

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

## **Complexos de Metais de Transição: Aplicações no tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer**

**Márcia Valéria Silva Lima\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM QUÍMICA, na área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Maria Carlos

\*Bolsista – CNPq

**São Carlos - SP**

**2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L732cm

Lima, Márcia Valéria Silva.

Complexos de metais de transição: aplicações no tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer / Márcia Valéria Silva Lima -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
100 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3. Fármacos. 4. Alzheimer, Doença de. I. Título.

CDD: 546 (20<sup>a</sup>)



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Márcia Valéria Silva Lima, realizada em 26/11/2014:

*Rose Maria Carlos*

---

Profa. Dra. Rose Maria Carlos  
UFSCar

*José Luiz Silva Sá*

---

Prof. Dr. José Luiz Silva Sá  
UESPI

*Maria Teresa Salles Trevisan*

---

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan  
UFC

*A. S. Ito*

---

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito  
FFCLRP/USP

*A. E. Mauro*

---

Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro  
UNESP

***Dedico este trabalho;***

*Aos meus pais Rita de Cássia e Antônio Carlos;*

*Aos meus irmãos Marília Vanessa e Antônio Filho;*

*"A confiança em si próprio, é o primeiro segredo do êxito"*

(Ralph Waldo Emerson)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

A Profa. Dra. Rose Maria Carlos pela orientação, mas, sobretudo pelos ensinamentos, confiança e amizade.

A Profa. Dra. Tereza Trevisan pela participação da banca de doutorado, pelas suas contribuições e sugestões.

Ao Prof. Dr. Antônio Mauro pela participação da banca de doutorado, pelas suas contribuições e sugestões.

Ao Prof. Dr. Amando Ito pela participação da banca de doutorado, pelas suas contribuições e sugestões.

Ao Prof. Dr. José Luiz pela participação da banca de doutorado, pelas suas contribuições e sugestões.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Feijó pela participação da banca de doutorado como suplente.

Ao Prof. Dr. João Batista pela participação da banca de doutorado como suplente.

Ao Prof. Dr. Angel Martí pela orientação na Rice University durante o doutorado sanduiche no departamento de química em Houston/TX-USA.

Ao Nathan Cook e Erika Jimenes pela amizade e ensinamentos durante o doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Amando Ito, pelas medidas Microscopia de fluorescência por tempo de vida, e pelas medidas de tempo de vida de emissão realizadas em seu laboratório no IF-USP/RB.

Aos alunos Wallance Pazin e Marina Bernardi pela ajuda nas medidas Microscopia de fluorescência por tempo de vida, e pelas medidas de tempo de vida de emissão.

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista, pelas medidas de Microscopia Confocal e citotoxicidade em células HeLa em seu laboratório no IQ-USP/SP.

À Cristiane Pavani pela ajuda nas medidas Microscopia Confocal e de citotoxicidade.

A Profa. Dra. Ana Paula pelas medidas no ITC e CD, e à sua aluna Juliana Cheleski e a técnica andressa na execução dos experimentos no IF-USP/SC.

Ao Ademir Sertori pelos reparos e confecções das vidrairas.

A Dorair Periotto pelas medidas no Espectrômetro de massas.

A Luciana Vizotto e ao Paulo pela ajuda nas medidas de RMN 1H e na análise elementar.

A técnica Helena e Ana Vieira do LCE, pela a ajuda com as medidas MET e AFM

A meus pais Antônio Carlos e Rita de Cássia, meus irmãos Marília Vanessa e Antônio Filho por todo amor, confiança, carinho e apoio.

A minha irmã-amiga Sâmya Danielle e ao meu irmão “preto” Jozemir Miranda , pelo carinho, paciência e amizade. E por tornar mais fácil os meus dias longe de casa.

Ao Roberto pelo amor, dedicação, paciência e companheirismo.

Aos meus amigos Leanne, Luciana, André, Lyanara que mesmo na distância nunca deixaram de me apoiar e me confortar nos momentos difíceis.

Ao Laécio Cavalcante pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos do LAFIB (Carolina, Eldevan, Paulo, Edjane, Inara, Mariana, Débora, Herisson, Bruno, Rafael, Mirian e Mariana Cali) pela amizade, risadas e por me proporcionarem momentos inesquecíveis no laboratório durante esses 4 anos. Sei que a amizade de muito de vocês será para toda a vida.

Às secretárias da pós-graduação (Ariane, Luciane, Cristina e Denise) pela ajuda e paciência durante esses 6 anos.

Ao corpo discente e docente do IFPI do campus Parnaíba pelo apoio, em especial ao coordenador Bartholomeu e a diretora de ensino Janiciara, pela minha liberação para a defesa de doutorado.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado.

A todos os colegas do departamento de química da UFSCar.

E meus humildes e sinceros agradecimentos a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ABRAZ** – Associação Brasileira de Alzheimer

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ACh** - Acetilcolina

**AChE** – Acetilcolinesterase

**BSA** – Albumina Bovina

**BuChE** - Butirilcolinesterase

**CM** – Complexo Metálico

**Cis** – Posição cis dos ligantes

**CHN** – Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio

**CH<sub>3</sub>CN** - Acetonitrila

**DA** – Doença de Alzheimer

**DC** – Dicroísmo Circular

**dd** - duplo dubleto

**DMEM** - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* sem fenol e sem soro fetal bovino

**DMEM (1%/10%)** - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* com vermelho fenol suplementado com 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino

**DMF** - Dimetilformamida

**DFT** - Teoria do funcional de densidade (do inglês, Density Functional Theory)

**DMSO** - Dimetil sulfóxido

**DTNB** – Reagente de Ellman

**E** – Potencial

**F** - Constante de Faraday

**FL** – Fluorescência

**FDA** – Food and Drug Administration

**f<sub>Ru</sub>** – Fração Molar do rutênio

**f<sub>βA-Ru</sub>** - fração Molar do b-amilóide menos a do rutênio

**HC** – Hipótese Colinérgica

**HG** – Hipótese Genética

**HSA** - Albumina humana

**i** - Densidade de corrente

**$i_0$**  - Densidade de corrente de troca

**IC<sub>50</sub>**- Concentração de composto necessária para inibir 50% do crescimento celular e da atividade da AChE

**ITC** - Calorimetria de Titulação isotérmica

**K<sub>d</sub>**- Constante de dissociação

**L** - Luminescência

**LLCT** - Transferência de carga do ligante para

**LMCT** - Transferência de carga do ligante para o metal

**LogP** – Coficiente de Partição

**m** – multiplete

**MC** - Microscopia confocal

**MET** – Microscopia eletrônica de transmissão

**MLCT** - Transferência de carga do metal para o ligante

**MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**ns** – Nanosegundos

**n** – Estequiometria da Ligação

**PPA** – Proteína Precursora Amiloide

**PTBA** – Perclorato de tetrabutílamônio

**PBS** - Tampão fosfato-salino

**Phen** – Ligante fenantrolina

**R** - Constante Universal dos Gases

**Redox** - Potencial de redução e oxidação

**RMN <sup>1</sup>H** - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**Ru(II)** - Rutênio no estado de oxidação II

**Ru(III)** - Rutênio no estado de oxidação III

**Ru<sub>Tot</sub>** - Fração molar do rutênio total (rutênio livre + rutênio ligado a proteína)

**Ru(2-Apy)** – Complexo de rutênio com a 2-aminopiridina

**Ru(4-IAC)** - Complexo de rutênio com o Imidazol ácido carboxílico

**Ru(4-IAA)** - Complexo de rutênio com o Imidazol ácido acético

**s** – Singleto

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**T** - Temperatura (K)

**TFA** - Ácido Trifluoroacético

**ThT** – Tioflavina T

**UV-Vis** - Ultravioleta-visível

**V** - Volts

**βA**- β-amilóide

**β-A<sub>1-40</sub>** – Fragmento de 1 a 40 do peptido β-amilóide

**β-A<sub>1-42</sub>** - Fragmento de 1 a 42 do peptido β -amilóide

**βA<sub>Tot</sub>** - Fração molar do amilóide total (amilóide livre + amilóide ligado ao rutênio)

**ΔS** – Variação da Entropia

**ΔG** - Energia Livre de Gibbs

**ΔH**- Variação da Entalpia

**ΔE** - Variação da Energia de Potencial

**δ** - Deslocamento químico nos espectros de RMN

**η** - Número de elétrons

**λ<sub>em</sub>** - Comprimento de onda de emissão

**λ<sub>ex</sub>** - Comprimento de onda de excitação

$\tau_1$  - Tempo de vida de emissão 1

$\tau_2$  - Tempo de vida de emissão 2

**2-Apy** – 2-aminopiridina

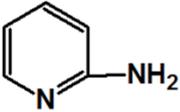
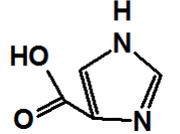
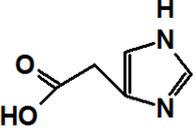
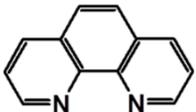
**4-ImAA** – Ligante 4-Imidazol ácido acético

**4-ImAC** - Ligante 4-Imidazol ácido Carboxílico

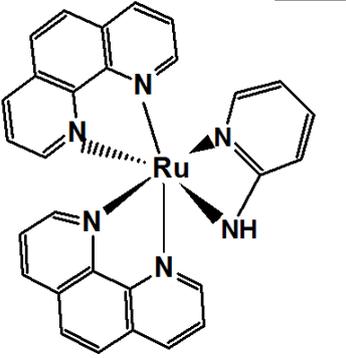
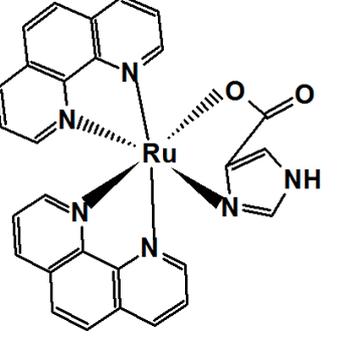
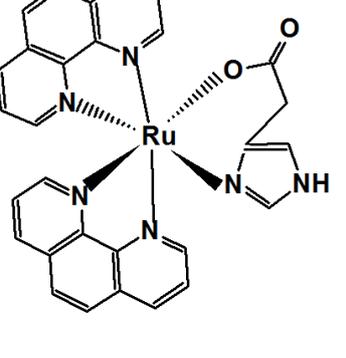
**[Complexo]<sub>aq</sub>** - Concentração do complexo na fase aquosa

**[Complexo]<sub>org</sub>** - Concentração do complexo na fase orgânica

## LISTA DE ABREVIATURAS DOS LIGANTES E COMPLEXOS

ABREVIATURA	LIGANTE	ESTRUTURA
2-Apy	2-aminopiridina	
4-ImAC	4-Imidazol Ácido Carboxílico	
4-ImAA	4-Imidazol Ácido Acético	
1,10-Phen	1,10-Fenantrolina	

## LISTA DE ABREVIATURAS DOS COMPLEXOS

ABREVIATURA	COMPLEXO	ESTRUTURA
Ru(2-Apy)	$cis-[Ru(phen)_2(2-Apy)]^{2+}$	
Ru(4-ImAC)	$cis-[Ru(phen)_2(4-ImAC)]^+$	
Ru(4-ImAA)	$cis-[Ru(phen)_2(4-ImAA)]^+$	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Porcentagem de crescimento das principais doenças causadoras de morte entre os anos de 2000 à 2008 nos Estados Unidos.....	2
<b>Figura 1.2</b> - Mecanismo do ciclo colinérgico: processo de liberação e degradação da ACh pela AChE na fenda sináptica.....	3
<b>Figura 1.3</b> - Reação de hidrólise da Acetilcolina.....	4
<b>Figura 1.4</b> - Estrutura dos primeiros fármacos comercializados: <b>(a)</b> Fisostigmina e <b>(b)</b> Tacrina..	5
<b>Figura 1.5</b> - Estrutura dos três fármacos anticolinesterásicos comercializados para o tratamento da DA; <b>(a)</b> donepezil, <b>(b)</b> rivastigmina, <b>(c)</b> galantamina e <b>(d)</b> huperzina.....	5
<b>Figura 1.6</b> - Representação de uma célula nervosa normal e doente (déficit de Ach, presença de emaranhados neurofibrilares e de placas senis).....	7
<b>Figura 1.7</b> - Clivagem da PPA e formação dos fragmentos $\beta$ -A <sub>1-40</sub> e $\beta$ -A <sub>1-42</sub> .....	7
<b>Figura 1.8</b> - Processo de agregação dos fragmentos $\beta$ -A <sub>1-40</sub> e $\beta$ -A <sub>1-42</sub> , formando os agregados fibrilares (placas senis).....	8
<b>Figura 1.9</b> - Diferentes formas de aglomeração do peptídeo $\beta$ -amilóide.....	9
<b>Figura 1.10</b> - Estrutura química do corante Tioflavina T. ....	9
<b>Figura 1.11</b> - Emissão fluorescente da ThT na presença dos monômeros, e na presença das fibrilas de $\beta$ -amilóide.....	10
<b>Figura 1.12</b> - Processo de agregação do $\beta$ -amilóide, acompanhado por luminescência através do uso de ThT como sonda em diferentes tempos de incubação.....	11
<b>Figura 1.13</b> - Espectros de absorção e emissão: <b>(a)</b> em comprimento de onda, <b>(b)</b> em número de onda com deslocamento Stokes, para o corante ThT. ....	12
<b>Figura 1.14</b> - Espectro de absorção das biomoléculas.....	13
<b>Figura 1.15</b> - Estrutura química das moléculas: <b>(a)</b> 2-aminopiridina (2-Apy); <b>(b)</b> 4-Imidazol ácido carboxílico (4-ImAC); e <b>(c)</b> 4-Imidazol ácido acético (4-ImAA).....	14

<b>Figura 1.16</b> – Esquema da <b>(a)</b> Configuração eletrônica dos orbitais d, <b>(b)</b> geometria octaédrica, apresentada para os complexos de rutênio (II).....	15
<b>Figura 3.1</b> - Esquema da reação para a primeira etapa da síntese, obtenção do complexo precursor.....	18
<b>Figura 3.2</b> - Esquema da reação para a segunda etapa da síntese e os três complexos de rutênio obtidos em cada síntese.....	19
<b>Figura 3.3</b> - Esquema das reações envolvidas na inibição da enzima AChE de acordo com o método proposto por Ellman.....	20
<b>Figura 4.1</b> - Estrutura otimizada dos complexos: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> ....	34
<b>Figura 4.2</b> - Espectros de absorção na região do UV-Vis teórico (linha preta) e experimental (linha vermelha) para os complexos: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> em acetonitrila.....	37
<b>Figura 4.3</b> – Espectro de infravermelho em pastilha de KBr para os complexos: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> .....	39
<b>Figura 4.4</b> - Espectro de infravermelho em pastilha de KBr para os ligantes livres: <b>(a)</b> 4-ImAAc e <b>(b)</b> 4-ImAC.....	40
<b>Figura 4.5</b> - Deslocalização eletrônica no ligante imidazólico coordenado ao centro metálico.....	41
<b>Figura 4.6</b> - <b>Figura 4.6</b> - Espectros de RMN de <sup>1</sup> H para os complexo: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> ; em acetona para o complexo <b>(c)</b> e em DMSO para os complexos <b>(a)</b> e <b>(b)</b> .....	43
<b>Figura 4.7</b> - Complexos de rutênio com os prótons assinalados: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	44
<b>Figura 4.8</b> - Espectros de RMN de <sup>1</sup> H para o ligante fenatrolina livre em DMSO.....	45
<b>Figura 4.9</b> - Espectros eletrônicos para os complexos de rutênio em CH <sub>3</sub> CN.....	47
<b>Figura 4.10</b> - Espectros eletrônicos para os complexos de rutênio em tampão fosfato pH 7.4.....	48
<b>Figura 4.11</b> - Voltametria cíclica para os complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (ImAA)]PF <sub>6</sub> e <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> em	

acetonitrila com velocidade de varredura de 100mV/s.....	50
<b>Figura 4.12</b> – Inclinação da curva obtida a partir da equação de Tafel para os complexos: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> . .....	51
<b>Figura 4.13</b> - Espectroeletróquímica para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> em DMF: <b>(a)</b> E <sub>aplicado</sub> = +1,02 V, e <b>(b)</b> E <sub>aplicado</sub> = + 0,5 V.....	52
<b>Figura 4.14</b> - Espectroeletróquímica para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> em DMF: <b>(a)</b> E <sub>aplicado</sub> = +1,02 V, e <b>(b)</b> E <sub>aplicado</sub> = + 0,5 V.....	52
<b>Figura 4.15</b> - Espectro de emissão para os complexos de rutênio: <b>(a)</b> em CH <sub>3</sub> CN; <b>(b)</b> tampão fosfato pH 7.4; na concentração de 5x10 <sup>-5</sup> mol/L.....	54
<b>Figura 4.16</b> - Deslocamento Stokes para os complexos: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> em acetonitrila.....	55
<b>Figura 4.17</b> - Deslocamento Stokes para os complexos: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> em tampão fosfato pH 7.4.....	56
<b>Figura 4.18</b> - Curvas de decaimento de emissão para os complexos de rutênio: <b>(a)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <b>(b)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <b>(c)</b> <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> , em acetonitrila à temperatura ambiente. A qualidade do ajuste está indicada pelos gráficos de resíduos mostrados abaixo das curvas de decaimento.....	58
<b>Figura 4.19</b> - Microscopia Confocal para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> .....	60
<b>Figura 4.20</b> - Microscopia Confocal para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> .....	61
<b>Figura 4.21</b> - Microscopia Confocal para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	61
<b>Figura 4.22</b> - Conversão do sal MTT no sal de formazan.....	62
<b>Figura 4.23</b> - Gráfico de barras para a velocidade de reação enzimática para os diferentes inibidores.....	64
<b>Figura 4.24</b> - Gráfico de Lineweaver-Burke de 1/V <sub>0</sub> versus a recíproca do substrato ACh, para diferentes concentrações do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> (0, 25, 50 e 100 μM).....	67
<b>Figura 4.25</b> - Gráfico de Lineweaver-Burke de 1/V <sub>0</sub> versus a recíproca do	

substrato ACh, para diferentes concentrações do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> (0, 25, 50 e 100 μM).....	67
<b>Figura 4.26</b> - Gráfico de Lineweaver-Burke de 1/V <sub>0</sub> versus a recíproca do substrato ACh, para diferentes concentrações do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (0, 25, 50 e 100 μM).....	68
<b>Figura 4.27</b> - Espectros de absorvância referentes aos estudo de estabilidade do complexo em tampão fosfato em pH 3.6.....	69
<b>Figura 4.28</b> - Espectros de absorvância referentes aos estudo de estabilidade do complexo em tampão fosfato em pH 7,4.....	70
<b>Figura 4.29</b> - Emissão luminescente do complexo em tampão fosfato em diferentes pH (5,0-12).....	71
<b>Figura 4.30</b> - Estudo de estabilidade do complexo na presença da proteína HSA tampão fosfato em pH 7.4.....	72
<b>Figura 4.31</b> - Espectro de emissão do complexo aminopiridina em tampão, na presença de HSA, e com sal.....	73
<b>Figura 4.32</b> - Espectro de DC do complexo aminopiridina em tampão, na presença de HSA.....	75
<b>Figura 4.33</b> - Experimento de ITC para o complexo aminopiridina com a proteína HSA.....	76
<b>Figura 4.34</b> - Valores de entalpia, energia de Gibbs e entropia provenientes do experimento de ITC para o complexo aminopiridina com a proteína HSA.....	77
<b>Figura 4.35</b> - Gráfico de barras para os complexos de rutênio (1 μM) na presença de β-amilóide (50 μM) em diferentes tempos de incubação (0 horas e 24 horas).....	79
<b>Figura 4.36</b> - Gráfico de barras para o complexo aminopiridina em diferentes concentrações com o peptideo β-amilóide sem incubação, após 24 horas de incubação.....	80
<b>Figura 4.37</b> - Conformação da folha-β com a formação da fenda hidrofóbica do β-A, exibindo as interações com o complexo de rutênio dppz, trabalho desenvolvido por Nathan e colaboradores.....	81
<b>Figura 4.38</b> - Emissão luminescente do complexo de aminopiridina na presença de tampão, com o β-A <sub>25-35</sub> na forma monomérica e fibrilar.....	82
<b>Figura 4.39</b> - Monitorização do processo de agregação do β-amilóide com os complexos de rutênio.....	83

<b>Figura 4.40</b> - Monitorização do processo de agregação do $\beta$ -amilóide com o <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> em diferentes concentrações e ThT.....	85
<b>Figura 4.41</b> - Gráfico de saturação do complexo de rutênio em diferentes concentrações com o $\beta$ -A.....	86
<b>Figura 4.42</b> - Gráfico de “ <i>Job Plot</i> ” para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	87
<b>Figura 4.43</b> - Acompanhamento do processo de agregação do $\beta$ -amilóide, em diferentes tempos de incubação (0h-24h).....	89
<b>Figura 4.44</b> - Acompanhamento do processo de crescimento do $\beta$ -amilóide por: <b>(a)</b> <i>Real Time</i> , <b>(b)</b> MC por emissão de tempo de vida.....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Massa, procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados na síntese dos complexos de rutênio.....	17
<b>Tabela 3.2</b> - Reagentes, grau de pureza e procedência dos reagentes utilizados nos experimentos de inibição enzimática.....	21
<b>Tabela 3.3</b> - Soluções utilizadas nos experimentos de inibição enzimática.....	21
<b>Tabela 3.4</b> - Procedência dos reagentes utilizados nos ensaios com $\beta$ -amilóide.....	23
<b>Tabela 3.5</b> - Lista de reagentes utilizados nos ensaios com a célula HeLa de citotoxicidade e microscopia confocal.....	27
<b>Tabela 4.1</b> - Ângulos de ligações para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> .....	35
<b>Tabela 4.2</b> - Ângulos de ligações para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAAc)]PF <sub>6</sub> .....	35
<b>Tabela 4.3</b> - Ângulos de ligações para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	36
<b>Tabela 4.4</b> - Principais comprimentos de ligações dos complexos: <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	36
<b>Tabela 4.5</b> - Análise elementar para os complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> , <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	38
<b>Tabela 4.6</b> - Modos vibracionais encontrados para os ligantes imidazólicos (4-ImAC e ImAA) e fenatrolina, e as suas atribuições.....	41
<b>Tabela 4.7</b> - Principais modos vibracionais para os complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub> e as suas atribuições.....	42

<b>Tabela 4.8</b> - Deslocamento químico(ppm), multiplicidade e número de $^1\text{H}$ para os espectros de RMN dos os complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub> , <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (ImAA)]PF <sub>6</sub> e <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	46
<b>Tabela 4.9</b> - Tempos de vida encontrado para os complexos de rutênio em acetonitrila, e os valores de $\chi^2$ .....	57
<b>Tabela 4.10</b> - Lipofilicidade dos complexos em tampão com pH 3,6 e 7,4.....	59
<b>Tabela 4.11</b> - Solubilidade dos complexos em tampão com pH 3,6 e 7,4.....	59
<b>Tabela 4.12</b> - Valores de IC <sub>50</sub> para os precursores, ligantes livres, complexos de rutênio e para os fármacos comerciais.....	63
<b>Tabela 4.13</b> - Valores de IC <sub>50</sub> para os complexos de rutênio e fármacos comerciais.....	65
<b>Tabela 4.14</b> - Valores de Ki para os complexos de rutênio e Tacrina.....	66
<b>Tabela 4.15</b> – Dados termodinâmicos obtidos a partir das medidas de ITC: constante de dissociação (K <sub>d</sub> ), número de sítios ativos (n), entalpia ( $\Delta\text{H}$ ), entropia ( $\Delta\text{S}$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta\text{G}$ ) .....	77

## RESUMO

### COMPLEXOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO COMO PRECURSORES DE MOLÉCULAS BIOATIVAS: APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Atualmente existem cerca de 35,6 milhões de pessoas diagnosticadas com a doença de Alzheimer (DA) no mundo, e espera-se que este número duplique até 2050. As causas da doença de Alzheimer, ainda não são conhecidas, mas seus sintomas são caracterizados pelo declínio da função cognitiva resultado da superatividade da enzima acetilcolinesterase (AChE); e à acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ -A) no cérebro dos doentes. Diante disso é importante o desenvolvimento de fármacos que atuem nos dois problemas da DA; tanto no declínio cognitivo (inibição da atividade da AChE) e na identificação dos agregados fibrilares de  $\beta$ -A (criação de novas sondas). Para esta finalidade foram preparados e ensaiados uma série de complexos luminescentes *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAAc)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, onde phen=1,10-fenantrolina, ImAA= 4-imidazol ácido acético, ImAC= 4-imidazol ácido carboxílico e Apy= 2-aminopiridina. Os complexos de rutênio foram sintetizados, onde sua elucidação estrutural e grau de pureza foram verificados por espectroscopia de RMN de H<sup>1</sup> e por análise elementar. Os compostos são solúveis em solução aquosa e exibem uma intensa e larga absorção e emissão na região do visível. Os complexos apresentaram tempo de vida relativamente longo, onde o  $\tau_1$  encontrado foi da ordem de 100 ns. Os complexos exibiram inibição moderada frente à enzima AChE, com um IC<sub>50</sub> da ordem de 10-20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A partir das imagens de microscopia confocal foi possível fazer a localização dos complexos no interior celular, através da emissão luminescente, onde os compostos imidazólicos se localizaram especificadamente na porção citoplasmática das células, e o complexo com aminopiridina, se distribuiu de forma homogênea em toda a porção celular. Foi possível acompanhar a formação das fibras a partir das medidas de emissão dos complexos, uma vez que os compostos apresentam intensidade de luminescência variável aos diferentes tipos de agregação do  $\beta$ -A. As fibrilas também foram confirmadas por microscopia fluorescente de tempo de vida de emissão. A partir dos resultados os complexos exibem grande potencial farmacológico frente ao tratamento da DA, uma vez que podem ser utilizados tanto no diagnóstico (identificação das fibrilas) e no tratamento da DA (inibição da AChE).

## ABSTRACT

### TRANSITION METAL COMPLEX AS PRECURSORS FOR BIOACTIVE MOLECULES: APPLICATIONS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Currently there are about 35.6 million people diagnosed with Alzheimer's disease (AD) in the world, and it is expected that this number will double by 2050. Causes of Alzheimer's disease are not yet known, but their symptoms are characterized the decline of cognitive function result of overactivity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE); and accumulation of  $\beta$ -amyloid peptide ( $\beta$ -A) in the brain of patients. Therefore it is important to the development of drugs that act on the two problems of AD; cognitive decline (inhibition of AChE activity) and the identification of fibrillar aggregates of  $\beta$ -A (creation of new probes). For this purpose have been prepared and tested a series of luminescent complex; *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAAc)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, where phen = 1,10-phenanthroline, ImAA = 4-imidazole acetic acid, ImAC = 4-imidazole carboxylic acid and Apy = 2-aminopyridine. The ruthenium complexes were synthesized, where its structural elucidation and purity were checked by NMR H<sup>1</sup> spectroscopy and by microanalysis. The compounds are soluble in aqueous solutions and exhibit an intense and broad absorption and emission in the visible region. The complexes have relatively long life with  $\tau_1$  the order of 100 ns. The complexes showed moderate inhibition against the enzyme AChE, with an IC<sub>50</sub> of about 10-20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>. From the images from confocal microscopy was possible to make the location of the complex inside the cells by luminescent emission, where the imidazole compounds were located specifically in the cytoplasmic portion of the cell, unlike the complex with aminopyridine, which was distributed homogeneously throughout cellular portion. It was possible to identify the formation of fibers from measurements of emission of the luminescent complex, since these complexes have intensity of luminescence variable with different types of A $\beta$  aggregation. The fibrils were also confirmed by fluorescence microscopy emission lifetime. From the results of the complexes exhibit high pharmacological potential to the treatment of AD since they can be used in diagnosis (identification of the fibrils) and in the treatment of AD (AChE inhibition).

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1.Expectativa de Vida.....	1
1.2.Hipóteses da DA.....	2
1.2.1. Hipótese Cognitiva (HC).....	2
1.2.2. Hipótese Genética (HG).....	6
1.3. Proposta do Trabalho.....	13
1.3.1. Ligantes.....	13
1.3.2. Complexos Metálicos.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos.....	16
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>17</b>
3.1. Reagentes.....	17
3.2. Síntese.....	17
3.2.1. Primeira Etapa.....	18
3.2.2. Segunda Etapa.....	18
3.3- Estudos Biológicos.....	20
3.3.1 - Experimentos de Inibição Enzimática .....	20
3.3.2- Experimentos com o $\beta$ -Amilóide.....	23
3.3.3- Estudos com a célula HeLa.....	26
3.3.4 - Experimentos com a Proteína HSA.....	28
3.3.5 – Determinação do Log P e da solubilidade.....	29
3.3.6- Cálculos Computacionais.....	30
3.3.7 – Caracterização dos complexos.....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>34</b>

4.1 . Cálculos Computacionais.....	34
4.2 . Análise Elementar .....	38
4.3 . Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	38
4.4 . Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	42
4.5 . Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível.....	47
4.6 . Medidas de Voltametria Cíclica.....	49
4.7 . Espectroeletrólise.....	52
4.8 . Luminescência e Tempo de vida de Emissão.....	53
4.9 . Solubilidade e Lipofilicidade.....	59
4.10 . Estudos Biológicos.....	60
4.10.1 . Microscopia Confocal.....	60
4.10.2 . Citotoxicidade.....	62
4.11 . Estudos Terapêuticos.....	64
4.11.1 . Inibição Enzimática.....	64
4.12 . Estudos de estabilidade e de Interação com a HSA.....	69
4.12.1. Estabilidade.....	69
4.12.2 . Interação com HSA.....	72
4.13. Diagnóstico.....	79
4.13.1 Experimentos com $\beta$ -Amilóide .....	79
4.13.2. Monitorização da fibrilização.....	83
4.13.3. Ensaio de Ligação.....	86
4.14- Detecção das Fibrilas por Imagem.....	88
4.14.1 . Imagem de Fluorescência por tempo de vida de emissão.....	89
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

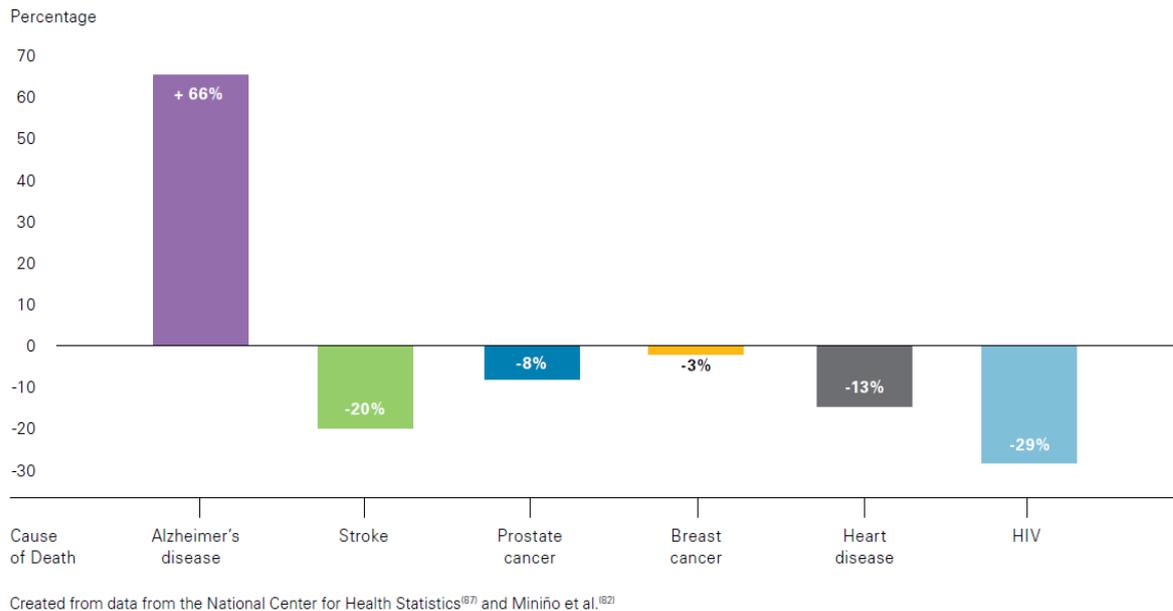
### 1.1 – Expectativa de vida

Avanços em diversas áreas das ciências, assim como uma melhora nas condições de vida da população de um modo geral, contribuíram para uma melhoria da qualidade de vida da população e conseqüentemente para um aumento da expectativa de vida, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento<sup>1-5</sup>. O aumento da população idosa surgem alguns problemas, como o acréscimo das doenças associadas a velhice. Dentre essas doenças destacam-se as demências, que acomete uma grande parte da população idosa<sup>6</sup>. A demência é uma síndrome de natureza crônica causada por uma diversidade de doenças mentais, que afetam em geral a memória, o raciocínio, o comportamento e a capacidade de fazer atividades cotidianas<sup>7</sup>.

Dentre as demências destaca-se a doença de Alzheimer (DA), já que a mesma corresponde por mais de 50% dos casos de demência. A DA é uma doença neurodegenerativa, que provoca perda de habilidades como pensar, raciocinar, memorizar, linguagem e locomoção; resultando da dependência total do doente de cuidadores<sup>6-10</sup>. A idade é o principal fator de risco, onde acomete de 1 a 6% nos grupos etários acima de 65 anos, de 30% com idade a partir de 80 anos, e 50% com idade maior ou igual a 95 anos<sup>11</sup>.

No Brasil, segundo a ABRAZ (Associação brasileira de Alzheimer) foram diagnosticados cerca de 1 milhão e meio de brasileiros portadores da doença<sup>12</sup>. No mundo, existe cerca de 35.6 milhões de pessoas diagnosticadas com a DA, onde a expectativa é que esse número dobre até 2050<sup>15</sup>.

Nos países desenvolvidos a DA já é a 3ª causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer<sup>14</sup>. De acordo com uma pesquisa realizada nos Estados Unidos nos anos de 2000 à 2008, verificou-se um declínio de mortes causadas por ataques cardíacos de -13%, diferente das mortes causadas por DA, uma vez que houve um acréscimo de cerca de 66%<sup>15</sup>. A progressão destas e outras doenças podem ser visualizadas na Figura 1.1.



**Figura 1.1** – Porcentagem de crescimento das principais doenças causadoras de morte entre os anos de 2000 à 2008 nos Estados Unidos.

Não se sabe ao certo as causas da doença de Alzheimer e conseqüentemente não se conhece a cura para a doença, mas existem hipóteses que estudam as principais características e patologias da DA, ajudando a compreender melhor a doença, e encontrar a cura para a mesma.

## 1.2 – Hipóteses da DA

Existem atualmente duas hipóteses que tentam explicar o mecanismo fisiopatológico inerente à doença de Alzheimer. As hipóteses existentes atualmente são a hipótese cognitiva e a hipótese genética<sup>16</sup>, onde as mesmas serão explicadas detalhadamente nos próximos tópicos.

### 1.2.1 – Hipótese Cognitiva (HC)

A HC foi a primeira hipótese a ser formulada na descrição da DA. A HC trata-se de uma hipótese uma vez que os idosos naturalmente apresentam uma diminuição da atividade colinérgica, devido ao envelhecimento das células nervosas. A HC aborda o déficit do neurotransmissor Acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central (SNC), resultando num declínio colinérgico para o portador da DA.

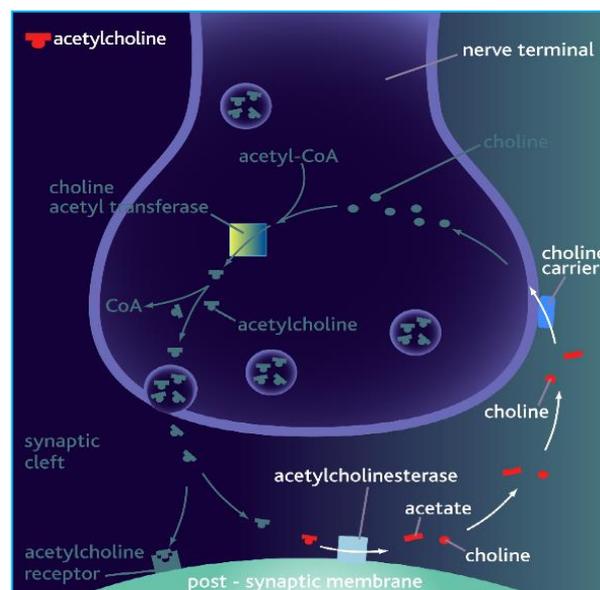
A HC abordou vários métodos de como reverter esse quadro clínico, através de estratégias compensatórias de ACh<sup>17</sup>, tais como:

- Uso de precursores para a ACh;
- Uso de agentes que aumentem a liberação de ACh;
- Uso de agonistas (Muscarínicos e Nicotínicos).

Todas essas tentativas iniciais foram realizadas sem sucesso, em razão de apresentarem resultados terapêuticos insatisfatórios.

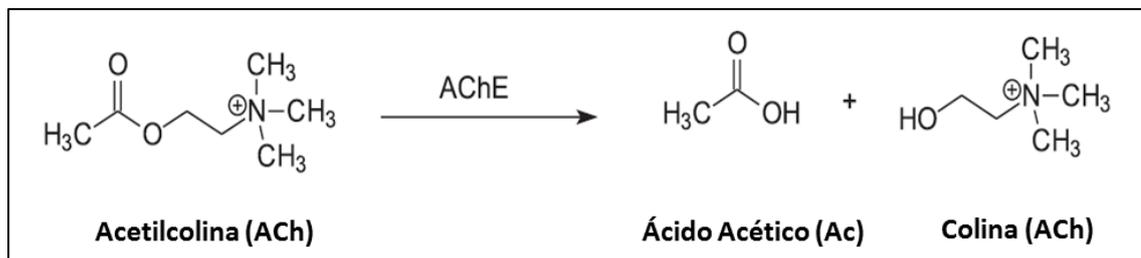
Uma outra estratégia adotada por esta hipótese, que é a mais difundida comercialmente, é o uso de fármacos que atuem na fenda sináptica inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE)<sup>18</sup>.

