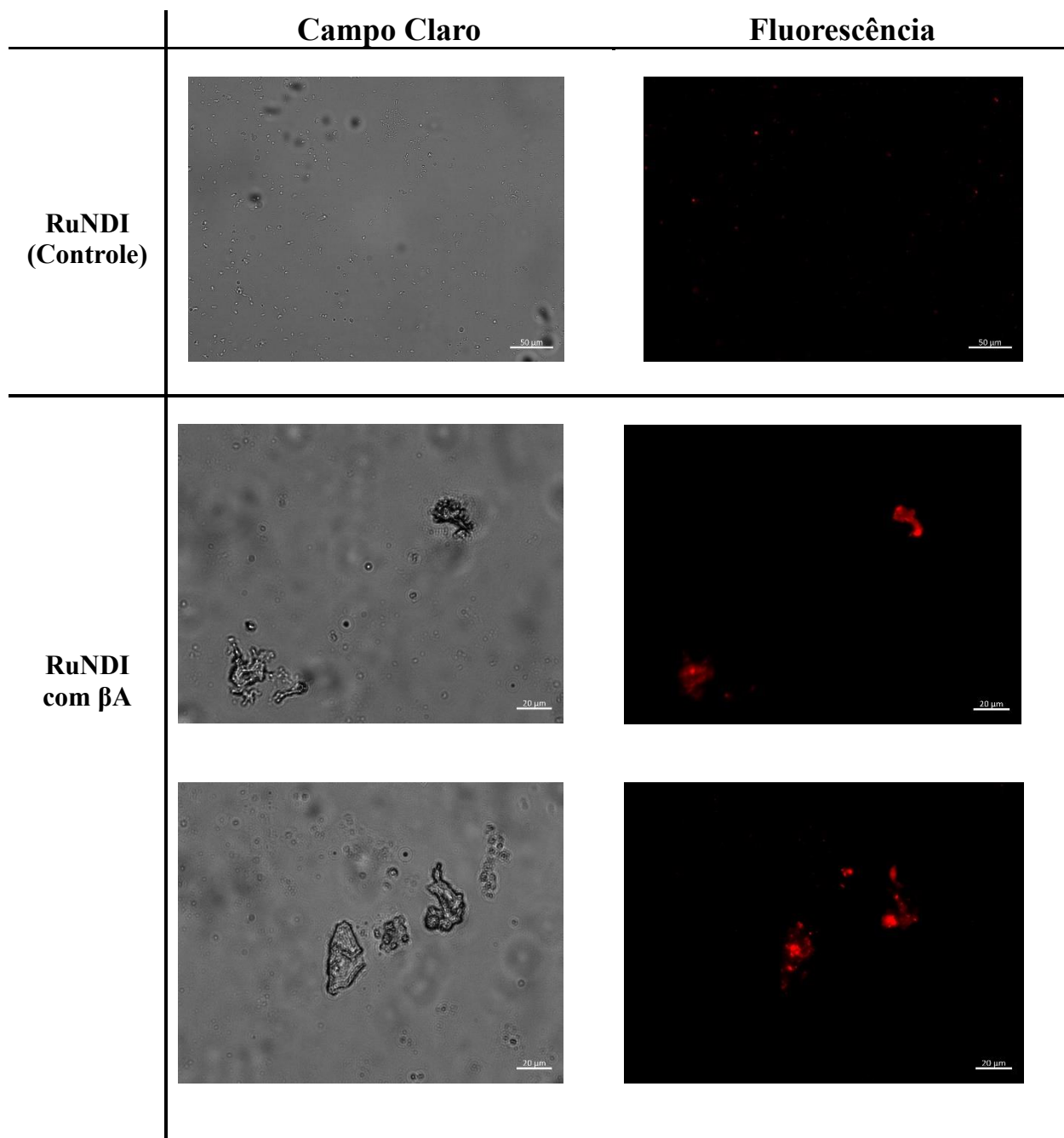


Figura 4.4.1.2.1 Imagens de microscopia de fluorescência do complexo RuNDI na ausência e presença das fibrilas amiloide do β A produzidas após 24h de agregação do peptídeo na temperatura de 37°C.

4.4.2 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NDI})](\text{PF}_6)_2$ como modulador da agregação do β A

Buscando verificar o potencial do complexo em atuar também como um modulador do processo de agregação do peptídeo β A, inicialmente realizou-se estudos de luminescência com o complexo na presença do peptídeo. Para que o efeito do complexo sobre a agregação possa ser verificado é necessário promover a interação entre complexo e peptídeo no início do experimento e acompanhar as possíveis alterações que a presença do composto pode inferir sobre o curso da agregação. Dessa forma, os experimentos devem ser realizados com o

complexo *in situ*. Uma vez que na proporção 1:1 (β A:RuNDI) o complexo demonstrou ser efetivo apenas como sonda luminescente, como visto na seção anterior, foi realizado um ajuste das proporções verificando se o efeito seria positivo frente ao objetivo desejado.

Entretanto, como apresentado nos estudos de concentração, o complexo apresenta certa limitação quanto a concentrações permitida para os estudos de espectroscopia de luminescência, desta forma foi necessário o uso de outras técnicas para uma análise satisfatória.

O estudo de luminescência foi realizado mantendo a proporção entre β A e RuNDI em 1:2, 20 μ M de β A e 40 μ M de RuNDI, a Figura 4.4.2.1 A, B e C apresenta os resultados.

