

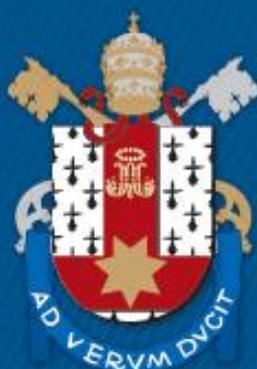
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

MARCELE SILVA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DA SONDA FLUORESCENTE 6-OH-BTA-0 E SUA
INTERAÇÃO COM PEPTÍDEOS BETA AMILOIDE**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DA SONDA FLUORESCENTE 6-OH-BTA-0 E SUA INTERAÇÃO COM PEPTÍDEOS BETA AMILOIDE

MARCELE SILVA DE SOUZA
BIOMÉDICA

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). RICARDO MEURER PAPALÉO

CO-ORIENTADOR: DR(a). ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre
Março, 2021

Ficha Catalográfica

D278c de Souza, Marcele Silva

Caracterização fotofísica da sonda fluorescente 6-OH-BTA-0 e sua interação com peptídeos beta amiloide / Marcele Silva de Souza. – 2021.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa Magno Nunes de Oliveira.

1. benzotiazol. 2. beta amiloide. 3. fluorescência. I. Papaléo, Ricardo Meurer. II. de Oliveira, Elisa Magno Nunes. III. Título.

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

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 ESCOLA POLITÉCNICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DA SONDA FLUORESCENTE 6-OH-BTA-0 E SUA INTERAÇÃO COM PEPTÍDEOS BETA AMILOIDE

CANDIDATA: MARCELE SILVA DE SOUZA

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grandedo Sul.

DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - ORIENTADOR

DRA. ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA - COORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

**DR. ANDRÉ ARIGONY SOUTO - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
 CELULAR E MOLECULAR DA PUCRS - PUCRS**

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
 Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900
 Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
 E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
 www.pucrs.br/politecnica

*“A vida é como andar de bicicleta.
Para se manter equilibrado, é
preciso seguir em frente.”*

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família. Ao meu esposo Lucas Tiago Flores, por todo o cuidado, carinho e compreensão no decorrer deste trabalho, aos meus pais e avós por acreditarem em mim mesmo quando eu mesmo não acreditei, a minha irmã por ser uma motivadora nata neste período desafiador. E com um carinho todo especial, ao meu avô Miguel Abreu, ao qual me apoiou com todo entusiasmo durante o processo, mas infelizmente não pôde ver o final deste capítulo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por todo seu cuidado e luz sobre mim.

Ao meu marido, Lucas Flores, por todo amor, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos pais e avós, por terem acreditado em mim e sempre me apoiado nas minhas escolhas. A minha irmã Maiara, que sempre tinha um sorriso e uma motivação ali para mim.

Ao Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo, por ter aceitado me orientar e me recebeu no grupo NANOPUC com muito carinho e paciência, por sua orientação e apoio.

A Prof.^a Dra. Elisa Magno no auxílio das atividades de laboratório, disciplinas, dúvidas em tudo, foi uma pessoa fora da curva neste meu caminho. Como muitas vezes já disse para ela: ela foi um anjo na minha vida e sou eternamente grata por tudo que fez e faz por mim.

A Prof.^a Dra. Mônica Vianna, Dr. Paulo e a técnica Jéssica do Zeblab no auxílio e na colaboração das atividades envolvendo as proteínas beta amiloides.

A Prof.^a Dra. Leandra Campos, pela colaboração e auxílio análises com o composto 6-OH-BTA-0 e nas discussões do mesmo.

A todos os colegas do CPBMS, em especial à técnica Márcia, por todo o apoio, discussão e por me receberem de braços abertos no grupo, ajudando nos momentos de sufoco com discussão e auxílio em diversas metodologias.

Ao LABCEMM da PUCRS, em especial à Moema, o Gustavo e o Leandro, pelas análises e as discussões de dados.

Aos funcionários do almoxarifado da Faculdade de Química da PUCRS e aos colegas do LOR pela parceria nos momentos de aperto.

A todos os colegas do grupo NANOPUC, pelo apoio e ajuda nas atividades desenvolvidas no projeto.

Aos meus colegas do PGETEMA que estiveram ao meu lado em momentos desafiadores como na disciplina de fundamentos, tornando a carga um pouco mais leve.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	6
AGRADECIMENTOS.....	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1. Princípios de fluorescência e seus mecanismos	22
3.1.1. Mecanismos de <i>quenching</i>	25
3.1.1.1. <i>Quenching</i> dinâmico	25
3.1.1.2. <i>Quenching</i> estático	26
3.1.1.3. <i>Quenching</i> dinâmico e estático combinado.....	27
3.1.2. Moléculas fluorescentes.....	28
3.2. Benzotiazóis e aplicações biomédicas.....	30
3.3. Beta amiloide e sua relevância na Doença de Alzheimer	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Materiais.....	35
4.2. Síntese da molécula 6-OH-BTA-0.....	36
4.3. Produção das diferentes conformações dos peptídeos de beta-amiloide..	37
4.4. Métodos de caracterização.....	37
4.4.1. Medidas de fluorescência	37
4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (SEC- HPLC)	38

4.4.3. Eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	39
4.4.4. Microscopia de força atômica (AFM).....	39
4.4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	40
4.5. Estudo da interação dos peptídeos beta amiloide com a molécula 6-OH-BTA-040	
4.5.1. Estudo de interação por fluorescência	40
4.5.2. Estudo de interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1. Propriedades fotofísicas do 6-OH-BTA-0	42
5.1.1. Medidas de fluorescência	42
5.2. Caracterização das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide ..	45
5.2.1. Caracterização por peso molecular e pureza.....	46
5.2.2. Caracterização da conformação estrutural, morfologia e processo de agregação.	48
5.3. Estudo da interação dos peptídeos beta-amiloide com a molécula 6-OH-BTA-054	
5.3.1. Estudo de interação por fluorescência	54
5.3.2. Estudo de interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	61
6. CONCLUSÕES	64
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Diagrama de Jabloskin (adaptado da referência [9]).....	22
Figura 3.2: Diagrama de Jabloskin simplificado (adaptado da referência [8]).	24
Figura 3.3: <i>Quenching</i> dinâmico e estático na mesma população de fluoróforos.[8]	27
Figura 3.4: Estruturas de substância fluorescentes (adaptado da referência [8]).....	30
Figura 3.5: Estrutura química do benzotiazol e seus derivados. A) benzotiazol, B) Tioflavina T, C) PIB e D) 6-OH-BTA-0 (adaptado das referências [3][21][7]).	30
Figura 3.6: Estruturas esperadas em cada forma de agregação do peptídeo beta amiloide (A β -42) (adaptado referencia [41])......	33
Figura 3.7: Cascata de agregação do peptídeo beta amiloide, adaptado da referência [43].	34
Figura 4.1: Rota simplificada da síntese da molécula 6-OH-BTA-0. Adaptada referência.[33]	37
Figura 5.1. Molécula 6-OH-BTA-0 protonada.....	42
Figura 5.2: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da molécula 6-OH-BTA-0 na concentração de 500 nM, na presença de diferentes solventes: acetona, acetato de etila, clorofórmio, etanol e PBS. Em (B) $\lambda_{abs}=340$ nm.....	43
Figura 5.3. Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-0 puro (500 nM, em PBS) em função do tempo (0- 50 min) nas temperaturas de A) 25 °C, B) 37 °C, C) 42 °C e D) gráfico da intensidade máxima da fluorescência em função do tempo, nas três temperaturas: 25, 37 e 42 °C.	45
Figura 5.4: Cromatograma do volume de eluição das diferentes formas do peptídeo beta amiloide por SEC-HPLC. A) monômero B) oligômero, concentração 20 μ M.	46
Figura 5.5: SDS-PAGE convencional corado com azul de coomasie. A) Marcador de peso molecular, B) monômero, C) oligômero e D) fibrila, na concentração de 10 μ M.	48
Figura 5.6: Imagens obtidas por AFM de uma alíquota de solução monomérica de 20 μ M sobre a placa de mica. Canais de análise A) topografia, B) adesão, C) dissipação e D) modulo de elasticidade.	49

- Figura 5.7: Imagens obtidas por AFM de alíquotas de solução A) oligomérica e B) fibrila de ambas a 20 μM sobre a placa de mica em 5 μm . Nos canais de análise topográfica, modulo de elasticidade e adesão. 50
- Figura 5.8: Imagens obtidas por AFM, na concentração de 20 μM em 1 μm . A) monômero, B) oligômero e C) fibrila. Canais de topografia, modulo de elasticidade e adesão, respectivamente. 51
- Figura 5.9: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão por contrastação negativa das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide em escala de 500, 200 e 100 nm, na concentração de 20 μM . A) monômero B) oligômero e C) fibrila..... 53
- Figura 5.10: Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (500 nM) na presença dos peptídeos amiloides (concentração variada de 33,22 a 540 nM) na forma de (A) monômero, (B) oligômero e (C) fibrila para diferentes tempos de exposição (0-40 min), medidos em três temperatura: 25, 37 e 42 $^{\circ}\text{C}$. $\lambda_{\text{exc}}=340\text{ nm}$ 54
- Figura 5.11: Gráficos da concentração e tempo em função de F_0/F dos peptídeos nas formas de monômero, oligômero e fibrila, nas três temperaturas (25, 37 e 42 $^{\circ}\text{C}$). Concentração de 500 nM para o 6-OH-BTA-0 e concentração variada de 33,22 a 540 nM para os peptídeos. 55
- Figura 5.12. Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (100 nM) na presença dos peptídeos amiloides (540 nM em PBS) na forma de (A) monômero, (B) oligômero e (C) fibrila para diferentes tempos de exposição (0-50 min), medidos em três temperatura: 25, 37 e 42 $^{\circ}\text{C}$. $\lambda_{\text{exc}}=340\text{ nm}$ 56
- Figura 5.13. Gráficos da intensidade máxima do 6-OH-BTA-0 na presença dos peptídeos na forma de monômero, oligômero e fibrila (540 nM) nas temperaturas de 25, 37 e 42 $^{\circ}\text{C}$ em função dos intervalos de tempo de medida (0-50 min). 57
- Figura 5.14: Estudo de interação da molécula 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (100 nM) titulado com peptídeo beta amiloide nas três formas: (A) monômero, (B) oligômero e (C) fibrila, em tampão PBS (33,22-1076 nM) em um volume final de 3mL ($\lambda_{\text{ex}}=340\text{ nm}$), com variação do tempo de 10 em 10 minutos e suas intensidades de fluorescência máxima. As medidas foram realizadas em três temperaturas (25, 37 e 42 $^{\circ}\text{C}$)..... 58
- Figura 5.15. Gráfico da concentração dos peptídeos nas formas de monômero, oligômero e fibrila em função de F_0/F nas três temperaturas (25, 37 e 42 $^{\circ}\text{C}$). 59
- Figura 5.16: Equação de *Stern-Volmer* comparando as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide pela temperatura, 25 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ e 42 $^{\circ}\text{C}$ 60

Figura 5.17: Gráficos de interação de titulação isotérmica dos peptídeos beta amiloide. A) peptídeo beta amiloide na forma de monômero (20 nM em água) com concentração crescente da molécula 6-OH-BTA (iniciando com 2 μ M). B) Mesmo estudo em uma escala mais próxima.62

Figura 5.18: Gráficos de interação de titulação isotérmica dos peptídeos beta amiloide. A) peptídeo beta amiloide na forma de monômero (20 nM em água) com concentração crescente da molécula 6-OH-BTA (iniciando com 5 μ M). B) Mesmo estudo em uma escala mais próxima.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Reagentes utilizados.	35
Tabela 4.2. Equipamentos utilizados.....	36
Tabela 5.1. Valores de constante dielétrica, viscosidade, comprimentos de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e fluorescência (λ_{fl}), rendimento quântico (Φ_{fl}) e coeficiente de absortividade molar (ξ) do composto 6-OH-BTA-0 em diferentes solventes.	43
Tabela 5.2: Valores das constantes de <i>Stern-Volmer</i> nas concentrações de 6-OH-BTA-0 500 nm e valores crescentes das diferentes formas do peptídeo beta amiloide (concentrações de 33,22 a 540 nM).....	55
Tabela 5.3: Valores das constantes de <i>Stern-Volmer</i> nas concentrações de 6-OH-BTA-0 500 nm e valores crescentes das diferentes formas do peptídeo beta amiloide, 33,22 a 540 nM.	61

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

βA_{42}	Peptídeo beta amiloide
S_0	Estado eletrônico fundamental
S_1	Primeiro estado eletrônico excitado
S_2	Estado eletrônico excitado de maior energia
T_1	Primeiro estado eletrônico tripleto
T_2	Estado eletrônico tripleto de maior energia
CI	Conversão interna
CIS	Conversão intersistemas
nm	Nanômetros
UV	Ultravioleta
pH	Potencial hidrogeniônico
DA	Doença de Alzheimer
APP	Proteína precursora da amiloide
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
AFM	Microscopia de força atômica
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
PBS	Tampão fosfato-salino
min	Minutos
DMSO	Dimetilsulfóxido
mM	Milimolar
μM	Micromolar
$^{\circ}C$	Graus celsius
RPM	Rotação por minuto
h	Horas
CCL	Comprometimento cognitivo leve

RESUMO

SILVA DE SOUZA, Marcele. **Caracterização fotofísica da sonda fluorescente 6-OH-BTA-0 e sua interação com peptídeos beta amiloide**. 2021. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O presente trabalho estudou a interação de diferentes formas do peptídeo beta amiloide A β -42 (monômero, oligômero e fibrila) com o a molécula fluorescente 2-(4-aminofenil)-1,3-benzotiazol-6-ol (6-OH-BTA-0). A molécula pura de 6-OH-BTA foi caracterizada em relação às suas propriedades fluorescentes em diferentes solventes. A produção das diferentes conformações oligoméricas do peptídeo beta amiloide foram avaliadas quanto a pureza e dispersão morfológica, utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (SEC-HPLC), eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O estudo da interação da molécula 6-OH-BTA-0 com as diferentes formas do peptídeo beta amiloide (monômero, oligômero e fibrila) foi realizado através da titulação da molécula 6-OH-BTA-0 a 500 nM, variando as concentrações das diferentes conformações do A β -42 (33,22 a 435 nM), bem como a temperatura (25, 37 e 42 °C). Foi observado na molécula 6-OH-BTA-0 uma fluorescência intrínseca com deslocamento batocrômico no espectro de fluorescência conforme a variação da polaridade e constante dielétrica do solvente. As diferentes formulações do peptídeo apresentaram estruturas de agregação com tamanho variáveis podendo chegar a centenas de nanômetro de comprimento no caso das fibrilas e 1-6 nm de diâmetro. No geral, a forma monomérica apresenta um maior conteúdo de agregados mais esféricos e a forma fibrila, um maior conteúdo de estruturas fibrilares e altamente compactadas. No estudo de interação por fluorescência, foi observado um *quenching* moderado da fluorescência da molécula 6-OH-BTA-0 devido a presença das diferentes conformações A β -42. Nas formas de oligômero e fibrila foi possível observar um *quenching* estático pela formação de um complexo sem a dependência de temperatura, os valores das constantes de afinidade de *Stern-Volmer* nas temperaturas de 25°C, 37° C e 42°C, respectivamente, na forma oligomérica foi $80,0 \pm 12,5$, $48,4 \pm 3,9$ e $42,3 \pm 2,2$, e na forma fibrilar foi $64,0 \pm 7,4$, $55,3 \pm 4,1$ e $33,7 \pm 4,3$. Já na forma monomérica foi

possível observar a influência da temperatura demonstrando um *quenching* dinâmico, as constantes de *Stern-Volmer* encontradas foi de $70,3 \pm 5,2$, $35,1 \pm 5,8$ e $75,4 \pm 18,9$.

Palavras-Chaves: benzotiazol, beta amiloide, fluorescência.

ABSTRACT

SILVA DE SOUZA, Marcele. **Photophysical characterization of the 6-OH-BTA fluorescent probe and its interaction with amyloid beta peptides**. 2021. Dissertation. Postgraduate Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The present work studied the interaction of different forms of the beta amyloid peptide A β -42 (monomer, oligomer and fibril) with the fluorescent molecule 2-(4-aminophenyl)-1,3-benzothiazole-6-ol (6-OH-BTA-0). The pure 6-OH-BTA molecule was characterized in relation to its fluorescent properties in different solvents. The production of the different oligomeric conformations of the beta amyloid peptide were evaluated for purity and morphological dispersion, using the techniques of high-performance liquid chromatography by size exclusion (SEC-HPLC), electrophoresis in polyacrylamide gels (SDS-PAGE), microscopy atomic force (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). The study of the interaction of the 6-OH-BTA-0 molecule with the different forms of the amyloid beta peptide (monomer, oligomer and fibril) was carried out by titrating the 6-OH-BTA-0 molecule at 500 nM, varying the concentrations of the different conformations of A β -42 (33.22 to 435 nM), as well as temperature (25, 37 and 42 ° C). An intrinsic fluorescence with a bathochromic shift in the fluorescence spectrum was observed in the 6-OH-BTA-0 molecule according to the polarity variation and solvent dielectric constant. The different formulations of the peptide presented aggregation structures with variable sizes, reaching hundreds of nanometers in length in the case of fibrils and 1-6 nm in diameter. In general, the monomeric form has a greater content of more spherical aggregates and the fibril form, a greater content of fibrillar and highly compacted structures. In the study of interaction by fluorescence, a moderate quenching of the fluorescence of the 6-OH-BTA-0 molecule was observed due to the presence of the different A β -42 conformations. In the forms of oligomer and fibril it was possible to observe a static quenching by the formation of a complex without the dependence of temperature, the values of the *Stern-Volmer* affinity constants at temperatures of 25 ° C, 37 ° C and 42 ° C, respectively, in the oligomeric form it was 80.0 ± 12.5 , 48.4 ± 3.9 and 42.3 ± 2.2 , and in the fibrillar form it was 64.0 ± 7.4 , 55.3 ± 4.1 e 33.7 ± 4.3 in monomeric form it was already possible to observe the influence of

temperature showing a dynamic quenching, the *Stern-Volmer* constants found were 70.3 ± 5.2 , 35.1 ± 5.8 and $75, 4 \pm 18.9$.

Keywords: benzothiazole, beta amyloid, fluorescence.

1. INTRODUÇÃO

Moléculas derivadas de estruturas de benzotiazóis são compostos já bastante estudados, principalmente por possuírem sítios ativos que permite a sua funcionalização, pela adição de grupos químicos que potencializam ações de bioatividades e aplicações farmacêuticas, bem como em desordens neurodegenerativas [1]–[3]. Por apresentarem características que atuam como sondas fluorescente, possuem emissão de comprimento de onda na faixa do infravermelho próximo, ideal para aplicações *in vivo*, afinidade com biomoléculas de atividade neural [4]. Por exemplo, a molécula Tioflavina T (ThT), sendo a molécula mais estudada para exames para o diagnóstico em tecidos *pós mortem* em pacientes com a Doença de Alzheimer (DA), possui alta afinidade aos peptídeos beta amiloide, proteína presente em pacientes que sofrem da DA em diferentes conformações durante a evolução da doença. Porém a ThT apresenta limitações de uso clínico, pela falta de detecção das diferentes conformações estruturais do peptídeo beta amiloide e também impossibilidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

Atualmente, utiliza-se o composto (^{11}C)-2-(4-(metil amino)fenil)-6-hidroxibenzotiazol (^{11}C -PIB) em exames por tomografia por emissão de prótons (PET/CT) para o diagnóstico precoce da DA. Ele apresenta alta afinidade com as fibrilas do peptídeo beta amiloide e alta seletividade comprovada, porém por se tratar de uma molécula com atividade radiológica e alto custo de produção a torna com uso limitado na rotina clínica. Portanto, estudos no desenvolvimento de análogos de hidroxibenzotiazóis torna-se promissor, levando em consideração que essa classe de moléculas, como o 2-(4-aminofenil)-1,3-benzotiazol-6-ol (6-OH-BTA-0), possui características fluorescentes que o tornam um possível biomarcador ou sonda fluorescente com potencial uso para imagens óticas [5]–[7].