A enzima acetilcolinesterase é a responsável pelo controle do neurotransmissor ACh na fenda sináptica, onde após a liberação do neurotransmissor, o mesmo é recebido pelos receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos), e após esse processo a ACh é degradada pela AChE (reação de hidrólise), transformando-a em colina e acetato, para depois ser novamente formada em ACh dando continuidade ao ciclo colinérgico<sup>17-19</sup>. A Figura 1.2 exibe o processo de formação e degradação da Ach.



**Figura 1.2** – Mecanismo do ciclo colinérgico: processo de liberação e degradação da ACh pela AChE na fenda sináptica.

A Figura 1.3 exibe a reação de hidrólise da Acetilcolina pela enzima Acetilcolinesterase.



**Figura 1.3** - Reação de hidrólise da Acetilcolina.

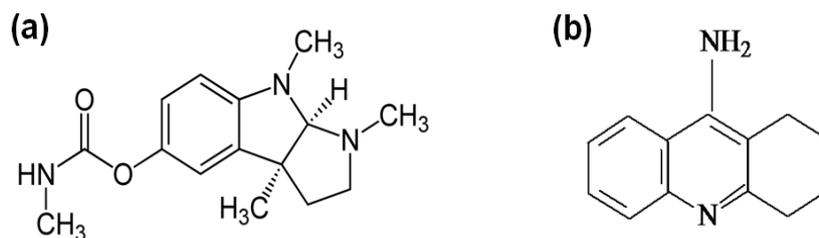
Atualmente existe vários fármacos anticolinesterásicos, os quais serão abordados nos tópicos a seguir.

### 1.2.1.1- Fármacos Anticolinesterásicos

Os fármacos anticolinesterásicos comercializados, são classificados de acordo com os diferentes mecanismos de inibição que apresentam. Esses mecanismos de inibição dependem do tipo de interação do fármaco com o sítio ativo da enzima, podendo essa inibição ser do tipo reversível ou irreversível<sup>20</sup>.

#### 1.2.1.1.1- Primeiros Fármacos

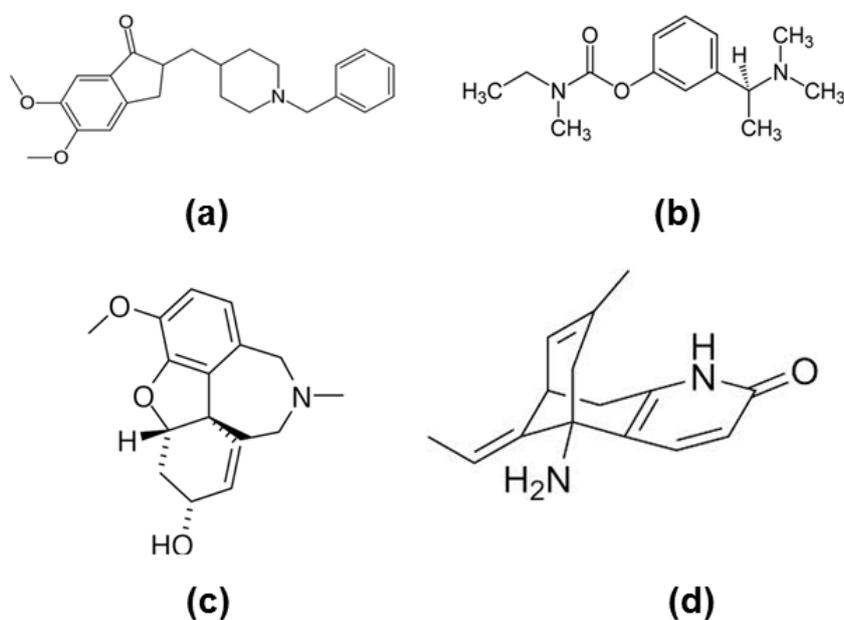
Os primeiros fármacos utilizados como inibidor irreversível da enzima AChE foi a Fisostigmina e a Tacrina (Cognex®) (Figuras 4a e 4b). A Fisostigmina teve a sua comercialização iniciada na década de 70, e a Tacrina na década de 90, porém a utilização dos mesmos foi limitada pela meia-vida curta ( $\approx 30$  min), necessitando de administrações freqüentes, causando elevados efeitos colaterais (náusea, vômito, cólica abdominal, suor e fasciculações), sendo esses efeitos mais acentuados para a Tacrina, uma vez que o mesma apresentou também elevada toxicidade hepática. Devido aos resultados insatisfatórios a Fisostigmina foi comercializada por pouco tempo, e a Tacrina apresenta o seu uso restrito em alguns países. Consequentemente devido aos inconvenientes apresentados por esses fármacos, desencadeou-se a procura por fármacos mais eficientes e menos danosos<sup>20-22</sup>.



**Figura 1.4** – Estrutura dos primeiros fármacos comercializados: **(a)** Fisostigmina e **(b)** Tacrina.

#### 1.2.1.1.2 – Fármacos Comercializados

Atualmente existem alguns fármacos aprovados e disponíveis comercialmente para o tratamento da DA, tais como: huperzina A (Hup A), donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Reminyl®) e memantina (Namenda®), mas somente 4 deles atuam na inibição da enzima AChE<sup>23</sup>, os quais podem ser visualizados na Figura 1.5:



**Figura 1.5** - Estrutura dos quatro fármacos anticolinesterásicos comercializados para o tratamento da DA; **(a)** donepezil, **(b)** rivastigmina, **(c)** galantamina e **(d)** huperzina.

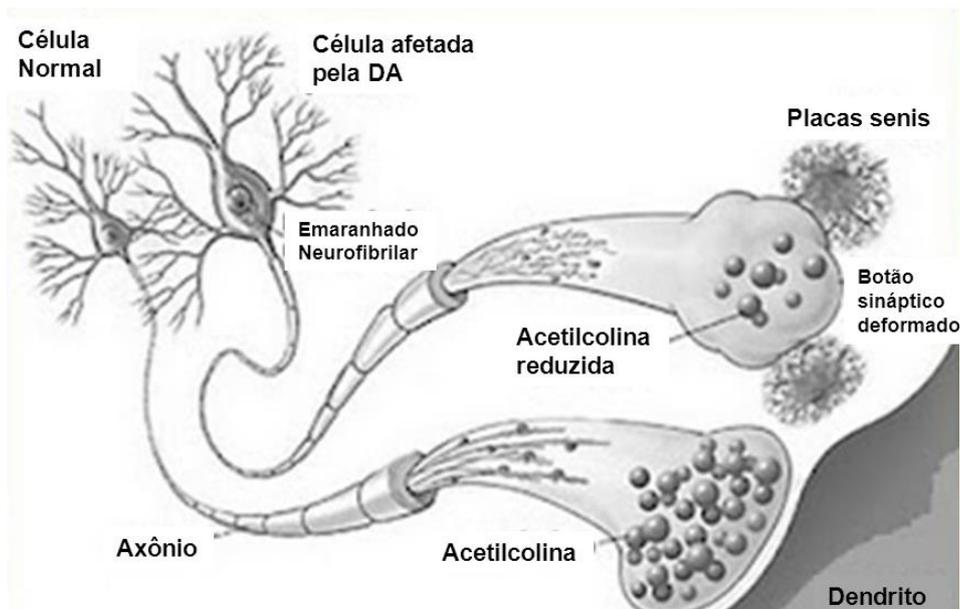
---

Apesar dos avanços dos fármacos propostos por esta hipótese, a HC apresenta limitações já que a mesma apresenta somente fins terapêuticos, uma vez que somente age na inibição da enzima AChE, não atuando na cura da doença, contribuindo apenas, para uma melhora comportamental. Diante disso atualmente existem outras hipóteses que tentam melhor elucidar as causas da doença e conseqüentemente encontrar a cura para a DA<sup>23-25</sup>.

### 1.2.2 – Hipótese Genética (HG)

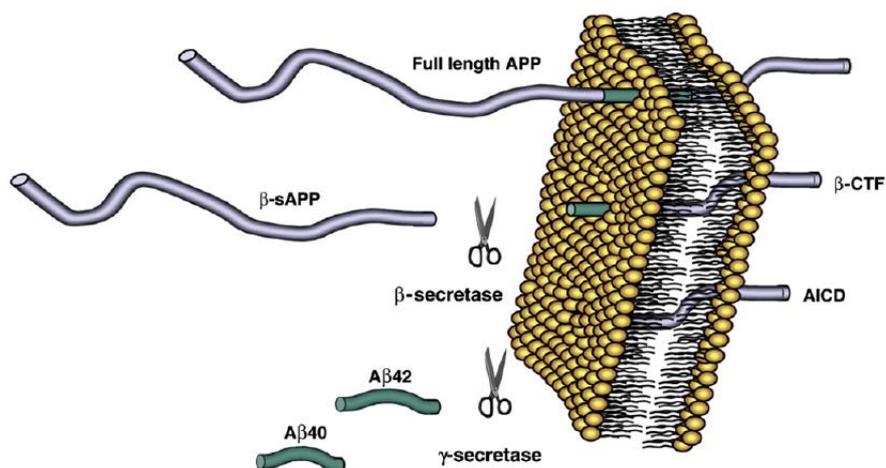
A hipótese genética está baseada no acúmulo de fragmentos de duas importantes proteínas; a proteína precursora amilóide (PPA), e a proteína Tau. As agregações podem ocorrer entre as células nervosas, provenientes do acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ -A), que são os fragmentos da PPA, sendo conhecidos por placas senis; ou no interior dessas células, resultante do acúmulo da proteína Tau, também conhecidos como emaranhados neurofibrilares. Independente da localização dos agregados, eles apresentam papel importante na progressão da doença de Alzheimer. Um dos focos deste projeto foi a pesquisa referente as agregações do peptídeo  $\beta$ -amilóide<sup>25-27</sup>.

A hipótese genética relacionada ao  $\beta$ -A, também conhecida como hipótese da cascata amiloida; aborda a presença de agregados amiloidais na forma fibrilar no cérebro dos portadores da DA. Esses agregados são formados no meio extracelular, ou seja, entre as células nervosas, dificultando a comunicação entre as mesmas (sinapses), desencadeando processos inflamatórios, que contribuem para o envelhecimento e morte celular. A Figura 1.6 exibe duas células nervosas, uma normal e outra doente, onde a célula doente apresenta a formação dos agregados amiloidais e da proteína Tau, e exibe também um déficit do neurotransmissor Ach<sup>28-</sup>

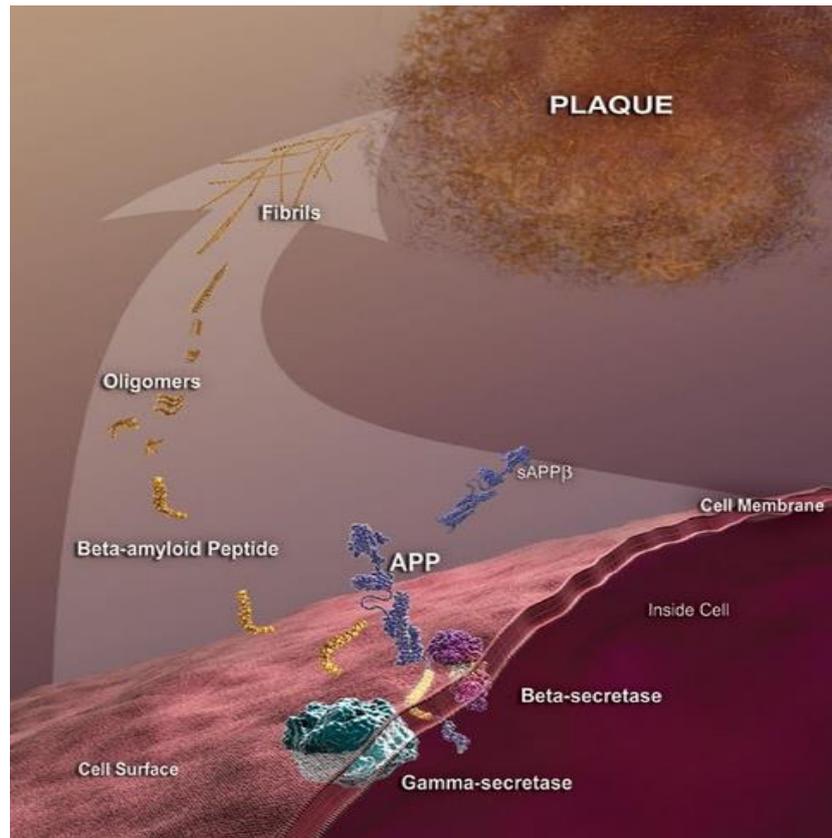


**Figura 1.6** - Representação de uma célula nervosa normal e doente (déficit de Ach, presença de emaranhados neurofibrilares e de placas senis).

De acordo com os estudos genéticos esses agregados são resultantes da mutação em 1 dos 3 genes da proteína precursora amilóide, onde essa proteína passa a ser produzida de maneira excessiva e clivada de forma incorreta pela enzima transmembrana  $\gamma$ -secretase, contribuindo para a agregação do peptídeos  $\beta$ -Amilóide de diferentes tamanhos ( $\beta$ -A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ -A<sub>1-42</sub>), resultando por fim, na formação das placas senis<sup>31-33</sup>. O esquema de clivagem e formação das placas senis podem ser visualizados nas Figuras 1.7 e 1.8, respectivamente.



**Figura 1.7** - Clivagem da PPA e formação dos fragmentos  $\beta$ -A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ -A<sub>1-42</sub>.

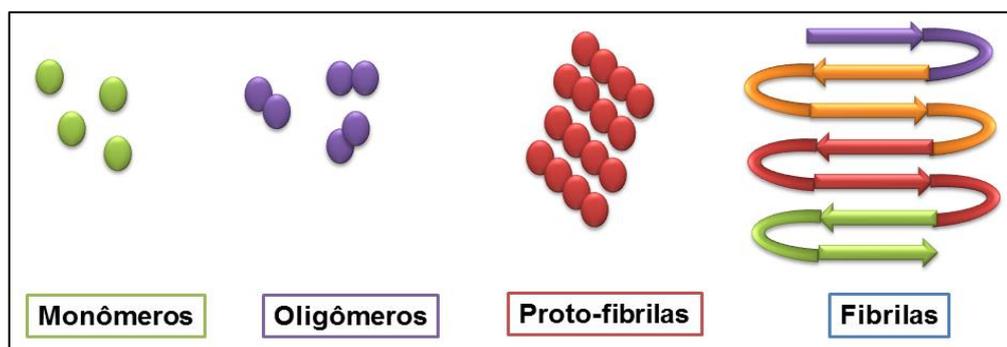


**Figura 1.8** - Processo de agregação dos fragmentos  $\beta$ -A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ -A<sub>1-42</sub>, formando os agregados fibrilares (placas senis).

Estudos recentes identificaram a presença de metais do tipo bivalentes e trivalentes como  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$  etc, nos agregados amiloidais resultando na formação de complexos bastante estáveis ( $\beta$ -A+M<sup>+n</sup>) entre o metal e o amilóide. Foi verificado que a presença desses metais favorecem um aumento da neurotoxicidade da doença, pois essa combinação  $\beta$ -A+M<sup>+n</sup> forma agregados mais insolúveis e propicia a formação de espécies reativas com oxigênio (ERO), contribuindo para o estresse oxidativo e conseqüentemente para o agravamento da doença<sup>34-37</sup>.

#### 1.2.2.1- Agregação do $\beta$ -Amilóide

Antes dos agregados amiloidas formarem as placas senis (densas e insolúveis), os peptídios se organizam em diferentes aglomerações, como podem ser visualizadas na Figura 1.9.

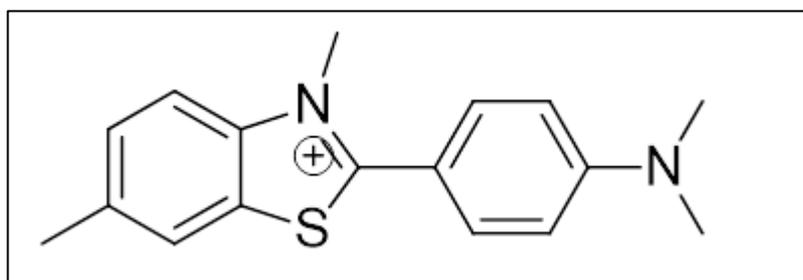


**Figura 1.9** - Diferentes formas de aglomeração do peptídeo  $\beta$ -amilóide.

O primeiro estágio do peptídeo é em sua forma monomérica, que é a forma não agregada. Posteriormente os monômeros de amilóide se agrupam, formando oligômeros, que se organizam formando as proto-fibrilas, e por fim, formam as fibrilas, que é o tipo de aglomeração mais nociva, por ser insolúvel e por ser capaz de interagir com os metais<sup>38-40</sup>.

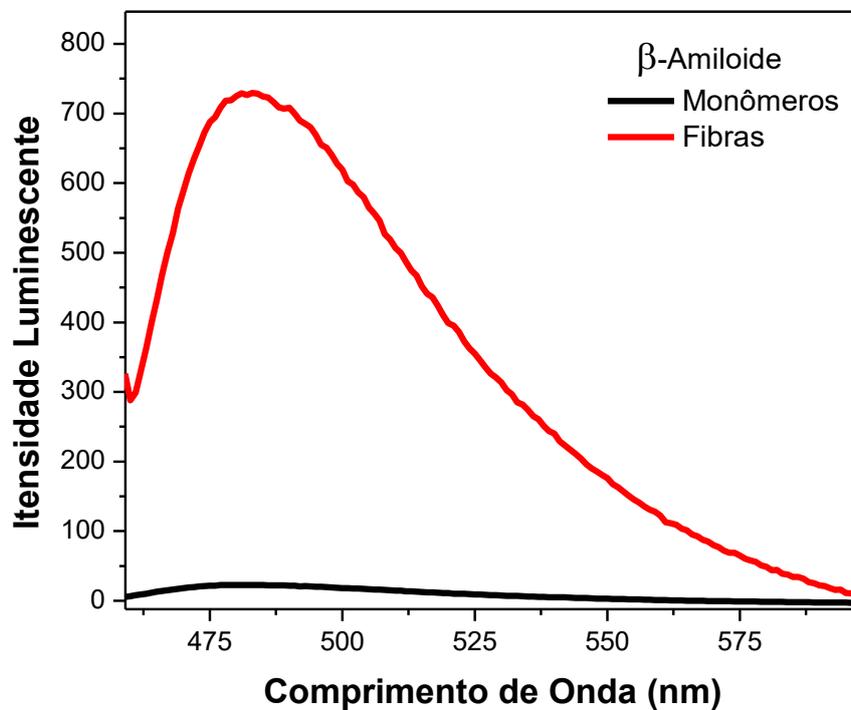
Não se conhece ao certo as causas que inicie o processo de agregação do  $\beta$ -A, mas sabe-se que os mesmos têm papel fundamental na evolução e agravamento da DA, sendo importante o estudo dos seus diferentes tipos de agregação. A formação desses agregados podem ser monitoradas a partir do uso de sondas biológicas que apresentem luminescência variável de acordo com os diferentes tipos de agregação do peptídeo<sup>41</sup>.

Uma das primeiras sondas utilizadas para essa finalidade foi a tioflavina T (ThT), sendo sua utilização intensificada nos anos 90. O corante ThT pertence ao grupo dos benzotiazóis<sup>42</sup>, cuja estrutura química pode ser visualizada na Figura 1.10.

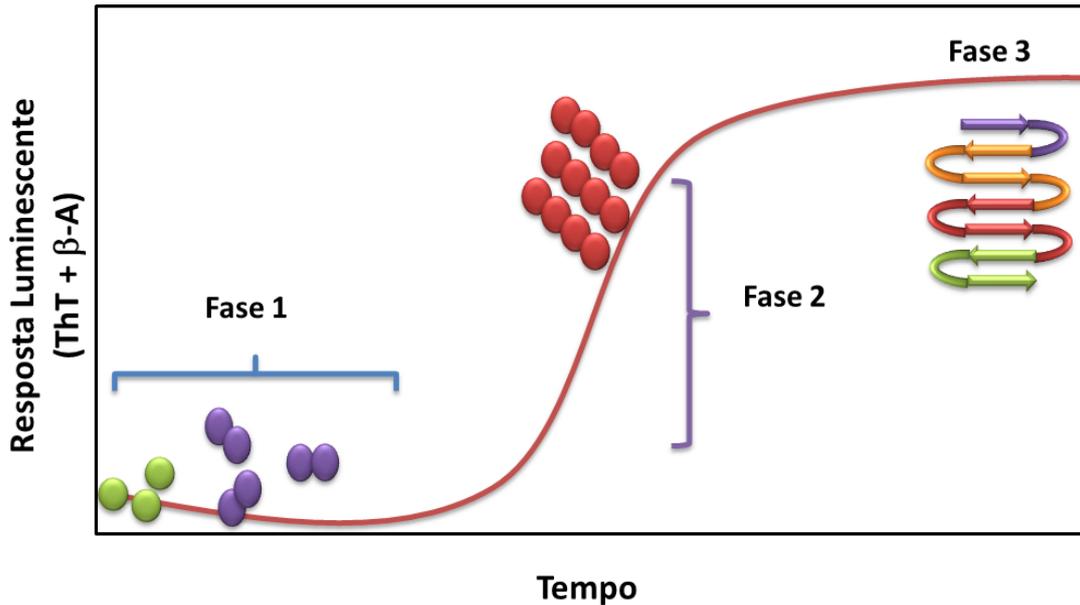


**Figura 1.10** - Estrutura química do corante Tioflavina T.

Esse corante apresenta baixa emissão fluorescente (FL) quando interage com o  $\beta$ -amilóide no seu estágio inicial de agregação (monômeros), mas a partir das primeiras formas de aglomeração a resposta de fluorescência muda, aumentando a partir da formação dos agregados maiores, ocorrendo um máximo de resposta quando as fibrilas são formadas<sup>43</sup> (Figura 1.11). A partir desse tipo de resposta é possível obter um gráfico em formato sigmoidal: resposta de fluorescência *versus* o tempo de incubação; sendo possível acompanhar o processo de agregação do  $\beta$ -A, como pode ser visualizado na Figura 1.12.



**Figura 1.11** - Emissão fluorescente da ThT T na presença dos monômeros, e na presença das fibrilas de  $\beta$ -amilóide.

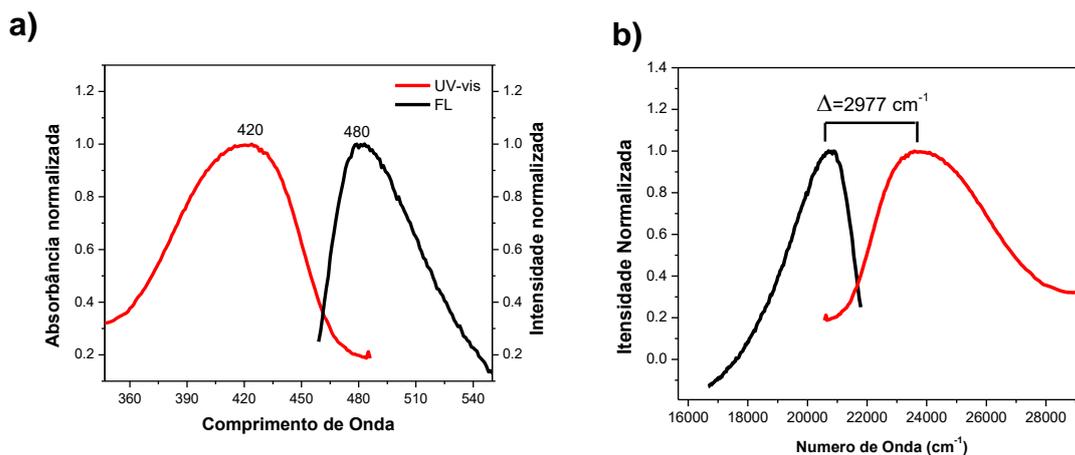


**Figura 1.12** - Processo de agregação do  $\beta$ -amilóide, acompanhado por luminescência através do uso de ThT como sonda em diferentes tempos de incubação.

Analisando a Figura 1.12 verifica-se que o processo de agregação é composto por 3 fases (de acordo com a inclinação da curva do gráfico), onde cada fase representa diferentes estágios de agregação do  $\beta$ -A. A primeira fase, também conhecida por ser a fase mais demorada (*lag phase*) é composta basicamente pelo peptídeo na forma monomérica e oligomérica; já a fase 2 é composta por agregados maiores e é verificado um aumento da resposta luminescente, essa fase é conhecida também como *elongation phase*. Na terceira e última fase, observa-se o máximo de resposta luminescente e é verificado também uma estabilidade da resposta FL, uma vez que a mesma não muda, já que atingiu o seu máximo. A fase 3 (*equilibrium phase*) é composta de agregados amiloidais na forma fibrilar<sup>44-46</sup>.

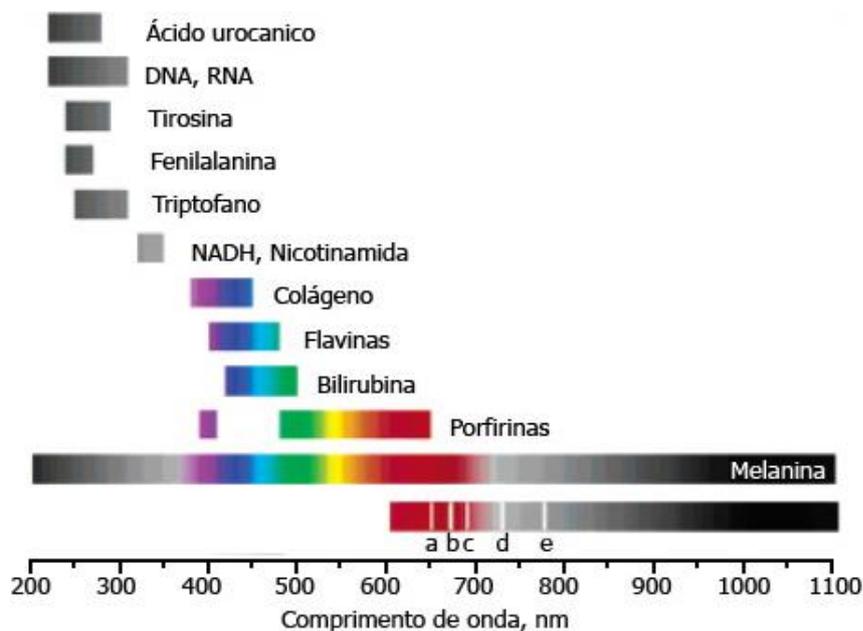
Apesar desse corante ser uma boa ferramenta para a determinação dos agregados fibrilares, o mesmo apresenta inconvenientes, como, um pequeno deslocamento Stokes ( $\approx 2977 \text{ cm}^{-1}$ ), pois a ThT absorve em 420 nm e emite em 480 nm, como pode ser visualizado na Figura 1.13(a) e (b). Esse pequeno deslocamento Stokes contribui para problemas como a autofluorescência, uma vez que a emissão e absorção desse corante, coincide com a absorção e emissão de alguns importantes componentes biológicos, como por exemplo a flavina, NAD(P)H, etc, e também coincide com algumas matrizes extracelulares, como o colágeno e

elastina. A autofluorescência não é interessante quando se pensa em uma sonda biológica, uma vez que a fluorescência que estará sendo observada durante o diagnóstico não será 100% do corante, já que existe a interferência dos componentes biológicos. Outro problema associado à ThT é o pequeno tempo de vida de fluorescência, que é menor que 10 ns, o que não é interessante quando se pensa na obtenção de imagens via FL, o que é desvantajoso para uma sonda biológica<sup>47-48</sup>.



**Figura 1.13** – Espectros de absorção e emissão: **(a)** em comprimento de onda, **(b)** em número de onda com deslocamento Stokes, para o corante ThT.

Diante disso é interessante a busca por novas sondas, que apresentem as propriedades seletivas da ThT (como ligar-se somente aos agregados fibrilares); mas que não apresente os seus inconvenientes fotofísicos (como pequeno deslocamento Stokes, autofluorescência, pequeno tempo de vida e reabsorção). Uma sonda vantajosa além de não apresentar os problemas observados pela ThT, tem que absorver na região do visível, já que é uma região não danosa ao meio celular, como pode ser visualizado na Figura 1.14 o qual exibe a janela fototerapêutica, ou seja, espectro de absorção das biomoléculas. A sonda também deve emitir na região do vermelho, ou do infravermelho próximo, para evitar problemas com autofluorescência e de reabsorção, e problemas com a dispersão da luz, contribuindo para que os tecidos absorvam mais, e conseqüentemente favorecendo o diagnóstico<sup>49-50</sup>.



**Figura 1.14** – Espectro de absorção das biomoléculas.

### 1.3 - Proposta do Trabalho

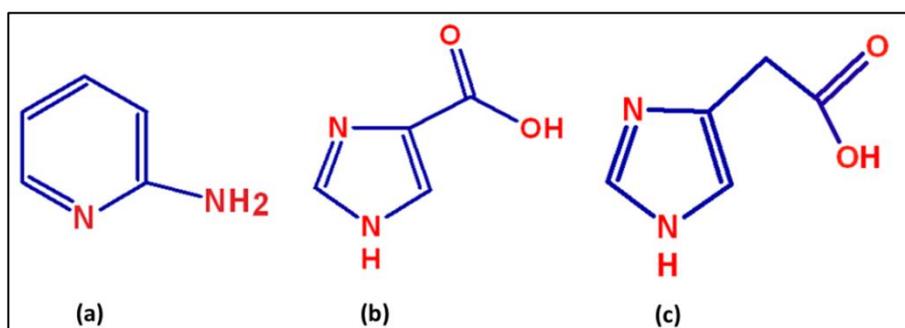
Diante os problemas apresentados pela HG e HC é importante o desenvolvimento de fármacos que atuem nas duas vertentes: na terapia da DA (inibição da enzima AChE), contribuindo para uma melhora comportamental do doente; e no diagnóstico da DA, como na detecção das fibras de  $\beta$ -A. Para essa finalidade foram escolhidas algumas biomoléculas da família dos imidazóis e da família das aminopiridinas, uma vez que essas moléculas apresentam propriedades farmacológicas interessantes, como será abordado no próximo tópico.

#### 1.3.1 - Ligantes

Para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos foram escolhidos moléculas da família dos imidazóis: o 4-Imidazol ácido carboxílico (4-ImAC) e 4-Imidazol Ácido Acético (4-ImAA), e da família das aminopiridinas, a 2-aminopiridina (2-Apy). Essas moléculas foram escolhidas devido as propriedades estruturais e biológicas que apresentam. Os imidazóis são estruturalmente semelhantes a histamina e ao GABA (ácido gama-aminobutírico), que são importantes neurotransmissores do sistema nervoso central. As aminopiridinas apresentam um

histórico de agirem no SNC, como a atuação nos canais de potássio das células nervosas, aumentando a concentração do neurotransmissor ACh, o que é fundamental para o funcionamento colinérgico<sup>51-53</sup>.

A Figura 1.15 exibe as estruturas químicas dos ligantes escolhidos neste trabalho.



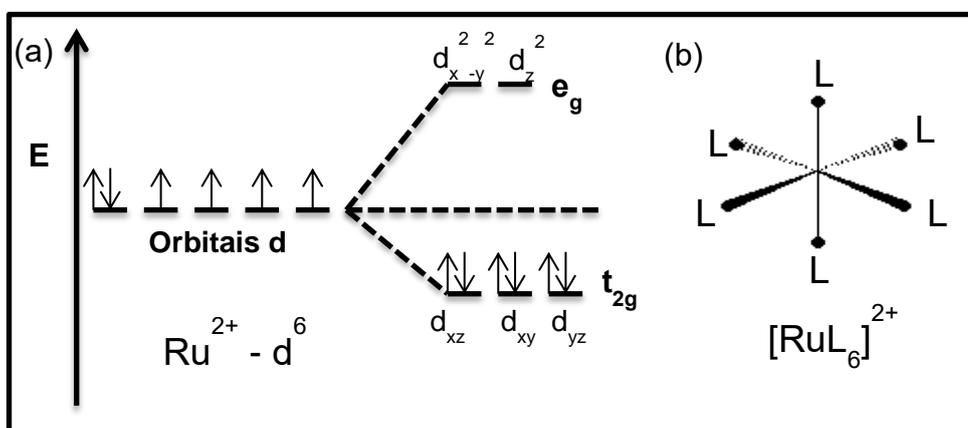
**Figura 1.15** - Estrutura química das moléculas: **(a)** 2-aminopiridina (2-Apy); **(b)** 4-Imidazol ácido carboxílico (4-ImAC); e **(c)** 4-Imidazol ácido acético (4-ImAA).

Mesmo essas biomoléculas apresentando excelentes características para o tratamento da DA, elas apresentam alguns inconvenientes, como os exibidos por ligantes estruturalmente semelhantes às mesmas, como por exemplo a 4-aminopiridina, que é um fármaco bastante estudado; que apresenta problemas quanto a biodistribuição no organismo e também pequeno tempo de retenção. Outro inconveniente que essas moléculas apresentariam seria a ausência de luminescência, o que comprometeria a ação diagnóstica dos agregados de  $\beta$ -amilóide. Uma das formas de reverter esses inconvenientes seria a coordenação desses ligantes a um centro metálico, formando os compostos de coordenação<sup>54</sup>.

### 1.3.2 - Complexos Metálicos

Neste trabalho foram desenvolvidos os complexos metálicos (CM) para serem as moléculas carreadoras dos candidatos a fármacos em estudo. O uso de complexos de metais de transição na medicina iniciou-se na década 60, onde os primeiros estudos foram realizados com os complexos de platina, para o tratamento de câncer, e desde então é crescente a pesquisa dos metais de transição no meio biológico<sup>55</sup>.

Para a construção da molécula carreadora, o centro metálico escolhido foi o rutênio (II), onde esse metal foi selecionado devido as propriedades químicas e biológicas que confere ao complexo metálico. O íon  $\text{Ru}^{2+}$  apresenta uma configuração eletrônica  $d^6$ , baixo spin [Figura 1.16 (a)], o que resulta em complexos bastante estáveis. O íon  $\text{Ru}^{2+}$  funciona como um ácido de Lewis, uma vez que apresentam orbitais d vazios ou semi-preenchidos, apresentando afinidade por ligantes ricos em elétrons, como por exemplo, os ligantes polipiridínicos, que funcionam como uma base de Lewis<sup>56</sup>. O rutênio (II) pode realizar 6 ligações, onde a geometria obtida é do tipo octaédrica como pode ser visualizado na Figura 1.16 (b).



**Figura 1.16** – Esquema da (a) Configuração eletrônica dos orbitais d, (b) geometria octaédrica, apresentada para os complexos de rutênio (II).

Os complexos de rutênio apresentam características importantes no meio biológico, como baixa toxicidade, pois o rutênio mimetiza o ferro em ligações com biomoléculas, como a transferrina. Outra importante característica são as suas propriedades redox, que são acessíveis ao meio biológico, já que o íon metálico pode ser reduzido e oxidado por componentes do meio, como por exemplo a glutatona ou ascorbato, que podem reduzir o centro metálico ( $\text{Ru}^{3+}$  e  $\text{Ru}^{4+}$ ), e a sua oxidação por oxigênio molecular ou citocromo. Outra relevante característica desses complexos no meio fisiológico é a sua interação com as proteínas do plasma sanguíneo, envolvidas na distribuição, excreção e eficiência terapêutica nos organismos de mamíferos, como a albumina e transferrina<sup>57-59</sup>.

---

Ao centro metálico serão coordenados tanto os ligantes exibidos na seção 1.3.2 e também duas moléculas de 1,10-fenantrolina na posição *cis*. Esse ligante polipiridínico foi escolhido devido às contribuições que dará ao complexo metálico, tais como, hidrofobicidade, propriedade importante na biodistribuição do fármaco no organismo; contribuindo também com interações no meio biológico, como as interações  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas. Outra relevante contribuição é na emissão luminescente do complexo, sua molécula vibra menos, devido os ligantes fenantrolina travarem o complexo, contribuindo para a emissão luminescente<sup>60</sup>. Essas e outras características do complexo final, como largo deslocamento Stokes fazem com que essas moléculas, sejam adequadas para o desenvolvimento do nosso trabalho.

---

## 2. Objetivos

### 2.1 - Geral

- Desenvolver candidatos a fármacos usando compostos de coordenação luminescentes, para atuarem no diagnóstico e tratamento da doença de Alzheimer.

### 2.2- Específicos:

- Sintetizar, isolar, caracterizar os complexos de rutênio: e avaliar as propriedades espectroscópicas (Uv-visível, RMN de  $^1\text{H}$ , FT-IR), eletroquímicas (voltametria cíclica e espectroeletroquímica) e fotofísicas (estado estacionário e resolvido no tempo) dos complexos *cis*-[Ru(phen) $_2$ (4-ImAC)]PF $_6$ , *cis*-[Ru(phen) $_2$ (4-ImAA)]PF $_6$  e *cis*-[Ru(phen) $_2$ (2-Apy)](PF $_6$ ) $_2$ ;
- Estudar a viabilidade dos complexos no meio biológico a partir das medidas de citotoxicidade celular, e por microscopia confocal com as células HeLa;
- Avaliar as propriedades terapêuticas dos complexos determinando o seu potencial de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase;
- Verificar as propriedades diagnósticas dos complexos de rutênio na presença de diferentes tipos de agregação  $\beta$ -Amilóide através das medidas de emissão luminescente, e por microscopia fluorescente por tempo de vida de emissão;
- Estudar a estabilidade e interações dos complexos com a proteína de transporte HSA (Albumina Serina Humana) por medidas espectroscópicas de UV-Vis, emissão, dicroísmo circular (DC) e por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 – Reagentes

Na Tabela 3.1 consta o número de mols dos reagentes utilizados na síntese dos complexos de rutênio, a sua procedência e o grau de pureza.