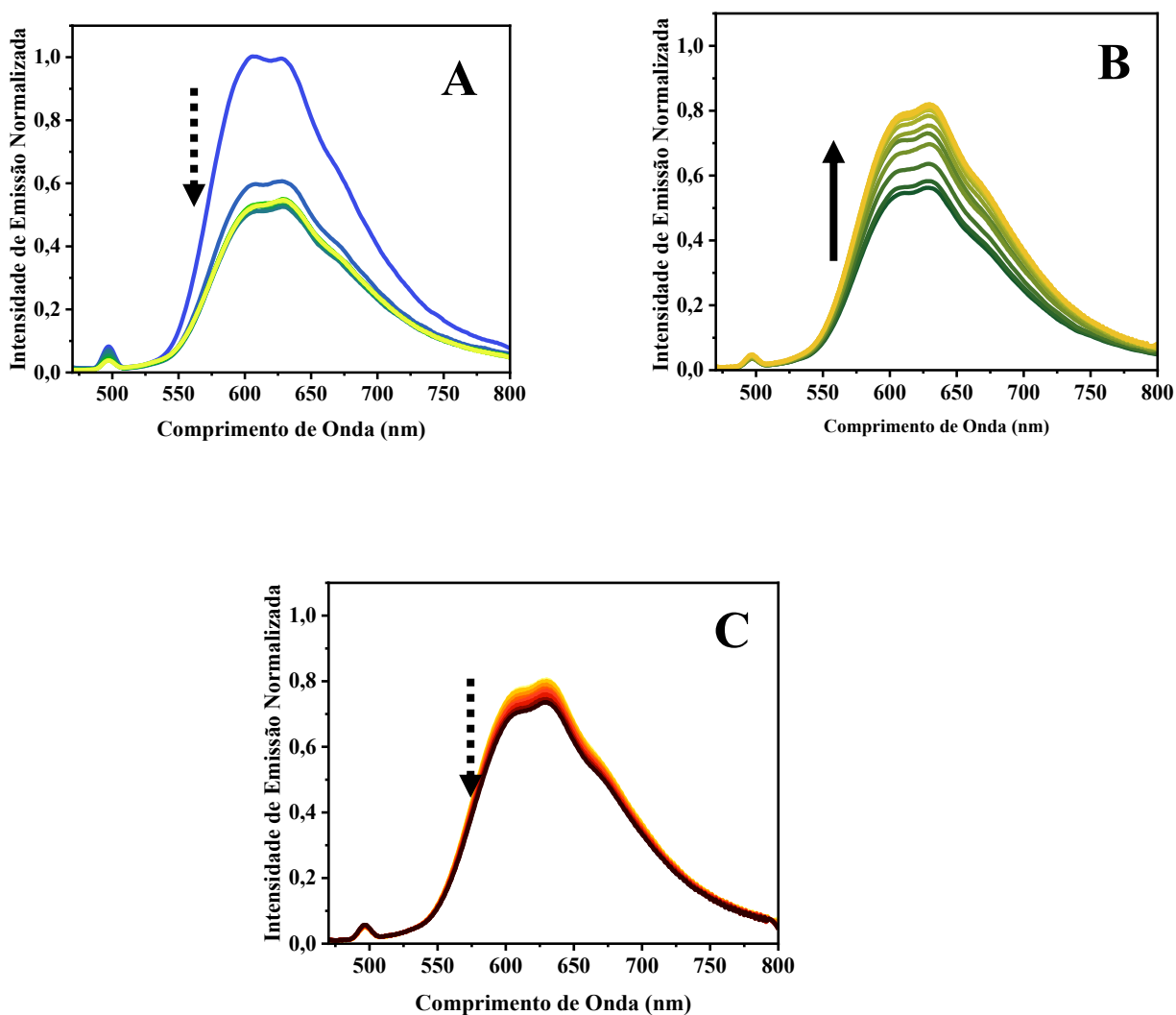


Figura 4.4.2.1 Espectros de emissão do complexo RuNDI (40 μ M) nos (A) primeiros 10 minutos de incubação, (B) de 20min a 11h de incubação e (C) de 12 a 24h de incubação com o β A (20 μ M) em PBS (10mM, pH 7,4) a 37°C.

A Figura 4.4.2.1 A apresenta os 10 minutos iniciais de agregação, nos quais nota-se uma queda inicial brusca que segue gradual até 4 minutos, após isso há uma estabilização até os 10

minutos. Este comportamento é semelhante ao discutido na seção anterior, e é atribuído ao tempo de estabilização térmica da solução. A partir dos 20 minutos de incubação, Figura 4.4.2.1 B, nota-se o aumento gradual da emissão, que segue até as 11h. Após esse tempo a emissão começa a sofrer uma leve queda que continua até as 24h, Figura 4.4.2.1 C. O gráfico de intensidade de emissão *versus* tempo da Figura 4.4.2.2 apresenta com mais clareza o resultados observados.

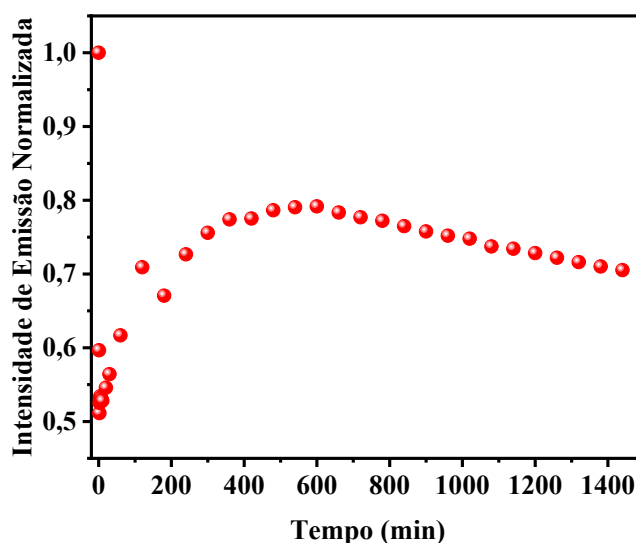


Figura 4.4.2.2 Gráfico de máxima intensidade de emissão do RuNDI *versus* o tempo de incubação da cinética de agregação do peptídeo na presença do complexo RuNDI na proporção 1:2 (β A:RuNDI).

Estes resultados iniciais indicam que em maiores proporções o efeito do complexo pode mudar frente a agregação do peptídeo, uma vez que se ele se mantivesse apenas como uma sonda luminescente, ainda deveria ser observado um aumento constante da emissão até o fim da agregação, como foi observado nos estudos anteriores.

Desta forma prosseguiu-se para os estudos de microscopia de força atômica (AFM), no qual pôde-se investigar o uso de proporções maiores entre complexo e proteína, 1:3, Figura 4.4.2.3, e 1:5, Figura 4.4.2.4. Foram analisados os tempos inicial (0h) e final da agregação (24h) e os resultados foram comparados com os experimentos realizados na ausência do complexo (Figura 4.3.3.1).

Cabe ressaltar que as estruturas maiores e com formato mais geométrico observado no tempo 0h na escala $2 \times 2 \mu\text{m}$ da Figura 4.4.2.3 são cristais de sal que não puderam ser retirados com a lavagem previamente realizada. Também no tempo 0h na escala $2 \times 2 \mu\text{m}$ da Figura 4.4.2.4 a região mais escura é referente a falhas do suporte de mica onde a amostra não aderiu.

As diferenças mais significativas foram observadas após as 24h de incubação, onde não

foram encontradas estruturas fibrilares como as observadas nas amostras do peptídeo sozinho. Na proporção de 1:3 já é possível observar a ausência destas estruturas, embora ainda seja possível ver estruturas globulares e algumas estruturas alongadas ao fundo da imagem, mas significativamente menor em altura (5nm) quando comparadas ao peptídeo sozinho (14nm). Quando a proporção aumenta entre 1:5, nota-se uma diminuição tanto das estruturas globulares maiores antes vista quanto das estruturas alongadas ao fundo da imagem, com estruturas com altura em torno de 3nm.

