

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

**“SÍNTESE DE COMPLEXOS DE Ru(II) LUMINESCENTES:
APLICAÇÕES NO COMBATE À DOENÇA DE ALZHEIMER.”**

Marlon Augusto Profeta de Almeida*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Rose Maria Carlos

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Marlon Augusto Profeta de Almeida, realizada em 17/12/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar)

Profa. Dra. Clelia Mara de Paula Marques (UFSCar)

Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel (UTFPR)

Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

Epígrafe

*“Se eu soubesse antes o que sei agora
Erraria tudo exatamente igual”
Engenheiros do Hawaii, Surfando Karmas & DNA(2002)*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois apenas Ele e eu sabemos o quanto foi difícil não perder a fé para chegar até aqui.

Agradeço à Prof^a Dr^a Rose Maria Carlos pela disponibilidade em todos os momentos, pela orientação e pelo conhecimento passado.

Agradeço aos membros do grupo LAFIB, pela camaradagem das cervejas e pelas discussões, científicas ou não, que são parte importantíssima deste trabalho.

Ao grupo “Turma do fundão” do whatsapp, formado somente por pós-graduandos de diversos lugares do Brasil, por serem a melhor terapia em grupo que eu conheci onde nós trocamos ideias, vagas de trabalho e concurso, experiências e reclamações da vida como um todo. Amizades valiosas que levo sempre comigo.

Agradeço ao Dr Hugo César Ramos de Jesus pelas análises e discussões dos espectros de massas.

Ao professor Dr Tiago Venâncio e ao Dr Flávio Vinícius Crisóstomo Kock pelos experimentos e discussões dos espectros de STD-¹H-RMN.

Ao programa de pós-graduação em química da UFSCar e aos funcionários do departamento de química pelo suporte.

À FAPESP e à CAPES (proc n° 88882.332778/2019-01) pelo suporte financeiro ao longo do projeto.

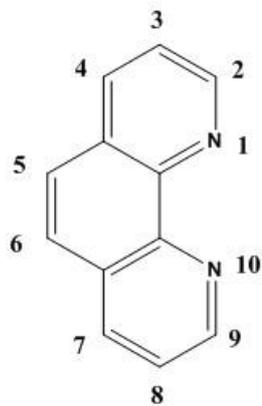
Agradecimentos Mais que Especiais

Aos meus pais, pela força mútua que nós nos damos, do nosso jeito meio torto, desde o começo deste desafio na minha vida há quatro anos.

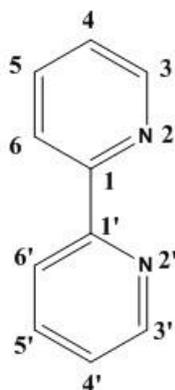
À minha namorada, Carol, pela paciência. Afinal ela sabe melhor do que qualquer outra pessoa como meu humor varia quando as coisas saem do meu controle e isso aconteceu inúmeras vezes ao longo destes quatro anos.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao meu amigo de longa data, Everton, e sua companheira, Gabriela, por dividirem a casa, as contas, as cervejas e a vida comigo nestes últimos quatro anos. E que me desculpem por alguma inconveniência.

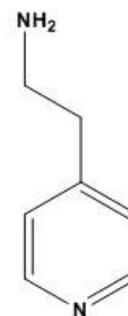
Ligantes Utilizados e Complexos Sintetizados (Numerações oficiais para atribuição de espectros de RMN)



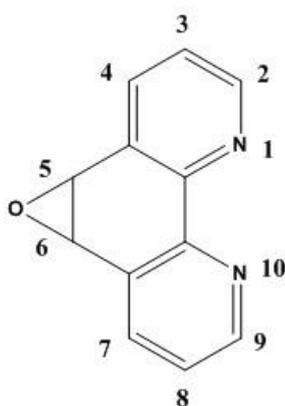
1,10 Fenantrolina



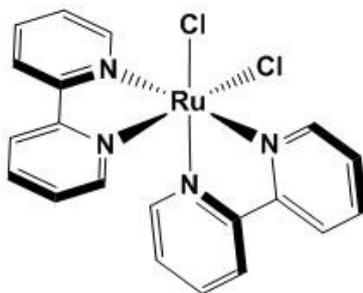
2,2' Bpiridina



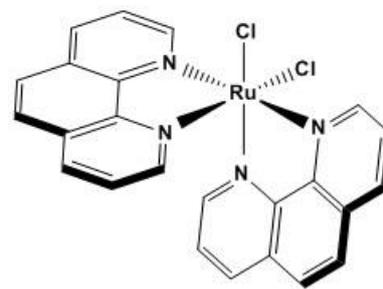
4,2-Etilamino Piridina



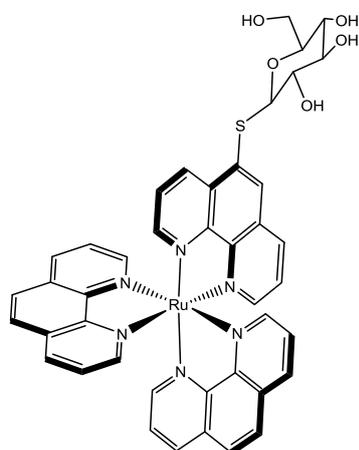
5,6 diidro 5,6 epoxi 1,10 fenantrolina



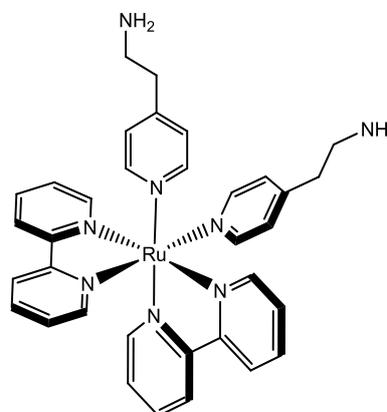
Clorobpy



Clorofen



[Ru(fen)₂(L-fen)]²⁺ - (RuFenGlic)



[Ru(bpy)₂(4,2EtPy)₂]²⁺ - (RuEtPy)

Lista de Tabelas

Tabela 1: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do ligante 5(β -D-tioglicose)1,10 fenantrolina.....	27
Tabela 2: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo precursor Clorofen.....	29
Tabela 3: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo RuFenGlic.	32
Tabela 4: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo precursor Clorobpy.....	40
Tabela 5: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo RuEtPy.....	43
Tabela 6: Dados de relaxometria mostrando os valores de tempo de relaxação dos ligantes do complexo RuEtPy na presença e na ausência das enzimas eeAChE e hAChE ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	67

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular da tacrina.....	5
Figura 2: Rota sintética seguida para obtenção do complexo RuFenGlic. Etapa 1: Síntese do ligante 5-(1β-D Tioglicose) 1,10 fenantrolina, DMSO em temperatura ambiente pela adição e desidratação do precursor 5,6diidro 5,6 epoxifenantrolina. Etapa 2: Síntese do precursor clorofen, DMF em refluxo por 8 horas, atmosfera inerte N ₂ e excesso de LiCl seguida pela substituição dos ligantes cloreto pelo ligante 5(1β-D-Tioglicose) 1,10 fenantrolina, EtOH/H ₂ O 1:1, 10 mL em refluxo por 4 horas, seguida da adição do ligante e refluxo por mais 4 horas, seguida de adição de NH ₄ PF ₆ em excesso.	15
Figura 3: Rota sintética seguida para obtenção do complexo RuEtPy. Etapa 1: Síntese do precursor Clorobpy, DMF em refluxo por 8 horas e excesso de LiCl em atmosfera inerte de N ₂ . Etapa 2: Substituição dos ligantes cloreto pelos ligantes piridínicos EtPy, EtOH/H ₂ O 1:1 (10 mL) em refluxo por 4 horas, adição do ligante EtPy e refluxo por mais 4 horas, ambos os processos em atmosfera inerte de N ₂	17
Figura 4: Reação que ocorre entre a tiocolina clivada pela enzima acetilcolinesterase com a molécula de DTNB gerando o íon TNB de acordo com o protocolo de Elmann.	20
Figura 5: Espectro de ¹ H-RMN do ligante L-fen (5(1β-D-Tioglicose)1,10 fenantrolina) . DMSO <i>d</i> ₆ , 400 MHz, 25°C	26
Figura 6: Espectro de ¹ H-RMN do complexo precursor Clorofen. CD ₃ CN , 25°C, 400 MHz.	28
Figura 7: Espectro de UV-Vis do complexo precursor Clorofen. Acetonitrila, 25°C, 50μM.	30
Figura 8: Espectro de ¹ H-RMN do complexo RuFenGlic. CD ₃ CN, 400 MHz, 25°C.....	31
Figura 9: Comparação dos espectros de RMN do complexo precursor Clorofen (marrom) e do complexo RuFenGlic (preto). CD ₃ CN, 400 MHz, 25°C.	33
Figura 10: Espectro de massas complexo do complexo RuFenGlic.....	34
Figura 11: A) Espectro de UV-Vis do complexo RuFenGlic. Acetonitrila, 50 μM, 25°C. B) Comparação dos espectros de UV-Vis dos complexos RuFenGlic (vermelho) e [Ru(Cl) ₂ (fen) ₂] ²⁺ (preto). Acetonitrila, 50 μM, 25°C.	35
Figura 12: Diagrama de Jablonski demonstrando as transições eletrônicas que ocorrem no complexo RuFenGlic.	36
Figura 13: Espectros de emissão (vermelho) e excitação (preto) em acetonitrila.	38

Figura 14: Espectro de RMN do complexo precursor Clorobpy. DMSO _d ₆ , 400 MHz, 25°C.....	39
Figura 15: Espectro de UV-Vis do complexo RuEtPy. Acetonitrila, 25°C.....	40
Figura 16: Espectro de 1H-RMN do complexo RuEtPy. DMSO _d ₆ , 25°C, 400 MHz, ausência de luz ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	42
Figura 17: Comparação dos espectros de RMN do complexo precursor Clorobpy (marrom) e complexo RuEtPy (preto). DMSO _d ₆ , 25°C, 400 MHz.	44
Figura 18: Espectro de massas completo do complexo RuEtPy ¹⁰² . Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	45
Figura 19: A) Espectro de UV-Vis do complexo RuEtPy. 50 M, 25°C ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022). B) Comparação entre os espectros de UV-Vis do complexo RuEtPy (vermelho) e o precursor Clorobpy (preto). Acetonitrila, 50 μM, 25°C.	47
Figura 20: Espectros de emissão (vermelho) e excitação (preto) do complexo RuEtPy em acetonitrila.....	48
Figura 21: Diagrama de Jablonski demonstrando as transições eletrônicas que ocorrem no complexo RuEtPy.	49
Figura 22: A) Espectros de Emissão do complexo RuFenGlic após irradiações sequenciais com feixe de luz de λ = 450 nm por um tempo total de 2 horas. B) Espectros de UV-Vis do complexo RuFenGlic após irradiações sequenciais com feixe de luz de λ = 450 nm por um tempo total de 2 horas. Acetonitrila, 25°C.	51
Figura 23: Espectros de 1H-RMN do complexo RuFenGlic em função do tempo de irradiação com um feixe de luz de λ = 450 nm. Não irradiado (marrom), irradiado por 30 minutos (verde), irradiado por 60 minutos (azul). CD ₃ CN, 25°C. 400 MHz.	52
Figura 24: A) Espectros de absorção no UV-Vis do complexo RuEtPy em acetonitrila demonstrando a variação da banda MLCT após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 450 nm por um tempo total de 2 horas. B) Espectros de emissão do complexo RuEtPy em acetonitrila demonstrando supressão da emissão após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 450 nm por um tempo total de 2 horas.....	53
Figura 25: Espectros de 1H-RMN em acompanhamento da fotólise do complexo RuEtPy com irradiações sequenciais de um feixe de luz de λ = 450 nm, demonstrando a substituição do ligante EtPy por moléculas de solvente. CD ₃ CN, atmosfera N ₂ , 25°C, 600 MHz.	55

Figura 26: Espectro de 1H-RMN do fotoproducto evidenciando a região alifática correspondente ao ligante EtPy, demonstrando a substituição de apenas um dos ligantes. CD3CN, 400 MHz, 25°C.....	56
Figura 27: Espectro de DOSY 1H-RMN após a fotólise demonstrando apenas 2 difusões no campo magnético, a do fotoproducto (azul) e do ligante EtPy (vermelho) e indicando a substituição de apenas um dos ligantes EtPy. CD3CN, 600 MHz, 25°C.	57
Figura 28: Curva de IC50 de inibição da atividade enzimática da enzima eeAChE pelo complexo RuFenGlic.....	58
Figura 29: Curvas de Michaelis-Mentem da inibição da atividade da enzima eeAChE pelo complexo RuFenGlic. Cada linha representa uma [RuFenGlic] 0 µM (preto), 25 µM (vermelho), 50 µM (azul), 75 µM (verde), 100 µM (rosa). B) Linearização de Lineweaver-Burke referente às curvas Michaelis-Mentem, demonstrando o mecanismo de inibição não competitivo. Cada linha representa uma [RuFenGlic] 0 µM (preto), 25 µM (vermelho), 50 µM (azul).....	59
Figura 30: A) Mapa de epitopo demonstrando qual dos ligantes recebe maior quantidade de magnetização proveniente da enzima eeAChE. Glicose (preto), Fenantrolina (vermelho). PBS deuterado (pH = 8,0), 600 MHz, 25°C. B) Experimentos titulométricos para estimativa do valor de Kd, demonstrando que a fenantrolina (vermelho) interage mais fortemente com o sítio ativo periférico da enzima eeAChE do que a glicose (preto), PBS deuterado (pH = 8,0), 600 MHz, 25°C.....	61
Figura 31: Curvas de Michaelis-Menten da inibição da atividade enzimática causada pelo complexo RuEtPy nas enzimas: A) eeAChE; B) hAChE. Cada linha representa uma [RuEtPy]: 0 µM (preto), 10 µM (vermelho), 20 µM (azul), 40 µM (rosa) ¹⁰² Reproduzido com autorização da Elsevier (Copyright 2022)...	62
Figura 32: Linearizações de Lineweaver-Burke referentes às curvas de Michaelis-Menten demonstrando o mecanismo competitivo de inibição. A) eeAChE. B) hAChE. Cada linha representa uma [RuEtPy]: 0 µM (preto), 10 µM (vermelho), 20 µM (azul), 40 µM (rosa) ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	63
Figura 33: Linearizações de Dixon para obtenção do valor de Ki para a inibição das enzimas. A) eeAChE. B) hAChE. Cada linha representa uma [Substrato]. Em A) 0,1 mM (preto), 0,15 mM (vermelho), 0,2 mM (azul). Em B) 0,05 mM (preto), 0,15 mM (azul), 0,25 mM (verde) ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	64

Figura 34: Curvas de IC50 da inibição das enzimática pelo complexo RuEtPy. A) eeAChE. B) hAChE ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	65
Figura 35: A) Espectros de 1H-RMN demonstrando deslocamento nos sinais dos ligantes do complexo RuEtPy na presença (vermelho) e na ausência (preto) da enzima eeAChE. B) Espectros de 1H-RMN demonstrando deslocamento nos sinais dos ligantes do complexo RuEtPy na presença (vermelho) e na ausência da enzima hAChE ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	66
Figura 36: Mapas de epitopo demonstrando quais ligantes do complexo RuEtPy interagem mais fortemente com o sítio ativo da enzima. Bpy (preto), EtPy (vermelho). A) eeAChE. B) hAChE ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	68
Figura 37: Experimentos titulométricos para obtenção do valor de Kd por STD-1H-RMN. Cada linha representa um ligante bpy (preto), EtPy (vermelho). A) eeAChE. B) hAChE ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).	69

Resumo

SÍNTESE DE COMPLEXOS DE Ru(II) LUMINESCENTES: APLICAÇÕES NO COMBATE À DOENÇA DE ALZHEIMER. A doença de Alzheimer (D.A) é a forma mais comum de demência, atingindo, principalmente, pessoas de idade avançada. Ainda hoje não há cura, e os fármacos existentes indicados para combate à D.A. atuam inibindo da enzima acetilcolinesterase (AChE), cuja hiperatividade está relacionada aos sintomas iniciais da doença. São tratamentos sintomáticos e paliativos que estão associados a inúmeros efeitos colaterais. Neste trabalho foram propostos dois novos complexos de Ru(II) (RuFenGlic e RuEtPy) projetados para atuarem como novos inibidores da enzima AChE. Estes complexos apresentaram luminescência, podendo ser utilizados como sondas luminescentes do processo de agregação do peptídeo β -amilóide, podendo gerar uma alternativa de sistema para diagnóstico. O complexo RuFenGlic apresentou baixa atividade inibitória, enquanto o complexo RuEtPy apresentou resultados comparáveis à droga Galantamina. Além disso, análises por STD- ^1H -RMN permitiram inferir quais que o ligante fenantrolina no complexo RuFenGlic e os ligantes EtPy no complexo RuEtPy são os responsáveis pela inibição observada. Foram estudadas as propriedades fotoquímicas de ambos os complexos em solução. O complexo RuFenGlic apresenta estabilidade fotoquímica quando irradiado em comprimentos de onda compreendidos em sua banda de absorção MLCT (420, 450 e 520 nm) na ausência de O_2 . Em contrapartida, o complexo RuEtPy apresenta fotossubstituição dos ligantes EtPy quando irradiado em solução nos mesmos comprimentos de onda. Este fenômeno é observado pela deslocamento da banda de absorção MLCT e sucessivas supressões de sua banda de luminescência após irradiação. Interessantemente, a reação fotoquímica para este complexo atinge estabilidade após 3 horas de irradiação, com substituição de apenas um dos ligantes e supressão entre 70 e 90% da intensidade de luminescência, não ocorrendo supressão total. Esta propriedade pode ser explorada no tratamento e diagnóstico de doenças como câncer através da quimioterapia fotoativada.

Abstract

SYNTHESIS OF LUMINESCENT Ru(II) COMPLEXES: APPLICATIONS IN COMBATING ALZHEIMER'S DISEASE. Alzheimer's disease (A.D) is the most common form of dementia affecting, especially, people with advanced age. There is no cure and the existing pharmaceuticals indicated for combating A.D act by inhibition of acetylcholinesterase enzyme (AChE), whose hyperactivity is related to the initial symptoms of the disease. These pharmaceuticals offer symptomatic and palliative treatments and are associated with several side effects. In this work two new Ru(II) compounds (RuFenGlic and RuEtPy) were designed to act as new AChE inhibitors. The complexes presented luminescence, being able to be used as luminescent probes for amyloid- β aggregation process which enables a potential diagnostic system. RuFenGlic complex showed poor inhibitory activity while RuEtPy complex showed inhibitory activity comparable to Galantamine drug. Furthermore, STD- $^1\text{H-NMR}$ analysis allowed inferring that Fen ligand of RuFenGlic complex and the EtPy ligand of RuEtPy complex are the most responsible for the inhibition observed for each complex. Photochemical properties of both complexes were studied in solution. RuFenGlic complex shows photostability when irradiated in wavelengths under its MLCT absorption band (420, 450, 520 nm). On the other hand, RuEtPy complex shows photosubstitution of the EtPy ligand when irradiated in the same wavelengths. The phenomenon is observed by MLCT shifts and sequential luminescence quenching after irradiation. Interestingly, this photochemical reaction for this complex reaches stabilization after 3 hours of irradiation, with substitution of only one of the EtPy ligands and luminescence quenching between 70 and 90% of the band, but never total quenching. This property can be explored for diagnose and treatment of cancer through photoactivatable chemotherapy (PACT).

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Histórico e Impactos Globais.....	1
1.2 A Hipótese Colinérgica da Doença de Alzheimer.....	4
1.3 Complexos de Ru(II) e Outros Metais na Medicina.....	7
1.4 A Barreira Hematoencefálica.....	9
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivos Gerais.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1 Materiais.....	15
3.2 Vias Sintéticas.....	15
3.2.1 Complexo $[\text{Ru}(\text{fen})_2(\text{L-fen})]^{2+}$, fen = 1,10 fenantrolina, L = β -D-Tioglicose. - (RuFenGlic).....	15
3.2.2 Complexo cis- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{EtPy})_2]^{2+}$, EtPy = 4,2-etilamino piridina; bpy = 2,2' bipyridina. - (RuEtPy).....	17
3.3 Caracterização Estrutural.....	18
3.3.1 ^1H e ^{13}C RMN.....	18
3.3.2 Espectrometria de Massas.....	18
3.4 Caracterização Espectroscópica.....	19
3.4.1 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Visível.....	19
3.4.2 Espectroscopia de Fluorescência.....	19
3.5 Ensaio Com as Enzimas Acetilcolinesterases.....	20
3.5.1 Método Colorimétrico de Elmann.....	20
3.5.2 STD- ^1H -NMR.....	22
3.5.2.1 Preparação das amostras.....	22
3.5.2.2 Condições dos experimentos de STD-RMN.....	23
3.6 Ensaio Fotoquímico.....	24
4. Resultados e Discussões.....	26
4.1 Caracterização Estrutural e Espectroscópica.....	26
4.1.1 Complexo RuFenGlic.....	26

4.1.2 Complexo RuEtPy	38
4.2 Comportamento Fotoquímico	50
4.2.1 Complexo RuFenGlic	50
4.2.2 Complexo RuEtPy	53
4.3 Experimento com as enzimas Colinesterases	58
4.3.1 Complexo RuFenGlic	58
4.3.2 Complexo RuEtPy	62
5. Conclusões.....	71
5.1 Complexo RuFenGlic.....	71
5.2 Complexo RuEtPy.....	72
6. Perspectivas Futuras	74
6.1 Complexo RuFenGlic.....	74
6.2 Complexo RuEtPy.....	74
7. Referências	76
Apêndice.....	95

Capítulo 1 Introdução

1. Introdução

1.1 Histórico e Impactos Globais

A doença de Alzheimer (D.A.) é uma enfermidade que ataca o sistema nervoso central, principalmente de idosos acima de 65 anos, sendo a segunda maior causa de morte de idosos nos EUA e a maior causa de demência no mundo¹⁻⁶. Foi batizada com o nome do seu descobridor, o psiquiatra austríaco Alois Alzheimer, tendo o primeiro relato sendo feito em um congresso de psiquiatria em 1901, na Alemanha⁷.

À época, Alzheimer apresentou imagens de lesões incomuns presentes no cérebro de uma paciente falecida aos 53 anos chamada Auguste Deter⁷. As lesões eram caracterizadas pela presença de placas sobre os neurônios bem como a deformação dos mesmos. Outra característica importante observada foi a considerável diminuição no volume cerebral da paciente em comparação com o cérebro de um adulto normal da mesma idade⁸.

Auguste Deter era uma mulher alemã que por volta dos 50 anos passou a apresentar comportamento atípico, como o esquecimento do caminho de casa, a sensação de estar sendo perseguida, entre outros, que obrigaram a família a interná-la no hospital onde Alois Alzheimer trabalhava, ficando aos seus cuidados. Este foi o primeiro relato médico de lesões cerebrais vinculadas à demência, que depois passaram a aumentar na Europa⁹.

Atualmente, de acordo com o relatório anual da doença de Alzheimer de 2019, existem mais de 50 milhões de pessoas acometidas pela D.A no mundo, sendo os países de economias menos desenvolvidas os que apresentam os maiores números. Estima-se que a prevalência global seja de 150 milhões de acometidos em 2050. Os números mais recentes indicam que existem 7,7 milhões de novos casos por ano, o que indica uma média de 1 novo caso a cada 4 segundos¹⁰.

No Brasil, cerca de 12,5% da população com idade acima de 65 anos apresenta alguma forma de demência, somando um total aproximado de 2,5 milhões de pessoas casos de Alzheimer. Este número era de pouco mais de 1 milhão de pessoas no

Capítulo 1 Introdução

levantamento de 2010, indicando que os números dobraram em 10 anos. A estimativa é que em 2050 sejam mais de 5 milhões de idosos afetados pela D.A no Brasil¹¹.

A D.A é uma doença atrelada à idade, sendo este seu maior fator de risco. A grande maioria dos casos ocorre em pessoas com idade avançada, apenas aproximadamente 5% dos casos ocorrem em pessoas com idade inferior a 60 anos¹². Estes casos são chamados de Doença de Alzheimer familiar (FAD, do inglês *Familial Alzheimer's Disease*), os quais tem ocorrência vinculada a mutações em genes específicos¹³⁻¹⁵. É importante ressaltar que, em geral, a neurodegeneração começa entre 10 e 30 anos antes de os primeiros sintomas clínicos serem detectados¹².

Entre os muitos genes relacionados ao desenvolvimento precoce da D.A. o principal deles é o que codifica a apoliproteína E (APOE), especialmente o alelo $\epsilon 4$ ¹⁶⁻¹⁹. Mutações nos genes das proteínas presinilinas 1 e 2 (PSEN 1 e PSEN 2) e, também, mutações na proteína APP desempenham papéis fundamentais nas formas hereditárias de D.A, que contabilizam de 1 a 3% dos casos, que também acometem pessoas jovens e podem levar a quadros severos com a formação de placas do peptídeo beta amilóide ($A\beta$) no curto período de 4 meses²⁰⁻²⁵.

Outros genes relacionados à D.A. familiar incluem os de outras apoliproteínas, como a clusterina (APOJ), que tem capacidade de se ligar ao $A\beta$ formando complexos permeáveis à barreira hematoencefálica (BHE), favorecendo seu acúmulo no SNC; assim como o gene responsável pela função dos íons Ca^{2+} (CALHM), cuja superexpressão pode levar a excesso de íon cálcio no citoplasma, desencadeando processos de apoptose celular²⁶⁻³².

É inevitável que o avanço científico e tecnológico a nível global influencie no número de doentes no mundo. Uma vez que se obtêm novas tecnologias é natural a ocorrência da melhora na qualidade de vida que reflete diretamente na expectativa de vida das pessoas ao redor do mundo¹⁰. Sendo assim, as novas tecnologias e os avanços na medicina tendem a elevar o número de idosos. o que imediatamente implica nesta tendência de aumento do número de casos¹⁰.

Capítulo 1 Introdução

Junto com o aumento do número de casos vem o impacto econômico. Apesar da inexistência de um tratamento efetivo que leve à cura da doença, existe uma demanda econômica considerável para com o doente e sua família. Para que o idoso acometido pela doença possa ter uma vida minimamente digna são necessários cuidados como acompanhamento psiquiátrico e psicológico, cuidadores, uma boa dieta e hábitos que minimizem os impactos causados pelos sintomas¹⁰.

Neste sentido, estima-se que o gasto global com a doença de Alzheimer seja de 1 trilhão de dólares em 2020, com estimativa de que este valor dobre até 2030. No Brasil, foram investidos cerca de 50 mil dólares em 2019 para os cuidados com a D.A, um valor próximo de 200 mil reais para a época¹¹.

Devido a estes indicadores, a D.A tem sido foco de pesquisas científicas em escala global a fim de encontrar as causas para a doença, um método de diagnóstico seguro e em estágios iniciais e, também, métodos e fármacos para tratamento que, atualmente, são apenas sintomáticos e paliativos, com efeitos de curta duração.³³⁻³⁶. Apesar do empenho de recursos, tanto financeiros quanto humanos, estas perguntas continuam sem respostas. O diagnóstico é, usualmente, obtido após o falecimento do paciente (*post mortem*). Algumas técnicas como a tomografia³⁷⁻⁴⁰ e a ressonância magnética por imagem⁴¹⁻⁴⁴ permitem identificar lesões, entretanto, já em estágio avançado.

A característica multifatorial que acompanha a D.A. faz com que não se encontre um único vetor para a doença, o que dificulta a obtenção de um diagnóstico e de tratamentos efetivos para a doença. Existe uma série de hipóteses que se inter cruzam, de forma que nenhuma delas pode ser completamente descartada.

Capítulo 1 Introdução

1.2 A Hipótese Colinérgica da Doença de Alzheimer

A acetilcolina é um dos neurotransmissores mais importantes e abundantes presentes no SNC. Juntamente com a butirilcolina elas formam o sistema colinérgico. Estes neurotransmissores são responsáveis por fazer a ligação entre os neurônios, facilitando a passagem do impulso elétrico enviado pelo cérebro⁴⁵.

O sistema colinérgico é responsável pela regulação de algumas funções importantes no sistema nervoso central, como a aprendizagem, a transformação da memória de curto prazo em memória de longo prazo, equilíbrio e controle de contração muscular⁴⁶.

Assim sendo, é importante para o pleno funcionamento que os neurotransmissores tenham suas concentrações bem controladas. Para isso, o organismo dispõe de um sistema de enzimas, responsáveis pela degradação de tais moléculas, chamadas enzimas colinesterases, isto é, butiril e acetilcolinesterase⁴⁷.

A acetilcolinesterase é uma enzima de forma elipsoidal com dimensões de 45 x 60 x 65 angstroms. Possui dois sítios de ligação, um sítio ativo e um alostérico, sendo uma enzima da família das serinoproteases, nas quais seus sítios ativos são compostos por uma tríade específica de aminoácidos formada por serina-histidina-glutamato⁴⁸.

A hipótese colinérgica, a mais antiga na tentativa de elucidar os mecanismos que levam aos sintomas observados nos pacientes de D.A., considera que ocorra atividade exacerbada das enzimas colinesterases, principalmente da acetilcolinesterase, o que leva à ausência de neurotransmissor nas sinapses dos neurônios do hipocampo, ocasionando o déficit cognitivo característico dos pacientes acometidos pela doença de Alzheimer^{49,50}.

Além da alta velocidade de clivagem do neurotransmissor, o déficit de concentração de neurotransmissor nas sinapses é, ainda, aumentado devido à diminuição da concentração da enzima colina acetiltransferase, responsável pela biossíntese do neurotransmissor acetilcolina^{47,49,51}. Desta forma, organismo não tem a capacidade de manter a homeostase de acetilcolina, o que leva ao mau funcionamento das sinapses, o que induz a apoptose celular dos neurônios e culmina na perda de

Capítulo 1 Introdução

volume cerebral na região hipocampal, que é uma característica comum aos pacientes de D.A.⁵².

Desta forma, os primeiros medicamentos criados com a finalidade de tratar a doença de Alzheimer foram os chamados anticolinérgicos, que têm a função de inibir a atividade das enzimas colinesterases a fim de reduzir os danos cognitivos, podendo agir como inibidores reversíveis ou irreversíveis⁵³.

O primeiro anticolinérgico relatado foi a Tacrina⁴⁹ (figura 1), que tem a capacidade de se ligar ao sítio ativo da enzima, resultando em uma inibição do tipo competitiva, onde o inibidor impede que a molécula alvo atinja o sítio ativo da enzima. A Tacrina é um potente inibidor das enzimas colinesterases, com IC50 e Ki na ordem nanomolar.

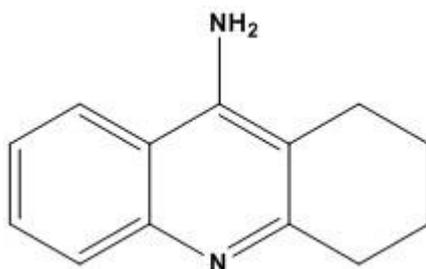


Figura 1: Estrutura molecular da tacrina.

Entretanto a Tacrina apresentou severos efeitos colaterais aos usuários, levando a obtenção de novos fármacos como a Galantamina, o Donepezil^{48,53}. Tais fármacos continuam no mercado e são os únicos medicamentos no combate à D.A, entretanto, seus efeitos na melhora cognitiva são de curto prazo com os sintomas sendo recobrados após um ou dois anos de uso. Desta forma, a obtenção de estruturas com potencial ação anticolinérgica continua sendo uma frente ampla de pesquisa⁵⁴.

A busca por novos fármacos, usualmente, se concentra em compostos puramente orgânicos e, no caso dos anticolinérgicos, não é diferente. É conhecido que pesticidas como organofosfatos e carbamatos são excelentes inibidores da AChE⁵⁵⁻⁵⁸.

Entretanto, desde o sucesso no uso do complexo metálico cis-platina no combate e cura de alguns tipos de câncer, os complexos de metais de transição vêm

Capítulo 1 Introdução

ganhando espaço e relevância como potenciais moléculas ativas. Isto porque eles apresentam algumas vantagens em relação aos compostos puramente orgânicos, como a geometria bem definida e a facilidade de se moldar as características espectroscópicas pela substituição de ligantes⁵⁹.

Recentemente, novos complexos baseados em platina tendo morfolina e carbenos do tipo NHC (*N heterocyclic carbene*) foram reportados por Aydin Aktas e colaboradores, apresentando apreciável potencial anticolinérgico. Foram apresentados 9 novos complexos que tiveram K_i para inibição da AChE entre 10 e 35 μM .⁶⁰

Entre os metais mais utilizados para a construção de tais estruturas, destacam-se o ródio, irídio, rênio e, particularmente neste trabalho, o rutênio^{61,62}. Devido suas propriedades químicas semelhantes às do ferro, os complexos de Ru(II) e Ru(III) sofrem pouca rejeição por parte do organismo, o que atrai a atenção da comunidade científica para estes compostos⁶³.

No contexto da atividade anticolinérgica, o número de trabalhos vem crescendo. Em 2017 e 2018, Sundaraneedi reportou três trabalhos interessantes utilizando complexos polipiridínicos de Ru(II), incluindo um tetranuclear, no combate à parasitas causadores de doenças tropicais como esquistossomose e malária. Os complexos inibem fortemente as enzimas colinérgicas destes parasitas, causando a morte dos mesmos, abrindo uma nova perspectiva para o tratamento de tais doenças.⁶⁴⁻⁶⁶

Em 2014, Vyas e colaboradores apresentaram um trabalho relacionando complexos de Ru(II) contendo polipiridinas como ligantes que apresenta capacidade de inibir a atividade das enzimas colinérgicas e, também, capaz de inibir a agregação do peptídeo β -Amilóide.⁶⁷ Ainda, em 2018, o mesmo grupo apresentou um novo trabalho utilizando um complexo bimetálico, contendo Ru(II) e Pt(II) que apresentam as mesmas características⁶⁸, representando importantes exemplos de drogas multi alvos no contexto do combate à doença de Alzheimer.

Capítulo 1 Introdução

A inibição das enzimas colinesterases, principalmente da acetilcolinesterase, é fundamental no combate à DA. Apesar da hipótese colinérgica ter perdido espaço após as fortes evidências sobre a participação do peptídeo A β na etiologia da doença, os efeitos da ação enzimática sobre os neurônios é evidente e continua sendo o único alvo que pode ser atacado no combate sintomático.

Por isso o campo de pesquisa de anticolinérgicos ainda é amplamente explorado, pois, os únicos medicamentos existentes para o tratamento, ainda que sintomático, da D.A tratam exatamente desta nuance, sendo importante a busca por novos e melhores fármacos.

1.3 Complexos de Ru(II) e Outros Metais na Medicina

Os complexos de coordenação têm ganhado atenção da comunidade científica após o sucesso da cis-platina no combate ao câncer. Entretanto, apesar da notória atividade, a cis-platina ainda apresenta inúmeros efeitos colaterais, o que demanda inovação constante. Assim sendo, o campo de pesquisa sobre metalofármacos está em franca evolução^{42,69}.

Há exemplos de complexos no tratamento de vários tipos de câncer por mecanismos de interação com o DNA, RNA e outras biomoléculas que podem desencadear processos apoptóticos das células tumorais, similar à ação da cis-platina^{70,71}.

Outra aplicação de complexos em amplo desenvolvimento é sua utilização como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética (IRM) e em tomografia de emissão de pósitrons (TEP). Utilizam-se, principalmente, complexos de $^{54}\text{Cu}^{2+}$ e Tc, como substitutos para os contrastes baseados em ^{19}F . Estas técnicas têm aplicação especial na área das neurociências por permitirem o mapeamento das áreas cerebrais e detecção de lesões que podem ajudar no diagnóstico de doenças como Parkinson e a própria doença de Alzheimer, apesar de não serem definitivas^{1,37-40,72,73}.

Uma característica fundamental dos complexos formados por metais da segunda série de transição é que, com bom planejamento dos ligantes, eles podem

Capítulo 1 Introdução

apresentar luminescência na região visível do espectro eletromagnético, proveniente da população e consequente decaimento de um estado eletrônico tripleto excitado ($^3T^*$), após absorção de luz. A população deste estado eletrônico favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo contato do complexo em seu estado excitado com o O_2 presente no ambiente celular, induzindo apoptose das células cancerígenas⁷⁴⁻⁸².

Esta técnica é chamada de terapia fotodinâmica e esta área está em franco crescimento por ser uma técnica não invasiva e que pode ser utilizada *in situ*, preservando as células saudáveis^{74,83-85}. Os complexos de metais de transição apresentam, ainda, uma característica que expande esta ideia, que é a possibilidade da fotodissociação, ou seja, a interação com a luz pode levar à clivagem da ligação coordenada ligante-metal pela população de um estado eletrônico $^3MC^*$ (tripleto centrado no metal), promovendo a liberação do ligante para o meio^{86,87}. Desta forma, é possível coordenar um fármaco ao metal para ser liberado pela ação da luz, diminuindo a toxicidade do fármaco e aumentando a especificidade da área de atuação. Existem inúmeros exemplos desta aplicação utilizando rutênio, ródio, irídio entre outros¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

O rutênio é um metal de configuração d^8 que assume 2 estados de oxidação principais, Ru(III), de configuração d^5 e Ru(II) de configuração d^6 . Encontra-se logo abaixo do ferro na tabela periódica e, por isso, tem a capacidade de mimetizar compostos de Fe no organismo, o que facilita sua interação com biomoléculas e diminui a toxicidade. É um centro metálico hexacoordenado, cuja geometria do complexo pode ser modulada pelo uso de ligantes multidentados em combinação com ligantes monodentados^{63,88-92}.

Os complexos de Ru(II) são, em geral, de spin baixo, levando a um estado fundamental singleto, com todos os elétrons do centro metálico emparelhados no orbital t_{2g} . Esta característica permite a fácil caracterização dos complexos por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, os complexos polipiridínicos, que são o foco deste trabalho, apresentam absorção MLCT intensa na

Capítulo 1 Introdução

região do visível ($\epsilon > 9000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), emissão por fosforescência na região do visível, com banda larga se aproximando do infravermelho próximo^{63,80,93–95}. A solubilidade em H₂O e sistemas tamponados pode variar, mas, em geral, é possível contornar este fator com a utilização de uma fração de volume de um solvente orgânico como DMSO. As sínteses são mais simples em relação às sínteses orgânicas e apresentam rendimento apreciável, na faixa de 60%.

As características espectroscópicas dos complexos de Ru(II), bem como sua capacidade de mimetização dos compostos de Fe(II), fazem deles bons candidatos à sondas fluorescentes biológicas⁶³.

Há exemplos importantes de complexos de Ru(II) atuando na marcação de diferentes organelas, como mitocôndria, retículo endoplasmático entre outros. Devido às características luminescentes, é possível observá-los através de técnicas de imagem como a microscopia confocal^{78,85,96–99}.

No escopo da doença de Alzheimer os complexos de Ru(II) recebem especial atenção por suas propriedades espectroscópicas e biofísicas que permitem sua aplicação como moléculas “multi target”, atuando em diferentes hipóteses da doença, principalmente como sondas luminescentes para o processo de agregação do peptídeo β amiloide, inibidores da enzima acetilcolinesterase e inibidores de espécies reativas de oxigênio que causam o estresse oxidativo^{1,67,78,100–104}.

1.4 A Barreira Hematoencefálica

O cérebro humano contém cerca de 640 km de vasos sanguíneos, sendo que 85% deste total é composto por capilares. Toda esta rede de irrigação tem a função de manter o cérebro nutrido para desempenhar suas metabólicas, já que o SNC consome aproximadamente 20% de toda glicose ingerida na dieta¹⁰⁵.

A barreira hematoencefálica (BBB do inglês *blood-brain barrier*) é uma membrana formada, principalmente, por células endoteliais e astrócitos localizada entre o cérebro e os capilares sanguíneos responsáveis por irrigá-lo, regulando firmemente o transporte de substâncias do fluxo sanguíneo para o cérebro¹⁰⁶.

Capítulo 1 Introdução

As células endoteliais cerebrais se apresentam como fios contínuos compostos por junções estreitas sendo expressos transportadores transmembranas específicos e um alto número de mitocôndrias, evidenciando uma alta demanda energética. Estas junções estreitas formam uma rede composta de proteínas transmembranas com domínios extracelulares capazes de segurar as células apertadamente próximas e de evitar a difusão livre de íons, criando um potencial elétrico transendotelial¹⁰⁷.

Os astrócitos, por sua vez, não tem papel fundamental na formação da barreira física da BBB, exercendo papel fundamental em sua manutenção. Os capilares sanguíneos podem ser quase que totalmente cobertos pelos pés dos astrócitos e é nesta região das células astrocíticas que são expressos importantes proteínas transportadoras, como os transportadores de glicose GLUT1 e canais de potássio além dos astrócitos sintetizarem moléculas biologicamente ativas que podem influenciar as células endoteliais¹⁰⁷. Todo este sistema elaborado e altamente organizado é comum a organismos que apresentam um sistema nervoso central desenvolvido^{108,109}.

A BBB apresenta inúmeras funções, sendo a principal delas, a proteção e manutenção da homeostase do SNC¹⁰⁹. Devido às características da arquitetura celular, suas junções estreitas são mais apertadas que as que existem em membranas celulares comuns. Desta forma, a BBB não permite difusão de substâncias com massa acima de 400 Da ou com mais de 8 ligações de hidrogênio para dentro do SNC, controlando a entrada e saída de moléculas, íons e peptídeos do fluxo sanguíneo para o cérebro^{108,109}.

Da mesma forma, moléculas e metabólitos com massa superior à 400 Da formados no interior do cérebro como resultado do metabolismo são prontamente excretada para a corrente sanguínea por mecanismos de efluxo, a fim de manter e regular a homeostase do sistema nervoso central^{108,109}.

Dadas as restrições impostas pela BBB, as células que a compõem expressam, em sua superfície, proteínas e transportadores capazes de internalizar moléculas essenciais para a manutenção da função cerebral, como peptídeos e a própria glicose,

Capítulo 1 Introdução

haja vista que estas moléculas, por apresentarem massa maior que 400 Da e serem polares, são incapazes de penetrar passivamente a barreira. Assim sendo, além de proteção essencial ao cérebro, a BBB representa, também, um dos maiores desafios na busca por moléculas ativas no SNC para diagnóstico e combate a doenças como glioblastomas, D.A, Parkinson entre muitas outras¹¹⁰.

As moléculas de fármacos são, em geral, muito maiores do que o limite de 400 Da, sendo prontamente reconhecidas como ameaças e eliminadas pelos sistemas de efluxo. Desta forma, é necessário que se encontrem maneiras de driblar a BBB na obtenção de novas moléculas^{110,111}. Atualmente, os caminhos mais empregados para a passagem de moléculas pela BBB é a ruptura física, ainda que momentânea, da mesma, seja por injeção intranasal, ultrassom ou pela ação da luz. Apesar da funcionalidade destes métodos, eles carregam consigo também certas limitações.

Ainda, o desgaste estrutural da BBB é evidência de muitas doenças que atingem o SNC como a D.A¹¹². Desta forma, uma quebra da sua estrutura pode levar a um aumento do fluxo de moléculas tóxicas para o SNC assim como respostas inflamatórias, causando problemas anteriormente inexistentes além de que não é certo que após a intervenção a barreira retorne ao seu estado inicial perfeito^{113,114}.

Assim sendo, novas metodologias para vencer o obstáculo imposto pela BBB são necessários. Uma saída que vem sendo explorada é a utilização dos transportadores de membrana para internalização da molécula de interesse via difusão facilitada ou via transporte ativo^{2,115-118}. Há relatos de moléculas internalizadas ao SNC para uma série de utilizações como quimioterápicos e sondas fluorescentes utilizando transportadores de ferro (transferrina)¹¹⁹⁻¹²¹, colina¹²²⁻¹²⁴, entre outros.