**Tabela 3.1** - Procedência e grau de pureza dos reagentes utilizados na síntese dos complexos de rutênio

Reagentes	nº de mmols	Pureza/Procedência
Cloreto de rutênio ( $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	1,15	99,9% Aldrich
1,10-Fenantrolina [ $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ ]	2,30	99,9% Aldrich
Cloreto de lítio ( $\text{LiCl}_3$ )	8,00	99,9% Aldrich
Hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ )	0,20	99,5% - Synth
4-Imidazol Ácido Carboxílico (4-ImAC)	0,10	99,9% Aldrich
2-Aminopiridina (2-Apy)	0,10	99,9% Aldrich
Imidazol Ácido Acético (ImAA)	0,10	99,9% Aldrich

Todos os solventes utilizados no procedimento experimental foram de procedência HPLC (dimetilformamida (DMF), acetona, etanol e acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )).

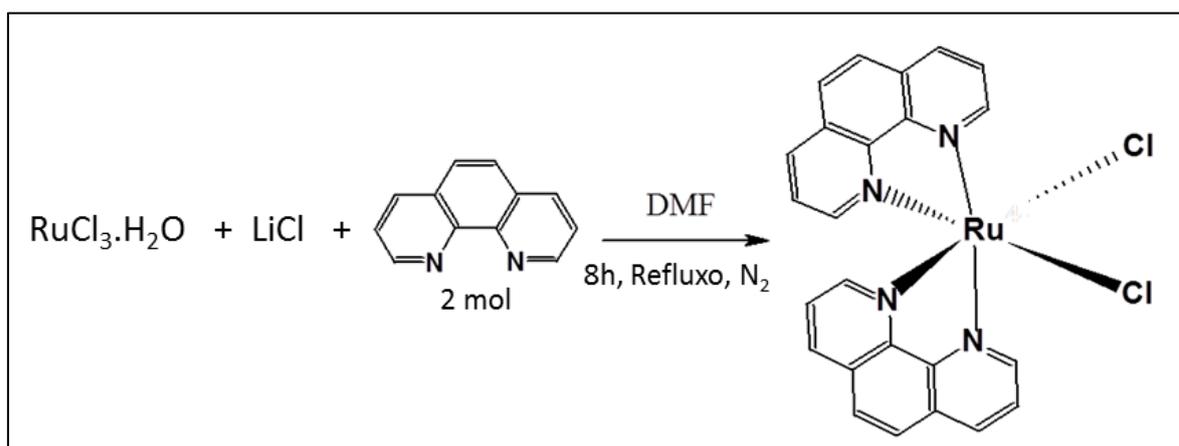
#### 3.2- Síntese

A síntese dos complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-ImAC})]\text{PF}_6$ , *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ImAA})]\text{PF}_6$  e *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(2\text{-Apy})](\text{PF}_6)_2$ , ocorreu em duas etapas como descrito, e exibido pelas Figuras 3.1 e 3.2.

### 3. Procedimento Experimental

#### 3.2.1- Primeira Etapa

A primeira etapa das sínteses constituiu na obtenção do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. O complexo foi preparado a partir de 1,15 mmol de RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O; 2,3 mmol de fenantrolina e 8,0 mmol de cloreto de lítio dissolvidos em 15 mL de dimetilformamida previamente desaerado. O sistema permaneceu sob-refluxo, em atmosfera de nitrogênio, com agitação e aquecimento constante. O balão reacional foi recoberto com papel alumínio para evitar a exposição do mesmo à luz. Após o tempo de síntese foi adicionado à mistura reacional 200 ml de acetona previamente destilada. A mistura resultante foi mantida sob-refrigeração por uma noite (12 horas), para a completa precipitação do complexo. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada gelada e seco a vácuo<sup>61</sup>. O rendimento obtido foi de 62%. A Figura 3.1 exibe de forma simplificada a equação da reação da etapa 1.



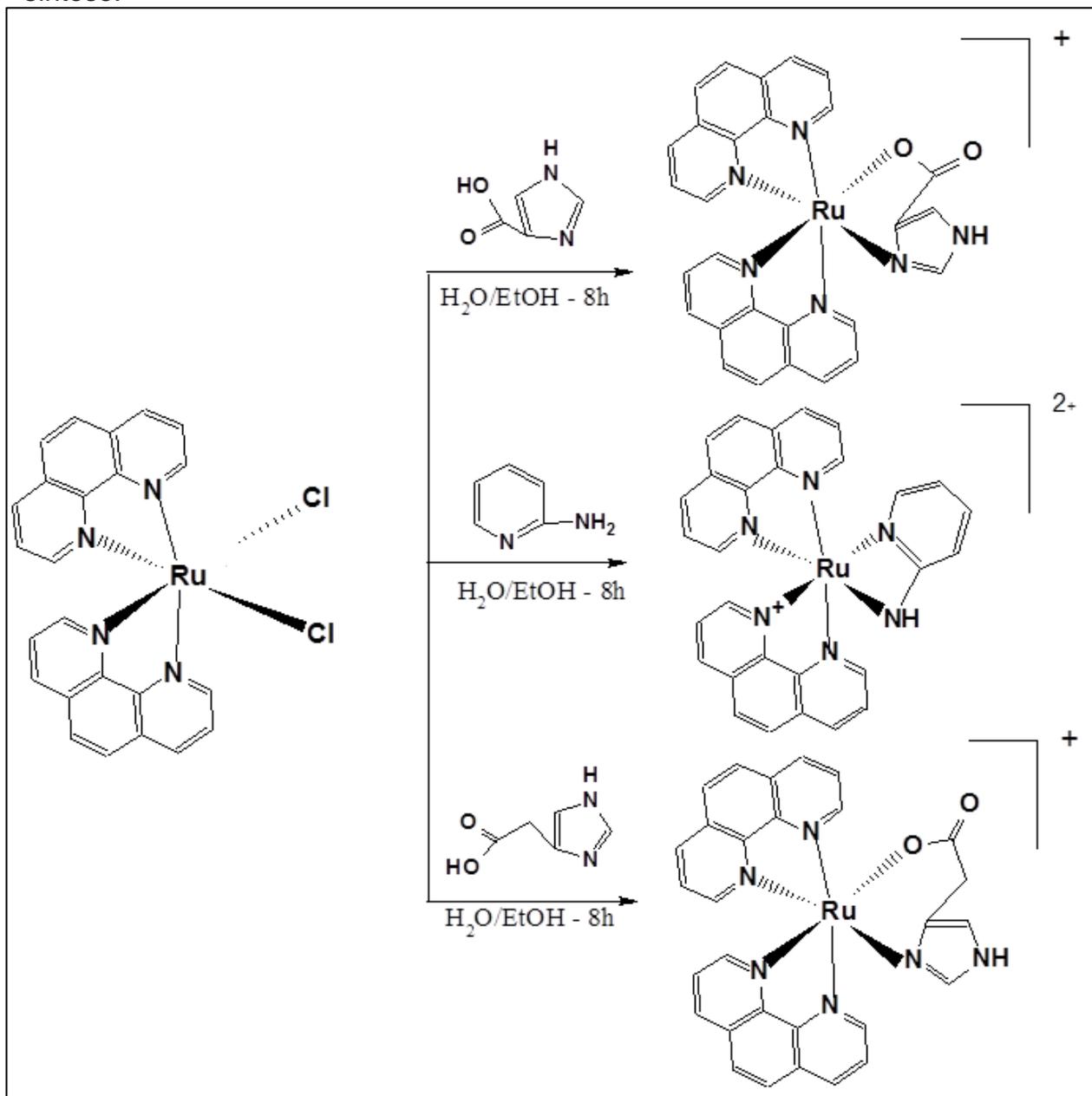
**Figura 3.1** - Esquema da reação para a primeira etapa da síntese, obtenção do complexo precursor.

#### 3.2.2 - Segunda Etapa

Os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, foram preparados a partir de 0,10 mmol do precursor *cis*-Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 0,10 mmol de 4-imidazol ácido carboxílico, 0,10 mmol de imidazol ácido acético e 0,10 mmol de 2-aminopiridina. Os reagentes foram dissolvidos em 10 mL de (etanol/água) previamente desaerados, com agitação contínua e aquecimento. O sistema permaneceu refluxando por oito horas sob atmosfera de nitrogênio, aquecimento, agitação e ausência de luz. Após este período deixou-se o sistema resfriar, e posteriormente foi adicionado 0,20 mmol do contra íon

### 3. Procedimento Experimental

hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ). Os complexos foram filtrados a vácuo e lavados com água e etanol gelada. Posteriormente foram secos a vácuo e estocados em dessecador<sup>62</sup>. O rendimento das 3 sínteses foram superior a 70%. A Figura 3.2 exibe a equação da reação para a etapa 2, e os complexos finais obtidos em cada síntese.



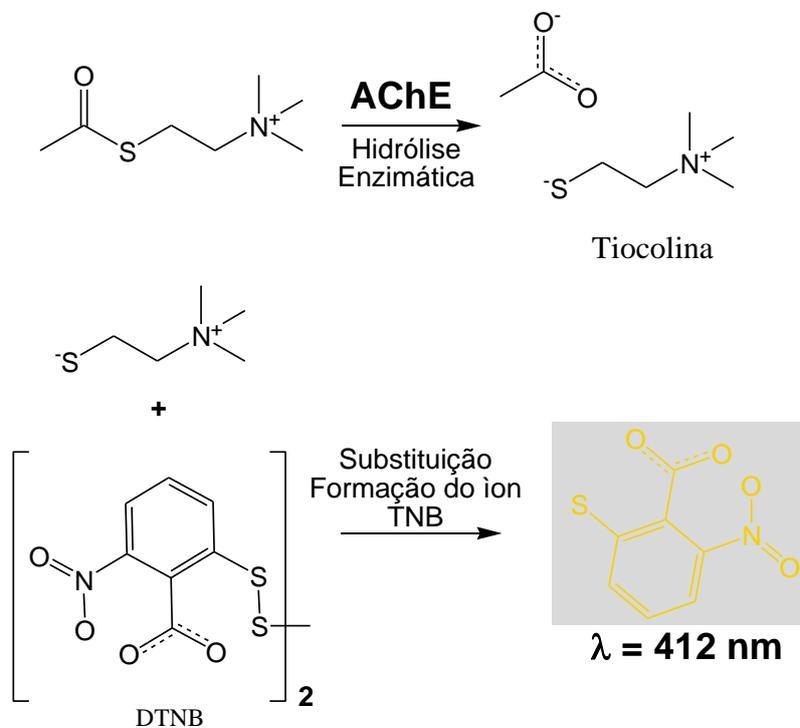
**Figura 3.2** - Esquema da reação para a segunda etapa da síntese e os três complexos de rutênio obtidos em cada síntese.

### 3. Procedimento Experimental

#### 3.3- Estudos Biológicos

##### 3.3.1 - Experimentos de Inibição Enzimática

Os experimentos de inibição da enzima AChE basiam-se no método de inibição proposto por Ellman (1961)<sup>63</sup>. Esse método baseia-se na hidrólise do iodeto de acetilcolina, pela enzima AChE, onde é formado o íon tiocolina, que reage com o reagente de Ellman (DTNB), formando um ânion amarelo que absorve em 412 nm. A mudança na atividade ótica a 412 nm por unidade tempo é a medida da atividade da enzima AChE. O esquema das reações envolvidas na inibição enzimática de acordo com o método proposto por Ellman podem ser visualizados na Figura 3.3:



**Figura 3.3** - Esquema das reações envolvidas na inibição da enzima AChE de acordo com o método proposto por Ellman.

Na Tabela 3.2 consta a procedência dos reagentes utilizados nos experimentos de inibição enzimática. Nos experimentos de inibição foram utilizados diversas soluções, as quais estão descritas na Tabela 3.3.

### 3. Procedimento Experimental

**Tabela 3.2** - Reagentes, grau de pureza e procedência dos reagentes utilizados nos experimentos de inibição enzimática

Reagentes	Procedência
DTNB Ácido5, 5' Ditiobis-[2- nitrobenzóico]	Sigma-Aldrich
Iodeto de Acetilcolina (AChI)	Sigma-Aldrich
Tris HCl	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio (NaCl)	Merck
Cloreto de Magnésio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Merck
Enzima acetilcolinesterase (AChE)	Sigma-Aldrich
Albumina Serina Bovina (BSA)	Sigma-Aldrich

**Tabela 3.3** - Soluções utilizadas nos experimentos de inibição enzimática

Soluções	Concentração
(1) Solução de Tris/HCl pH 8	0,05 M
(2) Solução dos sais: NaCl e MgCl <sub>2</sub>	0.1 M / 0,02M
(3) Solução de Ácido5, 5' Ditiobis-[2- nitrobenzóico]	0,01 M
(4) Solução de Iodeto de acetilticolina (AChI)	0,01 M
(5) Solução de AChE	5 U/mL
(6) Solução de soroalbumina bovina (BSA)	0,1%
(7) Solução dos complexos de rutênio	0,03 M

A solução de Tris/HCl pH 8 (1) foi utilizada na preparação das soluções (2) e (6). Já a solução de DTNB foi preparada a partir da solução dos sais (2), e a solução

### 3. Procedimento Experimental

---

de AChE foi preparada a partir da solução de BSA. A solução do substrato (AChI) foi preparada utilizando água Milli-Q. Para preparar a solução dos complexos de rutênio foi utilizado o solvente metanol.

Em uma cubeta de plástico foram adicionados 2,875  $\mu\text{L}$  da solução de DTNB, 100  $\mu\text{L}$  de complexo (100  $\mu\text{M}$ ), 15  $\mu\text{L}$  da enzima. Após a adição da enzima deixou-se o sistema incubando por 15 minutos, e após esse tempo, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de substrato e iniciou-se a medida da cinética enzimática em 412 nm. Para a realização da medida do branco, ou seja, a atividade da enzima sem inibidor, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do solvente metanol, sem complexo. A porcentagem de inibição dos complexos foi obtida, comparando com a atividade da enzima livre, sem inibidor, onde a mesma foi estipulada como 100% de atividade.

Para a determinação do  $\text{IC}_{50}$  (concentração de complexo que inibe 50% da atividade da enzima), variou-se a concentração dos complexos (0-100  $\mu\text{M}$ ), e a concentração do substrato foi mantida constante 100  $\mu\text{M}$ . Nos estudos de determinação do tipo inibição, variou-se a concentração do substrato de (50-300  $\mu\text{M}$ ), e foi utilizada a concentração de (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) para os complexos.

### 3. Procedimento Experimental

---

#### 3.3.2- Experimentos com o $\beta$ -Amilóide

A Tabela 3.4 contém reagentes utilizados nos experimentos com o peptídeo  $\beta$ -amilóide, e a sua procedência.

**Tabela 3.4** - Procedência dos reagentes utilizados nos ensaios com  $\beta$ -amilóide

Reagentes	Procedência
Tioflavina (ThT)	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado	Merck
Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado	Merck
Hidróxido de sódio	Merck
Cloreto de sódio	Fisher Scientific
$\beta$ -Amilóide ( $\beta$ -A <sub>1-40</sub> )	21st Century Biochemicals
Ácido Trifluoroacético (TFA)	Sigma-Aldrich

##### 3.3.2.1- Purificação do peptídeo

O peptídeo bruto ( $\beta$ -A<sub>1-40</sub>) foi dessalinizado e concentrado usando filtros Sartorius Stedim Vivaspin 15R centrifugação. A solução dessalinizada foi liofilizada usando um Labconco CentriVap concentrador, onde posteriormente, o mesmo foi purificado por HPLC de fase reversa em uma coluna Waters XBridge Prep C18. O peptídeo puro foi armazenado a -20 °C para uso posterior.

##### 3.3.2.2- Preparação do amilóide

O peptídeo purificado e liofilizado foi dissolvido em 200  $\mu$ L de solução de NaOH de 2 mM (150  $\mu$ L) e 100 mM (50  $\mu$ L). A solução de peptídeo foi sonicada durante 2 minutos em um banho de ultrassom, e em seguida, filtrada com filtros de centrífuga (VWR) de porosidade 0,2 $\mu$ m, por 10 minutos a 5000g. A solução do filtrado foi ajustada para 400  $\mu$ L, utilizando tampão fosfato de sódio (fosfato de sódio 100 mM a pH 7,4 , NaCl 150 mM ) e , em seguida, a concentração do péptido na

### 3. Procedimento Experimental

---

forma monomérica foi determinada utilizando um coeficiente de extinção de 1280 L.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> a 280 nm num espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 2450<sup>64</sup>.

#### 3.3.2.3- Processo de incubação do amilóide

Os monômeros de  $\beta$ -A foram preparados como descrito acima e, em seguida, foram diluídos até à concentração desejada em PBS (100 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,4). A tioflavina e os complexos foram adicionados onde suas concentrações variaram de acordo com os experimentos realizados, como serão explicados a seguir.

##### 3.3.2.3.1- Estudo do Monitoramento da Agregação (*Real time*)

Aliquotas de 400  $\mu$ L da solução de peptídeo na concentração de 50  $\mu$ M foram adicionados em tubos de RMN, onde posteriormente foram adicionados os sensores nas concentrações de 0,5, 1 e 5  $\mu$ M para os complexos, e de 1  $\mu$ M para a ThT. As amostras foram incubadas a 37 °C e agitadas a 900 rpm utilizando um Fischer Scientific Microtube misturador térmico. A formação das fibrilas de  $\beta$ -A foi monitorada em intervalos de 30 minutos, utilizando um fluorímetro HORIBA Jovin Yvon Fluorolog 3. Os tubos de RMN foram inseridos dentro da cubeta de quartzo contendo água para a realização das medidas. Antes de cada medida cada tubo de RMN foi brevemente agitado em vortex (~1-2 s)<sup>64</sup>.

A ThT foi excitada em 450 nm, o *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em 450 nm, e os complexos imidazólicos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> (RuImAAc) em 500 nm. A emissão foi medida num intervalo de 550-800 nm para os complexos, e para a ThT foi utilizado o intervalo de 460-600 nm. Os pontos de dados no ensaio de fibrilização do  $\beta$ -A são as intensidades máxima de emissão a 484 e 700 nm para ThT e complexos, respectivamente, em diferentes pontos de tempo. Foi guardada uma alíquota em cada tempo de incubação, para serem realizadas medidas microscopia como será abordado.

##### 3.3.2.3.2- Ensaio de Ligação com o peptídeo (*Binding Assay*)

Para os ensaios de interação foram utilizados o amilóide na forma fibrilar, onde os procedimentos de obtenção das fibrilas foram realizados como descritos anteriormente. Nesse experimento a concentração de  $\beta$ -A foi de 4  $\mu$ M e a

### 3. Procedimento Experimental

concentração dos complexos variaram de 0.5 a 150  $\mu\text{M}$ . As medidas foram realizadas da mesma forma como a descrita nos ensaios de *Real time*. A constante de dissociação foi determinada usando a equação 1, como pode ser visualizada abaixo<sup>15</sup>:

$$L = f_{Ru}Ru_{Tot} + \frac{f_{\beta A-Ru} - f_{Ru}}{2} (Ru_{Tot} + \beta A_{Tot} + K_d - \sqrt{(Ru_{Tot} + \beta A_{Tot} + K_d)^2 - 4Ru_{Tot}\beta A_T}) \quad (3.1)$$

Onde:

$L$  = Luminescência

$f_{\beta A-Ru}$  = fração Molar do  $\beta$ -amilóide

$K_d$  = Constante de dissociação

menos a do rutênio

$f_{Ru}$  = Fração molar do rutênio

$\beta A_{Tot}$  = Fração molar do amilóide total

$Ru_{Tot}$  = Fração molar do rutênio total (amilóide livre + amilóide ligado ao rutênio livre + rutênio ligado a proteína) rutênio)

#### 3.3.2.3.3- Determinação da Esterquiometria (*Job Plot*)

O amilóide fibrilar foi obtido como descrito anteriormente, e a concentração de 20 e 100  $\mu\text{M}$  foram as concentrações de partida de  $\beta$ -A utilizadas nos experimentos. A luminescência foi obtida variando a relação complexo metálico - peptídeo com o total das concentrações fixas em 20 e 100  $\mu\text{M}$ . A relação molar de *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> foi definida como o número de moles de complexo dividido pelo total de moles na solução, que é *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> +  $\beta$ -A. A relação molar de  $\beta$ -A foram obtidas a partir da subtração da fração molar do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> de 1. O número de monômeros de  $\beta$ -A por complexo de rutênio foi calculado pela divisão da fração molar de  $\beta$ -A pela fração molar do complexo<sup>65</sup>.

#### 3.3.2.4- Obtenção das Imagens

A fim de verificarmos e confirmarmos os diferentes tipos de agregação do  $\beta$ -amilóide foi realizado as medidas de imagens por Microscopia confocal por tempo de vida de emissão, e por Microscopia eletrônica de transmissão. Para os estudos foram guardadas aliquotas dos diferentes tempos de incubação do  $\beta$ -amilóide no experimento descrito na seção 3.3.2.3.1 com o complexo com aminopiridina. Foram

### 3. Procedimento Experimental

---

obtidas imagens por microscopia confocal do peptídeo com tempos de incubação de (0; 0.5; 1; 3; 5 e 24 horas).

#### 3.3.2.4.1- Microscopia Confocal (MC)

Para as medidas de MC as amostras foram depositadas em lamínulas de vidro para microscópio. Foi depositado cerca de 20  $\mu$ L de amostra ( $\beta$ A+complexo), e deixou-se secar á temperatura ambiente. Após secas, as laminulas foram estocadas em um dessecador, até serem utilizadas nos experimentos. Nas medidas de MC foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 450 nm, e as imagens foram obtidas por tempo de vida de emissão do complexo de rutênio<sup>66</sup>.

#### 3.3.2.4.2- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras foram depositadas grades de cobre com filme de carbono 200 mesh (Ted Pella 01811). Nos substratos foram depositados cerca de 3 mL da amostra, e posteriormente foi adicionado o mesmo volume do contraste negativo acetato de uranila a 3%. Após a secagem foram realizadas a obtenção das imagens em um microscópio JOEL 1230 operado a 80 KV. As amostras utilizadas nesse experimento foram as de 0 e 24 horas de incubação<sup>64</sup>.

### 3.3.3- Estudos com a célula HeLa

Foram realizados estudos de citotoxicidade e de microscopia confocal utilizando as células da linhagem celular HeLa (câncer do colo de útero). A Tabela 3.5 exibe os reagentes e soluções utilizados nesses experimentos, e suas respectivas siglas<sup>66</sup>.

### 3. Procedimento Experimental

**Tabela 3.5** - Lista de reagentes utilizados nos ensaios com a célula HeLa de citotoxicidade e microscopia confocal

Reagentes	Sigla
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> sem fenol e sem soro fetal bovino	DMEM
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> com vermelho fenol suplementado com 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino	DMEM (1%/10%)
Metil tiazol tetrazólio (1,2 mg.mL <sup>-1</sup> em PBS)	MTT
Dimetilsulfóxido	DMSO
Tampão fosfato salino pH 7,2 (0,1 M)	PBS

#### 3.3.3.1- Citotoxicidade

As células HeLa foram colocadas em placas de 24 poços na densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/poço. Após 18-24 horas as células foram incubadas com soluções em meio DMEM sem fenol red e sem soro fetal bovino com diferentes concentrações dos complexos e por 3 horas de incubação. Após a incubação as células foram lavadas com PBS. Foi adicionado 500  $\mu$ L do meio de cultura (DMEM) e as placas foram mantidas em estufa por mais 48 horas. Posteriormente foram adicionados 50  $\mu$ L da solução de MTT, sob incubação por 2 horas. Após a incubação retirou-se a solução de MTT e adicionou-se 500  $\mu$ L de DMSO. A medida de absorbância foi realizada em um leitor de placas em 560 nm e a porcentagem de células vivas foi calculada em relação às células controle (incubadas apenas com meio de cultura). Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão<sup>67</sup>.

### 3. Procedimento Experimental

---

#### 3.3.3.2- Microscopia Confocal

Os experimentos com cultura de células foram realizados posteriormente à obtenção das células aderidas às placas. Após o descongelamento das células e crescimento das mesmas em garrafas (em meio de cultura DMEM (1%/10%) – com vermelho fenol suplementado com 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino; estufa à 37 °C, ambiente úmido e na presença de 5% de gás carbônico), as células foram contadas e colocadas em placas individuais contendo uma lamínula em seu interior na densidade de  $10^4$  células/poço. Após aderência das células em um período de 18 horas, as mesmas foram incubadas com o complexo metálico na concentração de  $3,5 \times 10^{-4}$  M em meio DMEM, durante 4 horas.

Após este período, as células foram lavadas 2 vezes com PBS. Posteriormente as lamínulas molhadas com PBS foram colocadas sobre lâminas e vedadas com esmalte. As imagens foram obtidas em um microscópio confocal (Zeiss LSM510). Para obtenção das imagens de fluorescência das células foram usados filtros em 456 e 488 nm na excitação e 580-700 nm na emissão<sup>66,67</sup>.

#### 3.3.4 - Experimentos com a Proteína HSA

##### 3.3.4.1-Dicroísmo Circular (DC)

O complexo de rutênio (RuApy) foi incubado com as proteínas HSA e  $\beta$ A nas concentrações 1  $\mu$ M e 3 $\mu$ M, respectivamente, em tampão tris/HCl 50 mM pH 7,4. Os complexos foram incubados com as proteínas por 24 horas e depois feitas as medidas no DC. Os espectros foram obtidos com a acumulação de 16 varreduras no intervalo de comprimento de onda 198-250nm.

##### 3.3.4.2- Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Na cela reacional foi adicionado aproximadamente 1,43 mL de solução de HSA a 111  $\mu$ M. Na seringa utilizada na titulação foi adicionado a solução de complexo na concentração de 800  $\mu$ M. O HSA e o complexo foram preparados no mesmo tampão com pH $\approx$ 7,4. Antes de iniciar a titulação o meio reacional foi

### 3. Procedimento Experimental

---

equilibrado a uma temperatura de 37 °C e logo após foi iniciado o experimento. Foram adicionados 30 injeções de 8 µL de complexo no intervalo de tempo de 180s.

#### 3.3.5 – Determinação do Log P e da solubilidade

Foram obtidas informações a cerca da solubilidade e lipofilicidade dos complexos de rutênio. Esses experimentos são muito importantes, uma vez que vão nos dar informações de como será a afinidade desses complexos no meio biológico, assim como informações de interação e biodistribuição dos mesmos. Os experimentos foram obtidos a partir do método de “Shake-Flask”, onde foi utilizado nos testes soluções tampões (pH 3,6 e 7,4) simulando os meios fisiológicos (estômago e corrente sanguínea) e o solvente 1-octanol, mimetizando a barreira celular<sup>68</sup>.

##### 3.3.5.1 - Solubilidade

A solubilidade dos complexos de rutênio foram obtidas em solução tampão Tris/HCl em pH 3.6 e 7.4. Os experimentos foram realizados a 37 °C pelo método de Shake flask. Em 2 mL de solução tampão foi adicionado um excesso de complexo até a saturação. As suspensões foram agitadas numa temperatura de 37 °C durante 24 horas a 50 rpm. As amostras foram centrifugadas durante 8 minutos em um centrífuga FANEM 206-R a 220 rpm. Posteriormente a solução foi filtrada, e foi determinada a concentração dos complexos por medidas em um espectrofotômetro na região do UV-Vis.

##### 3.3.5.2 – Log P (Coeficiente de Partição)

O valor do Log P (lipofilicidade ou coeficiente de partição) foi determinado através do método de shake flask utilizando o solvente 1-octanol como a fase orgânica, e a solução tampão (Tris/HCl em pH 3.6 e 7.4.) como a fase aquosa. Os complexos a 100 ppm foram adicionados individualmente a mistura de 1 mL de 1-octanol e 1mL de tampão, que permaneceu sob agitação durante 24 horas a 50 rpm e 37 °C. Depois as amostras foram centrifugadas durante 8 minutos a 220 rpm. As duas fases foram separadas e a concentração dos complexos foi determinada por ICP-OES (Varian VISTA). Os experimentos foram realizados em duplicata. O valor de Log P foi calculado através da equação 3.2.

### 3. Procedimento Experimental

---

$$\log P = \log \frac{[\text{Complexo}]_{org}}{[\text{Complexo}]_{Aq}} \quad 3.2$$

Onde:

$\log P$  = Coeficiente de Partição  
 $[\text{Complexo}]_{org}$  = Concentração do complexo na fase orgânica  
 $[\text{Complexo}]_{Aq}$  = Concentração do complexo na fase aquosa

#### 3.3.6- Cálculos Computacionais

A estrutura da geometria otimizada dos complexos de rutênio foi obtida utilizando o software Gaussian 0959, empregando o método teoria do funcional de densidade (DFT) e a base funcional B3LYP60 com um conjunto de base LanL2DZ.61,62,63 O solvente acetonitrila foi incluído utilizando o modelo de polarização contínua (PCM). A partir das estruturas otimizadas foi possível obter os espectros de absorção teórico para os complexos, a partir do Gaussian 200<sup>69</sup>.

#### 3.3.7 – Caracterização dos complexos

##### 3.3.7.1- Equipamentos

- **Análise Elementar:** A determinação da porcentagem de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram efetuadas em um analisador de carbono, hidrogênio e nitrogênio, modelo EA 1108 da FISOONS, na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

- **Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN):** Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $H^1$  foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz e/ou ARX 200 MHz pertencentes ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

- **Comportamento eletroquímico:** As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se o potenciostato/galvanostato – AUTOLAB, modelo type III, sendo a cela eletroquímica de vidro, com capacidade para 5 mL e três eletrodos: um de referência Ag/AgCl armazenado em solução de KCl a 3,0 mol.L<sup>-1</sup> (solução saturada), e os

### 3. Procedimento Experimental

---

eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de discos de platina (Pt). Usou-se como eletrólito de suporte PTBA (perclorato de tetrabutilamônio) dissolvido em acetonitrila, na concentração de  $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>.

- **Espectroeletróquímica:** As medidas de espectroeletróquímica foram realizadas utilizando o potenciostato/galvanostato – AUTOLAB, modelo type III, e o espectrofotômetro de feixe simples UV-Vis-HP KAIK XA (HP Hewlett Packard 8453). Os experimentos foram feitos em célula eletrolítica de quartzo de 2 mm de espessura usando, onde o solvente utilizado foi o DMF (dimetilformamida), com 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de PTBA como eletrólito de suporte. A célula é composta de redes de platina como eletrodos de trabalho e auxiliar, e um fio de Ag/AgCl como eletrodo de referência.

- **Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis:** Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro de feixe simples UV-Vis-HP KAIK XA (HP Hewlett Packard 8453), onde utilizou-se celas de quartzo de 10,0 mm e 3,5 mL de capacidade. Nos experimentos com  $\beta$ -amilóide foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu 2450, disponibilizado pelo o grupo de Angel Martí, no departamento de química da Rice University (Houston-TX/USA), onde foi utilizado cubetas de quartzo de 4,0 mm e 400  $\mu$ L.

- **Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho:** Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em pastilha de KBr, utilizando-se um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB – 102 na região compreendida entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>.

- **Luminescência:** Os espectros de emissão foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Shimadzu, modelo RF-5301PC, com lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928. Nos experimentos com  $\beta$ -amilóide foi utilizado Espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog, disponibilizado pelo o grupo do Prof. Dr. Angel Martí, no departamento de química da Rice University (Houston-TX/USA).

- **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):** As micrografias das amostras de  $\beta$ -amilóide foram obtidas por intermédio de um microscópio eletrônico de

### 3. Procedimento Experimental

---

transmissão JEOL 1230 High Contrast operado em 80 KV, disponibilizado pelo o grupo do Prof. Dr. Angel Martí, no departamento de química da Rice University (Houston-TX/USA).

- **Microscopia Confocal (MC):** Para a obtenção das imagens dos complexos no interior das células HeLa, foi utilizado um microscópio confocal Zeiss modelo: LSM 510 meta com LASER de excitação de Ar (477 nm) , disponibilizado pelo o grupo do Prof. Dr. Maurício Baptista, no departamento de química da USP São Paulo.

- **Imagens de fluorescência por tempo de vida de Emissão (FLIM):** Para os experimentos de imagem com o  $\beta$ -amilóide, utilizou-se um microscópio confocal de fluorescência por tempo de vida de emissão. Utilizou-se para a obtenção das imagens um sistema Microtime 200 (PicoQuant). Na excitação do complexo foi utilizado um comprimento de onda de 440 nm. As imagens foram geradas por um software operacional do microscópio, SymPhoTime. O equipamento foi disponibilizado pelo o grupo do Prof. Dr. Amando Ito, no departamento de física da USP/Ribeirão preto.

- **Tempo de vida:** Para as medidas do tempo de vida de emissão foi utilizado um laser pulsado com excitação Tsunami 3950 (Spectra Physics) de titânio-safira (Ti:sapphire) bombeado por laser de estado sólido Millennia Xs (Spectra Physics), de Nd:YVO<sub>4</sub>, que tem saída com potência máxima de 10W no comprimento de onda 350nm. Foi utilizado o método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) para determinar o tempo de vida de emissão. O software F900 (Edburg Inst.) foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais, onde a qualidade do ajuste realizado pelo software foi avaliado pelo parâmetro estatístico  $\chi^2$  (chi-square). O equipamento foi disponibilizado pelo o grupo do Prof. Dr. Amando Ito, no departamento de física da USP/Ribeirão preto.

- **Calculos computacionais:** A estrutura da geometria otimizada dos complexos de rutênio foi obtida utilizando o software Gaussian 0959, empregando o método teórico de densidade funcional (DFT) e a base funcional B3LYP60 com um conjunto de base LanL2DZ.

- **Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC):** Os experimentos de ITC foram realizados em um VP-ITC, MicroCal. Os dados obtidos foram analisados pelo

### 3. Procedimento Experimental

---

programa Origin (versão 7,0 OriginLab). O equipamento foi disponibilizado pelo o grupo da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula, no departamento de física da USP/São Carlos.

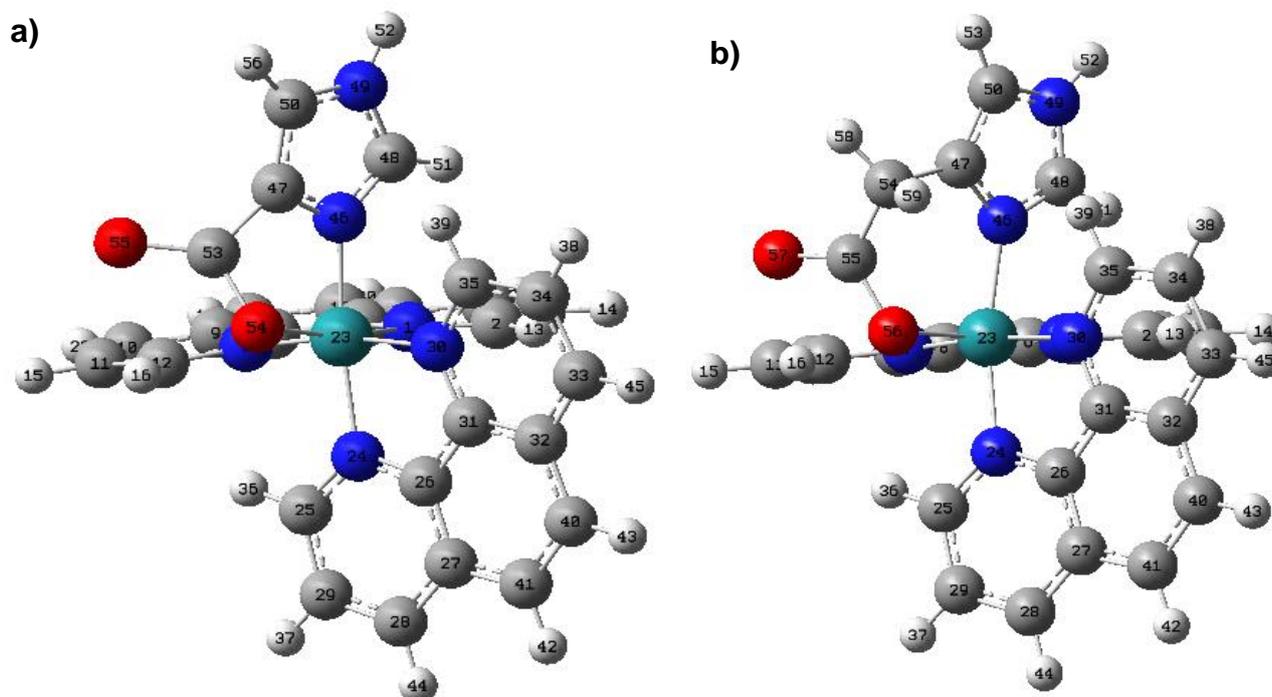
- **Discreísmo Circular (CD):** Para os experimentos de discreísmo circular as medidas foram feitas no equipamento JASCO J-815 CD Spectrometer utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1cm de caminho óptico a uma temperatura de 37°C. O equipamento foi disponibilizado pelo o grupo da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula, no departamento de física da USP/São Carlos

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

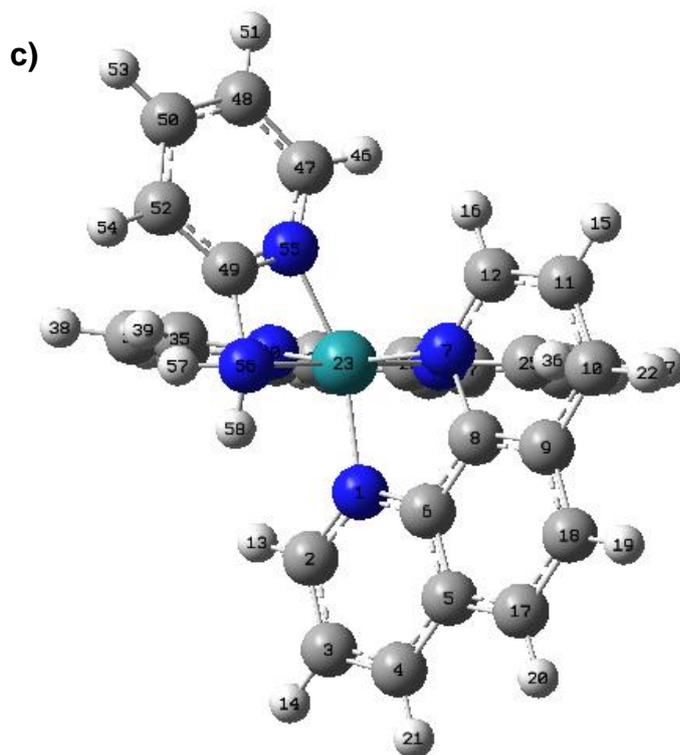
### 4.1- Cálculos Computacionais

A partir dos cálculos computacionais foi possível obter a estrutura otimizada dos complexos, e adquirir importantes informações a cerca da geometria espacial dos mesmos, como os ângulos de ligação, comprimentos de ligação, etc.

