



**ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE SISTEMAS
SUPRAMOLECULARES MEDIANTE TÉCNICAS
DE FLUORESCENCIA: DE CICLODEXTRINAS A
BETA-AMILOIDES**

Sonia Freire Rodríguez

Tesis Doctoral, 2015

Departamento de Química-Física
Universidad de Santiago de Compostela





**ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE SISTEMAS
SUPRAMOLECULARES MEDIANTE TÉCNICAS
DE FLUORESCENCIA: DE CICLODEXTRINAS A
BETA-AMILOIDES**

Sonia Freire Rodríguez

Tesis Doctoral, 2015

Departamento de Química-Física
Universidad de Santiago de Compostela



LOS DOCTORES MARÍA DE LA MERCED NOVO RODRÍGUEZ Y WAJIH AL-SOUFI,
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, con el título **“ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES MEDIANTE TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA: DE CICLODEXTRINAS A BETA-AMILOIDES”**, que presenta la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **SONIA FREIRE RODRÍGUEZ** para optar al **Título de Doctora** por la **Universidad de Santiago de Compostela**, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química-Física de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, a 13 de Abril de 2015.

M^a de la Merced Novo Rodríguez

Wajih Al-Soufi



Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a los directores de mi tesis doctoral, Prof. Dra. Mercedes Novo y Prof. Dr. Wajih Al-Soufi, su gran ayuda durante todos estos años para poder finalizar este trabajo, incluyendo su paciencia y apoyo en mis idas y venidas dentro y fuera de la Universidad. También quiero agradecer a Prof. Dra. M. Flor Rodríguez, Prof. Dr. Manuel Mosquera, Prof. Dra. M. Carmen Ríos y Prof. Dr. J. Carlos Penedo su importante ayuda y colaboración en este trabajo y, en general, a todo el grupo de investigación en el que he trabajado por facilitar la financiación que me ha permitido terminar esta tesis doctoral de la mejor forma posible.

No podría olvidarme de mis compañeros durante todos estos años, Belén, Carlos, Dani Jorge y Lucas, a los que debo muchos momentos inolvidables y gran cantidad de consejos. Además, debo destacar y agradecer también la participación de Jorge y Dani como coautores en los trabajos sobre las ciclodextrinas y los sistemas micelares, así como a Marcus H. de Araujo por su participación en el estudio sobre la Tioflavina T.

También quiero agradecer a mi familia toda su atención y paciencia cada día, ya que ellos siempre han sido y serán lo más importante de mi vida.

Para finalizar, agradecer a la Xunta de Galicia la concesión de la ayuda del programa María Barbeito, sin la cual no habría sido posible la realización de este trabajo.



ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción y objetivos.....	1
Capítulo 2. Antecedentes bibliográficos.....	11
Capítulo 3. Métodos y técnicas experimentales.....	73
Capítulo 4. Análisis de datos.....	99
Capítulo 5. Receptores para encapsulación de pequeñas moléculas.....	123
Capítulo 6. Marcadores fluorescentes de fibras de β -amiloides.....	167
Capítulo 7. Caracterización de agregados tempranos de β -amiloides.....	241
Capítulo 8. Conclusiones.....	289
Referencias bibliográficas.....	293
Apéndice. Obtención de modelos.....	311
Resumen de la tesis doctoral.....	327
Artículos de investigación originales.....	333



CAPÍTULO 1

Introducción y objetivos

En la actualidad, diversos campos de investigación se centran en el estudio de los sistemas supramoleculares con el objetivo de poder conocer mejor distintos procesos que se desarrollan en el cuerpo humano, incluyendo ciertas enfermedades comunes en nuestra sociedad, aunque también presentan aplicaciones a nivel industrial.

La Química Supramolecular se define como la química de agregados moleculares y los enlaces formados entre ambos (Steed 2009). Los *sistemas supramoleculares* son sistemas heterogéneos a nivel microscópico en los cuales pueden existir cavidades hidrofóbicas o hidrofílicas que hospeden o eliminen solutos. Se encuentran unidos mediante interacciones intermoleculares, es decir, *no covalentes*, y su principal característica es su *reversibilidad*. Esta tiene especial importancia en procesos como el transporte de solutos entre diferentes medios, que requiere uniones específicas del soluto en el medio de origen y su rápida liberación en el punto final, por lo que una unión irreversible no permitiría este transporte. Los sistemas supramoleculares pueden presentar también sitios cargados donde los efectos electrostáticos influyen de forma importante sobre la distribución de los solutos en el sistema y sus interacciones.

Actualmente, el gran interés que existe por estos sistemas se debe a sus importantes aplicaciones tecnológicas y a su uso como modelos de sistemas biológicos, ya que presentan características comunes a determinadas estructuras supramoleculares como son las bicapas lipídicas que forman las membranas celulares y los complejos enzima-sustrato. Así, en las últimas décadas se han empleado sistemas supramoleculares organizados, como micelas, micelas inversas, vesículas o liposomas, entre otros, para el transporte de sustratos, para el reconocimiento selectivo de iones, como catalizadores, como modelos para el estudio de sistemas de mayor complejidad, etc. También se han estudiado ampliamente los sistemas

supramoleculares resultantes de la interacción de una macromolécula con un sustrato, que juegan un papel primordial en muchos procesos biológicos y tienen también gran interés en aplicaciones industriales como la elaboración de fármacos. Muchos de estos sistemas supramoleculares se sintetizan con el objetivo de entender cómo se desarrollan procesos biológicos primarios como el reconocimiento molecular, la cooperatividad, la reversibilidad, el autoensamblaje, etc. (Steed 2009).

Los sistemas formados por la interacción entre macromoléculas o agregados de moléculas y otros sustratos presentes en el medio se denominan con el término inglés "*host-guest systems*". Este término no tiene una traducción directa al español, por lo que es necesario explicar cómo se va a denominar en el desarrollo de este trabajo, para así evitar equívocos. De forma general, se utilizará el término "*sustrato-receptor*", donde el *sustrato* (*guest*) es la molécula capaz de interactuar con la macromolécula o agregado, denominado *receptor* (*host*). Los receptores poseen cavidades o sitios capaces de albergar moléculas e interactuar con las mismas, dando lugar a *complejos de inclusión*. Estos complejos se forman por la aparición de distintas fuerzas intermoleculares que actúan en el proceso de asociación, siendo las principales responsables las fuerzas hidrofóbicas, aunque también pueden actuar fuerzas electrostáticas o incluso enlaces por puente de hidrógeno.

En el desarrollo de este trabajo se estudia el papel que juegan las distintas fuerzas intermoleculares presentes en sistemas supramoleculares de interés biológico, utilizando modelos de composición definida. Para realizar este estudio se han empleado distintos métodos espectroscópicos, siendo los sustratos moléculas fluorescentes (*fluoróforos* o *sondas fluorescentes*). Dichos métodos permiten determinar la estequiometría de los complejos de inclusión formados, sus constantes de asociación y sus propiedades fotofísicas, proporcionando información acerca del comportamiento del sistema supramolecular y las características estructurales del sustrato y del receptor. También es muy importante el conocimiento de la dinámica de asociación y de disociación del sistema supramolecular, es decir, la determinación de las velocidades de los procesos de entrada y salida del sustrato dentro o fuera del receptor, siendo estos métodos espectroscópicos muy adecuados debido a que permiten observar procesos dinámicos rápidos. Así, las técnicas empleadas son la Espectroscopia de Absorción UV-Vis, Espectroscopia de Fluorescencia en estado estacionario, Espectroscopia de Fluorescencia con resolución temporal, Anisotropía de Fluorescencia y Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia, siendo esta última técnica la de mayor complejidad y la que permite el estudio de la dinámica de los sistemas supramoleculares.

Los sistemas supramoleculares incluidos en este estudio presentan estructuras de distinta complejidad y rigidez, actuando en los mismos diferentes tipos de fuerzas

intermoleculares que definen su comportamiento. Así, inicialmente se estudiaron los sistemas supramoleculares formados por distintos sustratos fluorescentes en presencia de ciclodextrinas y micelas, ambas con importantes aplicaciones industriales centradas en la encapsulación de moléculas. Después se continuó con la caracterización de sistemas de gran importancia biológica, las proteínas β -amiloide. Concretamente se estudió el proceso de agregación del péptido β -amiloide de 42 aminoácidos, que presenta un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Estos agregados son sistemas supramoleculares por sí solos, al estar formados por la unión de varias moléculas mediante la actuación de distintas fuerzas, entre las que se incluyen enlaces por puente de hidrógeno. La formación de agregados de amiloide de distintos tamaños está siendo actualmente muy estudiada con el fin de obtener información acerca del proceso de asociación del péptido y determinar las condiciones que conllevan la aparición de los mismos. El estudio se lleva a cabo, al igual que los anteriores, mediante la interacción del sistema con una sonda fluorescente que actúa como el sustrato.

A continuación se van a indicar las características principales de los sistemas supramoleculares bajo estudio y de los distintos fluoróforos empleados para la caracterización de los mismos, ampliando esta información en el siguiente capítulo de antecedentes bibliográficos.

Las *ciclodextrinas* (CD_s) son moléculas cíclicas formadas por unidades de glucopiranosas unidas mediante enlaces $\alpha(1-4)$. Estas macromoléculas presentan una cavidad central altamente hidrofóbica en la que se pueden introducir gran cantidad de sustratos orgánicos e inorgánicos. Su disposición para formar estos complejos de inclusión, dando lugar a un sistema supramolecular, es la base de sus numerosas aplicaciones, ya que su moderada solubilidad en agua y su capacidad de hospedar moléculas permiten que sean utilizadas para transportar fármacos insolubles en medio acuoso y en procesos de liberación controlada de medicamentos. Además, estos sistemas son modelos de las interacciones enzima-sustrato y otras similares en las que los receptores son cavidades más o menos rígidas (Del Valle 2004, Challa 2005). El estudio de este sistema se realizó empleando como fluoróforo la Cumarina 460, aminocumarina que presenta un proceso de transferencia de carga en el estado excitado que hace que sea un fluoróforo muy sensible a la polaridad del medio. Además, este colorante presenta un amplio espectro de aplicaciones biológicas. Por tanto, su utilización en este estudio se basó en poder determinar información no sólo del sistema supramolecular sino también del propio sustrato.

En este trabajo también se completaron estudios existentes en el grupo de investigación sobre las interacciones de colorantes catiónicos con micelas de tensioactivos, centrándonos concretamente en las producidas entre el fluoróforo Rodamina 123 y los distintos tipos de

micelas según la carga de la cabeza polar (catiónicas, aniónicas y neutras). Los sistemas micelares son empleados como modelos de membranas biológicas ya que forman sistemas organizados, flexibles y dinámicos muy adecuados para este estudio por su tamaño y sencillez. Además, estas micelas también presentan una importante aplicación a nivel industrial ya que son empleadas en la elaboración de detergentes.

La Rodamina 123 es un marcador fluorescente de mitocondrias capaz de acumularse selectivamente en estos orgánulos presentes en las células vivas. Es un colorante catiónico que tiene un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y una elevada fotoestabilidad, motivo por el cual se eligió como fluoróforo para este estudio. Las fuerzas de interacción presentes entre este tipo de colorantes catiónicos y las micelas de tensioactivos son fundamentalmente hidrofóbicas y electrostáticas, y son también las responsables de la afinidad de los colorantes citados por las membranas biológicas. Por tanto, se usaron los sistemas micelares como modelos de dichas membranas, estudiándose los cambios de las propiedades fotofísicas del fluoróforo en presencia de diferentes concentraciones de los surfactantes. Industrialmente, el interés de estos estudios reside principalmente en la determinación de la concentración micelar crítica (*cmc*) de los tensioactivos, que es una de las propiedades más importantes para su utilización de los mismos en la elaboración de detergentes.

La parte más extensa de este trabajo corresponde a un estudio exhaustivo del proceso de agregación y de los agregados del péptido de β -amiloide(1-42), considerado el principal responsable de la aparición de la enfermedad de Alzheimer una vez se produce su autoasociación para dar lugar a agregados de distintos tamaños.

La Fundación Alzheimer España define la enfermedad de Alzheimer (EA) como “una enfermedad neurodegenerativa de las células cerebrales, las neuronas, de carácter progresivo e irreversible, de origen todavía desconocido y frente a la que no existe, hoy en día, ningún tratamiento capaz de curarla o prevenirla” (www.alzfae.org). En España, cerca de 600000 personas están afectadas y cada año aparecen más de 100000 nuevos casos. Actualmente, debido al fuerte impacto que supone la EA en la sociedad, en la sanidad y en la economía, la proteína β -amiloide, considerada la principal responsable de la misma, es una de las de mayor interés biomédico. Este péptido es un fragmento de la llamada proteína precursora amiloide (APP), proteína de gran tamaño, protectora del tejido nervioso y que da lugar al amiloide al ser degradada por determinadas enzimas. En un cerebro normal, este péptido es eliminado pero en la EA se asocia en forma de agregados de distintos tamaños (Selkoe 2001). Estos agregados presentan características tóxicas y se consideran los responsables de la aparición de diversas lesiones cerebrales (LaFerla 2007, Selkoe 2003). A medida que los agregados aumentan de tamaño se reorganizan para dar lugar a fibras insolubles que se

depositan entre las neuronas, originando las denominadas *placas seniles*. Además, el proceso de agregación favorece también un enmarañamiento de los microtúbulos de las neuronas, formándose los *ovillos neurofibrilares* típicos de esta enfermedad. Las lesiones citadas son características de la EA, aunque también aparecen otros cambios patológicos como numerosas alteraciones funcionales y estructurales (Selkoe 2001). Todos estos procesos conllevan una severa disfunción y pérdida sináptica y neuronal.

El péptido β -amiloide puede existir en múltiples estados de agregación, presentando una gran tendencia a formar fibras insolubles. Puede encontrarse como monómero o formando oligómeros, protofibras o, ya con una mayor organización en su estructura, fibras amiloides (Figura 1.1) (Selkoe 2001, LaFerla 2007). En su estado monomérico, el β -amiloide no parece ser neurotóxico. En cambio, la formación de fibras de amiloide se considera una de las causas de la enfermedad, debido a su acumulación en el cerebro en forma de placas sólidas. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que los pequeños agregados que se forman antes de la aparición de estas fibras son muy tóxicos, siendo probablemente los verdaderos responsables de los síntomas de la misma (Greene 2002, Walsh 2007, Sakono 2010).

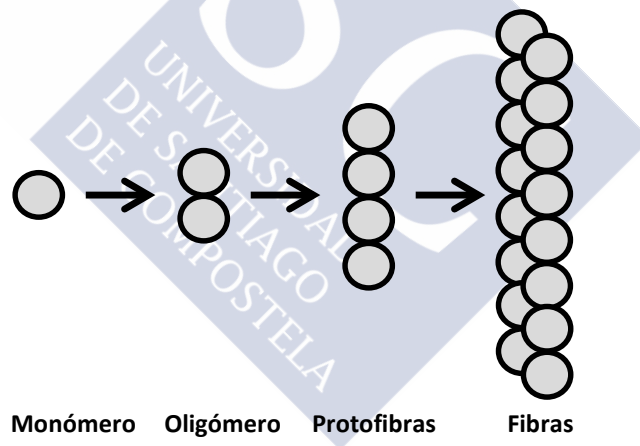


Figura 1.1. Estados de la agregación del péptido β -amiloide, desde monómeros hasta agregados altamente organizados denominados fibras (LaFerla 2007).

Las fibras de β -amiloide son estructuras largas y altamente ordenadas, con un diámetro medio de 6 a 12 nm (Stefani 2003, Gilead 2005). Su estructura secundaria, en general, consiste en elementos de lámina β . Están constituidas principalmente por el péptido β -amiloide(1-42), que se deposita en el cerebro como una placa insoluble, causando importantes daños celulares. En la actualidad, las técnicas más comunes para identificar la presencia de fibras amiloides son el uso del fluoróforo Tioflavina T para su marcaje fluorescente, la Microscopía

de Transmisión Electrónica (TEM) y la Espectroscopia de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) (Melanie R 2004).

El colorante Tioflavina T (ThT), ampliamente utilizado en el marcaje de fibras de amiloide, es un benzotiazol con afinidad por estas estructuras con morfología fibrilar, considerándose que no interacciona de forma significativa con monómeros ni agregados de bajo peso molecular (Groenning 2010). Este marcador permite determinaciones cualitativas de fibras de amiloide, basada en un gran incremento en su emisión de fluorescencia, y sólo es válido para estudios *in vitro*, ya que la molécula está cargada positivamente, lo cual es un impedimento para que pueda atravesar la barrera hematoencefálica del cerebro. A pesar de los numerosos trabajos recientes, el comportamiento fotofísico de la ThT en distintos medios no está totalmente descrito en la bibliografía, existiendo todavía datos inconsistentes que han sido clarificados con esta investigación. Además, se han analizado y discutido las ventajas y limitaciones de este fluoróforo para la detección y cuantificación de fibras de amiloide y de agregados más tempranos.

Debido a las limitaciones que presenta la ThT se ha abordado también en este trabajo una búsqueda de nuevos marcadores fluorescentes, no sólo para la detección de fibras de amiloide sino también para localizar y caracterizar agregados de menor tamaño, empleando siempre como referencia los resultados obtenidos para la ThT. Estas sondas podrían ser utilizadas para mejorar la precisión del diagnóstico en casos tempranos de la EA, si fueran capaces de marcar los agregados de bajo peso molecular. Además, podrían permitir observar la progresión de la enfermedad y evaluar la eficacia de los agentes terapéuticos.

En este trabajo se decidió estudiar como potenciales marcadores de amiloide sondas fluorescentes estructuralmente análogas a la ThT, capaces de sufrir en el estado excitado procesos de transferencia protónica y de transferencia de carga intramoleculares asociados, convirtiéndolas en sondas muy sensibles al medio que las rodea. Estos procesos primarios son la base de muchos procesos fotoquímicos y fotobiológicos complejos. Las moléculas que los presentan tienen importantes aplicaciones como, por ejemplo, en su uso como sensores en sistemas biológicos y químicos o en electroluminiscencia (Brenlla 2011).

La elección de este tipo de sondas no fue debida únicamente a su sensibilidad al entorno sino también por la posibilidad que plantean de establecer un método ratiométrico al presentar fluorescencia dual. Recientemente se ha demostrado la validez de dicho método para monitorizar la agregación de proteínas empleando una sonda con dos bandas de fluorescencia, justificando los resultados para el caso concreto de la α -sinucleína relacionada con la enfermedad de Parkinson (Yushchenko 2010). De forma general, la obtención de dos bandas de fluorescencia se basa en la existencia de distintos procesos fotofísicos como

transferencia de carga intramolecular (*ICT*), transferencia protónica intramolecular en el estado excitado (*ESIPT*), transferencia de energía por resonancia fluorescente (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*), transferencia electrónica a través de enlace (*Through-Bond Energy Transfer, TBET*) o formación de excímeros (Demchenko 2010, Lee 2014).

Las sondas seleccionadas para este estudio, HPIP, HPIP_NMe, HBO y HBT, pertenecen a las familias del imidazol, oxazol y tiazol. Inicialmente fueron estudiadas para su aplicación en la detección de fibras de β -amiloide, continuando después con su estudio en presencia de pequeños agregados del mismo péptido. Estos agregados de bajo peso molecular fueron caracterizados previamente mediante Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia utilizando un péptido de β -amiloide marcado. Así, se estudió la evolución temporal del proceso de agregación y su dependencia con la concentración de péptido, determinando el tamaño de los agregados. Posteriormente se procedió a analizar el comportamiento fotofísico de las sondas fluorescentes citadas en presencia de dichos agregados tempranos para comprobar su validez como marcadores.

Una vez definidos los sistemas y sus características principales, se van a establecer los **objetivos** del presente trabajo, dividiéndolos en tres bloques en función del sistema supramolecular estudiado.

- a) Complejos supramoleculares sustrato-receptor entre la Cumarina 460 y las ciclodextrinas: una cuestión de tamaño (*Supramolecular host guest complexes between Coumarin 460 and cyclodextrins: a matter of size, Artículo 1*) (Capítulo 5.1)

Se estudia la asociación entre las ciclodextrinas naturales y el fluoróforo Cumarina 460 a pH neutro, con el fin de comprobar la influencia que tiene el tamaño de la cavidad del receptor en la estequiometría, la estructura y la fuerza de asociación con el sustrato hidrofóbico. Se trata de obtener los valores de las constantes de equilibrio implicadas y caracterizar el complejo o los complejos formados, determinando sus propiedades fotofísicas.

- b) Papel de las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas en la interacción de colorantes iónicos con micelas cargadas (*Role of Electrostatic and Hydrophobic Forces in the Interaction of Ionic Dyes with Charged Micelles, Artículo 2*) (Capítulo 5.2)

Se investiga la asociación del fluoróforo catiónico Rodamina 123 con tensioactivos aniónicos, catiónicos y neutros y sus correspondientes micelas y se determina su comportamiento fotofísico en dichos medios, con el fin de analizar el papel que juegan las diferentes interacciones electrostáticas e hidrofóbicas producidas como consecuencia de la distintas estructuras de los surfactantes sobre la termodinámica del sistema supramolecular formado. Sobre la base de modelos capaces de explicar el proceso de asociación, se

determinaron las constantes de equilibrio características de esta interacción, así como otros parámetros informativos del comportamiento de estos sistemas.

c) Estudio del proceso de agregación del péptido β -amiloide(1-42) y caracterización de sus agregados tempranos y fibrilares mediante marcadores fluorescentes

Dentro de este bloque se han abordado diferentes estudios que se enumeran a continuación. Parte de los resultados obtenidos están pendientes de publicación pero se incluyen también en este trabajo.

- Estudio fotofísico de la Tioflavina T como marcador fluorescente de fibras amiloides (*Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils*, Artículo 3) (Capítulo 6.1)

Debido a que la ThT es el principal fluoróforo empleado en el marcaje de las fibras de amiloide y su comportamiento fotofísico aún es controvertido, se aborda en primer lugar su caracterización en disolución acuosa y en medios no acuosos de distintas viscosidades, como el cloroformo o el glicerol. A continuación se determina su comportamiento en presencia de la proteína β -amiloide(1-42) en forma de fibras maduras y de la proteína BSA, con estructura globular. El objetivo es establecer un mecanismo capaz de explicar esta interacción y determinar las distintas propiedades fotofísicas que caracterizan a los sistemas formados.

- Avanzando hacia la detección ratiométrica de fibras de amiloide *in vitro* (*Towards ratiometric sensing of amyloid fibrils in vitro*, Artículo 4) (Capítulo 6.2)

Se estudian los cambios en las propiedades fluorescentes del HPIP debidos a la presencia de los agregados fibrilares de β -amiloide, comparando siempre con los resultados obtenidos para la ThT, con el objetivo de comprobar su validez como marcadores del amiloide y caracterizarlos. Para analizar su comportamiento, se realizan estudios preliminares en distintos disolventes y en presencia de proteínas no fibrilares, como la BSA, para finalmente estudiar su interacción con las fibras de amiloide, llevando a cabo experimentos en función del tiempo y de la concentración de fibras.

- Otros potenciales marcadores fluorescentes de fibras de β -amiloide (Capítulo 6.3)

Se analiza también la potencial aplicación de otras sondas de transferencia protónica (HPIPnMe, HBO y HBT) para la detección y cuantificación de fibras de amiloide.

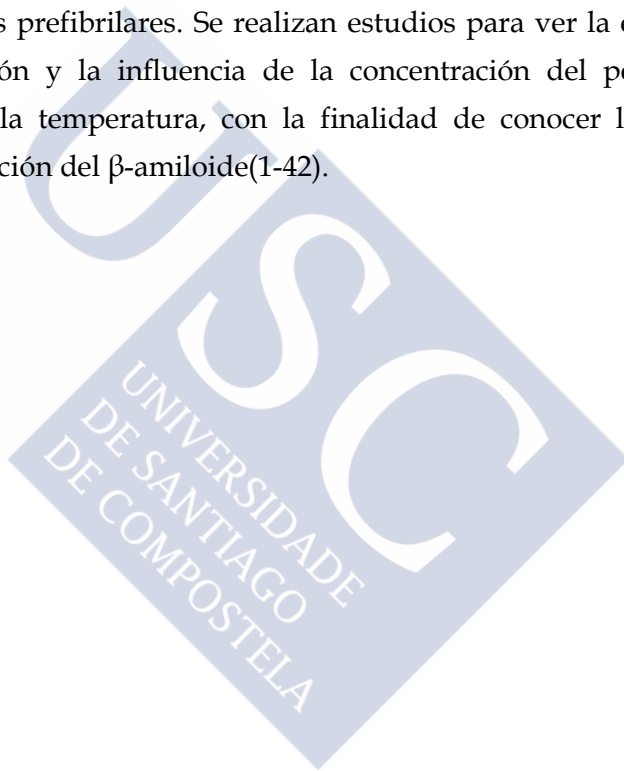
- Estudio del proceso de agregación y caracterización de los agregados tempranos de β -amiloide(1-42) mediante FCS (Capítulo 7.1 y 7.2)

Mediante la técnica de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS) se estudian los agregados tempranos de β -amiloide(1-42) con el objetivo de determinar su

comportamiento y caracterizarlos. Para esto se emplea un péptido de β -amiloide marcado fluorescentemente, el Hilyte Fluor 488- β -amiloide(1-42), y se analizan los cambios en la curva de correlación en función del tiempo y de la concentración de péptido. Estos experimentos permiten obtener información acerca del tamaño de los agregados y de la cinética de formación de los mismos.

- Caracterización de potenciales marcadores fluorescentes de pequeños agregados de β -amiloide(1-42) (Capítulo 7.3)

Mediante el uso de técnicas de fluorescencia convencionales se estudian los pequeños agregados de amiloide, ya caracterizados mediante FCS, en presencia de las mismas sondas fluorescentes utilizadas con fibras, con el objetivo de determinar su validez para el marcaje de este tipo de agregados prefibrilares. Se realizan estudios para ver la evolución temporal del proceso de agregación y la influencia de la concentración del péptido, además de comprobar el efecto de la temperatura, con la finalidad de conocer lo mejor posible el mecanismo de autoasociación del β -amiloide(1-42).





CAPÍTULO 2

Antecedentes bibliográficos

Contenidos

2.1. Los sistemas supramoleculares	13
2.1.1. Las ciclodextrinas	13
2.1.2. Los sistemas micelares	16
2.1.3. Las proteínas. El péptido β -amiloide y la enfermedad de Alzheimer	24
2.2. Las sondas fluorescentes	35
2.2.1. Sondas fluorescentes para medidas en FCS	36
2.2.2. Sondas fluorescentes con transferencia de carga intramolecular	41
2.2.3. Sondas fluorescentes con transferencia protónica	56
2.3. La Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS)	67
2.3.1. Principio básico de la técnica	67
2.3.2. Saturación óptica y fotoblanqueo	70



2.1. Los sistemas supramoleculares

En el desarrollo de este trabajo se analizan varios sistemas supramoleculares basados en la interacción no covalente de distintos tipos de sustratos y receptores. Inicialmente, se estudian sistemas organizados sencillos empleando como receptores las *ciclodextrinas*, macromoléculas de estructura cíclica rígida, para avanzar posteriormente a sistemas más flexibles como son los *sistemas micelares*. Se finaliza con el estudio de sistemas supramoleculares de mayor complejidad y de gran interés biomédico, como son los agregados formados por el péptido *β -amiloide*, centrándonos en la caracterización de las distintas fases del proceso de agregación.

2.1.1. Las ciclodextrinas

Las *ciclodextrinas* (CDs) son macromoléculas cíclicas formadas por residuos de D(+)-glucopiranosos unidos mediante enlaces $\alpha(1-4)$. Alcanzaron gran importancia a mitad del siglo XX al descubrirse su capacidad para formar complejos de inclusión, por lo que fueron muy estudiadas en diversos campos científicos (Szejtli 1988, Del Valle 2004, Challa 2005, Astray 2009).

La estructura de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas naturales son la α -ciclodextrina (α -CD), la β -ciclodextrina (β -CD) y la γ -ciclodextrina (γ -CD), que contienen 6, 7 y 8 moléculas de glucopiranosos, respectivamente. Se obtienen a partir del almidón por la acción de la ciclodextrin-glicosiltransferasa (CGTasa), que es una enzima producida por varios microorganismos.

La configuración molecular tridimensional más estable para estos oligosacáridos cíclicos tiene la forma de un *toroide* o *cono truncado* (Figura 2.1), con una apertura superior grande y una inferior de menor tamaño, presentando grupos hidroxilos primarios y secundarios hacia el exterior en contacto con el disolvente. El interior de la ciclodextrina es hidrofóbico, con un entorno rico en electrones debido a los átomos de oxígeno de los enlaces glucosídicos. Esta característica permite la inclusión de moléculas de diferentes tipos dentro de su cavidad apolar (Figura 2.2).

En cuanto al tamaño de la cavidad de las CDs, éste aumenta significativamente de la α -CD a la β -CD y a la γ -CD, aunque la altura del cono apenas se ve afectada, como se muestra en la Figura 2.1.

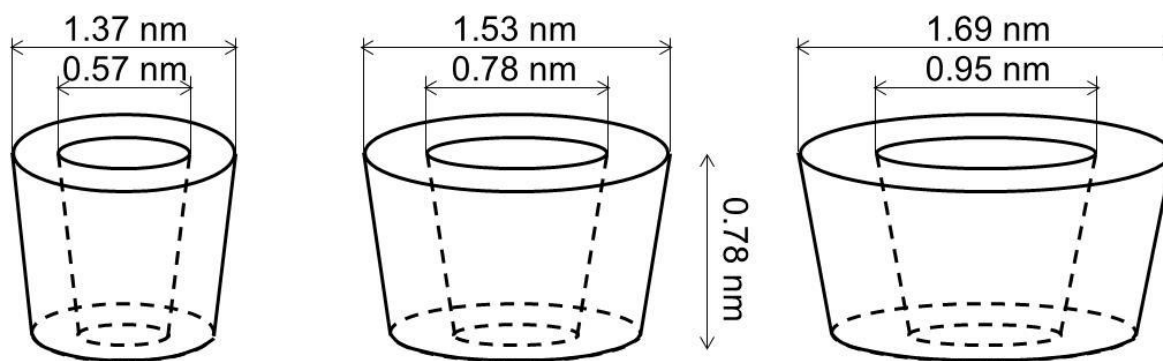


Figura 2.1. Estructura troncocónica y dimensiones moleculares de las ciclodextrinas naturales α -CD, β -CD y γ -CD, de izquierda a derecha.

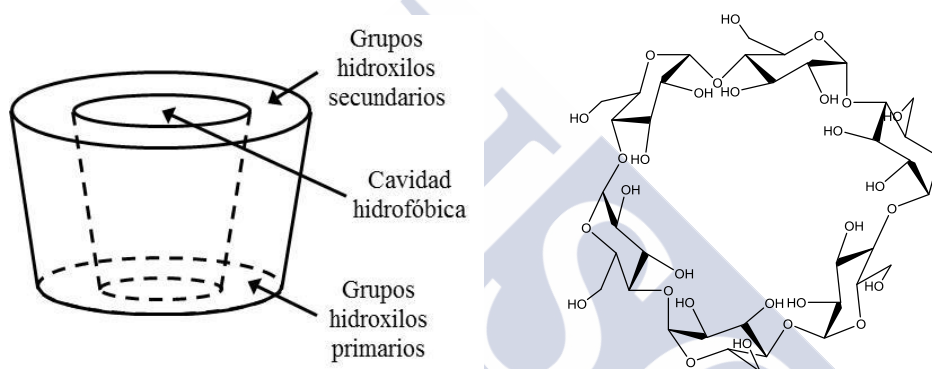


Figura 2.2. Esquema de la estructura funcional de las ciclodextrinas (izquierda). Estructura de la α -CD en la que se muestra la disposición de los grupos hidroxilo (derecha).

Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas

La presencia de grupos hidroxilos en la estructura de la ciclodextrina le confieren una cierta solubilidad en agua. Sin embargo, el grupo hidroxilo de una unidad de glucopiranososa puede formar un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo contiguo de la glucopiranososa adyacente. En la α -CD, el cinturón de enlaces de hidrógeno está incompleto debido a que una de las moléculas de las unidades de glucopiranososa está en posición distorsionada. Por tanto, sólo cuatro de los seis posibles enlaces de hidrógeno están estabilizados y, como resultado, la α -CD tiene una estructura más flexible y mayor solubilidad en agua. Con la γ -CD sucede algo similar. En cambio, en la β -CD estos enlaces de hidrógeno forman un cinturón secundario completo, otorgándole una estructura al anillo bastante rígida. Como consecuencia, la β -CD tiene una solubilidad en agua más baja que las anteriores (Szejtli 1988).

Como se ha indicado, las ciclodextrinas presentan una estructura cíclica hueca con dos zonas diferenciadas: una interna apolar y otra externa polar. Esta característica permite que puedan hospedar en su interior distintos compuestos, dando lugar generalmente a complejos de inclusión de estequiometría 1:1 (Figura 2.3).

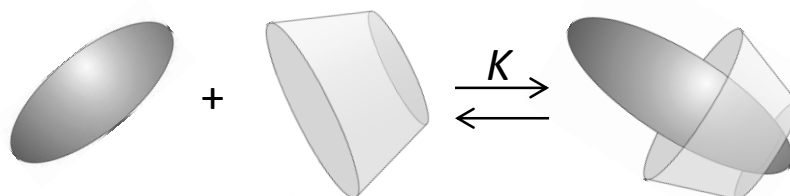


Figura 2.3. Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1, con constante de asociación K .

Los complejos de inclusión presentan características y propiedades fisicoquímicas diferentes a las de la ciclodextrina y del sustrato por separado. En algunos casos, la formación de estos complejos facilita la solubilización de sustancias mientras que en otros casos se produce la precipitación de algún componente de la disolución al formarse el complejo. Un ejemplo destacable es la formación del complejo colesterol: β -CD, que precipita en disolución acuosa, lo que ha permitido emplear la β -CD en la extracción del colesterol de alimentos (Del Valle 2004).

Los complejos de inclusión se forman como resultado de interacciones hidrofóbicas y/o específicas no covalentes entre las ciclodextrinas y las moléculas que incorporan. Estas fuerzas intermoleculares que actúan son muy variadas, comprendiendo desde fuerzas de Coulomb, de Van der Waals y de London, hasta los enlaces de hidrógeno. En general, las moléculas que interactúan con la ciclodextrina se orientan de forma que se alcance el máximo contacto entre la parte hidrofóbica del sustrato y la cavidad apolar de la ciclodextrina (Szejtli 1988, Szejtli 1996).

La estabilidad y la estructura de los complejos formados dependen fundamentalmente de factores geométricos y de factores de polaridad:

1. *Compatibilidad geométrica:* las CDs son capaces de formar complejos de inclusión con componentes que tengan un tamaño y una forma geométrica comparables a las dimensiones y geometría de su cavidad. La formación de complejos con moléculas más grandes es posible si dentro de ésta solamente penetran ciertos grupos o

cadena laterales menos voluminosos o si se forman complejos sustrato-receptor de estequiometría 1:2.

2. *Polaridad del sustrato*: solamente son susceptibles de formar complejos de forma estable aquellas moléculas que tiene una polaridad inferior a la del agua.

¿Qué aplicaciones presentan las ciclodextrinas?

El hecho de que las ciclodextrinas y sus derivados formen complejos de inclusión estables hace que éstas tengan multitud de aplicaciones industriales en farmacología, biotecnología, tecnología de alimentos, cosmética, química analítica, tecnología medioambiental, etc. (Del Valle 2004, Challa 2005, Astray 2009).

La aplicación de las ciclodextrinas en la *industria farmacéutica* se debe principalmente a que los complejos de inclusión formados con diversos fármacos modifican las propiedades físicas y químicas de los mismos, pudiendo aumentar su estabilidad o facilitar su dosificación controlada. Además, las ciclodextrinas ingeridas por vía oral no son tóxicas ni presentan efectos secundarios.

En el *sector alimentario* las ciclodextrinas se emplean por su capacidad para complejar sustancias aromáticas. Esta característica permite su uso en procesos como la aceleración o el retraso de la maduración de frutas, eliminación o reducción de olores y sabores no deseados, etc.

En la *industria agroquímica*, el uso de las ciclodextrinas se relaciona con la complejación de pesticidas, aumentando la biodisponibilidad de compuestos poco solubles y disminuyendo la dosis a emplear, protegiendo en mayor medida el medio ambiente.

En la *industria química* se utilizan las ciclodextrinas como modelos enzimáticos, catalizadores o inhibidores de reacción, agentes de complejación, etc., permitiendo una amplia gama de aplicaciones.

Su uso también es importante en la *tecnología medioambiental*, enfocándose principalmente en el tratamiento de aguas residuales y recuperación de petróleo de suelos.

2.1.2. Los sistemas micelares

Las sustancias tensioactivas, también denominadas surfactantes, tienen aplicaciones en muchas áreas, como química, biología, farmacia, etc., destacando su uso en la industria de los detergentes. Además, los sistemas organizados formados por surfactantes se utilizan a nivel de investigación como modelos de membranas biológicas.

Cada molécula de tensioactivo está constituida por dos partes de diferente naturaleza, una con gran afinidad por el medio acuoso y otra con afinidad por medios más hidrófobos. Se pueden representar por la fórmula general RX , donde R es normalmente una cadena hidrocarbonada apolar que posee entre 10 y 20 átomos de carbono y X es la cabeza con carácter polar. Por tanto, los tensioactivos son moléculas *anfipáticas* que tienen tendencia a acumularse en la interfase de un medio, orientándose para minimizar las interacciones desfavorables. Al aumentar la concentración de un tensioactivo, las moléculas tienden a ordenarse en forma de *monocapas*, causando una fuerte disminución de la tensión superficial. A una cierta concentración, denominada *concentración micelar crítica (cmc)*, los surfactantes tienden a formar agregados denominados *micelas* (Figura 2.4). Por encima de la *cmc*, la concentración de monómeros del surfactante en la interfase se mantiene constante y sólo aumenta el número de micelas, por lo que la tensión superficial se hace independiente de la concentración de tensioactivo.

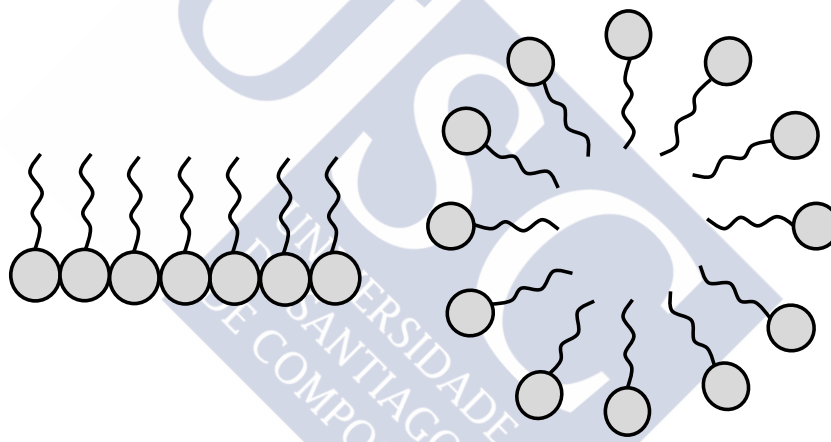


Figura 2.4. Tensioactivo agregado formando una monocapa (izquierda) y una micela esférica (derecha).

Dependiendo de la carga de la cabeza polar, los tensioactivos se clasifican en *catiónicos*, *aniónicos* o *no iónicos* (Domínguez 1997). Las moléculas de tensioactivo no iónicas se pueden agrupar en agregados de más de mil unidades, mientras que las especies iónicas tienden a disgregarse por las repulsiones electrostáticas entre los grupos polares, por lo que normalmente se limitan a agrupaciones inferiores a 100 unidades. Estas moléculas cargadas incluyen en su estructura iones de signo contrario, conocidos como *contraiones*, que intervienen en el proceso de micelización tal como se indica en la ecuación (2.1) para un tensioactivo aniónico.



S^- representa el anión del tensioactivo, C^+ el contraión, n el número de agregación y $z = n - m$ la carga neta de la micela. Una ecuación análoga podría escribirse para un tensioactivo catiónico y los correspondientes contraiones negativos.

Con esto se pueden definir los parámetros indicados en las ecuaciones (2.2) y (2.3), siendo α la fracción ionizada de la micela y β la fracción de contraiones o fracción de carga micelar neutralizada.

$$\alpha = \frac{n - m}{n} \quad (2.2)$$

$$1 - \alpha = \frac{m}{n} = \beta \quad (2.3)$$

¿Cómo se determina la *cmc* de un tensioactivo?

Para obtener la *cmc* de un tensioactivo se puede utilizar cualquier propiedad fisicoquímica cuya variación con la concentración presente una discontinuidad debida a la formación de micelas: tensión superficial, presión osmótica, difusión de luz, conductividad (sólo para tensioactivos iónicos), etc. (Figura 2.5).

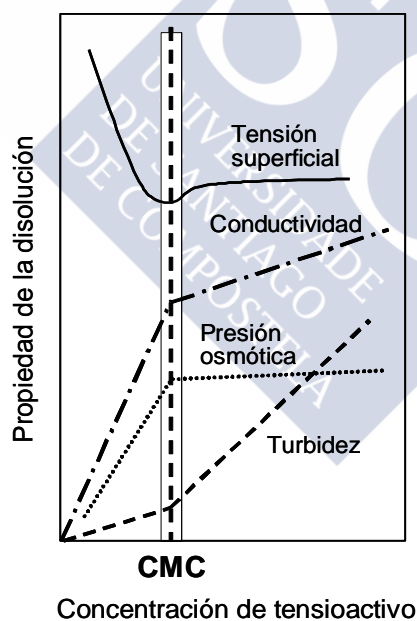


Figura 2.5. Propiedades fisicoquímicas empleadas para la determinación de la *cmc* de tensioactivos.

También se pueden utilizar métodos indirectos, como son la absorción Vis-UV o la emisión de fluorescencia, en los que se analiza la variación de las propiedades de un fluoróforo con el proceso de micelización.

Para entender los resultados obtenidos durante esta investigación se va a explicar un procedimiento para determinar la *cmc*, que es el *método de fluorescencia*. La Espectroscopia de Fluorescencia se utiliza generalmente para determinar este parámetro por su mayor sensibilidad, pero también se puede utilizar la Espectroscopia de Absorción, siendo análoga la base de aplicación de ambos métodos.

Para aplicar el método de fluorescencia y determinar la *cmc* de un tensioactivo es necesario emplear una sonda fluorescente hidrófoba, como es el *pireno*, cuya intensidad de fluorescencia y/o espectro de emisión varía significativamente con la polaridad del medio circundante (Piñeiro 2015). En ausencia de micelas, es decir, a concentraciones de surfactante menores que la *cmc*, el pireno se encuentra en un medio acuoso polar mientras que en presencia de micelas, por encima de la *cmc*, el pireno tiende a introducirse en el interior apolar de estos agregados (Kalyanasundaram 1977). Este cambio en el entorno del pireno se refleja en su espectro de emisión, cuya relación de intensidades entre su primera y su tercera banda vibracional (I_3 / I_1) varía con la concentración de surfactante según la Figura 2.6.

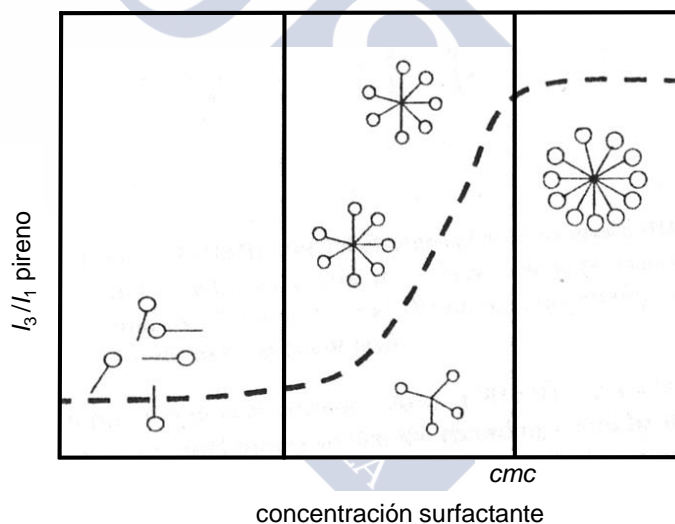


Figura 2.6. Proceso de micelización en función de la concentración de tensioactivo, observado a través de la relación de bandas de emisión del pireno (Sahoo 2002).

Se propusieron dos métodos como los posibles para determinar la *cmc* a partir de dicha relación de bandas del pireno (Zana 1997, Aguiar 2003):

- Tomando el punto de inflexión de la curva como *cmc*, comprobándose que se obtenían valores para este parámetro que estaban generalmente por debajo de los determinados mediante otros métodos. Este procedimiento estaría limitado a tensioactivos con *cmc* bajas (inferiores a 1 mM).

- Considerando la *cmc* como el valor de concentración al que se obtiene una estabilidad en la señal de fluorescencia (correspondiente al valor de concentración más alto indicado en la Figura 2.6). Este último punto fue el considerado más adecuado pero con ciertas restricciones: su validez se basa en que el fluoróforo empleado tenga *gran afinidad por entrar en la micela* porque en el momento en que se empiecen a formar éstas (o pequeños agregados premicelares) ya va a existir un cambio en la fluorescencia. Este método se considera válido para la mayoría de los surfactantes.

Tanto si se decide emplear un método como el otro, el valor de la *cmc* puede obtenerse ajustando la función de Boltzmann a los datos experimentales, como se muestra en la Figura 2.7 (obsérvese que en este caso se representa la relación I_1 / I_3 , pero el resultado es análogo al uso de I_3 / I_1).

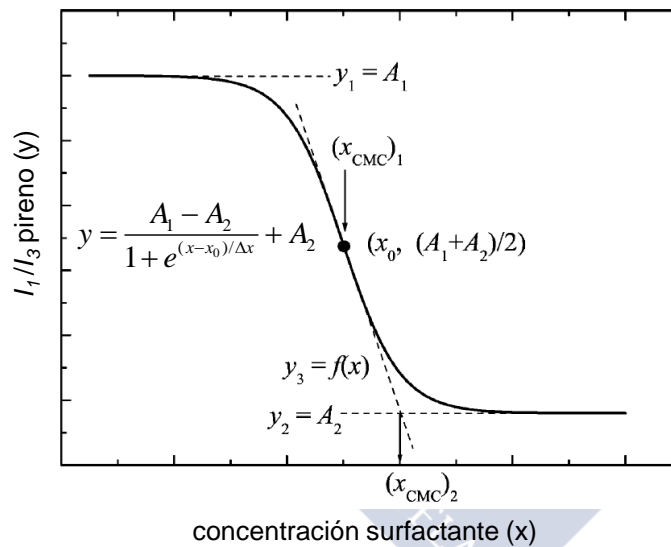


Figura 2.7. Parámetros característicos de la ecuación de Boltzmann y relación con la *cmc*: $(x_{CMC})_1$ es la concentración de tensoactivo en el punto de inflexión, $(x_{CMC})_2$ es la concentración de tensoactivo a la que la relación de intensidades se estabiliza (Aguiar 2003).

En este trabajo se decidió emplear la *cmc* dada por $(x_{CMC})_2$ (Figura 2.7), correspondiente al valor al que se alcanza la estabilidad en la fluorescencia. A partir del ajuste de la función de Boltzmann, se obtienen los parámetros A_1 , A_2 , x_0 y Δx , los cuales permiten determinar la *cmc* según la ecuación (2.4) (Aguiar 2003).

$$(x_{CMC})_2 = x_0 + 2\Delta x \quad (2.4)$$

De forma general, empleando otro tipo de sondas fluorescentes no se obtienen las bandas vibracionales típicas del pireno pero sí una variación en su intensidad de fluorescencia con la concentración de tensioactivo, cuyo comportamiento sería análogo al indicado para el pireno, al igual que su análisis. La diferencia surge si la sonda no es tan hidrófoba como éste o presenta carga electrostática, ya que entonces puede no existir una interacción rápida con la micela o agregados premicelares. En este caso, si la sonda empleada no presenta una gran tendencia a entrar en la micela, la representación de la propiedad estudiada frente a la concentración de tensioactivo tiene una forma distinta a la mostrada para el caso anterior, por lo que su análisis es diferente. En estos sistemas, antes de la *cmc* se observa una constancia, ya que mientras no se formen las micelas el fluoróforo no se introduce en las mismas, de forma que tampoco interacciona con agregados premicelares. El final de esta constancia define el valor para la *cmc*. A partir de este momento, la variación en la gráfica se produce de forma sistemática dependiendo de cómo penetre la sonda en la micela, volviendo a alcanzar finalmente una constancia al encontrarse toda la sonda asociada. Para explicar este proceso se considera un *equilibrio de reparto* del colorante entre el interior y el exterior de las micelas, de forma que la limitada afinidad que presenta el compuesto por las mismas lleva a que la interacción se produzca sólo después de la formación completa de los agregados micelares.

Nuestro grupo ha desarrollado recientemente un modelo cuantitativo que permite determinar la concentración de tensioactivo agregado para cualquier concentración total de surfactante y la relaciona con propiedades experimentales de las disoluciones como la conductividad o la tensión superficial o propiedades de los colorantes en las disoluciones micelares como la intensidad de fluorescencia, la absorbancia o el coeficiente medio de difusión traslacional (Al-Soufi 2012, Piñeiro 2013). Este modelo permite la determinación de la *cmc* y otros parámetros independientemente de la técnica empleada, además de poder obtener la concentración de los monómeros y de las micelas en cada momento. Se debe destacar el parámetro denominado *anchura de transición relativa*, r , que indica el paso del tensioactivo en estado monomérico al micelar. Este modelo ha sido comprobado con distintos surfactantes con una *cmc* conocida y mediante el uso de diferentes técnicas, de forma que se demostró su validez, obteniendo valores del parámetro r en torno a 0.1 (Al-Soufi 2012). Más recientemente también se aplicó el modelo a datos obtenidos mediante Espectroscopia de Fluorescencia y FCS, relacionando la concentración de la especie con la intensidad de fluorescencia y con el coeficiente de difusión traslacional, empleando colorantes con diferente hidrofobicidad en soluciones acuosas del surfactante neutro Triton X-100 (Piñeiro 2013). También se comprobó la validez del método para el análisis de la

intensidad de fluorescencia, relación de bandas vibracionales y relación monómero-excímero del pireno en sistemas micelares neutros y aniónicos (Piñeiro 2015).

Los tensioactivos empleados en el estudio

A continuación se indican los surfactantes empleados en este trabajo, teniendo en cuenta su clasificación según la carga de la fracción polar de la molécula.

- *Tensioactivos neutros*: caracterizados por presentar una cabeza polar sin carga. En el desarrollo de este trabajo se han estudiado tres tipos de tensioactivos no iónicos: el *heptaetilenglicol monododecil éter* ($C_{12}E_7$), el *polietilen(23)glico dodecil éter* (Brij 35) y el *Triton X-100* (TX-100) (Figuras 2.8, 2.9 y 2.10, respectivamente).

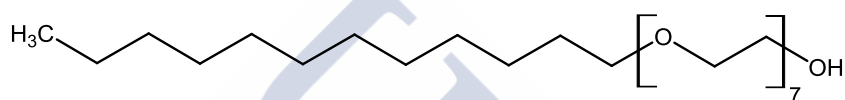


Figura 2.8. Estructura del tensioactivo $C_{12}E_7$.

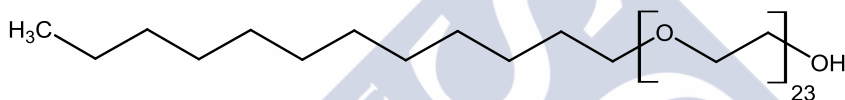


Figura 2.9. Estructura del tensioactivo Brij 35.

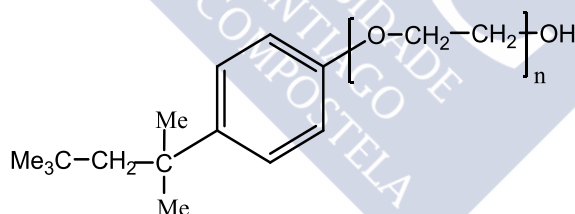


Figura 2.10. Estructura del tensioactivo Triton X-100, siendo $n=10$.

El Triton X-100 presenta una zona completamente apolar, constituida por un anillo bencénico sustituido con una pequeña cadena hidrocarbonada. Por el contrario, el Brij 35 y el $C_{12}E_7$ se diferencian del anterior en que su cadena hidrocarbonada no presenta un grupo aromático en su extremo. El $C_{12}E_7$ es muy empleado como aditivo en detergentes y agentes de limpieza.

- *Tensioactivos catiónicos*: su cabeza polar está cargada positivamente. En este trabajo se utilizan el *bromuro de dodeciltrimetilamonio* (DTAB) y el *bromuro de*

hexadecil-trimetilamonio (CTAB), cuyas estructuras se muestran en las Figuras 2.11 y 2.12, diferenciándose únicamente en la longitud de la cadena hidrocarbonada.

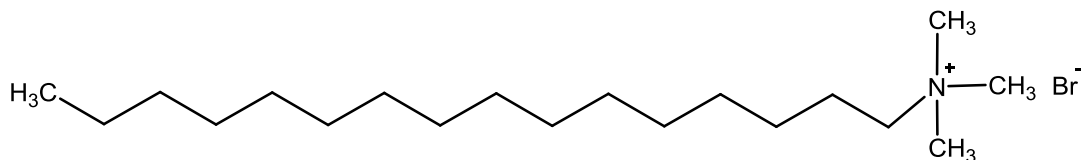


Figura 2.11. Estructura del tensioactivo CTAB.

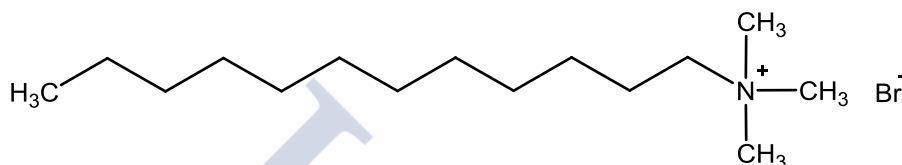


Figura 2.12. Estructura del tensioactivo DTAB.

- *Tensioactivos aniónicos*: su cabeza polar está cargada negativamente, siendo los más empleados en la industria de los detergentes. En este estudio se utilizaron el *dodecil sulfato sódico* (SDS) y el *alkylbenceno sulfonato lineal* (LAB), del que se estudió la sal sódica *alkylbenceno sodio sulfonato lineal*, que es una muestra monodispersa con una longitud de cadena de 12 átomos de carbono en alto porcentaje (92.5%) (C₁₂-LAS) (Figuras 2.13 y 2.14).

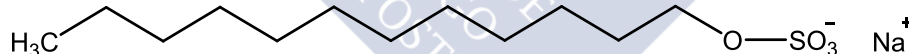


Figura 2.13. Estructura del tensioactivo SDS.

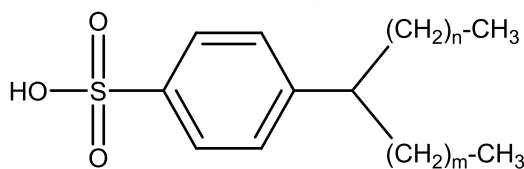


Figura 2.14. Estructura del tensioactivo LAB.

En la Tabla 2.1 se muestran las propiedades micelares de estos tensioactivos, con excepción del número de agregación del C₁₂-LAS, que se desconoce. Algunos de estos valores, especialmente del número de agregación, difieren significativamente dependiendo de la fuente y de la técnica empleada en su determinación. Además, factores como la

polidispersidad de una muestra o la concentración también pueden afectar a estos parámetros, observándose por ejemplo variaciones significativas del número de agregación del C₁₂E₇ en función de su concentración (Jeong 2002). Sin embargo, estos cambios no tienen influencia en la interpretación de los resultados experimentales.

Tabla 2.1. Propiedades micelares de los tensioactivos estudiados en este trabajo: concentración micelar crítica, *cmc*, y número de agregación, *N_{ag}*, a temperatura ambiente.

Surfactante	<i>cmc</i> / mol dm ⁻³	<i>N_{ag}</i>	Referencia bibliográfica
TX-100	2.6×10 ⁻⁴	143	[Kalyanasundaram, 1987]
Brij 35	6.0×10 ⁻⁵	40	[Kalyanasundaram, 1987]
C ₁₂ E ₇	6.5×10 ⁻⁵	89	[Honda, 2002] (25 °C)
DTAB	15.3×10 ⁻³	50	[Hiemenz, 1997]
CTAB	9.2×10 ⁻⁴	60	[Kalyanasundaram, 1987]
SDS	8.0×10 ⁻³	62	[Kalyanasundaram, 1987]
LAB	1.5×10 ⁻³	-	a
C ₁₂ -LAS	0.9×10 ⁻³	-	a

a Datos del grupo de investigación no publicados

En nuestro grupo de investigación se obtuvo un valor de *cmc* para el C₁₂E₇ de 6.0×10⁻⁵ M, similar al obtenido por Honda (Honda 2002), por lo que se va a utilizar este valor en el tratamiento de los datos experimentales.

2.1.3. Las proteínas. El péptido β-amiloide y la enfermedad de Alzheimer

La seroalbúmina bovina

La *seroalbúmina bovina* (BSA) es una proteína albúmina que se extrae del suero bovino. Posee una cadena de más de 600 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 66 kDa, presentando una conformación globular. Es muy similar a la seroalbúmina humana (HSA), que es la proteína más abundante del sistema circulatorio y la principal transportadora de ácidos grasos, siendo capaz de unirse a un amplio rango de metabolitos, fármacos y componentes orgánicos (Shobini 2001).

La BSA presenta una estructura secundaria principalmente en forma de hélice α, estimándose que un 66% de los aminoácidos totales forman parte de esta estructura helicoidal (Moriyama 2008). Es utilizada a menudo como un estándar de concentración de

proteínas. También presenta otras múltiples aplicaciones, debido a su elevada estabilidad y su bajo coste, como su uso en forma de nutriente en cultivos celulares y microbianos.

El péptido β -amiloide

En los últimos años se ha descubierto que muchas enfermedades humanas están relacionadas con alteraciones en el plegamiento normal de las proteínas y su posterior depósito extracelular en forma de agregados insolubles. Este plegamiento erróneo provoca la pérdida de su función, aumentando generalmente su toxicidad una vez se agregan. Ambos factores son características fundamentales de estas enfermedades, siendo uno de los principales tipos las *amiloidosis* (Del Pozo Yauner 2008). Éstas son un grupo de enfermedades degenerativas muy heterogéneas, al que pertenecen la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y la diabetes mellitus tipo II, entre otras.

Cada una de estas enfermedades presenta una acumulación de agregados fibrilares insolubles correspondiente a la alteración de una determinada proteína o a sus fragmentos, las cuales se denominan de forma general *proteínas* o *péptidos amiloides*. En la actualidad se han caracterizado veinticuatro proteínas diferentes cuyo plegamiento incorrecto está asociado a una determinada enfermedad (Del Pozo Yauner 2008).

Los distintos amiloides se caracterizan por propiedades microscópicas y espectroscópicas similares, lo cual indica que presentan determinados componentes comunes en su estructura. Se ha establecido una definición formal para las *fibras amiloides*, denominándose como “material depositado *in vivo*, que puede ser distinguido de depósitos no amiloides por su apariencia fibrilar observada por microscopio electrónico, un patrón de rayos X típico y reacción a las tinciones histológicas, concretamente afinidad por el colorante Rojo Congo, resultando en un birrefringencia verde al observarlos en un microscopio de luz polarizada” (Groenning 2010).

Para el caso concreto de la EA, sus señas de identidad son la *acumulación de placas amiloides* entre las células nerviosas del cerebro (las neuronas) y la *formación de ovillos neurofibrilares* dentro de las mismas. La formación de estas placas es debida a la deposición en forma de fibras insolubles del péptido *β -amiloide*, procedente de la escisión de la Proteína Precursora Amiloide (APP). En un cerebro sano, este fragmento de proteína se descompone y es eliminado de forma normal. En cambio, en la EA se acumula agregándose en forma de estructuras fibrilares para dar lugar a placas insolubles, denominadas *placas neuríticas o seniles* (Selkoe 2001). Con respecto a los ovillos neurofibrilares, éstos son fibras retorcidas insolubles que se encuentran dentro de las neuronas. Están formados por una proteína denominada *Tau*, la cual constituye parte de los microtúbulos, orgánulos que ayudan en el

transporte de nutrientes y otras sustancias de una parte del cerebro a otra. En la EA, la proteína Tau es anormal y la estructura de los microtúbulos se daña, enmarañándose para dar lugar a estos ovillos (Selkoe 2001).

Acompañando a estos procesos, durante la enfermedad se producen una serie de cambios que afectan a diversas zonas del cerebro, como se muestra en la Figura 2.15.

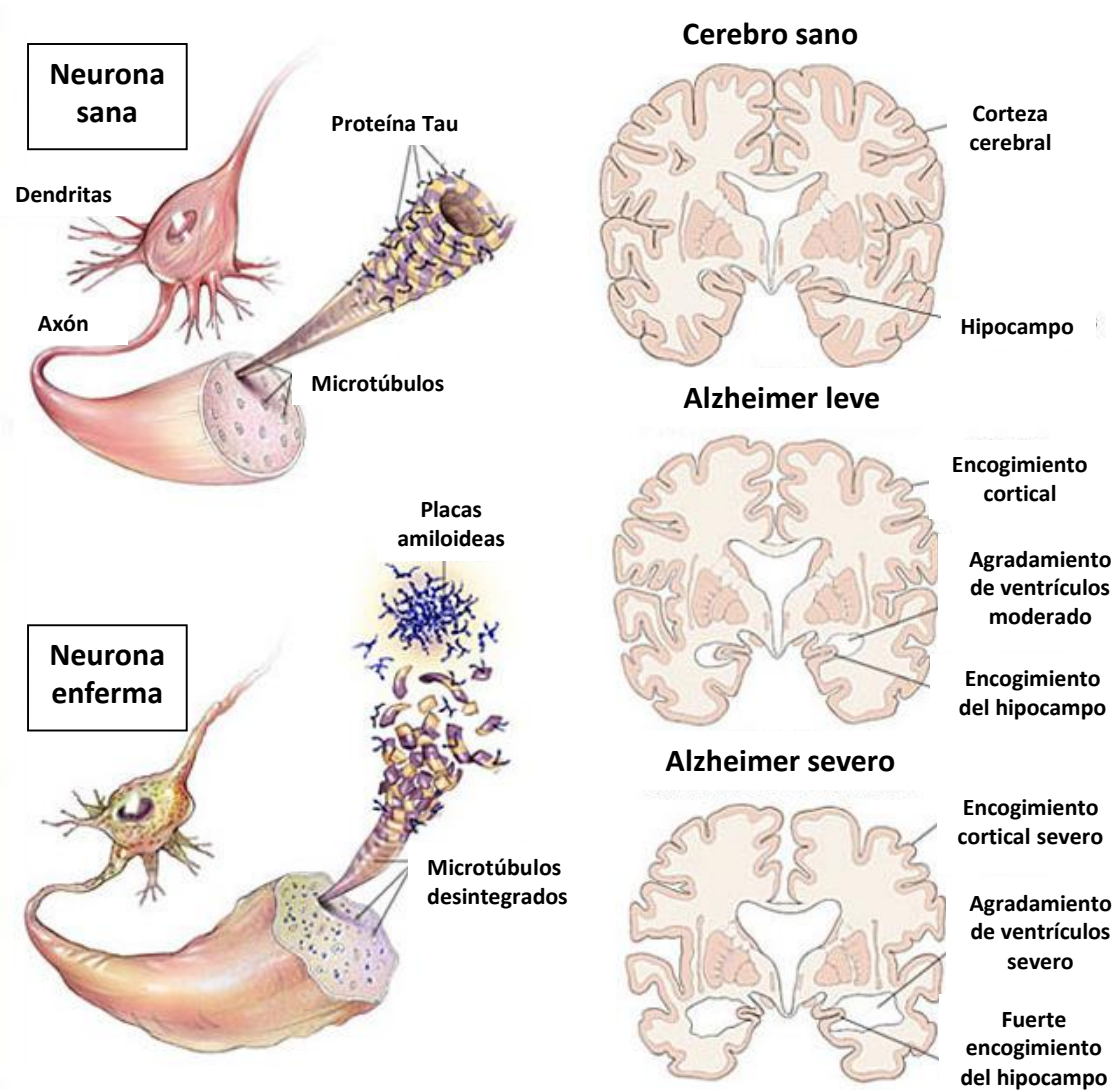


Figura 2.15. Cambios en el cerebro y en las células nerviosas durante el desarrollo de la EA, según la American Health Assistance Foundation (www.brightfocus.org).

¿Cómo se produce la formación y la agregación del péptido β -amiloide? El β -amiloide es un péptido de aproximadamente 4 kDa, derivado de la familia de proteínas denominadas Proteínas Precursoras Amiloides (APP), constituido por entre 39 y 43 aminoácidos (Martínez

Lage 1996). Tras muchos esfuerzos, fue caracterizada por Glenner y Wong en 1984, obteniéndose esta secuencia de aminoácidos para el β -amiloide formado por 42 residuos: Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala (Greene 2002).

Este péptido es muy estudiado por su implicación en la EA pero como monómero, en un cerebro sano, se cree que desempeña un papel fisiológico en el organismo, participando en varias funciones celulares normales como la estimulación de la proliferación celular, protección de las neuronas contra el daño oxidativo, etc. (Manzano-León 2006). Además, el monómero consta de una estructura secundaria compuesta principalmente por hélices α en un porcentaje que varía entre el 50 y el 71%, láminas β entre el 1 y el 13% y conformaciones al azar completando el porcentaje restante (Stine 2003, Cizas 2010).

Las APP, fuente de los β -amiloide, son glicoproteínas de membrana consistentes en 695 a 770 aminoácidos cuya función principal parece ser la de actuar como moléculas de adhesión celular, aunque en distintos experimentos se ha observado que también pueden ejercer de receptores de membrana, estando sus funciones no totalmente definidas hasta el momento (Hölscher 1998).

Las APP pueden someterse a procesos proteolíticos por varias vías, a través de una secuencia de rupturas realizadas por complejos enzimáticos de α -, β - y γ -secretasas. Concretamente, estos procesos siguen dos vías determinadas: la vía α/γ (no amiloidogénica) y la vía β/γ (amiloidogénica, con la consecuente formación de β -amiloide). A continuación se detallan ambas vías (Selkoe 2001, Hölscher 1998) (Figura 2.16):

- La vía de escisión de la APP más frecuente es la *no amiloidogénica*, en la que la proteína se rompe por la α -secretasa en el aminoácido 83 del término carboxi, dando lugar a un largo fragmento amino terminal (*sAPP α*), el cual es excretado en el medio extracelular. En cambio, el péptido de 83 aminoácidos permanece en la membrana y vuelve a ser dividido por la γ -secretasa, produciendo un pequeño fragmento denominado *p3*. La ruptura por la α -secretasa se produce dentro de la región del β -amiloide, evitando su formación.
- La vía *amiloidogénica* es el proceso que lleva a la generación de β -amiloide. La proteólisis inicial es mediada por la β -secretasa, que actúa sobre el aminoácido 99 desde el término carboxi. Este corte da lugar a la liberación del fragmento (*sAPP β*) en el medio extracelular y dejan un residuo de 99 aminoácidos dentro de la membrana. A continuación, esta última fracción vuelve a ser dividida por la

γ -secretasa, liberando un péptido β -amiloide intacto, con una longitud de entre 38 y 43 aminoácidos.

La mayoría de los β -amiloide formados por la vía amiloidogénica tienen una longitud de 40 aminoácidos (β -amiloide(1-40)), mientras que una pequeña proporción (aproximadamente del 10%) es de 42 aminoácidos (β -amiloide(1-42)). Esta última variante más larga también es más hidrofóbica debido a los aminoácidos finales de la cadena y más propensa a la formación de fibras que los β -amiloide(1-40) (Jarrett 1993, Chen 2006, Walsh 2007, LaFerla 2007, Haass 2007). Ambos péptidos están presentes en las placas seniles en la EA, siendo el β -amiloide(1-42) el predominante, mientras que el péptido de 40 aminoácidos se va depositando después a medida que maduran. Ambos se encuentran también en la sangre y en el fluido cerebroespinal en concentración nanomolar, con una relación de 10 (β -amiloide(1-40)) a 1 (β -amiloide(1-42)) (Bitan 2003b).

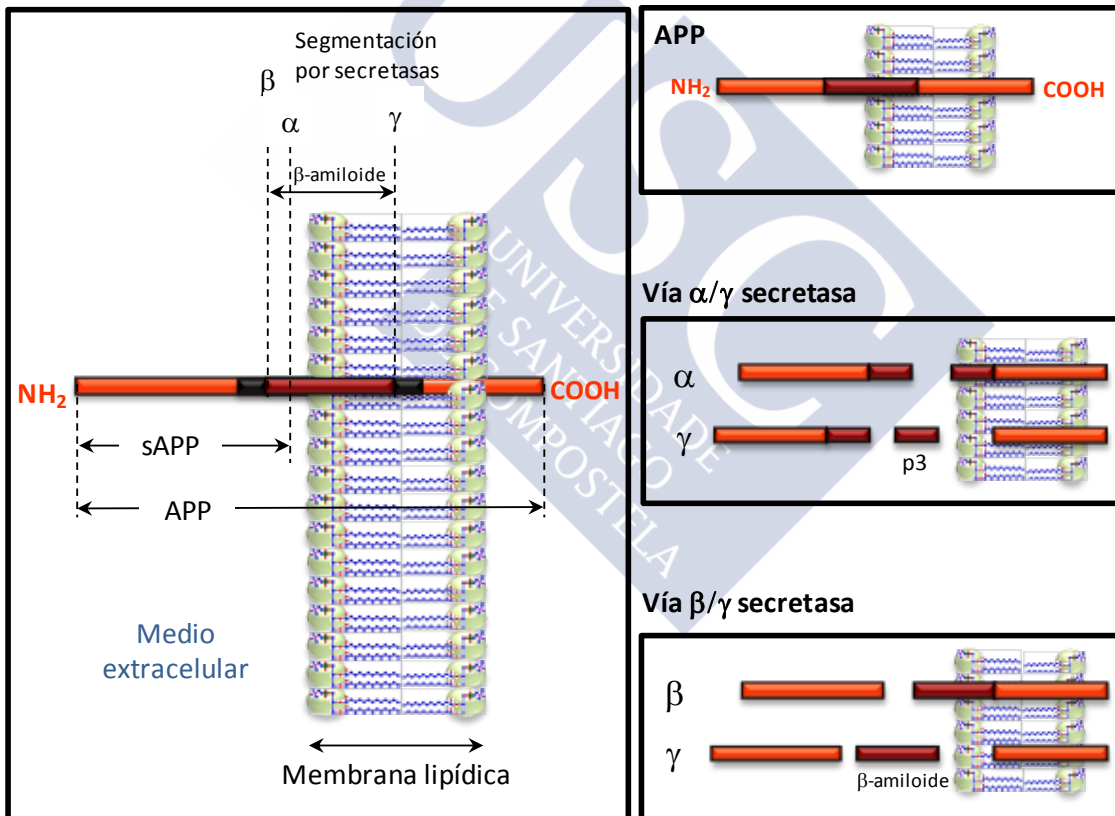


Figura 2.16. Segmentación de la APP por parte de las secretasas y consecuente formación del β -amiloide, según (Hölscher 1998) y (Selkoe 2001).

A nivel estructural y morfológico no se conoce de forma clara cómo son los agregados de β -amiloide, lo que aumenta la dificultad de establecer un mecanismo que describa su

formación. A partir de los datos conocidos se ha desarrollado un modelo simple para explicar el proceso de formación de fibras insolubles a partir de monómeros del péptido β -amiloide, considerando como base para definirlo el proceso de *crystalización*, en el que se parte de la formación de un núcleo o semilla para originar agregados de mayor tamaño (Figura 2.17) (Harper 1997, Dobson 2003, Gilead 2005).

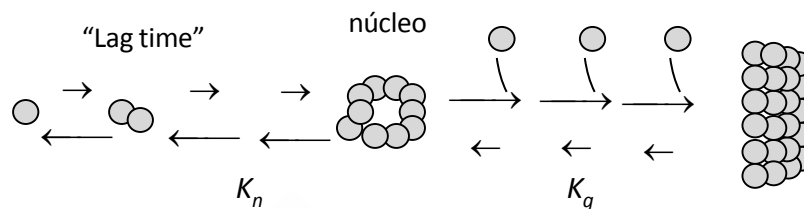


Figura 2.17. Mecanismo simple para la agregación del β -amiloide basado en un proceso de nucleación (Harper 1997).

En la Figura 2.17 se muestra de forma detallada el mecanismo propuesto para la agregación del β -amiloide. Consiste en una serie de equilibrios de asociación proteína-proteína no favorables (con constante de asociación K_n), que dan lugar a la formación de un núcleo inestable, seguidos de una serie de equilibrios favorables (con constante de asociación K_g) que finalizan con la formación de fibras (Harper 1997, Pedersen 2013). Los aspectos fundamentales de este mecanismo son (Jarrett 1993, Harper 1997, Dobson 2003):

1. La agregación no sucede a una concentración inferior a la *concentración crítica*. Cuando se alcanza una concentración superior a ésta, existe un periodo de tiempo antes de que ocurra la agregación (*lag time*). Tras este periodo, se forma el núcleo y continúa el proceso de agregación de forma inmediata.
2. Esta fase de *lag time* puede suprimirse por adición de agregados ya formados a la disolución, de forma que desde el inicio exista una semilla a partir de la cual continúe la agregación.
3. El paso más lento del proceso es la constitución del núcleo oligomérico ordenado.
4. La formación del núcleo puede ser dependiente de la concentración, por lo que un pequeño aumento en la misma puede incrementar en gran medida la velocidad de formación de fibras.

La concentración crítica del β -amiloide(1-42) parece situarse en un rango cinco veces menor que la concentración crítica para el β -amiloide(1-40), para el cual se considera en torno a $25 \mu\text{M}$ (Harper 1997) aunque existen distintos valores en la bibliografía (Tjernberg 1999).

Por debajo de esta concentración, el β -amiloide existe predominantemente en forma monomérica.

Aplicado al caso concreto del β -amiloide(1-42), el proceso de agregación se detalla en mayor medida en la Figura 2.18 (Bitan 2003a). Los monómeros oligomerizan para dar lugar a un *núcleo* o *paranúcleo*. Éste, a su vez, continúa la agregación incorporando monómeros u otros agregados para formar estructuras de mayor tamaño. En general, los monómeros, núcleos y grandes oligómeros no están estructurados (U) y contienen elementos tanto helicoidales (α) como láminas β (β). Los agregados formados se reorganizan y dan lugar a *protofibras*, consideradas estructuras prefibrilares de diferentes tamaños y morfologías, estables y ricas en láminas β . Por tanto, la formación de protofibras, proceso aún reversible, conlleva grandes reordenamientos conformacionales. El último paso es la transformación de protofibras en *fibras*, proceso que parece irreversible (Bitan 2003a, Jan 2010). Estas fibras de β -amiloide son estructuras largas (de más de $1\ \mu\text{m}$, aunque su tamaño varía de forma importante), altamente ordenadas y de elevada rigidez. Su estructura secundaria consiste principalmente en elementos de lámina β y presentan un diámetro medio de $6\ \text{nm}$ a $12\ \text{nm}$ (Gilead 2005, Stefani 2003). Cada fibra, generalmente, se forma por unión de dos a seis protofibras, cada una con un diámetro aproximado de $2\ \text{nm}$ que a menudo forman estructuras muy enrolladas (Stefani 2003).

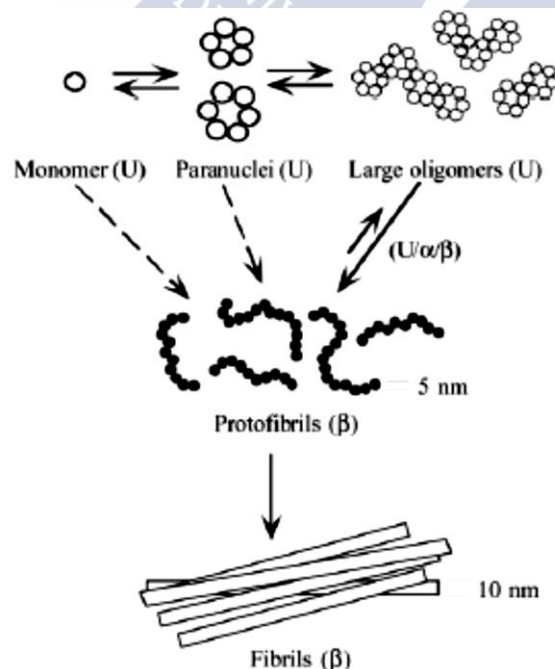


Figura 2.18. Modelo simple de agregación del β -amiloide(1-42), para la formación final de fibras amiloides altamente ordenadas. En la figura se indican los diámetros aproximados de las protofibras y de las fibras amiloides (Bitan 2003a).

Se ha propuesto que el péptido β -amiloide(1-40) presenta en los primeros estados de agregación un equilibrio entre monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros. En cambio, el β -amiloide(1-42) parece que tiende a agregarse inicialmente formando pentámeros u hexámeros para dar lugar al núcleo de la agregación (Bitan 2003b, Bitan 2003a). Otros estudios posteriores indicaron que los estados iniciales de agregación del β -amiloide(1-40) los forman estructuras principalmente monoméricas mientras que el β -amiloide(1-42) da lugar a especies en forma trímeros o tetrámeros a concentración aproximada de 12.5 μ M (Chen 2006).

A partir del proceso de agregación definido se forman las *placas neuríticas*, constituidas por fibras de amiloide depositadas de forma extracelular y asociadas a lesiones neuronales. El tiempo que tarda en desarrollarse una placa no se conoce con exactitud pero se cree que la evolución es gradual, pudiendo transcurrir meses o incluso años. El diámetro transversal de dichos depósitos, determinado en secciones de cerebros con EA, varía desde 10 μ m a valores mayores de 120 μ m, existiendo una gran variabilidad entre distintas placas (Selkoe 2001).

En las primeras hipótesis establecidas para la EA se consideró que era necesaria la deposición del β -amiloide para que se produjera la muerte celular observada en dicha enfermedad. Estos datos llevaron a la discusión de si los depósitos de β -amiloide eran los causantes del daño o si era la presencia del β -amiloide antes de agregarse la que era tóxica. Actualmente, los datos obtenidos a partir de β -amiloide sintético, modelos de cultivos celulares, animales en los que se sobre-expresa la proteína APP y estudios *postmortem* del cerebro humano de pacientes enfermos, han confirmado que los agregados prefibrilares son también responsables de las lesiones asociadas a la enfermedad. Se acepta que cuando la EA está avanzada, con abundantes depósitos insolubles de β -amiloide, existen interacciones de las fibras con la superficie celular de forma frecuente, provocando la destrucción de las funciones neuronales. Sin embargo, en los estados tempranos de la enfermedad, cuando el β -amiloide se encuentra principalmente como agregados solubles de menor tamaño, también existen interacciones entre estos y el medio celular que provocan daños cerebrales (Sakono 2010). En estudios sobre la toxicidad de los β -amiloide en medios celulares se observó que los efectos neurotóxicos eran dependientes del estado fibrilar del péptido y del grado y velocidad de la formación de las fibras, es decir, que distintos tipos de agregados presentan diferentes mecanismos de toxicidad (Greene 2002, Walsh 2007).

Se concluyó, por tanto, que el β -amiloide puede existir en múltiples estados de agregación. En su estado monomérico, el β -amiloide no parece ser neurotóxico. En cambio, los oligómeros y protofibras aún solubles son considerados como potentes bloqueadores de la plasticidad sináptica en el cerebro, dificultando la transferencia de información en el mismo (LaFerla 2007, Sakono 2010). Se considera incluso que estos oligómeros y protofibras

son más responsables de la neurotoxicidad producida que las propias fibras (LaFerla 2007, Haass 2007, Walsh 2002, Selkoe 2003, Gong 2003), aunque su mecanismo de actuación no está aún bien definido. Estos agregados solubles asociados a la enfermedad presentan una gran disparidad en cuanto a su tamaño, encontrándose en un rango de peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y 100 kDa e incluso agregados más grandes, con estructuras muy diferentes entre sí (Sakono 2010).

Ya en los años 80 diversos estudios determinaron la presencia en el cerebro de placas que carecían de la estructura compacta y fibrilar de las placas neuríticas clásicas. El reconocimiento de las mismas y su detección en regiones del cerebro que también contenían muchas placas seniles llevó a la conclusión de que estos depósitos amorfos podían representar lesiones precursoras de las placas seniles, denominándose *placas difusas* o *depósitos preamiloides* (Selkoe 2001). Se detectó que estas placas están formadas principalmente por β -amiloide(1-42) que, como ya se ha descrito, tiene mayor capacidad para agregarse que el β -amiloide(1-40), de manera que constituye estos depósitos más tempranos. A continuación se produciría la acumulación del péptido β -amiloide(1-40) sobre las mismas para dar lugar a las placas neuríticas, al ser este amiloide más resistente a la formación de fibras, lo que lleva a que solo se deposite sobre los depósitos previamente formados. El β -amiloide(1-40) puede llegar a convertirse en el mayor componente de las placas seniles a medida que maduran, con el transcurso de los años (Selkoe 2001).

En regiones del cerebro afectadas por la EA, muchas neuronas contienen manojos largos y enlazados de fibras anormales, consistentes en pares de filamentos en forma de hélice (pares de filamentos helicoidales) que dan lugar a los *ovillos neurofibrilares*. Los estudios de estas marañas sugirieron que están compuestas por la proteína *Tau* asociada a los microtúbulos, muy abundante en las neuronas. Se ha demostrado que en la EA esta proteína sufre una hiperfosforilación que lleva a su aparente disociación de los microtúbulos y su posterior agregación en filamentos insolubles (Selkoe 2001). Estos ovillos son, junto a las placas seniles, una señal clara de la aparición de la EA.

Una vez descrito el mecanismo de formación del péptido de β -amiloide y los daños asociados a la agregación del mismo, se resume en la Figura 2.19 todo el proceso.

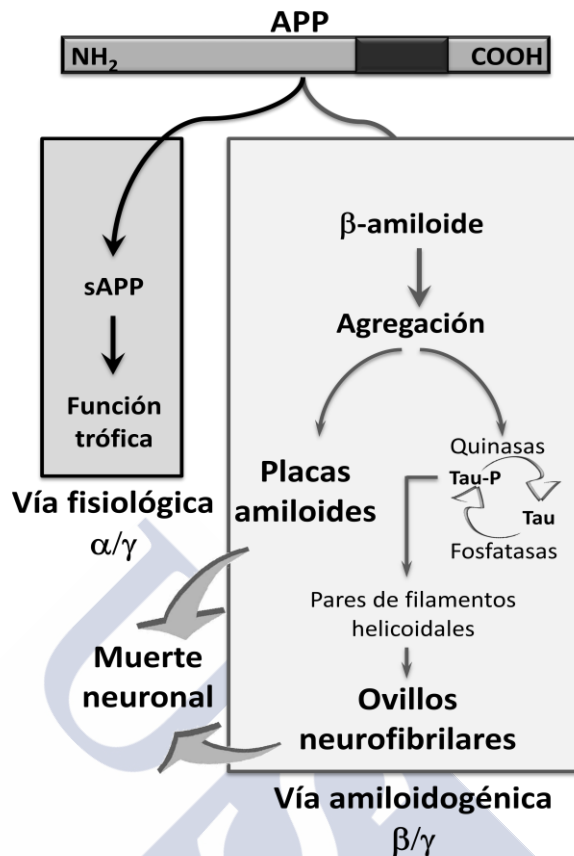


Figura 2.19. Vía de procesamiento normal (vía fisiológica) y vía de procesamiento patológico (vía amiloidogénica) de la APP por acción de las α -, β - y γ -secretasas para originar los β -amiloide. La agregación de estos péptidos promueve la formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, estos últimos favorecidos por la hiperfosforilación de la proteína Tau de los microtúbulos por acción de enzimas fosfatasa, dando lugar a la proteína fosforilada Tau-P (Rang 2004).

Marcaje fluorescente del péptido de β -amiloide. En este trabajo se emplea el β -amiloide(1-42) para la realización de los estudios establecidos como objetivos, debido a su participación en la EA como principal constituyente de las placas seniles. Para los experimentos de FCS, en los cuales se estudia la cinética de agregación y su dependencia con la concentración, se emplea un β -amiloide(1-42) marcado fluorescentemente.

Se conoce que el comportamiento del péptido β -amiloide es altamente dependiente de la conformación del mismo, por lo que la presencia en su estructura de un fluoróforo con grupos cargados o con gran tamaño puede provocar distintos efectos en los agregados que se formen y en su función. Existen varias estrategias que se pueden emplear para realizar estudios de agregación, intentando siempre que el péptido dé lugar a agregados uniformes (Jungbauer 2009):

1. La primera estrategia consiste en utilizar ya desde el principio el amiloide marcado, previo tratamiento para conseguir iniciar la agregación con el péptido en estado monomérico. Se prepara el mismo bajo las condiciones necesarias para originar fibras o agregados solubles y se estudia el proceso de formación de los mismos. Esta estrategia presenta una serie de ventajas e inconvenientes. Como *ventajas*, cabe destacar las siguientes: a) como el colorante está ya en el péptido, no se necesita una purificación posterior para eliminar el fluoróforo libre que pudiera haber en el medio una vez formados los agregados; b) se puede almacenar el péptido marcado y preparar sólo los agregados necesarios para la investigación diaria. Como *desventajas* se indican: a) la presencia del fluoróforo en el péptido puede afectar al proceso de agregación y a la estructura resultante; b) esta estrategia se limita a colorantes estables en las condiciones de síntesis de los péptidos; c) puede suceder un *quenching* de fluorescencia durante la agregación.
2. La segunda estrategia consiste en utilizar inicialmente el β -amiloide monomérico sin el fluoróforo, incubar el mismo bajo condiciones de formación de fibras u otros agregados y, finalmente, conjugar éstos con el fluoróforo correspondiente. En esta estrategia también se deben destacar una serie de ventajas e inconvenientes, con el fin de entender los resultados obtenidos a partir de la misma. Como *ventajas*, se debe indicar que: a) hay una probabilidad muy baja de que la conjugación del fluoróforo con el péptido influya en la estructura de los agregados; b) se pueden emplear numerosos fluoróforos para la conjugación, una vez activados correctamente. Como *desventajas*, destacan las siguientes: a) los oligómeros marcados fluorescentemente se deben preparar de nuevo antes de cada uso; b) el rendimiento final es reducido ya que se necesita una purificación posterior a la conjugación para eliminar el colorante libre; 3) no se puede conocer la proporción de agregados que están marcados y que no lo están.

En el caso concreto de este trabajo se optó por el uso de la primera estrategia para los estudios del proceso de agregación (capítulos 7.1 y 7.2), empleando para ello el fluoróforo comercial Hilyte Fluor 488- β -amiloide(1-42). Esto es debido a que es necesaria la presencia del fluoróforo ya desde el inicio del proceso para poder utilizar la técnica de FCS y ver las fluctuaciones de fluorescencia asociadas al proceso de agregación. La segunda estrategia se siguió en los estudios del marcaje de fibras (capítulo 6) y de agregados tempranos (capítulo 7.3), en los que se utilizaron diversos fluoróforos con gran sensibilidad al microentorno.

2.2. Las sondas fluorescentes

Las *sondas fluorescentes* o *marcadores fluorescentes* son fluoróforos de elevado rendimiento cuántico de fluorescencia que se introducen de forma específica en una determinada estructura intracelular o cuya fluorescencia se ve afectada por un receptor determinado.

Los marcadores fluorescentes se dividen en dos grandes grupos: los *intrínsecos* y los *extrínsecos*. Los intrínsecos son aquellos que forman parte del sistema objeto de estudio, como es el caso de aminoácidos aromáticos en las proteínas. La fluorescencia intrínseca de las proteínas se origina como consecuencia de presentar en su cadena peptídica algún aminoácido aromático: triptófano, tirosina o fenilalanina. Los colorantes extrínsecos son los que se añaden a una muestra para originar fluorescencia cuando inicialmente no la tiene, o para cambiar sus propiedades emisivas. Algunos ejemplos de este último grupo son la fluoresceína, las rodaminas, etc.

Frecuentemente, los sistemas que presentan interés no son fluorescentes o su fluorescencia intrínseca no es adecuada para el experimento. En muchos casos, la excitación de la muestra tendría que realizarse a longitudes de onda menores de 300 nm imposibilitando el uso de numerosas técnicas, como las microscópicas. Por ello, en muchos casos puede ser útil obtener la fluorescencia marcando la molécula objeto de estudio con un fluoróforo extrínseco.

En este trabajo, se van a clasificar los colorantes empleados en función de sus propiedades fotofísicas: 1) fluoróforos para estudios de fluorescencia de moléculas individuales (FCS); 2) colorantes con transferencia de carga intramolecular y 3) colorantes con transferencia protónica intramolecular en el estado excitado.

Dentro del primer grupo, fluoróforos para estudios con FCS, se engloban colorantes que presentan gran estabilidad y cuya absorción se produce en el rango visible del espectro. Como colorantes empleados se encuentra la *Rodamina 123*, utilizada para el estudio de sistemas micelares, por su elevado rendimiento cuántico y fotoestabilidad, y el péptido *HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42)*, constituido por el β -amiloide(1-42) marcado con el colorante HiLyte Fluor 488, que presenta una absorción en torno a los 500 nm. En el caso concreto de este trabajo, la Rodamina 123 fue empleada en FCS sólo para la calibración inicial del equipo pero no para caracterizar los sistemas micelares mediante esta técnica. De todas formas se engloba en este grupo porque sus propiedades hacen que sea un colorante idóneo para el trabajo en FCS.

En cuanto al segundo grupo, colorantes con transferencia de carga intramolecular, se engloban en el mismo la *Cumarina 460*, empleada en el estudio de las ciclodextrinas, y la

Tioflavina T, usada para el análisis de los β -amiloides. En estos colorantes, al ser excitados, se produce una transferencia de un electrón de un grupo *donor* de la molécula a otro *aceptor* de la misma, dando lugar a una estructura diferente, lo que produce cambios en su emisión de fluorescencia.

En el tercer grupo, colorantes con transferencia protónica intramolecular, se engloban los potenciales marcadores de β -amiloide que se estudiaron en este trabajo: el *HPIP*, el *HPIPMe*, el *HBO* y el *HBT*. Estos fluoróforos se caracterizan por la transferencia intramolecular de un protón en el estado electrónico excitado, asociándose este proceso a cambios en la emisión de fluorescencia de los mismos.

2.2.1. Sondas fluorescentes para medidas en FCS

La Rodamina 123

Esta sonda pertenece al grupo de marcadores fluorescentes de localización intracelular específica, los cuales permiten visualizar diferentes estructuras y componentes intracelulares y estudiar numerosos fenómenos asociados a los mismos (transporte, potencial de membrana, etc.). Estos marcadores también se usan en estudios de colocalización, es decir, determinación de la localización intracelular de otras sustancias por comparación con el marcador fluorescente.

La Rodamina 123 (R123, Figura 2.20) es una sonda fluorescente muy empleada en el marcaje de mitocondrias, acumulándose selectivamente en estos orgánulos celulares. También se estudia como un potencial agente anticáncer por sus propiedades fotosensibilizadoras y es utilizada además en citometría de flujo, técnica que consiste en contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas. Es un colorante catiónico, de alto rendimiento cuántico de fluorescencia y elevada fotoestabilidad (Chow 1986).

Las membranas mitocondriales son estructuras organizadas y altamente flexibles, con propiedades similares a las de los sistemas micelares. Esto permite que, mediante el uso de surfactantes, se estudie la interacción de la R123 con estos sistemas, de forma que se puedan relacionar los resultados con el comportamiento que presentarían en presencia de membranas biológicas. Por tanto, el estudio de los sistemas micelares empleando una sonda fluorescente como la R123 puede aportar información acerca de las interacciones hidrofóbicas-electrostáticas de estos colorantes con las estructuras organizadas de sistemas biológicos (Deumié 1993).

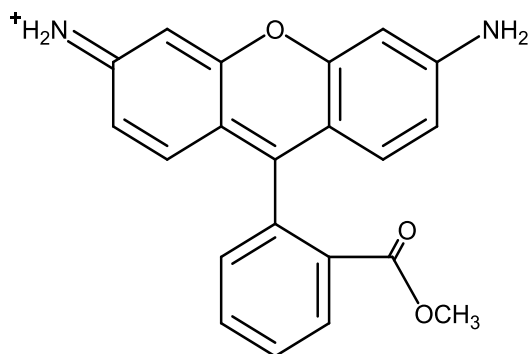


Figura 2.20. Estructura de la Rodamina 123 (3,6-diamino-9-[2-(metoxicarbonil)fenilo]).

Propiedades fotofísicas de las rodaminas. Las propiedades fotofísicas de estos colorantes están muy determinadas por parámetros como su estructura y los efectos provocados por el entorno (temperatura, naturaleza del disolvente, pH, etc.).

La R123 presenta un máximo de absorción en agua a aproximadamente 498 nm y emite fluorescencia a un máximo de 525 nm, aunque en la bibliografía se muestran pequeñas variaciones entre distintos estudios. En disoluciones acuosas neutras, su coeficiente de absorptividad molar es de $(76700 \pm 2000) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En etanol, esta rodamina tiene un coeficiente de absorptividad molar de $85200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 512 nm (máximo de absorción para este disolvente) (Chow 1986).

En cuanto a su dependencia con el pH, no se observan cambios espectrales en el intervalo de pH entre 1 y 7. En cambio, por debajo de un pH de 1 y por encima de 12 se observa un descenso de la absorbancia y de la intensidad de fluorescencia (Chow 1986).

López Arbeloa y colaboradores obtuvieron valores de tiempos de vida y rendimientos cuánticos para la R123. En agua este fluoróforo presenta un tiempo de vida de 3.98 ns y un rendimiento cuántico de 0.74 (López Arbeloa 1991, López Arbeloa 1992). Para la misma sonda, otros autores obtuvieron un rendimiento cuántico de 0.87 en agua, valor muy similar al obtenido en etanol (Pal 1996). De forma similar, Chow y colaboradores obtuvieron un rendimiento cuántico de 0.90 a 25°C para esta rodamina en agua, empleando como referencia para su determinación la Rodamina 6G, considerada muy adecuada para este cálculo (Chow 1986).

Las rodaminas no sufren procesos de hidrólisis como sucede con otros colorantes, pero si presentan elevada adsorción sobre las paredes del recipiente en que se depositen, pudiendo llevar a una gran dispersión en los datos experimentales.

Procesos de agregación. Las rodaminas, en general, presentan desviaciones de la ley de *Lambert-Beer* que se deben a la formación de agregados, tanto en disolución acuosa como en

sistemas micelares, al aumentar su concentración, lo que también provoca un *quenching* de fluorescencia (Valdés-Aguilera 1989). Este proceso de agregación depende de la estructura de los agregados, de la temperatura, del disolvente y de la presencia de electrolito. Suele ser mayor en agua que en disolventes orgánicos y aumenta con la fuerza iónica, por lo que se interpreta que hay una influencia de la constante dieléctrica del disolvente en la repulsión electrostática entre las moléculas de colorante (Valdés-Aguilera 1989). Como fuerzas responsables de la formación de agregados se consideran las fuerzas aditivas tipo *Van der Waals*, enlace de hidrógeno con el disolvente o coordinación con iones metálicos. En cada sistema pueden actuar varias de estas fuerzas.

En este trabajo no se han tenido en cuenta los procesos de agregación de los colorantes ya que a las bajas concentraciones usadas no se pusieron de manifiesto.

Rodaminas en sistemas micelares. Numerosos trabajos han estudiado el efecto de los surfactantes en las propiedades fotofísicas y químicas de las rodaminas. En el caso de la R123 se utilizaron tensioactivos como SDS, CTAB y Triton X-100, entre otros (Deumié 1993, Pal 1996).

Según Pal y colaboradores, la R123 en micelas de SDS y de Triton X-100 presenta una disminución de rendimiento cuántico y de tiempo de vida con respecto al agua y alcoholes de cadena corta, mientras que en CTAB se observa un pequeño aumento (Pal 1996).

Varias rodaminas de carga positiva estudiadas por Pal y colaboradores, incluyendo la R123, tienen un comportamiento análogo en presencia de SDS: el espectro de absorción disminuye en intensidad sin desplazamiento hasta alcanzar un mínimo a una relación de concentraciones $[SDS]/[R]=1000$, aumentando después la absorbancia o intensidad de fluorescencia con desplazamiento del máximo hacia el rojo hasta concentraciones de SDS del orden de la *cmc*. A partir de esa concentración el espectro de absorción no cambia. Los autores consideran que esa disminución de absorbancia o intensidad de fluorescencia se debe a la formación de agregados entre la rodamina y el surfactante, al principio como pares iónicos $R^+ - S^-$ y después agregados del tipo $(R^+ - S^-)_n$. Estos agregados tienen menor fluorescencia porque las moléculas de rodamina están muy cercanas y sufren *quenching*. Cerca de la *cmc* aumenta la absorbancia y la intensidad de fluorescencia porque los agregados se reorganizan en premicelas con una única molécula de rodamina. Según esta interpretación, a concentraciones de SDS superiores a la *cmc* toda la rodamina estaría en las micelas de forma monomérica (Pal 1996).

En cuanto a las micelas catiónicas de CTAB, Pal y colaboradores observaron variaciones muy pequeñas en los rendimientos cuánticos de fluorescencia y en tiempos de vida de la R123 con respecto al agua, con cambios poco significativos en los espectros de absorción y de

emisión. Se consideró que la ausencia de alteraciones se debía a las repulsiones electrostáticas entre la R123 y la micela cargada positivamente, de forma que la R123 no penetraba en la micela (Pal 1996).

En el mismo trabajo se estudiaron las rodaminas con carga positiva en surfactantes neutros como el Triton X-100 y se comprobó la existencia de cambios espectrales grandes comparando con el medio acuoso, de igual forma que en los rendimientos cuánticos y tiempos de vida, como consecuencia de la fuerte interacción entre la rodamina y el surfactante. El espectro de absorción se desplaza hacia el rojo al aumentar la concentración de Triton X-100, con un *punto isobéptico* que indica la existencia de dos especies en equilibrio y se interpreta como una asociación de la rodamina con las moléculas de Triton X-100. Aplicando la linealización de *Benesi-Hildebrand* se dedujo la existencia de complejos 1:1 y se obtuvieron las constantes correspondientes. Se debe tener en cuenta que los autores no consideraron la asociación del colorante con las micelas, sino con las moléculas de tensioactivo individuales, aunque trabajaron a concentraciones de surfactante siempre superiores a la *cmc*. Se interpretó que la rodamina penetra en la micela de Triton X-100 formando un complejo de transferencia de carga, por interacción con el grupo fenólico rico en electrones del Triton X-100 y la rodamina deficiente en electrones (Pal 1996).

Más recientemente nuestro grupo de investigación estudió la dinámica de intercambio del colorante R123 con micelas neutras, utilizando para ello la técnica FCS (Novo 2007). Como tensioactivos se emplearon el Brij 35 y el Triton X-100, estableciéndose un equilibrio de reparto entre el fluoróforo en la fase acuosa y en la pseudo-fase micelar. Se determinaron las constantes de velocidad de asociación y de disociación del colorante con las micelas, observándose que el proceso de asociación está controlado por difusión, debido a la ausencia de impedimentos estéricos, mientras que la velocidad de disociación depende de la fortaleza de las interacciones colorante-tensioactivo y determina la afinidad de la R123 por las micelas.

HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42)

El *HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42)* consiste en un péptido de β -amiloide(1-42) en el que se realizó un marcaje con el colorante *HiLyte Fluor 488* en la posición N-terminal de la cadena peptídica, como consecuencia de la capacidad amino-reactiva que presenta este fluoróforo en forma ácida. Su estructura es la siguiente: HiLyte FluorTM488-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH.

En la Figura 2.21 se muestra la estructura molecular del fluoróforo.

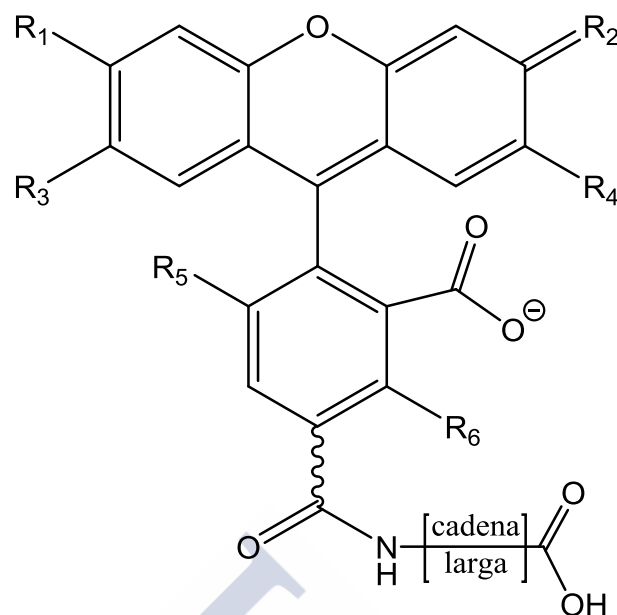


Figura 2.21. Estructura del fluoróforo Hilyte Fluor 488. R₁-R₆ son sustituyentes (no especificados por la casa comercial) (Jungbauer 2009).

Este fluoróforo es estable y su fluorescencia no está afectada por el pH si se trabaja en un rango entre pH 4 y pH 10 (Jungbauer 2009). Ha sido empleado en numerosos estudios realizados sobre el proceso de agregación del β -amiloide. Vestergaard y colaboradores emplearon el péptido β -amiloide(1-42) en concentración 80 μ M junto con el Hilyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) en concentración 8 μ M para estudiar el proceso de agregación mediante Microscopía de Fluorescencia y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), incubando la muestra a 37°C. Determinaron la variación producida en el radio hidrodinámico del amiloide con el tiempo, observando agregados con un radio medio de 150 nm ya inicialmente (a tiempo 0, tras 5 minutos empleados en la preparación y medida de la muestra después de la incubación). Mediante AFM observaron agregados incluso antes de iniciar la incubación que origina la agregación. También determinaron la aparición de fibras después de 2 horas de incubación, aumentando su tamaño con el tiempo. La determinación del radio hidrodinámico muestra una amplia distribución de agregados, observando tras 2 horas de incubación agregados con radio medio aproximado de 300 nm que aumenta hasta más de 450 nm después de 4 horas (Vestergaard 2008).

Jungbauer y colaboradores, en su estudio para conocer el efecto que puede tener la conjugación de un fluoróforo a un péptido β -amiloide en su estructura y función, concluyeron que bajo condiciones de formación de agregados prefibrilares (incubación a 4°C durante 24 horas) el Hilyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) parece no ser totalmente soluble,

aunque esto no se observa incubando a 37°C, 24 horas, para formación de fibras. No se conoce una explicación para este comportamiento (Jungbauer 2009).

Recientemente, Esbjörner y colaboradores estudiaron *in vitro* y en células vivas la cinética de agregación del péptido β -amiloides de 40 y de 42 aminoácidos conjugados con el fluoróforo Hilyte Fluor 488 (Esbjörner 2014). La técnica empleada fue FLIM, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, adecuada por la relación que parece presentar el tiempo de vida con la aparición de estructuras amiloides ricas en láminas β . Se obtuvieron los tiempos de vida medios de una solución fibrilar de péptido β -amiloides(1-42) marcado con Hilyte Fluor 488 y del mismo péptido monomérico, siendo sus valores 3.3 ± 0.1 ns y 3.7 ± 0.05 ns, respectivamente. También se obtuvo el tiempo de vida para agregados largos del péptido, entre 2.5 ns y 3.0 ns, siendo estos resultados similares a los obtenidos para el β -amiloides(1-40). En este trabajo también se comprobó que el colorante libre Hilyte Fluor 488 presentaba un tiempo de vida de 4.0 ± 0.1 ns tanto a pH 5.0 como a pH 7.4, demostrando que este parámetro no afecta al fluoróforo en este intervalo. Ya en los estudios con células se observaron diferencias entre el β -amiloides(1-40) y el β -amiloides(1-42), ambos marcados con el Hilyte Fluor 488. El β -amiloides(1-40) marcado no muestra cambios en su tiempo de vida en las primeras 6 horas de incubación dentro de la célula, mientras que tras 48 horas hay un claro descenso del mismo. Esto parece indicar la existencia de un *lag time* para la agregación intracelular de este amiloide. En cambio, el β -amiloides(1-42) marcado muestra un descenso progresivo del tiempo de vida de fluorescencia, no observándose el *lag time*, que si se detectó *in vitro*, aunque muy corto.

En la bibliografía también hay trabajos en los que se empleó el amiloide marcado Hilyte Fluor 488- β -amiloides(1-40) para estudiar la interacción del mismo con membranas lipídicas (Hamada 2010), con vesículas lipídicas de tamaño celular (Morita 2010), etc.

2.2.2. Sondas fluorescentes con transferencia de carga intramolecular

Los electrones no están enlazados con la misma fuerza en todos los átomos y moléculas. Un sistema rico en electrones que puede ceder de forma rápida un electrón se llama *donor* (D), mientras que el que presenta deficiencia en los mismos, con gran capacidad para recibirlos, se denomina *acceptor* (A). Cuando los sistemas D y A interactúan, la transferencia de electrones es posible.

Existe otra forma de que este proceso se lleve a cabo. Muchas sustancias, sobre todo las que presentan grupos cromóforos, pueden absorber luz de una determinada longitud de onda, lo que las lleva a sufrir una transición desde el estado fundamental hasta el estado electrónico excitado. En este estado, las moléculas son generalmente muy reactivas, lo que

favorece que sean capaces de ceder un electrón siempre que haya un aceptor adecuado en las proximidades.

La *transferencia de carga intramolecular fotoinducida* es un proceso fotofísico que describe la cesión de un electrón de un grupo donador de la molécula a otro aceptor de la misma, al ser excitada. Este proceso da lugar a una estructura diferente, lo que conlleva cambios en la emisión de fluorescencia.

Cuando una molécula de este tipo se excita al ser irradiada, llega a un estado localmente excitado (LE) de tipo (π - π^*) a partir del cual pasa a un estado de transferencia de carga intramolecular (ICT, *Intramolecular Charge Transfer*), donde el grupo π -donor cede un electrón al grupo π -aceptor, produciéndose un desacoplamiento de las dos subunidades y una separación de cargas, como se muestra en la Figura 2.22. A continuación, el sistema puede emitir radiación desde cualquiera de los dos estados, por lo que pueden aparecer en el espectro dos bandas de fluorescencia. Este fenómeno es conocido como *fluorescencia dual*, de forma que cada banda se asocia a un estado, el LE o el ICT. Este tipo de fluorescencia presenta grandes ventajas para un marcador fluorescente, ya que permite la aplicación del método ratiométrico (Lee 2014). De ahí que en la actualidad se intente diseñar marcadores fluorescentes con esta propiedad.

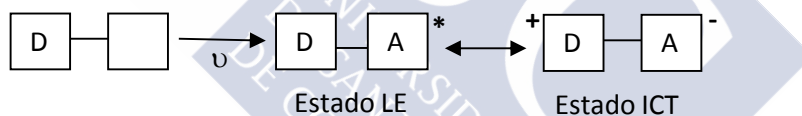


Figura 2.22. Esquema del proceso de transferencia de carga intramolecular, con la formación del estado localmente excitado *LE* y el estado de transferencia de carga intramolecular *ICT*.

La Cumarina 460

Dentro de las distintas cumarinas existentes, las *7-aminocumarinas* son importantes colorantes de láser debido a sus elevados rendimientos cuánticos en disoluciones de alcoholes y otros disolventes (López Arbeloa 1993), pero suelen presentar un bajo rendimiento cuántico en disoluciones acuosas. Entre ellas, la más usada es la *7-dietilamino-4-metilcumarina*, conocida como *C1* o *Cumarina 460* (*C460*). Este fluoróforo presenta aplicaciones como colorante de láser pero destaca su uso en la industria cosmética como bronceador, permitiendo largas horas de exposición solar (Scales-Medeiros 2000) También se utiliza en el “etiquetado fluorescente” de granos de trigo (Ram 2002). Su estructura molecular se muestra en la Figura 2.23.

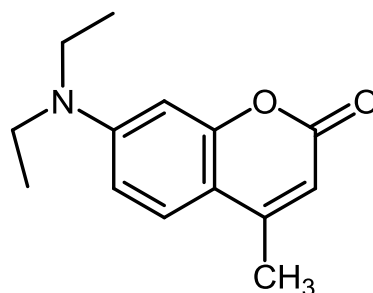


Figura 2.23. Estructura molecular de la Cumarina 460.

La Cumarina 460 se presenta en el estado fundamental con la *estructura A* representada en la Figura 2.24. Sin embargo, cuando esta moléculas se excita, sucede un proceso de *transferencia de carga intramolecular (ICT)* que origina una estructura diferente, denominada *estructura B* en la Figura 2.24. Esta estructura es la principal responsable de la emisión y se caracteriza por una elevada densidad electrónica en el grupo amino, que favorece la existencia de procesos de conversión interna en disolventes muy polares. Estos procesos pueden llevar a la formación de un segundo estado excitado, representado por la *estructura C* (Figura 2.24). Se han propuesto dos modelos para explicar los cambios que suceden en este segundo estado excitado: la formación de un *estado TICT (twisted intramolecular charge transfer)* y el *modelo ULM (umbrella-like motion)*. El estado TICT es un caso concreto de transferencia de carga intramolecular que se caracteriza por el paso de un electrón del grupo amino al anillo, seguido de una rotación primer grupo respecto al segundo, que origina una especie poco fluorescente. Este es el modelo mayoritariamente aceptado en la bibliografía (Grabowski 2003).

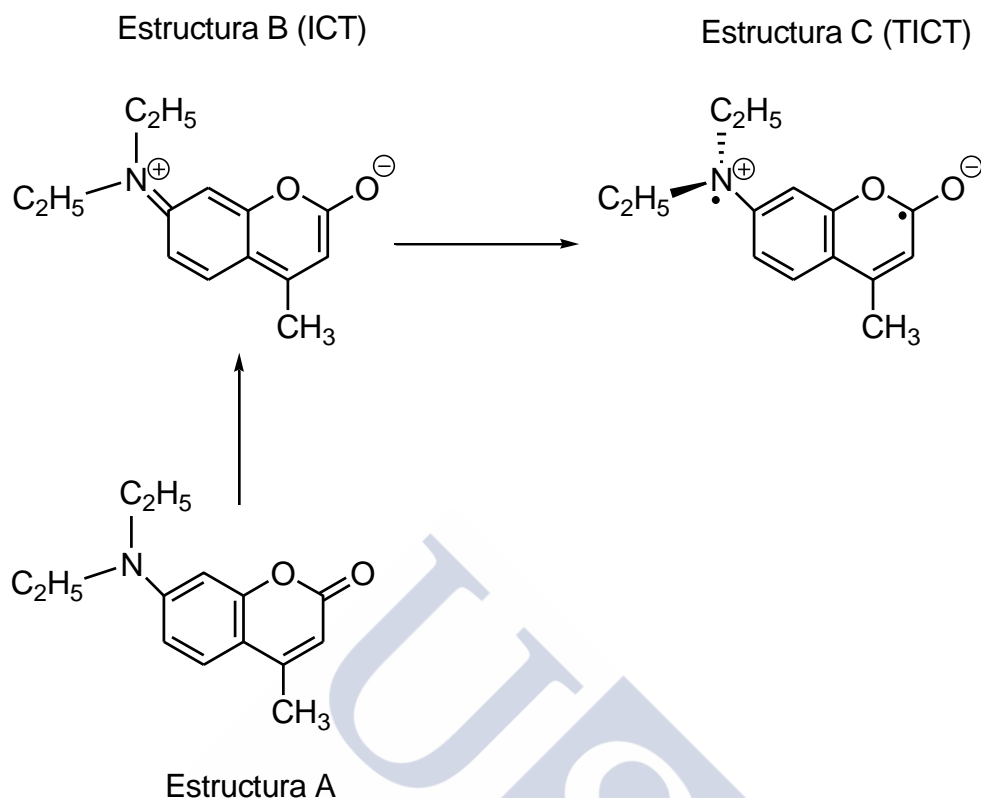


Figura 2.24. Estructuras moleculares propuestas para la Cumarina 460 en los estados singletes fundamental (inferior) y excitado (superior).

Las 7-aminocumarinas en distintos disolventes. Jones y colaboradores investigaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la C460 y otras cumarinas en medios polares, interpretando las diferencias sobre la base del paso del estado ICT a un estado TICT poco fluorescente, dependiente de la estructura de la cumarina y de la polaridad, viscosidad y temperatura del medio (Jones 1985). Yip y colaboradores analizaron los decaimientos de fluorescencia de la C460 y la Cumarina 102 (C102) en diferentes disolventes polares y los explicaron con un modelo de dos estados (Yip 1993).

López Arbeloa y colaboradores estudiaron las propiedades fotofísicas de las 7-aminocumarinas en agua y en diferentes alcoholes, determinando sus máximos de absorción y de emisión, rendimientos cuánticos, tiempos de vida y constantes de desactivación no radiante (López Arbeloa 1993). Los cambios observados fueron explicados a través de los enlaces de hidrógeno que se forman entre las cumarinas y las moléculas de disolvente. También investigaron cómo afectan estos enlaces de hidrógeno al mecanismo de conversión interna.

A pesar del bajo rendimiento que suelen presentar este tipo de cumarinas en agua, la presencia de dos estados excitados, el ICT altamente fluorescente frente al TICT no radiante,

hace que estos fluoróforos sean muy interesantes. En medios no polares o restrictivos de la rotación la formación del estado TICT se ve impedida observándose un elevado rendimiento cuántico y emisión a bajas longitudes de onda debido a la predominancia del estado ICT (Bordello 2010).

Las 7-aminocumarinas en sistemas organizados. En la bibliografía hay diversos estudios de las 7-aminocumarinas en sistemas organizados. Así, se ha investigado el comportamiento de estas cumarinas en disoluciones de sustancias tensioactivas y en membranas. Para la C460 en micelas de Triton X-100 se habla de un máximo de absorción de 375 nm y un máximo de emisión de 450 nm (Kunjappu 1993). Nuestro grupo también ha realizado estudios con la C460 en sistemas micelares de Triton X-100 demostrando que, aunque no es una sonda con total afinidad por las micelas, sí tiene una alta tendencia a la asociación con las mismas, con una constante de complejación 1:1 de $86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Teijeiro Veiga 2005).

Nuestro grupo de investigación también ha realizado numerosos estudios del comportamiento de otras 7-aminocumarinas en sistemas micerales. Así, la Cumarina 102 (C102) ha sido estudiada en presencia del tensioactivo Triton X-100, determinándose la constante de asociación y sus propiedades fotofísicas en el medio micelar. Se comprobó que la C102 tiene tendencia a formar complejos 1:1 de alta estabilidad con las micelas de este surfactante, lo que viene demostrado por la elevada constante de asociación obtenida (García Rodríguez 2006). Continuando con estos estudios, se empleó la Cumarina 152 (C152) para ver su interacción con las micelas de Triton X-100, determinando de nuevo las propiedades fotofísicas y las constantes de asociación correspondientes. Se observó que la interacción con el surfactante se produce mediante complejos de estequiometría 1:1 y 1:2 con constantes de equilibrio elevadas, que vienen explicadas porque la alta flexibilidad de las micelas favorece este proceso de inclusión (Novo 2007, Filgueira Carreira 2007). La C152 también fue estudiada en otro trabajo en presencia del tensioactivo catiónico CTAB y del aniónico LAS, componente usual de los detergentes, con el fin de determinar los parámetros fotofísicos en estos sistemas supramoleculares (Filgueiras Pérez 2007). También se realizaron estudios con la C152 y la Cumarina 153 (C153) en sistemas micelares del tensioactivo C_{12}E_7 mediante técnicas convencionales de fluorescencia y FCS, determinándose las constantes del equilibrio de reparto existentes entre los fluoróforos y las micelas, y analizándose la aparición de agregados premicelares (Piñeiro Maseda 2007, Lage Fernández 2008).

Los estudios de la C152 en micelas de Triton X-100, se completaron mediante el análisis del intercambio dinámico del colorante entre la fase acuosa y las micelas de tensioactivo, empleando para ello la técnica de FCS. Se determinaron las propiedades dinámicas y difusionales y se observó que la alta constante de equilibrio del sistema está principalmente determinada por la baja constante de velocidad de salida que presenta la C152 para

abandonar las micelas, parámetro que es dependiente de la hidrofobicidad de la sonda (Bordello 2010). Los estudios realizados con C152 y C153 en Triton X-100 fueron analizados de nuevo aplicando un modelo cuantitativo desarrollado en nuestro grupo. Este método permite un análisis completo de los datos, conociendo en cada punto la concentración de surfactante existente, lo que facilita la determinación de importantes propiedades de los sistemas colorante-micela, así como el valor de la *cmc* (Al-Soufi 2012, Piñeiro 2013).

Otros trabajos se han centrado en el estudio del comportamiento de las 7-aminocumarinas en presencia de proteínas. La C460 y sus análogos poseen una gran sensibilidad a la polaridad del medio, junto con una elevada fotoestabilidad, lo cual hace que sean útiles como sondas fluorescentes para sistemas biológicos (Nag 1990a). Además, poseen un amplio espectro de aplicaciones biológicas: anticoagulantes, analgésicos, propiedades diuréticas, etc. (Shobini 2001). Se ha visto que estos fluoróforos interaccionan con biomoléculas produciéndose una inhibición del estado TICT debido a la disminución de polaridad en el medio (Nag 1990a). En base a estos resultados, se observó que las 7-aminocumarinas aumentan la intensidad de emisión de fluorescencia al interaccionar con la proteína BSA. Esto se explicó en base a la menor formación del estado TICT en el interior hidrofóbico de la albúmina, lo cual supone un aumento del rendimiento cuántico y del tiempo de vida. En nuestro grupo también se han realizado trabajos de investigación para conocer la interacción de la C460 con la proteína BSA y su comportamiento en distintos disolventes y polaridades, estimando finalmente la naturaleza de los sitios de unión de la cumarina a la proteína (Álvarez Prada 2006). Asimismo se estudió la interacción de la Cumarina 102 (C102) con dicha proteína. Se determinó la constante de asociación del sistema mediante una complejación 1:1, aunque se observó que esta estequiometría no explica en su totalidad la interacción existente (García Rodríguez 2006). Continuando los estudios en nuestro grupo, se investigó la interacción de la C152 con la BSA, determinándose las propiedades fotofísicas de la sonda unida a la proteína y la constante de asociación correspondiente a un equilibrio 1:1. Esta constante presenta un valor elevado, aunque menor que la determinada para la interacción del fluoróforo con las micelas de Triton X-100, que sugiere que no existen restricciones estéricas importantes para la asociación (Filgueira Carreira 2007).

La interacción de estas cumarinas con seroalbúmina humana (HSA) también ha sido estudiada mediante técnicas de fluorescencia, observándose un aumento del rendimiento cuántico del fluoróforo en presencia de la proteína (Shobini 2001). Shobini y colaboradores analizaron los puntos de unión cumarina-proteína sobre la base de los espectros de emisión. Con BSA vieron un desplazamiento espectral hacia el azul que interpretaron como una inhibición del estado TICT.

Finalmente, existen algunos trabajos que investigaron la interacción de las 7-aminocumarinas con las ciclodextrinas. Dicha interacción es análoga a la observada entre estas cumarinas con biomoléculas, incrementándose el rendimiento cuántico del colorante en el medio (Bergmark 1990, Frankewich 1991). Vajda y colaboradores estudiaron la dinámica de solvatación de la C460 y la Cumarina 480 (C480) en agua y en el interior de la γ -CD, usando técnicas de fluorescencia de femtosegundos y de picosegundos. Mencionan la formación de complejos de inclusión de estequiometría 1:1 y 1:2 para la C460, obteniendo valores para las constantes de equilibrio de 641 M^{-1} y 67 M^{-1} (Vajda 1995). La interacción de la C460 y otras cumarinas con γ -CD produce un desplazamiento espectral hacia menores longitudes de onda y un aumento del rendimiento cuántico, que se justifica en base a la restricción del proceso TICT en el interior de la cavidad (Nag 1990b).

En nuestro grupo de investigación también se ha estudiado la interacción de las ciclodextrinas con este grupo de cumarinas. Concretamente, empleando la C102 se estudió su asociación con la γ -CD. Se comprobó que la C102 tiene tendencia a formar complejos 1:1 con esta ciclodextrina, con una constante de equilibrio de 389 M^{-1} , muy inferior a la determinada para este fluoróforo en presencia de micelas de Triton X-100 o de la proteína BSA (García Rodríguez 2006). También se investigó la interacción de la C152 con la β -CD y la γ -CD, observándose que la interacción con la β -CD se produce mediante complejos de estequiometría 1:1 y 1:2 de constantes $1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y 320 M^{-1} , respectivamente, mientras que la interacción con la γ -CD se explica mediante un equilibrio 1:1 con una constante muy baja de 32 M^{-1} (Filgueira Carreira 2007). Se concluyó que la C152 presenta una mayor afinidad por las micelas de Triton X-100 que por las ciclodextrinas, ya que en éstas debe darse una orientación adecuada para que se produzca la entrada del colorante en su cavidad.

La Tioflavina T

Históricamente, al considerar que las fibras de β -amiloide eran las principales causantes de la toxicidad en el cerebro de los enfermos con la EA, se estudiaron distintos colorantes como marcadores de las mismas para poder detectar su presencia en el cerebro de los pacientes. Se definieron las fibras de β -amiloide como estructuras que presentan las tres siguientes características: birrefringencia verde bajo la tinción de las mismas con el colorante Rojo Congo, morfología fibrilar y estructura secundaria de lámina β (Groenning 2010, Melanie R 2004). Esta definición también se puede aplicar a las demás fibras amiloides, formadas por distintas proteínas y responsables de otras enfermedades comunes.

El colorante Rojo Congo era el marcador más usado en análisis *post mortem* para la detección de fibras amiloides, debido a su enlace específico con las mismas. Se utilizó por primera en 1920, obteniéndose como resultado de la presencia de fibras una birrefringencia

verde característica cuando se observaba utilizando un polarizador, además de presentar un cambio en el máximo de absorción de 490 nm hasta aproximadamente 540 nm (Groenning 2010). También se empleaba como sonda fluorescente *in vitro* la *Tioflavina T* (ThT), cuyo enlace parece ser ligeramente más débil que el formado con el Rojo Congo pero cuya fluorescencia aumenta de forma extraordinaria al encontrarse en presencia de las placas seniles (Vassar 1959, Levine III 1993, Voropai 2003). Se utilizó por primera vez en 1959, convirtiéndose en un colorante estándar para la detección de fibras amiloides.

Actualmente se emplea en mayor medida la ThT, quedando más en desuso el Rojo Congo, ya que el proceso de tinción con este fluoróforo es muy laborioso y requiere el uso de un microscopio de luz polarizada, al tiempo que la birrefringencia verde que se obtiene es difícil de interpretar (Biancalana 2010). Además, el Rojo Congo no es adecuado para detecciones de depósitos *in situ*, ya que interfiere con los procesos de agregación de las proteínas, mientras que la ThT parece no influir. También se conoce que el Rojo Congo es capaz de inhibir o aumentar la formación de fibras amiloides en presencia de varias proteínas; en cambio, la ThT, en general, no afecta a la formación de estos depósitos (Groenning 2010).

El mecanismo de unión de los fluoróforos anteriores a las fibras amiloides, entre ellas los β -amiloides, permanece todavía sin ser totalmente conocido. Se han realizado muchos estudios para intentar entender el proceso, pero la naturaleza insoluble y heterogénea de las fibras dificulta su caracterización. Por tanto, los modelos existentes están incompletos, existiendo diferentes hipótesis para describir dicho mecanismo (Groenning 2010).

En la actualidad, entre las técnicas más comunes para identificar la presencia de fibras amiloides se encuentran la fluorescencia de la ThT, la Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y la Espectroscopia de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) (Melanie R 2004). Sin embargo, debido a los nuevos descubrimientos en cuanto a la toxicidad de los pequeños agregados de β -amiloide, muchos estudios tienen como objetivo encontrar nuevos colorantes para detectar la presencia de los mismos, ya que está generalmente aceptado que tanto el Rojo Congo como la ThT sólo muestran cambios importantes en su fluorescencia en presencia de fibras, no ante monómeros o pequeños agregados. Intentar monitorizar y conocer el proceso de agregación del péptido es esencial para entender su funcionamiento y la aparición de la enfermedad. Los tratamientos disponibles hoy en día para la EA tienen el inconveniente de ser altamente tóxicos para el organismo. Por tanto, se está tratando de avanzar en la creación de agentes que intervengan en los distintos pasos del proceso de formación de la fibra de β -amiloide, con el fin de evitar la aparición de los agregados dañinos asociados a la enfermedad.

La búsqueda de fluoróforos capaces de identificar las distintas estructuras amiloides se basa en intentar que cumplan una serie de requisitos que permitan finalmente su uso *in vivo*. Por tanto, de forma ideal, un buen marcador óptico *in vivo* para la EA sería aquel con un intervalo adecuado de absorción y emisión de fluorescencia (600-800 nm), con buena capacidad para penetrar en el cerebro después de su inyección y capaz de marcar específicamente los β -amiloides. Para que un colorante pueda entrar rápidamente en el cerebro necesita tener una alta permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), por lo que la molécula debe ser relativamente lipofílica, no mostrar grupos iónicos y ser relativamente pequeña (Nesterov 2005). Tanto el Rojo Congo como la ThT son moléculas cargadas, por lo que no cumplen este requisito para el marcaje *in vivo* de las fibras amiloides.

Existen análogos al Rojo Congo, como la Crisamina G, donde se reemplaza el grupo sulfonato por un grupo carboxílico menos ionizable, que incrementa significativamente la permeabilidad a la BBB manteniendo su especificidad por las fibras. También hay análogos de la ThT sin carga, como es el 6-OH-BTA-1, capaz de atravesar la BBB aunque con otras limitaciones con respecto a la ThT (Nesterov 2005). De forma más reciente se han estudiado sondas marcadas radiactivamente, como el PiB (derivado de la ThT), con gran afinidad por los amiloides y capaz de atravesar la BBB, que ha sido estudiado en personas vivas, ofreciendo información cuantitativa sobre los depósitos amiloides (Groenning 2010).

Debido al uso habitual de la ThT en el marcaje de los amiloides con estructura fibrilar, se decidió ampliar los estudios realizados con este colorante para intentar conocer mejor su mecanismo de actuación. Además, en este trabajo también se estudiaron otros fluoróforos como posibles análogos para la detección de fibras y pequeños agregados, utilizando siempre como referencia los resultados obtenidos para estas estructuras en presencia de la ThT.

Estructura y mecanismo de actuación de la ThT. La ThT es un fluoróforo de la familia de los benzotiazoles que se utilizó por primera vez para detectar fibras de amiloides en tejidos *ex vivo* en 1959, debido a su elevada afinidad por las mismas. Está formada por un fragmento benzotiazol N-metilado unido a un anillo dimetilnilina (Figura 2.25). Los cambios que sufre este colorante en sus propiedades fluorescentes al interaccionar con las fibras amiloides incluyen variaciones en su espectro de excitación y aumento en su rendimiento cuántico con respecto al medio acuoso. En disolventes próticos, este fluoróforo absorbe principalmente a 412 nm, con un máximo de emisión a 445 nm. Sin embargo, su espectro de excitación muestra un máximo a aproximadamente 350 nm (Groenning 2010). Al enlazarse con las fibras de β -amiloide, el máximo de absorción se desplaza a 440 nm, emitiendo a 480 nm con una intensidad de fluorescencia muy superior a la que presenta en disolución acuosa (Groenning 2010, Wolfe 2010). Se debe aclarar que estas propiedades espectrales de la ThT

han sido muy discutidas en la bibliografía. Así, se sugirió que la emisión a 445 nm correspondiente al fluoróforo libre si se excita a 350 nm era originada por impurezas, lo cual explicaría la no coincidencia del máximo de absorción con el de excitación. Pero, tras realizar más estudios, se descartó que la banda de excitación a 350 nm con emisión a 445 nm fuera debida a impurezas ya que se observó también en muestras recristalizadas de ThT. Se propuso entonces una hipótesis alternativa, en la que el máximo de excitación a 350 nm sería debido a la emisión propia del anillo benzotiazol de la ThT de forma aislada (Groenning 2010). En cuanto al rendimiento cuántico de la ThT en agua, éste presenta un valor muy bajo, en torno a 0.0003 con excitación a 440 nm (Maskevich 2007).

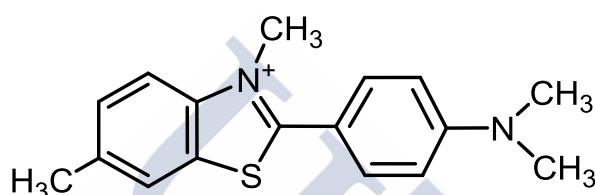


Figura 2.25. Estructura del fluoróforo Tioflavina T.

La ThT forma un complejo intensamente fluorescente con las fibras de β -amiloide, de ahí su interés. Tradicionalmente se consideraba que este colorante no interaccionaba con proteínas en estado nativo, es decir, no plegadas o parcialmente desnaturalizadas, ni con agregados amorfos de las mismas, sino que su interacción se producía específicamente con estructuras ordenadas en forma de *lámina β* (Voropai 2003, Reinke 2010). Sin embargo, estudios recientes sobre la interacción de la ThT con proteínas seroalbúminas demostraron que la interacción de este fluoróforo no es específica para la estructura *lámina β* . Estas proteínas presentan una conformación principalmente en forma de hélice α que interacciona con la ThT, apareciendo un máximo de emisión de fluorescencia a 480 nm, al excitar la muestra a 450 nm, que no se observaba en el medio no proteico (Sen 2009).

El mecanismo de interacción de la ThT con las fibras de amiloide y las causas del considerable aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia tras su incorporación a las mismas permanece sin ser totalmente conocido. Los cambios observados fueron atribuidos a la formación de excímeros, de dímeros muy fluorescentes o de micelas por parte del propio fluoróforo (Stsiapura 2008, Khurana 2005, Wu 2008). Estas hipótesis están basadas principalmente en el desplazamiento del máximo de emisión del espectro del colorante tras su enlace con las fibras. Pero se han encontrado varios motivos en contra de estas interpretaciones, entre los que se destaca que hay una baja probabilidad de dimerización o agregación de la ThT debido a su carga positiva, por la cual se esperaría una fuerte repulsión

electrostática que evitaría la formación de dímeros o micelas, especialmente en medios no polares como las fibras (Stsiapura 2008). Además, la fluorescencia característica de la ThT se observa también a valores inferiores a la *cmc* de las supuestas micelas (Groenning 2010). Por otro lado, se comprobó que el rendimiento cuántico de la ThT depende en gran medida de la viscosidad del medio, más que de la polaridad o propiedades próticas del disolvente (Voropai 2003). El aumento de la rigidez del entorno conlleva un importante incremento del rendimiento cuántico de este fluoróforo. En base a esto se ha sugerido una nueva hipótesis para explicar los cambios fluorescentes observados, basada en un proceso de transferencia de carga intramolecular fotoinducida en el colorante, actuando la ThT como un *rotor molecular* (Voropai 2003, Stsiapura 2008, Stsiapura 2007).

La característica principal de las sustancias que actúan como rotores moleculares es el importante aumento de la emisión de fluorescencia al introducir la molécula en un medio altamente viscoso, debido a la disminución de su relajación torsional, es decir, al inhibir la rotación libre de sus anillos. La rotación interna de los fragmentos moleculares está asociada con procesos de transferencia de carga intramolecular, permitiendo la transición desde un *estado fluorescente localmente excitado* (LE) a un *estado no fluorescente TICT, twisted intramolecular charge transfer state*, ya citado en la descripción de las cumarinas (apartado 2.2.2). En el caso de la ThT, se cree que en un medio no viscoso la rotación interna de los fragmentos benzotiazol y dimetilaminobenceno en el estado excitado está relacionada con un proceso de transferencia de carga intramolecular seguido por rotación que conduce a la formación del estado no fluorescente TICT. Así, el alto rendimiento cuántico de la ThT incorporada a las fibras amiloides estaría relacionado con la restricción de la rotación libre de los fragmentos anteriormente citados, uno con respecto al otro, debido a un impedimento estérico (Stsiapura 2008).

La molécula de ThT presenta dos enlaces con posibilidad de sufrir una torsión, como se muestra en la Figura 2.26. La rotación puede suceder alrededor del enlace simple C-N, girando el grupo dimetilamino, o bien puede ocurrir alrededor del enlace central C-C, rotando el fragmento benzotiazol. La torsión en uno de estos enlaces sería la responsable de la aparición del estado no radiante descrito anteriormente. Srivastava y colaboradores estudiaron los cambios en estos enlaces, llegando finalmente a la conclusión de que la rotación alrededor del enlace C-C central parece ser la principal responsable de la alta fluorescencia que presenta la molécula en medios rígidos (Srivastava 2010). Mediante estudios computacionales de la relajación torsional de la molécula de ThT, Stsiapura y colaboradores demostraron también que las propiedades fotofísicas del colorante estaban principalmente determinadas por el ángulo de torsión φ entre los anillos benzotiazol y dimetilaminobenceno (Figura 2.26) y establecieron que la conformación de la ThT que

correspondía a la mínima energía en el estado fundamental S_0 no era plana, sino que presentaba un ángulo de torsión φ del orden de 37° (Stsiapura 2008). En disolventes de baja viscosidad y tras la excitación se produciría una rotación entre los anillos citados, cambiando el ángulo φ de 37° a 90° y originando el paso del estado LE al TICT no fluorescente (Stsiapura 2008, Amdursky 2012). Estos autores obtuvieron también resultados experimentales concordantes con el modelo propuesto para la ThT en disolventes de baja viscosidad (agua, etanol, 2-propanol y butanol) mediante el uso de Espectroscopia de Femtosegundos, observando que el tiempo de vida del estado fluorescente LE en estos disolventes no excedía los 12 ps (Stsiapura 2010).

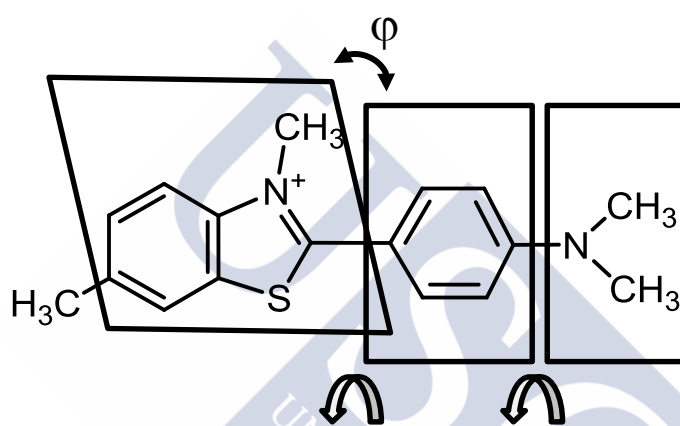


Figura 2.26. Estructura de la ThT, dividida en tres fragmentos: el anillo benzotiazol (izquierda), el anillo benceno (centro) y el grupo dimetilamino (derecha). Se identifica el ángulo de rotación φ como el ángulo formado entre los planos de los anillos benzotiazol y benceno. También se indican mediante flechas los dos enlaces susceptibles de sufrir torsión en la molécula (Stsiapura 2008).

Cálculos computacionales realizados por Maskevich y colaboradores indicaron que la presencia del grupo metilo en el nitrógeno del fragmento benzotiazol impide que la molécula de ThT presente una conformación plana y determina la existencia de una barrera de energía para un valor de $\varphi=0^\circ$ (o su equivalente 180°) (Maskevich 2007). Esta barrera de energía y la existente a $\varphi=90^\circ$ (270°) no tienen la misma naturaleza. El paso de la barrera a $\varphi=0^\circ$ no afecta a la estructura electrónica de la ThT mientras que la barrera a $\varphi=90^\circ$ está asociada con la ruptura de la conjugación entre el sistema de electrones π de los anillos benzotiazol y dimetilaminobenceno, lo que conlleva que estos anillos puedan actuar como cromóforos independientes. La presencia del grupo metilo mencionado previene la existencia de una configuración plana pero también facilita la formación de otras conformaciones energéticamente favorables a los valores del ángulo de torsión siguientes: $\varphi=37^\circ$, $\varphi=145^\circ$, $\varphi=217^\circ$ y $\varphi=325^\circ$.

En estudios experimentales sobre el enlace de la ThT con fibras amiloides se ha llegado a identificar tres sitios de unión entre ambos, con distintas estequiometrias y afinidades. Estos tres sitios pueden ser agrupados únicamente en dos tipos, basándose en la afinidad que presenta el fluoróforo por los mismos (Wu 2008, Lockhart 2005). Aunque no se conoce en detalle cómo se produce la interacción sí se puede indicar que la ThT tiene un fácil acceso a estos sitios de unión, ya que se ha demostrado que la cinética es muy rápida y la interacción se completa en aproximadamente 30 segundos, aunque este proceso parece ser dependiente de la morfología de la fibra (Groenning 2010).

El modo de unión de la ThT a la fibra se puede definir a través de la conformación del fluoróforo al asociarse con esta estructura y de su orientación con respecto al amiloide. A este respecto se propuso que las moléculas de ThT se enlazan a las fibras alineándose al eje largo de las mismas en paralelo y como monómeros (Krebs 2005). Recientemente, Biancalana y colaboradores ampliaron este estudio y concluyeron que las moléculas de colorante se sitúan linealmente unas a otras y se enlazan de forma paralela al eje longitudinal de las fibras, es decir, de forma perpendicular a las láminas β (Figura 2.27) (Biancalana 2010). Parece que la unión no se produce dentro de las láminas, posiblemente debido al impedimento estérico y a las fuerzas hidrofóbicas. Previsiblemente la interacción se realiza con los surcos de la superficie de las láminas, formados por residuos aromáticos, por los que la ThT parece presentar una mayor afinidad (Groenning 2010, Biancalana 2010).

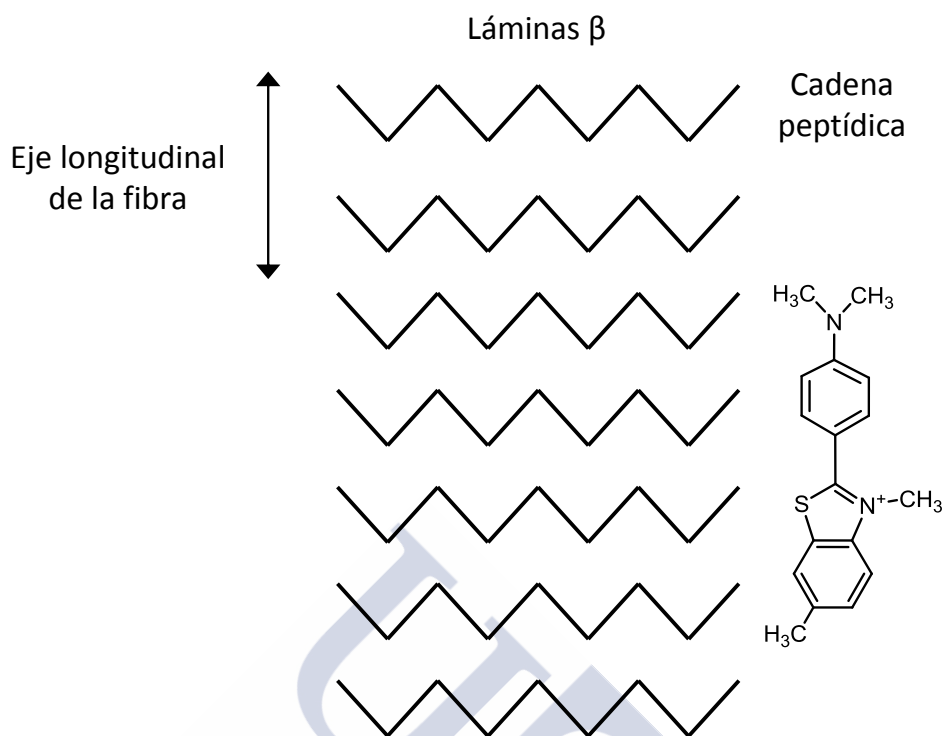


Figura 2.27. Esquema de la orientación de la ThT paralela al eje largo de las fibras. Se considera que el fluoróforo necesita sobre tres o cuatro cadenas peptídicas adyacentes para su interacción con las mismas (Groenning 2010).

Sobre la base de este modelo de unión, Krebs y colaboradores señalaron que todas las láminas β de las proteínas presentan canales o surcos capaces de enlazar la ThT por lo que posiblemente las proteínas con estas estructuras en estado nativo podrían interactuar con el fluoróforo sin necesidad de formar fibras (Krebs 2005). Varios autores observaron un ligero aumento en la emisión de fluorescencia al añadir la ThT a una disolución con proteínas con estructura laminar en estado nativo. De todas formas, se planteó que la interacción no es similar a la observada en presencia de fibra debido a que la proteína en estado nativo presenta láminas β cuyos surcos tienen mayor capacidad de giro, por lo que pueden estar más distorsionados y dificultar el enlace (Biancalana 2010, Krebs 2005).

Se realizaron también estudios de la interacción de la ThT con distintas ciclodextrinas, para poder conocer la importancia de la hidrofobicidad de la cavidad del receptor y comprobar la existencia de cambios en la fluorescencia del colorante. Se observó que en presencia de la γ -CD aparece un aumento de la intensidad de fluorescencia, ya que el diámetro de la cavidad y su altura son suficientes para encapsular totalmente la molécula de ThT. Los receptores con una cavidad más pequeña, como es el caso de la β -CD, no son capaces de inducir los cambios de fluorescencia característicos de la ThT (Groenning 2010).

Sobre la base de los resultados obtenidos que definen a la ThT como un rotor molecular, cuya fluorescencia dependería fuertemente de la capacidad de una fibra de amiloide de dificultar la libre rotación sus anillos, Sabeté y colaboradores estudiaron si la unión de este colorante a proteínas fibrilares causa también un aumento de la anisotropía de fluorescencia de la molécula. Destacaron que el rendimiento cuántico de fluorescencia de la ThT depende en gran medida del tipo de fibra empleada como modelo, existiendo varios tipos de fibras amiloides que llevaron a una fluorescencia muy leve o casi inapreciable de la ThT (Sabaté 2007).

A pesar de los numerosos trabajos recientes, el cambio existente en el comportamiento fotofísico de la ThT en un medio determinado no está totalmente comprendido, existiendo aún datos inconsistentes en la bibliografía. Por este motivo, en el presente trabajo se ha realizado un estudio exhaustivo de las propiedades fotofísicas de este fluoróforo en diferentes medios, incluyendo las fibras amiloides (ver capítulo 6).

Actualmente, a la ThT se le atribuyen muchas aplicaciones, como la detección de fibras de amiloide en tejidos utilizando Microscopía de Fluorescencia, observación del crecimiento de los depósitos fibrilares empleando Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Directa, monitorización de la formación de las fibras mediante Anisotropía de Fluorescencia o Espectroscopia de Fluorescencia, etc. (Groenning 2010).

Información adicional. Pureza de la ThT comercial. La ThT comercial tiene una pureza entre el 65% y el 75% solamente. Las principales impurezas presentes son sales que contienen iones sodio, cloruros o sulfuros. Un proceso de recristalización de la ThT es capaz de eliminar muchas de las impurezas presentes en el producto comercial. Por tanto, puede ser recristalizada en agua o con una mezcla de, por ejemplo, tolueno al 30% y etanol al 70%. El coeficiente de absorptividad molar en medio acuoso aumenta tras la recristalización de $23800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, determinado a 412 nm . Por tanto, si se determina su concentración a través de este factor, mediante la medida de la absorbancia de la disolución, este punto debe ser tenido en cuenta (Groenning 2010).

Se debe de ser cuidadoso a la hora de comparar la formación de fibras bajo diferentes condiciones, ya que hay un gran número de factores que pueden afectar a la intensidad de fluorescencia, como la morfología fibrilar, la concentración de ThT, el pH, la fuerza iónica, etc. A pH neutro, la afinidad de la ThT por las fibras parece ser prácticamente independiente de la fuerza iónica (Groenning 2010).

2.2.3. Sondas fluorescentes con transferencia protónica

Las reacciones de transferencia protónica son muy estudiadas actualmente debido a su presencia en muchos procesos naturales, como son las mutaciones y reparaciones del ADN, la fotosíntesis o la respiración celular. Las moléculas que sufren una transferencia protónica fotoinducida pueden tener aplicaciones como sondas para láser, marcadores de membranas y proteínas, etc.

Los procesos de *transferencia protónica fotoinducida en el estado excitado* tienen su origen en la variación de las propiedades ácido-base de las especies químicas en el estado excitado con respecto al fundamental, existiendo una transferencia del ión hidrógeno o protón en este estado electrónico. Para esto es necesario que en la molécula estén presentes grupos con carácter ácido y básico capaces de donar o aceptar protones, produciéndose una redistribución electrónica asociada a la absorción de un fotón de luz (Weller 1960). El resultado del proceso de transferencia protónica es la formación de uno o varios *tautómeros*, es decir, isómeros de la molécula original que sólo cambian en la posición de su grupo funcional, apareciendo entre ambas moléculas un equilibrio químico.

Dentro de los procesos de transferencia protónica, se puede distinguir entre aquellos en los que la transferencia es intrínseca o intramolecular (*Excited-State Intramolecular Proton Transfer, ESIPT*) y los restantes procesos con diferentes variantes de la transferencia intermolecular. Este último está asistido por especies con capacidad de aceptar o donar protones, como puede ser el mismo disolvente, que actúan de puente entre los grupos ácidos y básicos de la molécula.

La transferencia de un protón entre dos grupos de una molécula aromática produce grandes cambios estructurales y electrónicos, que se asocian a variaciones en el momento dipolar, elevados desplazamientos de Stokes (distancia entre el máximo de absorción y el máximo de emisión de la molécula), etc. En consecuencia, la dinámica de estos procesos puede ser muy dependiente de la naturaleza del disolvente, principalmente en lo que respecta a la formación y ruptura de enlaces de hidrógeno. Los procesos ESIPT generalmente se producen de forma muy rápida si hay enlaces de hidrógeno intramoleculares preformados.

Los procesos de tautomerización que tienen lugar a través de la transferencia intramolecular pueden ser representados esquemáticamente a partir de la curva de energía potencial de la Figura 2.28. Tras la excitación ($S_0(N) \rightarrow S_1(N)$), la molécula "normal" (N) sufre una fototautomerización dando lugar al tautómero (T) excitado, que es más estable y que posteriormente se desactiva ($S_1(T) \rightarrow S_0(T)$). Esta especie es más inestable en el estado fundamental, por lo que sufre una isomerización inversa para regenerar la forma normal.

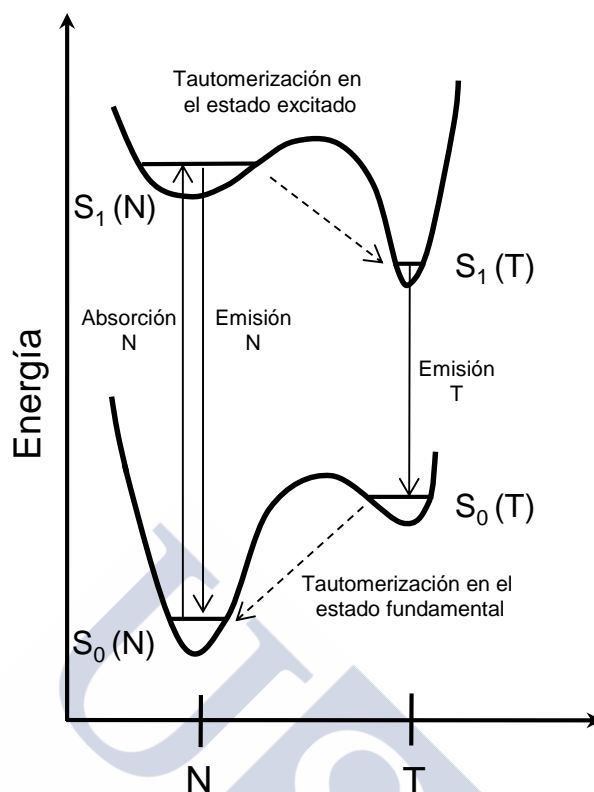


Figura 2.28. Diagrama de energía potencial del doble mínimo típico de los procesos de transferencia protónica intramolecular, con los principales procesos de interconversión posibles entre la especie normal (N) y el tautómero (T).

A pesar de su aparente simplicidad, los procesos de transferencia protónica pueden producirse a través de mecanismos complejos que no son totalmente entendidos en la actualidad.

Además, se debe destacar que muchas moléculas que presentan procesos de transferencia protónica intramolecular en el estado excitado sufren también procesos de transferencia de carga intramolecular. Las moléculas que registran ambos procesos pueden actuar absorbiendo de forma eficiente radiación UV, por lo que se utilizan como protectores solares, entre otras aplicaciones. La fotoprotección que ofrecen depende de la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular intacto, esencial para una transferencia protónica muy rápida en el estado excitado dentro de la propia molécula. El fototautómero formado en este proceso sufre una desactivación sin emitir radiación que transforma la energía absorbida en energía térmica inocua. Brenlla y colaboradores propusieron que esta desactivación del fototautómero estaba relacionada con la capacidad de estas especies de formar un estado de transferencia de carga TICT, cuya eficiencia depende de la facilidad que presente la molécula

de rotar y de la fuerza del par donador-aceptor de electrones del fototautómero (Brenlla 2011).

Debido a las enormes ventajas que presentan este tipo de fluoróforos, se van a describir una serie de sondas fluorescentes con procesos de transferencia protónica intramolecular, las cuales se estudiaron en este trabajo tanto como potenciales marcadores de fibras amiloides como de pequeños agregados solubles. Así, se buscaron sondas específicas para este tipo de péptidos, en las distintas fases de agregación, que presentaran transferencia protónica y/o de carga y con alta capacidad de asociación. Las sondas elegidas para el estudio pertenecen a las familias *imidazol*, *tiazol* y *oxazol*, poseyendo similitudes estructurales con la ThT. Se conoce que estos fluoróforos sufren procesos ESIPT en el estado excitado que los llevan a presentar, en determinadas condiciones, más de una banda de emisión correspondientes a la forma normal y al tautómero. Esta capacidad hace que sean sondas muy importantes que pueden permitir la aplicación de un método ratiométrico que relacione la intensidad de ambas bandas (u otros intervalos espectrales) para la determinación cuantitativa de un sustrato (Demchenko 2010).

Las moléculas de la familia imidazol han sido estudiadas por su fuerte sensibilidad al entorno siendo, por tanto, en las que más nos centraremos para este estudio.

Se van a indicar las estructuras de estos colorantes pero no todos los conformeros posibles, al no considerarlo necesario para la comprensión del trabajo.

HPIP

El fluoróforo 2-(2'-hidroxifenil)imidazo[4,5-b]piridina, nombrado como HPIP, es una sonda de transferencia protónica cuya forma neutra N (Figura 2.29) puede experimentar una transferencia protónica intramolecular ultrarrápida en el estado excitado (ESIPT) desde el grupo hidroxilo al nitrógeno del imidazol para dar lugar al tautómero T.

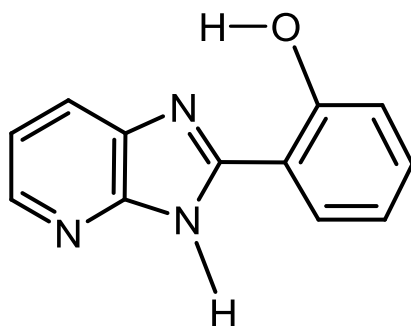


Figura 2.29. Estructura general del fluoróforo HPIP en su forma neutra normal N.

Las principales propiedades fotofísicas de esta molécula descritas en la bibliografía se detallan a continuación (Krishnamoorthy 2001b, Krishnamoorthy 2001a, Brenlla 2013). Conviene señalar que los estudios realizados en disolución acuosa se llevaron a cabo en presencia de porcentajes relativamente altos de alcohol (en torno al 25%), para facilitar la solubilización del HPIP. Se observó que la presencia de alcohol tiene una influencia importante en el comportamiento fotofísico de esta sonda y de otras similares.

- En el estado electrónico fundamental y en medio neutro, la molécula presenta un equilibrio entre varios conformeros, concretamente entre las formas normales N_{intra} , en las que el grupo OH presenta un enlace de hidrógeno intramolecular con el nitrógeno imidazólico, y N_{inter} , con el grupo OH unido intermolecularmente mediante enlace de hidrógeno al disolvente (véase Figura 2.30 y gráfica 2 en (Brenlla 2013)). En este estado fundamental, el grupo hidroxilo presenta un carácter ácido y el nitrógeno del imidazol básico. El comportamiento en el estado excitado de estos conformeros es diferente, ya que el grupo hidroxilo pasa a ser mucho más ácido y el nitrógeno imidazólico más básico.

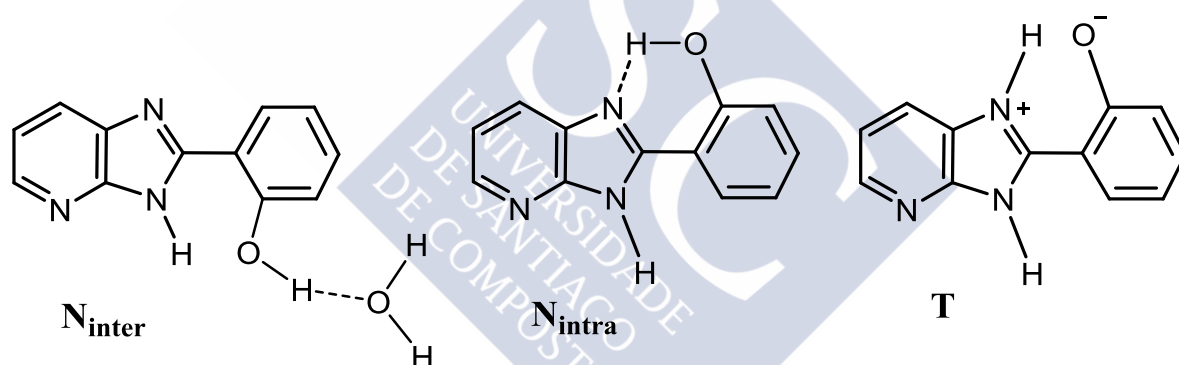


Figura 2.30. Estructura de las formas normales del HPIP, N_{inter} y N_{intra} , y del tautómero T obtenido por ESIPT tras la excitación de la molécula N_{intra} .

- Al excitar el HPIP en distintos disolventes en medio neutro, aparece una banda de emisión que no se superpone con la de excitación, ya que aparece a mayores longitudes de onda de lo que cabría esperar. Se sugiere que la forma normal en el estado excitado N_{intra}^* sufre un proceso ESIPT desde el grupo hidroxilo con carácter ácido al nitrógeno del imidazol, para dar lugar al tautómero T^* (Figura 2.30 y esquema 2 en (Brenlla 2013)), siendo éste el responsable de la emisión desplazada al rojo. Este proceso ESIPT es muy rápido si viene dado por conformeros como N_{intra} que presenten un enlace de hidrógeno intramolecular $OH \cdots N$ ya formado entre los grupos en los que se produce la transferencia protónica.

- En algunos disolventes se observa también una banda de emisión que se superpone a la de absorción, con un desplazamiento de Stokes normal. Esto confirma la presencia en el estado fundamental del conformero N_{inter} , incapaz de sufrir ESIPT en el estado excitado debido a que no forma el enlace de hidrógeno intramolecular $OH \cdots N$ (Figura 2.30).
- Si se estudia el comportamiento de la molécula en el estado fundamental en un rango de pH de 1 a 11 se comprueba la existencia de un equilibrio ácido-base correspondiente a la protonación de la molécula neutra **N** en medio ácido y a su desprotonación en medio básico. La desprotonación tiene lugar en el grupo hidroxilo, con carácter ácido, mientras que la molécula puede protonarse en el nitrógeno del imidazol o bien en el de la piridina, con carácter básico. Aunque no en la misma medida que el grupo hidroxilo, el HPIP también presenta como grupo ácido el nitrógeno protonado del imidazol. En este tipo de moléculas, en determinados medios la excitación electrónica puede provocar también su protonación (comportamiento fotobásico) o desprotonación (comportamiento fotoácido), actuando las moléculas de disolvente como donadores o aceptores de electrones.
- En determinados medios, el tautómero **T** en el estado excitado también puede sufrir otros procesos de transferencia de carga que llevan a un estado TICT, dando lugar a una nueva molécula no emisiva.

En estudios realizados con esta sonda en medio neutro, variando el disolvente, se observó que el rendimiento cuántico en ciclohexano es de 0.31, descendiendo luego de la siguiente manera: etanol>acetonitrilo>trifluoroetanol>agua con un 25% de etanol. En agua, con un 25% de etanol, su valor es de 0.03 (Brenlla 2013).

HPIPMe

El fluoróforo *2-(2'-hidroxifenil)-4-metil-4H-imidazo[4,5-b]piridina*, abreviado como *HPIPMe*, es estructuralmente un análogo de la molécula anterior, pero presenta un grupo metilo en el nitrógeno piridínico, lo que impide que sufra reacciones de transferencia protónica en este grupo (Figura 2.31). Al igual que para el HPIP, los estudios hasta el momento realizados en disolución acuosa se ejecutaron en presencia de un 25% de etanol.

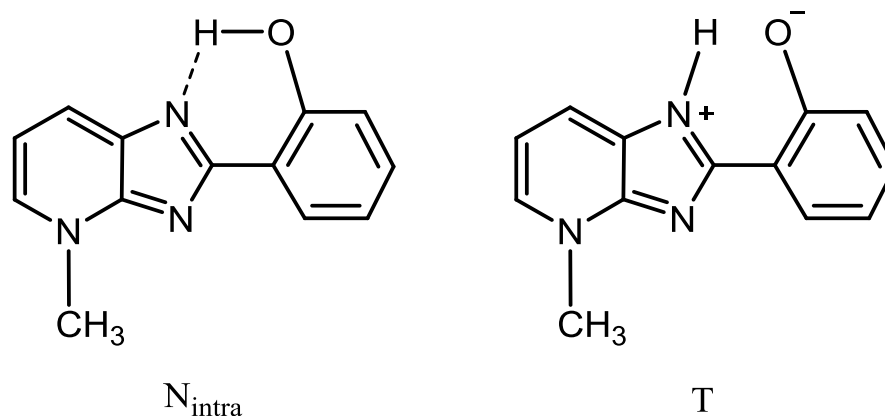


Figura 2.31. Estructura del fluoróforo HPIPMe en su forma plana normal N_{intra} y su tautómero T.

Las principales propiedades fotofísicas de esta molécula son las siguientes (Brenlla 2011):

- Se observa que el HPIPMe presenta un equilibrio ácido-base en disoluciones de carácter neutro a ácido, que es debido a la protonación de uno de los nitrógenos del grupo imidazol. En un medio muy básico, se encuentra un equilibrio adicional correspondiente a la desprotonación del grupo hidroxilo.
- Al igual que el HPIP, el grupo hidroxilo presenta un fuerte carácter fotoácido, por lo que pueden suceder procesos ESIPT en la molécula N_{intra}^* para dar lugar a la forma tautomérica T^* . Tanto en la molécula N_{intra}^* como en su isómero conformacional (con rotación de 180°) se presenta el enlace de hidrógeno intramolecular $\text{OH} \cdots \text{N}$ entre el grupo hidroxilo y el nitrógeno del imidazol, favoreciendo este tipo de procesos (Figura 2.31).
- Sin embargo, la especie tautomérica T formada no es emisiva en todos los medios. Se estudió su comportamiento y se llegó a la conclusión de que sufría una desactivación no radiante dependiente de la viscosidad del medio, con una migración de carga originada por el proceso ESIPT sucedido previamente. Esta transferencia de carga da lugar a un proceso TICT a través del que se forma una estructura rotada que no emite, $T(\text{CT})$ (Figura 2.32).

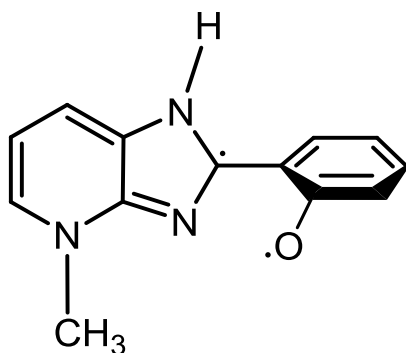


Figura 2.32. Estructura del fluoróforo HPIPMe en su forma rotada T(CT), tras sufrir un proceso TICT con transferencia de carga.

- La fluorescencia observada en disolventes como el trifluoroetanol se considera debida a la existencia en el estado fundamental de una concentración detectable de un conformero que no presenta enlace de hidrógeno intramolecular y que está en equilibrio con la forma N_{intra} . Se identifica como N_{inter} y se corresponde con la estructura representada en la Figura 2.33. La falta de este enlace evita la existencia de procesos ESIPT y TICT, por lo que es una especie emisiva. Esta molécula puede estar presente en disolventes capaces de formar enlaces de hidrógeno con la misma pero si el medio tiene alta capacidad para aceptar protones esta estructura *abierta* se puede disociar en el estado excitado para dar lugar a un anión. La carga negativa del grupo hidroxilo de esta molécula favorece que reaparezca el proceso TICT dando lugar a una desactivación no radiante.

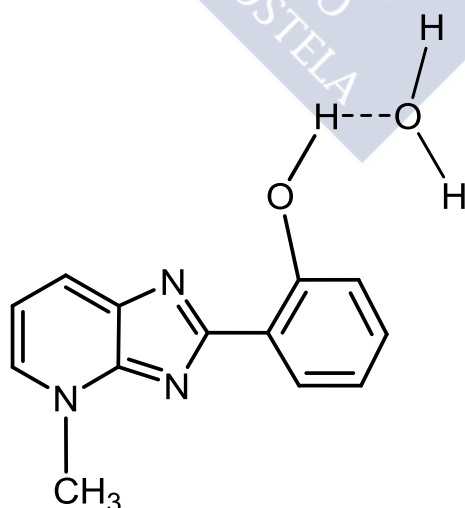


Figura 2.33. Estructura del isómero N_{inter} , con estructura abierta. No presenta enlace de hidrógeno intramolecular, impedido por la formación de enlaces de hidrógeno con las moléculas del disolvente.

El valor del pK_a para el HPIPMe en agua con un 25% de etanol es significativamente más alto que el del HPIP en el mismo medio (5.31 frente a 3.53), indicando que la metilación del nitrógeno piridínico aumenta la basicidad de los nitrógenos del imidazol (Brenlla 2011, Brenlla 2013).

HBO

El fluoróforo *HBO*, correspondiente a la molécula 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol, es una sonda de transferencia protónica de la familia oxazol (Figura 2.34). En la actualidad es utilizado como modelo para los pares de bases del ADN en estudios de solvatación y tautomerización, entre otros.

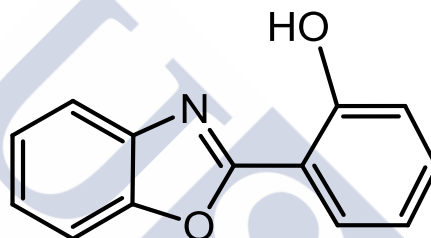


Figura 2.34. Estructura general del fluoróforo HBO en su forma normal N.

El comportamiento fotofísico del HBO ha sido ampliamente estudiado, aunque no se han publicado resultados en disolución acuosa pura (Ormsom 1994, Ríos Vázquez 2007, Abou-Zied 2007). A continuación detallaremos los aspectos más relevantes de dicho comportamiento fotofísico aunque limitándonos a medios neutros, que son los empleados en este trabajo.

En disolventes apróticos, la forma más estable de este fluoróforo en el estado fundamental es la especie con enlace de hidrógeno intramolecular N_{intra} (Figura 2.35). En disolventes próticos, se detectan otras conformaciones que presentan enlaces de hidrógeno con el disolvente (N_{inter}) en equilibrio con el conformero anterior, así como pequeñas proporciones del tautómero T (Ríos Vázquez 2007, Abou-Zied 2007). En cualquier disolvente, tras la excitación de la forma normal N_{intra} a su primer estado excitado singlete, el aumento de la acidez del grupo hidroxilo provoca una transferencia protónica intramolecular ultrarrápida (ESIPT) desde este grupo al nitrógeno del benzoxazol, dando lugar al tautómero plano T^* . Este tautómero puede sufrir una desactivación no radiativa dependiente de la temperatura y de la viscosidad. La dependencia con la temperatura de este proceso fue estudiada por Al-Soufi y colaboradores utilizando el análogo *HBT* (Al-Soufi 1990). Se concluyó que existían al menos dos formas de desactivación dependientes

de la temperatura para la forma T^* , por lo que se propusieron dos mecanismos: uno que incluye especies que sufren una rotación como intermedios, los cuales se relajan a la forma T en el estado fundamental, y otro basado en la formación de un antitautómero en el estado excitado y una conversión interna adicional (Ríos Vázquez 2007, Al-Soufi 1990). También se observa fluorescencia a bajas longitudes de onda debida a la forma normal N_{inter} , cuya intensidad depende del disolvente. Además, en presencia concentraciones elevadas de agua en mezclas con otros disolventes, el HBO sufre un proceso de desprotonación en el estado excitado dando lugar al anión A^* , que se caracteriza por una emisión significativa en el rojo, aunque desplazada a menores longitudes de onda respecto al tautómero (Abou-Zied 2007). Este comportamiento concuerda con el observado para el bencimidazol análogo HBI (2-(2'-hidroxifenil)bencimidazol), que en disolución acuosa neutra presenta un espectro de emisión compuesto por las bandas de emisión de la forma normal N_{inter}^* , el anión A^* y el tautómero T^* (Mosquera 1996).

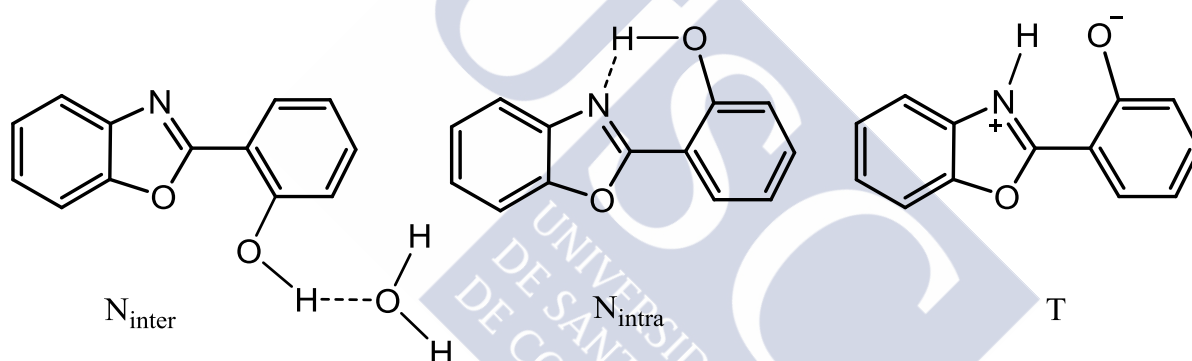


Figura 2.35. Estructura molecular del HBO en sus formas normales N_{inter} y N_{intra} y el tautómero T originado por el proceso ESITP de la molécula N_{intra}^* . El anión A^* se forma por desprotonación del grupo hidroxilo en el estado excitado.

El HBO y sus análogos HBT y HBI se han utilizado como sondas sensibles al pH en estudios con seroalbúmina humana para investigar las propiedades de los sitios de enlace de dicha proteína y su capacidad ionizante (Abou-Zied 2012, Abou-Zied 2013).

HBT

La sonda de transferencia protónica *HBT*, que se corresponde con la fórmula molecular 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol, es un fluoróforo estructuralmente muy similar al anterior, pero presenta un grupo benzotiazol en lugar del benzoxazol de la sonda HBO (Figura 2.36).

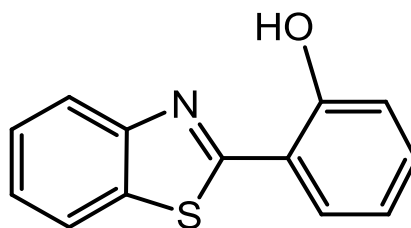


Figura 2.36. Estructura general del fluoróforo HBT en su forma normal N.

Al igual que el HBO, el HBT puede presentar diversas estructuras moleculares, que se representan en la Figura 2.37. En el estado fundamental, existe un equilibrio entre las formas N_{inter} y N_{intra} . Este último conformero, al ser excitado, da lugar a la formación del tautómero T mediante un proceso ES IPT (Ormsom 1994).

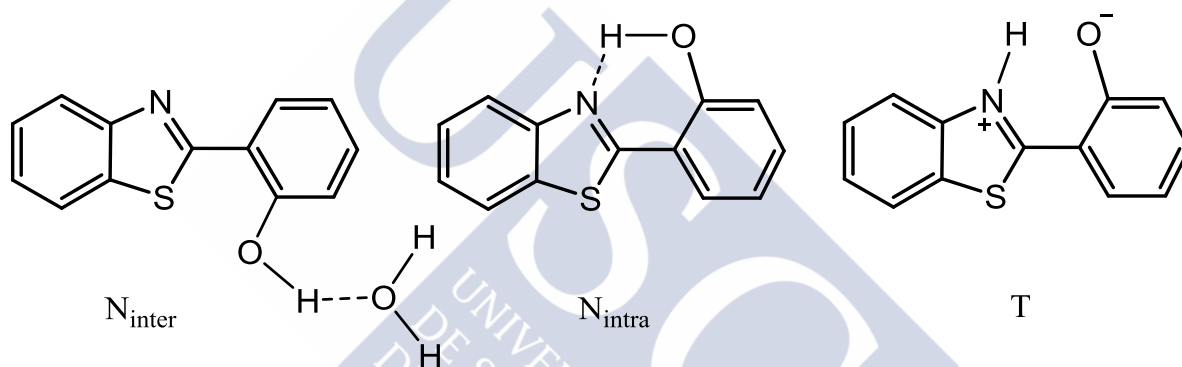


Figura 2.37. Estructura molecular del HBT en sus formas normales N_{inter} y N_{intra} y el tautómero T originado por el proceso ES IPT de la molécula N_{intra}^* .

Tanto para el HBO como para el HBT, el rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta con la viscosidad del disolvente ya que en medios muy viscosos se inhibe el proceso TICT que daría lugar a una especie no emisiva. Así, para el HBO en acetonitrilo el rendimiento cuántico es de 0.0026, mientras que en glicerol su valor se incrementa a 0.0332 (Ríos Vázquez 2007). En el caso del HBT, los valores de rendimiento cuántico son 0.0003 y 0.0222 para acetonitrilo y glicerol, respectivamente.

Estos valores de rendimiento cuántico son muy inferiores a los que presenta el fluoróforo HBI, lo que confirma la existencia de una desactivación no radiativa del tautómero T^* , que ocurre tanto para los benzoxazoles (HBO) como para los benzotiazoles (HBT), pero que no ocurre con los bencimidazoles (HBI). Este proceso de desactivación no emisiva es muy dependiente de la viscosidad del disolvente, ya que se observa que el rendimiento cuántico se eleva al aumentar esta propiedad. Esto confirma que la

Capítulo 2

desactivación está relacionada con el movimiento molecular del fluoróforo, que se ve inhibida al aumentar la viscosidad del disolvente (Ríos Vázquez 2007).



2.3. La Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS)

La técnica de *Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia* (*Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS*) es una técnica experimental que registra y analiza las fluctuaciones espontáneas de la intensidad de fluorescencia de una muestra con el fin de determinar parámetros tanto físicos como químicos correspondientes a la misma, como son los coeficientes de difusión y rotación, constantes cinéticas, pesos moleculares, etc. Estos parámetros permiten caracterizar sucesos de dinámica molecular que pueden ocurrir en el sistema bajo estudio como, por ejemplo, la difusión traslacional, los flujos ordenados de materia, equilibrios supramoleculares dinámicos, fluctuaciones conformacionales de biomoléculas, etc. (Thompson 1991, Rigler 1993, Pawley 1995, Elson 2011, Ries 2012).

Por tanto, en FCS es muy importante la variación temporal que experimenta la emisión de fluorescencia de una muestra, ya que es una técnica *dinámica*. Cualquier propiedad fisicoquímica de la disolución bajo estudio cuya variación espontánea, bajo condiciones de equilibrio termodinámico, conlleve una fluctuación de la intensidad de fluorescencia puede ser estudiada mediante esta técnica. Esto implica que se puede analizar toda una serie de propiedades fisicoquímicas a nivel molecular cuya variación se comprenda entre los picosegundos (excitación y relajación fluorescente de una molécula) y los milisegundos (difusión de la molécula a través del foco).

La técnica de FCS ha experimentado un rápido desarrollo en los últimos años, pasando a ser empleada de forma rutinaria para la determinación de diversos parámetros, principalmente en aplicaciones bioquímicas tanto a nivel molecular como celular (Elson 2011, Ries 2012, Widengren 1998, Widengren 2001, Hess 2002, Bacia 2003).

2.3.1. Principio básico de la técnica

La técnica de FCS se fundamenta en el análisis de las fluctuaciones espontáneas de la fluorescencia que suceden en un sistema en equilibrio termodinámico. Estas fluctuaciones responden a cambios en la concentración de las especies fluorescentes presentes en el medio, las cuales pueden ser debidas a distintas causas (Carreira Blanco 2007):

- Al propio tiempo de respuesta de la molécula de colorante. Cuando una molécula emite un fotón en su proceso de retorno al estado fundamental, transcurre un cierto tiempo en el estado excitado antes de comenzar el proceso de desactivación. Este tiempo de respuesta viene dado por el tiempo de vida de la molécula en el estado excitado.
- Al paso de la molécula de colorante a un estado triplete desde el que no se produce emisión fluorescente.

- A la interacción del colorante con otras moléculas, provocando cambios en su intensidad de fluorescencia, como procesos de reacción o asociación.
- A la propia entrada y salida de moléculas de colorante del volumen de medida, como consecuencia de un proceso de difusión traslacional debido al movimiento Browniano o a procesos de flujo global de materia.

Para que las fluctuaciones de emisión de fluorescencia sean detectables mediante esta técnica es fundamental la existencia de fuentes de excitación potentes y estables, de colorantes con una elevada luminosidad por molécula y la presencia de pocos fluoróforos observables en el volumen a analizar. Generalmente, mediante una serie de pasos se consigue que el número de moléculas en el volumen de detección se encuentre entre 1 y 10. De esta forma, cada una de ellas contribuirá de forma importante a la intensidad media de fluorescencia, observando las variaciones en la señal global por la aparición o desaparición de cada molécula fluorescente. El análisis de estos cambios permite determinar una *curva de autocorrelación*, de la cual se determinan distintos parámetros de interés.

En una curva de autocorrelación se pueden distinguir las siguientes regiones, correspondientes a los distintos fenómenos que causan las fluctuaciones en la señal de fluorescencia (Fries 1998, Rigler 2001, Valeur 2002, Koenig 2006):

- **Antibunching**: una molécula para poder emitir un fotón debe pasar del estado fundamental al estado excitado. Por tanto, hay un tiempo muerto desde que se emite un fotón en el cual la probabilidad de emitir otro fotón es muy baja. Este intervalo de tiempo mínimo entre la emisión de dos fotones consecutivos de la misma molécula viene dado por el tiempo de vida del colorante en el estado excitado y determina el fenómeno de *antibunching*.
- **Rotación difusional**: la probabilidad de excitar con luz un colorante depende del ángulo entre su momento dipolar de excitación y el vector de polarización de la luz excitatriz (Figura 2.38a). Así, si un colorante rota libremente, su velocidad de excitación y de emisión fluctúan dando lugar a un descenso en la función de correlación, con un tiempo de correlación de rotación característico. Generalmente, este término es difícil de detectar.
- **Triplete**: un fluoróforo en el estado excitado puede relajarse al estado excitado triplete, en el que no emite fluorescencia durante el tiempo que permanece en el mismo. La amplitud del triplete, A_T , refleja la porción de moléculas que se encuentran en este estado. A altos niveles de irradiancia aumenta el número de moléculas que pasan a este estado, reduciéndose la emisión de fluorescencia y aumentando su amplitud, regresando al estado fundamental de forma más lenta. Este tiempo de relajación al estado triplete se incluye como un término en la curva

de correlación, pero si su valor se superpone con el tiempo de difusión que se pretende determinar es interesante realizar las medidas con baja irradiancia para evitar lo máximo posible la contribución del triplete.

- **Difusión traslacional:** los fluoróforos entran y salen del volumen de muestreo debido a la difusión traslacional (Figura 2.38b) dando lugar a variaciones en el número de fotones detectados. El empleo de volúmenes de observación y moléculas grandes lleva a tiempos de correlación para la difusión de hasta segundos. Con moléculas pequeñas se observan tiempos de difusión del orden de milisegundos. La determinación del tiempo de difusión de la molécula permite determinar su dimensión, una vez conocido el tamaño del foco empleado.
- **Reacción:** un proceso de reacción o asociación entre un fluoróforo y otras moléculas pueden variar la intensidad de fluorescencia emitida (Figura 2.38c). Por tanto, estos procesos pueden dar lugar a un tiempo de correlación de reacción relacionado con las velocidades de reacción de los procesos directo e inverso.

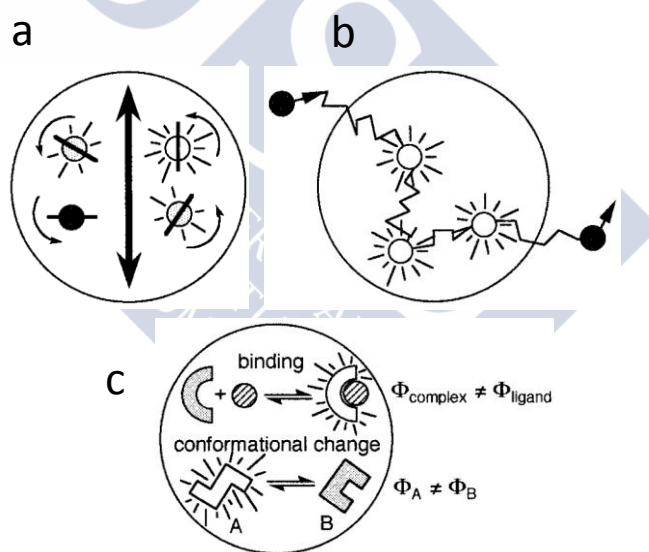


Figura 2.38. Representación de los procesos que originan las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia. Cada uno de ellos se corresponde con una región de la curva de correlación. a) Rotación difusional de las moléculas; b) Difusión traslacional de las moléculas; c) Reacción, cambio conformacional o asociación entre moléculas (Valeur 2002).

En la Figura 2.39 se representa una curva de correlación típica donde se muestran las distintas partes de la misma anteriormente explicadas. El término de reacción no se representa, no siendo necesario para el entendimiento de este trabajo.

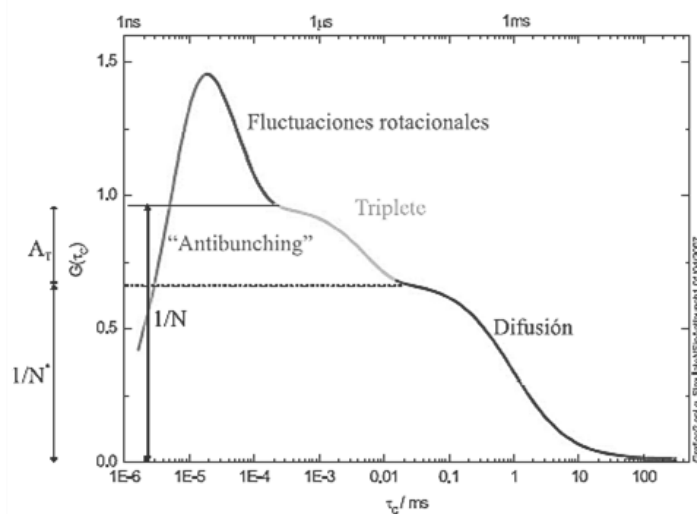


Figura 2.39. Esquema de una curva de correlación típica con diferentes términos que representan distintos procesos dinámicos, tal como se indica en el texto. N^* representa el número total de fluoróforos en el volumen de observación y A_T la amplitud del triplete (Reija Otero 2007).

2.3.2. Saturación óptica y fotoblanqueo

El equipo de FCS, además de permitirnos obtener las curvas de correlación correspondientes al sistema bajo estudio, también nos proporciona información de las cuentas de fluorescencia totales detectadas por segundo, denominado ADC. Este parámetro se corresponde con la fluorescencia emitida por las moléculas en cada momento y permite la determinación de la intensidad de fluorescencia detectada por molécula (*cpm*, *counts per molecule*). El valor de *cpm* se obtiene como el cociente entre el ADC total detectado (teniendo en cuenta que la fluorescencia se determina en dos canales, ver apartado 3.1.3.) y el número medio de moléculas en el foco, N .

En el estudio de un sistema mediante FCS, a bajos valores de irradiancia el parámetro *cpm* muestra una dependencia lineal con la misma. La irradiancia, denominada $I_0/2$, se define como la potencia por unidad de área en el foco y se expresa como kW/cm^2 . Esta linealidad desaparece al aumentar este parámetro, debido a los fenómenos denominados *saturación óptica* y *fotoblanqueo* (*photobleaching*).

La saturación óptica se debe al aumento del número de moléculas que pasan al estado triplete (disminuyendo la fluorescencia) con el aumento de la irradiancia. El nivel de irradiancia al que se alcanza la saturación depende de las propiedades fotofísicas del fluoróforo y de su tiempo de exposición a la radiación, dado por el tiempo de difusión, que a su vez depende del tamaño del foco. Además, este valor también puede cambiar cuando el

colorante se compleja, por lo que debe de determinarse tanto para el fluoróforo libre como complejo, empleando el mismo tamaño de foco.

El fenómeno del fotoblanqueo se produce como consecuencia de la degradación de la molécula fluorescente bajo una irradiación muy fuerte durante su paso a través del foco y es dependiente de la estabilidad de la molécula en un determinado disolvente, de su tiempo de difusión y de la irradiancia. A irradiancias altas descende el número de fotones registrados, como consecuencia de la destrucción de las moléculas.









CAPÍTULO 3

Métodos y técnicas experimentales

Contenidos

3.1. Equipos espectroscópicos	75
3.1.1. Espectrofotómetro Visible-Ultravioleta	75
3.1.2. Espectrofluorímetro con resolución temporal	76
3.1.3. Aparato de medida de correlación de fluorescencia	83
3.2. Reactivos y materiales	87
3.3. Metodología de preparación de muestras	89
3.3.1. Preparación inicial de los β -amiloide	89
3.3.2. Preparación de las disoluciones	93



3.1. Equipos espectroscópicos

3.1.1. Espectrofotómetro Visible-Ultravioleta

Los *espectros de absorción* se midieron con un espectrofotómetro Vis-UV de doble haz *Cary 100* de *Varian*. Al poseer doble haz, uno pasa a través de la disolución de referencia mientras que el otro pasa a través de la disolución que contiene la muestra.

La temperatura se mantuvo constante en todos los experimentos a $(25\pm 1)^\circ\text{C}$, usando un termostato *Heto Denmark* conectado al portacubetas del espectrofotómetro. En caso de emplear otra temperatura, se indicará al detallar el experimento concreto.

Las cubetas empleadas son de cuarzo prismáticas de *Hellma* con 10.0 mm y 3.00 mm de espesor. Se emplean cubetas idénticas para la muestra y la referencia.

Antes de realizar las medidas se debe hacer la *calibración del aparato*, que consiste en medir la línea base a 100% de transmitancia. Para ello se pone en las cubetas el disolvente empleado en las muestras que se van a medir y se ajusta a cero la absorbancia. A continuación, para comprobar si la corrección es correcta, se mide la absorbancia del disolvente empleado en el calibrado, que debe ser cero dentro del ruido. Se repetirá la línea base cada vez que se cambie de disolvente.

El espectro de absorción permite determinar la concentración de colorante adecuada de la disolución empleada para registrar su espectro de emisión de fluorescencia, ya que para esta medida la muestra debe estar lo suficientemente diluida para que su absorbancia sea menor a 0.1. En estas condiciones se puede asumir una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración del colorante. Se evita así la posibilidad de que exista un proceso de *reabsorción* de la radiación por parte de las propias moléculas de la disolución, es decir, parte de los fotones emitidos volverían a ser de nuevo absorbidos por el fluoróforo, lo que provocaría un descenso en la emisión de fluorescencia que llega al detector del instrumento de medida.

El aparato de medida, cuyo esquema óptico se muestra en la Figura 3.1, utiliza dos tipos de fuentes de radiación: una *lámpara de halógeno*, que emite radiación entre 350 y 2500 nm, que es empleada para la zona visible del espectro y una *lámpara de deuterio*, que emite en la zona ultravioleta del espectro.

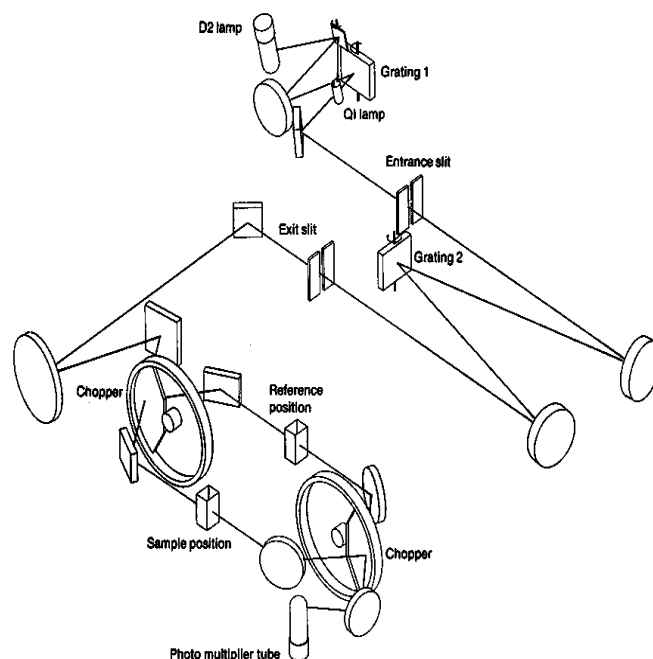


Figura 3.1. Esquema óptico del espectrofotómetro Cary 100.

En cuanto a las condiciones de medida, los espectros de absorción se registraron con una resolución digital de 1.0 nm, una velocidad de barrido de 300 nm/min, 2 nm de anchura de banda espectral y 0.2 s de tiempo de integración.

3.1.2. Espectrofluorímetro con resolución temporal

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un *espectrofluorímetro* de *Edinburgh Analytical Instruments (EAI), modelo F900*. Es un aparato que permite tanto la medida de espectros de fluorescencia de excitación y de emisión con una sensibilidad elevada, como la medida de tiempos de vida de fluorescencia mediante la técnica de "time-correlated single photon counting" (TCSPC).

Medidas de fluorescencia en estado estacionario

Los *espectros de emisión* se obtienen fijando el monocromador primario de excitación a una longitud de onda en la cual absorbe la molécula que se estudia, haciendo un barrido espectral con el monocromador secundario de emisión. La molécula absorbe radiación y luego la emite para volver al estado fundamental, registrándose esta luz emitida. Los *espectros de excitación* son representaciones del número de fotones absorbidos por la molécula en función de la longitud de onda. Se fija el monocromador secundario de emisión a una longitud de onda determinada, luego se hace un barrido con el monocromador primario de

excitación. Este espectro suele coincidir con el de absorción en el caso de que la muestra contenga un único fluoróforo en estado fundamental.

La cámara de cubetas permite alojar tres muestras. Posee un motor que permite situar estas cubetas ante el haz de luz, sin necesidad de cambiarla manualmente de posición. La temperatura de la muestra puede controlarse con el fluido de un baño termostatzado, en este caso agua, conectado a la cámara de las muestras. El aparato es un *termostato-criostato Haake*. La temperatura de los experimentos se mantiene a $(25\pm 1)^\circ\text{C}$, salvo que se indique lo contrario.

La lámpara empleada como fuente de excitación es de *Xenon* de 450 W, que emite continuamente, manteniendo a las moléculas en estado excitado. El rango espectral de esta lámpara es de 200 a 2600 nm, pero está restringido por la sensibilidad del monocromador de excitación, que va de 200 a 900 nm.

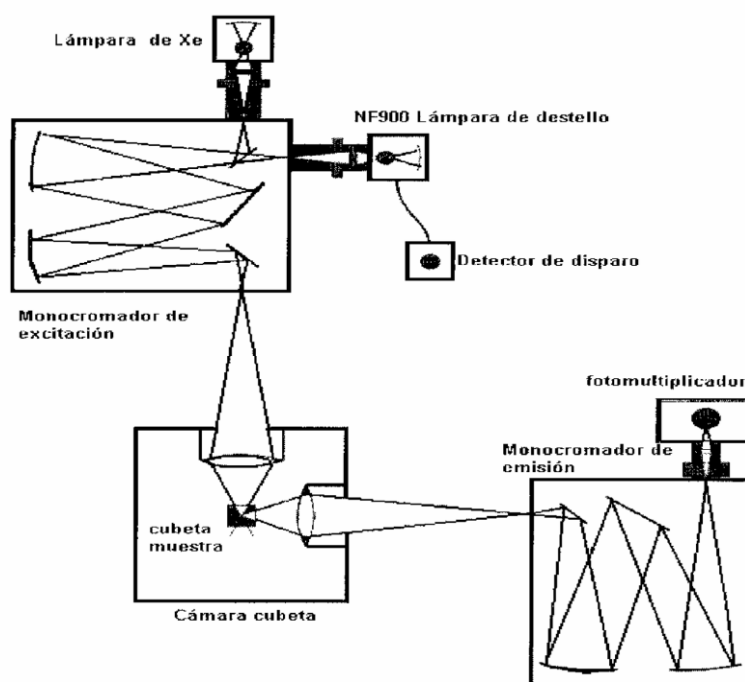


Figura 3.2. Esquema óptico del espectrofluorímetro de Edinburg Analytical Instruments, modelo F900.

El esquema óptico del espectrofluorímetro se representa en la Figura 3.2. En ésta se muestran los *monocromadores* necesarios para la selección de la longitud de onda adecuada y de los distintos tipos de espectros, excitación o emisión. El elemento dispersivo del monocromador es una red de difracción *Czery-Turner*. Poseen *rendijas* variables de forma

continua entre 10 μm y 10 mm, que se ajustan manualmente pero que se mantienen constantes en cada serie de medida, eligiendo las adecuadas según la intensidad de fluorescencia de la muestra y evitando sobrepasar un número de cuentas máximo determinado por el fotomultiplicador. Las rendijas deben ser adecuadas para dejar pasar lo máximo posible de luz monocromática para que no existan desviaciones de la ley de Lambert-Beer.

El *fotomultiplicador* es el detector de la radiación. Al registrar la señal la amplía para mejorar la sensibilidad. Dispone de un obturador que impide que le llegue la luz solar o la de la lámpara, que podría llegar a quemarlo si es intensa. Como se observa también en el esquema de la Figura 3.2, la radiación fluorescente se debe detectar de forma que no coincida con la radiación excitatriz, es decir, a 90° . Esto se debe a que la fluorescencia se emite en todas las direcciones y así se evita medir la radiación que no es la adecuada.

En cuanto a las condiciones de medida, las rendijas se ajustan en función de la concentración de colorante que se tenga y su correspondiente emisión. En el caso de las medidas realizadas con los fluoróforos estudiados como marcadores de β -amiloides, dado que todos los colorantes empleados tienen baja intensidad de fluorescencia, se fijan las rendijas en una posición igual para todos, que se corresponde con 5 nm de apertura en la emisión y 4 nm de apertura en la excitación.

En la selección de las longitudes de onda mediante los monocromadores de excitación y de emisión se tendrá en cuenta que la separación debe ser de al menos 10 nm, con el fin de no confundir la dispersión de la luz de excitación (luz difusa) con la luz emitida. Este fenómeno se concreta en la aparición de bandas de dispersión. La *banda Rayleigh de primer orden* aparece a la longitud de onda de excitación. Ésta es la más fuerte y se debe evitar, pero también existen bandas a la mitad y al doble de la longitud de onda de excitación, que se deben a la red de difracción, recibiendo el nombre de *bandas Rayleigh de segundo orden*. También pueden aparecer *bandas Raman*, que suelen ser debidas al disolvente y presentan una diferencia de frecuencia constante respecto a la radiación de excitación. Si se utiliza el fluoróforo concentrado estas bandas prácticamente no son visibles pero cuando éste está diluido o tiene muy bajo rendimiento cuántico de fluorescencia, estas bandas se observan con facilidad y pueden distorsionar el espectro.

En el caso concreto del Triton X-100, el efecto de la dispersión Rayleigh es muy significativo. Este tensioactivo absorbe fuertemente a longitudes de onda cercanas a 270 nm, emitiendo a aproximadamente 320 nm. Este intervalo no es el que se utilizó en las medidas realizadas en este trabajo pero su absorción sí afectó a los espectros de emisión obtenidos excitando a 496 nm ya que, como se ha indicado, la red de difracción del fluorímetro deja

pasar la longitud de onda de excitación (Rayleigh de primer orden) y también la mitad y el doble de la misma (Rayleigh de segundo orden). Esto provoca distorsiones en los espectros de emisión del colorante estudiado. Para evitarlas, se utilizaron filtros de tipo *long pass* en estas medidas, los cuales no permiten el paso de longitudes de onda inferiores a las que marca el filtro. Concretamente, se empleó un filtro de excitación de 455 nm para obstaculizar la radiación de segundo orden a la muestra y un filtro de emisión de 475 nm para bloquear la emisión del Triton X-100 en el caso de que algo de esa radiación llegase a la muestra.

Para las medidas de *Anisotropía de Fluorescencia* se ha usado el mismo aparato colocándole a mayores unos *polarizadores Glan-Tompson (Edinburg Analytical Instruments)*, con un rango espectral entre 230 y 900 nm.

En la Tabla 3.1 se indican las longitudes de onda de excitación empleadas para las medidas de emisión de fluorescencia realizadas con los colorantes empleados en el presente trabajo.

Tabla 3.1. Longitudes de onda de excitación de los marcadores fluorescentes empleados en este trabajo.

Colorante	$\lambda_{exc} / \text{nm}$
Cumarina 460	380
Rodamina 123	496
Tioflavina T	410 / 450
HPIP	330
HPIPMe	350
HBO	320
HBT	320

Medidas de fluorescencia con resolución temporal

Estas medidas se utilizan para determinar tiempos de vida de fluorescencia de las moléculas bajo estudio. El aparato utilizado es el mismo que en el caso anterior pero no se usa la misma lámpara ni la misma técnica.

Las medidas en estado estacionario son más simples que las medidas resueltas en el tiempo, que requieren instrumentos más complejos y caros, ya que los tiempos de vida de fluorescencia de las moléculas orgánicas son del orden de nano o picosegundos, por lo que son necesarias técnicas especiales de gran resolución temporal para seguir la evolución de las emisión de fluorescencia con el tiempo. Sin embargo, las medidas resueltas en el tiempo aportan importante información acerca de los fluoróforos.

Existen dos métodos para las medidas resueltas en el tiempo: la fluorescencia en el dominio temporal (o fluorimetría de pulsos) y la fluorescencia en el dominio de frecuencias. El equipo del que se dispone en nuestro laboratorio emplea la *fluorimetría de pulsos*. En esta técnica la muestra es excitada por un pulso de luz de duración menor que el tiempo de vida de la muestra. La dependencia de la intensidad con el tiempo se mide tras el pulso de excitación y el tiempo de decaimiento se obtiene de la representación del logaritmo de la intensidad frente al tiempo (Lakowicz 2006).

La fluorimetría de pulsos (TCSPC) se basa en el concepto de que la distribución de probabilidad para la emisión de un fotón particular tras la excitación coincide con la distribución intensidad-tiempo de la totalidad de fotones emitidos como resultado de la excitación. Por lo tanto, determinando el primer fotón que llega al detector tras la excitación y realizando un gran número de excitaciones es posible conocer la curva de dependencia temporal de la intensidad de fluorescencia de la muestra en estudio para una longitud de onda de emisión dada. La técnica TCSPC tiene la ventaja de su gran sensibilidad, permitiendo la medida de tiempos cortos y decaimientos multiexponenciales con gran precisión.

Se considera que la emisión de radiación sigue una cinética de primer orden, $I = I_0 e^{-kt}$, de forma que si se representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo obtenemos una recta de pendiente negativa en el caso de que exista un único fluoróforo en la muestra. El ajuste de esta recta nos da la constante de desactivación k y a partir de ésta se obtiene el tiempo de vida ($\tau = 1 / k$).

En la Figura 3.3 se muestra un diagrama esquemático de un instrumento de TCSPC, del cual se dará una idea general, omitiendo detalles de la técnica que aparecen recogidos en diversas monografías sobre el tema.

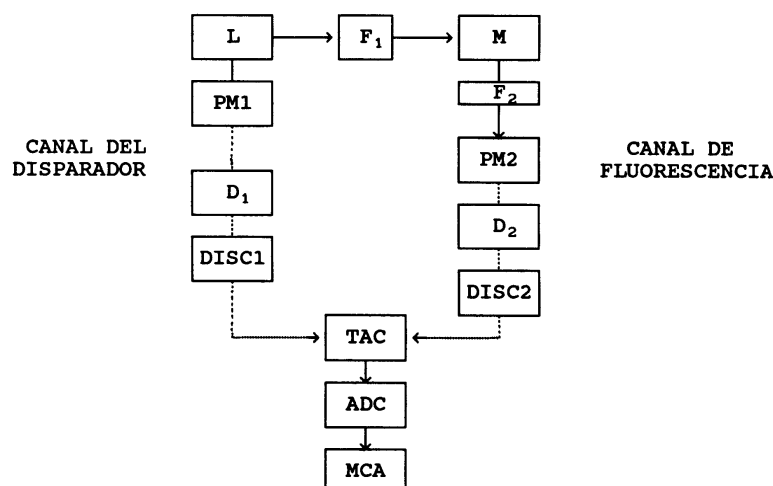


Figura 3.3. Diagrama de bloques convencional de un aparato de TCSPC; (-) señales ópticas; (---) señales electrónicas; L: Fuente de excitación; PM1: Fotomultiplicador de disparo; PM2: Fotomultiplicador de fluorescencia; D1, D2: Líneas de retraso; DISC1: Discriminador para la señal del disparador; DISC2: Discriminador para la señal de fluorescencia; TAC: Convertidor tiempo-amplitud; ADC: Convertidor analógico-digital; MCA: Analizador multicanal.

Los componentes fundamentales del equipo son una lámpara de destello de pulsos de nanosegundos o un láser pulsado de nanosegundos (L), un fotomultiplicador de disparo o de excitación ($PM1$), uno de parada o de fluorescencia ($PM2$), un convertidor tiempo-amplitud (TAC) y un analizador multicanal (MCA).