Trabalhos já realizados pelo grupo demonstram que os complexos de Ru(II) são capazes de interagir com as várias fases de aglomeração do peptídeo β -amilóide, também implicado na etiologia da D.A.. Nestes casos, observa-se que a emissão do complexo aumenta pela interação com as cadeias peptídicas. Outro fator, também, é a possibilidade de diferenciar cada fase de aglomeração através do tempo de vida de

Capítulo 1 Introdução

emissão, sendo que os tempos de vida de emissão do complexo também aumentam com o aumento do grau de aglomeração do peptídeo^{100,101}.

Além disso, os complexos apresentam boa capacidade de inibir as enzimas colinesterases implicadas na hipótese colinérgica, foco deste trabalho. Em alguns casos a inibição ocorre na mesma escala das conhecidas moléculas já utilizadas em pacientes da D.A.. Ainda, alguns dos complexos tem a capacidade de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, atuando em outra frente implicada na doença, o estresse oxidativo. Portanto, os complexos de Ru(II) demonstram ser potenciais fármacos com múltiplos alvos (multi-target), que é uma característica importante e cada vez mais necessária no tratamento de doenças multifatoriais^{103,125,126}.

Entretanto, vencer a barreira hematoencefálica continua um desafio não explorado utilizando complexos de Ru(II). Há evidências de que a funcionalização de estruturas com moléculas de glicose favorece a internalização das sondas luminescentes e outras arquiteturas moleculares ao SNC¹²⁷⁻¹²⁹. Recentemente, em 2020, um grupo de pesquisas no Japão reportou nanovesículas decoradas com glicose que foram internalizadas pela BBB através de transcitose mediada pelo receptor GLUT1 para servir como estruturas ativas no combate ao câncer no cérebro¹³⁰.

Desta forma, o ancoramento de uma ou mais moléculas de glicose a um complexo metálico com tais características pode proporcionar o cruzamento do mesmo através da BBB pela interação com receptor GLUT1. Outra via possível para exploração seria alterar a lipofilicidade da estrutura dos ligantes a fim de favorecer a internalização por difusão simples. O sucesso destas abordagens permitiria que o complexo atuasse diretamente no SNC desempenhando suas funcionalidades de múltiplos alvos *in situ* e *in vivo*, favorecendo o tratamento e diagnóstico em etapas precoces da doença¹³¹.

Capítulo 2 Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar e caracterizar complexos luminescentes de Ru(II) de estrutura inédita e avaliar a capacidade de ambos agirem como inibidores da enzima acetilcolinesterase como potenciais novos fármacos anticolinérgicos. Ainda, estas estruturas foram concebidas para apresentarem potencial cruzar a barreira hematoencefálica através de transportadores de membrana ou difusão passiva.

Capítulo 2 Objetivos

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e Isolar complexos polipiridínicos de Ru(II) de estrutura inédita. Um deles de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{fen})_2(\text{L-fen})]^{2+}$ (RuFenGlic), onde fen = 1,10 fenantrolina e L = 1 β -D-Tioglicose e outro de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{EtPy})_2]^{2+}$ (RuEtPy), onde bpy = 2,2' bipyridina e EtPy = 4,2 etilamino piridina e caracterizá-los estruturalmente pelas técnicas de ^1H e ^{13}C RMN e também por ESI-MS.
- Avaliar as propriedades fotofísicas, como intensidade de absorção, intensidade, rendimento quântico e tempo de vida de emissão, de ambos os complexos, através das técnicas de espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis e espectroscopia de emissão.
- Avaliar a atividade inibitória de ambos os complexos contra as enzimas colinesterases humana (hAChE) e do peixe elétrico (eehAChE, ee = *Electrophorus electricus*)
- Avaliar conformação espacial de ambos os complexos em relação às enzimas colinesterases e estimar as respectivas constantes de dissociação pela técnica de STD- ^1H -RMN.
- Avaliar a estabilidade fotoquímica de ambos os complexos utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis, espectroscopia de emissão e ^1H -RMN.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem prévia purificação, exceto pela dimetil formamida (DMF) que foi destilada anteriormente à síntese e utilizada logo em seguida.

Solventes deuterados utilizados nos experimentos de RMN foram adquiridos da Cambridge Isotope Lab,

O N₂ utilizado para obtenção de atmosfera inerte nas soluções e ambientes de síntese foram adquiridos da White Martins com alta pureza.

As enzimas colinesterases utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Sigma-Aldrich e utilizadas sem prévia purificação.

3.2 Vias Sintéticas

3.2.1 Complexo [Ru(fen)₂(L-fen)]²⁺, fen = 1,10 fenantrolina, L = β-D-Tioglicose. - (RuFenGlic)

O complexo RuFenGlic, foi sintetizado seguindo a rota sintética descrita pela figura 2.

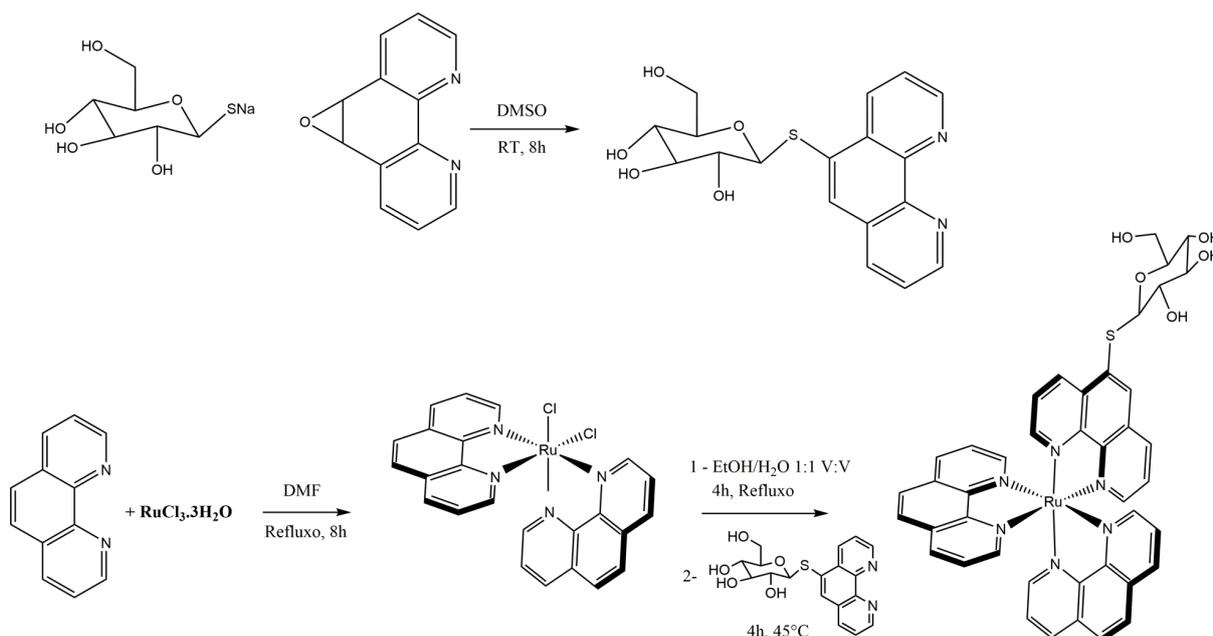


Figura 2: Rota sintética seguida para obtenção do complexo RuFenGlic. Etapa 1: Síntese do ligante 5-(1β-D Tioglicose) 1,10 fenantrolina, DMSO em temperatura ambiente pela adição e desidratação do precursor 5,6diidro 5,6

Capítulo 3 Materiais e Métodos

epoxifenantrolina. Etapa 2: Síntese do precursor clorofen, DMF em refluxo por 8 horas, atmosfera inerte N₂ e excesso de LiCl seguida pela substituição dos ligantes cloreto pelo ligante 5(β-D-Tioglicose) 1,10 fenantrolina, EtOH/H₂O 1:1, 10 mL em refluxo por 4 horas, seguida da adição do ligante e refluxo por mais 4 horas, seguida de adição de NH₄PF₆ em excesso.

*Síntese do ligante L-phen, onde L = β-D-Tioglicose*¹³².

Trata-se de uma abertura de epóxido seguida por uma desidratação para formação do produto final, 5(1β-D-Tioglicose)-1,10 fenantrolina. O composto foi sintetizado pela reação entre 5,6-diidro 5,6 epoxi 1,10 fenantrolina (50 mg, 0,255 mmol) e o sal de sódio da β-D-Tioglicose (65,5 mg, 0,3 mmol) em DMSO sob agitação constante e atmosfera de N₂ por 8 horas. Ocorre precipitação do produto como um sólido amarelo. O precipitado é lavado com etanol (3x25 mL) e seco sob pressão reduzida sendo o produto isolado como um sólido amarelo pálido (50 mg, 0,14 mmol, 55%).

Síntese do intermediário [Ru(Cl)₂(fen)₂]²⁺, Clorofen, onde fen = 1,10 fenantrolina

O complexo clorofen foi sintetizado pela reação de RuCl₃.3H₂O (300 mg, 1,15 mmol) com 1,10-fenantrolina (454 mg, 2,5 mmol) em excesso de LiCl (42,3 mg, 8,02 mmol) em DMF (15mL) sob refluxo em atmosfera de N₂ e agitação por 8 horas. Foram, então, adicionados 20 mL de acetona para promover a precipitação do complexo. A mistura foi filtrada e lavada com H₂O gelada até que o filtrado se tornasse incolor. O composto foi isolado como um sólido roxo (318 mg, 0,6 mmol, 62,3%).

Síntese do complexo [Ru(fen)₂(L-fen)]²⁺, RuFenGlic, onde L = β-D-Tioglicose e fen = 1,10 fenantrolina.

Clorofen (155 mg, 0,3 mmol) foi dissolvido em uma mistura degaseada de EtOH/H₂O (10 mL, 1/1 V:V) e aquecido ao refluxo por 4 horas sob agitação constante e atmosfera inerte de N₂. Então o ligante L-fen (165 mg, 0,44 mmol) é suspenso em uma mistura degaseada de EtOH/H₂O (10mL, 1/1 V:V). Esta suspensão é transferida via cânula para a solução do aquocomplexo e a temperatura é diminuída

Capítulo 3 Materiais e Métodos

para 45°C, sendo mantida sob agitação e atmosfera inerte de N₂ por mais 5 horas. Após o tempo reacional, a solução é concentrada por evaporação do solvente e adiciona-se excesso de NH₄PF₆ (92 mg, 0,5 mmol) para precipitação do complexo final. O precipitado é isolado por filtração como um sólido vermelho (205 mg, 0,2 mmol, 63%).

3.2.2 Complexo cis- [Ru(bpy)₂(EtPy)₂]²⁺, EtPy = 4,2-etilamino piridina; bpy = 2,2' bipyridina. - (RuEtPy)

O complexo RuEtPy foi sintetizado de acordo com a rota sintética mostrada na figura 3.

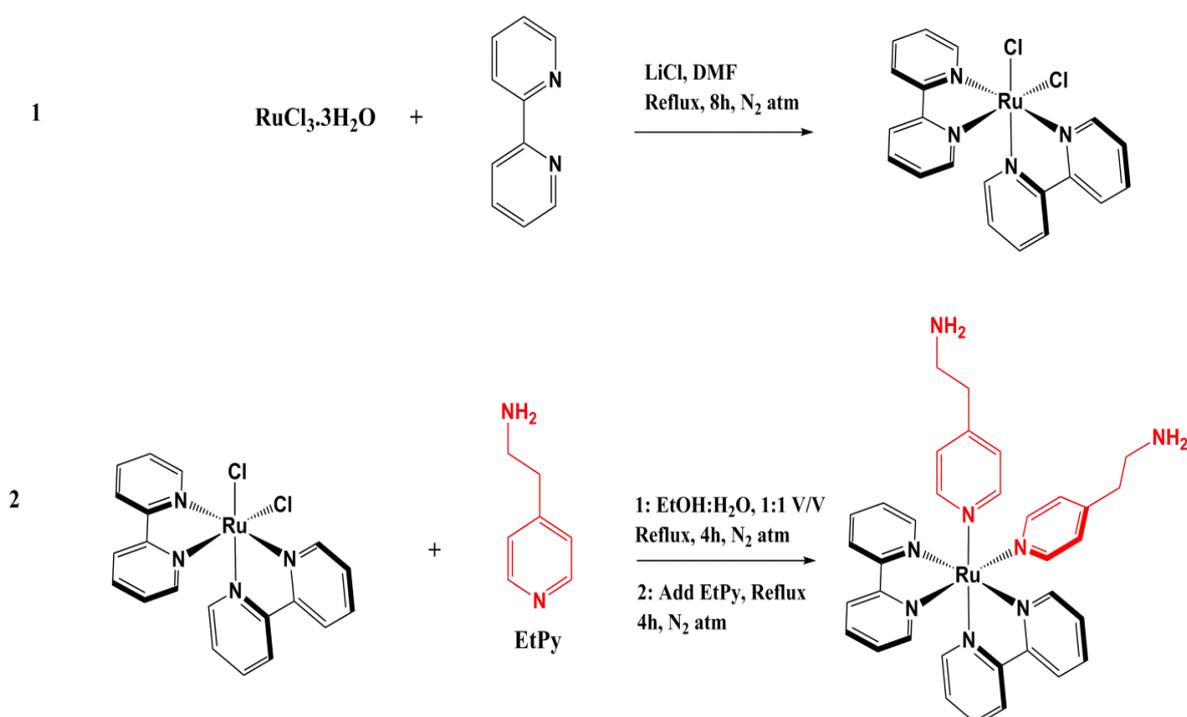


Figura 3: Rota sintética seguida para obtenção do complexo RuEtPy. Etapa 1: Síntese do precursor Clorobpy, DMF em refluxo por 8 horas e excesso de LiCl em atmosfera inerte de N₂. Etapa 2: Substituição dos ligantes cloreto pelos ligantes piridínicos EtPy, EtOH/H₂O 1:1 (10 mL) em refluxo por 4 horas, adição do ligante EtPy e refluxo por mais 4 horas, ambos os processos em atmosfera inerte de N₂.

Síntese do intermediário [Ru(bpy)₂(Cl)₂]²⁺, Clorobpy, onde bpy = 2,2' bipyridina

O complexo [Ru(bpy)₂(Cl)₂]²⁺ foi sintetizado pela reação de RuCl₃·3H₂O (300 mg, 1,14 mmol) com 2,2' bipyridina (391 mg, 2,5 mmol) em excesso de LiCl (340 mg, 8,0 mmol) em DMF (15mL) sob refluxo em atmosfera de N₂ e agitação por 8

Capítulo 3 Materiais e Métodos

horas. A mistura foi filtrada a quente e lavada com H₂O gelada até que o filtrado se tornasse incolor. O composto foi isolado como um sólido roxo (310 mg, 0,63 mmol, 55,2%).

Síntese do complexo cis- [Ru(bpy)₂(EtPy)₂]²⁺, RuEtPy, onde bpy = 2,2' bipyridina e EtPy = 4,2 etilamino piridina

Clorobpy (150 mg, 0,31 mmol) foi dissolvido em uma mistura degaseada de EtOH/H₂O (10mL, 1/1 V:V) e aquecido ao refluxo por 4 horas sob agitação constante e atmosfera inerte de N₂. Então o ligante 4-2etilamino piridina (EtPy) (83 mg, 0,68 mmol, 82 µL) é adicionado. O sistema é mantido sob agitação e refluxo em atmosfera inerte de N₂ por mais 5 horas. Após o tempo reacional, a solução é concentrada por evaporação do solvente e adiciona-se excesso de NH₄PF₆ (111 mg, 0,68 mmol) para precipitação do complexo final. O precipitado é isolado por filtração como um sólido vermelho (150 mg, 0,16 mmol, 51%).

3.3 Caracterização Estrutural

3.3.1 ¹H e ¹³C RMN

Os espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) foram obtidos em um equipamento Bruker Avance 400Mhz, em temperatura ambiente, utilizando acetonitrila (CD₃CN) ou DMSO (C₂D₆SO) como solventes deuterados. A calibração foi feita pelo sinal residual do solvente. A análise dos dados foi conduzida nos softwares Mestre Nova e Top Spin.

3.3.2 Espectrometria de Massas

As medidas de espectrometria de massas foram realizadas em modo positivo em um espectrômetro de massas Xevo G2 Q-TOF (Waters Co., Milford, MA, EUA) equipado com interface de ionização por electrospray. O espectro foi produzido na faixa de 100 a 1500 Da. Os experimentos de íon parental MS-MS foram realizados por dissociação induzida por colisão com argônio sendo o o

Capítulo 3 Materiais e Métodos

gás de colisão e a energia de colisão foi aumentada o suficiente para a fragmentação do íon precursor. Amostras foram preparadas em tampão carbonato de amônio (pH = 7,4) a em concentração de 0,1 mM. As soluções foram introduzidas por infusão direta no analisador utilizando uma seringa de vidro de 250 µL. Na fonte de ESI, a voltagem do capilar foi de 1,2 Kv, a voltagem do cone foi de 20 V, o fluxo de gás no cone (N₂) de 50 L/hr e a temperatura da fonte de 80 °C. Os dados foram processados utilizando o software MassLynx.

3.4 Caracterização Espectroscópica

3.4.1 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Visível

Os espectros de absorção eletrônica no UV-Vis foram obtidas em um espectrofotômetro Agilent 8453 equipado com uma lâmpada branca de tungstênio e uma lâmpada de deutério, utilizando uma cubeta de quartzo Elma com 1cm de caminho óptico e 3 mL de volume. Os complexos foram analisados em diversos solventes. Anteriormente à medida dos espectros, um branco do solvente foi medido para correção.

3.4.2 Espectroscopia de Fluorescência

As medidas foram obtidas de um espectralfluorofotômetro Shimadzu RFPC 5301 equipado com uma lâmpada de deutério e utilizando uma cubeta de quartzo Helma com 1cm de caminho óptico e 3 mL de volume e os quatro lados transparentes. O comprimento de onda utilizado na excitação é igual ao máximo de absorção da MLCT de cada complexo. Os espectros de excitação foram obtidos no mesmo equipamento, utilizando como referência o comprimento de onda máximo de emissão da MLCT de cada complexo. A emissão e excitação dos complexos foram medidas em diferentes solventes.

Capítulo 3 Materiais e Métodos

3.5 Ensaio Com as Enzimas Acetilcolinesterases

3.5.1 Método Colorimétrico de Elmann

O método mais popular de análise da capacidade inibidora de uma molécula frente às enzimas colinesterases é o protocolo colorimétrico proposto por Elmann na década de 1960¹³³.

O protocolo de Elmann (figura 4) é baseado na ação da enzima sobre o substrato acetiltiocolina de estrutura semelhante à acetilcolina utilizando ácido 5,5'ditio(2-nitro) benzóico (DTNB) como indicador.

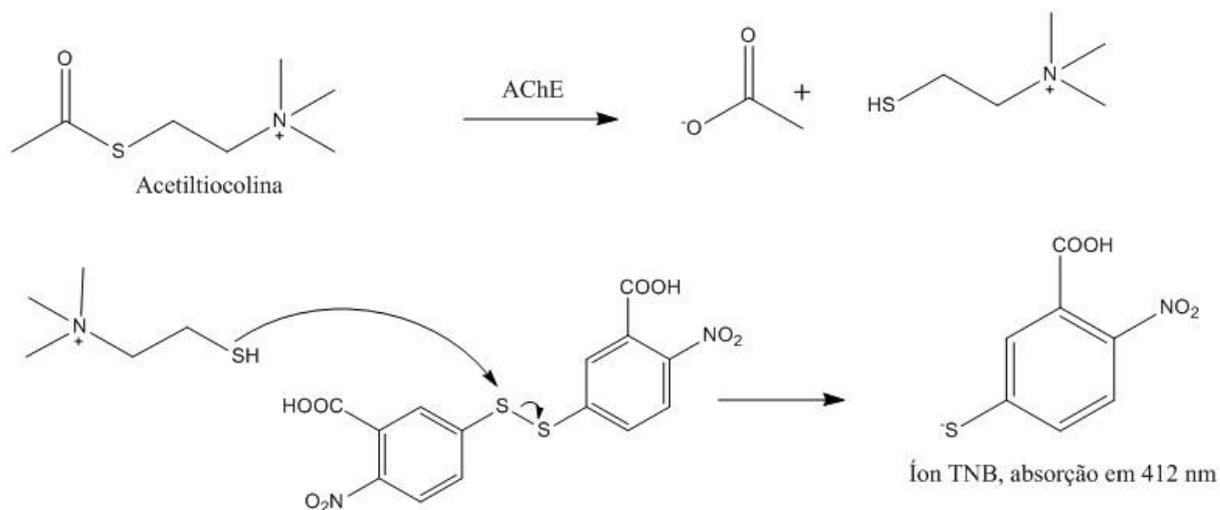


Figura 4: Reação que ocorre entre a tiocolina clivada pela enzima acetilcolinesterase com a molécula de DTNB gerando o íon TNB de acordo com o protocolo de Elmann.

A enzima cliva a ligação tioéster do substrato, liberando tiocolina como um dos produtos da reação. A tiocolina reage, subsequentemente, com o DTNB, gerando como produto o íon TNB. Este íon apresenta absorção característica em 412 nm ($\epsilon = 12400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), o que permite que a reação seja monitorada em tempo real pela técnica de absorção eletrônica no UV-Vis

As medidas foram obtidas em um espectrofotômetro Agilent 8453 equipado com software para análise cinética, com uma leitura a cada 15 segundos avaliando a intensidade da absorção em $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$, utilizando uma cubeta de quartzo Elma com 1cm de caminho óptico e 3 mL de volume contendo uma barra de agitação magnética e com a temperatura do laboratório mantida a 25°C. A reação foi observada por 5 minutos.

Capítulo 3 Materiais e Métodos

Os complexos foram dissolvidos em tampão trizma pH = 8,0. No caso do complexo RuEtPy, devido sua baixa solubilidade em H₂O, foi adicionado um volume de DMSO inferior a 5% do volume total. Nos ensaios, a concentração dos complexos foi variada de 0 a 100 µM.

O substrato acetiltiocolina foi dissolvido em uma solução de albumina bovina (BSA) previamente preparada contendo 15µM de BSA, 0,02 mM de MgCl₂ e 0,1 mM de NaCl. A concentração final de acetiltiocolina nesta solução estoque foi de 100 mM. Nos ensaios, a concentração de substrato foi variada de 0,05 a 0,25 mM.

O indicador DTNB foi solubilizado em solução eletrolítica contendo 0,02 mM de MgCl₂ e 0,1 mM de NaCl. A concentração final de DTNB na solução estoque foi de 0,348 mM. Nos ensaios, foi utilizada uma concentração fixa de 0,33 mM.

As enzimas utilizada nestes experimentos foi a acetilcolinesterase proveniente do peixe elétrico *electrophorus electricus* (eeAChE) e acetilcolinesterase humana (hAChE), ambas dissolvidas em PBS para soluções estoques de concentração de 5U.mL⁻¹. Nos ensaios foi utilizada uma concentração fixa de 0,025 U.mL⁻¹.

Nos ensaios de obtenção da IC₅₀, a intensidade da absorção em λ = 412 nm da reação na ausência de complexo foi considerada como 100% da atividade da enzima. A porcentagem de atividade da enzima na presença do complexo foi calculada por proporção direta em relação à medida controle.

As medidas obtidas na relação absorbância vs tempo são transformadas matematicamente utilizando a relação:

$$V_0 = \left(\frac{\Delta I}{\Delta t}\right) \cdot \varepsilon,$$

onde ε é o coeficiente de extinção molar do íon TNB no comprimento de onda λ = 412 nm e tem valor de 12400 L.mol⁻¹.cm⁻¹, ΔI é a variação de intensidade da absorção entre a primeira e a última medida nos 5 minutos observados e Δt é o tempo observado da reação.

Com esta transformação é obtido o valor de V₀ que permite plotar as curvas cinéticas de Michaelis-Mentem, V₀ vs [Substrato] e a linearização de dpulo recíproco,

Capítulo 3 Materiais e Métodos

conhecida como linearização de Lineweaver-Burke, $1/V_0$ vs $1/[\text{Substrato}]$. Estes dados são nos obter o mecanismo de inibição e as constantes cinéticas envolvidas, como K_m , K_i e K_d .

3.5.2 STD- $^1\text{H-NMR}$

A técnica de STD (*saturation transfer difference*) $^1\text{H-NMR}$ é baseada na transferência da magnetização induzida em uma macromolécula (proteína, DNA, etc) para uma molécula pequena (complexos, moléculas orgânicas, *leads*, etc) por acoplamento dipolar através do efeito nOe (*nuclear overhauser effect*). O experimento consiste em irradiar, com um pulso magnético, uma frequência do espectro onde nenhuma das moléculas em estudo sejam capazes de absorver (*off resonance*), usualmente, -20 ppm. Em seguida, irradia-se com outro pulso uma frequência onde apenas a macromolécula absorve (*on resonance*). Caso haja interação de força entre moderada e fraca entre as duas moléculas (Constante de dissociação, K_d , entre 10^{-8} e 10^{-3} mol.L $^{-1}$), uma parte da magnetização induzida é transferida pela macromolécula, neste caso a as enzimas AChE, para a pequena molécula, neste caso os complexos de Ru(II), através do efeito nOe. A subtração dos espectros *on* e *off* permite a identificação de qual porção dos ligantes do complexo recebeu a magnetização e com qual intensidade. Variando a concentração do inibidor nos experimentos e mantendo um tempo de saturação fixo, é possível construir uma curva de saturação da enzima e, a partir dela, estimar um valor de K_d , a constante de dissociação entre enzima e complexo. Estes dados permitem inferir a posição e orientação do complexo em contato com a enzima, permitindo identificar qual dos ligantes é o principal responsável pela inibição e também possíveis alterações na estrutura que levem a avanços nos resultados para estruturas com potencial aplicação farmacológica¹³⁴.

3.5.2.1 Preparação das amostras

Os experimentos de STD- $^1\text{H-NMR}$ foram obtidos utilizando um equipamento Bruker Avance 600 MHz equipado com uma sonda criogênica.

Capítulo 3 Materiais e Métodos

As enzimas eeAChE e hAChE foram preparadas em concentração de 2,0 mM em PBS deuterado (pH = 8,0), as soluções estoques continham 1480 μ L de volume total e foram guardadas em freezer (-20°C), sendo descongeladas apenas para o uso. Foram preparadas soluções estoque dos complexos na concentração de 2,10 mM em D₂O e algumas gotas de DMSOd₆ para favorecer a solubilização, com volume total de 1,5 mL. Os experimentos foram realizados utilizando uma proporção de 1:80 enzima:complexo em um tubo de RMN de 5 mm (Norrel Inc. EUA) com volume total de 525 μ L. Para obtenção dos mapas de epitopo, a concentração final do complexo foi de 0,6 mM enquanto a concentração das enzimas se mantiveram constantes em 7,6 μ M. Nos experimentos titulométricos (STD-RMN), a concentração do complexo foi variada de 0,4 mM a 0,05 mM, enquanto a concentração das enzimas foram mantidas constantes em 7,6 μ M, tendo sido realizados 5 experimentos independentes para cada enzima.

3.5.2.2 Condições dos experimentos de STD-RMN

Os experimentos foram realizados utilizando uma sequência de pulsos com supressão de água feitos por um esquema de excitação (stddiffesgp.3). Os dados de aquisição foram obtidos com 65536 pontos, utilizando um pulso calibrado de 8,47 μ s para ¹H, com tempo de aquisição de 3,4 s, largura de banda espectral de 16 ppm com compensação em 4,7 ppm, 256 scans com tempo de reciclo de 1,5 a 10 s. Dois experimentos foram realizados, com uma configuração pseudo-2D e aquisição intervalada entre os experimentos on e off. A saturação por irradiação seletiva das enzimas foi obtida utilizando uma série de pulsos Gaussianos suaves com atenuação de 55 dB. A frequência escolhida para irradiação das enzimas foi de -864,00 Hz (-1,4 ppm) para ressonância *on* e 30000 Hz (50 ppm) para ressonância *off*. A curva de saturação de STD foi adquirida variando o tempo de saturação entre 0,5 e 10 s, realizando 14 experimentos. O fator de amplificação de STD foi calculado levando em consideração as concentrações do complexo [L] e da proteína [P] além do sinal de intensidade do espectro de diferença de STD (STD *diff*) em relação à referência de

Capítulo 3 Materiais e Métodos

ressonância *off*, seguindo a equação (1)

$$A_{STD} = (I_0 - I_{STD})/I_0 \times [L]/[P] \quad (1)$$

Para determinação da porcentagem relativa do fator de amplificação, o sinal do proton com maior intensidade de integral foi associado ao valor 100%, sendo os outros valores normalizados a partir deste.

Para determinação da constante de dissociação (K_d), foi utilizada a equação 2:

$$A_{STD} = (\alpha_{STD} \times [P]) / (K_D + [P]) \quad (2)$$

Onde A_{STD} é a intensidade, α_{STD} é o máximo de intensidade de STD considerando concentração infinita, e $[P]$ é a concentração das enzimas, mantida constante em 7,6 μM , com a concentração dos complexos variando entre 0,05 e 0,4 mM, com 5 experimentos realizados. Após a obtenção dos valores de A_{STD} e α_{STD} , as curvas de concentração foram ajustadas adequadamente de acordo com o modelo de Michaelis-Menten utilizando o software Origin, versão 8,5. Estes experimentos foram realizados utilizando 65536 pontos, um pulso calibrado de 8,82 μs para ^1H , tempo de aquisição de 3,4 s, janela espectral de 16 ppm com compensação em 4,7 ppm, 256 scans, tempo de reciclo de 5,0 s e tempo de saturação de 5 s.

Todos os dados experimentais de STD obtidos (mapa de epitopo e determinação de K_d) foram processados aplicando correção automática de fase (apk) e de linha de base (abs) e transformada de Fourier pseudo-2D, utilizando 65536 pontos na dimensão direta (F2) e 1024 pontos na dimensão indireta (F1), com multiplicação exponencial equivalente (LB) a 0,30 Hz para alargamento de linha em ambas as dimensões, utilizando funções de apodização exponencial (EM) e SINE em F2 e F1, respectivamente.

3.6 Ensaios Fotoquímicos

Foram preparadas soluções dos complexos RuFenGlic (100 μM) em acetonitrila e RuEtPy (150 μM) em acetonitrila e em tampão tris-HCl (pH = 7,2). As soluções foram degaseadas por um fluxo de N_2 por 5 minutos e então foram irradiadas utilizando uma lâmpada de xenônio (modelo 6258) em um arco universal Newport Oriol. Foram utilizados filtros de 420, 450 e 520 nm para

Capítulo 3 Materiais e Métodos

observação da fotossustituição. As soluções foram alocadas em uma cubeta de quartzo Helma com 4 lados transparentes. O progresso da fotólise foi monitorada por UV-Vis, luminescência e ^1H -RMN. As soluções foram irradiadas em intervalos de tempo determinados e a solução na cubeta foi agitada por um agitador magnético para garantir uniformidade da absorção da luz pela amostra. As amostras foram irradiadas até que os espectros se tornassem constantes. A intensidade da lâmpada foi obtida por actinometria utilizando oxalato de ferro como padrão. No caso das fotólises acompanhadas por UV-Vis e luminescência, o tempo total médio de irradiação foi de 3 horas. No caso das fotólises acompanhada por ^1H -RMN, as soluções foram preparadas somente em acetonitrila deuterada, tendo também sido degaseadas por um fluxo de N_2 . Para irradiação foi utilizada uma lâmpada de LED Kessil (PR160 L) de comprimento de onda $\lambda = 456 \text{ nm}$ (352 mW/cm^2). O tubo contendo a solução foi colocado a 10 cm de distância da fonte de luz. Os experimentos foram conduzidos em um equipamento Bruker Avance 400 MHz, 25°C utilizando o solvente como lock.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

4. Resultados e Discussões

4.1 Caracterização Estrutural e Espectroscópica

4.1.1 Complexo RuFenGlic

O ligante L-phen (L = β -D-Tioglicose) foi caracterizado utilizando a técnica de ^1H -RMN. O espectro obtido (Figura 5) mostra sinais finos e definidos, característicos das substâncias em alto grau de pureza. Observa-se, também, o desdobramento dos sinais da fenantrolina. Este efeito é causado pela presença do substituinte 1- β -D Tioglicose na posição 5 que faz com que as posições dos prótons não sejam equivalentes pela quebra de simetria.

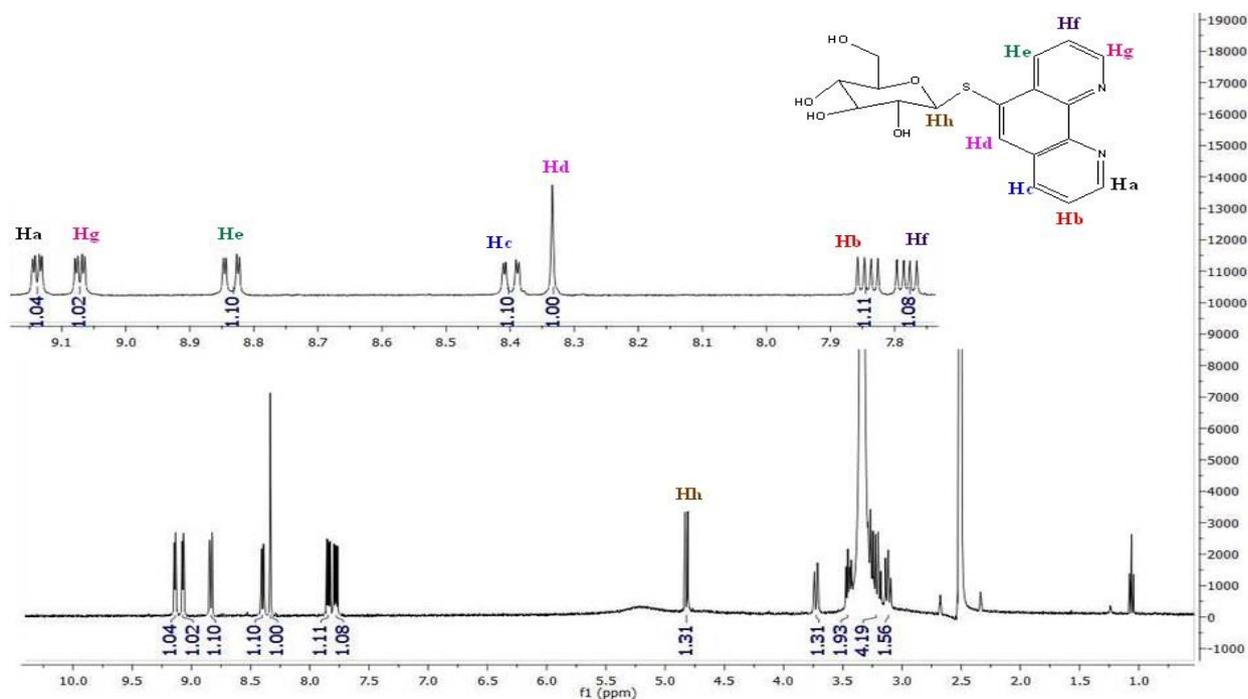


Figura 5: Espectro de ^1H -RMN do ligante L-fen (5(1 β -D-Tioglicose)1,10 fenantrolina) . DMSO d_6 , 400 MHz, 25°C .

Observa-se um sinal em 9,14 ppm (dd, $J_1 = 4,3$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H) referente ao hidrogênio da posição 9 (Ha) do anel, seguido por outro duplo dubleto em 9,05 ppm (9,05 ppm, dd, $J_1 = 4,3$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H) referente ao próton da posição 2 da fenantrolina (Hg). Na região de aromáticos observam-se também dois sinais, um em 7,84 ppm (dd, $J_1 = 8\text{Hz}$, $J_2 = 4,3$ Hz, 1H) e outro em 7,78 ppm (dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 4,3$ Hz, 1H) referentes às posições 3 e 8 (Hf e Hb) da fenantrolina. Dois sinais em 8,4 ppm (dd, $J_1 = 8\text{Hz}$, $J_2 = 1,8$ Hz, 2H) e 8,83 ppm (dd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz,

Capítulo 4 Resultados e Discussões

1H) referentes às posições 4 e 7 (He e Hc) e um sinal em 8,33 ppm (s, 1H) referente à posição 6 da fenantrolina (Hd). Este sinal é particularmente importante na identificação do produto, uma vez que as posições 5 e 6 são equivalentes em uma fenantrolina não substituída e o sinal esperado seria um dubleto integrando para 2 prótons¹³².

Ainda, observa-se um sinal em 4,79 ppm (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H) referente ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico na molécula de tioglicose (Hh), que também permite afirmar a formação do produto. Os demais sinais da molécula de glicose são esperados entre 2 e 3 ppm escondidos sob os sinais de DMSO *d6* e H₂O residuais¹³². As informações da atribuição foram detalhadas na tabela 1.

Tabela 1: Atribuição dos principais sinais do espectro de ¹H-RMN do ligante 5(β-D-tioglicose)1,10 fenantrolina.

Posição	Atribuição no Espectro	δ (ppm)	Multiplicidade (J Hz)	Integral
2	Hg	9,07	dd	1H
3	Hf	7,78	dd	1H
4	He	8,83	dd	1H
6	Hd	8,33	s	1H
7	Hc	8,4	dd	1H
8	Hb	7,84	dd	1H
9	Ha	9,14	dd	1H
H-Carbono anomérico	Hh	4,79	d	1H

O complexo precursor, clorofen, foi obtido seguindo protocolos já estabelecidos de síntese^{96,135,136}. Sua caracterização foi obtida pelas técnicas de ¹H-RMN e pelo espectro de absorção eletrônica no UV-Vis.

O espectro de RMN (figura 6) demonstra a quebra de simetria dos sinais da fenantrolina. Isso nos permite inferir que o complexo apresenta geometria *cis*. Os sinais observados estão de acordo com os reportados para este complexo na literatura¹³⁷.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

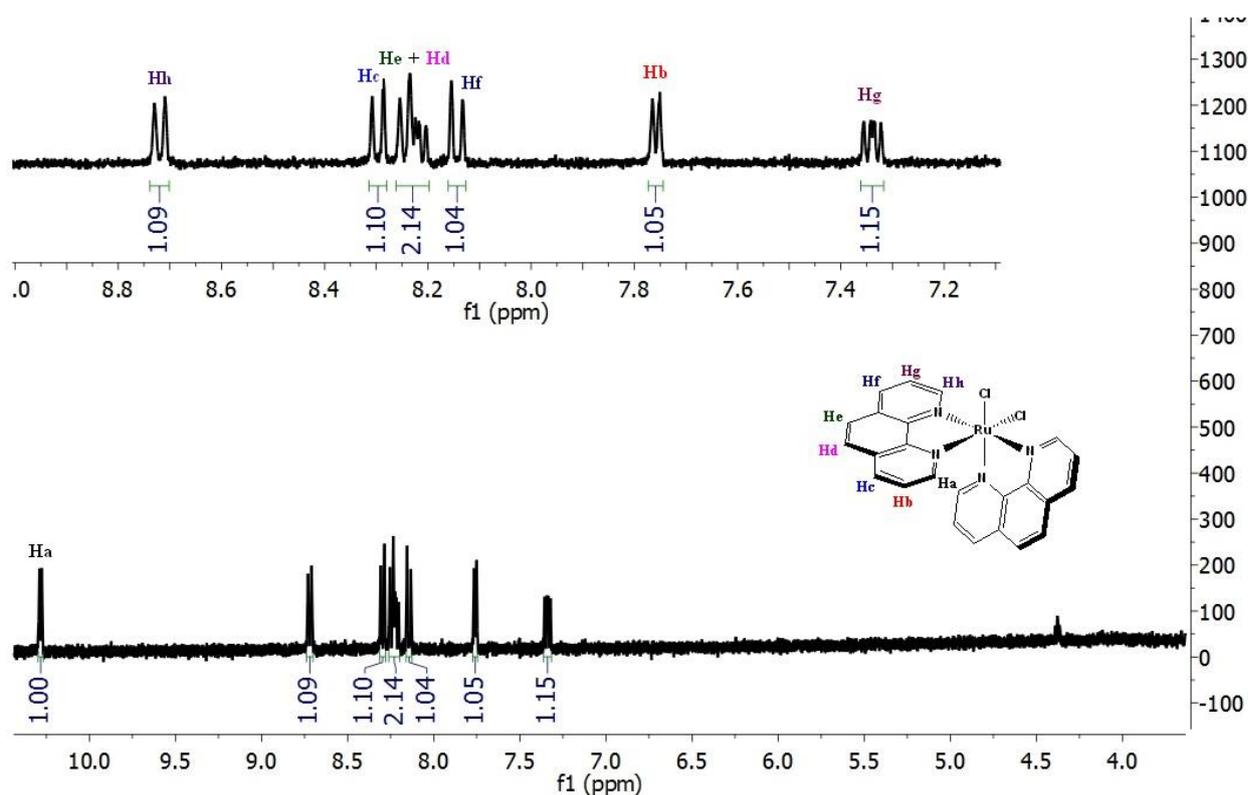


Figura 6: Espectro de ^1H -RMN do complexo precursor Clorofen. CD_3CN , 25°C , 400 MHz.

Observa-se a desproteção de alguns sinais da fenantrolina, por exemplo, o sinal do próton da posição 2 (Ha) em 10,5 ppm (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H). Este deslocamento pode estar relacionado à presença dos ligantes cloretos, que apresentam características σ e π doadores, coordenados ao Ru(II). Estes átomos tendem a aumentar a densidade eletrônica do centro metálico através da doação de elétrons π e, conseqüentemente, das fenantrolinas pelo mesmo motivo. Isto causa um aumento na corrente de anel dos aromáticos desblindando os prótons principalmente da porção da fenantrolina em trans ao cloreto (posição 4, Hc) e nos mais próximos ao centro metálico e do átomo de nitrogênio piridínico (posição 2, Ha).

Observa-se os sinais referentes às posições 3 e 8 (Hb e Hg respectivamente) como dois dubletos um em 7,3 ppm (7,3 ppm, d, $J_1 = 8\text{ Hz}$, 1H) e outro em 7,75 ppm (7,75 ppm, d, $J_1 = 8\text{ Hz}$, 1H). Estas posições na fenantrolina se encontram em frequências mais altas devido ao efeito de ressonância. Em 8,24 ppm encontra-se um multipletto (8,24 ppm, M, 2H) referente às posições 5 e 6 da fenantrolina (Hd e He,

Capítulo 4 Resultados e Discussões

respectivamente). Observa-se em 8,31 ppm (8,31 ppm, d, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 4,3$ Hz, 1H) o sinal do próton referente à posição 6 da fenantrolina (Hf), em 8,74 ppm (8,74 ppm, d, $J_1 = 8$ Hz, 1H) o sinal referente à posição 9 da fenantrolina (Hh). Os demais sinais apresentam proporção de hidrogênios e multiplicidades que corroboram a estrutura. As informações detalhadas da atribuição pode ser encontrada na tabela 2.

Tabela 2: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo precursor Clorofen.