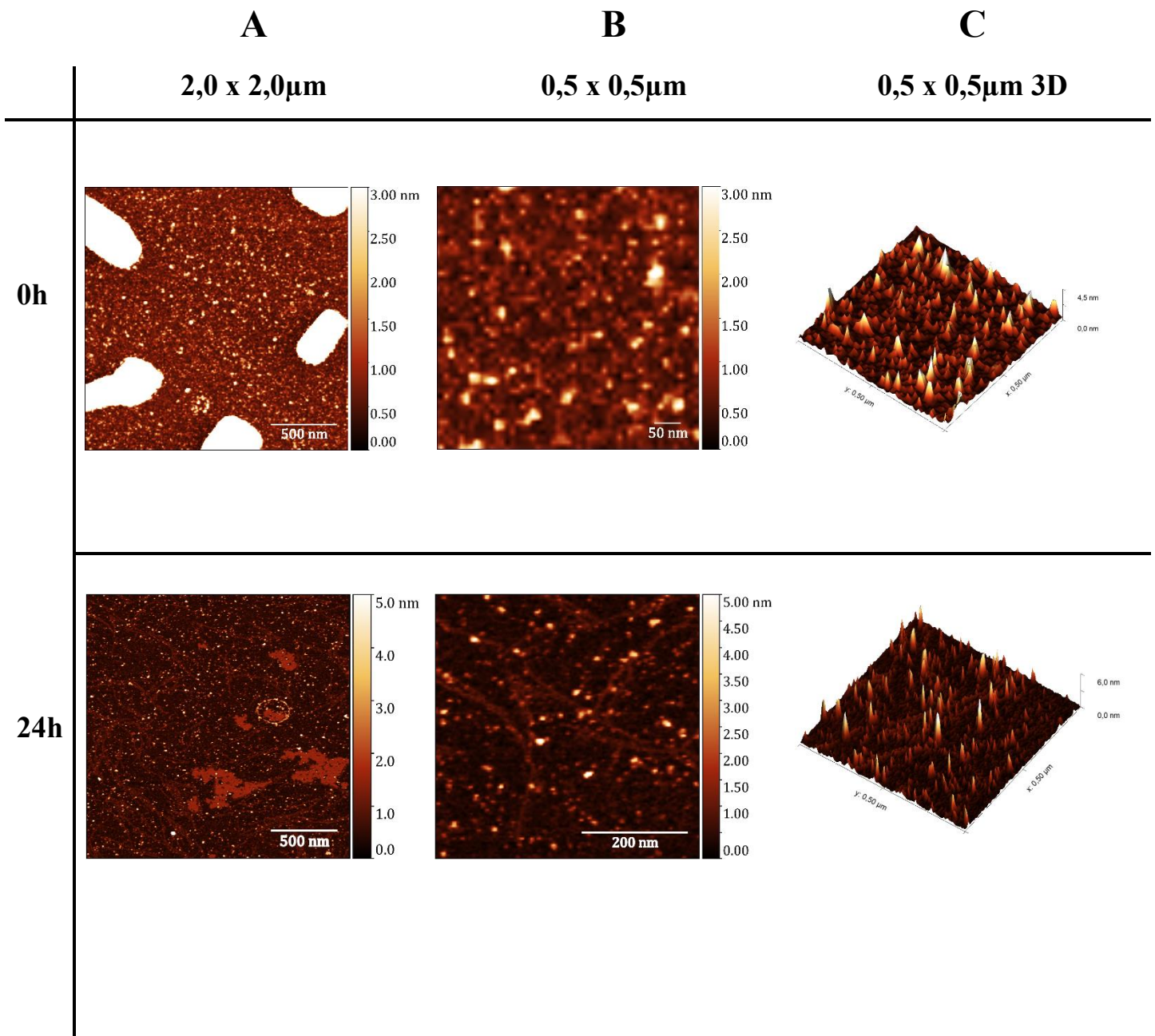


Figura 4.4.2.3 Micrografias A ($2 \times 2 \mu\text{m}$), B ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$) e C ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ em modo 3D) do peptídeo nos tempos 0h sem incubação e após 24h de incubação com complexo RuNDI na proporção 1:3 ($\beta\text{A}:\text{RuNDI}$).

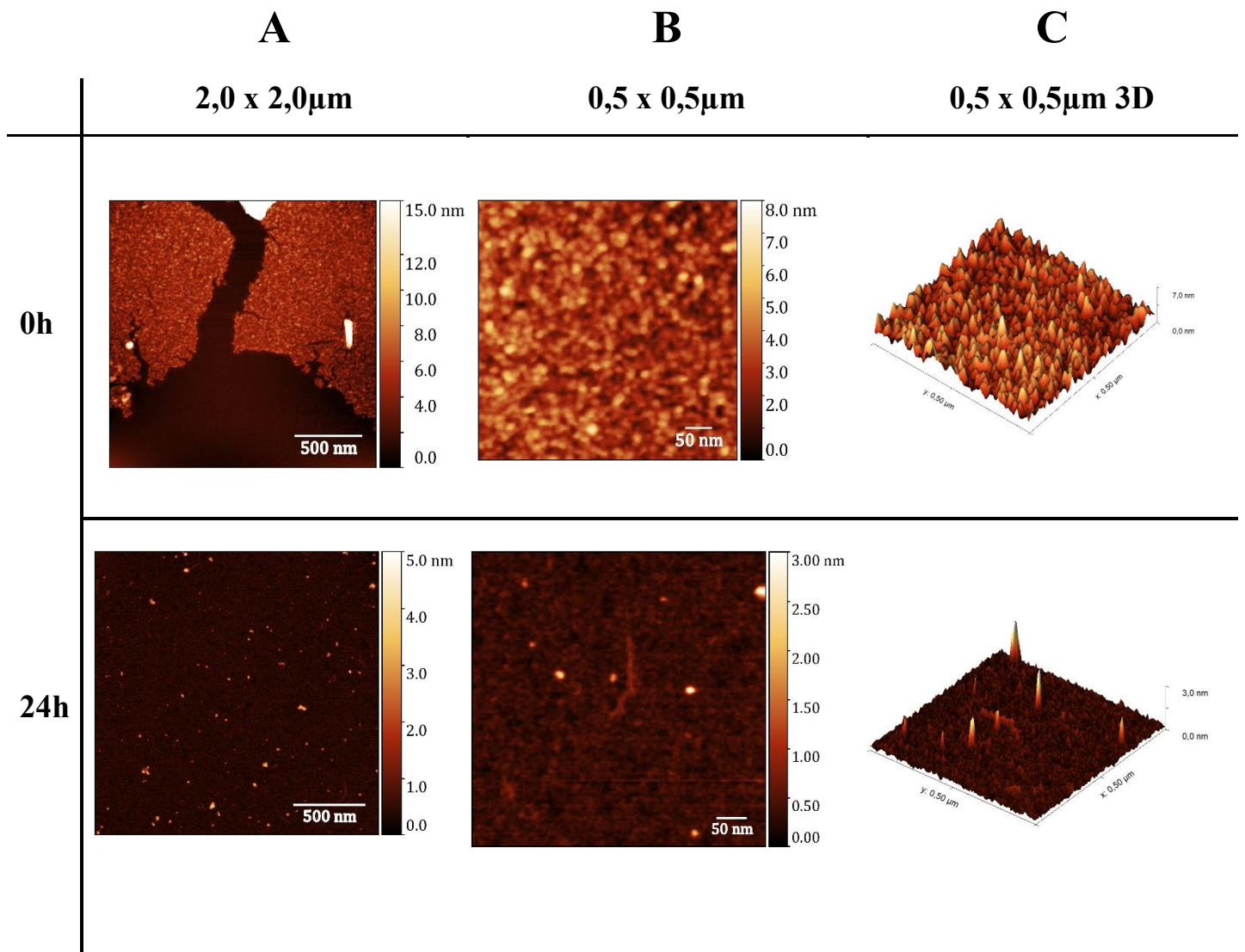


Figura 4.4.2.4 Micrografias A ($2 \times 2 \mu\text{m}$), B ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$) e C ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ em modo 3D) do peptídeo nos tempos 0h sem incubação e após 24h de incubação a 37°C com complexo RuNDI na proporção 1:5 ($\beta\text{A}:\text{RuNDI}$).