El disparador, $PM1$, genera un pulso eléctrico a un tiempo exactamente correlacionado con el instante al que se excita la muestra. El pulso es conducido a través de un discriminador para poner en marcha el convertidor tiempo-amplitud (TAC), que comienza a cargar un condensador. Por otra parte, el pulso óptico excita la muestra y ésta emite fluorescencia, detectándose los fotones emitidos en el fotomultiplicador $PM2$. En el momento en que el primer fotón llega al $PM2$, éste envía una señal de parada al TAC , que finaliza el proceso de carga del condensador y lanza un pulso cuya amplitud es proporcional a la carga del condensador, almacenándose una cuenta en el canal correspondiente.

El proceso se repite para un número grande de excitaciones hasta alcanzar un determinado valor del número de cuentas en el máximo de la distribución, que en este trabajo fue de 10000 cuentas para obtener una buena precisión.

Se emplearon varias fuentes de excitación. Para las medidas realizadas en la primera parte del trabajo, con ciclodextrinas y micelas, la fuente de excitación fue una **lámpara de destello llena de gas H_2 a 0.4-0.5 bar**, que presenta un pulso típico muy estable de unos 1.6 ns de ancho a la mitad de la altura. Existen otros gases muy utilizados como D_2 , N_2 o

aire, válidos también para medidas de tiempos de vida del orden de nanosegundos. La fuente de excitación debe mantenerse lo más estable posible. Se debe cuidar su limpieza, la estabilidad y la presión del gas, sobre todo si las medidas se realizan durante muchas horas o días. Las lámparas de pulsos deben tener electrodos limpios y desengrasados, situados en el centro de la cámara de la lámpara. Se recomienda que la lámpara se encienda y opere en las condiciones de medida durante al menos media hora antes de medir, para estabilizar la descarga. Para la medida de tiempos cortos se debe disponer de gas hidrógeno de pureza superior al 99-99.5% y libre de oxígeno, presión de 0.5 bar, apertura del electrodo de 1.0 mm, voltaje de la lámpara 7.0 kV y frecuencia de esta 40.0 kHz, es decir, 40000 pulsos/s.

La luz que sale por la ventana frontal de la lámpara pasa por un iris atenuador y se dirige al monocromador de excitación del espectrómetro. Esta luz excita la muestra, que entonces emite fluorescencia. El iris puede ajustarse de manera que la intensidad incidente en la muestra sea baja, ya que la técnica sólo es válida si la relación entre el número medio de cuentas por segundo que llega al detector y la frecuencia de excitación, 40 kHz, es pequeña. Por tanto, las medidas se realizan manteniendo esta relación por debajo de un límite, 0.05. Entonces, se mantienen el número medio de cuentas por segundo que llegan al detector en un valor inferior a 2000.

Esta lámpara no presenta un comportamiento ideal, de forma que entre cada medida de tiempos de vida se debe registrar la respuesta instrumental midiendo una disolución dispersante de partículas no fluorescentes (*scatter*). Esta lámpara citada fue utilizada para las medidas de tiempos de vida realizadas con Rodamina 123, donde las muestras se excitaron a 310 nm, y con Cumarina 460, que se excitó a 320 nm. En ambos casos el rango temporal de medida fue de 50 ns, manteniendo las rendijas de emisión y excitación totalmente abiertas (más de 10 nm de apertura).

En la actualidad es más frecuente la utilización de láseres de pulsos muy cortos y de detectores de elevada resolución temporal que permiten medir tiempos de vida en la región de los picosegundos. Este es el caso para las medidas realizadas en la segunda parte del trabajo, con las proteínas como sistemas objeto de estudio. La fuente de excitación empleada fue un **láser pulsado con emisión a 405 nm**, de Becker & Hickl GmbH (20 MHz). En este caso también debe medirse la respuesta instrumental, es decir, el pulso del láser, aunque su estabilidad es mucho mayor que la de la lámpara de H₂. Al emplear un láser, se debe tener en cuenta que su radiación está polarizada. En el caso de las medidas de decaimientos de fluorescencia este punto es muy importante, ya que los decaimientos de las componentes polarizadas verticalmente y horizontalmente pueden ser distintos. Para evitar este problema, se debe introducir un polarizador ajustado en el ángulo mágico (54.7°) antes de detectar la emisión. El efecto que se consigue bajo estas condiciones es que la señal obtenida sea

proporcional a la intensidad de fluorescencia total de la muestra y no a una de las componentes (Lakowicz 2006).

3.1.3. Aparato de medida de correlación de fluorescencia

A continuación se describe brevemente el equipo de *Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia* (FCS) empleado en el desarrollo del trabajo experimental. En la Figura 3.4 se muestra un diagrama de bloques del mismo y en la Figura 3.5 podemos ver una foto del equipo donde también se indican sus diferentes componentes.

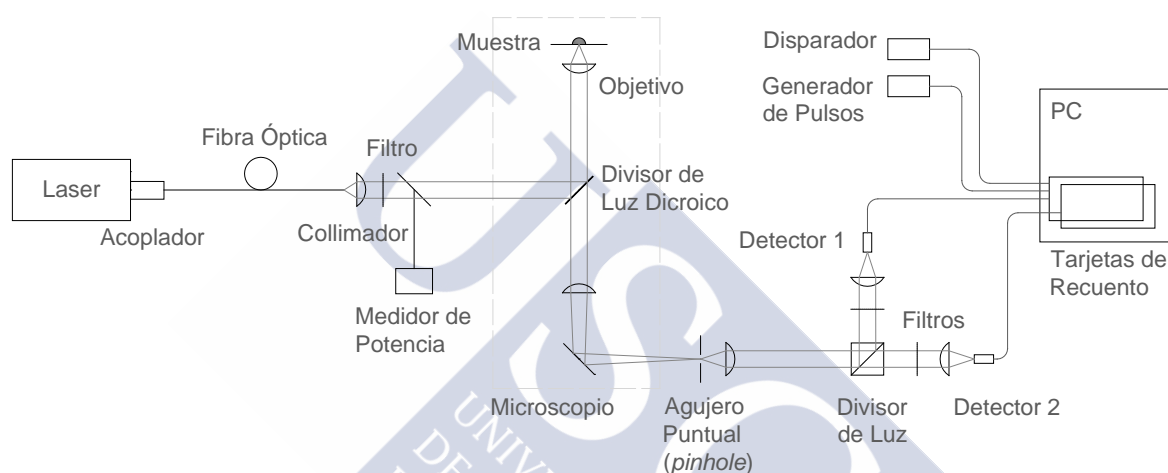


Figura 3.4. Diagrama de bloques del equipo de FCS.

El centro del equipo es un microscopio invertido confocal (*Olympus, IX-71*) montado encima de un tablero óptico aislado ante vibraciones.

La luz monocromática y polarizada de un láser de diodo (*Becker&Hickl, BDL-485-SMC*), de 488 nm, pasa a través de una fibra óptica monomódica (*Point-Source, kineFLEX-P-1-S-405-0.7*), de un colimador (*Schäfter&Kirchhoff, 60FC-4-6, 2-01-DI*) y de un filtro de paso de banda (*Semrock, Maxdiode FF01-482/18*) para generar un haz circular paralelo con una distribución radial de intensidad gaussiana bien definida. El haz se dirige mediante un divisor de luz dicroico (*AHF Analysentechnik, DI01-R488*) hacia un objetivo de gran apertura (*Olympus, UPLSAPO 60xW/1.20*) con el cual se enfoca el interior de una gota de la muestra situada en un pocillo de un *well plate* de poliestireno con fondo de vidrio (*Whatman 7706-2370, 96 pocillos, 300 μ l*). La luz emitida por la muestra es recogida por el mismo objetivo (epi-iluminación) y enfocada encima de una agujero puntual "pinhole" (*Thorlabs, $\varnothing=50 \mu$ m*) en el plano de la imagen.

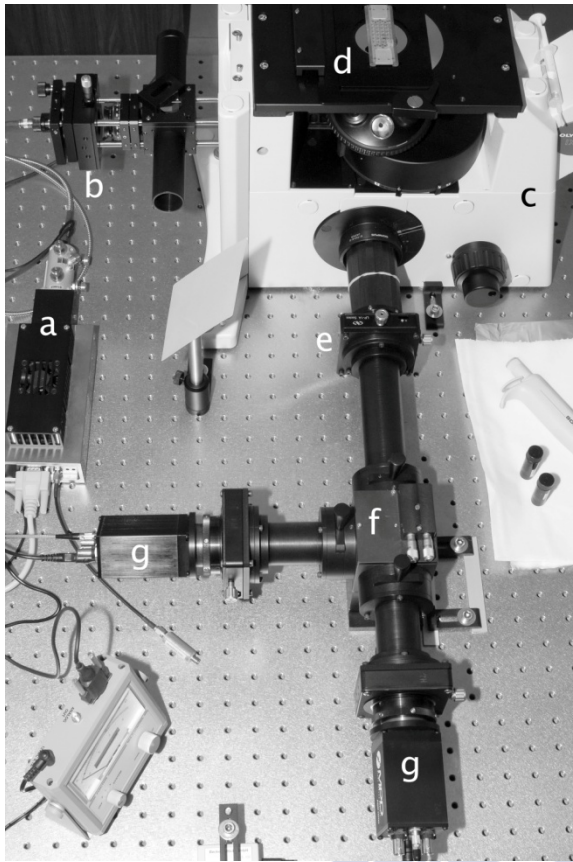
Un sistema de detección de sensibilidad de fotones individuales registra la luz que atraviesa el agujero en dos canales. Para esto se vuelve a colimar el haz de luz y se separan las dos componentes de polarización perpendiculares con un divisor de luz polarizada (*Newport, 05BC17MB.1*). Cada componente atraviesa un filtro óptico de paso de banda intercambiable e incide sobre los detectores (*Diodos de avalancha, MPD-50CTC Single Photon Counting APD, $\varnothing=50\ \mu\text{m}$*). En este trabajo se emplean filtros *Semrock, HC 525/45* frente a los detectores para eliminar la fluorescencia procedente de la luz dispersada del láser.

Los pulsos que generan los fotones incidentes en los dos detectores se analizan mediante dos tarjetas de recuento de fotones de alta velocidad (*Becker&Hickl GmbH, SPC-132*) y se almacenan en la memoria de un ordenador. La sincronización temporal entre las dos tarjetas se garantiza mediante un generador de pulsos (*Becker&Hickl*) y un disparador de medida.

La potencia del haz del láser se cambia modificando el ajuste del acoplador y se determina con un medidor de potencia (*Thorlabs, PM30-120*). Los elementos, desde el agujero puntual hasta los detectores, forman parte de una unidad optomecánica rígida y hermética a la luz ambiental que facilita el posicionamiento preciso (*diseño propio*).

Las medidas fueron realizadas a una temperatura de $(25.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$, depositando las muestras en los pocillos de un *well plate* con un volumen de disolución de 100 μl o superior.

En la Figura 3.6 se muestra un esquema donde se trata de representar la polarización del haz de luz en las distintas partes del aparato. La luz del láser está polarizada horizontalmente y define la orientación de polarización de referencia (*P*). El haz fluorescente al que permite el paso el espejo dicróico se descompone en sus dos componentes perpendiculares de polarización en el divisor de luz polarizada (*f*, Figura 3.5, *Polarizing BS*, Figura 3.6). Cada una de esas componentes es detectada por los fotodiodos de avalancha (*g*, Figura 3.5, *M1* y *M2* en la Figura 3.6) tras pasar a través de los correspondientes filtros ópticos para discriminar la fluorescencia de la luz dispersa del láser a la longitud de onda de excitación (488 nm) y de la luz Raman de las moléculas de disolvente.



Sistema confocal de medida de FCS:

- a) láser de diodo de 488 nm
- b) fibra óptica monomódica y óptica de colimación
- c) microscopio invertido con objetivo y filtro dicróico
- d) muestra
- e) agujero puntual, "pinhole"
- f) módulo optomecánico con ópticas de colimación, divisor de luz polarizada, filtros de interferencia y posicionadores micrométricos para el "pinhole" y los detectores
- g) detectores

No se muestra en la imagen:

- tarjetas de recuento de fotones
- generador de pulsos de sincronización
- ordenador PC de altas prestaciones para la adquisición de datos y el cálculo de las curvas de correlación.

Figura 3.5. Fotografía del equipo de FCS y de sus componentes principales.

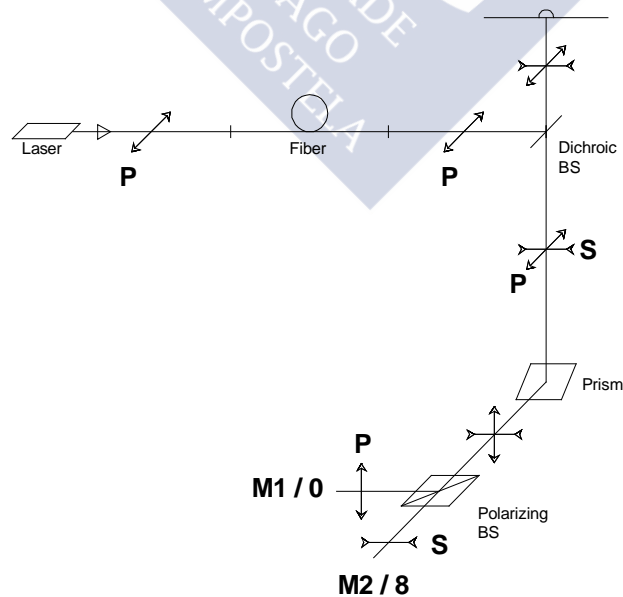


Figura 3.6. Orientación de los planos de polarización en las distintas partes del camino óptico.

Para la puesta a punto inicial del equipo se procedió cada día de medida a la calibración del tamaño del volumen de detección (tamaño del foco) mediante la determinación del tiempo de difusión a través del área focal de una molécula de colorante cuyo coeficiente de difusión es conocido. Para eso se empleó Rodamina 123 en disolución acuosa (Figura 3.7), cuyo coeficiente de difusión a 25°C es conocido e igual a $(4.6 \pm 0.4) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Kapusta 2010). En los experimentos presentados en este trabajo se utilizó un foco pequeño, con un factor geométrico w de 6.15 ± 0.22 y un radio $1/e^2$ radial del volumen de detección de $w_{xy} = 0.275 \text{ } \mu\text{m}$ (véase sección 4.6.1). Se decidió el uso de este foco y no de uno de mayor tamaño por las ventajas que presenta, como el aumento de la señal proveniente de las moléculas de fluoróforo con respecto al disolvente y la reducción de los tiempos de difusión (de forma que la saturación óptica sea menor), entre otras. El aumento del tamaño del foco puede ser necesario si se quiere aumentar el tiempo de difusión de la molécula, para poder separar este término de otros procesos, como el término de reacción. Este tamaño de foco es un valor crítico en FCS si las moléculas a estudiar son muy grandes con relación al mismo, debido a que los modelos de ajuste consideran a las moléculas como partículas puntuales.

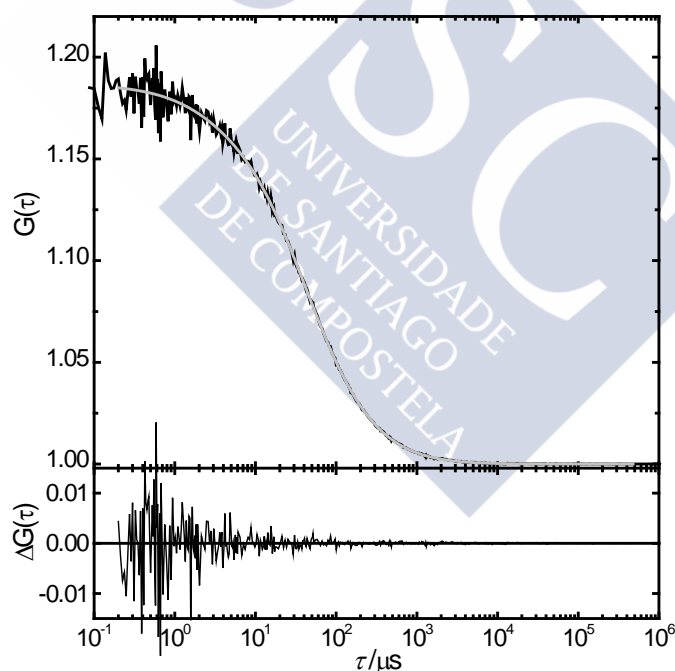


Figura 3.7. Ejemplo de curva de correlación experimental, curva ajustada y residuos del ajuste de la R123 en disolución acuosa realizados para la calibración del tamaño del foco antes de cada serie de medidas. Para todas las series se obtuvieron tiempos de difusión del fluoróforo dentro del valor medio de $\tau_D = 40.78 \pm 0.52 \text{ } \mu\text{s}$ y valores del factor geométrico w de 6.15 ± 0.22 , con un tiempo del triplete fijo de $2 \text{ } \mu\text{s}$ (véase sección 4.6.1).

3.2. Reactivos y materiales

Los reactivos y disolventes empleados en el desarrollo experimental de este trabajo se indican a continuación:

- 7-diethylamino-4-methylcoumarin o Cumarina 460 (C460), al 99%, de Aldrich. Pm=231.3 g/mol.
- α -ciclodextrina, de Pharma. Pm=972.9 g/mol.
- γ -ciclodextrina, de Fluka. Pm=1297.14 g/mol.
- β -ciclodextrina, de Fluka. Pm=1135.0 g/mol.
- Ácido sulfúrico, al 96%, $\rho=1.84$ kg/L, QP Panreac.
- Dihidrógeno fosfato de sodio anhidro, NaH_2PO_4 , de Fluka. Pm=119.98 g/mol.
- Hidrógeno fosfato disódico hidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, PA Panreac. Pm=358.14 g/mol.
- Hidróxido sódico, NaOH, al 98%, de Panreac. Pm=40.0 g/mol.
- Etanol absoluto, PAI Panreac, pureza 96%.
- Rodamina 123, de Sigma-Aldrich, pureza >90%. Pm=380 g/mol.
- SDS, de Sigma-Aldrich. Pm=288 g/mol.
- DTAB, de Sigma-Aldrich. Pm=308 g/mol.
- CTAB, Sigma-Aldrich. Pm=364 g/mol.
- Triton X-100, de Fluka BioChemika. Pm=625 g/mol, $\rho=1.065$ kg/L.
- Brij 35, de Fluka BioChemika. Pm=1198 g/mol.
- El C_{12} -LAS, LAB y C_{12}E_7 han sido suministrados por Henkel AG. El peso molecular promedio del LAB es de 320 g/mol, el del C_{12} -LAS es de 348 g/mol y el del C_{12}E_7 es de 494 g/mol.
- β -amiloide(1-42), de GenScript (pureza del 95%, humano). Pm=4514.1 g/mol.
- Tioflavina T, de Fluka, con una pureza del 75%. Pm=318.87 g/mol.
- HPIP, HPIPnMe, HBO y HBT fueron sintetizados en nuestro grupo de investigación del Campus de Santiago de Compostela. Pm(HPIP)=211 g/mol; Pm(HPIPnMe)=225 g/mol; Pm(HBO)=211 g/mol; Pm(HBT)=227 g/mol.
- HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42), de Anaspec, pureza >95%. Pm=4870.3 g/mol.
- 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFIP, pureza >99.8%). $\rho=1.596$ kg/L.
- Dimetil sulfóxido (DMSO), de Sigma-Aldrich. Anhidro. Pureza >99.9%. $\rho=1.1$ kg/L.
- Cloruro sódico, de Fluka, pureza >99.5%. Pm=58.44 g/mol.
- Fosfato potásico dibásico trihidrato, de Sigma-Aldrich, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pureza >99%. Pm=228.22 g/mol.
- Fosfato potásico monobásico, de Sigma-Aldrich, KH_2PO_4 , pureza >99.0%. Pm=136.09 g/mol.

Capítulo 3

- Cloroformo, de Sigma-Aldrich, pureza 99%. $\rho=1.48$ kg/L.
- Glicerol, de Panreac, pureza 99%. $\rho=1.26$ kg/L.
- Seroalbúmina bovina (BSA), de Sigma, pureza >99%. $P_m=66000$ g/mol.
- 7-Dimetilamino-4-trifluorometilcumarina o Cumarina 152 (C152), al 98%, de Aldrich. $P_m=257.22$ g/mol. Rendimiento cuántico de 0.064 (Bordello 2010).
- Sulfato de Quinina (SQ), de Sigma. Rendimiento cuántico de 0.577 en 0.1 M de H_2SO_4 (Lakowicz 2006).
- Sílica gel, 2.5 a 6 mm, con indicador, de Panreac.
- Agua desionizada filtrada con filtros milli-Q de Millipore.

En cuanto al material, se han utilizado matraces aforados de vidrio *Pirex* (clase A), así como vasos de precipitados del mismo material.

Las pipetas utilizadas son automáticas, *ACURA* de *Socorex*, con una imprecisión máxima que varía entre el 0.7% y 0.2% dependiendo de la cantidad pipeteada.

Las cubetas utilizadas para las medidas en el espectrofotómetro y en el fluorímetro son de cuarzo, de forma prismática, con camino óptico de 10.0 mm y 3.00 mm. Estas últimas tienen capacidad para un volumen de muestra muy pequeño, en torno a 50 μ L, por lo que son utilizadas con las medidas de β -amiloides.

Para la medida del pH se utilizó un medidor de pH *PHM82* de *Radiometer Copenhagen* provisto de electrodo de vidrio (las disoluciones tampón usadas en el calibrado fueron de pH 4.01 y 7.00 a 25°C, de *Crison*).

Para la preparación de las fibras amiloides se utilizó un agitador *Thermomixer Comfort* de *Eppendorf AG*. Este equipo presenta múltiples posibilidades de calentamiento y mezcla de líquidos en una escala de microlitros hasta mililitros. Permite el ajuste de la temperatura de la muestra, del tiempo de funcionamiento y de la velocidad de agitación. Además, para el almacenaje de las muestras de β -amiloides se emplearon microtubos de centrifuga con tapa (de *VWR*), de capacidad 0.65 mL, ya que se conoce que en presencia de disolventes como el HFIP estos viales no liberan grandes cantidades de material a la disolución.

La disolución de tampón fosfato salino de pH 7.20 (PBS) empleada en los estudios con proteínas contenía una concentración 140 mM de cloruro sódico y 10 mM de concentración total de fosfatos, simulando condiciones fisiológicas.

3.3. Metodología de preparación de muestras

3.3.1. Preparación inicial de los β -amiloide

Los péptidos β -amiloide adquiridos comercialmente deben ser sometidos a una serie de preparaciones iniciales, antes de su utilización en los experimentos, con el fin de eliminar los posibles agregados que presente el liofilizado de péptido. Se intenta de esta manera conseguir partir siempre de una *muestra en estado monomérico*, preparando además viales con una cantidad adecuada de péptido de forma que se evite la manipulación consecutiva de los mismos, lo que conllevaría la entrada de agua en el vial y la posible agregación del β -amiloide.

Las reacciones de agregación de los péptidos β -amiloide pueden ser heterogéneas, por lo que es posible que existan diferencias cuando se comparan muestras de distintas soluciones madre o de distintos vendedores. Se ha documentado la variabilidad de un lote a otro e incluso la dificultad en la reproducibilidad de los experimentos dentro del mismo lote (Melanie R 2004). En cuanto a los factores que pueden influir en esta variabilidad, se destaca la pureza de la muestra de proteína, debido a la dificultad que presenta la síntesis de este tipo de sustancias. Al completar los múltiples procesos necesarios para su obtención, el producto final suele contener una cantidad importante de péptidos no deseados, cuya detección y eliminación es muy complicada. Estas impurezas pueden tener un efecto importante en la cinética de agregación, pudiendo actuar como núcleo. Por tanto, es importante tratar de eliminar los posibles agregados presentes antes de iniciar los experimentos. Estos agregados se pueden eliminar por filtración o centrifugación, pero normalmente se utilizan disolventes orgánicos como el DMSO o el HFIP, ácidos fuertes o bases concentradas para su solubilización. Cuando se utiliza DMSO debe tenerse en cuenta que éste es muy higroscópico y que la presencia de humedad puede promover la agregación del amiloide (Melanie R 2004, Harper 1997).

Otro factor a tener en cuenta es la posible degradación química de las muestras, por lo que es importante que las condiciones de almacenamiento del péptido sean adecuadas. Normalmente, las proteínas son más estables cuando se almacenan como liofilizados, bajo atmósfera de N_2 , en un desecador y en el congelador (a $-20^\circ C$). Sin embargo, incluso bajo estas condiciones, algunos péptidos pueden sufrir modificaciones químicas (Melanie R 2004).

Procedimiento de preparación de las muestras de β -amiloide

A continuación se va a indicar paso a paso el protocolo seguido para el tratamiento del β -amiloide comercial, es decir, para su desagregación y separación en viales con una

cantidad adecuada de péptido monomérico, así como la posterior formación controlada de agregados. Stine y colaboradores realizaron estudios exhaustivos para caracterizar los procesos de oligomerización y fibrogénesis de los péptidos de β -amiloide, determinando así las condiciones adecuadas para la preparación de fibras, oligómeros y pequeños agregados, que han sido las utilizadas en esta investigación (Stine 2003, Stine 2011), entre otras fuentes bibliográficas (Jan 2010).

1. Preparación de las muestras para su almacenamiento:

- Se disuelve el péptido en HFIP a una concentración de 1 mg/mL. El HFIP elimina los agregados que se hayan formado en el péptido comercial liofilizado. En este paso es mejor usar viales de vidrio que de plástico, por lo que se puede disolver en el propio vial comercial si es adecuado.
- Se incuba la muestra a temperatura ambiente durante una hora, con agitación ocasional (se puede utilizar un vortex). La disolución debe aparecer tras este proceso clara y sin color.
- A continuación se agita el vial durante veinte minutos sin interrupción, utilizando un vortex. Este paso puede sustituirse por la aplicación de ultrasonidos durante diez minutos, aunque se debe tener en cuenta que una vez se tengan los amiloides en disolución acuosa no pueden aplicarse ultrasonidos, ya que es posible una alteración de la agregación.
- Se reparte la disolución madre anterior en viales de 100 μ L cada uno o en la cantidad adecuada para cada experimento. Para pipetear un volumen de HFIP de un vial y trasladarlo a otro es útil equilibrar la atmósfera de la pipeta con una disolución de cloroformo, pipeteando arriba y abajo la misma antes de coger la muestra.
- Se elimina el HFIP de cada vial con una suave corriente de nitrógeno, evitando en la medida de lo posible que se humedezca.
- Se llevan los viales a un desecador a vacío y se mantienen en él durante al menos 4 horas para eliminar las posibles trazas de HFIP o de humedad que queden en la muestra. Debe aparecer una película transparente en el fondo del vial cuando éste se encuentre perfectamente seco. Se tapa cada vial lo antes posible para evitar la condensación de agua. Se debe tener en cuenta la importancia de este paso ya que trazas de HFIP pueden favorecer la formación de agregados (Nichols 2005).

En este punto debemos tener el péptido en estado monomérico, pudiendo almacenarse por largos períodos de tiempo en un desecador a -20°C sin que se produzca agregación. Con la aplicación del tratamiento inicial con HFIP se consigue eliminar los posibles agregados del

liofilizado comercial. Se realizaron pruebas para comprobar la agregación en este disolvente y se detectó que tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente no aparecían agregados ni fibras en la disolución (Stine 2003). Como el HFIP es un alcohol corrosivo no compatible con ensayos *in vitro* o celulares, debe ser eliminado por evaporación para proseguir con los experimentos. Este tipo de alcoholes es capaz de romper la estructura de lámina β de la proteína, rompiendo las fuerzas hidrofóbicas en los agregados y promoviendo la estructura secundaria en hélice α . Se ha demostrado que la disolución directa del péptido comercial en el disolvente DMSO no es suficiente para eliminar los agregados presentes en el liofilizado (Stine 2003).

2. Preparación de disoluciones madre de β -amiloide en DMSO:

Para preparar una muestra de β -amiloide a partir de los viales almacenados a -20°C , hay que seguir los siguientes pasos:

- Se deja que el vial de péptido alcance la temperatura ambiente.
- Se disuelve el péptido adicionándole un cierto volumen de DMSO seco tal que la concentración final de péptido sea aproximadamente 1 mM, lo que asegura que el péptido se solubiliza completamente y no queda en las paredes del vial.
- Se pipetea arriba y abajo la disolución para solubilizar bien el péptido. La disolución no debe estar turbia ni tener color.
- Se agita la disolución en el vortex durante aproximadamente diez minutos a temperatura ambiente. Este paso puede evitarse si se observa que la disolución del péptido ha sido completa con el paso anterior.

Esta disolución puede almacenarse a -20°C durante unas pocas semanas, manteniéndose estable, aunque es mejor evitar este paso ya que con el tiempo pueden volver a aparecer agregados. Por tanto, es útil preparar esta disolución madre en DMSO en el momento en que se vaya a utilizar.

3. Procedimiento de agregación del β -amiloide:

- Estudios de **estados de agregación tempranos** o **agregación inicial** (oligómeros y pequeños agregados): se coge una alícuota de la disolución madre de péptido en DMSO (de concentración aproximada 1 mM) para preparar una disolución de β -amiloide de la concentración deseada en tampón fosfato salino (PBS), a pH 7.2. Esta disolución debe ser utilizada para las medidas inmediatamente después de su preparación. Los agregados preparados según este proceso se identifican como agregados tempranos, pequeños agregados, agregados solubles o agregados de bajo peso molecular, características que los definen y los diferencian de otras estructuras más ordenadas, como las fibras de amiloide.

- Estudios de **formación de agregados prefibrilares**: se coge una alícuota de la disolución madre de péptido en DMSO para preparar la concentración deseada de β -amiloide en PBS a pH 7.2. Se incuba la muestra a 4°C durante 24 horas, sin agitación.
- Estudios de **formación de fibras**: se coge una alícuota de la disolución madre de péptido en DMSO para obtener la concentración deseada en PBS a pH 7.2. Se incuba a 37°C durante 2 días, con agitación vigorosa.

La formación de oligómeros y pequeños agregados, agregados prefibrilares y fibras viene determinada por el tiempo, la concentración, la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el tipo de β -amiloide. Se ha demostrado que los oligómeros formados a partir del β -amiloide(1-42) utilizando el método anterior son capaces de inhibir la viabilidad neuronal diez veces más que las fibras y cuarenta veces más que el péptido no agregado (Stine 2003). Debido a este gran número de factores que determinan el resultado final en cuanto al tipo de agregado obtenido, es muy importante controlar bien el proceso de preparación de los mismos e iniciarlo partiendo de un material homogéneo no agregado.

Para iniciar la agregación hay que disolver el péptido monomérico en agua o en un tampón acuoso. Al investigar el comportamiento del péptido cuando se disolvía directamente en agua, sin el paso previo de disolución en DMSO, se comprobó que se formaban agregados con un amplio rango de tamaños inmediatamente tras la resuspensión (Stine 2003). Estas estructuras incluían tanto agregados largos como pequeños e incluso fibras de tamaño medio. Por tanto, la disolución directa en agua no es adecuada ya que genera una población de estructuras heterogénea que no permite controlar el proceso. En cambio, la disolución del péptido monomérico en DMSO antes de iniciar la agregación en un medio acuoso permite una mejor resuspensión del amiloide y facilita la completa disolución del mismo para iniciar después un proceso de agregación más controlado. Esto es debido a que el proceso de agregación se inicia con una nucleación, es decir, a partir de una semilla presente en el medio. Si se disuelve directamente el péptido en agua, como esta disolución es difícil, aparecen inmediatamente agregados en el medio que favorecen la formación de otros de mayor tamaño.

Diversos estudios han indicado que el pH ácido favorece la fibrillogénesis de los β -amiloide y otras proteínas, por lo que se podría optar por otro método de formación de fibras distinto al indicado en este apartado, que incluiría la adición de ácido clorhídrico 10 mM al péptido monomérico y una incubación a 37°C durante 24 horas (Stine 2003). Inmediatamente tras esta preparación, se observó que la mayoría del péptido permanecía no agregado, aunque sí se detectaron algunos oligómeros. Al transcurrir las 24 horas, se localizaron estructuras fibrilares de diámetro aproximado 4 nm que se extendían varias

micras. El efecto del pH en la formación de fibras puede ser debido a la protonación del grupo carbonilo terminal u otro residuo aminoacídico. Estos grupos cargados pueden participar en la estabilización de la estructura secundaria y facilitar la fibrilogénesis.

La formación de agregados a partir del péptido de β -amiloide(1-42) es dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de la proteína. En un estudio de Stine y colaboradores se analizaron varias muestras de concentraciones entre 10 μM y 100 μM , bajo condiciones de formación de agregados prefibrilares y de fibras, a pH ácido, observando la agregación inmediatamente tras la preparación, a las 24 horas y una semana después (Stine 2003). Bajo condiciones de formación de agregados prefibrilares, comprobaron que el péptido β -amiloide(1-42) formaba rápidamente oligómeros y que solo después de un largo tiempo de incubación a concentración igual o mayor de 25 μM era importante el número de protofibras. Los resultados obtenidos bajo condiciones de formación de fibras a pH ácido llevaron a la conclusión de que la concentración crítica para la formación de fibras se encuentra entre 10 y 50 μM , mientras que la formación de oligómeros y agregados prefibrilares sucede a concentraciones más bajas.

La formación de agregados también es dependiente de la temperatura (Stine 2003). Se comprobó que el proceso de formación de agregados prefibrilares empleando una temperatura de 4°C durante 24 horas daba lugar a una solución homogénea de los mismos. En cambio, si esta muestra se dejaba a temperatura ambiente la disolución permanecía prácticamente formada por pequeños agregados con una cantidad baja de protofibras. Si se empleaba una temperatura de 37°C aumentaba claramente el número de protofibras.

Si el péptido empleado en los estudios fuera el β -amiloide(1-40), los tiempos de incubación requeridos para la formación de agregados prefibrilares o de fibras deberían de ser mayores, comparados con los empleados para el β -amiloide(1-42), ya que su agregación es más lenta (Stine 2003).

3.3.2. Preparación de las disoluciones

Complejación C460-ciclodextrinas

La α -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina se recrystalizaron dos veces en agua Milli-Q y se secaron en una estufa a vacío siguiendo el procedimiento indicado en la bibliografía (Álvarez-Parrilla 2001). Para comprobar su pureza se prepararon disoluciones acuosas de las mismas y se registraron sus espectros de emisión de fluorescencia.

Para la preparación de la disolución madre de Cumarina 460 (C460) a partir del producto comercial sólido, debido a su baja solubilidad, se procedió a la adición de HClO_4

con el objetivo de alcanzar un pH ácido cercano a 3 y facilitar la disolución. Posteriormente se realizó una filtración por gravedad para eliminar los posibles residuos sólidos no disueltos y las impurezas insolubles en agua, garantizando de esta forma la homogeneidad de la disolución.

Para conocer la concentración exacta de C460, al no disponer de un valor fiable para el coeficiente de absorptividad molar de la misma en disolución acuosa, se optó por medir su absorbancia en disolución de etanol. Este coeficiente de absorptividad molar en etanol a 373 nm es conocido, siendo su valor $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Brackmann 1986). Para dicha determinación, se tomó un volumen concreto de la disolución madre acuosa, se dejó evaporar el agua y se diluyó el residuo en un volumen conocido de etanol, registrando su espectro de absorción. A partir de esta preparación se pudo obtener la concentración exacta de C460 en la disolución madre, así como el coeficiente de absorptividad molar de la C460 en agua ($\epsilon_{\text{agua}} = 2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para el estudio de la complejación de la C460 con ciclodextrinas, se preparó una nueva disolución madre (D1) de C460 de pH neutro a partir de la disolución madre ácida anterior. Para esto se añadió tampón fosfato de pH 7 de forma que la concentración final de fosfatos en la disolución madre fuese 0.01 M. Esta disolución se preparó con una concentración $2.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ para las medidas de absorción y $3.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ para las de emisión. Posteriormente, la disolución D1 fue empleada como disolvente para la preparación de las disoluciones de ciclodextrinas (D2), que contenían por tanto la misma concentración de C460 que la disolución D1. Las concentraciones más altas de α -CD y γ -CD fueron de 0.05 M y para la β -CD fue de 0.012 M (Teijeiro Veiga 2005). A continuación, las disoluciones de medida se prepararon mediante mezcla de volúmenes de las disoluciones D1 y D2, variando así la concentración de ciclodextrina sin cambiar la de C460. Se comprobó que el pH se mantenía constante y en torno a 7.

Se verificó la pureza de las disoluciones madre de ciclodextrina mediante la comparación de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia a distintas longitudes de onda, observando que coincidían entre sí, y también mediante la comparación con el espectro de absorción correspondiente.

Complejación R123-micelas

La Rodamina 123 (R123) tiene una pureza elevada y es muy soluble en agua, por lo que las disoluciones madre se prepararon directamente por pesada, utilizando una balanza de cuatro decimales que aporta mucha precisión. Se calculó la cantidad de producto necesaria

para obtener una concentración aproximada de 10^{-3} - 10^{-4} M, a partir de la cual se prepararon las disoluciones deseadas por dilución.

Así, para la realización de las series de medidas se empleó una concentración de colorante de aproximadamente 10^{-6} M en el caso de absorción y de 10^{-7} - 10^{-8} M en el caso de emisión. Estas disoluciones se prepararon por mezcla de volúmenes a partir de disoluciones madre, siguiendo estos pasos:

- Se preparó una cantidad suficiente de la disolución de colorante, de concentración adecuada para la medida, diluyendo la cantidad correspondiente de la disolución madre, utilizando agua como disolvente.
- Se pesó la cantidad de tensioactivo necesaria para obtener la concentración más alta del mismo y se disolvió utilizando como disolvente la disolución de R123 previamente preparada.
- A partir de las dos disoluciones anteriores se prepararon las disoluciones de medida de diferentes concentraciones de tensioactivo. Para ello se añadió la cantidad necesaria de la disolución de tensioactivo en el matraz (5 mL) y se enrasó con la disolución de R123 que se preparó al inicio. Así no se cambia esta concentración y la única variable es la concentración de surfactante y, por tanto, la de micelas.

Para enjuagar las cubetas se utilizó la misma disolución que se iba a medir, para evitar así la utilización de agua y poder conseguir que la adsorción del colorante en las paredes de la cubeta varíe lo menos posible, dando datos más reproducibles. Para el enjuague de los matraces tampoco se utilizó agua sino la disolución de R123 inicialmente preparada, por el mismo motivo.

Complejación en presencia de proteínas

Las disoluciones de ThT se prepararon por pesada, ya que se disuelve bien en los distintos disolventes empleados. Se tuvo en cuenta que su pureza es del 75%. El HPIP_NMe y la BSA se prepararon también por pesada, mientras que en el caso del HPIP, HBO y HBT se añadió una pequeña cantidad de sólido al disolvente y se dejó con agitación durante varias horas hasta la saturación de la disolución. A continuación se filtró la muestra para obtener la disolución madre.

En el caso del HPIP se determinó una *recta de calibrado* para poder obtener la concentración exacta de colorante. Para esto se preparó una disolución de concentración conocida del fluoróforo en etanol, siendo muy buena su solubilidad en este medio. A continuación se cogió una alícuota y se evaporó el alcohol, para después añadir el tampón fosfato salino empleado en las medidas en la cantidad adecuada para obtener la

concentración deseada. Se dejó la muestra con agitación varias horas y después se comprobó la completa disolución del HPIP mediante la determinación de espectros de fluorescencia estables con el tiempo. A partir de esta disolución madre de concentración conocida se prepararon varias disoluciones de distintas concentraciones y se determinaron sus espectros de emisión de fluorescencia para obtener la recta de calibrado (Figura 3.8).

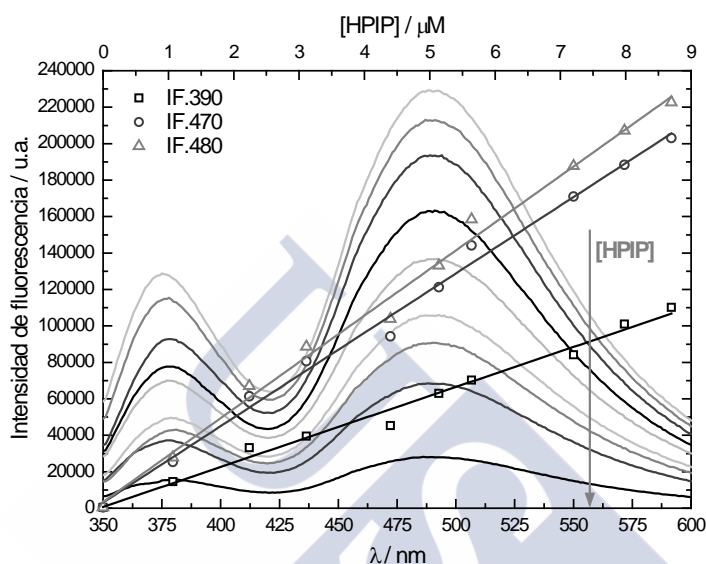


Figura 3.8. Espectros de emisión de fluorescencia con distintas concentraciones de HPIP y representación de la intensidad de fluorescencia a 390 nm, 470 nm y 480 nm en función de la concentración del fluoróforo, incluyendo el ajuste lineal de los datos.

En el caso de los β -amiloide, tras la preparación inicial a la que se someten las muestras del péptido comercial, se dispone de viales con una determinada cantidad de amiloide en estado monomérico, en forma de película sólida. A partir de estos viales, se disolvió el péptido mediante adición de DMSO hasta su completa disolución, como se ha indicado en el apartado anterior. Una vez en este punto, se procedió a la preparación de la muestra en función del experimento que se quiera realizar. La adición de un disolvente acuoso, como el tampón fosfato salino, inicia la agregación del péptido.

Para el estudio de los *agregados tempranos de β -amiloide*, se preparó tampón fosfato salino a pH 7.2 y se disolvió el vial anterior de péptido en DMSO con el mismo hasta la concentración final de amiloide deseada. Para los estudios de fluorescencia en estado estacionario se añadió a esta muestra el fluoróforo adecuado. Para esto, se preparó una disolución de colorante directamente en PBS a pH 7.2, de una concentración determinada, de forma que después se pueda añadir la cantidad adecuada de la misma al vial anterior para tener la concentración final de fluoróforo buscada. En algunos casos, también se empleó la

disolución del fluoróforo en PBS como el propio disolvente para el vial de amiloide en DMSO, preparando ya la disolución de colorante de la concentración final deseada. Para las medidas de FCS, se utilizó como colorante el amiloide marcado HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42), al que también se le aplicó previamente todo el protocolo de desagregación. Una vez se preparó la muestra de este péptido en DMSO, se disolvió el mismo en PBS a pH 7.2 para obtener la concentración adecuada de mismo, entre 1×10^{-7} y 5×10^{-7} M. Una vez preparada, se utilizó esta disolución como disolvente para el vial correspondiente de β -amiloide(1-42) sin marcar, previa adicción de DMSO, de forma que en la disolución final tenga tanto amiloide marcado como amiloide no marcado. Esta muestra se agitó un par de minutos y se procedió a las medidas, al iniciarse la agregación en el medio acuoso.

En cuanto a los *estudios de fibras de β -amiloide*, se inició el proceso con la preparación de fibras de una concentración determinada de amiloide, disolviendo el vial de péptido, ya en DMSO, en disolución acuosa de PBS a pH 7.2 que se agitó a 37°C durante dos días. Para las medidas de fluorescencia, se prepararon las disoluciones de colorante en PBS a pH 7.2 y a continuación se mezcló una alícuota de la muestra de fibras con la cantidad adecuada de la muestra de colorante. Se comprobó que la interacción es prácticamente inmediata, por lo que a partir de ese momento se procedió a realizar las medidas. En este caso no se puede añadir el colorante ya al inicio, con el β -amiloide monomérico, porque el proceso de agregación y formación de fibras se realiza a 37°C y el colorante puede degradarse.

A la hora de preparar fibras, se debe de intentar no preparar concentraciones muy elevadas de las mismas, ya que las fibras resultantes podrían tener otra estructura. Además, se debe controlar que no precipiten al preparar las disoluciones de medida.

En determinados experimentos en que fue necesaria la dilución de la muestra durante las medidas, se realizó este proceso en la propia cubeta, manteniendo constante la concentración de fluoróforo, de forma que no se modificaran las condiciones de medida durante el experimento.

Las medidas relacionadas con la formación de fibras amiloides son difíciles. El proceso de fibrillogénesis puede llevar consigo la precipitación de la proteína, alteraciones en su morfología y transformación de los agregados, que pueden afectar a varias técnicas analíticas usadas para analizar este proceso de agregación.



CAPÍTULO 4

Análisis de datos

Contenidos

4.1. Espectros de emisión, excitación y absorción	101
4.1.1. Corrección de espectros de emisión y excitación	101
4.1.2. Corrección de espectros de absorción	103
4.1.3. Conversión entre longitud de onda y número de onda	103
4.1.4. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia	104
4.1.5. El tiempo de vida de fluorescencia	106
4.1.6. El quenching de fluorescencia	106
4.2. La Anisotropía de Fluorescencia	108
4.3. Análisis de datos con OriginPro 8.5	110
4.4. Análisis Global y Análisis de Componentes Principales	110
4.4.1. Análisis Global	110
4.4.2. Análisis de Componentes Principales	111
4.5. Análisis de curvas de decaimiento de fluorescencia	113
4.6. Curvas de correlación de fluorescencia	114
4.6.1. La función de autocorrelación	114
4.6.2. Función de correlación para los estudios de agregación de β -amiloide	116
4.6.3. Determinación del radio hidrodinámico de la molécula y del tiempo de difusión esperado para la misma	119
4.6.4. Análisis de curvas de correlación de fluorescencia	120
4.6.5. Filtrado de los datos: Kristine	121



Las técnicas espectroscópicas empleadas actualmente nos suministran una gran cantidad y variedad de datos que hace necesario el uso de técnicas estadísticas y matemáticas que permiten un análisis exhaustivo de los mismos, obteniendo así la mayor información posible.

A continuación describimos las técnicas y los procedimientos empleados para el análisis de los datos obtenidos en esta tesis doctoral.

4.1. Espectros de emisión, excitación y absorción

Las series de espectros de emisión, excitación y absorción se obtienen determinando la variación de la emisión de fluorescencia o de la absorbancia, respectivamente, con la longitud de onda, en función de una variable externa (concentración del receptor, pH, etc.). Los resultados obtenidos pueden estar influenciados por posibles artefactos, derivados del equipo empleado, o por las propiedades ópticas de la muestra, como la turbidez o la fluorescencia del propio disolvente. Estos factores pueden distorsionar los datos experimentales, lo que hace necesario un pretratamiento de los resultados (*corrección* de los mismos) para obtener unos espectros que se correspondan con el espectro ideal de la muestra. Se detalla a continuación el tratamiento que se aplica a los distintos datos experimentales con el fin de obtener los espectros corregidos correspondientes a las muestras medidas.

4.1.1. Corrección de espectros de emisión y excitación

De forma experimental, se obtienen espectros de fluorescencia que presentan una dependencia de las características del aparato de medida empleado. Concretamente, están influenciados por las propiedades espectrales de los monocromadores de excitación y emisión, por la distribución energética que presenta la fuente de excitación y por la sensibilidad del fotomultiplicador en función de la longitud de onda. Todo esto lleva a que la forma de los espectros se vea distorsionada, denominándose por tanto *espectros aparentes o no corregidos*.

Para los análisis cuantitativos comparativos en los que sólo interesan los valores relativos de la intensidad de fluorescencia a una determinada longitud de onda, los espectros no corregidos son perfectamente válidos. Sin embargo, en análisis concretos puede ser muy importante la forma del espectro, como es el caso de la determinación de los rendimientos cuánticos, siendo necesario realizar la corrección del mismo para obtener el espectro ideal de la muestra.

A continuación se detallan las correcciones que se aplican a los espectros de excitación y emisión de fluorescencia, dependientes de cada equipo de medida.

La corrección debida a la *desviación de la linealidad del detector* se debe a que, tras el registro de cada fotón, el detector presenta un “tiempo muerto” breve durante el cual no detecta los fotones que recibe, disminuyendo la sensibilidad de detección. Esta corrección es muy importante cuando la intensidad de fluorescencia es alta, ya que llegan más fotones durante este tiempo muerto y el detector registra una intensidad significativamente menor a la real. La intensidad de fluorescencia corregida por la no linealidad del detector, $F_{C1}(\lambda)$, viene dada por la ecuación (4.1), donde $F_{exp}(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia experimental, en cuentas por segundo, t_d es el tiempo muerto de detección, determinado para el fotomultiplicador del equipo, y T es el tiempo de integración, el cual generalmente se fija a 1 s (Becker 2012).

$$F_{C1}(\lambda) = \frac{F_{exp}(\lambda)}{1 - F_{exp}(\lambda)t_d / T} \quad (4.1)$$

Otra corrección necesaria es debida a las *fluctuaciones de intensidad de la lámpara de excitación*, que se corrigen registrando simultáneamente la intensidad de la lámpara del equipo, $F_{ref}(\lambda)$, y la de la muestra. Se aplica la ecuación (4.2) a los espectros para corregirlos por este efecto, obteniendo la intensidad de fluorescencia corregida por la no linealidad del detector y por la variación de intensidad de la lámpara simultáneamente, $F_{C2}(\lambda)$. En esta corrección se normaliza la intensidad de la lámpara, $F_{ref}(\lambda)$, por el valor de la *intensidad media* de todos los espectros de la lámpara medidos, $F_{ref}^m(\lambda)$, de forma que la intensidad corregida se mantenga en el mismo orden de valores que la intensidad no corregida. Esto es importante para una ponderación correcta en el ajuste no-lineal.

Finalmente, para poder comparar los espectros de fluorescencia obtenidos en nuestro equipo con los medidos en otros y para realizar adecuadamente la determinación de los rendimientos cuánticos, se corrigen los espectros de emisión por la *diferente sensibilidad del sistema de detección con la longitud de onda*. Para esto, se determinaron unos factores de corrección que se aplican obteniendo el espectro final corregido. En el caso de las medidas realizadas con polarizadores, esta corrección no pudo ser aplicada, ya que se carece de los factores de corrección necesarios, que deben de obtenerse de forma individual para las componentes vertical y horizontal del espectro. De todas formas, debe indicarse que esta corrección no afecta a los valores de anisotropía de los sistemas.

Para poder realizar las correcciones de los espectros citadas, previamente se determinaron parámetros (como el tiempo muerto) y los factores de corrección correspondientes a nuestro equipo de medida, consistiendo el procedimiento en medir las dependencias antes citadas para unas sustancias estándar y compararlas con los espectros ya conocidos de las mismas.

A parte de las correcciones citadas, relacionadas con el equipo de medida, en algunos de los sistemas estudiados en este trabajo se aplicaron también correcciones como la eliminación de la contribución del disolvente, restando a los espectros medidos el espectro correspondiente al disolvente determinado bajo las mismas condiciones que la muestra. Se trata así de eliminar las intensas bandas Raman presentes en muestras de baja intensidad de fluorescencia. Esta corrección se realizó concretamente en los estudios con β -amiloide y BSA, ya que se emplean fluoróforos de bajo rendimiento cuántico. De la misma forma, en los estudios con estos sistemas también se sustrajo la contribución de la autofluorescencia propia de las proteínas, con el fin de obtener los espectros correspondientes a la interacción entre la proteína y el fluoróforo. Se comprobó que las ecuaciones de ajuste empleadas para estos sistemas, tanto corregidos como sin corregir por la contribución de la proteína, presentan la misma forma y la misma constante K , con la única diferencia de que los valores límites alcanzados son diferentes (ver ecuaciones en el Apéndice).

4.1.2. Corrección de espectros de absorción

La corrección de los espectros de absorción se debe a que la realización de las medidas puede ir acompañada de errores debidos a problemas en la línea base determinada por el equipo, ya que esta puede no ser suficientemente estable.

Al realizar una titración, cuando la sustancia ya no absorbe los distintos espectros que se obtienen deben coincidir, es decir, tener la misma absorbancia (prácticamente cero). Esto no siempre ocurre, debido a la inestabilidad de la línea base, por lo que deben ser corregidos. Se realiza, por tanto, una media de las absorbancias de los distintos espectros desde que estos ya se estabilizan, es decir, cuando dejan de absorber. La media de estos valores se resta a todas las medidas obtenidas a las distintas longitudes de onda, obteniendo así los espectros de absorción corregidos.

4.1.3. Conversión entre longitud de onda y número de onda

El espectro de emisión puede presentarse en una escala de longitud de onda (λ) o de número de onda ($\bar{\nu}$). La unidad habitual de longitud de onda es el nm, mientras que el número de onda se expresa en cm^{-1} . Estos dos parámetros pueden relacionarse fácilmente mediante la ecuación (4.3) (Lakowicz 2006).

$$\lambda = 1/\bar{\nu} \quad (4.3)$$

La escala en número de onda es proporcional a la energía de la radiación representada, por lo que muchos resultados finales se expresan en ésta. Sin embargo, los equipos de medida generalmente utilizan la longitud de onda en la determinación de los espectros.

A la hora de convertir la escala en longitud de onda en número de onda sólo es necesario realizar el inverso del otro parámetro, teniendo en cuenta las unidades. Sin embargo, debe de considerarse el efecto de esta conversión de escala sobre la forma del espectro representado. En la práctica la intensidad de emisión a una determinada longitud de onda se registra en un intervalo finito de longitudes de onda, el llamado ancho de banda. La intensidad registrada depende del ancho de banda, que se mantiene normalmente constante. Sin embargo, el ancho de banda de un espectro registrado en una escala de números de onda no es constante cuando la escala del espectro se convierte en longitud de onda, y viceversa. Este efecto debe tenerse en cuenta durante la conversión.

Para determinar la corrección necesaria se considera un intervalo del espectro (ancho de banda) definido como $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$, donde λ_1 y λ_2 son las longitudes de onda que definen un intervalo pequeño alrededor de la una longitud de onda central λ .

Cambiando la escala a número de onda observamos que si la longitud de onda aumenta la diferencia en número de onda, $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_2 - \bar{\nu}_1 = 1/\lambda_2 - 1/\lambda_1$, disminuye con el cuadrado de la longitud de onda λ (ecuación (4.4)).

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_2 - \bar{\nu}_1 = \frac{1}{\lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1} = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_1\lambda_2} \approx \frac{\Delta\lambda}{\lambda^2} \quad (4.4)$$

Por tanto, si el espectro se obtiene en términos de intensidad de fluorescencia por longitud de onda, cuando se hace la conversión a número de onda se requiere que también la intensidad sea convertida multiplicando por λ^2 (ecuación (4.5)).

$$F(\bar{\nu}) = F(\lambda) \cdot \lambda^2 \quad (4.5)$$

Esta conversión resulta en un aumento selectivo de la emisión a mayores longitudes de onda, por lo que hay un desplazamiento en el máximo de emisión aparente.

Esto no ocurre en los espectros de absorción, donde el paso a número de onda se realiza sólo convirtiendo la escala de longitud de onda, ya que la absorbancia se define como el logaritmo de la transmitancia, es decir, la radiación incidente en la muestra entre la absorbida, y esta relación no depende del ancho de banda de la medida.

4.1.4. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos y se puede calcular de la relación entre las constantes de velocidad de desactivación radiante (k_r) y la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos de desactivación, radiantes (k_r) y no radiantes (k_{nr}) (ecuación (4.6), Figura 4.1).

$$\Phi = \frac{\text{Número de fotones emitidos}}{\text{Número de fotones absorbidos}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (4.6)$$

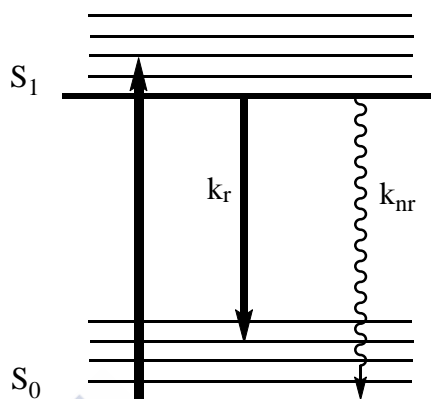


Figura 4.1. Procesos de absorción de luz y de desactivación radiante y no radiante.

El rendimiento cuántico respecto a una sustancia de referencia se puede calcular según la ecuación (4.7), a partir de los espectros de absorción y los espectros de emisión corregidos de disoluciones diluidas:

$$\Phi_x = \Phi_r \frac{A_r^{\lambda_r} I^{\lambda_r} n_x^2 D_x}{A_x^{\lambda_x} I^{\lambda_x} n_r^2 D_r} \quad (4.7)$$

Donde:

Φ : rendimiento cuántico de fluorescencia.

x : sustancia de rendimiento cuántico desconocido.

r : sustancia de referencia de rendimiento cuántico conocido.

A^λ : absorbancia de la disolución a la longitud de onda de excitación λ .

I^λ : intensidad relativa de la luz excitatriz a la longitud de onda de excitación λ .

n : índice de refracción.

D : área integrada bajo el espectro de emisión corregido por la diferente sensibilidad del sistema de detección a las distintas longitudes de onda de emisión.

En cuanto a la intensidad de la luz, I^λ , este valor no se va a necesitar porque se utiliza la misma longitud de onda de excitación para la referencia y para la muestra y, por tanto, el propio instrumento de medición corrige las variaciones de intensidad, ya que divide los espectros por la intensidad de radiación que emite la lámpara, que varía de unas medidas a otras. La ecuación queda entonces como se observa a continuación (ecuación (4.8)).

$$\Phi_x = \Phi_r \frac{A_r^\lambda n_x^2 D_x}{A_x^\lambda n_r^2 D_r} \quad (4.8)$$

El rendimiento cuántico disminuye con el aumento de la temperatura, ya que contribuye al aumento de las colisiones entre moléculas y, por tanto, a la desactivación no radiante.

4.1.5. El tiempo de vida de fluorescencia

Otro parámetro importante que sirve para caracterizar un fluoróforo es el tiempo de vida medio del estado singlete excitado. Éste es el tiempo en el que la intensidad de fluorescencia se reduce a $1/e$ del valor inicial, es decir, el tiempo medio que una molécula permanece en el estado excitado antes de volver al fundamental. La forma más habitual de designar el tiempo de vida de fluorescencia del fluoróforo es τ (ecuación (4.9)).

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{\Phi}{k_r} \quad (4.9)$$

El tiempo de vida que proporciona esta ecuación es distinto del llamado tiempo de vida de fluorescencia radiante, τ_F , que solo tiene en cuenta los procesos de desactivación radiante (ecuación (4.10)).

$$\tau_F = \frac{1}{k_r} \quad (4.10)$$

Tanto el rendimiento cuántico como el tiempo de vida pueden proporcionar información detallada sobre el microentorno del fluoróforo, ya que todos los mecanismos de desactivación que compiten con la fluorescencia están muy influenciados por el medio circundante.

4.1.6. El quenching de fluorescencia

Quenching o *extinción de fluorescencia* es cualquier proceso que provoca la disminución de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo. Se distinguen varios tipos:

- *Quenching colisional o dinámico*: es aquel debido a colisiones entre el fluoróforo y otra especie química, denominada *quencher*.
- *Quenching estático*: es el debido a la formación de complejos entre esas especies.

El *quenching* dinámico implica la difusión del *quencher* hasta el fluoróforo en el tiempo de vida del estado excitado, la colisión entre las dos especies y la desactivación del fluoróforo al estado fundamental sin emisión. Este tipo de desactivación se explica mediante la ecuación de *Stern-Volmer* (ecuación (4.11)).

$$F_0 / F = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (4.11)$$

siendo F_0 la intensidad de fluorescencia en ausencia de *quencher*, F la intensidad de fluorescencia en presencia de *quencher*, k_q la constante de *quenching* bimolecular, τ_0 el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia de *quencher* y $[Q]$ la concentración de esta especie.

Cuando el fluoróforo sufre los dos tipos de *quenching*, dinámico y estático, las gráficas de Stern-Volmer presentan desviaciones positivas, cumpliéndose la ecuación (4.12).

$$F_0 / F = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q]) \quad (4.12)$$

K_D es la constante de *quenching* dinámico y K_S la constante de *quenching* estático.



4.2. La Anisotropía de Fluorescencia

La *Anisotropía de Fluorescencia* es una técnica que permite determinar nueva información para la caracterización de un fluoróforo con respecto a la que ofrecen las técnicas anteriormente descritas. La anisotropía es una propiedad que nos indica la capacidad de *rotación* de las moléculas en el medio en el que se encuentran. Su valor depende de la movilidad del fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado, así como de ciertas propiedades estructurales de la molécula. En general, cuando una molécula se encuentra en disolución puede rotar libremente, por lo que presentará una anisotropía baja, mientras que cuando está asociada a otra molécula o agregado de mayor tamaño experimenta un cierto impedimento para la rotación, aumentando su anisotropía. Estas medidas dan información del tamaño y la forma de las moléculas o de la rigidez del medio en que se encuentra.

Las medidas de anisotropía se realizan con luz polarizada, es decir, cuyos fotones presentan vectores de campo eléctrico alineados bajo la misma dirección. En la Figura 4.2 se muestra un diagrama de la realización de dichas medidas.

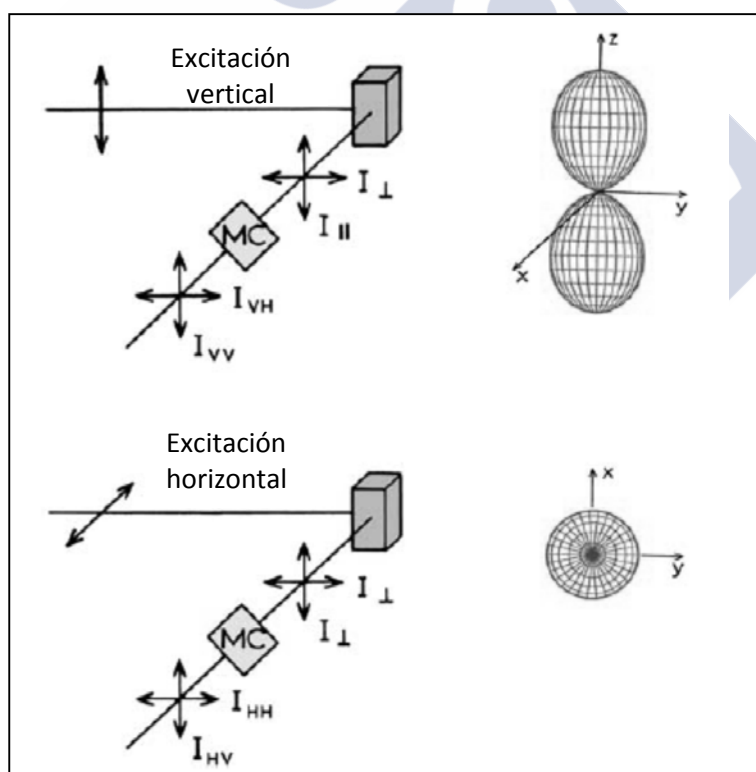


Figura 4.2. Diagrama esquemático de las medidas de anisotropía en los diferentes planos (Lakowicz 2006). MC: monocromador.

La anisotropía de fluorescencia (r) se define según la ecuación (4.13) (Lakowicz 2006).

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4.13)$$

Donde I_{\parallel} y I_{\perp} son las intensidades de fluorescencia de la emisión polarizada verticalmente (\parallel) y horizontalmente (\perp), cuando la muestra se excita con luz polarizada verticalmente.

La anisotropía es adimensional, ya que se normaliza la diferencia ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) por la intensidad total, que se define como $I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$. En ausencia de artefactos, esta propiedad es independiente de la concentración de fluoróforo. El valor máximo de anisotropía se asume como $r = 0.4$, correspondiente a un sistema rígido.

Para medir anisotropía de fluorescencia se utiliza luz polarizada tanto en el plano horizontal como en el vertical, por lo que hay que introducir un factor de corrección, G , que da cuenta de la diferente eficiencia del sistema de detección a los diferentes componentes de polarización de la emisión. El valor de G es fácilmente calculable a partir de las medidas de fluorescencia con excitación polarizada horizontalmente y se introduce en la ecuación (4.13) para el cálculo de la anisotropía, renombrando las intensidades como se indica a continuación (ecuaciones (4.14) y (4.15)):

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (4.14)$$

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \quad (4.15)$$

Donde I_{HV} es la intensidad de fluorescencia excitando en el plano horizontal y emitiendo en el plano vertical; I_{HH} es la intensidad de fluorescencia excitando y emitiendo en el plano horizontal; I_{VV} es la intensidad de fluorescencia excitando y emitiendo en el plano vertical y I_{VH} es la intensidad de fluorescencia excitando en el plano vertical y emitiendo en el plano horizontal.

La anisotropía presenta la ventaja de no depender de factores instrumentales, por lo que su determinación puede reproducirse en cualquier instrumento de medida sin depender de las características del mismo, de la concentración del fluoróforo, etc. A pesar de esta ventaja, debe de tenerse en cuenta que la anisotropía es muy sensible a los efectos de dispersión de luz como la banda Raman, que está totalmente polarizada, por lo que su determinación a longitudes de onda cercanas a esta banda pueden verse influenciadas por la misma.

4.3. Análisis de datos con OriginPro 8.5

Para el tratamiento inicial de los datos se utiliza el programa *OriginPro 8.5* de *OriginLab Corporation*. Los datos se importan desde el software de control de los aparatos de medida.

Este programa permite el tratamiento de series de datos individuales y el análisis global de varias curvas simultáneamente, pudiendo realizar una amplia variedad de representaciones gráficas y ajustes lineales y no lineales. Permite también definir las funciones de ajuste necesarias para tratar los datos, con un número de constantes limitado sólo por la correlación existente a la hora del ajuste. Se puede trabajar con más de una variable independiente.

Generalmente, a continuación se realiza un análisis más completo de los datos aplicando el programa de *Análisis Global* y *Análisis de Componentes Principales*.

4.4. Análisis Global y Análisis de Componentes Principales

4.4.1. Análisis Global

El Análisis Global (*Global Analysis, GA*) consiste en el ajuste de una función teórica (basada en un modelo) a la serie completa de datos experimentales obtenidos cambiando una variable externa (pH o concentración de fluoróforo, entre otras) de modo que los parámetros que no dependen de la variable externa se mantienen comunes a todos los espectros (parámetros globales). De esta forma su valor está mejor definido pues la posible correlación estadística entre parámetros ajustables se reduce significativamente.

Este tipo de análisis también se puede realizar en el programa *OriginPro 8.5* en el que, basándonos asimismo en un modelo, se ajustan los datos obtenidos a varias longitudes de onda para determinar unos parámetros. Pero en este caso es muy poco práctico ajustar series espectrales completas. Por tanto, este análisis ha sido programado en nuestro grupo de investigación para el tratamiento de las titulaciones de absorción, excitación y emisión (Al-Soufi 2001), para ajustar decaimientos de fluorescencia medidos a diferentes longitudes de onda de emisión (Reija 2003) y también para el ajuste global de curvas de correlación de fluorescencia (Granadero Rey 2006).

En este trabajo, mediante el uso del GA con las ecuaciones de ajuste para cada sistema, se determinó la constante de equilibrio de los mismos. En nuestro grupo de investigación se concluyó que el error obtenido de este ajuste para la constante K se reduce al aumentar el número de longitudes de onda (n) analizadas en un factor aproximadamente igual a la raíz cuadrada de n . En base a esto, una vez determinado el error de la constante de asociación a

través del GA, se determina un valor más real para el mismo multiplicándolo por \sqrt{n} , de forma que se tenga en cuenta la variación indicada (López Hortas 2006).

Generalmente, este tipo de ajustes se aplica a todo el espectro de forma combinada con un *Análisis de Componentes Principales*, mediante la utilización del programa *PCGA (Principal Component Global Analysis)* (Al-Soufi 2001, Al-Soufi 2011).

4.4.2. Análisis de Componentes Principales

El PCGA se basa en el Análisis de Componentes Principales (*Principal Component Analysis, PCA*), que es un método estadístico no solamente aplicable al campo de la química sino también a muchos otros campos experimentales cuando se requiere tratar matrices de datos de grandes dimensiones. Es de gran utilidad, por ejemplo, en estudios de Ingeniería Ambiental, donde se usa este método en estudios de biodiversidad.

Este método permite, ante series de datos con muchas variables, reducirlas a un número inferior, perdiendo la menor cantidad de información posible.

Aplicado a datos espectroscópicos, permite obtener el número mínimo de *espectros abstractos* (sin significado físico) que son capaces, mediante combinaciones lineales, de reproducir los espectros originales (Al-Soufi 2001, Al-Soufi 2011). La descripción matemática del PCA puede hacerse en su totalidad en base al Álgebra Lineal. Se describirán sólo unas características básicas del funcionamiento de este programa, debido a su complejidad.

Los datos experimentales van a conformar una matriz Y , de tamaño $(n_s \times n_w)$, donde las filas representan cada uno de los n_s espectros medidos, y las columnas las distintas n_w longitudes de onda (ecuación (4.16)).

$$Y_{n_s \times n_w} = \begin{pmatrix} y_{1,1} & y_{1,2} & \cdots & \cdots & y_{1,n_w} \\ y_{2,1} & y_{2,2} & \cdots & \cdots & y_{2,n_w} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ y_{n_s,1} & y_{n_s,2} & \cdots & \cdots & y_{n_s,n_w} \end{pmatrix} \quad (4.16)$$

La idea general es obtener el rango de esta matriz, por filas, es decir, el número mínimo de filas independientes que reproducen la matriz. Se tendrá en cuenta que los datos están afectados por el error experimental.

Los espectros medidos deben de poder representarse como combinación lineal de un número de espectros fijos, llamados *espectros puros*, que se corresponde con el número de componentes de la mezcla. El cambio de una variable externa, como la concentración del receptor, sólo debe afectar a la contribución de cada uno de estos espectros, es decir, a la concentración de dichos componentes, y no debe cambiar los espectros puros.

La mayoría de los procedimientos propuestos para distinguir los componentes que reproducen variaciones sistemáticas en los datos (*componentes estructurales*) y los que reproducen el ruido presente en los datos experimentales (*componentes residuales*) consisten en el análisis estadístico de los mismos. Existen muchos criterios estadísticos que se pueden aplicar para esta distinción (Kotz 1982, Bevington 2003), pero la mayoría no son válidos para los datos espectroscópicos. En el análisis de los datos de este trabajo se combina el uso de gráficos de autovectores, autovalores, de los valores del error medio residual y del valor del test estadístico de Durbin-Watson con el análisis visual de los residuos calculados con un número creciente de componentes incluidos (Al-Soufi 2011, Reija Otero 2007).

Diagrama de autovectores: se representan los primeros autovectores frente a la longitud de onda, la concentración del receptor o el tiempo, lo que permite ver cuál es el número de autovectores sistemáticos que indican el número mínimo de componentes presentes en la muestra.

Diagrama logarítmico de autovalores: Los autovalores son una medida de la varianza de los correspondientes componentes principales abstractos, por lo que su valor relativo indica el número de componentes principales que tienen una varianza significativamente diferente del ruido experimental. En principio, y en ausencia de ruido, los autovalores tomarían el valor de cero, pero por causa del ruido experimental siempre va a estar presente un pequeño cambio que necesitará de autovalores para ser explicado. El gráfico de los autovalores frente al número del autovalor muestra que los últimos autovalores tienen un valor prácticamente constante correspondiente a los componentes principales residuales que reproducen el ruido aleatorio espectral. El número de componentes principales con un autovalor por encima de este nivel de varianza corresponde al límite superior del número de componentes estructurales.

Diagrama de los errores medios residuales: este tipo de diagrama logarítmico refleja el error medio residual, que es una estimación de la desviación estándar entre los espectros experimentales y los teóricos incluyendo un número de componentes principales determinado. El error medio residual depende del número de componentes principales incluidos en los espectros teóricos y debería alcanzar un valor constante una vez que se han explicado la variación sistemática.

Gráfica de los valores del test de Durbin-Watson: representa el valor del parámetro Durbin-Watson para un número creciente de componentes incluidos. Una vez que el error sistemático de los espectros experimentales es reproducido por los primeros componentes principales, los residuos entre los espectros teóricos y los experimentales deberían mostrar sólo ruido, es decir, variaciones aleatorias sin correlación.

Análisis visual de los residuos: estos test citados determinan el número de componentes principales como el número que reproduce las variaciones mayores que las causadas por el ruido, por lo que solo determinan el número mínimo de componentes estructurales. Sin embargo, realizando un análisis visual de los residuos para un número creciente de componentes se puede obtener el número de componentes presente en la muestra.

Por tanto, con el análisis de PCA podemos estimar cuántas especies químicas diferentes son responsables de los cambios observados. Se debe aclarar que la determinación de estos componentes no indica que el número total de especies químicas sea el obtenido, ya que puede haber otras moléculas que no absorben o emiten fluorescencia en las condiciones de medida y que no se están determinando o que dos o más especies químicas dependen de la misma forma del parámetro externo y que por tanto aparecen como una sola especie en el PCA.

4.5. Análisis de curvas de decaimiento de fluorescencia

Este tipo de análisis se aplica a las medidas de fluorescencia con resolución temporal que dan lugar a curvas de decaimiento de fluorescencia, que se analizan con el fin de determinar el tiempo de vida de las especies fluorescentes presentes en la muestra.

El software de análisis empleado es el suministrado por *Edinburgh Analytical Instruments*, que analiza decaimientos individuales mediante el algoritmo de *Levenberg-Marquardt*, que permite ajustar un modelo de como máximo cuatro exponenciales a un decaimiento experimental, aplicando una deconvolución con el pulso de excitación. Es posible fijar valores de tiempos de vida conocidos para unas especies con el fin de determinar los restantes. Como indicativo de la calidad del ajuste realizado se emplea la representación gráfica de los residuos y el parámetro χ^2 .

El decaimiento de la intensidad de fluorescencia (I) sigue una cinética de primer orden, con lo que la ecuación tiene forma monoexponencial correspondiente a la ecuación (4.17).

$$I = I_0 e^{-kt} \quad (4.17)$$

De existir más de un fluoróforo en disolución, el decaimiento total puede expresarse como la suma de decaimientos monoexponenciales de las distintas especies (ecuación (4.18)).

$$I = \sum_i (B_i e^{-k_i t}) \quad (4.18)$$

Así, en el caso de que existan dos especies fluorescentes, el ajuste sería biexponencial y daría lugar a la determinación de dos tiempos de vida, $\tau_1 = (k_1)^{-1}$ y $\tau_2 = (k_2)^{-1}$, correspondiente con el modelo que se indica en la ecuación (4.19).

$$I(t) = B_1 e^{t/\tau_1} + B_2 e^{t/\tau_2} \quad (4.19)$$

Siendo B_1 y B_2 las amplitudes correspondiente a cada tiempo de vida, es decir, lo que contribuye cada especie fluorescente a la fluorescencia total. Del ajuste también se obtiene el parámetro *shift*, definido como el desplazamiento temporal de los decaimientos con respecto al pulso de la lámpara.

Para determinadas series se llevaron a cabo ajustes globales de los decaimientos de fluorescencia de forma simultánea, mediante la programación en Matlab® del análisis global para estas series de datos, realizado en nuestro grupo de investigación (Reija 2003). Por tanto, se pueden analizar los decaimientos de fluorescencia obtenidos a una longitud de onda de emisión fija para disoluciones con distintas concentraciones del receptor.

4.6. Curvas de correlación de fluorescencia

4.6.1. La función de autocorrelación

La herramienta matemática que nos permite obtener datos de interés acerca de una determinada muestra a partir de fluctuaciones temporales de la intensidad de fluorescencia registradas es la *autocorrelación* de esas variaciones a distintos tiempos.

El método de correlación analiza la intensidad de fluorescencia medida, $F(t)$, correlacionando las fluctuaciones alrededor del valor medio de fluorescencia, $\langle F(t) \rangle$, en un período finito de tiempo. La *función de autocorrelación* relaciona la intensidad de fluorescencia $F(t)$ a tiempo t con la intensidad de fluorescencia $F(t + \tau)$ a tiempo $t + \tau$, es decir, con una separación temporal τ , denominada tiempo de correlación. En la Figura 4.3, a la izquierda se muestran las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia alrededor del valor medio, de forma que a partir de ésta se obtiene la *curva de autocorrelación*, representada a la derecha.

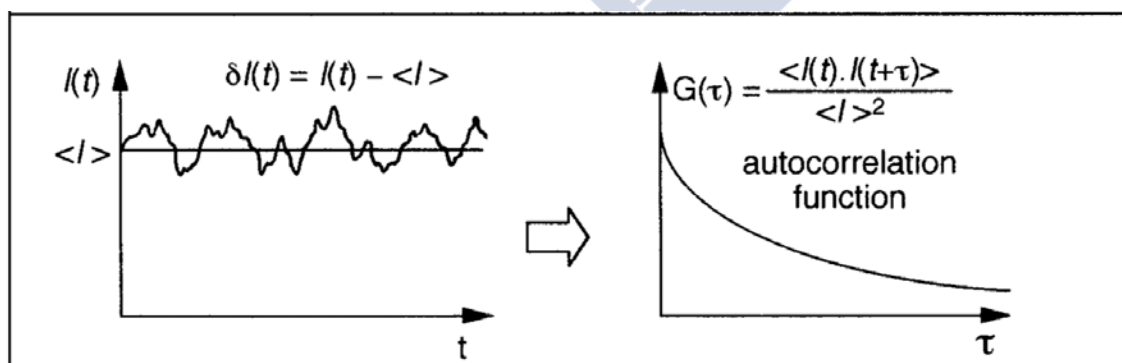


Figura 4.3. Representación esquemática de la obtención de la curva de autocorrelación a partir de la intensidad de fluorescencia (Valeur 2002).

La función de autocorrelación nos da la probabilidad de detectar un fotón a tiempo $t + \tau$ si se detectó un fotón a tiempo t .

Matemáticamente, la función de autocorrelación normalizada puede escribirse según la ecuación (4.20).

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (4.20)$$

Donde $\langle \rangle$ indica promedio temporal y la fluctuación de la señal de fluorescencia δF es la diferencia entre la intensidad de fluorescencia actual y la media: $\delta F = F(t) - \langle F(t) \rangle$. La función de autocorrelación decae con el tiempo de correlación τ dado que las fluctuaciones son menos correlacionadas al aumentar la separación temporal, es decir, cuanto mayor tiempo transcurre desde que una molécula emite un fotón menor será la probabilidad de que emita un nuevo fotón debido a las causas anteriormente explicadas en la sección 2.3.1. (tripleto, difusión, etc.).

A continuación se exponen los modelos teóricos propuestos para cada parte de la curva de autocorrelación (véase Figura 2.39, sección 2.3.1.) a los que se ajustarán los datos correlacionados con el fin de obtener los parámetros de interés del sistema bajo estudio.

Si las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia se deben sólo a la difusión traslacional, la parte dependiente del tiempo de la función de correlación viene dada por la ecuación (4.21) (Elson 1974, Rigler 1993, Krichevsky 2002, Al-Soufi 2005).

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (4.21)$$

En esta expresión se ha asumido que la fluorescencia detectada sigue una distribución Gaussiana en las tres dimensiones. N representa el número medio de moléculas fluorescentes en el elemento de volumen, τ_D es el tiempo de difusión traslacional de las moléculas y w_{xy} y w_z los radios del foco en dirección xy y z , siendo $w = w_z / w_{xy}$ el factor de geometría en el volumen de detección. Se observa que el valor de G_D a $\tau = 0$ muestra el inverso del número de moléculas fluorescentes ($G_D(0) = 1 / N$).

El volumen de detección (V) se determina mediante la ecuación (4.22) como el volumen del elipsoide de radio w_{xy} y altura w_z , que están relacionados a través del factor de geometría $w = w_z / w_{xy}$ que se obtiene en el ajuste de la ecuación (4.21) a la curva de correlación experimental del fluoróforo de referencia (véase sección 3.1.3).

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot w_{xy}^3 \cdot w \quad (4.22)$$

El coeficiente de difusión D se relaciona con el tiempo τ_D y el radio del foco w_{xy} según la siguiente expresión (ecuación (4.23)) (Valeur 2002).

$$D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (4.23)$$

En el extremo rápido de la curva de FCS la velocidad con que dos fotones sucesivos de la misma molécula pueden detectarse está limitada por las velocidades de excitación y emisión de fluorescencia. Este tiempo mínimo entre dos fotones introduce el término de antibunching en la función de correlación, $G_F(\tau)$, con un tiempo de subida característico $\tau_F = (k_{01} + k_{10})^{-1}$, determinado por la inversa de la suma de la constante de velocidad de excitación k_{01} y de decaimiento k_{10} , con una amplitud A_F (Kask 1985, Mets 2001). Bajo las condiciones de irradiancia utilizadas en este trabajo siempre se cumple que $k_{01} < k_{10}$ y el tiempo de antibunching viene definido por el tiempo de vida de fluorescencia de la molécula.

$$G_F(\tau) = (1 - A_F e^{-\tau/\tau_F}), \quad A_F = 1 \quad (4.24)$$

Por último, la población del estado triplete conlleva un término adicional (ecuación (4.25)).

$$G_T(\tau) = (1 + A_T e^{-\tau/\tau_T}) \quad (4.25)$$

$$A_T = \frac{T}{1 - T}$$

Donde τ_T es el tiempo de vida del triplete y la amplitud A_T está relacionada con la fracción de moléculas en el triplete T .

Finalmente, cumpliéndose la condición $\tau_D \gg \tau_T \gg \tau_F$, la función de correlación completa vendrá determinada por el producto de las tres funciones individuales, (4.21), (4.24) y (4.25) (Al-Soufi 2005).

$$G(\tau) = G_F G_T G_D \quad (4.26)$$

4.6.2. Función de correlación para los estudios de agregación de β -amiloide

Para estudiar la agregación de los β -amiloide en FCS se utiliza un péptido marcado que forma parte del sistema al agregarse, lo que permite ver la emisión de fluorescencia del mismo. En este tipo de sistemas sólo se tiene en cuenta el término de difusión traslacional y el del triplete. Por tanto, cuando no se ha iniciado la agregación, la función a utilizar se corresponderá con $G(\tau) = G_T G_D$, es decir, sólo el término del triplete y el de difusión correspondiente al fluoróforo marcado (ecuación (4.27)).

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} (1 + A_T e^{-\tau/\tau_T}) \quad (4.27)$$

Cuando se inicia la agregación aparecen distintos tipos de agregados, cada uno correspondiente a un nuevo término difusional y, por tanto, un nuevo tiempo de difusión. De forma general, se establece un modelo con dos tiempos de difusión, uno correspondiente al amiloide marcado libre y otro correspondiente al agregado (que estrictamente es un valor promedio de los distintos agregados presentes, con un valor de N promedio) y también un término de triplete. En este último caso, la función de correlación viene dada por las ecuaciones (4.28) y (4.29), donde en el término difusional aparece el parámetro r , que indica la proporción que equivale al tiempo de difusión 1, siendo $(1-r)$ la correspondiente al tiempo de difusión 2.

$$G(\tau) = \frac{1}{N}(rG_{D_1} + (1-r)G_{D_2})G_T \quad (4.28)$$

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[r \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_1}}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_1}}\right)^{-\frac{1}{2}} \right] + \right. \\ \left. + (1-r) \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_2}}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_2}}\right)^{-\frac{1}{2}} \right] \right] (1 + A_T e^{-\tau/\tau_T}) \quad (4.29)$$

Al analizar los resultados de agregación de β -amiloide obtenidos mediante el uso de esta técnica se comprobó que para un buen ajuste de los datos se deben incluir dos términos de triplete, además de los términos difusionales correspondientes. Como se indicará en el Capítulo 7, un término de triplete presenta un valor muy bajo, prácticamente despreciable y que no es significativo. Con el análisis de los datos se atribuyó el mismo a un artefacto instrumental, mientras que el segundo tiempo de triplete sí es correspondiente al sistema estudiado. Por tanto, todos los ajustes se realizan empleando estos dos tiempos, aunque sólo se prestará atención al valor correspondiente al triplete del β -amiloide marcado. Las ecuaciones (4.27) y (4.29) se amplían así incluyendo un segundo término de triplete, dando lugar a las ecuaciones (4.30) y (4.31), con uno y dos términos de difusión respectivamente.

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} (1 + A_{T_1} e^{-\tau/\tau_{T_1}})(1 + A_{T_2} e^{-\tau/\tau_{T_2}}) \quad (4.30)$$

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[r \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_1}}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_1}}\right)^{-\frac{1}{2}} \right] + \right. \\ \left. + (1-r) \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_2}}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_2}}\right)^{-\frac{1}{2}} \right] \right] (1 + A_{T_1} e^{-\tau/\tau_{T_1}})(1 + A_{T_2} e^{-\tau/\tau_{T_2}}) \quad (4.31)$$

Como se ha indicado anteriormente, el modelo que se emplea para el estudio de la agregación de los amiloides presenta dos especies fluorescentes: el amiloide marcado (1) y los agregados peptídicos formados (2). Estos agregados incluyen amiloide marcado fluorescentemente y amiloide sin marcar, por lo que su luminosidad depende de la carga de amiloide marcado que dispongan. Es posible describir el sistema anterior en función del número de moléculas correspondientes a cada especie fluorescente, siguiendo un modelo para la presencia de dos especies fluorescentes en FCS (Bordello Malde 2013). Este modelo indica que la función de correlación para dos especies viene dada por la curva de correlación de las especies individuales ponderada por el cuadrado de la contribución de cada especie a la intensidad de fluorescencia total. Siguiendo este modelo, la intensidad de fluorescencia media $N_i Q_i$ para cada especie viene dada por el número medio de moléculas en el volumen de detección N_i y por la luminosidad de cada especie Q_i , definida como el producto del coeficiente de extinción, ε_i , rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_i , y la eficiencia de detección, g_i .

$$G_D = \left(\frac{Q_1 N_1}{Q_1 N_1 + Q_2 N_2} \right)^2 \frac{1}{N_1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_1}} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_1}} \right)^{-\frac{1}{2}} + \left(\frac{Q_2 N_2}{Q_1 N_1 + Q_2 N_2} \right)^2 \frac{1}{N_2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_2}} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_2}} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (4.32)$$

Esta expresión puede convertirse en la siguiente:

$$G_D = \frac{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2}{(Q_1 N_1 + Q_2 N_2)^2} \left[\frac{Q_1^2 N_1}{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_1}} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_1}} \right)^{-\frac{1}{2}} + \frac{Q_2^2 N_2}{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_2}} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_{xy}}{w_z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{D_2}} \right)^{-\frac{1}{2}} \right] \quad (4.33)$$

Observando las ecuaciones (4.32) y (4.33), se establece la definición para el valor promedio de moléculas en el volumen de detección, N y para las contribuciones de cada especie fluorescente al término de difusión global (r y $1-r$).

$$\frac{1}{N} = \frac{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2}{(Q_1 N_1 + Q_2 N_2)^2} \quad (4.34)$$

$$r = \frac{Q_1^2 N_1}{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2} \quad (4.35)$$

$$1-r = \frac{Q_2^2 N_2}{Q_1^2 N_1 + Q_2^2 N_2} \quad (4.36)$$

Finalmente, teniendo en cuenta los fenómenos de fotoblanqueo y saturación óptica definidos en la sección 2.3.2., los sistemas bajo estudio deben analizarse siempre realizando las medidas dentro de la región lineal definida por la gráfica de *cpm* frente a irradiancia. Para esto se debe obtener una *serie de potencia* para el fluoróforo en la que se observe como varía el tiempo de difusión y el *cpm* a distintas potencias de excitación provenientes del láser.

4.6.3. Determinación del radio hidrodinámico de la molécula y del tiempo de difusión esperado para la misma

El coeficiente de difusión D está relacionado con el tamaño de la molécula, que se puede estimar a través del *radio hidrodinámico* (R_h), que representa el radio efectivo de la molécula en la disolución teniendo en cuenta todas las moléculas de disolvente que lleva consigo. Para moléculas de tamaño mucho mayor que las moléculas de disolvente, el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico se relacionan mediante la ecuación de Stokes-Einstein para esferas homogéneas (ecuación (4.37)) (Valeur 2002), siendo k la constante de Boltzmann, T la temperatura de medición, η la viscosidad del disolvente y D el coeficiente de difusión de la molécula, que a su vez está relacionado con el tamaño del foco y el tiempo de difusión de la molécula a través del mismo mediante la ecuación (4.23).

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (4.37)$$

Según la ecuación anterior, el radio hidrodinámico es inversamente proporcional al coeficiente de difusión. Por otra parte, el radio hidrodinámico es proporcional a la masa molecular de la molécula (M) elevada a un factor ν que da cuenta de la conformación de la misma, por lo que el coeficiente de difusión será inversamente proporcional a este valor. Si la molécula presenta la conformación más compacta, que es la esfera, el valor de ν es de $1/3$, mientras que para una molécula tipo varilla su valor es de 1. Como valores intermedios, cabe destacar que si la molécula presenta conformación al azar o de ovillo gaussiano el valor de ν es de 0.5 y si se comporta como un ovillo perturbado (conformación al azar con interacción fuerte con el disolvente) su valor es de 0.6.

A partir de esta relación anterior, se puede establecer la siguiente ecuación, siendo a el factor de proporcionalidad (ecuación (4.38)).

$$D = a M^{-\nu} \quad (4.38)$$

Esta ecuación puede aplicarse para el fluoróforo estudiado(x) y para el fluoróforo de referencia (*ref*) empleado en el ajuste del equipo de FCS (véase sección 3.1.3.), del que se conoce su tiempo de difusión, su coeficiente de difusión y su masa molecular. Así, si se divide la ecuación (4.38) aplicada a estos dos fluoróforos se eliminaría el factor de proporcionalidad y se obtendría la relación indicada en la ecuación (4.39).

$$\frac{D_{ref}}{D_x} = \frac{M_{ref}^{-v_{ref}}}{M_x^{-v_x}} \quad (4.39)$$

Además, a partir de la ecuación (4.23), para un mismo tamaño de foco, se puede relacionar también el coeficiente de difusión de la molécula bajo estudio (x) con su tiempo de difusión y, al mismo tiempo, relacionarlo también con el valor para el fluoróforo empleado como referencia en el ajuste inicial del equipo de FCS (ref). Se obtiene así la ecuación (4.40).

$$D_{ref}\tau_{D_{ref}} = D_x\tau_{D_x} \quad (4.40)$$

Finalmente, uniendo las ecuaciones (4.39) y (4.40) se obtiene una nueva expresión que relaciona los tiempos de difusión de las moléculas anteriores con sus masas moleculares, valores que se pueden determinar más fácilmente. Esto permite estimar con anterioridad, conociendo los parámetros para la molécula de referencia, el *tiempo de difusión esperado* para la molécula bajo estudio. Esta relación se muestra en la ecuación (4.41).

$$\frac{\tau_{D_x}}{\tau_{D_{ref}}} = \frac{D_{ref}}{D_x} = \frac{M_{ref}^{-v_{ref}}}{M_x^{-v_x}} \quad (4.41)$$

4.6.4. Análisis de curvas de correlación de fluorescencia

El equipo de FCS registra los fotones emitidos por la muestra de forma simultánea mediante dos canales de detección independientes pero sincronizados. Se trata de evitar así la limitación temporal impuesta por el tiempo muerto de un solo canal de detección. Para cada fotón que se registra se almacena su tiempo de llegada y el número de canal correspondiente. Al finalizar la medida, se calcula la función de correlación cruzada entre los fotones registrados en los dos canales mediante el software *Becker & Hickl SPCM*. A partir de este momento, ya disponiendo de las curvas de correlación medidas a diferentes concentraciones del receptor, a diferentes tiempos o modificando otro tipo de variable, se procede a analizar los datos y a realizar los análisis individuales y globales de las curvas mediante el uso de OriginPro 8.5, aplicando la función de correlación adecuada (ver sección 4.6.3).

Al realizar un tratamiento global de los datos se trabaja con las curvas de forma independiente pero compartiendo algún parámetro de ajuste. Esta es una herramienta potente que permite obtener valores coherentes para los parámetros y reducir el efecto de la correlación estadística entre ellos, además de minimizar los residuos que se obtienen.

Para una correcta minimización es necesario tener en cuenta los errores en los valores experimentales. En las curvas de correlación obtenidas mediante la aplicación de FCS existe mucha diferencia en el error que presentan los valores de $G(\tau)$ a distintos tiempos de correlación τ debido a que se trabaja con una escala temporal logarítmica. Para considerar

esta diferencia en los errores se aplican en todos los ajustes de las curvas de correlación *factores de ponderación*, dándole así a cada valor de $G(\tau)$ un peso según su error. Los factores de ponderación se obtienen a partir de un polinomio empírico que representa el error típico para cada valor del tiempo de correlación τ .

En ocasiones, debido a la gran sensibilidad de esta técnica, es necesario realizar un pretratamiento de los datos con el fin de eliminar paquetes de fotones que sobresalen de forma muy clara con respecto a los restantes. Estos fotones generalmente son debidos a partículas de polvo o agregados muy grandes presentes en la muestra que al pasar por el foco dan lugar a esta señal. En este trabajo, las medidas realizadas no tienen por objetivo observar estos grandes agregados que pueden presentarse, sino la evolución de la agregación de determinadas moléculas de menor tamaño, por lo que en ocasiones fue necesario realizar un *filtrado previo* para eliminar estos fotones y poder ver más claramente los restantes. Para el proceso de filtrado de datos se empleó el programas *Kristine*, programado en LabVIEW® en el grupo del Prof. Claus A. M. Seidel (Felekyan 2005).

4.6.5. Filtrado de los datos: Kristine

El programa *Kristine* permite realizar el ajuste de las curvas de correlación de fluorescencia de forma global, entre otras aplicaciones, pero en este trabajo se ha empleado principalmente por disponer de una función que permite ver y seleccionar distintos paquetes de fotones, lo que facilita la realización de un filtrado de los mismos para obtener una curva de correlación que no los incluya.

Este mismo programa permite la determinación de la nueva curva una vez filtrados los datos. El software de Becker & Hickl empleado para el cálculo de la curva de forma directa tras la medida genera también los ficheros con los fotones correspondientes, que son los que se importan al programa anterior para realizar el filtrado. Previamente al paso de los datos a *Kristine*, los fotones se agrupan en paquetes de fotones de un tamaño determinado mediante el uso del programa *Merge* de Becker & Hickl.

En la Figura 4.4 se muestra un ejemplo de filtrado de fotones mediante el uso de este programa.

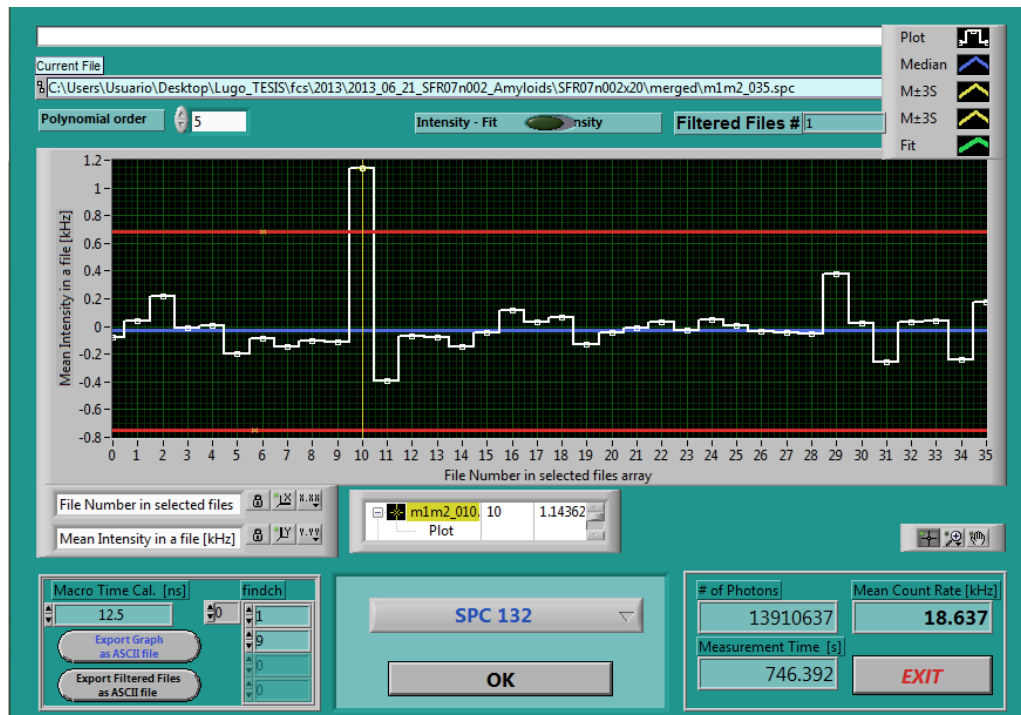
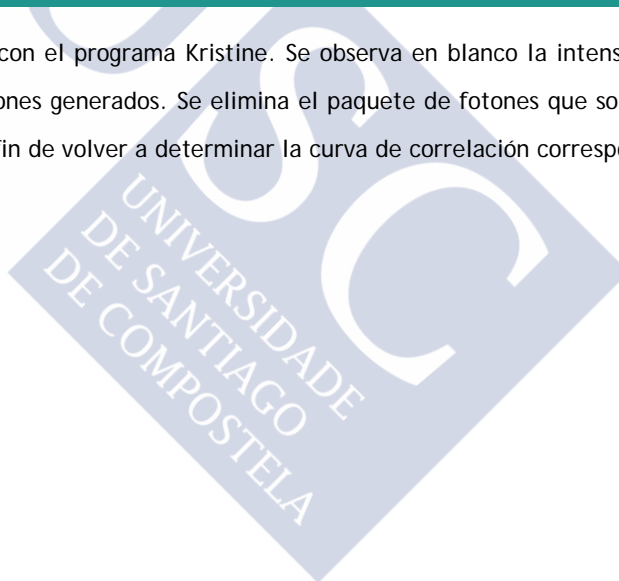


Figura 4.4. Proceso de filtrado con el programa Kristine. Se observa en blanco la intensidad media de los distintos paquetes de fotones generados. Se elimina el paquete de fotones que sobresale con respecto a los restantes, con el fin de volver a determinar la curva de correlación correspondiente.



CAPÍTULO 5

Receptores para encapsulación de pequeñas moléculas

Contenidos

5.1. Complejos supramoleculares sustrato-receptor entre la Cumarina 460 y las ciclodextrinas: una cuestión de tamaño (ARTÍCULO 1)	127
1. Introduction	127
1.1. Coumarin 460	127
1.2. Cyclodextrins	128
2. Results and discussion	129
2.1. Fluorescence titrations	129
2.2. Model and data analysis	130
2.3. Global Analysis	132
2.4. Interpretation of quantum yields and fluorescence lifetimes	134
3. Conclusions: Size-dependency of structure and stability of the complexes	135
References	136
Acknowledgements	136
5.2. Papel de las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas en la interacción de colorantes iónicos con micelas cargadas (ARTÍCULO 2)	137
1. Introduction	137
2. Results and discussion	140
2.1. Nonionic surfactants	140
2.2. Cationic surfactants	143
2.3. Anionic surfactants	148
2.4. Comparison of results	154

3. Experimental	157
3.1. Materials	157
3.2. Sample Preparation	157
3.3. Absorption and Fluorescence Measurements	158
3.4. Data analysis	158
4. Conclusions	159
Acknowledgments	159
Notes and references	160
Supplementary Information	163



Este capítulo se dedica al estudio de las interacciones de sustratos fluorescentes con receptores de distintas características estructurales: *ciclodextrinas*, que presentan cavidades hidrofóbicas rígidas por lo que el factor estérico es determinante en la asociación, y *micelas* de tensioactivos, que constituyen receptores hidrofóbicos muy flexibles en los que las fuerzas electrostáticas juegan un papel fundamental en la inclusión del sustrato.

Las ciclodextrinas son muy importantes en cuanto a su utilización en la encapsulación de pequeñas moléculas, presentando numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica por su falta de toxicidad (Steed 2009).