Este trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar a interação da molécula 6-OH-BTA-0 na presença de diferentes formas do peptídeo beta amiloide (monômero, oligômero e fibrila) produzidas em laboratório, variando o tempo de interação e a

concentração do peptídeo, e com isso relacionar possíveis mecanismos e constantes de afinidade associadas ao novo sistema formado.

A dissertação conta com 8 capítulos, incluindo esta introdução. No capítulo 2 são apresentados o objetivo geral e objetivos específicos do trabalho. O capítulo 3 expõe a fundamentação teórica sobre o assunto abordado. O capítulo 4 apresenta a descrição das metodologias utilizadas para execução dos experimentos. No capítulo 5, são demonstrados os resultados obtidos e discussão. O capítulo 6 as conclusões obtidas neste trabalho. No capítulo 7 as perspectivas e propostas para trabalhos futuros. No capítulo 8 as referências utilizadas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar as propriedades fluorescentes da molécula 6-OH-BTA-0 e sua interação com o peptídeo beta amiloide ($A\beta$ -42) em suas formas de monômero, oligômero e fibrila.

2.1. Objetivos Específicos

- Preparar o peptídeo beta amiloide em três diferentes conformações: monômero, oligômero e fibrila;
- Caracterizar a estrutura de cada conformação do beta amiloide quanto a pureza, polidispersão e morfologia;
- Caracterizar as propriedades ópticas da molécula 6-OH-BTA-0 por espectroscopia de fluorescência, incluindo medidas resolvidas no tempo;
- Estudar a interação entre o 6-OH-BTA-0 com as diferentes formas do peptídeo beta amiloide através dos processos de *quenching* de fluorescência e da técnica de calorimetria de titulação isotérmica;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Princípios de fluorescência e seus mecanismos

A capacidade de uma molécula em absorver e emitir luz é denominada luminescência. Este fenômeno ocorre quando a molécula passa de seu estado eletrônico fundamental para um estado eletrônico excitado, através da absorção de energia, podendo ou não retornar para o estado fundamental. A energia absorvida pode ser liberada em diferentes formas, tais como processos de transição não radiativos e emissão de luz, ou até mesmo por reações fotoquímicas [8]. A luminescência é comumente dividida em duas classes, conforme o tempo de vida do seu estado excitado: a fosforescência e a fluorescência [8].

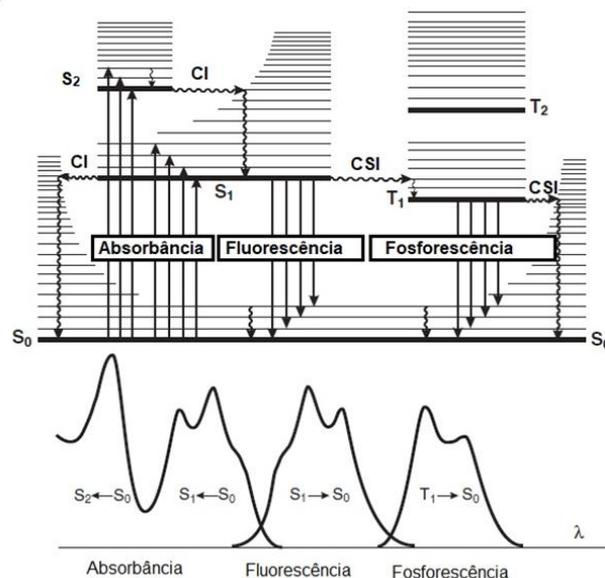


Figura 3.1: Diagrama de Jabloskin (adaptado da referência [9]).

O fenômeno de luminescência pode ser descrito através do diagrama de Jabloskin (Figura 3.1). O diagrama mostra possíveis transições a partir do estado fundamental, S_0 , para os estados eletrônicos: excitados singletos (S_1 e S_2) e tripleto

(T₁ e T₂). Nesse diagrama, exclui-se várias interações possíveis, como o processo de *quenching* ou extinção e interação com solventes. As transições entre os estados são representadas como linhas verticais. A absorção ocorre tipicamente a partir de moléculas com a menor energia vibracional, desencadeando vários processos. O fluoróforo é excitado para um nível eletrônico de energia maior (S₁ ou S₂) em transições eletrônicas HOMO-LUMO. O primeiro processo ocorre quando a energia de S₁' é parcialmente dissipada, produzindo um estado excitado singlete relaxado (S₁), a partir do qual a emissão de fluorescência é originada, o fenômeno é denominado conversão interna (CI). O segundo processo ocorre quando algumas moléculas, inicialmente excitadas, pela absorção não retornam ao estado fundamental (S₀) por emissão de fluorescência, e acabam por se encontrarem no estado S₁ e assim sofrem uma conversão de *spin* ao primeiro estado tripleto, T₁. A conversão de S₁ para T₁ é denominada de cruzamento entre sistemas (CIS), e irá produzir uma emissão denominada fosforescência, que geralmente é deslocada para comprimentos de onda mais longos em relação à fluorescência. A transição do estado T₁→S₀ é proibida, de modo que as taxas da emissão de tripletos são várias ordens de magnitude menor que as da fluorescência. Outros processos de perda de energia, como colisão, extinção e fluorescência por transferência de energia ressonante (FRET), também podem despovoar S₁ [5][7][11].

A partir destes espectros de emissão é possível definir características importantes do fluoróforo como o tempo de meia vida e o rendimento quântico. O tempo de meia vida do fluoróforo no estado excitado é definida pelo tempo médio que a molécula gasta no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental, geralmente próxima de 10 ns [8]. Enquanto o rendimento quântico da fluorescência é a razão entre o número de fótons de fluorescência emitidos e o número de fótons absorvidos. O rendimento quântico (Φ_{fl}), é dado pela equação 3.1:

$$\Phi_{fl} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3.1)$$

Onde Γ é a taxa de emissão do fluoróforo e k_{nr} é a taxa de emissão não radiativa. Sabe-se que o rendimento quântico pode estar próximo da unidade se a taxa de decaimento não radioativa for muito menor que a taxa de decaimento radiativo, ou seja, $k_{nr} \ll \Gamma$. O mesmo espectro de emissão de fluorescência é geralmente

observado independentemente do comprimento de onda da excitação, devido à dissipação parcial da energia de excitação antes do decaimento óptico [8][11].

No diagrama de Jabloskin (Figura 3.2), podem ser observados os processos responsáveis por retornar ao estado fundamental. Em particular, a taxa de emissão do fluoróforo (Γ) e sua taxa de decaimento não-radiativo para S_0 , que são agrupados em uma constante de taxa única, o K_{nr} , ambos responsáveis pela perda de energia do estado excitado [5].

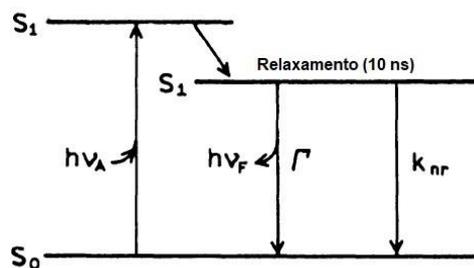


Figura 3.2: Diagrama de Jabloskin simplificado (adaptado da referência [8]).

A energia da emissão é tipicamente menor que a energia de absorção. Perdas de energia entre a excitação e a emissão são observadas em moléculas fluorescentes em solução, denominado de deslocamento do Stokes. Uma causa comum do deslocamento de Stokes é a rápido decaimento ao nível vibracional mais baixo no S_1 . Fluoróforos geralmente decaem para os níveis vibracionais mais altos de S_0 , resultando em mais perda de energia por calor, devido ao excesso de energia vibracional. Além desses efeitos, os fluoróforos podem exibir os deslocamentos de Stokes maiores devido a efeitos de solventes, estrutura molecular do fluoróforo, a temperatura, interação com outras moléculas, reações de estado excitado, formação complexa e/ou transferência de energia, entre outros [8][9]. O deslocamento de Stokes irá influenciar diretamente a sensibilidade da técnica de fluorescência, permitindo que os fótons de emissão sejam detectados de forma isolada aos fótons de excitação [11]. Observa-se que todo seu processo é cíclico, a menos que os fluoróforos sejam irreversivelmente destruídos no estado excitado por fenômenos como a fotodegradação, o mesmo pode ser repetidamente excitado e detectado, demonstrando que um único fluoróforo pode gerar muitos fótons detectáveis, sendo um atributo fundamental para a alta sensibilidade da fluorescência e seus estudos [8].

3.1.1. Mecanismos de *quenching*

Quenching ou extinção refere-se a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência emitida por um determinado fluoróforo. A extinção da fluorescência é amplamente estudada tanto como um fenômeno físico, como fonte de informação sobre interações bioquímicas.

O *quenching* pode ocorrer através de dois mecanismos principais, via a formação de complexos não fluorescentes entre o fluoróforo e a molécula inibidora (*quenching* estático) e por colisões da molécula supressora com o fluoróforo (*quenching* dinâmico). Tanto o *quenching* estático quanto o dinâmico necessitam que o fluoróforo esteja em contato com o agente extintor para que a supressão ocorra [8]. Este fato proporciona o acompanhamento de possíveis mecanismos de interações entre moléculas, por exemplo, uma determinada proteína alvo de estudo que é fluorescente e está em volta de uma membrana impermeável ao supressor não exibirá o *quenching*, tanto estático ou dinâmico. A análise deste fato irá proporcionar uma medida de permeabilidade da membrana aos supressores da proteína alvo [8]. Outras medidas como localização de fluoróforos em proteínas e acessibilidade do fluoróforo aos supressores, também são aplicações possíveis desta técnica [8][9][12][13].

3.1.1.1. *Quenching* dinâmico

No *quenching* dinâmico ou colisional, a supressão da fluorescência ocorre através do contato do agente supressor com a molécula, diminuindo a fluorescência do fluoróforo em seu estado excitado. A interação dinâmica por colisão provoca o retorno do fluoróforo ao seu estado fundamental sem a emissão de um fóton, e geralmente, sem qualquer mudança permanente na molécula. Este fenômeno é descrito através da equação de *Stern-Volmer*.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \times \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (3.2)$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente; K_q é a constante bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do agente supressor, $[Q]$ é a concentração

do agente supressor e K_D é a constante de *Stern-Volmer*, que é dada por $\tau * K_q$. A constante bimolecular irá refletir a eficiência de supressão ou a acessibilidade do fluoróforo ao supressor. Os dados obtidos através destes espectros de fluorescência são gerados a partir de um gráfico F_0/F em função de $[Q]$. Esse gráfico normalmente é linear em relação a concentração do agente supressor, mas alterações na curva podem ser observadas [8][9].

A variação de temperatura influencia neste processo, atuando como facilitador do processo de difusão entre as moléculas envolvidas, ou seja, altas temperaturas intensificam a interação observada neste fenômeno. O tempo de meia vida do fluoróforo também pode ser alterado e diminuir proporcionalmente a intensidade de fluorescência emitida [8][10].

3.1.1.2. *Quenching* estático

No *quenching* estático, a supressão da intensidade de fluorescência ocorre através da formação de um complexo entre o agente supressor e o fluoróforo, gerando uma mudança na estrutura molecular do fluoróforo, que pode ser permanente ou não. Quando esse complexo absorve energia sofrendo uma mudança em seu estado excitado, como o fluoróforo, ele irá retornar imediatamente para o seu estado fundamental, no entanto sem a emissão de um fóton. O *quenching* estático também pode ser descrito por uma equação similar a 3.2.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (3.3)$$

Onde K_S é a constante de associação. Assim como no *quenching* dinâmico, outros fatores podem influenciar na estabilidade destes complexos. A presença de variação de temperatura é um fator que causa desestabilidade nos complexos e pode interferir na formação dos mesmos impedindo a supressão, portanto a dependência da temperatura é importante. O tempo de vida é um fator determinante na diferenciação destes fenômenos, pois no *quenching* estático tem a formação de complexos não fluorescentes, isto quer dizer que apenas aquelas moléculas não complexadas serão observadas, como estas não sofrem perturbação, observa-se um tempo de meia vida constante igual a zero (τ_0) [8].

3.1.1.3. Quenching dinâmico e estático combinado

Em geral, o gráfico de *Stern-Volmer* linear demonstra apenas um grupo de fluoróforos presentes. No entanto, quando se tem mais de um grupo de fluoróforo presente não se observa mais uma curva de *Stern-Volmer* linear, e sim um gráfico com tendência côncava em direção ao eixo y, além de possíveis alterações, demonstrada na equação 3.4:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app} [Q] \quad (3.4)$$

Onde $K_{app} = (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2$ depende da concentração do agente supressor. Essa forma modificada da equação de *Stern-Volmer* é de segunda ordem em $[Q]$, o que explica a curvatura ascendente observada quando se tem o *quenching* estático e dinâmico para o mesmo fluoróforo. Esta equação permite que a separação das constantes K_D e K_S , demonstrado através de um gráfico de K_{app} versus $[Q]$, com uma linha reta e uma interceptação de $K_D + K_S$ e uma inclinação de $K_D K_S$, demonstrado na Figura 3.3 [8][10].

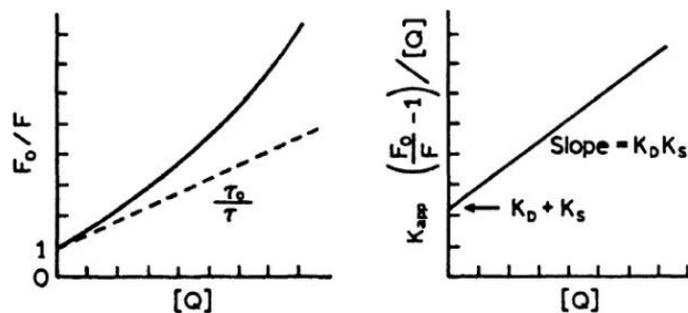


Figura 3.3: *Quenching* dinâmico e estático na mesma população de fluoróforos.[8]

Desse modo o uso da Equação 3.5 para observar o acesso da população ao agente supressor é dada por [10]:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (3.5)$$

Onde K_a é a constante de supressão de *Stern-Volmer* da fração acessível, $[Q]$ é a concentração de supressor e f_a é a fração da fluorescência inicial acessível ao supressor, dada por:

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b} + F_{0a}} \quad (3.6)$$

Onde F_{0a} e F_{0b} são as intensidades de fluorescência totais na ausência do supressor dos fluoróforos acessíveis e inacessíveis, respectivamente, permitindo calcular a acessibilidade total ao agente supressor.

Como descrito anteriormente o estudo da fluorescência e os resultados possíveis com as aplicações dos fenômenos de *quenching* são diversos, como no uso de localização e diferenciação de grupos proteicos dentro de um complexo variado [9] [10], caracterização de estruturas e interações moleculares diversas [14], síntese de complexos utilizados em estudos de DNA [15], caracterização de moléculas promissoras de diagnóstico para doenças como Parkinson e Alzheimer [16], entre outros [6][13].

3.1.2. Moléculas fluorescentes

As moléculas com propriedades fluorescentes, chamadas fluoróforos, são moléculas capazes de absorvem radiação no ultravioleta ou visível, e liberaram esta energia na forma de luz. Muitas moléculas absorvem radiação, no entanto não possuem o mecanismo de fluorescência. A rigidez da molécula, para que tenha menor perda de energia não radiativa, o que aumenta as transições radiativas; a estrutura da molécula, a conjugação de elétrons π , e seus grupos funcionais substituintes [17].

Os fluoróforos normalmente contém grupos aromáticos conjugados, moléculas planares ou cíclicas com várias ligações π conjugadas, e são divididos em duas classes: os de fluorescência intrínseca e extrínseca.

Os de fluorescência intrínseca são aqueles que ocorrem naturalmente, incluindo os aminoácidos aromáticos, flavinas oxidadas e derivados de piridoxal e clorofila. Os fluoróforos extrínsecos são geralmente adicionados à amostra para fornecer fluorescência ou para alterar suas propriedades fluorescentes. Dentre eles podemos destacar as moléculas de fluorescência extrínseca a fluoresceína e a

rodamina [8]. Ambos são utilizados em diversas áreas de estudo/diagnóstico biomédico, como estudos de marcação molecular e imunofluorescência, em técnicas analíticas e em estudos de interação de sistemas [8][11][18].

As sondas fluorescentes são moléculas utilizadas principalmente com o intuito de obter resposta a um estímulo específico ou para ser direcionada a uma região específica de uma amostra biológica [19][20]. Para que estas sondas sejam adequadas para aplicações biomédicas, algumas propriedades são necessárias. Isso inclui a intensidade luminescente, um espectro de emissão com comprimento de onda alto (600-900nm), ou seja, livre de interferência causada pela fluorescência intrínseca dos tecidos, um alto deslocamento de Stokes, (para uma separação adequada da luz de excitação e emissão) além de boa fotoestabilidade e resistência a degradação em sistemas biológicos [4][11].

A escolha destas moléculas fluorescentes ocorre a partir de mudanças observadas em seus espectros de absorção/emissão, intensidade de fluorescência ou tempo de vida, quando interagem com outras moléculas específicas. Ou seja, essas mudanças podem ser quantificadas em função da concentração do analito, funcionando como uma sonda marcadora. Este fenômeno pode ocorrer por aumento ou diminuição da intensidade de fluorescência, formação de complexos da sonda e o analito, ou por transferência de energia (FRET). Estas modificações na intensidade de fluorescência e no tempo de meia vida são as principais bases para seu uso analítico [18].

Os fluoróforos mais estudados e utilizados em técnicas de diferenciação por espectroscopia de fluorescência são os que apresentam fluorescência intrínseca, alguns pertencentes à classe de moléculas aromáticas. Isso ocorre devido ao grupo indol, juntamente com o triptofano (aminoácido encontrado nas proteínas), presente nesta classe de moléculas que lhe concede as propriedades necessárias para aplicações biológicas. Alguns exemplos estão apresentados na Figura 3.4. Dentre estas moléculas apresentadas, destaca-se a molécula quinina, presente na água tônica, a fluoresceína, utilizada em imagens biomédicas e a laranja de acridina, utilizadas em ensaios citopatológicos [5][7][19].