Diante destes resultados, realizou-se os estudos de dicroísmo circular nas mesmas proporções (1:3 e 1:5), após 24h de incubação, para investigar as possíveis mudanças estruturais que o complexo poderia estar causando na agregação do βA . A Figura 4.4.2.5 apresenta o resultado.

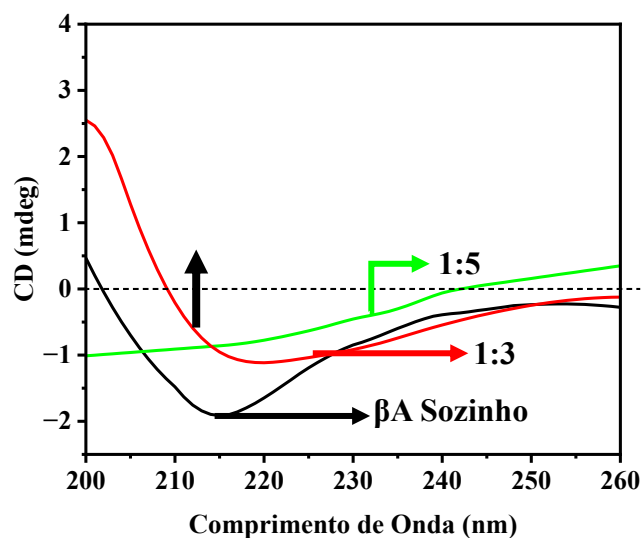


Figura 4.4.2.5 Espectros de dicroísmo circular do β A na ausência ($20\mu\text{M}$; preto) e presença do complexo nas proporções 1:3 (vermelho) e 1:5 (verde) após 24h de incubação na temperatura de 37°C .

Nota-se que, a banda em 218nm , referente a estrutura de folhas β presente nos agregados, sofre uma supressão com o aumento da concentração do complexo, indicando que o complexo de fato interfere com o processo de agregação e que o efeito é dependente da concentração do tal. Na concentração de 1:5 ainda há uma diminuição da intensidade da banda em 200nm , indicando a presença de estrutura desordenada, inconsistente com o esperado em agregados amiloides constituídos por folhas β bem organizadas.

A interferência do complexo RuNDI na agregação do peptídeo β -amiloide também foi investigada utilizando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os estudos foram realizados na Universidade de Estocolmo, no laboratório do professor Andreas Barth através da bolsa BEPE concedida pela agência FAPESP.

A agregação de proteínas geralmente está associada a mudanças conformacionais em sua estrutura secundária, as quais podem ser analisadas por técnicas sensíveis a esse comportamento, como a espectroscopia no infravermelho (IV). Nessa técnica, o estudo da banda amida I (em torno de 1650 cm^{-1}), resultante da vibração de alongamento da ligação $\text{C}=\text{O}$ presente nas proteínas (Figura 4.4.2.6), revela transformações estruturais durante o processo de agregação, já que cada estrutura secundária apresenta absorção em regiões específicas (BARTH; ZIMMERMANN, 2001; SARASWAT et al., 2016). Estruturas em folhas β exibem

uma banda característica em torno de 1630 cm^{-1} , podendo também apresentar uma banda de menor intensidade por volta de 1686 cm^{-1} , indicativa de folhas β antiparalelas (KRETSCHMANN et al., 2017). À medida que a agregação avança e o número de fitas aumenta, a banda em 1630 cm^{-1} tende a se deslocar para números de onda menores, enquanto a banda em 1686 cm^{-1} , associada às estruturas antiparalelas, tende a se deslocar para números de onda maiores (HAN et al., 2012). Esse comportamento permite um acompanhamento cinético do processo de agregação e a diferenciação das espécies formadas ao longo desse processo (KRETSCHMANN et al., 2017).

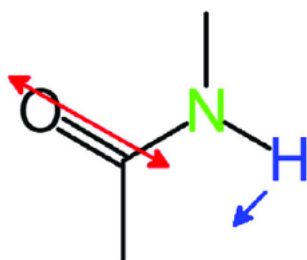


Figura 4.4.2.6 Representação da vibração Amida I. Imagem retirada de KHAN et al. (2016)

Fonte: KHAN, Subuhi et al. *Polyaniline hybrids with biological tissue, and biological polymers as physiological—electroactive materials*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 84, p. 505–520, 2016.

Os estudos iniciais tiveram como objetivo analisar as bandas relacionadas à estrutura do complexo RuNDI nos espectros de FTIR. Considerando que o complexo possui quatro grupos carbonila, foi necessário verificar se essas bandas interfeririam com a banda correspondente ao peptídeo, que também se origina das vibrações dos grupos carbonila presentes na estrutura do peptídeo.

A Figura 4.4.2.7 apresenta a segunda derivada do espectro de absorvância no infravermelho do complexo em solução tampão PBS 10 mM, pH 7,4, com concentração de 0,5 mM, na região de interesse ($1800\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$).

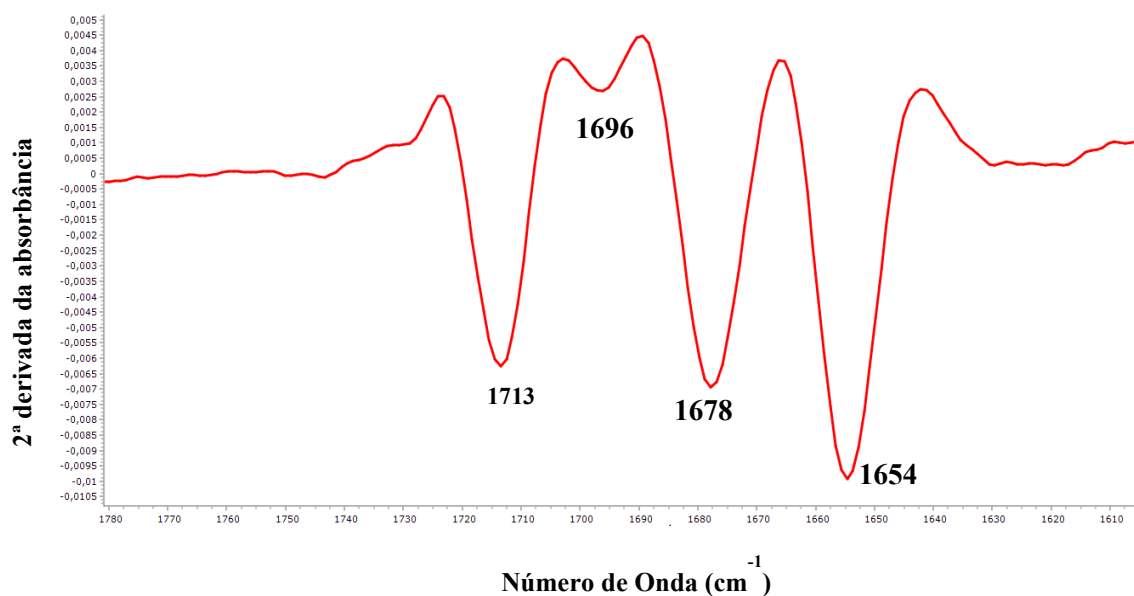


Figura 4.4.2.7 Segunda derivada do espectro de absorvância IR do complexo em solução de PBS 10 mM pD 7,4 na concentração de 500 μM .