En este capítulo se muestran los resultados del estudio de la interacción de las tres ciclodextrinas naturales (α -CD, β -CD y γ -CD) con un fluoróforo de la familia de las cumarinas, la Cumarina 460 (C460), que presenta aplicaciones industriales en la industria cosmética (Scales-Medeiros 2000) y se utiliza como marcador de sistemas biológicos por su buena capacidad para interactuar con proteínas (Nag 1990, Álvarez Prada 2006).

El objetivo del estudio de estas interacciones fue determinar la estequiometría de la reacción de complejación de la C460 con las ciclodextrinas a pH neutro, obtener los valores de las constantes de equilibrio implicadas y caracterizar los complejos formados determinando sus propiedades fotofísicas. Esta información permitió entender el comportamiento del sistema y conocer cómo actúa un sustrato al interactuar con este tipo de macromoléculas. Además, debido a la diferencia en el tamaño de la cavidad que presentan las ciclodextrinas empleadas, se pudo analizar la influencia de este factor en la interacción con la C460 y en los procesos de transferencia de carga intramolecular que determinan el comportamiento fotofísico de esta sonda fluorescente.

Las micelas de tensioactivos tienen una importante aplicación industrial pero también son muy útiles como modelos de membranas biológicas, ya que al igual que ellas se forman por agregación de sustancias tensioactivas y presentan una estructura altamente flexible. Mediante el uso de surfactantes neutros y cargados positiva y negativamente, se investigó qué fuerzas actúan en la interacción de sus correspondientes micelas con un colorante de carga positiva, la Rodamina 123 (R123), comúnmente empleado como marcador fluorescente de mitocondrias.

El objetivo de esta parte del trabajo fue determinar las constantes de equilibrio de complejación características de las interacciones entre el fluoróforo y las distintas micelas, sobre la base de modelos capaces de explicar la asociación, así como la obtención de las propiedades fotofísicas correspondientes a la sonda en diversos sistemas. Además, se analizó el papel que juegan las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas presentes en cada caso en la interacción del sustrato con las micelas.



5.1. Complejos supramoleculares sustrato-receptor entre la Cumarina 460 y las ciclodextrinas: una cuestión de tamaño (ARTÍCULO 1)

Supramolecular host-guest complexes between coumarin 460 and cyclodextrins: a matter of size

Mercedes Novo, Jorge Bordello, Daniel Granadero, **Sonia Freire** and Wajih Al-Soufi

Proceedings of the 12th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry 2008

MDPI, Basel, Switzerland

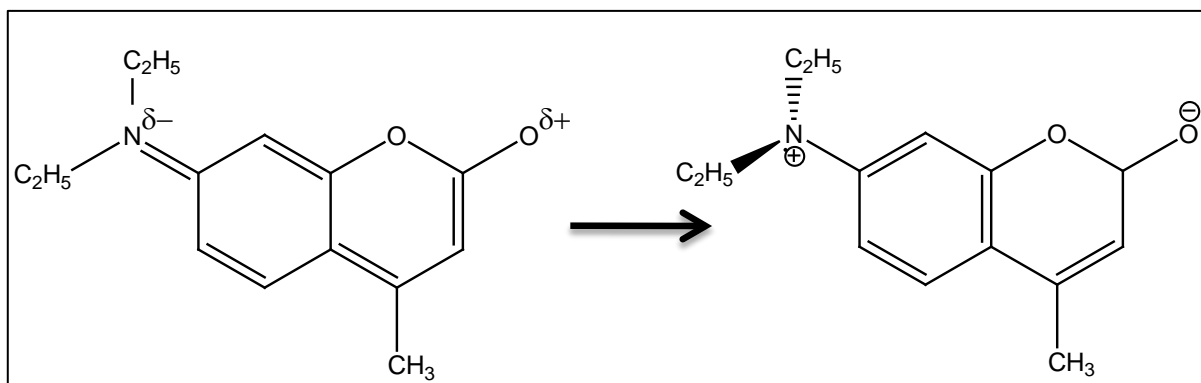
Abstract: *The role of the host size on stoichiometry, structure and strength of supramolecular association between a fluorescent probe, coumarin 460 (C460), and the three natural cyclodextrins (CDs) with increasing cavity sizes (α , β and γ -cyclodextrin) is analyzed, using fluorescence spectroscopy. The variations of the fluorescence emission spectra of C460 with CD concentration can be explained with a 1:1 complexation equilibrium model for α -CD and β -CD, but also a 1:2 complex has to be included in the case of γ -CD. Nevertheless, the photophysical properties and the stability of the complexes do not correlate in a simple way with the cavity size. For instance, the association between C460 and β -CD, which is the CD with medium cavity size, is much stronger than with the other CDs but it does not provoke fluorescence enhancement as in those cases. Detailed analysis of fluorescence quantum yields and fluorescence lifetimes of the complexes help us to propose an explanation for this unexpected behaviour. This is the formation of two types of 1:1 complexes with β -CD and γ -CD which differ in the side groups of C460 which are included in the CD cavity and how much effect this has on the photoinduced charge-transfer processes in the coumarins. This system is a nice example how subtle variations in the host-cavity size can induce big structural changes in the supramolecular complexes.*

1. Introduction

1.1. Coumarin 460

Aminocoumarins are natural fluorescence probes, some of them biologically active as analgesics, anticoagulants, etc. They are mainly used in cosmetics and in the food industry because of their ability to bind to proteins.

Some aminocoumarins undergo charge transfer processes in the excited state that make their fluorescence highly sensitive to the environment (Scheme 1) [1].



Intramolecular charge transfer (ICT) state	Twisted intramolecular charge transfer (TICT) state
--	---

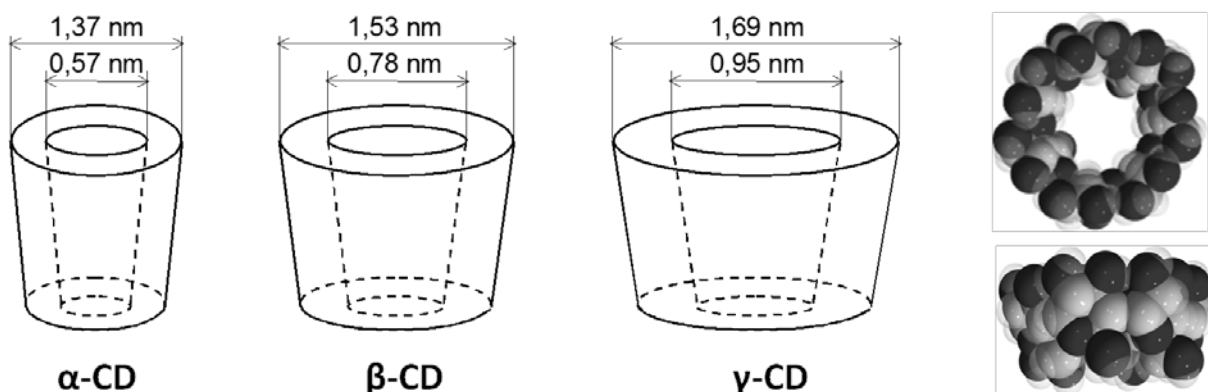
- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| ✓ Non polar media. | ✓ Polar media. |
| ✓ Strong fluorescence. | ✓ Weak fluorescence. |
| ✓ Emission at shorter wavelengths. | ✓ Emission at longer wavelengths |

Scheme 1. Structure of the Coumarin 460 (C460) in the excited state, where an intramolecular charge transfer occurs to yield the molecule on the left. If twisting takes place during the lifetime of the molecule, the structure on the right appears. The characteristics of these states are indicated at the bottom of the structures.

1.2. Cyclodextrins

Cyclodextrins (CDs) are toroidally shaped polysaccharides with a highly hydrophobic central cavity which allows them to form inclusion complexes with many organic substrates (Scheme 2).

Cyclodextrin inclusion complexes are simple and useful models for the investigation of host-guest interactions in supramolecular systems [2].



Scheme 2. Structures and cavity sizes of the three natural cyclodextrins (left) and a 3D representation (right).

2. Results and discussion

2.1. Fluorescence titrations

Figure 1, Figure 2 and Figure 3 show the variations of the fluorescence emission spectrum of C460 with increasing concentrations of the CDs. The insets are plots of the emission maxima versus CD concentration.

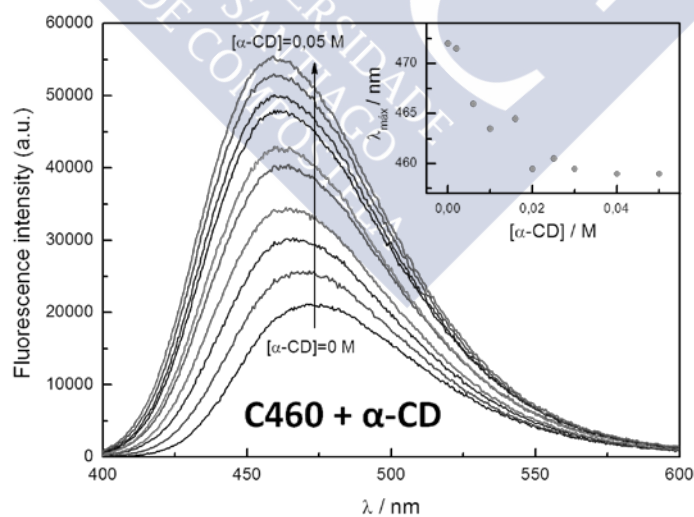


Figure 1. Fluorescence titrations of C460 with α -CD. *Inset*: variation of the fluorescence emission maximum with α -CD concentration.

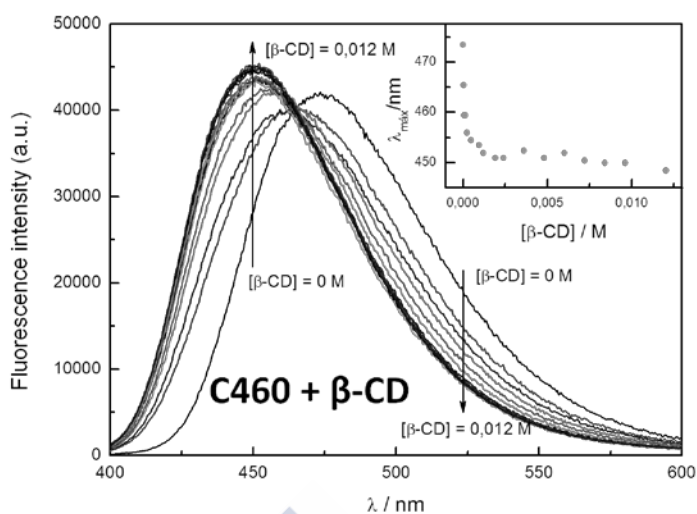


Figure 2. Fluorescence titrations of C460 with β -CD. *Inset*: variation of the fluorescence emission maximum with β -CD concentration.

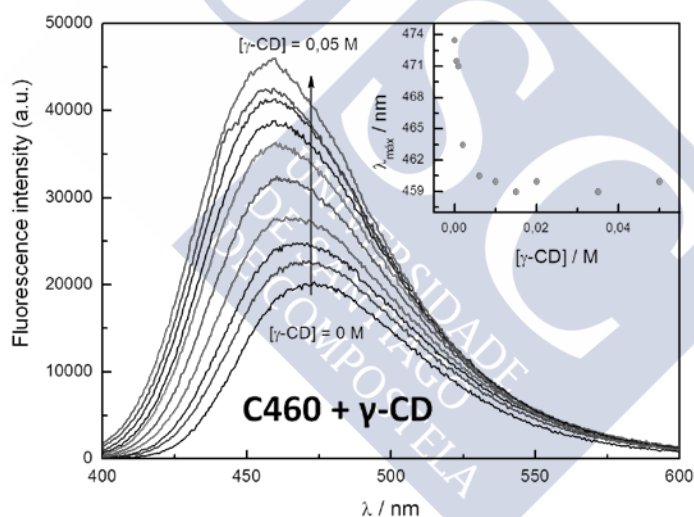


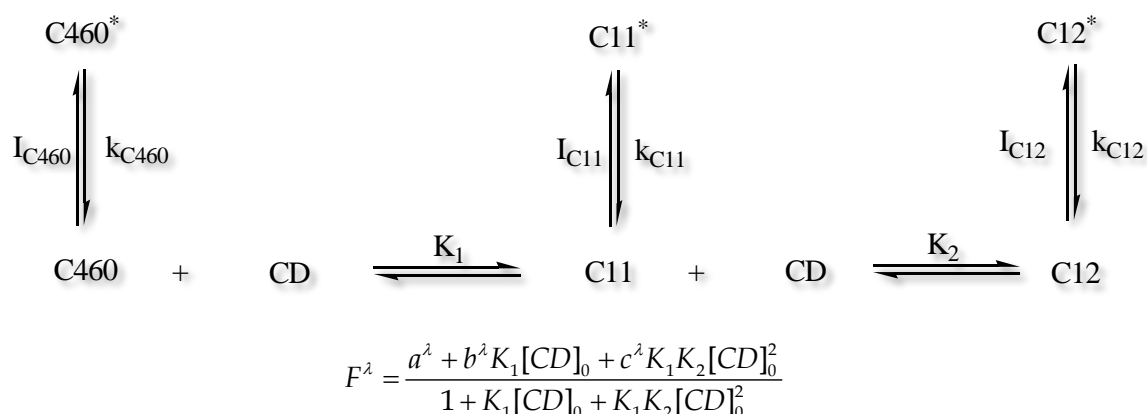
Figure 3. Fluorescence titrations of C460 with γ -CD. *Inset*: variation of the fluorescence emission maximum with γ -CD concentration.

By increasing the concentration of CD we observed:

- ✓ A huge increase of the fluorescence intensity for α -CD and γ -CD but not for β -CD.
- ✓ The fluorescence emission spectrum of the coumarin shifts to lower wavelengths.

2.2. Model and data analysis

Scheme 3 shows the proposed mechanism and fit function (K_2 only for γ -CD).



Scheme 3. Proposed mechanism and fit function used for the analysis of interactions of C460 with the cyclodextrins. The 1:2 complex is only observed in the case of γ -CD.

The individual fits of the model functions to the fluorescence intensity versus CD concentration data are shown in Figure 4, Figure 5 and Figure 6. The fit parameters are the association equilibrium constants K_1 and K_2 and the fluorescence intensities of free C460 and complexes C460:CD and C460:CD₂ (only for γ -CD).

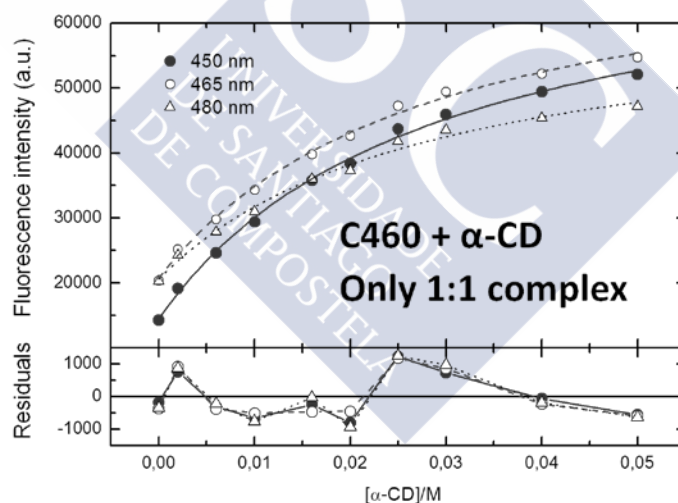


Figure 4. Individual fits of the model functions to the fluorescence intensity versus α -CD concentration data.

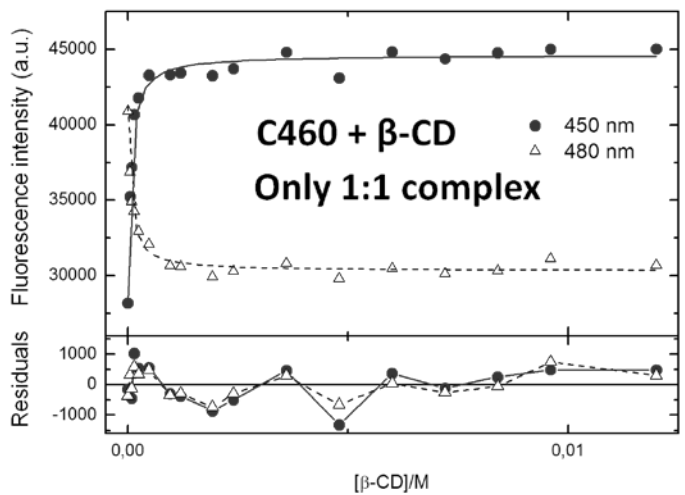


Figure 5. Individual fits of the model functions to the fluorescence intensity versus β -CD concentration data.

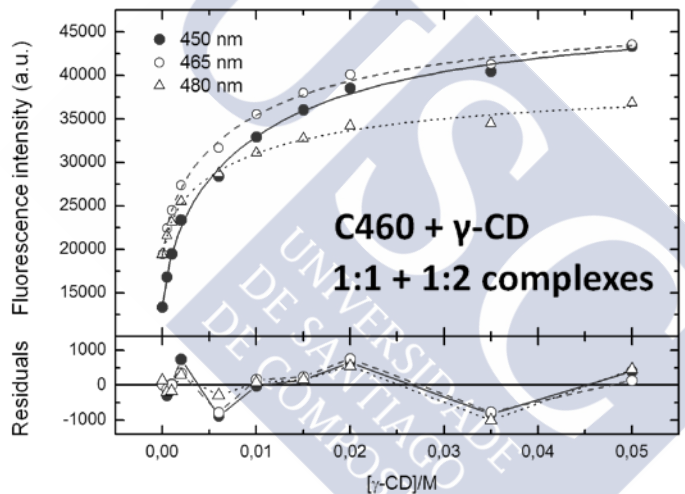


Figure 6. Individual fits of the model functions to the fluorescence intensity versus γ -CD concentration data.

2.3. Global Analysis

Global analyses with the whole emission spectra as dataset yield more precise values of the association equilibrium constants K_i (Table 1) and the fluorescence spectra of the free coumarin and the coumarin bound to the different CDs forming 1:1 or 1:2 complexes (Figure 7) [3,4].

Table 1. Number of fluorescent components of each system and binding equilibrium constants.

System	C460+ α -CD	C460+ β -CD	C460+ γ -CD
Fluorescent components	2 (C460+C11)	2 (C460+C11)	3 (C460+C11+C12)
K_1 / M^{-1}	34.6 \pm 0.2	14880 \pm 70	692 \pm 20
K_2 / M^{-1}	-	-	50 \pm 2

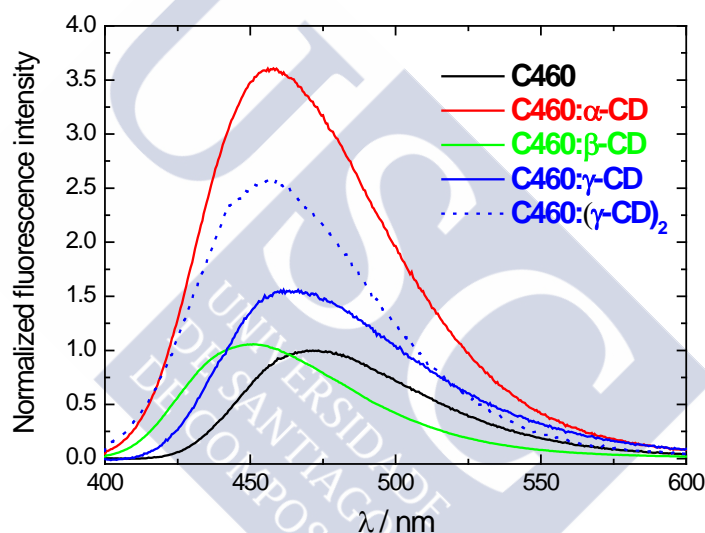


Figure 7. Fluorescence emission spectra of the free coumarin and the coumarin bound to the different CDs forming 1:1 or 1:2 complexes (normalized with respect to free coumarin).

It is observed that:

- ✓ Complex C460: β -CD shows much higher stability constant than the others.
- ✓ Normalizing the emission spectra of free coumarin, the spectra of the 1:1 complexes show unexpected differences among them.
- ✓ Both the increase in fluorescence intensity and the spectral shift of the 1:1 complexes with respect to free C460 do not correlate in a simple way with the cavity size.

2.4. Interpretation of quantum yields and fluorescence lifetimes

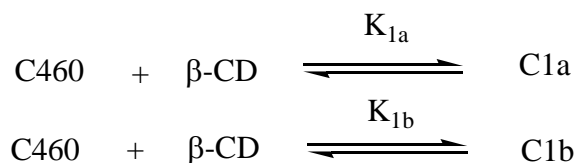
Table 2 shows the fluorescence quantum yields (Q) and lifetimes (τ) of free coumarin and its complexes with α -CD, β -CD and γ -CD.

Table 2. Fluorescence quantum yields (Q), lifetimes (τ) and radiative and nonradiative deactivation rate constants (k_r and k_{nr}) of free C460 and its complexes with CDs.

System	Q	τ / ns	k_r / ns^{-1}	k_{nr} / ns^{-1}
C460 in water	0.070	0.40	0.18	2.3
C460: α -CD	0.28	1.75	0.16	0.41
C460: β -CD	0.070	0.30 2.1	-	-
C460: γ -CD	0.14	0.78	0.18	1.1
C460:(γ -CD) ₂	0.21	2.0	0.10	0.40

The low values of Q and τ are explained as a result of TICT state predominance [5, 6]. The high values of these parameters are explained by the predominance of the ICT state indicating that complexation affects to the amino group and hinders the charge transfer. Finally, the intermediate values of Q and τ indicate the coexistence of both ICT and TICT states.

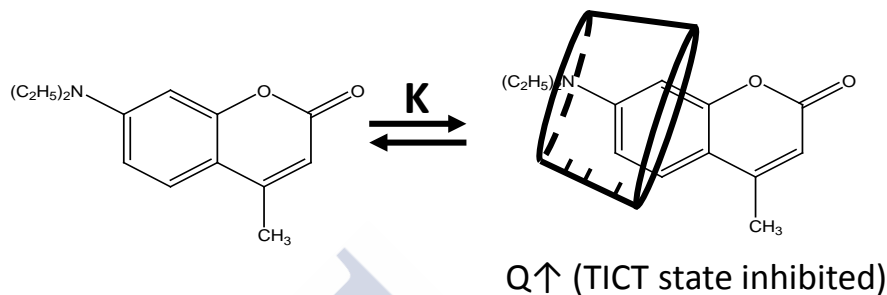
The two lifetimes for the system C460: β -CD denotes two types of 1:1 complexes (Scheme 4) [4]. Note that the fit function would not change since $[C1a]/[C1b] = K_{1a}/K_{1b} = \text{cte}$ and then $K = K_{1a} + K_{1b}$. Both types of C11 may also exist for C460+ γ -CD system, but the corresponding lifetimes cannot be resolved.



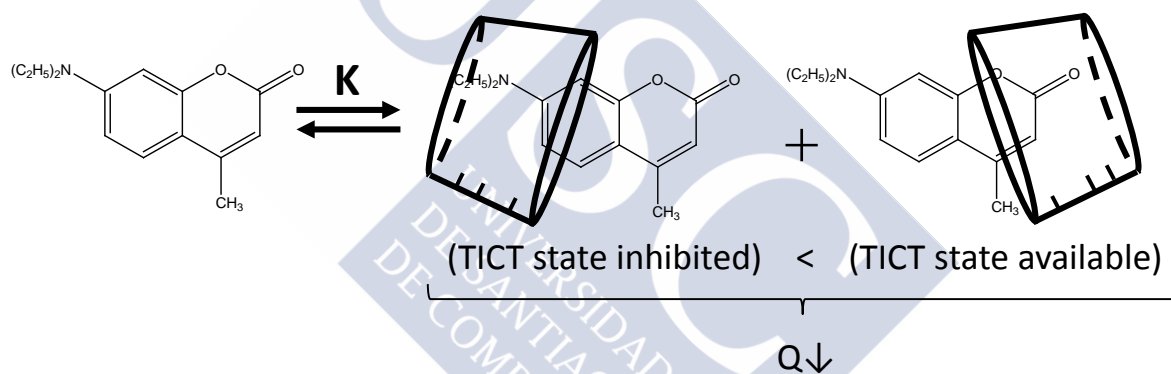
Scheme 4. Proposed mechanism for the interaction between C460 and β -CD.

3. Conclusions: Size-dependency of structure and stability of the complexes

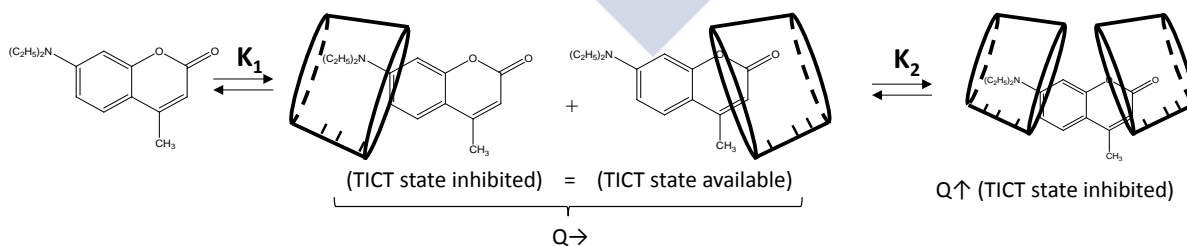
The following structures are proposed for the complexes of C460 with the different CDs: α -CD (Scheme 5), β -CD (Scheme 6) and γ -CD (Scheme 7).



Scheme 5. Proposed structure for the complex between C460 and α -CD.



Scheme 6. Proposed structures for the complexes between C460 and β -CD.



Scheme 7. Proposed structures for the complexes between C460 and γ -CD.

References

- [1] Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K.; Rettig, W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899-4031.
- [2] Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
- [3] Al-Soufi, W.; Novo, M.; Mosquera, M. Principal Component Global Analysis of Fluorescence and Absorption Spectra of 2-(2'-Hydroxyphenyl)Benzimidazole. *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 630-636.
- [4] Alvarez Parrilla, E.; Al-Soufi, W.; Ramos Cabrer, P.; Novo Rodríguez, María de la Merced; Vázquez Tato, J. In *Resolution of the association equilibria of 2-(p-toluidinyl)-naphthalene-6-sulfonate (TNS) with [Beta]-cyclodextrin and a charged derivative*; 2001.
- [5] Jones, G. I.; Jackson, W. R.; Halpern, A. M. Medium Effects on Fluorescence Quantum Yields and Lifetimes for Coumarin Laser Dyes. *Chemical Physics Letters* **1980**, *72*, 391-395.
- [6] Yip, R. W.; Wen, Y. X.; Szabo, A. G. Decay Associated Fluorescence Spectra of Coumarin 1 and Coumarin 102: Evidence for a Two-State Solvation Kinetics in Organic Solvents. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10458-10462.

Acknowledgements

We acknowledge the collaboration of Dr. Belén Reija and Arturo Teijeiro and the financial support by the Ministerio de Ciencia e Innovación (project CTQ2007-68057-C02-02_BQU).

5.2. Papel de las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas en la interacción de colorantes iónicos con micelas cargadas (ARTÍCULO 2)

Role of Electrostatic and Hydrophobic Forces in the Interaction of Ionic Dyes with Charged Micelles

Sonia Freire, Jorge Bordello, Daniel Granadero, Wajih Al-Soufi and Mercedes Novo

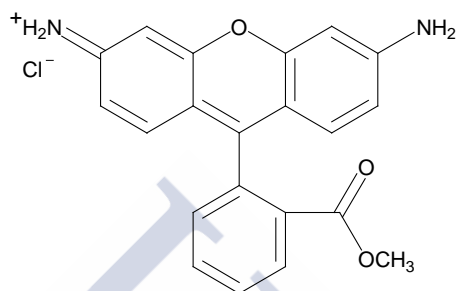
Photochem. Photobiol. Sci. 2010, 9, 687-696

Abstract: *The nature and strength of the interactions between a cationic fluorophore, Rhodamine 123 (R123), and surfactants of different head charge are investigated. Series of absorption, and fluorescence emission spectra and of fluorescence decays are measured. R123 does not interact with the monomers of both nonionic and cationic surfactants but it presents affinity to their micelles. A partition equilibrium model was proposed and the corresponding equilibrium constants were obtained, as well as the photophysical properties of the dye bound to the micelles. In the case of the cationic surfactants, changes of the fluorescence properties were already observed below the Critical Micellar Concentration (CMC) due to dynamic quenching caused by the free counterions. In the presence of anionic surfactants R123 shows a very different behaviour with dramatic spectral changes below the CMC. The observed variations are attributed to a first, strong interaction between R123 and the surfactant monomers, which yields ionic pairs of singular photophysical properties and dominates at low surfactant concentrations, followed by the association of R123 with the surfactant pre-micellar and micellar aggregates at higher surfactant concentrations near the CMC. This behaviour results from the competition between the strong electrostatic interactions of the cationic dye with the anionic surfactant head groups and the hydrophobic forces stabilizing the dye inside the micelles. The results of this work illustrate the complex physicochemical and photophysical behaviour of a charged dye in micellar systems, which resembles the expected situation in similar systems such as biological membranes.*

1. Introduction

Fluorescence techniques have been extensively used for the study of biological systems due to their high sensitivity. Usually a fluorescent dye is used whose photophysical properties change depending on its microenvironment or the biochemical mechanism, so that structural or dynamic information of the system under study can be derived. Nevertheless, the observed spectral shifts or changes in fluorescence intensity, lifetime or anisotropy of the fluorescence probe can be caused by different processes and chemical

species present in the surroundings, so that a very thorough analysis is necessary in order to correctly interpret the experimental data. This is even more important for ionic dyes, which give place to strong electrostatic interactions additionally to the typical hydrophobic-hydrophilic and H-bonding interactions controlling the distribution of a dye in the complex biological systems. In this work we analyze the role of such electrostatic interactions using a cationic dye as probe and surfactant micelles as model systems for biological membranes.



Scheme 1. Structure of Rhodamine 123 (R123).

The selected cationic dye is Rhodamine 123 (R123), a typical mitochondrial fluorescence marker that selectively accumulates at the mitochondria of living cells and also a potential anticancer agent capable of interacting with mitochondrial receptors. R123 was chosen because it is a stable cation over a wide pH range and presents high fluorescence quantum yield and photostability.¹ We studied the dye-exchange dynamics of R123 with neutral micelles in a previous work using Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) together with conventional fluorescence techniques.² We have shown that this probe partitions between the aqueous solution and the micellar pseudo-phase with diffusion-controlled entry rate constants and surfactant-dependent exit rate constants which determine the stability of the binding. In this paper we compare this behaviour with that of R123 in the presence of charged surfactants, both with like and with opposite charge. We use absorption and fluorescence techniques to resolve the species present in the system as a function of surfactant concentration and to determine the interactions leading to the variations observed in the photophysical behaviour of the probe. We also determine and compare the photophysical properties of R123 bound to the different micelles.

Numerous works have studied the effects of surfactants on the chemical and photophysical properties of rhodamines. Significant changes of rhodamine acid-base equilibrium constants^{5,6} and dye-surfactant aggregation⁶⁻⁸ have been observed for several rhodamines in the presence of surfactants. Special interest has received the fluorescence depolarization of rhodamines in the presence of surfactants, which demonstrates the

complex dynamics of the dyes inside the micelles.⁹⁻¹⁴ Two of these works deal with R123 in the presence of different surfactants and phospholipids: a qualitative fluorescence study with emphasis on the formation of dye-surfactant aggregates⁶ and a comparative study of the photophysical properties of R123 with those of some of its derivatives in alcohols and micelles of different charges.⁷ No quantitative analysis were performed in those works so that some important processes influencing the photophysical behaviour of the probe were not identified.

In this work we have used some well-known model surfactants as well as surfactants of industrial interest. As *nonionic surfactants* we chose *Triton X-100* (TX-100), *Polyethylene (23) Glycol Dodecyl Ether* (Brij 35) and *Heptaethylene Glycol Monododecyl Ether* (C₁₂E₇), the latter being used as additive in detergent and cleaning agents. As *cationic surfactants* we selected *Dodecyltrimethylammonium Bromide* (DTAB) and *Hexadecyltrimethylammonium Bromide* (CTAB), which only differ in the length of the hydrocarbon chain. A typical model *anionic surfactant*, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), was chosen together with a *Linear Alkylbenzene Sulfonate* (LAS), a type of surfactant widely used as main active surfactant in detergents. Reported values of the micellar properties of these surfactants, critical micelle concentration (CMC) and mean aggregation number (N_{ag}), are given in Table 1, except for the N_{ag} of LAS. Some of the values, especially those of N_{ag} , differ significantly depending on the literature source and the technique used for their determination. Also, the polydispersity of the sample has a significant effect on both the CMC and the aggregation number. Nevertheless, it must be noted that the inaccuracy of these values has no influence on the interpretation of the experimental features and would only affect to the absolute values of the equilibrium constants.

Table 1. Reported values of the micellar properties, critical micellar concentration (CMC) and mean aggregation number (N_{ag}), of the surfactants used in this work.

Surfactant	Charge	CMC/mol dm ⁻³	N_{ag}	Reference
TX-100	0	2.6×10^{-4}	143	15
Brij 35	0	6.0×10^{-5}	40	15
C ₁₂ E ₇	0	6.5×10^{-5}	89	16
DTAB	+	15.3×10^{-3}	50	17
CTAB	+	9.2×10^{-4}	60	15
SDS	-	8.0×10^{-3}	62	15
LAS	-	9.0×10^{-4}	-	a

^a Determined from conductivity measurements in our laboratory.

All values given for room temperature.

2. Results and discussion

Titration experiments were carried out by increasing the concentration of the different surfactants at a constant concentration of R123 in aqueous solution and by measuring the corresponding absorption spectra, fluorescence emission spectra or fluorescence decays. The series of spectra were analyzed with Principal Components Analysis (PCA) to determine the number of contributing species. On the basis of this information together with the concentration dependence of the spectral shift and of the intensity, a mechanism was proposed to explain the interactions dye-surfactant in both the ground and the excited states. Then, the corresponding model function was fitted to the different series of data to obtain physicochemical and photophysical properties of the system.

2.1. Nonionic surfactants

Figure 1a and Figure 1d show the spectra obtained in the absorption and fluorescence titrations of R123 with C₁₂E₇, which illustrate the typical behaviour of the probe in the presence of nonionic surfactants. No changes of the absorption and emission spectra are observed at surfactant concentrations below the CMC. However, at higher surfactant concentrations, both the absorption and the emission spectra shift to the red, the former showing a well-defined isobestic point and the latter decreasing significantly in intensity. These features are seen better in Figure 1b and Figure 1e, which are plots of the absorption and emission maxima versus C₁₂E₇ concentration, and Figure 1c and Figure 1f, where the molar absorptivity and the fluorescence intensity are plotted against the concentration of

$C_{12}E_7$. In these figures a logarithmic concentration scale was used to emphasize the behaviour at low surfactant concentrations.

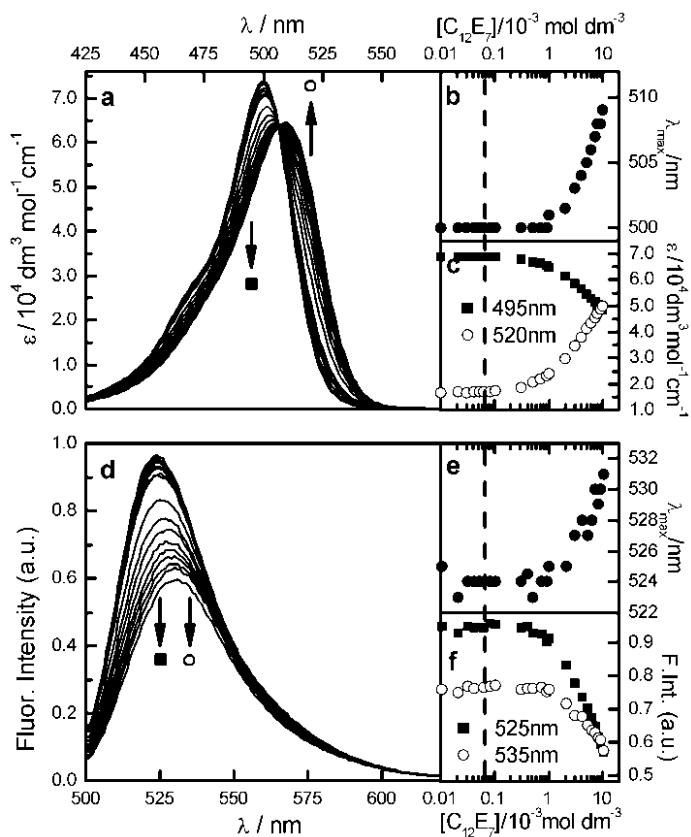
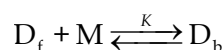


Figure 1. Series of absorption spectra (a) and fluorescence emission spectra (d) of R123 in aqueous solution in the presence of different concentrations of $C_{12}E_7$. Semilogarithmic plots of the corresponding absorption maxima (b), molar absorptivity at two selected wavelengths (c), emission maxima (e) and fluorescence intensity at two selected wavelengths (f) versus $C_{12}E_7$ concentration. The dashed lines mark the CMC value.

The constancy of the absorption and fluorescence properties below the CMC indicates that there is no interaction between the dye and the surfactant monomers, whereas the changes observed above the CMC reflect a strong interaction of R123 with the surfactant micelles. The appearance of a clear isosbestic point in the series of absorption spectra suggests the presence of two species in equilibrium, in accordance with the number of two structural components obtained by PCA both for the series of absorption and fluorescence spectra. Thus, as considered for other nonionic surfactants,² a partition equilibrium model is proposed between free dye (D_f) and dye bound to the micelles (D_b) with a binding

equilibrium constant K (Scheme 2). Micelles (M) are the hosts and their concentration is obtained from the total surfactant concentration [S] as follows:

$$[M] = \frac{[S] - \text{CMC}}{N_{ag}} \quad (1)$$



Scheme 2. Partition equilibrium model of a dye (D) in the presence of micelles (M). D_f denotes the free dye and D_b the dye bound to the micelles.

Under the experimental conditions used (fixed dye concentration and excess of micelles with respect to the total dye concentration) and assuming that excited-state association/dissociation processes do not take place, the model proposed leads to the following relation between the fluorescence intensity (or the absorbance) and the concentration of micelles:

$$F(\lambda) = \frac{F_f(\lambda) + F_b(\lambda)K[M]}{1 + K[M]} \quad (2)$$

where $F_f(\lambda)$ and $F_b(\lambda)$ are the limiting fluorescence intensities (or absorbances) of the dye free in the aqueous solution and bound to the micelles, respectively.

The series of absorption and emission spectra were then analyzed by Principal Components Global Analysis (PCGA) using equation (2) as fit function. The fits were satisfactory (see Figure 1S and 2S in Supporting Information). These analysis yielded values of the equilibrium constant K determined from absorption and from emission data which are in good agreement (see Table 6 in Comparison of Results), confirming that there are no additional processes in the excited state. Also the absorption and emission spectra of free R123 and of R123 bound to $C_{12}E_7$ micelles were obtained (see Figure 4 in Comparison of Results), which allow for the determination of the fluorescence quantum yield of R123 bound to those micelles (see Table 7 in Comparison of Results). The calculated spectra of free R123 are in very good agreement with those measured experimentally, proving the soundness of the analysis and supporting the proposed model.

The results of time-resolved fluorescence titrations for this system are in good agreement with the proposed model. Table 2 shows the results of the individual fits to the fluorescence decays of R123 in the presence of different concentrations of $C_{12}E_7$. Monoexponential decays are observed at surfactant concentrations below the CMC, with a single lifetime which coincides with that of R123 in aqueous solution.² This confirms that no interaction between R123 and the surfactant monomers takes place.

Table 2. Results of individual exponential fits to the fluorescence decays of R123 with different concentrations of $C_{12}E_7$. B1 and B2 are the normalized preexponential factors. $[R123]=8.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.

$[C_{12}E_7]/10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	τ_1/ns	τ_2/ns	B1	B2	χ^2
0.0110	4.021±0.005		100		1.234
0.0370	4.013±0.005		100		1.305
0.0739	4.068±0.008	0.7±0.1	86	14	1.073
0.124	4.073±0.008	0.7±0.1	88	12	1.118
0.621	4.11±0.01	1.3±0.2	90	10	1.045
1.17	4.12±0.01	1.0±0.1	87	12	1.209
4.85	4.22±0.01	1.1±0.1	87	12	1.088
9.65	4.30±0.02	1.8±0.2	85	15	1.033

At surfactant concentrations above the CMC the decays are biexponential, with two lifetimes that increase when increasing the surfactant concentration, but with approximately constant preexponential factors. This type of variation indicates that the observed lifetimes do not correspond to two species, but are average times of at least three species. In order to resolve the real lifetimes of these species, a global fit of the whole series of fluorescence decays was performed with three lifetimes as global parameters. Taking into account that, at the surfactant concentrations used, a certain proportion of free R123 is always present, one of the lifetimes was fixed to the lifetime of this species in order to reduce parameter correlation. As a result of the global fit, two additional lifetimes were obtained: a short one ($0.7 \pm 0.2 \text{ ns}$) which is very similar to those obtained with other nonionic surfactants² and is likewise attributed to the solvation dynamics of R123 inside the micelles. The second lifetime of about 5 ns is assigned to R123 bound to the micelles (see Table 7).

A similar detailed analysis was performed for R123 in the presence of other nonionic surfactants. The results are summarized in Tables 5 and 6 and in Figure 4. In the last section of this article we will compare the binding equilibrium constants and the photophysical properties of R123 bound to micelles for the different micellar systems under study.

2.2. Cationic surfactants

At concentrations above the CMC titrations of R123 with the cationic surfactant DTAB yield similar results as for $C_{12}E_7$, with significant shifts to the red of both absorption and emission spectra and a decrease of the fluorescence intensity, as shown in Figure 2.

However, at concentrations below the CMC a non-negligible decrease of fluorescence intensity is observed, contrasting to the constant absorbance values. If CTAB is used instead of DTAB, a similar behaviour is observed but the changes are much smaller, both in the absorption and in the emission spectra.

This quenching of the fluorescence is also reflected in the lifetime values of R123 with different concentrations of DTAB (Table 3). The single lifetime obtained at concentrations of DTAB below the CMC decreases with increasing surfactant concentration. At DTAB concentrations above the CMC the decays become biexponential, with a new shorter but constant lifetime whose contribution increases as the surfactant concentration is increased. On the contrary both the value and the contribution of the longer lifetime decrease when the concentration of DTAB is increased. Again, in the case of CTAB, the effects of surfactant concentration on the R123 lifetime are much smaller.

Table 3. Results of individual exponential fits to the fluorescence decays of R123 with different concentrations of DTAB. B1 and B2 are the normalized preexponential factors. [R123]= 8.0×10^{-7} mol dm⁻³.

[DTAB]/10 ⁻³ mol dm ⁻³	τ_1 / ns	τ_2 / ns	B1	B2	χ^2
0.118	4.020±0.005		100		1.229
0.417	4.018±0.005		100		1.265
9.77	3.851±0.005		100		1.229
30.1	3.73±0.02	1.37±0.08	76	24	1.178
52.6	3.64±0.02	1.52±0.05	59	41	1.031
60.5	3.63±0.02	1.51±0.04	55	45	1.039
71.1	3.63±0.02	1.56±0.04	47	53	1.208
89.3	3.55±0.03	1.54±0.03	42	58	1.088

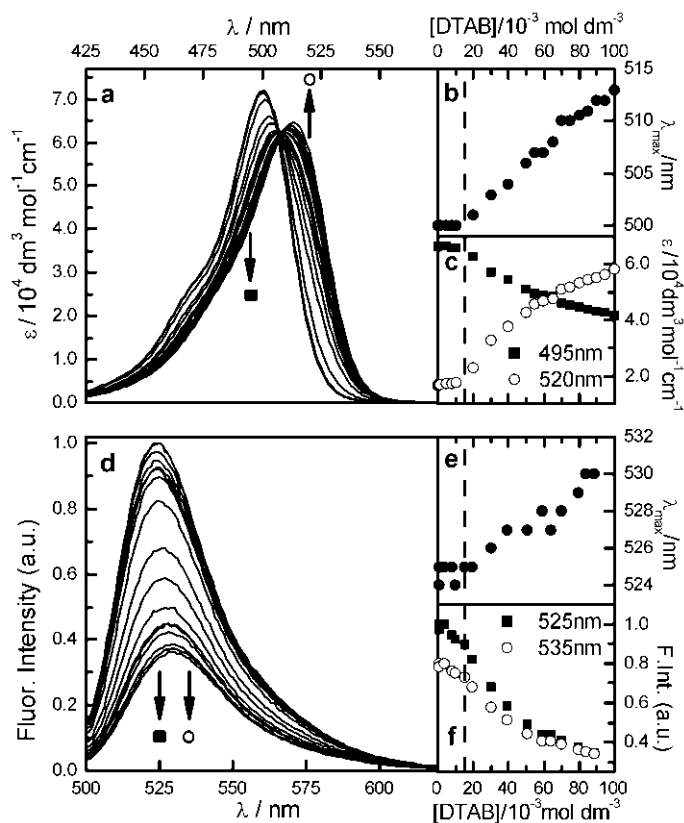


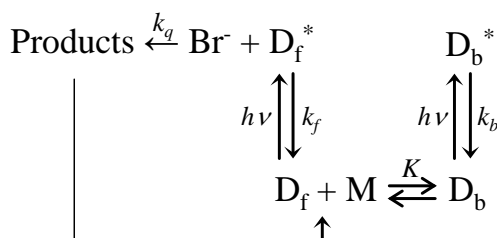
Figure 2. Series of absorption spectra (a) and fluorescence emission spectra (d) of R123 in aqueous solution in the presence of different concentrations of DTAB. Plots of the corresponding absorption maxima (b), molar absorptivity at two selected wavelengths (c), emission maxima (e) and fluorescence intensity at two selected wavelengths (f) versus DTAB concentration. The dashed lines mark the CMC value.

The similarity of the behaviour of R123 in the presence of DTAB with that observed with nonionic surfactants suggests that, again, R123 partitions between the aqueous phase and the micellar pseudophase. This is confirmed by PCA analysis that needs two spectral components to reproduce the experimental series of absorption and emission spectra. The results of lifetime measurements lead also to the same interpretation: the longer lifetime, whose contribution decreases when increasing DTAB concentration, is attributed to free R123 and the short lifetime appearing at surfactants concentrations above the CMC with increasing contribution corresponds to R123 bound to the micelles (see Table 7). Nevertheless, the addition of DTAB also causes a quenching of the fluorescence intensity at surfactant concentrations below the CMC (Figure 2f) together with a decrease of the fluorescence lifetime of free R123 (Table 3), features that are not observed with nonionic surfactants. This quenching could be caused by the bromide ions of DTAB, since they are known to be effective quenchers. The facts that, at DTAB concentrations below the CMC no

change of the R123 absorption spectrum is found and that the R123 emission spectrum changes in intensity but not in form (see Figure 2) indicate that the quenching is dynamic. This is confirmed by the monoexponential decays observed at DTAB concentrations below the CMC (Table 3).

Therefore, a mechanism is proposed to explain the photophysical behaviour of R123 in the presence of DTAB (Scheme 3), where dynamic quenching of free R123 by bromide ions is added to the partition equilibrium model proposed before for nonionic surfactants. At DTAB concentrations below the CMC the proposed model reduces to dynamic quenching and follows the Stern-Volmer equation, being the bromide concentration equal to the total concentration of DTAB. At surfactant concentrations above the CMC, the fluorescence intensity decreases due to both the dynamic quenching and the partition equilibrium. Under these conditions the concentration of free bromide ions (only those ions which do not form part of the micelles are quenchers) is given by equation (3), where α is the degree of dissociation of the micelles (related to the fraction of counterions β by $\alpha = 1 - \beta$) and $[M]$ is the concentration of micelles given by equation (1).

$$[\text{Br}^-]_f = \text{CMC} + \alpha N_{ag} [\text{M}] \quad (3)$$



Scheme 3. Mechanism including the partition equilibrium between dye (D) and micelles (M) with equilibrium constant K together with the dynamic quenching of the free dye (D_f) by the free surfactant counterions.

On the basis of the proposed mechanism (Scheme 3) and under the experimental conditions used (fixed dye concentration and excess of micelles with respect to the total dye concentration), the following function can be deduced to describe the variation of fluorescence intensity with the concentration of micelles at surfactant concentrations above the CMC:

$$F(\lambda) = \frac{F_f(\lambda)}{(1+k_q\tau_0[\text{Br}^-]_f)(1+K[\text{M}])} + \frac{F_b(\lambda)K[\text{M}]}{1+K[\text{M}]} \quad (4)$$

where k_q is the bimolecular quenching constant, τ_0 is the fluorescence lifetime of free R123 in the absence of quencher and K is the binding equilibrium constant (see Scheme 3). As in the case of nonionic surfactants, $F_f(\lambda)$ and $F_b(\lambda)$ are the limiting fluorescence intensities of the dye free in the aqueous solution and bound to the micelles, respectively. Since the quenching is dynamic, it does not affect the species in the ground state and therefore the fit equation for absorption data is the same as that used with nonionic surfactants (equation(2)).

The mechanism in Scheme 3 also explains the decrease of the lifetime of free R123 (τ_1 in Table 3) which is due to the dynamic quenching by bromide ions, described by the Stern-Volmer equation:

$$\tau = \tau_0 / (1 + k_q \tau_0 [\text{Br}^-]_f) \quad (5)$$

At surfactant concentrations below the CMC, the concentration of free bromide ions coincides with the concentration of DTAB whereas, at surfactant concentrations above the CMC, it is given by equation (3). Analysis of τ_1 in Table 3 with equation (5) in the two concentration ranges yields a value for the bimolecular quenching constant of $k_q = (1.1 \pm 0.1) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is of the expected order of magnitude.^{18, 19} Also a value for the dissociation degree of DTAB micelles is obtained ($\alpha = 0.21 \pm 0.03$) which is in very good agreement with that reported in the literature.¹⁷ Quenching by bromide ions would also explain the short lifetime of R123 bound to DTAB micelles (see Table 3). In this case, quenching is due to the bromide counterions (bromide ions bound to the micelle), whose concentration can be derived from equation (3): $[\text{Br}^-]_b = (1 - \alpha)N_{ag}[\text{M}]$. Using the value of α given above and the reported value for the shell volume of DTAB micelles,²⁰ the concentration of bromide counterions per micelle is estimated to be about 3 mol dm^{-3} . Applying equation (5) with $\tau = 1.5 \text{ ns}$ and this bromide concentration, a value of $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ is obtained for the quenching rate constant inside the micelles. This value is about 8 times lower than that obtained for the quenching in aqueous solution, in very good agreement with the increase of microviscosity inside the micelles that slows down the diffusion controlled rate constant.²⁰

A value for the bimolecular quenching constant can also be determined from the decrease of the fluorescence intensity at DTAB concentrations below the CMC: $k_q = (1.7 \pm 0.1) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This value is very close to that obtained from lifetime measurements but significantly higher. The disagreement can be explained by the great influence that the R123 adsorption to glass surfaces in the absence or at low surfactant concentrations has on the measured fluorescence intensity. Therefore, the value obtained from the analysis of the lifetimes will be taken as more accurate and used in the further analysis.

Equation (2) fits satisfactorily the series of absorption spectra of R123 with different concentrations of DTAB (see Figure 3S in Supporting Information) and yields an accurate value of the binding equilibrium constant for this system (Table 6). Also the “pure” absorption spectra of free and bound R123 are obtained (Figure 4). The series of emission spectra of R123 with varying concentrations of DTAB can be satisfactorily fitted using equation (4), with the equilibrium constant K as single fit parameter. The other parameters are fixed to the literature values (CMC and N_{ag} in Table 1) and to those obtained from the analysis of the fluorescence lifetimes (k_q and α given above). The goodness of the fit can be seen in Figure 4S for the fluorescence intensity measured at a certain emission wavelength. The value obtained for the binding equilibrium constant K is in very good agreement with that determined from the absorption spectra (see Table 6). The “pure” emission spectra of free R123 and R123 bound to the DTAB micelles are also determined in the global fit of the series of emission spectra (Figure 4). These are used, together with the “pure” absorption spectra, to calculate the fluorescence quantum yield of the R123 bound to DTAB micelles (Table 7).

The mechanism in Scheme 3 was also used to analyze the absorption and fluorescence data of R123 in the presence of CTAB and the results are summarized in Figure 4 and Table 6 and 7. For the analysis of the emission data the same values of the parameters k_q and τ_0 were used together with the micellar properties of CTAB given in Table 1 and the reported value of $\alpha=0.11$ for the dissociation degree of DTAB micelles²¹ (in this case this parameter could not be obtained from the lifetime values due to the small variations observed). The value obtained for the equilibrium constant K in this analysis was used to fit the absorption data.

2.3. Anionic surfactants

The behaviour of R123 in the presence of anionic surfactants contrasts to those described above for nonionic and cationic surfactants. As shown in Figure 3 for SDS, dramatic variations of the absorption and emission spectra of R123 are observed on the addition of anionic surfactants at concentrations below the CMC, whereas there are no changes at surfactant concentrations above the CMC. First, at very low surfactant concentrations, the absorption spectrum of R123 decreases in intensity and broadens with negligible spectral shift. Then when the surfactant concentration is further increased, it shifts significantly to longer wavelengths and increases in intensity becoming constant at concentrations around the CMC (see Figure 3a, 3b and 3c). Two isosbestic points are observed at about 495 and 508 nm. Emission spectra show a similar behaviour: at low surfactant concentrations there is a dramatic decrease of the fluorescence intensity without spectral shift followed by an

increase in intensity together with a significant spectral shift. Above the CMC, the emission spectra become constant (see Figure 3d, 3e and 3f).

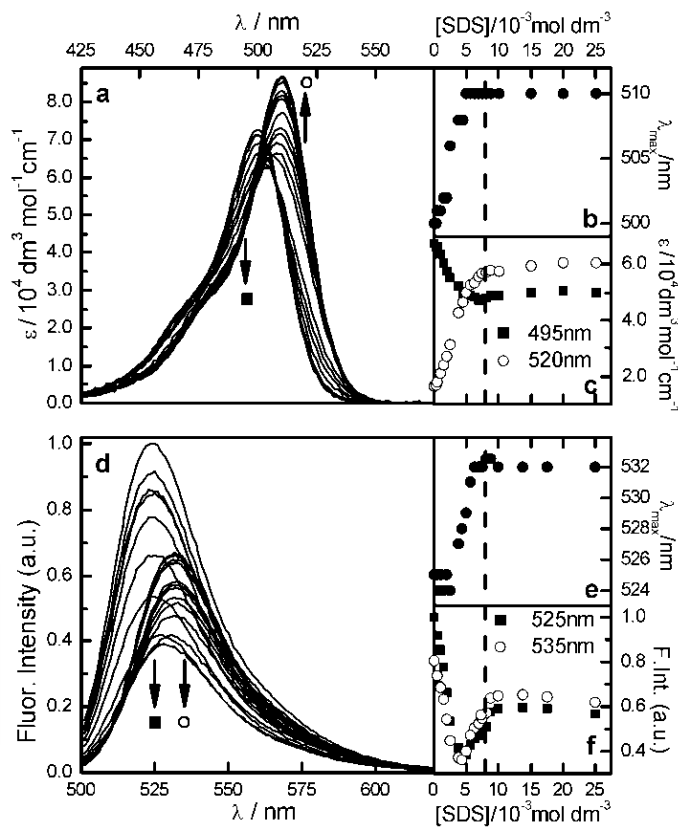


Figure 3. Series of absorption spectra (a) and fluorescence emission spectra (d) of R123 in aqueous solution in the presence of different concentrations of SDS. Plots of the corresponding absorption maxima (b), molar absorptivity at two selected wavelengths (c), emission maxima (e) and fluorescence intensity at two selected wavelengths (f) versus SDS concentration. The dashed lines mark the CMC value.

It is important to note that, for anionic surfactants, the concentration of R123 itself has a strong influence on the results obtained, which is not the case with nonionic surfactants. At dye concentrations typical for absorption measurements ($\approx 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), the solutions instantly turn red and a precipitate appears when small amounts of the anionic surfactant are added. Under such conditions the absorption spectrum is time dependent, changing both form and height, and depends also on the concentration of surfactant. Similar features have been reported for Rhodamine 6G in the presence of SDS and were explained on the basis of a complex mechanism including dimerization of the dye, formation of ion-pairs and of larger aggregates and precipitation of optically visible crystals.⁸ For our absorption measurements

we used a low concentration of R123 ($\approx 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) in order to obtain constant, reproducible spectra at the expense of a lower accuracy of the experimental data.

Also the results of the fluorescence lifetime titrations with anionic surfactants are very different to those obtained with nonionic and cationic surfactants. All decays can be satisfactorily fitted with a monoexponential model, as shown in Table 4 for SDS. At low surfactant concentrations the value of the lifetime is very close to that of free R123 and it increases to a slightly higher value at surfactant concentrations just below and above the CMC.

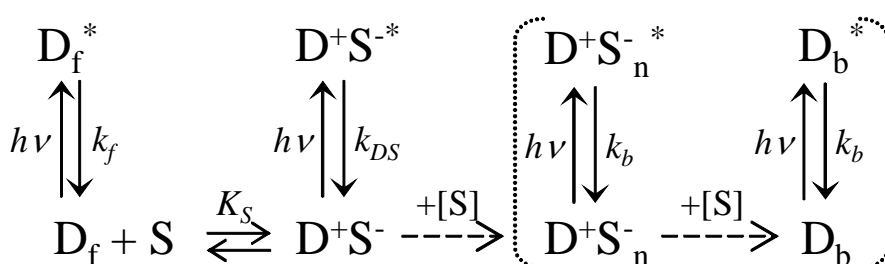
Table 4. Results of individual exponential fits to the fluorescence decays of R123 with different concentrations of SDS. $[\text{R123}] = 8.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.

$[\text{SDS}] / 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	τ_1 / ns	χ^2
0.025	4.031 ± 0.005	1.171
0.254	4.042 ± 0.005	1.073
1.90	4.043 ± 0.005	1.093
4.82	4.05 ± 0.02	1.112
7.49	4.305 ± 0.005	1.034
8.76	4.347 ± 0.005	1.206
15.3	4.352 ± 0.005	1.138
20.3	4.347 ± 0.005	1.243

The results show that R123 has a very high affinity to the micelles of anionic surfactants. The photophysical properties at surfactant concentrations above the CMC are different to those of free R123 but do not change once the CMC is reached. Thus, no partition equilibrium exists as in the case of nonionic and cationic surfactants but all the dye molecules are bound to the micelles once these are formed. Nevertheless, there are additional interactive processes between the dye and certain species present in the surfactant solutions which provoke significant changes in the spectral properties of R123 at surfactant concentrations below the CMC. Formation of dye-surfactant pairs and aggregates as well as induced pre-micellar aggregates have been proposed as possible processes to explain the behaviour of cationic and zwitterionic dyes in the presence of anionic surfactants at concentrations below the CMC,^{6,7} but no quantitative analysis has been reported yet. In this

work we deal with such an analysis with the help of advanced methods of data analysis as PCA and GA.

PCA of the complete series of absorption and emission spectra yields three spectral components for the full concentration range. This indicates that the full series of spectra can be reconstructed as a linear combination of only three constant spectra, corresponding to three distinct species with different contributions depending on the surfactant concentration. Thus a mechanism based on three distinct species should be proposed. The presence of an isosbestic point at about 508-510 nm in the absorption spectra within the first range of surfactant concentrations (up to 2.5×10^{-3} mol dm⁻³ for SDS and 5×10^{-5} mol dm⁻³ for LAS) suggests that in this range only two absorbing species in equilibrium are present. This is confirmed by PCA of the reduced series of absorption and emission spectra corresponding to this concentration range, although the second component has only a small contribution to the emission data. Therefore, for this first range, we propose the simplest possible model consisting in a 1:1 interaction between the dye and the surfactant monomers yielding ion pairs of the type D⁺S⁻, characterized by the equilibrium constant K_S (see Scheme 4). This is actually a static quenching model, where species D⁺S⁻ would show red-shifted absorption spectra compared to free R123 and none or low fluorescence, leading to the dramatic fluorescence decrease and to the single fluorescence decays observed under these conditions (in the case of the surfactant LAS, it seems to appear a second short lifetime with small contribution but its value is beyond the detection limits of the apparatus used). The fact that the fluorescence lifetime of R123 does not decrease in this concentration range indicates that no dynamic quenching takes place.



Scheme 4. Mechanism to explain the interactions of a cationic dye (D⁺) with an anionic surfactant (S) as a function of surfactant concentration. The species involved are: free dye (D_f), ion pairs (D⁺S⁻), premicellar aggregates (D⁺S_n⁻) and dye bound to the micelles (D_b), being D⁺S_n⁻=D_b for $n=N_{ag}$. The deactivation rate constants are k_f , k_{DS} and k_b for the free dye, the ion pairs and the dye bound to surfactant aggregates (premicelles or micelles), respectively.

On the basis of the mechanism proposed for this first range of surfactant concentrations, where no association/dissociation processes in the excited state are considered, the following equation is deduced to account for the variation of the fluorescence intensity (or absorbance) at a certain wavelength λ , $F(\lambda)$, with the total concentration of surfactant $[S]$, where $F_f(\lambda)$ and $F_{DS}(\lambda)$ are the fluorescence intensities (or absorbances) of the free dye and the ion pair, respectively, and K_s is the equilibrium constant for the ion-pair formation as defined in Scheme 4.

$$F(\lambda) = \frac{F_f(\lambda) + F_{DS}(\lambda)K_s[S]}{1 + K_s[S]} \quad (6)$$

A second range of surfactant concentrations can be distinguished where significant red shifts of both absorption and emission spectra together with intensity changes take place (see Figure 3). This concentration range can be considered to extend up to the CMC, although the spectral shifts are completed at lower concentrations. At higher surfactant concentrations the photophysical properties of the dye remain constant since all the molecules are bound to the micelles. Therefore, the changes observed within this second range of surfactant concentrations must be due to the gradual formation of a third species with photophysical properties similar to those of the dye bound to micelles. We assign these species to dye-surfactant premicellar aggregates of the type $D^+S_n^-$ with $2 \leq n \leq N_{ag}$ (note that $D^+S_n^- = D_b$ for $n = N_{ag}$). PCA of the reduced series of absorption and emission spectra corresponding to this range of surfactant concentrations yields three structural components, which would correspond to the three spectrally-distinct species present: free R123, ion-pairs D^+S^- and premicellar or micellar aggregates $D^+S_n^-$. At the lowest surfactant concentrations within this range the free R123 and the ion-pairs D^+S^- are the predominant species so that the photophysical properties observed are mainly contributed by these two species. As the surfactant concentration is increased, higher aggregates $D^+S_n^-$ appear and their size and concentration increases up to the CMC, where they are the main species in solution. The fact that aggregates $D^+S_n^-$ of different size n appear as only one spectrally distinct species in PCA indicates that the observed photophysical properties of the dye in small aggregates must be very similar to those in fully formed micelles. Already an aggregate of a small number of surfactants shifts the spectrum of the dye to that observed in micelles. The gradual changes observed in the spectra at concentrations below the CMC must then be due to a displacement of the equilibrium between the three species (see Scheme 4).

For a quantitative analysis of this kind of experimental data the main problem resides in the lack of a suitable theoretical model for micelle formation which takes into account the premicellar aggregation. For highly hydrophobic fluorescence probes which interact strongly with surfactant micelles, as for example pyrene, a Boltzmann-type sigmoid (equation (7)) has

been proved to be a satisfactory empirical fit function.²² The more or less abrupt change of the fluorescence properties of the probe at surfactant concentrations just below the CMC has been attributed to the association of the probe with some kind of premicellar aggregates, which convert into micelles at surfactant concentrations above the CMC.^{22, 23} The question of whether the formation of these premicellar aggregates is induced by the probe itself is still open, although a recent work predicted the existence of a surfactant concentration range of appreciable premicellar aggregation on the basis of a two-state thermodynamic model where free monomers are in equilibrium with aggregates of $n > 1$ being n a degree of freedom.²⁴

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/\Delta x}} + A_2 \quad (7)$$

Although equation (7) is used as empirical fit function, the parameters involved have been given a physical meaning when applied to the changes of a fluorescence property (dependent variable y) as a function of the total surfactant concentration (independent variable x).²² Thus, the limits of the sigmoid, A_1 and A_2 , correspond to the limiting values of the registered property (in our case, the absorbance or the fluorescence intensity) when the probe is outside or inside the micelles, respectively. The center of the sigmoid, x_0 , and the parameter Δx , which is related to the range of abrupt change of the dependent variable, are used to determine the CMC of the surfactant. For ionic surfactants, where the ratio $x_0/\Delta x$ is relatively high, the CMC value is obtained from equation (8) and corresponds to the surfactant concentration at the onset of the plateau given by A_2 .

$$\text{CMC} = x_0 + 2 \Delta x \quad (8)$$

Therefore, for a quantitative analysis of the absorption and fluorescence data of R123 in the presence of anionic surfactants we used equation (6) to fit the first range of surfactant concentrations, in which ion-pair formation takes place, and equation (7) to fit the rest of the data corresponding to the premicellization and micellization regions. The data at surfactant concentrations in between the two ranges were discarded in the fits to avoid distortions.

The fits were satisfactory (see Figure 5S and 6S in the Supporting information) and yield the values given in Table 5 for the equilibrium constant K_s of the dye-surfactant ion-pair formation and the CMC (calculated using equation (8)). The value of K_s is much higher for LAS than for SDS indicating a stronger interaction of R123 with the monomers of LAS, probably due to the aromatic nature of this surfactant. The result obtained for the CMC of SDS agrees with the literature value and that of LAS is very close to the value determined by conductivity measurements in our laboratory. This shows that, in spite of the strong electrostatic interactions between the cationic R123 and the anionic surfactants, the probe is suitable to determine CMC values of this kind of surfactants. As global analysis of the whole spectra were performed, the fits also yield the “pure” spectra of the species present which

are spectrally different: free R123 (parameter $F_f(\lambda)$ in equation (6)), ion-pairs D^+S^- (parameter $F_{DS}(\lambda)$ in equation (6)) and premicellar or micellar aggregates $D^+S^-_n$ (parameter A_2 in equation (7)). Both the absorption and the emission spectra obtained for free R123 are in perfect agreement with the experimental spectra. The spectra obtained for the R123 bound to the anionic micelles (Figure 4) are very similar for the two surfactants. From these spectra the fluorescence quantum yields of bound R123 are obtained (Table 7). For the ion-pairs red-shifted and broadened absorption spectra and weak fluorescence spectra are obtained (see Figure 7S in the Supporting information).

Table 5. Physicochemical parameters obtained in the global fits of equations(6) and (7) to the absorption and emission data of R123 with different concentrations of an anionic surfactant.

Surfactant	$K_S/10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$	CMC/ $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
SDS	0.31±0.02	8.2±0.2
LAS	13±1	0.80±0.05

Finally, the fluorescence lifetimes of R123 bound to anionic micelles are calculated as average of the lifetimes obtained at surfactant concentrations above the CMC (see Table 4 for SDS). These lifetimes are slightly longer than that of free R123 and very similar for the two anionic surfactants under study (Table 7).

2.4. Comparison of results

The results obtained in this study show that the strength of the interactions of the cationic dye R123 with micelles depends strongly on the head charge of the surfactant. The dye partitions between the aqueous phase and the micellar pseudo-phase in the case of nonionic and cationic surfactants, whereas it enters completely into the micelles of anionic surfactants. This much higher affinity of R123 to the negatively charged micelles is attributed to the strong attractive electrostatic forces cooperating with the typical hydrophobic interactions responsible for the entrance of the dye inside the micelles. Comparing nonionic and cationic surfactants, the binding equilibrium constants are much higher for the former (see Table 6). The small binding constants with cationic dyes can be also explained in terms of electrostatic forces, in this case repulsive, between the dye and the surfactant heads. Among the three nonionic surfactants under study, R123 has a higher affinity to the TX-100 micelles, probably due to the stronger hydrophobic interactions of the probe with the aromatic group present in this surfactant.

Table 6. Binding equilibrium constants of R123 with the micelles of different surfactants, as determined by PCGA of absorption and emission spectra.

$K / 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$	Absorption data	Emission data
R123+C₁₂E₇	16±3	16±2
R123+TX-100	65±4	65±3
R123+Brij 35	17±1	19±1
R123+DTAB	1.4±0.3	1.5±0.2
R123+CTAB	0.9 (f)	0.9±0.1

Now we will discuss the photophysical properties of the R123 bound to the micelles. Figure 4 shows the “pure” absorption and emission spectra of R123 bound to the different types of micelles under study, together with those of free R123. Significant red shifts of bound R123 with respect to free R123 are observed which are larger in the absorption spectrum and for cationic surfactants. Analogous shifts have been observed for this probe in long-chain alcohols.⁷ Within each type of surfactants (nonionic, cationic, anionic) the absorption and emission maxima of the different surfactants coincide quite well, indicating that the head charge of the surfactant determines the extent of the spectral shift more than the particular structure of the hydrophobic tail. Also the fluorescence lifetimes and quantum yields of R123 bound to the different types of micelles correlate with the head charge of the surfactant (see Table 7), with the exception of the nonionic surfactant TX-100, where both lifetime and quantum yield decrease with respect to free R123 whereas they increase in the case of the other nonionic surfactants. The derived values of the radiative and nonradiative deactivation rate constants show that the binding mainly affects the nonradiative processes (Table 7). For nonionic surfactants the nonradiative deactivation rate constants are somewhat smaller than that of free R123, except for TX-100 where it is much higher probably due to quenching processes provoked by the phenol ring of this surfactant. In the case of cationic surfactants there is a great increase of the nonradiative deactivation rate constant which can also be attributed to quenching processes by the counterions forming part of the micelles. Finally, for anionic surfactants there is a small increase of the nonradiative processes, probably due to the electrostatic interaction with the negative surfactant molecules.

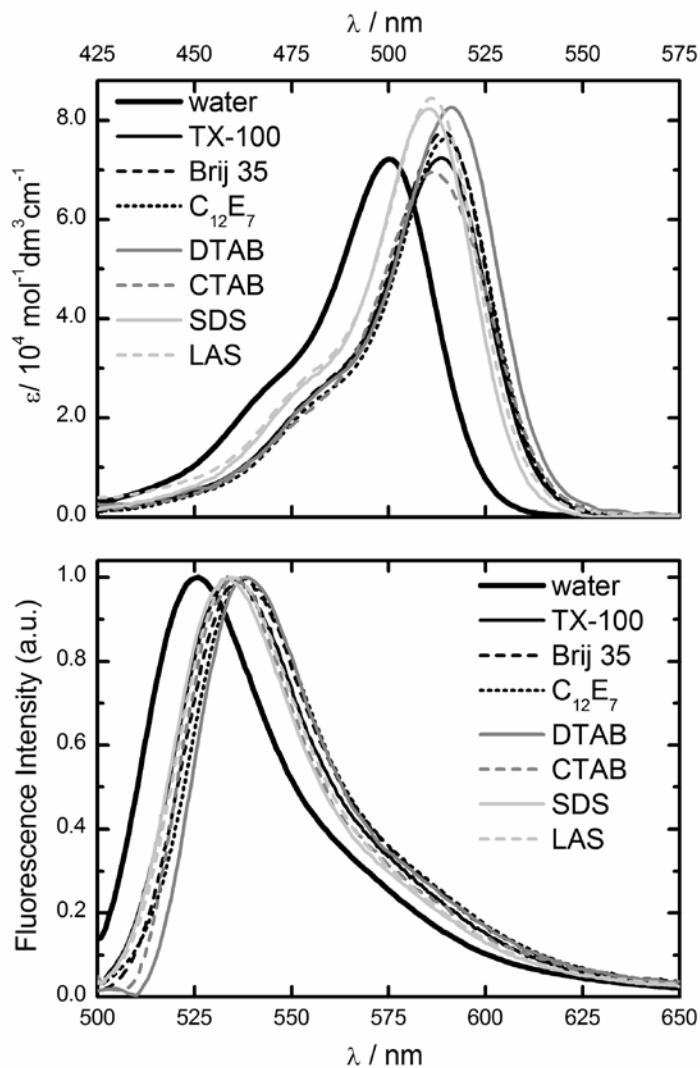


Figure 4. "Pure" absorption and fluorescence emission spectra of R123 in aqueous solution (thick black lines) and R123 bound to micelles of different types: nonionic (black lines), cationic (dark grey lines) and anionic (light grey lines) as obtained from PCGA (see text).

Table 7. Photophysical properties of R123 in aqueous solution and bound to micelles of different surfactants.

Solvent / Surfactant	ϕ	τ / ns	k_r / ns ⁻¹	k_{nr} / ns ⁻¹
Water	0.90	4.01±0.01	0.22	0.025
C ₁₂ E ₇	0.92	5.0±1.4	0.18	0.016
TX-100	0.67	2.7±0.2	0.25	0.12
Brij 35	0.92	4.7±0.3	0.20	0.017
DTAB	0.32	1.53±0.02	0.21	0.44
CTAB	0.50	1.4±0.2	0.36	0.36
SDS	0.82	4.349±0.003	0.19	0.041
LAS	0.85	4.47±0.03	0.19	0.034

3. Experimental

3.1. Materials

Rhodamine 123 (R123) was obtained from Sigma-Aldrich and was used without purification. The surfactants SDS, DTAB and CTAB were purchased from Sigma-Aldrich whereas TX-100 and Brij 35 were from Fluka BioChemika. The other surfactants, C₁₂E₇ and LAS, were kindly supplied by Henkel AG. The LAS used in this work is a so-called monodisperse sample of Linear Alkylbenzene Sodium Sulfonate with an alkyl chain length of 12 (molecular structure $H\text{SO}_3(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}((\text{CH}_2)_n\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_m\text{CH}_3)$ with $n+m+3=12$) and a high percentage (92.5%) of alkyl chains attached at the second carbon atom (i.e., $n=0$, $m=9$). The active matter content of this sample is 34.2% and the molecular weight of the surfactant 348. All the surfactants were checked for potential fluorescence impurities and were used without further purification. Solutions were prepared using Milli-Q water.

3.2. Sample Preparation

R123 stock solutions (10^{-4} - 10^{-5} M) were used within one or two weeks and were diluted to the adequate concentration in each experiment (about 10^{-6} M for absorption measurements and 10^{-7} - 10^{-8} M for time-resolved and steady-state fluorescence measurements). Even assuming a total association of the dye with the micelles, the low dye concentrations used guarantee mean occupation numbers lower than 1 for all the surfactants. Stock aqueous solutions of the surfactants were freshly prepared for the measurements at concentrations 5-100 times higher than the corresponding CMC by dissolving the necessary amount of surfactant in the diluted solution of R123. Then the measuring samples were obtained by

mixing different volumes of the surfactant stock solution with the diluted solution of R123. In this way a very good constancy of the R123 concentration in the measuring solutions was achieved. The measurements were performed immediately after preparation, especially with anionic surfactants, to prevent precipitation.

3.3. Absorption and Fluorescence Measurements

Absorption spectra were recorded using quartz cells with a path length of 10.0 mm in a Varian-Cary 300 spectrometer. The baseline was recorded with water in both sample and reference cells. The absorption spectra are given in units of molar absorptivity. Steady-state and time-resolved fluorescence measurements were obtained with an Edinburgh-Instruments F900 spectrofluorimeter, equipped with a Xenon lamp of 450 W as excitation source for steady-state measurements and a hydrogen-filled nanosecond flashlamp for lifetime measurements using the time-correlated single photon counting technique. Excitation wavelengths were 496 nm for steady-state emission spectra and 310 nm in time-resolved measurements. Fluorescence decays were measured at 525 nm. Fluorescence quantum yields were determined using Rhodamine B in ethanol as standard.²⁵ Radiative and nonradiative deactivation rate constants were obtained from the values of fluorescence quantum yields and lifetimes using the relation: $\phi = k_r \tau$. All experiments were carried out at (20±1)°C.

3.4. Data analysis

Series of absorption and emission spectra were measured varying the concentration of surfactant at a fixed concentration of R123. These experimental data were analyzed using a program developed in our group which applies Principal Components Global Analysis (PCGA).²⁶ The first step of PCGA is the Principal Components Analysis (PCA) which yields the minimal number of components that reproduce the experimental spectra, i.e. it allows one to determine the minimum number of chemical species that contribute to the spectra. This step helps to propose a mechanism which explains the observed variations necessary in the second step, the Global Analysis (GA). GA consists in the fit of the theoretical model to the whole series of experimental spectra to estimate the model parameters and the pure spectra of the contributing species.

Individual fits of fluorescence decays were performed with the software package from Edinburgh Instruments. The series of fluorescence decays measured at different surfactant concentrations together with the corresponding pulse responses were also fitted globally using a home-made program in Matlab.

All given uncertainties are the standard deviations estimated from the fits.

4. Conclusions

The interaction of the moderately hydrophobic cationic dye R123 with surfactants of differently charged head groups shows a behaviour of surprising variety. The simplest case is found with nonionic surfactants. Below the CMC, dye and surfactant molecules do not interact, whereas, once micelles are formed, the dye exchanges between the aqueous and the micellar phases with a partition equilibrium constant which depends on the strength of the hydrophobic interaction with the specific surfactant. In the case of cationic surfactants the behaviour is, at first sight, similar. The partition equilibrium constant is much lower than in the case of nonionic micelles, due to the electrostatic repulsion between dye and head groups. However, now the counterions play an important role acting as effective fluorescence quenchers already below the CMC. The most complex situation presents the interaction with anionic surfactants. The strong electrostatic attraction between dye and surfactant leads to the formation of ionic pairs with low quantum yield and reduced solubility at very low surfactant concentrations. At higher concentrations more and more small dye-surfactant aggregates are formed with photophysical properties similar to those of the dye bound to fully formed micelles. Above the CMC all the dye is included in micelles.

In view of this complex behaviour it is therefore important to stress that, although the spectral characteristics of R123 in the different micellar environments are quite similar, the type of interactions and the processes at microscopic level may be very different. The fluorescence intensity of R123 may be strongly quenched by counterions or by surfactant anions which has to be taken into account when R123 is used as fluorescent marker of intracellular localization. Moreover, the characterization of micellar systems with R123 as a hydrophobic dye in bulk or single molecule fluorescence studies may be complicated by the partition equilibrium and the formation of pre-micellar aggregates. In any case a thorough characterization of the dye-surfactant system at the full concentration range is necessary in order to avoid a misinterpretation of the spectral data.

Acknowledgments

Financial support by the *Ministerio de Ciencia e Innovación* is acknowledged (project CTQ2007-68057-C02-02_BQU). SF and JB thank the Xunta de Galicia and the Ministerio de Ciencia e Innovación for research scholarships.

Notes and references

Electronic Supplementary Information (ESI) available: additional figures cited here.

- 1 A. Chow, J. C. Kennedy, R. Pottier and T. G. Truscott, Rhodamine 123 - photophysical and photochemical properties, *Photobiochem. Photobiophys.*, 1986, **11**, 139-148.
- 2 M. Novo, S. Felekyan, C. A. M. Seidel and W. Al-Soufi, Dye-Exchange Dynamics in Micellar Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *J Phys Chem B*, 2007, **111**, 3614-3624.
- 3 R. Barnadas-Rodríguez and J. Estelrich, Photophysical changes of pyranine induced by surfactants: evidence of pre-micellar aggregates, *J Phys Chem B*, 2009, **113**, 1972-1982.
- 4 H. Zettl, Y. Portnoy, M. Gottlieb and G. Krausch, Investigation of Micelle Formation by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *J Phys Chem B*, 2005, **109**, 13397-13401.
- 5 N. O. Mchedlov-Petrosyan, N. A. Vodolazkaya and A. O. Doroshenko, Ionic equilibria of fluorophores in organized solutions: the influence of micellar microenvironment on protolytic and photophysical properties of rhodamine B, *J. Fluoresc.*, 2003, **13**, 235-248.
- 6 M. Deumié and M. El Baraka, Self-aggregation of R110 and R123 rhodamines with surfactants and phospholipid vesicles of negative charge: a qualitative fluorescence study, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1993, **74**, 255-266.
- 7 P. Pal, H. Zeng, G. Durocher, D. Girard, R. Giasson, L. Blanchard, L. Gaboury and L. Villeneuve, Spectroscopic and photophysical properties of some new rhodamine derivatives in cationic, anionic and neutral micelles, *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 1996, **98**, 65-72.
- 8 J. C. Micheau, G. V. Zakharova and A. K. Chibisov, Reversible aggregation, precipitation and re-dissolution of rhodamine 6G in aqueous sodium dodecyl sulfate, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6**, 2420-2425.
- 9 H. P. Tschanz, T. Binkert and U. Jörg, Untersuchung der Rotationsrelaxation von Rhodamin 6G in Wasser-Triton-X-100-Lösungen, *Rapport de la Société Suisse de Physique*, 1975, **26**, 663-666.
- 10 U. K. A. Klein and H. - Haar, Picosecond time dependent rotational diffusion of rhodamine 6G in micellar solution, *Chem. Phys. Letters*, 1978, **58**, 531-536.
- 11 A. J. W. G. Visser, K. Vos, A. Van Hoek and J. S. Santema, Time-resolved fluorescence depolarization of rhodamine B and (octadecyl)rhodamine B in triton X-100 micelles and aerosol OT reversed micelles, *J. Phys. Chem.*, 1988, **92**, 759-765.

- 12 E. L. Quitevis, A. H. Marcus and M. D. Fayer, Dynamics of ionic lipophilic probes in micelles: picosecond fluorescence depolarization measurements, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 5762-5769.
- 13 N. C. Maiti, M. M. G. Krishna, P. J. Britto and N. Periasamy, Fluorescence Dynamics of Dye Probes in Micelles, *J Phys Chem B*, 1997, **101**, 11051-11060.
- 14 J. L. DelaCruz and G. J. Blanchard, Understanding the Balance between Ionic and Dispersion Interactions in Aqueous Micellar Media, *J Phys Chem B*, 2003, **107**, 7102-7108.
- 15 K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, New York, 1987.
- 16 C. Honda, M. Itagaki, R. Takeda and K. Endo, Solubilization of pyrene in CnE7 micelles, *Langmuir*, 2002, **18**, 1999-2003.
- 17 P. C. Hiemenz and R. Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- 18 B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Germany, 2002.
- 19 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, USA, 2006.
- 20 B. L. Bales and R. Zana, Characterization of micelles of quaternary ammonium surfactants as reaction media I: dodecyltrimethylammonium bromide and chloride, *J Phys Chem B*, 2002, **106**, 1926-1939.
- 21 T. Asakawa, H. Kitano, A. Ohta and S. Miyagishi, Convenient estimation for counterion dissociation of cationic micelles using chloride-sensitive fluorescence probe, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, **242**, 284-287.
- 22 J. Aguiar, P. Carpena, J. A. Molina-Bolivar and C. C. Ruiz, On the Determination of the Critical Micelle Concentration by the Pyrene 1 : 3 Ratio Method, *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, **258**, 116-122.
- 23 L. Sahoo, J. Sarangi and P. K. Misra, Organization of amphiphiles, Part 1: Evidence in favor of pre-micellar aggregates though fluorescence spectroscopy, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2002, **75**, 859-865.
- 24 R. Hadgiivanova and H. Diamant, Premicellar aggregation of amphiphilic molecules, *J Phys Chem B*, 2007, **111**, 8854-8859.
- 25 F. López Arbeloa, T. López Arbeloa, M. J. Tapia Estévez and I. López Arbeloa, Photophysics of Rhodamines. Molecular Structure and Solvent Effects, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 2203-2208.

- 26 W. Al-Soufi, M. Novo and M. Mosquera, Principal component global analysis of fluorescence and absorption spectra of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole, *Appl. Spectrosc.*, 2001, **55**, 630-636.



Supplementary Information

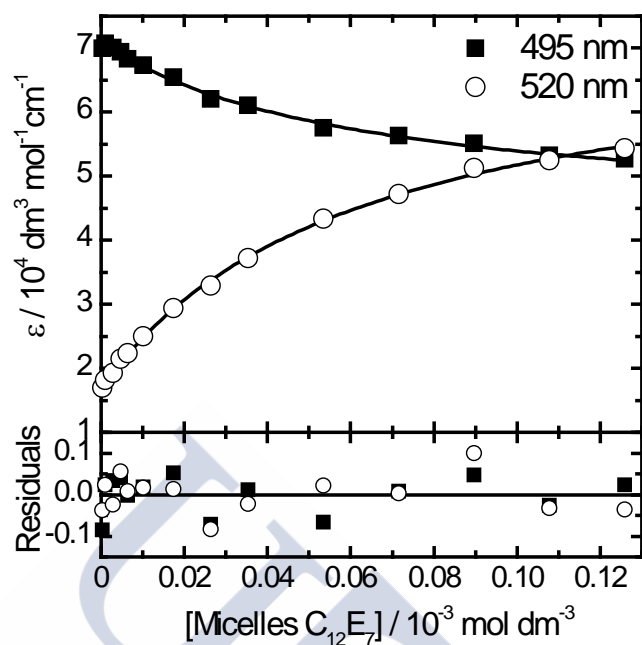


Figure 1S. Variation of the molar absorptivity at two selected wavelengths with the concentration of micelles of the nonionic surfactant C12E7. Symbols are the experimental data and lines are the fitted curves. The lower graph shows the corresponding residuals.

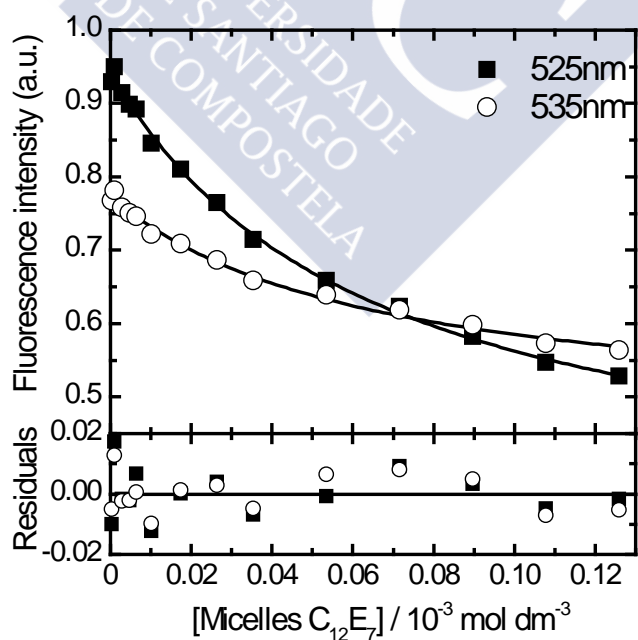


Figure 2S. Variation of the fluorescence intensity at two selected wavelengths with the concentration of micelles of the nonionic surfactant C12E7. Symbols are the experimental data and lines are the fitted curves. The lower graph shows the corresponding residuals.

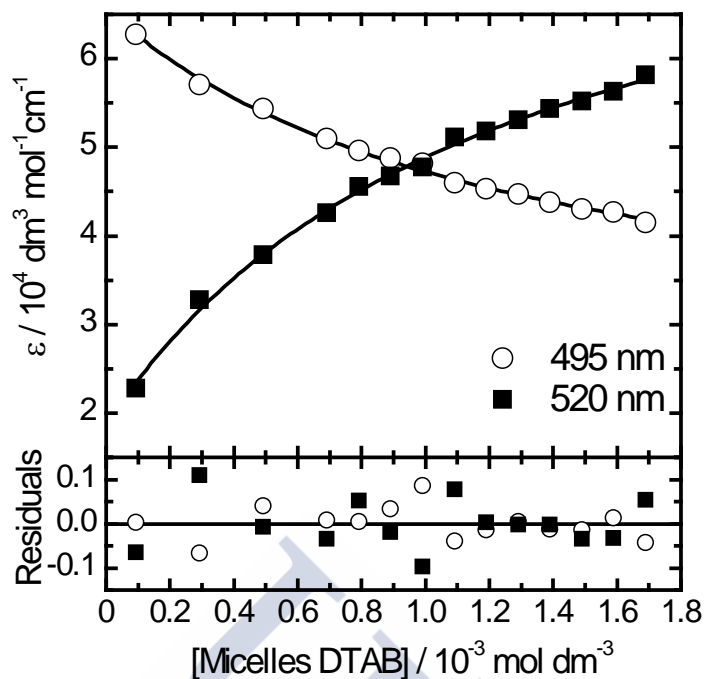


Figure 3S. Variation of the molar absorptivity at two selected wavelengths with the concentration of micelles of the cationic surfactant DTAB. Symbols are the experimental data and lines are the fitted curves. The lower graph shows the corresponding residuals.

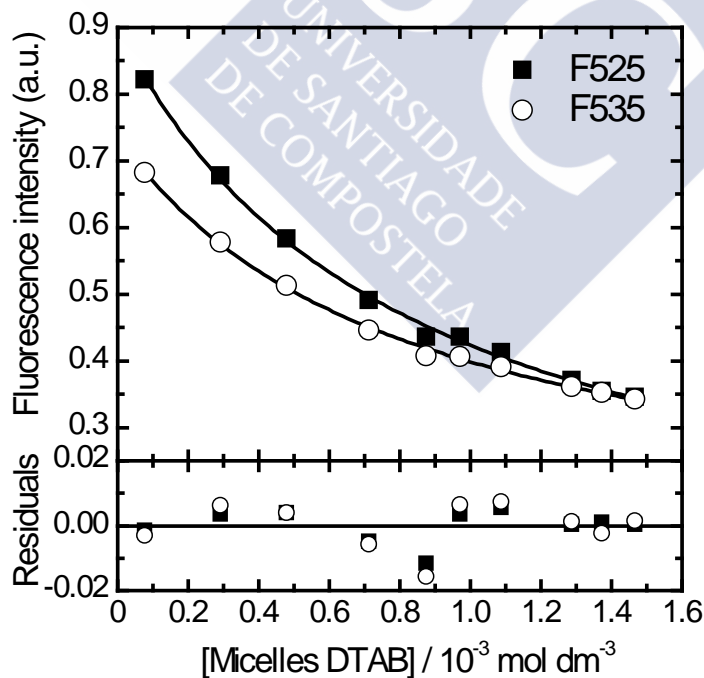


Figure 4S. Variation of the fluorescence intensity at two selected wavelengths with the concentration of micelles of the cationic surfactant DTAB. Symbols are the experimental data and lines are the fitted curves. The lower graph shows the corresponding residuals.

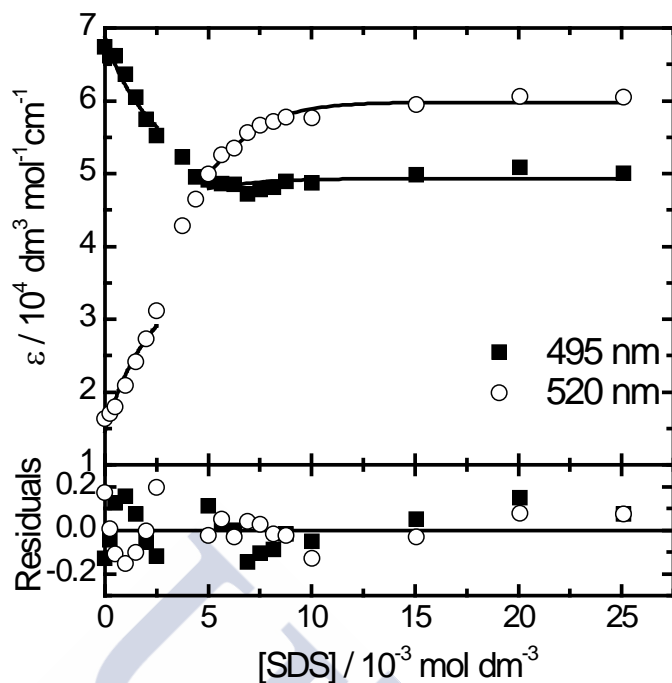


Figure 5S. Variation of the molar absorptivity at two selected wavelengths with the concentration of micelles of the anionic surfactant SDS. Symbols are the experimental data and lines are the fitted curves for the concentration ranges analyzed. The lower graph shows the corresponding residuals.

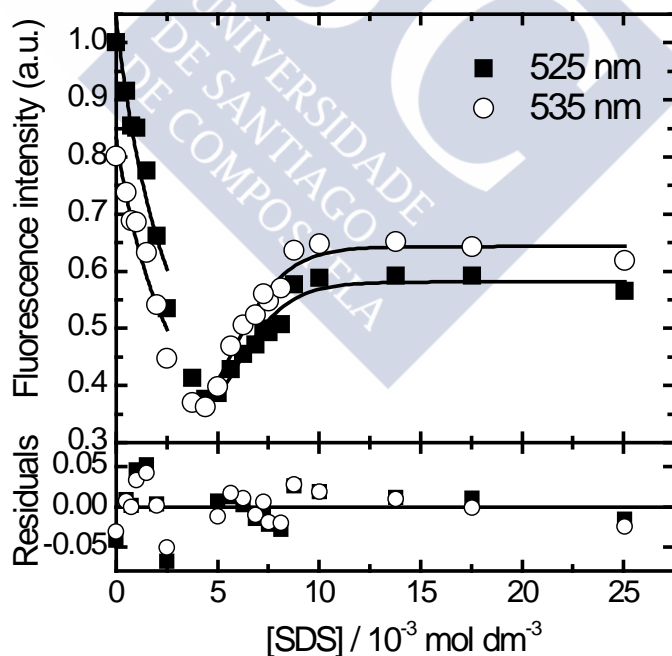


Figure 6S. Variation of the fluorescence intensity at two selected wavelengths with the concentration of micelles of the anionic surfactant SDS. Symbols are the experimental data and lines are the fitted curves for the concentration ranges analyzed. The lower graph shows the corresponding residuals.

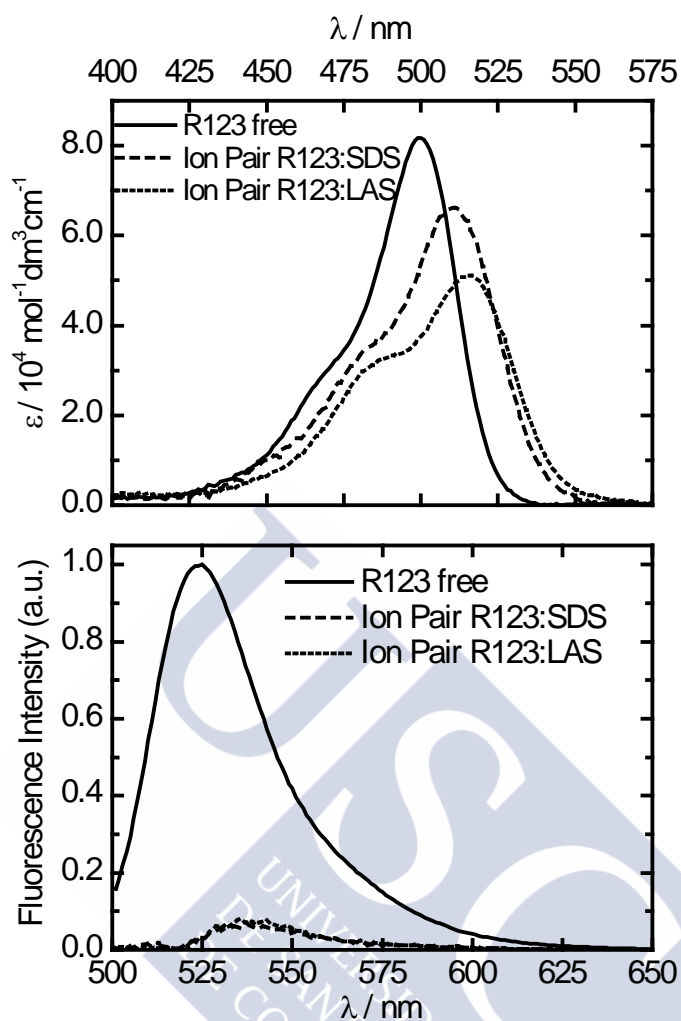


Figure 7S. “Pure” absorption (upper graph) and emission (lower graph) spectra of the ion-pairs D^+S^- formed by R123 with the anionic surfactants SDS and LAS compared to the spectra of free R123 in aqueous solution.

CAPÍTULO 6

Marcadores fluorescentes de fibras de β -amiloide

Contenidos

6.1. Estudio fotofísico de la Tioflavina T como marcador fluorescente de fibras amiloides (ARTÍCULO 3)	171
1. Introduction	172
2. Material and method	173
2.1. Materials	173
2.2. Sample Preparation	174
2.3. Absorption and Fluorescence Measurements	174
2.4. Data analysis	175
3. Results and discussion	176
3.1. Wavelength dependency of ThT fluorescence and absorption	176
3.2. Fluorescence properties of bound Thioflavin T	184
4. Conclusions	191
Acknowledgements	192
References	192
Supplementary Information	197

6.2. Avanzando hacia la detección ratiométrica de fibras de amiloide <i>in vitro</i> (ARTÍCULO 4)	201
1. Introduction	201
2. Results and Discussion	204
2.1. Photophysical behavior of HPIP in physiologically relevant aqueous solutions	205
2.2. Spectral ratio <i>SR</i> as a ratiometric magnitude sensitive to the surrounding medium	207
2.3. Binding of HPIP to amyloid fibrils and BSA	209
2.4. Comparison between HPIP and ThT as fluorescent markers of amyloid fibrils	217
3. Conclusions	219
4. Experimental Section	219
4.1. Materials	219
4.2. Sample preparation	220
4.3. Photostability of HPIP	221
4.4. Absorption and fluorescence measurements	221
4.5. Data analysis and fit functions	222
Acknowledgements	223
References	224
Supporting Information	226
6.3. Otros potenciales marcadores fluorescentes de fibras de β-amiloide	229
6.3.1. Comportamiento fotofísico en disolución acuosa a pH neutro	229
6.3.2. Comportamiento fotofísico en presencia de fibras amiloides	233

Continuando con el estudio de sistemas supramoleculares de interés biomédico, este capítulo se dedica a la caracterización del péptido β -amiloide(1-42) en su forma fibrilar. Se investigaron diferentes sondas fluorescentes como marcadores de las fibras de amiloide, analizando su idoneidad para la determinación de la concentración de las mismas. La detección y caracterización de los pequeños agregados tempranos de β -amiloide se presenta en el capítulo siguiente.

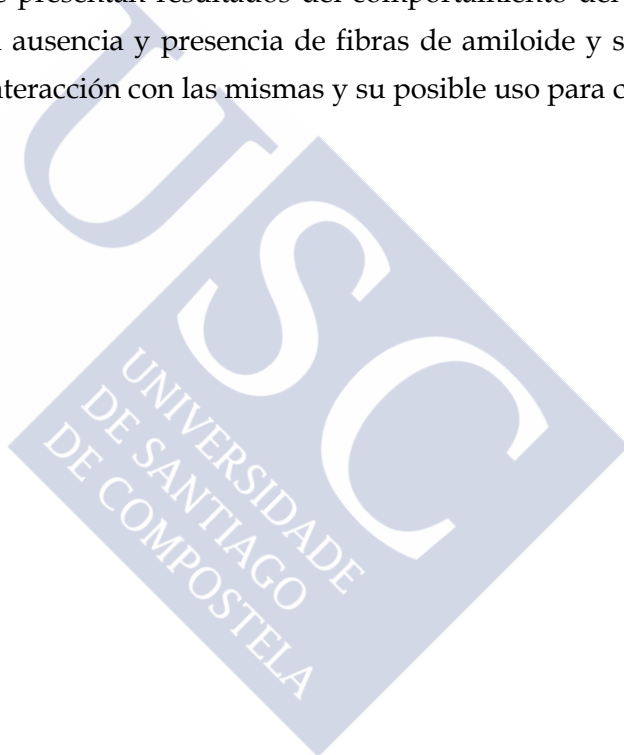
Actualmente, la forma más común de determinar la presencia de fibras amiloides *in vitro* es mediante el uso de la Tioflavina T (ThT), un marcador fluorescente de la familia de los benzotiazoles que muestra un gran aumento en su intensidad de fluorescencia al interaccionar con estos agregados fibrilares. A pesar de que este colorante ha sido ampliamente estudiado para poder determinar su comportamiento en presencia de amiloides, el mecanismo en el que se basa no es totalmente conocido. Por tanto, el primer artículo presentado en este capítulo se dedica al estudio fotofísico de la ThT como marcador fluorescente de fibras amiloides y a determinar su comportamiento en medios de distinta viscosidad y en presencia de proteínas. Mediante el análisis de distintas series de datos se obtuvieron las constantes de asociación de la ThT a las fibras amiloides y a la seroalbúmina bovina, como ejemplo de proteína no fibrilar, y se determinaron distintas propiedades fotofísicas como los rendimientos cuánticos y los tiempos de vida del colorante libre y de los complejos formados.