Posição	Atribuição no Espectro	δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	Integral
2	Ha	10,28	d (5,3)	1H
3	Hb	7,76	d (5,4)	1H
4	Hc	8,3	d (8,9)	1H
5	Hd	8,26 - 8,19	m	2H
6	He			
7	Hf	8,14	d (8,8)	1H
8	Hg	7,34	dd (8,0; 5,1)	1H
9	Hh	8,72	d (8,1)	1H

O característico espectro de UV-Vis deste complexo é apresentado na figura 7. Observam-se 2 bandas na região do UV, em $\lambda = 230$ nm ($\epsilon = 25000$ L.mol $^{-1}$.cm $^{-1}$) e a segunda em $\lambda = 320$ nm ($\epsilon = 30000$ L.mol $^{-1}$.cm $^{-1}$). Estas bandas são características da transição eletrônica entre os orbitais $\pi - \pi^*$ do ligante (L-L). Estas bandas são muito intensas por apresentarem uma alta probabilidade de ocorrer de acordo com o princípio de Franck-Condon, causando uma grande modificação nos orbitais envolvidos e, por isso, apresentam um valor muito alto de coeficiente de absorvidade molar. Observa-se também uma banda larga na região do visível, com máximo em $\lambda = 550$ nm ($\epsilon = 9500$ L.mol $^{-1}$.cm $^{-1}$). Esta banda é atribuída a uma transição eletrônica do metal para o ligante (MLCT), pela transição do elétron entre os orbitais $d\pi_{\text{metal}} - \pi^*_{\text{ligante}}$ ^{76,77,138}.

A região mais próxima do vermelho da banda MLCT em relação às das bandas L-L pode ser explicada pela característica π -doadora dos cloretos, que levam a diminuição do gap energético entre os orbitais HOMO e LUMO, resultando em uma transição em regiões de maior comprimento de onda. Como esta transição tem uma

Capítulo 4 Resultados e Discussões

probabilidade menor de ocorrer, o valor de ϵ é mais baixo, apesar da transição ser permitida. Este tipo de transição é comumente encontrada na literatura dos compostos de Ru(II) e esta banda é característica do complexo proposto^{74,96,98}.

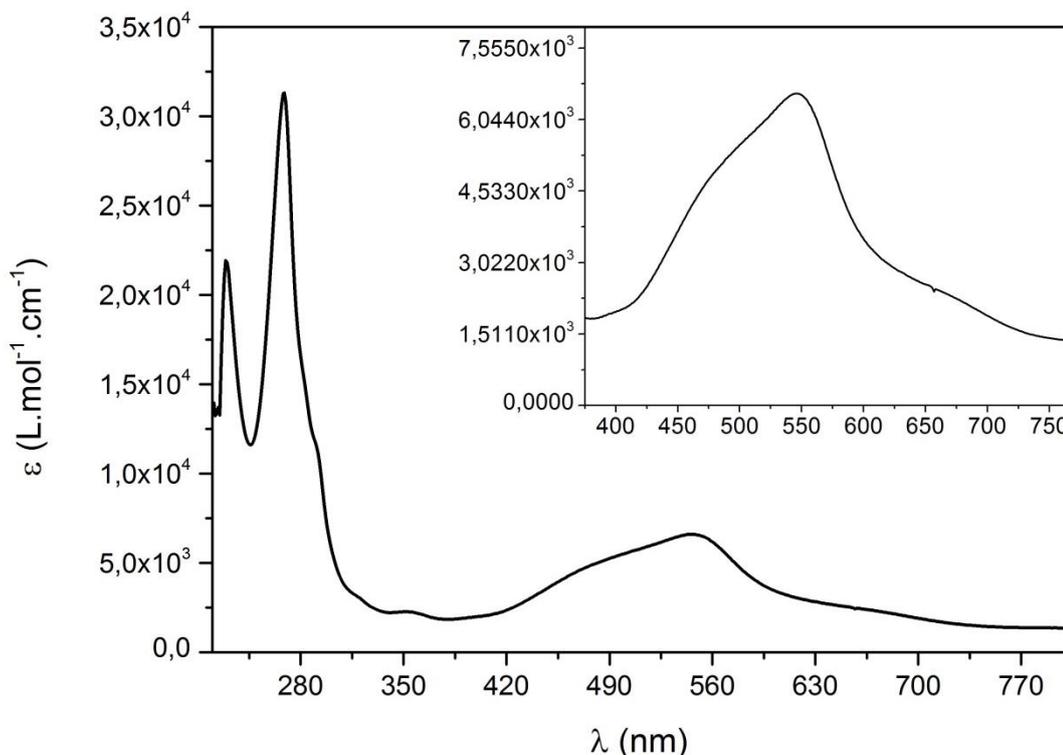


Figura 7: Espectro de UV-Vis do complexo precursor Clorofen. Acetonitrila, 25°C, 50 μ M.

É importante afirmar que, apesar da emissão ser uma característica comum aos complexos de Ru(II) polipiridínicos, este precursor não apresenta tal fenômeno. A explicação é a presença dos ligantes cloretos de característica σ e π doador. A doação π favorece transições do ligante para o metal (LMCT, do inglês *ligand to metal charge transfer*) em vez das transições MLCT (*metal to ligand charge transfer*) que são favorecidas pelas fenantrolinas que são ligantes π receptores. Esta mistura de transferências de cargas favorece a desativação não radiativa, impedindo a emissão.^{73,99,101}

Tendo o complexo precursor e o ligante totalmente caracterizados, a síntese do complexo alvo final foi conduzida, também sob protocolos estabelecidos para a obtenção de complexos de Ru(II). O complexo RuFenGlic foi obtido com apreciáveis 60% de rendimento e foi totalmente caracterizado.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

O espectro de ^1H -RMN (figura 8) mostra os sinais esperados na região de aromáticos, porém um pouco mais largos devido tanto à presença do centro metálico quanto à sobreposição dos sinais. Foram realizados experimentos em 2D (Apêndice, figuras A1 a A8) para tentativa de obtenção de uma atribuição inequívoca, porém devido às muitas correlações, não foi possível atribuir totalmente todos os sinais. Entretanto, as multiplicidades e integrações permitem a inferência de que o complexo foi obtido. O espectro não indica a presença significativa de impurezas ou de material de partida.

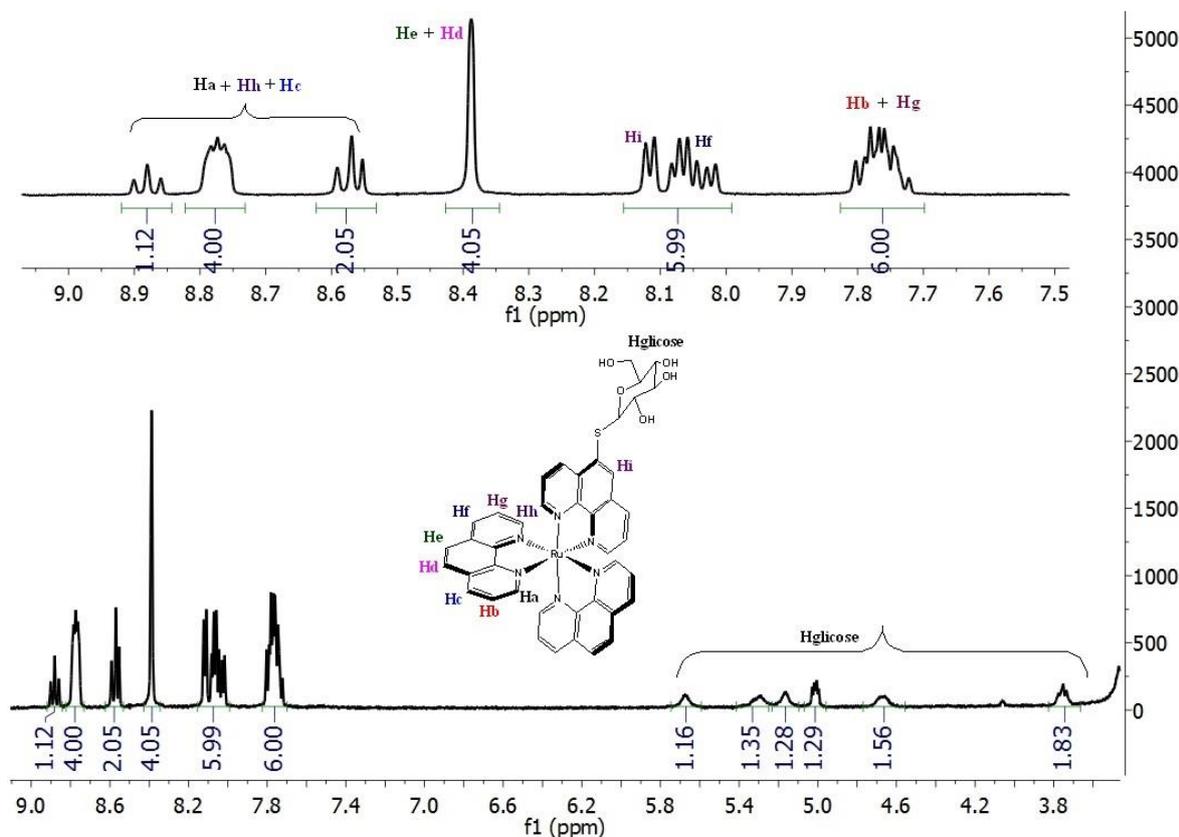


Figura 8: Espectro de ^1H -RMN do complexo RuFenGlic. CD_3CN , 400 MHz, 25°C.

O sinal chave para a identificação da estrutura é o duplete em 8,39 ppm ($J = 8\text{Hz}$, 4H) atribuído aos prótons da posição 5 e 6 das fenantrolinas não substituídas (Hd e He). Sua integração pra 4H indica que uma das fenantrolinas está substituída em alguma dessas posições, quebrando a simetria dos eventuais 6 hidrogênios existentes para esta posição e alterando seu deslocamento químico. Já no caso do sinal atribuído a 7,75 ppm (m, 6H) a presença da glicose não afeta o deslocamento

Capítulo 4 Resultados e Discussões

químico e os 6 prótons referentes às posições 3 e 8 das fenantrolinas (Hb e Hg) aparecem juntos em 1 multipletto. Entre 8 e 8,15 ppm temos um multipletto (m, 6H) referente à posição 6 da fenantrolina substituída (Hi) juntamente com os outros 5 hidrogênios referentes à posição 3 (Hc). Em frequências mais baixas encontramos uma série de tripletos referentes às posições 2 e 9 das fenantrolinas (Ha e Hh) com um sinal sobreposto à um próton da posição 3 (Hc).

O sinal do hidrogênio ligado ao carbono anomérico da molécula de tioglicose aparece consideravelmente desblindado em 5,6 ppm (5,6 ppm, s, 1H), demonstrando o efeito da complexação, uma vez que o ligante livre tinha o sinal em frequência mais alta (4,79 ppm). Os demais sinais referentes à molécula de glicose encontram-se na região entre 5,3 e 3,75 ppm como uma série de singletos. Os dados de atribuição foram sumarizados na tabela 3.

Tabela 3: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo RuFenGlic.

Posição	Atribuição no Espectro	δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	Integral
2	Ha	8,88	t (8,0; 5,4)	1H
9	Hh	8,77	t (7,7; 3,5)	4H
4	Hc	8,57	t (7,6; 4,5)	2H
7	Hf	8,09 – 8,16	m	6H
5 (fenantrolina substituída)	Hi			
3	Hb	7,7 – 7,83	m	6H
8	Hg			
5	Hd	8,39	s	4H
6	He			

Ao compararmos o espectro de ^1H -RMN do complexo precursor com o do complexo alvo (figura 9), observa-se claramente a variação na posição dos prótons da região dos aromáticos, principalmente o deslocamento dos prótons referentes à posição 2 (Ha) para frequências maiores, de 10,28 ppm no precursor Clorofen para 8,88 ppm no complexo RuFenGlic ($\Delta\delta = 1,4$ ppm). Observa-se também um pequeno deslocamento para frequências menores dos hidrogênios atribuídos à posição 3 da

Capítulo 4 Resultados e Discussões

fenantrolina (Hg), de 7,34 ppm no precursor Clorofen para 7,8 no complexo RuFenGlic ($\Delta\delta = 0,46$ ppm). A substituição dos cloretos, ligantes σ e π doadores por uma fenantrolina de características σ doador π receptor retira densidade eletrônica do centro metálico e ganha-se um novo ligante com orbitais π^* receptores vazios, o que faz com que a desblindagem inicial dos prótons no complexo precursor seja diminuída, ocasionando o deslocamento nos sinais para campos mais altos.

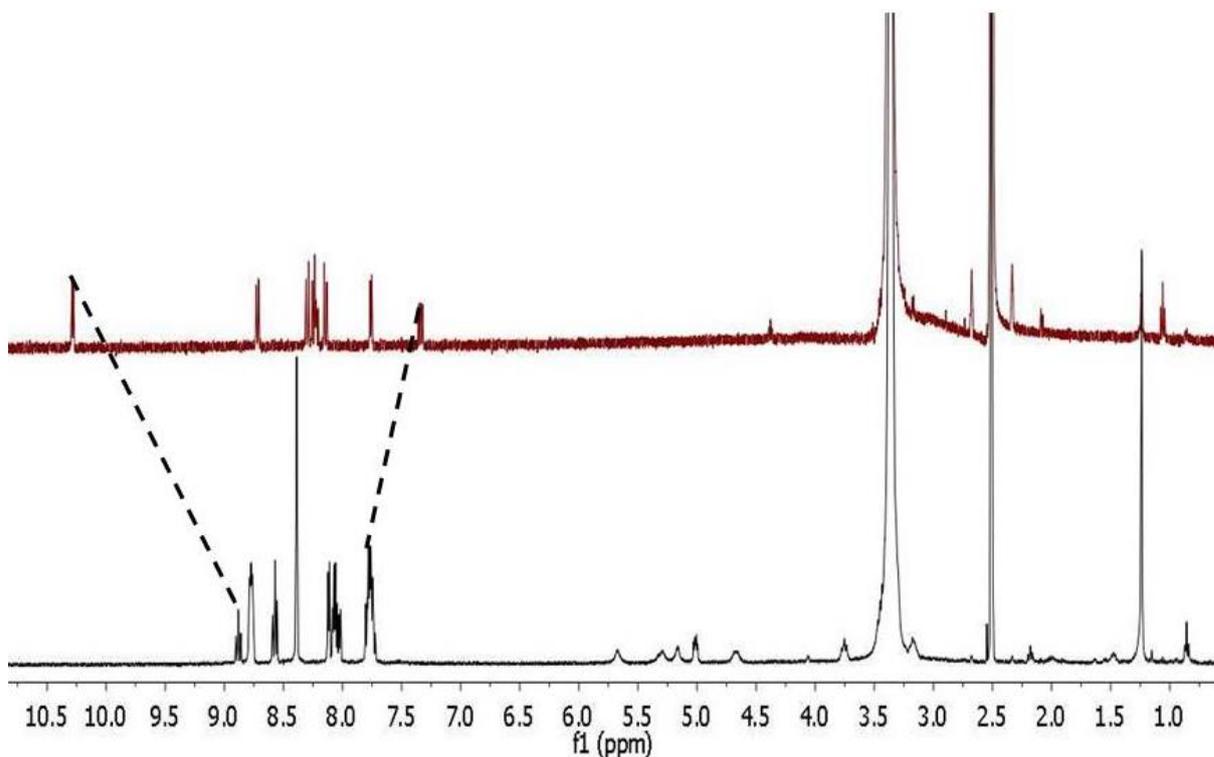


Figura 9: Comparação dos espectros de RMN do complexo precursor Clorofen (marrom) e do complexo RuFenGlic (preto). CD_3CN , 400 MHz, 25°C.

O espectro de massas (figura 10) mostra claramente a estrutura e suas fragmentações.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

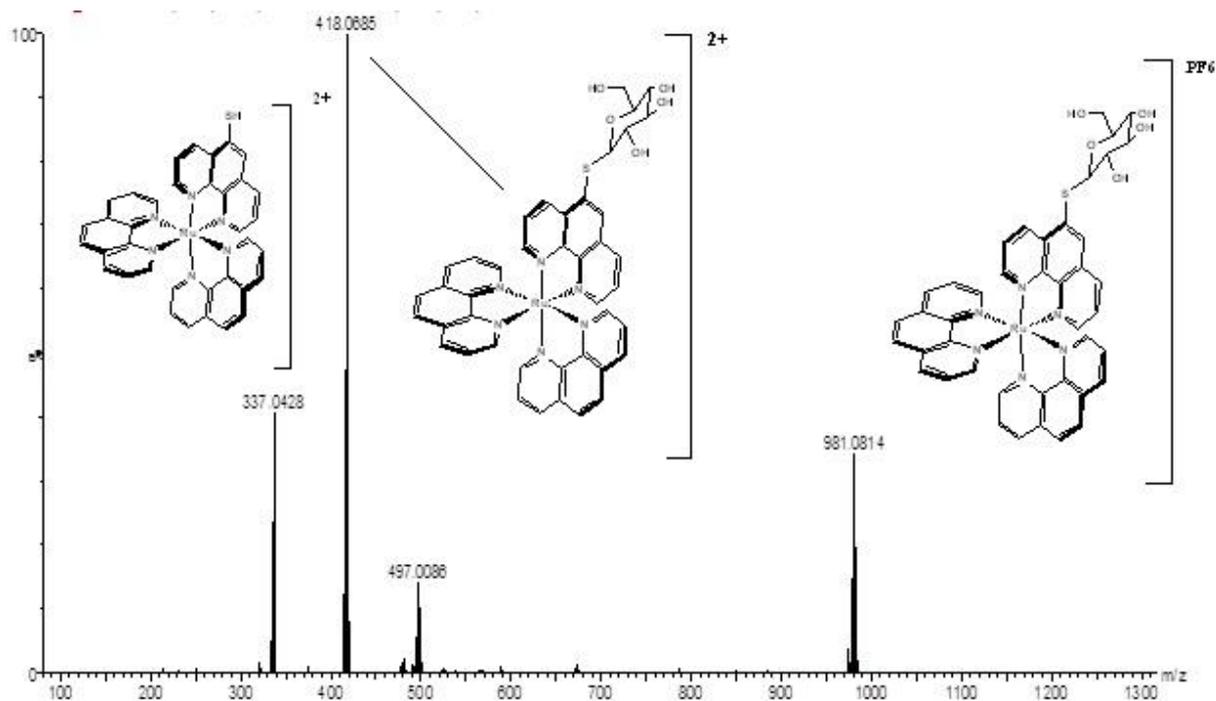


Figura 10: Espectro de massas complexo do complexo RuFenGlic.

A massa molar do complexo sintetizado (M) é 1126 g.mol^{-1} com fórmula molecular $\text{C}_{42}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_5\text{RuS}$. Observa-se a presença do íon molecular ($m/z = 981$; $[\text{M-PF}_6]^+$) com carga +1 pela ausência de um dos contra-íons. Também observa-se o pico base com carga +2 ($m/z = 418$; $[\text{M-2PF}_6]^{2+}$) atribuído ao complexo sem os dois contra-íons, conforme esperado. Observa-se também um sinal de carga +2 ($m/z = 337$, $[\text{M-2PF}_6\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{O}_5]^{2+}$), atribuído ao complexo após a perda da glicose, restando apenas o tiol como substituinte na fenantrolina.

Cada um destes íons foi submetido à técnica de íon parental ESI MS-MS (Apêndice, figuras A9 e A10), que analisa a fragmentação de cada íon separadamente. Os resultados indicam que a fragmentação de cada íon gera o próximo de menor massa, ou seja, os sinais são todos resultados da fragmentação do íon molecular.

O espectro de absorção no UV-Vis mostra (figura 11 A), novamente, duas bandas na região do UV em $\lambda = 235 \text{ nm}$ ($\epsilon = 40000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e $\lambda = 320 \text{ nm}$ ($\epsilon = 45000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) atribuídas às transições intraligante $\pi\text{-}\pi^*$ dos ligantes fenantrolinas (L-L) como observado no espectro do complexo precursor. Entretanto,

Capítulo 4 Resultados e Discussões

observa-se um grande deslocamento da banda MLCT para regiões de maior energia, de $\lambda = 550$ nm para $\lambda = 455$ nm (figura 11 B).

Este deslocamento está relacionado com a substituição dos ligantes cloretos pela fenantrolina derivatizada. As características σ -doador e π -receptor deste novo ligante fazem com que haja um desdobramento maior dos níveis de energia dos orbitais HOMO-LUMO, o que leva a uma transição mais energética. Observa-se também uma elevação considerável no valor do coeficiente de absorvidade molar desta banda, de 6500 para 10000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, que também está relacionada com a substituição dos ligantes^{77,139}.

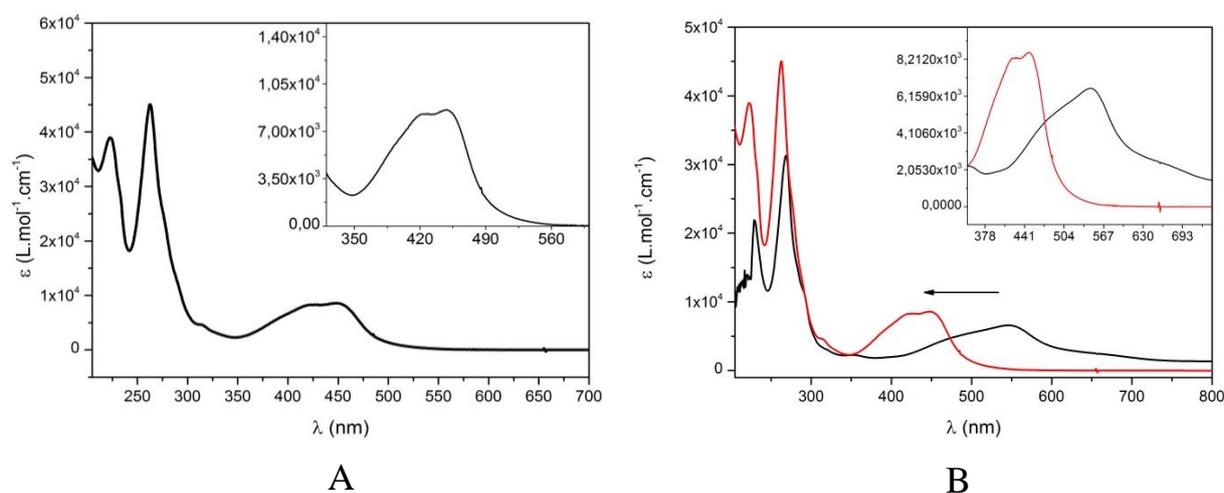


Figura 11: A) Espectro de UV-Vis do complexo RuFenGlic. Acetonitrila, 50 μM , 25°C. B) Comparação dos espectros de UV-Vis dos complexos RuFenGlic (vermelho) e $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{fen})_2]^{2+}$ (preto). Acetonitrila, 50 μM , 25°C.

Este complexo apresentou alta solubilidade em acetonitrila e, especialmente, em H_2O , tampão PBS e DMSO, o que é fundamental para sua utilização em sistemas biológicos. Entretanto, o complexo apresenta solubilidade razoável na maioria dos outros solventes. Suas características espectroscópicas variam pouco com a variação do solvente.

Ao contrário do complexo precursor, observa-se luminescência intensa deste complexo em solução. A substituição dos cloretos pela fenantrolina aproxima as energias dos estados $^1\text{S}^*$ e $^3\text{T}^*$ que elimina as transições do tipo LMCT, juntamente com o acoplamento spin-órbita característico dos compostos de Ru(II), favorecendo o

Capítulo 4 Resultados e Discussões

cruzamento intersistemas e promovendo o fenômeno da emissão do estado tripleto excitado, como podemos observar no diagrama de Jablonski (figura 12)^{74,139,140}.

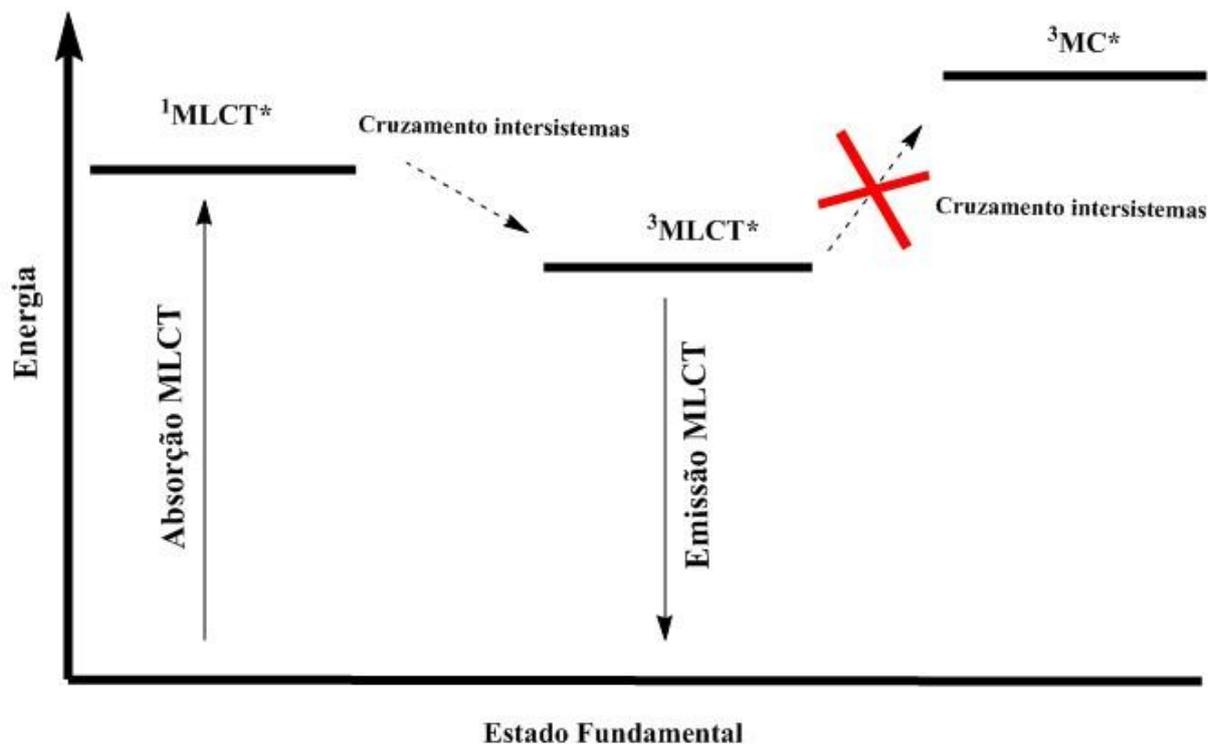


Figura 12: Diagrama de Jablonski demonstrando as transições eletrônicas que ocorrem no complexo RuFenGlic.

O máximo de emissão deste complexo (figura 13) fica em $\lambda = 615$ nm com um ombro em 600 nm tanto em acetonitrila quanto em tampão PBS (pH = 7,0) com rendimentos quânticos de emissão da ordem de $9,48 \times 10^{-2}$ em PBS (pH = 7,0) e $4,13 \times 10^{-2}$ em acetonitrila em soluções desaeradas, semelhantes ao seu análogo não substituído $[\text{Ru}(\text{fen})_3]^{2+}$, onde fen = 1,10 fenantrolina.

Observa-se que o tempo de vida de emissão segue um decaimento biexponencial, tanto em acetonitrila quanto em tampão PBS. Entretanto, os tempos de vida de emissão são consideravelmente diferentes. Em tampão observa-se um tempo e um tempo muito longo da ordem de 800 ns, enquanto em acetonitrila encontra-se um tempo de decaimento longo de 160 ns. Esta diferença pode ser atribuída às interações eletrostáticas entre os grupos OH presentes na molécula de glicose e os sais presentes na solução tampão. Estas interações limitam a mobilidade de rotação e

Capítulo 4 Resultados e Discussões

vibração da molécula, minimizando caminhos não radiativos de decaimento do estado $^3T^*$, enquanto em acetonitrila estas interações não ocorrem.

Os longos tempos de vida de emissão corroboram que a emissão é referente ao decaimento do estado tripleto, caracterizando a fosforescência.

A banda de emissão é larga, chegando ainda intensa até próximo de 720 nm. O complexo também apresenta um largo deslocamento de Stokes, da ordem de 5000 cm^{-1} . A banda de excitação é semelhante à banda MLCT obtida no espectro de absorção no UV-Vis, o que nos permite concluir que a emissão observada é resultado da excitação na região da MLCT. Observa-se também que a variação de pH não altera significativamente as propriedades espectroscópicas do complexo.

Estes dados são importantes pois a banda ainda intensa em 720 nm associada a estabilidade em ambientes de diferentes pH e ao alto tempo de vida de emissão permitem diferenciar a luminescência do complexo da luminescência de moléculas biológicas, assim como o largo deslocamento de Stokes impede os fenômenos de auto-supressão e reabsorção de luz, ou seja, o complexo apresenta características apreciáveis para sua utilização como sonda luminescente em sistemas biológicos.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

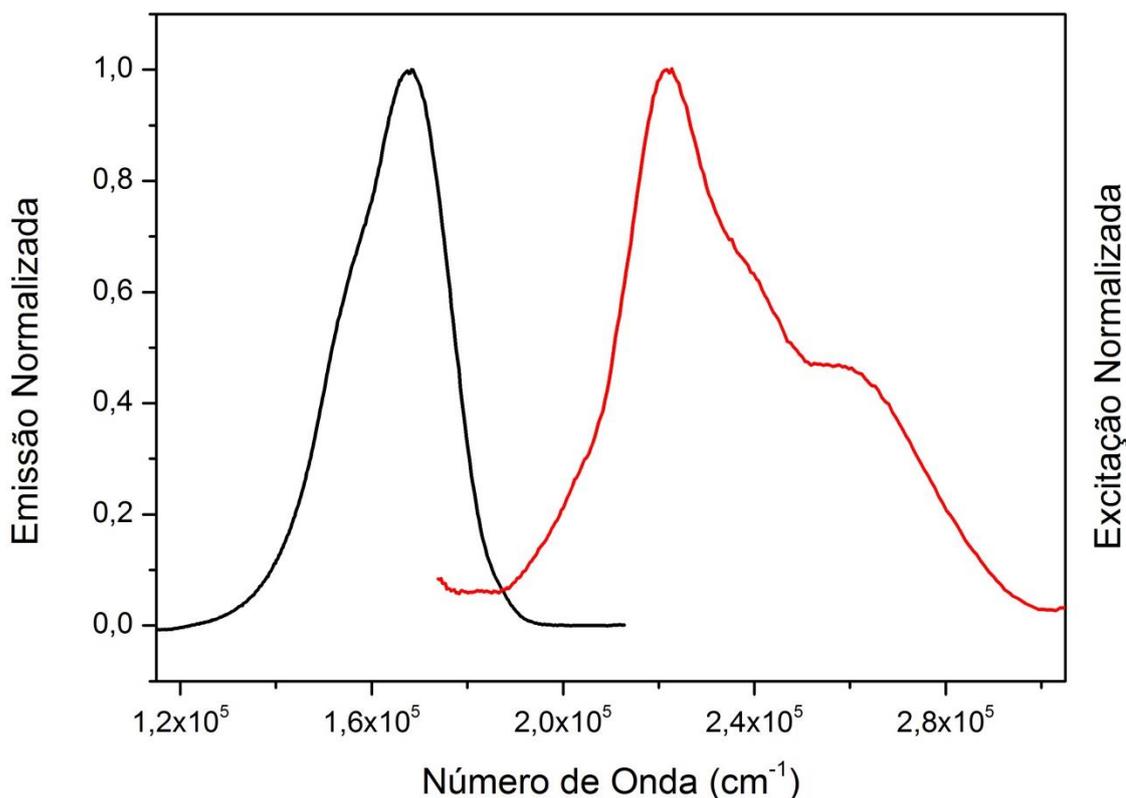


Figura 13: Espectros de emissão (vermelho) e excitação (preto) em acetonitrila.

Observamos que o complexo sintetizado neste trabalho apresenta características espectroscópicas idênticas ao seu análogo comercial $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (Apêndice, figuras A11 e A12). Podemos concluir, então, que a presença da molécula de glicose não altera significativamente as propriedades do complexo.

4.1.2 Complexo RuetPy

O complexo precursor, clorobpy, foi caracterizado por ^1H -RMN e espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis.

O espectro de ^1H -RMN (figura 14) mostra os sinais esperados de acordo com a literatura¹³⁷. Observa-se uma quebra de simetria, característica da complexação de dois ligantes bidentados na geometria *cis*.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

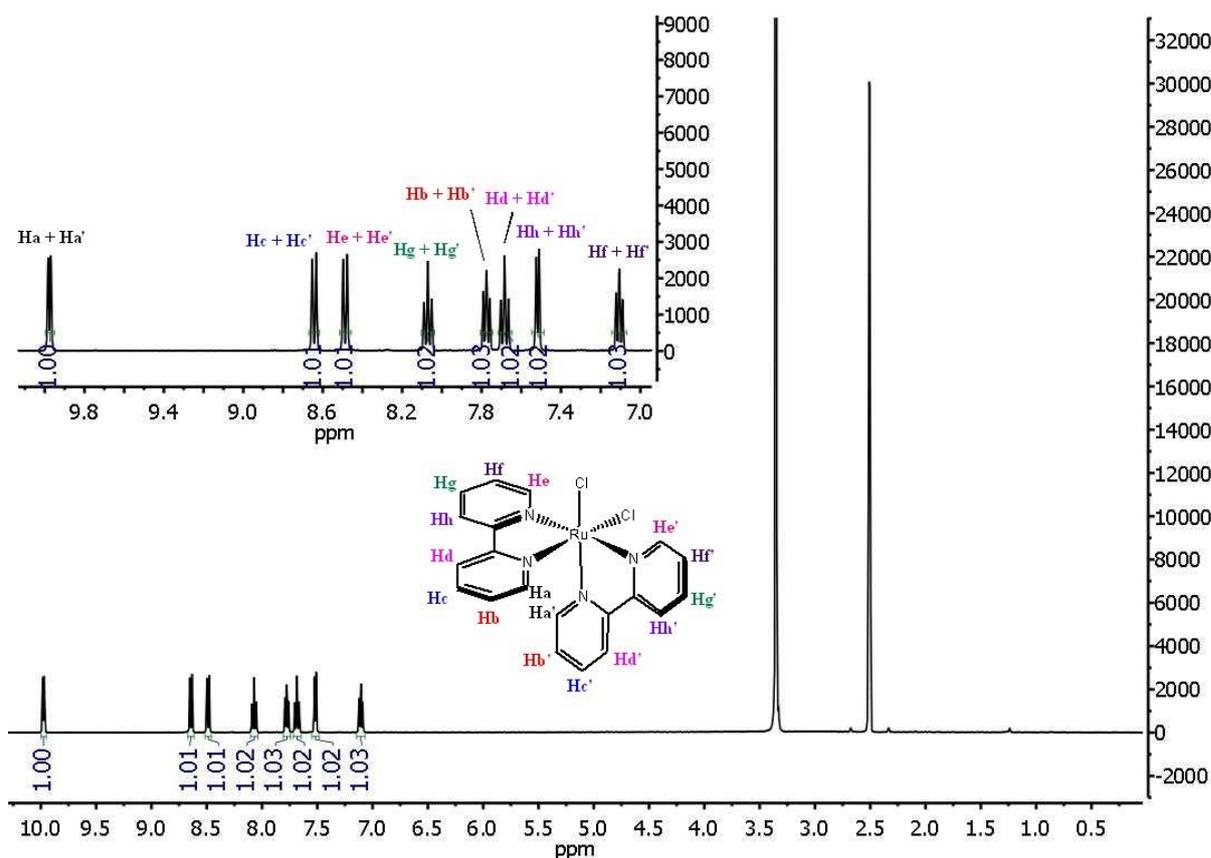


Figura 14: Espectro de RMN do complexo precursor Clorobpy. DMSO_d_6 , 400 MHz, 25°C.

Os sinais característicos, um dubleto em 10 ppm (d, $J = 6$ Hz, 1H) e outro em 8,64 ppm ($J = 8$ Hz, 1H) atribuídos aos hidrogênios nas posições 2 e 2' da bpy (Ha,Ha' e He/He', respectivamente). Observa-se também dois tripletos, um em 8,07 ppm (t, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, 1H) e um em 7,78 ppm (t, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 5,2$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios das posições 3,3' (Hb/Hb', Hf/Hf', respectivamente) e dois tripletos em 7,11 ppm (t, $J_1 = 7,1$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, 1H) e em 7,68 ppm (t, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 5,2$ Hz, 1H) referentes às posições 5,5' da bpy (Hd/Hd', Hh/Hh'). Observam-se também um dubleto em 7,52 ppm (d, $J = 5,2$ Hz, 1H) e outro em 8,59 (d, $J = 8$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios das posições 4,4' (Hc/Hc', Hg/Hg'). As integrações normalizadas mostram a proporção esperada de prótons por sinal e as multiplicidades confirmam a estrutura¹³⁷. As informações da atribuição foram sumarizadas na tabela 4.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Tabela 4: Atribuição dos principais sinais do espectro de ^1H -RMN do complexo precursor Clorobpy.

Posição	Atribuição no Espectro	δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	Integral
2	Ha, Ha'	9,98	d (8,0)	1H
2'	He, He'	8,49	d (8,0)	1H
3	Hb, Hb'	7,78	t (7,5; 5,0)	1H
3'	Hf, Hf'	7,11	t (7,0, 5,5)	1H
4	Hc, Hc'	8,64	d (8,0)	1H
4'	Hg, Hg'	8,07	t (7,5; 5,2)	1H
5	Hd, Hd'	7,68	t (7,5; 5,2)	1H
5'	Hh, Hh'	7,52	d (5,5)	1H

Assim como para o complexo clorofen, observa-se sinais bastante desblindados na região de aromáticos devido a presença dos ligantes cloretos que causam este fenômeno.

O espectro de absorção do UV-Vis (figura 15) ajuda a corroborar a formação do complexo intermediário. A atribuição é bastante similar ao precursor clorofen, porém com alguns detalhes diferentes.

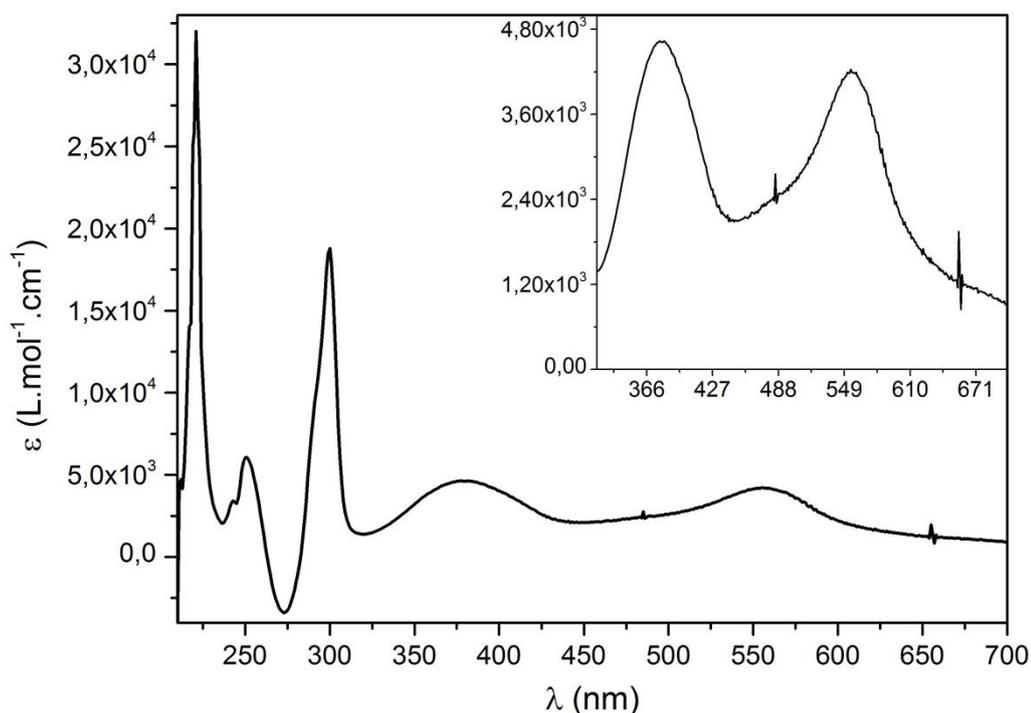


Figura 15: Espectro de UV-Vis do complexo RuEtPy. Acetonitrila, 25°C.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Encontram-se 3 bandas finas e intensas na região do UV em $\lambda = 220$ nm ($\epsilon = 32000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) e $\lambda = 250$ nm (6000 L.mol⁻¹.cm⁻¹) e $\lambda = 350$ nm ($\epsilon = 18000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹), atribuídas à transição π - π^* características dos ligantes aromáticos bpy (L-L)¹⁴¹.

Em $\lambda = 370$ nm pode-se observar uma banda bem definida ($\epsilon = 7000$ mol.L⁻¹.cm⁻¹). Esta banda é inexistente no complexo clorofen e é atribuída à transição $d_{\pi} - d_{\sigma}$, de caráter puramente metálica (MC)¹⁴¹. A observação desta banda é curiosa, pois em geral a transição MC é pouco intensa e de baixa energia, estando associada ao final da banda de absorção da MLCT. Entretanto, como a bpy é um ligante relativamente mais flexível que a phen e outros ligantes aromáticos bidentados. Esta flexibilidade traz consigo um maior grau de liberdade de movimentação e vibração, podendo quebrar a simetria do complexo, fazendo com que esta transição seja mais pronunciada e com energia relativamente maior^{78,86,141}.

Em $\lambda = 560$ nm ($\epsilon = 9000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) encontra-se a banda de transição MLCT característico de transições $d\pi_{\text{metal}} - \pi^*_{\text{ligante}}$. Esta banda se apresenta em regiões de menor energia no espectro, mais próxima do vermelho, devido à presença dos ligantes cloretos de característica π -doadores. Assim como o complexo clorofen o complexo clorobpy não apresenta emissão.

Tendo caracterizado o precursor, foi produzido, então, o complexo alvo RuEtPy, que foi caracterizado estruturalmente pelas técnicas de ¹H-RMN e ESI-MS.

Pelo espectro de ¹H-RMN (figura 16) pode-se observar que a quebra de simetria observada nos sinais do espectro do complexo precursor permanece. Observa-se também o surgimento de novos sinais na região de aromáticos e de alifáticos, o que confirma a complexação dos novos ligantes monodentados na geometria *cis*.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

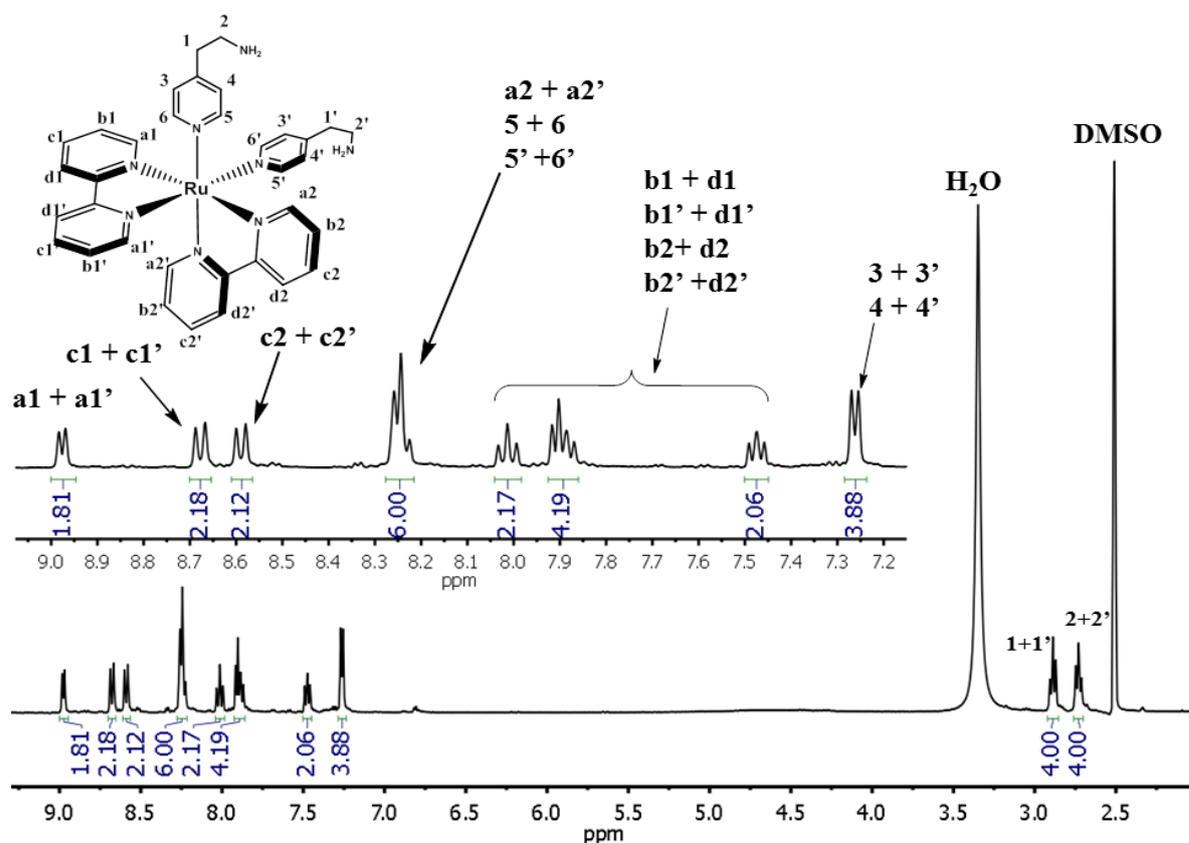


Figura 16: Espectro de ¹H-RMN do complexo RuEtPy. DMSO-d₆, 25°C, 400 MHz, ausência de luz¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Observa-se dois tripletos na região de alifáticos, um deles em 2,73 ppm (T, $J = 7,2$ Hz, 4H) e outro em 2,89 ppm (T, $J = 7,2$ Hz, 4H), referentes aos hidrogênios dos grupos etila dos ligantes 4-2 etil aminopiridina. Os sinais que apareciam desblindados no precursor agora aparecem em frequências mais baixas pela presença dos novos ligantes aromáticos de característica π receptor.