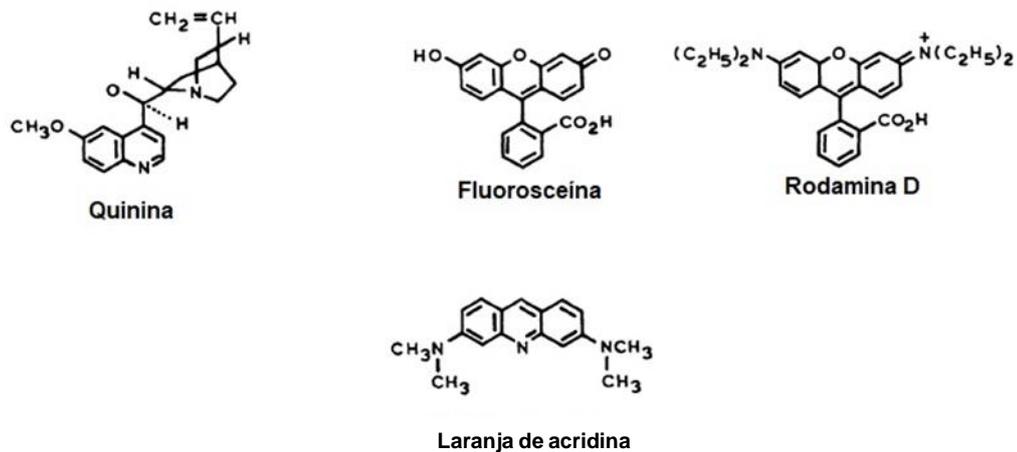


Figura 3.4: Estruturas de substância fluorescentes (adaptado da referência [8]).

3.2. Benzotiazóis e aplicações biomédicas

O benzotiazol é um composto heterocíclico composto por um anel aromático ligado a um anel tiazol, um heterocíclico que contém um átomo de nitrogênio e um de enxofre na sua estrutura (Figura 3.5). Essas moléculas são sintetizadas usualmente por via de condensação bimolecular de aminotiofenóis com aldeídos, ácidos carboxílicos ou cloretos de ácido [1].

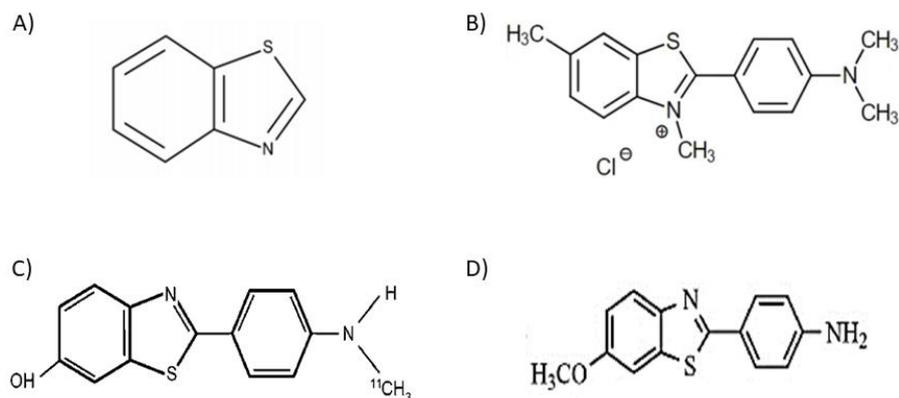


Figura 3.5: Estrutura química do benzotiazol e seus derivados. A) benzotiazol, B) Tioflavina T, C) PIB e D) 6-OH-BTA-0 (adaptado das referências [3][21][7]).

Os derivados de benzotiazol são estruturas utilizadas como base para formação de estruturas moleculares maiores com sítios bioativos que permite a sua funcionalização [1]. Em sua grande maioria com ações bioativas e aplicações

farmacêuticas para o tratamento de diabetes, tumores e inflamação [1]. Com a descoberta do Riluzole (6-trifluorometoxi-2-benzotiazolamina) como interferente de mecanismos bioquímicos na neurotransmissão do glutamato, diversos benzotiazóis vem sendo estudados como agentes antibacterianos e antivirais, e ainda em estudos de desordens neurodegenerativas [2][3][22].

Nos estudos de desordens neurodegenerativas, benzotiazóis têm sido usados como moléculas para diagnóstico, pois seus derivados possuem características promissoras como sondas fluorescentes *in vivo*. As características essenciais são: (1) emissão comprimento de onda acima de 650 nm, para minimizar a fluorescência de fundo de tecidos cerebrais; (2) afinidade de ligação com o peptídeo beta amiloide; e (3) alteração da emissão de fluorescência após interação [1][23].

Dentre os derivados de benzotiazóis mais utilizados, têm-se a Tioflavina T, sendo a mais utilizada em análises de espectroscopia de fluorescência *in vitro* e ensaios para a confirmação da Doença de Alzheimer (DA) em tecidos *pós mortem*, com melhor desempenho do que moléculas como o vermelho de congo e crisamina G [24][25]. A Tioflavina T (ThT) é uma molécula derivada da 2-arilbenzotiazóis e aumenta drasticamente sua emissão de fluorescência na presença de peptídeos beta amiloide. O efeito fotofísico perante a ligação do complexo ThT com o peptídeo beta amiloide ainda é muito discutido. A hipótese mais aceita atualmente para a mudança do efeito fotofísico desta interação é que o mesmo ocorre por um fenômeno de rotação molecular, na qual a ThT após ligar-se ao peptídeo beta amiloide sofre uma torção, modificando sua conformação e passando a fluorecer [26]. Apesar de possuir uma grande afinidade com os agregados beta amiloides, a ThT possui limitações de uso clínico mas é a precursora de diversos compostos usados hoje para o diagnóstico em *in vivo* de paciente com DA. Dentre eles, destacam-se os compostos (¹⁸F)-2-(1-(2-(N-(2-fluoroetil)-N-metilamino)naftaleno-6YL)-etileno) malononitril, conhecido por (¹⁸F)FDDNP, e o composto (¹¹C)-2-(4-(metilamino)fenil)-6-hidroxi-benzotiazol, conhecido como (¹¹C)-6-OH-BTA-1 ou Pittsburgh Compound B (PIB) [5][27][23][28][29].

O PIB é considerado atualmente o padrão ouro no diagnóstico da DA em combinação com o diagnóstico clínico [5]. Estudos com a molécula PIB, em técnicas de tomografia por emissão de prótons (PET/CT) e fluorescência demonstraram possuir uma alta sensibilidade e afinidade as placas beta amiloides e rápida captação pelo cérebro [30][31]. No entanto, o PIB possui algumas limitações para diagnóstico

precoce por não diferenciar as formas primárias (monômeros e oligômeros) do peptídeo beta amiloide encontrado no início da DA e também para uso diário na rotina clínica, devido o tempo de meia vida curta do carbono 11 e o alto custo de produção do radioisótopo, tendo em vista a necessidade de um ciclotron. Desta forma estudos complementares são realizados afim de obter modificações na molécula ligada ao carbono 11 (6-OH-BTA-1), no marcador nuclear, ou na técnica de utilizada para aquisição de imagem, entre outros [27][28][31][32].

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver análogos do PIB, dentre eles destacam-se as moléculas 6-OH-BTA, com estrutura semelhante ao PIB, sem o radioisótopo (carbono 11) (Figura 3.5, D), assim como muitos derivados de benzotiazol possui uma fluorescência intrínseca promissoras para detecção via imagens ópticas [6][7][23][32][33]. O PIB apresenta afinidade ao peptídeo beta amiloide maior que a ThT quando coradas em tecido *pós-mortem* e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica [6][23][32][33].

3.3. Beta amiloide e sua relevância na Doença de Alzheimer

As doenças neurodegenerativas são patologicamente caracterizadas pelo acúmulo de proteínas em locais vulneráveis do cérebro, gerando lesões em regiões como hipocampo, subículo e córtex entorrinal, podendo chegar a 60% de deterioração em estágios mais avançados, como no caso da Doença de Alzheimer (DA) [16][34][35][36][37].

Atualmente, duas vias são ditas como as responsáveis pelas alterações histopatológicas observadas no cérebro dos pacientes com DA. A primeira é a formação dos emaranhados neurofibrilares que está associada a mutações na proteína Tau hiperfosforilada, reduzindo sua afinidade pela tubulina, proteína dos microtúbulos, levando a degradação do microtúbulo [34]. Já na segunda temos o mecanismo de formação das placas senis compostas pelas proteínas beta amiloides.

A hipótese mais aceita como mecanismo de formação das placas senis é da cascata amiloidal, que descreve que as placas são derivadas a partir de uma anomalia no processo de clivagem da proteína precursora da beta amiloide, produzindo peptídeos de 40 e 42 aminoácidos. A forma do peptídeo A β -42 (contendo 42 aminoácidos) é a forma mais tóxica e agressiva gerada na DA. Em sua forma

monomérica possui a capacidade de formar agregados de proteínas devido características como alta hidrofobicidade, alta propensão para converter da estrutura α -hélice em β -folha e baixa carga líquida, proporcionando um ambiente favorável para a agregação e formação das placas senis no tecido cerebral [38][39][40].

Agregados de forma globulares conectam-se para formar as protofibrilas, que aparecem como glóbulos de 2,5 a 5 nm de diâmetro, e com uma tendência intrínseca de se agruparem em estruturas tubulares e anelares semelhantes a poros (Figura 3.6).

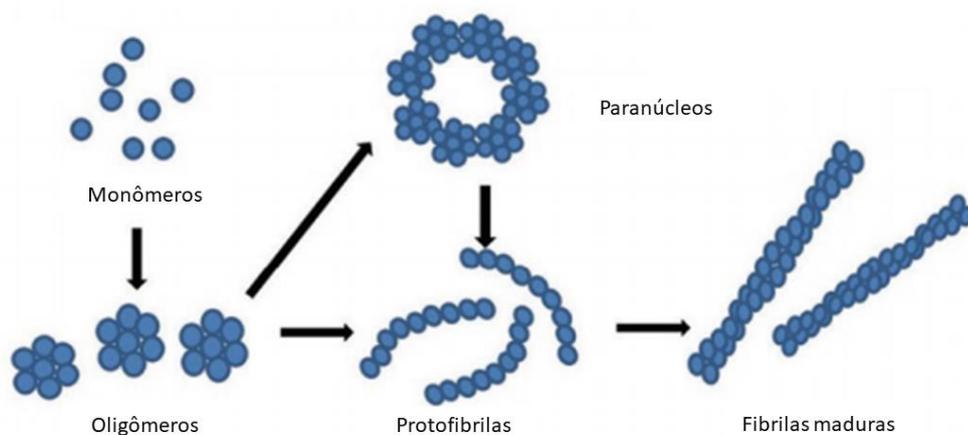


Figura 3.6: Estruturas esperadas em cada forma de agregação do peptídeo beta amiloide (A β -42) (adaptado referencia [41]).

A precursora das fibrilas maduras, a protofibrila possui uma característica de sensibilidade a concentração de A β , interações iônicas e temperatura, com tamanhos variados de 6 a 9 nm de diâmetro [42]. Após a formação do núcleo de agregação, no fim do período de alongamento, acredita-se então que o crescimento das fibrilas maduras prossiga por associação de protofibrilas, monômeros e oligômeros com o núcleo (Figura 3.7), essa é a última forma descrita antes da formação das placas senis [43][44].

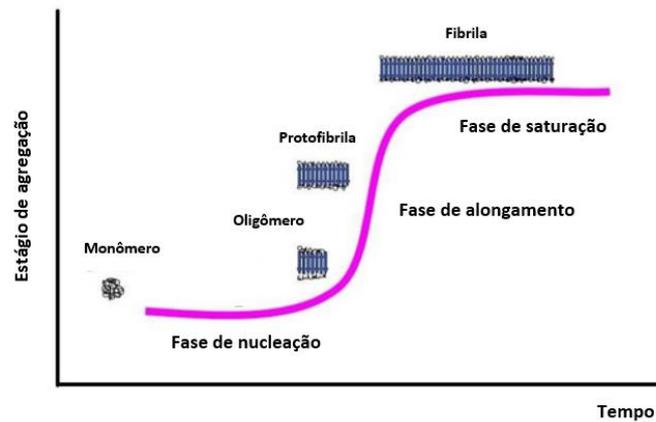


Figura 3.7: Cascata de agregação do peptídeo beta amiloide, adaptado da referência [43].

A caracterização do processo de formação dos agregados do peptídeo beta amiloide foi um grande feito e têm sido o foco de diversos estudos científicos, devido a sua importância no diagnóstico e na compreensão de seus estágios iniciais [8]. Em 2011, as organizações *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Strokes* (NINCDS) e pelo *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA), reconhecendo que o acúmulo dos peptídeos beta amiloides resultante nas lesões anatomopatológicas típicas iniciam anos antes do aparecimento dos sintomas, levaram a reavaliação das diretrizes de diagnóstico da doença, incluindo assim as fases assintomáticas e os biomarcadores. Por exemplo o acúmulo dos peptídeos beta amiloide no exame de imagem por PET com sinais de positividade do mesmo como o ^{18}F -Fluorodeoxiglicose (FDG) e redução no líquor, atrofia no hipocampo em exames de ressonância magnética (RMN) e aumento da proteína Tau hiperfosforilada no líquor [34].

No entanto, o diagnóstico da DA segue sendo prioritariamente clínico, tornando o estudo com os biomarcadores uma das formas mais importante para aperfeiçoar a detecção das fases iniciais da doença.

Nesse trabalho, iremos estudar a interação entre o análogo 6-OH-BTA-0 sintetizado via condensação direta entre 2-aminotiofenol gerado *in situ* a partir da clivagem de dissulfeto e ácidos carboxílicos [33] com diferentes formas do peptídeo beta amiloide por espectroscopia de fluorescência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo será dedicado à descrição dos materiais, equipamentos, procedimentos e análises realizadas no desenvolvimento do trabalho.

4.1. Materiais

Na parte experimental, foram utilizados reagentes e equipamentos descritos nas tabelas 4.1 e 4.2, com suas respectivas especificações técnicas.

Tabela 4.1. Reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula química	Procedência
Acetato de etila	$C_4H_8O_2$	Merck
Acetato de uranila 2%	$UO_2(CH_3COO)_2$	Merck
Água ultrapura	H_2O	Sistema Milli-Q
Álcool etílico 70%	CH_3CH_2OH	Merck
Clorofórmio	$CHCl_3$	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	C_2H_6OS	Sigma-Aldrich
Etanol	C_2H_6O	Sigma-Aldrich
Tampão fosfato-salino (PBS)	$NaCl, KCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4$	Sigma-Aldrich
Ácido trifluoroacético (TFA)	$C_2HF_3O_2$	Merck
Acrilamida	C_3H_5NO	Merck
Azul de coomassie	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Merck
Glicerol	$C_3H_8O_3$	Merck
Tris 1M	$C_4H_{11}NO_3$	Merck
Ditiotreitol 4M	$C_4H_{10}O_2S_2$	Merck
Dodecil sulfato de sódio 10% (SDS)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	Merck

Acetonitrila	C ₂ H ₃ N	Merck
Beta amiloide (1-42)	C ₂ O ₃ H ₃₁₁ N ₅₅ O ₆₀ S	Sigma-Aldrich
2- (4-aminofenil) -1,3-benzotiazol-6-ol	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ OS	Laboratório de Fotoquímica Orgânica Aplicada- UFRGS

Tabela 4.2. Equipamentos utilizados.

Equipamento/utensílio	Modelo	Marca
Centrifuga	KC5 – 40 kHz	Kindly
Espectrômetro de infravermelho	Spectrum One	Perkin Elmer
Espectrômetro de fluorescência	LS 55	Perkin Elmer
Estufa	305	Lab-LINE
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	UltiMate3000	DIONEX
Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	iTC200	MicroCal, Inc., GE Healthcare
Microscópio de força atômica (AFM)	Icon PT-PKG	Bruker
Microscópio eletrônico de transmissão (TEM)	Tecnai G2 20 X-TWIN	FEI CompanyTecnai
Cuba de eletroforese		Bio-rad

4.2. Síntese da molécula 6-OH-BTA-0

A molécula 2-(4-aminofenil)-1,3-benzotiazol-6-ol (6-OH-BTA-0) foi sintetizada de acordo com o protocolo de Coelho [33]. A molécula foi produzida no Laboratório de Fotoquímica Orgânica Aplicada-UFRGS (Profa. Dra. Leandra F. Campo). A Figura 4.1 mostra a rota utilizada para síntese da molécula 6-OH-BTA-0.

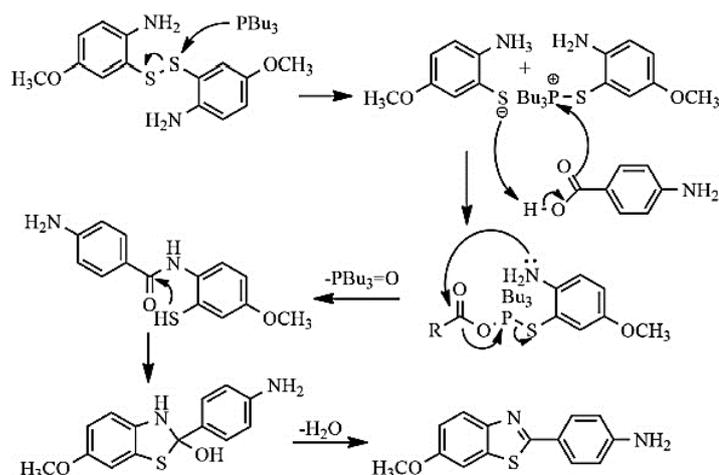


Figura 4.1: Rota simplificada da síntese da molécula 6-OH-BTA-0. Adaptada referência.[33]

4.3. Produção das diferentes conformações dos peptídeos de beta-amiloide

O peptídeo β A-42 foi preparado em suas diferentes formas: monômero, oligômero e fibrila; seguindo as instruções do fabricante e protocolo de Cunvong et al [45]. Inicialmente, o β A-42 foi dissolvido em solução de DMSO até uma concentração final de 1 mM e diluído com água a 10 μ M (DMSO a 0,25% em água). Para evitar a agregação de β A-42 na forma protofibrila, a solução foi mantida a uma temperatura máxima de 28 °C e o pH foi ajustado para 7,0.

A solução anterior foi incubada por 5 dias a 37 °C para preparar uma solução composta, principalmente por oligômeros, conforme descrito por Cameron et al. e depois congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -20 °C [46].

Para preparar a solução enriquecida com fibrilas, a preparação original com monômeros foi incubada em um agitador (800 rpm) a 23 °C por 36 h, depois centrifugada (10 min, a 15000 g), congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -20 °C [47].

4.4. Métodos de caracterização

4.4.1. Medidas de fluorescência

Foram analisadas as propriedades de absorção e emissão da molécula fluorescente 6-OH-BTA-0 em diferentes solventes (acetona, acetato de etila, clorofórmio, etanol e tampão PBS). Os espectros de emissão foram obtidos em PBS em três variações de temperatura (25, 37 e 42 °C). Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro LS 55-Perkin Elmer um intervalo de comprimento de onda de 350-500 nm e comprimento de onda de excitação de 340 nm.

O rendimento quântico (Φ_{fl}) da molécula 6-OH-BTA-0 (na concentração de 500 nM em PBS) foi calculado a partir dos espectros de absorção e emissão, conforme a equação 4.1: [48]

$$\Phi_{fl} = \frac{A_{ref} \times F_{solvente} \times n_{solvente}^2}{A_{solvente} \times F_{ref} \times n_{ref}^2} \times \Phi_{ref} \quad (4.1)$$

Onde A é a absorbância, F é a área sob a curva de emissão de fluorescência e n é o índice de refração do PBS [49][50]. O coeficiente de absorvidade também foi calculado na molécula 6-OH-BTA-0 na concentração de 500 nM em tampão PBS.