A estrutura otimizada dos complexos podem ser visualizadas na Figura 4.1, e os principais ângulos e comprimentos de ligação, podem ser visualizados nas Tabelas 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4.



## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.1** - Estrutura otimizada dos complexos: **(a)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, **(b)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(c)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

Como pode ser visualizado na Figura 4.1, os complexos apresentam 6 ligações, resultando em uma estrutura octaédrica, onde os dois ligantes fenantrolina estão coordenados na posição *cis*, e os ligantes imidazólicos (4-ImAC e 4-ImAA) e aminopiridina estão coordenados de forma bidentada. A estrutura octaédrica para os três complexos é distorcida, não formando ângulos de 90° exatos, como ocorre para um octaédro perfeito, apresentando valores abaixo, ou acima de 90°.

Comparando os ângulos de ligação entre os átomos N-Ru-O dos complexos imidazólicos (em destaque nas Tabelas 4.1 e 4.2), o ângulo de cone é maior para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> com um valor de 93,6°, para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub> o valor é de 84,4°. Esses valores são importantes para explicar as diferentes estabilidades destes complexos, descritas no decorrer do trabalho. Os valores dos ângulos de ligação para os três complexos podem ser visualizados nas Tabelas 4.1; 4.2 e 4.3.

## 4. Resultados e Discussão

Tabela 4.1 - Ângulos de ligações para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>

<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub>			
Átomos	Ângulo (°)	Átomos	Ângulo (°)
N <sub>46</sub> -Ru-O <sub>54</sub>	84,4	N <sub>30</sub> -Ru-N <sub>7</sub>	173,1
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	177,4	N <sub>24</sub> -Ru-O <sub>54</sub>	93,5
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	86,0	N <sub>24</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	91,9
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>7</sub>	90,4	N <sub>24</sub> -Ru-N <sub>7</sub>	91,0
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>30</sub>	95,8	N <sub>1</sub> -Ru-O <sub>54</sub>	172,9
N <sub>30</sub> -Ru-O <sub>54</sub>	91,7	N <sub>1</sub> -Ru-N <sub>7</sub>	84,1
N <sub>30</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	82,7	N <sub>7</sub> -Ru-O <sub>54</sub>	91,3
N <sub>30</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	93,4		

Tabela 4.2 - Ângulos de ligações para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub>

<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub>			
Átomos	Ângulo (°)	Átomos	Ângulo (°)
N <sub>46</sub> -Ru-O <sub>56</sub>	93,6	N <sub>46</sub> -Ru-O <sub>56</sub>	93,6
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	171,6	N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	171,6
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	84,9	N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	84,9
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>7</sub>	90,9	N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>7</sub>	90,9
N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>30</sub>	89,1	N <sub>46</sub> -Ru-N <sub>30</sub>	89,1
N <sub>30</sub> -Ru-O <sub>56</sub>	43,3	N <sub>30</sub> -Ru-O <sub>56</sub>	43,3
N <sub>30</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	83,3		

## 4. Resultados e Discussão

**Tabela 4.3** - Ângulos de ligações para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>			
Átomos	Ângulo (°)	Átomos	Ângulo (°)
N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>56</sub>	69,5	N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>56</sub>	69,5
N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>30</sub>	89,6	N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>30</sub>	89,6
N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	102,7	N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>24</sub>	102,7
N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	166,7	N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>1</sub>	166,7
N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>8</sub>	95,5	N <sub>55</sub> -Ru-N <sub>8</sub>	95,5
N <sub>7</sub> -Ru-N <sub>56</sub>	87,5	N <sub>7</sub> -Ru-N <sub>56</sub>	87,5
N <sub>7</sub> -Ru-N <sub>30</sub>	173,9		

Os complexos apresentaram valores de comprimentos de ligação próximos, como pode ser visualizado na Tabela 4.4, onde o complexo com aminopiridina apresentou valor de comprimento de ligação maior que 2 Å, entre o N(56) do grupo amino (NH<sub>2</sub>) e o Ru.

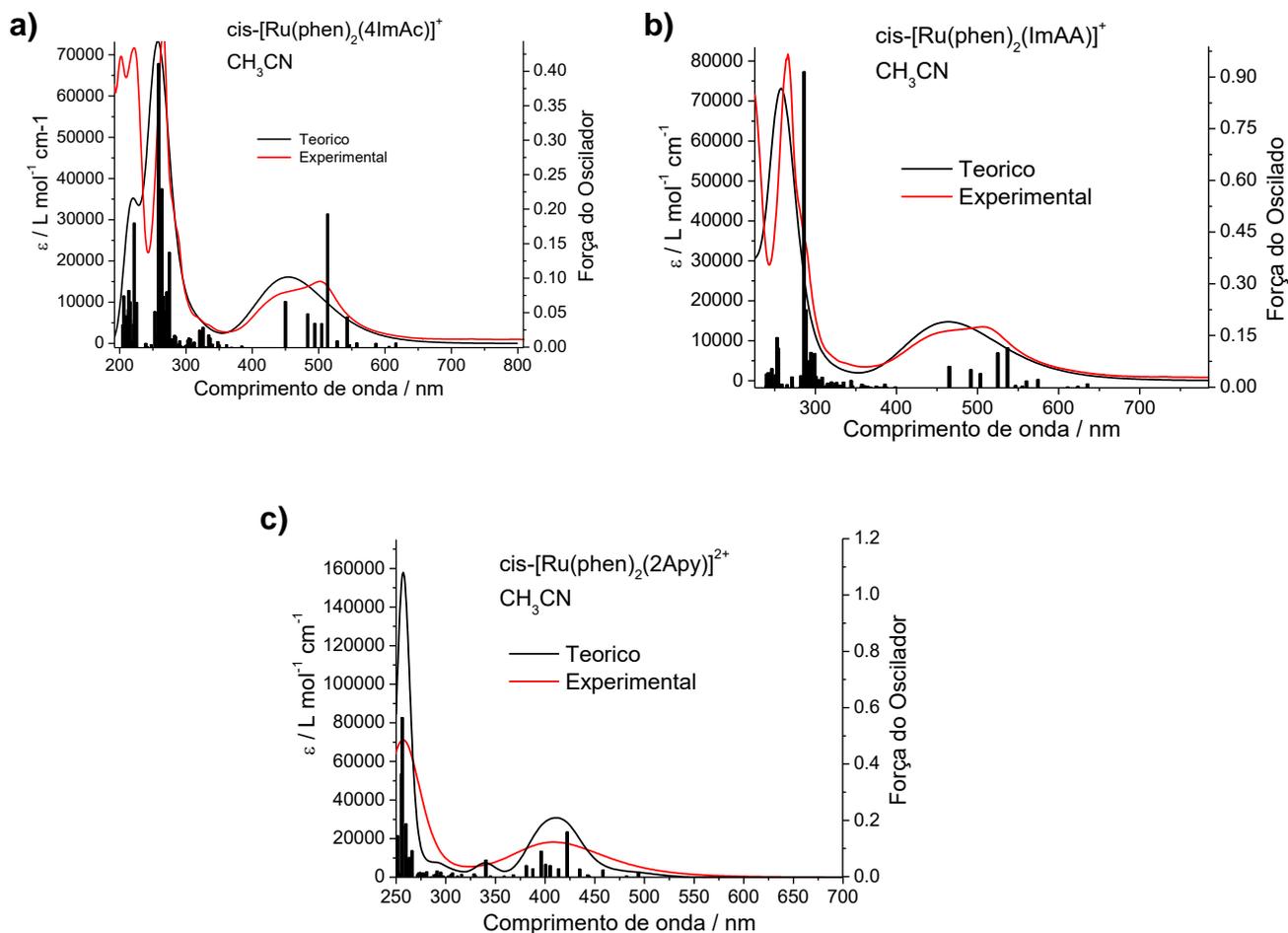
**Tabela 4.4** - Principais comprimentos de ligações dos complexos: *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub>		<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub>		<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	
Átomos	Distância (Å)	Átomos	Distância (Å)	Átomos	Distância (Å)
N <sub>46</sub> -Ru	1.94	N <sub>7</sub> -Ru	1.95	N <sub>55</sub> -Ru	1.87
O <sub>54</sub> -Ru	1.96	N <sub>1</sub> -Ru	1.97	N <sub>56</sub> -Ru	2.02
N <sub>1</sub> -Ru	1.96	N <sub>24</sub> -Ru	1.95	N <sub>24</sub> -Ru	1.95
N <sub>7</sub> -Ru	1.94	N <sub>30</sub> -Ru	1.95	N <sub>1</sub> -Ru	1.95
N <sub>30</sub> -Ru	1.95	N <sub>46</sub> -Ru	1.97	N <sub>7</sub> -Ru	1.93
N <sub>24</sub> -Ru	1.95	O <sub>56</sub> -Ru	1.92	N <sub>30</sub> -Ru	1.95

Além de informações a cerca da geometria espacial dos complexos, a partir dos cálculos teóricos foi possível gerar espectros de absorção na região do UV-Vis para os complexos, como podem ser visualizados na Figura 4.2. Comparando os

#### 4. Resultados e Discussão

gráficos verifica-se que os espectros teóricos e experimentais estão bem semelhantes, o que é importante, uma vez que aumenta a confiabilidade dos estudos teóricos<sup>70,71</sup>.



**Figura 4.2** - Espectros de absorção na região do UV-Vis teórico (linha preta) e experimental (linha vermelha) para os complexos: **(a)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAc)]PF<sub>6</sub>, **(b)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(c)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em acetonitrila.

#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.2- Análise Elementar

Foi realizada a análise elementar dos complexos obtidos (Figura 4.1), para confirmar o grau de pureza dos mesmos. A Tabela 4.5 exibe os resultados referentes à análise elementar para os complexos de rutênio.

**Tabela 4.5** - Análise elementar para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

COMPLEXO	Composição teórica	Composição experimental	Erro (%)
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)](PF <sub>6</sub> )	%C = 46,87	%C = 45,50	2,90
RuC <sub>28</sub> H <sub>19</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	%N = 11,71	%N = 11,80	0,80
	%H = 2,67	%H = 2,57	3,70
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)](PF <sub>6</sub> )	%C = 47,61	%C = 46,55	2,22
RuC <sub>29</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	%N = 11,49	%N = 11,38	0,96
	%H = 2,89	%H = 2,83	2,00
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	%C = 41,20	%C = 40,11	2,61
RuC <sub>29</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub>	%N = 9,94	%N = 10,20	2,60
	%H = 2,62	%H = 2,55	2,70

Os resultados encontrados para os dados experimentais e teóricos estão dentro dos limites de erro, indicando uma boa concordância entre a formulação proposta (teórica) e a obtida (experimental).

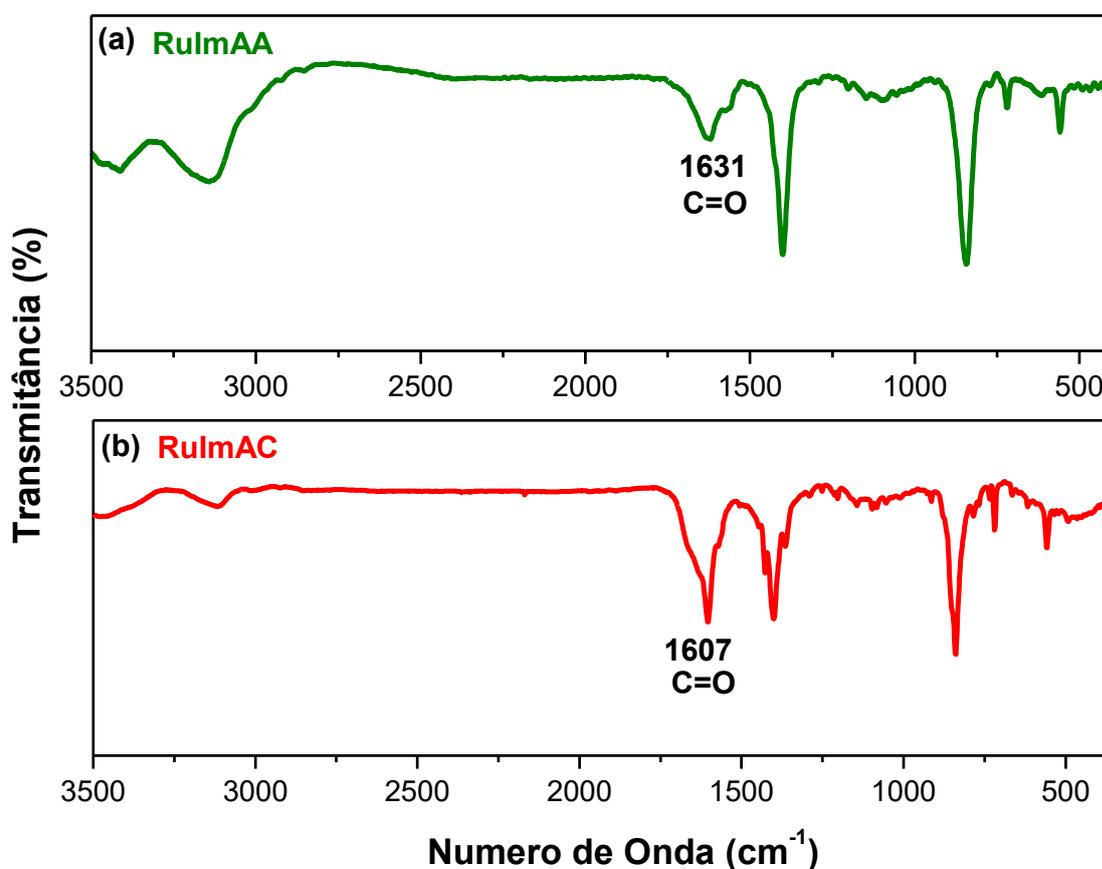
##### 4.3- Espectroscopia na Região do Infravermelho

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi utilizada para identificar as unidades estruturais dos complexos, com base nas frequências vibracionais dessas moléculas, para contribuir na caracterização e identificação dos compostos<sup>72</sup>.

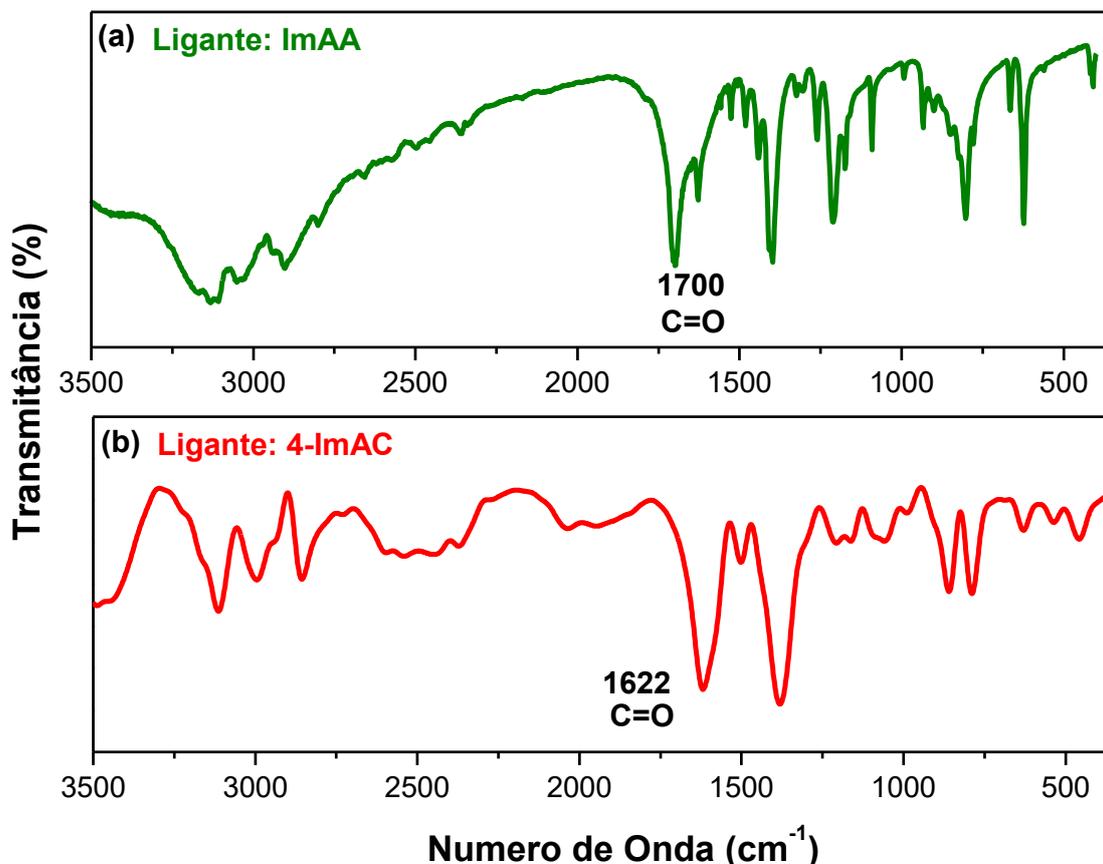
#### 4. Resultados e Discussão

Foram obtidos os espectros de infravermelho para os complexos com ligantes imidazólicos a fim de verificarmos a banda vibracional referente à carbonila.

As Figuras 4.3 (a e b) e 4.4 (a e b) exibem os espectros de infravermelho obtidos em pastilha de KBr para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e para os ligantes livres 4-Imidazol Ácido Carboxílico e Imidazol Ácido acético.



**Figura 4.3** - Espectro de infravermelho em pastilha de KBr para os complexos: **(a)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(b)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>.



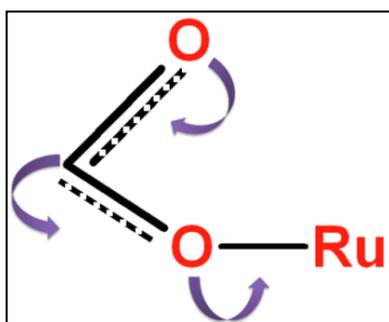
**Figura 4.4** - Espectro de infravermelho em pastilha de KBr para os ligantes livres: **(a)** 4-ImAAc e **(b)** 4-ImAC.

Analisando os espectros de infravermelho para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> foram verificadas bandas de estiramentos  $\nu$ C=C (1600-1400 cm<sup>-1</sup>),  $\delta$ C-H (800-600 cm<sup>-1</sup>),  $\nu$ C-N (1200-1000 cm<sup>-1</sup>) e  $\nu$ N-H (3400-3100 cm<sup>-1</sup>) referentes aos ligantes imidazólicos e fenantrolina. Foram observadas outras bandas na região de 490 cm<sup>-1</sup> e em 550 cm<sup>-1</sup> que são referentes aos estiramentos  $\nu$ Ru-O e  $\nu$ Ru-N, respectivamente, indicando a coordenação dos imidazóis (4-ImAC) e (ImAA) ao centro metálico através do oxigênio e nitrogênio, confirmando que o ligante coordenou de forma bidentada. Foi verificado também uma banda bastante intensa em 837 cm<sup>-1</sup> referente ao contra-íon PF<sub>6</sub><sup>73</sup>

Na Figura 4.4 (a e b), são exibidos os espectros de infravermelho (1900-1500 cm<sup>-1</sup>) na região da carbonila para os ligantes imidazólicos. Quando comparadas as bandas da carbonila dos imidazóis na forma livre e na forma

#### 4. Resultados e Discussão

complexada, observa-se um deslocamento da banda para região de menor frequência, evidenciando a coordenação do ligante ao centro metálico, uma vez que quando coordenado o metal retira a densidade eletrônica do ligante, e a fim de suprir essa deficiência eletrônica, ocorre uma deslocalização eletrônica no ligante (Figura 4.5), fazendo com que a dupla ligação passe a ter caráter de ligação simples, ocorrendo, portanto o deslocamento da banda C=O para região de menor frequência (menor energia) <sup>74</sup>.



**Figura 4.5** - Deslocalização eletrônica no ligante imidazólico coordenado ao centro metálico.

As Tabelas 4.6 e 4.7 exibem os principais modos vibracionais encontrados para os ligantes (fenatrolina e imidazóis) e para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e as suas correspondentes atribuições.

**Tabela 4.6** - Modos vibracionais encontrados para os ligantes imidazólicos (4-ImAC e ImAA) e fenatrolina, e as suas atribuições

Modos Vibracionais (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3400-3100	νN-H
1600-1400	νC=C
1500-1700	νC=O
1200-1000	νN-C
800-600	δC-H

#### 4. Resultados e Discussão

**Tabela 4.7** - Principais modos vibracionais para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e as suas atribuições

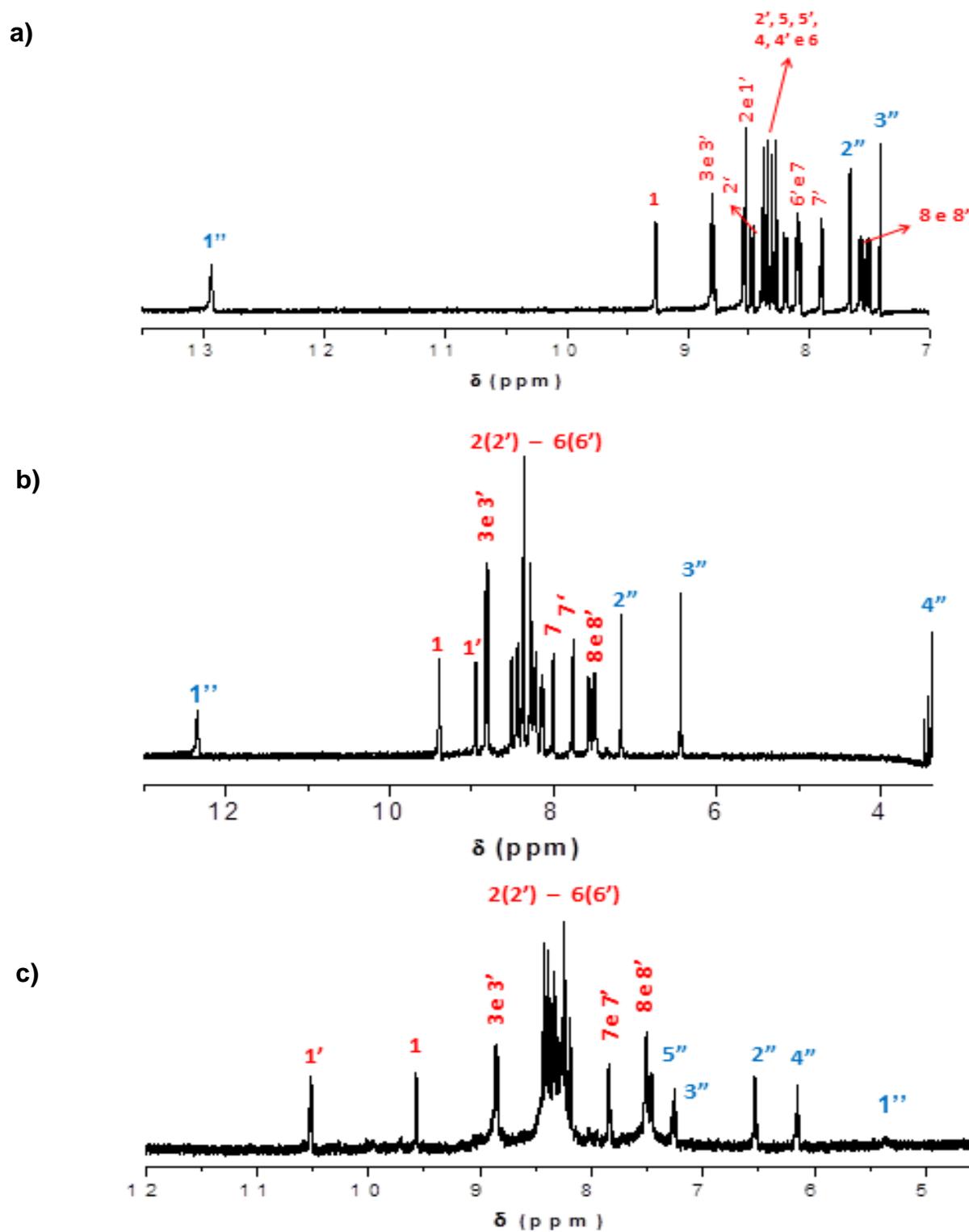
Modos Vibracionais (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
1604-1631	νC=O
837	νP-F
490	νRu-O
550	νRu-N

#### 4.4- Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

Por intermédio da técnica de RMN de <sup>1</sup>H foi possível elucidar a estrutura dos complexos, onde a mesma confirmou a coordenação bidentada dos ligantes imidazólicos e aminopiridina ao centro metálico.

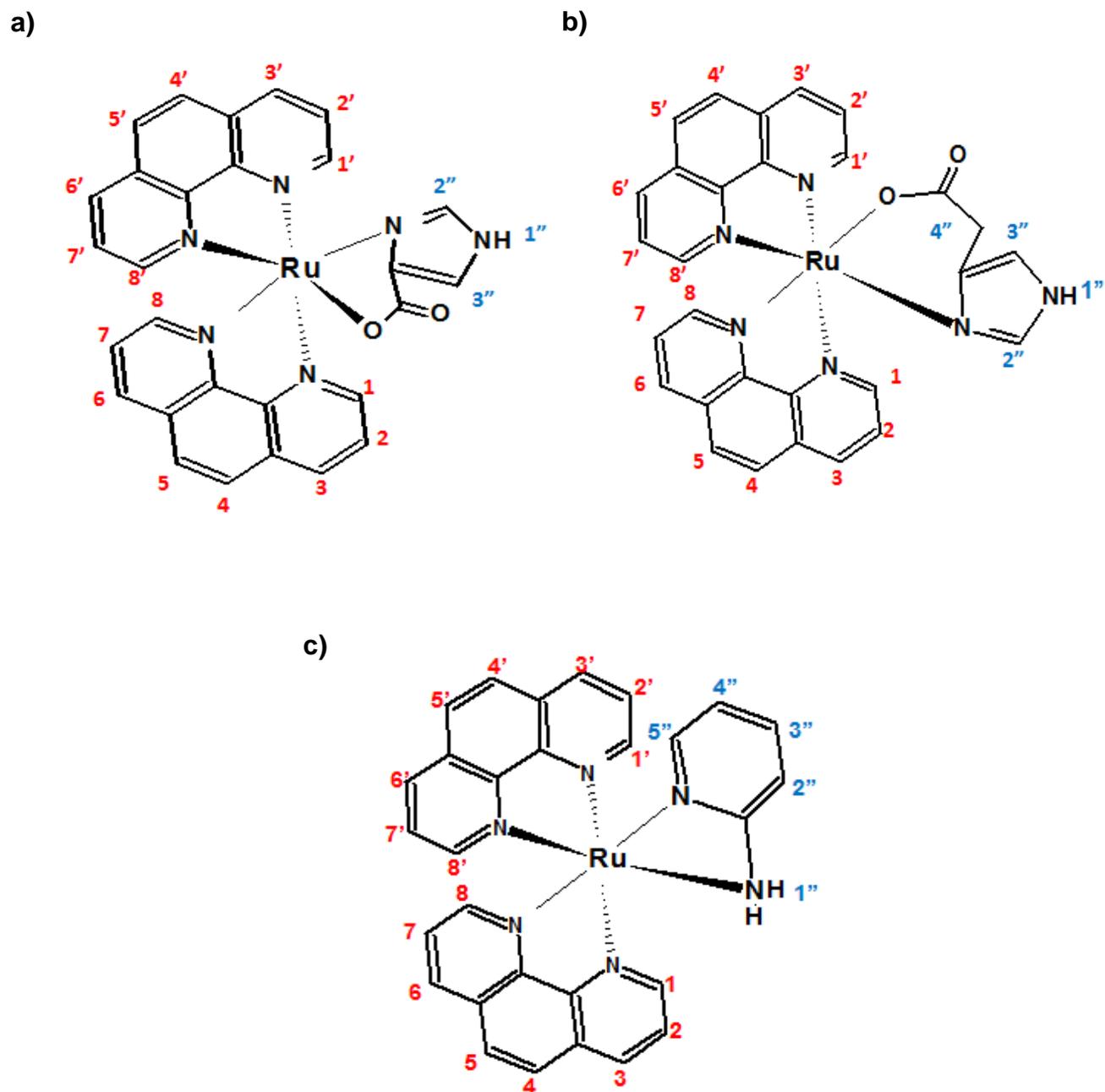
As Figuras de 4.6 e 4.7 (a), (b) e (c) exibem os espectros de RMN obtidos em DMSO e acetona deuterada e os complexos de rutênio *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.6** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os complexos: **(a)**  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-ImAC})]\text{PF}_6$ , **(b)**  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ImAA})]\text{PF}_6$  e **(c)**  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(2\text{-Apy})](\text{PF}_6)_2$ ; em acetona para o complexo **(c)** e em DMSO para os complexos **(a)** e **(b)**.

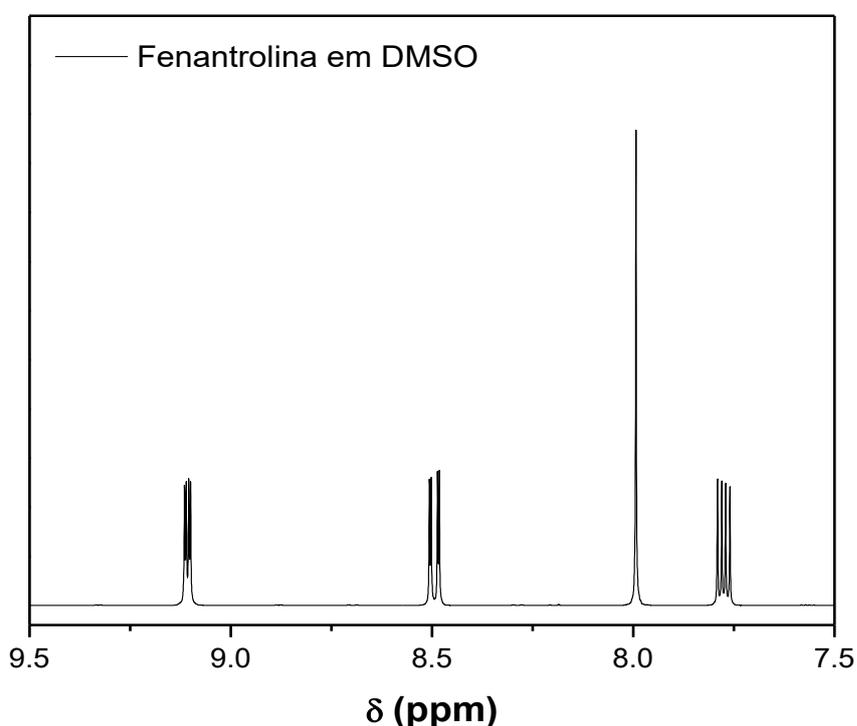
## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.7** - Complexos de rutênio com os prótons assinalados: **a)**  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, **(b)**  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(c)**  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

#### 4. Resultados e Discussão

Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os 3 complexos, e comparando com os dados da Literatura<sup>73</sup>, observa-se que os sinais da fenantrolina (7,5 à 9,2 ppm) para os complexos com imidazóis, e de (6 à 10,5 ppm) para o complexo com aminopiridina, aparecem deslocados e dobrados (16 sinais) quando comparados com os sinais da fenantrolina livre, o qual pode ser visto na Figura 4.8 (4 sinais – 7,58; 8,20; 8,22 e 9,18 ppm), indicando a coordenação desse ligante ao centro metálico. Os sinais multiplicados da fenantrolina se devem aos diferentes ambientes químicos dos seus hidrogênios, que não são equivalentes, ocorrendo um desdobramento dos sinais. Confirmando a coordenação de forma bidentada dos ligantes (imidazóis e aminopiridina), uma vez que na sua forma monodentada (duas moléculas de ligante), apareceriam apenas 8 sinais, devido a equivalência dos prótons da fenantrolina. Os dados de RMN estão em concordância com os dados de infravermelho, e análise elementar, evidenciando a coordenação de apenas um ligante<sup>73,74</sup>.



**Figura 4.8** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para o ligante fenatrolina livre em DMSO.

#### 4. Resultados e Discussão

Verifica-se na região de 13-12 ppm aproximadamente para os complexos de rutênio com imidazol (Figuras 4.6 (b e c)) um sinal correspondente ao próton do N-H do ligante imidazólico, que aparece numa região bastante ácida, como era de se esperar. Foram observados também singletos na região de 7,4 a 7,6 ppm (*cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>) e 6,25 a 7,80 ppm (*cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub>) que correspondem aos hidrogênios do anel imidazólico, onde a integração da área dessas sinais correspondem somente a um ligante. As atribuições dos sinais foram feitas com base nos dados da literatura<sup>60,62,73-75</sup>. Para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> os sinais dos prótons da aminopiridina apareceram na região de 7,3 a 6,1 ppm, e o sinal dos prótons N-H<sub>2</sub> do anel da aminipiridina, aparece em 5.5 ppm, onde o mesmo não aparece nítido devido a interações desses prótons com o solvente.

Os sinais dos prótons, e a multiplicidade para os 3 complexos podem ser visualizados na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** - Deslocamento químico(ppm), multiplicidade e número de <sup>1</sup>H para os espectros de RMN dos os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub>		<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub>		<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	
H	δ <sub>H</sub> (Mult) (nH)	H	δ <sub>H</sub> (Mult, Hz)	H	δ <sub>H</sub> (Mult, Hz)
NH	12.93 (s) (1H)	NH	12.35 (s) (1H)	NH <sub>2</sub>	5.4 (s) (1H)
1	9.25 (dd) (1H)	1	9.39 (dd) (1H)	1	10.45 (dd) (1H)
3, 3 <sup>`</sup>	8.80 (m) (2H)	3	8.95 (dd) (1H)	1 <sup>'</sup>	9.5 (dd) (1H)
2, 1 <sup>`</sup>	8.60 (m) (2H)	3 <sup>'</sup> , 1	8.81 (m) (2H)	3,3 <sup>'</sup>	8.85 (m) (2H)
2 <sup>`</sup>	8.48 (dd) (1H)	2, 2 <sup>`</sup>	8.49 (dd) (2H)	2, 2 <sup>`</sup>	8,1 (dd) (2H)
5, 5 <sup>`</sup>	8.37 (m) (2H)	5, 5 <sup>`</sup>	8.37 (dd) (2H)	5, 5 <sup>`</sup>	8,15 (dd) (2H)
4, 4 <sup>`</sup>	8.27 (m) (2H)	4, 4 <sup>`</sup>	8.27 (dd) (2H)	4, 4 <sup>`</sup>	8,25 (dd) (2H)
6	8.20 (dd) (1H)	6, 6 <sup>`</sup>	8.20 (m) (2H)	6, 6 <sup>`</sup>	8,3 (dd) (2H)
6 <sup>`</sup> , 7	8.08 (m) (2H)	7	8.00 (dd) (2H)	7, 7 <sup>`</sup>	8,4 (dd) (2H)
7 <sup>`</sup>	7.90 (dd) (1H)	7 <sup>`</sup>	7.76 (dd) (2H)	8, 8 <sup>`</sup>	7.8 (dd) (2H)
1a	7.66 (s) (1H)	8, 8 <sup>`</sup>	7.49 (m) (2H)	1 <sup>''</sup>	7.5 (dd) (1H)
8	7.56 (dd) (1H)	1a	7.17 (s) (1H)	2 <sup>''</sup>	7.25 (dd) (1H)
8 <sup>`</sup>	7.52 (dd) (1H)	2a	6.44 (s) (1H)	3 <sup>''</sup>	6.5 (dd) (1H)
2a	7.42 (s) (1H)	3a	3.46 (s) (2H)	4 <sup>''</sup>	6.11 (dd) (1H)

#### 4.5 - Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível

A partir da técnica de espectroscopia na região do ultravioleta-visível foi possível encontrar as bandas referentes às transferências de carga do metal para o ligante (MLCT), a banda centrada no metal e as bandas referentes às transições eletrônica dos ligantes<sup>79</sup>. As Figura 4.9 e 4.10 exibem os espectros eletrônicos de absorção para os complexos em acetonitrila e tampão fosfato pH 7,4, respectivamente na concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{M}$ .