Foram observadas quatro bandas associadas às vibrações de alongamento dos grupos carbonila do complexo RuNDI, com posições em 1713 cm^{-1} , 1696 cm^{-1} , 1678 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} , respectivamente. Considerando que a banda da amida I, relacionada à estrutura secundária do peptídeo, se localiza em torno de 1630 cm^{-1} , determinou-se viável o uso do complexo para os estudos de interação.

Os estudos na presença do complexo foram realizados utilizando a solução de βA_{1-42} preparada conforme o protocolo do grupo do Professor Barth (VOSOUGH; BARTH, 2021). Para avaliar o efeito do complexo RuNDI na agregação do peptídeo, uma solução monomérica de βA a 100 μM foi incubada com 500 μM do complexo (1:5), e o processo de agregação foi monitorado ao longo de 24 horas.

O grupo do Professor Andreas Barth tem se dedicado ao estudo da agregação do peptídeo β -amiloide por meio de espectroscopia de FTIR, correlacionando o tamanho dos oligômeros formados com a posição da banda correspondente à estrutura em folhas beta, além

de realizar estudos cinéticos que monitoram o deslocamento dessa banda ao longo do tempo (VOSOUGH; BARTH, 2021).

De acordo com esses estudos, o tamanho dos oligômeros pode ser relacionado à posição da banda principal no espectro do peptídeo: para oligômeros menores, a banda é observada em números de onda mais altos, enquanto para oligômeros maiores ocorre um deslocamento para números de onda mais baixos.

Dessa forma, os estudos de interação entre o complexo e o peptídeo tiveram como objetivo avaliar o efeito do complexo na agregação do peptídeo, analisando possíveis alterações na posição da banda principal, bem como a velocidade de seu deslocamento em comparação com o controle.

A primeira análise realizada investigou o efeito da presença do complexo nas etapas iniciais da agregação, com foco na verificação de possíveis alterações no posicionamento da banda no início do processo. Conforme mostrado no primeiro espectro registrado a 0 °C (Figura 4.4.2.8), a banda principal é observada em 1627,6 cm⁻¹ na ausência do complexo e em 1629,6 cm⁻¹ na presença dele, indicando que o RuNDI provoca um deslocamento da banda para um número de onda mais alto, o que pode sugerir a estabilização ou modulação de espécies oligoméricas menores pelo complexo.

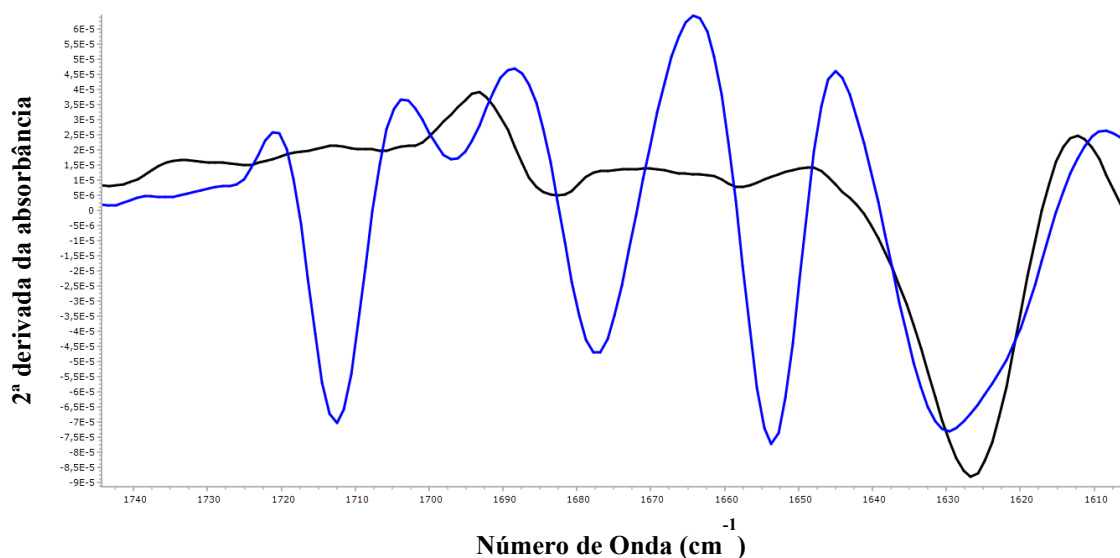


Figura 4.4.2.8 Segunda derivada dos espectros de absorvância de IR no tempo inicial da agregação a 0 °C: β A na ausência do complexo em preto (100 μ M; PBS 10mM; pD 7,4, dado obtido de Vousogh, Faraz, reproduzido com permissão); β A na presença do complexo RuNDI na concentração de 500 μ M em azul. (PBS 10mM; pD 7,4).

A partir dos espectros subsequentes, a análise passou a avaliar o efeito do complexo durante a agregação, ou seja, após o aumento da temperatura para 37°C, verificando se a velocidade de deslocamento da banda se altera em sua presença. Para facilitar essa análise, foi construído um gráfico de posição da banda (cm^{-1}) em função do tempo (horas) referente aos experimentos com o complexo, representado nas Figura 4.4.2.9 B e comparado com o gráfico produzido por Vousogh, representado com permissão na Figura 4.4.2.9 A, permitindo observar o perfil do deslocamento da banda ao longo do tempo.

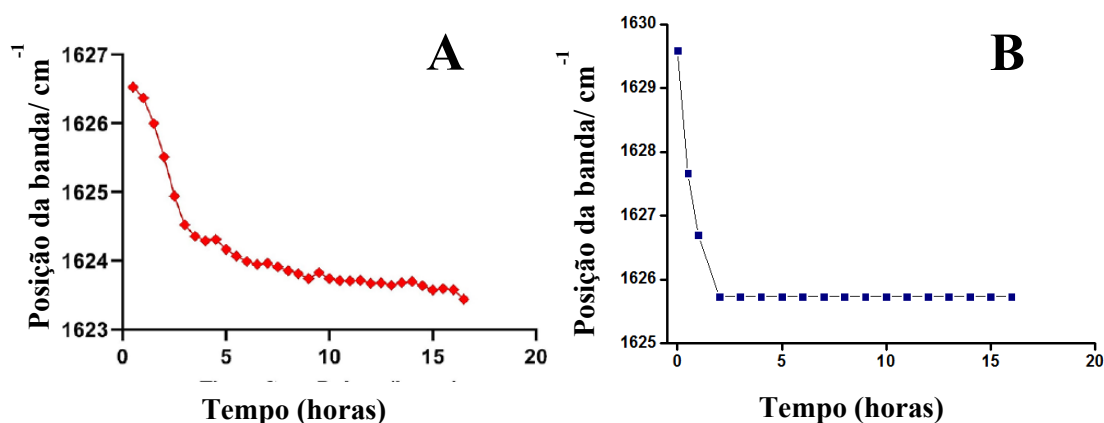


Figura 4.4.2.9 (A) Variação da posição da banda, referente a vibração da amida I do peptídeo, em função do tempo durante a cinética de agregação do peptídeo β -amiloide (100 μM) em PBS, 37 °C na ausência do complexo — dado obtido de Vousogh, Faraz, reproduzido com permissão. **(B)** Variação da posição da banda, referente a vibração da amida I do peptídeo, em função do tempo durante a cinética de agregação do βA (100 μM) na presença do complexo RuNDI (500 μM) em PBS, 37 °C.