Encontramos em 8,9 ppm (8,9 ppm, d, $J = 8$ Hz, 2H) os hidrogênios referentes à posição 2 e 2' de uma das bpy (Ha₁ e Ha₁'), seguido por 2 dubletos em 8,65 ppm (8,65 ppm, d, $J = 8$ Hz, 2H) e 8,59 ppm (8,59 ppm, d, $J = 8$ Hz, 2H) associados aos hidrogênios das posições 2 e 2' da outra fenantrolina (Ha₂ e Ha₂') e aos hidrogênios da posição 4 e 4' de uma das fenantrolinas (Hc e Hc') de uma das fenantrolinas, respectivamente. Em seguida encontra-se um multipletto em 8,25 ppm (8,25 ppm, m, 6H) assinalados aos hidrogênios da posição 4 e 4' da segunda fenantrolina (Hc₂ e Hc₂') sobrepostos aos hidrogênios das posições *orto* dos ligantes EtPy (5, 6, 5' e 6')

Capítulo 4 Resultados e Discussões

respectivamente. Já em frequências mais altas, encontra-se uma série de sinais composta de 2 tripletos em 8 ppm (8 ppm, t, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, 2H) e em 7,48 ppm (7,48 ppm, t, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, 2H) com um multipletto no meio, em 7,9 ppm (7,9 ppm, m, 4H), num total de 8 prótons que correspondem aos hidrogênios das posições 3, 3', 5 e 5' das bipyridinas (b1, b2, d1, d2, b1', b2', d1' e d2'), seguidos de um dubleto em 7,27 ppm (7,27 ppm, d, $J = 4,5$ Hz, 4H) referentes à posição em meta nos ligantes EtPy.

Observa-se, que os sinais na região de aromáticos são bem definidos. Há pouca sobreposição dos sinais do ligante bpy e do ligante EtPy, o que torna a elucidação estrutural menos problemática com o auxílio das técnicas de correlação em 2D (apêndice, figuras A13 a A18).

Todas as informações da atribuição são encontradas na tabela 5.

Tabela 5: Atribuição dos principais sinais do espectro de $^1\text{H-RMN}$ do complexo RuEtPy.

Posição	Atribuição no Espectro	δ (ppm)	Multiplicidade, J (Hz)	Integral
2	a1, a1'	8,98	d (6,0)	2H
2'	a2, a2'	8,24	m	6H
orto – aminopiridina (EtPy)	5, 5', 6, 6'			
3	b1, b1'	8,01	t (8,0; 5,1)	2H
3'	b2, b2'	7,47	dd (7,5; 5,0)	2H
4	c1, c1'	8,68	d (8,1)	2H
4'	c2, c2'	8,59	d (8,1)	2H
5	d1, d1'	7,92 – 7,86	m	4H
5'	d2, d2'			
meta – aminopiridina (EtPy)	3, 3', 4, 4'	7,26	d (6,0)	4H
CH ₂ – Pir Etilamino (EtPy)	1, 1'	2,89	t (7,2)	4H
CH ₂ – N Etilamino (EtPy)	2, 2'	2,73	t (7,2)	4H

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Estes sinais estão com a multiplicidade esperada e a proporção das integrais indica a complexação de dois ligantes ao invés de apenas um de forma bidentada, utilizando a amina primária presente na cauda alifática como segundo ponto de coordenação. Este resultado era esperado, pois a geometria do ligante impediria a ligação da amina ao mesmo centro metálico.

A comparação com o espectro de ^1H -RMN do complexo precursor clorobpy (figura 17) mostra claramente a mudança de deslocamento químico para frequências mais baixas na região de aromáticos, de forma semelhante ao observado anteriormente para o complexo RuFenGlic e seu precursor (figura 9).

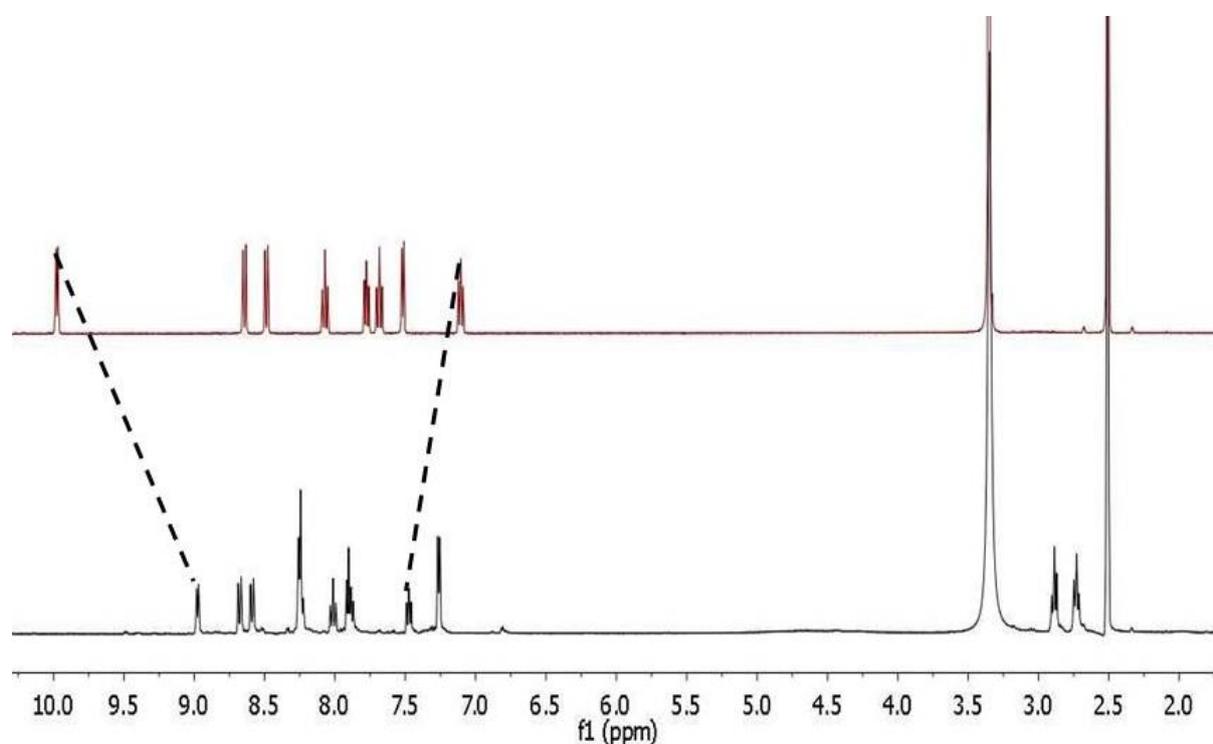


Figura 17: Comparação dos espectros de RMN do complexo precursor Clorobpy (marrom) e complexo RuEtPy (preto). DMSO_d6, 25°C, 400 MHz.

A confirmação da estrutura do complexo foi obtida pela técnica de espectrometria de massas ESI-MS, (figura 18).

Capítulo 4 Resultados e Discussões

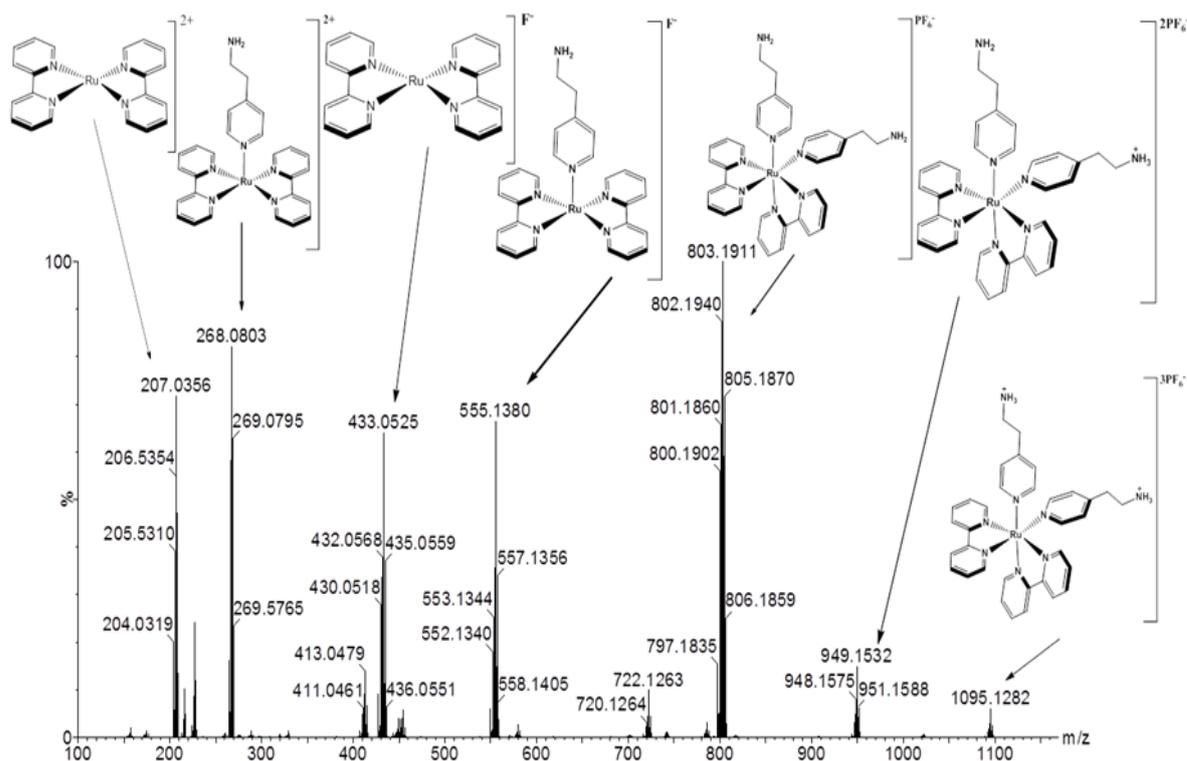


Figura 18: Espectro de massas completo do complexo RuEtPy¹⁰². Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

O complexo obtido apresenta fórmula molecular $C_{34}H_{36}N_8Ru$ e massa molar (M) $948 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Observa-se a presença de um sinal de massa elevada com carga +1 ($m/z = 1095 [M+2H^++PF_6]^+$). Este íon é correspondente a uma espécie formada no espectrômetro é um aduto que contém as duas aminopiridinas protonadas e um contra-íon PF_6 excedente. Esta observação não era esperada devido a instabilidade da estrutura e, por isso, a intensidade do sinal é muito baixa.

Encontra-se, também, o sinal em baixa concentração, do íon molecular com carga +1 ($m/z = 949 [M+1]^+$), indicando a protonação da estrutura, possivelmente em uma das aminas do ligante EtPy. Este resultado está de acordo com o esperado devido a presença de ácido fórmico residual no sistema de medição. A baixa concentração deste íon molecular indica que a estrutura se fragmenta facilmente.

Também encontra-se o sinal referente ao íon molecular com carga +1 após a eliminação de um contra-íon PF_6 ($m/z = 803, [M-PF_6]^+$), este já com alta intensidade,

Capítulo 4 Resultados e Discussões

demonstrando que esta estrutura do íon molecular é predominante em solução em relação aos íons anteriormente descritos.

Interessantemente e em contraste com o espectro de ESI-MS do complexo RuFenGlic, o espectro de massas do complexo RuEtPy apresenta uma quantidade muito maior de sinais que podem indicar ou a presença de impurezas e materiais que não reagiram no processo de síntese, ou que a estrutura é mais frágil e fragmenta-se facilmente.

Para elucidar as fragmentações, os picos mais representativos foram analisados pela técnica de íon parental ESI MS-MS (Apêndice, figuras A19 e A20). Os resultados indicam que os íons de massa maior levam à formação dos íons de massa menor, ou seja, as espécies obtidas no espectro são fragmentações do íon molecular, não impurezas da reação.

Observa-se, também, que todos os picos levam à formação do íon de $m/z = 207$, corresponde à estrutura $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$, ou seja, o precursor do complexo obtido. Curiosamente, o íon molecular com carga 2+ não é observado no espectro devido à fragmentação que ocorre na ligação monodentada Ru-EtPy, consideravelmente menos energética do que as ligações em ligantes bidentados. Este íon também não é encontrado nos experimentos de MS-MS. Outra curiosidade é que muitas estruturas encontradas contam com o fluoreto como contra-íon, em vez do PF_6 , indicando a fragmentação do contra-íon.

Com estes dados, podemos confirmar a obtenção da estrutura proposta alto grau de pureza e rendimento apreciável de 55%.

O espectro de absorção no UV-Vis do complexo (figura 19 A) mostra ainda as 2 bandas referentes às transições $\pi-\pi^*$ intraligante (L-L) em $\lambda = 245 \text{ nm}$ ($\epsilon = 55000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 45000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Observa-se também a banda referente a transição MC em $\lambda = 330 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e da banda MLCT com $\lambda = 460 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

É interessante apontar que tanto a banda atribuída a transição centrada no metal (MC) como a banda MLCT sofrem um deslocamento para o azul (figura 19 B), ou

Capítulo 4 Resultados e Discussões

seja, para regiões de maior energia. Assim como já descrito anteriormente, este deslocamento na banda de MLCT está relacionado à substituição de ligantes cloretos, σ e π doadores, para dois novos ligantes aminopiridínicos que são σ e π receptores, o que leva a um aumento no gap de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, causando o mesmo efeito na banda MC, uma vez que os orbitais alterados tem características metálicas.

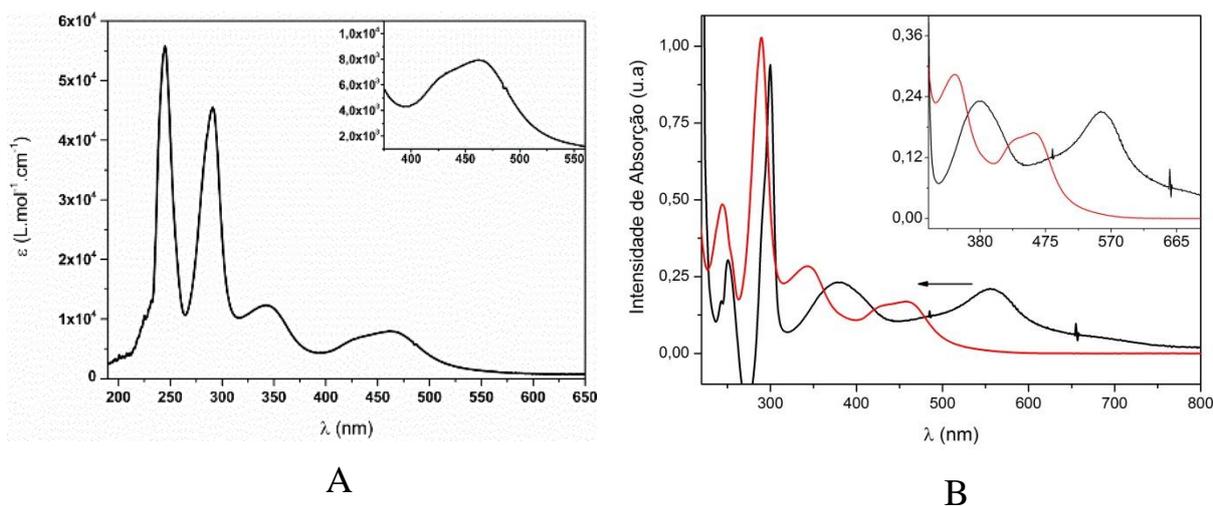


Figura 19: A) Espectro de UV-Vis do complexo RuEtPy. 50 M, 25°C¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022). B) Comparação entre os espectros de UV-Vis do complexo RuEtPy (vermelho) e o precursor Clorobpy (preto). Acetonitrila, 50 μ M, 25°C.

Diferentemente do complexo RuFenGlic, o complexo RuEtPy apresenta emissão de baixa intensidade (figura 20) quando excitado no comprimento de onda de máxima absorção da MLCT ($\lambda = 460$ nm). Tanto em acetonitrila quanto em tampão PBS (pH = 7,4), apresenta uma banda larga com máximo em $\lambda = 660$ nm que se expande até próximo de $\lambda = 750$ nm, com um ombro em $\lambda = 610$ nm. As características da banda de emissão não também não sofrem alterações significativas com a alteração do solvente. O complexo apresenta menor solubilidade em sistemas aquosos, o que é justificado pela maior lipofilicidade conferida à estrutura pelos grupos etila presentes nos ligantes piridínicos. Entretanto, soluções da ordem de 200 μ M são facilmente obtidas, o que permite sua utilização em sistemas biológicos.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

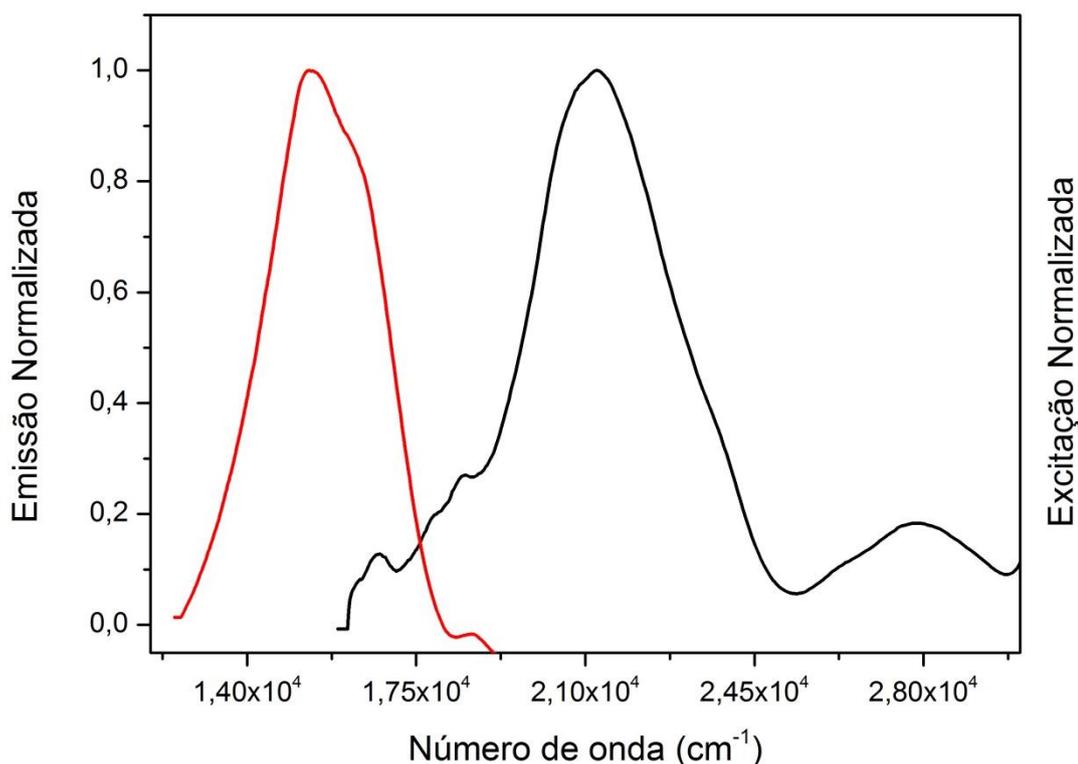


Figura 20: Espectros de emissão (vermelho) e excitação (preto) do complexo RuEtPy em acetonitrila.

Em comparação ao complexo RuFenGlic, esta banda ocorre em um comprimento de onda ainda mais deslocado para o vermelho, resultado da maior mobilidade dos ligantes menos rígidos que compõem a estrutura. A menor intensidade da emissão é corroborada pelos valores baixos de rendimento quântico de emissão ($2,01 \times 10^{-3}$ em acetonitrila e $6,46 \times 10^{-4}$ em tampão PBS (pH = 7)). Entretanto, continua sendo uma banda característica da emissão de estados tripletos excitados, comumente atingidos nos complexos de Ru(II) diimida.

A banda obtida no espectro de excitação (figura 20) é semelhante à banda de MLCT obtida no espectro de absorção no UV-Vis, o que indica que a emissão do complexo é relativa à absorção da MLCT e não por outra banda interna.

A baixa intensidade da emissão deste complexo pode ser explicada justamente pela sua estrutura mais flexível no que diz respeito ao ligante bipyridina se comparada com a rigidez imposta pela fenantrolina. Soma-se a isto o fato de que as aminopiridinas são ligantes monodentados, cujas ligações ao centro metálico tem

Capítulo 4 Resultados e Discussões

liberdade de rotação. Podemos incluir também os grupos etilamino na posição 4 do anel piridínico que é totalmente livre para se mover.

Todos estes fatores citados levam à um considerável aumento dos graus de liberdade de movimento desta estrutura que, quando excitada pelo feixe de luz, tem uma série de caminhos para liberar a energia de excitação por vias térmicas, o que diminui a população do estado $^3\text{MLCT}^*$ responsável pela emissão de luz. Outro fator é que neste sistema os orbitais $^3\text{MLCT}^*$ e $^3\text{MC}^*$ estão mais próximos em energia e a população deste último leva a fotodissociação do ligante monodentado quando em solventes coordenantes como acetonitrila e H_2O , resultando em ainda outro caminho para desativação do estado $^3\text{MLCT}^*$, conforme demonstrado no diagrama de Jablonski (figura 21).

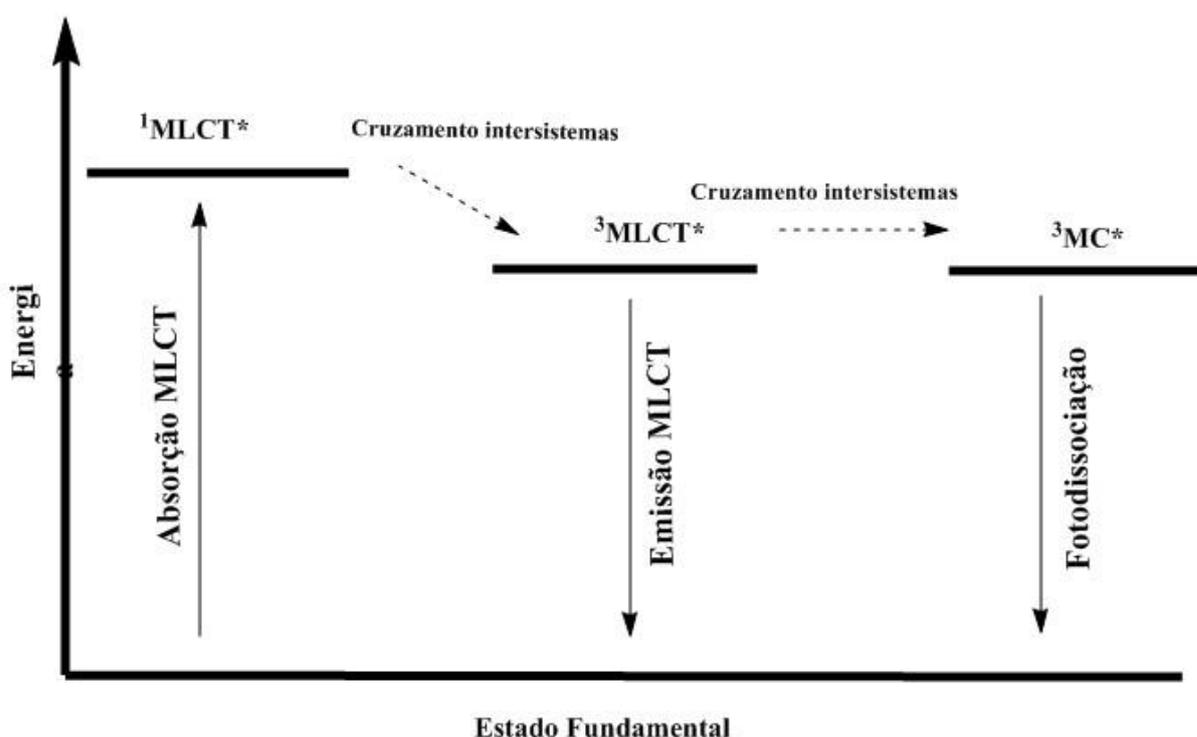


Figura 21: Diagrama de Jablonski demonstrando as transições eletrônicas que ocorrem no complexo RuEtPy.

O tempo de vida de emissão deste complexo segue um decaimento triexponencial, com dois tempos de emissão curtos de 7,6 e 1,9 ns e um tempo de vida longo da ordem de 102 ns em acetonitrila. Já em tampão o complexo continua

Capítulo 4 Resultados e Discussões

apresentando um decaimento triexponencial, com um tempo longo de 118 ns e dois tempos curtos de 18,3 e 3,17 ns.

Os tempos de vida são evidência da luminescência proveniente do estado $^3\text{MLCT}^*$, porém são mais baixos que os obtidos para o complexo RuFenGlic, o que pode ser explicado pelos vários caminhos de desativação não radiativa do estado $^3\text{MLCT}^*$.

4.2 Comportamento Fotoquímico

4.2.1 Complexo RuFenGlic

A maioria dos compostos de Ru(II) com ligantes piridínicos monodentados apresentam o fenômeno de fotodissociação, no qual ocorre substituição de um ligante piridínico por uma molécula de solvente coordenante, como acetonitrila, DMSO, H₂O, após irradiação de uma solução do complexo por um feixe de luz monocromática com comprimento de onda conhecido por um certo tempo em atmosfera inerte, neste caso, de N₂.

Quando ocorre a fotodissociação, há uma alteração na esfera de coordenação primária do complexo devido a substituição do ligante. Esta alteração é acompanhada por uma consequente alteração na banda MLCT de absorção no UV-Vis do complexo, sendo deslocada para a região de absorção do novo complexo formado. Ainda, pode-se observar a supressão da banda de emissão do complexo, haja vista que o complexo formado como produto de fotodissociação nestes solventes não emite luz.

Para estudar este comportamento, foram conduzidos experimentos de fotodissociação em tempo real. Para isto, foi preparada uma solução do complexo de concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em acetonitrila (ACN). Esta solução foi degaseada com fluxo contínuo de N₂ por aproximadamente 5 minutos e irradiada por períodos cronometrados variando de 1 segundo a 5 minutos. O comprimento de onda de irradiação foi de 450 nm, que é próximo ao máximo de absorção MLCT do complexo ($\lambda_{\text{máx}} = 455\text{nm}$) Após cada período de tempo de irradiação, as soluções foram

Capítulo 4 Resultados e Discussões

analisadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis e por espectroscopia de fluorescência. O tempo total de Irradiação foi de aproximadamente 3 horas.

Observa-se que, o complexo não apresenta alterações em suas características fotofísicas após a irradiação da solução, ou seja, as bandas de absorção e emissão não se alteram, o que permite inferir que a estrutura do complexo permanece inalterada após irradiação (figura 22 A e B).

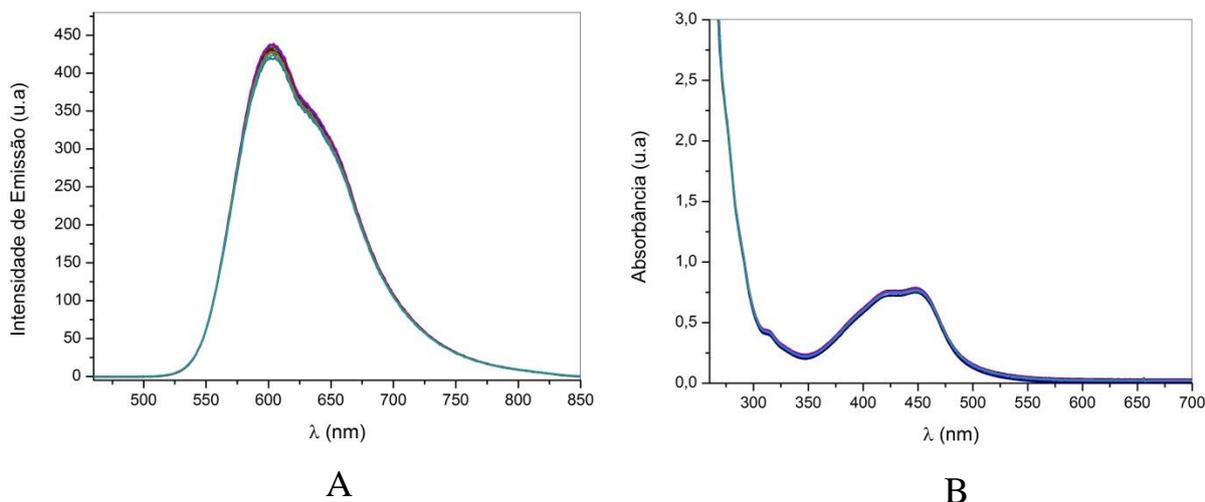


Figura 22: A) Espectros de Emissão do complexo RuFenGlic após irradiações sequenciais com feixe de luz de $\lambda = 450$ nm por um tempo total de 2 horas. B) Espectros de UV-Vis do complexo RuFenGlic após irradiações sequenciais com feixe de luz de $\lambda = 450$ nm por um tempo total de 2 horas. Acetonitrila, 25°C.

Esta observação pode ser explicada se levarmos em conta que todos os ligantes deste complexo são bidentados, formando um quelato, consideravelmente estável. A fotodissociação implica na quebra da ligação coordenada metal-ligante. No caso deste complexo, seria necessária energia suficiente para quebrar as 2 ligações coordenadas simultaneamente no mesmo ligante, que é um processo bem mais difícil e menos provável do ponto de vista energético do que em ligações simples de ligantes monodentados¹⁴².

Outro ponto é que a fotodissociação ocorre pela população de um estado tripleto excitado centrado no metal ($^3MC^*$). Este estado não está acessível energeticamente neste complexo, como demonstrado no diagrama de Jablonski (figura 12) devido ao efeito quelato que leva à considerável diminuição energética nos orbitais HOMO¹⁴².

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Uma vez que os experimentos de UV-Vis e emissão indicam que a esfera de coordenação do complexo não é alterada pela presença de luz, restava ainda confirmar que a irradiação não eliminaria o ligante glicosídico pela clivagem da ligação tioéter que mantem a molécula de glicose ligada à fenantrolina. Esta resposta foi obtida através de experimentos de irradiação acompanhada por ^1H -RMN (figura 23)

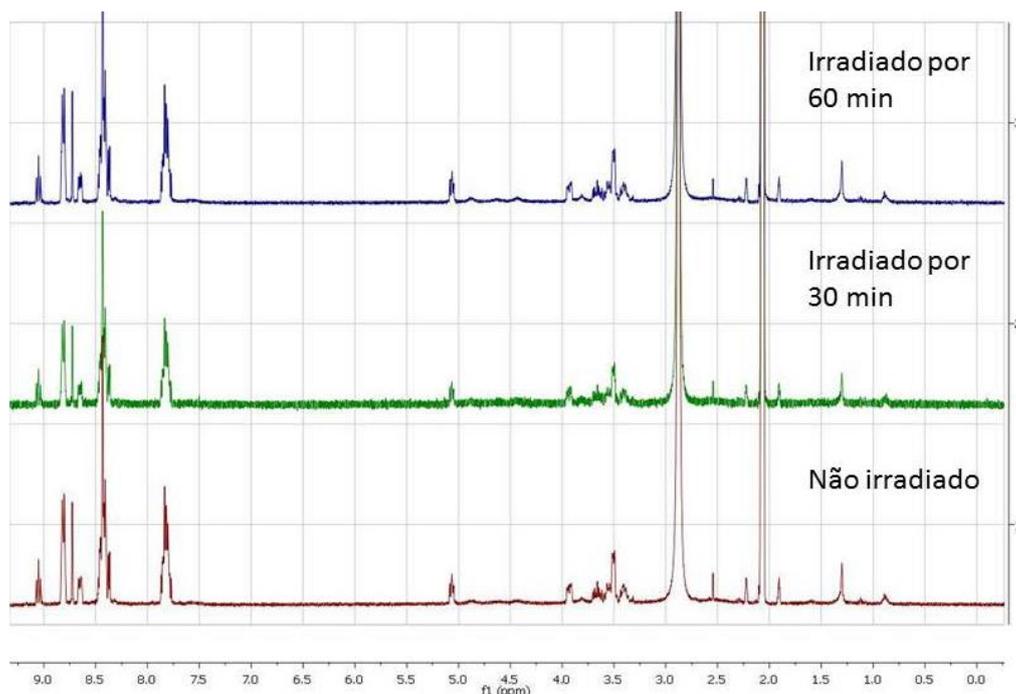


Figura 23: Espectros de ^1H -RMN do complexo RuFenGlic em função do tempo de irradiação com um feixe de luz de $\lambda = 450$ nm. Não irradiado (marrom), irradiado por 30 minutos (verde), irradiado por 60 minutos (azul). CD_3CN , 25°C . 400 MHz.

Observa-se que mesmo após a irradiação por 60 minutos o espectro de ^1H -RMN se mantém inalterado, confirmando que o complexo RuFenGlic se mantém intacto após a exposição. Este resultado é importante para os objetivos a longo prazo para aplicação deste complexo. Para ser uma boa sonda luminescente em sistemas biológicos, a estrutura precisa ser resistente à irradiação, pois este processo irá ocorrer inúmeras vezes já que a resposta emissiva esperada depende da exposição do complexo à luz.

Portanto, este complexo apresenta todos os atributos necessários para ser utilizado como sonda luminescente em sistemas biológicos: É estável no escuro,

Capítulo 4 Resultados e Discussões

resistente à exposição de luz e solúvel em sistemas aquosos tamponados, além de apresentar um deslocamento de Stokes consideravelmente alto que impede a auto-supressão e reabsorção de luz.

4.2.2 Complexo RuEtPy

O complexo RuEtPy apresenta dissociação fotoinduzida, comum a compostos com ligantes aminopiridínicos⁸⁶. As condições experimentais foram idênticas às utilizadas para o mesmo estudo com o complexo RuFenGlic, detalhado na seção 4.2.1.

Observa-se que, em acetonitrila, a irradiação altera a banda de absorção da MLCT, que é deslocada de $\lambda = 455$ nm para $\lambda = 420$ nm, (figura 24 A) se aproximando da região do UV com maiores energias enquanto o espectro de emissão apresenta supressão da banda de emissão da MLCT conforme o tempo de exposição à luz aumenta. (figura 24 B). Esta alteração indica que ligantes aminopiridínicos estão sendo dissociados do complexo original, sendo substituídos por moléculas de solvente.

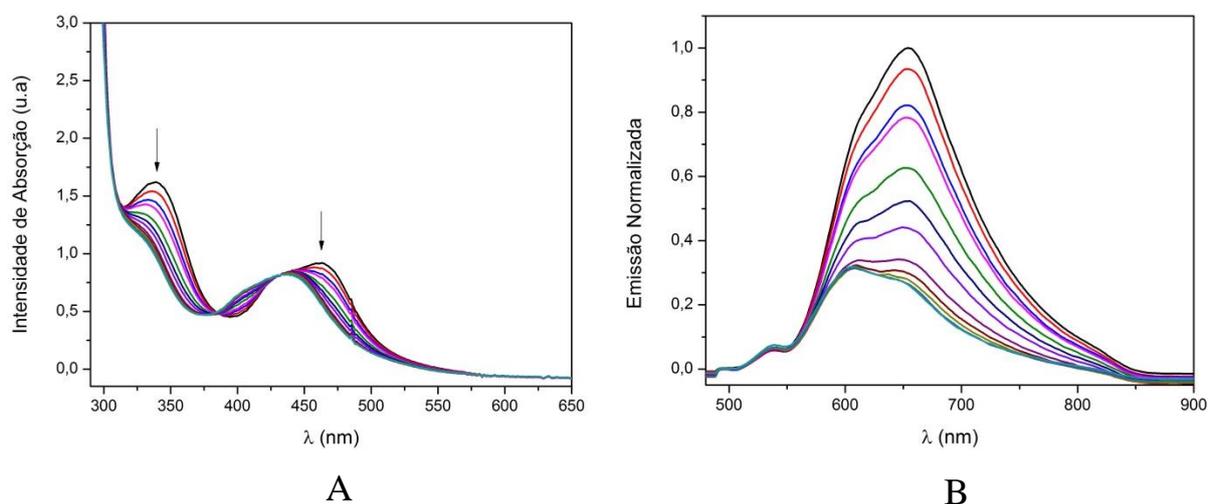


Figura 24: A) Espectros de absorção no UV-Vis do complexo RuEtPy em acetonitrila demonstrando a variação da banda MLCT após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 450 nm por um tempo total de 2 horas. B) Espectros de emissão do complexo RuEtPy em acetonitrila demonstrando supressão da emissão após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 450 nm por um tempo total de 2 horas.

Já em sistema tamponado (apêndice, figuras A21 a A26), o deslocamento observado é inverso, com a banda da MLCT indo para o vermelho, de $\lambda = 455$ nm

Capítulo 4 Resultados e Discussões

para $\lambda = 475$ nm, indicativo da formação do *aquo* complexo, ou seja, a substituição das aminopiridinas por moléculas de H₂O. Ainda, observa-se que as bandas de emissão também são suprimidas. Estes resultados se repetem em sistema tamponado utilizando-se ao menos 3 comprimentos de onda de irradiação diferentes compreendidos na banda de MLCT, inclusive em $\lambda = 520$ nm, no final da banda de absorção, já na região verde do espectro, indicando que a fotólise ocorre mesmo em comprimentos de onda de mais baixa energia⁸⁶.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura para as reações de fotodissociação de complexos polipiridínicos de Ru(II)^{143,144}. Estes dados abrem um novo caminho para utilização desta estrutura como fotosensibilizador para o combate ao câncer pela técnica de quimioterapia fotoativada (PACT, do inglês *PhotoActivatable ChemoTherapy*), que utiliza a luz para combater o câncer, porém se diferencia da terapia fotodinâmica pela atuação em ambientes hipóxicos^{84,145,146}.

Interessantemente, após 3 horas de irradiação, a banda de emissão estabiliza em uma determinada intensidade, porém nunca é totalmente suprimida nestas condições. Esta observação sugere que nem toda aminopiridina está sendo substituída. Como não há mais alterações nos espectros de UV-Vis e de emissão, as modificações a partir deste ponto de estabilização precisam de outra técnica para serem avaliadas.

Para isto, recorreremos à um ensaio de fotodissociação acompanhado por ¹H-RMN de uma solução do complexo RuEtPy (3 mM) em CD₃CN degaseada por um fluxo de N₂, permanecendo em atmosfera inerte. A solução foi irradiada por períodos determinados de tempo utilizando uma fonte de luz de $\lambda = 450$ nm e, após cada irradiação, uma medida era feita (figura 25).

Capítulo 4 Resultados e Discussões

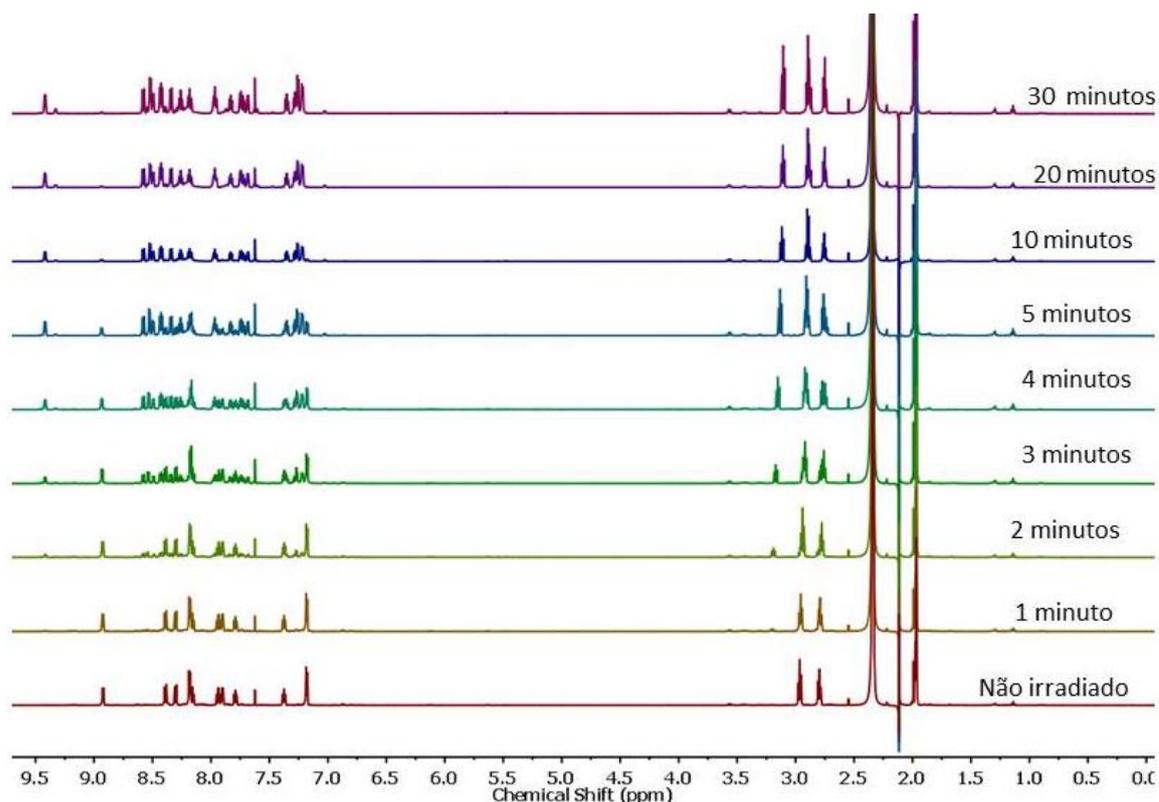


Figura 25: Espectros de ¹H-RMN em acompanhamento da fotólise do complexo RuEtPy com irradiações sequenciais de um feixe de luz de $\lambda = 450$ nm, demonstrando a substituição do ligante EtPy por moléculas de solvente. CD₃CN, atmosfera N₂, 25°C, 600 MHz.

Os resultados indicam que, a partir de 2 minutos de irradiação, os sinais da região de aromáticos começam a se desdobrarem. Isto é esperado pela formação de uma mistura de substâncias na solução, pois começamos a ter o complexo intacto juntamente com o complexo substituído e o ligante aminopiridina livre.