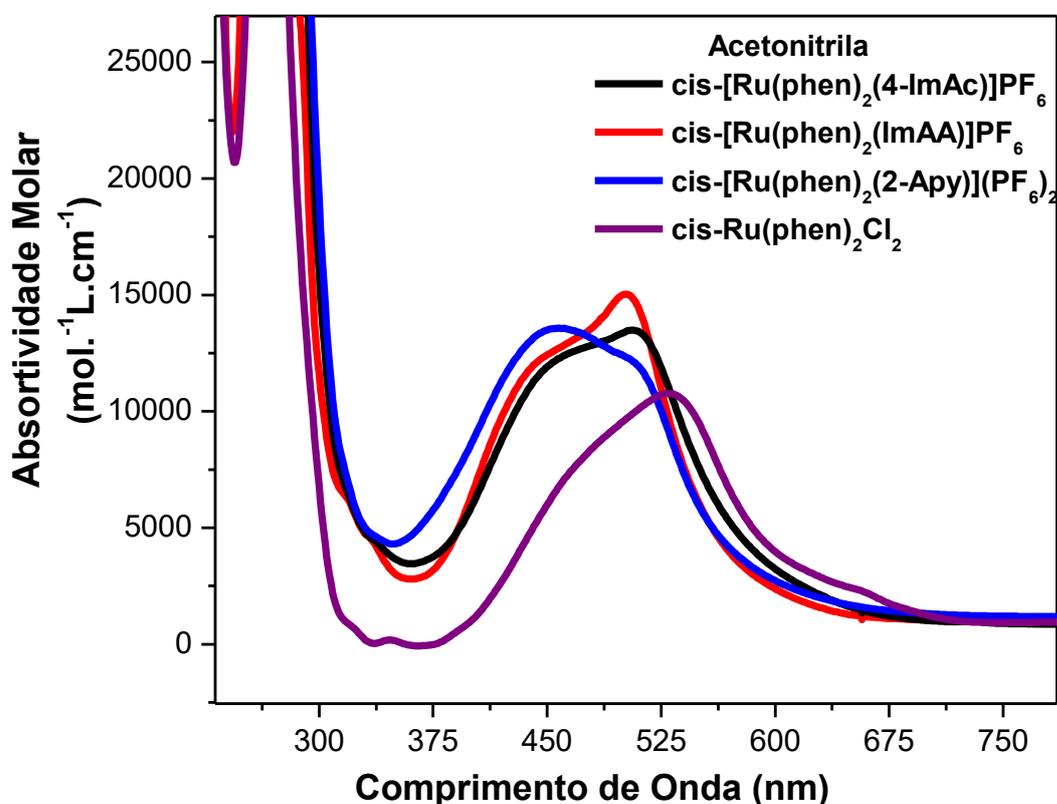
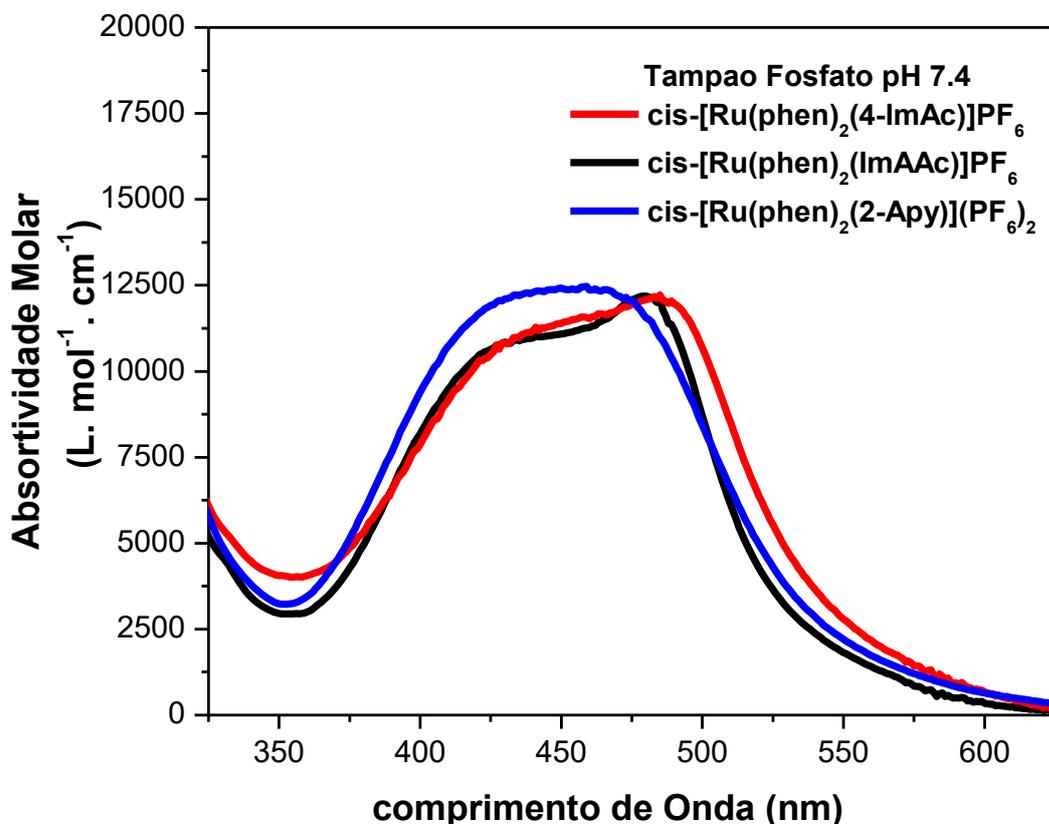


Figura 4.9 - Espectros eletrônicos para os complexos de rutênio em  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.10** - Espectros eletrônicos para os complexos de rutênio em tampão fosfato pH 7.4.

A partir dos espectros de absorção observam-se bandas bastante definidas e intensas na região do visível para os complexos, as quais são atribuídas às transições de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT  $d\pi(\text{Ru(II)}) \rightarrow \text{phen}(\pi^*)$ ). Verifica-se um deslocamento da banda MLCT do complexo precursor de 530 nm (Figura 4.9) para regiões menor comprimento de onda para os complexos obtidos (RuImAA, Ru4-ImAC e Ru2-Apy). Esse deslocamento é resultado da estabilidade eletrônica que esses complexos obtiveram, devido às substituições dos ligantes cloretos, pelos ligantes imidazólicos e aminopiridina, já que estes ligantes além de serem doadores  $\sigma$ , são receptores  $\pi$ , diferente dos cloretos, que são doadores  $\pi$ . A substituição dos cloretos resulta numa maior estabilização do centro metálico (estabilização da energia dos orbitais  $t_{2g}$ ), deslocando a banda MLCT para menor comprimento de onda no espectro, que é referente ao de maior energia<sup>76</sup>.

#### 4. Resultados e Discussão

---

Foi observado também outra banda em 347 nm para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] que corresponde a uma transferência de carga centrada no metal Ru(II) → Ru(II) ( $d\pi \rightarrow d\pi^*$ ). Para os outros complexos essa banda de absorção não aparece, provavelmente houve uma sobreposição dessa banda pela banda MLCT. Foram verificadas absorções presentes na região do ultravioleta (250–320 nm) que são típicas das transições eletrônicas de transferência de carga interna dos ligantes (LLCT), 1,10-phen → 1,10-phen ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), Im → Im ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) e Apy → Apy ( $\pi \rightarrow \pi^*$ )<sup>60,62,76</sup>.

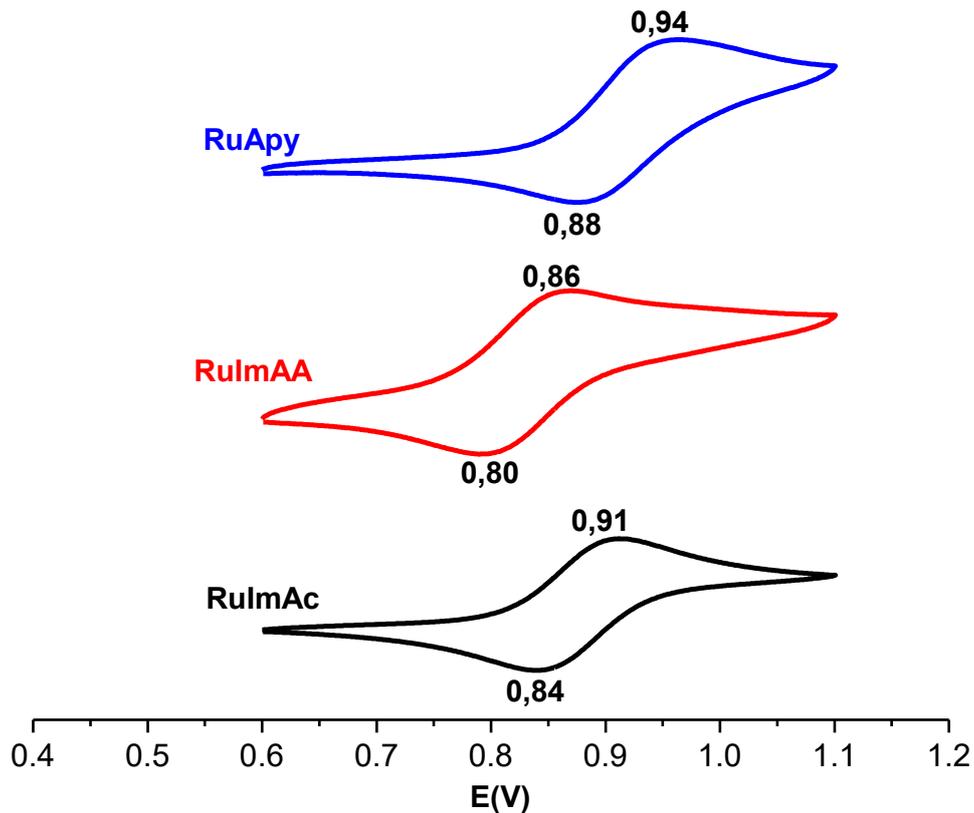
Para os 3 complexos obtidos foram verificados valores de  $\epsilon$  (absortividade molar) bem intensos (acima de 10.000 L.mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>), evidenciando o quanto é permitida e favorável acontecer às transições de transferência de carga do metal para o ligante (MLTC)<sup>60,76</sup>.

Pelo fato dos complexos apresentarem elevada solubilidade em meio aquoso, foi possível obter os espectros de absorção para os mesmos em tampão (Figura 4.9), onde verifica-se o mesmo comportamento eletrônico apresentado pelos complexos em acetonitrila.

#### 4.6- Medidas de Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico dos complexos foi analisado utilizando a técnica de voltametria cíclica. O estudo foi realizado em solução de acetonitrila contendo PTBA (perclorato de tetrabutilamônio) como eletrólito de suporte, onde se utilizou o eletrodo de prata como eletrodo de referência. Os compostos foram estudados numa concentração de 1.10<sup>-3</sup> mol/L.

A partir das medidas de voltametria cíclicas foi possível encontrar os potenciais de oxidação e redução do centro-metálico. Foi observado um par redox reversível, onde o primeiro potencial refere-se à oxidação do centro metálico (Ru<sup>II</sup> a Ru<sup>III</sup>), e o processo inverso, corresponde a redução do rutênio (Ru<sup>III</sup> a Ru<sup>II</sup>)<sup>60, 62</sup>. Os voltamogramas para os três complexos de rutênio podem ser visualizados na Figura 4.11.



**Figura 4.11** - Voltametria cíclica para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em acetonitrila com velocidade de varredura de 100mV/s.

Observa-se que para os três complexos está envolvido apenas 1 elétron no processo redox, onde foi possível confirmar o número de elétrons envolvidos na reação utilizando-se a equação de Tafel<sup>77</sup> (Equação 4.1).

$$i = i_0 \frac{nF}{RT} \Delta E \quad (4.1)$$

Onde:

$n$  = número de elétrons

$T$  = Temperatura (K)

$R$  = Constante Universal dos Gases

$\Delta E$  = Variação da Energia de Potencial

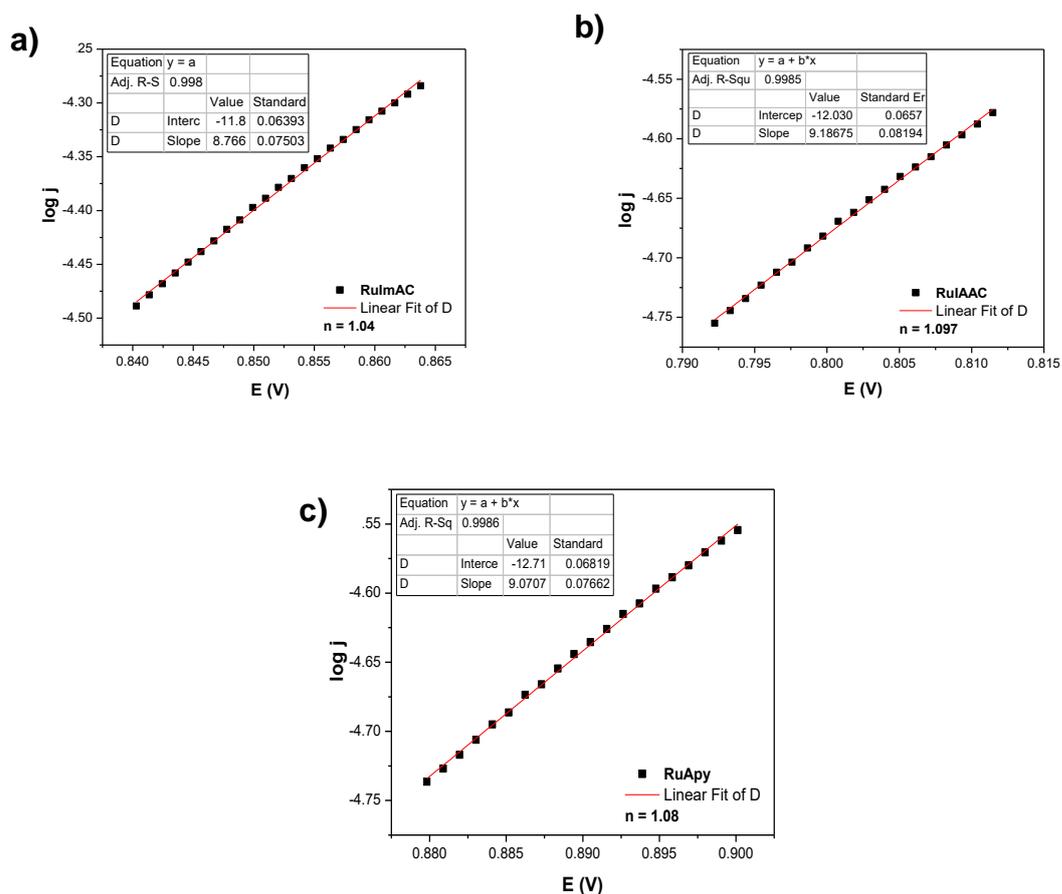
$F$  = Constante de Faraday

$i_0$  = Densidade de corrente de troca

$i$  = Densidade de corrente

#### 4. Resultados e Discussão

A partir de informações como concentração, área do eletrodo, potencial, corrente foi possível calcular o números de elétrons, onde para os três complexos foi encontrado valores de  $n$  próximos a 1, indicando realmente a participação de apenas 1 elétron no processo de oxidação e redução do rutênio. Nas Figuras 4.12 (a, b e c) está ilustrado as inclinações provenientes da equação de Tafel.

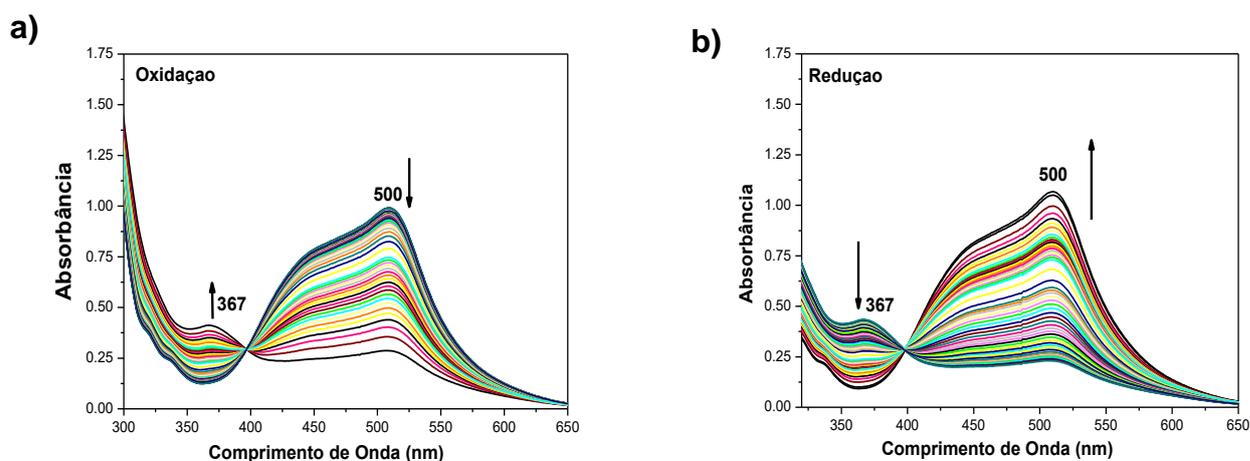


**Figura 4.12** - Inclinação da curva obtida a partir da equação de Tafel para os complexos: **(a)**  $\text{cis}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-ImAC})]\text{PF}_6$ , **(b)**  $\text{cis}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ImAA})]\text{PF}_6$  e **(c)**  $\text{cis}[\text{Ru}(\text{phen})_2(2\text{-Apy})](\text{PF}_6)_2$ .

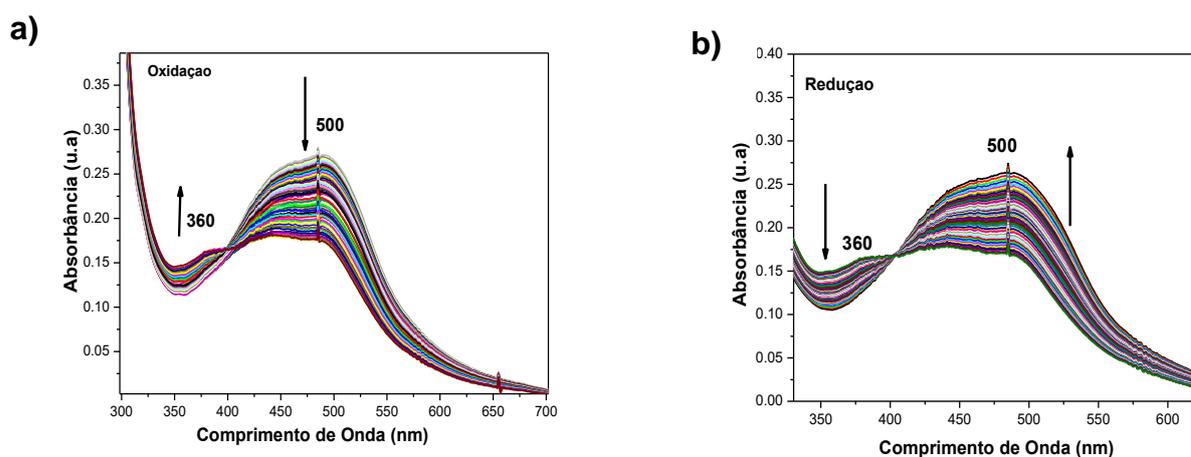
#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.7 – Espectroeletróquímica

A fim de verificar a reversibilidade do processo redox foram realizadas as medidas de espectroeletróquímica para os complexos. Nesse sistema, os compostos foram analisados numa concentração de  $1.10^{-4}$  mol/L em DMF, onde os tempos das medidas foram de 7200 s. As Figuras 4.13 (a e b) e 4.14 (a e b) exibem os gráficos de espectroeletróquímica para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAAc)]PF<sub>6</sub>, respectivamente.



**Figura 4.13** - Espectroeletróquímica para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub> em DMF: **(a)**  $E_{\text{aplicado}} = +1,02$  V, e **(b)**  $E_{\text{aplicado}} = +0,5$  V.



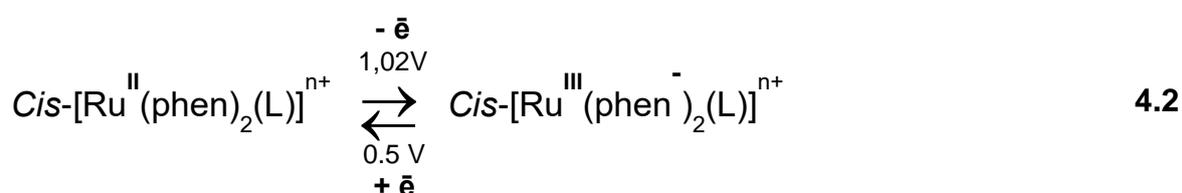
**Figura 4.14** - Espectroeletróquímica para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> em DMF: **(a)**  $E_{\text{aplicado}} = +1,02$  V, e **(b)**  $E_{\text{aplicado}} = +0,5$  V.

#### 4. Resultados e Discussão

Observando os espectros presentes nas Figuras 4.12 e 4.13, percebe-se que ao aplicar o potencial inicial ( $E_i$ ) de +1,02 V, observa-se no espectro uma banda de absorção localizada em  $\approx 500$  nm para os complexos com imidazol. Conforme se inicia o processo de varredura, observa-se uma diminuição no valor de absorbância da banda em 500 nm e o surgimento de uma nova banda em  $\approx 360$  nm para os dois complexos.

A banda de absorção em 500 nm corresponde a uma transferência de carga do metal para o ligante (MLCT), que vai sendo consumida quando se aplica um potencial de oxidação de +1,02 V. Nessa voltagem o Ru<sup>II</sup> é oxidado, passando a ser Ru<sup>III</sup>, onde esse elétron vai para o ligante fenantrolina, fazendo com que ela se reduza a fenantrolina menos ( $\text{phen}^-$ ), diminuindo a intensidade da transição ( $\text{Ru}^{\text{II}} \rightarrow \text{phen}$ ) por isso ela é consumida. Já o surgimento da banda em  $\approx 360$  nm se refere à  $\text{phen}^-$  reduzida. Quando foi aplicado um potencial menor que +1,02 V nesse sistema, ocorreu o processo contrário; a redução do metal, ou seja, o Ru<sup>III</sup> voltou a ser Ru<sup>II</sup>, com isso a intensidade da banda MLCT aumentou, e conseqüentemente a banda em  $\approx 360$  nm diminuiu<sup>60,62,78</sup>.

A equação abaixo exhibe os processos redox geral envolvidos para os complexos.



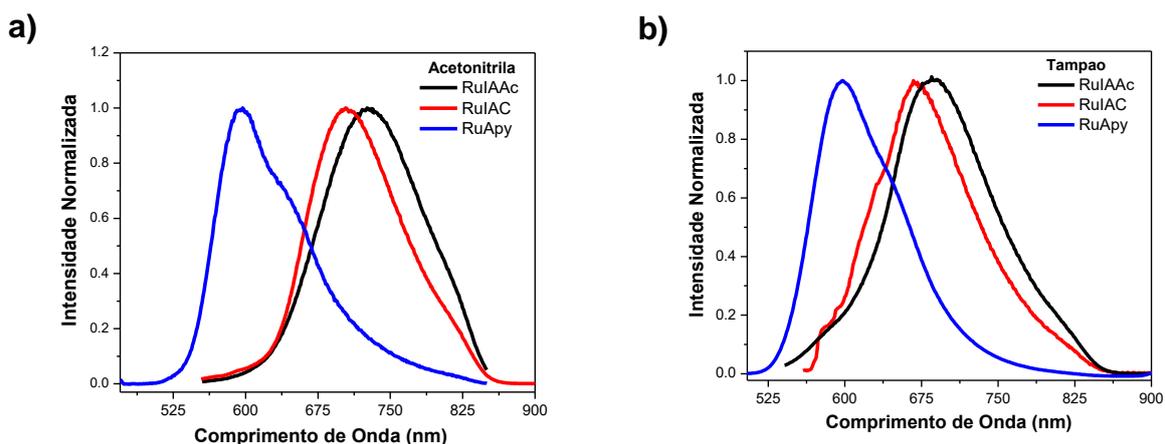
#### 4.8 – Luminescência e Tempo de vida de Emissão

O comportamento óptico dos complexos foi analisado a fim de verificar a sua viabilidade como sonda molecular. Este estudo foi realizado a partir de medidas de emissão luminescente. O experimento foi realizado em solução de acetonitrila, devidamente desairada, numa concentração de  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Para a obtenção dos espectros foi utilizado um comprimento de onda de 450 nm de excitação para o complexo com aminopiridina e de 500 nm de excitação para os complexos com imidazol.

#### 4. Resultados e Discussão

As Figuras 4.15 (a e b) exibem os espectros de emissão para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, em acetonitrila e tampão fosfato pH 7.4, respectivamente.

O espectro de emissão exibe uma banda intensa e bem definida na região de 600 nm aproximadamente para o complexo com o ligante aminopiridina, e na região de 700 nm para os complexos com imidazol.

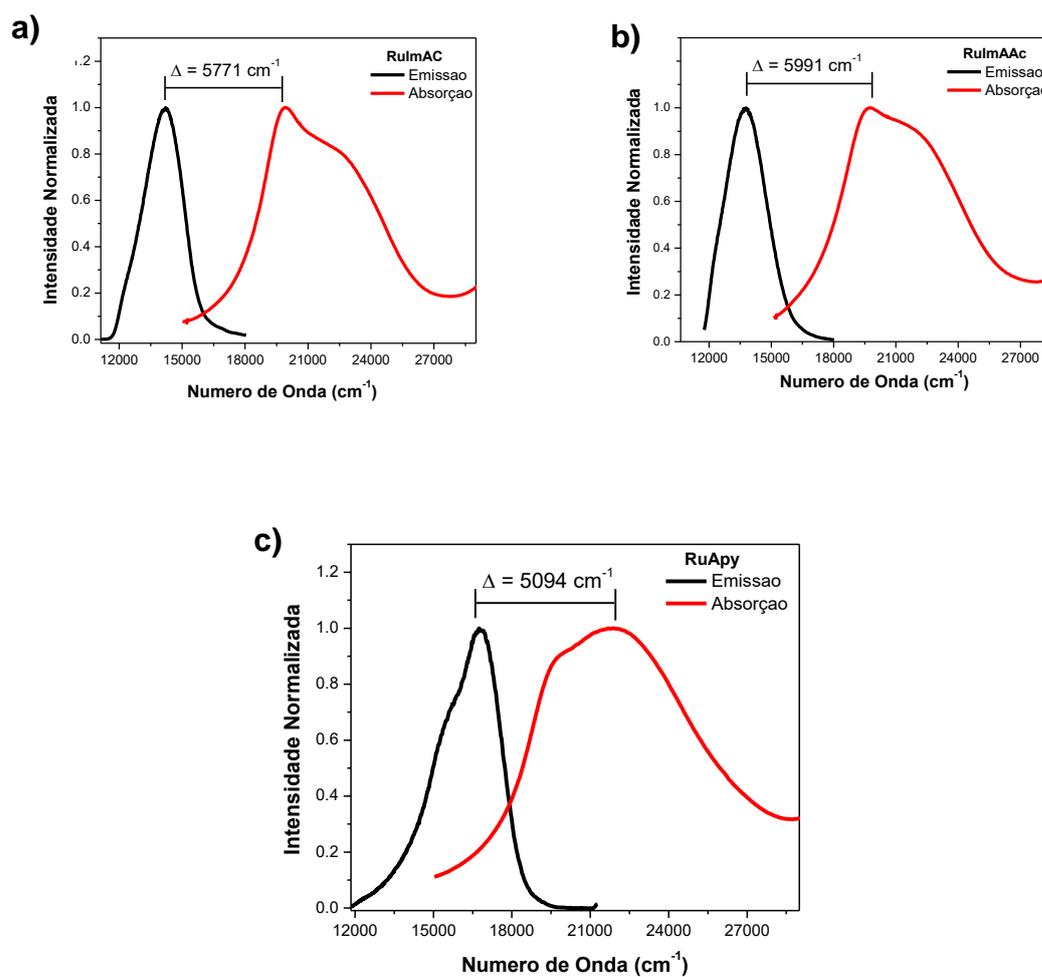


**Figura 4.15** - Espectro de emissão para os complexos de rutênio: **(a)** em CH<sub>3</sub>CN; **(b)** tampão fosfato pH 7.4; na concentração de  $5 \times 10^{-5}$  mol/L.

A emissão e absorção desses complexos na região do visível é muito importante, uma vez que tem-se o interesse de utilizá-los como sonda biológica, já que os mesmos absorvem e emitem numa região não danosa ao meio biológico ampliando a janela terapêutica dos complexos. Outra importante característica é o largo deslocamento Stokes que os mesmos apresentam ( $> 5000 \text{ cm}^{-1}$ ), evitando problemas de autofluorescência, o que é muito importante quando se pensa em uma sonda molecular<sup>60,62,79</sup>.

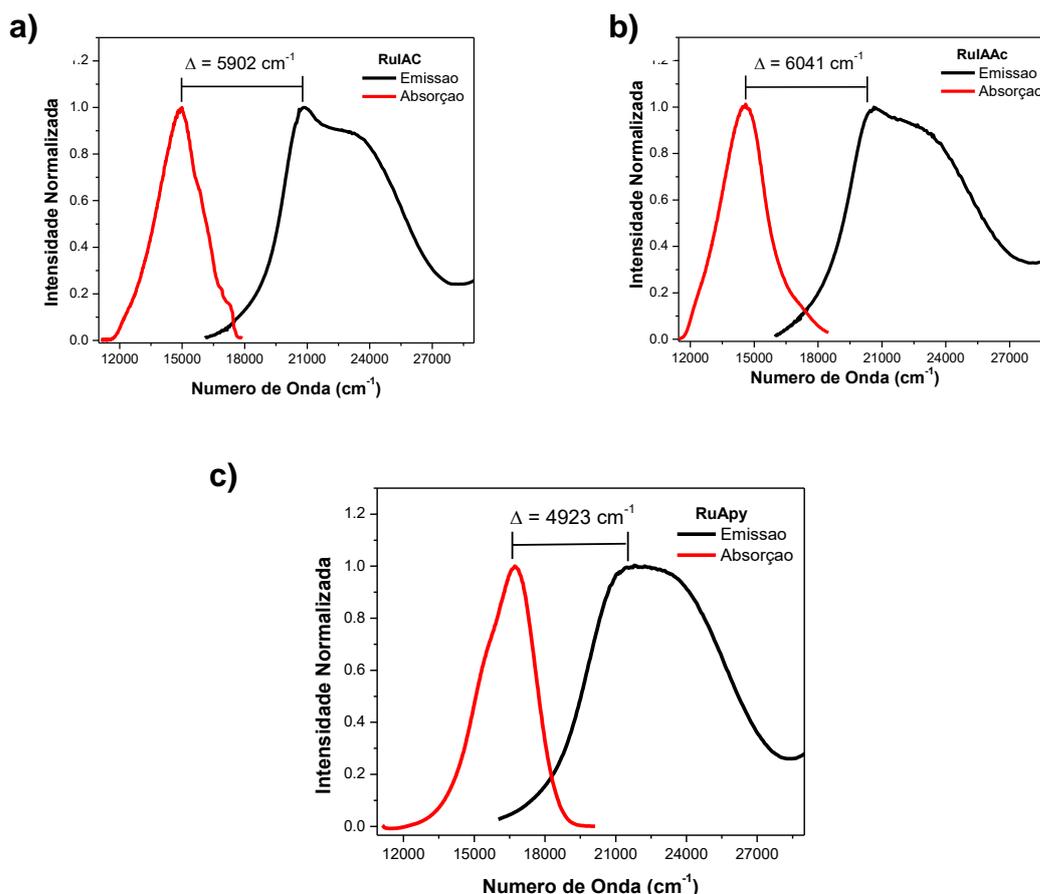
As Figuras 4.16 (a, b e c) e 4.17 (a, b e c) exibem os espectros de absorção e emissão com o deslocamento Stokes para os três complexos de rutênio em acetonitrila e tampão.

## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.16** – Deslocamento Stokes para os complexos: **(a)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, **(b)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(c)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em acetonitrila.

## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.17** – Deslocamento Stokes para os complexos: **(a)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, **(b)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(c)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em tampão fosfato pH 7.4.

Foram realizados os estudos de tempo de vida para os complexos de rutênio, onde os mesmos apresentaram tempo de vida relativamente longo, da ordem de  $\approx 100$  ns para os três complexos, com um decaimento bi-exponencial (Tabela 4.9), evidenciando a população de dois estados quando excitado, onde o  $\tau_1$  de maior tempo de vida é proveniente do estado MLCT<sup>3</sup>, e o  $\tau_2$  de menor tempo de vida é proveniente do estado MLCT<sup>1</sup>. De acordo com Marti e colaboradores a ThT apresenta um tempo de vida da ordem de 10 ns, sendo 10 vezes menor que os complexos de rutênio. Os tempos de vida relativamente longos dos 3 complexos são importantes, uma vez que corroboram com os objetivos deste trabalho, que é a utilização dos mesmos como sonda biológica.

#### 4. Resultados e Discussão

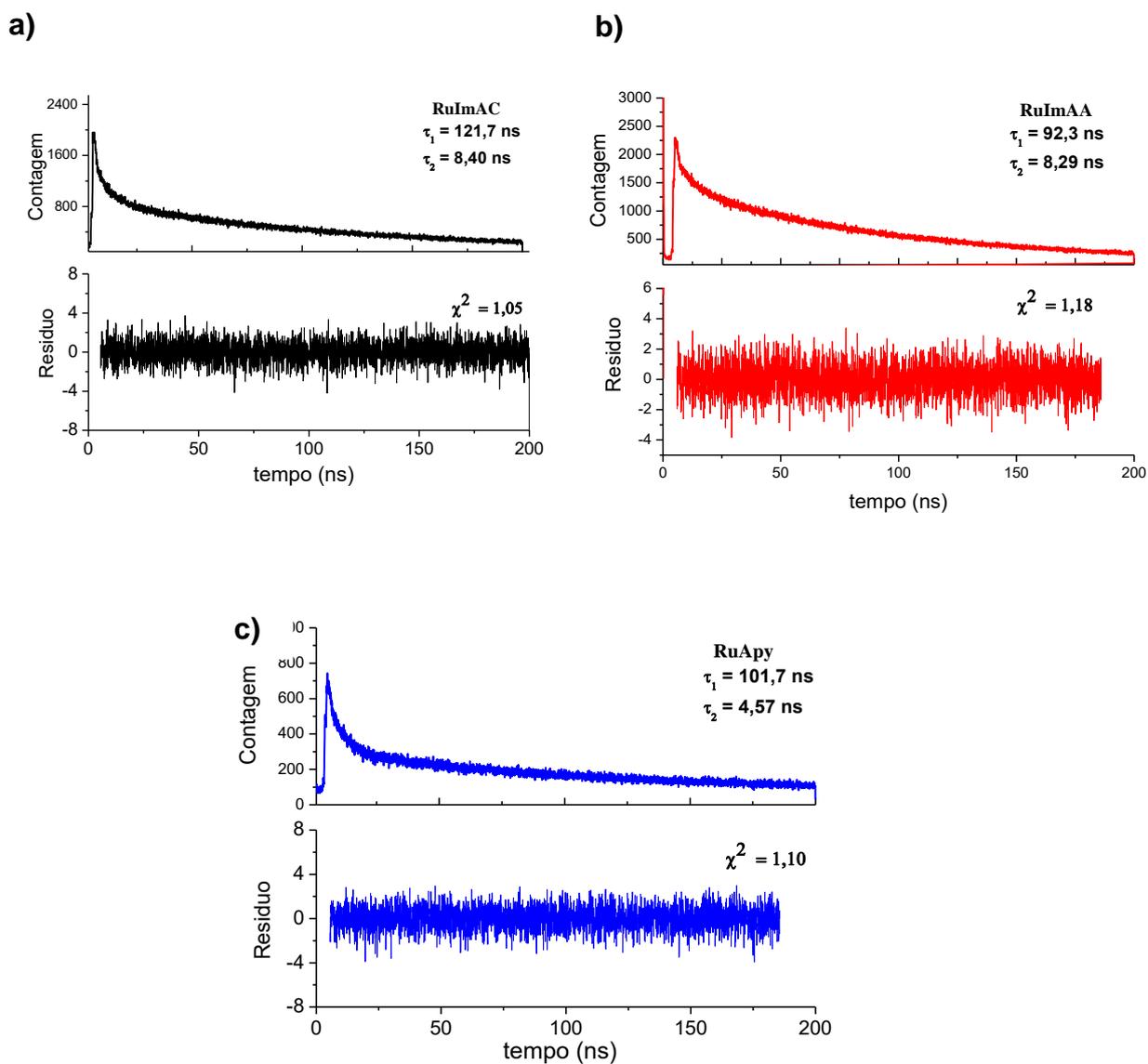
Para as medidas de decaimento de emissão foi utilizado um comprimento de onda de 450 nm de excitação para o complexo com aminopiridina e de 500 nm de excitação para os complexos com imidazol.

**Tabela 4.9** - Tempos de vida encontrado para os complexos de rutênio em acetonitrila, e os valores de  $\chi^2$

Complexo (CH <sub>3</sub> CN)	$\tau_1$ / ns	$\tau_2$ / ns	$\chi^2$
<b>Ru(4-ImAC)</b>	121,7 (94,58%)	8,40 (5,42%)	1,05
<b>Ru(ImAA)</b>	92,3 (96,42%)	8,29 (3,58%)	1,18
<b>Ru(2-Apy)</b>	101,4 (78,95%)	4,57 (21,05%)	1.10

Nas Figuras 4.18 (a, b e c) é possível visualizar as curvas de decaimento de emissão para os complexos de rutênio.

## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.18** - Curvas de decaimento de emissão para os complexos de rutênio: **(a)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>, **(b)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(ImAA)]PF<sub>6</sub> e **(c)** *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, em acetonitrila à temperatura ambiente. A qualidade do ajuste está indicada pelos gráficos de resíduos mostrados abaixo das curvas de decaimento.