Para a medida de estabilidade da emissão da molécula em função do tempo, a molécula 6-OH-BTA-0 foi preparada em uma cubeta, na concentração fixa de 500 nM (em solvente PBS), os espectros de emissão foram obtidos em uma variação de tempo (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 30; 40 min), em três temperaturas (25, 37 e 42 °C).

4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (SEC-HPLC)

Alíquotas das formas conformacionais (monômero, oligômero e fibrila) do peptídeo beta amiloide foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho de exclusão por tamanho acoplada ao detector de UV (SEC-HPLC) (Äkta Purifier GE). A análise SEC-HPLC foi realizada usando uma coluna Superdex 200 HR 10/300, a uma vazão de 0,5 mL/min, utilizando Fosfato de Sódio 20 mM + 150 mM de NaCl pH=7,2 como fase móvel. Uma curva de calibração foi construída utilizando os kits de calibração de alto e baixo peso molecular (Gel Filtration Calibration Kit HMW e LMW - GE Healthcare). Uma regressão linear foi feita baseada no

coeficiente de partição (K_{av}) e no logaritmo do peso molecular dos padrões utilizados.

[51] O K_{av} foi calculado a partir da equação abaixo:

$$K_{av} = \frac{v_e - v_0}{v_c - v_0} \quad (4.2),$$

Onde v_e é o volume de eluição da amostra, v_0 é o volume morto da coluna v_c e o volume total de eluição da coluna. As diferentes amostras sintetizadas foram injetadas individualmente e seu peso molecular foi calculado a partir da regressão linear obtida na curva de calibração.

4.4.3. Eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Adicionalmente, uma análise por eletroforese em géis de poliacrilamida pelas técnicas de SDS-PAGE convencional e não desnaturante foram escolhidas porque permite visualizar simultaneamente os peptídeos em estudo com os seus respectivos tamanhos em solução, e estimar o tamanho aproximado de cada amostra (monômetro, oligômero e fibrila). O gel de SDS-PAGE convencional utiliza sódio dodecil sulfato (SDS), um agente que rompe a estrutura quaternária da proteína enquanto o gel não desnaturante não utiliza essa substância. Ambos os testes foram realizados utilizando uma alíquota de 20 μ L de cada amostra foi adicionada a 5 μ L de tampão de amostra 5X, e submetida em géis de poliacrilamida de 0,75 mm de espessura (12% de acrilamida). Os géis foram corridos a 80–100 V e corados com azul de coomassie [51].

4.4.4. Microscopia de força atômica (AFM)

A análise topográfica de alíquotas do peptídeo beta amiloide nas conformações de monômero, oligômero e fibrila depositadas sobre mica foram realizadas em um microscópio de Força Atômica (Bruker, modelo *Dimension icon*), operando no modo de *Peak Force Tapping* e *Peak Force QNM*, no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM-PUCRS). Foram utilizadas sondas *Sharp Nitride Lever* (SNL) da Bruker, em varredura de 256 linhas em campo de 500 nm e 5 μ m e taxa de

escaneamento de 0.50Hz/l. As amostras foram preparadas na concentração de 20 μ M de 6-OH-BTA-0 em PBS, depositadas em um volume de 50 μ L em mica, deixado em fixação por 24 h.

4.4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram empregados a fim de caracterizar estrutura e tamanho das formas monômero, oligômero e fibrila do peptídeo beta amiloide. Para a obtenção das imagens foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão, modelo Tecnai G2 20 X-TWIN, marca FEI CompanyTecnai, na tensão de 200 kV, e as imagens foram adquiridas por uma câmera Eagle, 2K, no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM-PUCRS).

As amostras foram preparadas pela técnica de exame direto por contrastação negativa (*negative staining*), depositadas em *grids* de cobre (300 mesh). Foram depositados 20 μ L das amostras, deixando 1 min em contato com o *grid* e retirando o excesso com uso de papel filtro. Após o tempo, utilizamos como contraste negativo o acetato de uranila em solução aquosa 2%, deixando 1 min e retirando o excesso após o tempo. As amostras preparadas foram mantidas em dessecador à vácuo até o momento da análise.

4.5. Estudo da interação dos peptídeos beta amiloide com a molécula 6-OH-BTA-0

O estudo de interação da molécula 6-OH-BTA-0 com as diferentes formas estruturais do peptídeo beta amiloide (monômero, oligômero e fibrila) foram avaliadas pelo método de titulação por supressão de fluorescência e por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

4.5.1. Estudo de interação por fluorescência

No método de titulação por supressão de fluorescência, foram preparados um volume fixo de 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (pH 7,0; 3 mL; 500 nM) e adicionados alíquotas do peptídeo (10-40 μ L) até a concentração desejada. Após, foi realizado um estudo onde foi preparado um volume fixo contendo 6-OH-BTA-0 (500 nM) e o

peptídeo beta amiloide (540 nM) em tampão PBS (pH 7,0; volume final de 3 mL). Os espectros de emissão foram obtidos em função do tempo (0,5; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50 min), utilizando o comprimento de onda de excitação de 340 nm. Em seguida, uma análise com intervalo de tempo fixo e volume fixo de 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (pH 7,0; 3 mL; 100 nM) foi titulado com concentrações variadas das diferentes formas do peptídeo beta amiloide (10-40 μ L, na concentração inicial de 20 μ M).

4.5.2. Estudo de interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

No teste de afinidade de ligação da interação entre as diferentes formas do peptídeo beta amiloide (monômero, oligômero e fibrila) e a molécula 6-OH-BTA-0 por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Utilizou-se duas células: a de referência (carregada com 200 μ L do solvente água) e a célula de amostra (preenchida com 200 μ L de 6-OH-BTA-0 2 μ M e 5 μ M). As titulações foram realizadas na faixa de temperatura de 25 e 37 °C, a reação de ligação foi iniciada com uma injeção de 2 e 3 μ L do peptídeo beta amiloide (20 μ M em água), seguida de 19 injeções de 1 μ L em intervalos de 300 s, chegando a um volume final injetado de 30 μ L com uma velocidade de agitação de 500 rpm, na forma monomérica. Titulações-controle foram realizadas para subtrair o calor de diluição e de mistura para cada experimento.[52][53] O experimento foi realizado sob pressão constante, utilizando-se o microcalorímetro iTC200 (MicroCal, Inc., GE Healthcare).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos das propriedades fotofísicas do composto 6-OH-BTA-0 e a interação com diferentes solventes. Em seguida, serão abordadas as características estruturas e morfológicas das diferentes formas do peptídeo beta amiloide. E por fim, os resultados da interação da molécula 6-OH-BTA-0 com as diferentes formas do peptídeo beta amiloide com a variação de tempo e a temperatura.

5.1. Propriedades fotofísicas do 6-OH-BTA-0

5.1.1. Medidas de fluorescência

A molécula 6-OH-BTA-0 apresentou fluorescência intrínseca resultante da conjugação de ligações π e da protonação do grupo amino, que leva a uma reorganização eletrônica estrutural e a formação de uma estrutura quinóide. O grupo amino presente ocasiona uma perturbação no estado excitado (LUMO) de forma que a transição π - π^* tenha um caráter de transferência de carga [54]–[56].

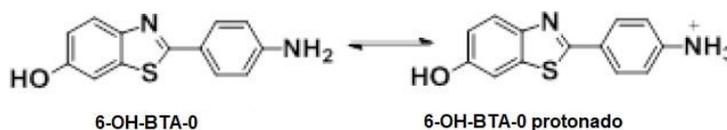


Figura 5.1. Molécula 6-OH-BTA-0 protonada.

A Figura 5.2 apresenta o espectro de absorção e emissão da molécula pura 6-OH-BTA-0 na presença de diferentes solventes: acetona, acetato de etila, clorofórmio, etanol e PBS.

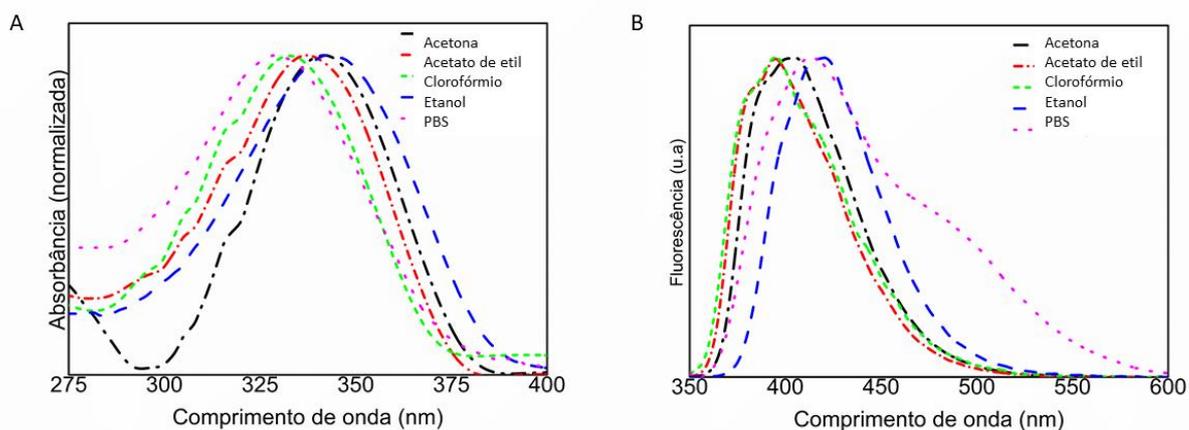


Figura 5.2: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da molécula 6-OH-BTA-0 na concentração de 500 nM, na presença de diferentes solventes: acetona, acetato de etila, clorofórmio, etanol e PBS. Em (B) $\lambda_{\text{abs}}=340$ nm.

O comprimento de onda máximo de absorção da molécula 6-OH-BTA-0, conforme a Tabela 5.1, apresentou um deslocamento no espectro para a região do vermelho (deslocamento batocrômico), conforme a polaridade do solvente, com exceção do tampão PBS. Da mesma forma, observou-se que o comprimento de onda máximo de emissão também apresentou um deslocamento batocrômico, seguindo de valores crescentes das constantes dielétricas para clorofórmio > acetato de etila > acetona > etanol, com exceção do tampão PBS, o que pode também ser observado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Valores de constante dielétrica, viscosidade, comprimentos de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e fluorescência (λ_{fl}), rendimento quântico (Φ_{fl}) e coeficiente de absortividade molar (ξ) do composto 6-OH-BTA-0 em diferentes solventes.

Solvente	Constante dielétrica	Viscosidade (cP)	λ_{abs} (nm)	λ_{fl} (nm)	Φ_{fl}	ξ ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Clorofórmio	4,8	0,55	334	395	0.060	6120
Acetato de etila	6	0,45	339	394	0.018	7740
Acetona	21,4	0,33	342	405	0.019	5040
Etanol	24	1,11	344	419	0.017	5440
Tampão PBS	80	0,904	330	414	0.033	2060

O aumento da polaridade dos solventes na presença da molécula 6-OH-BTA-0 afetou sua energia no estado excitado. A energia relativa do estado excitado após a fluorescência encontrou-se diferente do que era durante no espectro de absorção, diminuindo a energia interna no estado excitado, ocasionando assim o deslocamento do comprimento de onda de emissão para o vermelho [57][58]. No tampão PBS foi possível observar um ombro em 470 nm no espectro de emissão. Este comportamento pode ter ocorrido devido à protonação do grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) (Figura 5.1) [56][59][60].

Como observado, a diferença de polaridade dos solventes influencia o comportamento fluorescente das moléculas. Estes efeitos podem decorrer devido a interações de forças intermoleculares entre o soluto e solvente, ocorrendo as variações obtidas nos espectros de absorção e emissão, o que foi observado nos valores obtidos do índice de refração, viscosidade e constante dielétrica, e consequentemente do rendimento quântico, descritos na Tabela 5.1. Conforme descrito na literatura o aumento da viscosidade e da polaridade do solvente influencia nos valores de rendimento quântico, diminuindo-o [18].

O rendimento quântico da molécula fluorescente demonstrou variações de comportamento, podendo haver diferentes interações intermoleculares entre o próprio solvente e soluto, bem como decorrência no deslocamento e formato das bandas, variações no rendimento quântico, entre outras [58]. Era esperado um rendimento quântico maior, conforme a polaridade e viscosidade do solvente, como observado no tampão de PBS. No entanto, o rendimento máximo observado para o clorofórmio, isso pode ocorrer devido às diferentes interações do composto com o meio e os processos de fluorescência e a concentração do fluoróforo [48].

Foi realizado um estudo mais aprofundado da molécula fluorescente 6-OH-BTA-0 pura na presença do solvente PBS, pois foi o mesmo meio utilizado para a preparação dos peptídeos beta amiloide. O comportamento de fluorescência da molécula 6-OH-BTA-0 dissolvida em PBS, em três temperaturas diferentes (25, 37 e 42 °C), também foi analisada e seus espectros são apresentados na Figura 5.3. Medidas temporais realizadas a fim de verificar a estabilidade do sinal também apresentadas na Figura 5.3. D.

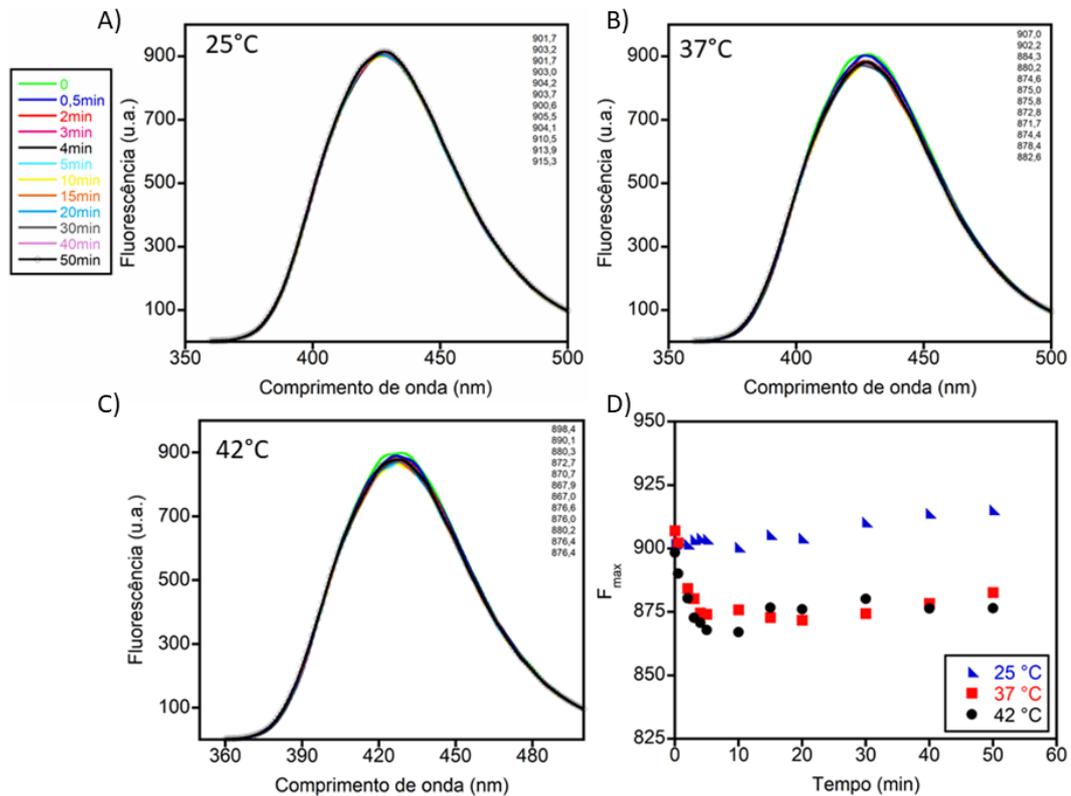


Figura 5.3. Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-0 puro (500 nM, em PBS) em função do tempo (0- 50 min) nas temperaturas de A) 25 °C, B) 37 °C, C) 42 °C e D) gráfico da intensidade máxima da fluorescência em função do tempo, nas três temperaturas: 25, 37 e 42 °C.

Observa-se na Figura 5.3, que os valores de intensidade máxima de fluorescência variam pouco com a temperatura. Contudo, há um leve decaimento da intensidade para as temperaturas de 37 °C e 42 °C, de aproximadamente 3%, na qual se estabiliza após 10 minutos de espera, indicando o período de estabilização da molécula e processos de *autoquenching* no meio aquoso. Portanto, foi proposto o tempo de espera de 10 minutos para a estabilização e coleta dos espectros nos experimentos de interação com as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide descritos na seção 5.3.1.

5.2. Caracterização das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide

Para caracterização das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide em monômero, oligômero e fibrila, foram empregadas as técnicas de: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia de transmissão eletrônica (TEM) a

fim de diferenciar as diferentes conformações quanto a peso molecular, pureza, conformação estrutural, morfologia e processo de agregação.

5.2.1. Caracterização por peso molecular e pureza

O SEC-HPLC por gel de filtração foi empregado a fim de determinar a massa molar e pureza de cada uma das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide. A Figura 5.4 mostra o cromatograma, onde o pico de emissão (linha rosa) representa o momento em que ocorre a passagem do peptídeo pelo poro que corresponde ao valor do volume de eluição no eixo x, das formas de monômero e oligômero pela coluna do SEC-HPLC. Através de uma curva de calibração e a relação entre o volume de eluição de cada amostra e o seu tamanho, descrito pela Equação 4.2, foi possível calcular o tamanho aproximado do composto em cada uma das formas conforme descrito na seção 4.4.2.

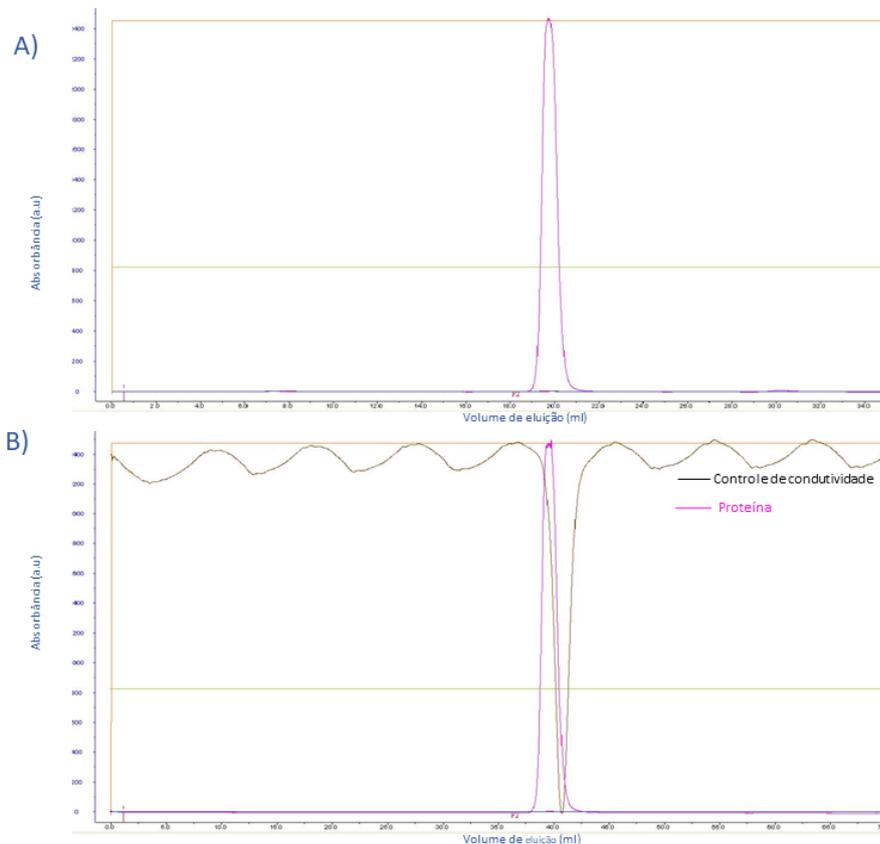


Figura 5.4: Cromatograma do volume de eluição das diferentes formas do peptídeo beta amiloide por SEC-HPLC. A) monômero B) oligômero, concentração 20 μ M.