É importante salientar que os sinais dos tripletos referentes aos grupos etilamino na região de alifáticos também começam a se distorcer, confirmando que as aminopiridinas estão sofrendo o processo de dissociação.

Após 30 minutos de irradiação é atingida uma estabilidade. Observando o último espectro, podemos identificar que o sinal em 9,2 ppm referente a um próton referente às posições 2 e 2' da bipyridina é totalmente suprimido, dando lugar a um outro mais desblindado em 9,6 ppm com um segundo de menor intensidade em 9,5 ppm. A integração destes dois sinais somadas são referentes a 1H, indicando a desblindagem, conforme observado no complexo precursor clorobpy.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Na região de alifáticos, observa-se considerável deslocamento químico, com os sinais se tornando, agora, 2 tripletos totalmente definidos e um multipletto, que parece ser a sobreposição de outros dois tripletos. Este resultado é curioso, pois, se houvesse total dissociação das aminopiridinas, seria esperado que houvesse ainda apenas dois tripletos, referentes às duas aminopiridinas livres. Este resultado indica que, nestas condições, não há total dissociação das aminopiridinas.

Aprofundando a análise deste espectro, observamos que ao integrarmos estes sinais, obtemos uma relação de 1:2:1 prótons (figura 26). Esta relação permite a conclusão de que apenas uma das aminopiridinas foi substituída, ou seja, o multipletto gerado pela fotodissociação é a sobreposição de dois sinais tripletos referentes a um dos CH₂ do grupo etilamino de um ligante livre e um CH₂ do grupo etilamino de um ligante aminopiridínico coordenado.

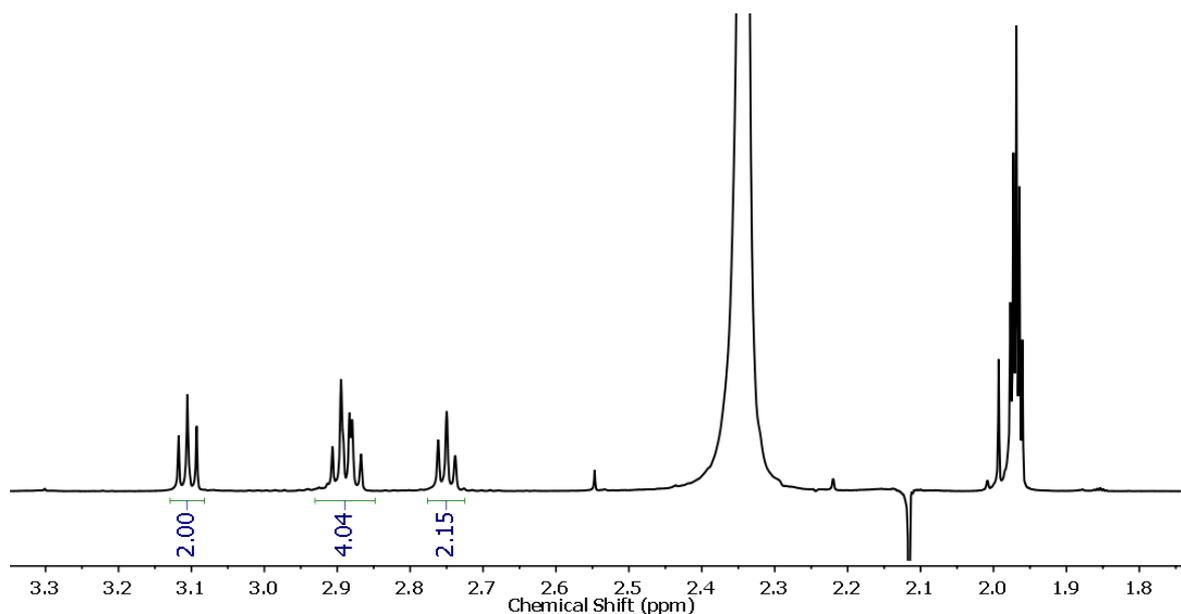


Figura 26: Espectro de ¹H-RMN do fotoproduto evidenciando a região alifática correspondente ao ligante EtPy, demonstrando a substituição de apenas um dos ligantes. CD₃CN, 400 MHz, 25°C.

Uma análise pela técnica 2D de difusão magnética (DOSY ¹H-RMN) da solução irradiada por 30 minutos mostra claramente duas difusões (figura 27). Uma delas indicativa do complexo fotoproduto (azul) e a outra atribuída aos sinais do ligante EtPy fotodissociado (vermelho). É interessante salientar que há sinais do ligante EtPy se difundindo juntamente com o complexo fotoproduto, corroborando

Capítulo 4 Resultados e Discussões

nossas conclusões de que apenas uma das aminopiridinas foi dissociada neste experimento.

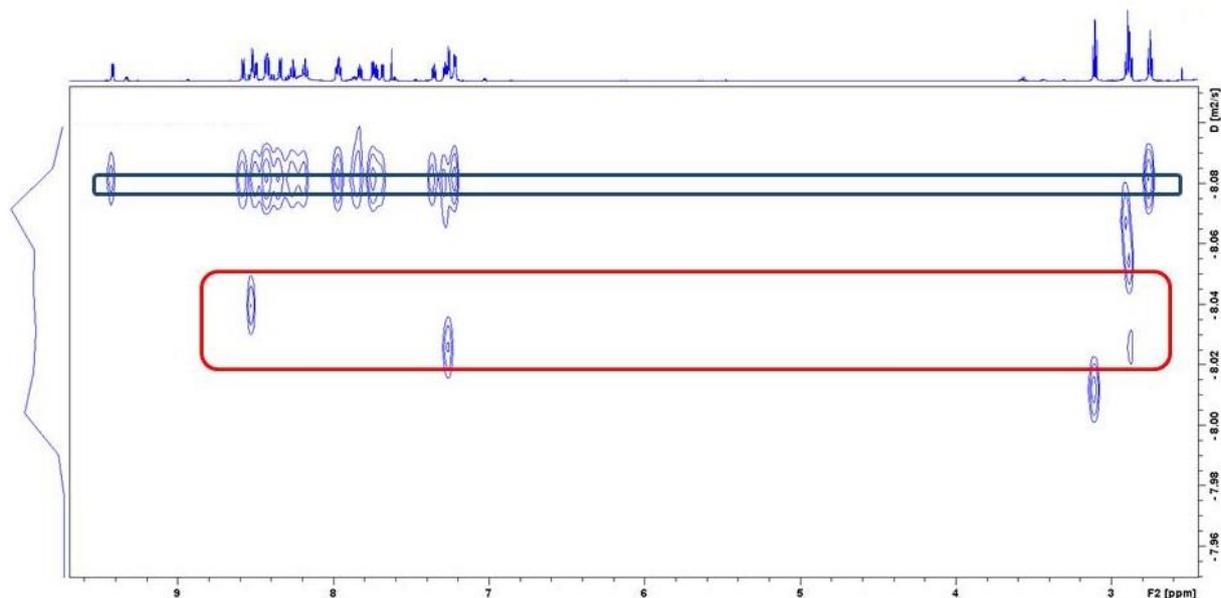


Figura 27: Espectro de DOSY 1H-RMN após a fotólise demonstrando apenas 2 difusões no campo magnético, a do fotoproduto (azul) e do ligante EtPy (vermelho) e indicando a substituição de apenas um dos ligantes EtPy. CD3CN, 600 MHz, 25°C.

A luz irradiada na região da absorção MLCT provoca a população de um estado eletrônico tripleto centrado no metal ($^3MC^*$), tanto por absorção de luz e transição entre os orbitais d do metal (transição eletrônica d-d), ou por desativação não radiativa do estado $^3MLCT^*$. Ou seja, o estado 3MC comporta os orbitais eg (σ) e t_{2g} (π) de um centro metálico em um complexo de simetria octaédrica. No caso do Ru(II) que apresenta 6 elétrons nos orbitais d e complexo de spin baixo no estado fundamental os elétrons ocupam os orbitais t_{2g} , de simetria (π), enquanto os orbitais eg(σ) são utilizados na coordenação dos ligantes^{139,142,144}.

Quando a irradiação de luz em um determinado comprimento de onda causa a população eletrônica do estado $^3MC^*$, o que ocorre é a promoção de um elétron para um orbital já completo. Este fenômeno implica em grande aumento da repulsão eletrônica devido a falha no princípio de exclusão de Pauli, pois haveria 3 elétrons em um mesmo orbital. Assim sendo, ocorre a liberação do ligante pela clivagem da ligação coordenada inicial¹⁴⁴.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Quando o elétron inicialmente excitado retorna ao seu orbital de origem, o centro metálico sequestra uma molécula do meio, em geral uma molécula de solvente, para ocupar a posição deixada livre pela dissociação do ligante inicial. Por isso observa-se as mudanças nos espectros de absorção no UV-Vis e no espectro de emissão quando o experimento é conduzido em solventes com alto potencial coordenante como ACN e H₂O, pois um novo composto está sendo formado, com características fotofísicas diferentes^{142,144}. Este processo foi demonstrado no diagrama de Jablonski (figura 22).

4.3 Experimento com as enzimas Colinesterases

4.3.1 Complexo RuFenGlic

Observa-se que o complexo apresenta IC₅₀ = 17 μM nas condições utilizadas contra eeAChE (figura 28). Em comparação com a drogas aprovadas para o tratamento da D.A. como donepezil e galantamina, que apresentam IC₅₀ na ordem de nanomolar, o valor é considerado alto, porém comparável ao da droga rivastigmina (11 μM)^{147,148}.

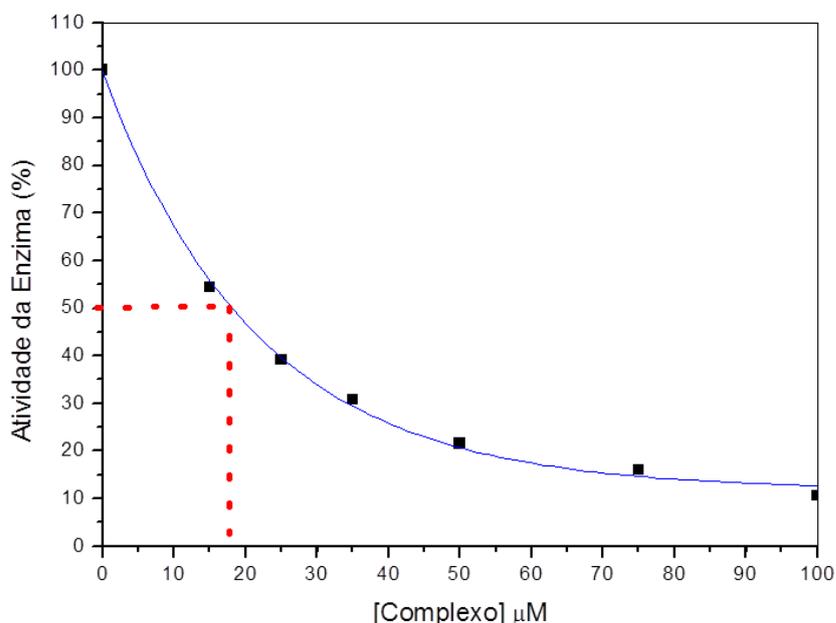


Figura 28: Curva de IC₅₀ de inibição da atividade enzimática da enzima eeAChE pelo complexo RuFenGlic.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Entretanto, vale salientar que as medidas de IC50 podem variar de acordo com o protocolo utilizado, pois ela é dependente tanto da concentração da enzima quanto da concentração do substrato utilizadas. Desta forma, observar puramente os dados de IC50 como atestado da eficácia da inibição enzimática pode levar a incorreções.

Assim sendo, buscamos por outras constantes cinéticas de inibição da enzima a fim de obtermos um conjunto de dados mais robusto. A figura 29 A apresenta as curvas de Michaelis-Mentem e a figura 29 B as linearizações de Lineweaver-Burke para obtenção gráfica das constantes cinéticas da reação enzimática e do mecanismo de inibição.

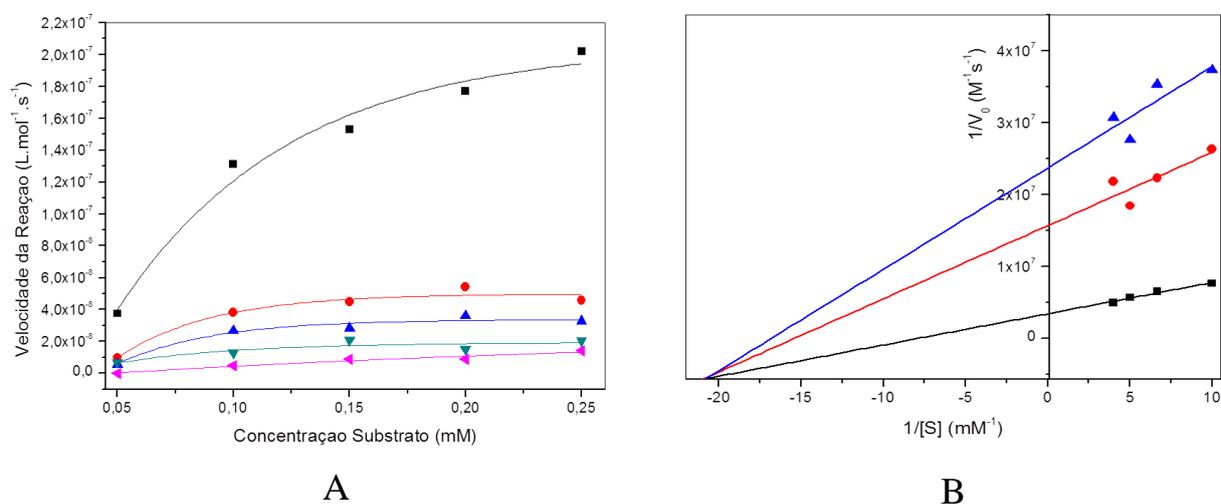


Figura 29: Curvas de Michaelis-Mentem da inibição da atividade da enzima eeAChE pelo complexo RuFenGlic. Cada linha representa uma [RuFenGlic] 0 μM (preto), 25 μM (vermelho), 50 μM (azul), 75 μM (verde), 100 μM (rosa). B) Linearização de Lineweaver-Burke referente às curvas Michaelis-Mentem, demonstrando o mecanismo de inibição não competitivo. Cada linha representa uma [RuFenGlic] 0 μM (preto), 25 μM (vermelho), 50 μM (azul).

As curvas cinéticas mostram claramente que a velocidade da reação diminui conforme a concentração de complexo aumenta, evidenciando a inibição da atividade enzimática como esperado.

Através da linearização de Lineweaver-Burke é possível desvendar o tipo de mecanismo de inibição exercido pelo complexo. Neste caso, nota-se que as retas se cruzam sobre um mesmo ponto no eixo x negativo, o que indica um mecanismo não competitivo (misto). Neste tipo de mecanismo de inibição, a velocidade da reação diminui com o aumento da concentração do inibidor, porém a constante cinética K_m é constante. A enzima se liga ao substrato, formando o complexo enzima-substrato.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Então o inibidor interage com esta estrutura, impedindo sua dissociação e, conseqüentemente, a ocorrência da reação.

K_m é a constante que mede a concentração de substrato necessária para que a reação enzimática atinja metade de sua velocidade máxima. Sua interpretação está ligada à afinidade da enzima pelo seu substrato. Quanto maior o valor de K_m , menor é a afinidade, e vice versa. Como neste mecanismo de inibição o valor de K_m é constante, o valor pode ser obtido graficamente pelo ponto onde as linhas se cruzam no eixo x negativo que corresponde a $-1/K_m$, neste caso, o ponto é -21mM^{-1} , o que gera um valor de $K_m = 47,6 \mu\text{M}$.

Os valores de K_m variam de enzima para enzima, estando em uma faixa entre $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ e $1 \times 10^{-7} \text{ M}$. O valor obtido neste experimento está na faixa baixa de micromolar (10^{-6} M), ou seja, a presença no complexo não diminui a afinidade da enzima pelo seu substrato. Comparando com o complexo análogo $[\text{Ru}(\text{fen})_3]^{2+}$, observa-se que houve uma duplicação no valor de IC_{50} com a presença da glicose¹⁰³, desta forma, podemos interpretar que o complexo é um inibidor apenas razoável da enzima eeAChE.

As análises de STD-¹H-RMN (figuras 30 A e B) podem ser divididas em prótons referentes ao substituinte glicosídico e referentes aos ligantes fenantrolina. Observa-se que a intensidade de transferência de saturação é maior para a região das fenantrolinas, do que para a glicose.

Isto indica que neste sistema em particular, a fenantrolina é a maior responsável pela inibição observada nos resultados cinéticos obtidos pelo método de Elmann. Devido a alta aromaticidade imposta pelos 3 ligantes fenantrolinas, esta interação deve ocorrer também de forma supramolecular, pela formação de empilhamento das nuvens π (π - π *stacking*) entre as fenantrolinas e as cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos^{101,102}. Desta forma, podemos inferir que o complexo RuFenGlic deve interagir com o sítio ativo periférico, composto de aminoácidos de cadeias laterais aromáticas¹⁰¹.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Entretanto, observa-se também que a tioglicose recebe uma grande quantidade de magnetização, o que permite afirmar que também ela está em contato próximo com a superfície da enzima, provavelmente pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do carboidrato e as cadeias laterais dos aminoácidos.

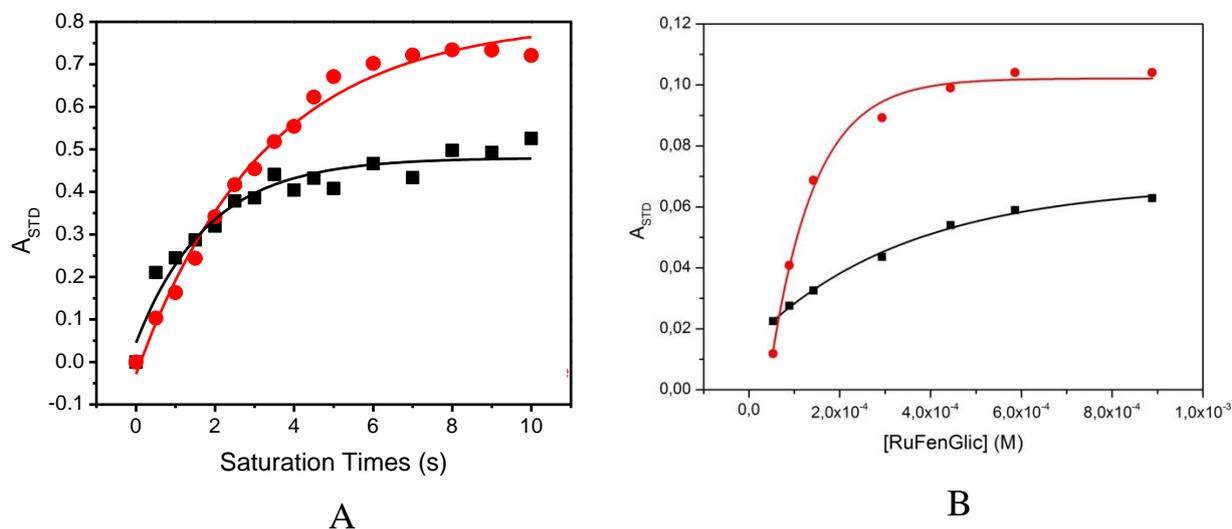


Figura 30: A) Mapa de epitopo demonstrando qual dos ligantes recebe maior quantidade de magnetização proveniente da enzima eeAChE. Glicose (preto), Fenantroline (vermelho). PBS deuterado (pH = 8,0), 600 MHz, 25°C. B) Experimentos titulométricos para estimativa do valor de K_d , demonstrando que a fenantroline (vermelho) interage mais fortemente com o sítio ativo periférico da enzima eeAChE do que a glicose (preto), PBS deuterado (pH = 8,0), 600 MHz, 25°C.

O mapa de epitopo (figura 30 A) obtido através de um experimento titulométrico variando a concentração de complexo nos dá o valor da constante de dissociação K_d (figura 30 B).

O valor obtido foi $k_d = 333 \mu\text{M}$, consideravelmente alto, maior que para a tacrina ($144 \mu\text{M}$), molécula conhecida pela alta inibição da hAChE¹⁴⁹. Esta constante expressa o equilíbrio de dissociação entre o complexo e a enzima. Quanto mais alto o valor de K_d , maior o indicativo de que o equilíbrio é deslocado para as moléculas livres em vez de associadas. Do ponto de vista do mecanismo de inibição não competitivo, este resultado está de acordo, já que o complexo de Ru(II) interage com o complexo enzima-substrato em vez de interagir diretamente com a enzima.

Entretanto, o valor alto de K_d indica que o complexo se dissocia rapidamente do sítio de ligação da enzima. Comparando com o valor da constante de afinidade K_m , identifica-se que a enzima tem maior preferência de interação com o substrato

Capítulo 4 Resultados e Discussões

do que com o inibidor, ou seja, é provável que quando ocorra a formação do complexo enzima-substrato o inibidor se desligue rapidamente do sítio da enzima, o que dificulta a ação inibitória e permite a clivagem do neurotransmissor.

Assim sendo, o valor de IC₅₀ alto associado às outras constantes cinéticas também elevadas inviabiliza a utilização deste complexo como um possível fármaco anticolinérgico. Vale ressaltar que moléculas aprovadas para utilização farmacológica, como o donepezil, apresentam o mesmo mecanismo de inibição demonstrado pelo complexo RuFenGlic, porém com IC₅₀ da ordem de 6 nM¹⁵⁰.

Como as variações de resultados entre as enzimas eeAChE e hAChE não costumam ser significativas, o complexo RuFenGlic não foi testado como inibidor da enzima humana.

4.3.2 Complexo RuEtPy

O complexo RuEtPy foi testado frente as enzimas colinesterases utilizando as mesmas técnicas empregadas para o complexo RuFenGlic, nas mesmas condições de enzima e concentração de substrato. Observam-se diferenças no mecanismo de inibição e valor das constantes cinéticas deste complexo em relação ao anterior.

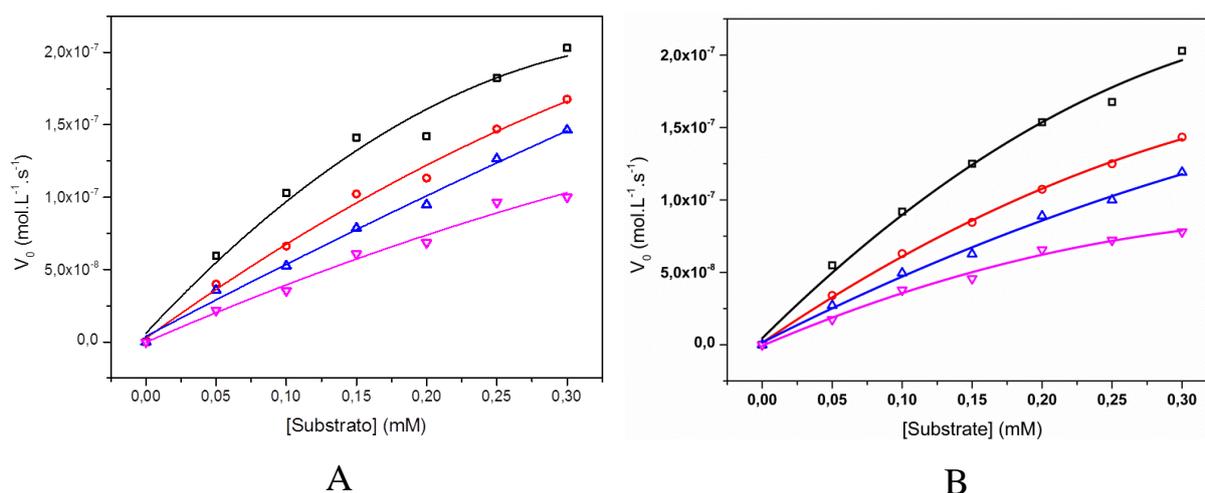


Figura 31: Curvas de Michaelis-Menten da inibição da atividade enzimática causada pelo complexo RuEtPy nas enzimas: A) eeAChE; B) hAChE. Cada linha representa uma [RuEtPy]: 0 μM (preto), 10 μM (vermelho), 20 μM (azul), 40 μM (rosa)¹⁰² Reproduzido com autorização da Elsevier (Copyright 2022).

Capítulo 4 Resultados e Discussões

As curvas de Michaelis-Menten (figura 31A eeAChE, 31B hAChE) indicam que ocorre a inibição pela diminuição da velocidade com o aumento da concentração do complexo. Porém, diferentemente do complexo RuFenGlic, as curvas tem inclinação elevada, o que indica que as velocidades máximas ($V_{0\text{máx}}$) demonstram a tendência de se igualarem se inúmeros pontos fossem estudados.

Esta observação implica que a cada curva apresenta um valor de K_m cada vez menor para cada análise e indica que o mecanismo de inibição apresentado por este complexo difere do mecanismo encontrado para complexo anterior.

As linearizações de Lineweaver-Burke (Figura 32A eeAChE, 32B hAChE) permitem, novamente, desvendar o mecanismo de inibição.

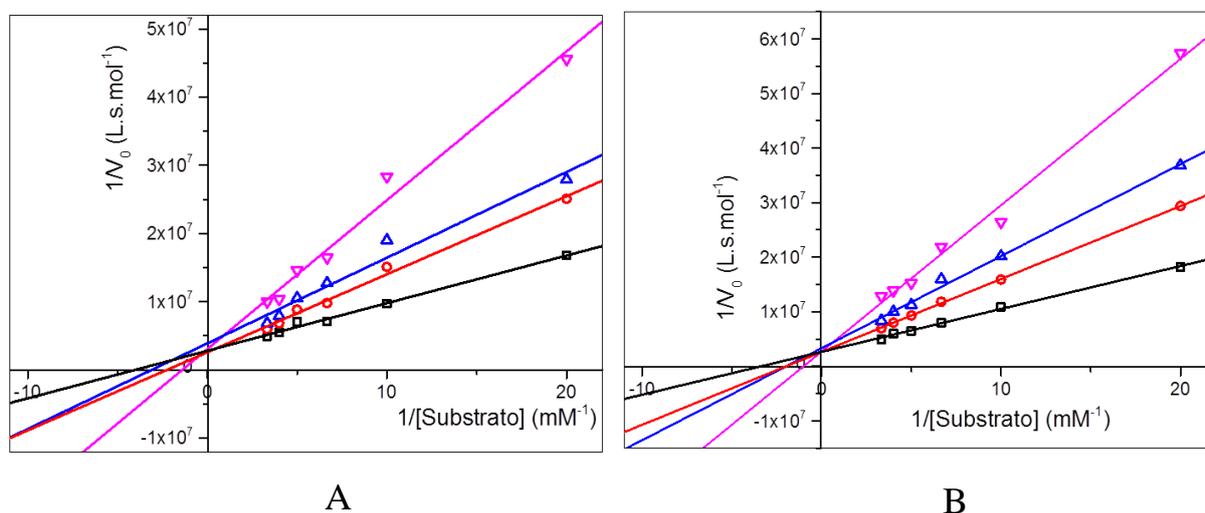


Figura 32: Linearizações de Lineweaver-Burke referentes às curvas de Michaelis-Menten demonstrando o mecanismo competitivo de inibição. A) eeAChE. B) hAChE. Cada linha representa uma $[RuEtPy]$: 0 μM (preto), 10 μM (vermelho), 20 μM (azul), 40 μM (rosa)¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

As linearizações corroboram a hipótese levantada pela observação das curvas cinéticas anteriores. As linhas se cruzam em um único ponto no eixo y, demonstrando que a velocidade máxima ($V_{0\text{máx}}$) é constante, enquanto cada linha cruza um ponto diferente no eixo x negativo, indicando um K_m diferente para cada experimento.

É interessante observar que os valores de K_m diminuem conforme aumenta a concentração de complexo, o que indica que a presença do complexo diminui a afinidade da enzima pelo seu substrato. Estas características são inerentes a um

Capítulo 4 Resultados e Discussões

mecanismo competitivo de inibição, onde o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio ativo na enzima¹⁵¹.

Os valores da constante intrínseca de inibição, K_i , também foram obtidos graficamente através as plotagens de linearização de Dixon (Figura 33 A eeAChE e 33 B hAChE). Observa-se que as retas se cruzam acima do eixo x, o que corrobora a conclusão do mecanismo competitivo de inibição.

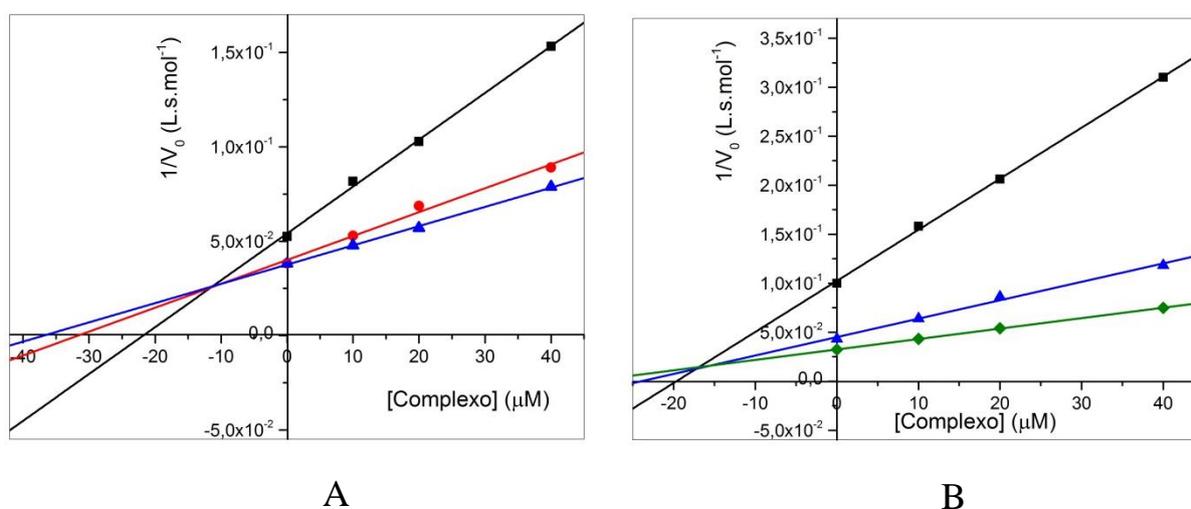


Figura 33: Linearizações de Dixon para obtenção do valor de K_i para a inibição das enzimas. A) eeAChE. B) hAChE. Cada linha representa uma [Substrato]. Em A) 0,1 mM (preto), 0,15 mM (vermelho), 0,2 mM (azul). Em B) 0,05 mM (preto), 0,15 mM (azul), 0,25 mM (verde)¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

As retas se cruzam no eixo x negativo em um ponto equivalente ao valor de $-K_i$. Observa-se que para eeAChE (figura 33 A) o valor obtido é de $K_i = 11 \mu\text{M}$, enquanto que para hAChE (figura 33 B), $K_i = 16,5 \mu\text{M}$. Os valores da ordem de micromolar baixo indicam que o complexo apresenta alta capacidade de inibir a atividade enzimática, sendo bons candidatos a aplicação.

Os valores de IC_{50} observados para este complexo são da ordem de $43 \mu\text{M}$ para a enzima eeAChE (Figura 34 A) e de $39 \mu\text{M}$ para a enzima hAChE (figura 34 B). Estes valores são considerados relativamente altos¹⁵¹. Entretanto, como discutido anteriormente para o complexo RuFenGlic, o valor de IC_{50} , sozinho, pode levar a incorreções na atribuição de potência e capacidade inibitória.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

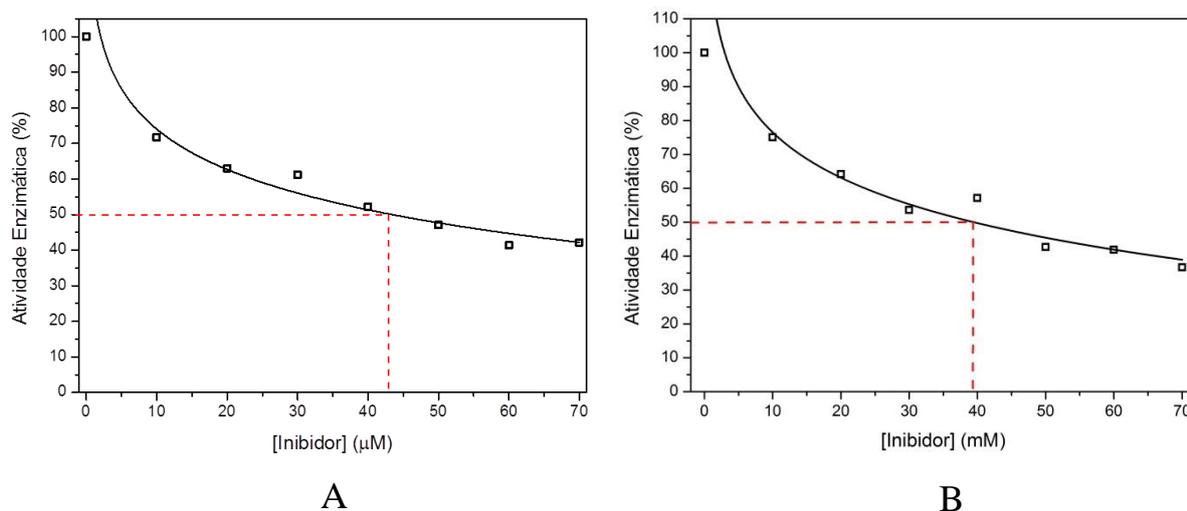


Figura 34: Curvas de IC50 da inibição das enzimática pelo complexo RuEtPy. A) eeAChE. B) hAChE¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Assim como para o composto anterior, outras constantes cinéticas foram consideradas para a conclusão sobre a atividade inibitória do complexo. Observa-se que, apesar de um valor relativamente alto de IC50, a constante inibitória baixa e o mecanismo competitivo obtidos pelo protocolo de Ellman permitem inferir que o complexo RuEtPy apresenta maior capacidade inibitória contra as enzimas colinesterases.

Este complexo também foi submetido a ensaios de STD-¹H-RMN. O primeiro experimento realizado (figura 35 A eeAChE e 35 B hAChE) teve o objetivo apenas de observar se a presença da enzima na solução leva à alguma alteração nos padrões dos sinais no espectro do complexo livre. É comum que a interação entre o complexo e a macromolécula cause alargamento ou deslocamento nos sinais onde a interação for mais relevante

Capítulo 4 Resultados e Discussões

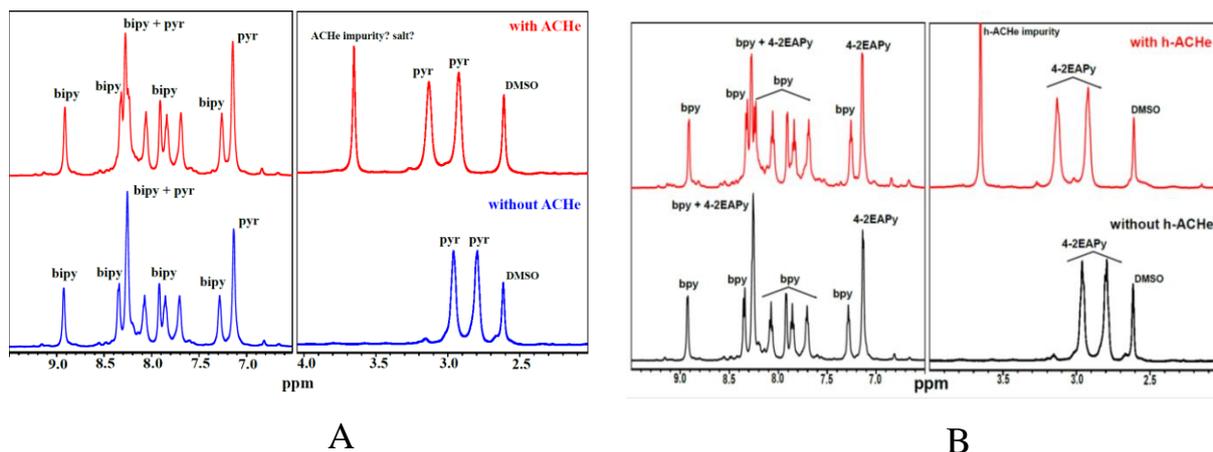


Figura 35: A) Espectros de ^1H -RMN demonstrando deslocamento nos sinais dos ligantes do complexo RuEtPy na presença (vermelho) e na ausência (preto) da enzima eeAChE. B) Espectros de ^1H -RMN demonstrando deslocamento nos sinais dos ligantes do complexo RuEtPy na presença (vermelho) e na ausência da enzima hAChE¹⁰². Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Observa-se que, tanto para o experimento com eeAChE quanto com hAChE, não ocorre alargamento dos sinais. Entretanto, em ambos os casos os sinais referentes ao grupo etilamino do ligante EtPy sofrem um considerável deslocamento para regiões de campo mais alto. Isto indica que este grupo está interagindo com a enzima. As interações mais prováveis são do tipo π - π stacking entre os aminoácidos com cadeias laterais aromáticas e os ligantes do complexo¹⁰¹. Entretanto, é importante observar que os grupos NH_2 no ligante EtPy são capazes de formarem ligações de hidrogênio e interações ácido-base com aminoácidos como o glutamato presente no sítio ativo da enzima¹⁰².

Entretanto, os deslocamentos nos sinais observados não são suficientes para determinar as relações de posição e as constantes de interação entre o complexo e a enzima. Desta forma, foram conduzidos experimentos de relaxometria para determinar qual dos ligantes apresenta interação mais relevante com a enzima.

Os experimentos de relaxometria mede os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2), parâmetros que estão diretamente ligados a mobilidade molecular no meio. Desta forma, espera-se que os ligantes que tenham interação mais pronunciada com a enzima tenham um tempo de relaxação mais longo¹⁴⁹. Os dados de relaxometria obtidos estão descritos na tabela x.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

Tabela 6: Dados de relaxometria mostrando os valores de tempo de relaxação dos ligantes do complexo RuEtPy na presença e na ausência das enzimas eeAChE e hAChE¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Ligante	hAChE			eeAChE		
	T ₁ (s) Presença	T ₁ (s) Ausência	ΔT_1 (s)	T ₁ (s) Presença	T ₁ (s) Ausência	ΔT_1
Bpy	15.3	5.3	10.0	15.63	5.3	10.33
EtPy	15.2	5.7	9.5	15.20	5.7	9.5

O experimento de relaxometria para o complexo RuEtPy apresenta valores próximos para as duas enzimas. Em ambos os casos há uma grande diferença de tempo de relaxação entre o complexo sozinho e na presença das enzimas. Este resultado indica que deve haver uma interação forte entre complexo e enzima e as variações nos tempos de relaxação não são apenas desvios ocasionados por alterações de viscosidade do meio, que pode ocorrer pela presença de macromoléculas.

Para uma avaliação mais acurada dos resultados, é importante que tenhamos informações sobre as constantes de ligação entre o ligante (complexo) e a macromolécula. Para isto, foram conduzidos experimentos de STD-¹H-NMR para a obtenção dos mapas de epitopo (figura 36 A eeAChE e 36 B hAChE). Através destes experimentos é possível identificar qual dos componentes do complexo está em maior contato com a enzima e, portanto, tem papel fundamental na inibição da atividade enzimática.

Capítulo 4 Resultados e Discussões

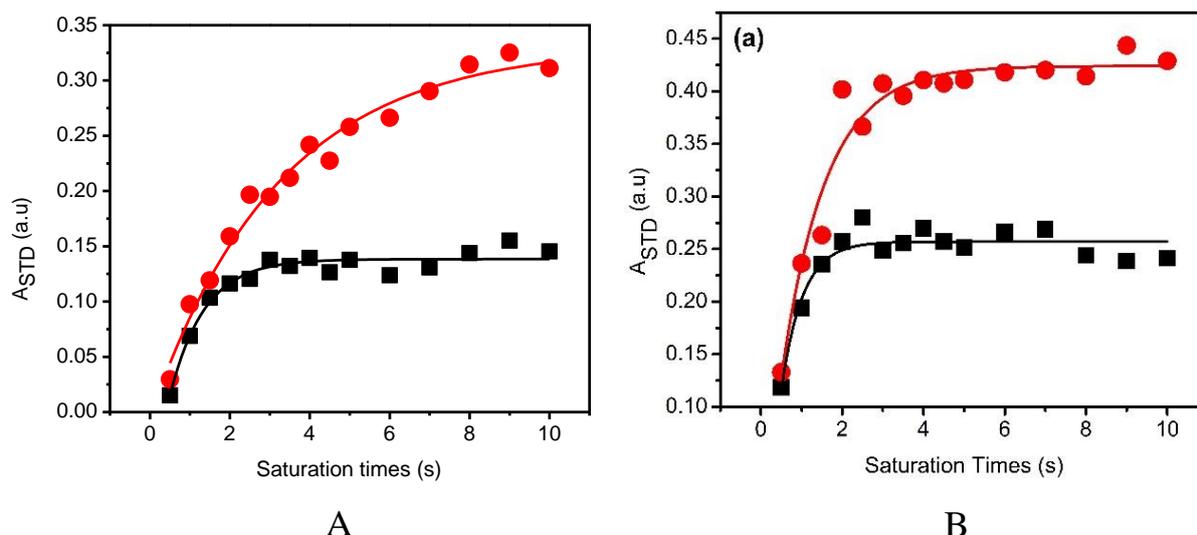


Figura 36: Mapas de epitopo demonstrando quais ligantes do complexo RuEtPy interagem mais fortemente com o sítio ativo da enzima. Bpy (preto), EtPy (vermelho). A) eeAChE. B) hAChE¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Observa-se que os mapas de epitopo são bastante similares nos sistemas contendo eeAChE (36 A) e hAChE (36 B). Em ambos os casos observa-se que o ligante EtPy (vermelho) apresenta maior intensidade de transferência de saturação, ou seja, o ligante piridínico recebe maior magnetização proveniente da enzima, o que permite inferir que este ligante esteja em contato mais próximo com a superfície do sítio ativo da enzima, desenvolvendo uma interação mais forte.

Este dado pode indicar a presença de ligações de hidrogênio ou interação ácido-base entre o grupo NH_2 e aminoácidos carregados como o glutamato presentes na tríade Ser-His-Glut inerente ao sítio ativo da AChE. À estas interações, soma-se a interação hidrofóbica π - π stacking do anel piridínico com aminoácidos de cadeia lateral aromática, evidenciada também pela magnetização dos ligantes bpy (preto).

Por outro lado, o ligante bpy apenas estabelece π - π stacking como interação, o que pode explicar a interação menos pronunciada com este ligante em relação ao ligante EtPy que indicam que a transferência de saturação entre bpy e enzima são de 73 e 64% respectivamente, enquanto em ambos os casos é de 100% para os ligantes EtPy¹⁰².

Finalmente, experimentos titulométricos por STD-¹H-RMN foram feitos para estimar a constante de dissociação, K_d , entre o complexo e as enzimas (figura 37 A

Capítulo 4 Resultados e Discussões

eeAChE e 37 B hAChE). Esta constante cinética indica a força da interação entre os dois componentes.