#### 4.9 – Solubilidade e Lipofilicidade

Os valores de solubilidade e lipofilicidade dos complexos de rutênio foram obtidos a partir do método de *shake Flask*, onde os experimentos foram realizados a 37 °C e em soluções tampões de pH 3,6 e 7,4 simulando a fase aquosa, e 1-octanol simulando a fase orgânica, como descrito no procedimento experimental.

As Tabelas 4.10 e 4.11 exibem os resultados de lipofilicidade e de solubilidade para os complexos de rutênio.

**Tabela 4.10** - Lipofilicidade dos complexos em tampão com pH 3,6 e 7,4

Complexos	Lipofilicidade – LogP	
	Tampão	
	pH=7,4	pH=3,6
Ru(4-ImAc)	-0,4730	-0,5440
Ru(ImAA)	-0,4524	-0,4093
Ru(2-Apy)	-0,3594	-0,2388

**Tabela 4.11** - Solubilidade dos complexos em tampão com pH 3,6 e 7,4

Complexos	Solubilidade ( $\times 10^{-3}$ ) M	
	Tampão	
	pH=7,4	pH=3,6
Ru(4-ImAc)	1,02	0,95
Ru(ImAA)	0,87	0,77
Ru(2-Apy)	0,78	0,66

De acordo com os dados das tabelas verifica-se que o complexo com aminopiridina é o mais hidrofóbico, diferente dos complexos com imidazol. E como era de se esperar, os complexos com imidazol são mais hidrofílicos que o complexo com aminopiridina, como pode ser visualizado na Tabela 4.11. Os dados de

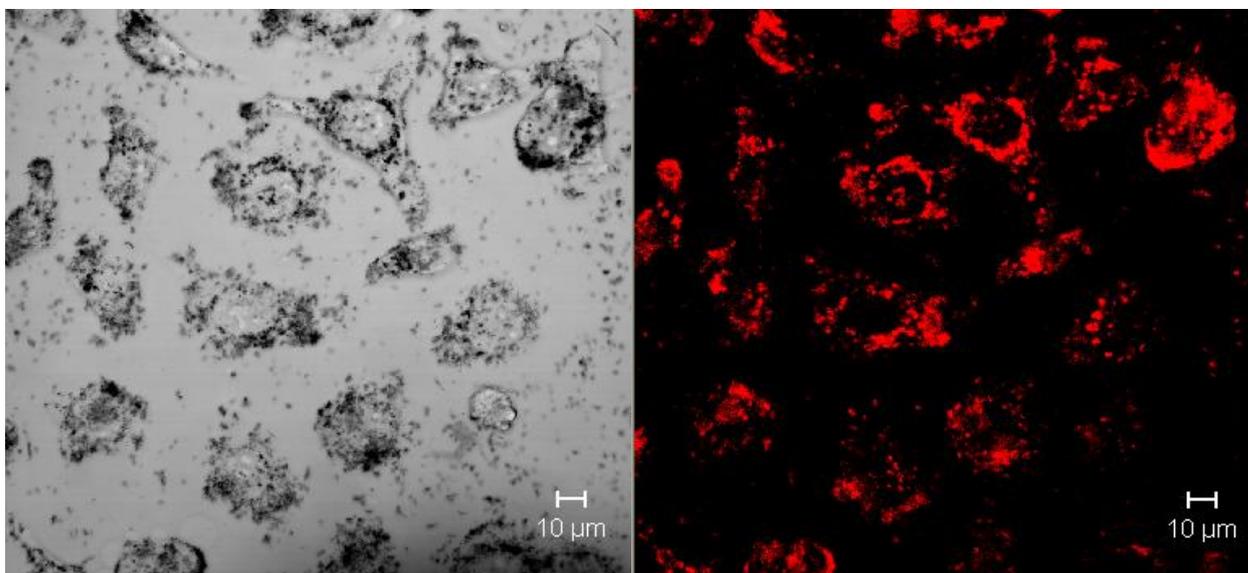
## 4. Resultados e Discussão

lipofilicidade e solubilidade estão de acordo com as características estruturais desses complexos. Esses resultados são importantes, uma vez que os mesmos irão influenciar diretamente nos estudos de interação no meio biológico, como serão visualizados nos tópicos adiante.

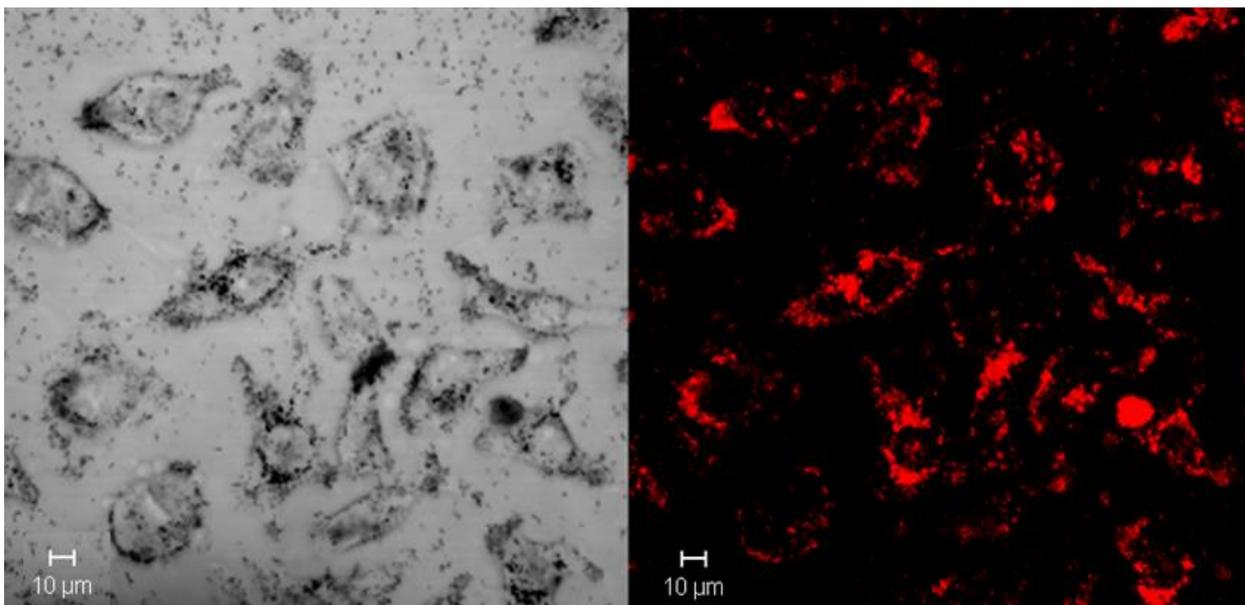
### 4.10 – Estudos Biológicos

#### 4.10.1 - Microscopia Confocal

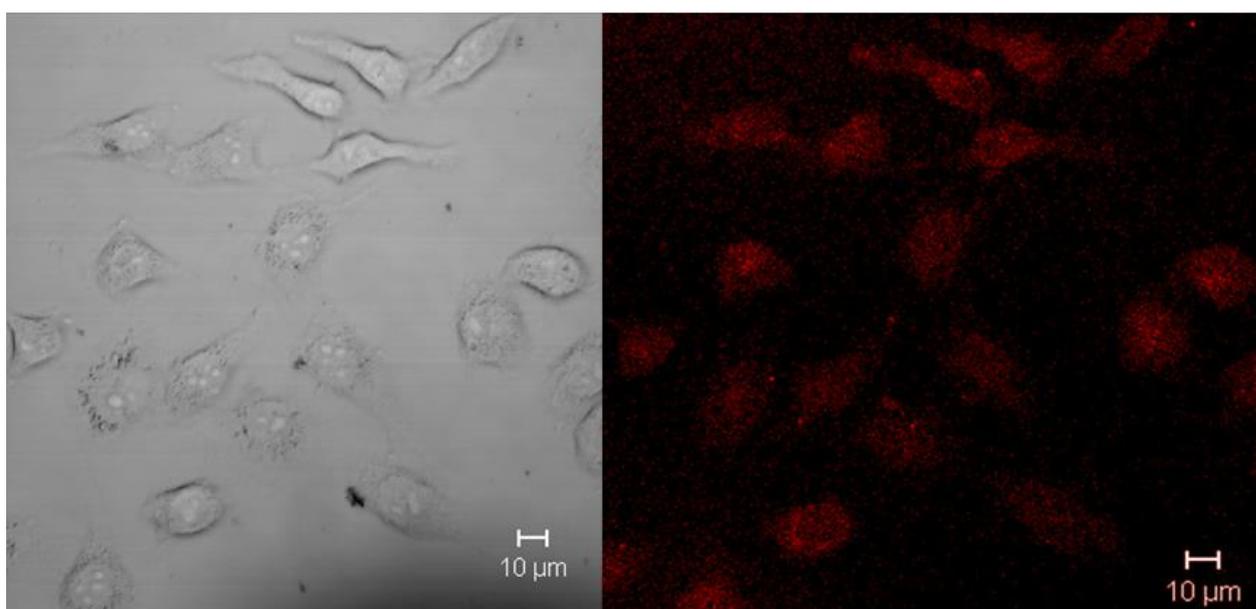
Sabendo que os complexos apresentam propriedades ópticas importantes para uma sonda biológica; como absorver e emitir no visível; e por apresentar tempo de vida relativamente longos ( $\approx 100$  ns), a próxima etapa do trabalho foi verificar se os complexos mantêm suas propriedades luminescentes no meio biológico, a fim de verificar a sua viabilidade como sonda. Nos experimentos foram utilizadas as células da linhagem celular HeLa (câncer do colo de útero), onde as células foram incubadas com os complexos na concentração de  $3,5 \times 10^{-4}$  M por 3 horas. As Figuras 4.19, 4.20 e 4.21 exibem as microscopias para os complexos de rutênio.



**Figura 4.19** - Microscopia Confocal para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub>.



**Figura 4.20** - Microscopia Confocal para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub>.



**Figura 4.21** - Microscopia Confocal para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

A partir das micrografias é possível fazer a localização desses complexos no interior das células, já que os mesmos não perderam suas propriedades emissivas no meio celular, o que é importante uma vez que uma sonda biológica precisa manter suas propriedades emissivas no meio celular. Analisando as imagens observa-se que os complexos com os ligantes imidazólicos (ImAC e ImAA) ocuparam de forma predominante a região citoplasmática das células, diferente do

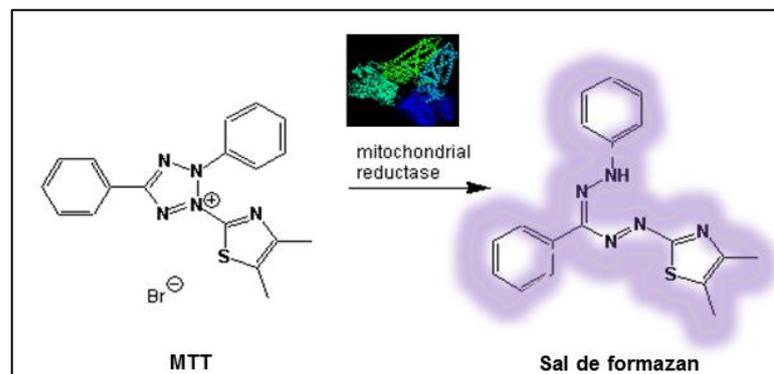
#### 4. Resultados e Discussão

complexo com aminopiridina, já que o mesmo ocupou de forma homogênea toda a porção celular, tanto a região citoplasmática quanto a região nuclear. Essas diferentes biodistribuição dos complexos na porção celular se devem aos seus diferentes valores de lipofilicidade e solubilidade. Como foi visto na seção anterior, o complexo com aminopiridina apresenta maior lipofilicidade, diante disso o mesmo interage e penetra com maior facilidade as membranas celulares (citoplasmática e nuclear), diferente dos complexos com imidazol.

##### 4.10.2 - Citotoxicidade

Foram realizados os testes de citotoxicidade dos complexos a fim de avaliar sua viabilidade no meio biológico. Para esses experimentos foram utilizadas as células da linhagem celular HeLa, onde variou-se a concentração dos complexos de 0 a 1000  $\mu\text{M}$ .

Os experimentos de citotoxicidade foram avaliados de acordo com a conversão do sal tetrazólico (MTT) no sal de Formazan, onde essa conversão só é possível através de enzimas presentes em células viáveis. A Figura 4.22 ilustra a equação de conversão do sal de MTT no sal de formazan, que é um sal que apresenta uma coloração púrpura.



**Figura 4.22** - Conversão do sal MTT no sal de formazan.

A partir dos dados de citotoxicidade foi possível identificar os valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração necessária para manter viva 50% das células). A Tabela 4.12

#### 4. Resultados e Discussão

exibe os dados de citotoxicidade para os precursores, ligantes livres, complexos de rutênio e para os fármacos comerciais (Tacrina e Galantamina).

**Tabela 4.12** - Valores de IC<sub>50</sub> para os precursores, ligantes livres, complexos de rutênio e para os fármacos comerciais

<b>Complexo</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAC)]PF <sub>6</sub>	884,20
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-ImAA)]PF <sub>6</sub>	800,12
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (2-Apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	726,97
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (Cl) <sub>2</sub> ]	590,59
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	> 1000
<b>2-aminopiridina</b>	> 1000
<b>4-Imidazol Ácido Carboxílico</b>	> 1000
<b>Fenantrolina</b>	> 1000
<b>Tacrina</b>	291,97
<b>Galantamina</b>	> 1000

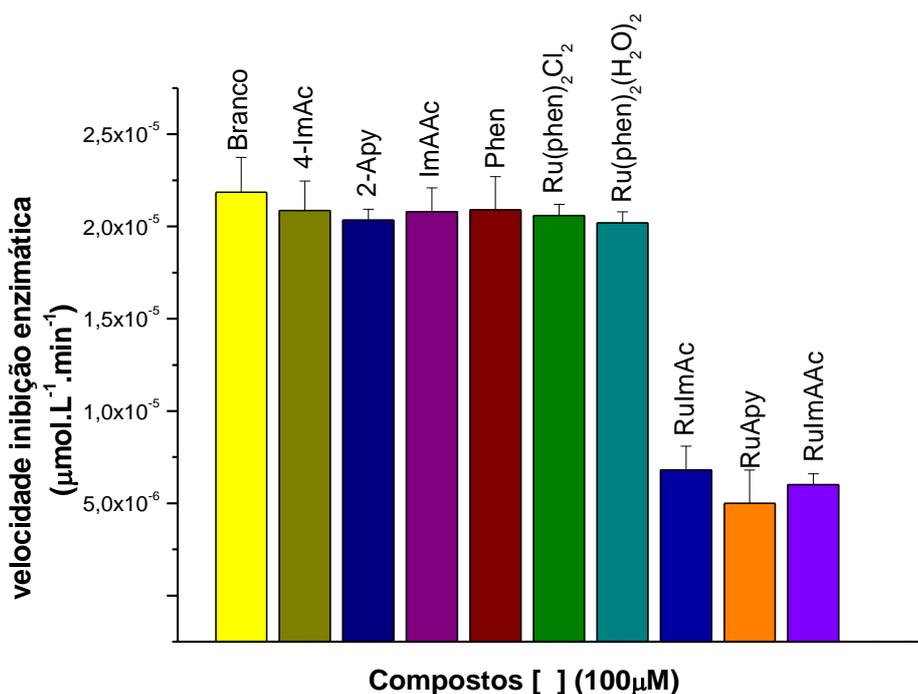
A partir dos dados de citotoxicidade verificou-se que os ligantes livres, precursores, os complexos com imidazol e aminopiridina apresentaram baixa toxicidade frente as células HeLa, uma vez que apresentaram um IC<sub>50</sub> próximo da máxima concentração utilizada nos testes biológicos. O fármaco Galantamina apresentou também baixa toxicidade, diferente do fármaco Tacrina que apresentou um menor valor IC<sub>50</sub> (291,97 μM), apresentando portanto, uma maior toxicidade quando comparado com os complexos de imidazol e aminopiridina.

## 4.11 – Estudos Terapêuticos

Sabendo que os complexos não apresentam toxicidade frente as células HeLa, e que mantêm suas propriedades luminescentes no meio biológico, o próximo passo foi verificar as suas propriedades terapêuticas para o tratamento da DA. Para essa finalidade foram realizados os estudos de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).

### 4.11.1- Inibição Enzimática

Foram realizados os testes de inibição da enzima Acetilcolinesterase, de acordo com a metodologia proposta por Ellman (1961)<sup>63</sup>. A Figura 4.23 exibe os dados de atividade de inibição da enzima AChE para os precursores, ligantes livres e complexos de rutênio na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 4.23** - Gráfico de barras para a porcentagem de inibição enzimática para os diferentes inibidores.

A partir do gráfico de barras observa-se que os ligantes livres, assim como os precursores, não apresentaram inibição frente à enzima acetilcolinesterase. Diferentes dos complexos de rutênio, que inibiram a atividade da enzima em cerca de 60%.

#### 4. Resultados e Discussão

Foram encontrados os valores de  $IC_{50}$  para os complexos (concentração na qual o complexo inibe 50% de atividade da enzima), onde podem ser visualizados na Tabela 4.13. Os complexos com os ligantes imidazólicos apresentaram maiores valores de  $IC_{50}$ , da ordem de 11  $\mu M$ , quando comparados com o complexo com aminopiridina, que apresentou um valor de 7,5  $\mu M$ . Comparando os valores de  $IC_{50}$  os complexos são interessantes uma vez que os seus valores estão dentro da janela terapêutica dos fármacos comerciais, ou seja, seu valores estão entre o  $IC_{50}$  da Rivastigamina que é de 181  $\mu M$  e da Huperzina que é de 0,0082  $\mu M$ <sup>79</sup>. Os valores de  $IC_{50}$  para os fármacos comerciais podem ser visualizados também na Tabela 4.13.

**Tabela 4.13** - Valores de  $IC_{50}$  para os complexos de rutênio e fármacos comerciais

Complexo	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
RulmAC	11,38
RulmAA	10,5
RuApy	7,5
Huperzina	181,39
Rivastigamina	0,0082

O complexo com aminopiridina apresentou também menor valor de  $K_i$  (constante de dissociação), indicando que as suas interações são mais fortes quando comparadas com os complexos com imidazóis. Essa melhor interação do complexo com aminopiridina se deve à sua maior hidrofobicidade, já que a enzima apresenta 3 sítios ativos e dois desses sítios são hidrofóbicos. O terceiro sítio é negativo, e pelo fato desse complexo apresentar maior carga positiva (2+) interage mais com esse sítio, diferente dos complexos imidazólicos que apresentam menor carga (1+). A fim de validarmos o método realizado em nosso laboratório, obtivemos os valores de  $K_i$  para a Tacrina, onde foi obtido um valor de 0,035  $\mu M$ , o que está coerente, uma vez que os valores de  $K_i$  reportados na literatura é de 0,031  $\mu M$ , sendo portanto valores bem próximos, indicando que o método realizado em nosso laboratório é confiável<sup>80</sup>. Os valores de  $K_i$  para os complexos de rutênio e para a tacrina podem ser visualizados na Tabela 4.14.

**Tabela 4.14** - Valores de  $K_i$  para os complexos de rutênio e Tacrina

<b>Complexes</b>	<b><math>K_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>LD_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Complex I	25,0	11,38
Complex II	24,5	10,5
Complex III	8,0	7,5

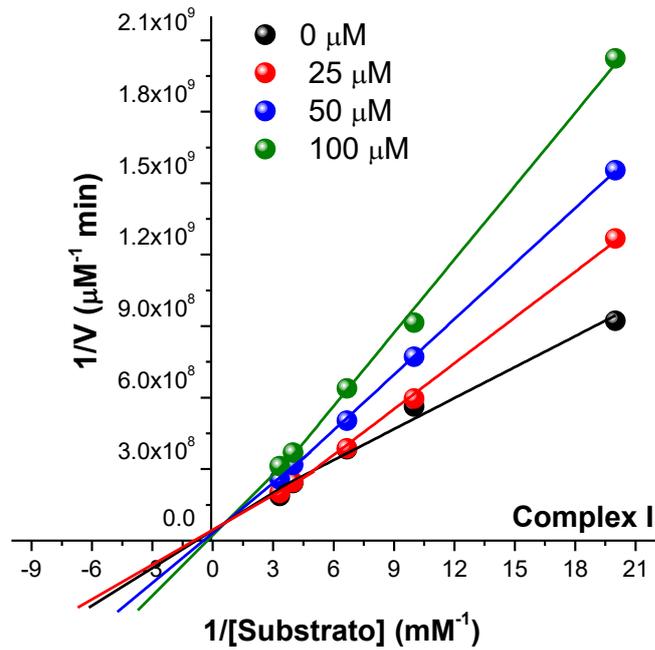
#### 4.10.1.1- Tipo de Inibição:

Sabendo que os complexos tem inibição frente a enzima AChE, a próxima etapa foi descobrir o tipo de inibição que os complexos apresentam frente a enzima. A inibição enzimática pode ser de dois tipos: irreversível e reversível, onde o tipo de inibição vai ser definido de acordo com a força de ligação e interação do complexo com a enzima. Os inibidores reversíveis se classificam em competitivo, não-competitivo e incompetitivo. O perfil do gráfico de Lineweaver–Burk, ou de duplos recíprocos vai indicar qual o tipo de inibição que estará ocorrendo<sup>80,81</sup>.

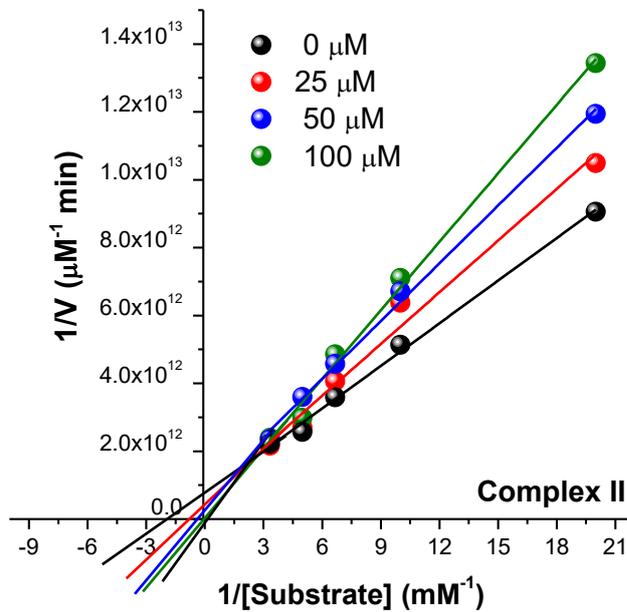
Para essa finalidade, foi obtido um gráfico variando a concentração de substrato AChI (50, 100, 150, 250 e 300  $\mu\text{M}$ ) e de complexo de rutênio (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Observando o perfil dos gráficos das Figuras 4.24, 4.25 e 4.26 os complexos apresentaram inibição do tipo reversível, ou seja, o complexo não disputa com o substrato pelo mesmo sítio ativo da enzima.

Os complexos apresentaram uma inibição do tipo reversível, o que é interessante e importante, uma vez que os inibidores irreversíveis são muito tóxicos para o organismo, como por exemplo a tacrina, já que não são específicos, sendo capazes de inativar qualquer enzima, o que não é benéfico.

## 4. Resultados e Discussão

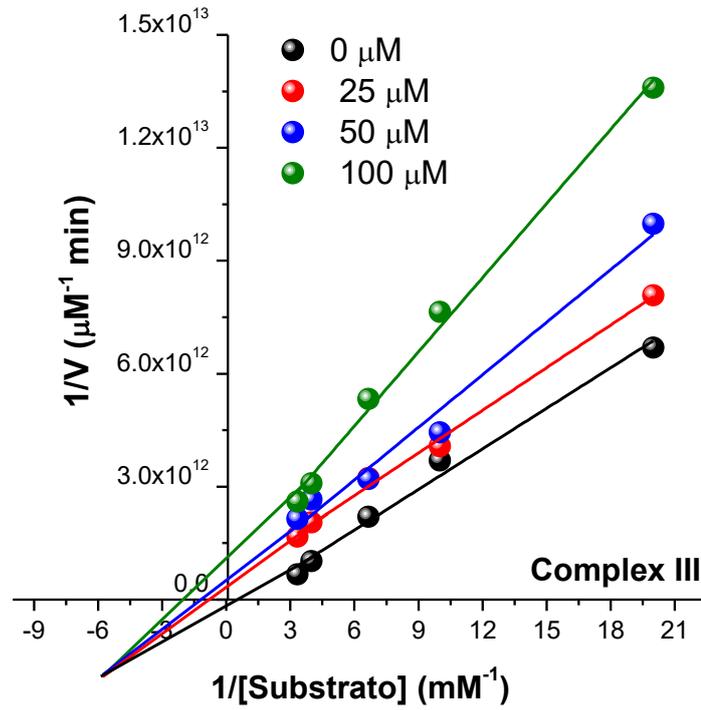


**Figura 4.24** - Gráfico de Lineweaver-Burke de  $1/V_0$  versus a recíproca do substrato ACh, para diferentes concentrações do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAC)]PF<sub>6</sub> (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 4.25** - Gráfico de Lineweaver-Burke de  $1/V_0$  versus a recíproca do substrato ACh, para diferentes concentrações do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-ImAA)]PF<sub>6</sub> (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ).

## 4. Resultados e Discussão

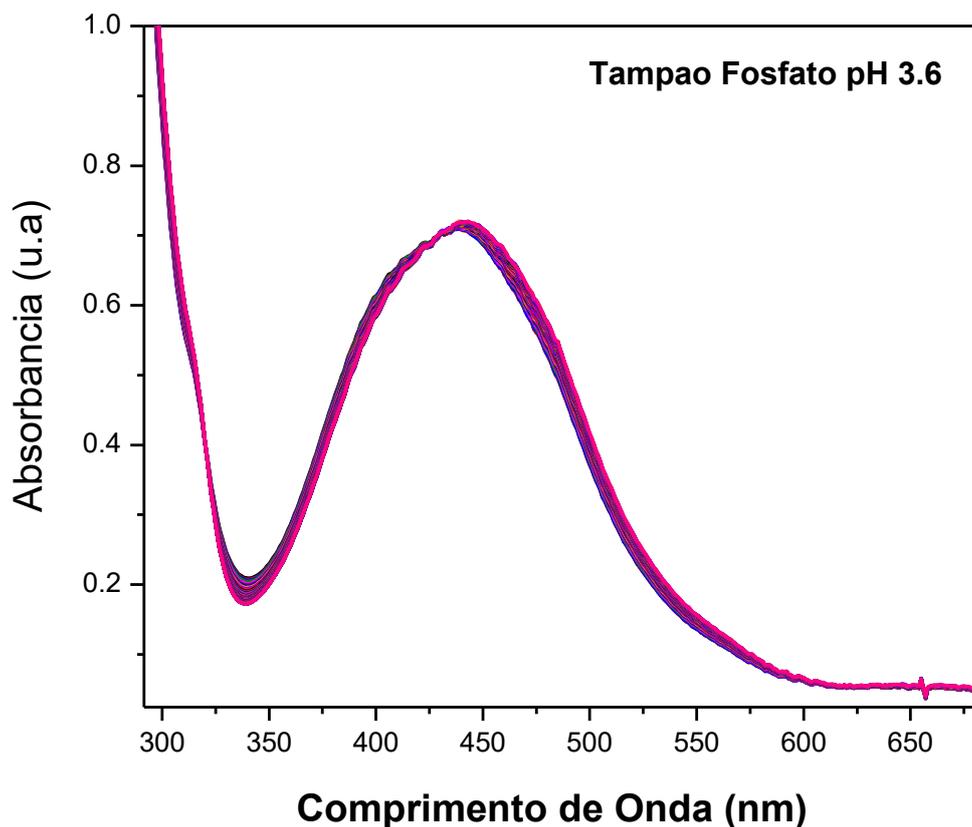


**Figura 4.26** - Gráfico de Lineweaver-Burke de  $1/V_0$  versus a recíproca do substrato ACh, para diferentes concentrações do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (0, 25, 50 e 100  $\mu M$ ).

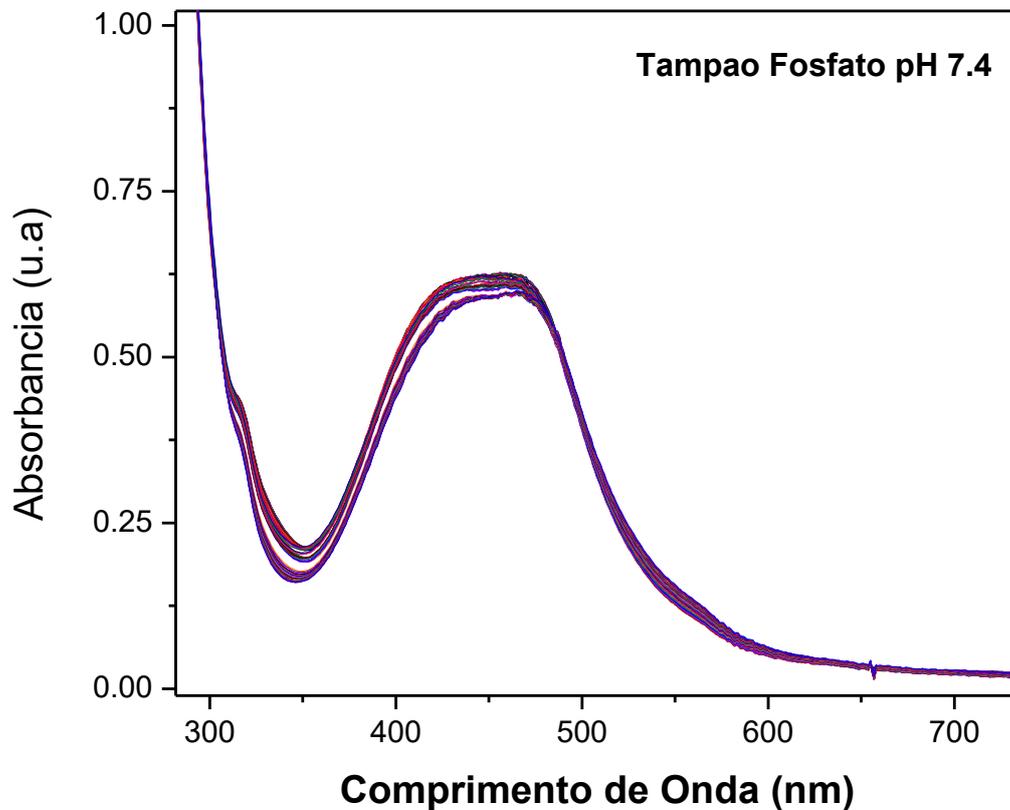
## 4.12- Estudos de estabilidade e de Interação com a HSA

### 4.12.1 - Estabilidade

Visto que o complexo com aminopiridina apresenta propriedades terapêuticas promissoras, foi verificado o comportamento desse complexo em tampão fosfato em diferentes valores de pH (3.6 e 7.4) que mimetizam os meios do estômago e da corrente sanguínea, através de medidas de espectroscópicas na região do UV-Vis por 12 horas. Os espectros de absorção nos diferentes pH podem ser visualizados nas Figuras 4.27 e 4.28. A luminescência desse complexo também foi avaliada em tampão com diferentes valores de pH, como pode ser visto na Figura 4.29.



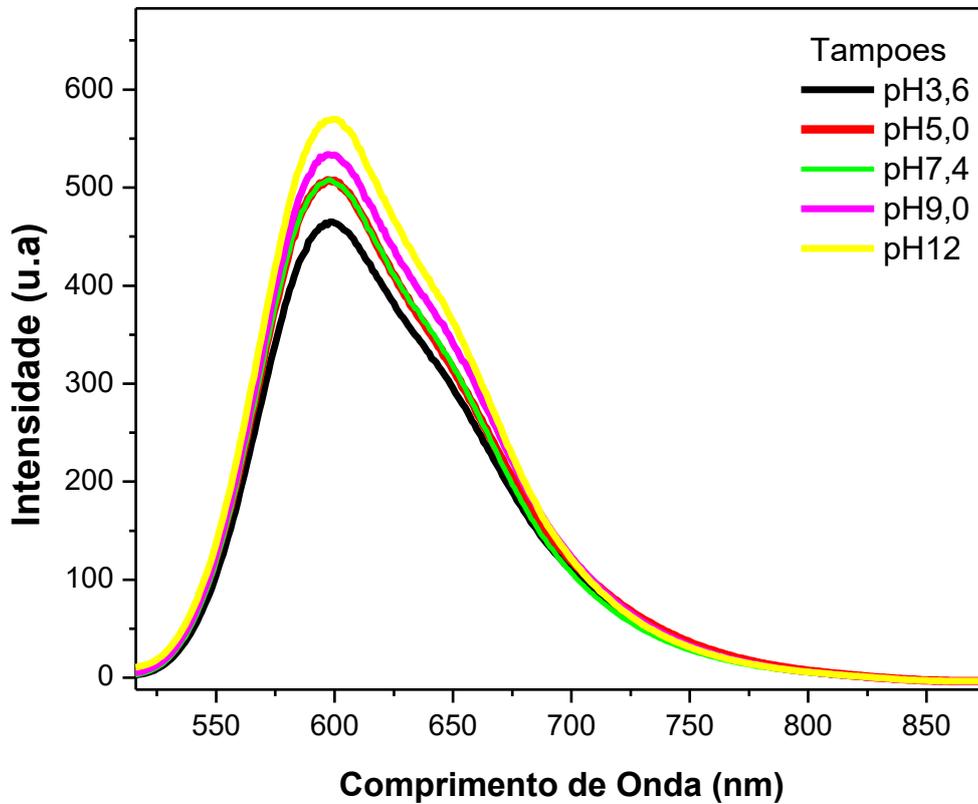
**Figura 4.27** - Espectros de absorvância referentes aos estudo de estabilidade do complexo em tampão fosfato em pH 3.6.



**Figura 4.28** - Espectros de absorvância referentes aos estudos de estabilidade do complexo em tampão fosfato em pH 7,4.

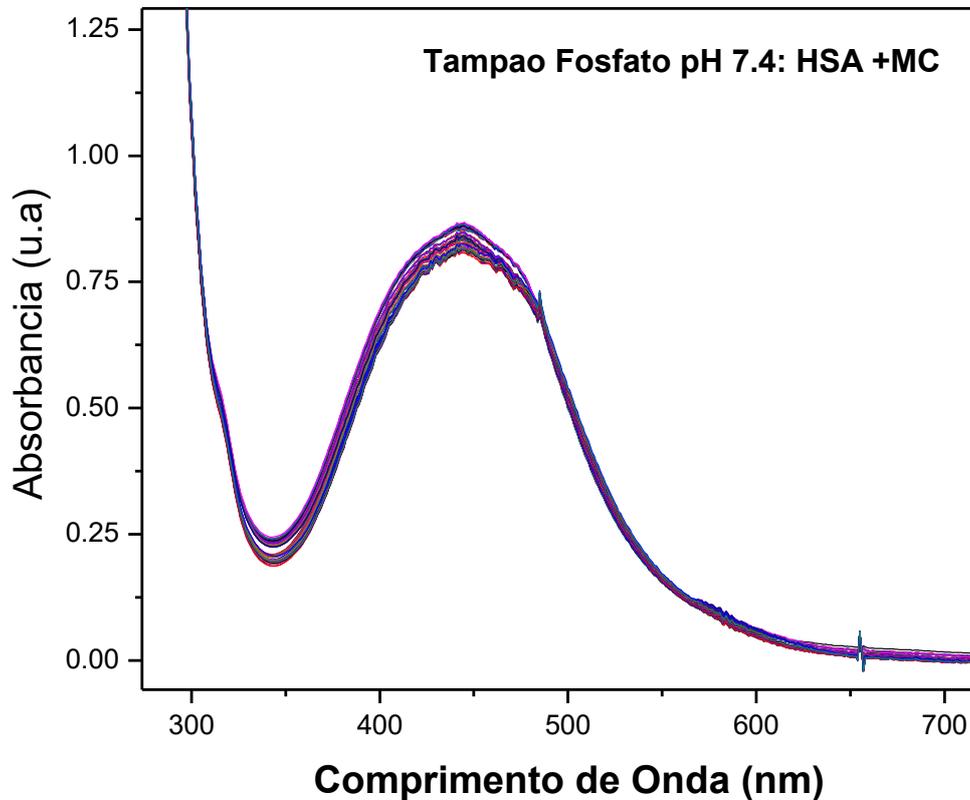
Observando os espectros verifica-se que o complexo na solução com pH 3,6 e 7,4 não exibiu diferenças significativas em seus espectros de absorção. Verifica-se também que o complexo apresentou estabilidade nessas diferentes soluções de pH, o que é importante, uma vez que o fármaco no meio biológico percorrerá diferentes meios, com diferentes valores de pH, sem perder a sua identidade química, apenas ocorrendo a protonação ou não<sup>86</sup>.

Na Figura 4.29 verifica-se que praticamente não houve mudanças significativas na resposta luminescente dos complexos em diferentes valores de pH, indicando que a modificação do pH não faz com que esse complexo perca suas propriedades luminescentes, o que é uma característica importante quando se pensa em uma sonda biológica.



**Figura 4.29-** Emissão luminescente do complexo em tampão fosfato em diferentes pH (5,0-12).

Foi verificado também a estabilidade do complexo na presença da proteína Albumina Serina Humana (HSA), que é uma importante proteína de transporte de fármacos e outros componentes no meio biológico. As medidas espectroscópicas foram realizadas por 12 horas, em tampão fosfato (pH 7.4), na presença de HSA na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e do complexo na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Esses dados podem ser vistos na Figura 4.30.



**Figura 4.30** - Estudo de estabilidade do complexo na presença da proteína HSA tampão fosfato em pH 7.4.

O complexo apresentou ser estável (não sofre hidrólise) na presença da proteína o que é importante, uma vez que no meio biológico durante o processo de distribuição os dois irão interagir, diante disso é importante que mantenha suas propriedades inalteradas para que possa cumprir com a sua função.