Esta técnica permite separar os peptídeos através de poros com diferentes tamanhos na coluna. Os peptídeos menores têm um volume de eluição maior, ou seja, demoram mais para sair da coluna, pois penetram nos poros que constituem a coluna, enquanto que proteínas maiores passam pela coluna, sem entrar nesses poros e eluem mais rapidamente. O controle da técnica foi realizado por leituras de absorvância do peptídeo em um comprimento de onda fixo de 215 nm. As diferentes conformações do peptídeo beta amiloide obtiveram o mesmo volume de eluição de 19,71 mL (os dados da fibrila não foram apresentados na Figura 5.4). Este volume é maior do que a menor proteína do kit de calibração, a Aprotinina que possui um volume de eluição de 18,2 mL e peso molecular de 6,5 kDa. Foi calculado a constante de participação e o peso molecular aproximado de cada uma das formas através da regressão linear. Como o volume foi igual para todas as conformações o peso molecular encontrado também foi o mesmo. O coeficiente de participação das diferentes formas foi de $K_{av} = -0,2875 \log MW + 0,9054$, e o peso molecular para as diferentes formas do peptídeo foi de aproximadamente 3,16 kDa. Este valor é menor do que o descrito pelo fabricante, de 4,51 kDa. Esta diferença pode ter ocorrido por diferença de calibração da curva, escolha do solvente para fase móvel utilizada e coluna, e ainda o tempo de retenção da coluna, estes fatores podem ter influenciado no processo de agregação nas conformações do oligômero e fibrila, devido seu tipo de ligação e tamanho esperado [41].

Esta técnica possui limitações devido aos efeitos da forma do peptídeo no volume de eluição, bem como as interações inespecíficas entre a proteína de estudo e a própria matriz da coluna. Estes parâmetros não puderam ser otimizados devido à restrições de acesso aos laboratórios devido à pandemia do Covid [61].

A técnica de SDS-PAGE convencional e não desnaturante foi utilizada a fim de visualizar simultaneamente as diferentes conformações do peptídeo (monômero, oligômero e fibrila) em estudo com os seus respectivos tamanhos em solução, sem desestabilizar a estrutura quaternária e estimar o tamanho aproximado de cada, conforme apresentado na Figura 5.5.

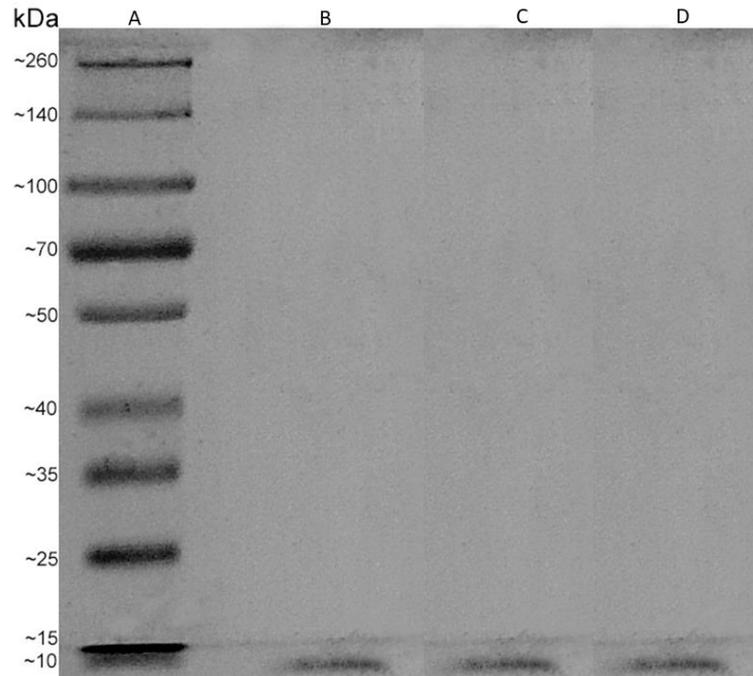


Figura 5.5: SDS-PAGE convencional corado com azul de coomassie. A) Marcador de peso molecular, B) monômero, C) oligômero e D) fibrila, na concentração de 10 μ M.

Observou-se que as três formas do peptídeo (monômero, oligômero e a fibrila), após a ação do agente desnaturante SDS, o qual desnatura os peptídeos em sua forma nativa, a monomérica, possuem o tamanho descrito pelo fabricante e esperado de sua forma primária de 4,51 kDa, que representa a forma do monômero [62]. No entanto, na análise com o gel não desnaturante não foi possível visualizar a corrida de gel de eletroforese, provavelmente devido a concentração mínima de poliacrilamida no gel de agarose (12%) obtida no protocolo que impediu a passagem das formas maiores do peptídeo.

5.2.2. Caracterização da conformação estrutural, morfologia e processo de agregação.

A microscopia de força atômica (AFM) foi empregada para caracterizar as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide, suas diferenças morfológicas e de estado de agregação. Diversos canais foram avaliados no estudo, dentre eles o de topográfica, adesão, dissipação e módulo de elasticidade. Na Figura 5.6, são apresentados os primeiros resultados obtidos com a forma monomérica.

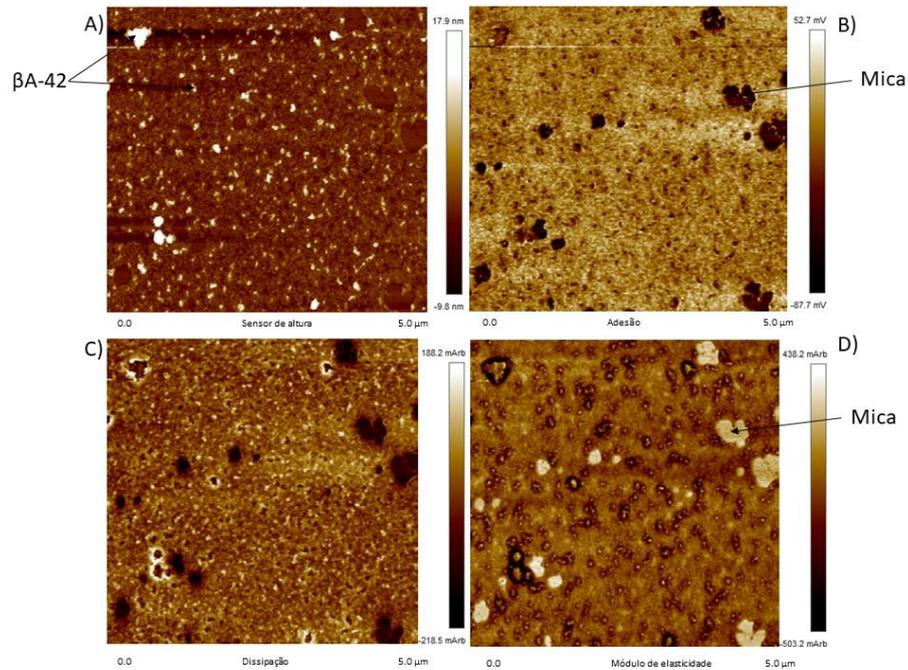


Figura 5.6: Imagens obtidas por AFM de uma alíquota de solução monomérica de 20 µM sobre a placa de mica. Canais de análise A) topografia, B) adesão, C) dissipação e D) módulo de elasticidade.

A Figura 5.6 é possível observar pequenas esferas com bordas alongadas provavelmente devido à formação de 42 aminoácidos, semelhantes a forma esperada pelo monômero em estudos de agregação. Essas estruturas destacam-se sobre um filme quase contínuo com buracos que deixam aparente o substrato da mica. A presença da mica é confirmada pelo módulo de elástico maior e dissipação/adesão menor nos canais não topográficos. Observa-se também nas imagens de adesão, dissipação e módulo de elasticidade que em torno dos aglomerados Aβ-42 há uma borda distinta de um material mais macio, mais aderente e com maior dissipação. O centro dos aglomerados, contudo tem baixa dissipação e módulo de elasticidade intermediários. Fica claro nessas imagens que uma região com alta concentração do peptídeo foi captada, o que provavelmente não representa o estado do preparado em solução e deve envolver agregação induzida durante o processo de secagem.

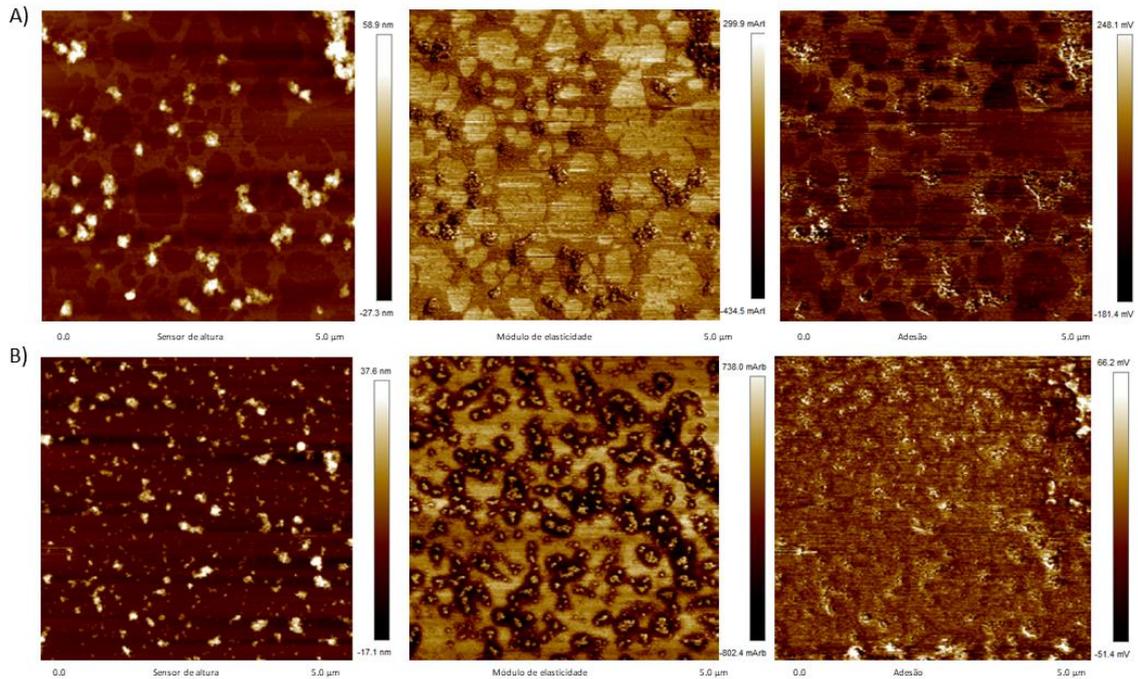


Figura 5.7: Imagens obtidas por AFM de alíquotas de solução A) oligomérica e B) fibrilar de ambas a 20 μM sobre a placa de mica em 5 μm. Nos canais de análise topográfica, módulo de elasticidade e adesão.

Na Figura 5.7 são mostradas imagens equivalentes de AFM para as conformações oligoméricas e de fibrilar. Observou-se que para os oligômeros (Figura 5.7 A) uma estrutura similar observada no monômeros: estruturas de aglomerados arredondadas e alongadas sobre um “filme” muito poroso de espessura de 1 a 4 nm. Nessa conformação predomina agregados maiores, se comparados com o monômero. O diâmetro aproximado destas diferentes formas e dos aglomerados foram em média de 35 nm, 216 nm e 134 nm, nas conformações de monômero, oligômero e fibrilar respectivamente. Uma análise com varredura de 1 μm foi realizada a fim de definir melhor as estruturas observadas.

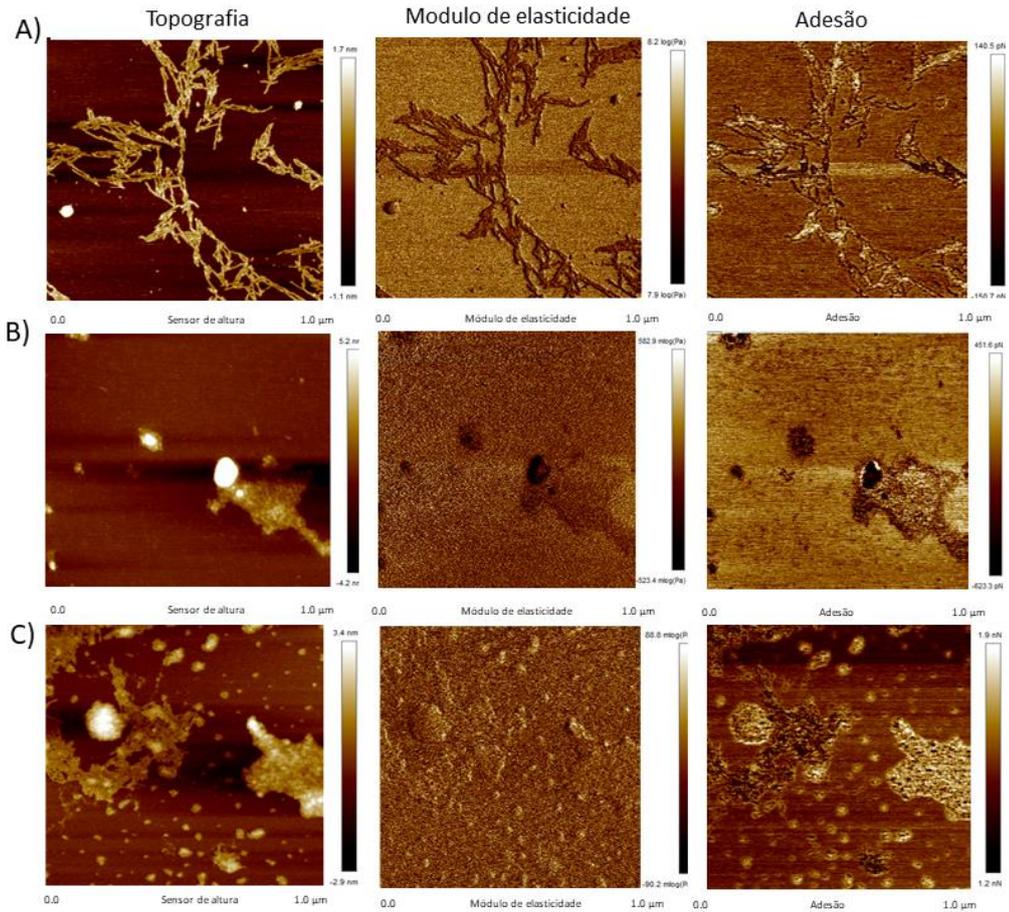


Figura 5.8: Imagens obtidas por AFM, na concentração de 20 μM em 1 μm. A) monômero, B) oligômero e C) fibrila. Canais de topografia, modulo de elasticidade e adesão, respectivamente.

Na Figura 5.8 mostra as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide em uma varredura de 1 μm. Nota-se que a forma monomérica é caracterizada por estruturas em forma de fibras comprimento em média de 25 nm e altura de 25 pN. Essas estruturas alongadas têm altura inferior a 1 nm compatível com as dimensões esperadas para uma molécula linear de βA-42. Observa-se, portanto, que mesmo na solução monomérica a tendência a agregação é alta. Inicialmente em linhas que seriam compostas por grupos de monômeros e depois por empilhamento lateral dessas fibras que as vezes aparece como estruturas radiais. As fibrilas aqui observadas não devem ser confundidas com as fibrilas, pois sua altura é muito maior 3-8 nm, segunda literatura [42].

Na conformação oligomérica observou-se uma variação nas dimensões em um conjunto de agregados com comprimento em média de 123 nm e altura de 174 pN. Indicando um processo de agregação por empilhamento lateral de monômeros. Processo que continua a ser observados das imagens de fibrilas, onde se têm os

conjuntos de agregados com comprimento em média de 190 nm e altura de 4 nm, nesta figura não se observa a presença das fibrilas formadas inicialmente pelos monômeros. No entanto, formas menores podem ser observadas na imagem da fibrila, entre os grandes agregados com um comprimento de 28 nm e altura de $\pm 1,5$ nm, confirmando a presença da forma monomérica durante o processo de agregação.

No canal módulo de elasticidade mostrou que as três formas possuem uma elasticidade semelhante, diferente de seu comportamento de adesão. As formas de monômero e oligômero possuem uma alta adesão se comparada a forma da fibrila. Este comportamento pode estar relacionado a fase de agregação, ao qual cada forma está. A fase de nucleação (forma monomérica) e alongamento (forma oligomérica) são as fases mais instáveis e propensas a agregação devido suas modificações do meio, já a fase de saturação ocorre nas formas de protofibrilas até a formação final das placas senis [44][63].

Apesar de todas as características conforme os diferentes canais, foi possível observar que a análise pontual obtida pelo AFM pode variar conforme a alíquota utilizada na análise, representando uma porção pequena do que podemos encontrar em solução. Uma análise seriada pode nos fornecer dados importantes sobre o preparo de cada uma das formas de maneira rápida e com pouca quantidade de amostra, e como esperado não é possível obter uma solução pura de apenas uma forma do peptídeo devido sua propensão à agregação.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi aplicada a fim de determinar diferenças morfológicas de estrutura e tamanho das diferentes formas do peptídeo beta amiloide em monômero, oligômero e fibrila. A Figura 5.9 mostra as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide em diferentes aproximações.

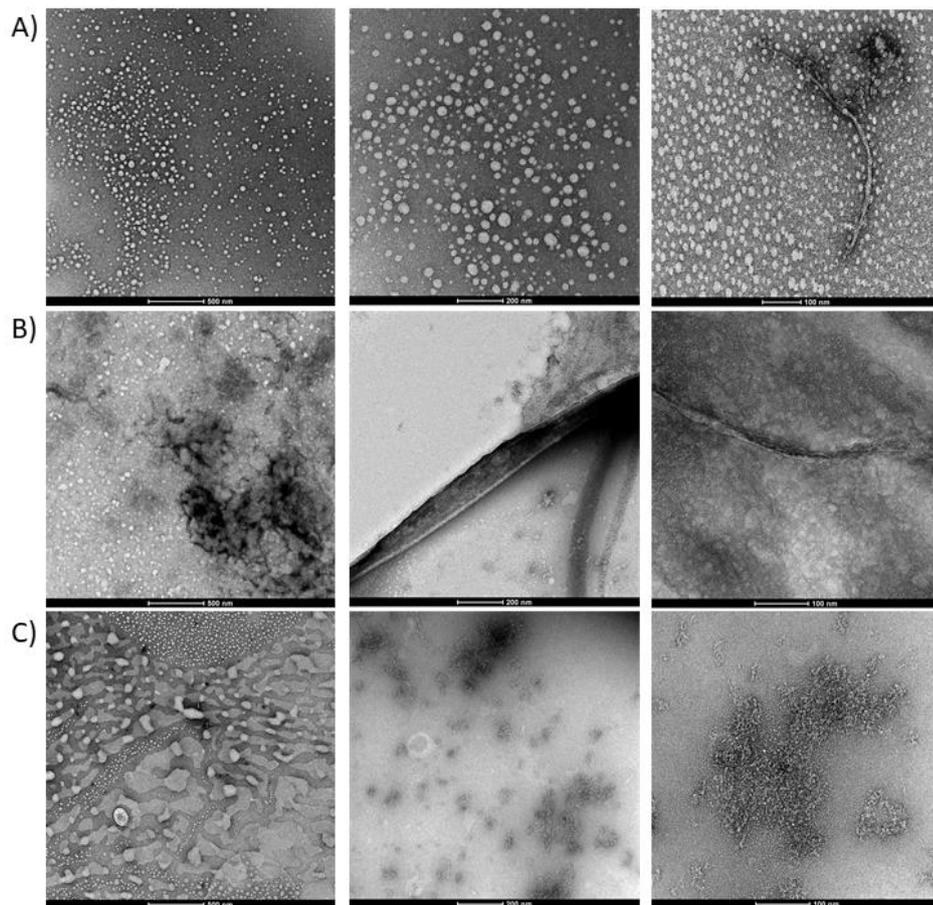


Figura 5.9: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão por contrastação negativa das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide em escala de 500, 200 e 100 nm, na concentração de 20 μM . A) monômero B) oligômero e C) fibrila.