Debido a los inconvenientes que presenta la ThT para el marcaje de los agregados fibrilares, detallados en el artículo citado, se amplió la investigación caracterizando nuevos marcadores fluorescentes estructuralmente similares a la ThT. Concretamente, se estudiaron marcadores de las familias imidazol, tiazol y oxazol, que presentan propiedades muy interesantes al ser sondas de transferencia protónica muy sensibles al medio y con fluorescencia dual, lo cual posibilita la utilización de métodos ratiométricos. Debido a los interesantes resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo, nos centraremos en mayor medida en los imidazoles, dentro de los que se incluye el colorante HPIP.

Así, el segundo artículo incluido en este capítulo presenta un estudio detallado del HPIP en medio acuoso a pH neutro y en presencia de distintas proteínas, utilizando medidas de espectros de emisión y de anisotropía de fluorescencia. En las condiciones citadas, este fluoróforo presenta dos bandas de emisión de fluorescencia muy diferenciadas cuyos cambios en presencia de proteínas posibilitan el establecimiento de un parámetro ratiométrico muy sensible al medio que permite detectar y cuantificar la concentración de las proteínas. Este estudio se concluye con una exhaustiva comparación entre HPIP y ThT, con el fin de establecer sus ventajas e inconvenientes en cuanto a su uso como marcadores fluorescentes de fibras amiloides.

La capacidad de poder establecer un método ratiométrico para la cuantificación de proteína empleando el HPIP es una característica muy importante de este tipo de fluoróforos. Esta propiedad permite evitar interferencias propias del instrumento de medida, de la concentración de colorante, etc. Actualmente, el diseño de este tipo de marcadores fluorescentes se basa en obtener moléculas con dos o más bandas de emisión cuyas intensidades cambien con las propiedades del medio o la adición de otro componente. Esto permite establecer una relación de la intensidad de las bandas u otras relaciones espectrales.

Debido al interés de estos métodos ratiométricos, se incluyen en este capítulo estudios preliminares realizados con otras sondas de transferencia protónica, cuya interacción con fibras amiloides las convierte en posibles alternativas para su uso como marcadores fluorescentes de las mismas. Se presentan resultados del comportamiento del HBO, HBT y HPIP_NMe en medio acuoso en ausencia y presencia de fibras de amiloide y se detallan las características que definen su interacción con las mismas y su posible uso para cuantificarlas.



6.1. Estudio fotofísico de la Tioflavina T como marcador fluorescente de fibras amiloides (ARTÍCULO 3)

Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils

Sonia Freire, Marcus H. de Araujo, Wajih Al-Soufi and Mercedes Novo

Dyes and Pigments 2014, 110, 97-105

Abstract: Thioflavin T is a highly sensitive fluorescent marker of amyloid fibrils that has been widely used for in vitro biomedical assays. However, neither its complex photophysical behavior nor its binding mode to amyloid fibrils are still well understood. We present a detailed analysis of the photophysical properties of Thioflavin T in various media, including solvents and solvent mixtures of different viscosities as well as fibrillar and globular proteins. We propose a model that explains the strong wavelength dependency of the Thioflavin T fluorescence and the large fluorescence enhancement in certain environments. We determine the binding affinities and the fluorescence properties of Thioflavin T bound to amyloid- β (1-42) fibrils and to bovine serum albumin and discuss the sensitivity and the specificity of this probe to amyloid aggregates. These results allow us to assess the suitability of Thioflavin T for quantitative determinations in biomedical studies.

Abbreviations

A β 40 - Amyloid- β (1-40), with 40 aminoacids

HFIP - Hexafluoroisopropanol

A β 42 - Amyloid- β (1-42), with 42 aminoacids

LE - Locally excited state

BSA - Bovine serum albumin

PBS - Phosphate buffered saline

Buffer sol. - Buffer solution (PBS buffer of pH 7.2)

PCA - Principal Components Analysis

CT - Charge transfer

PCGA - Principal Components Global Analysis

DMSO - Dimethyl sulfoxide

ThT - Thioflavin T

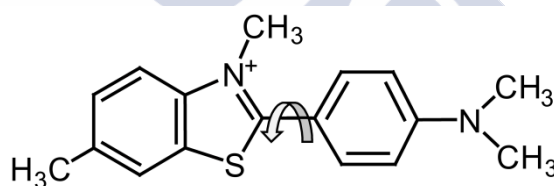
GA - Global Analysis

TICT - Twisted intramolecular charge-transfer

HAS - Human serum albumin

1. Introduction

The term amyloidosis refers to a group of diseases caused by misfolded proteins that accumulate in various tissues and organs leading to disruption of their normal function. These proteins form insoluble aggregates, called amyloid fibrils, which are characterized by a fibrillar morphology, β -sheet-rich structure and green birefringence upon staining with Congo Red [1]. The most common marker used for the detection of amyloid fibrils is Thioflavin T (ThT), a fluorescent dye of the benzothiazole family that shows a huge fluorescence enhancement upon binding to amyloid aggregates [2,3]. This dye can be used both for visualization and quantification of amyloid fibrils in vitro using fluorescence spectroscopy and for amyloid diagnosis in tissue sections using fluorescence microscopy [2]. ThT has also been used to monitor the fibrillation process [4,5], although recent studies suggest that the dye itself may promote amyloid aggregation [6]. Another disadvantage of ThT is its lack of interaction with amyloid oligomers and protofibrils [7], which have been proposed to be responsible for neurotoxicity rather than fibrils [8-10].



Scheme 1. Molecular structure of Thioflavin T with the torsion angle φ between the benzothiazole and the aminobenzene moieties.

The photophysical mechanism underlying the dramatic fluorescence enhancement of ThT upon binding to amyloid fibrils has been widely studied but is still controversial. Numerous studies postulate that ThT behaves as a molecular rotor, so that its fluorescence properties are determined by the extent of quenching of the locally excited (LE) state to a dark twisted intramolecular charge-transfer (TICT) state [3]. This quenching implies the twisting around the central C–C single bond (torsion angle φ) in the excited state [11], and is therefore highly dependent on the viscosity of the medium. The observed fluorescence enhancement of ThT in viscous solvents and in different confined environments, where the twisting process is hindered, support this hypothesis, as well as the low fluorescence quantum yields of this dye in non-viscous solvents [12-19]. Also the excited-state dynamics from LE to TICT state have been recently found to be correlated with the viscosity of the medium [20].

Notwithstanding this well founded hypothesis, in the last few years some reports have attributed the changes of ThT fluorescence upon binding to amyloid fibrils to the formation of highly fluorescent dimers, excimers or even micelles of ThT molecules [2,21]. Excimer formation is very unlikely since the lifetime of ThT bound to amyloid fibrils is too short. Also the formation of micelles by ThT is very doubtful and is not clearly supported by the published conductivity data [22]. Hence, in our opinion, the only plausible alternative hypothesis proposed so far would be that ThT binds to amyloid fibrils as dimers. However, dimers of ThT have still not been experimentally detected [23].

The binding mode of ThT to amyloid fibrils has been extensively studied in order to achieve a better structural understanding of amyloid fibrils as well as to explore the potential therapeutic use of this dye. Nevertheless, to date there is no conclusive model that accounts for the orientation and conformation of ThT when bound to amyloid fibrils [2]. Confocal microscopy studies suggested that ThT binds as monomer to amyloid fibrils such that their long axes are parallel [24]. On the basis of crystal structures contradictory results have been reported [25,26], but they are compatible with the existence of a binding region of ThT at the amyloid fibril surface [21]. Very recently the results obtained by Polarization-Resolved Fluorescence Microscopy using ThT as marker revealed polymorphism of insulin amyloid fibrils [27].

Among the many different amyloid-like peptides, those called amyloid- β were given most attention due to their primal role in the development of Alzheimer's disease as they accumulate as insoluble plaques among the neurons at the brain [28]. These deposits are formed mainly by peptides of 40 aminoacids ($A\beta_{40}$) and 42 aminoacids ($A\beta_{42}$), the latter being at a higher proportion [28-30]. The $A\beta_{42}$ shows a higher hydrophobicity and a much lower critical concentration for aggregation than $A\beta_{40}$, so that it aggregates very fast and has a high tendency to form fibrils [10,31,32]. In spite of its arduous handling, we have used $A\beta_{42}$ in this work due to its greater relevance in amyloid aggregation.

2. Material and method

2.1. Materials

Thioflavin T (ThT, Fluka) was used without further purification. Bovine serum albumin (BSA) was purchased from Sigma-Aldrich and human amyloid- β (1-42) ($A\beta_{42}$) from GenScript USA Inc. Phosphate buffered saline (PBS, pH=7.2, 150 mM NaCl) was used for the preparation of the amyloid- β samples. The solvents used, chloroform (Sigma-Aldrich) and glycerol (Panreac), had a purity of 99%. All aqueous solutions were prepared using Milli-Q water.

2.2. Sample Preparation

Stock solutions of ThT in the different solvents or solvent mixtures were prepared by weighing. The real dye concentration was determined experimentally from the absorbance in water using the reported value of $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the molar extinction coefficient of ThT in water at 412 nm [2]. These stock solutions were used within a few days and diluted to the adequate concentration in each experiment. The measurements showed in this work were performed at the following ThT concentrations: (a) PBS samples: 1.2 and $9.4 \mu\text{M}$; (b) chloroform samples: $1\text{-}2 \mu\text{M}$; (c) Glycerol-water mixtures: $2.2 \mu\text{M}$; (d) samples with A β 42 fibrils: 1.1 and $7.0 \mu\text{M}$ for fluorescence and $244 \mu\text{M}$ for absorption measurements; (e) samples with BSA: 2.4 and $3.1 \mu\text{M}$ for fluorescence and $12.2 \mu\text{M}$ for absorption and lifetime measurements.

Stock solutions of BSA and fibrillar A β 42 were freshly prepared for each experiment. The samples for the titrations were prepared by the dilution-extraction method beginning with the corresponding protein stock solution containing the desired concentration of ThT and diluting with a solution of ThT of the same concentration. Amyloid concentrations mentioned in this work refer to the total concentration of amyloid monomers used in the preparation of the sample.

For the preparation of amyloid- β fibrils we followed established protocols [33]. Firstly, potential aggregates that could be formed in the commercial peptide were broken up by hexafluoroisopropanol (HFIP). The amyloid was dissolved in HFIP at a concentration of 1 mg/ml and the solution was incubated during 1 hour with occasional mixing and then shaken for about 20 minutes. Next the solution was split up into several vials and the HFIP was removed under a stream of nitrogen. Vials were transferred into a desiccator and vacuum was applied to remove the remaining traces of HFIP. The resulting dried aliquots of monomeric peptide were stored at -20°C .

Stock solutions of the amyloid were prepared by suspending the peptide aliquot in dried dimethyl sulfoxide (DMSO) with a final concentration of $\approx 1 \text{ mM}$ and shaking it for about 15 minutes in order to dissolve the peptide. To prepare amyloid- β fibrils an aliquot of the DMSO stock solution was dissolved in PBS at pH 7.2. This sample was incubated at 37°C for 2 days under vigorous agitation.

2.3. Absorption and Fluorescence Measurements

Absorption spectra were recorded using quartz cells with path lengths of 3.00 and 10.0 mm in a Varian-Cary 100 spectrometer. All spectra were recorded using baseline correction with the corresponding solvent. Nevertheless, for the titrations with BSA and

A β 42, further correction of the experimental absorption spectra was required in order to subtract the contributions of protein absorption and light dispersion (only for the samples with A β 42). The absorption spectra are given in units of molar absorptivity.

Steady-state and time-resolved fluorescence measurements were performed using an Edinburgh-Instruments F900 spectrofluorimeter, equipped with a Xenon lamp of 450 W as excitation source for steady-state measurements and a picosecond diode laser 405-nm laser (Becker & Hickl GmbH, \approx 80 ps, 20 MHz) for lifetime measurements with the time-correlated single photon counting technique. Excitation and emission fluorescence spectra were corrected for the wavelength-dependent output of the Xenon lamp and the non-ideal response of the instrument, respectively. Additionally, all spectra were corrected for the solvent contribution, in order to remove the intense Raman bands appearing in the samples of very low quantum yields and the fluorescence of impurities in the samples with glycerol. The contribution of BSA and A β 42 autofluorescence was also subtracted. Fluorescence quantum yields were determined using Quinine Sulphate ($\phi=0.58$ in 0.1 M sulfuric acid) [34] or Coumarin 152 ($\phi=0.064$) [35] as standards for excitation wavelengths below and above 400 nm, respectively. For anisotropy measurements Glan-Thompson polarizers were used with a spectral range of 230-900 nm.

Both absorption and fluorescence measurements were carried out at $(25\pm 1)^\circ\text{C}$.

2.4. Data analysis

Most data processing was done with the program OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, US). The series of absorption and emission spectra obtained in the titrations were analyzed using a program developed in our group which applies Principal Components Global Analysis (PCGA) [36]. The first step of PCGA is the Principal Components Analysis (PCA) which yields the minimal number of components that reproduce the experimental spectra, i.e. it allows one to determine the number of chemical species that contribute to the spectra. This step helps to propose a mechanism which explains the observed variations. Global Analysis (GA) consists in the fit of the proposed theoretical model to the whole series of experimental spectra in order to estimate the model parameters and the pure spectra of the contributing species.

Individual fits of fluorescence decays were performed with the software package from Edinburgh Instruments. The series of fluorescence decays measured at different protein concentrations together with the corresponding pulse responses were also fitted globally using a home-made program in Matlab (*The MathWorks*, US).

The values of refractive index and viscosity of the solvents and glycerol-water mixtures were obtained from the literature [37-39].

Different properties Y (absorbance, fluorescence intensity, ...) were related to protein concentration $[H]$ by a 1:1 complexation model with binding equilibrium constant K and the limiting values of the property for free and bound dye, A and B , respectively:

$$Y = \frac{A + B \cdot K[H]}{1 + K[H]} \quad (1)$$

3. Results and discussion

The photophysical behavior of ThT is very complex, already in aqueous solution, but even more in the presence of BSA or A β 42-fibrils. In order to understand it the full picture has to be analyzed, comparing and explaining critically the results from multiple techniques in different solvents and environments. In the following the absorption, steady-state fluorescence emission, excitation and anisotropy spectra are analyzed in different media as function of excitation and emission wavelength, concentrations of BSA and A β 42-fibrils as hosts and the solvent viscosity in glycerol water mixtures. A model is described which gives a good explanation of the experimental findings and which is in line with results published by other authors.

3.1. Wavelength dependency of ThT fluorescence and absorption

Figure 1 shows fluorescence emission spectra measured at different excitation wavelengths, together with excitation spectra monitored at two emission wavelengths and the absorption spectra, of ThT in three environments: aqueous solution, chloroform and a concentrated solution of amyloid fibrils. Chloroform was chosen as an aprotic and relatively nonpolar solvent, opposite to water. Fluorescence emission maxima, quantum yields and anisotropy determined for each excitation wavelength are given in Table 1.

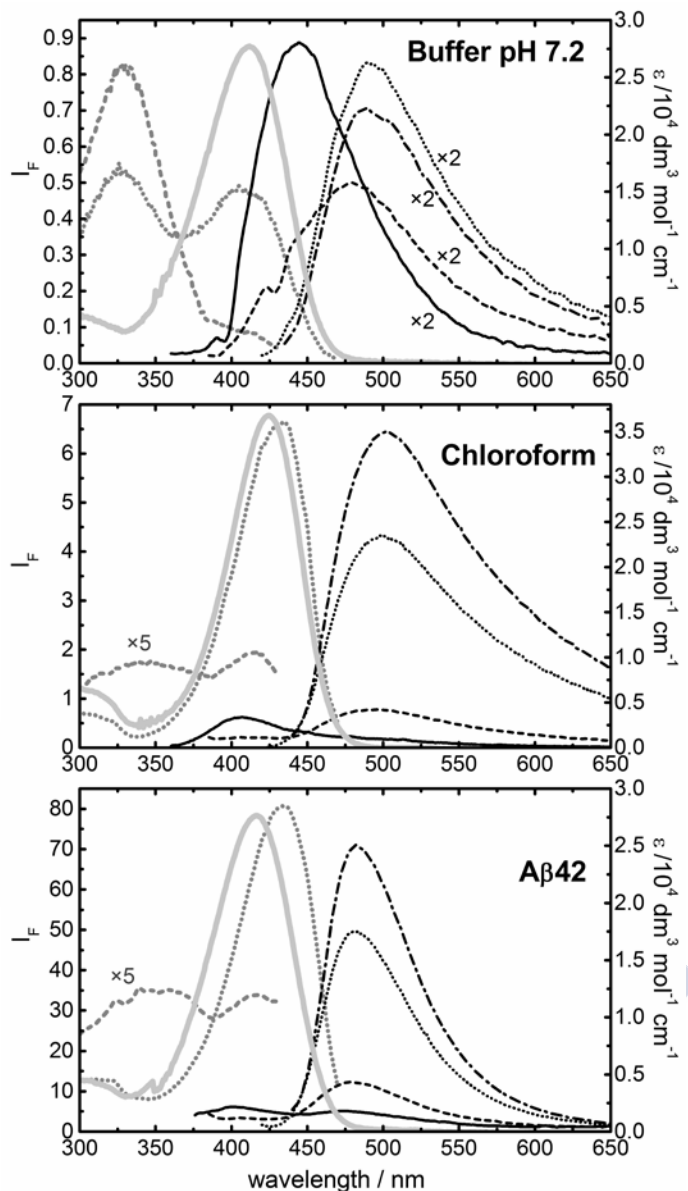


Figure 1. Absorption (light gray solid lines) and fluorescence excitation (dark gray lines on the left) and emission (black lines on the right) spectra of ThT in PBS buffer, chloroform and in the presence of an aqueous solution of A β 42 138 μ M. Excitation spectra monitored at 440-nm (grey dashed lines) and 480-nm (grey dotted lines). Emission spectra measured with excitation at 350 nm (black solid lines), 375 nm (black dashed lines), 410 nm (black dotted lines) and 430 nm (black dash-dot-dashed lines). Fluorescence intensity (left scale) was measured under the same experimental conditions for all three samples. Absorption spectra are given in units of molar absorptivity (right scale). Some spectra were multiplied by factors as indicated.

Table 1. Photophysical properties of ThT in aqueous solution (PBS buffer of pH 7.2), chloroform and a solution of A β 42 138 μ M: absorption maximum λ_{ab}^{max} , emission maxima for different excitation wavelengths λ_{em}^{max} , fluorescence quantum yield ϕ , and steady-state anisotropy r in the wavelength intervals 425-450 nm and 500-525 nm. The anisotropy values in brackets are averages of data with a clear tendency.

Thioflavin T	$\lambda_{ab}^{max}/\text{nm}$	λ_{ex}/nm	$\lambda_{em}^{max}/\text{nm}$	ϕ	r (425-450 nm)	r (500-525 nm)
		350	445	0.0017	≈ 0	(0.21)
Buffer solution	412	375	479	0.00086	-	0.31 \pm 0.02
		410	489	0.00033	-	0.36 \pm 0.01
Chloroform	425	350	407	0.016	0.09 \pm 0.01	(0.15)
		375	491	0.013	-	0.167 \pm 0.006
		410	498	0.017	-	0.149 \pm 0.005
Fibrillar amyloid- β (1-42) [A β 42]=138 μ M	416	350	402	0.077	0.252 \pm 0.007	(0.31)
			472			
		375	479	0.035	-	0.347 \pm 0.006
		410	482	0.048	-	0.350 \pm 0.002

The absorption spectra of ThT are very similar in the three samples, with only small shifts of their maxima λ_{ab}^{max} . The emission spectrum of ThT depends in all three media strongly on the excitation wavelength (black curves in Figure 1). When exciting at 350 nm, in the minimum of the absorption spectrum, an emission band in the range of 400-450 nm is observed (black solid curve), whereas excitation at the high absorbance wavelengths longer than 400 nm, leads to an emission band around 480-500 nm (black dotted and dash-dotted curves). These two emission bands are observed as a mixture when exciting in-between, for example at 375 nm (black dashed curve). In accordance to this, the observed emission maxima of ThT depend on the excitation wavelength in all three media (λ_{em}^{max} in Table 1). Moreover, the fluorescence quantum yields determined from these experimental emission spectra show significant differences depending on the excitation conditions (ϕ in Table 1). It is remarkable that the fluorescence quantum yield at 350-nm excitation is comparably high, in spite of the low or similar intensity of the corresponding emission spectra. This turns out to be the result of the much lower absorbance of ThT at 350 nm as compared to the other excitation wavelengths (see solid grey curve in Figure 1).

So far, the dependency of the emission spectra on the excitation wavelength hints to the presence of at least two ground-state species of ThT of different photophysical properties, one (type 1) with low absorbance at lower wavelengths but a comparably high quantum

yield and another (type 2) with high absorbance at higher wavelengths but lower quantum yield.

This observation is confirmed by the excitation spectra. In PBS buffer the excitation spectra have always a well-defined band at 330 nm that decreases in intensity as the recording emission wavelength is increased, at the same time that a second excitation band at about 410 nm appears. The excitation spectrum monitored at 440 nm (grey dashed curve) would be due to the first, highly emissive species, absorbing very weakly in the 300-350 nm range, which is therefore not detected in the absorption spectra. The excitation band followed in the 480-nm emission band (grey dotted curve) corresponds then to a mixture of the emissions of the first species and of the second, strongly absorbing species that is the main responsible for the overall observed absorption.

For chloroform and amyloid fibrils the behavior is similar, although the short-wavelength excitation and emission bands are less intense than in aqueous solution and two emission bands can be distinguished when exciting at 350 nm (black solid curves in Figure 1). In buffer, the much higher fluorescence quantum yield of the first species, emitting at short wavelengths, in comparison to the second, red emitting species (Table 1) explains then that the short-wavelength excitation band is so visible in aqueous solution.

A first, simple hypothesis that assigned the short-wavelength excitation and emission bands to impurities [40] is not convincing since these bands are still present with similar contributions after thorough recrystallization of ThT [2].

Recently, Maskevich et al. proposed an alternative explanation for the wavelength dependency of ThT fluorescence in aqueous and alcoholic solutions, which is based on the existence of two types of ground-state conformers: one with a torsion angle φ between the benzothiazole and the aminobenzene moieties (Scheme 1) close to 90° or 270° , and another one with a unified π -electron system corresponding to the energy minima at the torsion angles of 37° and 145° , and 217° and 325° [12]. In the first type of conformers the benzothiazole and aminobenzene rings would behave as independent chromophores and therefore, show absorption and emission bands at shorter wavelengths than the second type of conformers with an integrated system of π -conjugated bonds, which would be responsible for the observed strong absorption band and the corresponding long-wavelength, low-energy, emission. Quantum-chemical calculations showed that the methyl group bound to the nitrogen of the benzothiazole ring accounts for the low energy barrier separating the two types of conformers with minimum energy, so that the fraction of conformers with torsion angle about 90° or 270° is not negligible at room temperature [41]. These are, however, results obtained for the gas phase.

The two species observed in the emission and excitation spectra can be readily assigned to the two conformers. This model explains very nicely the basic photophysical behavior of ThT observed so far in the different environments.

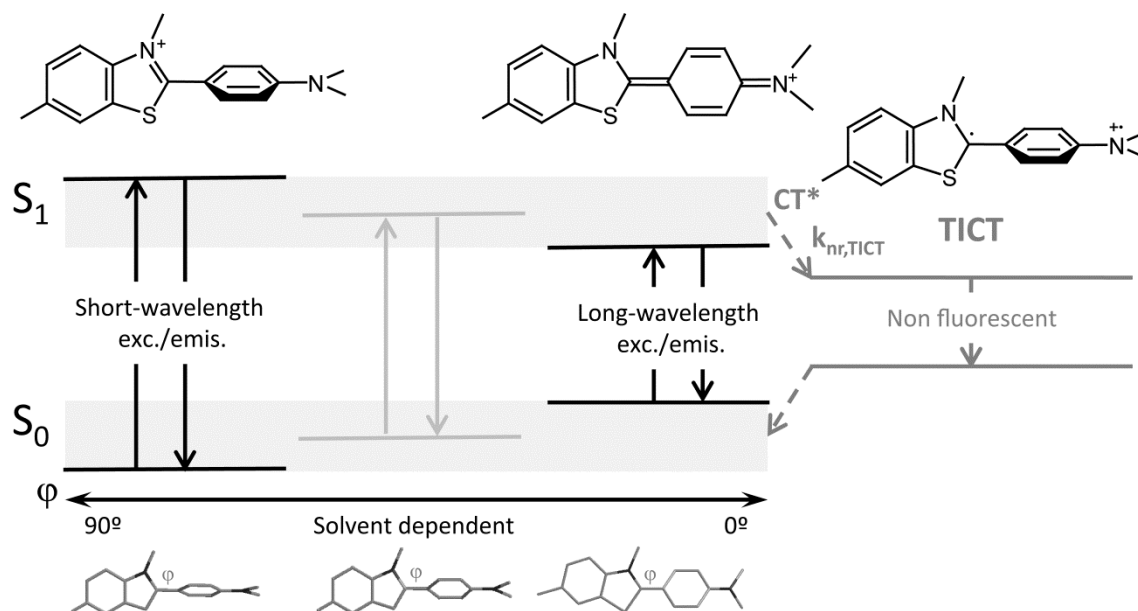
However, some experimental details show that this model with only two, well defined, conformers is not sufficient. The excitation spectra measured in chloroform and with A β 42 at the longer 480-nm emission are atypical, as far as they show a small but significant red shift with respect to the corresponding absorption spectrum. For amyloid solutions it was proven that this red shift increases further with increasing monitoring emission wavelength (data not shown). In a two species model the absorption spectrum would be the weighted mean of that of the two species and would be expected to be broader but not shifted with respect to the excitation/absorption spectrum of one of the species.

The influence of the solvent polarity on the absorption and emission maxima is small, except for the emission at short wavelengths that is blue shifted in chloroform and amyloid fibrils as compared to aqueous solution (Table 1). On the contrary, a great effect is observed in the fluorescence quantum yields that are at least one order of magnitude higher in chloroform than in buffer.

Anisotropy emission spectra determined for the different excitation wavelengths give additional information about the photophysical behavior of ThT in the different media. In general, the anisotropy of the ThT fluorescence does not have a constant value throughout the emission range (Figure 1S in SI). When exciting at 350 nm the mean anisotropy of the short-wavelength emission can be determined in the range from 425 to 450 nm (Table 1), whereas increasing values are obtained at longer wavelengths. Excitation at 375 nm and 410 nm yields constant values of the anisotropy for the emission at long wavelengths (anisotropy in the range 500-525 nm, Table 1), which are higher than those of the short-wavelength emission. Both in aqueous solution and in the presence of amyloid the mean anisotropies at long wavelengths coincide and approach the anisotropy limit, whereas in chloroform they are significantly lower.

On the basis of these observations, an extension of the model described above is proposed (Scheme 2). Instead of two conformers, ThT presents at room temperature in a given environment a wider distribution of ground-state conformations, going from those with nearly perpendicular benzothiazole and aminobenzene moieties ($\varphi=90^\circ$ or 270°), which are responsible for excitation/emission at short wavelengths, to those almost planar ($\varphi=0^\circ$ or 180°), which correspond to excitation/emission at long wavelengths. The distribution of molecules among the different possible conformations depends in homogeneous solutions on the solvent polarity and temperature, being the perpendicular

ones better stabilized in polar solvents. In heterogeneous solutions (BSA, A β 42) the distribution depends also on the local microenvironment of ThT.



Scheme 2. Model proposed to explain the ground and excited-state behavior of ThT, which presents a distribution of conformations with different photophysical properties. Planar conformations can undergo charge transfer (CT) in the excited state to the nonfluorescent TICT state.

The observed absorption spectra are linear combinations of the spectra of the different conformers and depend therefore exclusively on their equilibrium concentrations and their molar absorptivities. The positions of the absorption maxima (Table 1) show that, in all three media, conformations approaching planarity that allow π -conjugation predominate in the ground state and are moderately dependent on the solvent polarity, as stated in the literature [12].

The strong wavelength dependency of the excitation and emission spectra is due to the very different excited-state behavior of the conformers that, in turn, depends strongly on solvent polarity and viscosity. Depending on the excitation wavelength, different conformational subpopulations are selected. At shorter wavelength ThT molecules with rather perpendicular conformations are excited, which show the typical emission of the benzothiazole moiety and its corresponding excitation band, characterized by relatively high fluorescence quantum yield and strong dependency on solvent polarity [42]. These conformations are favored in aqueous solution in comparison to chloroform, and are also observed in the concentrated amyloid solution. The blue-shifted emission maximum, higher

fluorescence quantum yield and increased anisotropy of ThT in the A β 42 solution with respect to the buffer solution (Figure 1 and Table 1) indicate that such conformers bind to the amyloid fibrils.

ThT molecules excited at longer wavelengths have close to planar conformations and emit from the locally excited state or deactivate by charge transfer to the nonfluorescent TICT state. Studies with similar benzothiazole derivatives support this mechanism and show that the presence of the methyl group at the nitrogen of the benzothiazole increases the electron-acceptor strength of this moiety as well as the amino group of the benzene moiety increases its electron-donor capacity [43,44]. The extent of the charge-transfer quenching process depends on the polarity of the medium, but, above all, on its viscosity or its ability to hinder the excited-state twisting process. In non-viscous solvents, such as water and chloroform, twisting is free and the fluorescence intensity depends on the stabilization of the TICT state by the solvent, which is more effective in aqueous solution. This transition of the excited planar ThT to the nonfluorescent TICT state is the reason for the very low fluorescence quantum yield of ThT in aqueous solution (Table 1). By contrast, ThT bound to amyloid fibrils seems to be locked to nearly planar conformations and cannot undergo the twisting process. Therefore it emits from the locally excited state with high fluorescence quantum yield. The high anisotropy value obtained in this case (Table 1), close to the limit and much higher than that in chloroform, confirms this explanation.

The long-wavelength emission of ThT in aqueous solution presents a very high anisotropy in spite of its free rotation. This might be due to the fact that the observed very weak emission corresponds to the small subpopulation of molecules that have planar conformation in the ground state and emit from the same excited-state conformation without being quenched by rotation.

The selective excitation of specific conformers allows for a plausible explanation of the red shift of the ThT excitation spectra with respect to the absorption spectrum in solutions of A β 42 fibrils. The absorption spectrum in this medium corresponds to the wide distribution of conformers of both free and bound ThT, weighted by concentration and absorptivities. Only a small fraction of ThT is in a conformation with torsion angles low enough to lead to absorption at higher wavelengths. However, the excitation spectrum is additionally weighted by the quantum yield, which is especially high for low torsion angles. Therefore, the excitation spectra recorded at higher emission wavelengths selectively represent those highly emissive conformations, not distinguishable in the absorption spectrum due to their low contribution.

From this notably complex photophysical behavior it can already be concluded that ThT is not a suitable probe for the *quantitative* determination of amyloid fibrils. All fluorescence properties show a strong wavelength dependency caused by a complex ground and excited-state behavior that makes it difficult to establish reference values. Moreover, the large fluorescence enhancement upon binding to amyloid fibrils that makes ThT a remarkable marker is also a challenge since the fluorescence properties of bound ThT cannot be easily related to those of the practically non-fluorescent free dye.



3.2. Fluorescence properties of bound Thioflavin T

In this second part of the work we determine the binding constant of ThT to A β 42 fibrils and the photophysical properties of the bound dye. These results are compared with those obtained for ThT bound to a non fibrillar protein and with the fluorescence properties of this dye in viscous media. The aim is to examine the difference between the fluorescence of ThT bound to amyloid fibrils as compared to other rigid media as well as to analyze the specificity of the dye to such fibrillar structures. Glycerol-water mixtures were used to obtain homogeneous media of increasing viscosities.

Figure 2 shows the fluorescence titrations of ThT in aqueous solution with increasing volume percentage of glycerol, concentration of BSA or concentration of A β 42. All measurements were performed under similar excitation conditions around the corresponding absorption maxima so that mainly the long-wavelength emission is observed (see above). The emission spectra (grey curves, upper wavelength scale) are very similar in all three media, although broader for glycerol and BSA than for amyloid solutions. The emission maxima are slightly blue shifted in the order glycerol, BSA and amyloid. There is also a huge fluorescence enhancement (open circles in Figure 2) that follows a typical complexation profile both for BSA and for A β 42. This increase in fluorescence is attributed to the binding of ThT to the peptides and a resulting steric hindrance for the dye to undergo the twisting process. By contrast, in glycerol-water mixtures the increase of the fluorescence intensity becomes only noticeable at high volume percentages of glycerol, where the viscosity increases enough to hinder the formation of the dark TICT state.

Absorption titrations (Figure 2S in SI) show slight but systematic variations of the absorption spectrum of ThT in aqueous solution as the volume percentage of glycerol or the concentrations of BSA or A β 42 are increased. A red shift is observed in all three media, indication for the redistribution of the ground-state equilibrium conformations with increasing contributions of planar conformations as the rotation is more and more hindered by the medium. In the case of BSA and A β 42 these variations are due to the binding of ThT and suggest again that approximately planar conformations bind preferably to the peptides. For the glycerol-water mixtures the spectral variations are more significant at low volume percentage of glycerol, in contrast to the fluorescence enhancement (Figure 2), indicating that they are induced by polarity changes rather than by viscosity effects.

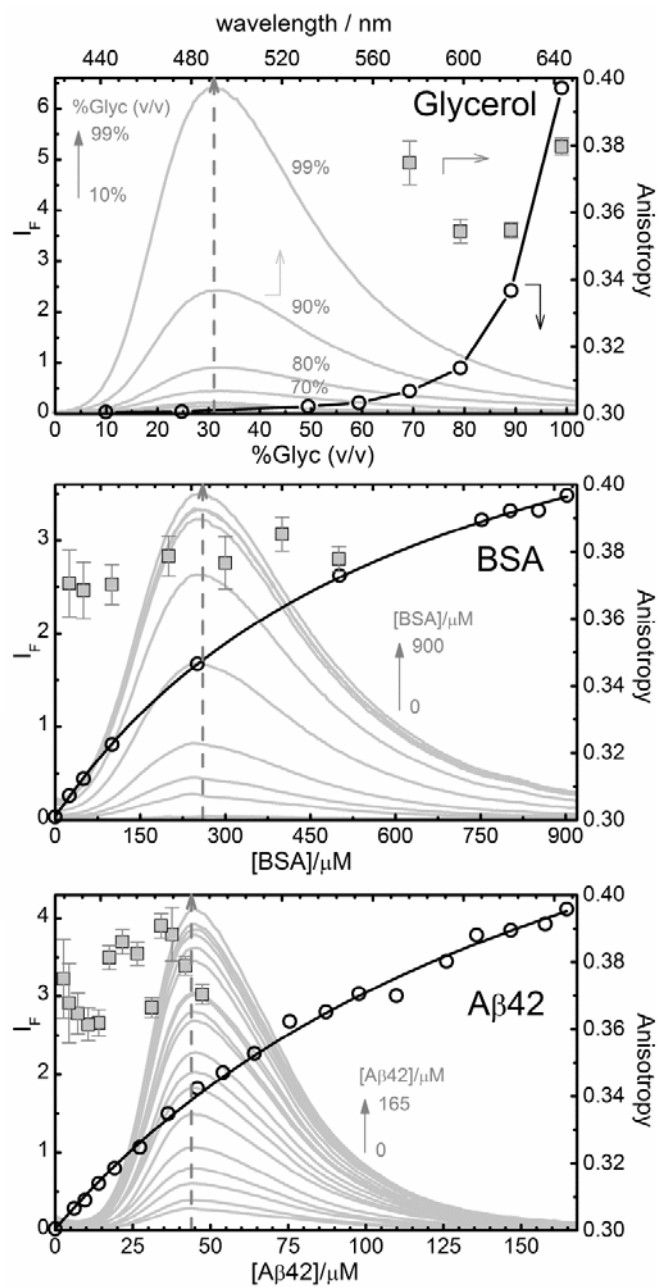


Figure 2. Fluorescence emission spectra (grey lines, upper scale) obtained in the titrations of ThT in aqueous solution with glycerol, BSA and A β 42. The open circles represent the fluorescence intensities of ThT at the emission maximum as a function of the volume percentage of glycerol or the concentrations of BSA and A β 42 (lower scale). In the case of BSA and A β 42 the solid black lines were obtained by the fit of a 1:1 complexation model (eq. (1)) to the experimental data (for the parameters see text). The grey squares are the mean anisotropy values r of ThT determined in the emission range 500-525 nm. All measurements were performed with an excitation wavelength of 410 ± 10 nm, except for the anisotropy at different concentrations of A β 42, where 450 nm was used. Left scale: fluorescence intensity; right scale: anisotropy; bottom scales: volume percent or concentration; top scale: wavelength.

Table 2. Photophysical properties of ThT in different media under excitation at 410 ± 10 nm: absorption maximum $\bar{\nu}_{ab}$, emission maximum $\bar{\nu}_{em}$, steady-state anisotropy r (mean values of emission at 500-525 nm), fluorescence quantum yield ϕ , and fluorescence lifetimes τ (emission wavelength 490 ± 10 nm) with their corresponding contribution to fluorescence. The values given for BSA and A β 42 were obtained from global analysis of the corresponding series of absorption and emission spectra and of fluorescence decays (see text). The last column shows the apparent binding constants K of ThT to BSA and A β 42.

ThT	$\bar{\nu}_{ab}/\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_{em}/\text{cm}^{-1}$	r	ϕ	τ_1/ns (%fluor)	τ_2/ns (%fluor)	$K/$ $10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$
Buffer sol.	24270	19960	0.36 ± 0.01	0.00033	0.023 ± 0.001 (81)	1.42 ± 0.03 (19)	-
Chloroform	23530	19570	0.149 ± 0.005	0.017	0.058 ± 0.001 (46)	0.68 ± 0.04 (54)	-
99% Glycerol	23530	20240	0.381 ± 0.003	0.15	0.286 ± 0.003 (54)	0.685 ± 0.008 (46)	-
BSA	24100	20370	0.378 ± 0.004	0.055	0.566 ± 0.006 (40)	2.225 ± 0.007 (60)	1.35 ± 0.01
Fibrillar A β 42	23920	20580	0.350 ± 0.002	0.31	0.82 ± 0.01 (10)	2.37 ± 0.01 (90)	5.85 ± 0.07

In order to obtain the binding equilibrium constants and the spectra of ThT bound to BSA and to A β 42, the whole series of emission spectra were analyzed with PCGA. PCA confirmed that each series can be reproduced by a linear combination of two components that are assigned to free and bound ThT. Then a 1:1 complexation model (eq. (1)) was used as fit function in the global analysis of each series of emission spectra, yielding the binding constant K (Table 2) and the “pure” emission spectra of free and bound dye (Figure 3 and 3S in SI). Using a similar procedure, the series of absorption spectra (Figure 2S in SI) were analyzed with PCGA yielding the “pure” absorption spectra also shown in Figure 3 (K was fixed to the value obtained from emission data since the variations of the absorption spectrum are too small for a free fit of K). It was checked that the spectra obtained for the free dye coincide with those measured experimentally.

The binding equilibrium constants determined with this analysis are given in Table 2. They are apparent constants resulting from the contribution of the different microscopic constants of each individual conformation and binding site. In the case of BSA, there is a

good agreement with the value found in the literature [16]. No data are available for A β 42, but the value obtained is significantly lower than those reported for other amyloid fibrils [2]. Nevertheless, it must be noted that most literature values are obtained by linearization methods such as Scatchard plots that imply strong assumptions and have high uncertainties. Moreover the high ThT concentrations that are often used lead to erroneous results, as already pointed out by other authors [12].

On the basis of these binding constants we can discuss the specificity of ThT to amyloid fibrils and assess its cross-sensitivity to other proteins. There are some reports that point to nonspecific binding of ThT but they lack quantitative data [22,24,45]. The affinity of the dye to A β 42 fibrils is only about 4 times higher than to the α -helical protein BSA (Table 2). Furthermore, the binding constant of ThT to human serum albumin (HSA) is about 100 times than to BSA [16]. In a mixture of A β 42 fibrils with BSA or HSA, a significant fraction of ThT would also bind BSA and almost of the dye would bind HSA. Therefore, the affinity of ThT to amyloid fibrils alone does not support its consideration as a specific probe for such fibrillar structures. We will now analyze the photophysical properties of the dye bound to amyloid fibrils in order to evaluate whether they are distinct enough to specifically discriminate these peptides.

Figure 3 (and 3S in SI) compares the spectra obtained for ThT bound to BSA and to A β 42 with those measured in other media. Their corresponding maxima are given in Table 2. The absorption spectra (grey curves in Figure 3) are very similar for all media, with a slight shift of about 700 cm^{-1} in glycerol and chloroform with respect to aqueous solution and nearly no shift for bound ThT. Thus no strong solvent dependency of the absorption maximum is observed, as stated in the literature [12]. The normalized emission spectra show also only small changes of their maximum with the environment, but are clearly different in their width. ThT bound to A β 42 (solid black line) has the narrowest fluorescence band of all them, with a half width of 2800 cm^{-1} , significantly smaller than for BSA and glycerol (dotted and dash-dot-dotted lines, half width \approx 4000 cm^{-1}). This difference in width suggests that the molecules of ThT bound to the amyloid fibrils are restricted to some subset of conformations with very uniform fluorescence properties. The fibrillar structure may favor particular conformations, probably those close to planarity. By contrast, the high viscosity of glycerol or the binding to BSA do not have such a selective effect. These spectral differences between ThT bound to A β 42 and ThT bound to BSA may be exploited for the discrimination of different types of peptide.

In aqueous solution and in chloroform there is an enhancement of the red emission resulting in band half widths that are nearly twice that in amyloid fibrils. This weak red emission becomes visible in the normalized spectra of these samples because of the much

lower fluorescence quantum yield of the blue emission (Table 2). At 410 nm the perpendicular conformations are not effectively excited and in any case their emission is located at lower wavelengths (see Figure 1). Therefore this weak low-energy emission might be due to limiting ThT conformations or to an exiguous fluorescence of the TICT state.

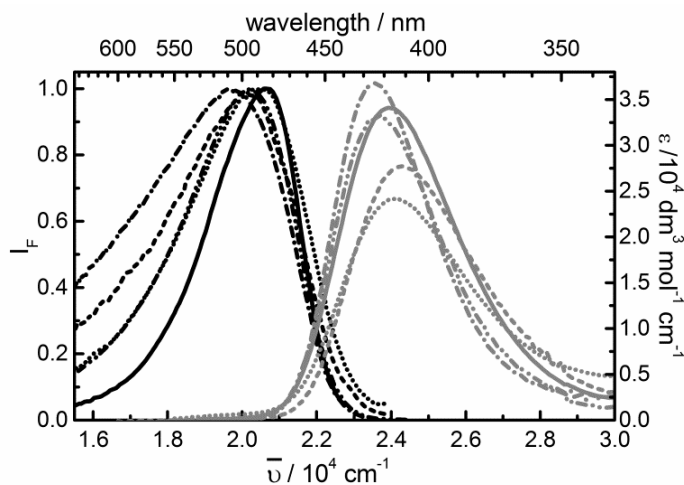


Figure 3. Absorption (grey lines) and normalized fluorescence emission spectra (black lines) of ThT in different media under excitation at (410 ± 10) nm. The spectra of ThT in PBS buffer (dashed), chloroform (dash-dotted) and 99% glycerol (dash-dot-dotted) were measured directly. The spectra of ThT bound to BSA (dotted) and to A β 42 (solid) are “pure” spectra obtained by global analysis of the corresponding series of absorption and emission spectra. (The spectra have been transformed to wavenumber taking into account the variation in bandpass $I_F(\bar{\nu}) = \lambda^2 I(\lambda)$ [34]. Spectra in the wavelength scale are given in Figure 3S in the SI.

Using the absorption and emission “pure” spectra determined above for ThT bound to BSA and A β 42 and the experimental spectra of ThT in the different solvents and mixtures, the fluorescence quantum yields of ThT in the different media were calculated (Table 2 and open circles in Figure 4). The values obtained for the pure solvents agree quite well with reported data [12]. For glycerol-water mixtures we obtain significantly higher absolute quantum yields than those found in the literature [13]. This can be due to the different experimental conditions and quantum-yield standard used. Nevertheless, the viscosity dependence coincides with that reported, with an increase in ϕ of nearly 3 orders of magnitude from aqueous solution to 99% glycerol that is explained by the increasing hindrance of TICT formation as the solvent becomes more viscous (Figure 4 and Scheme 2).

ThT bound to A β 42 shows the highest fluorescence quantum yield of all media (Table 2), with a value similar to those reported for other amyloid-type peptides [17,46,47]. In this case

TICT formation is hindered due to the binding of the dye to the amyloid fibrils. When ThT binds to BSA the increase of ϕ is smaller. This might be due to a weaker dye-protein interaction or to the different binding mode of ThT with non fibrillar proteins.

The fluorescence lifetimes determined for ThT in the different solvents and mixtures are shown in Table 2 and Figure 4. In all cases two lifetimes were necessary to fit the experimental decays. In aqueous solution the main contribution is from a species with very short lifetime that is attributed to planar conformations undergoing a rapid conversion to the dark TICT state, whereas the second longer lifetime could be due to a small fraction of the brighter perpendicular conformations (Scheme 2). Similar lifetimes are obtained in chloroform, although in this case they have equal contributions to the total fluorescence, in contrast to aqueous solution.

For the glycerol-water mixtures also two lifetimes are obtained (Figure 4 and Table 2). The shorter one increases as the glycerol percentage is increased and contributes with about 90% to the measured fluorescence except at the highest glycerol percentages. The viscosity dependence of the lifetime is similar to that of the corresponding fluorescence quantum yield and can be explained likewise (Scheme 2). At low viscosities ThT has a short lifetime due to a conversion to the TICT state that is faster than the radiative deactivation. The twisting process is progressively more hindered as the viscosity is increased so that the TICT formation becomes slower and competes with the radiative deactivation leading to a longer lifetime. Neglecting the contribution of the second longer lifetime to the observed fluorescence, the nonradiative rate constant $k_{nr} = (1 - \phi) / \tau_1$ can be estimated from ϕ and τ_1 in these mixtures (black triangles in Figure 4). The results show that k_{nr} , which is a measure of the conversion rate to the TICT state $k_{nr,TICT}$, drops very rapidly as the viscosity increases, reflecting the raising hindrance for the excited-state twisting process. This estimation is not valid for the highest volume percentages of glycerol since there the contribution of the second lifetime is not negligible. Similarly to the other solvents, this longer lifetime can be attributed to perpendicular conformations with relatively high fluorescence intensity. The lifetimes obtained for ThT in 99% glycerol (Table 2) are compatible with those reported at other temperatures [13].

For BSA and A β 42 time-resolved fluorescence titrations were performed by varying the protein concentration at a constant dye concentration. All decays are biexponential (apart from minor contributions associated to BSA impurities) and show the same two lifetimes but increasing amplitudes as the concentration of the peptide is increased. These results indicate that there are two emitting species in the presence of A β 42 (or BSA) that behave as expected for bound ThT since their concentrations increase as the peptide concentration is increased. These species must be assigned to two distinct binding sites of ThT in the peptides that are

related to conformations with different fluorescence properties and probably different binding affinities. Further analysis of the amplitudes will allow us to extract information about these two binding sites. Best estimates of the lifetimes (τ_1 and τ_2) and the amplitudes ($A1$ and $A2$) as obtained from global analysis of the series of fluorescence decays are given in Table 2 and Figure 4S in the SI.

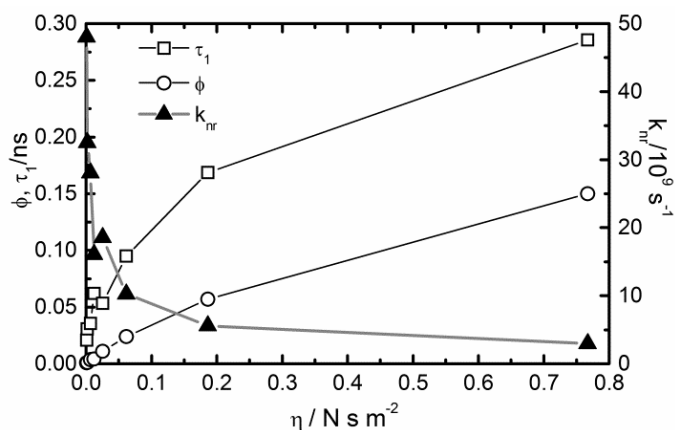


Figure 4. Fluorescence quantum yield ϕ (open circles), fluorescence lifetime τ_1 (open squares) and nonradiative deactivation rate constant k_{nr} (black triangles) of ThT in glycerol-water mixtures versus viscosity. The volume percentages of glycerol are the same as in Figure 2 (9.9, 24.7, 49.5, 59.4, 69.3, 79.2, 89.1 and 99.0%) and correspond to increasing viscosity values. The fluorescence quantum yields were obtained from the spectra shown in Figure 2 and 2S. Fits of the decays yield a second longer lifetime with low contribution and great uncertainty ($\tau_2=0.6\pm 0.1$ ns) and two residual lifetimes associated to glycerol impurities. The nonradiative deactivation rate constant k_{nr} was calculated from ϕ and τ_1 .

Assuming independent complexation processes for the two binding sites, the macroscopic binding constant K determined from the fluorescence intensity (Table 2) is the sum of the microscopic binding constants K_1 and K_2 corresponding to site 1 (associated with τ_1 and $A1$) and site 2 (τ_2 and $A2$), respectively. Each amplitude is proportional to the fluorescence quantum yield and to the concentration of ThT at the corresponding binding site. Therefore, the fit of $A1$ and $A2$ to 1:1 complexation models (eq. (1)) with K_1 and K_2 as binding constants and under the constraint that $K = K_1 + K_2$ (curves in Figure 4S) yields rough estimates of the microscopic binding constants and of the individual fluorescence intensities of ThT at the two binding sites (fluorescence percentages in Table 2).

For the binding of ThT with A β 42 the value of K_1 is about 4 times higher than that of K_2 , indicating that ThT binds preferably to site 1. Nevertheless, when all the ThT is bound to A β 42 then 90% of the observed fluorescence is due to ThT molecules in site 2 (see

percentages in Table 2), which also have the longer lifetime. According to the photophysical model proposed (Scheme 2), ThT bound to site 2 must have essentially a planar conformation with a strong steric hindrance for the excited-state twisting so that it emits efficiently from the locally excited state. Thus, ThT bound to site 1 may correspond to nearly perpendicular conformations, characterized by a shorter lifetime and lower fluorescence intensity. The fact that most of the fluorescence comes from those ThT molecules bound to site 2 explains the narrow fluorescence band of ThT bound to A β 42 (Figure 3 and 3S in SI).

According to these results, only one of five ThT molecules bound to A β 42 have the highly fluorescent conformation of site 2. This dominance of the emission of the weakly bound site is an inconvenience of this marker for the quantitative determination of amyloid fibrils, since the detected species has effectively a weak interaction with the fibrillar structure. It should be further investigated whether this effect is common to all amyloid fibrils. A recent study has found two binding sites of ThT with insulin and lysozyme fibrils but the second, weak-fluorescent site has much lower fluorescent quantum yield [47].

The behavior of ThT bound to BSA is quite different. K_1 is now approximately half of K_2 , so that site 2 is favored. Lifetimes τ_1 and τ_2 have similar values as for ThT bound to A β 42 and can therefore be assigned to the same conformations. Nevertheless, the two binding sites have comparable contributions to the observed fluorescence (percentages in Table 2). This must be the reason for the broadening of ThT emission spectrum when it is bound to BSA in comparison to amyloid fibrils. Also the lower fluorescence quantum yield must be due to the significant contribution of the less fluorescent site 1.

Steady-state anisotropy was determined for some high volume percentages of glycerol and for different concentrations of BSA and A β 42 (grey squares in Figure 2). Despite the relatively high deviations it can be observed that ThT anisotropy has similar values in all three media and they are close to the anisotropy limit of 0.40. Moreover, these high anisotropy values are already reached at small concentrations of BSA or A β 42, since the observed fluorescence is only due to bound ThT as the free dye has very low quantum yield (see Table 2). Thus, the mean anisotropy is mostly independent of the fraction of bound dye which is again a disadvantage of ThT as a probe for the quantitative determinations of amyloid fibrils.

4. Conclusions

The detailed photophysical analysis confirms that the remarkable properties of ThT as fluorescence marker of amyloid fibrils are based on its behavior as molecular rotor. Nevertheless, the existence of a wide solvent-dependent distribution of ground-state

conformations with very different photophysical behaviors makes ThT a highly complex probe with strong wavelength dependencies of all its fluorescence properties. The binding constant of ThT to A β 42 is rather low and is comparable to that with BSA. In both proteins ThT is bound to two distinct sites associated to different ThT conformations.

Acknowledgements

S.F. and M. H. A. thank the Xunta de Galicia and the Ministerio de Educación, Cultura e Deporte (Program “Ciencia sin Fronteras”) for scholarship. M.N. and W.A. thank the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Xunta de Galicia for their financial support (CTQ2010-21369, CN2012/314, GPC2013/052).

References

- [1] Melanie R N. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004 9; 34(1): 151-60.
- [2] Groenning M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils – current status. *J. Chem. Biol.* 2010; 3(1): 1-18.
- [3] Amdursky N, Erez Y, Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Acc. Chem. Res.* 2012; 45(9): 1548-57.
- [4] Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(19): 16462-5.
- [5] Sabaté R, Saupe SJ. Thioflavin T fluorescence anisotropy: an alternative technique for the study of amyloid aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;360(1):135-8.
- [6] D’Amico M, Di Carlo MG, Groenning M, Militello V, Vetri V, Leone M. Thioflavin T promotes A β (1–40) amyloid fibrils formation. *J. Phys. Chem. Lett.* 2012; 3(12): 1596-601.
- [7] Reinke AA, Abulwerdi GA, Gestwicki JE. Quantifying prefibrillar amyloids in vitro by using a “Thioflavin-like” spectroscopic method. *ChemBioChem* 2010; 11(13): 1889-95.
- [8] Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. *Nature* 2003; 426(6968): 900-4.
- [9] Gong YS, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(18): 10417-22.

- [10] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid [β]-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8(2): 101-12.
- [11] Srivastava A, Singh PK, Kumbhakar M, Mukherjee T, Chattopadhyay S, Pal H, et al. Identifying the bond responsible for the fluorescence modulation in an amyloid fibril sensor. *Chem. Eur. J.* 2010; 16(30): 9257-63.
- [12] Maskevich AA, Stsiapura VI, Kuzmitsky VA, Kuznetsova IM, Povarova OI, Uversky VN, et al. Spectral properties of Thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *J. Proteome Res.* 2007; 6(4): 1392-401.
- [13] Stsiapura VI, Maskevich AA, Kuzmitsky VA, Uversky VN, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of Thioflavin T in solvents with different viscosity. *J. Phys. Chem. B* 2008; 112(49): 15893-902.
- [14] Stsiapura VI, Maskevich AA, Tikhomirov SA, Buganov OV. Charge Transfer process determines ultrafast excited state deactivation of Thioflavin T in low-viscosity solvents. *J. Phys. Chem. A* 2010; 114(32): 900-4.
- [15] Naik L, Naik AB, Pal H. Steady-state and time-resolved emission studies of Thioflavin-T. *J. Photochem. Photobiol. A* 2009; 204(2): 161-7.
- [16] Sen P, Fatima S, Ahmad B, Khan RH. Interactions of Thioflavin T with serum albumins: spectroscopic analyses. *Spectroc. Acta Pt A: Molec. Biomolec. Spectr.* 2009; 74(1): 94-9.
- [17] Sulatskaya AI, Maskevich AA, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescence quantum yield of Thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS One* 2010; 5(10): e15385.
- [18] Dutta Choudhury S, Mohanty J, Upadhyaya HP, Bhasikuttan AC, Pal H. Photophysical studies on the noncovalent interaction of Thioflavin T with cucurbit [n] uril macrocycles. *J. Phys. Chem. B* 2009; 113(7): 1891-8.
- [19] Choudhury SD, Mohanty J, Pal H, Bhasikuttan AC. Cooperative metal ion binding to a cucurbit [7] uril- Thioflavin T complex: Demonstration of a stimulus-responsive fluorescent supramolecular capsule. *J. Am. Chem. Soc.* 2010; 132(4): 1395-401.
- [20] Singh PK, Kumbhakar M, Pal H, Nath S. Viscosity effect on the ultrafast bond twisting dynamics in an amyloid fibril sensor: Thioflavin-T. *J. Phys. Chem. B* 2010; 114(17): 5920-7.
- [21] Sabate R, Rodríguez-Santiago L, Sodupe M, Saupe SJ, Ventura S. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chem. Commun.* 2013; 49: 5745-7.

- [22] Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, et al. Mechanism of Thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* 2005; 151(3): 229-38.
- [23] Groenning M, Norrman M, Flink JM, van de Weert M, Bukrinsky JT, Schluckebier G, et al. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* 2007; 159(3): 483-97.
- [24] Krebs MRH, Bromley EHC, Donald AM. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* 2005 1; 149(1): 30-7.
- [25] Rodríguez-Rodríguez C, Rimola A, Rodríguez-Santiago L, Ugliengo P, Álvarez-Larena Á, Gutiérrez-de-Terán H, et al. Crystal structure of Thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: insights at the molecular level. *Chem. Commun.* 2010; 46(7): 1156-8.
- [26] Wolfe LS, Calabrese MF, Nath A, Blaho DV, Miranker AD, Xiong Y. Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye Thioflavin T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107(39): 16863.
- [27] Duboisset J, Ferrand P, He W, Wang X, Rigneault H, Brasselet S. Thioflavine-T and Congo Red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy. *J. Phys. Chem. B* 2013; 117(3): 784-8.
- [28] LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-[beta] in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8(7): 499-509.
- [29] Chen Y, Glabe CG. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid- β peptides A β 40 and A β 42: stable trimer or tetramer formation by A β 42. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(34): 24414-22.
- [30] Walsh DM, Selkoe DJ. A β Oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* 2007; 101(5): 1172-84.
- [31] Harper JD, Lansbury Jr PT. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1997; 66(1): 385-407.
- [32] Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32(18): 4693-7.
- [33] Stine WB, Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(13): 11612-22.

- [34] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. USA: Springer; 2006.
- [35] Bordello J, Novo M, Al-Soufi W. Exchange-dynamics of a neutral hydrophobic dye in micellar solutions studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.* 2010; 345: 369-76.
- [36] Al-Soufi W, Novo M, Mosquera M. Principal component global analysis of fluorescence and absorption spectra of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole. *Appl. Spectrosc.* 2001; 55(5):630-6.
- [37] Weast RC. CRC handbook of chemistry and physics. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1986.
- [38] Cheng N. Formula for the viscosity of a glycerol-water mixture. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2008; 47(9): 3285-8.
- [39] The Dow Chemical Company. Refractive index of glycerine-water solutions. Available at:
<http://www.dow.com/optim/optim-advantage/physical-properties/refractive.htm>.
Accessed March 15, 2014.
- [40] Voropai E, Samtsov M, Kaplevskii K, Maskevich A, Stepuro V, Povarova O, et al. Spectral properties of Thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *J. Appl. Spectrosc.* 2003; 70(6): 868-74.
- [41] Stsiapura VI, Maskevich AA, Kuzmitsky VA, Turoverov KK, Kuznetsova IM. Computational study of Thioflavin T torsional relaxation in the excited state. *J. Phys. Chem. A* 2007; 111(22): 4829-35.
- [42] Dey JK, Dogra SK. Solvatochromism and prototropism in 2-(aminophenyl) benzothiazoles. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1991; 64(10): 3142-52.
- [43] Rios Vazquez S, Rios Rodriguez MC, Mosquera M, Rodriguez-Prieto F. Excited-state intramolecular proton transfer in 2-(3'-Hydroxy-2'-pyridyl)benzoxazole. Evidence of coupled proton and charge transfer in the excited state of some o-Hydroxyarylbenzazoles. *J. Phys. Chem. B* 2007; 111(10): 1814-26.
- [44] Demchenko AP, Tang K, Chou P. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42(3): 1379-408.
- [45] Eisert R, Felau L, Brown LR. Methods for enhancing the accuracy and reproducibility of Congo Red and Thioflavin T assays. *Anal. Biochem.* 2006; 353:144-6.

- [46] Sulatskaya AI, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Interaction of Thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye. *J. Phys. Chem. B* 2011; 115(39): 11519-24.
- [47] Kuznetsova IM, Sulatskaya AI, Uversky VN, Turoverov KK. Analyzing Thioflavin T binding to amyloid fibrils by an equilibrium microdialysis-based technique. *PloS one* 2012; 7(2): e30724.



Supplementary Information

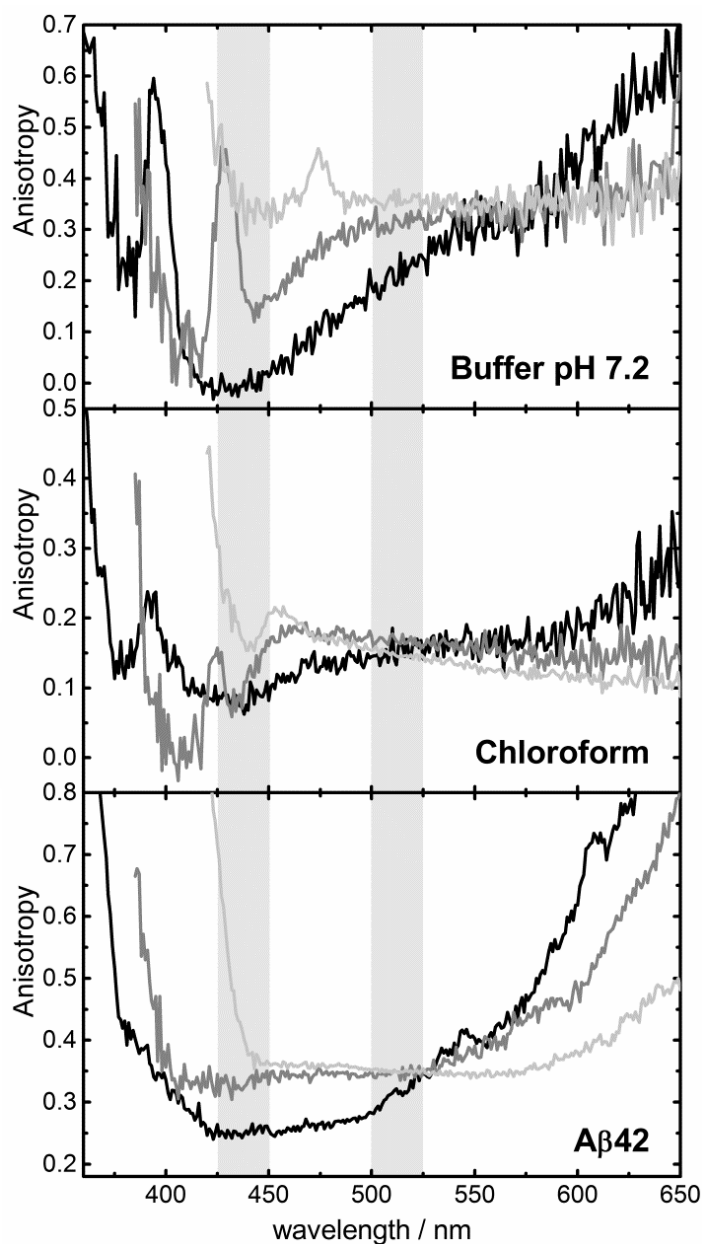


Figure 1S. Anisotropy emission spectra of ThT in PBS buffer, chloroform and in the presence of an aqueous solution of $A\beta_{42}$, 138 μM . Spectra were measured with excitation at 350 nm (black lines), 375 nm (grey lines) and 410 nm (light grey lines). The intervals used to determine the values of the anisotropy (from 425 to 450 nm and from 500 to 525 nm) are shown as grey rectangles. (The sharp peaks are due to Raman scattering that is excitation-wavelength dependent. The initial drop at the beginning of the spectra is due to Rayleigh scatter).

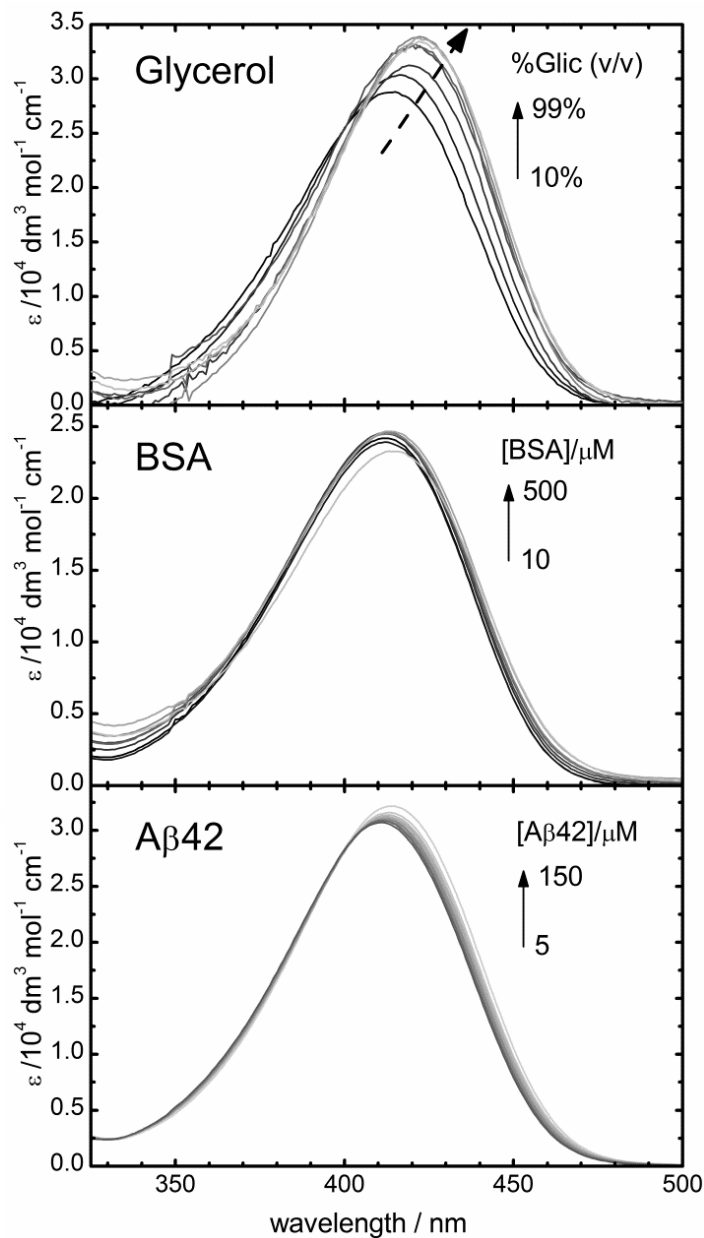


Figure 2S. Absorption spectra obtained from the titrations of ThT in aqueous solution with glycerol, BSA and A β 42. Absorption is given in units of molar absorptivity. The volume percentages of glycerol are the same as in Figure 2 and 4.

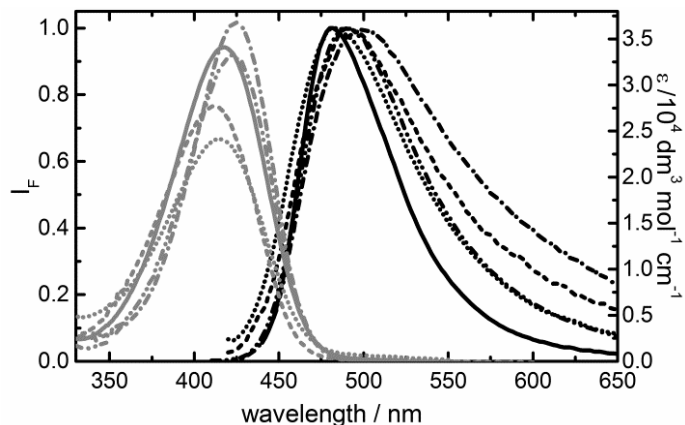


Figure 3S. Absorption (grey lines) and normalized fluorescence emission spectra (black lines) of ThT in different media under excitation at (410 ± 10) nm, in wavelength units. The spectra of ThT in PBS buffer (dashed), chloroform (dash-dotted) and 99% glycerol (dash-dot-dotted) were measured directly. The “pure” spectra of ThT bound to BSA (dotted) and to A β 42 (solid) were obtained by global analysis of the corresponding series of absorption and emission spectra.

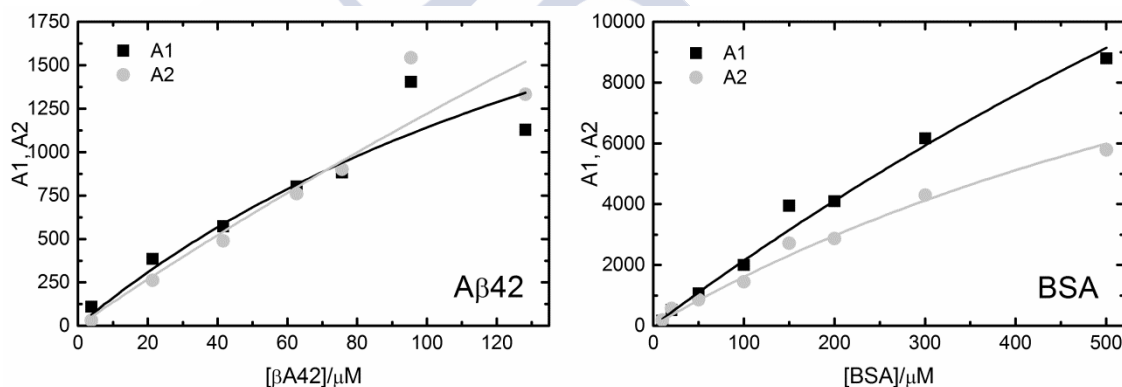


Figure 4S. Amplitudes obtained from global analysis of the fluorescence decays series of ThT with A β 42 fibrils and BSA with shared lifetimes and free amplitudes. Amplitude A1 (black squares) corresponds to the lifetime τ_1 and amplitude A2 (grey circles) to the lifetime τ_2 (Table 2). The curves are the result of fits to the amplitudes using a 1:1 complexation model (eq. (1)) under the constraint that $K = K_1 + K_2$. (Black line corresponds to amplitude A1 and grey line to amplitude A2.)



6.2. Avanzando hacia la detección ratiométrica de fibras de amiloide *in vitro* (ARTÍCULO 4)

Towards ratiometric sensing of amyloid fibrils *in vitro*

Sonia Freire, Flor Rodríguez-Prieto, M. Carmen Ríos Rodríguez, J. Carlos Penedo, Wajih Al-Soufi and Mercedes Novo

Chem. Eur. J. 2015, 21, 3425-3434

Abstract: *The aggregation of amyloid- β peptide and its accumulation in the human brain has an important role in the etiology of Alzheimer's disease. Thioflavin T has been widely used as fluorescent marker of these amyloid aggregates. Nevertheless, its complex photophysical behavior, with strong wavelength dependencies of all its fluorescence properties, requires searching for new fluorescent probes. We propose the use of 2-(2'-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-b]pyridine (HPIP), which shows two emission bands and a rich excited-state behavior due to the existence of excited-state intramolecular processes of proton transfer (ESIPT) and charge transfer (TICT). These properties determine a high sensitivity of HPIP fluorescence to its microenvironment and cause a large differential fluorescence enhancement of the two bands upon binding to aggregates of the amyloid- β peptide. Based on this behavior, a very sensitive ratiometric method is established for detection and quantification of amyloid fibrils, which can be combined with the monitoring of fluorescence anisotropy. Binding selectivity of HPIP is discussed on the basis of the apparent binding equilibrium constants of this probe to amyloid- β (1-42) fibrils and to the non-fibrillar protein bovine serum albumin (BSA). Finally, an exhaustive comparison between HPIP and Thioflavin T is presented in order to discuss the sensitivity and specificity of these probes to amyloid aggregates and the significant advantages of the HPIP dye for quantitative determinations.*

1. Introduction

The aggregation of misfolded peptides and proteins into toxic species that accumulate in various tissues and organs, leading to disruption of their normal function, is a major hallmark of many neurological degenerative disorders. These misfolded structures, so-called amyloids, are characterized by the formation of an anomalous cross- β -sheet conformation.^[1] Among the different amyloidogenic sequences, amyloid- β peptides ($A\beta$) are attracting considerable interest due to their toxic role in the development of Alzheimer's disease, since they accumulate as insoluble aggregates among the neurons at the brain.^[2] These deposits are mainly formed by peptides of 40 ($A\beta_{40}$) and 42 aminoacids ($A\beta_{42}$), which result from the

β - and γ -secretase cleavage of the amyloid precursor protein (APP). A β 42 is less abundant than A β 40^[2-4] however, it constitutes the more neurotoxic species due to its higher hydrophobicity, which results in faster aggregation rates at much lower concentrations than A β 40.^[5-7]

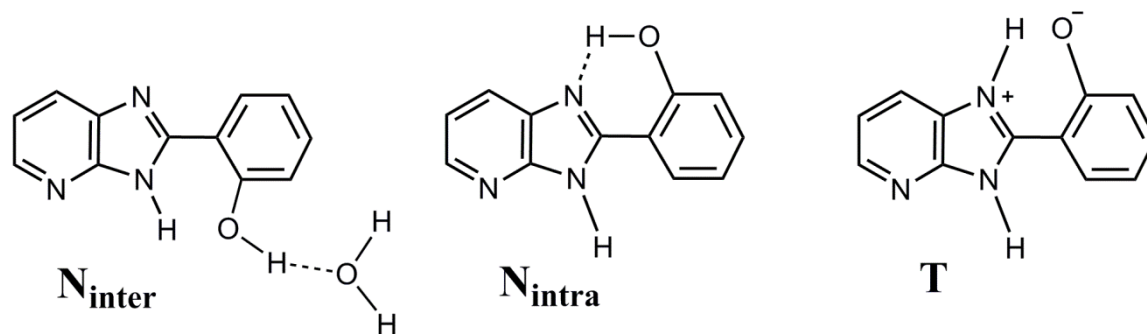
The most common marker used for the detection of amyloid fibrils is Thioflavin T (ThT), a fluorescent dye of the benzothiazole family that shows a dramatic fluorescence enhancement upon binding to amyloid aggregates.^[8,9] Several photophysical mechanisms have been proposed to explain this remarkable response. The main hypothesis postulates that ThT behaves as a molecular rotor, so that its fluorescence properties are determined by the extent of quenching of the locally excited state to a dark twisted intramolecular charge-transfer (TICT) state.^[9,10] This quenching implies the twisting around the central C—C single bond in the excited state^[11] and is therefore highly dependent on the viscosity of the medium. ThT molecules in aqueous solution are free to undergo the TICT process but in rigid media, as those potentially present as ThT binding sites in amyloid aggregates, the twisting process is hindered, increasing the fluorescence emission of the dye. In a recent contribution we confirmed this behavior of ThT as molecular rotor and unraveled some controversial features of its photophysical properties.^[12]

Although the fluorescence enhancement of ThT has been widely used over the years to monitor amyloid aggregation, it is well known that ThT presents severe limitations that preclude its wider application as a quantitative method. For instance, we have recently shown a broad solvent-dependent distribution of ground-state conformations with very different photophysical behaviors and a strong wavelength dependency of all its fluorescence properties, which clearly limit its potential as an amyloid marker.^[12]

Several alternative fluorophores for the determination of amyloid fibrils have been reported in recent years. For instance, BSB and K114, both derived from the structure of Congo-Red-like Chrysamine-G, have been used to recognize amyloid lesions and, in the case of K114, to follow fibril formation in solution through a quantitative fluorometric assay.^[13-15] Recently, new dyes based on benzothiazol and benzimidazole families have been designed to detect fibrillar β -lactoglobulin^[16] and also other compounds like tryptophanol were employed for monitoring A β aggregation.^[17] Unfortunately, to date, most amyloid sensors have been developed around the concept of intensity changes of a single emission band to signal the aggregation process, a feature that intrinsically limits their application as quantitative tools for diagnostic applications. Moreover, the majority of sensors exhibit very little Stokes shift between the excitation and emission wavelengths, which also poses severe drawbacks for their use as bio-imaging agents. A potential solution to overcome these limitations is through the development of ratiometric probes.^[18, 19] By following changes in

the ratio of two emission bands as a function of analyte concentration, ratiometric probes provide a built-in reference to account for effects such as photobleaching or variations in sensor concentration, and also for environmental factors such as polarity, pH and changes in temperature, which may affect the intrinsic quantum yield of the probe and lead to incorrect interpretations. Interestingly, whereas a number of ratiometric sensors have been designed for ions^[20-22] or DNA,^[23] both in vitro and in vivo, only scarce examples exist for sensing protein aggregates.^[24]

In this work, we demonstrate the potential of a novel marker, 2-(2'-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-*b*]pyridine (HPIP), to act as a ratiometric probe for amyloid aggregation. HPIP is a member of the imidazole family, which is characterized by the presence, at physiological pH and temperature, of an equilibrium between two different fluorescently active hydrogen-bonded conformers (Scheme 1): N_{inter} (OH group intermolecularly hydrogen bonded to the solvent) and N_{intra} (OH group intramolecularly hydrogen bonded to the imidazole nitrogen). It has been previously shown that the fluorescent properties of these so-called 'normal' (N) conformers (N_{intra} and N_{inter}) are significantly different and that their relative equilibrium populations are very sensitive to the environment.^[25-28] Excitation of the N_{intra} conformer yields a new zwitterionic species (tautomer T, see Scheme 1) in the excited state, which emits with an extremely large red-shift ($\lambda_{em} \sim 480$ nm) when compared to the normal-Stokes-shifted emission band of the N_{inter} conformer ($\lambda_{em} \sim 380$ nm). Simultaneous emission originating from the two species leads to the characteristic dual-fluorescence behavior exhibited by HPIP and other members of the imidazole family. The hydrogen-bond ability of the solvent dictates the relative proportions of N_{intra} and N_{inter} conformers, and consequently, the intensity ratio between the two emission bands. But the solvent has also a profound influence on the quantum yield of the emissive species, facilitating further proton-transfer processes of excited N_{inter} and a TICT process of excited T.^[25] These processes are highly dependent on viscosity, polarity, and acid-base properties of the medium,^[29] adding new factors to the sensitivity of HPIP fluorescence to the environment. All these facts suggest that HPIP may be a suitable probe for the development of bio-imaging agents.^[18]



Scheme 1. Molecular structure of conformers and tautomers of HPIP. Structures shown are the normal forms N_{inter} (OH group *inter*molecularly hydrogen bonded to the solvent) and N_{intra} (OH group *intra*molecularly hydrogen bonded to the imidazole nitrogen), and the tautomer T (obtained by ESIPT after exciting N_{intra}).

Here, we report a detailed characterization of the fluorescent behavior of HPIP in the presence of two proteins with different morphologies, the fibrillar aggregates of amyloid- β and the globular bovine serum albumin (BSA). Our data have revealed a significant increase in the red-shifted emission of HPIP upon incubation with both types of proteins, which allows exploiting the dual emission of this probe for protein detection and quantification. A ratiometric quantity was successfully established to quantitatively determine protein concentration without interference from external parameters potentially present in ThT-based assays. This ratiometric assay should allow the direct quantification of amyloid fibers across different platforms and laboratories. Such standardization is crucial to resolve some of the discrepancies reported in the literature when using ThT as a probe. Moreover, HPIP exhibits a significant change in anisotropy between free and bound probe, absent when using ThT, which allows further characterization of the HPIP-protein interactions. We will also demonstrate that the affinity of HPIP for fibrillar A β 42 is similar to that reported for ThT.^[12] In conclusion, the present study clearly indicates that HPIP outperforms ThT as a probe for amyloid- β aggregates and suggests that a search among other members of the imidazole family may uncover additional ratiometric probes for amyloid sensing with further improved properties.

2. Results and Discussion

The main objective of this work is to explore the potential of HPIP as a ratiometric reporter of protein aggregates. Given the lack of available information regarding the fluorescence properties of HPIP in physiologically relevant aqueous conditions, we first carried out a photophysical study of HPIP in PBS buffer. Following the characterization of HPIP in this environment, we next report a detailed study on its fluorescence response as a

protein probe using as model the fibril-like aggregates of amyloid- β peptide and the globular protein BSA, respectively. These model systems were already used in a recently reported study with ThT,^[12] so that the suitability of HPIP as fluorescent marker of amyloid fibrils can be directly compared with that of ThT.

2.1. Photophysical behavior of HPIP in physiologically relevant aqueous solutions

The photophysical behavior of HPIP in different solvents has been thoroughly studied,^[25-27] but only scarce results have been published for HPIP in aqueous solution.^[30] Due to its low quantum yield in aqueous solution, most of the studies have been done with the dye dissolved in a mixture of water with 25% of ethanol to increase its solubility. However, we found that HPIP behavior in the presence of ethanol, even at small percentages, is quite different to that in water or aqueous buffer. Therefore, the first step of this work has been to investigate the photophysical behavior of HPIP in physiologically relevant aqueous solutions. For these studies, we chose as solvent a typical aqueous buffer solution used for protein samples (PBS buffer of pH 7.2).

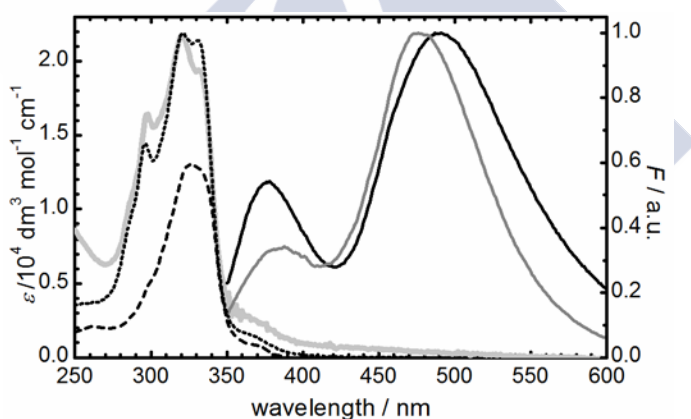
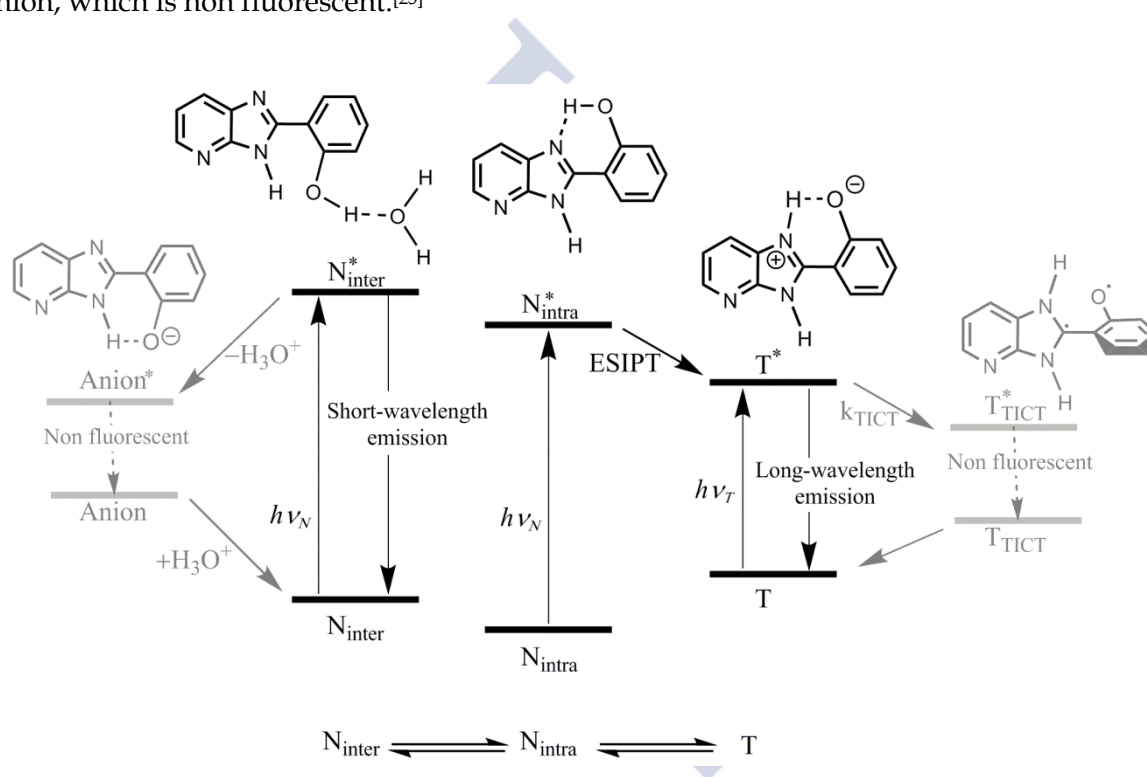


Figure 1. Absorption (gray thick solid line, left scale) and fluorescence excitation and emission spectra (right scale) of HPIP in PBS buffer of pH 7.2. Excitation spectra monitored at emission wavelengths of 400 nm (black dashed line) and 480 nm (black dotted line). Uncorrected emission spectrum measured with polarizers (dark gray solid line, total fluorescence intensity) and corrected emission spectrum without polarizers (black solid line).

The emission spectrum of HPIP in PBS buffer of pH 7.2 (Figure 1) shows the characteristic long-wavelength emission band due to T^* ($\lambda_{em} \sim 480$ nm) and the short-wavelength emission band due to the normal form N^* ($\lambda_{em} \sim 380$ nm). The excitation spectrum recorded at 480 nm (T^* band) corresponds to N_{intra} conformers, which undergo

ESIPT upon excitation to yield T^* . This spectrum is very similar to the absorption spectrum (Figure 1). The excitation band monitored at 400 nm (N^* band) is due to N_{inter}^* conformers, which are unable to give ESIPT. This band shows no vibrational structure and is red-shifted with respect to the absorption. This ability of this solvent, which indicates that N_{intra} is the main ground-state conformer of HPIP in water, despite the high hydrogen-bonding favors the N_{inter} conformers. Moreover, the weak shoulder observed at about 370 nm in the absorption spectrum is probably due to the existence of a minor amount of T in the ground state, in equilibrium with N_{inter} and N_{intra} .^[31, 32] Scheme 2 summarizes the ground- and excited-state behavior of HPIP in PBS buffer of pH 7.2. This scheme includes the deprotonation of a fraction of N_{inter} molecules at the OH group upon excitation to give the anion, which is non fluorescent.^[25]



Scheme 2. Model proposed to explain the ground- and excited-state (*) behavior of HPIP. N_{inter} , N_{intra} and T are in equilibrium in the electronic ground state. N_{inter}^* fluoresces at short wavelengths, whereas T^* is responsible for the long wavelength emission of HPIP. N_{intra}^* does not fluoresce because it undergoes an ultrafast ESIPT process to give the tautomer T^* . The fluorescence intensity of HPIP is dependent on the environment because it affects the effectivity of N_{inter}^* deprotonation and the intramolecular charge transfer of T^* , both of which produce nonemissive species.

For the proposed studies with proteins the emission spectra were recorded through polarizers. Besides the beneficial effect of preventing HPIP photodegradation (see experimental section), the use of polarizers allows determination of steady-state anisotropy

and total fluorescence intensity from the same experimental data. Nevertheless, these emission spectra could not be corrected for instrumental factors (see experimental section), and therefore show significant differences both in shape and intensity with respect to the corrected emission spectrum recorded without polarizers (see Figure 1). However, the relative changes of the uncorrected spectra with protein concentration allow quantification of the dye-protein interaction in exactly the same way as the corrected spectra, provided the measurements are made in the same equipment. Additionally, we must emphasize that fluorescence anisotropy is independent of “instrumental corrections”. Consequently, most of the measurements shown in this work have been done with polarizers, and the emission spectra will be shown without the “instrumental correction”, unless otherwise noted. The fact that uncorrected spectra can be used for these studies represents an experimental simplification, useful for routine measurements.

2.2. Spectral ratio *SR* as a ratiometric magnitude sensitive to the surrounding medium

The dual fluorescence of HPIP in aqueous solution makes it possible to establish a ratiometric method based on the quotient of the fluorescence intensities of the two emission bands. This method is highly recommended since the intensity ratio at two wavelengths is independent of dye concentration, and therefore provides an internal reference for the intensity measurements that the single emitters do not have.^[18]

Initially, one would define a *spectral ratio SR* as the quotient between the maximum intensities of the two bands. Nevertheless, we will define *SR* as a valley-to-peak ratio. At the peak (average intensity at 490-495 nm), the fluorescence of the tautomer T* reaches its maximum, whereas at the valley (average intensity at 420-425 nm), the contribution of N* prevails. The choice of these wavelengths to define *SR* intends minimization of the following undesirable factors: (a) with an excitation wavelength of 330 nm, the water Raman band is located at 373 nm, which is close to the center of the short-wavelength emission band, and has an important contribution in comparison with the low fluorescence intensity of the dye in aqueous solution; (b) the influence of protein autofluorescence is greater at the wavelength range of the blue-shifted emission band; (c) residual photochemical decomposition of HPIP would have a stronger effect on the intensity of the short-wavelength emission maximum.

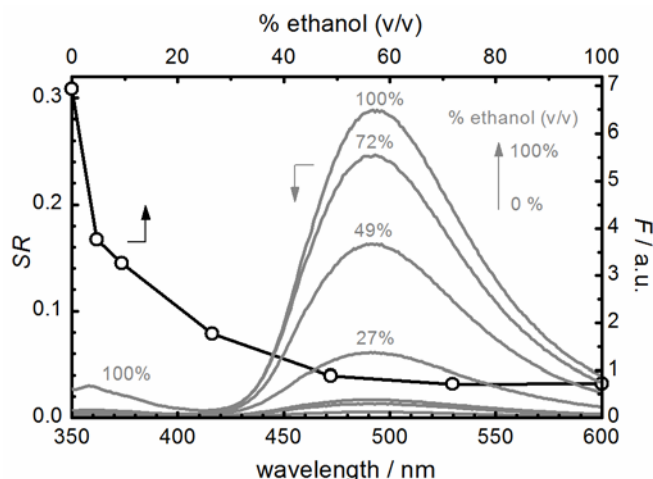


Figure 2. Corrected emission spectra (gray solid lines, lower and right scales, measured without polarizers) of HPIP in mixtures of PBS buffer with ethanol (0-100% (v/v) ethanol/PBS mixture). The open circles represent the ratio SR as a function of the volume percentage of ethanol (upper and left scales).

To test the ability of the spectral ratio SR of HPIP to report variations in the properties of the surrounding environment, we have investigated the influence of added ethanol in the fluorescence properties of aqueous solutions of HPIP. As previously mentioned, ethanol percentages even as low as 25% induce a significant change in the fluorescence response of HPIP. Thus, the use of water/ethanol mixtures represents a suitable method to validate the spectral ratio SR as reporter of the changes in HPIP environment.

The fluorescence intensity of HPIP significantly increases with the ethanol percentage in the mixtures ethanol/water, both at N^* and T^* emission bands (Figure 2). The fact that the intensities of both bands rise cannot be explained by a change in the ground-state equilibrium between N_{inter} , N_{intra} , and T , and suggests that the fluorescence quantum yields of N^* and T^* increase with the addition of ethanol. We propose that deprotonation of N_{inter}^* may be less efficient in ethanol than in pure water (see Scheme 2), resulting in a significantly higher emission of N^* as the ethanol percentage is increased. With respect to T^* emission, previous studies on HPIP^[25] showed that its fluorescence quantum yield in neutral solutions, mainly due to T^* , decreased from cyclohexane (0.31) to ethanol (0.14), and the value was even lower in water with 25% ethanol (0.03). A close look at the emission spectra of HPIP in aqueous solution with 27% ethanol and without ethanol (see Figure 2) reveals that the fluorescence quantum yield of HPIP in pure water must be much lower than 0.03. T^* probably undergoes in the excited state a large-amplitude rotational motion connected to a charge migration from the deprotonated phenol ring to the protonated imidazopyridine moiety (TICT process), leading to a nonfluorescent charge-transfer state (see Scheme 2)

which is favored in aqueous solution. A similar twisted intramolecular charge-transfer process has been reported for the tautomer of various HPIP-related hydroxyarylbenzazoles.^[25, 29, 33, 34]

As shown in Figure 2, the value of the spectral ratio SR for HPIP is highly sensitive to the environment of the dye. In aqueous medium, the ratio SR has a value of approximately 0.3, which drops abruptly with the addition of a small percentage of ethanol. When this percentage is increased, SR decreases further until it reaches a constant value of about 0.03 in 100% ethanol. Therefore, the ratio SR is a very sensitive parameter to monitor the HPIP environment and will be used in the following studies with proteins.

2.3. Binding of HPIP to amyloid fibrils and BSA

Once the spectral ratio SR is validated as a sensitive quantity to probe the environment, we next used it to determine the apparent equilibrium constants for the binding of HPIP to A β 42 fibrils and to BSA. We also used the fluorescence anisotropy r as a second property sensitive to the binding of HPIP to proteins, as will be explained below.

Addition of A β 42 fibrils leads to a large fluorescence enhancement and a red shift of the long-wavelength emission band of HPIP, together with a moderate increase in the intensity of the short-wavelength emission band (Figure 3a). The fluorescence anisotropy shows also important changes with the concentration of fibrils, going from a constant value of 0.13 in buffer solution to higher values, which are wavelength dependent (Figure 3b). The anisotropy increase seems to be somewhat higher for the long-wavelength band assigned to T^* than for the N^* band, although the anisotropy values at short wavelengths show distortions due to the effect of Rayleigh and Raman scattering.

We also studied the fluorescence of HPIP in the presence of the globular protein BSA, in order to compare its affinity and sensitivity to proteins of different morphologies and to examine the specificity of this probe for amyloid fibrils. Figure 1S in the Supporting Information shows a fluorescence emission titration of HPIP in aqueous solution with BSA and the corresponding emission anisotropy spectra, all corrected by solvent and protein contribution (the emission spectrum of BSA at the highest concentration is also given to show the effect of its autofluorescence). Similarly to A β 42 fibrils, there is an increase of fluorescence intensity as the BSA concentration is raised, which is huge for the red-shifted emission band. Addition of BSA leads also to an anisotropy increase, which is very large for tautomer fluorescence (note that distortions due to Rayleigh and Raman scattering make it difficult to analyze the anisotropy values of the short-wavelength band).

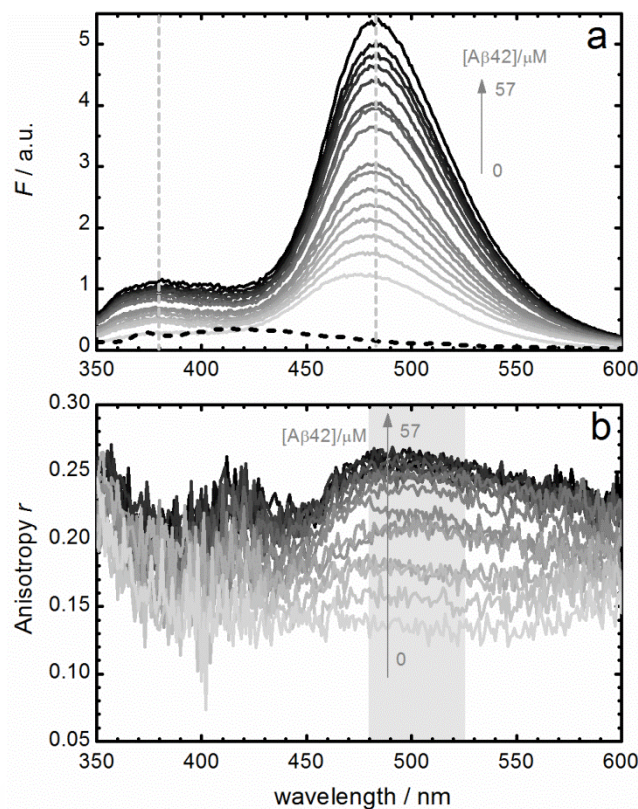


Figure 3. (a) Fluorescence emission spectra obtained by titration of HPIP in aqueous solution with A β 42 fibrils (solid lines). The dashed black line represents the amyloid autofluorescence, obtained for a solution of A β 42 fibrils at the highest concentration (57 μ M) without addition of HPIP. The vertical dashed gray lines indicate the positions of the two emission maxima. (b) Fluorescence anisotropy spectra of HPIP in aqueous solution with different concentrations of A β 42 fibrils. The wavelength interval used to determine the average values of anisotropy (from 480 nm to 525 nm) is shown as gray rectangle. All spectra are corrected for the contribution of A β 42 autofluorescence and solvent (see experimental section).

The observed changes in the emission spectra of HPIP both with A β 42 fibrils (Figure 3) and with BSA (Figure 1S in the Supporting Information) must be attributed to its binding to these proteins. This interaction seems to promote the formation of the excited tautomer T^* and/or the increase of its fluorescence. The observed increase of fluorescence anisotropy at the tautomer band indicates that HPIP bound to the protein has a more constrained microenvironment than in aqueous solution. As a consequence, the nonradiative deactivation of the bound tautomer via TICT is hindered, exhibiting a large fluorescence enhancement. Similar but smaller effects are observed for the short-wavelength emission band assigned to N_{inter}^* conformer, indicating that this species is less quenched when bound to proteins (probably due to a lesser tendency to deprotonate than in water). The larger

increase of the red-shifted emission band in BSA with respect to A β 42 fibrils, together with the higher anisotropy value reached, indicate that HPIP has a more constrained environment when bound to BSA.

Figure 2S in the Supporting Information shows the excitation spectra for HPIP in PBS buffer and in the presence of a high concentration of A β 42 fibrils or BSA. Apart from the contribution of protein autofluorescence at short wavelengths (< 280 nm), the presence of proteins causes a shift to the red of the excitation spectrum monitored at 480 nm. Moreover, the vibrational structure of the excitation spectra is amplified with respect to aqueous solution, probably due to the rigidity of the protein environment of the dye, as also confirmed by the anisotropy increase.