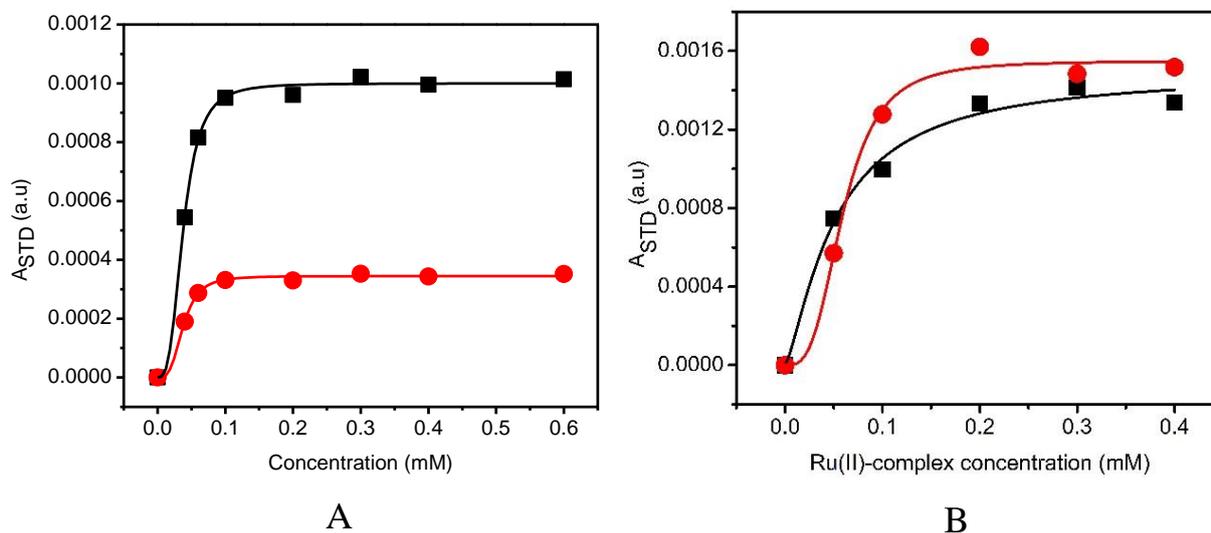


Figura 37: Experimentos titulométricos para obtenção do valor de K_d por STD-1H-RMN. Cada linha representa um ligante bpy (preto), EtPy (vermelho). A) eeAChE. B) hAChE¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Os dados obtidos foram tratados pela equação de Michaelis-Menten e os cálculos indicam que o complexo RuEtPy apresenta $K_d = 37 \mu\text{M}$ contra eeAChE e $K_d = 54 \mu\text{M}$ contra hAChE.

Interessantemente, o aumento da concentração de complexo na solução causa comportamentos diferentes para as enzimas. Nota-se que para a enzima eeAChE a interação com o ligante bpy é muito mais pronunciado, enquanto na enzima humana o aumento da concentração do complexo na solução faz com que a interação de ambos os ligantes tenha força similar, ou seja, a enzima eeAChE interage mais fortemente com o ligante bpy em altas concentrações, enquanto na enzima humana este efeito não ocorre.

Os valores de K_d do complexo são obtidos pela média dos valores de K_d de cada grupo de ligantes, por isso os K_d para eeAChE é mais baixo, enquanto na enzima humana o valor acaba sendo mais alto. É importante ressaltar que os valores de K_d obtidos para ambas as enzimas são inferiores ao valor obtido para a tacrina

Capítulo 4 Resultados e Discussões

(140 μM), indicando que o complexo é um potente inibidor das enzimas colinesterases¹⁴⁹.

Este resultado pode estar relacionado com diferenças na composição de aminoácidos na enzima eeAChE que leva à maior interação dos ligantes bpy com o sítio ativo, que indica que estes componentes devem formar um sistema enzima-complexo mais estável, o que implica em um menor valor de K_d , enquanto a composição da enzima humana leva a um comportamento diferente, com o complexo sendo menos ativo para sua inibição.

Os dados obtidos por STD-¹H-RMN estão alinhados com a nossa conclusão prévia de que o complexo tem maior capacidade inibitória contra a enzima eeAChE do que contra a enzima hAChE. Além disso, os dados indicam que o ligante EtPy apresenta um papel fundamental na atividade inibitória da enzima humana pois, como indicam os estudos por STD-¹H-RMN, este ligante estabelece uma interação mais forte com a enzima, o que pode estar relacionado com a similaridade estrutural do grupo etilamino com grupo etilamônio presente na estrutura da molécula de colina do substrato original, acetilcolina⁵⁵.

Também podemos identificar que, apesar de diferentes, os resultados entre as enzimas eeAChE e hAChE estão próximos em ordem de grandeza, conforme exposto anteriormente. O complexo RuEtPy foi testado em ambas as enzimas porque os resultados com a eeAChE foram promissores.

Capítulo 5 Conclusões

5. Conclusões

5.1 Complexo RuFenGlic

Este complexo de estrutura inédita foi sintetizado utilizando metodologias amplamente conhecidas da literatura pra obtenção de complexos de Ru(II), tendo sido obtido em apreciáveis 65% de rendimento. Sua caracterização estrutural foi obtida por espectrometria de massas ESI-MS e por técnicas de ^1H e ^{13}C - RMN, além de técnicas de acoplamento 2D, como COSY (H-H), HMBC e HSQC (C-H).

A caracterização fotofísica foi obtida utilizando técnicas espectroscópicas amplamente utilizadas como absorção no UV-Vis e luminescência. A presença da molécula de glicose não altera as características espectroscópicas do complexo, de acordo com a comparação feita utilizando o complexo análogo $[\text{Ru}(\text{fen})_3]^{2+}$.

O complexo apresenta absorção intensa na região do visível atribuída a uma transição MLCT, com máximo em $\lambda = 455$ nm. A irradiação de luz neste comprimento de onda gera emissão de luz identificada por uma banda no espectro de luminescência com máximo em $\lambda = 610$ nm. Estas características são pouco sensíveis à mudança de solvente. O complexo apresenta boa solubilidade em água e demais solventes polares e estabilidade em relação à variação de pH do sistema.

O rendimento quântico de emissão deste complexo é de $9,48 \times 10^{-2}$ em PBS (pH = 7,0) e $4,13 \times 10^{-2}$ em acetonitrila. Os valores indicam que a emissão é mais intensa no sistema tamponado, possivelmente pela interação dos sais e das moléculas de água com a molécula de glicose, formando uma rede que diminui os caminhos de desativação não radiativa. A emissão apresenta tempos de vida de 800 ns em tampão PBS (pH = 7,0) e 160 ns em acetonitrila. Este complexo não apresenta comportamento fotodissociativo quando exposto a luz.

Os experimentos de inibição da enzima eeAChE pelo método de Elmann indicaram que o complexo inibe a ação enzimática seguindo um mecanismo não competitivo, com $\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{M}$, $\text{K}_m = 47 \mu\text{M}$.

Os experimentos de STD- ^1H -RMN indicam que a molécula de glicose recebe a maior intensidade de magnetização, sendo este o grupo que interage mais fortemente

Capítulo 5 Conclusões

ligado à superfície da enzima, possivelmente pela formação de ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos aminoácidos. Experimentos titulométricos mostram uma constante de dissociação $K_d = 333 \mu\text{M}$, um valor consideravelmente alto. Este resultado somado aos resultados obtidos pelo método de Elmann indicam que este complexo tem um potencial entre médio e baixo de aplicação farmacológica, o que nos levou a descartar os testes na enzima humana.

Entretanto, todas as características espectroscópicas de solubilidade em soluções tampão fazem deste complexo um grande candidato a sonda luminescente em sistemas biológicos diversos.

5.2 Complexo RuEtPy

Este complexo, também de estrutura inédita, foi sintetizado e caracterizado seguindo protocolos semelhantes e as mesmas técnicas do complexo RuFenGlic, tendo sido obtido em apreciáveis 55% de rendimento.

A caracterização fotofísica foi obtida utilizando também as mesmas técnicas utilizadas para o complexo anterior. O complexo apresenta banda de absorção MLCT com máximo em $\lambda = 465 \text{ nm}$. A excitação neste comprimento de onda gera emissão com uma banda de máximo $\lambda = 655 \text{ nm}$.

Ao contrário do complexo RuFenGlic, a emissão deste complexo é pouco intensa, com rendimento quântico $2,01 \times 10^{-3}$ em acetonitrila e $6,46 \times 10^{-4}$ em tampão PBS (pH = 7). Os tempos de vida de emissão são 102 ns em tampão e 118 ns em acetonitrila. Estes resultados são explicados pela maior flexibilidade e liberdade de movimento desta estrutura geram caminhos não radiativos para o decaimento do estado excitado que levam a diminuição da intensidade de emissão.

O complexo RuEtPy apresenta fotodissociação quando exposta a luz de comprimentos de onda compreendidos em sua banda de absorção MLCT. Esta característica é comprovada pelo deslocamento da banda MLCT e pela supressão da emissão, tanto em acetonitrila quanto em tampão. Foram calculados os rendimentos

Capítulo 5 Conclusões

quânticos de fotodissociação em tampão para os comprimentos de onda $\lambda = 420$ nm (x), 450 nm (y) e 520 nm (z), que estão de acordo com a literatura.

A fotodissociação evidencia a população do estado $^3MC^*$, sendo este mais um caminho não radiativo de desativação do estado excitado $^3MLCT^*$ responsável pela baixa intensidade da emissão. A irradiação do complexo nas condições utilizadas neste trabalho apenas substitui uma das aminopiridinas, conforme demonstrado pelo acompanhamento por 1H -RMN.

Os estudos de inibição das enzimas colinesterases pelo método de Elmann mostram que o complexo inibe fortemente a ação das enzimas seguindo um mecanismo de inibição competitivo, com $IC_{50} = 43 \mu M$ para eeAChE e $39 \mu M$ para hAChE e K_i de $11 \mu M$ para eeAChE e $16,8$ para hAChE. Estes dados sugerem uma forte inibição, comparável à droga Rivastigmina, aprovada para uso no combate à D.A..

Os experimentos de STD- 1H -RMN indicam que os ligantes EtPy recebem a maior intensidade da magnetização proveniente da enzima, o que permite afirmar que eles estão mais fortemente ligados à superfície da enzima, possivelmente pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio ou interações ácido-base entre o ramo etilamino do ligante piridínico e os aminoácidos de cadeias laterais ácidas presentes no sítio ativo, como o glutamato.

Os ligantes bpy recebem menor intensidade de magnetização, indicando que elas interagem mais fracamente, provavelmente por interações hidrofóbicas do tipo empilhamento π (π - π *stacking*). Os experimentos titulométricos indicam constante de dissociação $K_d = 55 \mu M$, demonstrando o potencial de aplicação desta estrutura como anticolinérgico.

Capítulo 6 Perspectivas Futuras

6. Perspectivas Futuras

6.1 Complexo RuFenGlic

Apesar do baixo potencial para utilização como fármaco anticolinérgico, o complexo RuFenGlic apresenta características espectroscópicas interessantes que ainda não foram exploradas. O complexo apresenta grande potencial para utilização como sonda luminescente em sistemas de diagnóstico e marcação de mecanismos biológicos, como a agregação do peptídeo β -amilóide, também envolvido na etiologia da doença de Alzheimer.

A presença da glicose pode favorecer a internalização da estrutura pelas células através dos mecanismos de transporte ativo por receptores, neste caso, os da família GLUT1, específicos para glicose. O sucesso nesta frente pode levar ao cruzamento da barreira hematoencefálica sem a necessidade de rompê-la mecanicamente, o que pode abrir caminhos para o desenvolvimento de novos fármacos para o SNC com acesso ao cérebro aumentado pela derivatização com biomoléculas específicas e pela exploração de mecanismos de transporte celular.

6.2 Complexo RuEtPy

Os estudos com este complexo demonstraram um maior potencial de ação como anticolinérgico. Neste sentido, uma possibilidade é explorar a técnica de STD- ^1H -RMN e alterar a estrutura dos ligantes a fim de encontrar uma estrutura ideal com resultados ainda mais relevantes.

Este complexo apresenta uma estrutura mais lipofílica, principalmente pela presença das etilas no ligante EtPy. Esta característica pode favorecer a difusão simples do complexo pelas membranas celulares, sendo um caminho para vencer a barreira hematoencefálica a ser explorado.

Devido ao comportamento fotoquímico, o complexo RuEtPy tem potencial utilização como sistema de entrega controlada de fármacos através de irradiação de

Capítulo 6 Perspectivas Futuras

luz. Ainda, há a possibilidade de ser utilizado como fotossensibilizador no tratamento de câncer pela técnica de PACT.

Como a emissão não é totalmente suprimida na fotoquímica, este complexo também pode ser utilizado como sonda luminescente do peptídeo β -amilóide. Desta forma, este complexo tem potencial para ser um fármaco que atua simultaneamente em mais de uma frente no combate à doença de Alzheimer.

Capítulo 7 Referências

7. Referências

1. Hayne, D. J., Lim, S. & Donnelly, P. S. Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6701–6715 (2014).
2. Fu, H. *et al.* Highly Sensitive Near-Infrared Fluorophores for in Vivo Detection of Amyloid- β Plaques in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **58**, 6972–6983 (2015).
3. Vila-Real, H. *et al.* Peptidomimetic β -Secretase Inhibitors Comprising a Sequence of Amyloid- β Peptide for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **58**, 5408–5418 (2015).
4. Alí-Torres, J., Maréchal, J.-D., Rodríguez-Santiago, L. & Sodupe, M. Three dimensional models of Cu(2+)-A β (1-16) complexes from computational approaches. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15008–14 (2011).
5. Rauk, A. The chemistry of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2698–2715 (2009).
6. Kepp, K. P. Alzheimer's disease: How metal ions define β -amyloid function. *Coord. Chem. Rev.* **351**, 127–159 (2017).
7. Aderinwale, O. G., Ernst, H. W. & Mousa, S. A. Current therapies and new strategies for the management of Alzheimers disease. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* **25**, 414–424 (2010).
8. Kidd, P. M. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: Current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern. Med. Rev.* **13**, 85–115 (2008).
9. Falco, A. De, Cukierman, D. S., Hauser-davis, R. A. & Rey, N. A. DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E

Capítulo 7 Referências

- PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. *Quim. Nova* **39**, 63–80 (2016).
10. Adelina, C. The costs of dementia: advocacy, media and stigma. *Alzheimer's Dis. Int. World Alzheimer Rep. 2019* 100–101 (2019).
 11. Amado, D. K. & Brucki, S. M. D. Knowledge about alzheimer's disease in the Brazilian population. *Arq. Neuropsiquiatr.* **76**, 775–782 (2018).
 12. Hamley, I. W. The amyloid beta peptide: A chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem. Rev.* **112**, 5147–5192 (2012).
 13. George-Hyslop, P. S. *et al.* Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat. Genet.* **2**, 330–334 (1992).
 14. D'argenio, V. & Sarnataro, D. New insights into the molecular bases of familial alzheimer's disease. *J. Pers. Med.* **10**, (2020).
 15. Tanzi, R. E. *et al.* The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **3**, 159–168 (1996).
 16. Sunderland, T. *et al.* Cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42 and tau in control subjects at risk for Alzheimer's disease: The effect of APOE ϵ 4 allele. *Biol. Psychiatry* **56**, 670–676 (2004).
 17. Sando, S. B. *et al.* APOE ϵ 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; A case control study from central Norway. *BMC Neurol.* **8**, 1–7 (2008).
 18. Arendt, T. *et al.* Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein ϵ 4 allele. *J. Neurosci.* **17**, 516–529 (1997).
 19. Bennett, D. A. *et al.* Apolipoprotein E ϵ 4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology* **60**, 246–252 (2003).

Capítulo 7 Referências

20. Kelleher, R. J. & Shen, J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 629–631 (2017).
21. Wong, T. H., Seelaar, H., Melhem, S., Rozemuller, A. J. M. & van Swieten, J. C. Genetic screening in early-onset Alzheimer's disease identified three novel presenilin mutations. *Neurobiol. Aging* **86**, 201.e9-201.e14 (2020).
22. Lanoiselée, H. M. *et al.* APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med.* **14**, 1–16 (2017).
23. Kabir, M. T. *et al.* Exploring the Role of PSEN Mutations in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Neurotox. Res.* **38**, 833–849 (2020).
24. Hardy, J. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the “amyloid cascade hypothesis”. *FEBS J.* **284**, 1040–1044 (2017).
25. Hatami, A., Monjazez, S., Milton, S. & Glabe, C. G. Familial Alzheimer's disease mutations within the amyloid precursor protein alter the aggregation and conformation of the amyloid- β peptide. *J. Biol. Chem.* **292**, 3172–3185 (2017).
26. Calvo-Rodriguez, M. & Bacskai, B. J. Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death. *Trends Neurosci.* **44**, 136–151 (2020).
27. Chami, M. & Checler, F. Alterations of the Endoplasmic Reticulum (ER) Calcium Signaling Molecular Components in Alzheimer's Disease. *Cells* **9**, 1–23 (2020).
28. Kashio, M., Wei-qi, G., Ohsaki, Y., Kido, M. A. & Taruno, A. CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral

Capítulo 7 Referências

- membrane of epithelial cells including taste cells. *Sci. Rep.* **9**, 1–13 (2019).
29. Galla, L., Redolfi, N., Pozzan, T., Pizzo, P. & Greotti, E. Intracellular calcium dysregulation by the alzheimer's disease-linked protein presenilin 2. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 30. Moezzi, S. M. I. *et al.* Apolipoprotein J in Alzheimer's Disease: Shedding Light on Its Role with Cell Signaling Pathway Perspective and Possible Therapeutic Approaches. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 4060–4072 (2020).
 31. Shepherd, C. E., Affleck, A. J., Bahar, A. Y., Carew-Jones, F. & Halliday, G. M. Intracellular and secreted forms of clusterin are elevated early in Alzheimer's disease and associate with both A β and tau pathology. *Neurobiol. Aging* **89**, 129–131 (2020).
 32. Foster, E. M., Dangla-Valls, A., Lovestone, S., Ribe, E. M. & Buckley, N. J. Clusterin in Alzheimer's disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front. Neurosci.* **13**, 1–27 (2019).
 33. Hung, S. Y. & Fu, W. M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* **24**, 1–12 (2017).
 34. Herrmann, N., Chau, S. A., Kircanski, I. & Lanctôt, K. L. Current and emerging drug treatment options for alzheimers disease: A systematic review. *Drugs* **71**, 2031–2065 (2011).
 35. Anand, A., Patience, A. A., Sharma, N. & Khurana, N. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *Eur. J. Pharmacol.* **815**, 364–375 (2017).
 36. Kumar, A., Singh, A. & Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol. Reports* **67**, 195–203 (2015).

Capítulo 7 Referências

37. Hickey, J. L. *et al.* Diagnostic imaging agents for Alzheimer ' s disease : Copper radiopharmaceuticals that target A β Plaques Diagnostic imaging agents for Alzheimer ' s disease : Copper radiopharmaceuticals that target A β plaques . *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16120–16132 (2013).
38. Viola, K. L. *et al.* Towards non-invasive diagnostic imaging of early-stage Alzheimer's disease. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 91–98 (2015).
39. Lagarde, J. *et al.* Cholinergic Changes in Aging and Alzheimer Disease: An [18F]-F-A-85380 Exploratory PET Study. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **31**, 8–12 (2017).
40. Blennow, K., Mattsson, N., Schöll, M., Hansson, O. & Zetterberg, H. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 297–309 (2015).
41. Bowman, G. L. & Quinn, J. F. Alzheimer's disease and the blood-brain barrier: Past, present and future. *Aging health* **4**, 47–57 (2008).
42. Guo, Z. & Sadler, P. J. Metals in Medicine. *Angew. Chemie Int. Ed.* **38**, 1512–1531 (1999).
43. Lu, J. X. *et al.* XMolecular structure of β -amyloid fibrils in alzheimer's disease brain tissue. *Cell* **154**, 1257 (2013).
44. Sekhon, B. S. & Kamboj, S. R. Inorganic nanomedicine--part 2. *Nanomedicine* **6**, 612–8 (2010).
45. Hampel, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **141**, 1917–1933 (2018).
46. Gholivand, K., Abdollahi, M., Mojahed, F., Alizadehgan, A. M. & Dehghan, G. Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase inhibition activity of some new carbacylamidophosphate deriviatives. *J. Enzyme Inhib. Med.*

Capítulo 7 Referências

- Chem.* **24**, 566–576 (2009).
47. H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F. & M. Ribeiro, F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 101–115 (2016).
 48. Thapa, S., Lv, M. & Xu, H. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini-Reviews Med. Chem.* **17**, 1665–1676 (2017).
 49. Ashford, J. W. Treatment of Alzheimer's Disease: The Legacy of the Cholinergic Hypothesis, Neuroplasticity, and Future Directions. *J. Alzheimer's Dis.* **47**, 149–156 (2015).
 50. Baruah, P., Rohman, M. A., Yesylevskyy, S. O. & Mitra, S. Therapeutic potency of substituted chromones as Alzheimer's drug: Elucidation of acetylcholinesterase inhibitory activity through spectroscopic and molecular modelling investigation. *BioImpacts* **9**, 79–88 (2019).
 51. Kamkwala, A. & Newhouse, P. Beyond Acetylcholinesterase Inhibitors: Novel Cholinergic Treatments for Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **13**, 1–1 (2016).
 52. Martorana, A., Esposito, Z. & Koch, G. Beyond the cholinergic hypothesis: Do current drugs work in alzheimer's disease? *CNS Neurosci. Ther.* **16**, 235–245 (2010).
 53. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. & Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 315–335 (2013).
 54. Tumiatti, V. *et al.* Progress in acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: An update. *Expert Opin. Ther. Pat.* **18**, 387–401 (2008).

Capítulo 7 Referências

55. das Neves, A. M. *et al.* Synthesis of thiazolidin-4-ones and thiazinan-4-ones from 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **35**, 31–41 (2020).
56. Chen, X. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors with photoswitchable inhibition of β -amyloid aggregation. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 377–389 (2014).
57. Lemes, L. F. N. *et al.* Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **108**, 687–700 (2016).
58. Holzgrabe, U., Kapková, P., Alptüzün, V., Scheiber, J. & Kugelmann, E. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 161–179 (2007).
59. Wang, X., Wang, X. & Guo, Z. Metal-involved theranostics: An emerging strategy for fighting Alzheimer's disease. *Coord. Chem. Rev.* **362**, 72–84 (2018).
60. Aktaş, A. *et al.* Novel morpholine liganded Pd-based N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antidiabetic and anticholinergic properties. *Polyhedron* **159**, 345–354 (2019).
61. Man, B. Y. W. *et al.* Group 9 metal-based inhibitors of β -amyloid (1-40) fibrillation as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Chem. Sci.* **2**, 917–921 (2011).
62. Heffern, M. C. *et al.* Modulation of amyloid- β aggregation by histidine-coordinating cobalt(III) schiff base complexes. *ChemBioChem* **15**, 1584–1589 (2014).
63. Mital, M. & Ziora, Z. Biological applications of Ru(II) polypyridyl

Capítulo 7 Referências

- complexes. *Coord. Chem. Rev.* (2018) doi:10.1016/j.ccr.2018.02.013.
64. Sundaraneedi, M. K. *et al.* Tetranuclear Polypyridylruthenium(II) Complexes as Inhibitors and Down-Regulators of Phosphatase Enzymes. *ChemistrySelect* **2**, 10668–10672 (2017).
65. Sundaraneedi, M. *et al.* Polypyridylruthenium(II) complexes exert in vitro and in vivo nematocidal activity and show significant inhibition of parasite acetylcholinesterases. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **8**, 1–7 (2018).
66. Sundaraneedi, M. K. *et al.* Polypyridylruthenium(II) complexes exert anti-schistosome activity and inhibit parasite acetylcholinesterases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–21 (2017).
67. Vyas, N. A. *et al.* Ruthenium(II) polypyridyl complex as inhibitor of acetylcholinesterase and A β aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* **75**, 375–381 (2014).
68. Vyas, N. A. *et al.* Acetylcholinesterase and A β aggregation inhibition by heterometallic ruthenium(II)-platinum(II) polypyridyl complexes. *Inorg. Chem.* **57**, 7524–7535 (2018).
69. van Rijt, S. H. & Sadler, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov. Today* **14**, 1089–97 (2009).
70. Arjmand, F. *et al.* Recent advances in metallodrug-like molecules targeting non-coding RNAs in cancer chemotherapy. *Coord. Chem. Rev.* **387**, 47–59 (2019).
71. Anthony, E. J. *et al.* Metallodrugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development. *Chem. Sci.* **11**, 12888–12917 (2020).

Capítulo 7 Referências

72. Bowen, M. L. *et al.* Long-chain rhenium and technetium glucosamine conjugates. *Dalt. Trans.* 9228–9236 (2009) doi:10.1039/b914309b.
73. Gottschaldt, M. *et al.* Synthesis and structure of novel sugar-substituted bipyridine complexes of rhenium and ^{99m}-technetium. *Chem. - A Eur. J.* **13**, 10273–10280 (2007).
74. Swavey, S., Kumar, S. V. & Erb, J. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Coordinated Directly to the Pyrrole Backbone of π -Extended Boron Dipyrromethene (Bodipy) Dyes: Synthesis, Characterization, and Spectroscopic and Electrochemical Properties. *Inorg. Chem.* **56**, 10664–10673 (2017).
75. Cadranel, A., Alborés, P., Yamazaki, S., Kleiman, V. D. & Baraldo, L. M. Efficient energy transfer via the cyanide bridge in dinuclear complexes containing Ru(ii) polypyridine moieties. *Dalt. Trans.* **41**, 5343–5350 (2012).
76. Dongare, P., Myron, B. D. B., Wang, L., Thompson, D. W. & Meyer, T. J. [Ru(bpy)₃]²⁺ revisited. Is it localized or delocalized? How does it decay? *Coord. Chem. Rev.* **345**, 86–107 (2017).
77. Kawamoto, K. *et al.* Disentangling the 1MLCT transition of [Ru(bpy)₃]²⁺ by Stark absorption spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **353**, 618–624 (2018).
78. Cardoso, C. R. *et al.* Luminescent ruthenium complexes for theranostic applications. *J. Med. Chem.* **57**, 4906–4915 (2014).
79. Zhang, K. Y. *et al.* Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chem. Rev.* **118**, 1770–1839 (2018).
80. Mariappan, M. *et al.* Synthesis, solvatochromism, photochemistry, DNA

Capítulo 7 Referências

- binding, photocleavage, cytotoxicity and molecular docking studies of a ruthenium(II) complex bearing photoactive subunit. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **356**, 617–626 (2018).
81. Boynton, A. N., Marcélis, L., McConnell, A. J. & Barton, J. K. A Ruthenium(II) Complex as a Luminescent Probe for DNA Mismatches and Abasic Sites. *Inorg. Chem.* **56**, 8381–8389 (2017).
 82. Oviedo, P. S., Pieslinger, G. E., Cadranel, A. & Baraldo, L. M. Exploring the localized to delocalized transition in non-symmetric bimetallic ruthenium polypyridines. *Dalt. Trans.* **46**, 15757–15768 (2017).
 83. Heinemann, F., Karges, J. & Gasser, G. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2727–2736 (2017).
 84. Mari, C., Pierroz, V., Ferrari, S. & Gasser, G. Combination of Ru(II) complexes and light: New frontiers in cancer therapy. *Chem. Sci.* **6**, 2660–2686 (2015).
 85. Zhang, P. *et al.* Isomeric Ruthenium(II) Complexes for Cancer Therapy and Cellular Imaging. *Inorganica Chim. Acta* **469**, 593–599 (2017).
 86. Camilo, M. R., Cardoso, C. R., Carlos, R. M. & Lever, A. B. P. Photosolvolytic of *cis*-[Ru(α -diimine)₂(4-aminopyridine)₂]²⁺ Complexes: Photophysical, Spectroscopic, and Density Functional Theory Analysis. *Inorg. Chem.* **53**, 3694–3708 (2014).
 87. Yuan, A. *et al.* NIR Light-Activated Drug Release for Synergetic Chemo-Photothermal Therapy. *Mol. Pharm.* **14**, 242–251 (2017).
 88. Brown, C. M. *et al.* Structural, electrochemical and photophysical behavior of Ru(II) complexes with large bite angle sulfur-bridged terpyridyl ligands.

Capítulo 7 Referências

- Inorg. Chem. Front.* **7**, 117–127 (2019).
89. Havrylyuk, D., Deshpande, M., Parkin, S. & Glazer, E. C. Ru(ii) complexes with diazine ligands: Electronic modulation of the coordinating group is key to the design of ‘dual action’ photoactivated agents. *Chem. Commun.* **54**, 12487–12490 (2018).
90. Nakagawa, A., Ito, A., Sakuda, E., Fujii, S. & Kitamura, N. Emission Tuning of Heteroleptic Arylborane–Ruthenium(II) Complexes by Ancillary Ligands: Observation of Strickler–Berg-Type Relation. *Inorg. Chem.* [acs.inorgchem.8b01058](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01058) (2018)
doi:10.1021/acs.inorgchem.8b01058.
91. Chow, H. S., Constable, E. C., Housecroft, C. E., Neuburger, M. & Schaffner, S. Ligands and complexes with supramolecular aromatic–aromatic interactions: Iron(ii) and ruthenium(ii) complexes of 2,2':6',2'-terpyridines with pendant naphthalene groups. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2881–2890 (2006) doi:10.1039/b515610f.
92. Wu, K. *et al.* Homochiral D₄-symmetric metal-organic cages from stereogenic Ru(II) metalloligands for effective enantioseparation of atropisomeric molecules. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2016).
93. Peng, M. N., Zhu, Z. Y. & Tan, L. F. Binding Differences of Two Homochiral [Ru(bpy)₂dppz]²⁺Complexes with poly(U)·poly(A)*poly(U) Triplex RNA. *Inorg. Chem.* **56**, 7312–7315 (2017).
94. Song, C. *et al.* Preparation and time-gated luminescence bioimaging application of ruthenium complex covalently bound silica nanoparticles. *Talanta* **79**, 103–108 (2009).
95. Perdisatt, L. *et al.* Synthesis, characterisation and DNA intercalation studies of regioisomers of ruthenium (II) polypyridyl complexes. *J. Inorg.*

Capítulo 7 Referências

- Biochem.* **182**, 71–82 (2018).
96. Cardoso, C. R. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bi-dentate histamine ligand. *Dalt. Trans.* **41**, 6726–6734 (2012).
97. Svensson, F. R., Abrahamsson, M., Strömberg, N., Ewing, A. G. & Lincoln, P. Ruthenium(II) complex enantiomers as cellular probes for diastereomeric interactions in confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 397–401 (2011).
98. Law, W. H. T. *et al.* Phosphorescent cellular probes and uptake indicators derived from cyclometalated iridium(III) bipyridine complexes appended with a glucose or galactose entity. *Inorg. Chem.* **52**, 13029–13041 (2013).
99. Lau, C. T. S., Chan, C., Zhang, K. Y., Roy, V. A. L. & Lo, K. K. W. Photophysical, Cellular-Uptake, and Bioimaging Studies of Luminescent Ruthenium(II)–Polypyridine Complexes Containing a d-Fructose Pendant. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 5288–5294 (2017).
100. Cali, M. P. *et al.* Comparison of A β (1–40, 1–28, 11–22, and 29–40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex. *J. Inorg. Biochem.* **215**, 111314 (2021).
101. Silva, D. E. S. *et al.* Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A β Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer’s Disease. *J. Med. Chem.* **59**, 9215–9227 (2016).
102. Almeida, M. P., Kock, F. V. C., de Jesus, H. C. R., Carlos, R. M. & Venâncio, T. Probing the acetylcholinesterase inhibitory activity of a novel

Capítulo 7 Referências

- Ru(II) polypyridyl complex and the supramolecular interaction by (STD)-NMR. *J. Inorg. Biochem.* **224**, 111560 (2021).
103. Vyas, N. A. *et al.* Acetylcholinesterase and A β aggregation inhibition by heterometallic ruthenium(II)-platinum(II) polypyridyl complexes. *Inorg. Chem.* **57**, 7524–7535 (2018).
104. Ristovski, S. *et al.* Organoruthenium Prodrugs as a New Class of Cholinesterase and Glutathione-S-Transferase Inhibitors. *ChemMedChem* **13**, 2166–2176 (2018).
105. Sweeney, M. D., Sagare, A. P. & Zlokovic, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 133–150 (2018).
106. Patching, S. G. Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Mol. Neurobiol.* **54**, 1046–1077 (2017).
107. Wilhelm, I. & Krizbai, I. A. In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol. Pharm.* **11**, 1949–1963 (2014).
108. Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., Zlokovic, B. V & Angeles, L. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* **163**, 1064–1078 (2016).
109. Abbott, N. J. J., Patabendige, A. A. A. K. K., Dolman, D. E. M. D. E. M., Yusof, S. R. S. R. & Begley, D. J. D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).
110. Yan Chen, L. L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 640–665 (2012).

Capítulo 7 Referências

111. Banks, W. A. From blood-brain barrier to blood-brain interface: New opportunities for CNS drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 275–292 (2016).
112. Zenaro, E., Piacentino, G. & Constantin, G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **107**, 41–56 (2017).
113. Serrano, I. D., Ribeiro, M. M. B. & Castanho, M. A. R. B. A focus on glucose-mediated drug delivery to the central nervous system. *Mini Rev. Med. Chem.* **12**, 301–12 (2012).
114. Hawkins, B. T. & Davis, T. P. The Blood-Brain Barrier / Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* **57**, 173–185 (2005).
115. Qin, Y. *et al.* In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes. *J. Drug Target.* **18**, 536–549 (2010).
116. Zhang, F., Lin, Y. A., Kannan, S. & Kannan, R. M. Targeting specific cells in the brain with nanomedicines for CNS therapies. *J. Control. Release* **240**, 212–226 (2016).
117. Peluffo, H. *et al.* BBB-targeting, protein-based nanomedicines for drug and nucleic acid delivery to the CNS. *Biotechnol. Adv.* **33**, 277–287 (2015).
118. Umezawa, F. & Eto, Y. Liposome targeting to mouse brain: Mannose as a recognition marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1038–1044 (1988).
119. Cabezón, I. *et al.* Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood-Brain Barrier. *Mol. Pharm.* **12**, 4137–4145 (2015).
120. Paterson, J. & Webster, C. I. Exploiting transferrin receptor for delivering

Capítulo 7 Referências

- drugs across the blood-brain barrier. *Drug Discov. Today Technol.* **20**, 49–52 (2016).
121. Johnsen, K. B. *et al.* Targeting transferrin receptors at the blood-brain barrier improves the uptake of immunoliposomes and subsequent cargo transport into the brain parenchyma. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
122. Fenart, L. *et al.* Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 1017–1022 (1999).
123. Allen, D. D. Active Transport of High-Affinity Choline and Nicotine Analogs into the Central Nervous System by the Blood-Brain Barrier Choline Transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 1268–1274 (2002).
124. Zheng, G. *et al.* Bis-azaaromatic quaternary ammonium salts as ligands for the blood-brain barrier choline transporter. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 3208–3210 (2010).
125. Santos, M. A., Chand, K. & Chaves, S. Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. *Coord. Chem. Rev.* **327–328**, 287–303 (2016).
126. Xu, P., Zhang, M., Sheng, R. & Ma, Y. Synthesis and biological evaluation of deferiprone-resveratrol hybrids as antioxidants, A β 1–42 aggregation inhibitors and metal-chelating agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **127**, 174–186 (2017).
127. Wang, H. *et al.* Nanodisk-based glioma-targeted drug delivery enabled by a stable glycopeptide. *J. Control. Release* **284**, 26–38 (2018).
128. Singh, I., Swami, R., Jeengar, M. K., Khan, W. & Sistla, R. p-Aminophenyl- α -d-mannopyranoside engineered lipidic nanoparticles for effective delivery of docetaxel to brain. *Chem. Phys. Lipids* **188**, 1–9

Capítulo 7 Referências

- (2015).
129. Dufes, C. *et al.* Glucose-targeted niosomes deliver vasoactive intestinal peptide (VIP) to the brain. *Int. J. Pharm.* **285**, 77–85 (2004).
 130. Min, H. S. *et al.* Systemic Brain Delivery of Antisense Oligonucleotides across the Blood–Brain Barrier with a Glucose-Coated Polymeric Nanocarrier. *Angew. Chemie* **132**, 8250–8257 (2020).
 131. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier and neurotherapeutics. *NeuroRx* **2**, 1–2 (2005).
 132. Dotsenko, I. A., Curtis, M., Samoshina, N. M. & Samoshin, V. V. Convenient synthesis of 5-aryl(alkyl)sulfanyl-1,10-phenanthrolines from 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-phenanthroline, and their activity towards fungal β -d-glycosidases. *Tetrahedron* **67**, 7470–7478 (2011).
 133. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95 (1961).
 134. Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L. & Cabrita, E. J. Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *J. Chem. Educ.* **88**, 990–994 (2011).
 135. Ravi, C. *et al.* Synthesis, spectral studies, DNA binding, photocleavage, antimicrobial and anticancer activities of isoindol Ru(II) polypyridyl complexes. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **38**, 788–806 (2019).
 136. Liu, X. W. *et al.* DNA-binding, photocleavage studies of ruthenium(II) complexes with 2-(2-quinolinyl) imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **102**, 142–149 (2013).

Capítulo 7 Referências

137. Viala, C. & Coudret, C. An expeditious route to cis-Ru(bpy)₂C12 (bpy = 2,2'-bipyridine) using carbohydrates as reducers. *Inorganica Chim. Acta* **359**, 984–989 (2006).
138. Albani, B. A., Peña, B., Dunbar, K. R. & Turro, C. New cyclometallated Ru(II) complex for potential application in photochemotherapy? *Photochem. Photobiol. Sci.* **13**, 272–280 (2014).
139. Soupart, A., Alary, F., Heully, J. L., Elliott, P. I. P. & Dixon, I. M. Recent progress in ligand photorelease reaction mechanisms: Theoretical insights focusing on Ru(II) 3MC states. *Coord. Chem. Rev.* **408**, 213184 (2020).
140. Taniguchi, A., Shimizu, Y., Oisaki, K., Sohma, Y. & Kanai, M. Switchable photooxygenation catalysts that sense higher-order amyloid structures. *Nat. Chem.* **8**, 974–982 (2016).
141. Innocenzi, P., Kozuka, H. & Yoko, T. Fluorescence properties of the Ru(bpy)₃²⁺ complex incorporated in Sol-Gel-derived silica coating films. *J. Phys. Chem. B* **101**, 2285–2291 (1997).
142. Göttle, A. J. *et al.* Pivotal Role of a Pentacoordinate 3MC State on the Photocleavage Efficiency of a Thioether Ligand in Ruthenium(II) Complexes: A Theoretical Mechanistic Study. *Inorg. Chem.* **55**, 4448–4456 (2016).
143. Meijer, M. S. & Bonnet, S. Diastereoselective Synthesis and Two-Step Photocleavage of Ruthenium Polypyridyl Complexes Bearing a Bis(thioether) Ligand. *Inorg. Chem.* **58**, 11689–11698 (2019).
144. Dixon, I. M., Bonnet, S., Alary, F. & Cuny, J. Photoinduced Ligand Exchange Dynamics of a Polypyridyl Ruthenium Complex in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Lett.* 7278–7284 (2021)
doi:10.1021/acs.jpcllett.1c01424.

Capítulo 7 Referências

145. Zhang, Y., Zhou, Q., Tian, N., Li, C. & Wang, X. Ru(II)-Complex-Based DNA Photocleaver Having Intense Absorption in the Phototherapeutic Window. *Inorg. Chem.* **56**, 1865–1873 (2017).
146. Tian, N. *et al.* A nuclear permeable Ru(II)-based photoactivated chemotherapeutic agent towards a series of cancer cells: In vitro and in vivo studies. *Dalt. Trans.* **48**, 6492–6500 (2019).
147. Hariri, R. *et al.* Novel Tacrine-Based Pyrano[3',4':5,6]pyrano[2,3-b]quinolinones: Synthesis and Cholinesterase Inhibitory Activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **349**, 915–924 (2016).
148. Najafi, Z. *et al.* 1,2,3-Triazole-Isoxazole Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Docking Study. *Lett. Drug Des. Discov.* **14**, 58–65 (2016).
149. Tanoli, N. U. *et al.* Characterization of the interactions between coumarin-derivatives and acetylcholinesterase: Examination by NMR and docking simulations. *J. Mol. Model.* **24**, (2018).
150. Peauger, L. *et al.* Donepezil-Based Central Acetylcholinesterase Inhibitors by Means of a 'bio-Oxidizable' Prodrug Strategy: Design, Synthesis, and in Vitro Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **60**, 5909–5926 (2017).
151. Gao, X. hui *et al.* Tertiary amine derivatives of chlorochalcone as acetylcholinesterase (AChE) and buthylcholinesterase (BuChE) inhibitors: the influence of chlorine, alkyl amine side chain and α,β -unsaturated ketone group. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 146–152 (2017).

Capítulo 7 Referências

Apêndice

Apêndice

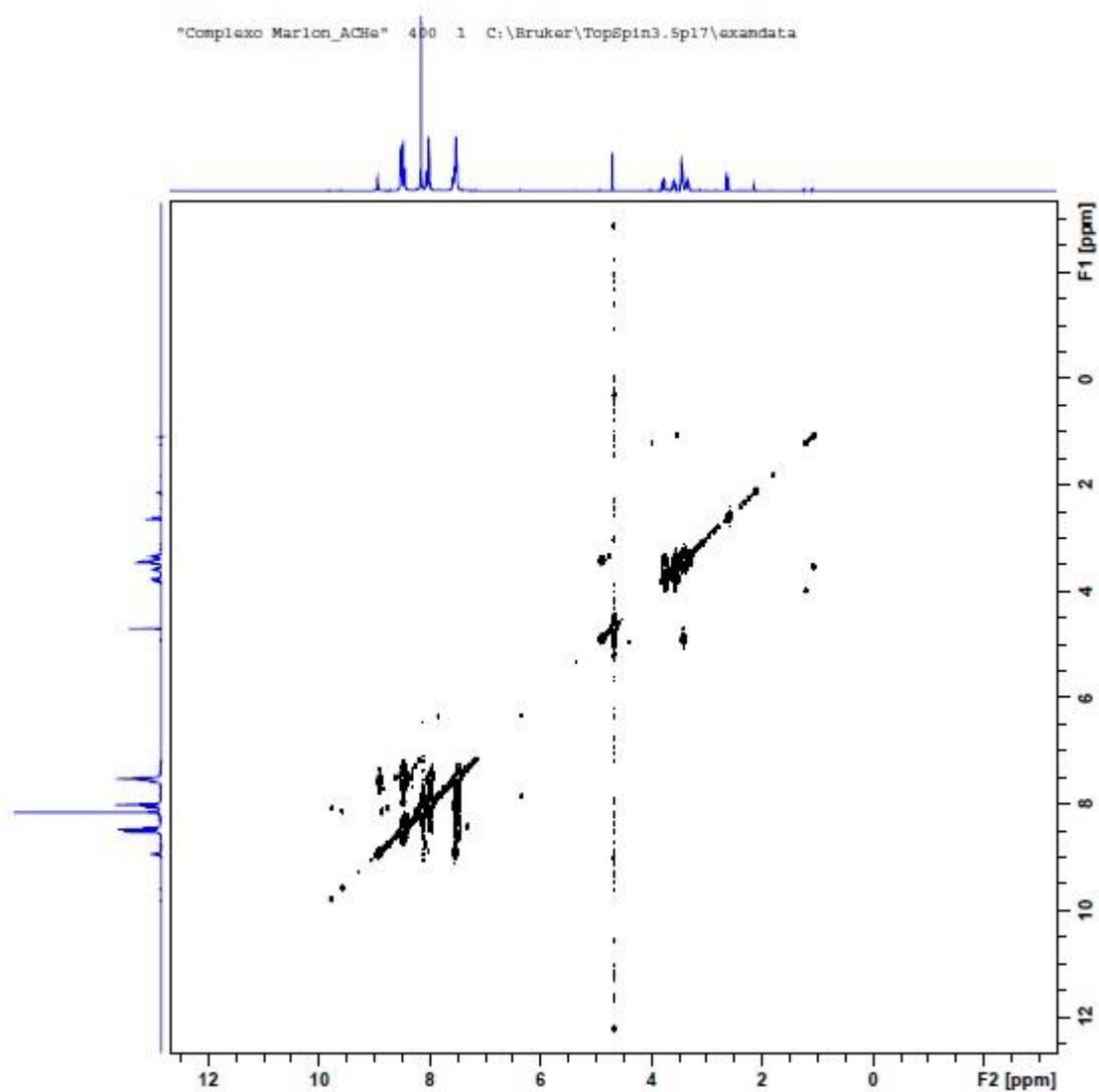


Figura A1: Espectro de COSY-RMN do complexo RuFenGlic em DMSO₆, 25°C, 400MHz.