A análise demonstrou uma diferença na forma de agregação entre as formas de oligômero e fibrila, em comparação com a forma monomérica. O monômero possui uma forma preferencialmente esférica, com tamanho de diâmetro médio de 32 ± 10 nm (482 contagens de várias imagens do monômero) com distância irregular entre eles. A amostra da forma oligomérica demonstrou presença de formas semelhantes as monoméricas, com tamanho de diâmetro médio de 28 ± 9 nm e com a presença de filamentos em hélice (Figura 5.9, B escala de 200 nm), conforme o esperado [41][64][65]. Na amostra da forma de fibrila, temos todas as conformações vistas anteriormente, porém com aglomerados mais compactados na forma de fibrilas (agregações que variaram entre 90-100 nm), como visto no AFM [41][66].

O processo de agregação dos peptídeos $\beta\text{A-42}$ é altamente sensível e instável, em uma mesma solução é possível ter diferentes formas e tamanhos do peptídeo, conforme o tempo de incubação e preparo.

5.3. Estudo da interação dos peptídeos beta-amiloide com a molécula 6-OH-BTA-0

5.3.1. Estudo de interação por fluorescência

A partir dos dados obtidos da análise dos espectros do 6-OH-BTA-0 puro, foi possível estipular os parâmetros de análise da molécula na presença dos peptídeos beta amiloide. Um estudo inicial foi realizado para determinar a possível interação da molécula 6-OH-BTA-0 com as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide (monômero, oligômero e fibrila). Em uma concentração fixa de 6-OH-BTA-0 de 500 nM em PBS, foi adiciona alíquotas das diferentes formas do peptídeo beta amiloide inicial de 10 μM (10-30 μL) com uma variação de tempo entre as medidas (1-10 min), demonstrado na Figura 5.10.

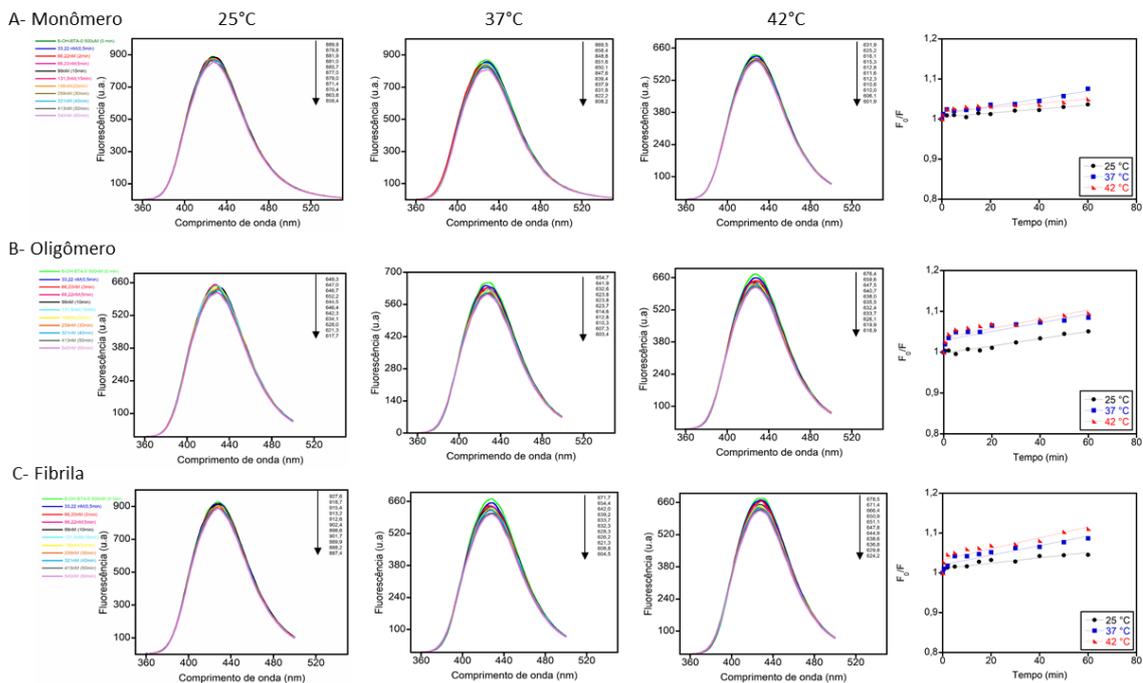


Figura 5.10: Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (500 nM) na presença dos peptídeos amiloides (concentração variada de 33,22 a 540 nM) na forma de (A) monômero, (B) oligômero e (C) fibrila para diferentes tempos de exposição (0-40 min), medidos em três temperatura: 25, 37 e 42 °C. $\lambda_{exc}=340$ nm.

Observou-se uma interação entre o peptídeo beta amiloide e as diferentes formas, com uma baixa da intensidade de fluorescência nos primeiros 10 minutos,

condizente com o comportamento observado na molécula pura. A análise permitiu uma triagem para isolarmos as variáveis e analisar qual processo está ocorrendo na interação molécula/peptídeos, se pela mudança de temperatura ou de concentração do peptídeo beta amiloide.

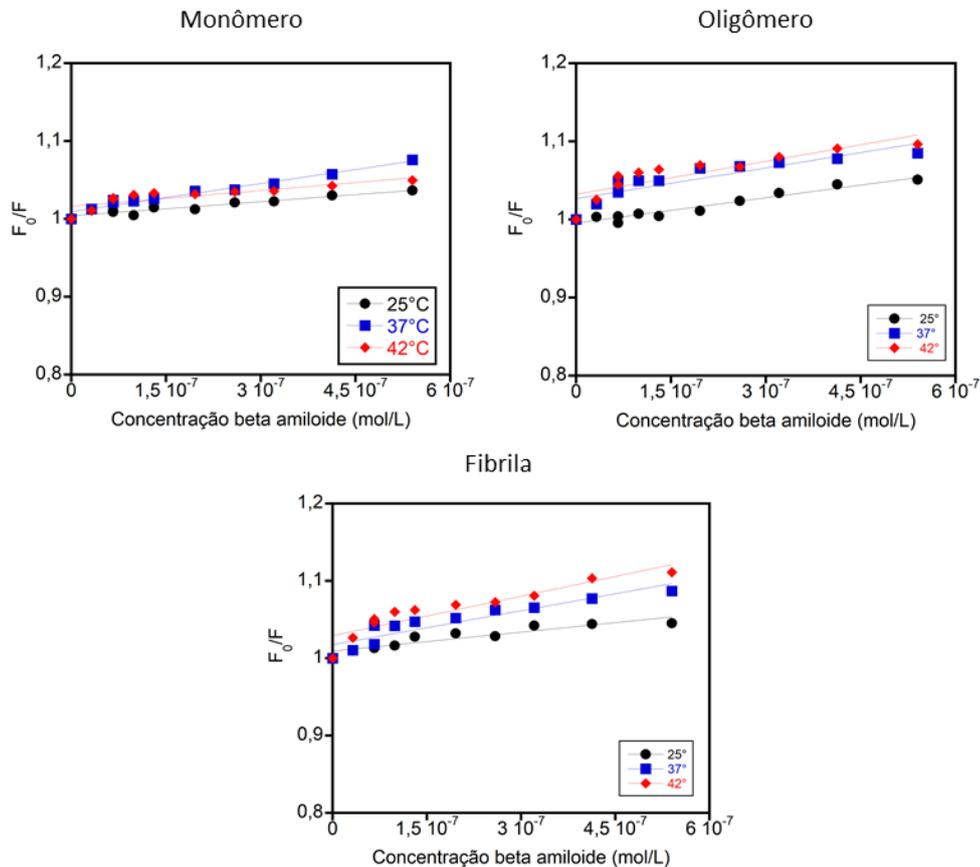


Figura 5.11: Gráficos da concentração e tempo em função de F_0/F dos peptídeos nas formas de monômero, oligômero e fibrila, nas três temperaturas (25, 37 e 42°C). Concentração de 500 nM para o 6-OH-BTA-0 e concentração variada de 33,22 a 540 nM para os peptídeos.

Com os dados obtidos através da análise preliminar foi possível determinar que ocorre uma supressão de fluorescência do composto 6-OH-BTA-0 na presença do peptídeo beta amiloide. O gráfico de fluorescência do composto 6-OH-BTA-0 em função da concentração do peptídeo beta amiloide apresentado na Figura 5.11. Da figura foram obtidas as constantes de *Stern-Volmer* (K_{SV}) para as formas de monômero, oligômero e fibrila, dispostas da tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores das constantes de *Stern-Volmer* nas concentrações de 6-OH-BTA-0 500 nm e valores crescentes das diferentes formas do peptídeo beta amiloide (concentrações de 33,22 a 540

nM).

Peptídeos	Ksv ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}$)			
	25 °C	37 °C	42 °C	r ²
Monômero	60,6 ± 6,3	120 ± 8,2	67,9 ± 14,2	0,91
Oligômero	108 ± 8,6	131 ± 24,2	141 ± 27,3	0,94
Fibrila	81,9 ± 11,0	146 ± 20,6	170 ± 23,9	0,86

Observa-se um aumento no processo de supressão conforme o aumento da temperatura, demonstrando um *quenching* de natureza dinâmica, facilitado as colisões entre o fluoróforo e os peptídeos beta amiloide.

Posteriormente, foi analisado a estabilidade temporal para uma concentração de 100 nM do 6-OH-BTA-0 e de 540 nM para cada conformação do peptídeo beta amiloide. Esses valores foram estipulados de acordo com a literatura, na qual foram utilizados razões de peptídeo/molécula de no mínimo 3x [67]. As alíquotas dos peptídeos foram adicionadas à solução de 6-OH-BTA e a fluorescência foi medida em diferentes tempos (0-50 minutos), bem como em três temperaturas (25, 37 e 42 °C). Os espectros de emissão de fluorescência estão apresentados na Figura 5.12.

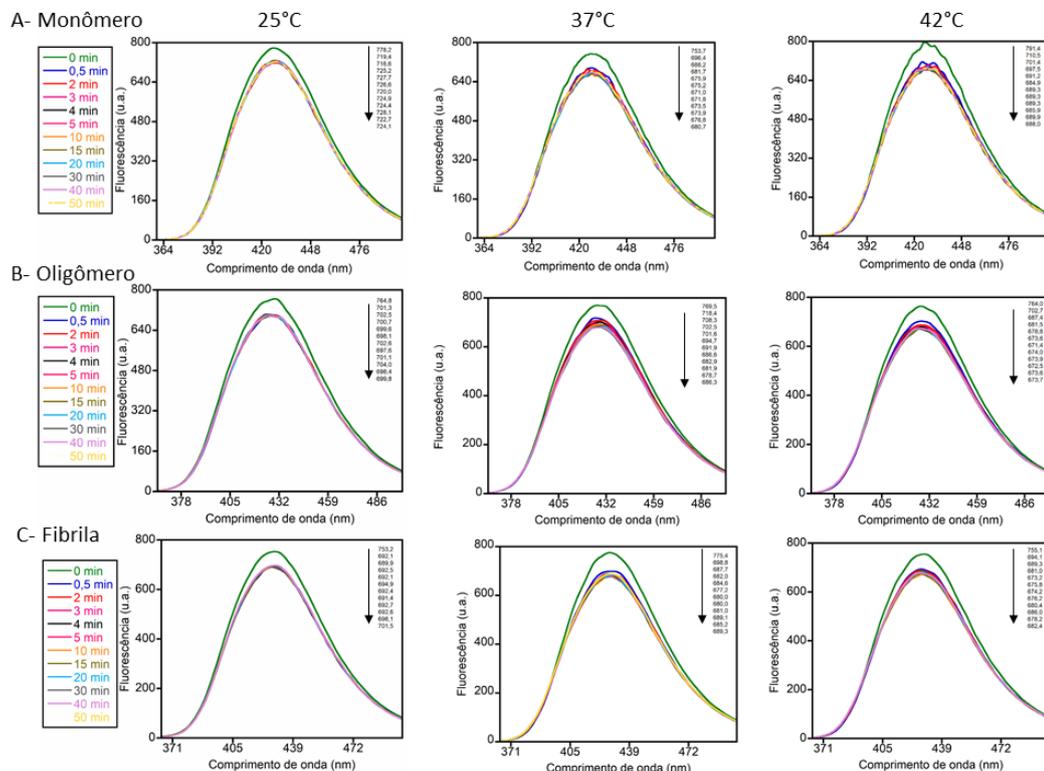


Figura 5.12. Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (100 nM) na presença dos peptídeos amiloides (540 nM em PBS) na forma de (A) monômero, (B) oligômero e (C) fibrila para diferentes tempos de exposição (0-50 min), medidos em três temperatura: 25, 37 e 42 °C.

$$\lambda_{\text{exc}}=340 \text{ nm.}$$

Os valores da intensidade máxima de fluorescência de cada sistema em função do tempo e temperatura estão representados nas Figuras 5.13.

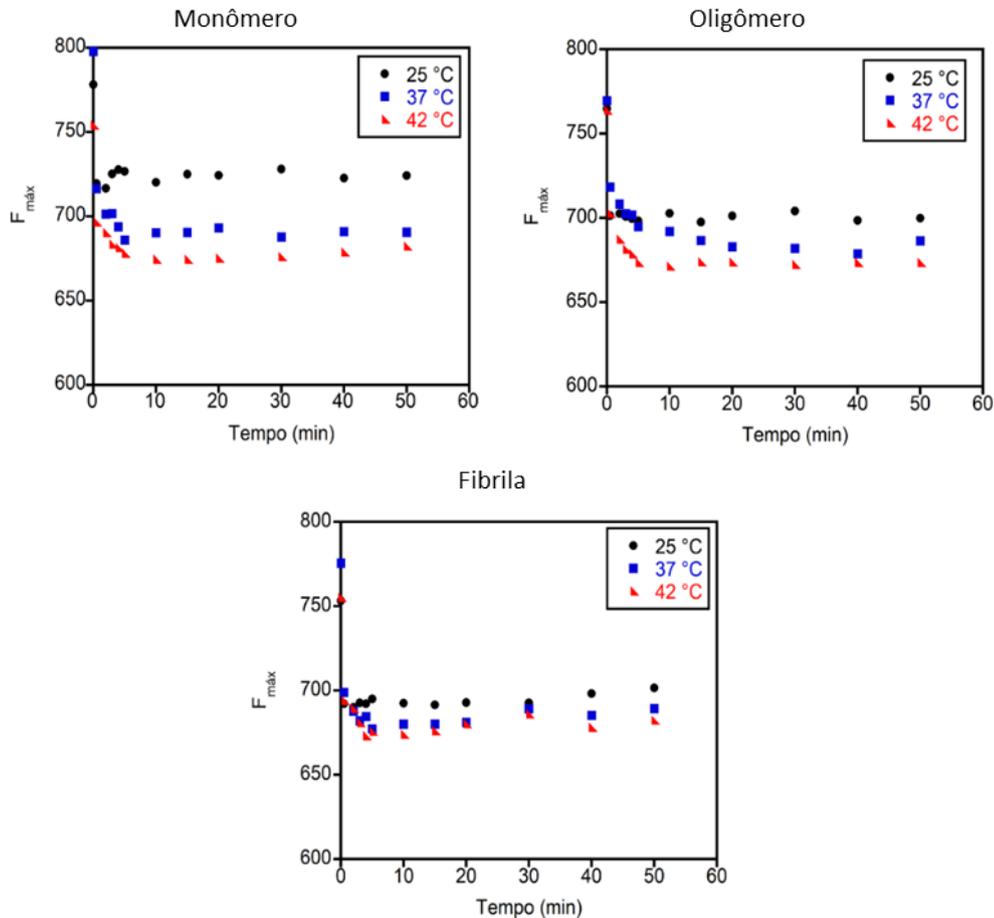


Figura 5.13. Gráficos da intensidade máxima do 6-OH-BTA-0 na presença dos peptídeos na forma de monômero, oligômero e fibrila (540 nM) nas temperaturas de 25, 37 e 42 °C em função dos intervalos de tempo de medida (0-50 min).

Observou-se um tempo de diminuição seguido da estabilização da emissão de fluorescência após 10 minutos, este comportamento é semelhante a análise da molécula 6-OH-BTA-0 pura, Figura 5.3. E este comportamento se mantém mesmo variando a temperatura. A partir desta otimização do tempo de estabilização do sistema, foram realizadas medidas de intensidade de fluorescência da molécula 6-OH-BTA-0 em tempo fixo de 10 minutos entre cada medida, variando a concentração dos peptídeos nas temperaturas de 25, 37 e 42 °C, demonstrados na Figura 5.14.