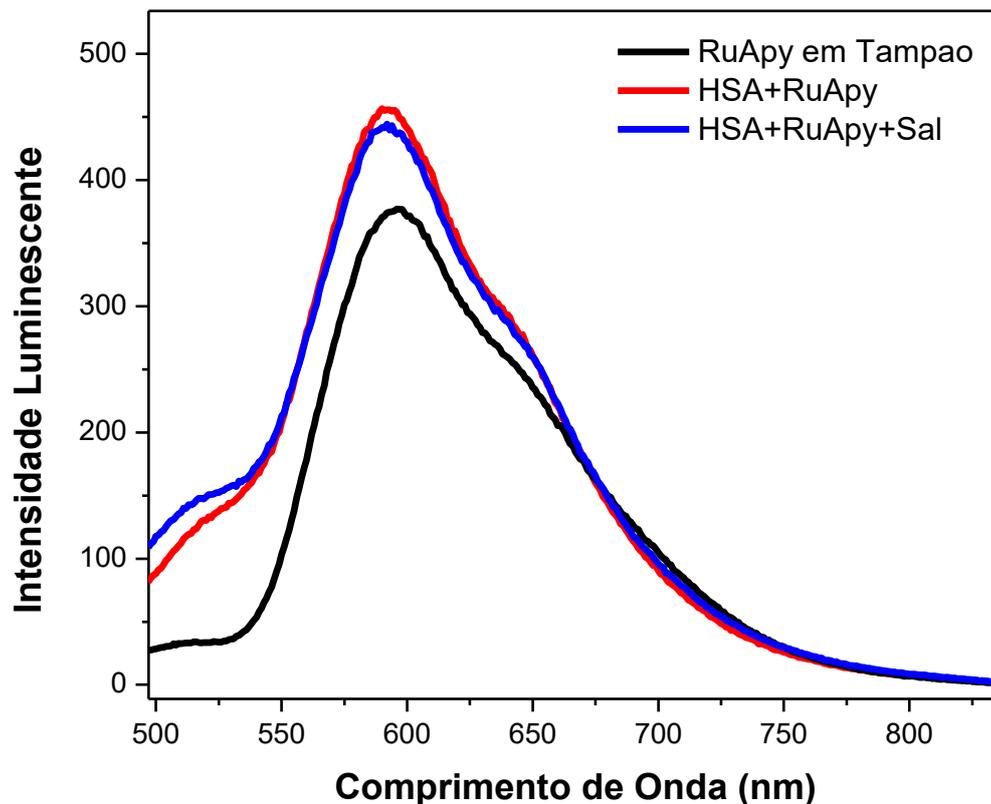
#### 4.12.2 - Interação com HSA

Após verificarmos a estabilidade dos complexos em tampão com diferentes valores de pH, e com a proteína, a próxima etapa foi avaliar as interações do complexo de rutênio com a HSA. Esses estudos são bastante importantes uma vez que a força de ligação entre a HSA e o complexo, vai influenciar no mecanismo de distribuição do fármaco no organismo. Foram realizadas medidas de luminescência,

#### 4. Resultados e Discussão

de ITC e DC para estudarmos o tipo de interação, e obtermos as características termodinâmicas dessa interação.

Inicialmente foram avaliadas as interações entre os complexos e HSA a partir das medidas de emissão luminescente o qual pode ser visualizado na Figura 4.31.



**Figura 4.31** - Espectro de emissão do complexo aminopiridina em tampão, na presença de HSA, e com sal.

A partir dos espectros de emissão verifica-se que o complexo na presença de HSA apresentou um significativo aumento na intensidade luminescente, quando comparada com emissão do complexo em tampão. Esse aumento significativo se deve às interações entre o complexo e a proteína HSA. Foi realizada a medida da emissão na presença de complexo, proteína e sal, a fim de verificarmos se as interações eram de natureza eletrostática, e a partir dos espectros verificou-se que

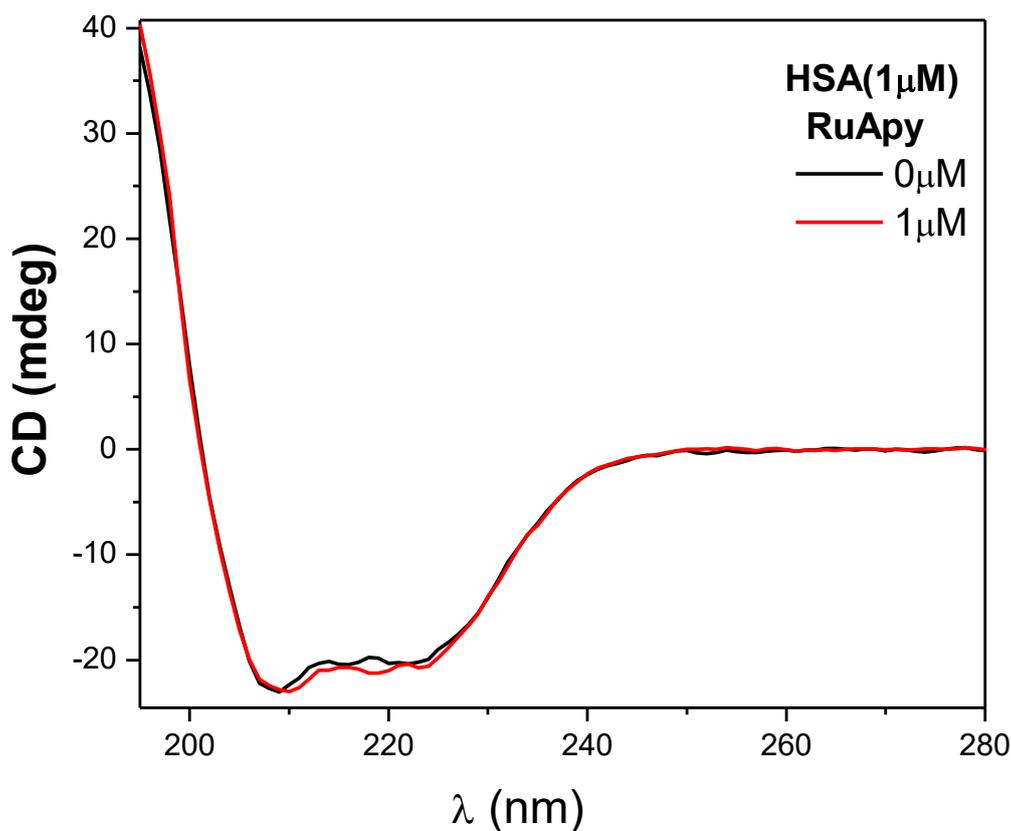
#### 4. Resultados e Discussão

---

não houve mudanças da resposta luminescente quando comparado com o complexo+HSA, indicando que as interações não são de natureza eletrostática. Essas interações serão melhores elucidadas pelos experimentos de ITC e DC como será visto nos experimentos adiante<sup>82</sup>.

Foram realizadas medidas de dicroísmo circular (DC), onde foi possível avaliar a conformação secundária da proteína HSA. Quando a conformação da proteína sofre mudanças na presença de algum ligante, pode-se concluir que a interação proteína-ligante modificou a estrutura secundária da proteína. Se a mudança for acentuada, pode resultar na desativação das funções da proteína ou desnaturá-la. Quando não há variação na banda de DC não significa que não houve interação entre a proteína e o ligante, indica apenas que essa interação não alterou a estrutura secundária<sup>82,83</sup>.

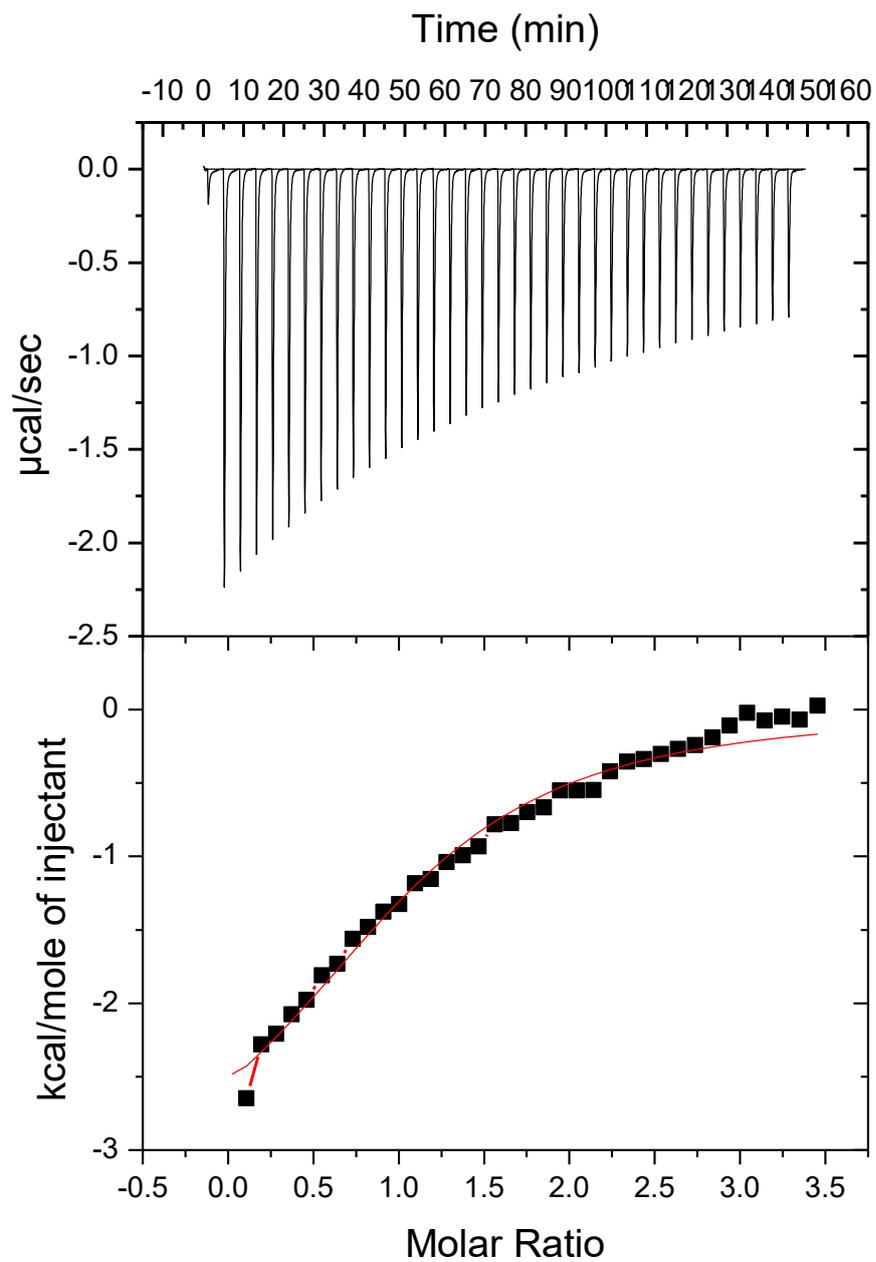
Na Figura 4.32 é possível visualizar o gráfico de DC para o complexo com aminopiridina e HSA. As duas bandas de absorção observadas no espectro com máximo de absorção em 208 nm e 220 nm são caracterizados como sendo as absorções provenientes das transições das estruturas secundárias  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , respectivamente. Estas bandas não sofreram variações significativas na presença do complexo sugerindo que a HSA não sofreu alteração em sua estrutura secundária quando interagiu com o complexo<sup>82,83</sup>.



**Figura 4.32** - Espectro de DC do complexo aminopiridina em tampão, na presença de HSA.

Por intermédio da técnica de ITC é possível obter informações sobre os valores da constante de afinidade, número de sítios de ligação e sobre os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ) de uma ampla variedade de interações. O HSA foi dissolvido em tampão fosfato pH 7,4 (0,1M), com 10% DMSO. Para os cálculos de concentração de HSA utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar da proteína ( $\epsilon = 43824 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) em 280 nm<sup>83,84</sup>. O gráfico de ITC pode ser visualizado na Figura 4.33, referentes às interações do complexo RuApy com a proteína.

## 4. Resultados e Discussão



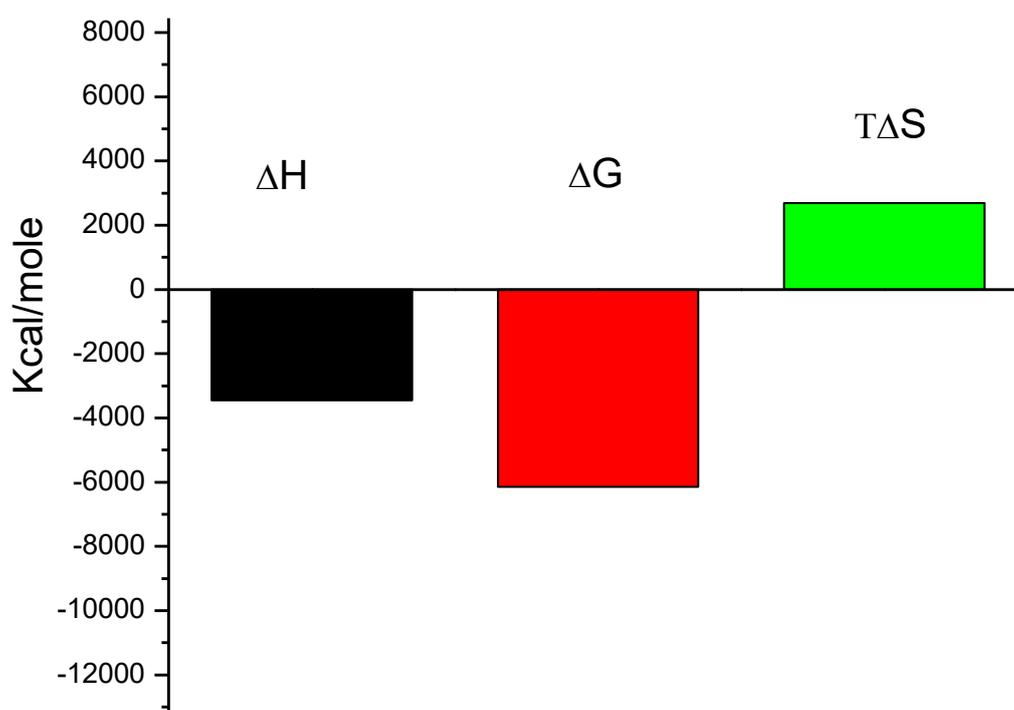
**Figura 4.33** - Experimento de ITC para o complexo aminopiridina com a proteína HSA.

Na tabela 4.15 e na Figura 4.34 constam os dados termodinâmicos obtidos a partir das medidas de ITC ( $K_d$ ,  $n$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta H$ ).

## 4. Resultados e Discussão

**Tabela 4.15** – Dados termodinâmicos obtidos a partir das medidas de ITC: constante de dissociação ( $K_d$ ), número de sítios ativos ( $n$ ), entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ )

T (K)	n	$K_d \times 10^4$ (mol L <sup>-1</sup> )	$\Delta H \times 10^3$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )
310	1,08 ± 0,057	2,16 ± 3,19	-3,456 ± 3,7	8,69 ± 0,5



**Figura 4.34** - Valores de entalpia, energia de Gibbs e entropia provenientes do experimento de ITC para o complexo aminopiridina com a proteína HSA.

A interação entre o complexo e a HSA é de natureza exotérmica, como pode ser visto na Tabela o valor de  $\Delta H$ . Essa interação apresentou um valor de constante de dissociação de  $2,16 \times 10^3$  M, indicando que as interações são

#### 4. Resultados e Discussão

---

relativamente fracas, uma vez que apresentou elevado valor de  $K_d$ . A interação apresenta uma estequiometria de reação de 1:1, ou seja, na interação existe 1 proteína para 1 complexo metálico. A interação é impulsionada pela entalpia ( $-3,456 \pm 3,7$  kcal/mol) e por uma entropia favorável ( $8,69 \pm 0,5$  kcal/mol). A entalpia de ligação reflete principalmente na força das interações (ligação de hidrogênio, pontes salinas e de van der Waals) entre o ligante e a proteína. A entropia de ligação está relacionada com alterações nos graus de liberdade do sistema<sup>82-86</sup>.

A formação do complexo restringe conformações de ligante e proteína e, portanto, resulta em perdas de entropia de ligação de translação e rotação. Por outro lado, a liberação de moléculas de água resulta em uma contribuição de entropia favorável. A fraca afinidade de interação RuApy/HSA sugere uma interação não covalente e de acordo com a literatura<sup>86</sup>, o perfil do gráfico 4.33 é resultante de interação por ligação de hidrogênio.

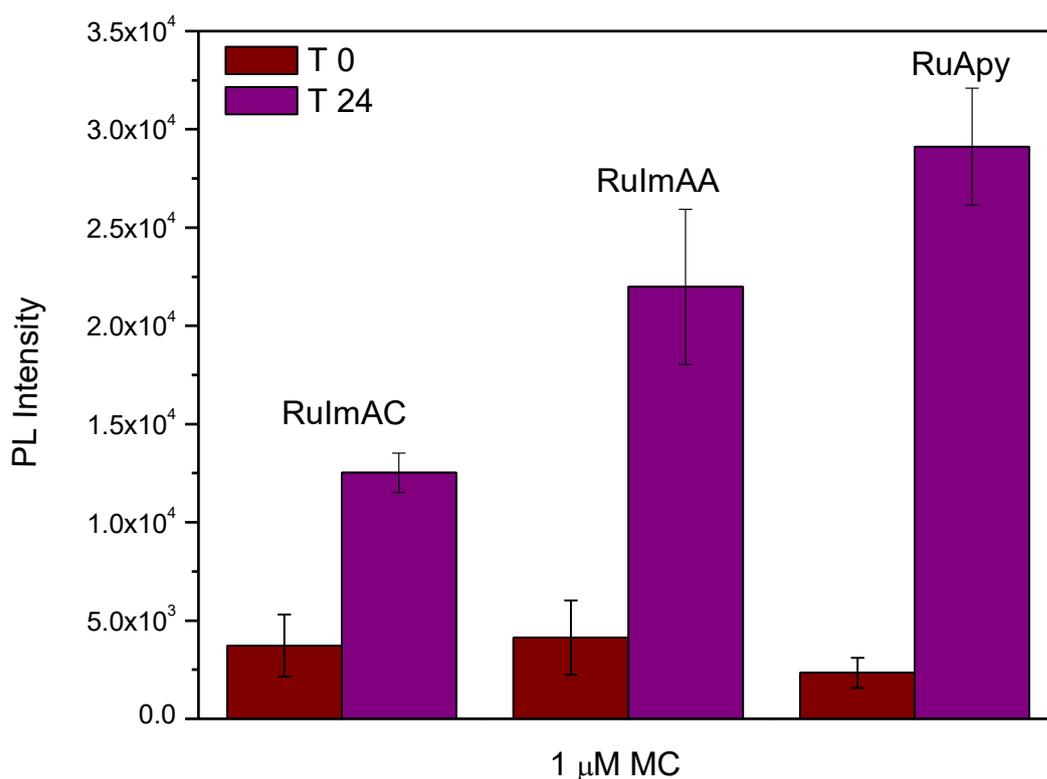
O complexo com aminopiridina apresentou interações fracas com a HSA, o que é importante e interessante, uma vez que a HSA é uma proteína de transporte, a mesma não pode ligar-se fortemente com o fármaco o qual irá carrear, senão não será realizada a liberação do mesmo de forma eficiente.

### 4.13- Diagnóstico

#### 4.13.1- Experimentos com $\beta$ -Amilóide

Sabendo que os complexos apresentam inibição frente a AChE, apresentaram considerável interação com a proteína HSA, que mantiveram suas propriedades luminescentes tanto no interior das células como nos diferentes meios de pH, a etapa seguinte foi verificar se os complexos poderiam ser utilizados na identificação das fibras de  $\beta$ -amilóide, ou seja, se podiam ser utilizados no diagnóstico da DA. Foi realizada medidas de emissão luminescente dos complexos na presença dos monômeros e das fibras de  $\beta$ -A, onde esses dados estão ilustrados na Figura 4.35.

## 4. Resultados e Discussão



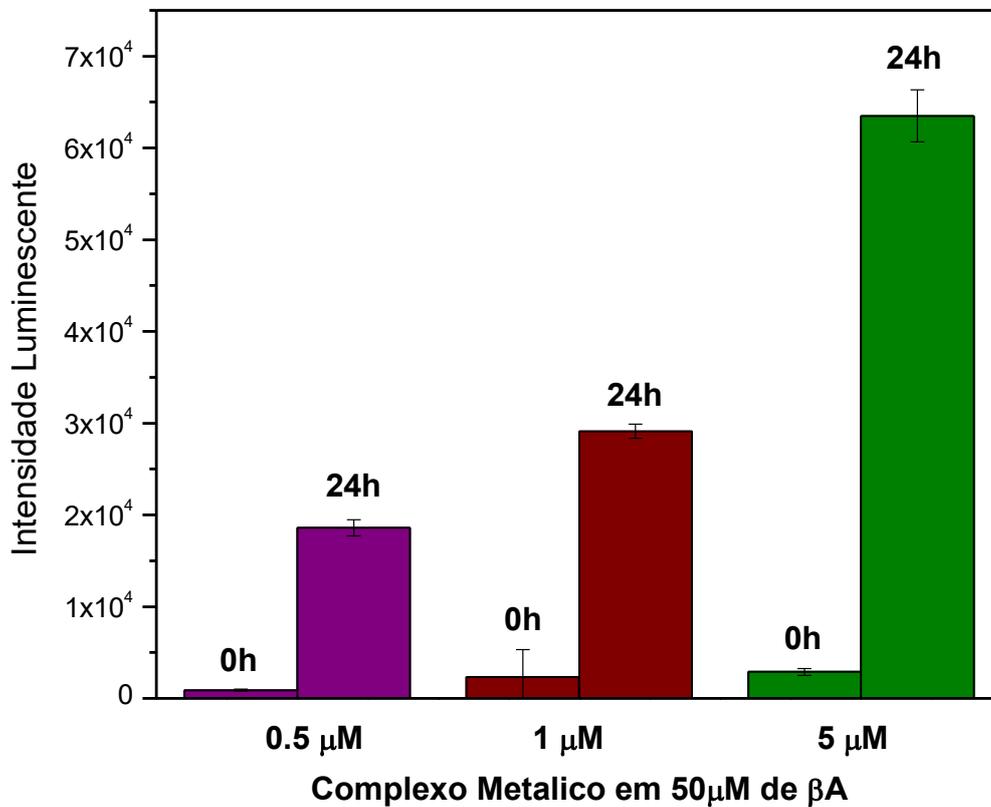
**Figura 4.35** - Gráfico de barras para os complexos de rutênio (1  $\mu\text{M}$ ) na presença de  $\beta$ -amilóide (50  $\mu\text{M}$ ) em diferentes tempos de incubação (0 horas e 24 horas).

Os complexos apresentaram baixa luminescência no estágio inicial da agregação no tempo zero (T 0), diferente de após 24 horas de incubação. No estágio inicial de agregação, existe o  $\beta$ -amilóide somente na forma monomérica, diferente de 24 h de incubação, que o peptídeo se encontra na forma fibrilar. Esses resultados são importantes porque realmente comprovam a sensibilidade emissiva destes complexos com os diferentes tipos de agregação do peptídeo. Observando o gráfico de barras verifica-se que o complexo com aminopiridina apresentou maior sensibilidade luminescente às diferentes agregações, do que os complexos imidazólicos, uma vez que teve uma maior resposta de luminescência, já que os complexos com imidazol teve um aumento da luminescência de 3,32 e 5,32 vezes, para RuImAC e RuImAA respectivamente, e de 12,5 vezes para o complexo com aminopiridina.

Foram realizados outras medidas com tempos de incubação de 0 e 24 horas, em diferentes concentrações do complexo com aminopiridina (0.5, 1.0 e 5.0  $\mu\text{M}$ ) e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -amilóide. As diferenças nas respostas luminescentes para o complexo

#### 4. Resultados e Discussão

em diferentes concentrações podem ser visualizadas no gráfico de barras exibidos na Figura 4.36.



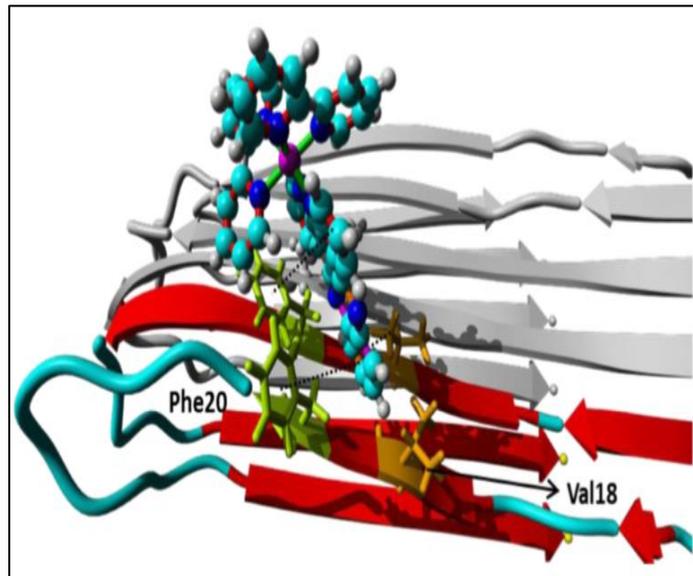
**Figura 4.36** - Gráfico de barras para o complexo aminopiridina em diferentes concentrações com o peptídeo  $\beta$ -amilóide sem incubação, após 24 horas de incubação.

Analisando o gráfico, verifica-se que à medida que aumentou a concentração dos complexos, teve um aumento da resposta luminescente, como era de se esperar.

De acordo com Martí e colaboradores<sup>87</sup> essas diferenças na resposta luminescente se devem à interações hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio que os complexos apresentam com o  $\beta$ -amilóide na forma fibrilar. No amilóide fibrilar existe a formação das folhas  $\beta$ , e de acordo com a organização conformacional, tem-se nessas fibrilas a presença de fendas hidrofóbicas formadas pelos aminoácidos valina e fenilalanina, das posições 18 e 20, respectivamente da sequência do

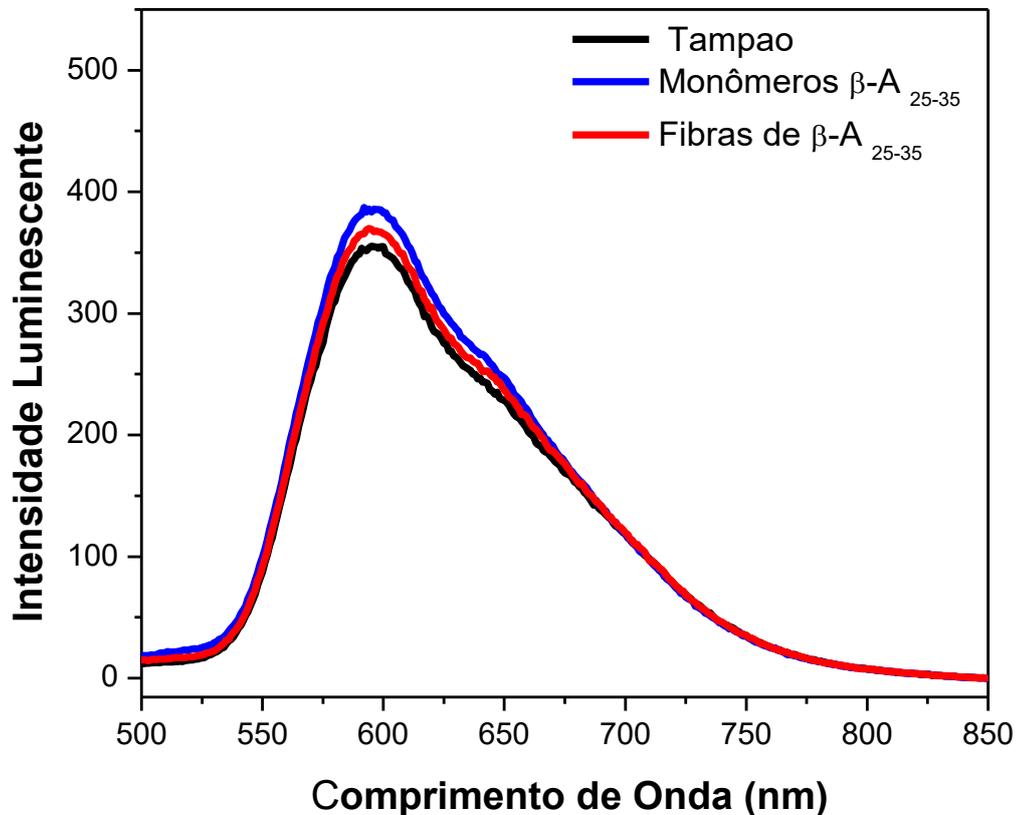
#### 4. Resultados e Discussão

amilóide  $\beta$ -A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ -A<sub>1-42</sub>. De acordo com esses autores, são nessas fendas que ocorrem as interações com o complexo de rutênio, contribuindo com a emissão luminescente<sup>82</sup>. A Figura 4.37 exhibe a conformação das folhas- $\beta$  e interação das fendas hidrofóbicas com o complexo de rutênio de dppz, modelo este desenvolvido por Martí e colaboradores<sup>87</sup>.



**Figura 4.37** - Conformação da folha- $\beta$  com a formação da fenda hidrofóbica do  $\beta$ -A, exibindo as interações com o complexo de rutênio dppz, trabalho desenvolvido por Nathan e colaboradores.

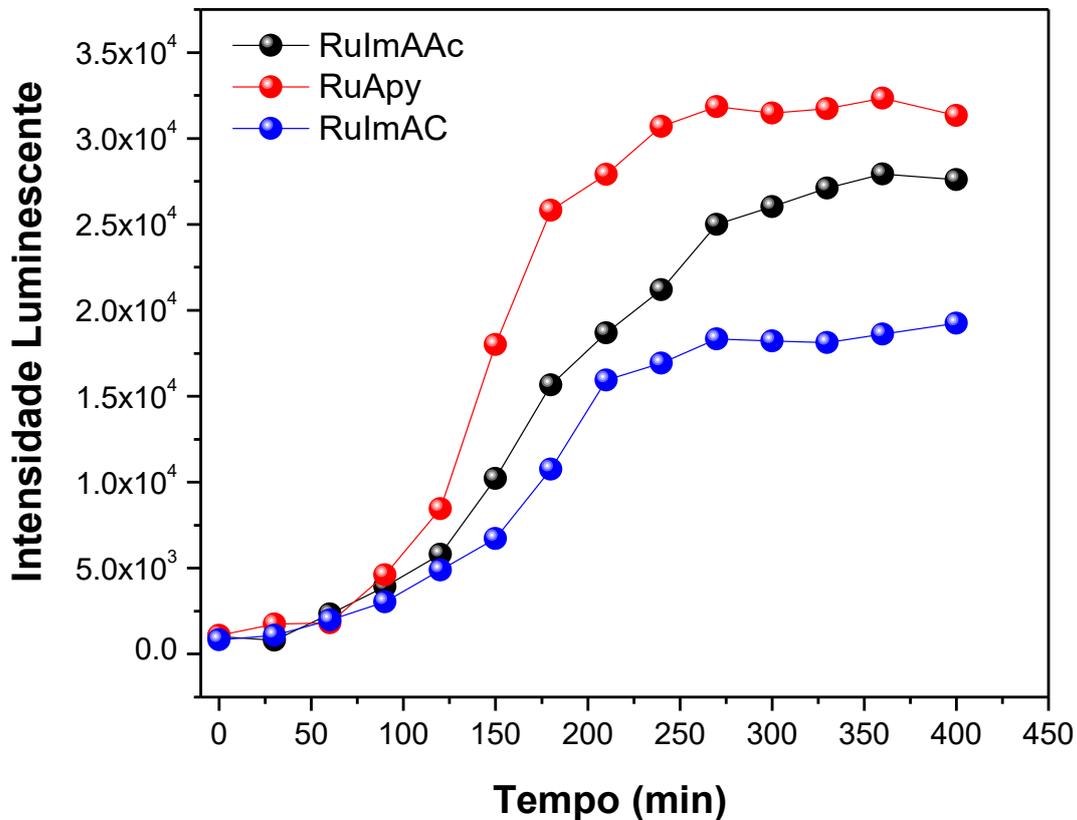
A fim de verificarmos se a luminescência dos complexos são realmente provenientes dessas interações com esses aminoácidos, foram realizadas medidas de luminescência do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> com o  $\beta$ -A<sub>25-35</sub>, que é um fragmento do peptídeo que não apresenta os aminoácidos responsáveis pelas interações com o complexo (Val18 e Phe20). Verificou-se que os complexos não apresentaram mudanças significativas na emissão luminescente na presença dos monômeros e das fibrilas desse peptídeo, confirmando que de fato as interações ocorrem por meio desses aminoácidos<sup>87</sup>. A Figura 4.38 exhibe as emissões luminescentes do complexos na presença de tampão, do monômero e das fibrilas do  $\beta$ -A<sub>25-35</sub>.



**Figura 4.38** - Emissão luminescente do complexo de aminopiridina na presença de tampão, com o  $\beta$ -A<sub>25-35</sub> na forma monomérica e fibrilar.

#### 4.13.2-Monitoração da Agregação

Após verificar se os complexos apresentavam luminescência sensível às mudanças dos aglomerados de  $\beta$ -A, realizou-se a monitorização do processo de fibrilização (*Real time*) do  $\beta$ -amilóide através das medidas de luminescência. Para os testes de monitorização foram utilizados os complexos na concentração de 5  $\mu$ M, onde os mesmos foram incubados com o  $\beta$ -amilóide na forma monomérica na concentração de 50  $\mu$ M, na temperatura de 37 °C e com agitação de 900 rpm. A cada 30 min de incubação, foram realizadas as medidas luminescentes, onde foram obtidas curvas sigmoidais (intensidade de luminescência *versus* tempo), como podem ser visualizadas na Figura 4.39.



**Figura 4.39** - Monitorização do processo de agregação do  $\beta$ -amilóide com os complexos de rutênio.

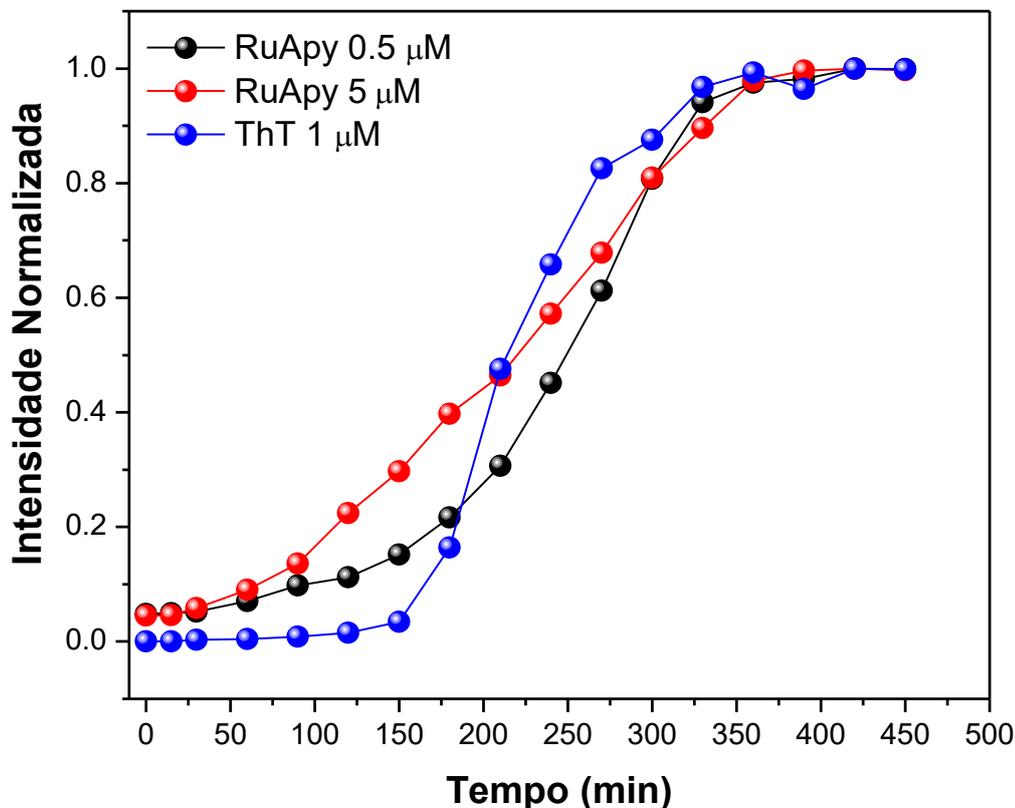
Analisando a Figura 4.39 verifica-se que o processo de agregação é composto por 3 fases (de acordo com a inclinação da curva do gráfico), onde a primeira fase (lag phase) é composta basicamente pelo peptídeo na forma monomérica, onde apresenta menor intensidade de FL. Já a fase 2 é composta por agregados maiores e é verificado um aumento da resposta luminescente, essa fase é conhecida também como (elongation phase). Na terceira e última fase, observa-se o máximo de resposta luminescente e onde é verificada também uma estabilidade da FL, uma vez que a mesma não muda mais, já que atingiu o seu máximo de resposta. Essa fase é composta de agregados amiloidais na forma fibrilar. A partir de 200 min de incubação verifica-se a inclinação da curva sigmoide, indicando a formação dos agregados fibrilares<sup>88</sup>.

#### 4. Resultados e Discussão

---

Avaliando o perfil das duas curvas sigmoidais verifica-se que o *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> apresentou melhor perfil como sonda para as fibrilas, uma vez que o mesmo apresentou melhor resposta luminescente e melhor delineamento na curva sigmoidal para as três fases. Essa melhor resposta se deve a uma maior interação desse complexo com o peptídeo amilóide nas fendas lipofílicas, pelo fato do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> ser mais hidrofóbico, ele interage mais com o β-amilóide nessas fendas. Devido a esses resultados; os estudos a seguir foram aprofundados somente para esse complexo<sup>87,88</sup>.