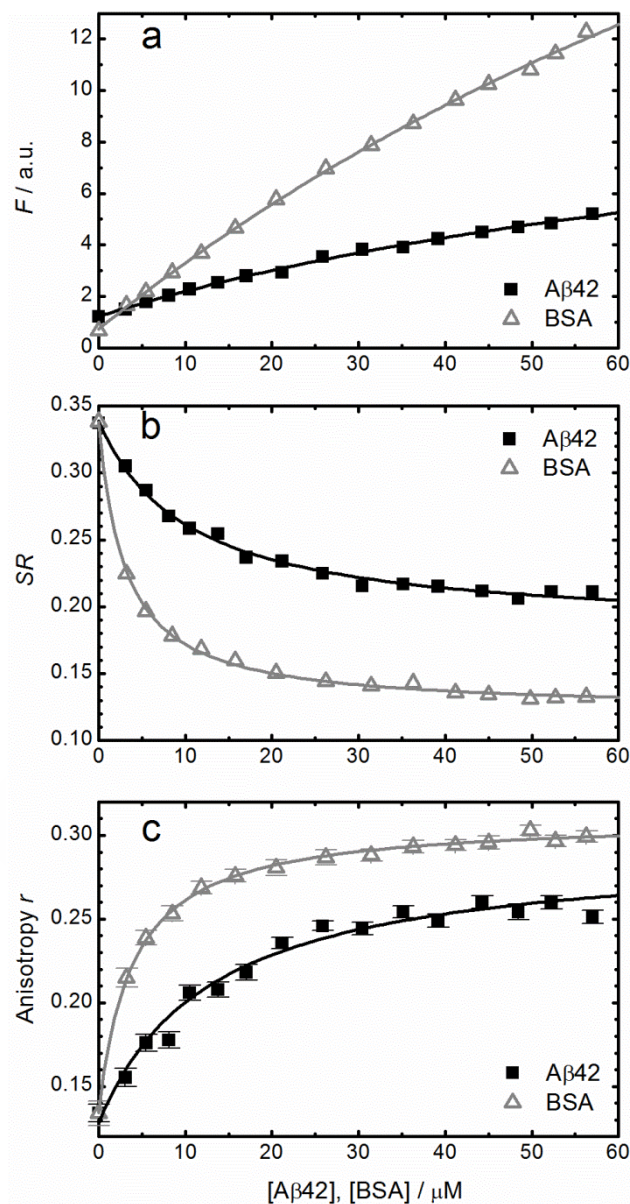


Figure 4. Plots of (a) fluorescence intensities at 490 nm, (b) SR ratio and (c) mean anisotropy r (480 nm to 525 nm) of HPIP against the concentration of A β 42 (black squares) or BSA (gray triangles). All data are corrected for solvent contribution (essentially the intense Raman band) and protein autofluorescence. Solid lines are the fitted curves to intensity, SR and r data using equations (4), (5) and (6), respectively (see text for the fit parameters).

From the titration series (Figure 3 and 1S in the Supporting Information), the dependencies of the different fluorescence properties of HPIP with protein concentration can be obtained. Figure 4 shows the experimental data for the two proteins of the fluorescence intensity F at 490 nm, close to the maximum of the long-wavelength band, the spectral ratio SR as defined above, and the mean anisotropy r of the long wavelength band (no suitable

values can be determined for the short wavelength band due to the distortions caused by Rayleigh and Raman scattering). It is observed that all these three properties follow a typical binding profile (see equation (1) in the experimental section), varying from the value of the free dye to that of the dye bound to the protein. Nevertheless, both the spectral ratio SR and the anisotropy approach constant values at protein concentrations where the fluorescence intensity just begins to deviate from a straight line. This indicates that the ratio SR and the anisotropy have greater sensitivity than fluorescence intensity and allow quantitative determinations with lower concentrations of protein.

Quantitative analysis of the variations of the three selected properties with the protein concentration is now performed on the basis of the binding equilibrium given in equation (1). The characteristic equilibrium constant K is an apparent binding constant, since it is contributed by the different microscopic constants of each individual conformation and binding site. The fit functions for the fluorescence intensity at a certain wavelength, the spectral ratio SR and the mean anisotropy r are given in equations (4), (5) and (6), respectively. All these three functions have the same mathematical form and only differ in the meaning of the fit parameters. The binding constant K can only be directly determined from the analysis of the absolute intensities, since it appears as the product $K_q = K q_{bf}(\lambda)$ in the fit functions of SR and r (see equations (5) and (6)). Nevertheless, once the parameter K_q is determined, the binding constant K can be calculated by dividing through the corresponding value of the brightness ratio $q_{bf}(\lambda)$. This ratio is defined as the quotient of fluorescence intensities of the bound dye and the free dye, and its value can be obtained from the “pure” spectra of the free dye and the dye bound to the protein, as explained below.

First we consider the analysis of the absolute fluorescence intensities, which allows determination of the binding equilibrium constant K and the emission spectra of HPIP free and bound to the protein. The whole series of emission spectra (titrations as those shown in Figure 3a and 1Sa in the Supporting Information) were analyzed by the method of Principal Components Global Analysis (PCGA, see the experimental section), using equation (4) as fit function. PCGA confirmed that each series can be well reproduced by a linear combination of two independent components, which are assigned to free and bound HPIP. The fits yielded the values of the binding constant K of HPIP to the proteins under study (Table 1) and the “pure” emission spectra of free and bound dye (Figure 5). It was checked that the spectrum obtained for the free dye agreed with that measured experimentally. The high quality of the fits can be appreciated in Figure 4a for the two proteins at a selected wavelength.

The values obtained for the binding equilibrium constant of HPIP to A β 42 fibrils and to BSA are of the same order of magnitude, but somewhat larger for the former, indicating a

higher affinity of HPIP to the fibrillar protein (Table 1). No data are available in the literature for the interaction of HPIP with A β 42 fibrils, but two studies have been recently published on the interaction of HPIP and analogues with BSA.^[30, 35] The values reported for the binding constants of the different analogues to BSA are similar to ours, but the value determined for HPIP ($K = 14.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) is about twice larger than that obtained in this study. Nevertheless, the method used in these publications is the linear Benesi-Hildebrand analysis, which involves strong assumptions with consequent inaccuracy of the quantitative results.

Table 1. Photophysical properties of HPIP in PBS buffer and bound to A β 42 fibrils or to BSA: steady-state anisotropy r (mean values in the wavelength range 480 nm to 525 nm), spectral ratio SR , brightness ratio $q_{bf}(\lambda)$ determined from the “pure” fluorescence emission spectra, and binding constants K_q and K of HPIP to A β 42 fibrils and to BSA.

Method	r	SR	$q_{bf}(\lambda)$	$K_q/10^3$ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$	$K/10^3$ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$
PBS^a	0.128±0.008	0.345±0.004	-	-	-
Aβ42					
Intensity	-	-	8.0±0.5 ^b	-	10±2
fibrils					
SR Ratio	-	0.185±0.004	10.1±0.6 ^c	98±11	10±1
Anisotropy	0.293±0.008	-	10.0±0.6 ^d	78±16	8±2
BSA					
Intensity	-	-	40±4 ^b	-	6.7±0.8
SR Ratio	-	0.124±0.001	59±6 ^c	334±13	5.7±0.6
Anisotropy	0.310±0.001	-	59±6 ^d	259±18	4.4±0.5

^a Values determined for free HPIP in the fits of anisotropy and SR ratio experimental data

^b Value determined in the full range of the “pure” emission spectra (350 nm to 600 nm)

^c Value determined in the wavelength range from 490 nm to 495 nm of the “pure” emission spectra

^d Value determined in the wavelength range from 480 nm to 525 nm of the “pure” emission spectra

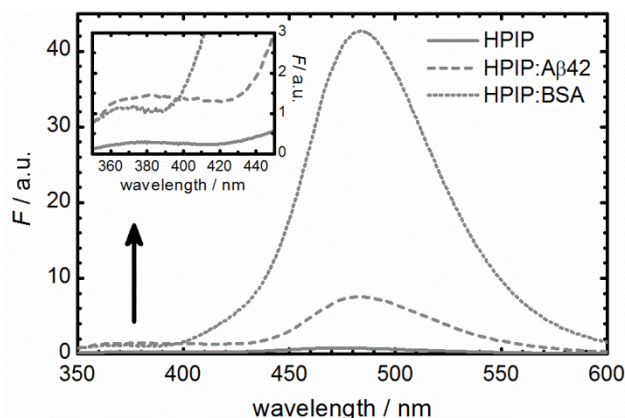


Figure 5. “Pure” fluorescence emission spectra obtained by global analysis of the corresponding titration series of emission spectra of HPIP with A β 42 fibrils and BSA: HPIP in PBS buffer (gray solid line), HPIP bound to A β 42 fibrils (gray dashed line) and HPIP bound to BSA (gray dotted line). The spectra are corrected for the contributions of protein autofluorescence and solvent. The inset shows an enlargement of the same graph in the wavelength range from 350 nm to 450 nm in order to observe the changes in the short-wavelength band.

Comparison of the “pure” emission spectra of HPIP obtained in the analysis confirms the stronger tautomer fluorescence when the dye is bound to proteins and more significantly to BSA (Figure 5). The short-wavelength emission band of bound HPIP (see inset in Figure 5) exhibits a similar fluorescence enhancement for the two proteins. This result can be attributed to the reduction of the fluorescence quenching process that excited N_{inter}^* experiences in water due to the dissociation to give the non-fluorescent anion (see Scheme 2). This process is probably not efficient for HPIP bound to the protein due to the lack of an appropriate proton acceptor. Also a red shift of about 10 nm and a narrowing of the long wavelength emission band is also observed for HPIP bound to proteins with respect to the free dye (see normalized spectra in Figure 3S in the Supporting Information). These changes suggest that the molecules of HPIP bound to A β 42 fibrils or to BSA are restricted to certain conformations of the tautomer T with very uniform fluorescence properties.

Quantitative analysis of the ratio SR and the anisotropy r was performed by non-linear fit of equations (5) and (6), yielding the apparent binding constant K_q and the limiting values of SR and r for the free dye and the dye bound to protein (Table 1). The value of K_q is larger when HPIP binds to BSA, suggesting a higher affinity of the dye to this protein, in contrast to the results obtained from the analysis of fluorescence intensities. The explanation of this apparent discrepancy is the value of the brightness ratio $q_{\text{bf}}(\lambda)$, which is included in the constant K_q . Its value is more than 5 times higher for HPIP bound to BSA than bound to amyloid fibrils, i.e., the fluorescence intensity is higher for the HPIP molecules bound to BSA

than bound to A β 42 fibrils. Once K_q is known, the binding equilibrium constant K can be estimated using the values of $q_{bf}(\lambda)$ obtained from the “pure” emission spectra of free and bound HPIP (Figure 5) at the appropriate wavelength range (see Table 1). The values determined from the different properties for the binding constant K agree well within their 95% confidence intervals, ensuring the consistency of the analysis.

From the values in Table 1, a great anisotropy increase is observed for HPIP upon binding to the proteins, which is about 10% higher for BSA, suggesting a more rigid microenvironment of the dye bound to the non-fibrillar protein. This is consistent with the higher fluorescence enhancement of the tautomer band for HPIP bound to BSA (Figure 5), since radiationless TICT deactivation would be more hindered than in amyloid fibrils. Consequently, also the limiting ratio SR decreases more strongly in the case of BSA (Table 1) due to the higher fluorescence intensity of the tautomer band when HPIP is bound to this protein (Figure 5). Nevertheless, the limiting spectral ratios SR for HPIP bound to proteins do not reach values as low as in water-ethanol solutions of high alcohol percentages (see Figure 2), probably due to the simultaneous fluorescence enhancement of the two emission bands for the complexes of HPIP with proteins (see Figure 5).

Comparing the results obtained from the three selected properties: fluorescence intensity, spectral ratio and anisotropy, it is concluded that the binding of HPIP to a protein can only be well characterized from precise measurement and analysis of the absolute fluorescence intensities. Nevertheless, quantification of the amount of protein present in a sample is straightforward using either the ratio SR or the anisotropy, once a calibration curve has been determined. The key advantages of these properties against absolute fluorescence intensity are their independency of the HPIP concentration and the much lower protein concentration required to obtain a suitable calibration curve.

The data shown in Figure 4 have been corrected for the contributions of solvent and protein fluorescence. The effect of these corrections on the three selected properties is shown in Figure 4S in the Supporting Information for the case of amyloid fibrils (analogous data are found for BSA). Since the solvent Raman band appears at 373 nm and the proteins fluoresce around 420 nm (see emission spectra of A β 42 fibrils and BSA in Figure 3a and 1Sa, respectively), the correction has a strong effect on the intensity of the short-wavelength band. This is observed at first glance for the absolute fluorescence intensities, where the values at 390 nm are much more affected than those at 490 nm (Figure 4Sa). Also major differences are observed for the spectral ratio SR , as correction provides quite different limiting values due to its influence on the fluorescence intensity at the valley of the spectra, from 420 nm to 425 nm. Instead, the mean anisotropy is almost not influenced by this correction because it is obtained from the long-wavelength emission band which is only slightly disturbed by

protein autofluorescence. Nevertheless, the concentration dependency is analogous for the two types of data under the experimental conditions used in this work and therefore this data correction is not necessary, provided that consistent data are used for all data analysis.

2.4. Comparison between HPIP and ThT as fluorescent markers of amyloid fibrils

In this section we compare HPIP with ThT for their use as fluorescent probes in the detection and determination of amyloid fibrils.

Table 2. Photophysical properties of HPIP and ThT in PBS buffer and bound to fibrillar A β 42 or to BSA: absorption maximum λ_{ab}^{\max} (for ThT) or fluorescence excitation maximum λ_{exc}^{\max} (monitored at 480 nm, for HPIP), fluorescence emission maximum λ_{em}^{\max} , steady-state anisotropy r , brightness ratio $q_{bf}(\lambda)$ and binding constant K to A β 42 fibrils and BSA as determined by global analysis of the corresponding fluorescence titration series.

<i>ThT</i> ^a	$\lambda_{ab}^{\max}/\text{nm}$	$\lambda_{em}^{\max}/\text{nm}$	r^b	$q_{bf}(\lambda)^c$	$K/10^3$ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$
PBS	412	489	0.357 \pm 0.010	-	-
Aβ42 fibrils	416	482	0.350 \pm 0.002	1.6 \times 10 ³	5.85 \pm 0.07
BSA	415	483	0.378 \pm 0.004	1.6 \times 10 ²	1.35 \pm 0.01
<i>HPIP</i>	$\lambda_{exc}^{\max}/\text{nm}$	$\lambda_{em}^{\max}/\text{nm}$	r^b	$q_{bf}(\lambda)^c$	$K/10^3$ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$
PBS	321, 331	378, 474	0.128 \pm 0.008	-	-
Aβ42 fibrils	326, 338	382, 484	0.293 \pm 0.008	8.0 \pm 0.5	10 \pm 2
BSA	326, 338	373, 484	0.310 \pm 0.001	40 \pm 4	6.7 \pm 0.8

^a Data taken from reference^[12] using an excitation wavelength of 410 \pm 10 nm.

^b Mean anisotropy determined in the ranges: 500-525 nm for ThT and 480-525 nm for HPIP.

^c Brightness ratio of the "pure" emission spectra: 440-650 nm for ThT and 350-600 nm for HPIP.

Table 2 shows a summary of the photophysical properties of HPIP and ThT in PBS buffer, bound to A β 42 fibrils and bound to the non-fibrillar protein BSA. Because of the low solubility of HPIP, fluorescence excitation maxima are shown instead of absorption maxima. The fluorescence emission maxima and the mean anisotropy are also indicated. To compare the fluorescence intensity enhancement of the free and bound dyes, the brightness ratio

$q_{bf}(\lambda)$ is determined in the full range of the pertinent “pure” fluorescence emission spectra. Finally, the binding equilibrium constants K are given in order to discuss the specificity of ThT and HPIP to amyloid fibrils. These binding constants were obtained by global analysis of the corresponding series of fluorescence titrations. In the case of HPIP, these constants were also determined from the spectral ratio and the anisotropy variations but those obtained by global analysis were chosen to maintain the same determination method as in the case of ThT.

As fluorescent marker for proteins, the main advantage of ThT is its absorption maximum around 412 nm, which is significantly red-shifted with respect to HPIP and therefore less sensitive to protein autofluorescence, as well as suitable for fluorescence microscopy. However, the fluorescence emission of ThT depends on the excitation-wavelength and shows a single emission band when excited at the absorption maximum. By contrast, fluorescence emission of HPIP does not depend on the excitation wavelength^[25] and exhibits dual emission. This feature allows a more sensitive detection and the quantitative determination of amyloid fibrils by using a ratiometric method, which is impossible with ThT.

In the case of ThT, two emission bands can be observed by exciting at short wavelengths around 330 nm, corresponding to the free and the bound dye. Nevertheless, under these conditions, ThT shows very low fluorescence intensity and small changes upon binding to proteins. When ThT in a protein solution is excited at the absorption maximum, only the emission of the bound dye is observed since it is much more intense than that of the free dye. Therefore, only absolute measurements of fluorescence intensity are possible for ThT.

The brightness ratio $q_{bf}(\lambda)$ enables the comparison of the fluorescence enhancement of the two dyes upon binding to proteins, since it is defined as the ratio of fluorescence intensities of the bound dye with respect to the free dye. The value of $q_{bf}(\lambda)$ is about 200 times greater for ThT than for HPIP upon binding to amyloid fibrils, but only 4 times higher in the case of BSA (Table 2). This apparently convenient high contrast of ThT has however an adverse effect for quantitative determinations of the amyloid fibrils, since the fluorescent intensity of the free dye are almost undetectable and only the fluorescence coming from bound ThT is observed.

Regarding steady-state anisotropy, ThT shows similar values either when it is free in aqueous solution or bound to proteins (Table 2). These anisotropy values correspond to planar conformations that emit from the excited-state without undergoing the TICT process. Therefore, this property of ThT cannot be used to detect proteins present in the solution. By contrast, the probe HPIP allows obtaining the anisotropy values of the free and

bound dye in the long-wavelength emission band since they are associated to the tautomer emission. The steric constraints of HPIP when it is bound to proteins lead to a large increase of the tautomer mean anisotropy, together with a great fluorescence enhancement caused by a slower TICT deactivation.

The values of the binding equilibrium constants shown in Table 2 indicate that HPIP and ThT have comparable affinities to proteins. Nevertheless, the binding constant of HPIP to amyloid fibrils is approximately twice that of ThT. The binding constant of ThT to amyloids is about 4 times greater than to BSA, while HPIP has similar equilibrium constants for binding to both proteins. These results indicate that both dyes are very sensitive to fibrillar and non-fibrillar proteins, but they are not specific probes to identify fibrillar structures.

3. Conclusions

A new ratiometric fluorescence probe for the quantitative analysis of fibrillar A β 42 and BSA proteins has been developed. The ESIP-based dual-fluorescence probe HPIP showed a great enhancement of the long-wavelength emission band upon binding, together with a large anisotropy increase. We demonstrated that the fluorescence intensity ratio of the two emission bands and the anisotropy can be successfully used for the determination of the mentioned proteins.

An exhaustive comparison of the behavior of HPIP with that of ThT demonstrated the great advantages of HPIP for sensitive and quantitative determination of amyloid fibrils. In addition, the photophysical properties of HPIP are not wavelength dependent as those of ThT.

Because of the advantages of HPIP, it should be considered improving its photochemical stability (see experimental section) by designing more stable derivatives with similar photophysical properties.

4. Experimental Section

4.1. Materials

2-(2'-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-*b*]pyridine (HPIP) was prepared and characterized in our group.^[25] Bovine serum albumin (BSA) was purchased from Sigma-Aldrich, human amyloid- β (1-42) (A β 42) from GenScript USA Inc and ethanol from Panreac. Phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.2, 10 mM phosphates and 140 mM NaCl) was used for the preparation of the samples. All aqueous solutions were prepared using Milli-Q water.

4.2. Sample preparation

HPIP stock solutions were prepared by stirring a small amount of solid in PBS for about 12 h until saturation and then filtering it using 0.45- μm nylon filters. These stock solutions were used within a few days and diluted to the adequate concentration in each experiment (1 - 4 μM). During the whole procedure, HPIP solutions were kept protected from light. In order to determine the real concentration of HPIP, a fluorescence calibration curve was performed for the HPIP concentration range 1 - 9 μM . To obtain the samples for calibration, a well-known amount of the dye was dissolved in ethanol. Then, an aliquot was taken and the ethanol was evaporated, redissolving the solute in buffer until the sample fluorescence remained stable. Fluorescence intensity of these samples showed a linear dependence with HPIP concentration. No dimerization or aggregation of HPIP was observed in the corresponding absorption spectra.

To prepare the samples of HPIP with different ethanol percentages (Figure 2), HPIP was first dissolved in ethanol and then diluted with the corresponding ethanol/buffer mixture. For the series shown in Figure 2, the concentration of HPIP was 5 μM .

Stock solutions of BSA and fibrillar A β 42 were freshly prepared for each experiment. The samples for the titrations were prepared by dilution of the corresponding protein stock solution containing the desired concentration of the dye with a solution of the same dye concentration. Amyloid concentrations mentioned in this work refer to the total concentration of amyloid monomers used in the preparation of the sample.

For the preparation of amyloid- β fibrils, we followed established protocols.^[36] Firstly, potential aggregates that could be formed in the commercial peptide were broken up by hexafluoroisopropanol (HFIP). The amyloid was dissolved in HFIP at a concentration of 1 mg/ml and the solution was incubated during 1 h with occasional mixing and then shaken for about 20 min. Next the solution was split up into several vials and the HFIP was removed under a stream of nitrogen. Vials were transferred into a desiccator and vacuum was applied to remove the remaining traces of HFIP. The resulting dried aliquots of monomeric peptide were stored at -20°C.

Stock solutions of the amyloid were prepared by suspending the peptide aliquot in dried dimethyl sulfoxide (DMSO) with a final concentration of 1 mM and shaking it for about 15 min in order to dissolve the peptide. To prepare amyloid- β fibrils an aliquot of the DMSO stock solution was dissolved in PBS at pH 7.2. This sample was incubated at 37°C for 2 days under vigorous agitation.

4.3. Photostability of HPIP

The studies of the photophysical properties of HPIP in aqueous solution have evidenced some photoinstability of this dye, which mainly affects its short-wavelength fluorescence band. After preparing a HPIP stock solution, no significant changes were observed in its emission spectrum when a fresh aliquot was measured for several days. However, if a sample was continuously irradiated for some minutes, a significant increase in the fluorescence intensity of the short-wavelength emission band was detected, together with a slight decrease of the long-wavelength emission band. This change was especially notable when using ultra-micro fluorescence cells where the sample volumes are very small (about 60 μ L for a 3 \times 3 mm cell). However, remixing the sample or refreshing it by addition of small amounts of fresh HPIP solution reduced the spectral changes significantly. Also the use of polarizers, with the consequently much lower irradiation intensity, minimized the problem. It was concluded that the observed spectral changes were due to a photochemical decomposition of HPIP that can be avoided by choosing suitable experimental conditions.

Because of the low quantum yield of HPIP in aqueous solution, it is necessary to use quite open slits in the excitation channel during fluorescence measurements. Also, ultra-micro fluorescence cells must be used for the small volumes of the protein samples. Therefore, in order to prevent HPIP photodegradation, it was decided to perform the fluorescence measurements with polarizers because their presence reduces the light that reaches the sample in about 10 times. Furthermore, protein titrations were always performed by diluting the sample with fresh HPIP solution so that the effect of degradation is reduced.

4.4. Absorption and fluorescence measurements

Absorption spectra were recorded using quartz cells with path lengths of 3.00 and 10.0 mm in a Varian-Cary 100 spectrophotometer. All spectra were recorded using baseline correction with the corresponding solvent. Steady-state fluorescence measurements were performed using an Edinburgh-Instruments F900 spectrofluorometer equipped with a 450 W xenon lamp as excitation source. For anisotropy measurements, Glan-Thompson polarizers with a spectral range of 230-900 nm were incorporated. The excitation wavelength was 330 nm, which is at the red flank of the absorption maximum to reduce the contribution of protein autofluorescence as much as possible. All measurements were performed at 25 ± 1 °C.

Excitation and emission fluorescence spectra measured without polarizers were corrected for the non-ideal response of the instrument ("instrumental correction"). When polarizers were used, the spectra were not corrected because no appropriate correction

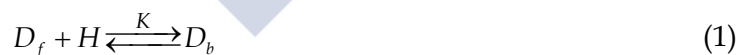
factors were available. Furthermore, all spectra were corrected for the solvent contribution, in order to remove the Raman bands, which interfere for samples of low fluorescence intensity. The contribution of BSA and A β 42 autofluorescence can also be subtracted to yield what we called “corrected” spectra. The influence of this correction on the data has been discussed above.

4.5. Data analysis and fit functions

Most data processing was done with the program OriginPro 8.5 (*OriginLab Corporation, US*). The series of emission spectra obtained in the titrations were analyzed using a program developed in our group which applies PCGA.^[37, 38] The first step of PCGA is the Principal Components Analysis (PCA), which yields the minimal number of spectral components that reproduce the experimental spectra. Global Analysis (GA) consists in the fit of the proposed theoretical model to the whole series of experimental spectra in order to estimate the model parameters and the “pure” spectra of the contributing species.

All reported uncertainties are based on the standard errors of the fitted parameters and do not take into account other sources of uncertainty, such as concentration errors.

A 1:1 binding equilibrium model between the free dye (D_f) and the dye bound (D_b) to the non-fluorescent protein (host, H) with a binding equilibrium constant K (equation (1)) is used for the analysis of the experimental data. It must be noticed that K is an apparent constant, since it comprises the contributions of the different microscopic constants of each individual conformation and binding site. Moreover, the interactions between the dye and the fibrillar amyloid are determined with reference to the total concentration of amyloid monomers and not to the fibrillar concentration in the sample, which is unknown. Nevertheless, the determination of the binding constant K allows quantification of protein concentration and comparison of HPIP with other fluorescent probes.



Under the experimental conditions used (fixed dye concentration and excess of protein with respect to the total dye concentration, i.e. $[H] \approx [H]_0$) and assuming that excited-state association or dissociation do not take place, the following equations for the equilibrium concentrations of D_f and D_b can be easily deduced:

$$[D_f] = \frac{[D]_0}{1 + K [H]_0} \quad (2)$$

$$[D_b] = \frac{[D]_0 K [H]_0}{1 + K [H]_0} \quad (3)$$

The fluorescence intensity at a certain wavelength, $F(\lambda)$, is the sum of the fluorescence intensities of the free and the bound dyes, which in turn are proportional to their concentrations. Then the following relation between the fluorescence intensity and the concentration of protein is deduced:

$$F(\lambda) = \frac{F_f(\lambda) + F_b(\lambda) K [H]_0}{1 + K [H]_0} \quad (4)$$

where $F_f(\lambda)$ and $F_b(\lambda)$ are the limiting fluorescence intensities at the wavelength λ of the dye free in aqueous solution and bound to the protein, respectively.

Equation (4) allows for the determination of the binding constant K from fluorescence titrations. Nevertheless, this equilibrium constant can also be estimated from the spectral ratio SR or the anisotropy r obtained from the fluorescence titrations. The corresponding fit functions can be easily deduced using equation (4) and the definitions of these properties.

We define the ratio between the fluorescence intensities at two spectral wavelengths λ_1 and λ_2 of the same spectrum as the *spectral ratio* (SR). The variation of SR with the concentration of protein is given by equation (5), where SR_f and SR_b are the limiting spectral ratios of the free dye and the dye bound to protein, respectively, and $q_{bf}(\lambda_2)$ is the brightness ratio between bound and free dye at the wavelength λ_2 .

$$SR = \frac{F(\lambda_1)}{F(\lambda_2)} = \frac{\frac{F_f(\lambda_1)}{F_f(\lambda_2)} + \frac{F_b(\lambda_1)}{F_b(\lambda_2)} \frac{F_b(\lambda_2)}{F_f(\lambda_2)} K [H]_0}{1 + \frac{F_b(\lambda_2)}{F_f(\lambda_2)} K [H]_0} = \frac{SR_f + SR_b q_{bf}(\lambda_2) K [H]_0}{1 + q_{bf}(\lambda_2) K [H]_0} \quad (5)$$

For the steady-state anisotropy r determined at a certain emission wavelength or wavelength range λ , equation (6) is obtained, where r_f and r_b are the limiting anisotropies of the free dye and the dye bound to protein, respectively, and $q_{bf}(\lambda)$ is the brightness ratio between bound and free dye at the wavelength λ .

$$r = \frac{r_f + \frac{F_b(\lambda)}{F_f(\lambda)} r_b K [H]_0}{1 + \frac{F_b(\lambda)}{F_f(\lambda)} K [H]_0} = \frac{r_f + r_b q_{bf}(\lambda) K [H]_0}{1 + q_{bf}(\lambda) K [H]_0} \quad (6)$$

Acknowledgements

S.F. thanks the Xunta de Galicia for a scholarship. The authors thank the European Regional Development Fund, the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Xunta de Galicia for their financial support (CTQ2010-21369, CTQ2010-17835, GPC2013/052 and R2014/051). JCP thanks the RS MacDonald Charitable Trust for financial support. We thank Alfonso Brenlla for the synthesis of HPIP.

References

- [1] N. Melanie R, *Methods* **2004**, *34*, 151-160.
- [2] F. M. LaFerla, K. N. Green, S. Oddo, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 499-509.
- [3] Y. Chen, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24414-24422.
- [4] D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172-1184.
- [5] J. D. Harper, P. T. Lansbury Jr, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 385-407.
- [6] J. T. Jarrett, E. P. Berger, P. T. Lansbury, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.
- [7] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101-112.
- [8] M. Groenning, *J. Chem. Biol.* **2010**, *3*, 1-18.
- [9] N. Amdursky, Y. Erez, D. Huppert, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1548-1557.
- [10] A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, V. A. Kuzmitsky, I. M. Kuznetsova, O. I. Povarova, V. N. Uversky, K. K. Turoverov, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1392-1401.
- [11] A. Srivastava, P. K. Singh, M. Kumbhakar, T. Mukherjee, S. Chattopadhyay, H. Pal, S. Nath, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9257-9263.
- [12] S. Freire, M. H. de Araujo, W. Al-Soufi, M. Novo, *Dyes Pigments* **2014**, *110*, 97-105.
- [13] W. E. Klunk, M. L. Debnath, J. W. Pettegrew, *Neurobiol. Aging* **1995**, *16*, 541-548.
- [14] M. L. Schmidt, T. Schuck, S. Sheridan, M. Kung, H. Kung, Z. Zhuang, C. Bergeron, J. S. Lamarche, D. Skovronsky, B. I. Giasson, *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 937-943.
- [15] A. S. Crystal, B. I. Giasson, A. Crowe, M. Kung, Z. Zhuang, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 1359-1368.
- [16] K. Volkova, V. Kovalska, A. Balanda, R. Vermeij, V. Subramaniam, Y. L. Slominskii, S. Yarmoluk, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 727-733.
- [17] A. A. Reinke, G. A. Abulwerdi, J. E. Gestwicki, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1889-1895.
- [18] A. P. Demchenko, *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 1099-1128.
- [19] M. H. Lee, J. S. Kim, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, In press.
- [20] J. Wu, W. Liu, J. Ge, H. Zhang, P. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483-3495.
- [21] Z. Liu, W. He, Z. Guo, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1568-1600.
- [22] H. Woo, Y. You, T. Kim, G. Jhon, W. Nam, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 17100-17112.
- [23] J. Ueberfeld, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 947-952.

- [24] D. A. Yushchenko, J. A. Fauerbach, S. Thirunavukkuarasu, E. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7860-1.
- [25] A. Brenlla, M. Veiga, J. L. Pérez Lustres, M. C. Ríos Rodríguez, F. Rodríguez-Prieto, M. Mosquera, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 884-896.
- [26] G. Krishnamoorthy, S. K. Dogra, *J. Lumin.* **2001**, *92*, 91-102.
- [27] G. Krishnamoorthy, S. K. Dogra, *J. Lumin.* **2001**, *92*, 103-114.
- [28] F. A. Chipem, G. Krishnamoorthy, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 12063-12070.
- [29] S. Rios Vazquez, M. C. Rios Rodriguez, M. Mosquera, F. Rodriguez-Prieto, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1814-1826.
- [30] F. A. Chipem, S. K. Behera, G. Krishnamoorthy, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, DOI: 10.1039/c4pp00099d.
- [31] F. Rodríguez Prieto, M. C. Ríos Rodríguez, M. Mosquera Gonzalez, M. A. Ríos Fernández, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 8666-8672.
- [32] M. Mosquera, J. C. Penedo, M. C. Ríos Rodríguez, F. Rodríguez-Prieto, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5398-5407.
- [33] S. Rios Vazquez, M. C. Rios Rodriguez, M. Mosquera, F. Rodriguez-Prieto, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 376-387.
- [34] A. Brenlla, M. Veiga, M. C. R. Rodríguez, M. Mosquera, F. Rodríguez-Prieto, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1622-1636.
- [35] N. Dash, A. Mishra, G. Krishnamoorthy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *77*, 55-62.
- [36] W. B. Stine Jr, K. N. Dahlgren, G. A. Krafft, M. J. LaDu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612-11622.
- [37] W. Al-Soufi, M. Novo, M. Mosquera, *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 630-636.
- [38] W. Al-Soufi, M. Novo, M. Mosquera, F. Rodríguez-Prieto, in *Reviews in Fluorescence 2009* (Ed: C. D. Geddes), Springer **2011**, pp. 23-45.

Supporting Information

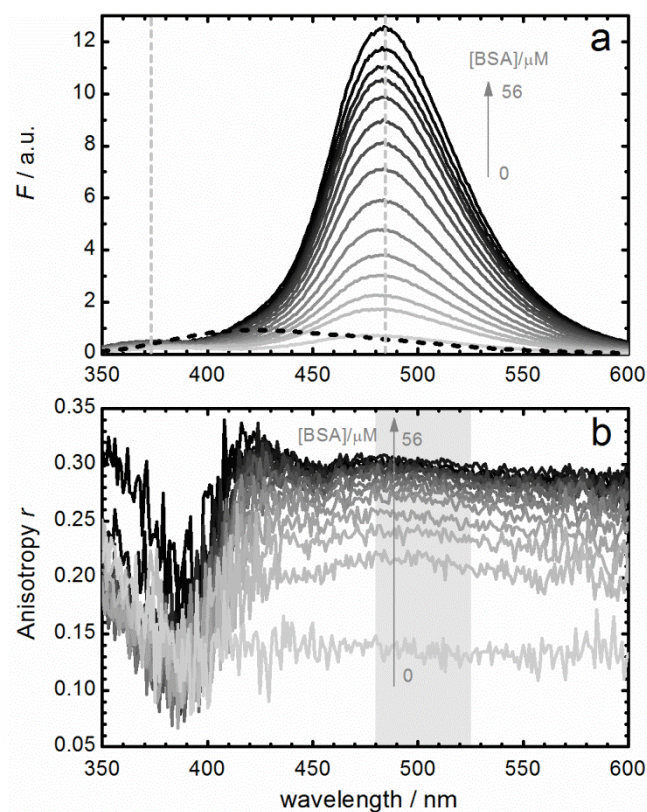


Figure 1S. (a) Fluorescence emission spectra obtained by titration of HPIP in aqueous solution with BSA (solid lines). The dashed black line represents the protein autofluorescence, obtained from a solution of BSA at the highest concentration (56 μM), without addition of HPIP. The vertical dashed gray lines indicate the positions of the two emission maxima of HPIP. (b) Fluorescence anisotropy spectra of HPIP in aqueous solution with different concentrations of BSA. The wavelength interval used to determine the average values of anisotropy (from 480 to 525 nm) is shown as gray rectangle. All spectra are corrected for the contribution of BSA autofluorescence and solvent (see experimental section).

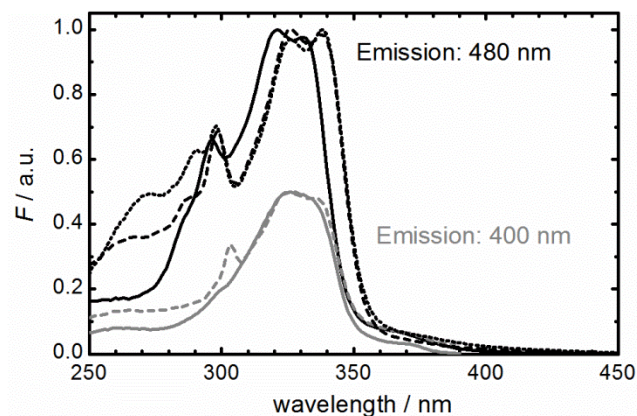


Figure 2S. Normalized fluorescence excitation spectra of HPIP in PBS buffer (solid lines), in the presence of A β 42 fibrils 87 μ M (dashed lines) and in the presence of BSA 97 μ M (dotted lines). Excitation spectra monitored at 400 nm (gray lines, normalized to 0.5 at the maxima) and 480 nm (black lines, normalized to 1 at the maxima). For the sample of HPIP with BSA, the excitation spectrum monitored at 400 nm could not be measured due to the intense absorption band of the protein. Bands observed at wavelengths shorter than 280 nm in the samples with protein are due to protein fluorescence.

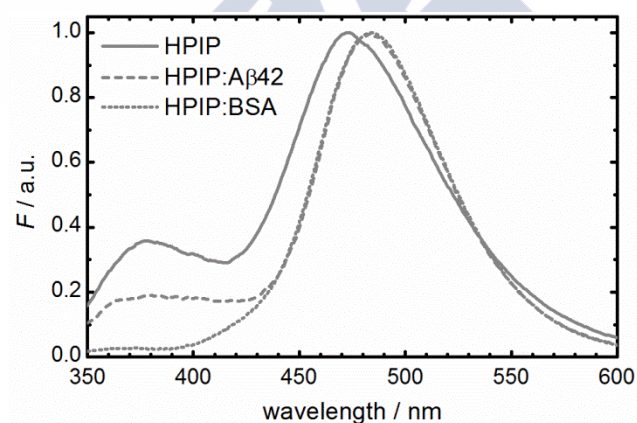


Figure 3S. Normalized "pure" fluorescence emission spectra obtained by global analysis (see materials and methods section in main manuscript) of the corresponding titration series of HPIP with A β 42 fibrils and BSA: HPIP in PBS buffer (gray solid line), HPIP bound to A β 42 fibrils (gray dashed line) and HPIP bound to BSA (gray dotted line). The spectra are corrected for the contributions of protein autofluorescence and solvent.

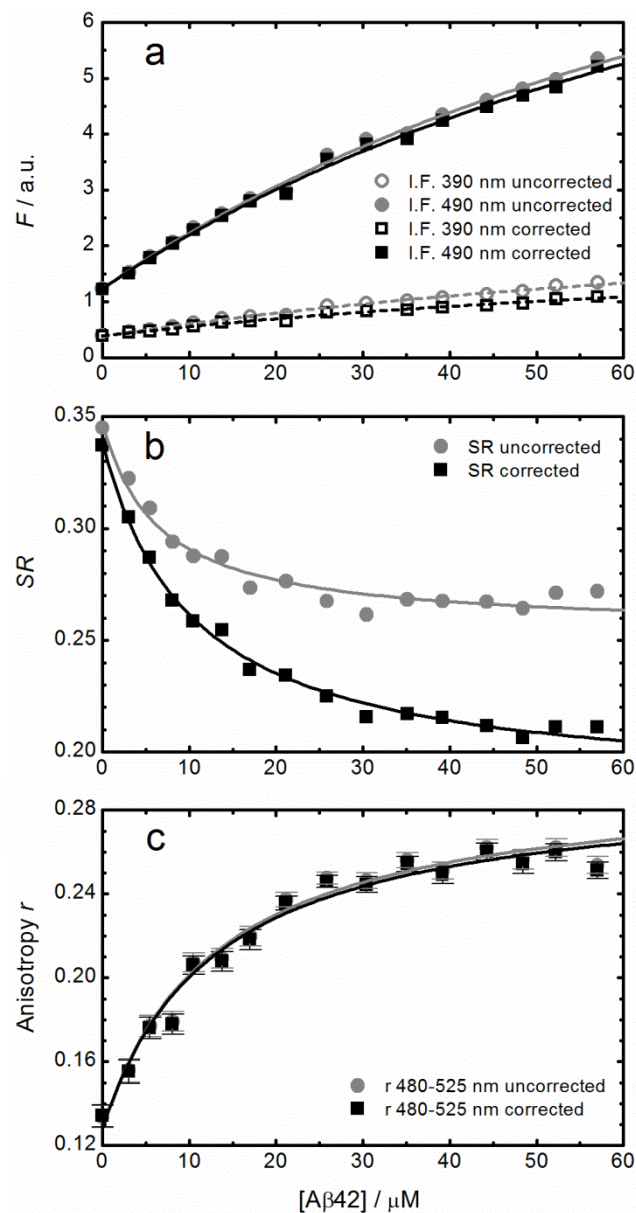


Figure 4S. Plots of (a) fluorescence intensities at 390 nm and 490 nm, (b) SR ratio and (c) mean anisotropy r (480 nm to 525 nm) of HPIP against A β 42 concentration. All three properties are shown as “uncorrected” (gray symbols) and “corrected” values (black symbols), where corrections for solvent contribution (essentially the intense Raman band) and for A β 42 autofluorescence were applied. Solid and dashed lines are the fitted curves to intensity, SR and r data using equations (4), (5) and (6), respectively (see text for the fit parameters).

6.3. Otros potenciales marcadores fluorescentes de fibras de β -amiloide

En este apartado se van a analizar los resultados preliminares obtenidos para distintos colorantes como marcadores de fibras amiloides. Los fluoróforos analizados pertenecen a la familia del imidazol (HPIP_NMe), oxazol (HBO) y tiazol (HBT), con características estructurales similares a la ThT y al HPIP ya descritos. Además, como sondas de transferencia protónica que son, presentan una gran sensibilidad al medio que las rodea, lo que hace que sean potencialmente viables para la detección de fibras de amiloide.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los distintos fluoróforos en medio acuoso y en presencia de fibras amiloides y se realiza el análisis de los mismos.

6.3.1. Comportamiento fotofísico en disolución acuosa a pH neutro

Inicialmente, se van a mostrar los espectros de absorción y emisión típicos de los colorantes HPIP_NMe, HBO y HBT en medio acuoso neutro, concretamente en tampón PBS a pH 7.2. La concentración de HPIP_NMe empleada en las medidas que se muestran a continuación es de 0.5 μ M, mientras que la concentración de las demás disoluciones es desconocida ya que se prepararon por disolución del colorante hasta saturación y posterior filtración (ver sección 3.3.2.).

En las medidas de los espectros de emisión se emplearon los polarizadores, con el fin de determinar también la anisotropía de la muestra, por lo que los espectros obtenidos no están corregidos por la dependencia de la sensibilidad del sistema de detección con la longitud de onda (ver apartado 4.1.1.). Tal como se indicó en los trabajos anteriores, el hecho de que los espectros no estén corregidos no tiene influencia alguna en los resultados obtenidos, ya que siempre se comparan espectros medidos en condiciones idénticas. Sí se observan pequeñas deformaciones en los espectros respecto a las bandas de emisión naturales, especialmente en aquellos que presentan su máximo en torno a 460 nm, longitud de onda a la que el espectro de corrección del fluorímetro utilizado presenta un punto de inflexión muy acusado. Debido a la débil emisión de fluorescencia de los colorantes empleados, tanto por su reducida solubilidad como por su bajo rendimiento cuántico en medio acuoso, los espectros presentaban bastante ruido y han sido suavizados para facilitar su análisis y comparación. Además, aparecen picos estrechos cuya posición depende de la longitud de onda de excitación, que corresponden a bandas Raman del disolvente y luz dispersa.

En la Figura 6.1 se muestran los espectros de absorción, excitación y emisión correspondientes al colorante HPIP_NMe en medio acuoso. Se observa que el máximo de absorción del colorante está en 351 nm mientras que el de emisión está en 475 nm, por lo que

el desplazamiento de Stokes es importante. El espectro de excitación muestra dos máximos, a 290 nm y a 355 nm, que no coinciden con el del espectro de absorción.

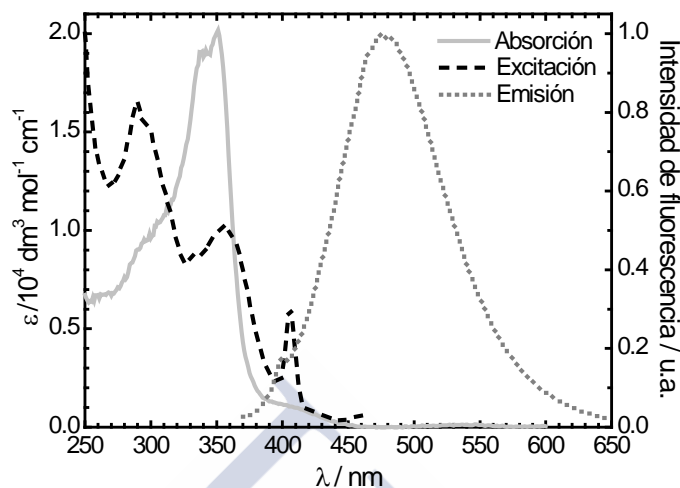


Figura 6.1. Espectros de absorción (línea gris continua, escala izquierda), excitación (línea negra a trazos, escala derecha) y emisión de fluorescencia (línea gris a puntos, escala derecha) del HPIPMe en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2). Absorción indicada en unidades de absorptividad molar. Excitación con $\lambda_{em}=470$ nm y emisión con $\lambda_{exc}=350$ nm (normalizados en el máximo).

La estructura del HPIPMe es muy similar a la del HPIP, que fue estudiado en el apartado anterior, pero presenta un grupo metilo en el nitrógeno piridínico que impide la transferencia de un protón hacia ese grupo pero no otros procesos de transferencia protónica. Los estudios realizados para esta sonda en disolución acuosa con 25% de etanol mostraron que la especie neutra tiene una fluorescencia muy baja debido a la rápida transferencia protónica intramolecular en el estado excitado (ESIPT), seguida de una relajación por transferencia de carga intramolecular con torsión (TICT) y la consiguiente conversión interna, que es muy rápida (Brenlla 2011).

El comportamiento fotofísico en disolución acuosa sin etanol es bastante similar, con un espectro de absorción análogo y un espectro de emisión con una sola banda. Dicha banda de emisión es idéntica en forma y posición espectral a la banda de altas longitudes de onda del HPIP, por lo que se atribuye al tautómero T de la forma neutra (véase Figura 2.31), que sufre una rápida desactivación vía TICT y, por lo tanto, presenta muy baja fluorescencia (véase esquema 2 en el capítulo 6.2 y esquema 3 en (Brenlla 2011)). No se observa para el HPIPMe, sin embargo, la banda de emisión atribuida a la forma normal N_{inter} en el HPIP, lo cual podría ser debido a una eficiente desprotonación en el estado excitado que conduce al anión no fluorescente (Brenlla 2011). El hecho de que el HPIPMe presente una única banda de

fluorescencia hace que, *a priori*, ésta no sea una sonda tan interesante para la detección de amiloides como su análogo HPIP, cuya emisión dual posibilita la utilización del método ratiométrico.

Las diferencias observadas entre el espectro de absorción y el de excitación del HPIP_NMe podrían ser debidas a que la especie responsable de la fluorescencia no es mayoritaria en el estado fundamental, aunque sería necesario realizar un estudio fotofísico más detallado utilizando muestras de mayor pureza para poder descartar la contribución de impurezas fluorescentes.

La Figura 6.2 muestra los espectros de absorción, excitación y emisión del fluoróforo HBO en medio acuoso neutro. El espectro de absorción presenta un máximo a 291 nm y otro a 312 nm, que se corresponden bastante bien con el máximo y el hombro del espectro de excitación, aunque éste presenta también una banda débil en el intervalo 350-400 nm que no se observa en el espectro de absorción. El espectro de emisión tiene el máximo a 441 nm.

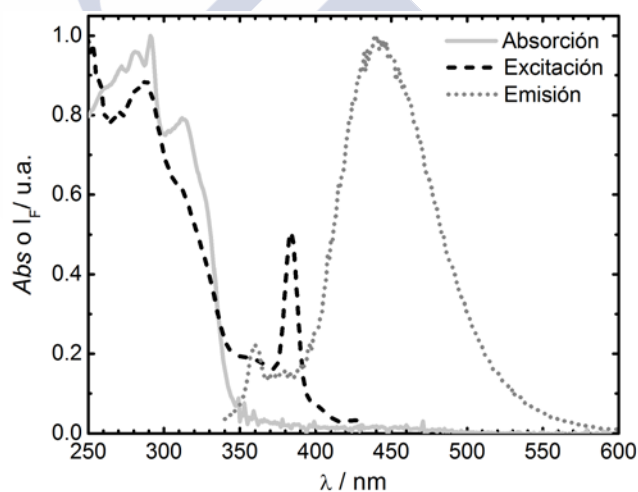


Figura 6.2. Espectros de absorción (línea gris continua), excitación (línea negra a trazos) y emisión de fluorescencia (línea gris a puntos) del HBO en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2). Excitación con $\lambda_{em}=440$ nm y emisión con $\lambda_{exc}=320$ nm. Espectros normalizados en el máximo.

Para el HBT (Figura 6.3), el espectro de emisión presenta una única banda similar a las de los fluoróforos anteriores, con máximo a 456 nm. El espectro de excitación es similar al del HBO, con dos máximos próximos y una banda más débil en el intervalo de 330-400 nm, mientras que el espectro de absorción está distorsionado, posiblemente debido a la baja concentración de colorante en la muestra. Por ello en adelante se discuten los espectros de excitación en lugar de los de absorción.

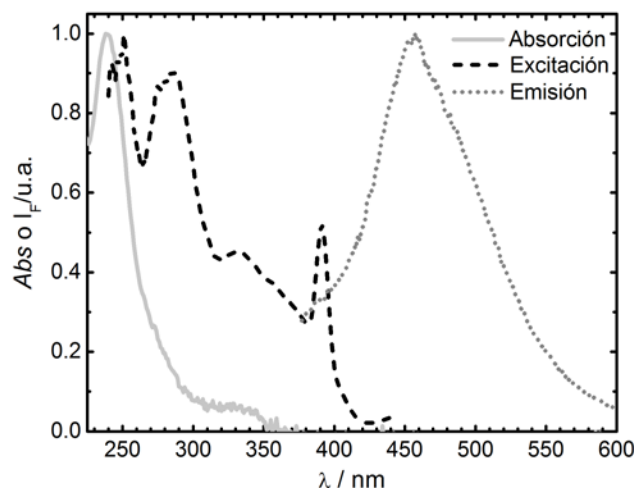


Figura 6.3. Espectros de absorción (línea gris continua), excitación (línea negra a trazos) y emisión de fluorescencia (línea gris a puntos) del HBT en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2). Excitación con $\lambda_{em}=450$ nm y emisión con $\lambda_{exc}=320$ nm. Espectros normalizados en el máximo.

Estos resultados están en concordancia con los publicados para el HBO en mezclas de agua con otros disolventes (Abou-Zied 2007) y para el análogo HBI en disolución acuosa neutra (Mosquera 1996). En el estado fundamental coexisten las dos especies normales N_{inter} y N_{intra} y el tautómero T , responsable de la banda débil a altas longitudes de onda en los espectros de excitación (Figuras 6.2 y 6.3). En el espectro de emisión del HBO se observa una débil banda en el intervalo 350-400 nm, que también parece existir para el HBT aunque no se ha registrado todo este intervalo, que debe ser asignada a la emisión normal de la especie N_{inter}^* . La banda de emisión más intensa tiene su máximo a 441 nm para el HBO y a 456 nm para el HBT, por lo que no es atribuible al tautómero T^* , que emite a mayores longitudes de onda, sino al anión A^* formado por fotodisociación de la especie N_{inter}^* . Teniendo en cuenta que se observa el tautómero en los espectros de excitación, esta banda debe estar formada por la contribución del anión A^* y del tautómero T^* , al igual que se observó para el HBI, aunque la primera es más importante debido a la rápida desactivación no radiante del tautómero en estos medios.

En este trabajo, las medidas se realizaron a una temperatura constante de 25°C. Según varios estudios, la emisión del tautómero formado a partir del HBO y del HBT es dependiente de la temperatura. Esto no es sólo debido a la dependencia de este parámetro que presenta el rendimiento cuántico de la molécula sino también porque el equilibrio en el estado fundamental que existe entre las formas N_{inter} y N_{intra} es una función de la temperatura, favoreciéndose la forma N_{inter} a bajas temperaturas (Ríos Vázquez 2007).

6.3.2. Comportamiento fotofísico en presencia de fibras amiloides

A continuación se van a mostrar los resultados obtenidos para el HPIP_NMe, HBO y HBT en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras amiloides medidos en el mismo día, con la misma disolución madre de fluoróforo, de forma que la concentración de éste y las condiciones de medida son las mismas en ambas muestras. Se ha comprobado que al añadir el fluoróforo a la disolución de fibras la interacción es prácticamente instantánea, por lo que tras varios minutos ya se estabiliza la emisión de fluorescencia. Se comprobó también que después de 24 horas de incubación no había cambios significativos con respecto a la situación inicial.

La concentración de β -amiloide que se utilizó es de 12.5 μ M, siempre referida a la concentración de monómero empleada para la preparación de fibras, desconociendo la concentración de éstas. Según los resultados de los estudios con HPIP y ThT, se considera que con una concentración tan baja de amiloide no se alcanza la complejación total del colorante, que con dichos fluoróforos se situaba en torno a una concentración de β -amiloide de 100 μ M. Pero el empleo de una concentración baja del péptido permite comprobar si el colorante interacciona con las fibras y si los cambios observados son suficientes para considerar al colorante como un marcador válido. En cuanto a los fluoróforos utilizados, la concentración del HPIP_NMe fue de 0.5 μ M mientras que el HBO y HBT se prepararon saturando la disolución, al igual que en los estudios anteriores.

Se realizaron medidas de los espectros de excitación y de emisión, así como de la anisotropía de fluorescencia de los fluoróforos en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras de β -amiloide. Dada la baja emisión de los fluoróforos utilizados, los espectros de emisión fueron corregidos por la autofluorescencia propia del β -amiloide, que fue registrada en las mismas condiciones. Dichos espectros de autofluorescencia del amiloide se han incluido en las figuras para mostrar su rango de influencia. Conviene también indicar que los espectros de anisotropía de fluorescencia presentan fuertes distorsiones a bajas longitudes de onda debidas al efecto de las bandas Rayleigh y Raman, aunque estas no afectan al intervalo de longitudes de onda analizado.

En este trabajo se registraron los espectros de excitación en lugar de los de absorción debido a la baja absorbancia que presentan los colorantes y a la gran dispersión que provocan los amiloides, que impide ver los cambios del espectro de absorción en presencia de fibras.

La Figura 6.4 muestra los espectros de emisión de fluorescencia del HPIP_NMe en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras de β -amiloide. En la gráfica inferior de dicha figura se muestran también los espectros de anisotropía correspondientes. De forma

análoga, la Figura 6.5 y la Figura 6.6 muestran los espectros de emisión y de anisotropía de fluorescencia del HBO y del HBT en disolución acuosa sin y con fibras de β -amiloides.

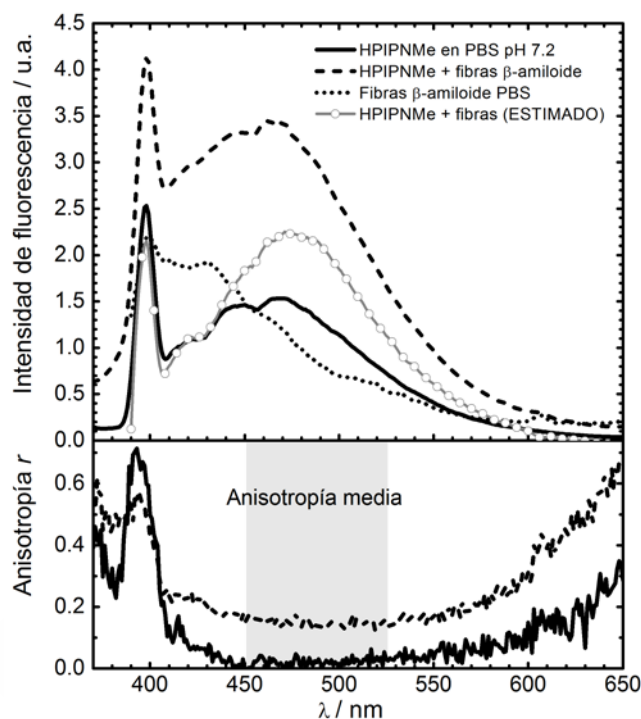


Figura 6.4. Espectros de emisión de fluorescencia del HPIPnMe en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2), HPIPnMe en presencia de fibras de β -amiloides (concentración de monómero 12.5 μ M) y fibras de β -amiloides en PBS en la misma concentración que la muestra anterior (espectros en negro). Espectro estimado para el HPIPnMe en presencia de fibras una vez eliminada la contribución de la autofluorescencia del amiloide (gris). En la gráfica inferior se muestran los espectros de anisotropía de fluorescencia para el colorante en disolución acuosa sin y con fibras, correspondientes a las muestras de los espectros anteriores.

En todos los casos se comprueba que hay un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia al añadir amiloide fibrilar al medio. En el caso del HPIPnMe aumenta la intensidad de fluorescencia con un pequeño desplazamiento hacia el rojo de su máximo de emisión en presencia de las fibras. En cambio, el HBO en medio acuoso presenta un máximo a aproximadamente 440 nm que se desplaza muy significativamente en el medio fibrilar, apareciendo una nueva banda más intensa a 478 nm. De forma análoga, el HBT presenta un máximo de emisión en disolución acuosa en torno a 456 nm que en presencia de las fibras se desplaza y se desdobra, apareciendo una nueva banda más intensa a mayores longitudes de onda (505 nm). Las variaciones espectrales observadas indican que los tres fluoróforos

presentan interacción con las fibras de β -amiloide y que son posibles marcadores de estos agregados.

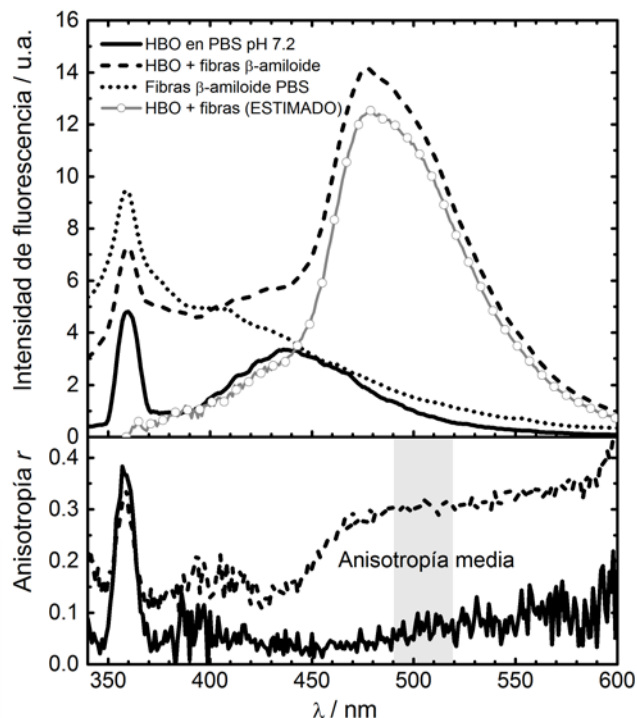


Figura 6.5. Espectros de emisión de fluorescencia del HBO en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2), HBO en presencia de fibras de β -amiloide (concentración de monómero 12.5 μ M) y fibras de β -amiloide en PBS en la misma concentración que la muestra anterior (espectros en negro). Espectro estimado para el HBO en presencia de fibras una vez eliminada la contribución de la autofluorescencia del amiloide (gris). En la gráfica inferior se muestran los espectros de anisotropía de fluorescencia para el colorante en disolución acuosa sin y con fibras, correspondientes a las muestras de los espectros anteriores.

Observando los espectros de anisotropía de fluorescencia, se deduce que en todos los casos se produce un incremento en la misma al interaccionar los colorantes con las fibras de β -amiloide. Para hacer un análisis cuantitativo de dicha variación, se determinó el valor medio de anisotropía en el intervalo indicado en las figuras, donde la anisotropía presenta una mayor constancia y que corresponde a la zona espectral de mayor variación de la intensidad de fluorescencia. En la Tabla 6.1 se muestran dichos valores medios de anisotropía. Para los tres fluoróforos el valor de anisotropía en disolución acuosa es muy pequeño, tal como se espera para este medio. En presencia de fibras la anisotropía aumenta en un factor de 4 – 7 veces, confirmando que se produce interacción entre los colorantes y los agregados fibrilares.

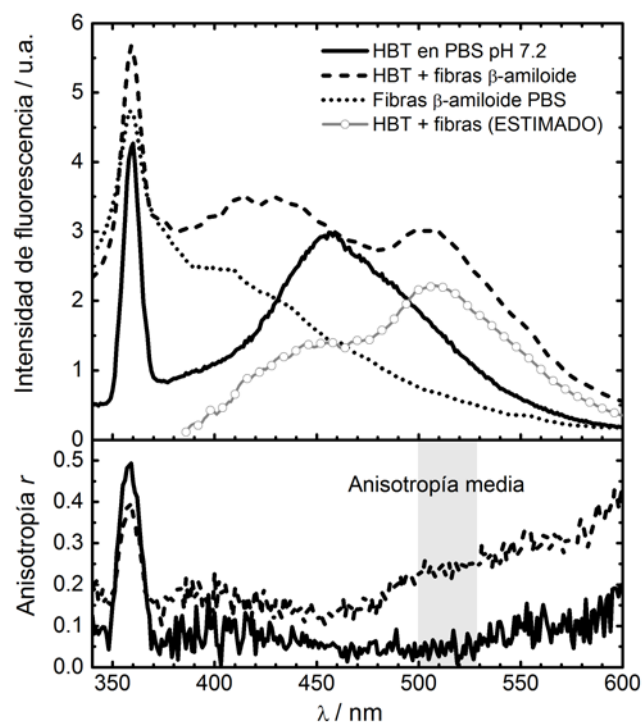


Figura 6.6. Espectros de emisión de fluorescencia del HBT en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2), HBT en presencia de fibras de β -amiloide (concentración de monómero $12.5 \mu\text{M}$) y fibras de β -amiloide en PBS en la misma concentración que la muestra anterior (espectros en negro). Espectro estimado para el HBT en presencia de fibras una vez eliminada la contribución de la autofluorescencia del amiloide (gris). En la gráfica inferior se muestran los espectros de anisotropía de fluorescencia para el colorante en disolución acuosa sin y con fibras, correspondientes a las muestras de los espectros anteriores.

Tabla 6.1. Valores medios de anisotropía del HPIPMe, HBO y HBT en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras de β -amiloide (concentración de monómero $12.5 \mu\text{M}$). El intervalo de determinación para el HPIPMe fue de 450 a 525 nm, para el HBO de 490 a 520 nm y para el HBT de 500 a 530 nm.

Colorante	Medio	r
HPIPMe	PBS pH 7.2	0.020 ± 0.014
	Fibras β -amiloide	0.149 ± 0.011
HBO	PBS pH 7.2	0.067 ± 0.017
	Fibras β -amiloide	0.306 ± 0.010
HBT	PBS pH 7.2	0.046 ± 0.020
	Fibras β -amiloide	0.240 ± 0.013

La existencia de interacción entre los fluoróforos y los agregados fibrilares de β -amiloide también se pone de manifiesto en las variaciones de los espectros de excitación en presencia de fibras. En el caso del HPIPnMe (Figura 6.7) se produce un aumento de la intensidad junto con un claro desplazamiento de las bandas del espectro de excitación cuando se añaden fibras de β -amiloide a la disolución acuosa. Para los otros dos fluoróforos los cambios son menos acusados aunque significativos, como se muestra en la Figura 6.8 para el HBO y en la Figura 6.9 para el HBT.

Las variaciones de los espectros de excitación están directamente relacionadas con cambios de los tipos de especies presentes en el estado fundamental y/o de sus concentraciones. Para los tres fluoróforos se observa un aumento de la absorción de mayores longitudes de onda, que fue atribuida a pequeñas concentraciones de tautómero presentes en el estado fundamental, por lo que se deduce que la concentración de equilibrio de esta especie se incrementa cuando el colorante interacciona con los agregados fibrilares. Las variaciones espectrales a menores longitudes de onda, ligadas a las bandas de absorción de las especies normales, no son fáciles de interpretar debido a las distorsiones que presentan los espectros debido a la baja solubilidad y rendimiento cuántico de los colorantes (véase sección anterior).

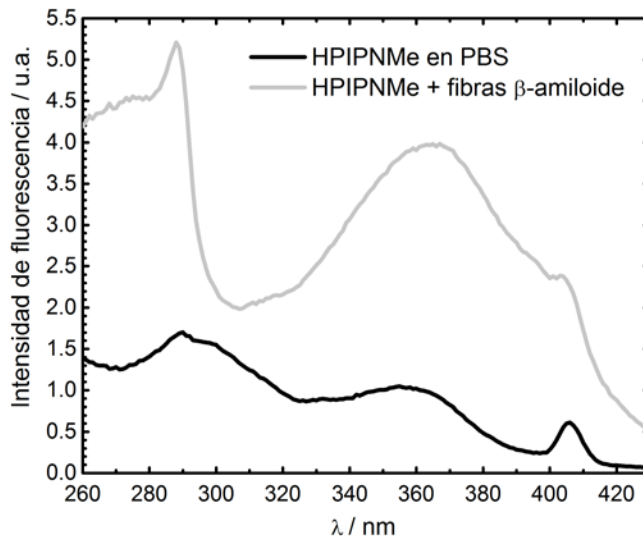


Figura 6.7. Espectros de excitación del HPIPnMe en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras de β -amiloide (concentración de monómero 12.5 μ M). $\lambda_{em}=470$ nm.

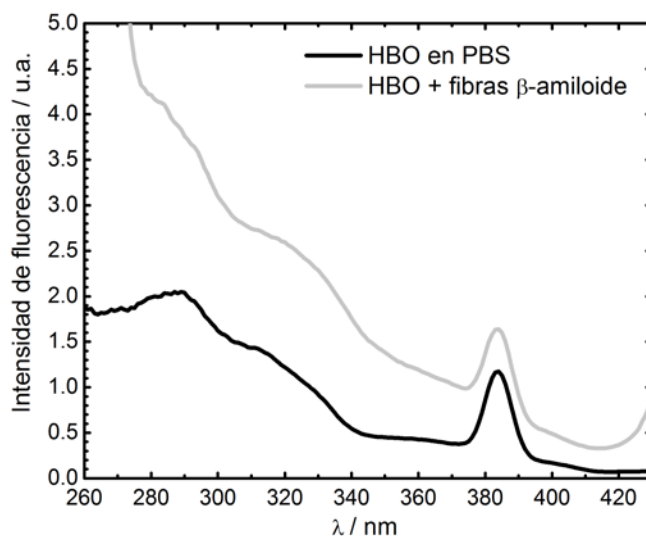


Figura 6.8. Espectros de excitación del HBO en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras de β-amiloide (concentración de monómero 12.5 μM). $\lambda_{em}=440$ nm.

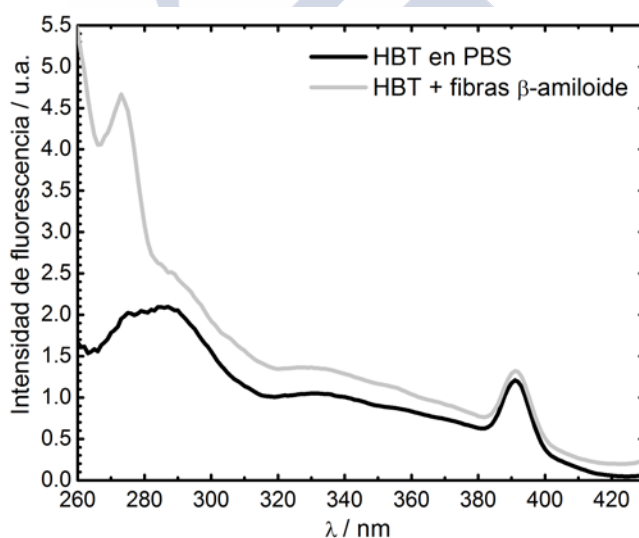


Figura 6.9. Espectros de excitación del HBT en disolución acuosa en ausencia y en presencia de fibras de β-amiloide (concentración de monómero 12.5 μM). $\lambda_{em}=450$ nm.

Como se señaló anteriormente, el fluoróforo HPIPMe no presenta dos bandas de emisión de fluorescencia en disolución acuosa (Figura 6.4) como es el caso del HPIP ni tampoco aparece una segunda banda en presencia de fibras amiloides, como ocurre en el HBO (Figura 6.5) y el HBT (Figura 6.6). Esto se debe a que la emisión viene fundamentalmente del tautómero T* tanto en ausencia como en presencia de fibras. Sí se observa un desplazamiento hacia el rojo de la banda de emisión, así como un incremento de la intensidad de fluorescencia que se interpreta como un aumento del rendimiento cuántico

de fluorescencia del tautómero cuando éste está unido a las fibras de β -amiloide. Según Brenlla y colaboradores, el tautómero es poco emisivo en disolución acuosa ya que este medio favorece una transferencia de carga en la molécula que conlleva la formación de un estado TICT no fluorescente (Brenlla 2011). Sin embargo, esta desactivación no radiante es dependiente de la viscosidad del medio y, según los resultados obtenidos con el HPIP, cabe esperar que cuando el tautómero está asociado a los agregados fibrilares el proceso TICT sea inhibido y el tautómero se vuelva más emisivo.

La variación de intensidad de fluorescencia observada para el HPIP_{NMe} en presencia de fibras de β -amiloide no es muy grande (Figura 6.4), bien porque la proporción de fluoróforo unido a las fibras es baja a la concentración de amiloide utilizada (afinidad baja) o porque el aumento de rendimiento cuántico del tautómero al enlazarse con las fibras es pequeño. Esto lleva a que la intensidad de fluorescencia no sea una propiedad muy sensible para detectar la presencia de fibras, al igual que ocurría con el HPIP (véase Figura 4 en el capítulo 6.2). En cambio, la anisotropía sí que presenta un cambio muy grande, incrementándose en un factor de 7 para la misma concentración de amiloide (Figura 6.4 y Tabla 6.1). Este aumento es incluso mayor que el que se observaba en el HPIP (véase Figura 4 en el capítulo 6.2) y pone de manifiesto que la anisotropía es un parámetro muy sensible para la detección de las fibras. No obstante, el análogo HPIP tiene la ventaja de presentar dos bandas de fluorescencia cuya relación de intensidades varía con la concentración de amiloide, lo cual permite la utilización de un método ratiométrico que no es posible en el HPIP_{NMe}.

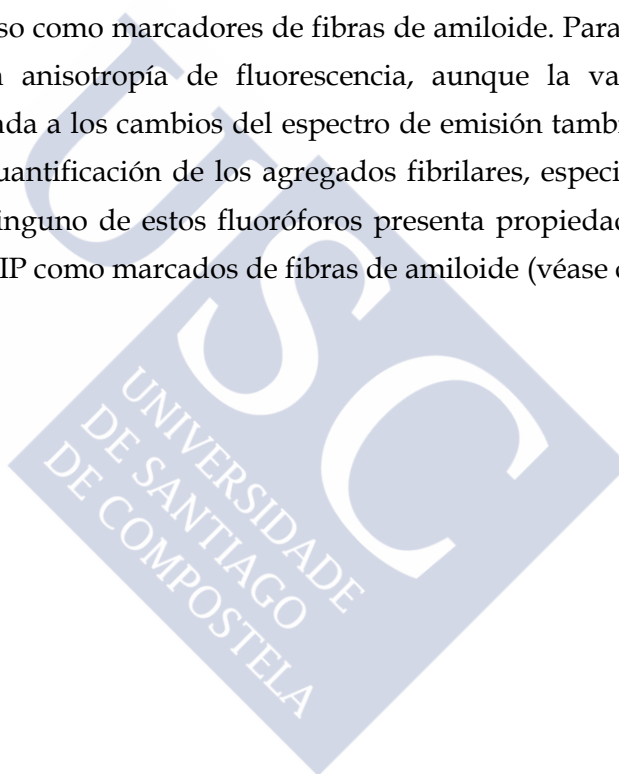
En el caso de los fluoróforos HBO (Figura 6.5) y HBT (Figura 6.6), la adición de fibras de β -amiloide conduce a la aparición de una segunda banda de emisión a mayores longitudes de onda que se asocia con la fluorescencia del tautómero T^* correspondiente. Este tautómero se forma en el estado excitado a partir del confórmero N_{intra}^* mediante un proceso ESIPT muy rápido. Una vez formado T^* , la unión con las fibras inhibe su capacidad para sufrir el proceso TICT y la molécula emite dando lugar a la banda citada. En el caso del HBO, la inhibición del estado TICT es clara ya que la banda del tautómero es muy intensa. Estos resultados están en muy buena concordancia con los publicados para HBO y HBT en disolución acuosa neutra (Abou-Zied 2007, Kim 2009) y en presencia de la proteína no fibrilar seroalbúmina humana (HSA), donde los colorantes presentan fluorescencia dual con mayor intensidad de la banda del tautómero (Abou-Zied 2012, Abou-Zied 2013).

La existencia de estas dos bandas de emisión hace que estos fluoróforos sean muy interesantes en cuanto a su posible uso como sondas fluorescentes para estas biomoléculas, ya que permitirían el uso de un método ratiométrico en análisis cuantitativos para determinar la concentración de proteína (Lee 2014). El mayor inconveniente de estos

fluoróforos es su pequeña solubilidad en agua, así como su bajo rendimiento cuántico, que dificultan la realización de las medidas experimentales.

Por otra parte, el aumento de la anisotropía en la banda del tautómero para el HBO (Figura 6.5) y el HBT (Figura 6.6) es muy acusado, aunque algo menor que en el caso del HPIP_{NMe}. En todos los casos dicho aumento indica que el entorno microscópico en el que se encuentra el tautómero al unirse a las fibras amiloides es más rígido que el medio acuoso, por lo que sufre un mayor impedimento para rotar que lleva a la inhibición del proceso TICT. Por tanto, la anisotropía constituye un parámetro muy sensible para la detección de amiloides con estos fluoróforos.

En conclusión, los tres fluoróforos utilizados en este estudio poseen propiedades fotofísicas adecuadas para su uso como marcadores de fibras de amiloide. Para todos ellos el parámetro más sensible es la anisotropía de fluorescencia, aunque la variación de la intensidad de fluorescencia ligada a los cambios del espectro de emisión también podría ser utilizada para la detección y cuantificación de los agregados fibrilares, especialmente en el caso del HBO. Sin embargo, ninguno de estos fluoróforos presenta propiedades fotofísicas superiores a las del análogo HPIP como marcados de fibras de amiloide (véase capítulo 6.2).



CAPÍTULO 7

Caracterización de agregados tempranos de β -amiloide

Contenidos

7.1. Estudio preliminar del HiLyte Fluor 488-β-amiloide(1-42)	245
7.2. Caracterización de pequeños agregados de β-amiloide(1-42) mediante FCS	251
7.2.1. Evolución temporal de los agregados tempranos	253
7.2.2. Dependencia de la concentración en la formación de agregados tempranos	255
7.3. Estudio de potenciales marcadores de pequeños agregados de β-amiloide	263
7.3.1. Agregación del β -amiloide a 25°C en función del tiempo de incubación	264
7.3.2. Agregación del β -amiloide a 25°C en función de la concentración de péptido	276
7.3.3. Agregación del β -amiloide bajo condiciones de formación de fibras	285



En la actualidad se conoce y acepta que la deposición en el cerebro de β -amiloide en estado fibrilar es claramente una señal de la EA pero también se ha demostrado que los pequeños agregados solubles de β -amiloide están asociados con los daños causados por la misma. Por tanto, no solo es importante estudiar el comportamiento de las fibras amiloides sino también de los agregados de menor peso molecular formados previamente, con el fin de conocer los distintos pasos que llevan a su agregación y poder controlarla.

Este capítulo se dedica al estudio de oligómeros y pequeños agregados solubles de β -amiloide formados en las etapas tempranas del proceso de agregación que originaría posteriormente las fibras insolubles. A diferencia de los estudios con fibras, en este caso no se realiza ningún procedimiento de preparación de los pequeños agregados, sino que éstos se forman espontáneamente al disolver el amiloide en disolución acuosa. Para estos estudios se parte del péptido monomérico obtenido tras el tratamiento del amiloide comercial y se solubiliza el mismo en una pequeña cantidad de DMSO antes de disolverlo en el tampón PBS a pH 7.2 (ver apartado 3.3.1).

La primera parte de este estudio consiste en la caracterización de los pequeños agregados de amiloide utilizando la técnica de *Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia* (FCS), con el fin de comprender la dinámica de su proceso de formación y determinar sus propiedades. Para estos estudios se emplea el β -amiloide(1-42) y este mismo péptido marcado fluorescentemente, el *HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42)*, que se incorpora a los agregados a medida que se forman, permitiendo observarlos mediante la técnica de FCS.

Para la caracterización de estos pequeños agregados se realizaron estudios a distintos tiempos de incubación y a diferentes concentraciones de péptido con el fin de analizar la evolución temporal del proceso y la influencia del incremento de la concentración de monómero en el mismo.

En la segunda parte se utilizan técnicas de espectroscopia de fluorescencia convencionales para determinar el comportamiento de los pequeños agregados amiloides en presencia de potenciales marcadores fluorescentes de los mismos que permitan su detección en medio acuoso. Se estudiaron las sondas de transferencia protónica empleadas en los ensayos con fibras amiloides, comparando las mismas con la Tioflavina T. El objetivo fue determinar si estos colorantes eran adecuados también para el marcaje de los agregados tempranos solubles y si permitían seguir el proceso de agregación de los mismos. Debido al bajo rendimiento cuántico en disolución acuosa que presentan los fluoróforos estudiados, los ensayos se centraron principalmente en la sonda HPIP, cuya validez para la detección de fibras amiloides fue demostrada, y en el HBO. Se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones que los estudios anteriores con FCS, centrados en analizar la evolución temporal

de la agregación y su dependencia con la concentración del péptido a la temperatura de 25°C. Además, se analizaron los posibles cambios en la evolución temporal del proceso de agregación al elevar la temperatura a 37°C y aplicar agitación (condiciones empleadas en la formación de fibras), utilizando el HPIP y la Tioflavina T como fluoróforos, aunque sólo se van a indicar los resultados finales obtenidos con la ThT.

Los resultados mostrados en este capítulo son preliminares ya que son estudios muy recientes y tendrán que ser completados y confirmados con nuevos experimentos y análisis.



7.1. Estudio preliminar del HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42)

El β -amiloide(1-42) marcado con el fluoróforo HiLyte Fluor 488 es un péptido fluorescente cuyo máximo de absorción se encuentra en 503 nm. En la Figura 7.1 se muestran sus espectros de excitación y de emisión en tampón PBS a pH 7.2. El espectro de excitación presenta una estructura con varios picos, a 483 nm, 493 nm y 503 nm, este último correspondiente al máximo del espectro de absorción. El espectro de emisión tiene su máximo a 528 nm. No fue posible medir el espectro de absorción debido a la baja concentración de colorante empleada y la alta dispersión provocada por el propio amiloide. Es necesario conocer de antemano las características de los fluoróforos que se van a utilizar en las medidas de FCS para poder seleccionar el láser, su potencia y los filtros que se deben emplear.

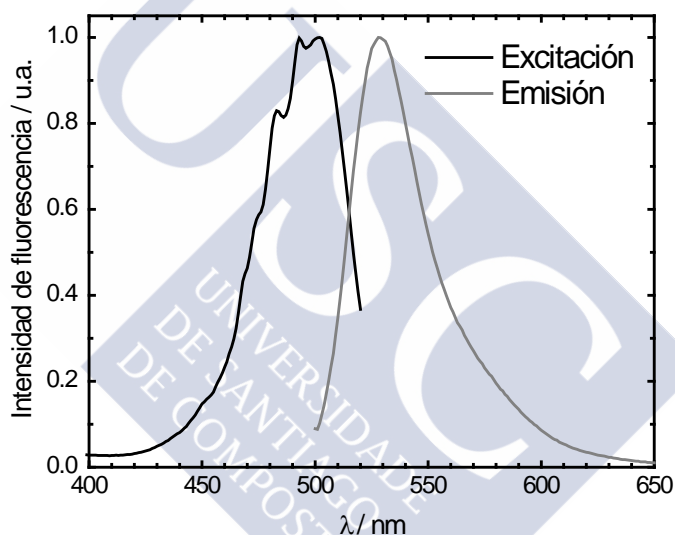


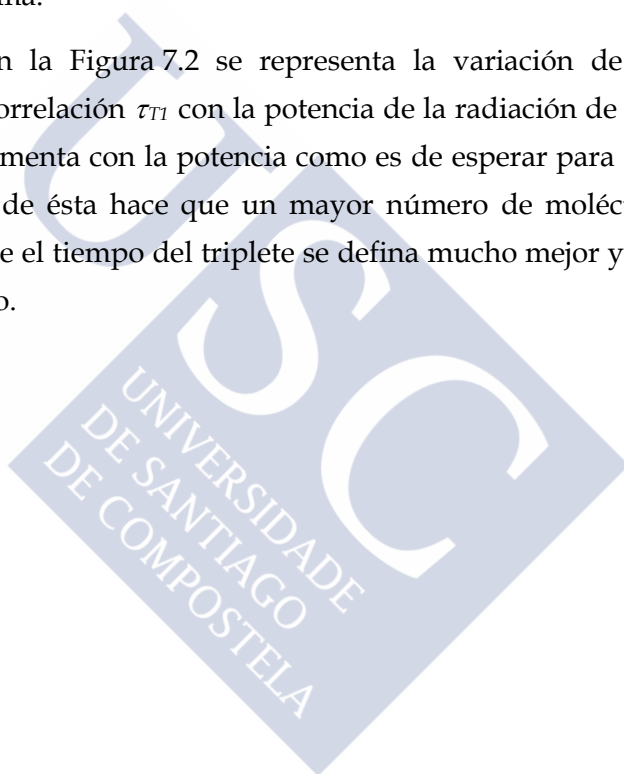
Figura 7.1. Espectro de excitación (izda.) y emisión (drcha.) del péptido marcado HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) en PBS a pH 7.2. Excitación medida con $\lambda_{em}=528$ nm y emisión determinada con $\lambda_{exc}=488$ nm.

Se ha comprobado que la variación de la concentración de este péptido marcado no lleva a cambios en la banda del espectro de emisión, aumentando la intensidad de fluorescencia linealmente con el incremento de la concentración. También se determinó la anisotropía media en el intervalo del máximo de emisión (520 nm a 540 nm), que tiene un valor bastante bajo de 0.068 ± 0.002 que indica gran libertad de rotación del colorante unido al péptido.

Para poder iniciar los experimentos en FCS, se deben definir bien determinadas características del péptido, de forma que se conozca su tiempo de difusión y la potencia óptima a emplear. Para esto, se realiza una serie de potencia a 25°C empleando una muestra

del HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) de concentración 0.3 μ M en PBS pH 7.2. Se determinan las curvas de correlación correspondientes a la misma en un intervalo de potencia de 10 a 400 μ W (Figura 7.2). Los resultados obtenidos se ajustan mediante la ecuación 4.30, con un tiempo de difusión correspondiente al monómero de β -amiloide marcado y dos tiempos de triplete ($\tau_{T1}=2.1\pm 0.2$ μ s y $\tau_{T2}=0.30\pm 0.03$ μ s). El valor más alto de esos dos tiempos se asigna al tiempo de vida del triplete del fluoróforo estudiado mientras que el tiempo de 0.30 μ s se considera que es un artefacto experimental, sobre el que no hay suficiente información pero que tampoco tiene mucha significación por su baja amplitud. Para definir bien este tiempo se realizaron ajustes de las curvas de correlación completas (desde 0.01 μ s), pero en este trabajo se van a mostrar las curvas desde 0.1 μ s, ya que los tiempos de correlación tan bajos no tienen importancia en este sistema.

En la gráfica insertada en la Figura 7.2 se representa la variación de la amplitud correspondiente al tiempo de correlación τ_{T1} con la potencia de la radiación de excitación. Se observa que dicha amplitud aumenta con la potencia como es de esperar para un tiempo de triplete, ya que el incremento de ésta hace que un mayor número de moléculas pasen al estado triplete. Esto permite que el tiempo del triplete se defina mucho mejor y favorece una buena determinación del mismo.



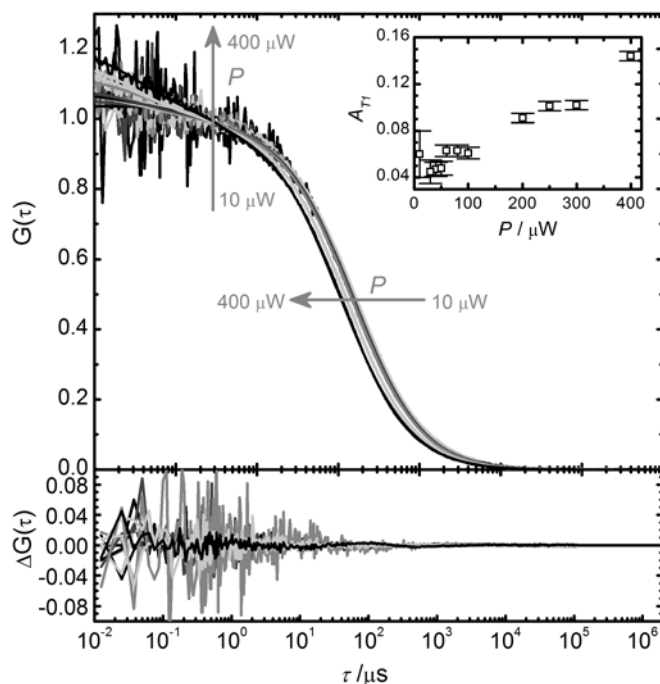


Figura 7.2. Curvas de correlación normalizadas obtenidas con FCS para la serie de potencia del HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) en PBS a pH 7.2 ([péptido]=0.3 μ M). La serie de potencia se realizó variando este parámetro entre 10 y 400 μ W. Se muestran las curvas con sus correspondientes ajustes mediante la ecuación 4.30 y los residuos resultantes (gráfica inferior). En la gráfica insertada se muestra la variación con la potencia de la amplitud del triplete correspondiente a $\tau_{T1}=2.08 \mu$ s, obtenida para el ajuste de cada curva (A_{T1}).

A partir de los resultados de los ajustes de la serie de potencia (Figura 7.2) se analizó la variación del tiempo de difusión del monómero de amiloide marcado en función de la potencia (o de la irradiancia), así como el cambio del parámetro *cpm* (*counts per molecule*), que da cuenta de la intensidad de fluorescencia por molécula (Figura 7.3). El comportamiento de estos parámetros permite determinar un intervalo óptimo de potencia para trabajar con este péptido, de manera que no se produzcan efectos como la saturación óptica o el fotoblanqueo (ver sección 2.3.2).

En la representación del tiempo de difusión se observa un valor constante para el mismo en el intervalo de potencia entre 10 y 100 μ W. En este mismo intervalo se observa linealidad en la representación del parámetro *cpm* frente a la potencia. Al aumentar la potencia por encima de 100 μ W, el tiempo de difusión desciende de forma importante y el parámetro *cpm* deja de seguir una línea recta, indicando la existencia de procesos de fotoblanqueo, en los que las moléculas se destruyen como consecuencia de la fuerte irradiación. A potencias altas también se produce una saturación óptica al aumentar el número de moléculas que pasan al estado triplete no fluorescente. Este proceso provoca un aumento en la amplitud del triplete,

como se observó en la Figura 7.2. Por tanto, el **intervalo óptimo** de potencia con el que se debe trabajar se encuentra entre **10 y 100 μW** .

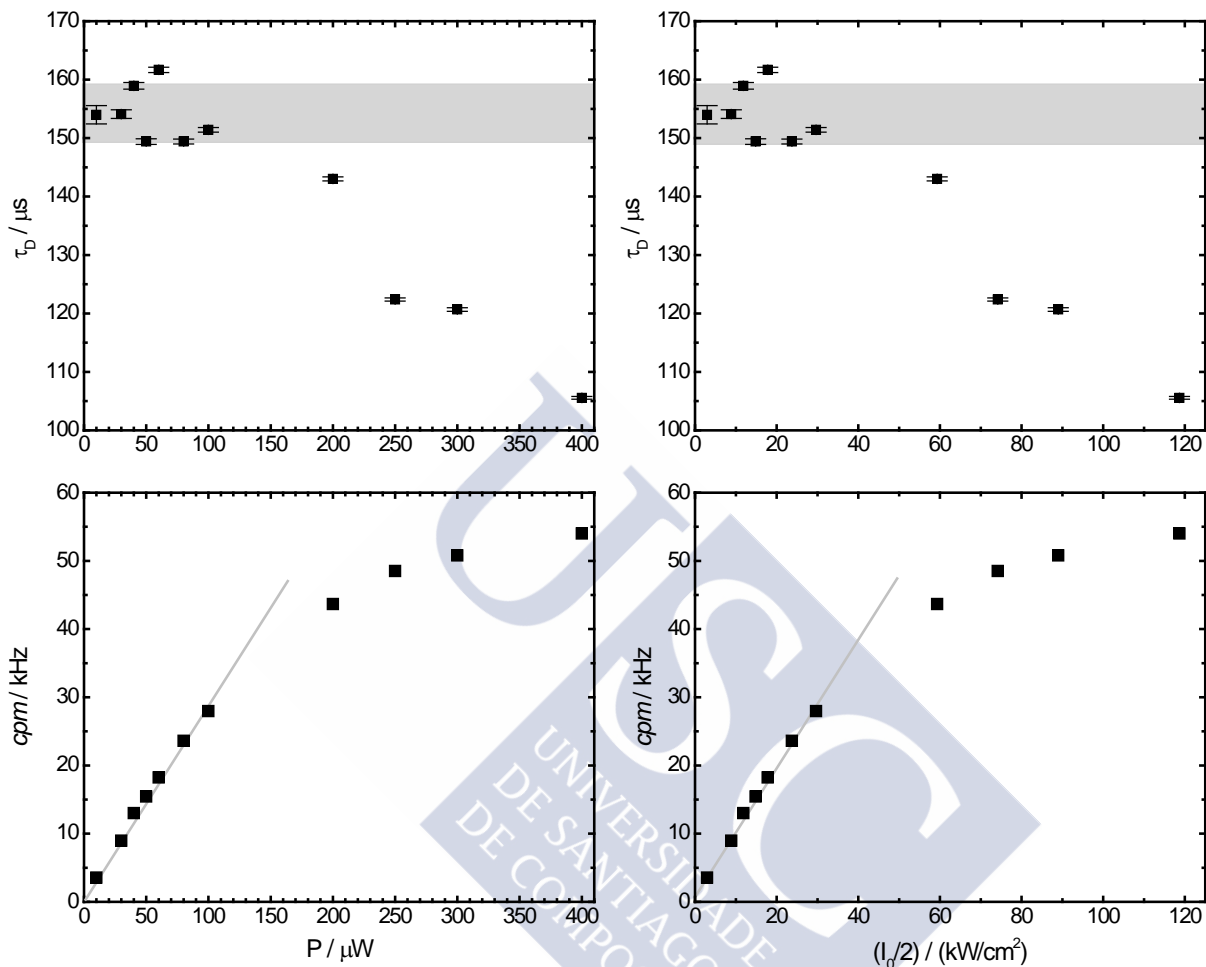


Figura 7.3. Gráficas superiores: variación del tiempo de difusión obtenido del ajuste de las curvas de correlación de la Figura 7.2 con la potencia (izda.) y con la irradiancia (drcha.). Con fondo gris se indica el intervalo en que se mantiene prácticamente constante el tiempo de difusión. Gráficas inferiores: variación del parámetro *cpm* (cuentas por molécula) con la potencia (izda.) y con la irradiancia (drcha.). La línea gris indica la dependencia lineal que presenta el parámetro *cpm* en el intervalo hasta 100 μW de potencia.

A partir de la representación anterior, en el intervalo óptimo de potencia se puede determinar un valor medio para el tiempo de difusión del β -amiloide marcado, que se corresponde con $\tau_D = 154 \pm 5 \mu\text{s}$. Este valor puede variar algo dependiendo del ajuste inicial del equipo, ya que el tamaño del foco no es idéntico en todas las series de medida, por lo que en los ajustes se utilizó el valor correspondiente a cada una. De todas formas, las variaciones entre las series son muy pequeñas y el valor indicado, dentro del error que presenta, es

coincidente con el que le corresponde al amiloide marcado en la mayoría de las medidas realizadas. A partir de ese valor del tiempo de difusión y del obtenido para la referencia en la serie correspondiente (R123, con $\tau_{Dref} = 41.3 \pm 0.2 \mu\text{s}$ y $D_{ref} = (4.6 \pm 0.4) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) se determina el coeficiente de difusión del β -amiloide marcado mediante la ecuación 4.40, obteniéndose un valor de $D(\beta\text{-amiloide marcado}) = (1.23 \pm 0.11) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, que está en muy buena concordancia con los valores dados por Danielsson y colaboradores para el β -amiloide(1-40) y una serie de fragmentos del mismo (Danielsson 2002).

Si se calcula el tiempo de difusión esperado para este amiloide en función de su masa molecular para las posibles conformaciones de la molécula, en función del factor ν , se obtienen los valores indicados en la Tabla 7.1 (véase apartado 4.6.3). Se observa que el tiempo de difusión obtenido experimentalmente para el amiloide marcado ($\tau_D = 154 \pm 5 \mu\text{s}$) corresponde a una conformación intermedia entre el ovillo gaussiano y la esfera. Concretamente, dicho valor corresponde a una conformación con $\nu = 0.43$, que coincide perfectamente con el valor de 0.44 ± 0.01 determinado por Danielsson y colaboradores. Según estos autores, la conformación de este tipo de amiloide sería de ovillo gaussiano aunque con cierta estructura residual en los péptidos de mayor tamaño (Danielsson 2002).

Tabla 7.1. Valores calculados del tiempo de difusión y del coeficiente de difusión del β -amiloide marcado con HiLyte Fluor 488 en función de la masa molecular para diferentes conformaciones del péptido. En el cálculo se utilizaron los siguientes valores para la referencia R123: tiempo de difusión de $41.3 \mu\text{s}$ y factor $\nu = 0.4$ (Al-Soufi 2008).

Conformación	ν	$\tau_D / \mu\text{s}$	$D / 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
Esfera	1/3	66	2.9
Ovillo gaussiano	1/2	278	0.68
Ovillo perturbado	3/5	650	0.29

Las condiciones de medida determinadas a través de esta serie de potencia son válidas para los sistemas en los que se estudie sólo este amiloide marcado. En los experimentos realizados en FCS para analizar la agregación del péptido se emplea este amiloide marcado en una concentración muy baja (y siempre similar en todas las series) junto con amiloide sin marcar en concentración variable. De esta forma, los agregados formados tienen una determinada carga de fluoróforo y se pueden observar con esta técnica. Al añadir amiloide sin marcar, el comportamiento fotofísico del amiloide marcado podría verse afectado, ya que el tiempo del triplete podría variar al producirse cambios en el entorno del fluoróforo y,

además, la estabilidad fotoquímica del amiloide marcado podría ser menor cuando se encuentra formando parte de partículas más grandes que tardan más tiempo en atravesar el foco y, por lo tanto, reciben más radiación. Por ello es necesario realizar nuevas series de potencia del amiloide marcado en presencia de amiloide sin marcar, con el fin de definir la potencia a emplear en los experimentos y determinar el tiempo del triplete correspondiente, ya que puede ser necesario fijar este tiempo en los ajustes de las curvas de correlación.

Se realizaron series de potencia con amiloide marcado con HiLyte Fluor 488 en concentración $0.3 \mu\text{M}$ y amiloide sin marcar en concentraciones de $1 \mu\text{M}$ y $23 \mu\text{M}$. Al añadir estas cantidades de amiloide sin marcar se espera que aparezcan agregados de mayor tamaño que los monómeros, de manera que los efectos del fotoblanqueo y de la saturación óptica podrían aparecer a menores potencias de excitación.

Para el análisis de estas curvas de correlación, y de las que se presentarán en adelante, se limitó el rango de ajuste hasta tiempos de $20000 \mu\text{s}$, ya que en ocasiones aparecen agregados de gran tamaño (muy pocos pero muy luminosos) que deforman la curva de correlación a tiempos largos pero que no son de interés en nuestro estudio. Como función de ajuste se utilizó la ecuación 4.31, con dos tiempos de difusión que corresponden al monómero de amiloide marcado y a un valor promedio del tiempo de difusión de los agregados presentes, así como dos tiempos de triplete (véase apartado 4.6.2).

Una vez realizados los ajustes de las curvas de correlación de esas series de potencia, se comprobó que los tiempos de triplete obtenidos se correspondían con los determinados en el análisis de la serie de potencia del amiloide marcado sólo, por lo que la agregación no parece afectar al tiempo de vida del triplete del fluoróforo. Para determinar el intervalo de potencia óptimo de medida no es posible utilizar el tiempo de difusión de los agregados, como se hizo para el monómero, ya que éste fluctúa aleatoriamente de una medida a otra. Tampoco es factible calcular el parámetro cpm , ya que el número promedio de partículas N que atraviesan el foco y que se determina en el ajuste es un valor aparente para una mezcla de monómeros y agregados que, además, está muy influido por la luz dispersada por los amiloides. Por ello, la determinación del intervalo de potencia óptimo se basó en el rango de variación lineal en la gráfica de la intensidad de fluorescencia detectada por segundo (ADC, véase sección 2.3.2) frente a la potencia (o a la irradiancia). Tal como se muestra en la Figura 7.4, existe una variación lineal en el intervalo desde $10 \mu\text{W}$ hasta $100 \mu\text{W}$, por lo que el rango de potencia óptimo es el mismo que para el amiloide monomérico.

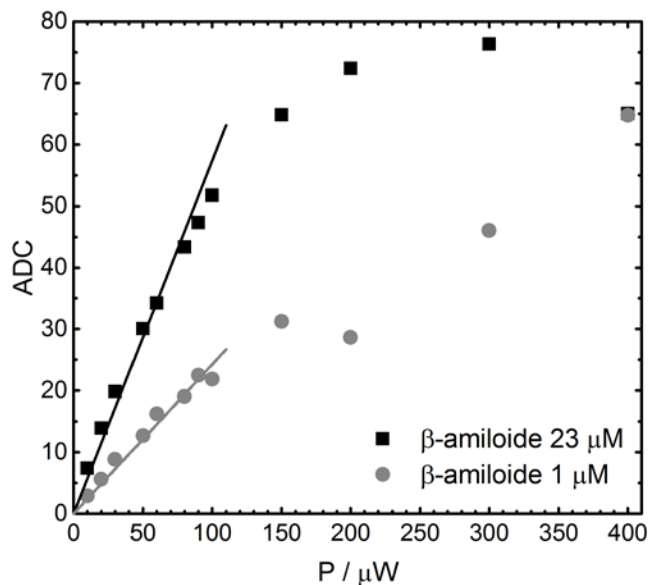


Figura 7.4. Variación de la intensidad de fluorescencia detectada por segundo, ADC, con la potencia de la radiación de excitación, tanto para la serie con β -amiloide sin marcar 1 μ M (gris) como 23 μ M (negro), ambas con una concentración de HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) de 0.3 μ M. Las líneas gris y negra indican la dependencia lineal que presenta el parámetro ADC hasta un valor de 100 μ W de potencia, para cada una de las series de medidas.

En función de los resultados obtenidos, se estableció el uso de una potencia de 80 μ W como valor óptimo para realizar los estudios de agregación del amiloide. Además, la concentración de amiloide marcado se fijó en un valor de 0.3 μ M en cada serie, ya que se obtuvo un número adecuado de moléculas en el foco. La determinación de dos tiempos de triplete (uno correspondiente a un artefacto experimental) lleva a emplear la ecuación 4.31 para el análisis de las series realizadas para estudiar la agregación del amiloide, obteniendo también dos tiempos de difusión: el correspondiente al amiloide marcado en estado monomérico, cuyo valor es el determinado anteriormente ($154 \pm 5 \mu$ s), y un segundo tiempo correspondiente al tiempo promedio de difusión de los agregados formados. Los ajustes se realizaron en el intervalo temporal de 0.01 μ s a 20000 μ s, fijando un tiempo de triplete en 0.3 μ s y otro en 2.1 μ s (este último se fijó sólo en caso necesario y siempre se comprobó que se podía ajustar libremente).