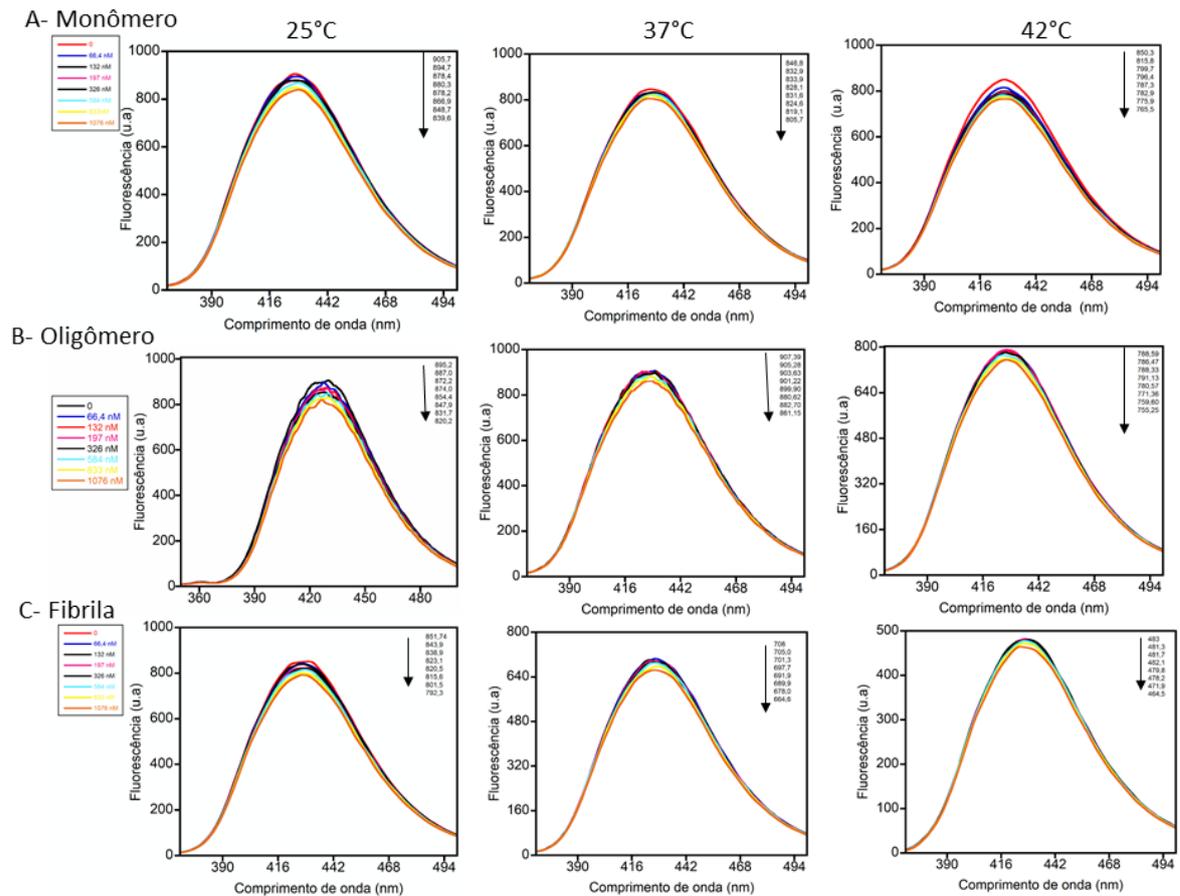


Figura 5.14: Estudo de interação da molécula 6-OH-BTA-0 em tampão PBS (100 nM) titulado com peptídeo beta amiloide nas três formas: (A) monômero, (B) oligômero e (C) fibrila, em tampão PBS (33,22-1076 nM) em um volume final de 3mL ($\lambda_{ex}=340$ nm), com variação do tempo de 10 em 10 minutos e suas intensidades de fluorescência máxima. As medidas foram realizadas em três temperaturas (25, 37 e 42°C).

Observou-se uma tendência de diminuição da emissão de fluorescência da molécula 6-OH-BTA-0 na presença das três formas do peptídeo beta amiloide, conforme o aumento da concentração. Este dado confirmou a interação apresentada anteriormente entre as diferentes formas do peptídeo e a molécula 6-OH-BTA-0, que diferente da sua precursora a ThT, tem sua interação confirmada com a diminuição da fluorescência por um mecanismo de *quenching* de sua fluorescência intrínseca [68]. A supressão da fluorescência permite estimar as constantes de afinidade a partir da equação de *Stern Volmer* [69][70]. Portanto, aplicamos as constantes de supressão de fluorescência de *Stern-Volmer* entre o 6-OH-BTA-0 e os peptídeos beta-amiloide [71]. Não foi observado fluorescência intrínseca do peptídeos beta amiloide (dados não apresentados).

Os valores da intensidade máxima de fluorescência de cada sistema em função da concentração do peptídeo beta amiloide e temperatura em função de F_0/F para observação do processo de supressão são representados nas Figuras 5.15 e 5.16.

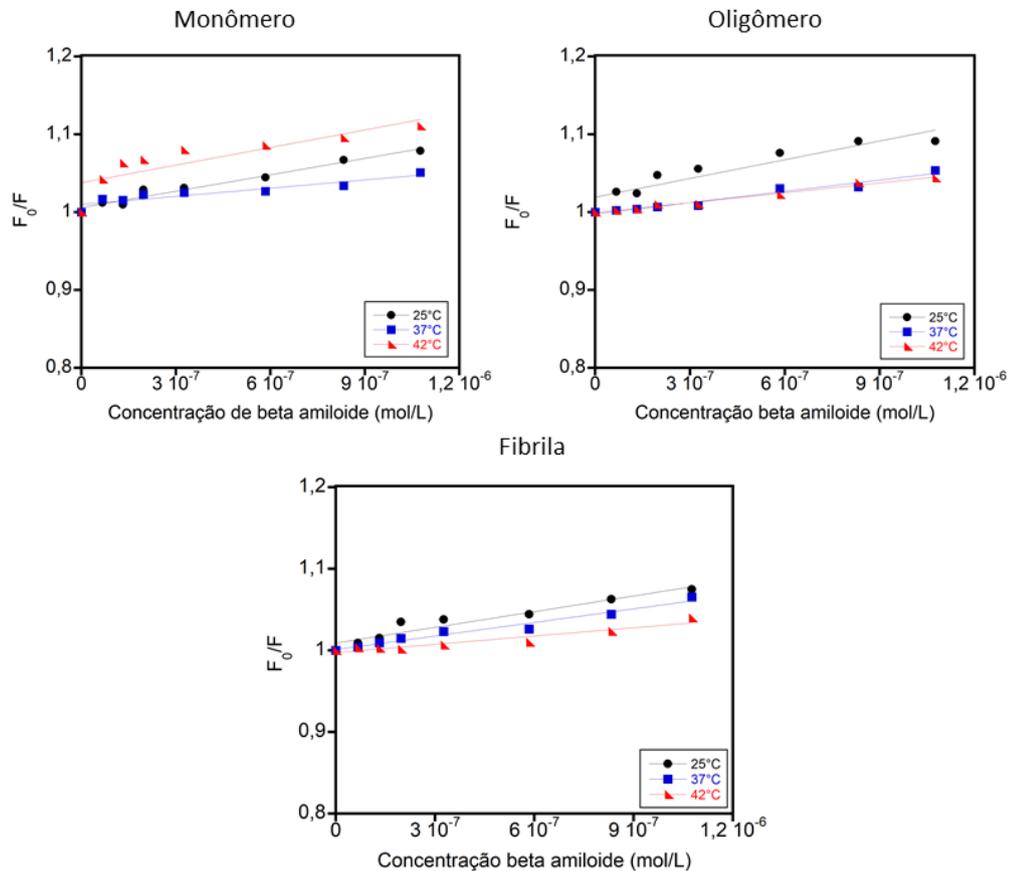


Figura 5.15. Gráfico da concentração dos peptídeos nas formas de monômero, oligômero e fibrila em função de F_0/F nas três temperaturas (25, 37 e 42°C).

Os valores de supressão de fluorescência foram tabelados, de acordo com a equação de *Stern-Volmer* (Equação 3.5) [8][72].

Ao observar esta interação, mostra um comportamento linear em função do aumento da concentração do peptídeo beta amiloide além disso é possível notar que as formas do peptídeo se comportam de maneira diferente em cada temperatura (Figura 5.16). Na temperatura de 25°C, foi possível observar um aumento da intensidade maior da supressão de fluorescência das formas oligoméricas e das fibrilas, em comparação com a forma monomérica, que tem sua interação intensificada na temperatura de 42°C. Enquanto nas temperaturas de 37°C e 42°C, mostram um comportamento diferente influenciando diretamente no processo de interação nas

formas de oligômero e fibrila, provocando uma diminuição de sua intensidade de supressão em comparação a temperatura de 25°C.

Os mecanismos de supressão de fluorescência, como descrito no capítulo 3.1.1, pode ser classificado em *quenching* dinâmico, na qual teremos a influência da temperatura como um facilitador do processo e estático onde se tem a formação de um complexo proteína/ligante sabe-se que ambos os processos podem ocorrer de forma simultânea, como observado, devido aos sítios de ligação das diferentes formas do peptídeos disponível para ligação [23][26][73][67].

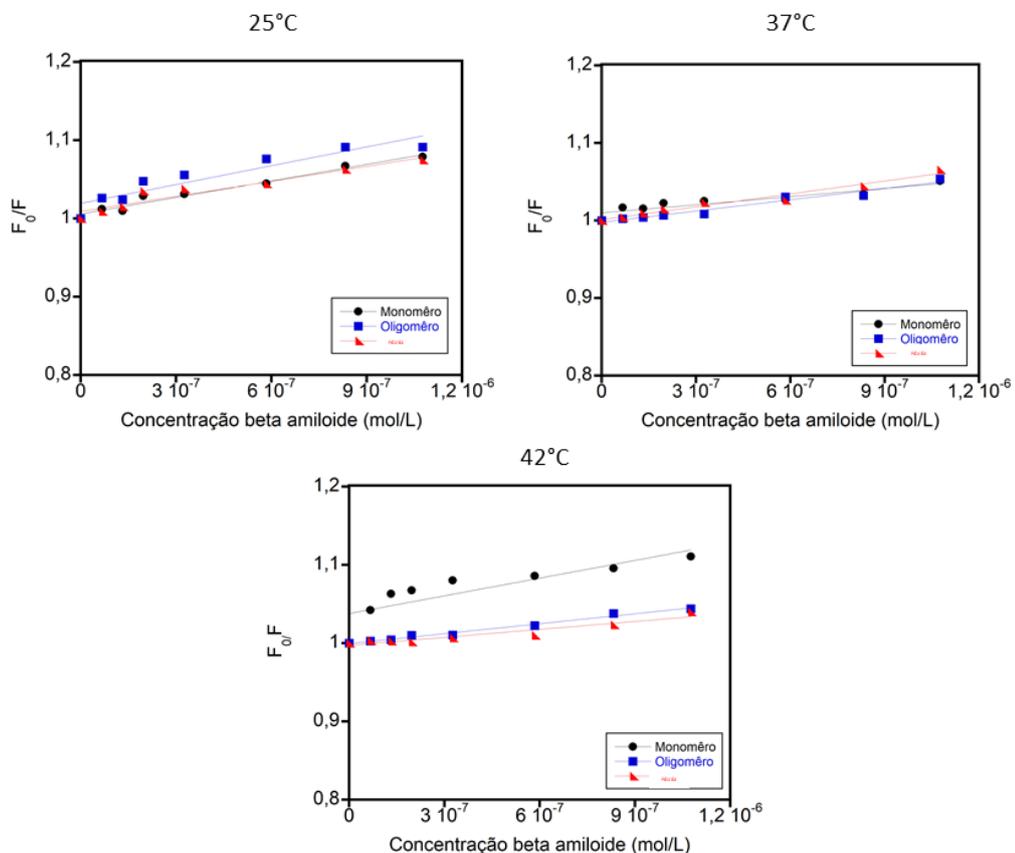


Figura 5.16: Equação de *Stern-Volmer* comparando as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide pela temperatura, 25°C, 37°C e 42°C.

Nos gráficos de *Stern-Volmer* com a influência da temperatura onde foi possível observar que o comportamento linear da interação se mantém, com um aumento do *quenching* na forma monomérica em 42 °C, indicando que a temperatura foi um facilitador do processo de supressão, indicando um *quenching* dinâmico. As constantes de *Stern-Volmer* nas três formas do peptídeo estão descritas na Tabela 5.3. Para a forma monomérica, ocorreu um leve aumento nos valores das constantes

com o aumento da temperatura. Nas formas do oligômero e fibrila, sem a influência da temperatura, demonstrando um comportamento de *quenching* estático. A K_{sv} do peptídeo beta amiloide na forma de fibrila se mostrou maior que na forma do monômero e oligômero. Isto pode estar ocorrendo devido à disposição de sítios ativos presentes nos agregados formados no processo de formação das fibrilas [74][75].

Tabela 5.3: Valores das constantes de *Stern-Volmer* nas concentrações de 6-OH-BTA-0 500 nm e valores crescentes das diferentes formas do peptídeo beta amiloide, 33,22 a 540 nM.

Peptídeos	$K_{sv} (x10^3 M^{-1})$			
	25 °C	37 °C	42 °C	r^2
Monômero	70,3 ± 5,2	35,1 ± 5,8	75,4 ± 18,9	0,96
Oligômero	80,0 ± 12,5	48,4 ± 3,9	42,3 ± 2,2	0,97
Fibrila	64,0 ± 7,4	55,3 ± 4,1	33,7 ± 4,3	0,96

Ao definir um tempo de estabilização do complexo (Figura 5.13), foi possível obter um comportamento diferente do primeiro observado, onde a curva e as constantes de supressão mudaram seu comportamento, demonstrando um influência do tempo de estabilidade entre o composto 6-OH-BTA-0 e as diferentes formas do peptídeo beta amiloide. No entanto um teste de viscosidade seria interessante para a análise desta mudança de comportamento, por se tratar de uma variável importante nas análises de fluorescência [8].

5.3.2. Estudo de interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

O estudo de interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi realizado para obter as constantes de interação entre a molécula 6-OH-BTA-0 e o peptídeo beta amiloide. As variáveis foram otimizadas com a forma monomérica, onde foram realizadas medidas conforme descritos do item 4.5.2. Foi possível observar uma variação no térmica conforme o aumento da concentração da molécula 6-OH-BTA-0 no peptídeo beta amiloide, demonstrado na Figura 5.17 e 5.18.

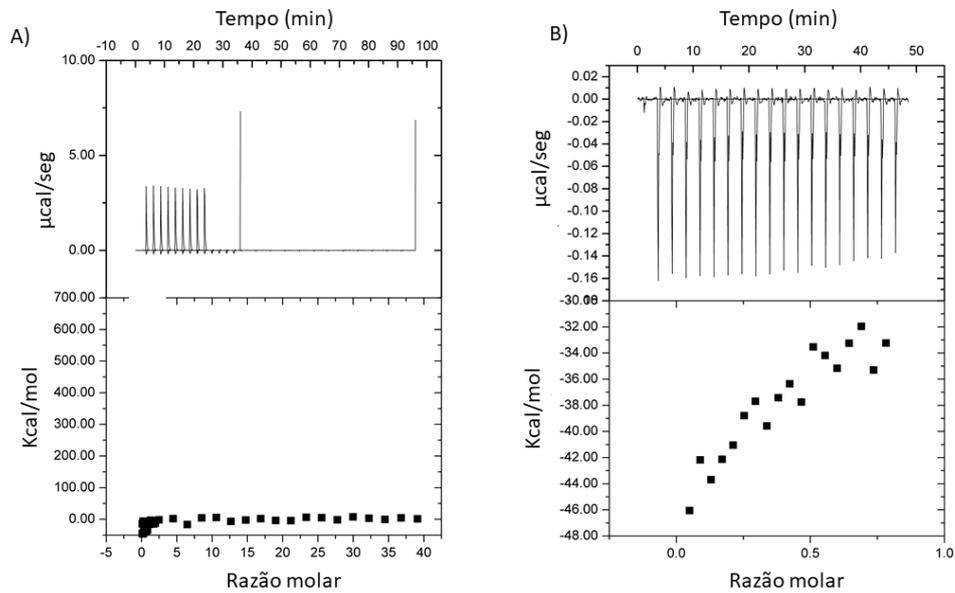


Figura 5.17: Gráficos de interação de titulação isotérmica dos peptídeos beta amiloide. A) peptídeo beta amiloide na forma de monômero (20 nM em água) com concentração crescente da molécula 6-OH-BTA (iniciando com 2 µM). B) Mesmo estudo em uma escala mais próxima.

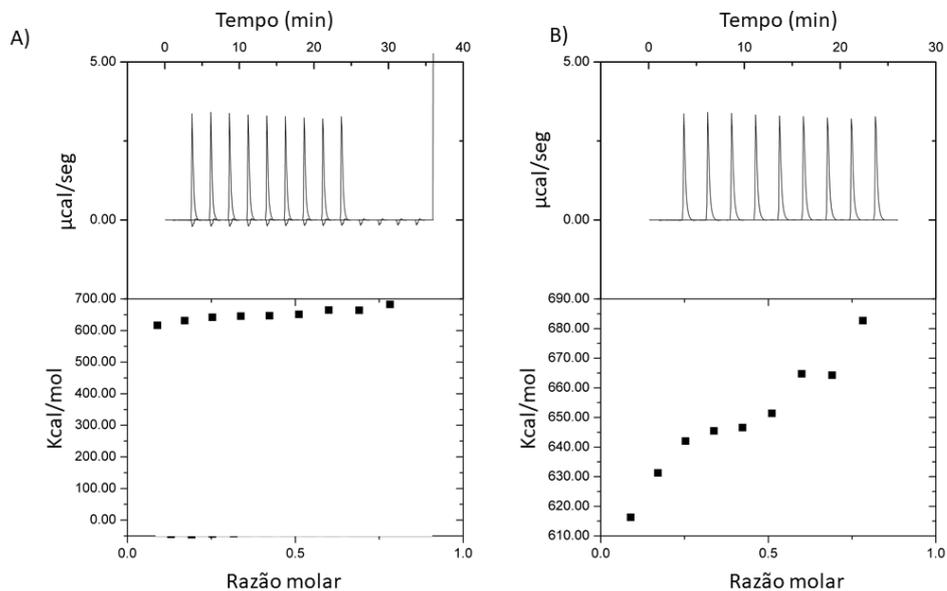


Figura 5.18: Gráficos de interação de titulação isotérmica dos peptídeos beta amiloide. A) peptídeo beta amiloide na forma de monômero (20 nM em água) com concentração crescente da molécula 6-OH-BTA (iniciando com 5 µM). B) Mesmo estudo em uma escala mais próxima.

Foi possível observar que com o aumento da concentração da molécula 6-OH-BTA-0, a liberação de calor na interação aumentou, indicando uma reação exotérmica.

No entanto não foi possível obter um pico de sinal suficiente, na qual que pudesse excluir artefatos de diluição, por exemplo, fazendo necessário então uma otimização do protocolo, como o aumento da concentração da proteína e da molécula de estudo, e um aumento da temperatura inicial.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que a molécula pura de 6-OH-BTA-0 possui uma fluorescência intrínseca, com deslocamento batocrômico no espectro de absorção e emissão, conforme a variação da polaridade solvente, na qual foi possível observar, principalmente, seu comportamento no meio de PBS. As análises da fluorescência revelaram que a molécula pura de 6-OH-BTA-0 apresenta valores de intensidade máxima de fluorescência que variam pouco com a temperatura, apenas com leve decaimento (~3%) da intensidade para as temperaturas de 37 °C e 42 °C. Porém, isso se estabiliza após 10 minutos de espera, indicando o período de estabilização da molécula e possíveis processos de *autoquenching* no meio aquoso.

As diferentes preparações conformacionais dos A β -42 foram caracterizadas demonstrando que, no protocolo utilizado, não é possível obter apenas uma forma “pura” do peptídeo em solução, devido à sua sensibilidade ao processo de agregação. Todos os preparados revelaram uma distribuição de estruturas com tamanhos diversos. Contudo ficou claro que há diferenças morfológicas nas diferentes conformações do peptídeo beta amiloide. Foi observado a tendência dos agregados serem maiores no preparado fibrilar, inclusive com o aparecimento de zonas com alto alinhamento das fibrilas em estruturas compactadas no formato de placas. Estudos adicionais são necessários para uma avaliação detalhada das estatísticas dos tamanhos e de possível envelhecimento dos preparados ao longo do tempo.