Foram realizados o processo de monitorização dos agregados de β-A (50 μM) com o *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> nas concentrações de 0,5 e 5 μM a fim de definir qual a melhor concentração para os estudos. Também foi utilizado o corante Tioflavina, que é um corante bastante utilizado na identificação das fibrilas, a fim de validar o método e também para realizar comparações entre os perfis sigmoidais/monitorização do complexo e ThT (Figura 4.40).



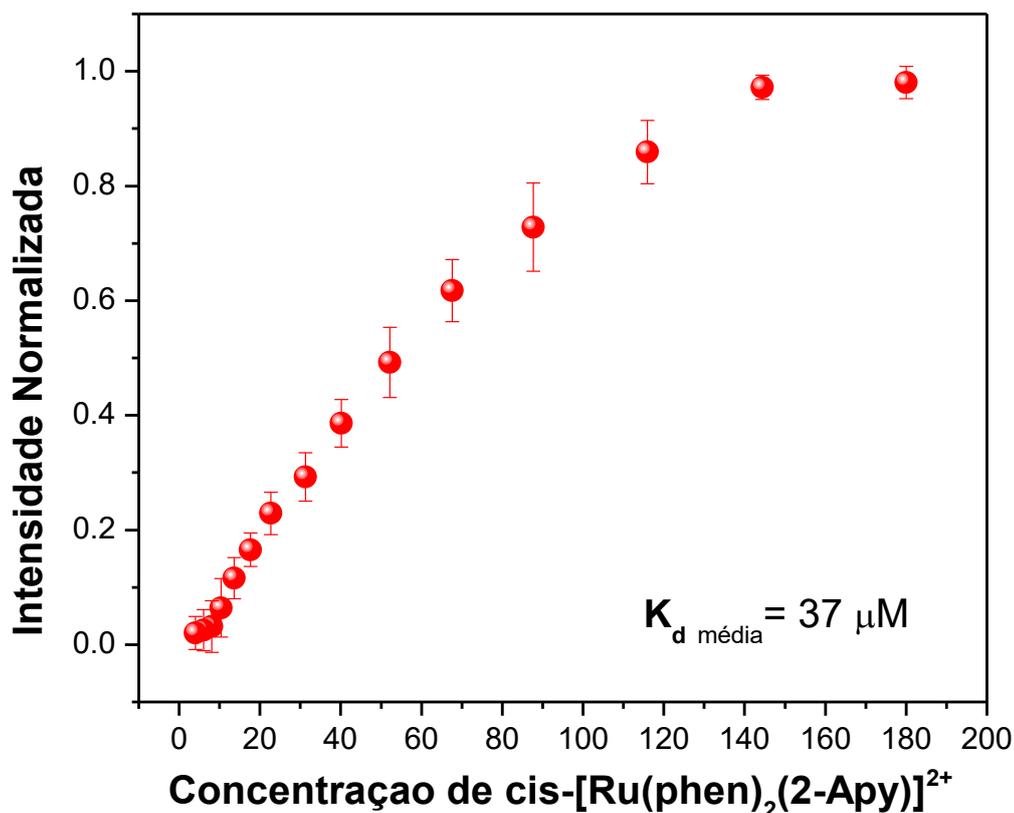
**Figura 4.40** - Monitorização do processo de agregação do  $\beta$ -amilóide com o *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em diferentes concentrações e ThT.

Verifica-se que nas diferentes concentrações de *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, a concentração de 0,5  $\mu$ M exibiu maior eficácia, e verificou-se também que esse complexo apresentou características promissoras de detecção das fibrilas quando comparados com o padrão ThT. Após verificar que os complexos são sensíveis aos diferentes tipos de agregação do peptídeo, o próximo passo foi realizar os estudos de ligação do complexo com o  $\beta$ -A, como será abordado nos tópicos a seguir.

### 4.13.3 - Ensaios de Ligação

#### 4.13.3.1 - Determinação da Constante de Dissociação ( $K_d$ )

A Figura 4.41 exibe a curva de saturação do complexo de rutênio em diferentes concentrações, com uma concentração constante de amiloide fibrilar. A partir da saturação da curva foi possível determinar a constante de equilíbrio de dissociação ( $K_d$ ), onde foi utilizado o programa Origin 8.0 para a realização dos cálculos, como descrito no procedimento experimental.



**Figura 4.41** - Gráfico de saturação do complexo de rutênio em diferentes concentrações com o  $\beta$ -A.

Para o complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(2\text{-Apy})](\text{PF}_6)_2$  foi encontrado um valor de  $K_d$  de  $37 \pm 0,5 \mu\text{M}$  (com constante de ligação  $K_b$  de  $0.027 \mu\text{M}^{-1}$ ). Esse valor de  $K_d$  pode ser considerado elevado quando comparado com outras constantes de complexos descritos na literatura, como o  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ , mas muitos fatores influenciam nessa constante, como por exemplo a lipofilicidade uma vez que a do complexo com

#### 4. Resultados e Discussão

aminopiridina é muito menor, quando comparada com o complexo com dppz, resultando numa interação mais fraca com o peptídeo<sup>87</sup>. Esses valores também se devem aos efeitos geométricos e estéricos que o complexo com aminopiridina apresenta, os quais não são tão favoráveis quanto o complexo com dppz, diminuindo sua interação com o amilóide.

##### 4.13.3.2 - Determinação da relação complexo e amilóide (*Job Plot*)

Foram realizados estudos com variações na concentração Ru- $\beta$ -A (como descrito no procedimento), a fim de encontrar o número de monômeros de  $\beta$ -A associados na ligação com o *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, o resultado dessas variações podem ser visualizados na Figura 4.42.

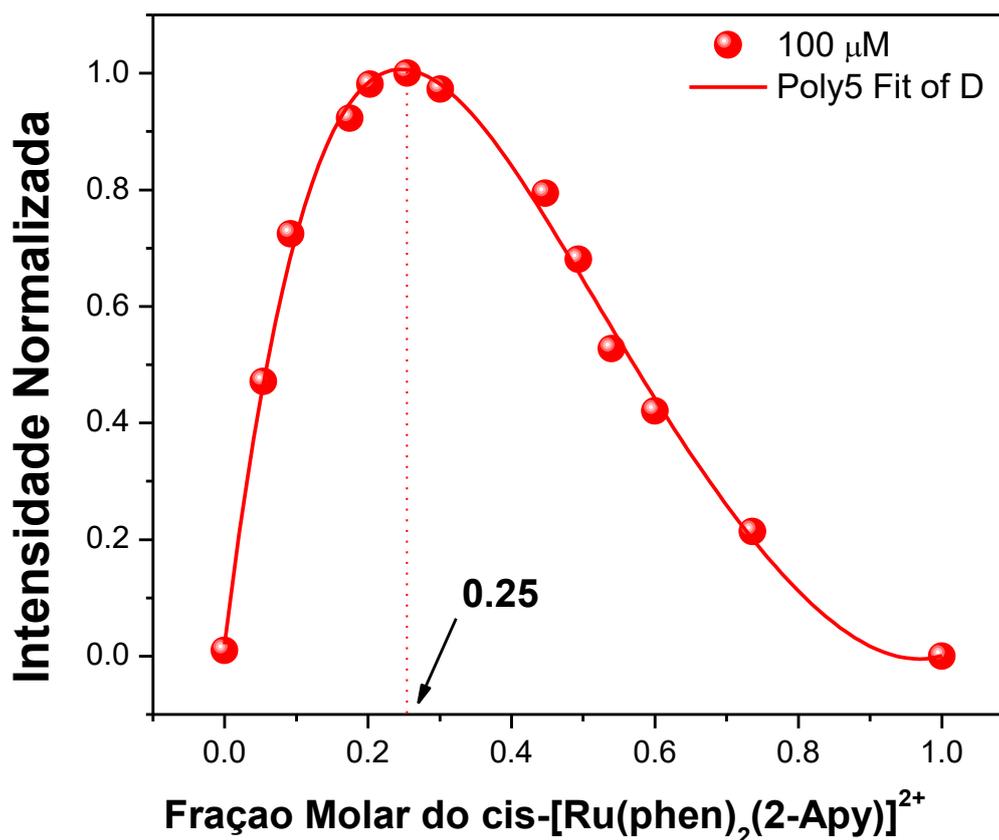


Figura 4.42 - Gráfico de “*Job Plot*” para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(2-Apy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

## 4. Resultados e Discussão

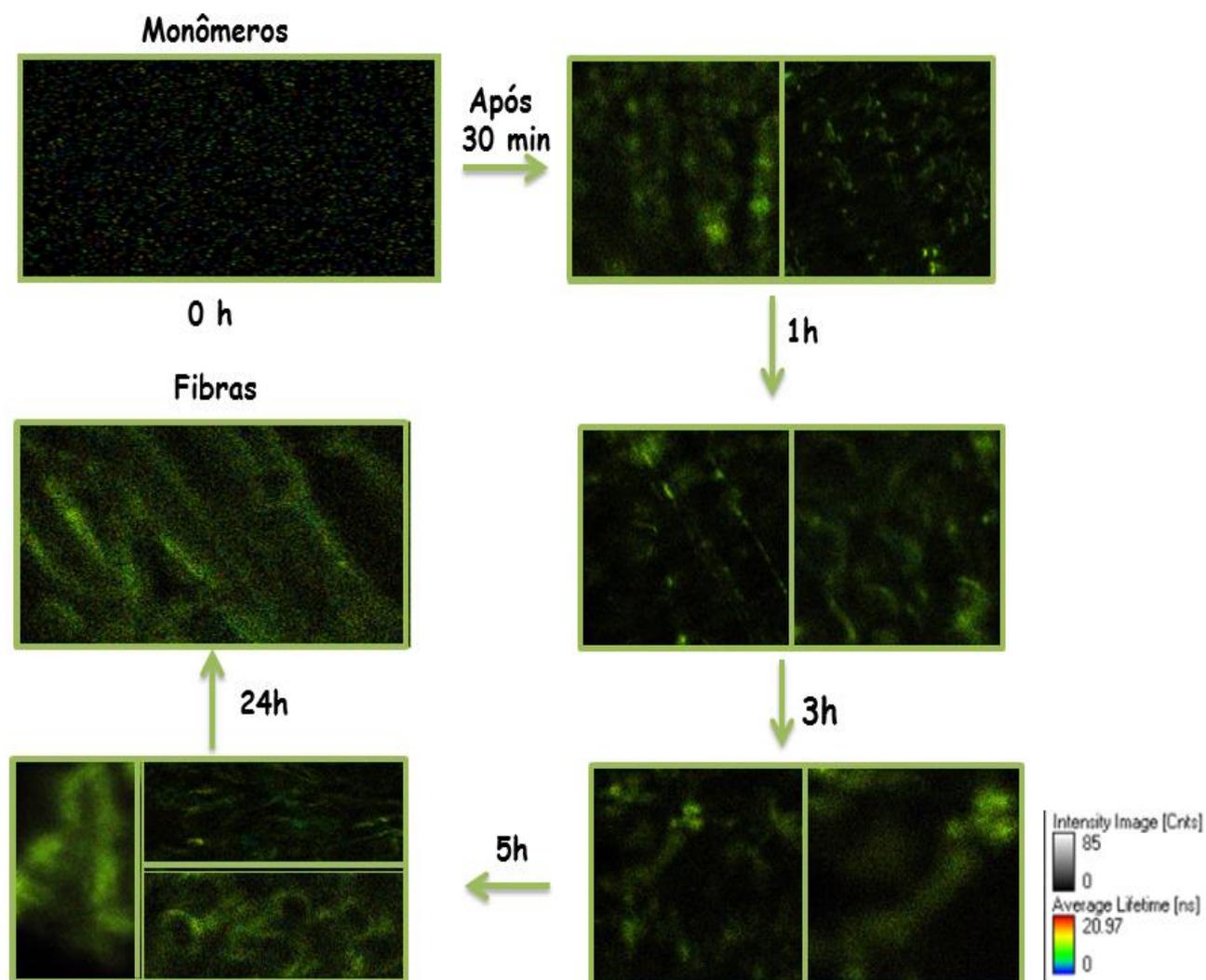
---

A curva gerada é também conhecida com Job Plot, onde exhibe o máximo da fração molar do complexo de rutênio, que corresponde a uma fração molar aproximadamente de 0.25. Foi encontrada uma estequiometria de ligação de 3.0 monômeros de  $\beta$ -A para uma molécula de complexo. Estudos identificaram 2.6 monômeros de  $\beta$ -A para 1 complexo com dppz<sup>87, 89</sup>. O valor encontrado para o complexo com aminopiridina, está bem próximo do valor para o complexo com dppz.

### 4.14- Detecção das Fibrilas por Imagem

#### 4.14.1 – Microscopia de Fluorescência por tempo de vida de emissão - FLIM

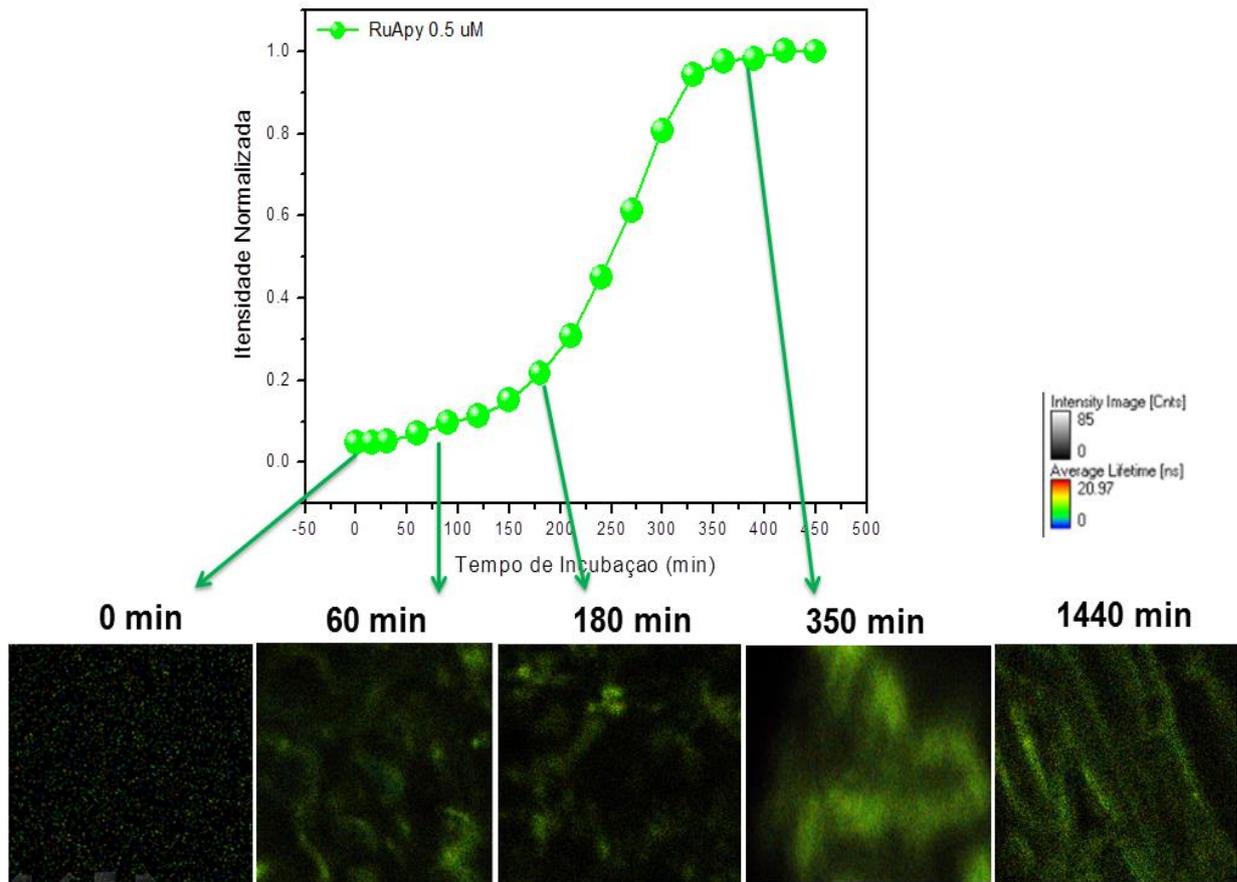
O processo de formação das fibras também foi confirmada por MC de tempo de vida de emissão. Foi possível a obtenção das imagens devido às interações entre o complexo e  $\beta$ -amilóide, como visto anteriormente (seção 4.11 ). Na Figura 4.43 é possível verificar o crescimento das fibras, quando se aumenta o tempo de incubação (0h-24h).



**Figura 4.43** - Acompanhamento do processo de agregação do  $\beta$ -amilóide, em diferentes tempos de incubação (0h-24h).

A partir das micrografias verifica-se que à medida que aumenta-se o processo de incubação, induz o crescimento do peptídeo formando as fibras, como foi verificado pelas medidas luminescência. Na Figura 4.44 é possível fazer um acompanhamento da formação das fibrilas tanto por emissão luminescente, como por MC<sup>90</sup>.

## 4. Resultados e Discussão



**Figura 4.44-** Acompanhamento do processo de crescimento do  $\beta$ -amilóide por: (a) *Real Time*, (b) MC por emissão de tempo de vida.

Em tempo maior que 60 min é possível ver nitidamente a presença de agregados menores e maiores de  $\beta$ -amilóide, como os oligômeros e proto-fibrilas, respectivamente.

---

## 5. CONCLUSÃO

- A obtenção e grau de pureza dos complexos sintetizados foram confirmadas por RMN de  $^1\text{H}$  e análise elementar;
- Os complexos apresentam características espectroscópica e físico-químicas (solubilidade e lipofilicidade) interessantes para se trabalhar no meio biológico;
- Os compostos apresentaram viabilidade biológica, uma vez que não apresentaram toxicidade frente as células HeLa;
- Os complexos apresentaram-se ser excelentes inibidores reversíveis da enzima AChE, uma vez que inibiu a atividade da enzima em 60%, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ ;
- Os complexos apresentam importantes características para serem usados como sonda biológicas, já que apresentam absorção e emissão no visível, e tempos de vida relativamente longos;
- Foi possível identificar as fibrilas de  $\beta$ -amilóide, tanto por medidas de luminescência e por imagem de fluorescência por tempo de vida de emissão;
- O complexo de rutênio com aminopiridina apresentou melhores resultados de inibição da AChE e de identificação das fibras, devido ser mais hidrofóbico, e consequentemente interage mais com o alvo;
- O complexo com aminopiridina apresentou estabilidade em meio com diferentes valores de pH, e também na presença da proteína HSA;
- O complexo com aminopiridina apresentou interações fracas com a HSA, o que é importante e interessante, uma vez que a HSA é uma proteína de transporte, a mesma não pode ligar-se fortemente com o fármaco o qual irá carrear, senão não será realizado a liberação do mesmo de forma eficiente;



## 5. Conclusão

---

- Os compostos apresentaram a ação multifuncional esperada; uma vez que inibiram a atividade da enzima AChE (ação terapêutica), e na identificação das fibrilas de  $\beta$ -A (Diagnóstico).

---

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- <sup>1</sup>HAYFLICK, L. "The future of ageing". *Nature*, 9, 408, 2000.
- <sup>2</sup>DAY, J. C., "Population Projections of the United States by Age, Sex, Race, and Hispanic Origin: 1995 to 2050". U.S. Bureau of the Census, Current Population Reports, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, P25-1130, 1996.
- <sup>3</sup><http://www.comciencia.br/reportagens/envelhecimento/texto/env16.htm>, acessado em 21 de junho de 2014.
- <sup>4</sup>NASRI, F. "The aging population in Brazil" *Einstein*, 6, S4-S6, 2008.
- <sup>5</sup>HOBBS, F. B.; DAMON, B. L. "65C United States - US Bureau of the Census Current Population Reports. Special Studies, 23-190, 1996.
- <sup>6</sup>VILALTA-FRANCH, J.; GARRE-OLMO, S.; LÓPEZ-POUSA, A.; TURON-ESTRADA. PERICOT-NIERGA. "Diferencias entre las demencias según la edad de inicio: estudio a partir de los datos de un registro de demencias". *Neurologia*, 23, 145-151, 2008.
- <sup>7</sup>JOHANSSON, L.; GUO, X.; WAERN, M.; ÖSTLING, S.; GUSTAFSON, D.; BENGTSSON, C.; SKOOG, I. "Midlife psychological stress and risk of dementia: a 35-year longitudinal population study". *Brain*, 133, 2217-2224, 2010.
- <sup>8</sup>BAREYRE, F. M. "Neuronal repair and replacement in spinal cord injury" *Jour. of the Neur. Sciences*, 265, 63-72, 2008.
- <sup>9</sup>ABREU, I. D.; FORLENZA, O. V.; BARROS, H. L. "Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia". *Rev. de Psiqu. Clín.*, 32, 131-136, 2005.
- <sup>10</sup>Rauk, A. "The chemistry of Alzheimer's disease". *Chem. Soc. Rev.* 38, 2698-2715, 2009.
- <sup>11</sup>[www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod\\_pagina=1011](http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1011) ref. Newsletter nº 274 - Ano VI - 24 de Outubro de 2006, acessado em 16 de setembro de 2014.
- <sup>12</sup>JAKOB-ROETNE, R.; JACOBSEN, H. "Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches". *Angew. Chem. Int. Ed.*; 48, 3030 – 3059, 2009.
- <sup>13</sup>OLIVEIRA, J. R. M.; NISHIMURA, A. L.; LEMOS, R. R.; ZATZ, M. "The Genetics of Alzheimer's Disease in Brazil: 10 Years of Analysis in a Unique Population". *J. Molecular Neuroscience*. 37, 74-79, 2009.
- <sup>14</sup>KABANOVA, A. V.; GENDELMAN, H. E. "Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders". *Prog. Polym. Sci.* 32, 1054–1082, 2007.

## 6. Referência Bibliográfica

---

- <sup>15</sup>[http://www.alz.org/downloads/facts\\_figures\\_2012.pdf](http://www.alz.org/downloads/facts_figures_2012.pdf), acessado em 15 de agosto de 2014.
- <sup>16</sup>VIEGAS, F. P. D.; SIMÕES, M. C. R.; ROCHA, M. D.; CASTELLI, M. R.; MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. “Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório”. *Rev. Virtual Quim.*; 3, 286-306, 2011.
- <sup>17</sup>SERENIKI, A.; VITAL, M. B. F. “Alzheimer’s disease: pathophysiological and pharmacological features”. *Rev Psiquiatr RS.*; 30, 2008.
- <sup>18</sup>FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. “Fundamentos da terapia racional”. *Farmac. Clín.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- <sup>19</sup>COREY-BLOOM J, ANAND R, VEACH J. “A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer’s disease”. *J. Geriatric Psychopharmacol*, 55- 65, 1998.
- <sup>20</sup>MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P. H. F. “Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer”. *Rev. Neurociências* 8, 11-14, 2000.
- <sup>21</sup>THAL L. J., SCHWARTZ G., SANO M. “A multicenter double- blind study of controlled-release physostigmine for the treatment of symptoms secondary to Alzheimer’s disease”. *Neurology*, 47, 1389-1395, 1996.
- <sup>22</sup>KNAPP M. J.; KNOPMAN D. S.; SOLOMON D. S.; SOLOMON P. R.; PENDLEBURY W. W.; DAVIS, C. S.; GRACON, S. I. “A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer’s disease”. *JAMA*, 271, 985-991, 1994.
- <sup>23</sup>KAUFER, D. I.; CUMMINGS, J. L.; CHRISTINE, D. “Effects of tacrine of behavioral symptoms in Alzheimer’s disease: an open label study”. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*; 9, 1-6, 1996.
- <sup>24</sup>ROGERS, S. L.; DOODY, R.S.; MOHS, R. C.; FRIEDHOFF, L. T. “Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double blind, placebo-controlled study”. *Arch Int. Med.*, 158, 1021-1031, 1998.
- <sup>25</sup>ROGERS, S. L.; FARLOW, M. R.; MOHS, R.; FRIEDHOFF, L. T. “A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer’s disease”. *Neurology*, 50, 136-145, 1998.
- <sup>26</sup>FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S. P.; DIAS NETO, E.; OJOPI, É. P. B. “Alterações genéticas na doença de Alzheimer”. *Rev. Psiqu. Clín.* 31, 19-25, 2004.

## 6. Referência Bibliográfica

---

- <sup>27</sup>ELOBEID, A.; SOININEN, H.; ALAFUZOFF. "Hyperphosphorylated tau in young and middle-aged subjects". *Acta Neuropathol.* 123, 97–104, 2012.
- <sup>28</sup>HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis". *Science*, 256, 184–185, 1992.
- <sup>29</sup>HARDY, J.; SELKOE, D. J. "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics". *Science* 297, 353–356, 2002.
- <sup>30</sup>DEMATTOS, R. B. "Peripheral anti-A $\beta$  antibody alters CNS and plasma A $\beta$  clearance and decreases brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 8850–8855, 2001.
- <sup>31</sup>SELKOE, D. J. "The molecular pathology of Alzheimer's disease". *Neuron* 6, 487–498, 1991.
- <sup>32</sup>HARDY, J.; ALLSOP, D. "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease". *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388, 1991.
- <sup>33</sup>WEINER, M. W.; VEITCH, D. P.; AISEN, P. S.; BECKETT, L. A.; CAIRNS, N. J.; GREEN, R. C.; HARVEY, D.; JACK, C. R.; JAGUST, W.; LIU, E.; MORRIS, J. C.; PETERSEN, R. C.; SAYKIN, A. J.; SCHMIDT, M. E.; SHAW, L.; JUDITH, A. S.; SOARES, H.; TOGA, A. W.; TROJANOWSKI, J. Q. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*". *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*, 8, 2012.
- <sup>34</sup>BRENDER, J. R.; HARTMAN, K.; NANGA, R. P. R.; POPOVYCH, N.; BEA, R. S.; VIVEKANANDAN, S.; MARSH, E. N. G.; RAMAMOORTHY, A. "Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation". *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 26, 8973–8983, 2010.
- <sup>35</sup>DONG, J.; SHOKES, J. E.; SCOTT, R. A.; LYNN, D. G. "Modulating Amyloid Self-Assembly and Fibril Morphology with Zn(II)". *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 11, 3540–3542, 2006.
- <sup>36</sup>PITHADIA, A. S.; LIM, M. H. Current. "Metal-amyloid- $\beta$  species in Alzheimer's disease". *Op. in Chem. Biology*, 16, 67–73, 2012.
- <sup>37</sup>SAVELIEFF, M. G.; DETOMA, A. S.; DERRICK, J. S.; LIM, M. H. "The ongoing search for small molecules to study metal-associated amyloid- $\beta$  species in Alzheimer's disease". *Acc Chem Res.*; 47, 2475–82, 2014.

## 6. Referência Bibliográfica

---

- <sup>38</sup>CAUGHEY, B., LANSBURY, P.T. “Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders”. *Annu Rev Neurosci*, 26, 267-98, 2003.
- <sup>39</sup>DU, X.; WANG, Z.; ZHENG, Y.; LI, H.; NI, J.; LIU, Q. “Inhibitory Effect of Selenoprotein P on Cu<sup>+</sup>/Cu<sup>2+</sup>-Induced A $\beta$ 42 Aggregation and Toxicity”. *Inorg. Chem.* 53,1672–1678, 2014.
- <sup>40</sup>FURUMOTO, S., OKAMURA N., KUDO Y. “Recent advances in the development of amyloid imaging agents”. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 1773–1789, 2007.
- <sup>41</sup>WOLFE, L. S.; CALABRESE, M. F.; XIONG, Y.”Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:16863–16868, 2010.
- <sup>42</sup>SULATSKAYA, A. I.; MASKEVICH, A. A.; TUROVEROV K. K. “Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils”. *PLoS ONE.* 5, 15385, 2010.
- <sup>43</sup>WU, C.; BOWERS, M. T.; SHEA, J. “On the Origin of the Stronger Binding of PIB over Thioflavin T to Protofibrils of the Alzheimer Amyloid- $\beta$  Peptide: A Molecular Dynamics Study”. *Biophys. J.*,100, 1316–1324, 2011.
- <sup>44</sup>HARDY, J.; ALLSOP, D. “Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer’s disease” *Trends Pharmacol Sci.*, 12, 383–388, 1991.
- <sup>45</sup>HAMPEL, H.; SHEN, Y.; WALSH, D. M.; AISEN, P.; SHAW, L. M.; ZETTERBERG, H. “Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer’s disease”. *Exp Neurol*, 223, 334–46, 2010.
- <sup>46</sup>CLARK, C. M.; DAVATZIKOS, C.; BORTHAKUR, A.; NEWBERG, A.; LEIGHT, S.; LEE, V. M. “Biomarkers for early detection of Alzheimer pathology”. *Neurosignals*, 16, 11–8, 2008.
- <sup>47</sup>COOK, N. P.; MARTI, A. A. “Facile Methodology for Monitoring Amyloid- $\beta$  Fibrillization” *ACS Chem. Neurosci.*, 3, 896–899, 2012.
- <sup>48</sup>BIANCALANA, M.; KOIDE, S. “Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils”. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1804, 1405–1412, 2010.
- <sup>49</sup>LEVINE, H. “Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer’s disease @-amyloidp peptides: Detection of amyloid aggregation in solution”. *Protein Science*, 2, 404-410, 1993.

## 6. Referência Bibliográfica

---

- <sup>50</sup>VIEGAS, M. S.; MARTINS, T. C.; SECO, F.; DO CARMO, A. "An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues". *Eur. J. Histochem.*,51, 59-66, 2007.
- <sup>51</sup>HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. "Histamine in the Nervous System" *Physiol. Rev.*,88,1183–1241, 2008.
- <sup>52</sup>HAYES, K. C. "The use of 4-aminopyridine (fampridine) in demyelinating disorders". *CNS Drug Rev. Winter*; 10, 295-316, 2004.
- <sup>53</sup>MÜLLER, M.; DIERKES, P, W,; SCHLUE, W, R. "Ionic mechanism of 4-aminopyridine action on leech neuropile glial cells". *Brain Res.*, 24, 826, 63-73, 1999.
- <sup>54</sup>CHININI, G. L. "Complexos do tipo cis-[Ru(phen-L)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com interesse no tratamento do Mal de Alzheimer : propriedades fisico-quimicas e estudos de inibicao da enzima acetilcolinesterase". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2011, Dissertação de Mestrado, 108f.
- <sup>55</sup>CLARK, M. J. "Medicinal Applications of Coordination Chemistry". *Coord chem. Rev.* 232, 69, 2002.
- <sup>56</sup>SEDDON, E.A. *The Chemistry of Ruthenium*, New York, 1984.
- <sup>57</sup>ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. "Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects". *Platinum Metals Rev.*, 2001.
- <sup>58</sup>DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; O'DWYER, M. F. "Biological Activity of Complex Ions". *Nature* 170, 190–191, 1952.
- <sup>59</sup>SANTOS, DOS, R. R. P., "Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente à linhagem celular K562 e estudos de interação com albumina de soro humano (HSA)". São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Química – USP, 2009, Tese de doutorado, 120f
- <sup>60</sup>CARDOSO, C. R.; DE AGUIAR, I.; CAMILO, M. R.; LIMA, M. V. S.; ITO, A. S.; BAPTISTA, M. S. ;PAVANI, C.; VENÂNCIO, T.; CARLOS, R. M. "Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bi-dentate histamine ligand". *Dalton Transactions* 41, 6726, 2012.
- <sup>61</sup>SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. "Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium". *Inorg. Chem.*,17, 3334–3341, 1978.

## 6. Referência Bibliográfica

---

- <sup>62</sup>CAMILO, M. R. “Complexos de Metais de Transição Neuroativos: Investigações fotoquímicas, fotofísicas, físico-químicas, e citotoxicidade para drogas neuroativas em fase III”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2010, Dissertação de Mestrado, 120f.
- <sup>63</sup>ELLMAN, G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. “A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY”. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95, 1961.
- <sup>64</sup>CELEJ, M. S.; JARES-ERIJMAN, E. A.; JOVIN, T. M. “Fluorescent *N*-Arylamino-naphthalene Sulfonate Probes for Amyloid Aggregation of  $\alpha$ -Synuclein”. *Biophys. J.*, 94, 4867–4879, 2008.
- <sup>65</sup>HUANG, C. Y. *Methods Enzymol.*, 1982, 87, 509–525, 1982.
- <sup>66</sup>Fernández-Moreira, V.; Thorp-Greenwood, F. L.; Coogan, M. P. “Application of d<sup>6</sup> transition metal complexes in fluorescence cell imaging”. *Chem. Commun.*, 46, 186-202, 2010.
- <sup>67</sup>YU, Q.; LIU, Y.; XU, L.; ZHENG, C.; LE, F.; QIN, X.; LIU, Y.; LIU, J. “Ruthenium(II) polypyridyl complexes: cellular uptake, cell image and apoptosis of HeLa cancer cells induced by double targets”. *Eur J Med Chem.*, 82:82-95, 2014.
- <sup>68</sup>Shweshein, K. S. A. M.; Andrić, F.; Radoičić, A.; Zlatar, M.; Maja Gruden-Pavlović, M. Z.; Milojković-Opsenica, D. “Lipophilicity Assessment of Ruthenium(II)-Arene Complexes by the Means of Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography and DFT Calculations”. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014.
- <sup>69</sup>FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A., JR.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.;

## 6. Referência Bibliográfica

---

WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. *Gaussian 03*, revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

<sup>70</sup>GORELSKY S. I.; DA SILVA, S. C.; LEVER, A. B. P.; FRANCO, D. W. "Electronic Spectra of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(L)NO]<sup>3+/2+</sup> Complexes". *Inorg. Chim. Acta.* 300-302, 698-709, 2000.

<sup>71</sup>GORELSKY S. I.; LEVER A. B. P. "Electronic Structure and Spectra of Ruthenium Diimine Complexes by Density Functional Theory and INDO/S. Comparison of the two methods". *J. Organomet. Chem.* 635, 187 – 196, 2001.

<sup>72</sup>NAKAMOTO, K. *Infrared Raman Spectra of Inorganic Coordination Compounds*, 4th ed.; Wiley: New York, 1996.

<sup>73</sup>SILVERSTEIN, *Espectrometric Identification of Organic Compounds*. 7a ed. 2005.

<sup>74</sup>PAVIA, D. L.; Lampman, G. M; Kriz, G. S. *Introduction to Spectroscopy - Guide for Students of Organic Chemistry*, 3e, Thomson, 2001.

<sup>75</sup>[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) - acessado em 14 de agosto de 2014.

<sup>76</sup>JONES, C. J. *A Química dos Elementos de Transição dos Blocos d e f*. Porto alegre, Bookman, 2002.

<sup>77</sup>BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. "Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications" 2nd Ed. Wiley, New York. 2001.

<sup>78</sup>HEATH, G. A.; YELLOWLEES, L. J.; BRATERMAN, P. S. "Spectro-electrochemical studies on tris-bipyridyl ruthenium complexes; ultra-violet, visible, and near-infrared spectra of the series [Ru(bipyridyl)<sub>3</sub>]<sup>2+/1+/0/1-</sup>". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 287-289, 1981.

<sup>79</sup>CARDOSO, C. R., "Complexos de Metais de Transição para o desenvolvimento de Novas Drogas Neuroativas". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2010, Dissertação de Mestrado, 107f.

<sup>80</sup>OLIVEIRA, R. M. M. "Novos complexos de Ru(II) e Mg(II) com flavonóides: atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2012, Tese de doutorado, 107f.

<sup>81</sup>PURICH, D. L. *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc 87, 3-830,1982.

<sup>82</sup>CARDOSO, C. R. "COMPLEXOS DE RUTÊNIO BIOATIVOS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2014, Defesa de Tese, 107f.

## 6. Referência Bibliográfica

---

- <sup>83</sup>CARDOSO, C. R.; LIMA, M. V. S.; CHELESKI, J.; PETERSON, E. J.; VENÂNCIO, T.; FARRELL, N. P.; CARLOS, R. M. "Luminescent ruthenium complexes for theranostic applications". *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 4906–4915, 2014.
- <sup>84</sup>CARTER, DC.; HO, JX. "Structure of serum albumin". *Adv Protein Chem* 45, 153-203, 1994.
- <sup>85</sup>AMASAKI, K.; MARUYAMA, T.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. "Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site". *Biochim. Biophys. Acta*, 1295, 147-157, 1996.
- <sup>86</sup>MARTÍNEZ, A.; SUÁREZ, J.; SHAND, T.; MAGLIOZZO, R. S.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. "Interactions of arene-Ru(II)-chloroquine complexes of known antimalarial and antitumor activity with human serum albumin (HSA) and transferrin". *Inorg Biochem*, 105, 39-45, 2013.
- <sup>87</sup>COOK, N. P.; OZBIL, M.; KATSAMPES, C.; PRABHAKAR, R.; MARTÍ, A. A. "Unraveling the Photoluminescence Response of Light-Switching Ruthenium(II) Complexes Bound to Amyloid- $\beta$ ". *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10810–10816, 2013.
- <sup>88</sup>COOK, N. P.; TORRES, V.; JAIN, D.; MARTÍ, A. A. "Sensing Amyloid- $\beta$  Aggregation Using Luminescent Dipyridophenazine Ruthenium(II) Complexes". *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 11121–11123, 2011.
- <sup>89</sup>RENNY, J. S.; TOMASEVICH, L. L.; TALLMADGE, E. H.; COLLUM, D. B. "Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry". *Angew Chem Int.*, 52, 11998–12013, 2013.
- <sup>90</sup>BASTIAENS, P. I. H.; SQUIRE, A. "Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell". *Trends Cell Biol.* 9, 48–52, 1999.
- .