Na ausência do complexo, observa-se um deslocamento mais lento e contínuo da banda, atingindo no espectro final uma posição em torno de 1623,5 cm^{-1} . Quando o experimento é realizado na presença do complexo RuNDI, o deslocamento inicial é mais rápido nas primeiras 2 horas, estabilizando-se nas horas seguintes, com a banda final posicionada aproximadamente em 1625,7 cm^{-1} . Essas diferenças observadas na velocidade de deslocamento e na posição final da banda indicam que há variações no tamanho e/ou na estrutura dos oligômeros formados na ausência e na presença do complexo RuNDI.

O posicionamento da banda correspondente à formação de folhas-beta antiparalelas em 1686 cm^{-1} não pôde ser avaliado com precisão na presença do complexo, pois uma das bandas do RuNDI está localizada em 1678 cm^{-1} , próxima a essa região. No entanto, observa-se um alargamento da banda do complexo em 1678 cm^{-1} , o que indica que a formação da banda em

1686 cm^{-1} provavelmente ainda ocorre, mesmo na presença do complexo. Em relação às demais bandas associadas ao complexo, não foram observados deslocamentos significativos, apenas na banda de 1654 cm^{-1} , mas sim alterações na intensidade, especialmente nas bandas em 1696 cm^{-1} , 1678 cm^{-1} que são suprimidas ao longo do tempo, conforme ilustrado na Figura 4.4.2.10. Já a banda em 1654 cm^{-1} sofre uma supressão inicial e depois tem um aumento de intensidade.

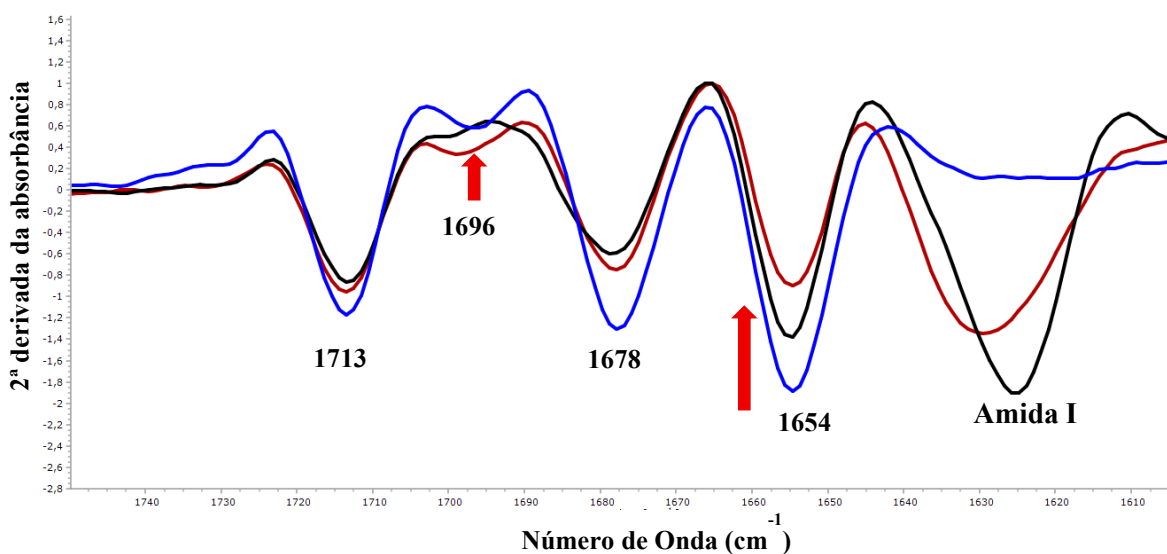


Figura 4.4.2.10 Comparação dos espectros de absorvância da segunda derivada do complexo RuNDI (500 μM , em PBS 10mM; pD7,4) na ausência do peptídeo (azul) e na presença do peptídeo β -amiloide (100 μM) nos tempos 0h (vermelho) e 24h (preto).

Embora não haja grandes deslocamentos na frequência, as alterações na intensidade das bandas C=O do RuNDI sugerem que esses grupos estão envolvidos em interações intermoleculares, mas sem causar mudanças drásticas na frequência vibracional. Tais interações podem ocorrer por ligações de hidrogênio ou empilhamento π - π ; no entanto, no caso de ligações de hidrogênio, seria esperado também um deslocamento de frequência. Essa mudança pode ser sutil se a interação não for suficientemente forte ou se os grupos carbonílicos do complexo já estiverem interagindo com o solvente (D_2O) via ligações de hidrogênio. Dessa forma, não se observa um deslocamento, apenas uma diminuição na intensidade da banda devido às novas interações com o complexo (CZARNECKI, 2012; ATHOKPAM et al., 2016).

Uma vez que o complexo RuNDI apresenta estrutura altamente aromática, com um extenso sistema π -conjugado distribuídos em seus ligantes deve haver um favorecimento de interações do tipo π - π stacking, especialmente com resíduos aromáticos presentes no núcleo

hidrofóbico central do peptídeo β A (resíduos 17–21: Leu–Val–Phe–Phe–Ala), que é rico em resíduos apolares e aromáticos, como fenilalanina (Phe19 e Phe20) (GENJI et al., 2017; SENGUEN et al., 2011).

Esse tipo de interação pode estabilizar o contato entre o complexo e o β A, favorecendo o reconhecimento seletivo e interferindo na agregação fibrilar do peptídeo (HUNTER; SANDERS, 1990; KOLLANDRA et al., 2022), como foi observado nos experimentos realizados.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou investigar os efeitos do complexo RuNDI no processo de agregação do peptídeo β -amiloide, analisando seu potencial em atuar como uma sonda luminescente e também como um modulador da agregação. Os resultados apresentados evidenciam as qualidades do complexo no monitoramento da agregação, uma vez que este apresentou aumento significativo na emissão quando na presença de espécies iniciais e fibrilares do β A, além disso, as propriedades espectroscópicas do complexo permitiram a obtenção de imagens dos agregados fibrilares confirmando sua capacidade em detectar tais espécies.

Para além deste fato, o complexo também apresentou resultados satisfatórios quanto ao potencial em atuar como modulador da agregação, apresentando melhor resultado em proporção de 1:5 β A:RuNDI, na qual ocorreu diminuição significativa de estruturas maiores e ricas em folhas β como identificado pelas técnicas de AFM, CD e FTIR.

Diante destes resultados conclui-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]\text{PF}_6$ se demonstrou capaz em atuar tanto como sonda luminescente quanto modulador da agregação do peptídeo β -amiloide 1-42.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALGHAMDI, A. A. M. Time-resolved emission spectra of intrinsic tyrosine during early aggregation stages. 2022. Tese (Doutorado em Física) – University of Strathclyde, Glasgow, 2022. Disponível em: <https://stax.strath.ac.uk/concern/theses/rv042t63m>. Acesso em: 25 jul. 2025.

ADI - Dementia statistics. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>. Acesso em: 25 jul. 2025.

ALZHEIMER. A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin, v. 64, p. 146-148, 1907.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION BRASIL. Demência e Alzheimer no Brasil. Disponível em: <https://www.alz.org/br/demencia-alzheimer-brasil.asp>. Acesso em: 25 jul. 2025.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. Types of dementia: Alzheimer's disease. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/types-of-dementia/alzheimers-disease/>. Acesso em: 25 jul. 2025.