Apêndice

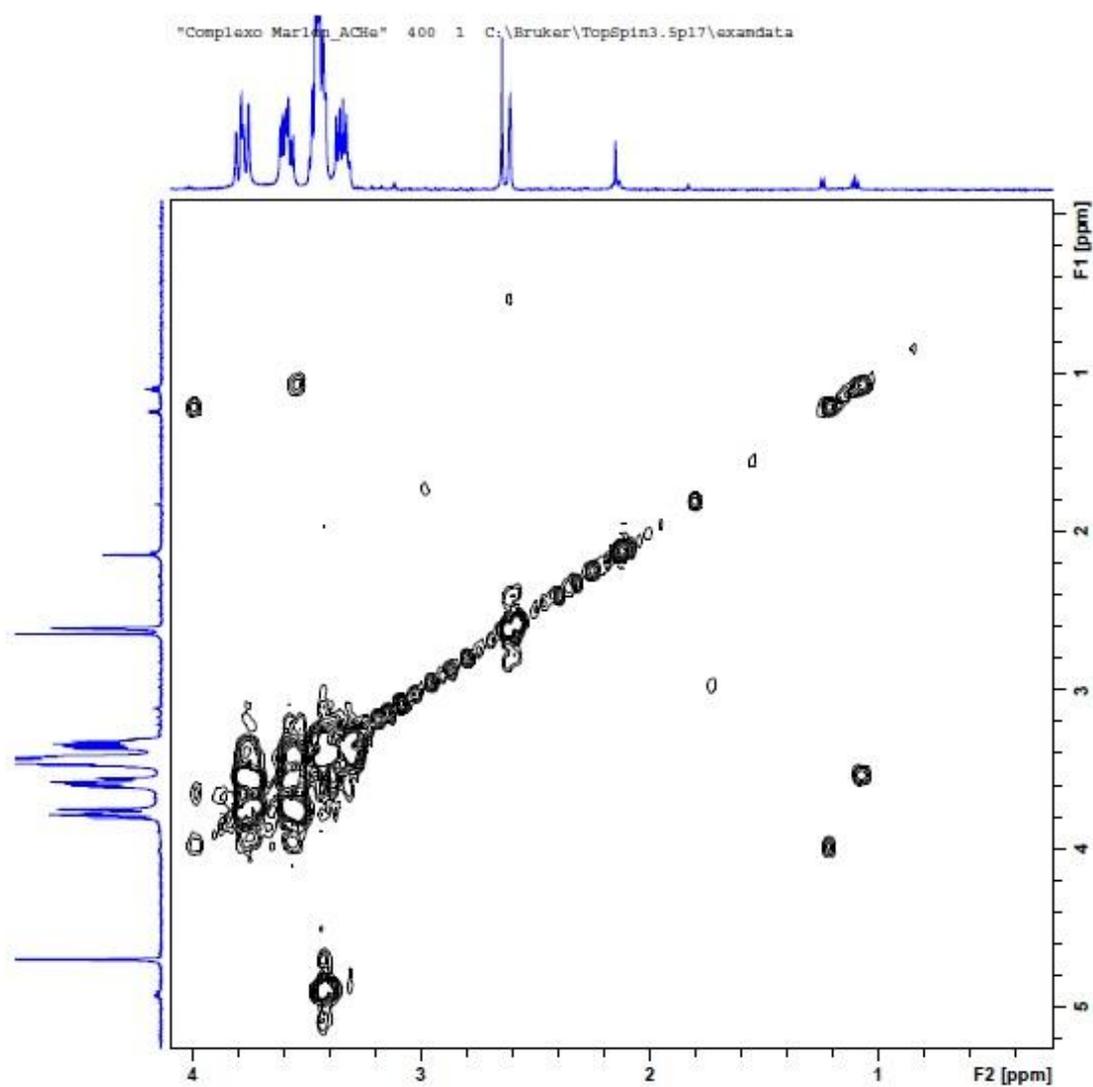


Figura A2: Espectro de COSY-RMN (Expansão da região alifática) do complexo RuFenGlic em DMSO-d_6 , 25°C, 400MHz.

Apêndice

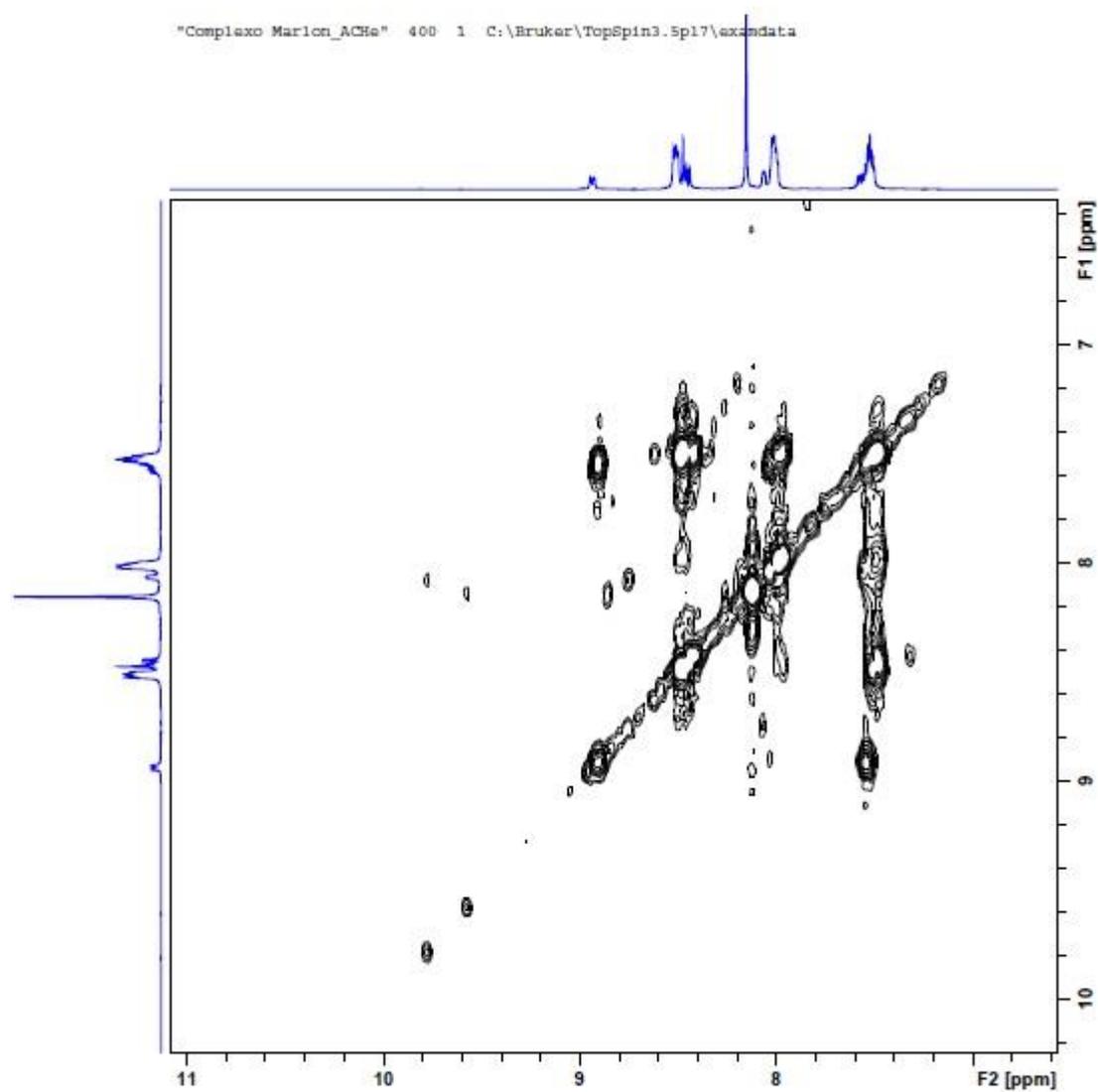


Figura A3: Espectro de COSY-RMN (Expansão da região aromática) do complexo RuFenGlic em DMSO-d_6 , 25°C, 400MHz.

Apêndice

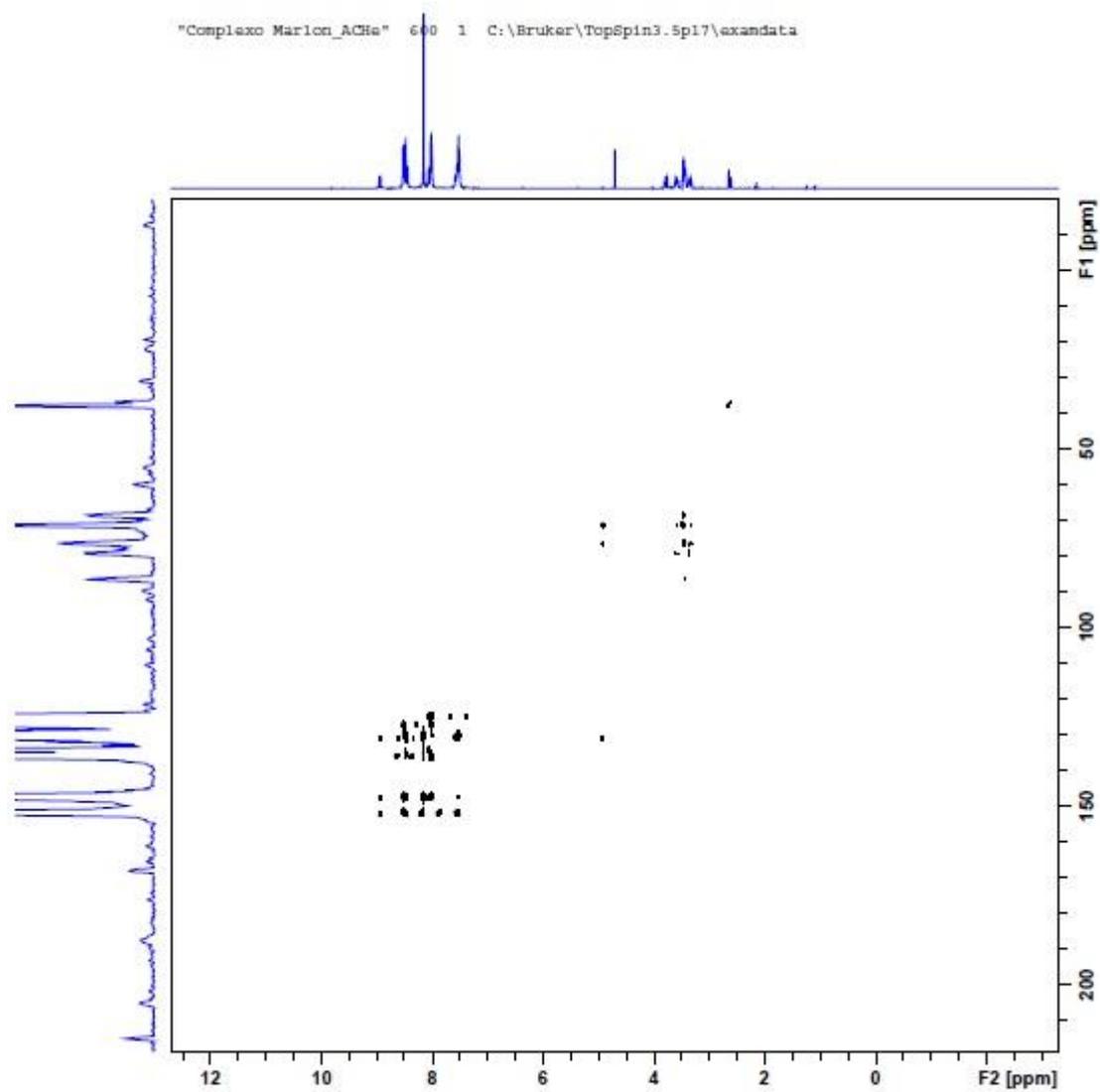


Figura A4: Espectro de HMBC do complexo RuFenGlic em DMSO_d_6 , 25°C, 400MHz.

Apêndice

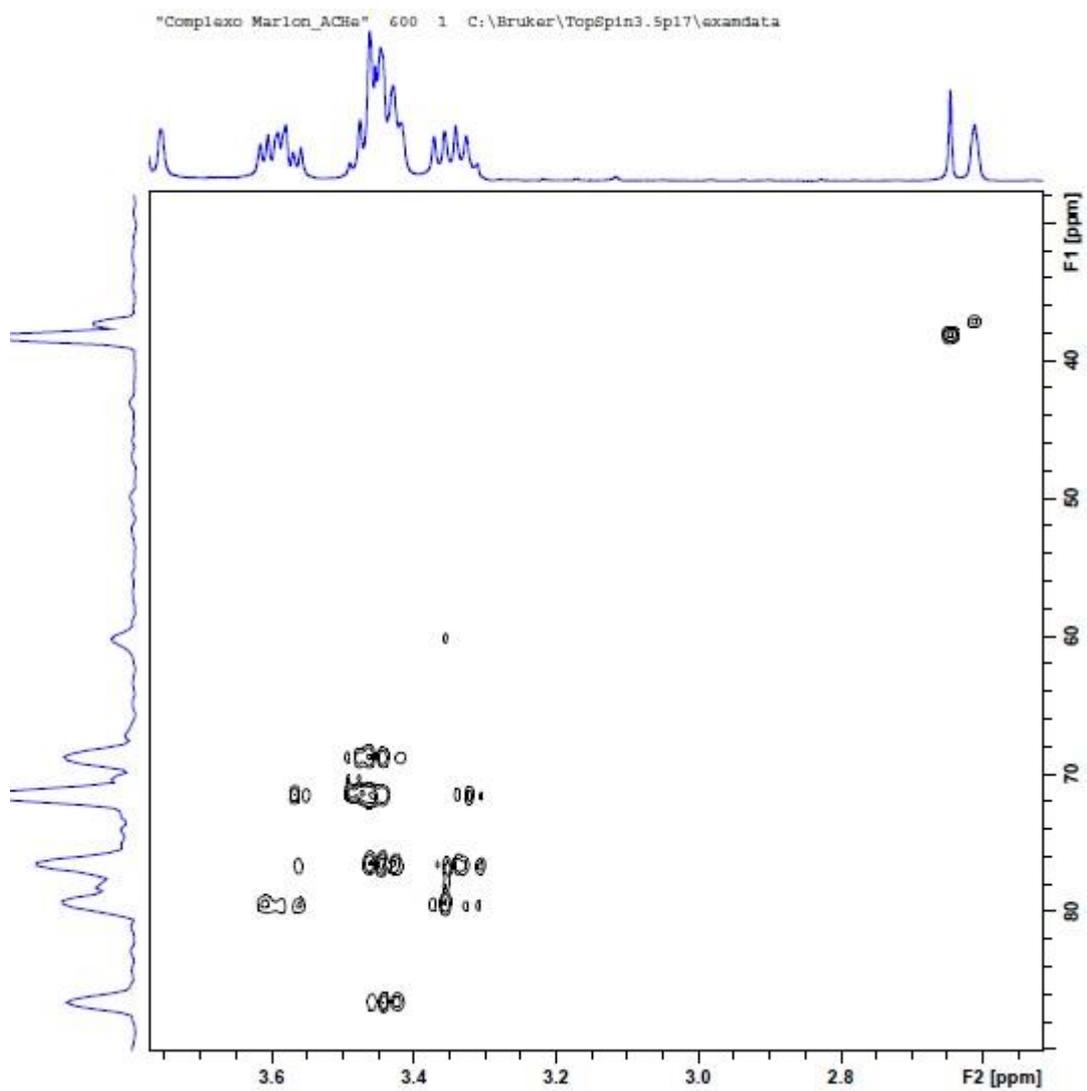


Figura A5: Espectro de HMBC (Expansão da região alifática) do complexo RuFenGlic em DMSO_d₆, 25°C, 400MHz.

Apêndice

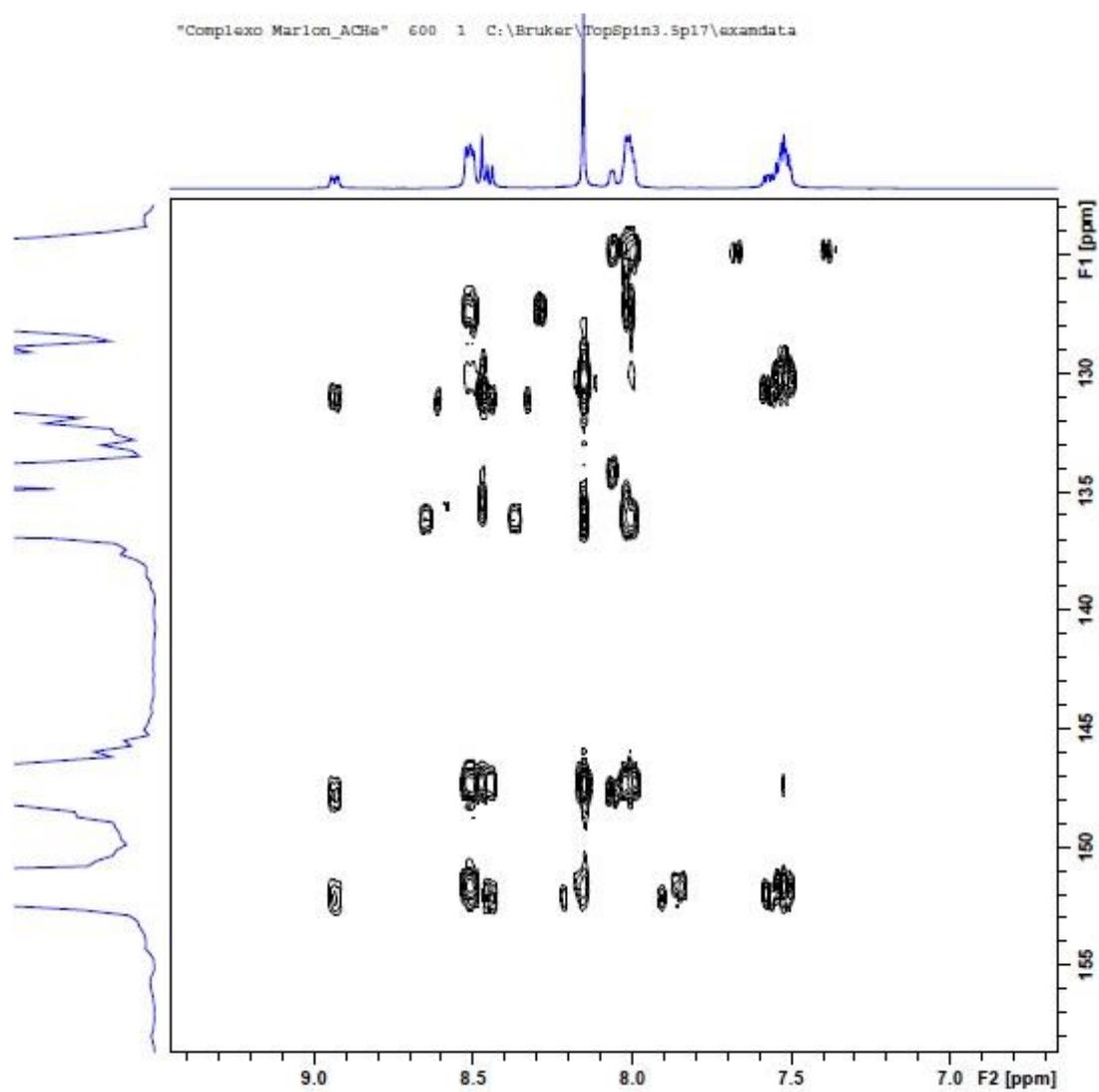


Figura A6: Espectro de HMBC (Expansão da região aromática) do complexo RuFenGlic em DMSO-d_6 , 25°C, 400MHz.

Apêndice

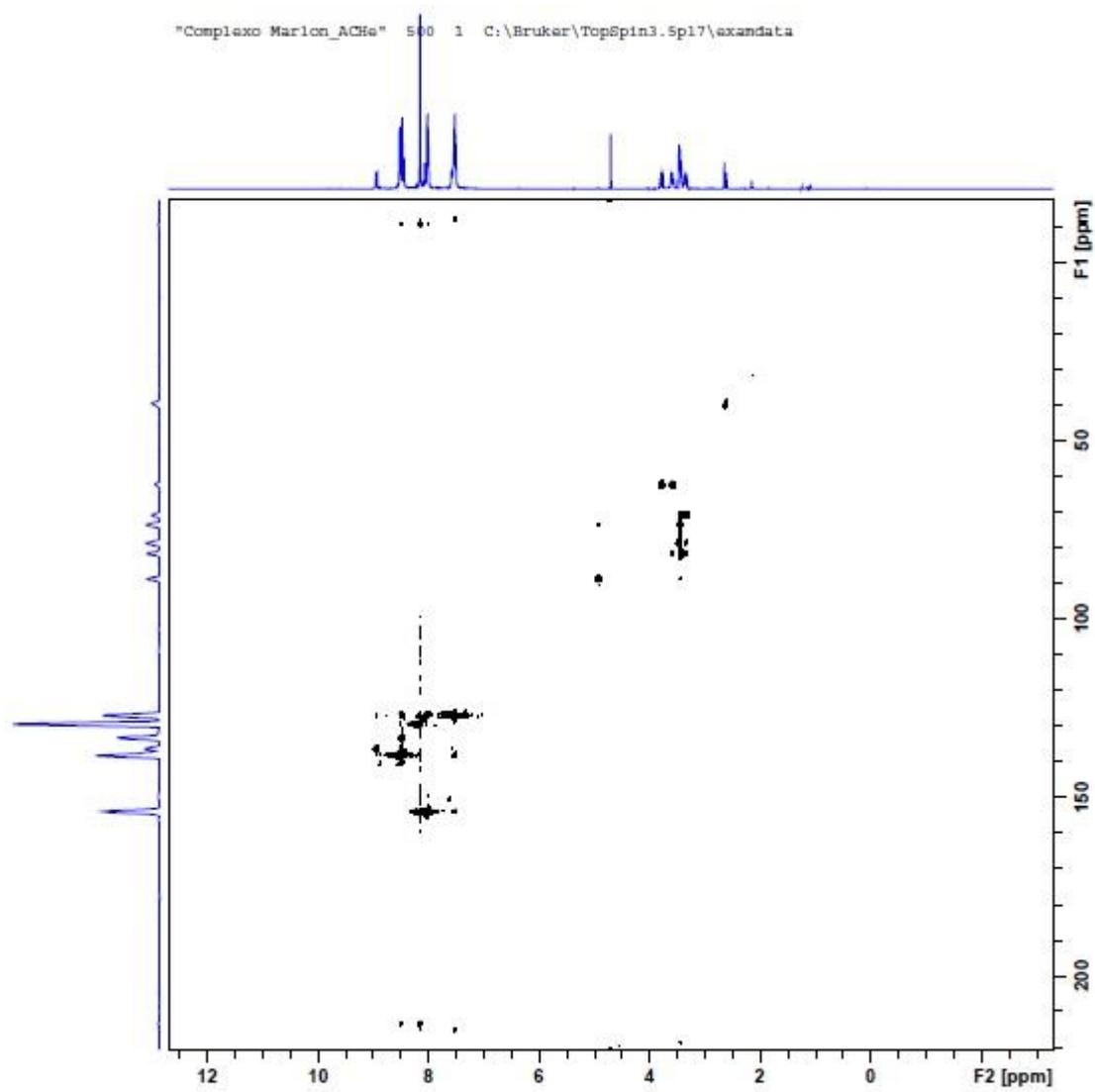


Figura A7: Espectro de HSQC do complexo RuFenGlic em DMSO-d_6 , 25°C, 400MHz.

Apêndice

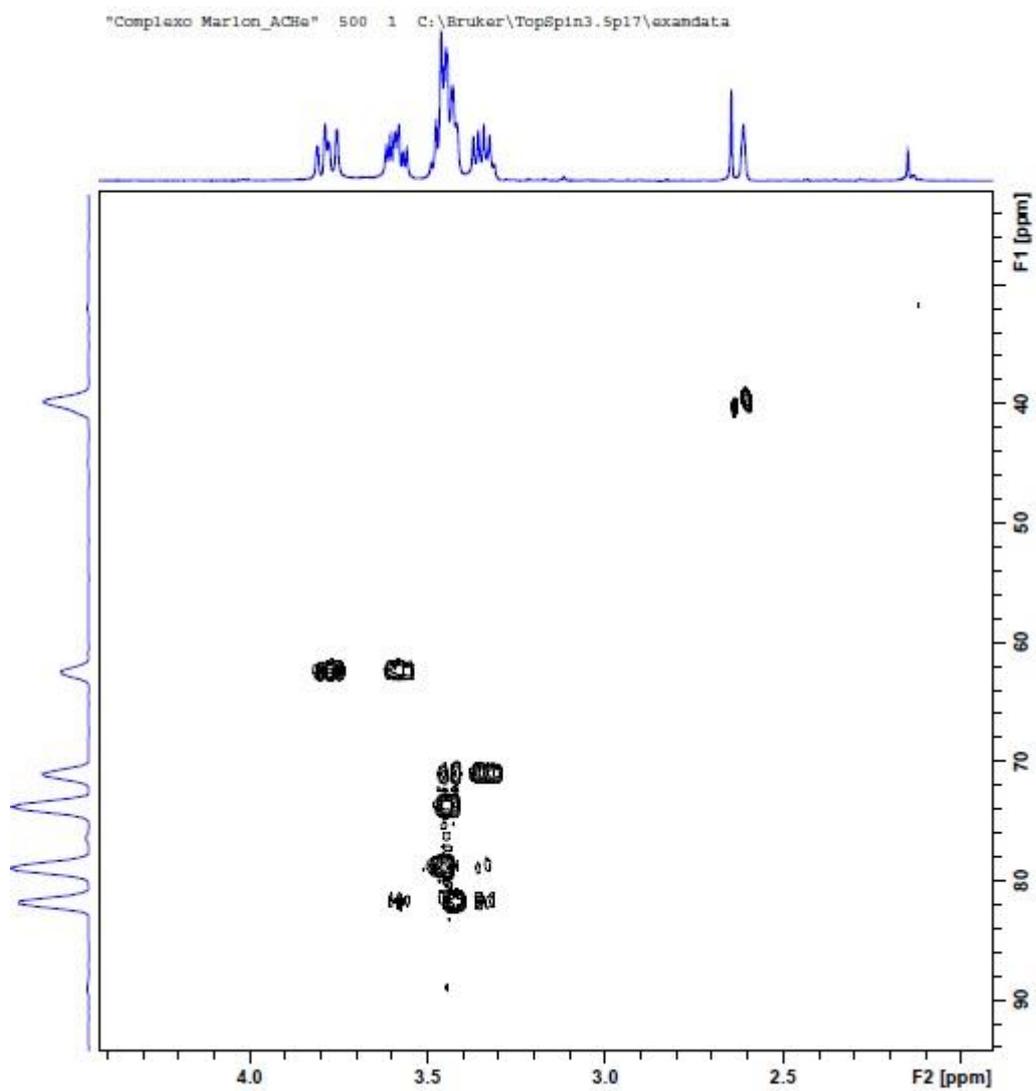


Figura A8: Espectro de HSQC (Expansão da região alifática) do complexo RuFenGlic em $\text{DMSO-}d_6$, 25°C , 400MHz.

Apêndice

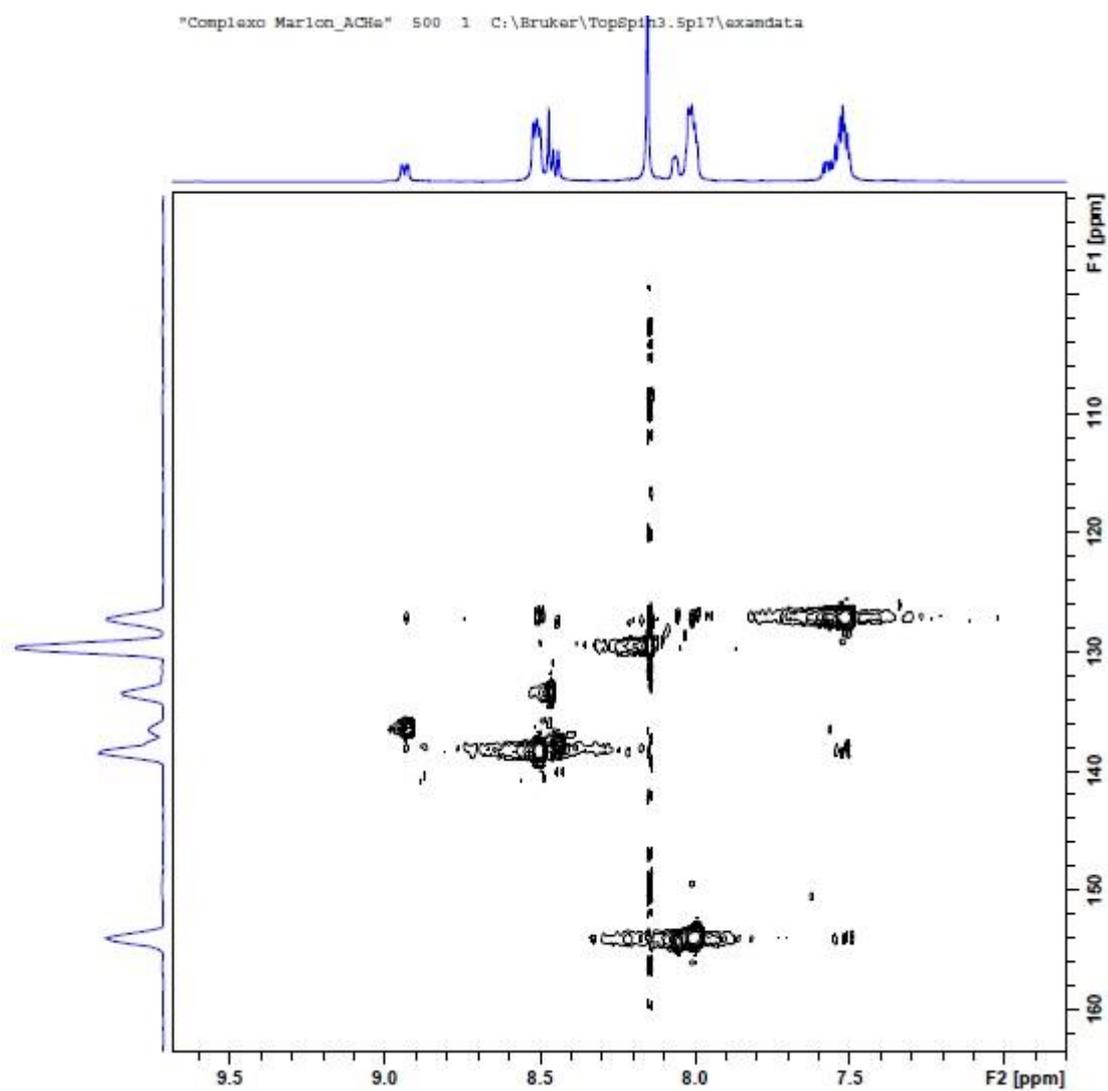


Figura A8: Espectro de HSQC (Expansão da região aromática) do complexo RuFenGlic em DMSO_d_6 , 25°C, 400MHz.

Apêndice

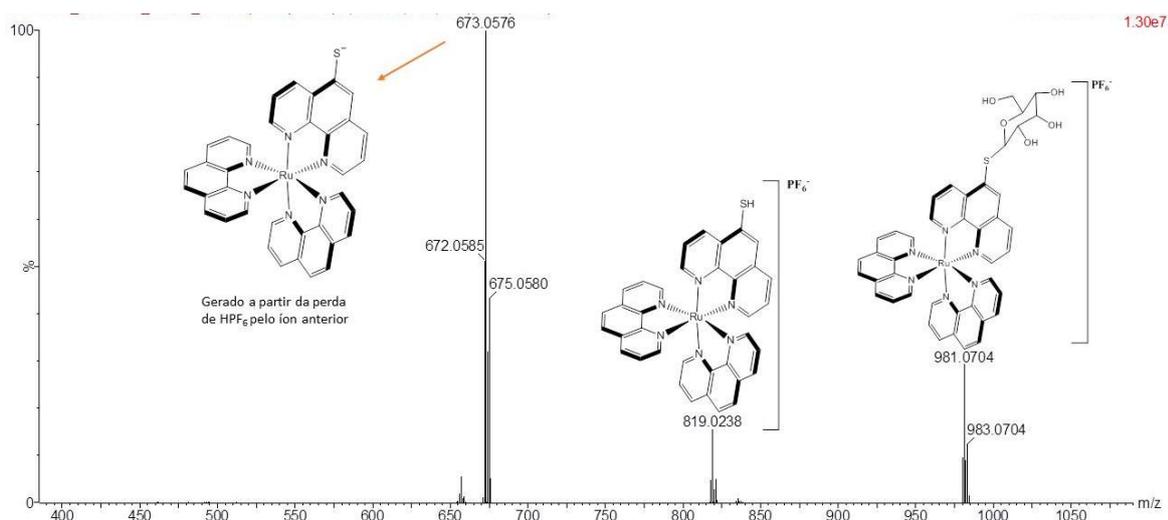


Figura A9: Espectro MS/MS do íon $m/z = 981$ gerando os íons $m/z = 819$ e $m/z = 673$. Tampão NH_4CO_3 (pH = 7,4).

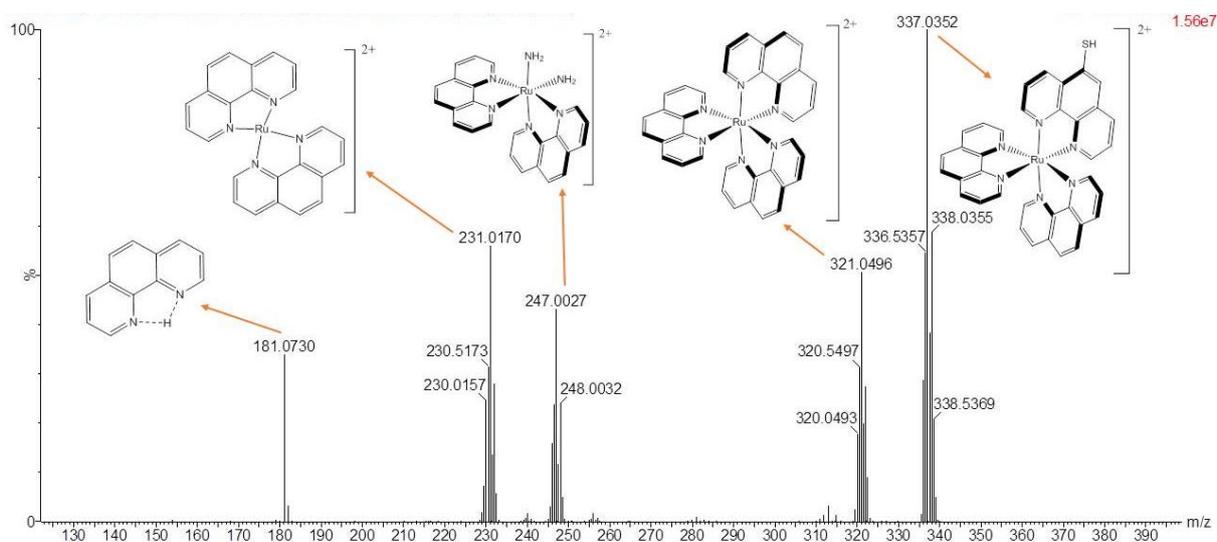


Figura A10: Espectro MS/MS do íon $m/z = 338$ gerando os íons $m/z = 321$, $m/z = 247$, $m/z = 231$ e $m/z = 181$. Tampão NH_4CO_3 (pH = 7,4).

Apêndice

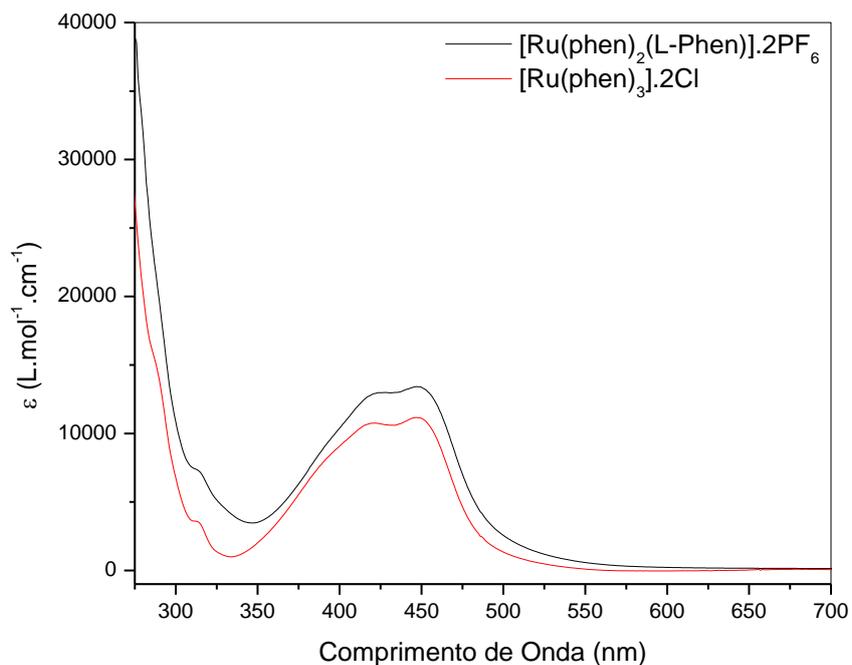


Figura A11: Comparação do espectro de absorção UV-Vis do complexo RuFenGlic (Preto) e do análogo comercial $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Acetonitrila, 25°C.

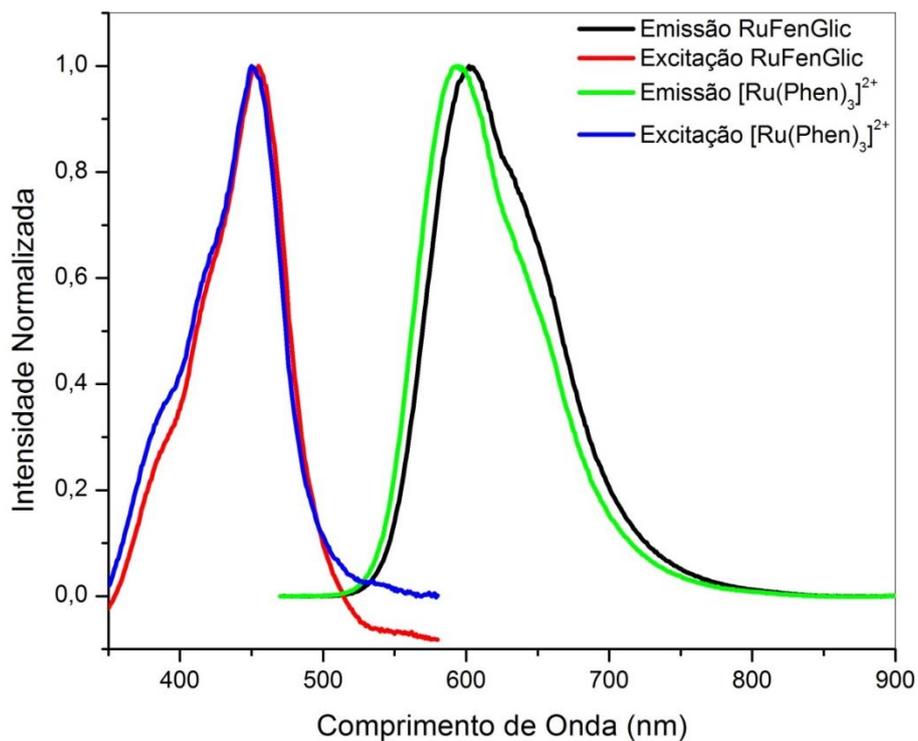


Figura A12: Comparação dos espectro de emissão e excitação do complexo RuFenGlic (Preto e Vermelho, respectivamente) e do análogo comercial $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (Verde e Azul, respectivamente). Acetonitrila, 25°C.