7.2. Caracterización de pequeños agregados de β -amiloide(1-42) mediante FCS

Para la caracterización de los agregados tempranos de β -amiloide(1-42) se preparan muestras en PBS de pH 7.2 que contienen distintas concentraciones de péptido no marcado a las que se añade una cantidad fija (0.3 μ M) de HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42). Cada

muestra se agita y se vierte en el pocillo del *well plate* para realizar las medidas de FCS. Se determina la curva de correlación de fluorescencia de la muestra a distintos tiempos de incubación, considerando el tiempo 0 como la primera medida obtenida tras la preparación. Para todas las series se emplea una potencia de $80 \mu\text{W}$, ajustando siempre el equipo mediante el uso de la R123 como referencia y determinando la curva de correlación correspondiente al amiloide marcado sólo en concentración $0.3 \mu\text{M}$, para comprobar que el vial está en buenas condiciones y que no hay agregados. Cada experimento se mide en un intervalo de tiempo entre 2 y 3 horas, manteniendo las muestras a una temperatura constante de 25°C .

Las curvas de correlación de fluorescencia obtenidas para el amiloide marcado sólo se ajustan mediante la ecuación 4.30 y las determinadas para las muestras (amiloide marcado + amiloide sin marcar) con la ecuación 4.31. En todos los casos, se fija el tiempo de $0.30 \mu\text{s}$ (correspondiente a un artefacto experimental) y se ajusta el tiempo de triplete del sistema, con un valor en torno a $2 \mu\text{s}$. Para evitar la elevada correlación entre los parámetros a la hora de realizar los ajustes, el valor para el tiempo de difusión del amiloide marcado en estado monomérico (τ_{D1}) también se fija, determinando el mismo en función del valor de la R123, que indica el tamaño del foco para cada experimento (ecuación 4.41). Este valor se encuentra en torno a $154 \mu\text{s}$ en todos los experimentos, coincidiendo con el determinado a través de las series de potencia (ver apartado anterior). De esta manera se obtiene el tiempo de difusión medio τ_{D2} correspondiente a los agregados amiloides formados en la disolución y el parámetro r , que indica la contribución del amiloide monomérico marcado a la amplitud del término de difusión. En el ajuste también se determina N , que es al número medio de partículas presentes en la disolución que difunden a través del foco.

Todas las series se ajustan en el intervalo hasta $20000 \mu\text{s}$ con el fin de analizar sólo los pequeños agregados que se forman en la disolución, evitando así agregados de mayor peso molecular que puedan aparecer y originar tiempos de difusión más altos. Los agregados de gran tamaño pueden distorsionar las curvas de correlación ya que suelen presentar una importante contribución a ésta debido a su elevada luminosidad, a pesar de estar en muy baja concentración. Esto dificulta el análisis de las curvas de correlación e invalida en muchos casos las expresiones empleadas para su ajuste, cuando las partículas son de tamaño similar al foco. Por tanto, el interés de este trabajo se centra en los agregados de menor tamaño que contribuyen a la curva de correlación a tiempos más cortos.

7.2.1. Evolución temporal de los agregados tempranos

Tras la realización de las medidas de cada serie (con distintas concentraciones de amiloide) en función del tiempo de incubación, se comprobó que durante el período de tiempo del experimento (2-3 h) no hay cambios sistemáticos en los valores de los tiempos de difusión determinados para los agregados formados ni en los parámetros r y N correspondientes.

En la Figura 7.5 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de correlación de fluorescencia y sus ajustes obtenidas para una muestra de β -amiloide(1-42) y β -amiloide(1-42) marcado en una concentración total de péptido $34.9 \mu\text{M}$, empleando las condiciones ya indicadas. Se observa que las curvas son prácticamente coincidentes e independientes del tiempo de incubación, a pesar de la elevada concentración de péptido. Los ensayos realizados comprendieron concentraciones entre $0.4 \mu\text{M}$ y $45 \mu\text{M}$ de péptido (concentración total de amiloide) y en ningún caso se observaron variaciones sistemáticas de las curvas de correlación con el tiempo de incubación.

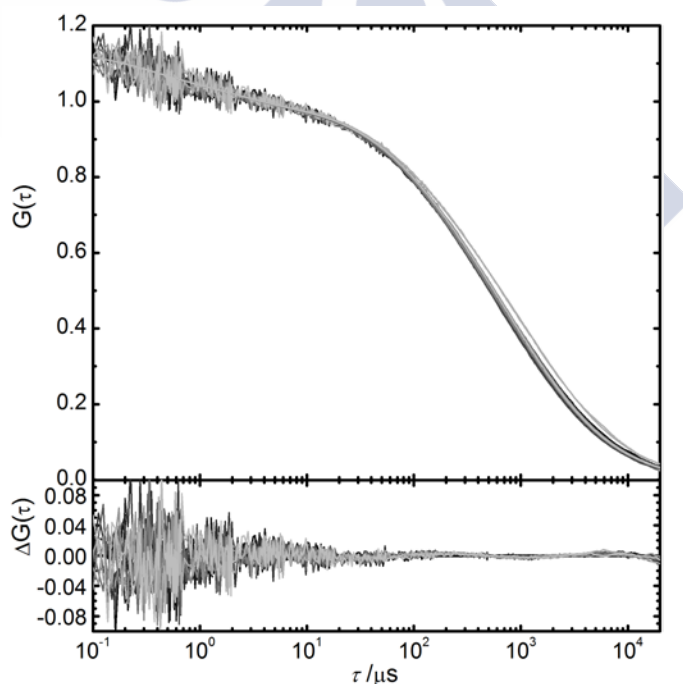


Figura 7.5. Curvas de correlación de fluorescencia normalizadas obtenidas para una muestra con concentración $0.3 \mu\text{M}$ de HiLyte Fluor 488- β -amiloide(1-42) y $34.7 \mu\text{M}$ de β -amiloide(1-42) sin marcar en PBS de pH 7.2, entre 0 y 120 min, con una potencia de $80 \mu\text{W}$. Se muestran los ajustes realizados para las mismas y sus correspondientes residuos.

Mediante análisis de las curvas mostradas en la figura anterior se determinaron los tiempos de difusión de los agregados y el valor correspondiente de r (Figura 7.6). El tiempo de difusión determinado es previsiblemente un valor medio correspondiente a la presencia de agregados de distintos tamaños, como se ha comprobado en otras investigaciones (Kuo 1996, Vestergaard 2008). Como se ha indicado, no se observan cambios sistemáticos en los parámetros en función del tiempo de incubación, aunque existe una cierta fluctuación de los valores del tiempo de difusión de los agregados, entre 1200 μs y 1600 μs , y de la contribución de los monómeros r , entre 0.40 y 0.44. Esto significa que ni el tamaño de los agregados ni su concentración media (proporcional a $1-r$) varían con el tiempo de incubación. Tampoco el valor para el número medio de moléculas (datos no mostrados) muestra cambios sistemáticos con el tiempo de incubación.

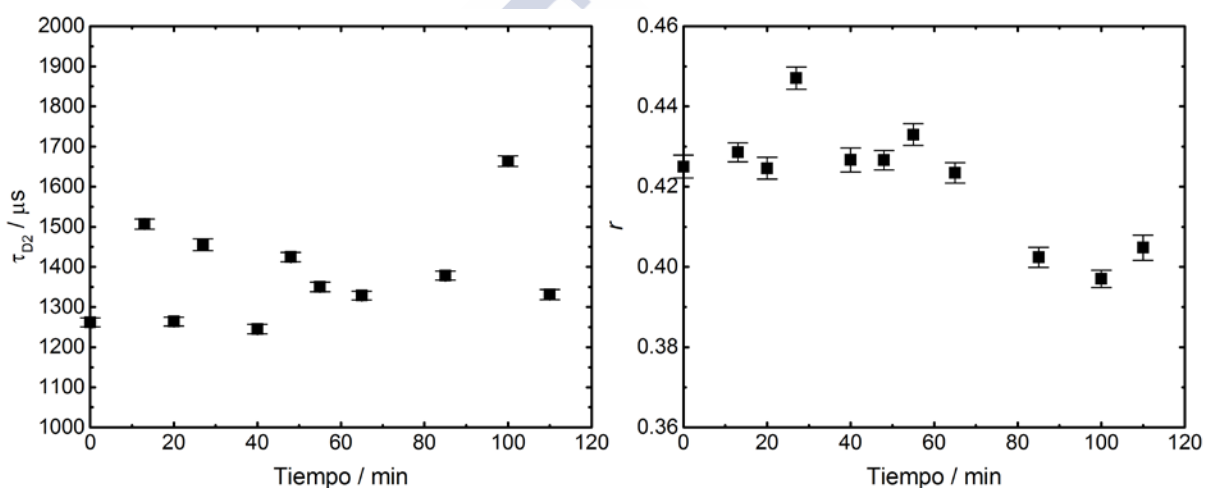


Figura 7.6. Variación entre 0 y 120 min para el tiempo de difusión determinado a partir de las curvas de correlación de la Figura 7.5, correspondiente a los pequeños agregados presentes en la disolución (izda.). Variación con el tiempo del parámetro r , que muestra la contribución al término de difusión del monómero de amiloide marcado (con un tiempo $\tau_{D1}=152 \mu\text{s}$ fijado en el ajuste) (drcha.).

Para analizar el efecto de períodos de incubación más largos, algunas de las muestras se mantuvieron a temperatura constante de 25°C durante 24 horas y después se midieron sus curvas de correlación. No se observaron cambios significativos, aunque en muchos casos se produjo evaporación del disolvente con el consiguiente incremento en la concentración de las muestras. De estos resultados se deduce que, bajo las condiciones experimentales empleadas y a la temperatura de 25°C, la formación de agregados no depende del tiempo de incubación.

La existencia de un segundo tiempo de difusión más largo que el del amiloide monomérico ya desde el inicio del experimento indica la presencia en la disolución de agregados de pequeño tamaño, que no se observaron en las medidas realizadas con el amiloide marcado sólo. El proceso de agregación debe ser, por tanto, muy rápido, ocurriendo dentro de los primeros minutos tras la preparación de la muestra. La aparición de agregados ya en los primeros minutos fue observada también en otros estudios (Vestergaard 2008, Bitan 2003), que consideraron la existencia para el β -amiloide(1-42) de una agregación muy rápida para dar lugar a pequeños agregados. Para el β -amiloide(1-40), empleando FCS, también se comprobó que la agregación daba lugar de forma muy rápida a la aparición de agregados de mayor tamaño a lo esperado, considerando que los agregados formados por pocas unidades de péptido presentaban una vida corta en los primeros momentos de la agregación o que no se pudieron detectar mediante la técnica o las condiciones empleadas (Tjernberg 1999).

Este resultado de la no dependencia con el tiempo para muestras incubadas a 25°C difiere con el descrito en la bibliografía para el mismo amiloide a una concentración 80 μ M incubando la muestra a 37°C en tampón acuoso con amiloide marcado 8 μ M. Se determinó el radio hidrodinámico de los agregados en un periodo de aproximadamente 8 horas, observando un aumento en el mismo hasta alcanzar un valor estable en torno a un radio de 480 nm a las 4 horas del ensayo (Vestergaard 2008). Esta diferencia se atribuye a la elevada concentración de amiloide y a la mayor temperatura empleada de 37°C, que son las condiciones experimentales típicas para la formación de fibras de amiloide y favorecen el proceso de agregación. Dado que no es técnicamente posible por el momento realizar medidas a esa mayor temperatura en nuestro equipo de FCS, no se han podido realizar los experimentos oportunos para analizar el proceso de agregación a 37°C. Sin embargo, en apartados posteriores se mostrarán estudios realizados bajo las condiciones de formación de fibras utilizando técnicas de fluorescencia convencionales.

Por tanto, bajo las condiciones de realización del experimento no se aprecia una evolución temporal en la agregación: los agregados se forman en los primeros instantes y su tamaño y concentración no varían con el tiempo de incubación.

7.2.2. Dependencia de la concentración en la formación de agregados tempranos

Una vez confirmada la independencia del proceso de agregación con el tiempo de incubación en las condiciones experimentales aplicadas, se analiza su posible dependencia con la concentración total de amiloide, utilizando para ello todos los datos experimentales

obtenidos a los diferentes tiempos de incubación, de manera que se dispone de un amplio conjunto de datos a los que aplicar un criterio estadístico.

A continuación se muestran las curvas de correlación normalizadas determinadas para los experimentos descritos anteriormente en función de la concentración total de amiloide, para ciertos tiempos de incubación, entre 10 min y 15 min (Figura 7.7) y entre 60 min y 70 min (Figura 7.8). Se muestran también los ajustes realizados con sus correspondientes residuos. Se observan variaciones con la concentración similares en las dos series de curvas de correlación, con un desplazamiento del término de difusión hacia tiempos más largos a medida que aumenta la concentración de amiloide. Por tanto, se observa una dependencia que es sólo debida a la variación de la concentración total de β -amiloide(1-42).

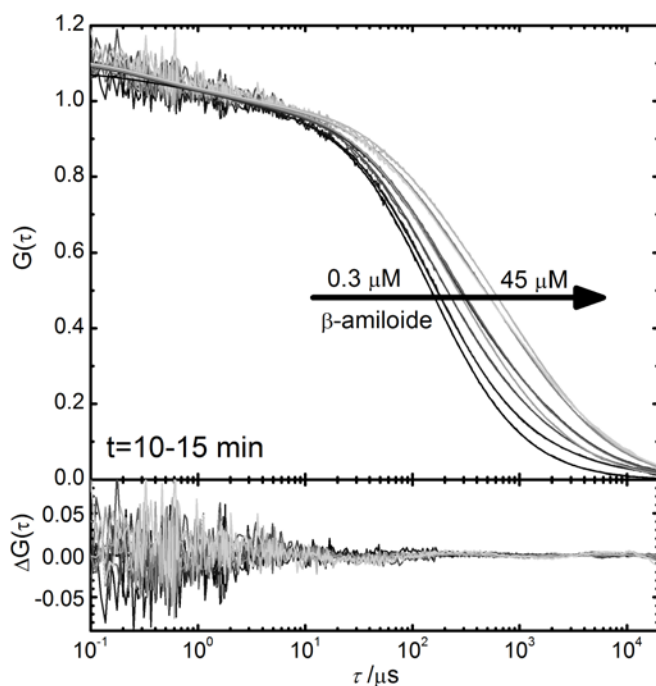


Figura 7.7. Curvas de correlación de fluorescencia normalizadas determinadas para distintas muestras de β -amiloide marcado $0.3 \mu\text{M}$ con amiloide sin marcar a distintas concentraciones totales del péptido entre $0.4 \mu\text{M}$ y $45 \mu\text{M}$, determinadas a un tiempo de incubación de 10-15 min. Se muestran los ajustes realizados para las mismas y sus correspondientes residuos.

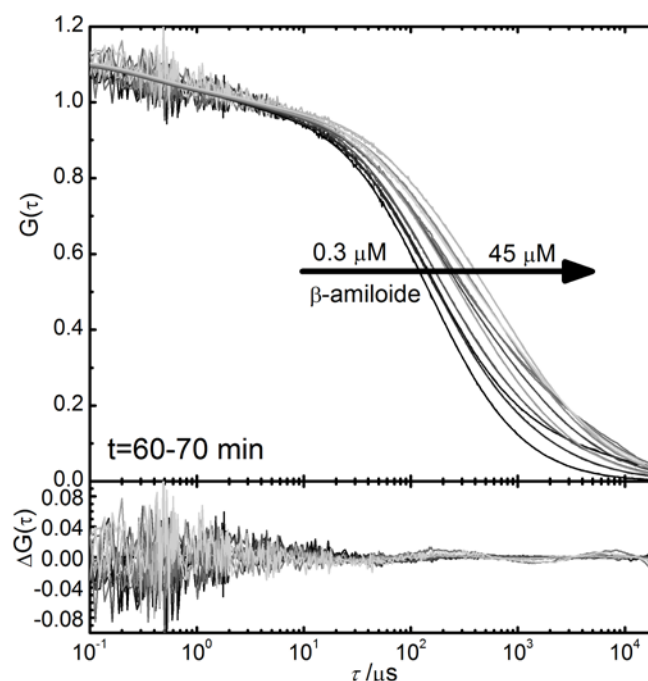


Figura 7.8. Curvas de correlación de fluorescencia normalizadas determinadas para distintas muestras de β -amiloide marcado $0.3 \mu\text{M}$ con amiloide sin marcar a distintas concentraciones totales del péptido entre $0.4 \mu\text{M}$ y $45 \mu\text{M}$, determinadas a un tiempo de incubación de 60-70 min. Se muestran los ajustes realizados para las mismas y sus correspondientes residuos.

Dado que no existe dependencia temporal de las curvas de correlación, se utilizan los datos obtenidos a los diferentes tiempos de incubación para obtener los parámetros promedios correspondientes a cada concentración. En la Figura 7.9 se representan todos los valores del tiempo de difusión correspondiente a los agregados obtenidos del ajuste de las curvas de FCS a distintos tiempos de incubación para cada concentración total de péptido. Se observa que el tiempo de difusión no es dependiente de la concentración, obteniéndose valores entre $1000 \mu\text{s}$ y $2000 \mu\text{s}$, exceptuando las concentraciones más bajas en las cuales se obtienen tiempos mayores y con mucha más dispersión. La concentración de amiloide marcado empleada fue siempre constante e igual a $0.3 \mu\text{M}$, mientras que la de amiloide sin marcar se varió entre $0.1 \mu\text{M}$ y $45 \mu\text{M}$. En las series realizadas con una concentración de amiloide baja, aproximadamente $0.1 \mu\text{M}$ (concentración total de péptido en torno a $0.4 \mu\text{M}$) los agregados formados presentan una carga muy alta de fluoróforo, ya que el péptido marcado está en una proporción del 75%. Esto provoca que los agregados formados tengan una luminosidad muy alta, por lo que son observados aunque su concentración sea muy pequeña. Este efecto hace que se obtengan tiempos de difusión más altos y con mayores diferencias entre sí. Sobre la base de estos argumentos, se concluye que no hay variación

significativa del tiempo de difusión de los agregados y, en consecuencia de su tamaño, con la concentración total de péptido. Descartando estadísticamente los valores situados por debajo y por encima de los percentiles 25 y 75, respectivamente, se determina el valor medio del tiempo de difusión correspondiente a los agregados, que se representa en la Figura 7.10 en función de la concentración total de amiloide.

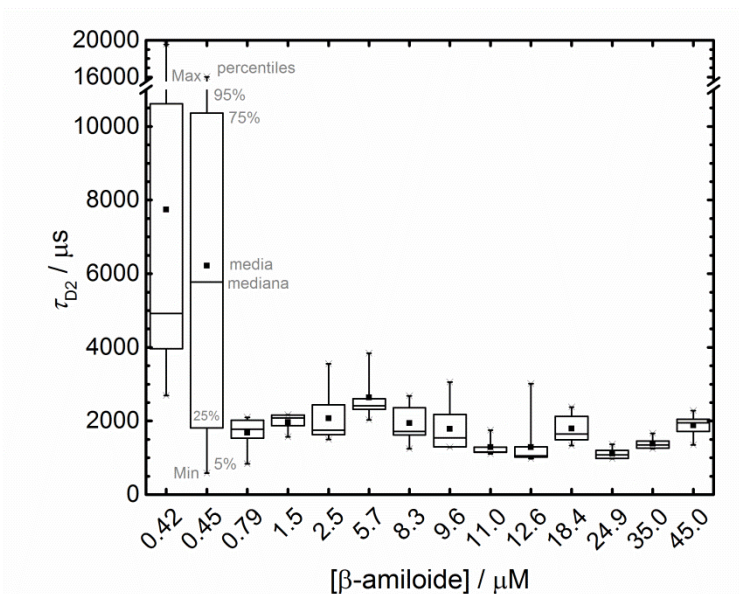


Figura 7.9. Valores del tiempo de difusión de los agregados obtenidos a diferentes tiempos de incubación para las muestras de β -amiloide marcado con β -amiloide sin marcar a distintas concentraciones (referidas a la concentración de amiloide total). Se representan en forma de diagramas de caja con el fin de evidenciar la variación existente entre los tiempos.

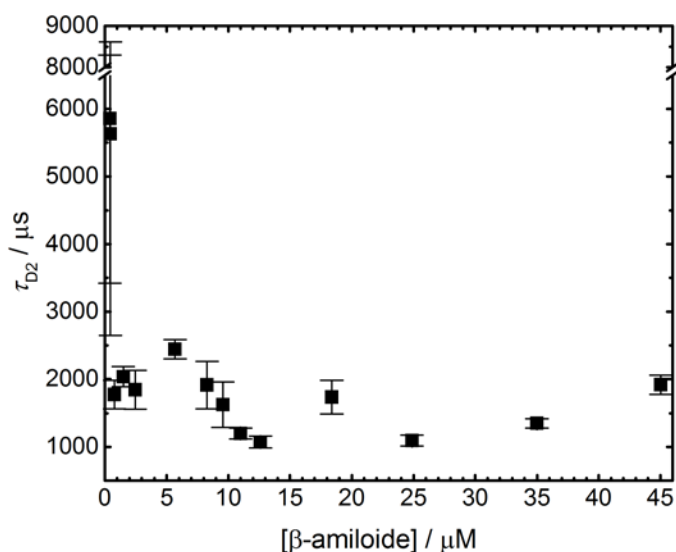


Figura 7.10. Valores del tiempo de difusión de los agregados determinados como la media de los resultados obtenidos a distintos tiempos de incubación para las muestras de β -amiloide marcado con β -amiloide sin marcar a distintas concentraciones (referidas a la concentración de amiloide total). Estos datos se obtuvieron a partir de los resultados mostrados en la Figura 7.9 una vez descartados los valores menores y mayores que los percentiles 25 y 75, respectivamente.

A partir de las curvas de FCS también se determinó el valor promedio del parámetro r , calculado como la media a distintos tiempos de incubación para cada experimento realizado a una concentración determinada de péptido (Figura 7.11). Se observa que el parámetro r sí depende de la concentración total de amiloide. Así, la contribución de los monómeros de amiloide al término de difusión, r , desciende al aumentar la concentración de péptido, lo que sugiere que aumenta la concentración de agregados (cuya contribución es $1-r$), aunque no su tamaño, que está directamente relacionado con su tiempo de difusión. No obstante, se debe de tener en cuenta que el parámetro r es muy dependiente de la luminosidad de las partículas (ver ecuación 4.35), por lo que su valor no da directamente la concentración relativa de monómeros en la muestra. Además, esta fuerte dependencia de r con la luminosidad provoca la importante dispersión observada en los datos experimentales, ya que una misma concentración de monómero lleva a distintos valores del parámetro r según el tamaño, y por lo tanto la luminosidad, de los agregados observados durante la medida. Sin embargo, teniendo en cuenta que los datos experimentales indican que el tamaño de los agregados no depende de la concentración total de monómero (Figura 7.10), es razonable pensar que la disminución del parámetro r con la concentración es debida a la disminución de la concentración de monómeros en la disolución a medida que se incrementa la concentración total de amiloide. Por ello, se está trabajando en un modelo que nos permita

determinar la concentración de agregados en las muestras con el fin de comprobar si existe una concentración crítica de agregación, como se sugiere en la bibliografía, y, en su caso, determinar dicha concentración para el amiloide objeto de estudio.

La dependencia del proceso de agregación con la concentración de péptido también fue probada para el β -amiloide(1-40) empleando la misma técnica de FCS (Tjernberg 1999). Para ese péptido se estimó una concentración crítica de agregación de 50 mM a la temperatura de 20°C, aunque en el análisis no se tuvo en cuenta la mayor luminosidad de los agregados.

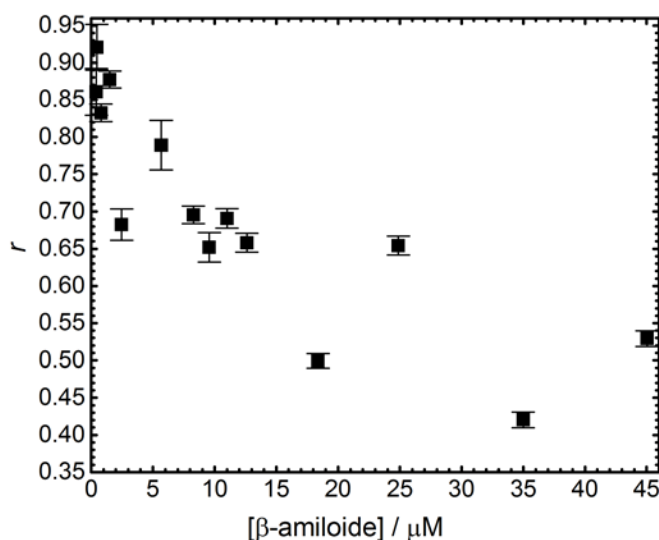


Figura 7.11. Valores medios del parámetro r (contribución del monómero al término de difusión) determinados a partir de los resultados obtenidos a los diferentes tiempos de incubación para las muestras de β -amiloide marcado con β -amiloide sin marcar a distintas concentraciones totales de péptido entre 0.4 μM y 45 μM . En este cálculo se descartaron los valores menores y mayores que los percentiles 25 y 75, respectivamente, de cada serie de datos.

Conociendo los tiempos de difusión de dos especies y sus correspondientes masas moleculares se puede establecer una relación entre ambas (ver sección 4.6.3.). Considerando que el sistema estudiado está formado por dos especies fluorescentes, el amiloide marcado monomérico y los pequeños agregados formados por amiloide marcado y no marcado (que denominaremos especies 1 y 2, con masas moleculares M_1 y M_2 , respectivamente), se puede deducir dicha relación introduciendo el parámetro \bar{n} como número medio de monómeros que forman parte de un agregado (ecuación (7.1)).

$$\frac{\tau_{D_2}}{\tau_{D_1}} = \frac{D_1}{D_2} = \frac{(M_2)^{\bar{n}}}{(M_1)^{\bar{n}}} \quad (7.1)$$

Como se ha comentado en el apartado anterior, el amiloide libre presenta para el parámetro ν un valor de 0.43. No se conoce si esta dependencia con la masa molecular se mantiene en los agregados tempranos formados, aunque previsiblemente el valor no sería el mismo ya que los agregados irían adquiriendo una mayor ordenación estructural. Dado que no existe información bibliográfica al respecto y que no disponemos de información suficiente para determinar este valor en los agregados, consideramos un exponente $\nu = 0.43$ para las dos especies, monómeros y agregados, obteniéndose la ecuación (7.2) que permite determinar el parámetro \bar{n} sólo en función de los tiempos de difusión de ambas especies.

$$\frac{\tau_{D_2}}{\tau_{D_1}} = \left(\frac{M_1 \bar{n}}{M_1} \right)^\nu \rightarrow \bar{n} = \left(\frac{\tau_{D_2}}{\tau_{D_1}} \right)^{1/0.43} \quad (7.2)$$

Conocido el tiempo de difusión del monómero de amiloide marcado, $154 \mu\text{s}$, se calcula mediante la ecuación anterior el valor del parámetro \bar{n} para cada tiempo de difusión τ_{D_2} y se representa su valor medio en función de la concentración total de péptido (Figura 7.12).

Se observa que, a las más bajas concentraciones de amiloide, se obtienen valores muy altos del número de agregación medio \bar{n} , lo que tiene explicación por el elevado porcentaje de amiloide marcado en esas muestras que lleva a una muy alta luminosidad de los agregados, tanto mayor cuantas más moléculas de péptido formen el agregado. No obstante, omitiendo estos datos, los valores del parámetro \bar{n} obtenidos indican que los agregados presentes en la disolución están formados por un número medio de monómeros entre 100 y 400, siendo el promedio de 160 monómeros para las concentraciones mayores de $10 \mu\text{M}$ (menos afectadas por la luminosidad). Por tanto, no se observa la presencia de oligómeros formados por unas pocas moléculas de amiloide, como se sugiere en la bibliografía, sino que el proceso de agregación lleva a la formación de agregados relativamente grandes desde los instantes iniciales. No obstante, debe recordarse que el tiempo de difusión τ_{D_2} asignado a los agregados es un valor promedio y que la técnica de FCS tiende a exagerar el peso de los agregados grandes con mayor luminosidad en dicho promedio. Por ello, puede haber agregados más pequeños que no son visibles en nuestros resultados. Asimismo, el valor del exponente ν_2 , que da la dependencia con la masa molecular de los agregados, tiene una enorme influencia sobre el valor resultante para el número de agregación.

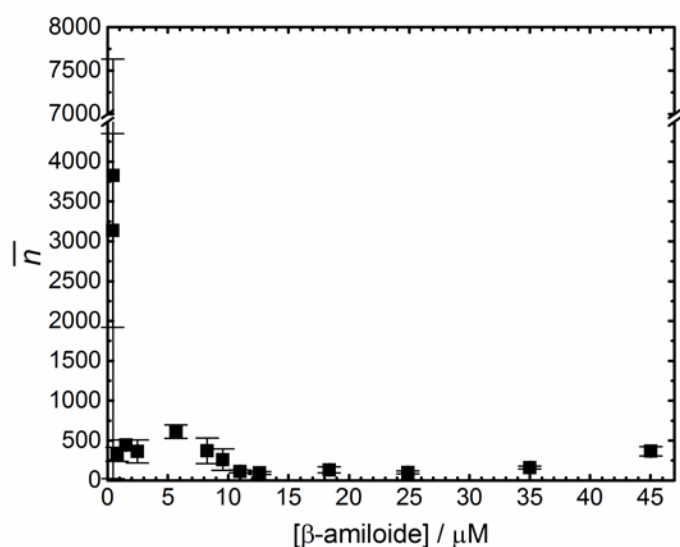


Figura 7.12. Valores medios para el parámetro \bar{n} obtenidos a partir de los resultados de los tiempos de difusión de cada serie de medidas, una vez descartados los valores menores y mayores que los percentiles 25 y 75 correspondientes, respectivamente.

Un parámetro más fácilmente comparable con los datos existentes en la bibliografía es el radio hidrodinámico de los agregados, que se puede obtener a partir de su tiempo de difusión y viene a ser el radio de una esfera de tamaño equivalente a los agregados (ecuación 4.37). Aunque el valor del tiempo de difusión determinado para el monómero de amiloide marcado ya pone de manifiesto que estos péptidos no presentan una conformación esférica, el radio hidrodinámico es un parámetro estándar que se utiliza para definir el tamaño de macromoléculas o sistemas supramoleculares complejos. Los valores obtenidos para el radio hidrodinámico R_h de los agregados se representan en la Figura 7.13 frente a la concentración de amiloide total.

Exceptuando los datos de las más bajas concentraciones de amiloide, el valor del radio hidrodinámico obtenido para los agregados se encuentra entre 15 nm y 25 nm, que es muy inferior a los valores entre 100 nm y 400 nm determinados para la agregación del mismo péptido a la temperatura de incubación de 37°C ya a bajos tiempos del proceso (Vestergaard 2008). Otros autores señalan la presencia de agregados solubles de peso molecular comprendido entre 10 kDa y 100 kDa, o incluso mayores, en cerebros de pacientes con la EA, lo que indicaría que los pequeños agregados que pueden participar en el proceso de la enfermedad abarcan un amplio rango de tamaños (Kuo 1996, Sakono 2010). Para el β-amiloide(1-40) se observaron agregados de tamaño mucho mayor, del orden de 60 μm, a la temperatura de incubación de 20°C (Tjernberg 1999).

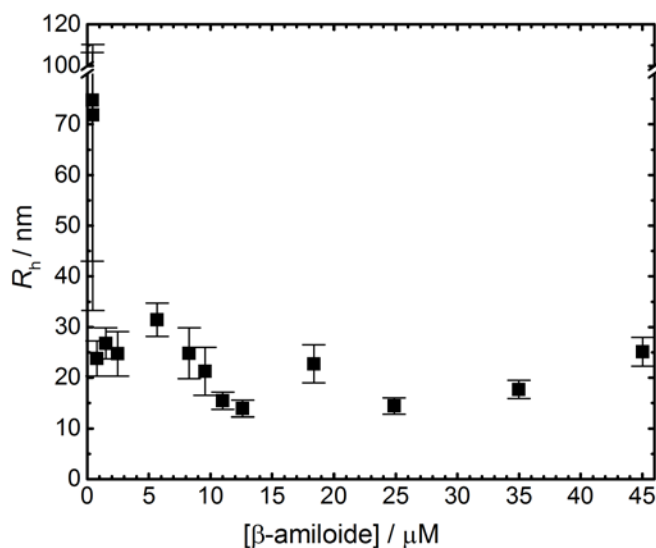


Figura 7.13. Valores medios del radio hidrodinámico R_h de los pequeños agregados detectados en las distintas series de medidas, obtenidos a partir de los resultados medios de los tiempos de difusión correspondientes (Figura 7.10).

La presencia ya desde el inicio de los experimentos de pequeños agregados en las muestras lleva a concluir que la formación de éstos es prácticamente inmediata al disolver el amiloide en un medio acuoso. Empleando la técnica de FCS, se caracterizaron estos agregados en función del tiempo, sin observar cambios en las primeras horas del proceso, y de la concentración de péptido, comprobando que sí existe una dependencia con la misma de la concentración de agregados pero no de su tamaño. Una vez caracterizados los agregados formados en el estadio inicial del proceso de agregación, se estudió la posibilidad de utilizar distintos marcadores fluorescentes para la detección de dichos agregados *in vitro*. Estos estudios se describen en la sección 7.3 a continuación.

7.3. Estudio de potenciales marcadores de pequeños agregados de β -amiloide

En este apartado se muestran los resultados obtenidos mediante el uso de técnicas de fluorescencia convencionales para distintos fluoróforos en presencia de agregados de β -amiloide tempranos o iniciales.

En función de los resultados obtenidos para los colorantes ThT y HPIP en presencia de fibras de amiloides, se iniciaron experimentos para comprobar la posible utilidad de estos fluoróforos como marcadores de los pequeños agregados caracterizados mediante FCS. También se realizaron los mismos estudios con los fluoróforos HPIP_NMe, HBO y HBT pero su bajo rendimiento cuántico en disolución acuosa dificultó en gran medida el trabajo con los

mismos. Por tanto, sólo se mostrarán resultados obtenidos para el HBO, descartándose el posible uso del HPIPnMe y el HBT para la detección de estos pequeños agregados.

Inicialmente, se muestran los resultados obtenidos manteniendo la muestra de péptido a 25°C, empleando así las mismas condiciones que las medidas realizadas con FCS, lo que permite comparar los resultados de ambos experimentos. Los ensayos se realizaron en función del tiempo de incubación y de la concentración de péptido. Para finalizar, se muestran los resultados determinados para la ThT en presencia de amiloide bajo condiciones de formación de fibras (37°C y agitación), para analizar cómo influye estos factores en el proceso de agregación.

7.3.1. Agregación del β -amiloide a 25°C en función del tiempo de incubación

Mediante el uso de técnicas de fluorescencia convencionales, se realizaron ensayos en función del tiempo de incubación empleando los distintos colorantes. Se prepararon muestras de β -amiloide(1-42) de concentración 25 μ M en tampón PBS a pH 7.2, añadiendo la cantidad adecuada de cada colorante y disolviendo previamente el péptido en DMSO, para su correcta solubilización. Se estudiaron estas muestras en función del tiempo de incubación, a una temperatura de 25°C.

Se utiliza una concentración 25 μ M de β -amiloide(1-42) con el fin de intentar superar la concentración crítica a la cual este péptido se agrega, en función de los resultados obtenidos anteriormente mediante FCS y los datos encontrados en la bibliografía. Para el β -amiloide(1-40) la concentración crítica estaría en torno a 25 μ M y esta sería por lo menos cinco veces menor en el caso del amiloide de 42 aminoácidos (Harper 1997), aunque en otro estudio de FCS con ese mismo péptido se obtuvo un valor en torno a 50 μ M (Tjernberg 1999).

Se iniciaron los ensayos con el colorante ThT. Se determinaron los espectros de emisión y anisotropía de fluorescencia correspondientes a una muestra de β -amiloide de concentración aproximada 25 μ M en presencia de ThT 1.3 μ M, a una temperatura de 25°C. La serie de medidas se realizó en función del tiempo de incubación durante aproximadamente 3 horas (Figura 7.14). Como tiempo 0 ($t=0$ min) se considera la primera medida realizada para la muestra tras disolver el amiloide en la disolución acuosa del colorante, agitar el vial y colocar la disolución en el equipo de medida (considerado así para todos los experimentos mostrados en este apartado).

En esta serie se empleó una longitud de onda de excitación de 450 nm, por lo que se excitan de forma más directa las moléculas de ThT con una conformación plana, entre las que se incluyen moléculas unidas a los agregados de amiloide que no son capaces de sufrir TICT (ver resultados con agregados fibrilares, apartado 6.1). Con esta longitud de onda de

excitación se minimiza en gran medida la emisión de fluorescencia del propio amiloide, que es muy alta si se excita a menores longitudes de onda. Aun así, los espectros mostrados están corregidos restando la contribución a la fluorescencia que presentan el amiloide y el disolvente.

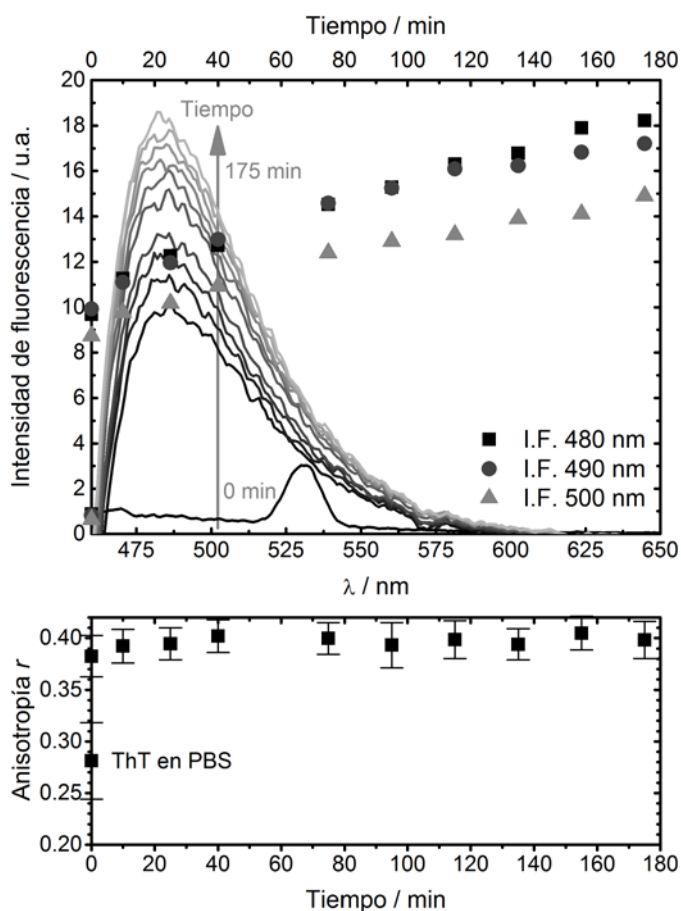


Figura 7.14. Gráfica superior: espectros de emisión de la ThT en presencia de agregados iniciales de β -amiloide 25 μ M, a $T=25^{\circ}\text{C}$, determinados a varios tiempos de incubación entre 0 y 175 min (el espectro de menor intensidad se corresponde con la ThT sin amiloide en PBS, observándose la banda Raman a aprox. 530 nm), y variación de la emisión de fluorescencia a 480 nm, 490 nm y 500 nm con el tiempo de incubación (la ThT en PBS se muestra también a $t=0$). Gráfica inferior: variación de la anisotropía de fluorescencia con el tiempo de incubación para la ThT determinada bajo las mismas condiciones en el intervalo de longitudes de onda de 500-510 nm. Todos los espectros fueron corregidos restando la contribución del amiloide y del disolvente. Excitación a 450 nm.

Los resultados muestran que, ya en los primeros tiempos de incubación, hay un cambio en la emisión de fluorescencia, aumentando fuertemente la intensidad de fluorescencia y apareciendo una banda en torno a 482 nm (la ThT en PBS tiene una emisión prácticamente

nula bajo las condiciones de medida, Figura 7.14). Con el paso del tiempo continúa un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia de la ThT, que podría indicar una cierta dependencia temporal de la agregación de la muestra. Sin embargo, se debe de tener en cuenta que el cambio observado en la intensidad de fluorescencia es mucho menor que el medido en presencia de fibras, lo que lleva a descartar que los agregados formados tengan estructura fibrilar.

Si se analiza la variación de anisotropía (gráfica inferior de la Figura 7.14), se comprueba que el valor de este parámetro es estable con el tiempo y que se encuentra casi en el límite posible para el mismo (0.40). Comparando la anisotropía de la ThT en PBS ($r = 0.28 \pm 0.04$) con el valor alcanzado una vez que se añade el amiloide ($r = 0.39 \pm 0.01$), se observa un aumento importante que indica la mayor restricción para la rotación de la ThT al unirse a los agregados tempranos de amiloide.

La aparición de una banda a 482 nm para la ThT en presencia de pequeños agregados de péptido sugiere que el comportamiento de este colorante al unirse a los mismos y a fibras amiloides es similar en algunos aspectos. En presencia de fibras, la ThT presenta su máximo de emisión a 485 nm (al excitar la muestra a 410 o a 450 nm), muy cercano al observado para estos pequeños agregados (véase sección 6.1). El rendimiento cuántico del fluoróforo aumenta de manera muy considerable en presencia de fibras en comparación con la disolución acuosa, mientras que en presencia de los agregados tempranos el incremento de intensidad es mucho menor. La diferencia es muy notable y se puede observar de forma clara en la Figura 7.15, en la que se representa un espectro de ThT con fibras amiloides en una concentración aproximada de 25 μM (referida al monómero de partida) y con pequeños agregados de la misma concentración inicial de péptido.

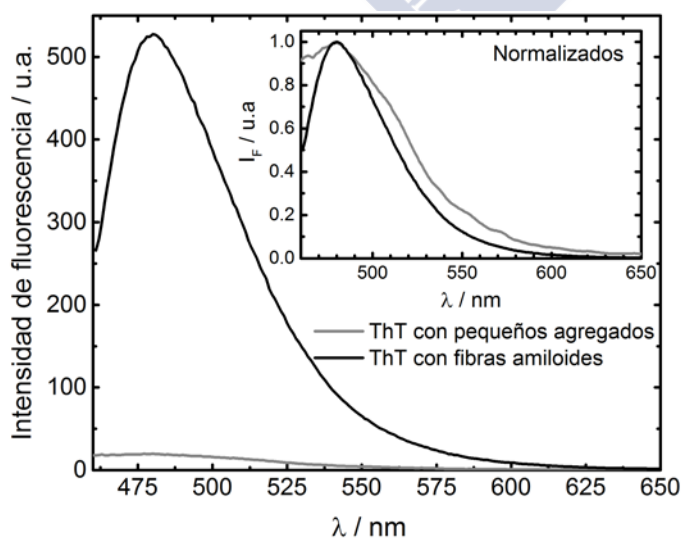


Figura 7.15. Espectros de emisión de la ThT con $\lambda_{exc}=450$ nm en presencia de pequeños agregados de β -amiloide a $t=0$ min (gris) y con fibras amiloides (negro), en ambos casos para una concentración total de péptido de $25 \mu\text{M}$, a $T=25^\circ\text{C}$, idénticas condiciones de medida e igual concentración de ThT ($1.5 \mu\text{M}$). Gráfica insertada: los mismos espectros normalizados en el máximo.

La intensidad de fluorescencia observada en el máximo de emisión para la ThT en presencia de fibras es 1320 veces mayor que para este fluoróforo en PBS. En cambio, con pequeños agregados la intensidad aumenta en 67 veces con respecto a la ThT en disolución acuosa (cuyo espectro no se representa en la Figura 7.15 debido a que su emisión es prácticamente cero en la escala utilizada). Por tanto, el aumento en presencia de fibras es casi 20 veces mayor que el producido en presencia de pequeños agregados del β -amiloide. Si se analizan los espectros normalizados (gráfica insertada en la Figura 7.15), se puede ver que el espectro del colorante con fibras amiloides es más estrecho que el que presenta con agregados tempranos. Esto también sucede si se compara la emisión de la ThT unida a una proteína fibrilar con la que presenta cuando se une a una proteína globular como la BSA o en un medio viscoso como el glicerol (ver sección 6.1). Esto es debido a que en el medio fibrilar la ThT se une al péptido con una conformación uniforme y previsiblemente plana en la que se ve impedido el proceso de desactivación no radiante tipo TICT. En cambio, en el caso de los pequeños agregados, existirían muy diferentes conformaciones de la ThT unida a los agregados y sólo las conformaciones planas, que no sufren el proceso TICT, contribuirían significativamente al aumento de la fluorescencia. Además, dichas conformaciones son más efectivamente excitadas a 450 nm. El espectro más ancho observado para este sistema se explica del mismo modo, ya que la ThT se encontraría unida al péptido con distintas conformaciones más planas o más perpendiculares, sin favorecerse o estabilizarse tanto una concreta como en el caso de las fibras. No obstante, también hay que tener en cuenta que la concentración de agregados presentes en la muestra en las etapas iniciales de la agregación debe ser muy inferior a la existente en las muestras de fibras, por lo que el equilibrio de asociación estará mucho más desplazado hacia los reactivos, colorante y agregados libres, y habrá un menor aumento de intensidad de fluorescencia en las muestras de agregados tempranos.

El monómero de β -amiloide(1-42) presenta una estructura principalmente compuesta por hélices α (Stine 2003, Cizas 2010). Se considera que los pequeños agregados no están estructurados y contienen elementos con hélice α y láminas β que se van ordenando a medida que se forman las fibras, dando lugar a estructuras constituidas principalmente por láminas β (Bitan 2003). Al estudiar en este trabajo la interacción de la ThT con la BSA (formada principalmente por elementos helicoidales) ya se comprobó que este fluoróforo no

interacciona sólo con elementos con estructura laminar, como en muchas ocasiones se sugiere en la literatura (Voropai 2003, Reinke 2010). Al observar el pequeño incremento en la intensidad que se produce al añadir ThT a los pequeños agregados amiloides se puede concluir también que sí existe una interacción con los mismos, aunque sean agregados sin un orden determinado, pero su afinidad por estos es mucho menor que en el caso de las fibras y, además, hay muchos menos. Si en un medio se añadiera ThT a una mezcla de pequeños agregados y agregados fibrilares no sería posible distinguir ambos grupos y sólo se observarían estos últimos, debido a su fuerte interacción con los mismos. No se puede concretar si esta interacción sólo se produce con las láminas β que forman parte de los agregados, que también están presentes en la BSA. En estudios realizados con la ThT en presencia de otros tipos de proteínas amiloides se observó también la existencia de una interacción con las mismas antes de la formación de fibras, aunque presentando una menor afinidad (Krebs 2005). Esta interacción menos favorable se consideró debida a la estructura más desordenada que presentan los pequeños agregados, pudiendo no estar disponibles o no tener el tamaño suficiente las láminas β para que se produzca la interacción con el fluoróforo.

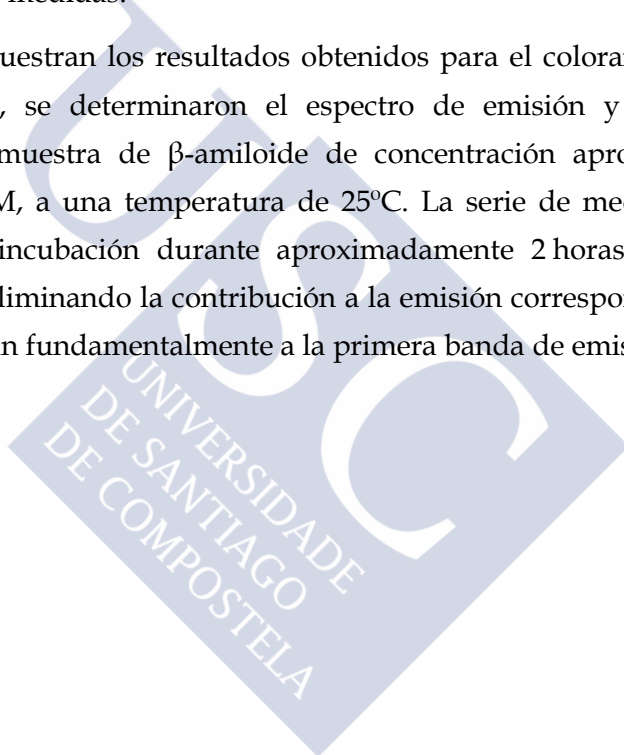
Empleando el péptido β -amiloide(1-40), Rolinski y colaboradores también realizaron ensayos con el tiempo en presencia de ThT para estudiar la cinética de formación de los agregados tempranos (Rolinski 2010). La preparación de la muestra fue realizada de forma análoga al protocolo empleado en este trabajo para la preparación de pequeños agregados. Se obtuvo una muestra final con una concentración 30 μM de péptido y 15 μM de ThT en tampón fosfato a pH 7, cuya emisión de fluorescencia se registró durante aproximadamente 360 horas manteniendo una temperatura de 22°C y excitando a 450 nm, con un máximo de emisión en torno a 480 nm. Durante las primeras 50 horas del experimento apenas se observaron cambios en la agregación, siendo la emisión de fluorescencia muy baja. A partir de ese momento, la intensidad aumentaba de manera considerable, alcanzando un valor final (a las 360 h) 40 veces más alto que el de partida. Al igual que se ha interpretado para nuestros resultados, se consideró que los pequeños agregados formados en las primeras horas no eran capaces de fijar de la misma forma que las fibras las conformaciones más planas del fluoróforo responsables de esta emisión, bien debido a su tamaño o a la falta de estructura fibrilar.

La anisotropía de la ThT no permite distinguir cambio alguno en la agregación con el tiempo de incubación. El valor que se alcanza en presencia de los pequeños agregados ($r = 0.39 \pm 0.01$) está próximo al observado en presencia de fibras. En este medio, la anisotropía también es constante con la concentración de péptido y tiene un valor medio de $r = 0.350 \pm 0.002$ (ver apartado 6.1), que se ha demostrado que corresponde a la ThT unida a

las fibras. En el caso de los agregados de bajo peso molecular, la anisotropía también es debida a la ThT asociada ya que el colorante libre apenas tiene emisión. Además, este parámetro es independiente de la fracción de colorante que se encuentra libre o unida al péptido, lo que impide ver los cambios que se puedan producir con la agregación.

La ausencia de cambios en el valor de la anisotropía y el pequeño aumento que se produce en la emisión de fluorescencia para la ThT con el tiempo de incubación hacen que este colorante no sea muy adecuado para estudiar la formación de los agregados tempranos. La emisión de la ThT en medio acuoso es muy baja y un pequeño incremento en la misma no es suficiente para poder determinar bien los cambios espectrales debidos al proceso de agregación, ya que la autofluorescencia del amiloide o errores experimentales podrían tener mucha importancia en las medidas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el colorante HPIP. De igual forma que para la ThT, se determinaron el espectro de emisión y la anisotropía de fluorescencia para una muestra de β -amiloide de concentración aproximada 25 μ M en presencia de HPIP 3.4 μ M, a una temperatura de 25°C. La serie de medidas se realizó en función del tiempo de incubación durante aproximadamente 2 horas (Figura 7.16). Los espectros se corrigieron eliminando la contribución a la emisión correspondiente al amiloide y al disolvente, que afectan fundamentalmente a la primera banda de emisión.



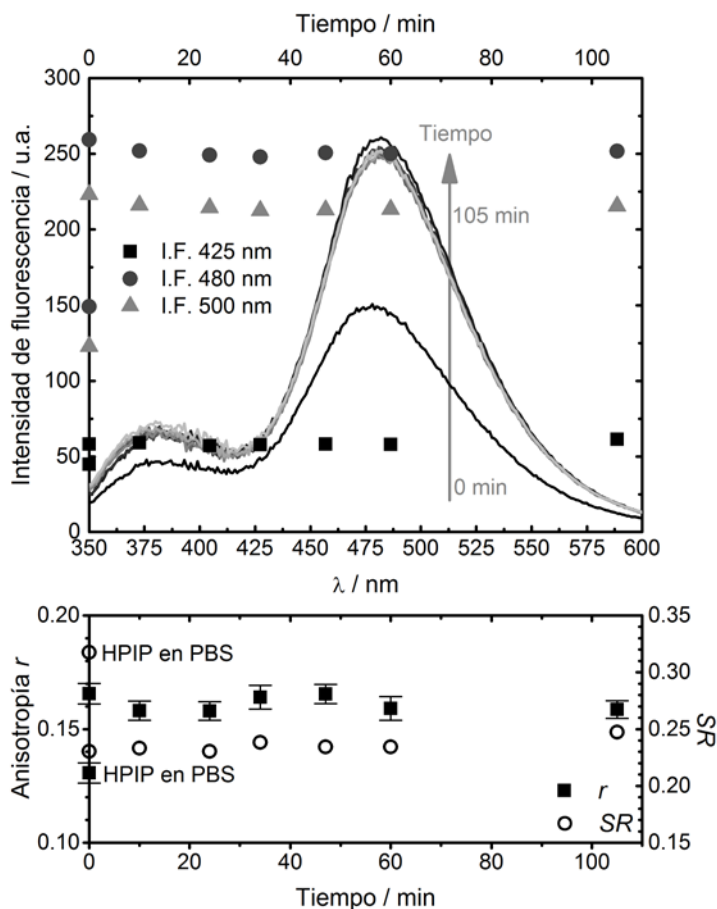


Figura 7.16. Gráfica superior: espectros de emisión del HPIP en presencia de agregados iniciales de β -amiloide 25 μ M, a $T=25^\circ\text{C}$, determinados a varios tiempos de incubación entre 0 y 105 min (el espectro de menor intensidad se corresponde con el HPIP sin amiloide en PBS), y variación de la emisión de fluorescencia a 425 nm, 480 nm y 500 nm con el tiempo de incubación (el HPIP en PBS se muestra también a $t=0$ min). Gráfica inferior: variación de la anisotropía y del parámetro SR con el tiempo de incubación para el HPIP determinados bajo las mismas condiciones (valores medios de anisotropía en el intervalo 480-525 nm). Todos los espectros fueron corregidos restando la contribución del amiloide y del disolvente. Excitación a 330 nm.

Al igual que en el caso de la ThT, el HPIP presenta un aumento en la intensidad de fluorescencia de las dos bandas de emisión al interactuar con los pequeños agregados de β -amiloide(1-42), con respecto a su emisión en disolución acuosa (tampón PBS a pH 7.2). En cambio, la emisión es prácticamente estable con el tiempo de incubación durante el intervalo estudiado. Además, analizando el valor de la anisotropía en la banda correspondiente al tautómero (ver apartado 6.2) se comprueba que el fluoróforo aumenta desde un valor de $r = 0.130 \pm 0.004$ en disolución acuosa a un valor medio constante de $r = 0.161 \pm 0.004$ en presencia de los agregados tempranos de amiloide. Por otro lado, el parámetro SR (véase su

definición en el Apéndice y en el apartado 6.2) desciende desde un valor próximo a 0.32 en disolución acuosa a un valor medio de $SR = 0.235 \pm 0.006$ con la presencia de dichos agregados, valor que es estable con el tiempo de incubación.

En la Figura 7.17 se comparan los espectros de emisión del HPIP en medio acuoso (PBS a pH 7.2), en presencia de los pequeños agregados de amiloide formados a la concentración de $25 \mu\text{M}$ y a $t=0 \text{ min}$, y en presencia de fibras de amiloide a la misma concentración total del péptido. Se observa que el aumento de la intensidad de fluorescencia es mayor en presencia de fibras que con los pequeños agregados. Con respecto a la emisión del HPIP en medio acuoso, en el máximo de la primera banda hay un aumento de intensidad de 1.5 veces para los pequeños agregados y de casi el doble para las fibras, mientras que en la segunda banda la emisión aumenta en 1.8 veces para los agregados solubles y en 2.7 veces en presencia de fibras. Comparando estos espectros normalizados se observa que los correspondientes al HPIP en presencia de pequeños agregados y de fibras son prácticamente coincidentes y con un máximo en torno a 482 nm , mientras que el espectro del HPIP en disolución acuosa sin amiloides se encuentra algo desplazado a menores longitudes de onda, con un máximo en torno a 476 nm .

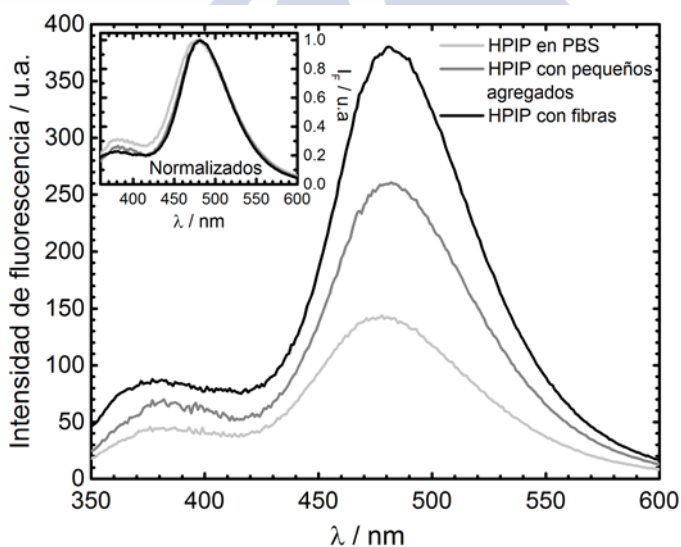


Figura 7.17. Espectros de emisión del HPIP sin amiloides en PBS (gris claro), en presencia de pequeños agregados de β -amiloide a $t=0 \text{ min}$ (gris oscuro) y con fibras amiloides (negro), en ambos casos para una concentración total de péptido de $25 \mu\text{M}$, a $T=25^\circ\text{C}$, idénticas condiciones de medida e igual concentración de HPIP ($3.2 \mu\text{M}$). Gráfica insertada: los mismos espectros normalizados en el máximo.

Analizando los resultados mostrados en la Figura 7.16 y los espectros de la Figura 7.17 se concluye que el comportamiento del HPIP en presencia de pequeños agregados amiloides es muy similar al que presenta con las fibras.

La banda de emisión a menores longitudes de onda, atribuida al confórmero N_{inter} (ver secciones 2.2.3 y 6.2), aumenta su emisión al interactuar con los distintos agregados de β -amiloide(1-42) como consecuencia de una disminución en el *quenching* que sufre esta molécula en medio acuoso al disociarse para originar un anión no fluorescente. La banda de emisión a mayores longitudes de onda, que se atribuye al tautómero **T** originado por un proceso ESIPT a partir del confórmero N_{intra} , también aumenta en intensidad en presencia de pequeños agregados y de fibras de amiloide. Este aumento indica que la interacción con el péptido favorece la formación del tautómero en el estado excitado o aumenta su emisión de fluorescencia. Además, el desplazamiento hacia el rojo de la banda a mayores longitudes de onda se produce para ambos sistemas. Para ambas bandas el incremento de intensidad observado es del mismo orden de magnitud en el caso de los pequeños agregados y de las fibras, aunque menor para los primeros. Así, para la banda a mayores longitudes de onda, se observa un incremento del triple al interactuar el HPIP con fibras con respecto al colorante en PBS frente a un aumento de casi el doble en presencia de agregados tempranos. Esta diferencia podría ser debida a que la interacción del HPIP con los pequeños agregados es más débil que con las fibras, o simplemente a la menor concentración de agregados en las muestras de agregados tempranos, que lleva a una mayor proporción de colorante libre.

El valor de la anisotropía de fluorescencia, determinada en la banda del tautómero, aumenta en presencia de los agregados tempranos hasta un valor próximo a 0.16, que se corresponde con la anisotropía que presenta el HPIP en presencia de fibras a una concentración total de amiloide de 3-4 μ M. Para el HPIP con fibras a la concentración de péptido de 25 μ M, el valor de la anisotropía del medio en la banda citada es mucho mayor, aproximadamente 0.25. Esta diferencia podría ser debida a que el HPIP unido a las fibras se encuentra en un entorno mucho más restringido que en los pequeños agregados, que impediría la desactivación no radiativa por parte del tautómero unido al péptido a través de un proceso TICT. Sin embargo, a la vista de que los espectros de emisión del HPIP en presencia de ambos tipos de agregados son idénticos (Figura 7.17), la diferencia de anisotropía observada podría ser únicamente debida a una mayor proporción de HPIP libre en la muestra de agregados tempranos, que provoca la disminución del valor medio de anisotropía.

En cuanto al parámetro SR , una muestra de HPIP con fibras a concentración total de amiloide 25 μ M presenta un valor de $SR=0.225$, similar pero algo inferior al obtenido en presencia de agregados iniciales de la misma concentración ($SR = 0.235 \pm 0.006$). El cambio en

SR con respecto al valor que presenta el HPIP en PBS (~ 0.32) es muy grande y permite, al igual que la anisotropía, poder detectar la presencia de agregados tempranos de amiloides en medio acuoso. La dificultad se encuentra en poder distinguir entre los dos tipos de agregados, agregados pequeños tempranos y fibras, ya que el valor para *SR* es muy similar para una misma concentración. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el HPIP es más sensible a la formación de agregados tempranos de amiloide que la ThT y podría permitir su cuantificación a través de la anisotropía o de la relación de intensidades *SR*. Además, el hecho de que no haya cambios de dichos parámetros con el tiempo de incubación confirma la no dependencia temporal del proceso de agregación en las etapas tempranas.

Es importante indicar que al producirse un menor aumento en la intensidad de fluorescencia del HPIP en presencia de estos agregados con respecto al que se produce en fibras, la fluorescencia provocada por el propio amiloide influye más y la corrección que se realiza para eliminar su contribución tiene mayor importancia que en el caso de las fibras. Si esta corrección no se realiza el parámetro *SR* puede llevar a valores erróneos, ya que está más influenciado por la contribución del amiloide a la fluorescencia.

Como en los casos anteriores, para el fluoróforo HBO también se obtuvieron los espectros de emisión y la anisotropía de fluorescencia para una muestra de β -amiloide de concentración total $25 \mu\text{M}$ en presencia del colorante a una temperatura de 25°C . La serie de medidas se realizó en función del tiempo de incubación durante aproximadamente 3 horas (Figura 7.18). Los espectros se corrigieron eliminando las contribuciones del amiloide y del disolvente.

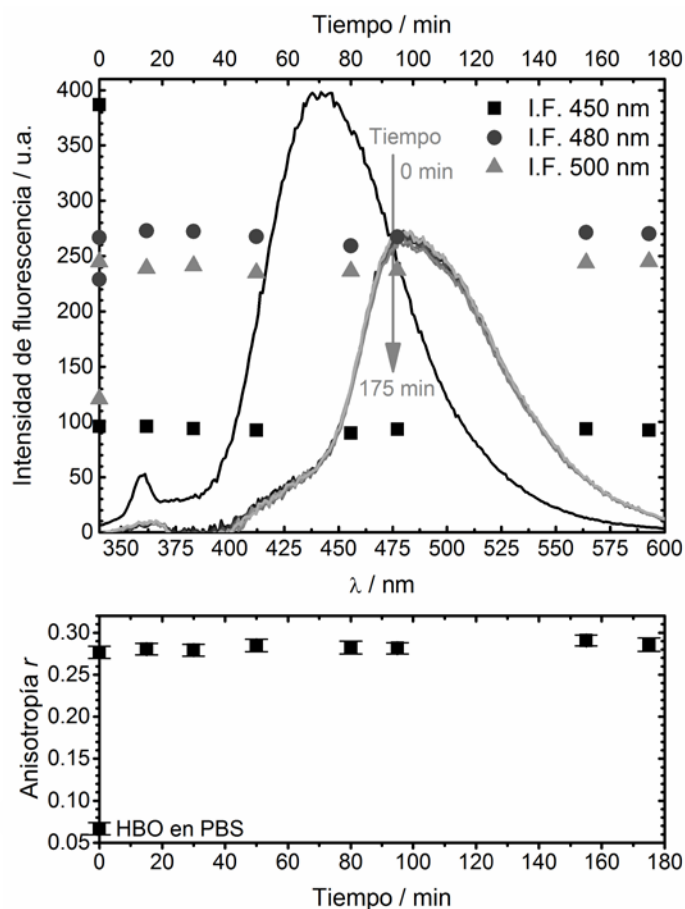


Figura 7.18. Gráfica superior: espectros de emisión del HBO en presencia de agregados iniciales de β -amiloide 25 μ M, a $T=25^{\circ}\text{C}$, determinados a varios tiempos de incubación entre 0 y 175 min (el espectro de mayor intensidad se corresponde con el HBO sin amiloide en PBS, observándose la banda Raman a aprox. 360 nm), y variación de la emisión de fluorescencia a 450 nm, 480 nm y 500 nm con el tiempo de incubación (el HBO en PBS se muestra también a $t=0$ min). Gráfica inferior: variación de la anisotropía de fluorescencia con el tiempo de incubación para el HBO determinada bajo las mismas condiciones en el intervalo de longitudes de onda de 490-525 nm. Todos los espectros fueron corregidos restando la contribución del amiloide y del disolvente. Excitación a 320 nm.

En la figura anterior se observa que el HBO en medio acuoso presenta una banda de emisión que en presencia de pequeños agregados amiloides desaparece para dar lugar a otra banda a mayores longitudes de onda. También se puede ver que el HBO sufre un *quenching* de fluorescencia al interactuar con el péptido, descendiendo bruscamente su emisión. No se observan cambios en la intensidad de fluorescencia con el tiempo de incubación. En cuanto a la anisotropía, determinada en la banda de emisión a mayores longitudes de onda, el HBO en PBS presenta un valor de $r = 0.067 \pm 0.007$ que aumenta desde el mismo instante en que se mezcla el amiloide a un valor constante con el tiempo de $r = 0.283 \pm 0.004$.

El bajo rendimiento cuántico que presenta el HBO en medio acuoso dificulta en gran medida la obtención de resultados reproducibles. Como consecuencia, no se pudo realizar una comparación gráfica de los resultados obtenidos para este fluoróforo en presencia de fibras y agregados iniciales de la misma concentración de amiloide ya que los datos disponibles no eran directamente comparables. Además, la baja solubilidad del HBO en tampón PBS a pH 7.2 lleva a desconocer su concentración real en las muestras.

No obstante, se puede afirmar que el comportamiento del HBO en presencia de los agregados tempranos es muy similar al que presenta con fibras. En disolución acuosa el HBO presenta un máximo de emisión en torno a 440 nm, correspondiente a la forma normal N_{inter} (ver apartados 2.2.3 y 6.3). Al interaccionar el colorante con los agregados tempranos de β -amiloide(1-42) desaparece esta banda para originarse una a mayores longitudes de onda, debida a la emisión del tautómero **T** formado a partir del confórmero N_{intra} mediante un proceso ESIPT. Esta banda aparece a 478 nm, igual que la observada para este colorante en presencia de fibras amiloides, por lo que la interacción del HBO con los diferentes agregados parece favorecer la formación de la especie tautomérica. En presencia de los agregados fibrilares no se observó el fuerte descenso en la emisión que sí se ve en contacto con los agregados tempranos, aunque esta diferencia podría ser debida a las dificultades ya comentadas para trabajar con el HBO.

El cambio tan fuerte observado en el espectro de emisión del HBO hace que este colorante pueda ser un buen candidato para el marcaje de pequeños agregados amiloides, lo que también indica el aumento que se produce en su anisotropía. El valor de anisotropía que presentan estos pequeños agregados en concentración 25 μ M, $r = 0.283 \pm 0.004$, es algo menor pero similar al observado para el HBO en presencia de fibras 12.5 μ M ($r = 0.306 \pm 0.010$), por lo que la restricción de movimiento para el fluoróforo en ambos medios es similar. Esto indica que la unión del HBO a los pequeños agregados es parecida a la que ocurre en presencia de fibras de una menor concentración, favoreciendo la formación del tautómero e impidiendo que éste sufra un proceso TICT no emisivo. Al igual que en el caso del HPIP, el menor aumento de anisotropía se debe probablemente a un menor grado de asociación del colorante en las muestras de agregados tempranos.

Realizando estudios análogos con los mismos colorantes para otras concentraciones de β -amiloide menores de 25 μ M se comprobó tampoco se observaban cambios en la agregación con el tiempo de incubación, obteniéndose resultados similares a los anteriores. En el caso de la ThT, a menor concentración de péptido deja de observarse el pequeño aumento de intensidad que se produce con el tiempo de incubación para la concentración de amiloide 25 μ M, de forma que no se producen cambios durante las primeras horas del proceso. Así, en todos los casos y para todas las concentraciones, se concluye que no hay cambios en la

emisión o anisotropía de fluorescencia con el tiempo de incubación para los agregados tempranos de amiloide a 25°C.

Estos resultados son concordantes con los obtenidos al estudiar la agregación del β -amiloide(1-42) mediante FCS a 25°C. Como se mostró en el apartado anterior, durante 2-3 horas no se observan cambios significativos en los tiempos de difusión ni en la contribución de los mismos al término de difusión para una determinada concentración de péptido. Se debe tener en cuenta que la estabilidad con el tiempo de incubación de los parámetros determinados con FCS no se observa tan claramente como en los experimentos con técnicas de fluorescencia convencionales. Esto es debido a que en la disolución no hay un único tipo de agregados sino una distribución de tamaños, lo que lleva a obtener tiempos de difusión promedios que pueden verse muy afectados si durante la medida pasa por el foco un agregado de un tamaño mucho mayor o menor que el promedio.

7.3.2. Agregación del β -amiloide a 25°C en función de la concentración de péptido

Una vez comprobado que no se observan cambios con el tiempo de incubación tras iniciar la formación de pequeños agregados amiloides en medio acuoso a 25°C, se realizaron nuevos ensayos para estudiar la dependencia del proceso de agregación con la concentración de péptido. Para esto, se llevan a cabo nuevos experimentos variando la concentración de amiloide en cada muestra. Por tanto, se prepararon distintas muestras de β -amiloide, previamente disuelto en DMSO, en tampón PBS a pH 7.2 con la cantidad adecuada del colorante estudiado, manteniendo esta concentración siempre estable en la serie de medidas, de forma que sólo cambie la concentración de péptido. De esta manera se determina el espectro de emisión y la anisotropía de cada muestra siempre en el mismo punto de la agregación. Este punto se considera como $t=0$ min, es decir, la medida de cada muestra se realiza una vez preparada la misma y situada en la cubeta (lo que supone aproximadamente 5 minutos desde la adición de la disolución de colorante). La temperatura se mantiene a 25°C para cada muestra, como en los ensayos anteriores. La concentración de amiloide dada está siempre referida a la cantidad total de péptido que se encuentra en forma de monómero antes de iniciarse la agregación.

Se iniciaron los ensayos con el estudio de la ThT como marcador, en concentración 1.6 μ M. Se emplearon dos longitudes de onda de excitación, 410 nm y 450 nm. Se obtuvieron resultados similares para ambas, por lo que se mostrarán sólo los obtenidos a 410 nm, debido a que se obtuvo una mayor intensidad de fluorescencia. La ventaja de excitar las muestras a 450 nm es una menor emisión por parte del amiloide, aunque al excitar a 410 nm la banda Raman aparece prácticamente en el medio de la banda de emisión. Para evitar estas

distorsiones del espectro, se muestran los resultados corregidos restando la contribución del péptido y del disolvente.

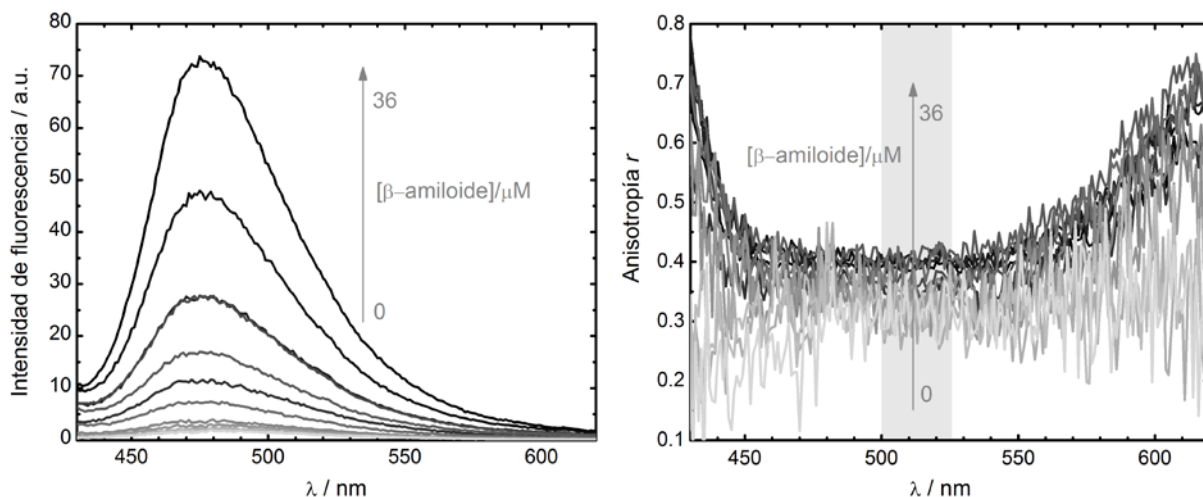


Figura 7.19. Espectros de emisión de la ThT en presencia de distintas concentraciones de pequeños agregados de β -amiloide(1-42) (izda.) y sus correspondientes espectros de anisotropía de fluorescencia (drcha.). En la gráfica de anisotropía se identifica con un rectángulo gris el intervalo en el que se determinan los valores de anisotropía medios (500-525 nm).

En la Figura 7.19 se observa que la ThT aumenta su emisión de fluorescencia conforme se incrementa la concentración de amiloide en forma de pequeños agregados, presentando un máximo en torno a 480 nm. También se puede ver un aumento en el valor de la anisotropía, al incrementarse la concentración, aunque el cambio que se produce es pequeño en relación con la incertidumbre de los datos. La Figura 7.20 muestra la variación que presenta la intensidad de fluorescencia de la ThT a varias longitudes de onda en presencia de agregados tempranos de amiloide a distintas concentraciones de péptido y la correspondiente variación en la anisotropía de fluorescencia media.

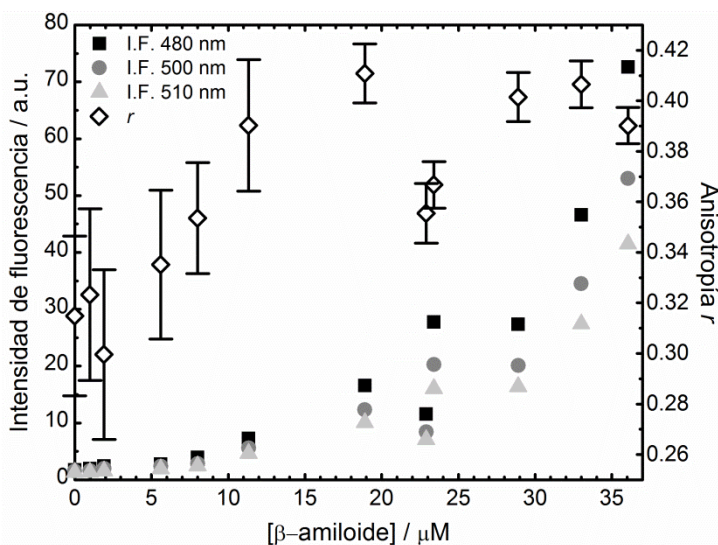


Figura 7.20. Variación de la intensidad de fluorescencia a varias longitudes de onda (480 nm, 500 nm y 510 nm) para la ThT con la concentración total de amiloide en condiciones de formación de agregados tempranos (escala izda.) y variación de la anisotropía media para el mismo sistema con la concentración del péptido (escala drcha.). Anisotropía media determinada en el intervalo de 480 nm a 525 nm.

En función de los resultados anteriores, se observa que al aumentar la concentración del péptido se incrementa la emisión de fluorescencia de la ThT, lo que demuestra de nuevo la existencia de una interacción entre el colorante y el amiloide en forma de pequeños agregados. La intensidad de fluorescencia presenta un aumento más importante cuando la concentración de péptido es mayor de 20-25 μM , sin llegar a observarse una estabilización en la misma. En cambio, la anisotropía de fluorescencia presenta a bajas concentraciones un valor en torno a 0.32 que aumenta ya desde una concentración 7-10 μM a valores entre 0.38-0.40, concordantes con los observados para la ThT en presencia de fibras. Se debe de tener en cuenta para la anisotropía determinada a bajas concentraciones de péptido que la emisión de fluorescencia en estas condiciones es muy débil, lo que lleva a errores grandes en la determinación de este parámetro. Por tanto, la pequeña diferencia que se observa en la anisotropía no se puede considerar muy significativa.

El comportamiento de la ThT como rotor molecular explica los cambios observados, ya que el aumento de la intensidad de fluorescencia se corresponde con la interacción del fluoróforo con los pequeños agregados y un mayor impedimento por parte de las moléculas planas para sufrir el proceso TICT. Este efecto es mayor a medida que se incrementa la concentración de péptido ya que, previsiblemente, se forma una mayor concentración de agregados y se une más ThT a los mismos. La emisión de fluorescencia observada no alcanza

un valor estable, lo que indicaría que todo el colorante se ha unido a los agregados si el mecanismo de interacción de la ThT con éstos fuera similar al establecido en presencia de fibras. El menor cambio con respecto a un medio con fibras amiloides es debido a la capacidad más baja de estos pequeños agregados para estabilizar las moléculas de ThT con conformación plana y a la menor cantidad de agregados, como ya se ha comentado en el apartado anterior. En cuanto a la anisotropía, el valor que presenta la ThT próximo al límite de 0.40 se atribuye a la unión de las moléculas planas con los agregados, que limitan su rotación, observándose sólo este tipo de moléculas bajo las condiciones de medida.

En presencia del β -amilide(1-40), Amaro y colaboradores estudiaron el proceso de agregación del péptido mediante la emisión de fluorescencia propia del aminoácido tirosina presente en la cadena (Amaro 2011). Estudiaron los cambios para muestras preparadas en concentraciones de 5 μM y 50 μM de péptido en tampón acuoso a pH 7.3 y a 37°C, tras aplicar un protocolo de desagregación similar al empleado por nuestro grupo. Los resultados experimentales indicaron que la muestra con baja concentración de amiloide no sufre cambios en ningún parámetro durante las 210 h del experimento o la velocidad a que ocurren es muy pequeña y no se puede detectar. Al contrario, con el aumento de la concentración de monómero inicial a 50 μM sí se observaron cambios en los tiempos de vida determinados y sus contribuciones correspondientes, en un tiempo mucho menor. Estos resultados están en concordancia con los nuestros, en los cuales se observan cambios significativos para la ThT a concentraciones mayores de 20 μM de péptido. De todas formas, se debe tener en cuenta que el comportamiento del β -amiloide(1-40) y del β -amiloide(1-42) puede ser muy distinto y que la temperatura empleada es más alta, pudiendo favorecer la agregación, como se comentará en el siguiente apartado.

De igual forma que para la ThT, se realizaron ensayos para el HPIP en concentración 3.4 μM variando la concentración de amiloide, bajo las condiciones para la formación de pequeños agregados ya citadas.

La Figura 7.21 muestra la variación de los espectros de emisión del HPIP en presencia de agregados amiloides tempranos, empleando distintas concentraciones totales del péptido. Se observa un aumento de las dos bandas de emisión a medida que se incrementa la cantidad de amiloide, siendo más significativo el cambio en la banda a mayores longitudes de onda. De igual forma, los espectros de anisotropía también muestran un aumento correspondiente al cambio en la concentración de péptido, siguiendo la misma tendencia que la emisión de fluorescencia.

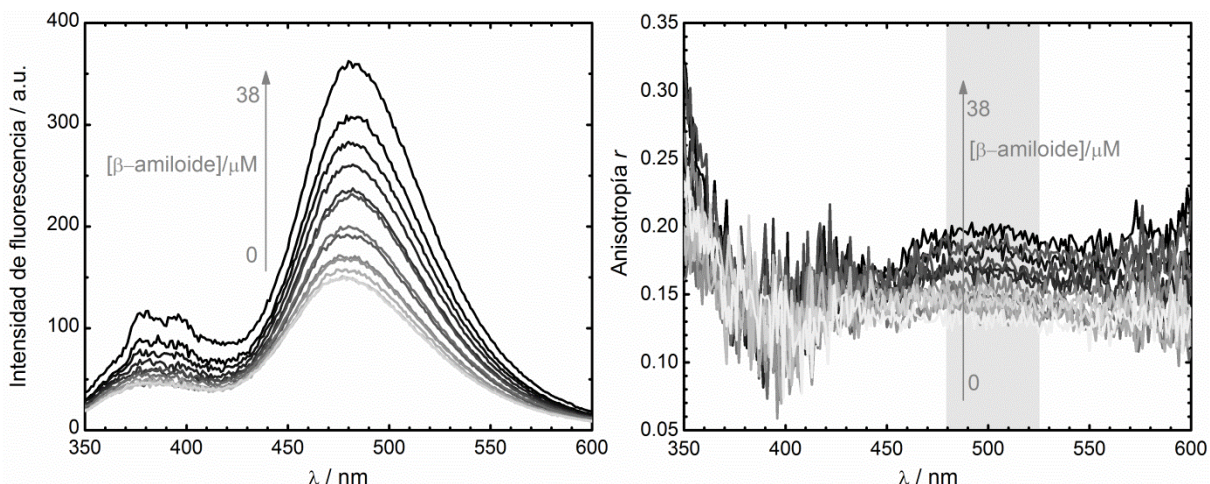


Figura 7.21. Espectros de emisión del HPIP en presencia de distintas concentraciones de pequeños agregados de β -amiloide(1-42) (izda.) y sus correspondientes espectros de anisotropía de fluorescencia (drcha.). En la gráfica de anisotropía se identifica con un rectángulo gris el intervalo en el que se determinan los valores de anisotropía medios (480-525 nm).

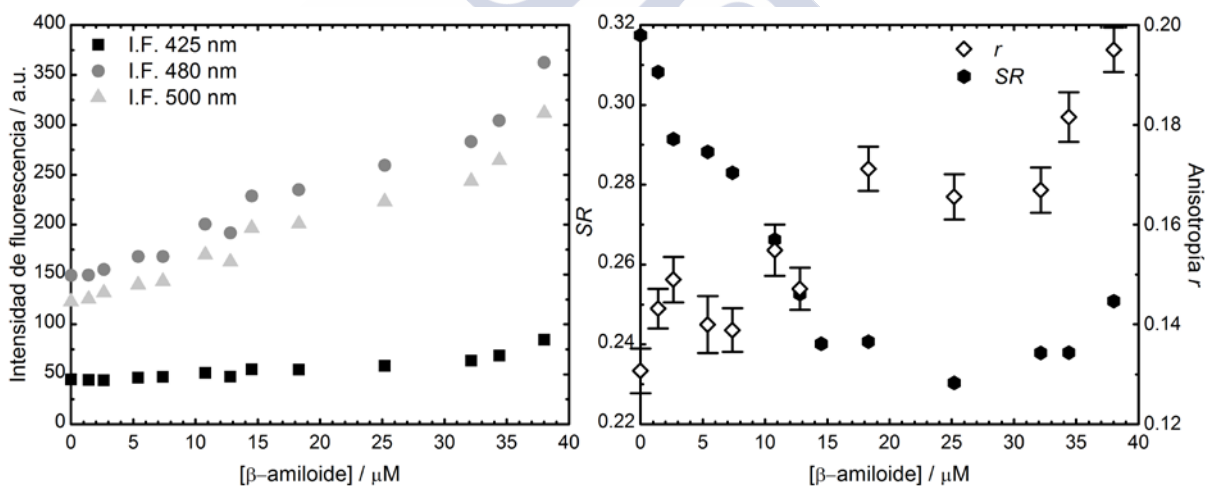


Figura 7.22. Variación de la intensidad de fluorescencia a varias longitudes de onda (425 nm, 480 nm y 500 nm) para el HPIP en función de la concentración total de amiloide en condiciones de formación de agregados tempranos (gráfica izda.). Variación del parámetro SR y de la anisotropía media correspondientes al mismo sistema con la concentración del péptido (gráfica drcha.; escala izda. y escala drcha., respectivamente). Anisotropía media determinada en el intervalo de 480 nm a 525 nm.

La Figura 7.22 muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a distintas longitudes de onda para el HPIP en presencia de pequeños agregados de amiloide preparados a partir de diferentes concentraciones del péptido en forma monomérica. Se

observa un incremento en ambas bandas de emisión. Además, la anisotropía de fluorescencia aumenta su valor desde el correspondiente al HPIP en medio acuoso, $r = 0.128 \pm 0.008$, hasta un valor en torno a 0.20 para una concentración de amiloide 38 μM . Al contrario, el parámetro SR desciende desde 0.32 (HPIP en PBS) hasta un valor medio constante de 0.23, que ya se alcanza a partir de una concentración 15 μM de amiloide.

La corrección aplicada en los espectros anteriores (Figura 7.21) eliminando la contribución del amiloide no es perfecta y lleva a que la banda a bajas longitudes de onda se vea un poco distorsionada en las medidas realizadas con mayor concentración de péptido. Este problema se ve acentuado por la presencia de la banda Raman en dicha banda, que influye en la intensidad medida en el intervalo 420-425 nm que se emplea para la determinación del parámetro SR (Figura 7.22). En presencia de fibras esta influencia es menos importante debido a que la emisión del HPIP es mayor.

Las variaciones observadas en la emisión de fluorescencia del HPIP con agregados tempranos pueden explicarse de forma similar al caso de este fluoróforo en presencia de fibras amiloides. El cambio en la banda a bajas longitudes de onda viene dado por un menor *quenching* de la forma normal N_{inter} del HPIP, disminuyendo en este medio su disociación para dar lugar a un anión no fluorescente. En cuanto a la banda de emisión a mayores longitudes de onda, su cambio se debe a un incremento en la formación del tautómero T o a un aumento de su emisión como consecuencia de una mayor estabilización de la molécula, que se forma a partir del confórmero N_{intra} por un proceso ES IPT y que ve inhibida la posibilidad de sufrir un proceso TICT al unirse a los agregados, que restringen su movimiento. Por otra parte, la variación en la intensidad de fluorescencia también depende de la concentración de agregados en cada muestra y la correspondiente mayor o menor presencia de fluoróforo no asociado.

Los cambios observados en anisotropía confirman el comportamiento anterior, demostrando que con el aumento de la concentración de amiloide el medio impide en mayor grado la rotación del HPIP, aumentando la emisión del tautómero T . La anisotropía no alcanza un valor límite como consecuencia de que bajo estas condiciones no todo el amiloide se encuentra complejo. Por otro lado, se observa que el parámetro SR es mucho más sensible a los cambios en la agregación que la anisotropía o intensidad de fluorescencia, alcanzándose un valor estable de 0.23 a partir de una concentración de amiloide 15 μM . Esta variación permite la posibilidad de establecer un modelo que explique el comportamiento del HPIP en presencia de pequeños agregados y bajo el cual se puedan determinar parámetros importantes como la constante de asociación del sistema. Este estudio aún está en desarrollo pero los cambios observados hacen que el HPIP pueda ser un buen candidato para emplear en la detección de pequeños agregados amiloides *in vitro*.

Se realizaron los mismos ensayos para el HBO en presencia de distintas concentraciones de agregados tempranos de amiloide, aunque el bajo rendimiento cuántico de este fluoróforo en disolución acuosa dificultó la obtención de un número amplio de datos experimentales como en los casos anteriores. A pesar de esto, se muestran los resultados por el interés que presenta esta sonda.

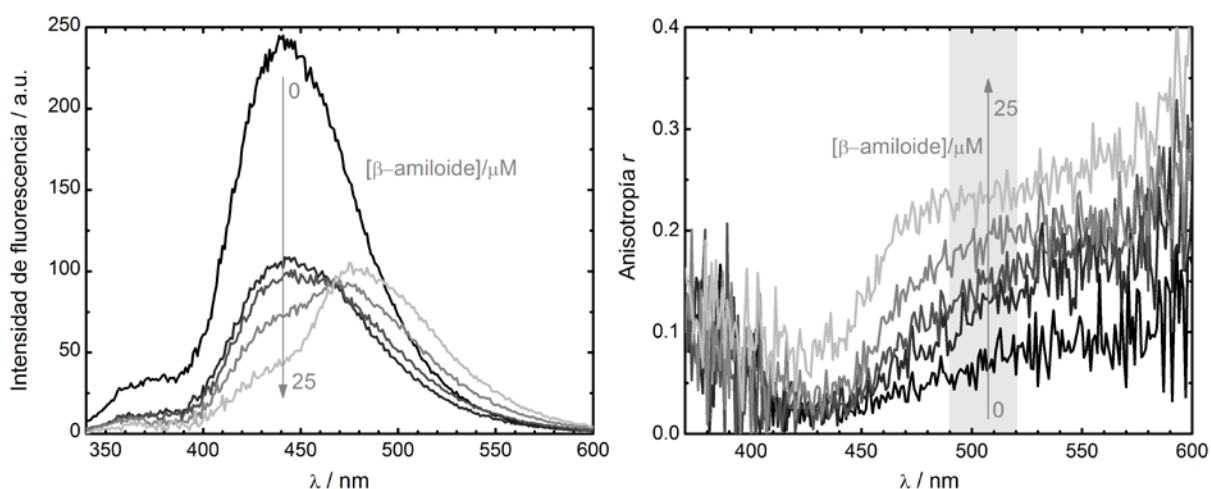


Figura 7.23. Espectros de emisión del HBO en presencia de distintas concentraciones de pequeños agregados de β -amiloide(1-42) (izda.) y sus correspondientes espectros de anisotropía de fluorescencia (drcha.). En la gráfica de anisotropía se identifica con un rectángulo gris el intervalo en el que se determinan los valores de anisotropía medios (490-520 nm).

La Figura 7.23 muestra la variación en el espectro de emisión correspondiente al HBO en presencia de concentraciones de amiloide entre 0 (negro) y 25 μM (gris claro), bajo condiciones de formación de agregados tempranos, así como los correspondientes espectros de anisotropía de fluorescencia.

En los espectros de emisión se observa que el HBO en PBS presenta una emisión más intensa que la correspondiente en presencia del amiloide. Al interactuar el HBO con una concentración baja de agregados se produce un *quenching* de fluorescencia, descendiendo fuertemente la emisión de la banda a 440 nm (correspondiente a su forma normal N_{inter}). A medida que aumenta la concentración del péptido, desciende en mayor medida la emisión de esta banda para aparecer una nueva banda en torno a 475 nm, que corresponde a la emisión del tautómero T.

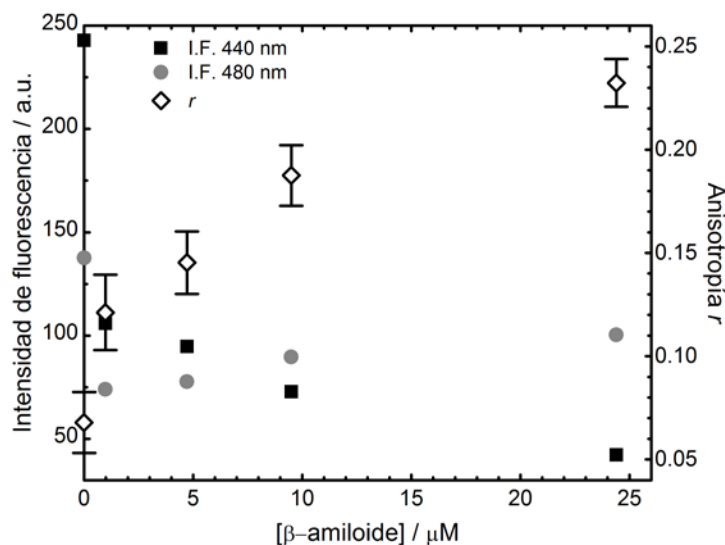


Figura 7.24. Variación de la intensidad de fluorescencia a varias longitudes de onda (440 y 480 nm) para el HBO con la concentración total de amiloide en condiciones de formación de agregados tempranos (escala izda.) y variación de la anisotropía media para el mismo sistema con la concentración total de péptido (escala drcha.). Anisotropía media determinada en el intervalo de 490 nm a 520 nm.

La Figura 7.24 muestra la intensidad de fluorescencia determinada a 440 nm y a 480 nm para el sistema anterior, así como el valor medio de anisotropía determinado en la banda de emisión del tautómero, en la que se observa un mayor cambio. La intensidad de fluorescencia a 440 nm sufre un brusco descenso al interaccionar el HBO con los agregados, mientras que la intensidad de fluorescencia a 480 nm se incrementa levemente a medida que aumenta la concentración de péptido y aparece esta banda. En cuanto a la anisotropía, este parámetro aumenta de 0.067 ± 0.007 (HBO en PBS) hasta un valor en torno a 0.25 para la concentración más alta. En presencia de fibras $12.5 \mu\text{M}$, el valor determinado para este parámetro fue de 0.31 (véase sección 6.3). La tendencia que se observa en este caso parece seguir un típico equilibrio de complejación, por lo que puede ser posible la determinación de los parámetros asociados a éste. En este medio, el HBO parece que ve favorecida la formación de su tautómero, mientras que el conformero N_{inter} sufre un *quenching* muy importante.

Los grandes cambios observados en el espectro de emisión del HBO como consecuencia de su interacción con estos agregados tempranos hace que este fluoróforo sea un marcador de interés para la detección *in vitro* de los mismos, aunque sería importante mejorar su solubilidad en medio acuoso. Además, la presencia de dos bandas de emisión permitiría establecer un método ratiométrico similar al utilizado para el HPIP.

Las diferencias que se observan para la ThT o para el HPIP en presencia de pequeños agregados con respecto a los cambios identificados en presencia de fibras pueden explicarse principalmente en función de la cantidad de amiloide agregado, que se considera mucho mayor en el caso de las fibras. Además, se considera también que la constante de afinidad para estos sistemas es distinta, de manera que el comportamiento observado en las series realizadas en función de la concentración de amiloide difiere con respecto al determinado con fibras.

Los resultados obtenidos en FCS son concordantes con los cambios observados mediante estas técnicas de fluorescencia. En FCS se comprobó que al aumentar la concentración de monómero se incrementaba también la contribución de los agregados al término de difusión, sugiriendo un aumento en la concentración de los mismos ya que no se vieron cambios significativos en el tamaño. Observando los resultados obtenidos con la ThT y el HPIP y el aumento producido en la emisión de fluorescencia al interaccionar con el péptido, se concluye también que la concentración de agregados aumenta con el aumento de la concentración del monómero.



7.3.3. Agregación del β -amiloide bajo condiciones de formación de fibras

Tras comprobar los cambios existentes al interaccionar distintos fluoróforos con pequeños agregados formados en disolución acuosa a 25°C, se realizaron nuevos ensayos para determinar si las variaciones temporales en la agregación son mayores al realizar la agregación del amiloide bajo condiciones de formación de fibras (37°C y agitación). Se muestran los resultados obtenidos para la interacción entre la ThT en concentración 1.04 μM con el de β -amiloide(1-42) de concentración 20 μM a diferentes tiempos de incubación. Para esto se prepara el amiloide siguiendo el protocolo ya establecido para la formación de fibras (véase sección 3.3.1) y se van cogiendo alícuotas a distintos tiempos, mezclando en este momento la ThT con el péptido y realizando las medidas. De esta forma, el amiloide permanece siempre a 37°C y con agitación, excepto en el momento de la medida, que se realiza a 25°C. De nuevo se emplea como longitud de onda de excitación 450 nm, aunque como se ha indicado en el apartado anterior los resultados serían similares a 410 nm. En este caso, la elección de 450 nm se debe a que la emisión propia del amiloide es muy baja excitando en este valor por lo que no es necesario corregir los espectros. Esta corrección es difícil de realizar en el caso de este experimento ya que bajo las condiciones de 37°C y agitación se ha comprobado que la autofluorescencia del péptido varía con el tiempo.

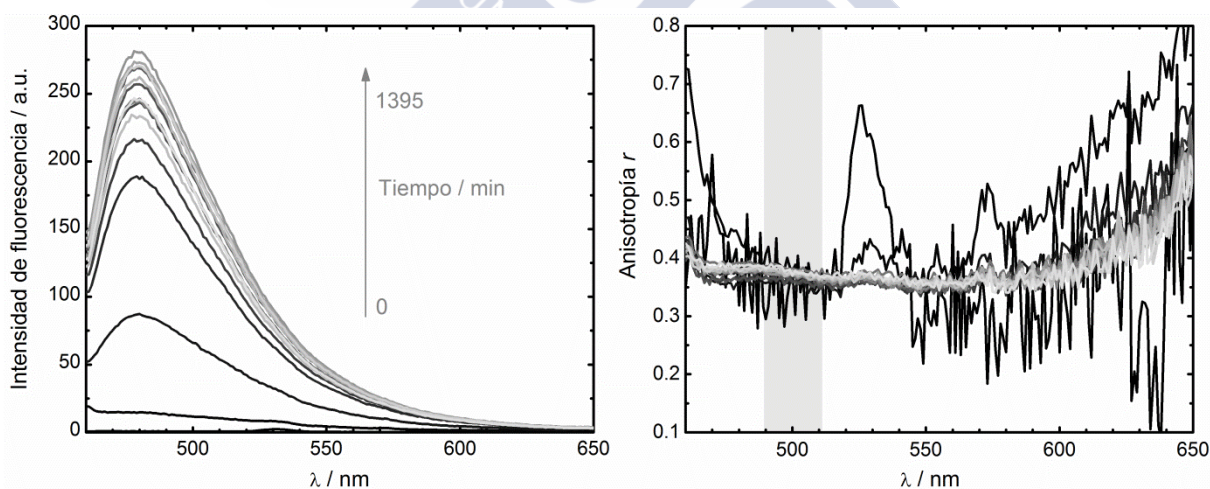


Figura 7.25. Espectros de emisión de la ThT en presencia de agregados de β -amiloide(1-42) a una concentración total de péptido de 20 μM , preparados a 37°C y con agitación, en función del tiempo de incubación entre 0 y 1395 min (izda.) y sus correspondientes espectros de anisotropía de fluorescencia (drcha.). En la gráfica de anisotropía se identifica con un rectángulo gris el intervalo en el que se determinan los valores de anisotropía medios (490-510 nm). El pico observado en torno a 525 nm se corresponde con la banda Raman.

En la Figura 7.25 se muestran los espectros de emisión obtenidos para cada muestra de amiloide con ThT a distintos tiempos de incubación y sus espectros de anisotropía de fluorescencia correspondientes.

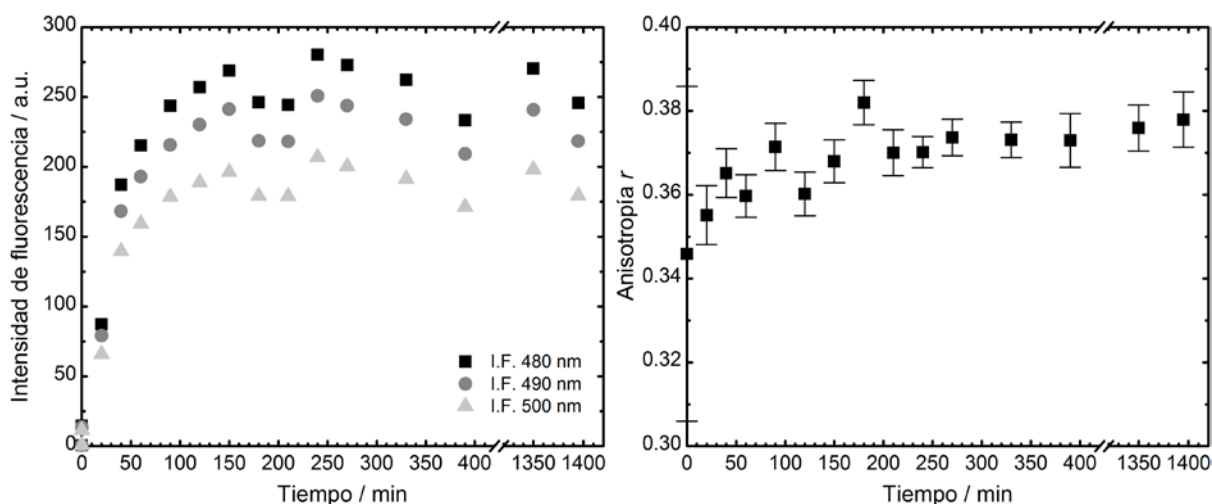


Figura 7.26. Variación con el tiempo de incubación de la intensidad de fluorescencia a varias longitudes de onda (480 nm, 490 nm y 500 nm) para el HPIP en presencia de agregados amiloides formados a una concentración total de péptido de 20 μ M en condiciones de formación de fibras (izda.) y de la anisotropía media para el mismo sistema (drcha.). Anisotropía media determinada en el intervalo de 490 nm a 510 nm.