AMARO, M.; BIRCH, D. J. S.; ROLINSKI, O. J. Beta-amyloid oligomerisation monitored by intrinsic tyrosine fluorescence. Physical Chemistry Chemical Physics, [S. l.], v. 13, n. 15, p. 6492–6501, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1039/c0cp02652b>.

ANTOSIEWICZ, J. M.; SHUGAR, D. “UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. part 2: selected applications”. Biophysical reviews, v. 8, n. 2, p. 163-177, 2016.

ASHRAFIAN, Hossein; ZADEH, Elaheh Hadi; KHAN, Rizwan Hasan. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. International Journal of Biological Macromolecules, v. 167, p. 382–394, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020351308>. Acesso em: 25 jul. 2025.

ATHOKPAM, B., RAMESH, S. G., McKenzie, R. H. Effect of hydrogen bonding on the infrared absorption intensity of OH stretch vibrations. Chemical Physics, Volumes 488–489, 2017, Pages 43-54.

BARTH, A.; ZIMMERMANN, G. Protein infrared spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2001.

BEKARD, I. B.; DUNSTAN, Dave E. “Tyrosine autofluorescence as a measure of bovine insulin fibrillation”. Biophysical journal, v. 97, n. 9, p. 2521-2531, 2009.

BIANCALANA, M.; KOIDE, S. “Molecular mechanism of ThioflavinT binding to amyloid fibrils”. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics, v. 1804, n. 7, p. 1405-1412, 2010.

BOTELLA LUCENA, Pablo; HENEKA, Michael T. Inflammatory aspects of Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica, v. 148, n. 1, p. 31, 2024.

BRODSKI, A. et al. Amyloid- β Peptide: Physiological Role in the Normal Brain. Frontiers in Neuroscience, v. 13, 2019. DOI: 10.3389/fnins.2019.00222.

CHEN, G. et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, set. 2017.

CHEN, Guo-fang; XU, Ting-hai; YAN, Yan; et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 2017.

CHEN, Y. R. et al. The effect of A β conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism spectroscopy. *Journal of Biochemistry*, v. 139, n. 4, p. 733–740, 2006.

COOK, N. P. et al. Sensing amyloid- β aggregation using luminescent dipyrrophenazine ruthenium(II) complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, n. 29, p. 11121–11123, 2011.

CZARNECKI, Mirosław A. Frequency shift or intensity shift? The origin of spectral changes in vibrational spectra. *Vibrational Spectroscopy*, v. 58, p. 193–198, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203111001767>>. Acesso em: 25 jul. 2025.

DA CRUZ GARCIA, Maria Laura; PAIXÃO, Rafaela Ribeiro; PAZIN, Wallance M.; et al. Binding of cis-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ to Model Lipid Membranes: Implications for New Tools in the Development of Antiamyloid Drugs. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 40, n. 52, p. 27345–27355, 2024.

EBENEZER, Philip J.; WEIDNER, Adam M.; LEVINE, Harry; et al. NEURON SPECIFIC TOXICITY OF OLIGOMERIC BETA AMYLOID: Implications for JUN-kinase and oxidative stress. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, v. 22, n. 3, p. 839–848, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412400/>>. Acesso em: 25 jul. 2025.

GARCIA, M. L. DA C. et al. Binding of *cis* -[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ to Model Lipid Membranes: Implications for New Tools in the Development of Antiamyloid Drugs. **Langmuir**, v. 40, n. 52, p. 27345–27355, dez. 2024.

GAZIT, E. A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *The FASEB Journal*, v. 16, n. 1, p. 77–83, jan. 2002.

GENJI, M. et al. Aromaticity of Phenylalanine Residues Is Essential for Amyloid Formation by Alzheimer's Amyloid β -Peptide. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 65, n. 7, p. 668–673, 2017.

GLAZER, E. C.; MAGDE, D.; TOR, Y. “Ruthenium complexes that break the rules: structural features controlling dual emission”. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 27, p. 8544-8551, 2007.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 120, n. 3, p. 885-890, 1984.

GROOT, N. S. DE et al. Mutagenesis of the central hydrophobic cluster in A β 42 Alzheimer's peptide. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 3, p. 658–668, fev. 2006.

GURSKY, Olga; ALESHKOV, Sergei. Temperature dependent β -sheet formation in β amyloid $A\beta_{1-40}$ peptide in water: uncoupling β structure folding from aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1476, p. 93–102, 2000.

HABASHI, Maram; VUTLA, Suresh; TRIPATHI, Kuldeep; et al. Early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease by targeting toxic soluble $A\beta$ oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 119, n. 49, p. e2210766119, 2022.

HACKER, Ryan M.; GRIMARD, Daniela M.; MORGAN, Katie A.; et al. Ru(II)-arene azole complexes as anti-amyloid- β agents. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, v. 53, n. 47, p. 18845–18855, 2024.

HAN, J.; NARAYANAN, S.; NAGARAJU, M. Kinetic study of amyloid fibril formation by infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, v. 415, n. 4, p. 709–715, 2012.

HARDY, J.; HIGGINS, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, v. 256, n. 5054, p. 184-185, 1992.

HORTON, Tanner; SENDEK, Austin. Time Until Neuron Death After Initial Puncture From an Amyloid-Beta Oligomer. 2015. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1505.01579>>. Acesso em: 25 jul. 2025.

HOSPITAL OSWALDO CRUZ. Famílias são o pilar do cuidado com a demência no Brasil. Disponível em: <https://www.hospitaloswaldocruz.org.br/imprensa/releases/familias-sao-o-pilar-do-cuidado-com-a-demencia-no-brasil-assumindo-73-dos-custos>. Acesso em: 25 jul. 2025.

HUANG, Ya-Ru; LIU, Rui-Tian. The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 4477, 2020.

HUDSON, S. A. et al. 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, out. 2009.

HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The nature of π - π interactions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 14, p. 5525–5534, 1990.

JIANG, B.; MARTÍ, A. A. Probing Amyloid Nanostructures using Photoluminescent Metal Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 2021, n. 43, p. 4408–4424, 2021.

JONES, A.; SMITH, B. Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *Journal of Neurodegenerative Disorders*, v. 12, n. 4, p. 123-135, 2023.

KATZMAN, R. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 321, n. 2, p. 91-102, 1989.

KAWASAKI, Y.; TAKAHASHI, M. Mechanisms of Amyloid Beta Aggregation: Primary and Secondary Pathways. *Neuroscience Letters*, v. 742, p. 135-143, 2021.

KHAN, Subuhi et al. Polyaniline hybrids with biological tissue, and biological polymers as physiological—electroactive materials. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 84, p. 505–520, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.090>.