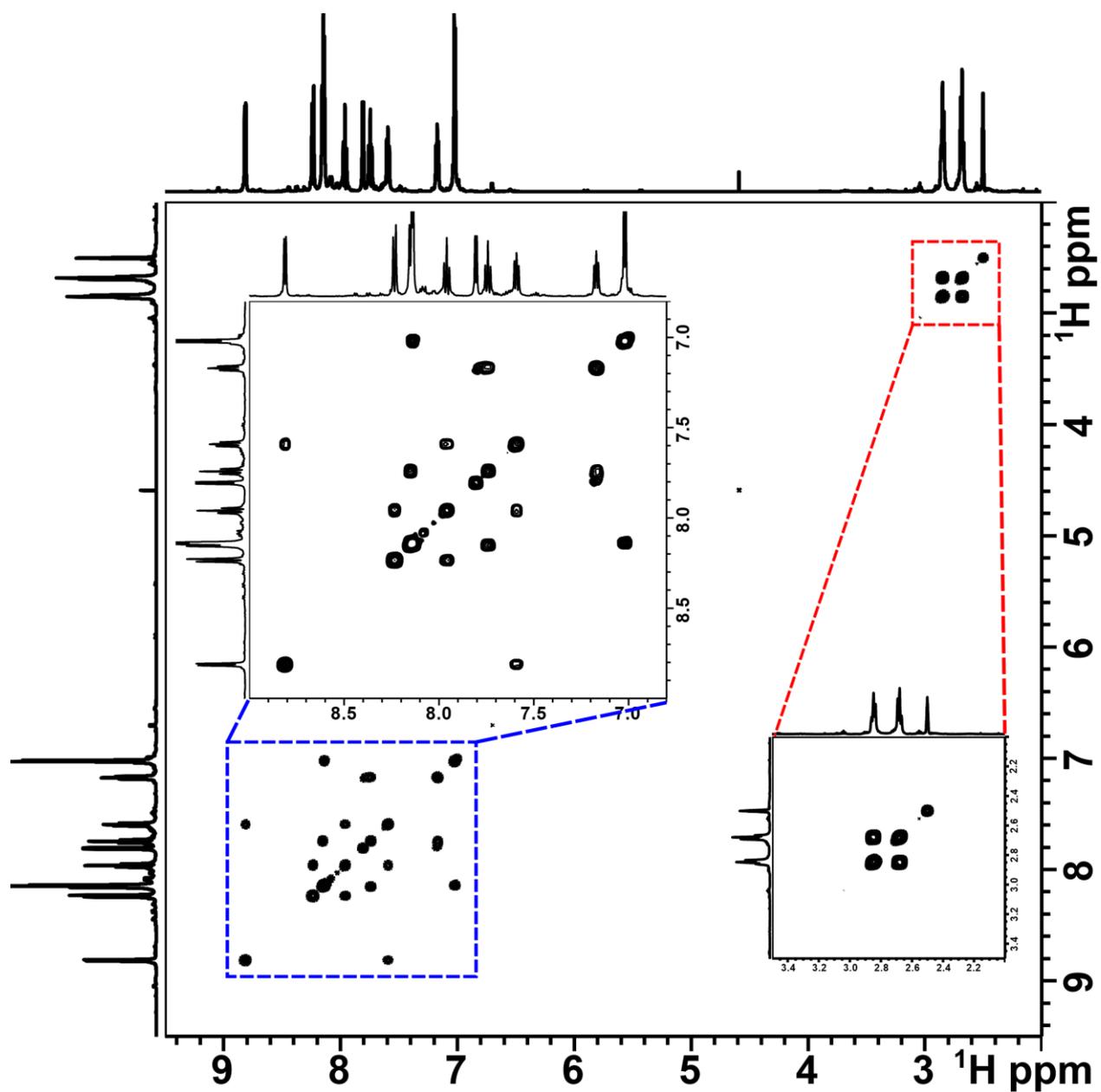


Figura A13: Espectro de COSY-RMN do complexo RuEtPy em DMSO-d_6 , 25°C , 400MHz ¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Apêndice

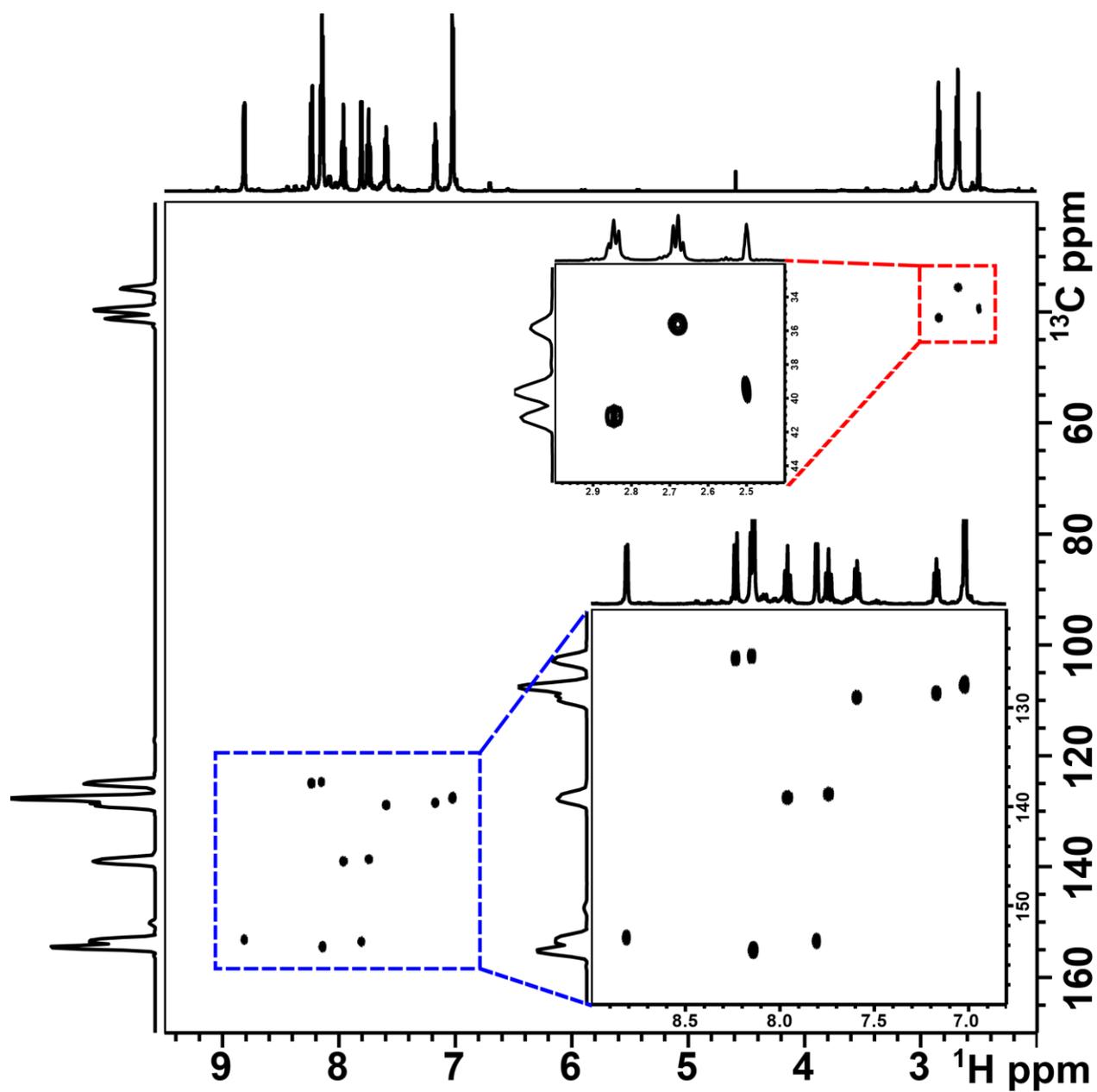


Figura A14: Espectro de HSQC do complexo RuEtPy em DMSO-d_6 , 25°C, 400MHz¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

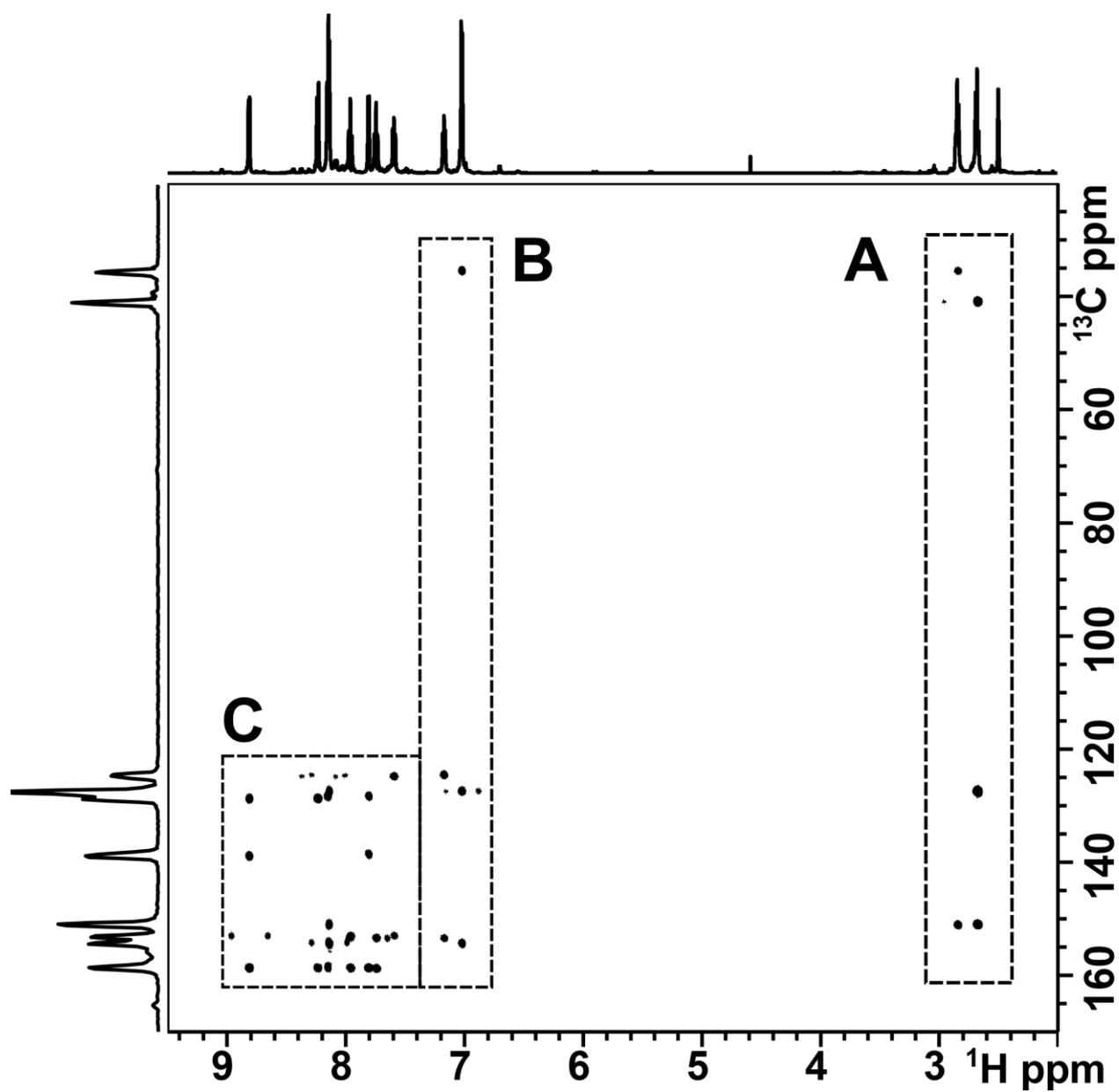


Figura A15: Espectro de HMBC do complexo RuEtPy em DMSO-d_6 , 25°C , 400MHz^{102} Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Apêndice

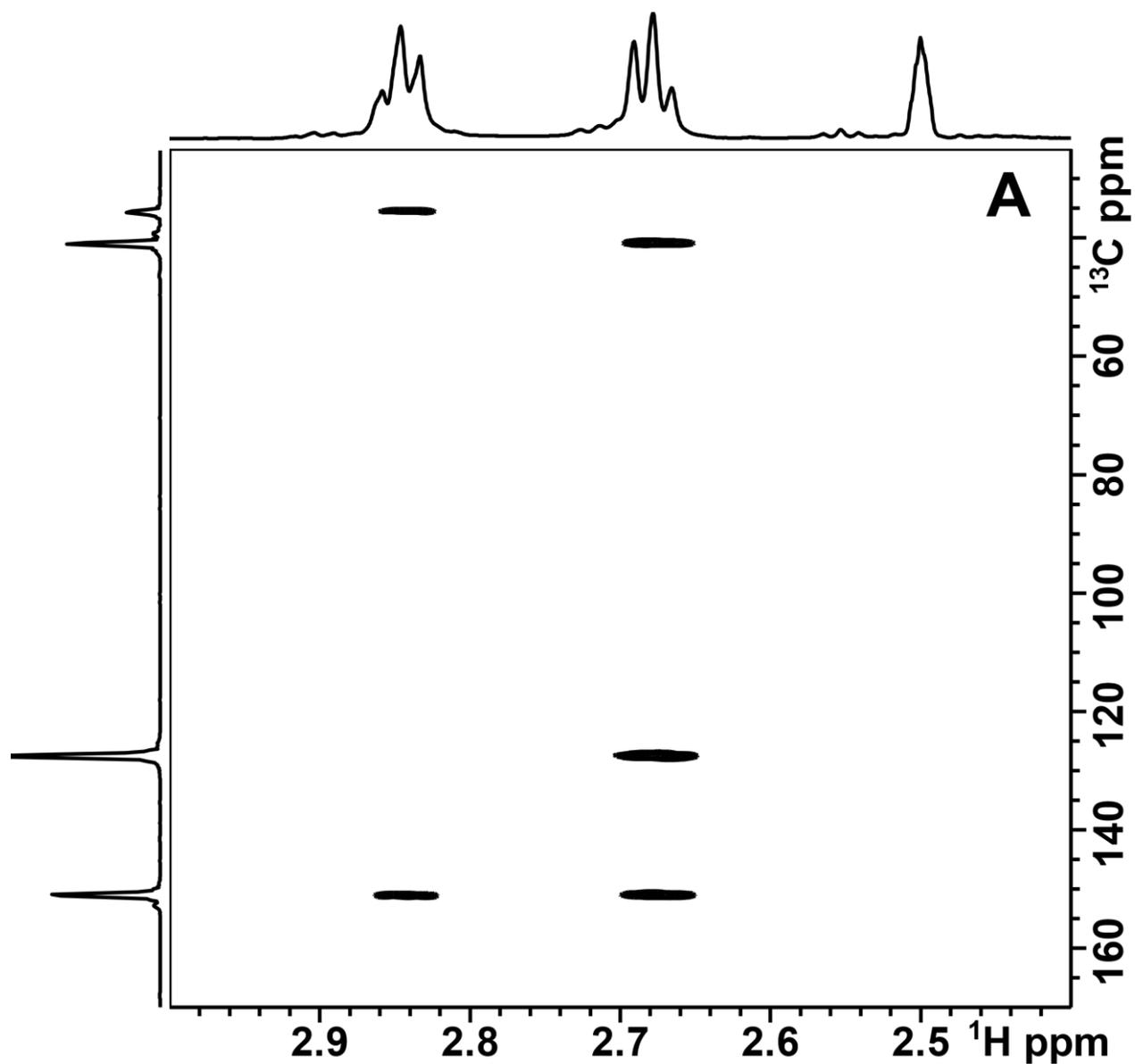


Figura A16: Espectro de HMBC (Expansão da região alifática) do complexo RuEtPy em DMSO_d_6 , 25°C, 400MHz¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

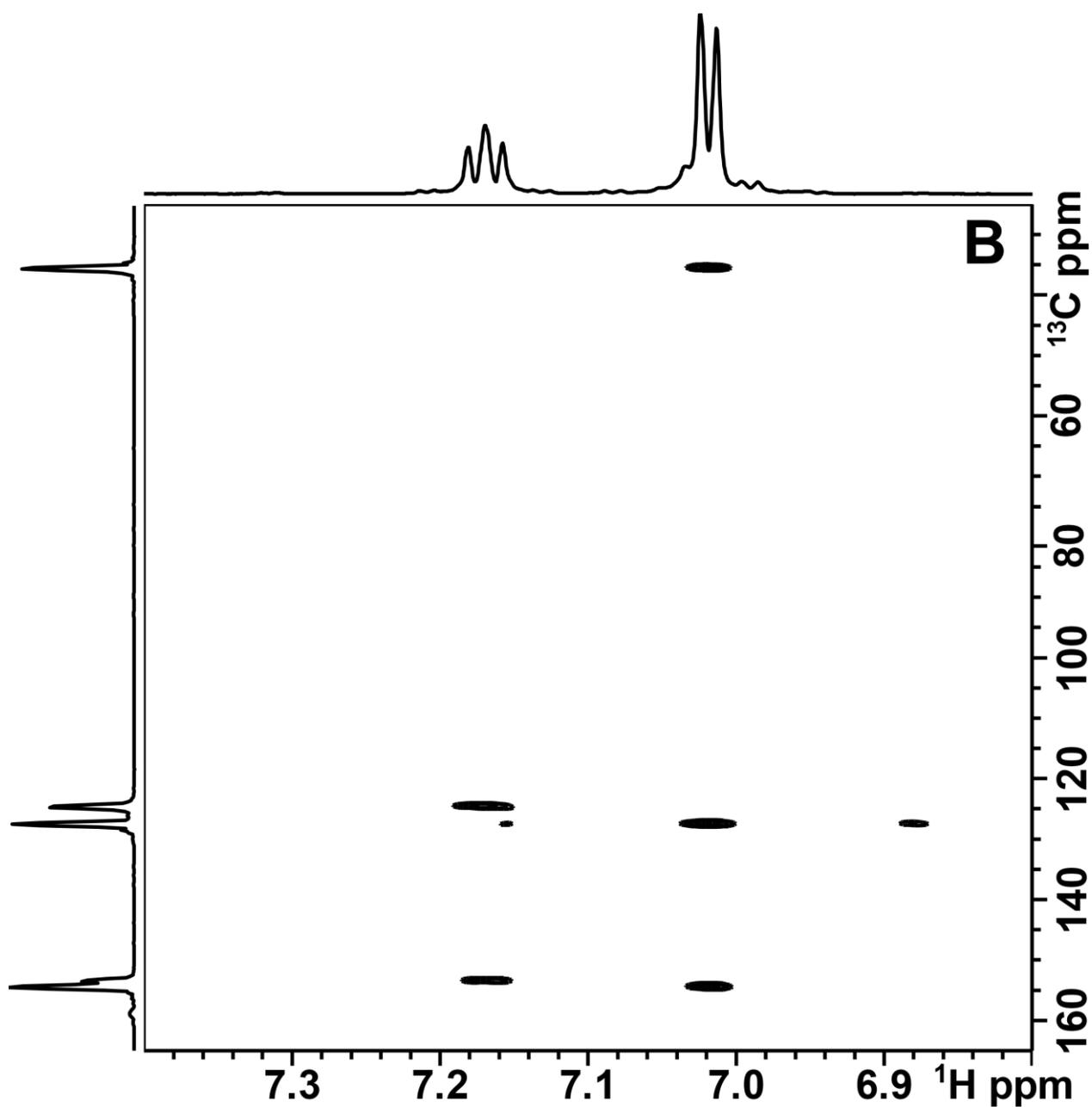


Figura A17: Espectro de HMBC (Expansão da região aromática) do complexo RuEtPy em DMSO_d₆, 25°C, 400MHz¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Apêndice

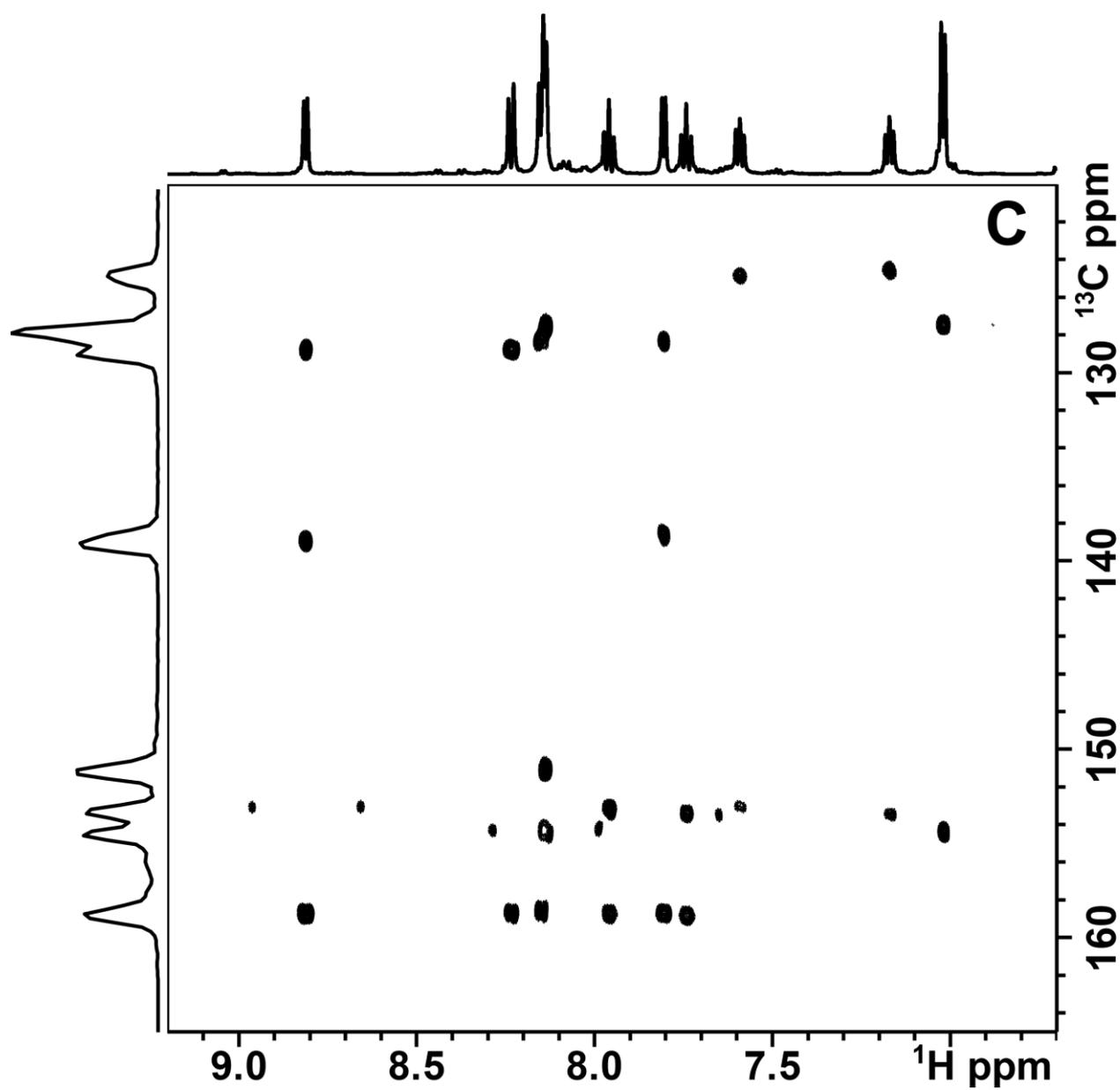


Figura A18: Espectro de HMBC (Expansão da região aromática) do complexo RuEtPy em DMSO-d_6 , 25°C , 400MHz^{102} Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Apêndice

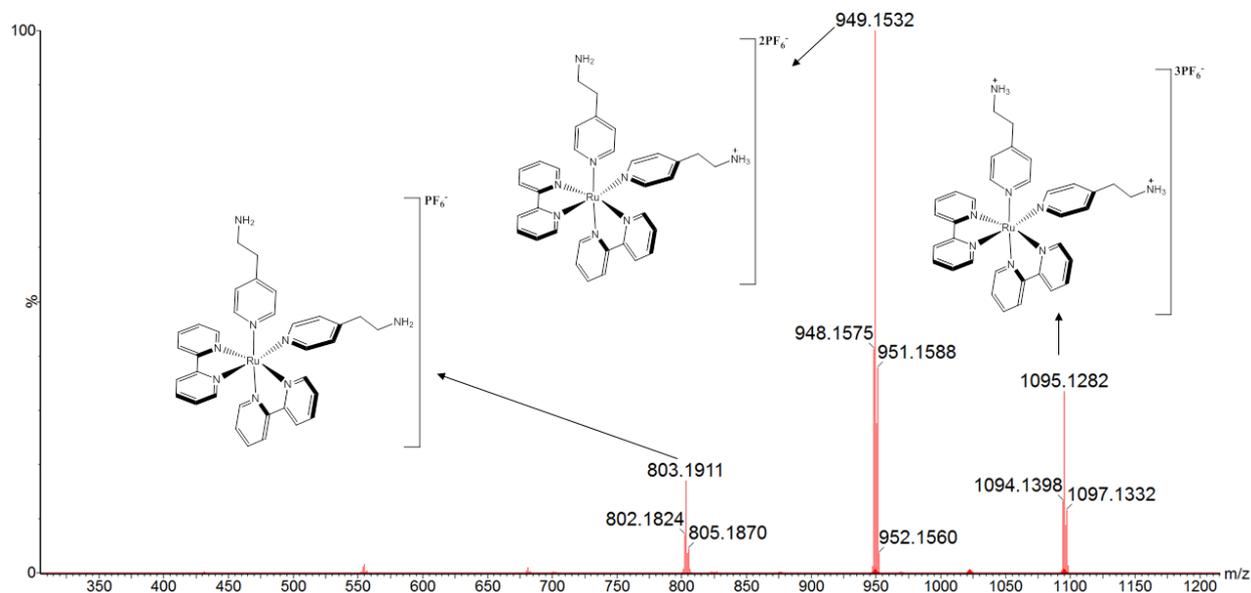


Figura A19: Espectro MS/MS do íon $m/z = 1095$ gerando os íons $m/z = 949$ e $m/z = 803$ referentes à estrutura do complexo RuEtPy. Tampão NH_4CO_3 ($\text{pH} = 7,4$)¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

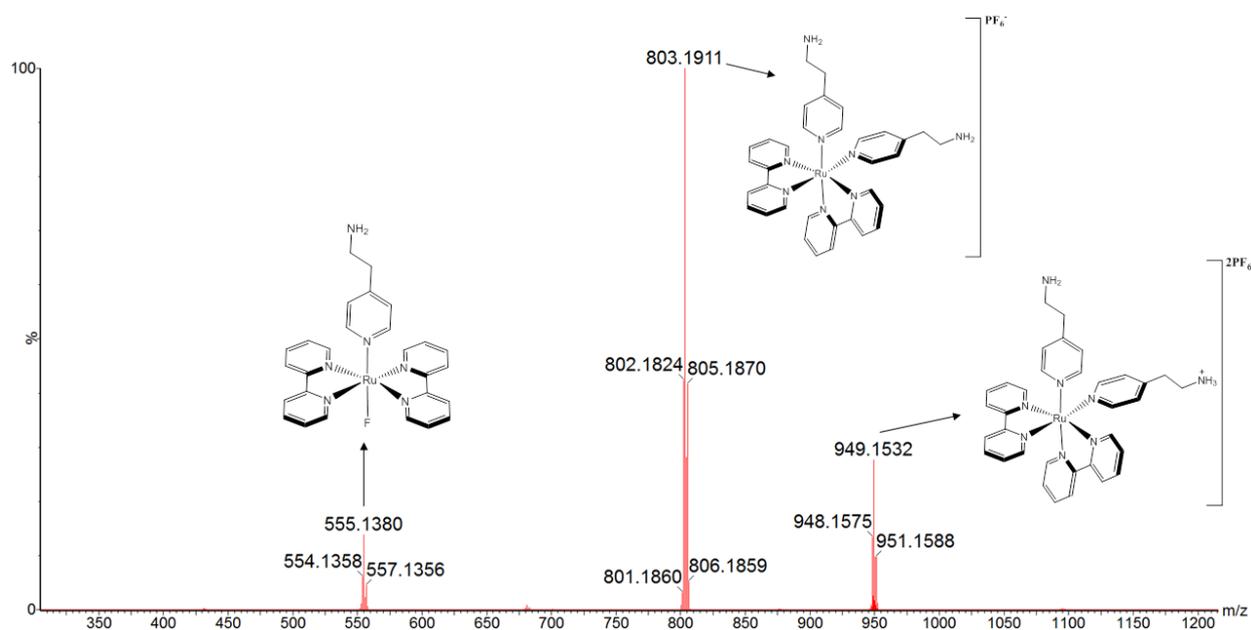


Figura A20: Espectro MS/MS do íon $m/z = 949$ gerando os íons $m/z = 803$ e $m/z = 555$ referentes à estrutura do complexo RuEtPy. Tampão NH_4CO_3 ($\text{pH} = 7,4$)¹⁰² Reproduzido com autorização da REF 102. Elsevier (Copyright 2022).

Apêndice

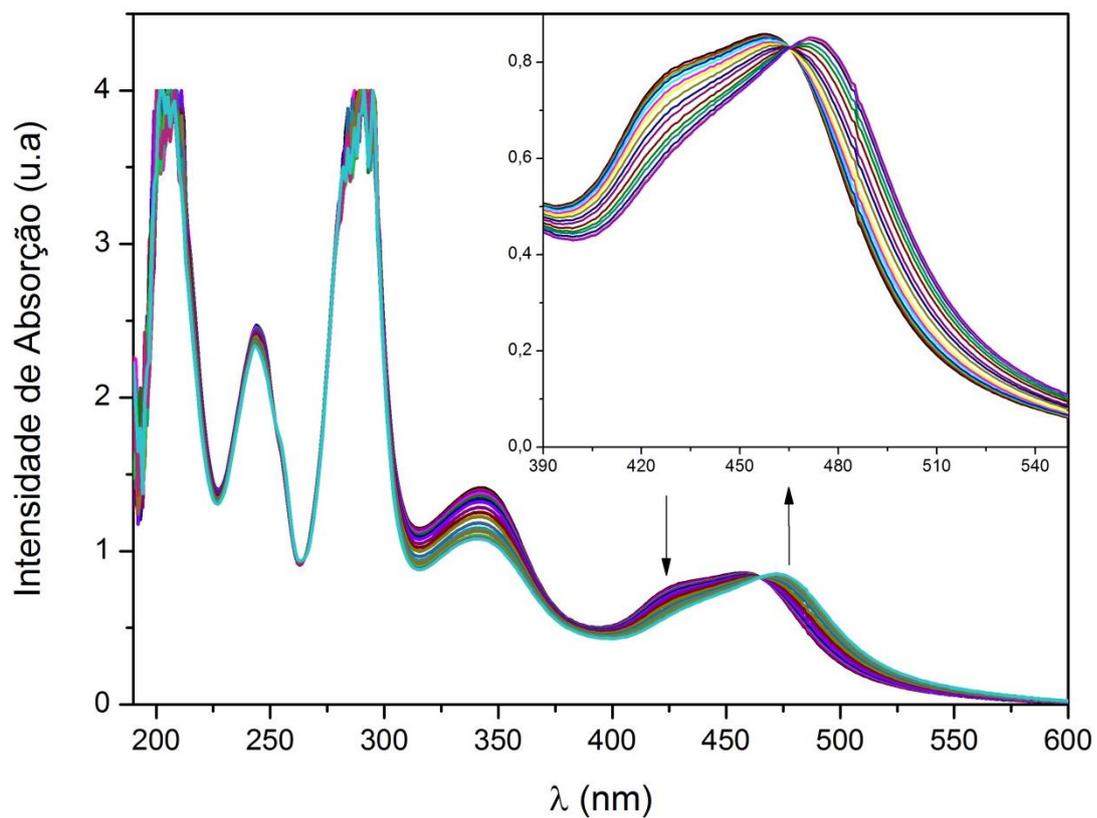


Figura A21: Espectros de absorção no UV-Vis do complexo RuEtPy em tampão Tris HCl (pH = 7,2) demonstrando a variação da banda MLCT após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 420 nm por um tempo total de 2 horas.

Apêndice

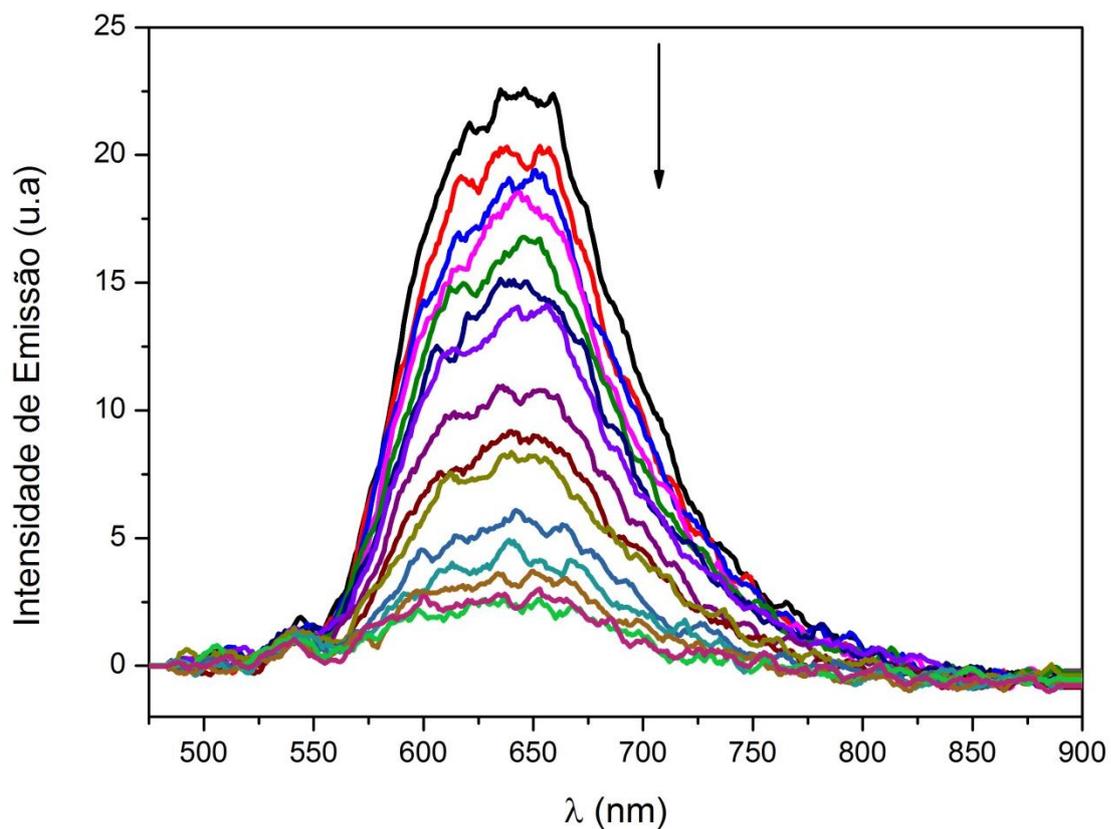


Figura A22: Espectros de emissão do complexo RuEtPy em tampão Tris-HCl (pH = 7,2) demonstrando supressão da emissão após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 420 nm por um tempo total de 2 horas.

Apêndice

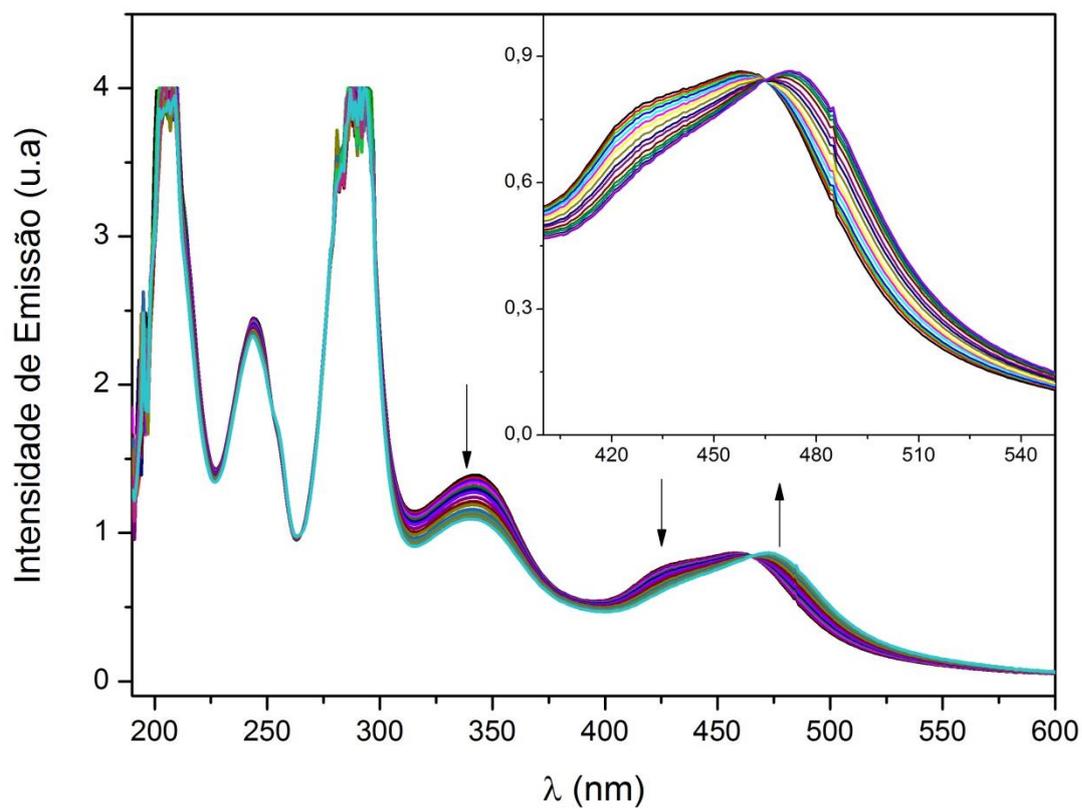


Figura A23: Espectros de absorção no UV-Vis do complexo RuEtPy em tampão Tris HCl (pH = 7,2) demonstrando a variação da banda MLCT após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 450 nm por um tempo total de 2 horas.

Apêndice

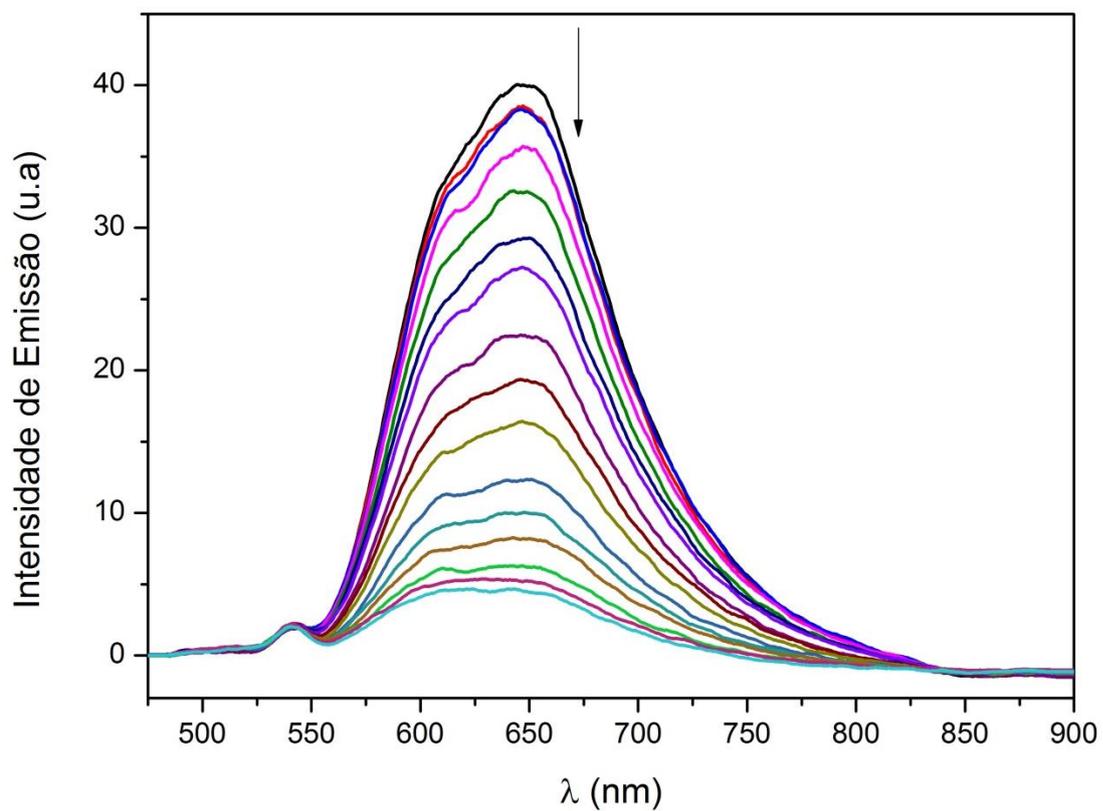


Figura A24: Espectros de emissão do complexo RuEtPy em tampão Tris-HCl (pH = 7,2) demonstrando supressão da emissão após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 450 nm por um tempo total de 2 horas.

Apêndice

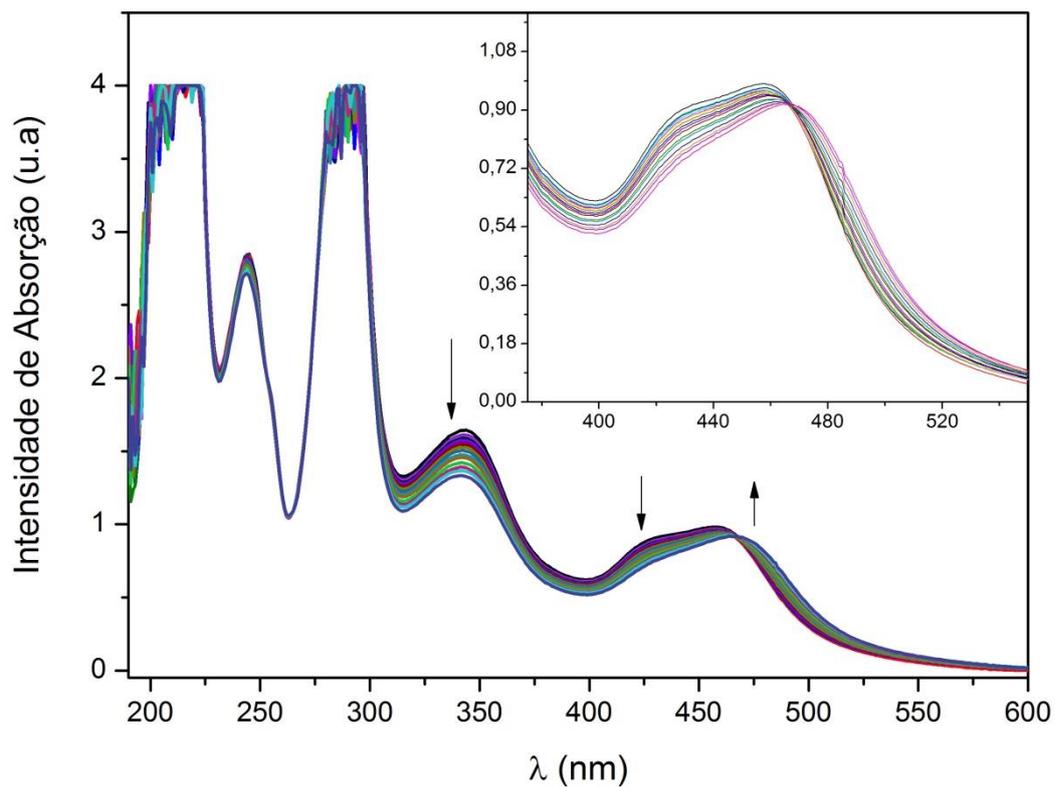


Figura A25: Espectros de absorção no UV-Vis do complexo RuEtPy em tampão Tris HCl (pH = 7,2) demonstrando a variação da banda MLCT após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 520 nm por um tempo total de 2 horas.

Apêndice

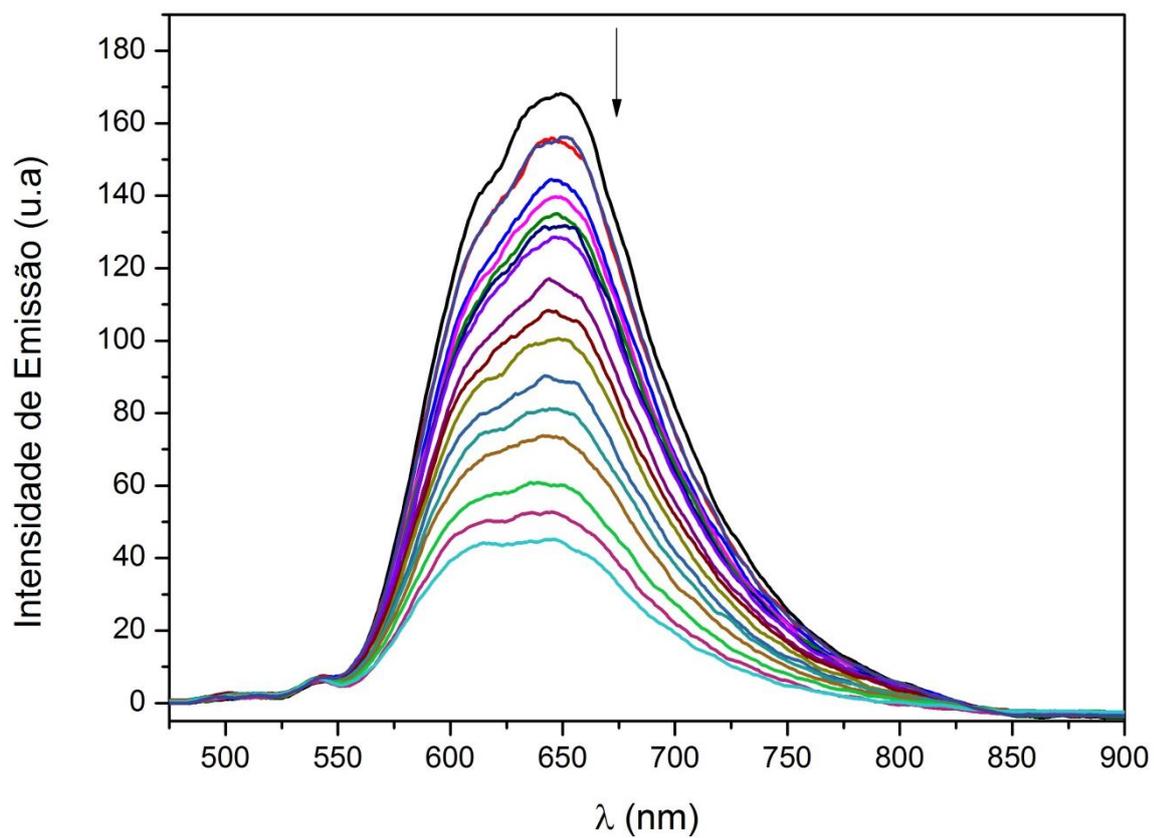


Figura A26: Espectros de emissão do complexo RuEtPy em tampão Tris-HCl (pH = 7,2) demonstrando supressão da emissão após irradiações sequenciais por um feixe de luz de 520 nm por um tempo total de 2 horas.