Nos estudos da interação dos peptídeos com a molécula 6-OH-BTA-0 foi observado um *quenching* de fluorescência da molécula moderado, o qual aumenta com o aumento da concentração das diferentes conformações A β -42. Os valores das constantes de *Stern-Volmer* obtidos nas temperaturas de 25°C, 37° C e 42°C, respectivamente, na forma oligomérica foi $80,0 \pm 12,5$, $48,4 \pm 3,9$ e $42,3 \pm 2,2$, e na forma fibrilar foi $64,0 \pm 7,4$, $55,3 \pm 4,1$ e $33,7 \pm 4,3$. Nas formas de oligômero e fibrila foi possível observar um *quenching* estático, sem a dependência de temperatura, provavelmente pela formação de um complexo. Já na forma monomérica, observou-se a influência da temperatura demonstrando um mecanismos de *quenching* dinâmico com os seguintes valores das constantes de *Stern-Volmer* encontradas foi de $70,3 \pm 5,2$, $35,1 \pm 5,8$ e $75,4 \pm 18,9$. Na análise do ITC, os dados demonstraram uma interação exotérmica, no entanto foram inconclusivos devido as concentrações do

peptídeo beta amiloide e da molécula 6-OH-BTA-0, sendo necessário a otimização do protocolo e ajustes das concentrações dos mesmos.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

O trabalho motiva para mais estudos relacionados ao diagnóstico precoce da doença de Alzheimer com o uso de fluorescência em tecido biopsiado ou como ligante para desenvolvimento de nanopartículas em imagens biomédicas.

Este trabalho também motiva estudos de interação do fluoróforo 6-OH-BTA-0 com as diferentes conformações do peptídeo beta amiloide por estudos com bioinformática a fim de determinar os sítios ativos onde está molécula se liga as diferentes formas do peptídeo e a influência da temperatura em um ambiente simulado.

Em conjunto, o trabalho vem para incentivar a caracterização dos processos de agregação de proteína proposto em diversos trabalhos, a fim de observar o final de cada processo, aplicando otimização em protocolos adequadas para afirmar o processo de agregação proposto para os peptídeos beta amiloide.

Os parâmetros do ITC, HPLC e SDS-PAGE para análise correta das diferentes conformações do peptídeo beta amiloide precisa ser otimizados.

Um estudo complementar do fluoróforo 6-OH-BTA-0 com diferentes concentrações dos solventes a fim de obter mais dados de sua fluorescência.

Estudos controle de interação por fluorescência entre o fluoróforo 6-OH-BTA-0 e outras proteínas, a fim de determinar sua seletividade em análise por fluorescência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. Ali and N. Siddiqui, "Biological aspects of emerging benzothiazoles: A short review," *J. Chem.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/345198.
- [2] S. Molavipordanjani, S. Emami, A. Mardanshahi, F. Talebpour Amiri, Z. Noaparast, and S. J. Hosseinimehr, "Novel ^{99m}Tc -2-arylimidazo[2,1-b]benzothiazole derivatives as SPECT imaging agents for amyloid- β plaques," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 175, pp. 149–161, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.069.
- [3] F. Paper, P. S. Yadav, D. Devprakash, and G. P. Senthilkumar, "ChemInform Abstract: Benzothiazole: Different Methods of Synthesis and Diverse Biological Activities," *ChemInform*, vol. 42, no. 40, p. no-no, 2011, doi: 10.1002/chin.201140238.
- [4] M. A. Hahn, A. K. Singh, P. Sharma, S. C. Brown, and B. M. Moudgil, "Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: Current status and future perspectives," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 1, pp. 3–27, 2011, doi: 10.1007/s00216-010-4207-5.
- [5] A. Kadir and A. Nordberg, "Target-specific PET probes for neurodegenerative disorders related to dementia," *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 9, pp. 1418–1430, 2010, doi: 10.2967/jnumed.110.077164.
- [6] J. Schwenck *et al.*, "Fluorescence and Cerenkov luminescence imaging," *Nuklearmedizin*, vol. 55, no. 02, pp. 63–70, Jan. 2016, doi: 10.1055/s-0037-1616471.
- [7] C. A. Mathis, Y. Wang, D. P. Holt, G. F. Huang, M. L. Debnath, and W. E. Klunk, "Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents," *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 13, pp. 2740–2754, 2003, doi: 10.1021/jm030026b.
- [8] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2^o ed. Boston, MA: Springer US, 1999.
- [9] M. Teresa Montero, J. Hernández, and J. Estelrich, "Fluorescence quenching of albumin. A spectrofluorimetric experiment," *Biochem. Educ.*, vol. 18, no. 2, pp. 99–101, Apr. 1990, doi: 10.1016/0307-4412(90)90188-T.
- [10] M. B. Moreira, D. S. Franciscato, K. C. F. Toledo, J. R. B. De Souza, H. S. Nakatani, and V. R. De Souza, "Investigação da supressão de fluorescência de

- soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio,” *Quim. Nova*, vol. 38, no. 2, pp. 227–232, 2015, doi: 10.5935/0100-4042.20140315.
- [11] B. Valeur and M. N. Berberan-Santos, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging Fluorescence Applications in Biotechnology and Life Sciences Surface Enhanced Raman Spectroscopy Applied and Industrial Photochemistry*. 2012.
- [12] M. Balcioglu, M. Rana, N. Robertson, and M. V. Yigit, “DNA-length-dependent quenching of fluorescently labeled iron oxide nanoparticles with gold, graphene oxide and MoS₂ nanostructures,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 15, pp. 12100–12110, 2014, doi: 10.1021/am503553h.
- [13] L. Simine, H. Lammert, L. Sun, J. N. Onuchic, and P. J. Rossky, “Fluorescent Proteins Detect Host Structural Rearrangements via Electrostatic Mechanism,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 4, pp. 1203–1206, Jan. 2018, doi: 10.1021/jacs.7b10851.
- [14] D. K. Singh, P. K. Iyer, and P. K. Giri, “Role of molecular interactions and structural defects in the efficient fluorescence quenching by carbon nanotubes,” *Carbon N. Y.*, vol. 50, no. 12, pp. 4495–4505, 2012, doi: 10.1016/j.carbon.2012.05.030.
- [15] R. R. Kumar, M. K. Mohamed Subarkhan, and R. Ramesh, “Synthesis and structure of nickel(II) thiocarboxamide complexes: Effect of ligand substitutions on DNA/protein binding, antioxidant and cytotoxicity,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 58, pp. 46760–46773, 2015, doi: 10.1039/c5ra06112a.
- [16] L. M. Needham *et al.*, “Bifunctional fluorescent probes for detection of amyloid aggregates and reactive oxygen species,” *R. Soc. Open Sci.*, vol. 5, no. 2, 2018, doi: 10.1098/rsos.171399.
- [17] M. Rudin, “Molecular Imaging: Principles and Application in Biomedical Research,” vol. 2 nd ed, pp. 148–174, 2005.
- [18] W. M. Ito, Amando Siuti; Bernardi, Marina; Pazin, *Fluorescência e aplicações em biofísica*, Livraria d. São Paulo, 2016.
- [19] J. P. Gosling, “A decade of development in immunoassay methodology,” *Clin. Chem.*, vol. 36, no. 8 I, pp. 1408–1427, 1990, doi: 10.1093/clinchem/36.8.1408.
- [20] A. Gürses, M. Açıkyıldız, K. Güneş, and M. S. Gürses, “‘Dyes and Pigments: Their Structure and Properties’ in SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability,” pp. 13–29, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-33892-7.

- [21] W. E. Klunk, Y. Wang, G. feng Huang, M. L. Debnath, D. P. Holt, and C. A. Mathis, "Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain," *Life Sci.*, vol. 69, no. 13, pp. 1471–1484, 2001, doi: 10.1016/S0024-3205(01)01232-2.
- [22] M. Mahran, S. William, F. Ramzy, and A. Sembel, "Synthesis and in vitro Evaluation of New Benzothiazole Derivatives as Schistosomicidal Agents," *Molecules*, vol. 12, no. 3, pp. 622–633, Mar. 2007, doi: 10.3390/12030622.
- [23] H. Watanabe, M. Ono, T. Ariyoshi, R. Katayanagi, and H. Saji, "Novel Benzothiazole Derivatives as Fluorescent Probes for Detection of β -Amyloid and α -Synuclein Aggregates," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 8, no. 8, pp. 1656–1662, 2017, doi: 10.1021/acschemneuro.6b00450.
- [24] M. Biancalana and S. Koide, "Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1804, no. 7, pp. 1405–1412, 2010, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
- [25] P. Sen, S. Fatima, B. Ahmad, and R. H. Khan, "Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 74, no. 1, pp. 94–99, 2009, doi: 10.1016/j.saa.2009.05.010.
- [26] S. Freire, M. H. De Araujo, W. Al-Soufi, and M. Novo, "Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils," *Dye. Pigment.*, vol. 110, pp. 97–105, 2014, doi: 10.1016/j.dyepig.2014.05.004.
- [27] C. A. Mathis, Y. Wang, D. P. Holt, G. Huang, M. L. Debnath, and W. E. Klunk, "Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents," pp. 1–15, 2009, [Online]. Available: papers2://publication/uuid/2805C6AA-2F64-4A19-8293-A70436085455.
- [28] K. Serdons *et al.*, "Synthesis and evaluation of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BAT-phenylbenzothiazole conjugate as a potential in vivo tracer for visualization of amyloid β ," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 22, pp. 6086–6090, 2007, doi: 10.1016/j.bmcl.2007.09.055.
- [29] C. Promteangtrong *et al.*, "Multimodality imaging approaches in alzheimer's disease: Part II: ^1H MR spectroscopy, FDG PET and amyloid PET," *Dement. e Neuropsychol.*, vol. 9, no. 4, pp. 330–342, 2015, doi: 10.1590/1980-57642015DN94000330.
- [30] W. E. Klunk *et al.*, "Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh

- Compound-B,” *Ann. Neurol.*, vol. 55, no. 3, pp. 306–319, 2004, doi: 10.1002/ana.20009.
- [31] Y. Wang *et al.*, “Development of a PET / SPECT Agent for Amyloid Imaging in Alzheimer ’ s Disease,” vol. 24, pp. 55–62, 2004.
- [32] M. Salerno and D. Santo Domingo Porqueras, “Alzheimer’s disease: The use of contrast agents for magnetic resonance imaging to detect amyloid beta peptide inside the brain,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 327–328, pp. 27–34, 2016, doi: 10.1016/j.ccr.2016.04.018.
- [33] F. L. Coelho and L. F. Campo, “Synthesis of 2-arylbenzothiazoles via direct condensation between in situ generated 2-aminothiophenol from disulfide cleavage and carboxylic acids,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 58, no. 24, pp. 2330–2333, 2017, doi: 10.1016/j.tetlet.2017.04.078.
- [34] B. O. Nitzsche, H. P. de Moraes, and A. R. T. Júnior, “Doença de Alzheimer: novas diretrizes para o diagnóstico - Alzheimers disease: new guidelines for diagnosis,” *Rev. méd. Minas Gerais*, 2015.
- [35] A. G. Vlassenko, T. L. S. Benzinger, and J. C. Morris, “PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer’s disease,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1822, no. 3, pp. 370–379, 2012, doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.005.
- [36] K. Cecí *et al.*, “Biomarcadores na doença de Alzheimer,” *Geriatr. Gerontol. Aging*, vol. 6, no. 3, pp. 273–282, 2012.
- [37] H. Amiri, K. Saeidi, P. Borhani, A. Manafirad, M. Ghavami, and V. Zerbi, “Alzheimer’s disease: Pathophysiology and applications of magnetic nanoparticles as MRI theranostic agents,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 4, no. 11, pp. 1417–1429, 2013, doi: 10.1021/cn4001582.
- [38] E. G. Zinser, T. Hartmann, and M. O. W. Grimm, “Amyloid beta-protein and lipid metabolism,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1768, no. 8, pp. 1991–2001, 2007, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.02.014.
- [39] B. Barz, Q. Liao, and B. Strodel, “Pathways of Amyloid- β Aggregation Depend on Oligomer Shape,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 1, pp. 319–327, 2018, doi: 10.1021/jacs.7b10343.
- [40] G. Chen *et al.*, “Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 38, no. 9, pp. 1205–1235, Sep. 2017, doi: 10.1038/aps.2017.28.
- [41] P. D. E. P. E. M. Química, “Mapeamento do Processo de Nucleação e

- Crescimento do Peptídeo Beta Amilóide pelo Complexo Luminescente cis - [Ru(phen) 2 (Apy) 2] 2+ ' Mariana Pigozzi Cali*," 2018.
- [42] P. N. Nirmalraj *et al.*, "Complete aggregation pathway of amyloid β (1-40) and (1-42) resolved on an atomically clean interface," *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 15, p. eaaz6014, Apr. 2020, doi: 10.1126/sciadv.aaz6014.
- [43] C. Iannuzzi, G. Irace, and I. Sirangelo, "Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation," *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2014, doi: 10.3389/fmolb.2014.00009.
- [44] V. H. FINDER and R. GLOCKSHUBER, "Amyloid- β Aggregation," *Neurodegener. Dis.*, vol. 4, no. 1, pp. 13–27, 2007, doi: 10.1159/000100355.
- [45] K. CUNVONG, D. HUFFMIRE, D. W. ETHELL, and D. JOSHUA CAMERON, "Amyloid- β increases capillary bed density in the adult zebrafish retina," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 2, pp. 1516–1521, 2013, doi: 10.1167/iovs.12-10821.
- [46] D. J. CAMERON *et al.*, "Alzheimer's-related peptide amyloid- β plays a conserved role in angiogenesis," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, pp. 1–8, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039598.
- [47] E. O'HARE *et al.*, "Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A β (1–42)," *Brain Res.*, vol. 815, no. 1, pp. 1–10, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0006-8993(98)01002-6.
- [48] P. D. E. P. E. M. QUÍMICA and L. F. CAMPO, "Síntese de materiais fotossensíveis baseados em corantes fluorescentes como meio ativo para dispositivos ópticos .," 2003.
- [49] W. H. MELHUIH, "Quantum Efficiencies Of Fluorescence Of Organic Substances: Effect Of Solvent And Concentration Of The Fluorescent Solute," *J. Phys. Chem.*, vol. 65, no. 2, pp. 229–235, Feb. 1961, doi: 10.1021/j100820a009.
- [50] S. FERY-FORGUES and D. LAVABRE, "Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure ? A Demonstration Using Familiar Stationery Products," vol. 76, no. 9, pp. 1260–1264, 1999.
- [51] R. PUJOL-PINA *et al.*, "SDS-PAGE analysis of A β oligomers is disserving research into Alzheimer's disease: Appealing for ESI-IM-MS," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. May, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1038/srep14809.
- [52] L. JASKULSKI *et al.*, "Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to Mycobacterium tuberculosis cytidine monophosphate

- kinase," *Arch. Biochem. Biophys.*, 2013, doi: 10.1016/j.abb.2013.05.012.
- [53] E. Y. Cotrina *et al.*, "Calorimetric Studies of Binary and Ternary Molecular Interactions between Transthyretin, A β Peptides, and Small-Molecule Chaperones toward an Alternative Strategy for Alzheimer's Disease Drug Discovery," *J. Med. Chem.*, vol. 63, no. 6, pp. 3205–3214, Mar. 2020, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01970.
- [54] L. A. Munishkina and A. L. Fink, "Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1768, no. 8, pp. 1862–1885, 2007, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.03.015.
- [55] S. K. Dogra, "Spectral characteristics of 2-(3',5'-diaminophenyl)benzothiazole: effects of solvents and acid–base concentrations," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 172, no. 2, pp. 185–195, May 2005, doi: 10.1016/j.jphotochem.2004.12.008.
- [56] J. K. Dey and S. K. Dogra, "Solvatochromism and Prototropism in 2-(Aminophenyl)benzothiazoles," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 64, no. 10, pp. 3142–3152, Oct. 1991, doi: 10.1246/bcsj.64.3142.
- [57] S. R. Patil, S. K.; Wari, M. N.; Panicker, C. Y.; Inamdar, "Determination ground and excited state dipole moments of dipolar laser dyes by solvatochromic shift method," *Spectrochim. Acta Part A – Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 123, pp. 117–126, 2014.
- [58] B. M. Krasovitskii, B. M.; Bolotin, "Organic Luminescent Materials," *New York Wiley-VCH*, p. 340, 1988.
- [59] J. K. Dey and S. K. Dogra, "Spectral characteristics of three different isomeric 2-(aminophenyl)benzoxazoles: Effect of solvents and acid concentrations," *Chem. Phys.*, vol. 143, no. 1, pp. 97–107, May 1990, doi: 10.1016/0301-0104(90)85010-T.
- [60] E. M. N. de Oliveira, "AGENTES DE CONTRASTE NANOESTRUTURADOS A BASE DE ÓXIDO DE FERRO : SÍNTESE , CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO Porto Alegre Março , 2018," 2018.
- [61] A. Korepanova and E. D. Matayoshi, "HPLC-SEC characterization of membrane protein-detergent complexes," *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 1, no. SUPPL.68, pp. 1–12, 2012, doi: 10.1002/0471140864.ps2905s68.
- [62] T. L. Rocha *et al.*, "Eletroforese bidimensional e análise de proteomas.,"

- Embrapa*, no. ISSN 9192-0099, pp. 1–12, 2005.
- [63] L. C. Serpell, "Alzheimer's amyloid fibrils: Structure and assembly," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1502, no. 1, pp. 16–30, 2000, doi: 10.1016/S0925-4439(00)00029-6.
- [64] O. S. Makin and L. C. Serpell, "Structures for amyloid fibrils," *FEBS J.*, vol. 272, no. 23, pp. 5950–5961, 2005, doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x.
- [65] M. R. Nilsson, "Techniques to study amyloid fibril formation in vitro," *Methods*, vol. 34, no. 1, pp. 151–160, 2004, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.012.
- [66] O. Szczepankiewicz *et al.*, "N-Terminal Extensions Retard A β 42 Fibril Formation but Allow Cross-Seeding and Coaggregation with A β 42," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 46, pp. 14673–14685, 2015, doi: 10.1021/jacs.5b07849.
- [67] L. Qin, J. Vastl, and J. Gao, "Highly sensitive amyloid detection enabled by thioflavin T dimers," *Mol. Biosyst.*, vol. 6, no. 10, pp. 1791–1795, 2010, doi: 10.1039/c005255h.
- [68] A. Lockhart *et al.*, "Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on β -amyloid peptide fibrils," *J. Biol. Chem.*, 2005, doi: 10.1074/jbc.M412056200.
- [69] A. Hawe, M. Sutter, and W. Jiskoot, "Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 1487–1499, Jul. 2008, doi: 10.1007/s11095-007-9516-9.
- [70] A. A. Reinke and J. E. Gestwicki, "Insight into amyloid structure using chemical probes," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 77, no. 6, pp. 399–411, 2011, doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01110.x.
- [71] P. Thordarson, "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 3, pp. 1305–1323, 2011, doi: 10.1039/C0CS00062K.
- [72] E. R. Padayachee and C. G. Whiteley, "Spectrofluorimetric analysis of the interaction of amyloid peptides with neuronal nitric oxide synthase: Implications in Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1810, no. 12, pp. 1136–1140, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.09.002.
- [73] M. Sebastiao, N. Quittot, and S. Bourgault, "Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility," *Anal. Biochem.*, vol. 532, pp. 83–86, 2017, doi: 10.1016/j.ab.2017.06.007.

- [74] M. Ghavami *et al.*, "Physiological temperature has a crucial role in amyloid beta in the absence and presence of hydrophobic and hydrophilic nanoparticles," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 4, no. 3, pp. 375–378, 2013, doi: 10.1021/cn300205g.
- [75] M. Dong *et al.*, "Structural and Material Properties of Amyloid A β 40/42 Fibrils," *ChemPhysChem*, vol. 31705, pp. 2558–2566, 2016, doi: 10.1002/cphc.201600256.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br