- KIM, J.; LEE, S. Limitations of Thioflavin T in detecting amyloid intermediates. *Analytical Biochemistry*, v. 570, p. 1–9, 2019.
- KOLLANDRA, L. et al. Small molecule modulators targeting amyloid- β aggregation. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2022.
- KRETSCHMANN, M.; RÜEGER, H.; AMANN-WINKLERT, M. Monitoring protein aggregation by infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 409, n. 25, p. 5991–6002, 2017.
- KUMAR, Amit; MOODY, LaMaryet; OLAIVAR, Jason F.; et al. Inhibition of A β 42 Peptide Aggregation by a Binuclear Ruthenium(II)–Platinum(II) Complex: Potential for Multimetal Organometallics as Anti-amyloid Agents. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 1, n. 10, p. 691–701, 2010.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3. ed. New York: Springer, 2006.
- LAZAR, I.; THOMAS, K. Toxicity of Amyloid Beta Oligomers: Molecular Insights. *Molecular Neurobiology*, v. 59, n. 3, p. 1357-1370, 2022.
- LEVIN, I. Fluorescence studies of amyloid fibrils. *Biophysical Journal*, v. 65, n. 6, p. 2590–2597, 1993.
- LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J. A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, v. 2, n. 12, p. 910-919, 2005.
- LIU, H.; QU, Y.; WANG, X. Amyloid β -targeted metal complexes for potential applications in Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 6, p. 679–701, 2018.
- LIU, Yi; MA, Jiaying; ZHANG, Qianling; et al. Mechanism of Metal Complexes in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 22, p. 11873, 2024.
- LUAN, Y. et al. Prefrontal-Temporal Pathway Mediates the Cross-Modal and Cognitive Reorganization in Sensorineural Hearing Loss With or Without Tinnitus: A Multimodal MRI Study. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, mar. 2019.
- MANCINI, O. et al. Tyrosine rotamer states in beta amyloid: signatures of aggregation and fibrillation. *ACS Omega*, [S. 1.], v. 3, n. 11, p. 15179–15188, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02406>.
- MARTINS, F. et al. Inflammatory Aspects of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology*, v. 15, 2024.
- MAURSTAD, G.; PRASS, M.; SERPELL, L. C. Dehydration stability of amyloid fibrils studied by AFM. *European Biophysics Journal*, v. 38, p. 1135–1140, 2009. DOI: 10.1007/s00249-009-0526-x.
- McGAUGHEY, G. B.; GAGNÉ, M.; RAPPÉ, A. K. π -Stacking interactions: Alive and well in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 25, p. 15458–15463, 1998.
- MEI, J. et al. Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! *Chemical Reviews*, v. 115, n. 21, p. 11718–11940, 2015.

- MICHAELIAN, K.; SIMEONOV, A. “Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum”. *Biogeosciences*, v. 12, n. 16, p. 4913-4937, 2015.
- NGUYEN, P. H. et al. Structural basis for the recognition of the hydrophobic cluster in amyloid- β peptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 6, p. 1707–1716, 2007.
- PEREIRA, Lorena Maria Borges; DE OLIVEIRA, Diego França; TIBURCIO, Marco Antonio; et al. Exploring the Reversible Equilibrium State between 3CS and 3CSS in a Ru(phen)–Naphthalene Diimide Dyad. *Inorganic Chemistry*, v. 64, n. 17, p. 8544–8553, 2025.
- PROFIT, A. A.; FELSEN, V.; CHINWONG, J.; MOJICA, E.-R. E.; DESAMERO, R. Z. B. Evidence of π -stacking interactions in the self-assembly of hIAPP(22–29). *Proteins*, v. 81, n. 4, p. 690–703, 2013. DOI: 10.1002/prot.24229. (texto disponível em PMC).
- ROLINSKI, O. J. et al. Tyrosine photophysics during the early stages of beta amyloid aggregation leading to Alzheimer’s disease. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, [S. l.], v. 6, n. 18, p. 3841–3847, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b01678>.
- SÁNCHEZ DE GROOT et al. (2006) — Mutagenesis of the central hydrophobic cluster in A β 42 Alzheimer’s peptide. Side-chain properties correlate with aggregation propensities. *FEBS Journal*, 273(3): 658–668, 2006.
- SANTOS, R.; LIMA, C. Structural Basis of Amyloid Beta Oligomer Toxicity. *Biophysical Journal*, v. 118, n. 5, p. 982-992, 2020.
- SARASWAT, S.; COWAN, J. A.; ZHANG, X. FTIR spectroscopy reveals structural changes in amyloid fibrils upon binding to copper. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1864, n. 3, p. 288–296, 2016.
- SEHAR, Ujala; RAWAT, Priyanka; REDDY, Arubala P.; et al. Amyloid Beta in Aging and Alzheimer’s Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, p. 12924, 2022.
- SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Science*, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.
- SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, v. 8, n. 6, p. 595-608, 2016.
- SENGUEN, F. T.; LEE, N. R.; GU, X.; RYAN, D. M.; DORAN, T. M.; ANDERSON, E. A.; NILSSON, B. L. Probing aromatic, hydrophobic, and steric effects on the self-assembly of an amyloid- β fragment peptide. *Molecular BioSystems*, v. 7, p. 486-496, 2011. DOI: 10.1039/C0MB00080A.
- SERIANNI, Anthony. *Organic Chemistry – Chapter 9B: Spectroscopy and Structure Determination*. University of Notre Dame, [s.d.].
- STINE, W. B. et al. The nanometer-scale structure of amyloid- β visualized by atomic force microscopy. *Protein Journal*, v. 15, n. 2, p. 193–203, 1996. DOI: 10.1007/BF01887400.
- SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. “Mixed phosphine 2,2'- bipyridine complexes of ruthenium”. *Inorg. Chem.*, 17, 3334–3341, 1978.

TEALE, F. W. J. “The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution”. *Biochemical journal*, v. 76, n. 2, p. 381, 1960.

TJERNBERG, L. O. et al. Arrest of β -amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 15, p. 8545–8548, 1996.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.

VERMA, S.; KAR, P.; DAS, A. & GHOSH, H. N. “Photophysical properties of ligand localized excited state in ruthenium (ii) polypyridyl complexes: a combined effect of electron donor–acceptor ligand”. *Dalton Transactions*, v. 40, n. 38, p. 9765-9773, 2011.

VOROPAI, E. S.; SAMTSOV, M. P.; KAPLEVSKII, K. N.; MASKEVICH, A. A.; STEPURO, V. I.; POVAROVA, O. I.; UVERSKII, V. N. “Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils”. *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 70, n. 6, p. 868-874, 2003. 97.

VOSOUGH, Faraz; BARTH, Andreas. Characterization of Homogeneous and Heterogeneous Amyloid- β 42 Oligomer Preparations with Biochemical Methods and Infrared Spectroscopy Reveals a Correlation between Infrared Spectrum and Oligomer Size. *ACS chemical neuroscience*, v. 12, n. 3, p. 473–488, 2021.

WANG, W. et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 38, n. 9, p. 1205-1235, 2017.

WIMO, A. et al. The worldwide costs of dementia in 2019. ***Alzheimer’s & Dementia***, v. 19, n. 7, p. 2865–2873, jul. 2023.

WITTENBERG, R. et al. The worldwide costs of dementia in 2019. *Alzheimer’s & Dementia*, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dementia. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acesso em: 25 jul. 2025.

XUE, C.; LIN, T. Y.; CHANG, D.; GUO, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect of salts. *Royal Society Open Science*, v. 4, n. 12, p. 160696, 2017.

YU, H.-J. et al. Real-Time Monitoring of Self-Aggregation of β -Amyloid by a Fluorescent Probe Based on Ruthenium Complex. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 4, p. 2953–2960, 2020.