Representando la emisión de fluorescencia a varias longitudes de onda y el valor de anisotropía medio determinado a partir de la figura anterior (Figura 7.26) se puede observar un fuerte aumento de la intensidad de fluorescencia ya desde tiempos bajos, alcanzando un valor estable en torno a las 3 horas del experimento, mientras que la anisotropía de fluorescencia apenas muestra cambio. En el máximo del espectro, 480 nm, se comprueba que la emisión del fluoróforo es casi 400 veces mayor para la última medida realizada con respecto a la intensidad que presenta la ThT en medio acuoso. Este valor nos permite ver la diferencia respecto a los cambios observados en estudios anteriores (apartado 7.3.1) para los experimentos realizados a 25°C, tanto en presencia de pequeños agregados (donde el aumento observado era de aproximadamente 70 veces con respecto al fluoróforo en PBS) como en presencia de fibras (cuyo incremento en la emisión es mayor de 1300 veces). Esto indica que el cambio en las condiciones de preparación de los agregados influye mucho en su formación, siendo ésta más rápida, aunque en el tiempo de transcurso del experimento (aproximadamente 1 día) la ThT no aumenta tanto su emisión como para ser similar a la que presenta al interactuar con fibras maduras. Por tanto, se puede considerar que los

agregados formados no tienen la estructura tan bien definida como en el caso de las fibras maduras pero sí pueden presentar un mayor orden que impida la rotación de la ThT para dar lugar a un proceso TICT no fluorescente. Es posible que la estabilidad se alcance durante el proceso de maduración de las fibras, por lo que previsiblemente aumentaría de nuevo la emisión de la ThT al transcurrir más horas de incubación y presentar los amiloides un mayor contenido en láminas β . Además, la concentración de agregados en las condiciones de formación de fibras debe aumentar considerablemente con respecto a las usadas en los experimentos de agregados tempranos, siendo por tanto mayor la proporción de fluoróforo asociado.

En estudios realizados con el β -amiloide(1-42) y el mismo péptido marcado fluorescentemente con el HiLyte Fluor 488 en concentraciones de 80 μ M y 8 μ M, respectivamente, incubando la muestra en un tampón acuoso a pH 7.4 y temperatura de 37°C, se determinó el radio hidrodinámico de los agregados formados durante un periodo de 6-7 horas (Vestergaard 2008). Se observó un comportamiento similar al de la Figura 7.26 para la variación de la intensidad de fluorescencia, aumentando el radio durante las primeras horas del ensayo y alcanzando una estabilidad en torno a las 4 horas. Mediante la obtención de imágenes con un microscopio de fuerza atómica los autores observaron la aparición de las primeras fibras en torno a las 2 horas, las cuales aumentaban su tamaño a medida que continuaba la incubación. También comprobaron mediante esta técnica la existencia de agregados en la disolución antes de iniciar el proceso de incubación a 37°C. Estos resultados concuerdan con los mostrados en este apartado, ya que en las medidas realizadas a 25°C también se observan agregados sin necesidad de incubar la muestra a mayor temperatura y al realizar los ensayos a 37°C la estabilidad en la emisión de fluorescencia se alcanza en torno a las 3 horas del ensayo, siendo este tiempo cercano al obtenido por Vestergaard y colaboradores para el cambio en el radio hidrodinámico de los agregados.

Estos resultados determinados con la ThT también explican la diferencia observada entre los datos obtenidos en FCS en función del tiempo (sin evolución en los parámetros determinados) y los mostrados en el trabajo de Vestergaard (Vestergaard 2008), ya que la temperatura empleada fue de 25°C y 37°C, respectivamente, siendo mucho más rápida la agregación en este último caso.

El mismo ensayo se realizó con el HPIP, observándose también cambios muy rápidos, como se ha indicado con la ThT. No se muestran estos resultados ya que son preliminares y es necesario comprobarlos con más experimentos. Sí se puede indicar que antes de las 2 horas de medida se alcanzó un valor estable para la anisotropía del HPIP en presencia de amiloide, en torno a 0.26, valor próximo al determinado para el complejo del HPIP con fibras amiloides ($r=0.293\pm 0.008$, ver apartado 6.2).

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que la formación de agregados tempranos no tiene una evolución temporal significativa durante las primeras horas del proceso mientras que sí se observa una dependencia clara de la agregación con la concentración de péptido. Esto ha sido observado tanto en FCS como al comprobar la validez de distintos marcadores fluorescentes para la detección de pequeños agregados, obteniendo resultados muy interesantes tanto con el HPIP como con el HBO. También se comprobó que en la disolución no se encuentran presentes fibras amiloides, sino agregados de menor tamaño, lo que se observó de forma muy clara en los ensayos con técnicas de fluorescencia convencionales.



CAPÍTULO 8

Conclusiones

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron estudios de la interacción de distintas macromoléculas o sistemas supramoleculares, actuando como receptores, con diferentes sustratos fluorescentes. Esto permitió analizar interacciones de distintos tipos (hidrofóbicas, electrostáticas, enlaces de hidrógeno, etc.), las cuales se comprobó que determinan la fuerza de unión de los sistemas y los cambios fotofísicos originados por el proceso de asociación, caracterizado por una determinada constante de equilibrio.

Este trabajo se ha realizado como un compendio de artículos de investigación, incluyendo también varios estudios que aún no están publicados. Por tanto, a modo de resumen se indican a continuación los artículos incluidos en el mismo y los estudios que están en proceso de preparación para su publicación:

- Complejos supramoleculares sustrato-receptor entre la Cumarina 460 y las ciclodextrinas: una cuestión de tamaño (*Supramolecular host guest complexes between Coumarin 460 and cyclodextrins: a matter of size*, Artículo 1).
- Papel de las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas en la interacción de colorantes iónicos con micelas cargadas (*Role of Electrostatic and Hydrophobic Forces in the Interaction of Ionic Dyes with Charged Micelles*, Artículo 2).
- Estudio fotofísico de la Tioflavina T como marcador fluorescente de fibras amiloides (*Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils*, Artículo 3).
- Avanzando hacia la detección ratiométrica de fibras de amiloide *in vitro* (*Towards ratiometric sensing of amyloid fibrils in vitro*, Artículo 4).
- Estudio de otros potenciales marcadores fluorescentes de fibras de β -amiloide.
- Caracterización de pequeños agregados de β -amiloide(1-42) mediante FCS y estudio de potenciales marcadores de pequeños agregados del péptido. Esta parte del

trabajo está actualmente en proceso de preparación para su publicación, debido a los interesantes resultados obtenidos.

Del trabajo expuesto en los capítulos anteriores se pueden extraer los siguientes **resultados finales y conclusiones**:

A. Las ciclodextrinas y las micelas: encapsulación de pequeñas moléculas

1. Las ciclodextrinas provocan cambios importantes en las propiedades fotofísicas de un sustrato al interactuar con él, los cuales son muy dependientes del tamaño de la cavidad.
2. Comparando las tres ciclodextrinas estudiadas, se observa que la constante de equilibrio de formación de los correspondientes complejos con la C460 es más alta en el caso de la β -ciclodextrina. Esto es debido al adecuado tamaño de su cavidad, que permite un perfecto encaje de la cumarina y, en consecuencia, una fuerte interacción del sustrato con los oxígenos glucosídicos del interior del receptor.
3. Los procesos de transferencia de carga que puede sufrir la C460 llevan a que sea un fluoróforo muy sensible al medio en que se encuentra. Su interacción con las ciclodextrinas está caracterizada por una inhibición de la libre rotación de la molécula que está directamente ligada con la eficiencia del proceso de quenching del fluoróforo mediante transferencia de carga en el estado excitado (TICT).
4. El fluoróforo R123 interacciona con los surfactantes y sus micelas, siendo dicha interacción fuertemente dependiente de la carga del grupo cabeza del tensioactivo y, por tanto, de las fuerzas intermoleculares electrostáticas que actúan en el proceso de asociación.
5. A concentraciones menores que la CMC, la R123 no presenta interacción con surfactantes catiónicos y neutros, por lo que apenas se observan cambios en sus propiedades fotofísicas. La pequeña variación de la fluorescencia de la R123 observada con tensioactivos catiónicos antes de la CMC es consecuencia de un quenching dinámico originado por la presencia de iones bromuro. A concentraciones mayores que la CMC aparece un equilibrio de reparto del marcador dentro y fuera de las micelas. En el caso de los tensioactivos neutros, la localización de la R123 dentro de las micelas es superficial y no actúan fuerzas electrostáticas. Para los tensioactivos catiónicos, la interacción dominante es la repulsión electrostática entre la superficie de las micelas y el fluoróforo, ambos cargados positivamente, de forma que la entrada del colorante no está favorecida (bajas constantes de afinidad) y éste se localizaría más probablemente en el interior apolar.
6. La R123 presenta una gran afinidad por los tensioactivos aniónicos, debida a las fuertes interacciones electrostáticas que aparecen como consecuencia de la distinta

carga entre la micela y el colorante. Esto conlleva la aparición de pares iónicos y agregados premicelares a concentraciones inferiores a la CMC. A concentraciones mayores, este fluoróforo interacciona fuertemente con las micelas y se sitúa fundamentalmente en la superficie de las mismas por la gran atracción electrostática.

B. Agregación del péptido β -amiloide(1-42)

7. Los estudios realizados con la ThT como marcador fluorescente de fibras de amiloide confirmaron su comportamiento como rotor molecular, estableciéndose un mecanismo con una distribución de conformaciones en el estado fundamental capaz de explicar sus propiedades fotofísicas.
8. Las propiedades fotofísicas de la ThT son altamente dependientes de la longitud de onda, lo que dificulta en gran medida su uso como sonda fluorescente de fibras de amiloide. Además, su débil emisión en disolución acuosa en comparación con la elevada intensidad de fluorescencia que presenta al unirse a las fibras de amiloide hacen inviable una determinación cuantitativa de la concentración de fibras.
9. Se estableció también un mecanismo de actuación para el benzotiazol HPIP, fluoróforo estudiado como potencial marcador fluorescente de fibras de amiloide y agregados proteicos de menor tamaño, demostrándose el interés de su aplicación en ambos casos. Su comportamiento en el estado excitado como sonda de transferencia protónica que puede sufrir también procesos de transferencia de carga asociados, provoca la aparición de dos bandas de emisión de fluorescencia cuya relación de intensidades (parámetro *SR*) es altamente dependiente del medio. Esto permite la aplicación de un método ratiométrico para la detección de dichos agregados de amiloide, que es muy ventajoso al posibilitar determinaciones cuantitativas frente al mero análisis cualitativo con la ThT. Además, se demostró que también la anisotropía de fluorescencia del HPIP puede ser utilizada en dicha determinación cuantitativa, en contraste con el caso de la ThT.
10. Se demostró también que los dos fluoróforos, ThT y HPIP, son muy sensibles a agregados fibrilares pero que además interaccionan con proteínas no fibrilares, como es el caso de la proteína globular BSA. Esta interacción con distintos tipos de proteínas dificulta su utilización para la detección de agregados de β -amiloide en muestras biológicas, ya que no son específicos de estas estructuras.
11. La ThT no es un colorante adecuado para la detección de pequeños agregados de amiloide formados en las etapas iniciales del proceso de agregación, ya que muestra cambios poco significativos en la interacción con los mismos. En cambio, el HPIP permite observar variaciones en la formación de estos agregados iniciales a través

de su anisotropía o del parámetro *SR* obtenido a partir del método ratiométrico ya citado.

12. Las notables y ventajosas propiedades fotofísicas del HPIP hacen necesario abordar una mejora de su estabilidad fotoquímica mediante el diseño de compuestos análogos al mismo pero más estables.
13. Otros fluoróforos similares a la ThT fueron estudiados para el marcaje de fibras de amiloide y agregados solubles del mismo. Concretamente, el oxazol HBO mostró cambios muy importantes en presencia de las distintas estructuras del péptido, pudiendo aplicarse también un método ratiométrico para la detección de los agregados. Sin embargo, este fluoróforo presenta el inconveniente de ser muy poco soluble bajo las condiciones de medida empleadas en este trabajo, observándose además una emisión de fluorescencia muy débil. Por tanto, sería muy interesante abordar el diseño de otros marcadores con características similares a éste pero mejorando el problema indicado.
14. Los estudios de pequeños agregados tempranos mediante FCS y otras técnicas de fluorescencia demostraron que el proceso de agregación del β -amiloide(1-42) a 25°C durante aproximadamente 2-3 horas no muestra una dependencia con el tiempo, formándose agregados de un determinado tamaño de forma muy rápida al iniciarse el proceso. En cambio, sí se observó una dependencia con la concentración de amiloide, variando la proporción de péptido agregado a medida que se incrementaba la concentración del monómero, sin aparecer cambios significativos en el tamaño de los agregados.
15. En estudios preliminares realizados para analizar el proceso de agregación del péptido mediante el uso de las condiciones de formación de fibras, 37°C y agitación, sí se demostró la existencia de una dependencia temporal de la emisión de fluorescencia de distintos fluoróforos que podría evidenciar la dinámica de dicho proceso de agregación.

Referencias bibliográficas

- (Abou-Zied 2007) Abou-Zied, O.K. 2007, "The role of water in solvating the hydrogen-bonding center of 2-(2'-hydroxyphenyl) benzoxazole", *Chemical Physics*, vol. 337, no. 1, pp. 1-10.
- (Abou-Zied 2012) Abou-Zied, O.K. 2012, "Revealing the ionization ability of binding site I of human serum albumin using 2-(2'-hydroxyphenyl) benzoxazole as a pH sensitive probe", *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 14, no. 8, pp. 2832-2839.
- (Abou-Zied 2013) Abou-Zied, O.K. 2013, "Spectroscopy of hydroxyphenyl benzazoles in solution and human serum albumin: detecting flexibility, specificity and high affinity of the warfarin drug binding site", *RSC Advances*, vol. 3, no. 23, pp. 8747-8755.
- (Aguiar 2003) Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J.A. y Ruiz, C.C. 2003, "On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method", *Journal of colloid and interface science*, vol. 258, no. 1, pp. 116-122.
- (Al-Soufi 1990) Al-Soufi, W., Grellmann, K.H. y Nickel, B. 1990, "Triplet state formation and cis-trans isomerization in the excited singlet state of the keto tautomer of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole", *Chemical Physics Letters*, vol. 174, no. 6, pp. 609-616.
- (Al-Soufi 2001) Al-Soufi, W., Novo, M. y Mosquera, M. 2001, "Principal component global analysis of fluorescence and absorption spectra of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole", *Applied Spectroscopy*, vol. 55, no. 5, pp. 630-636.

Referencias bibliográficas

- (Al-Soufi 2005) Al-Soufi, W., Reija, B., Novo, M., Felekyan, S., Kühnemuth, R. y Seidel, C.A.M. 2005, "Fluorescence Correlation Spectroscopy, a tool to investigate supramolecular dynamics: inclusion complexes of pyronines with cyclodextrin", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, no. 24, pp. 8775-8784.
- (Al-Soufi 2008) Al-Soufi, W., Reija, B., Felekyan, S., Seidel, C.A. y Novo, M. 2008, "Dynamics of supramolecular association monitored by fluorescence correlation spectroscopy", *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry*, vol. 9, no. 13, pp. 1819-1827.
- (Al-Soufi 2011) Al-Soufi, W., Novo, M., Mosquera, M. y Rodríguez-Prieto, F. 2011, "Principal Component Global Analysis of Series of Fluorescence Spectra", *Reviews in Fluorescence 2009*, pp. 23-45.
- (Al-Soufi 2012) Al-Soufi, W., Piñeiro, L. y Novo, M. 2012, "A model for monomer and micellar concentrations in surfactant solutions: application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tension data", *Journal of colloid and interface science*, vol. 370, no. 1, pp. 102-110.
- (Álvarez Prada 2006) Álvarez Prada, L. 2006, "Estudio de la asociación de la cumarina 460 con la proteína seroalbúmina bovina", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Álvarez-Parrilla 2001) Álvarez-Parrilla, E., Al-Soufi, W., Ramos Cabrer, P., Novo, M. y Vázquez Tato, J. 2001, "Resolution of the Association Equilibria of 2-(P-Toluidinyl)-Naphthalene-6-Sulfonate (Tns) With Beta-Cyclodextrin and a Charged Derivative", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, no. 25, pp. 5994-6003.
- (Amaro 2011) Amaro, M., Birch, D.J. y Rolinski, O.J. 2011, "Beta-amyloid oligomerisation monitored by intrinsic tyrosine fluorescence", *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 14, pp. 6434-6441.
- (Amdursky 2012) Amdursky, N., Erez, Y. y Huppert, D. 2012, "Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the Thioflavin T fluorescent marker", *Accounts of Chemical Research*, vol. 45, no. 9, pp. 1548-1557.
- (Astray 2009) Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J., Rial-Otero, R. y Simal-Gándara, J. 2009, "A review on the use of cyclodextrins in foods", *Food Hydrocolloids*, vol. 23, no. 7, pp. 1631-1640.

- (Bacia 2003) Bacia, K. y Schwille, P. 2003, "A dynamicv of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy", *Methods*, vol. 29, no. 1, pp. 74-85.
- (Becker 2012) Becker, W. (ed) 2012, "The bh TCSPC Handbook", *Becker & Hickl GmbH*, Germany.
- (Bergmark 1990) Bergmark, W.R., Davis, A., York, C., Macintosh, A. y Jones, G.I. 1990, "Dramatic fluorescence effects for coumarin laser dyes coincluded with organic solvents in cyclodextrins", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 94, no. 12, pp. 5020-5022.
- (Bevington 2003) Bevington, P.R. y Robinson, K.D. 2003, "Data reduction and error analysis for the physical sciences", *McGraw-Hill Higher Education*, USA.
- (Biancalana 2010) Biancalana, M. y Koide, S. 2010, "Molecular mechanism of Thioflavin T binding to amyloid fibrils", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1804, no. 7, pp. 1405-1412.
- (Bitan 2003a) Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B. y Teplow, D.B. 2003a, "Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ oligomerize through distinct pathways", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 1, pp. 330.
- (Bitan 2003b) Bitan, G., Tarus, B., Vollers, S.S., Lashuel, H.A., Condron, M.M., Straub, J.E. y Teplow, D.B. 2003b, "A molecular switch in amyloid assembly: Met35 and amyloid- β protein oligomerization", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 50, pp. 15359-15365.
- (Bordello 2010) Bordello, J., Novo, M. y Al-Soufi, W. 2010, "Exchange-dynamics of a neutral hydrophobic dye in micellar solutions studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 345, pp. 369-376.
- (Bordello Malde 2013) Bordello Malde, J. 2013, "Single-molecule fluorescence studies of the dynamics in supramolecular systems of biological interest", *Tesis doctoral*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Brackmann 1986) Brackmann, U. 1986, "Lambdachrome laser dyes", *Goettingen: Lambda Physik GmbH*, 1986, vol. 1.

Referencias bibliográficas

- (Brenlla 2011) Brenlla, A., Veiga, M., Rodríguez, M.C.R., Mosquera, M. y Rodríguez-Prieto, F. 2011, "Fluorescence of methylated derivatives of hydroxyphenylimidazopyridine. Resolution of strongly overlapping spectra and a new ESIPT dye showing very efficient radiationless deactivation", *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 10, no. 10, pp. 1622-1636.
- (Brenlla 2013) Brenlla, A., Veiga, M., Pérez Lustres, J.L., Ríos Rodríguez, M.C., Rodríguez-Prieto, F. y Mosquera, M. 2013, "Photoinduced proton and charge transfer in 2-(2'-Hydroxyphenyl)imidazo [4, 5-b] pyridine", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, no. 3, pp. 884-896.
- (Carreira Blanco 2007) Carreira Blanco, C. 2007, "Puesta a punto y validación de un equipo de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia para el estudio de sistemas micelares", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Challa 2005) Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. y Khar, R. 2005, "Cyclodextrins in drug delivery: an updated review", *Aaps Pharmscitech*, vol. 6, no. 2, pp. E329-E357.
- (Chen 2006) Chen, Y. y Glabe, C.G. 2006, "Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid- β peptides A β 40 and A β 42: stable trimer or tetramer formation by A β 42", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 34, pp. 24414-24422.
- (Chow 1986) Chow, A., Kennedy, J.C., Pottier, R. y Truscott, T.G. 1986, "Rhodamine 123 - photophysical and photochemical properties", *Photobiochemistry and Photobiophysics*, vol. 11, no. 2, pp. 139-148.
- (Cizas 2010) Cizas, P., Budvytyte, R., Morkuniene, R., Moldovan, R., Broccio, M., Lösche, M., Niaura, G., Valincius, G. y Borutaite, V. 2010, "Size-dependent neurotoxicity of [beta]-amyloid oligomers", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 496, no. 2, pp. 84-92.
- (Danielsson 2002) Danielsson, J., Jarvet, J., Damberg, P. y Graslund, A. 2002, "Translational diffusion measured by PFG-NMR on full length and fragments of the Alzheimer A β (1-40) peptide. Determination of hydrodynamic radii of random coil peptides of varying length", *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 40, pp. S89-S97.

- (Del Pozo Yauner 2008) Del Pozo Yauner, L., Rodríguez Ambriz, S.L. y Becerril, B. 2008, "Las amiloidosis humanas: cuando las proteínas muestran su lado oscuro", *Mensaje Bioquímico*, vol. 32, pp. 79-93.
- (Del Valle 2004) Del Valle, E.M. 2004, "Cyclodextrins and their uses: a review", *Process biochemistry*, vol. 39, no. 9, pp. 1033-1046.
- (Demas 1971) Demas, J.N. y Crosby, G.A. 1971, "The measurement of photoluminescence quantum yields. A review", *The Journal of physical chemistry*, vol. 75, no. 8, pp. 991-1024.
- (Demchenko 2010) Demchenko, A.P. 2010, "The concept of λ -ratiometry in fluorescence sensing and imaging", *Journal of Fluorescence*, vol. 20, no. 5, pp. 1099-128.
- (Deumié 1993) Deumié, M. y Baraka, M. 1993, "Self-aggregation of R110 and R123 rhodamines with surfactants and phospholipid vesicles of negative charge: a qualitative fluorescence study", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 74, pp. 255-266.
- (Dobson 2003) Dobson, C.M. 2003, "Protein folding and misfolding", *Nature*, vol. 426, no. 6968, pp. 884-890.
- (Domínguez 1997) Domínguez, A., Fernández, A., González, N., Iglesias, E. y Montenegro, L. 1997, "Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques", *Journal of chemical education*, vol. 74, no. 10, pp. 1227-1231.
- (Elson 1974) Elson, E.L. y Magde, D. 1974, "Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual basis and theory", *Biopolymers*, vol. 13, no. 1, pp. 1-27.
- (Elson 2011) Elson, E.L. 2011, "Fluorescence Correlation Spectroscopy: past, present, future", *Biophysical journal*, vol. 101, no. 12, pp. 2855-2870.
- (Esbjörner 2014) Esbjörner, E.K., Chan, F., Rees, E., Erdelyi, M., Luheshi, L.M., Bertoncini, C.W., Kaminski, C.F., Dobson, C.M. y Schierle, G.S.K. 2014, "Direct observations of amyloid- β self-assembly in live cells provide insights into differences in the kinetics of A β (1-40) and A β (1-42) aggregation", *Chemistry & biology*, vol. 21, pp. 1-11.

Referencias bibliográficas

- (Felekyan 2005) Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Kudryavtsev, V., Sandhagen, C., Becker, W. y Seidel, C.A.M. 2005, "Full correlation from picoseconds to seconds by time-resolved and time-correlated single photon detection", *Review of Scientific Instruments*, vol. 76, no. 8.
- (Filgueira Carreira 2007) Filgueira Carreira, J. 2007, "Estudio de la interacción de la cumarina C152 con sistemas organizados biomiméticos", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Filgueiras Pérez 2007) Filgueiras Pérez, S. 2007, "La cumarina 152 como sonda fluorescente para el estudio de tensioactivos de uso en la industria de detergentes", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Frankewich 1991) Frankewich, R.P., Thimmaiah, K.N. y Hinze, W.L. 1991, "Evaluation of the relative effectiveness of different water-soluble β -cyclodextrin media to function as fluorescence enhancement agents", *Analytical Chemistry*, vol. 63, no. 24, pp. 2924-2933.
- (Fries 1998) Fries, J.R., Brand, L., Eggeling, C., Kollner, M. y Seidel, C.A.M. 1998, "Quantitative identification of different single molecules by selective Time-Resolved Confocal Fluorescence Spectroscopy", *Journal of Physical Chemistry a*, vol. 102, no. 33, pp. 6601-6613.
- (García Rodríguez 2006) García Rodríguez, S. 2006, "Estudio de la interacción de la cumarina 102 con sistemas organizados biomiméticos", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Gilead 2005) Gilead, S. y Gazit, E. 2005, "Self-organization of short peptide fragments: from amyloid fibrils to nanoscale supramolecular assemblies", *Supramolecular Chemistry*, vol. 17, no. 1-2, pp. 87-92.
- (Gong 2003) Gong, Y.S., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A. y Klein, W.L. 2003, "Alzheimer's Disease-affected brain: presence of oligomeric ABeta ligands (Addls) suggests a molecular basis for reversible memory loss", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 18, pp. 10417-10422.

- (Grabowski 2003) Grabowski, Z.R., Rotkiewicz, K. y Rettig, W. 2003, "Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures", *Chemical reviews*, vol. 103, pp. 3899-4031.
- (Granadero Rey 2006) Granadero Rey, D. 2006, "Análisis global de curvas de correlación de fluorescencia", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Greene 2002) Greene, J. 2002, "Neurobiology of Alzheimer's disease", *Brain*, vol. 125, no. 5, pp. 1163-1164.
- (Groenning 2010) Groenning, M. 2010, "Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils –current status", *Journal of chemical biology*, vol. 3, no. 1, pp. 1-18.
- (Haass 2007) Haass, C. y Selkoe, D.J. 2007, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid [beta]-peptide", *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 8, no. 2, pp. 101-112.
- (Hamada 2010) Hamada, T., Morita, M., Kishimoto, Y., Komatsu, Y., Vestergaard, M. y Takagi, M. 2010, "Biomimetic microdroplet membrane interface: detection of the lateral localization of amyloid-beta peptides", *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 1, pp. 170-173.
- (Harper 1997) Harper, J.D. y Lansbury Jr, P.T. 1997, "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 66, no. 1, pp. 385-407.
- (Hess 2002) Hess, S.T., Huang, S., Heikal, A.A. y Webb, W.W. 2002, "Biological and chemical applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: a review", *Biochemistry*, vol. 41, no. 3, pp. 697-705.
- (Hiemenz 1997) Hiemenz, P.C. y Rajagopalan, R. 1997, "Principles of colloid and surface chemistry", *Marcel Dekker*, New York.
- (Hölscher 1998) Hölscher, C. 1998, "Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. A review", *Neurobiology of disease*, vol. 5, pp. 129-141.

Referencias bibliográficas

- (Honda 2002) Honda, C., Itagaki, M., Takeda, R. y Endo, K. 2002, "Solubilization of pyrene in CnE7 micelles", *Langmuir*, vol. 18, no. 6, pp. 1999-2003.
- (Jan 2010) Jan, A., Hartley, D.M. y Lashuel, H.A. 2010, "Preparation and characterization of toxic A β aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research", *Nature protocols*, vol. 5, no. 6, pp. 1186-1209.
- (Jarrett 1993) Jarrett, J.T., Berger, E.P. y Lansbury, P.T. 1993, "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Biochemistry*, vol. 32, no. 18, pp. 4693-4697.
- (Jeong 2002) Jeong, J., Kimb, J., Chac, J. y Kim, J. 2002, "The effect of polydispersity on the static and dynamic behavior of dodecyl ethoxylates at the air-water interface", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 207, no. 1-3, pp. 161-167.
- (Jones 1985) Jones, G.I., Jackson, W.R., Choi, C.Y. y Bergmark, W.R. 1985, "Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 89, pp. 294-300.
- (Jungbauer 2009) Jungbauer, L.M., Yu, C., Laxton, K.J. y LaDu, M.J. 2009, "Preparation of fluorescently-labeled amyloid-beta peptide assemblies: the effect of fluorophore conjugation on structure and function", *Journal of molecular recognition: JMR*, vol. 22, no. 5, pp. 403.
- (Kalyanasundar. 1977) Kalyanasundaram, K. y Thomas, J.K. 1977, "Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 99, no. 7, pp. 2039-2044.
- (Kapusta 2010) Kapusta, P. 2010, "Absolute diffusion coefficients: compilation of reference data for FCS calibration" en http://www.picoquant.com/technotes/appnote_diffusion_coefficients.pdf, *Picoquant Application Notes*.
- (Kask 1985) Kask, P., Piksarv, P. y Mets, Ü. 1985, "Fluorescence Correlation Spectroscopy in the nanosecond time range: photon antibunching in dye fluorescence", *European Biophysics Journal*, vol. 12, no. 3, pp. 163-166.

- (Khurana 2005) Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A., Krishna, V., Grover, R.K., Roy, R. y Singh, S. 2005, "Mechanism of Thioflavin T binding to amyloid fibrils", *Journal of structural biology*, vol. 151, no. 3, pp. 229-238.
- (Kim 2009) Kim, T., Jin Kang, H., Han, G., Chung, S.J. y Kim, Y. 2009, "A highly selective fluorescent ES IPT probe for the dual specificity phosphatase MKP-6", *Chemical Communications*, , no. 39, pp. 5895-5897.
- (Koenig 2006) Koenig, M. 2006, "Multi parameter-fluorescence-spectroscopic investigations of molecular dynamics on single biomolecules", Heinrich-Heine Universität.
- (Kotz 1982) Kotz, S., Johnson, N.L. y Read, C.B. 1982, "Encyclopedia of Statistical Sciences", *John Wiley & Sons, Inc*, New York.
- (Krebs 2005) Krebs, M.R.H., Bromley, E.H.C. y Donald, A.M. 2005, "The binding of Thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications", *Journal of structural biology*, vol. 149, no. 1, pp. 30-37.
- (Krichevsky 2002) Krichevsky, O. y Bonnet, G. 2002, "Fluorescence Correlation Spectroscopy: the technique and its applications", *Reports on Progress in Physics*, vol. 65, pp. 251-297.
- (Krishnamoorthy 2001a) Krishnamoorthy, G. y Dogra, S.K. 2001a, "Prototropic reactions of 2-(2'-hydroxyphenyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine in aqueous and organic solvents", *Journal of Luminescence*, vol. 92, no. 1-2, pp. 103-114.
- (Krishnamoorthy 2001b) Krishnamoorthy, G. y Dogra, S.K. 2001b, "Excited state intramolecular proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridine: effect of solvents", *Journal of Luminescence*, vol. 92, no. 1-2, pp. 91-102.
- (Kunjappu 1993) Kunjappu, J.T. 1993, "Photophysical properties of five laser dyes (C120, C1, C102, C1F and C153) in homogeneous, surfactant and membrane media", *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, vol. 71, no. 3, pp. 269-273.

Referencias bibliográficas

- (Kuo 1996) Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J. y Roher, A.E. 1996, "Water-soluble ABeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 8, pp. 4077-4081.
- (LaFerla 2007) LaFerla, F.M., Green, K.N. y Oddo, S. 2007, "Intracellular amyloid-[beta] in Alzheimer's disease", *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 8, no. 7, pp. 499-509.
- (Lage Fernández 2008) Lage Fernández, N. 2008, "Estudio de la agregación de tensioactivos mediante Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Lakowicz 2006) Lakowicz, J.R. 2006, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", *Springer*, USA.
- (Lee 2014) Lee, M.H., Kim, J.S. y Sessler, J.L. 2014, "Small molecule-based ratiometric fluorescence probes for cations, anions, and biomolecules", *Chem. Soc. Rev.*, vol. In press.
- (Levine III 1993) Levine III, H. 1993, "Thioflavin T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution", *Protein Science*, vol. 2, no. 3, pp. 404-410.
- (Lockhart 2005) Lockhart, A., Ye, L., Judd, D.B., Merritt, A.T., Lowe, P.N., Morgenstern, J.L., Hong, G., Gee, A.D. y Brown, J. 2005, "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", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 9, pp. 7677-7684.
- (López Arbeloa 1991) López Arbeloa, F., López Arbeloa, T., Tapia Estévez, M.J. y López Arbeloa, I. 1991, "Photophysics of rhodamines. molecular structure and solvent effects", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 95, pp. 2203-2208.
- (López Arbeloa 1992) López Arbeloa, T., López Arbeloa, F., Hernández Bartolome, P. y López Arbeloa, I. 1992, "On the mechanism of radiationless deactivation of rhodamines", *Chemical Physics*, vol. 160, no. 1, pp. 123-130.

- (López Arbeloa 1993) López Arbeloa, T., López Arbeloa, F., Tapia, M.J. y López Arbeloa, I. 1993, "Hydrogen-bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, no. 18, pp. 4704-4707.
- (López Hortas 2006) López Hortas, M.I. 2006, "Análisis global de series de espectros de fluorescencia. Determinación de intervalos de confianza de parámetros fisicoquímicos mediante simulaciones de Monte Carlo", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Manzano-León 2006) Manzano-León, N. y Mas-Oliva, J. 2006, "Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer", *Gaceta médica de México*, vol. 142, no. 3, pp. 229-238.
- (Martínez Lage 1996) Martínez Lage, J.M. 1996, "Enfermedad de Alzheimer: proteínas y genes", *Real Academia Medicina Zaragoza*, Zaragoza.
- (Maskevich 2007) Maskevich, A.A., Stsiapura, V.I., Kuzmitsky, V.A., Kuznetsova, I.M., Povarova, O.I., Uversky, V.N. y Turoverov, K.K. 2007, "Spectral properties of Thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form", *Journal of Proteome Research*, vol. 6, no. 4, pp. 1392-1401.
- (Melanie R 2004) Melanie R, N. 2004, "Techniques to study amyloid fibril formation in vitro", *Methods*, vol. 34, no. 1, pp. 151-160.
- (Mets 2001) Mets, Ü. 2001, "Antibunching and rotational diffusion in FCS" *Fluorescence Correlation Spectroscopy: theory and applications*, eds. R. Rigler & E.S. Elson, Springer Verlag, Berlin, pp. 346-359.
- (Morita 2010) Morita, M., Vestergaard, M., Hamada, T. y Takagi, M. 2010, "Real-time observation of model membrane dynamics induced by Alzheimer's amyloid-beta", *Biophysical chemistry*, vol. 147, no. 1-2, pp. 81-86.
- (Moriyama 2008) Moriyama, Y., Watanabe, E., Kobayashi, K., Harano, H., Inui, E. y Takeda, K. 2008, "Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 C and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 51, pp. 16585-16589.

Referencias bibliográficas

- (Mosquera 1996) Mosquera, M., Penedo, J.C., Ríos Rodríguez, M.C. y Rodríguez-Prieto, F. 1996, "Photoinduced inter- and intramolecular proton transfer in aqueous and ethanolic solutions of 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzimidazole: evidence for tautomeric and conformational equilibria in the ground state", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, no. 13, pp. 5398-5407.
- (Nag 1990a) Nag, A. y Bhattacharyya, K. 1990a, "Role of twisted intramolecular charge transfer in the fluorescence sensitivity of biological probes: diethylaminocoumarin laser dyes", *Chemical Physics Letters*, vol. 169, no. 1-2, pp. 12-16.
- (Nag 1990b) Nag, A., Chakrabarty, T. y Bhattacharyya, K. 1990b, "Effect of γ -cyclodextrin on the intramolecular charge transfer processes in aminocoumarin laser dyes", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 94, no. 10, pp. 4203-4206.
- (Nesterov 2005) Nesterov, E.E., Skoch, J., Hyman, B.T., Klunk, W.E., Bacskai, B.J. y Swager, T.M. 2005, "In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers", *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 44, no. 34, pp. 5452-5456.
- (Nichols 2005) Nichols, M.R., Moss, M.A., Reed, D.K., Cratic-McDaniel, S., Hoh, J.H. y Rosenberry, T.L. 2005, "Amyloid-beta protofibrils differ from amyloid-beta aggregates induced in dilute hexafluoroisopropanol in stability and morphology", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 4, pp. 2471-2480.
- (Novo 2007) Novo, M., Felekyan, S., Seidel, C.A.M. y Al-Soufi, W. 2007, "Dye-exchange dynamics in micellar solutions studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 14, pp. 3614-3624.
- (Ormson 1994) Ormson, S.M. y Brown, R.G. 1994, "Excited state intramolecular proton transfer part 1: ESIPT to nitrogen", *Progress in Reaction Kinetics*, vol. 19, no. 1, pp. 45-91.

- (Pal 1996) Pal, P., Zeng, H., Durocher, G., Girard, D., Giasson, R., Blanchard, L., Gaboury, L. y Villeneuve, L. 1996, "Spectroscopic and photophysical properties of some new rhodamine derivatives in cationic, anionic and neutral micelles", *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, vol. 98, no. 1-2, pp. 65-72.
- (Pawley 1995) Pawley, J.B. 1995, "Handbook of biological confocal microscopy", *Plenum Press*, New York.
- (Pedersen 2013) Pedersen, J.T. y Heegaard, N.H. 2013, "Analysis of protein aggregation in neurodegenerative disease", *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 9, pp. 4215-4227.
- (Piñeiro Maseda 2007) Piñeiro Maseda, L. 2007, "Caracterización de tensioactivos básicos en la industria de detergentes mediante fluorescencia", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Piñeiro 2013) Piñeiro, L., Freire, S., Bordello, J., Novo, M. y Al-Soufi, W. 2013, "Dye exchange in micellar solutions. Quantitative analysis of bulk and single molecule fluorescence titrations", *Soft Matter*, vol. 9, no. 45, pp. 10779-10790.
- (Piñeiro 2015) Piñeiro, L., Novo, M. y Al-Soufi, W. 2015, "Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 215, no. 0, pp. 1-12.
- (Ram 2002) Ram, M.S., Dowell, F.E. y Seitz, L. 2002, "Invisible coatings for wheat kernels", *Cereal Chemistry*, vol. 79, no. 6, pp. 857-860.
- (Rang 2004) Rang, H., Dale, M., Ritter, J. y Moore, P. 2004, *Farmacología. 5ª ed.*, Editorial Elsevier, Madrid.
- (Reija 2003) Reija, B. 2003, "Análisis avanzado de espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo", *Proyecto Fin de Carrera*, Santiago de Compostela.
- (Reija Otero 2007) Reija Otero, B. 2007, "Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes", *Tesis Doctoral*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Reinke 2010) Reinke, A.A., Abulwerdi, G.A. y Gestwicki, J.E. 2010, "Quantifying prefibrillar amyloids in vitro by using a Thioflavin-like spectroscopic method", *ChemBioChem*, vol. 11, no. 13, pp. 1889-1895.

Referencias bibliográficas

- (Ries 2012) Ries, J. y Schwille, P. 2012, "Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Bioessays*, vol. 34, no. 5, pp. 361-368.
- (Rigler 1993) Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. y Kask, P. 1993, "Fluorescence Correlation Spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion", *European Biophysics Journal*, vol. 22, no. 3, pp. 169-175.
- (Rigler 2001) Rigler, R. y Elson, E.S. 2001, "Fluorescence Correlation Spectroscopy: theory and applications", *Springer Verlag*, Berlin.
- (Ríos Vázquez 2007) Rios Vazquez, S., Rios Rodriguez, M.C., Mosquera, M. y Rodriguez-Prieto, F. 2007, "Excited-State intramolecular proton transfer in 2-(3'-Hydroxy-2'-pyridyl)benzoxazole. Evidence of coupled proton and charge transfer in the excited state of some o-hydroxyarylbenzazoles", *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, no. 10, pp. 1814-1826.
- (Rolinski 2010) Rolinski, O.J., Amaro, M. y Birch, D.J. 2010, "Early detection of amyloid aggregation using intrinsic fluorescence", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, no. 10, pp. 2249-2252.
- (Sabaté 2007) Sabaté, R. y Saupe, S.J. 2007, "Thioflavin T fluorescence anisotropy: an alternative technique for the study of amyloid aggregation", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 360, no. 1, pp. 135-138.
- (Sahoo 2002) Sahoo, L., Sarangi, J. y Misra, P.K. 2002, "Organization of amphiphiles, Part 1: evidence in favor of pre-micellar aggregates though fluorescence spectroscopy", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 75, pp. 859-865.
- (Sakono 2010) Sakono, M. y Zako, T. 2010, "Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers", *FEBS journal*, vol. 277, no. 6, pp. 1348-1358.
- (Scales-Medeiros 2000) Scales-Medeiros, V.A. y Vaidya, N.A. 2000, "Light responsive self-tanning products and methods for use", Patent no. 5626839, US.
- (Selkoe 2001) Selkoe, D.J. 2001, "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy", *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 2, pp. 741-766.

- (Selkoe 2003) Selkoe, D.J. 2003, "Folding proteins in fatal ways", *Nature*, vol. 426, no. 6968, pp. 900-904.
- (Sen 2009) Sen, P., Fatima, S., Ahmad, B. y Khan, R.H. 2009, "Interactions of Thioflavin T with serum albumins: spectroscopic analyses", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 74, no. 1, pp. 94-99.
- (Shobini 2001) Shobini, J., Mishra, A.K., Sandhya, K. y Chandra, N. 2001, "Interaction of coumarin derivatives with human serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopic technique and modeling studies", *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 57A, no. 5, pp. 1133-1147.
- (Srivastava 2010) Srivastava, A., Singh, P.K., Kumbhakar, M., Mukherjee, T., Chattopadhyay, S., Pal, H. y Nath, S. 2010, "Identifying the bond responsible for the fluorescence modulation in an amyloid fibril sensor", *Chemistry-A European Journal*, vol. 16, no. 30, pp. 9257-9263.
- (Steed 2009) Steed, J.W. y Atwood, J.L. 2009, "Supramolecular chemistry", *John Wiley & Sons*, UK.
- (Stefani 2003) Stefani, M. y Dobson, C.M. 2003, "Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution", *Journal of molecular medicine*, vol. 81, no. 11, pp. 678-699.
- (Stine 2003) Stine, W.B.Jr, Dahlgren, K.N., Krafft, G.A. y LaDu, M.J. 2003, "In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 13, pp. 11612-11622.
- (Stine 2011) Stine, W.B., Jungbauer, L., Yu, C. y LaDu, M.J. 2011, "Preparing synthetic A β in different aggregation states", *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia*, vol. 670, pp. 13-32.
- (Stsiapura 2007) Stsiapura, V.I., Maskevich, A.A., Kuzmitsky, V.A., Turoverov, K.K. y Kuznetsova, I.M. 2007, "Computational study of Thioflavin T torsional relaxation in the excited state", *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, no. 22, pp. 4829-4835.
- (Stsiapura 2008) Stsiapura, V.I., Maskevich, A.A., Kuzmitsky, V.A., Uversky, V.N., Kuznetsova, I.M. y Turoverov, K.K. 2008, "Thioflavin T as a

Referencias bibliográficas

- molecular rotor: fluorescent properties of Thioflavin T in solvents with different viscosity", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 49, pp. 15893-15902.
- (Stsiapura 2010) Stsiapura, V.I., Maskevich, A.A., Tikhomirov, S.A. y Buganov, O.V. 2010, "Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of Thioflavin T in low-viscosity solvents", *The Journal of Physical Chemistry A*, pp. 900-904.
- (Szejtli 1988) Szejtli, J. 1988, "Cyclodextrin Technology", *Kluwer Academic*, Dordrecht.
- (Szejtli 1996) Szejtli, J., Osa, T. y Atwood, J.L. 1996, "Comprehensive supramolecular chemistry", *Pergamon*, Oxford.
- (Teijeiro Veiga 2005) Teijeiro Veiga, A. 2005, "Caracterización de la Cumarina 460 como sonda fluorescente de sistemas organizados", *Proyecto Fin de Carrera*, Universidade de Santiago de Compostela.
- (Thompson 1991) Thompson, N.L. 1991, "Fluorescence Correlation Spectroscopy" *Topics in Fluorescence Spectroscopy. Techniques*, ed. J.R. Lakowicz, Plenum Press, New York, pp. 337-378.
- (Tjernberg 1999) Tjernberg, L.O., Pramanik, A., Bjorling, S., Thyberg, P., Thyberg, J., Nordstedt, C., Berndt, K.D., Terenius, L. y Rigler, R. 1999, "Amyloid [beta]-peptide polymerization studied using Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Chemistry & biology*, vol. 6, no. 1, pp. 53-62.
- (Vajda 1995) Vajda, S., Jiménez, R., Rosenthal, S.J., Fidler, V., Fleming, G.R. y Castner Jr, E.W. 1995, "Femtosecond to nanosecond solvation dynamics in pure water and inside the gamma-cyclodextrin cavity", *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, vol. 91, no. 5, pp. 867-873.
- (Valdés-Aguilera 1989) Valdés-Aguilera, Ó. y Neckers, D.C. 1989, "Aggregation phenomena in xanthene dyes", *Accounts of Chemical Research*, vol. 22, no. 5, pp. 171-177.
- (Valeur 2002) Valeur, B. 2002, "Molecular Fluorescence: Principles and applications", *Wiley-VCH*, Germany.

- (Vassar 1959) Vassar, P.S. y Culling, C. 1959, "Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues", *Archives of Pathology*, vol. 68, pp. 487.
- (Vestergaard 2008) Vestergaard, M., Hamada, T., Saito, M., Yajima, Y., Kudou, M., Tamiya, E. y Takagi, M. 2008, "Detection of Alzheimer's amyloid-beta aggregation by capturing molecular trails of individual assemblies", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 377, no. 2, pp. 725-728.
- (Voropai 2003) Voropai, E., Samtsov, M., Kaplevskii, K., Maskevich, A., Stepuro, V., Povarova, O., Kuznetsova, I., Turoverov, K., Fink, A. y Uverskii, V. 2003, "Spectral properties of Thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils", *Journal of Applied Spectroscopy*, vol. 70, no. 6, pp. 868-874.
- (Walsh 2002) Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J. y Selkoe, D.J. 2002, "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition", *Biochemical Society transactions*, vol. 30, no. 4, pp. 552-557.
- (Walsh 2007) Walsh, D.M. y Selkoe, D.J. 2007, "A β Oligomers - a decade of discovery", *Journal of neurochemistry*, vol. 101, no. 5, pp. 1172-1184.
- (Weller 1960) Weller, A. 1960, "Investigation of rapid reactions of excited molecules by fluorescence measurements", *Zeitschrift fuer Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie*, vol. 64, pp. 55-59.
- (Widengren 1998) Widengren, J. y Rigler, R. 1998, "Fluorescence Correlation Spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces", *Cellular and molecular biology*, vol. 44, no. 5, pp. 857-879.
- (Widengren 2001) Widengren, J. 2001, "Photophysical aspects of FCS measurements" *Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications*, eds. R. Rigler & E.S. Elson, Springer Verlag, Berlin, pp. 276-301.
- (Wolfe 2010) Wolfe, L.S., Calabrese, M.F., Nath, A., Blaho, D.V., Miranker, A.D. y Xiong, Y. 2010, "Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye Thioflavin T", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 39, pp. 16863.

Referencias bibliográficas

- (Wu 2008) Wu, C., Wang, Z., Lei, H., Duan, Y., Bowers, M.T. y Shea, J. 2008, "The binding of Thioflavin T and its neutral analogue BTA-1 to protofibrils of the Alzheimer's disease A β 16-22 peptide probed by molecular dynamics simulations", *Journal of Molecular Biology*, vol. 384, no. 3, pp. 718-729.
- (Yip 1993) Yip, R.W., Wen, Y.X. y Szabo, A.G. 1993, "Decay associated fluorescence spectra of coumarin 1 and coumarin 102: evidence for a two-state solvation kinetics in organic solvents", *Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, no. 40, pp. 10458-10462.
- (Yushchenko 2010) Yushchenko, D.A., Fauerbach, J.A., Thirunavukkuarasu, S., Jares-Erijman, E. y Jovin, T.M. 2010, "Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of alpha-synuclein aggregation", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, no. 23, pp. 7860-1.
- (Zana 1997) Zana, R., Lévy, H., Danino, D., Talmon, Y. y Kwetkat, K. 1997, "Mixed micellization of cetyltrimethylammonium bromide and an anionic dimeric (gemini) surfactant in aqueous solution", *Langmuir*, vol. 13, no. 3, pp. 402-408.



APÉNDICE

Obtención de modelos

Contenidos

Equilibrio de complejación 1:1	313
Modelo de complejación 1:1 sin aproximaciones	316
Modelo de complejación 1:1 con aproximaciones	317
Modelo de complejación 1:1 mediante relación de intensidades	319
Modelo de complejación 1:1 para anisotropía	322
Quenching dinámico	324



Equilibrio de complejación 1:1

Los modelos de ajuste para un equilibrio de complejación 1:1 se obtienen considerando que la absorbancia y la intensidad de fluorescencia observada son combinaciones lineales de las concentraciones en disolución de las especies que absorben o emiten, respectivamente.

Tenemos una molécula de una especie fluorescente A en el estado fundamental, S_0 , cuyo estado singlete excitado, S_1 , se representa por A^* . Considerando estado estacionario, podemos establecer una relación entre la constante de velocidad de desactivación k_A , la intensidad de radiación absorbida I_A , y la concentración de la molécula en el estado excitado $[A^*]_{ss}$ (ecuación (A.1)).



$$\frac{d[A^*]}{dt} = I_A - k_A[A^*] = 0 \Rightarrow [A^*]_{ss} = \frac{I_A}{k_A} \quad (\text{A.1})$$

La intensidad de radiación absorbida puede calcularse a partir de la ley de Lambert-Beer, siendo B la fracción de luz absorbida por la muestra, I_0 la intensidad de luz incidente y Abs_A la absorbancia de la sustancia A en la muestra (ecuación (A.2)).

$$I_A = I_0 B = I_0 (1 - 10^{-Abs_A}) \quad (\text{A.2})$$

El exponencial que aparece en la ecuación anterior puede desarrollarse mediante la serie de Taylor (Demas 1971), obteniendo la ecuación (A.3).

$$B = 1 - \left[1 - 2.303 Abs_A + \frac{(2.303 Abs_A)^2}{2} + \dots \right] \approx 2.303 Abs_A \quad (\text{A.3})$$

Para poder realizar esta aproximación se tendrá en cuenta que la absorbancia debe tener un valor lo suficientemente pequeño, inferior a 0.1, de forma que los demás términos se puedan despreciar.

Considerando la intensidad de fluorescencia del fluoróforo A a una determinada longitud de onda (F_A^λ) proporcional a la concentración de la misma molécula en el estado excitado, se determina la ecuación (A.4).

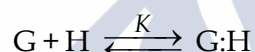
$$F_A^\lambda = k_{rA} \sigma_A^\lambda [A^*]_{ss} \quad (\text{A.4})$$

Donde k_{rA} es la constante de velocidad de desactivación radiante y σ_A^λ una constante que depende de las condiciones experimentales en que se realiza la medida y de la longitud de onda de detección, λ .

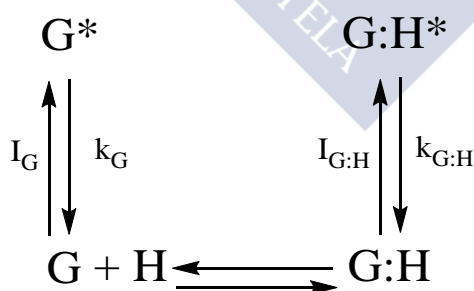
Juntando las expresiones anteriores obtenemos la siguiente ecuación, según la cual la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda determinada será proporcional a la concentración del estado fundamental del fluoróforo en disolución (ecuación (A.5)).

$$F_A^\lambda = k_{rA} \sigma_A^\lambda \frac{2.303 I_0 \epsilon_A l [A]}{k_A} \quad (\text{A.5})$$

Para este trabajo, el modelo de equilibrio que se plantea es una *asociación 1:1*, es decir, la asociación de una única molécula de sustrato (*Guest*, G) con el receptor (*Host*, H), por lo que se tiene una *estequiometría 1:1*, existiendo un equilibrio de reparto entre las especies. El sustrato empleado para los distintos estudios es un fluoróforo, mientras que los receptores usados en este trabajo varían desde las ciclodextrinas a las micelas y finalmente a las proteínas (β -amiloide o BSA). Como resultado de estas interacciones, se forma un complejo G:H, generalmente también fluorescente, junto con el sustrato G. A continuación se indica como sería el equilibrio de reparto, con una constante de equilibrio K.



Siguiendo la ecuación (A.1) y el esquema que la acompaña, se amplía el modelo para esta nueva situación, en la que las especies fluorescentes son el colorante libre (sustrato, G) y el complejo entre el colorante y la ciclodextrina, micela o proteína (G:H). Estas especies absorben radiación I_G e $I_{G:H}$, respectivamente, pasando al estado excitado, para desactivarse a continuación al estado fundamental con constantes k_G y $k_{G:H}$.



Para el colorante libre en el estado excitado, G^* , su concentración viene dada por la ecuación (A.6) (ver ecuación (A.1)).

$$[G^*]_{ss} = \frac{I_G}{k_G} \quad (\text{A.6})$$

Y a partir de las ecuaciones (A.2) y (A.3) se pueden establecer las ecuaciones (A.7) y (A.8) (aproximación válida si la absorbancia es inferior a 0.1).

$$I_G = I_0 B \quad (\text{A.7})$$

$$B \approx 2.303 Abs_G \quad (\text{A.8})$$

En el caso del colorante asociado al receptor, en el estado excitado ($G:H^*$) su concentración viene dada por la ecuación (A.9). Su intensidad de radiación absorbida viene descrita en la ecuación (A.10), detallándose B en la ecuación (A.11).

$$[G:H^*]_{ss} = \frac{I_{G:H}}{k_{G:H}} \quad (\text{A.9})$$

$$I_{G:H} = I_0 B \quad (\text{A.10})$$

$$B \approx 2.303 Abs_{G:H} \quad (\text{A.10})$$

En función de la ecuación (A.4) se relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración de la molécula en el estado excitado. Para este sistema, esta relación viene dada por la ecuación (A.12).

$$F^\lambda = k_{rG} \sigma_G^\lambda [G^*]_{ss} + k_{rG:H} \sigma_{G:H}^\lambda [G:H^*]_{ss} \quad (\text{A.11})$$

Sustituyendo en la ecuación (A.12) las ecuaciones (A.6) y (A.9), inicialmente, y a continuación las ecuaciones (A.7) y (A.10), para finalmente sustituir las ecuaciones (A.8) y (A.11), se obtiene la (A.13).

$$F^\lambda = k_{rG} \sigma_G^\lambda \frac{I_0 2.303 Abs_G}{k_G} + k_{rG:H} \sigma_{G:H}^\lambda \frac{I_0 2.303 Abs_{G:H}}{k_{G:H}} \quad (\text{A.12})$$

La ley de Lambert-Beer relaciona la absorbancia con la concentración del fluoróforo, de forma que se puede establecer la ecuación (A.14) para cada especie fluorescente.

$$\begin{aligned} Abs_G &= \varepsilon_G l [G] \\ Abs_{G:H} &= \varepsilon_{G:H} l [G:H] \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

Siendo ε el coeficiente de absortividad molar del colorante libre o asociado, a la longitud de onda correspondiente, y l es el espesor de la cubeta.

La ecuación (A.13), tras sustituir en la misma la ecuación (A.14), queda representada como la ecuación (A.15).

$$F^\lambda = k_{rG} \sigma_G^\lambda \frac{I_0 2.303 \varepsilon_G l [G]}{k_G} + k_{rG:H} \sigma_{G:H}^\lambda \frac{I_0 2.303 \varepsilon_{G:H} l [G:H]}{k_{G:H}} \quad (\text{A.14})$$

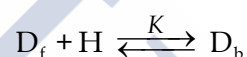
Por tanto, si se definen los nuevos parámetros F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$, se puede indicar la fluorescencia total de la muestra como $F^\lambda = F_G^\lambda [G] + F_{G:H}^\lambda [G:H]$, detallándose F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$ en las ecuaciones (A.16) y (A.17). De esta forma, la fluorescencia de la muestra es proporcional a la concentración de las sustancias fluorescentes presentes en la disolución.

$$F_G^\lambda = k_{rG} \sigma_G^\lambda \frac{I_0 2.303 \varepsilon_G l}{k_G} \quad (\text{A.15})$$

$$F_{G:H}^\lambda = k_{rG:H} \sigma_{G:H}^\lambda \frac{I_0 2.303 \varepsilon_{G:H} l}{k_{G:H}} \quad (\text{A.16})$$

A partir de este modelo que describe el equilibrio de complejación 1:1, se van a desarrollar varias situaciones que pueden presentarse, indicando las ecuaciones que corresponden a cada caso concreto.

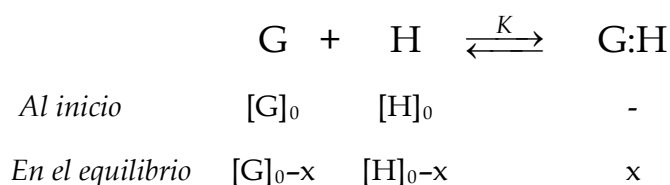
Los artículos incluidos en este trabajo pueden presentar una nomenclatura distinta a la indicada en este apéndice, ya que en este apartado se analizan los sistemas de forma general, sin especificar cada caso concreto. De forma más detallada, cuando la interacción del colorante se produce con las micelas o con las proteínas, se suele indicar el equilibrio de complejación de esta forma:



En este caso, D_f (G) es la molécula de colorante libre (D se corresponde con *Dye* y f con *free*), H es el receptor (micela o proteína, *Host*) y D_b (G:H) es la molécula de colorante complejada con el receptor (b corresponde a *bound*). Esta nomenclatura se utiliza con estos receptores concretos (micelas o proteínas) debido a que, generalmente, la unión del colorante con los mismos no es exclusivamente 1:1 (lo que indica G:H), sino que más de una molécula de colorante se une al receptor. De todas formas, en los análisis que se realizan se asume la aproximación de que la asociación sí es principalmente 1:1. Esta aproximación es correcta siempre que la asociación de sucesivas moléculas al mismo receptor sea independiente de la estequiometría (o número de ocupación), siempre con la misma constante de asociación K . (Piñeiro 2013)

Modelo de complejación 1:1 sin aproximaciones

Como se ha indicado anteriormente, el equilibrio de asociación 1:1 viene dado por una constante K , definiéndose el sistema de esta forma:



Para este sistema, la constante de equilibrio se define según la ecuación (A.18).

$$K = \frac{[G:H]}{[G][H]} \quad (\text{A.17})$$

Además, se establece un balance de materia según la ecuación (A.19).

$$\begin{aligned} [H]_0 &= [H] + [G:H] \\ [G]_0 &= [G] + [G:H] \end{aligned} \quad (A.18)$$

Sin aplicar ninguna aproximación, las concentraciones de equilibrio que se obtienen quedan según lo indicado en las ecuaciones (A.20) y (A.21), tras combinar las expresiones anteriores.

$$[G:H] = \frac{a - \sqrt{a^2 - 4[H]_0 [G]_0}}{2} \quad (A.19)$$

$$[G] = [G]_0 - [G:H] = [G]_0 - \frac{a - \sqrt{a^2 - 4[H]_0 [G]_0}}{2} \quad (A.20)$$

Siendo $a = 1/K + [H]_0 + [G]_0$.

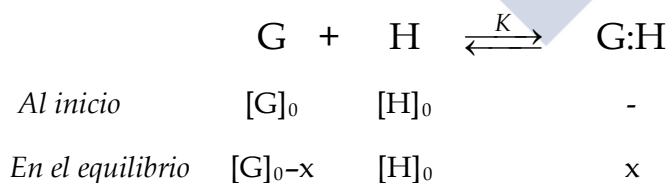
A partir de la ecuación (A.15) se conoce que la fluorescencia total (F^λ) a una longitud de onda es proporcional a la concentración de cada especie que emite, pudiendo establecerse la ecuación (A.22) de forma abreviada, definiéndose F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$ según las ecuaciones (A.16) y (A.17).

$$F^\lambda = F_G^\lambda [G] + F_{G:H}^\lambda [G:H] \quad (A.21)$$

Por tanto, para el análisis con OriginPro o PCGA se establece la ecuación anterior, en la que se sustituyen las concentraciones correspondientes de las especies fluorescentes (ecuaciones (A.20) y (A.21)), obteniendo la constante K y los parámetros F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$, valores límite de la intensidad de fluorescencia de cada especie que emite.

Modelo de complejación 1:1 con aproximaciones

Para este modelo, se considera que hay un *exceso de receptor* en la muestra. Por tanto, esta concentración se mantiene prácticamente constante en el sistema y viene dada por la concentración inicial de la molécula. Se define el equilibrio de esta forma:



La constante de equilibrio del sistema anterior viene dada por la ecuación (A.23).

$$K = \frac{[G:H]}{[G] \cdot [H]} \quad (A.22)$$

Donde [G:H] es la concentración del complejo formado entre el sustrato y el receptor, [G] la concentración de colorante y [H] la del receptor, en el estado fundamental. En este caso se aplica la aproximación citada, por lo que $[H] \approx [H]_0$.

Los balances de materia se expresan a través de las ecuaciones (A.24) y (A.25).

$$[H]_0 = [G:H] + [H] \approx [H] \quad (A.23)$$

$$[G]_0 = [G] + [G:H] \quad (A.24)$$

De las ecuaciones (A.24) y (A.25) se obtiene la ecuación (A.26).

$$[G] = \frac{[G:H]}{K[H]} = [G]_0 - [G:H] = [G]_0 - K[H][G] \quad (A.25)$$

Por tanto, la concentración de G_0 quedaría según las ecuaciones (A.27) y (A.28).

$$[G]_0 = [G] + K[G][H] \quad (A.26)$$

$$[G]_0 = [G](1 + K[H]) = [G](1 + K[H]_0) \quad (A.27)$$

Así, obtenemos a partir de la deducción anterior la concentración de G (ecuación (A.29)).

$$[G] = \frac{[G]_0}{1 + K[H]_0} \quad (A.28)$$

La concentración del complejo G:H se indica en la ecuación (A.30).

$$[G:H] = K[G][H] = K[G][H]_0 = K \frac{[G]_0}{1 + K[H]_0} [H]_0 \quad (A.29)$$

Si se sustituyen las ecuaciones de las concentraciones de las especies fluorescentes (ecuaciones (A.29) y (A.30)) en la ecuación desarrollada para la fluorescencia de estas dos especies (ecuación (A.15)), se obtiene la ecuación (A.31).

$$F^\lambda = \frac{F_G^\lambda + F_{G:H}^\lambda K[H]_0}{1 + K[H]_0} \quad (A.30)$$

Indicándose F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$ en las ecuaciones (A.32) y (A.33) Se mantiene esta nomenclatura pero se debe observar que estos dos parámetros incluyen también la concentración inicial del colorante, $[G]_0$, a diferencia de los definidos en las ecuaciones (A.16) y (A.17).

$$F_G^\lambda = k_{rG} \sigma_G^\lambda \frac{I_0 2.303 \varepsilon_G l [G]_0}{k_G} \quad (A.31)$$

$$F_{G:H}^\lambda = k_{rG:H} \sigma_{G:H}^\lambda \frac{I_0 2.303 \varepsilon_{G:H} l [G]_0}{k_{G:H}} \quad (A.32)$$

La ecuación A.31 es la empleada en el ajuste con OriginPro y con Análisis Global de los espectros completos, representando la intensidad de fluorescencia a una determinada longitud de onda de los distintos espectros frente a la concentración de ciclodextrina, micelas o proteína (realizando una titración con variación de este parámetro). El ajuste es una curva de la que se obtiene K , F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$, estos dos últimos como valores límite de la intensidad de fluorescencia de la especie libre y de la especie complejada, respectivamente.

En el caso de las series de absorción, también esta propiedad se puede expresar en función de una combinación lineal de las concentraciones de los fluoróforos de la mezcla (ecuación (A.34)).

$$Abs^\lambda = \varepsilon_G^\lambda l [G] + \varepsilon_{G:H}^\lambda l [G:H] \quad (A.33)$$

Sustituyendo las ecuaciones (A.29) y (A.30) en la ecuación (A.34), obtenemos la ecuación (A.35).

$$Abs^\lambda = \frac{A_G^\lambda + A_{G:H}^\lambda K [H]_0}{1 + K [H]_0} \quad (A.34)$$

Definiéndose A_G^λ y $A_{G:H}^\lambda$ en las ecuaciones (A.36) y (A.37).

$$A_G^\lambda = \varepsilon_G^\lambda l [G]_0 \quad (A.35)$$

$$A_{G:H}^\lambda = \varepsilon_{G:H}^\lambda l [G]_0 \quad (A.36)$$

El cálculo de los parámetros se realiza de la misma forma pero representando la absorbancia a una determinada longitud de onda frente a la concentración de ciclodextrina, micelas o proteína. Como resultado del ajuste se obtienen los parámetros K , A_G^λ y $A_{G:H}^\lambda$, estos últimos como valores límites de absorbancia alcanzados por la especie libre y la especie complejada.

En el caso de las micelas, es necesario conocer su concentración $[M]$, que se define mediante la ecuación (A.38), donde $[S]_0$ es la concentración del tensioactivo total, cmc es la concentración micelar crítica, coincidente con la concentración de surfactante libre una vez se forman micelas y N_{ag} es el número de agregación.

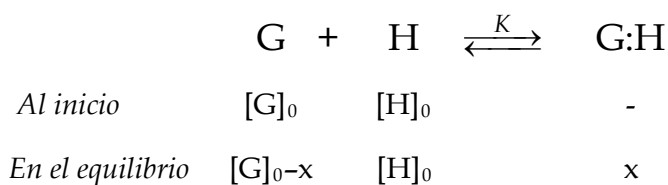
$$[M] = \frac{[S]_0 - cmc}{N_{ag}} \quad (A.37)$$

En el caso que se necesite la concentración micelar cerca de la cmc se debe aplicar el modelo APN (Piñeiro 2013, Al-Soufi 2012).

Modelo de complejación 1:1 mediante relación de intensidades

En este caso, la ecuación final se obtiene a través de la relación entre la ecuación de complejación 1:1 aplicada a dos rangos de longitud de onda del mismo espectro. Se emplea para las medidas de emisión de fluorescencia del colorante *HPIP* en presencia de proteína, debido a que este fluoróforo tiene dos bandas espectrales que cambian al interaccionar con amiloide o BSA. Se van a aplicar las mismas aproximaciones que en el apartado anterior, considerando que hay un *exceso de receptor en la muestra*.

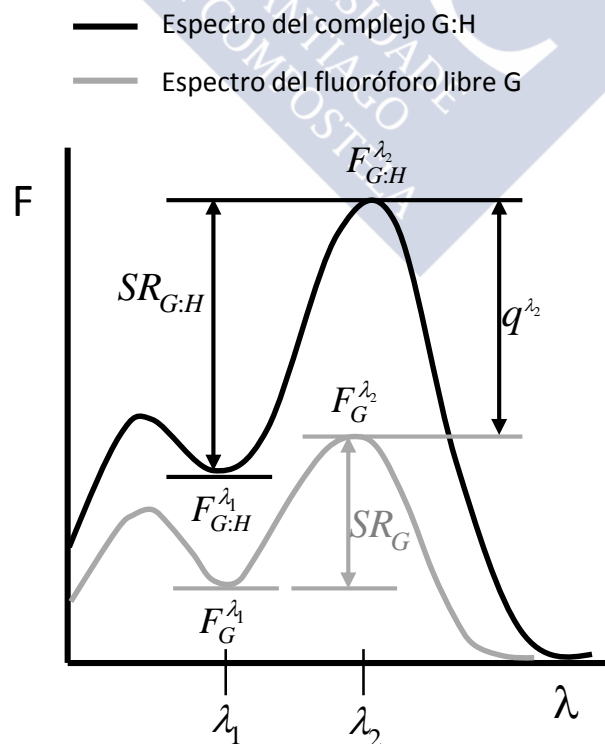
El equilibrio de asociación 1:1 viene dado por la constante K , definiéndose el sistema de esta forma (al igual que en el caso anteriormente descrito):



Tras definir la constante de equilibrio y los balances de materia, las concentraciones de las especies fluorescentes en el equilibrio vienen dadas por las ecuaciones (A.29) y (A.30).

Siguiendo el Esquema A.1, se definen los parámetros que se emplean en la ecuación de *relación de intensidades*. Esta ecuación se va a definir a partir de la relación entre la intensidad de fluorescencia en el mínimo del espectro del colorante libre o complejo (al final de la primera banda), y la fluorescencia el máximo del mismo, a mayores longitudes de onda (en la segunda banda). Además, en vez de relacionar las intensidades medidas a longitudes de onda individuales, se usan los valores medios de las intensidades en rangos espectrales, para reducir las posibles fluctuaciones aleatorias que pueda haber en el espectro experimental. Se define por norma general la relación $F(420-425 \text{ nm})/F(490-495 \text{ nm})$. Este *método ratiométrico* es menos sensible a alteraciones inespecíficas que afectan a ambas bandas de la misma forma, por lo que se recomienda en mayor medida que el uso del análisis anteriormente descrito.

Esquema A.1. Parámetros empleados para la determinación de la ecuación de relación de intensidades para el fluoróforo HPIP en presencia de proteínas. Modelo de complejación 1:1 aproximado.



La intensidad de fluorescencia total a λ_1 (F^{λ_1}) que, como ya se ha indicado, se determina como promedio de un rango espectral, es proporcional a las concentraciones en el equilibrio de ambas especies fluorescentes, siendo los factores de proporcionalidad $F_G^{\lambda_1}$ y $F_{G:H}^{\lambda_1}$. De la misma forma, se define la fluorescencia total correspondiente al máximo de la segunda banda, F^{λ_2} , como la suma de las concentraciones del fluoróforo libre y complejoado multiplicadas por los respectivos factores de proporcionalidad $F_G^{\lambda_2}$ y $F_{G:H}^{\lambda_2}$. Estos factores se definen según las ecuaciones (A.16) y (A.17). La relación entre F^{λ_1} y F^{λ_2} se va a denominar *SR* (*Spectral Ratio*), indicándose en la ecuación (A.39).

$$SR = \frac{F^{\lambda_1}}{F^{\lambda_2}} = \frac{F_G^{\lambda_1} [G] + F_{G:H}^{\lambda_1} [G:H]}{F_G^{\lambda_2} [G] + F_{G:H}^{\lambda_2} [G:H]} \quad (A.38)$$

Se sustituyen en la ecuación anterior las concentraciones de las especies fluorescentes (ecuaciones (A.29) y (A.30)) y se vuelve a agrupar el término $[G]_0$ dentro de los parámetros $F_G^{\lambda_1}$, $F_{G:H}^{\lambda_1}$, $F_G^{\lambda_2}$ y $F_{G:H}^{\lambda_2}$ (definidos ahora según las ecuaciones (A.32) y (A.33), sin cambiar la nomenclatura), añadiendo otro parámetro constante a estos términos (ecuación (A.40)).

$$SR = \frac{F^{\lambda_1}}{F^{\lambda_2}} = \frac{F_G^{\lambda_1} [G]_0 + F_{G:H}^{\lambda_1} [G]_0 K[H]_0}{F_G^{\lambda_2} [G]_0 + F_{G:H}^{\lambda_2} [G]_0 K[H]_0} = \frac{F_G^{\lambda_1} + F_{G:H}^{\lambda_1} K[H]_0}{F_G^{\lambda_2} + F_{G:H}^{\lambda_2} K[H]_0} \quad (A.39)$$

A continuación se divide el numerador y el denominador por $F_G^{\lambda_2}$, obteniendo la ecuación (A.41).

$$SR = \frac{F^{\lambda_1}}{F^{\lambda_2}} = \frac{\frac{F_G^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} + \frac{F_{G:H}^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0}{\frac{F_G^{\lambda_2}}{F_G^{\lambda_2}} + \frac{F_{G:H}^{\lambda_2}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0} = \frac{\frac{F_G^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} + \frac{F_{G:H}^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0}{1 + \frac{F_{G:H}^{\lambda_2}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0} \quad (A.40)$$

Y reorganizamos la ecuación multiplicando y dividiendo el segundo término del numerador por $F_{G:H}^{\lambda_2}$ (ecuación (A.42)).

$$SR = \frac{F^{\lambda_1}}{F^{\lambda_2}} = \frac{\frac{F_G^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} + \frac{F_{G:H}^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0 \left(\frac{F_{G:H}^{\lambda_2}}{F_{G:H}^{\lambda_2}} \right)}{1 + \frac{F_{G:H}^{\lambda_2}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0} = \frac{\frac{F_G^{\lambda_1}}{F_G^{\lambda_2}} + \frac{F_{G:H}^{\lambda_1}}{F_{G:H}^{\lambda_2}} \frac{F_{G:H}^{\lambda_2}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0}{1 + \frac{F_{G:H}^{\lambda_2}}{F_G^{\lambda_2}} K[H]_0} \quad (A.41)$$

Definimos los parámetros indicados en el Esquema A.1, de forma que se simplifique la expresión. Si se define SR_G como $F_G^{\lambda_1} / F_G^{\lambda_2}$, $SR_{G:H}$ como $F_{G:H}^{\lambda_1} / F_{G:H}^{\lambda_2}$ y q^{λ_2} como $F_{G:H}^{\lambda_2} / F_G^{\lambda_2}$ se obtiene la ecuación final (A.43). Aquí distinguimos entre la *relación espectral SR* de intensidades a dos longitudes de onda de la misma especie y la *relación de luminosidad q* de la forma libre y complejada de una especie a una longitud de onda.

$$SR = \frac{F^{\lambda_1}}{F^{\lambda_2}} = \frac{SR_G + SR_{G:H} q^{\lambda_2} K[H]_0}{1 + q^{\lambda_2} K[H]_0} \quad (A.42)$$

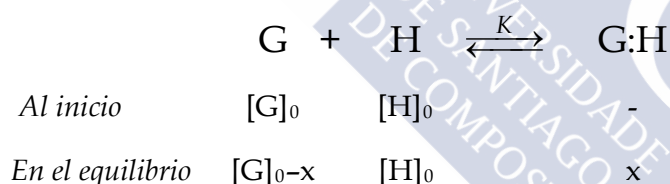
Mediante la ecuación (A.43) se pueden realizar los ajustes con OriginPro para determinar la constante de complejación K , a partir de los valores de la relación de intensidades de fluorescencia a λ_1 y λ_2 y la concentración de proteína en la muestra. La concentración de colorante libre se mantiene constante en las titulaciones. Se obtienen también los valores límites de la relación espectral para el colorante libre y complejo, SR_G y $SR_{G:H}$.

En la ecuación (A.43) el parámetro q^{λ_2} solamente aparece en los productos $q^{\lambda_2}K$, por lo cual está totalmente correlacionado con la constante de equilibrio K . Por esto se define una nueva constante aparente de equilibrio, K_q , que incluye tanto a la constante de equilibrio K como al término q^{λ_2} ($K_q = q^{\lambda_2}K$), facilitando el ajuste. El parámetro q^{λ_2} puede ser determinado en el intervalo de longitudes de onda denominado λ_2 , ya que está definido en función del mismo. Por tanto, la ecuación final de ajuste queda según la ecuación (A.44).

$$SR = \frac{F^{\lambda_1}}{F^{\lambda_2}} = \frac{SR_G + SR_{G:H} K_q [H]_0}{1 + K_q [H]_0} \quad (A.43)$$

Modelo de complejación 1:1 para anisotropía

Para una mezcla de especies fluorescentes que presente un equilibrio de complejación 1:1, sin interacciones en el estado excitado, se puede obtener una expresión para la anisotropía de la muestra en función de las concentraciones de equilibrio de las especies que emiten.



Al determinarse esta ecuación para el mismo sistema y bajo las mismas condiciones que las ecuaciones obtenidas en los apartados anteriores, es decir, suponiendo que hay un *exceso del receptor en la muestra*, las concentraciones de equilibrio de las especies fluorescentes vienen dadas por las ecuaciones (A.29) y (A.30). Así, se va a obtener la expresión para la anisotropía total de una mezcla de especies emisivas (r) en función de las concentraciones de equilibrio de las mismas.

Inicialmente, conociendo la aditividad de la anisotropía (Valeur 2002), se puede establecer que $r = \sum f_i r_i = \sum (I_i/I) r_i$, donde cada especie fluorescente con anisotropía r_i contribuye a la fluorescencia total con una fracción f_i (definida, por tanto, como la relación entre la fluorescencia de la especie y la fluorescencia total). Así, la anisotropía total r viene determinada por la anisotropía de cada especie que emite, r_G y $r_{G:H}$ por sus correspondientes

intensidades de fluorescencia totales a una determinada longitud de onda I_G^λ y $I_{G:H}^\lambda$ y por la intensidad de fluorescencia total de la muestra I^λ , según la ecuación (A.45).

$$r = \frac{I_G^\lambda}{I^\lambda} r_G + \frac{I_{G:H}^\lambda}{I^\lambda} r_{G:H} \quad (\text{A.44})$$

La fluorescencia total de la muestra se define como la suma la fluorescencia total de cada especie que emite presente en la misma, es decir, $I^\lambda = I_G^\lambda + I_{G:H}^\lambda$. Se conoce, a partir de la ecuación (A.15), que la fluorescencia total es proporcional a la concentración de las especies fluorescentes presentes en la muestra, por lo que se define la ecuación (A.46). F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$ son los parámetros definidos en las ecuación (A.16) y (A.17).

$$I^\lambda = F^\lambda = I_G^\lambda + I_{G:H}^\lambda = F_G^\lambda [G] + F_{G:H}^\lambda [G:H] \quad (\text{A.45})$$

Por tanto, la fluorescencia total de la especie G viene dada por $I_G^\lambda = F_G^\lambda [G]$ y la de la especie G:H por $I_{G:H}^\lambda = F_{G:H}^\lambda [G:H]$. Sustituyendo la expresión (A.46) y la definición de I_G^λ y $I_{G:H}^\lambda$ en la ecuación (A.45) se obtiene una ecuación para la anisotropía, relacionada con la concentración de las especies fluorescentes en el equilibrio (ecuación (A.47)).

$$r = \frac{F_G^\lambda [G] r_G + F_{G:H}^\lambda [G:H] r_{G:H}}{F_G^\lambda [G] + F_{G:H}^\lambda [G:H]} \quad (\text{A.46})$$

Se sustituyen las ecuaciones de las concentraciones, (A.29) y (A.30), en la ecuación anterior y se obtiene la ecuación (A.48).

$$r = \frac{F_G^\lambda [G]_0 r_G + F_{G:H}^\lambda [G]_0 K[H]_0 r_{G:H}}{F_G^\lambda [G]_0 + F_{G:H}^\lambda [G]_0 K[H]_0} \quad (\text{A.47})$$

Del mismo modo que en los casos anteriores, se vuelve a agrupar el término $[G]_0$ dentro de los parámetros F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$, formando parte de su valor, sin modificar la nomenclatura (ecuación (A.49)). F_G^λ y $F_{G:H}^\lambda$ vienen ahora definidos por las ecuaciones (A.32) y (A.33).

$$r = \frac{F_G^\lambda r_G + F_{G:H}^\lambda K[H]_0 r_{G:H}}{F_G^\lambda + F_{G:H}^\lambda K[H]_0} \quad (\text{A.48})$$

Si se divide el numerador y el denominador por F_G^λ se obtiene la ecuación (A.50).

$$r = \frac{\frac{F_G^\lambda}{F_G^\lambda} r_G + \frac{F_{G:H}^\lambda}{F_G^\lambda} K[H]_0 r_{G:H}}{\frac{F_G^\lambda}{F_G^\lambda} + \frac{F_{G:H}^\lambda}{F_G^\lambda} K[H]_0} = \frac{r_G + \frac{F_{G:H}^\lambda}{F_G^\lambda} K[H]_0 r_{G:H}}{1 + \frac{F_{G:H}^\lambda}{F_G^\lambda} K[H]_0} \quad (\text{A.49})$$

Al igual que en el apartado anterior, se define un parámetro q^λ como $F_{G:H}^\lambda / F_G^\lambda$, obteniendo así la ecuación final (A.51).

$$r = \frac{r_G + q^\lambda K[H]_0 r_{G:H}}{1 + q^\lambda K[H]_0} \quad (\text{A.50})$$

Se debe tener en cuenta que este parámetro q^λ es dependiente de la longitud de onda y su determinación debe realizarse en el mismo intervalo en el que se determine la anisotropía de la muestra.

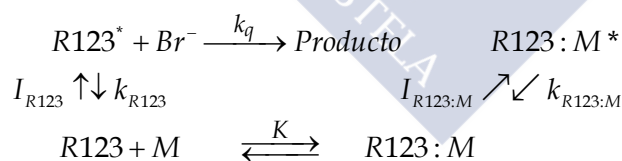
Para el ajuste con OriginPro se puede emplear la ecuación (A.51), a partir del valor de la anisotropía a distintas concentraciones de receptor H. Durante las titulaciones, la concentración de fluoróforo libre G se mantiene constante. Se obtiene el parámetro K y los valores límites de anisotropía para el colorante libre y asociado a la proteína, r_G y $r_{G:H}$.

Como se ha indicado en el apartado anterior, el ajuste de los datos se complica por la correlación entre el parámetro q^λ y la constante de equilibrio K en la ecuación, por lo que se define una nueva constante aparente de equilibrio, K_q , que incluye tanto a la constante de equilibrio K como al término q^λ ($K_q = q^\lambda K$). Así, se puede emplear la ecuación (A.52) para los ajustes, facilitando la realización de los mismos. A continuación, mediante la determinación del parámetro q^λ se puede obtener la constante de asociación.

$$r = \frac{r_G + K_q [H]_0 r_{G:H}}{1 + K_q [H]_0} \quad (\text{A.51})$$

Quenching dinámico

En el estudio de la interacción de la R123 con las *micelas con carga positiva* (M) se observa la existencia de un *quenching dinámico* que provoca cambios en las propiedades espectrales antes de la *cmc*, como consecuencia de la presencia en el medio de iones cargados negativamente, como el Br⁻ (ver secciones 4.1.6 y 5.2). Siguiendo el esquema que se muestra a continuación, se establecen las ecuaciones correspondientes al análisis de este sistema.



A partir de la ecuación (A.1) se obtienen las ecuaciones (A.53) y (A.54) para las concentraciones de colorante libre, [R123], y micelizado, [R123:M].

$$\frac{d[R123^*]}{dt} = I_{R123} - k_{R123}[R123^*] - k_q[R123^*][Br^-] = 0 \Rightarrow [R123^*]_{SS} = \frac{I_{R123}}{k_{R123} + k_q[Br^-]} \quad (\text{A.52})$$

$$\frac{d[R123:M^*]}{dt} = I_{R123:M} - k_{R123:M}[R123:M^*] = 0 \Rightarrow [R123:M^*]_{SS} = \frac{I_{R123:M}}{k_{R123:M}} \quad (\text{A.53})$$

Sabiendo que $K = [R123:M]/[R123][M] \approx [R123:M]/[R123][M]_0$, considerando un exceso de micelas con respecto al fluoróforo, y que $[R123]_0 = [R123] + [R123:M]$ se obtienen las ecuaciones (A.55) y (A.56) para las concentraciones de las especies fluorescentes.

$$[R123] = \frac{[R123]_0}{1 + K[M]_0} \quad (A.54)$$

$$[R123:M] = \frac{K[M]_0[R123]_0}{1 + K[M]_0} \quad (A.55)$$

Si la absorbancia es baja, se definen las ecuaciones (A.57), (A.58) y (A.59), para finalizar con la (A.60), al igual que se obtuvieron las ecuaciones (A.14) y (A.15).

$$I_{R123} = \varepsilon_{R123} l [R123] I_0 \quad (A.56)$$

$$I_{R123:M} = \varepsilon_{R123:M} l [R123:M] I_0 \quad (A.57)$$

$$F^\lambda = \sigma_{R123} k_{rR123} [R123^*]_{SS} + \sigma_{R123:M} k_{rR123:M} [R123:M^*]_{SS} \quad (A.58)$$

$$F^\lambda = \sigma_{R123} k_{rR123} \frac{\varepsilon_{R123} l [R123]_0 I_0}{(k_{R123} + k_q [Br^-])(1 + K[M]_0)} + \sigma_{R123:M} k_{rR123:M} \frac{\varepsilon_{R123:M} l [R123]_0 [M]_0 I_0}{k_{R123:M} (1 + K[M]_0)} \quad (A.59)$$

Definiendo las ecuaciones (A.61) y (A.62) como F_{R123}^λ y $F_{R123:M}^\lambda$, se obtiene la ecuación final (A.63), empleada en el ajuste de los datos.

$$F_{R123}^\lambda = \frac{\sigma_{R123} k_{rR123} \varepsilon_{R123} l [R123]_0 I_0}{k_{R123}} \quad (A.60)$$

$$F_{R123:M}^\lambda = \frac{\sigma_{R123:M} k_{rR123:M} \varepsilon_{R123:M} l [R123]_0 I_0}{k_{R123:M}} \quad (A.61)$$

$$F^\lambda = \frac{F_{R123}^\lambda}{(1 + k_q \tau_0 [Br^-]_{libre})(1 + K[Mic])} + \frac{F_{R123:M}^\lambda K[Mic]}{1 + K[Mic]} \quad (A.62)$$



RESUMEN

En el desarrollo de esta tesis doctoral se han estudiado varios sistemas supramoleculares mediante el uso de distintos sustratos fluorescentes con el fin de analizar las diferentes interacciones presentes, hidrofóbicas, electrostáticas y de otros tipos, que caracterizan la fuerza de unión de dichos sistemas y sus correspondientes propiedades fotofísicas. Se inició el estudio con macromoléculas y sistemas supramoleculares más sencillos, como son las ciclodextrinas y las micelas, para finalmente llevar a cabo un complejo estudio del proceso de agregación del péptido β -amiloide(1-42).

En la primera parte del trabajo se estudió la interacción de distintos sustratos fluorescentes con varias ciclodextrinas naturales y sistemas micelares. Ambos receptores presentan un amplio abanico de aplicaciones de interés biológico y tecnológico. La diferencia principal entre ellos es la rigidez de la cavidad que les permite actuar como receptores, siendo mucho más flexible en el caso de las micelas. Además, esta diferencia caracteriza las fuerzas de interacción que actúan al asociarse con un determinado sustrato, siendo muy importante el impedimento estérico en el caso de las ciclodextrinas mientras que las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas dominan la asociación de sustratos en los sistemas micelares. La gran importancia industrial que presentan las ciclodextrinas en la encapsulación de moléculas hace que sea necesario un conocimiento detallado de su interacción con distintos sustratos. Además, su utilización como modelos de asociaciones enzima-sustrato, entre otras, las convierte en valiosas macromoléculas para la caracterización de complejos de inclusión constituidos por receptores con cavidades rígidas. En cambio, las micelas de tensioactivo presentan una amplia aplicación industrial debido a su utilización en la fabricación de detergentes pero también se emplean como modelos de membranas biológicas, al ser sistemas organizados como éstas, pero más simples y de tamaño más adecuado para el estudio *in vitro*. La interacción de sondas fluorescentes con micelas permite analizar los procesos de asociación de distintos sustratos con sistemas autoorganizados y flexibles, con la finalidad de obtener las propiedades fotofísicas correspondientes y conocer el comportamiento existente durante la asociación.

En la segunda parte del trabajo se mostraron los resultados obtenidos para la caracterización de los agregados fibrilares del β -amiloide(1-42) utilizando distintas sondas fluorescentes. Actualmente, este péptido se considera el principal responsable de la aparición

de las lesiones existentes en pacientes con la Enfermedad de Alzheimer, debidas tanto a su asociación en forma de fibras insolubles como a la presencia de pequeños agregados de bajo peso molecular.

De forma general, el fluoróforo más empleado en el marcaje de las fibras de amiloide *in vitro* es la Tioflavina T, cuyo comportamiento aún está siendo muy discutido actualmente. Por tanto, se inició el estudio examinando el comportamiento de la Tioflavina T en diferentes disolventes más o menos viscosos y en presencia de proteínas fibrilares y globulares, proponiendo finalmente un mecanismo de actuación para el colorante muy dependiente de la rigidez del medio en que se encuentre. Se demostró que este fluoróforo presenta importantes inconvenientes para su uso en el marcaje de fibras de amiloide por lo que se analizaron nuevos potenciales marcadores fluorescentes, estructuralmente análogos al anterior, en los que se producen procesos de transferencia protónica y de transferencia de carga asociados en el estado excitado que los hacen muy sensibles al medio y, por tanto, posibles marcadores de estos agregados. Tras los estudios destacó el colorante HPIP, un imidazol que presenta dos bandas de emisión de fluorescencia que varían en función del medio, lo que permitió establecer un método ratiométrico capaz de detectar y cuantificar las fibras de amiloide.

Debido a la importancia actual de estos métodos ratiométricos para la monitorización del proceso de agregación del amiloide, se estudiaron otros potenciales marcadores de fibras con procesos de transferencia protónica y de carga en el estado excitado: el HPIP_{NMe}, el HBO y el HBT. Estos colorantes mostraron cambios al interactuar con las fibras del péptido, aunque los resultados obtenidos son preliminares y deben ser completados con nuevos estudios.

Para finalizar, en el último apartado se realizó un estudio exhaustivo del proceso de agregación del β -amiloide(1-42) en los estados iniciales del mismo, es decir, durante la formación de agregados tempranos del péptido, aún solubles y de menor peso molecular que los agregados fibrilares. Se caracterizaron estos pequeños agregados formados mediante Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia utilizando un β -amiloide(1-42) marcado con el colorante HiLyte Fluor 488, observando su dependencia temporal y en función de la concentración de péptido a 25°C. Finalmente, se estudiaron también estos agregados tempranos empleando técnicas de fluorescencia más convencionales y aplicando los fluoróforos ya estudiados como marcadores de fibras. Así, se comprobó su validez para el marcaje de estos agregados tempranos, que apenas son observados mediante el uso de la Tioflavina T.

RESUMO

No desenvolvemento desta tese estudáronse varios sistemas supramoleculares empregando diferentes substratos fluorescentes, coa finalidade de analizar as diferentes interaccións presentes, hidrofóbicas, electrostáticas e doutros tipos, que caracterizan a forza de unión presente nos devanditos sistemas e as súas correspondentes propiedades fotofísicas. Iniciouse o estudo con macromoléculas e sistemas supramoleculares máis sinxelos, como son as ciclodextrinas e as micelas, para finalmente levar a cabo un complexo estudo do proceso de agregación do péptido β -amiloide(1-42).

Na primeira parte do traballo estudouse a interacción de distintos substratos fluorescentes con varias ciclodextrinas naturais e sistemas micelares. Ambos receptores presentan un amplo abanico de aplicacións de interese biolóxico e tecnolóxico. A principal diferenza entre eles é a rixidez da cavidade que lles permite actuar como receptores, sendo moito máis flexible no caso das micelas. Ademais, esta diferenza caracteriza as forzas de interacción que actúan ó asociarse cun determinado substrato, sendo moi importante o impedimento estérico no caso das ciclodextrinas mentras que as forzas electrostáticas e hidrofóbicas dominan á asociación de sustratos nos sistemas micelares. A gran importancia industrial que presentan as ciclodextrinas na encapsulación de moléculas fai que sexa necesario un coñecemento detallado da súa interacción con distintos substratos. Ademais, o seu emprego como modelos de asociación enzima-substrato, entre outros, convérteas en valiosas macromoléculas para a caracterización de complexos de inclusión constituídos por receptores con cavidades ríxidas. En cambio, as micelas de tensioactivo presentan unha ampla aplicación industrial debido á súa utilización na fabricación de deterxentes pero tamén se empregan como modelos de membranas biolóxicas, ó ser sistemas organizados como estas, pero máis simples e cun tamaño máis adecuado para o seu estudo *in vitro*. A interacción de sondas fluorescentes con micelas permite analizar os procesos de asociación de distintos substratos con sistemas autoorganizados e flexibles, coa finalidade de obter as propiedades fotofísicas correspondentes e coñecer o comportamento existente durante a asociación.

Na segunda parte do traballo mostráronse os resultados obtidos para a caracterización dos agregados fibrilares do β -amiloide(1-42) empregando distintas sondas fluorescentes. Actualmente, este péptido considérase o principal responsable da aparición das lesións

existentes en pacientes coa Enfermidade de Alzheimer, debidas tanto á súa asociación en forma de fibras insolubles como á presenza de pequenos agregados de baixo peso molecular.

De forma xeral, o fluoróforo máis empregado na marcaxe das fibras de amiloide *in vitro* é a Tioflavina T, cuxo comportamento aínda está sendo moi discutido actualmente. Por tanto, iniciouse o estudo examinando o comportamento da Tioflavina T en diferentes disolventes máis ou menos viscosos e na presenza de proteínas fibrilares e globulares, propoñendo finalmente un mecanismo de actuación para o colorante moi dependente da rixidez do medio no que se atope. Demostrouse que este fluoróforo presenta importantes desvantaxes para o seu emprego na marcaxe de fibras de amiloide polo que se analizaron novos potenciais marcadores fluorescentes, estruturalmente análogos ó anterior, nos que se producen procesos de transferencia protónica e de transferencia de carga asociados no estado excitado que os fan moi sensibles ó medio e, polo tanto, posibles marcadores destes agregados. Tralos estudos destacou o colorante HPIP, un imidazol que presenta dúas bandas de emisión de fluorescencia que varían en función do medio, o que permitiu establecer un método ratiométrico capaz de detectar e cuantificar as fibras de amiloide.

Debido á importancia actual destes métodos ratiométricos para monitorizar o proceso de agregación do amiloide, estudáronse outros potenciais marcadores de fibras con procesos de transferencia protónica e de carga no estado excitado: o HPIP_NMe, o HBO e o HBT. Estes colorantes mostraron cambios ó interaccionar coas fibras do péptido, aínda que os resultados obtidos son preliminares e deben ser completados con novos estudos.

Para finalizar, no último apartado realizouse un estudo exhaustivo do proceso de agregación do β -amiloide(1-42) nos estados iniciais do mesmo, é dicir, durante a formación dos primeiros agregados do péptido, aínda solubles e de menor peso molecular que os agregados fibrilares. Caracterizáronse estes pequenos agregados formados mediante Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia empregando un β -amiloide(1-42) marcado co colorante HiLyte Fluor 488, observando a súa dependencia temporal e en función da concentración de péptido a 25°C. Finalmente, estudáronse tamén estes agregados solubles empregando técnicas de fluorescencia máis convencionais e aplicando os fluoróforos xa estudados como marcadores de fibras. Así, comprobouse a súa validez para a marcaxe destes pequenos agregados, que apenas son observados mediante o uso da Tioflavina T.

SUMMARY

In the development of this thesis we have studied several supramolecular systems using different fluorescent substrates in order to analyse the interactions, such as hydrophobic or electrostatic, that characterize the binding force of these systems and their corresponding photophysical properties. The study was initiated with simpler macromolecules and supramolecular systems, such as cyclodextrins and micelles, to finally perform a complex study of the aggregation process of amyloid- β (1-42) peptide.

In the first part of this work the interaction of different fluorescent substrates with several natural cyclodextrins and micellar systems was studied. The two hosts show a wide range of biological and technological applications. The main difference between them is the rigidity of the cavity that allows them to behave as hosts, being much more flexible in the case of the micelles. Moreover, this difference determines the type of interaction forces that play a role in the association with a substrate, among which the most important is steric hindrance in the case of cyclodextrins whereas electrostatic and hydrophobic forces control substrate association in micellar systems. The important industrial applications of cyclodextrins for the encapsulation of molecules makes it necessary a detailed knowledge of their interaction with different substrates. Furthermore, their use as models of substrate-enzyme associations, among others, makes them useful macromolecules for the characterization of inclusion complexes formed with rigid hosts. Instead, surfactant micelles have a wide industrial application due to their use in the manufacture of detergents but they are also suitable models of biological membranes because they are selforganized systems, but simpler and with an appropriate size for *in vitro* studies. The interaction of fluorescent probes with surfactant micelles allows analysis of the association processes of different substrates with selforganized and flexible systems, in order to obtain their photophysical properties and understand their behaviour during the association.

In the second part of this work fibrillar aggregates of amyloid- β peptide were characterized using different fluorescent probes. Currently, this peptide is considered the first responsible of the appearance of the cerebral lesions in patients with Alzheimer's disease, due both to its selfaggregation as insoluble fibrils and to its presence as small aggregates of low molecular weight.

Summary

Generally, the main fluorophore used to probe these amyloid fibrils *in vitro* is the Thioflavin T, whose photophysical behaviour is still very controversial. Therefore, the behaviour of Thioflavin T in different solvents more or less viscous and in the presence of fibrillar and globular proteins was studied firstly, proposing finally an action mechanism for the dye highly dependent on the rigidity of the medium. This fluorophore was demonstrated to have important drawbacks for its use as probe of amyloid fibrils and therefore new potential fluorescent markers structurally analogous to Thioflavin T were analysed, in which coupled excited-state proton and charge transfer processes occur that make them very sensitive to the environment and therefore potential interesting markers. As a result of our studies we focused on the dye HPIP, an imidazole that has two fluorescence emission bands very dependent of the environment which allow the use of a ratiometric method for detecting and quantifying amyloid fibrils.

Due to the current importance of these ratiometric methods for monitoring the aggregation processes of amyloid fibrils, other potential markers with proton and charge transfer processes in the excited state were studied: HPIP_NMe, HBO and HBT. These dyes showed changes by interaction with the peptide fibrils although these results are preliminary and must be completed by further studies.

Finally, a comprehensive study was performed of the initial stages of the aggregation process of amyloid- β peptide, that is during the formation of early soluble peptide aggregates of lower molecular weight than fibrillar aggregates. These small aggregates were characterized by Fluorescence Correlation Spectroscopy using a labelled amyloid- β peptide and analysing the time and concentration dependency of the aggregation process at 25°C. Finally, these early aggregates were studied using conventional fluorescence techniques with the same fluorophores that were used in the fibrillar studies. Thus, the suitability of these markers to detect small aggregates was checked, while it was found that Thioflavin T is not a proper probe for this purpose.

Artículos de investigación

Esta tesis doctoral se presenta como un compendio de artículos de investigación, que han sido indicados durante el desarrollo de la misma. A continuación se exponen las publicaciones incluidas en este trabajo mostrándolas según su formato original, que anteriormente se modificó para su mejor visualización.

ARTÍCULO 1

Novo, M., Bordello, J., Granadero, D., **Freire, S.**, Al-Soufi, W. 2008, "Supramolecular host-guest complexes between coumarin 460 and cyclodextrins: a matter of size", *Proceedings of the 12th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, MDPI, Basel, Switzerland.

ARTÍCULO 2

Freire, S., Bordello, J., Granadero, D., Al Soufi, W., Novo, M. 2010, "Role of Electrostatic and hydrophobic forces in the interaction of ionic dyes with charged micelles", *Photochem. Photobiol. Sci.*, Vol. 9, pp. 687-696.

ARTÍCULO 3

Freire, S., de Araujo, M. H., Al-Soufi, W., Novo, M. 2014, "Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils", *Dyes and Pigments*, Vol. 110, pp. 97-105.

ARTÍCULO 4

Freire, S., Rodríguez-Prieto, F., Ríos Rodríguez, M. C., Penedo, J. C., Al-Soufi, W., Novo, M. 2015, "Towards ratiometric sensing of amyloid fibrils in vitro", *Chem. European Journal*, Vol. 21, no. 8, pp. 3425-3434.

