

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

**“COMPLEXOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO  
MULTIFUNCIONAIS PARA O TRATAMENTO E  
DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER”.**

**Débora Eduarda Soares Silva\***

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

Orientadora: Professora Dra. Rose Maria Carlos

\*bolsista FAPESP (Processo n° 2014/07935-8 )

SÃO CARLOS - SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586c Silva, Débora Eduarda Soares  
Complexos de metais de transição multifuncionais  
para o tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer  
/ Débora Eduarda Soares Silva. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
84 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Química Inorgânica. 2. Complexos de Rutênio. 3.  
Aminopiridinas. 4. Doença de Alzheimer. 5. Beta-  
amilóide. I. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Débora Eduarda Soares Silva, realizada em 29/02/2016:

*Rose Maria Carlos*

---

Profa. Dra. Rose Maria Carlos  
UFSCar

*AM C Ferreira*

---

Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira  
USP

*JBF*

---

Prof. Dr. João Batista Fernandes  
UFSCar

## DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Antonio e Maria  
de Lourdes, e meu companheiro Matheus  
pelo amor e apoio em todos os  
momentos. Amo muito vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof. Dra. Rose Maria Carlos agradeço pela orientação e confiança durante esses dois anos de trabalho.

Aos Professores Dr. Amado Siuti Ito, Dr. Manoel de Arcisio Mirando Filho e Dr. Tiago Venâncio, pela receptividade em seus laboratórios e colaboração.

Ao Prof. Douglas Wagner Franco e Dr. Maykon Lima Souza pelas medidas de EPR.

Aos colegas do LAFIB, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, como também pelos bolos e risadas.

Aos amigos de Rio Paranaíba pela amizade e apoio.

A todos os professores e funcionários que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, minha irmã Janaina, e sobrinhos Rhyan e Igor pelo incentivo, amor e apoio incondicional. Amo vocês!

Ao Matheus agradeço principalmente pelo companheirismo e pela presença em todos os momentos mesmo que separados por 500 km.

A Deus por todas as bênçãos em minha vida, e por ser minha fortaleza e porto seguro em todos os momentos! Sem a fé nada seria.

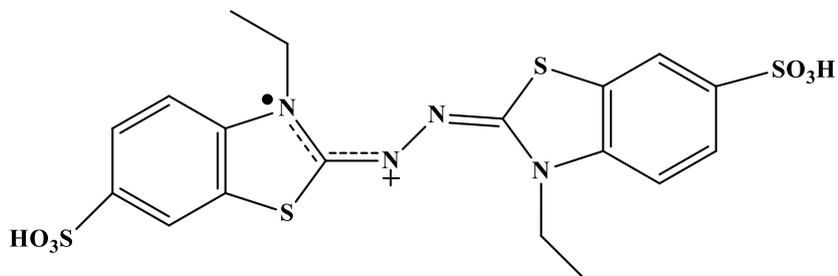
A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado no país (Processo n° 2014/07935-8).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

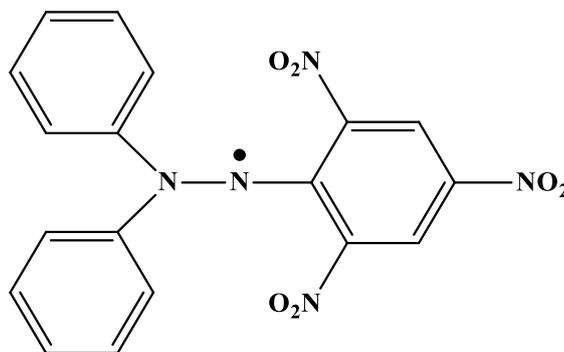
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)
ACh	Acetilcolina
ATChI	Iodeto de acetiltiocolina
BSA	Albumina bovina (do inglês, bovine serum albumin)
BuTChI	Iodeto de butiriltiocolina
DA	Doença de Alzheimer
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTNB	Ácido 5, 5' Ditiobis-[2- nitrobenzóico]
eeAChE	Enzima acetilcolinesterase da espécie <i>Electrophorus electricus</i>
FLIM	Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência
hAChE	Enzima acetilcolinesterase recombinante humana
hBuChE	Enzima butirilcolinesterase de soro humano
$K_i$	Constante de inibição
ThT	Tioflavina
STD	Diferença de Transferência de Saturação (do inglês, Saturation Transfer Difference)
$\beta$ A	Peptídeo beta-amilóide

## LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS

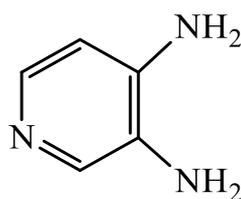
ABTS 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido-sulfônico)



DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

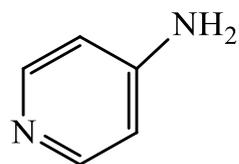
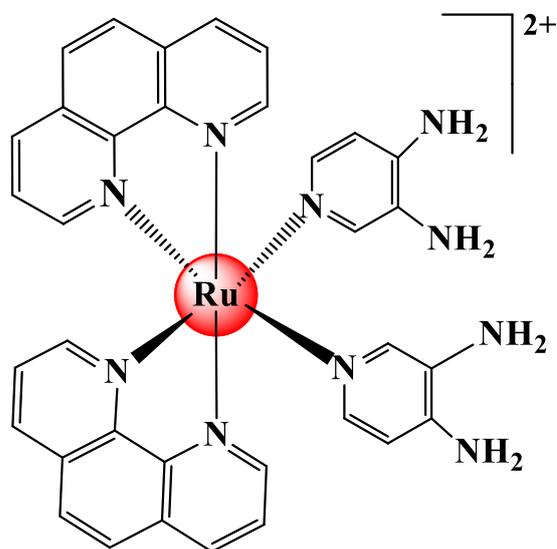
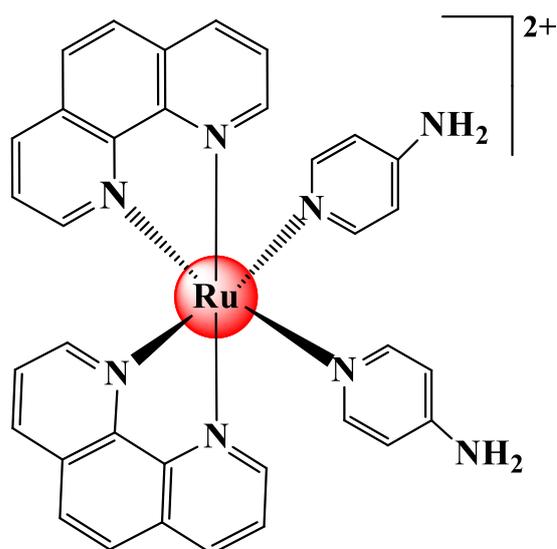


3,4-Apy 3,4-diaminopiridina



4-Apy

4-aminopiridina

 $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  $cis-[Ru(phen)_2(4-Apy)_2]^{2+}$ 

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Características estruturais das enzimas colinesterases. Fonte: SOREQ, 2001, p 294.....	3
FIGURA 1.2- Estrutura tridimensional da AChE do Torpedo californica, em destaque a tríade catalítica (PDB 1EA5).....	4
FIGURA 1.3- Modelo do processo de agregação do $\beta$ A. Fonte: KUMAR, 2011, p. 298.....	6
FIGURA 1.4- (A) Representação da estrutura da tioflavina; (B) Identificação das fibrilas do $\beta$ A a partir das propriedades de emissão no estado estacionário da ThT. Fonte: AMDURSKY, 2012, p. 1549.....	8
FIGURA 4.1- Espectros de RMN $^1\text{H}$ 600 MHz em DMSO- $\text{d}_6$ para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ , 400 MHz em DMSO- $\text{d}_6$ para 1,10-fenantrolina e 3,4-diaminopiridina.....	27
FIGURA 4.2- Espectro de absorção em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4) do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ .....	29
FIGURA 4.3- Espectros de: excitação (verde), absorção UV-Vis (vermelho), emissão a temperatura ambiente (preto, $\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm) do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). O coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) se aplica apenas ao espectro de absorção.....	31
FIGURA 4.4- Espectro de emissão do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em solução aquosa em diferentes comprimentos de onda de excitação.....	32
FIGURA 4.5- Estudo de agregação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4; $\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm).....	32
FIGURA 4.6- Curvas de decaimento de emissão para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em: (A) acetonitrila e (B) solução aquosa (tampão fosfato, pH-7,4). Os gráficos de resíduos indicam a qualidade do ajuste.....	33
FIGURA 4.7- Janela fototerapêutica de componentes biológicos.....	33
FIGURA 4.8- Espectro de emissão do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ em diferentes solventes ( $\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm).....	35

- FIGURA 4.9- Orientações dos planos do ligante 4-aminopiridina: (A) Plano do ligante localizado no centro da molécula; (B) Plano do ligante no centro do ligante fenantrolina. Fonte: CAMILO, 2014, p. 3699..... 36
- FIGURA 4.10- Comportamento da emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em soluções aquosas com diferentes valores de pH ( $\lambda_{exc} = 480$  nm)..... 37
- FIGURA 4.11- Estabilidade do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> acompanhada por RMN de <sup>1</sup>H em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4)..... 38
- FIGURA 4.12- Espectros de RMN <sup>1</sup>H do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em diferentes valores de pH obtidos imediatamente após o preparo das soluções..... 38
- FIGURA 4.13- Espectros de RMN <sup>1</sup>H do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em diferentes valores de pH obtidos após 24 h do preparo das soluções..... 39
- FIGURA 4.14- Estabilidade fotoquímica do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em acetonitrila: (A) espectro de absorção e (B) espectro de emissão (Tempo total de irradiação = 39 minutos,  $I_0 = 1 \times 10^{-8}$  einstens s<sup>-1</sup>)..... 41
- FIGURA 4.15- Estabilidade fotoquímica do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4): (A) espectro de absorção e (B) espectro de emissão (Tempo total de irradiação = 39 minutos,  $I_0 = 1 \times 10^{-8}$  einstens s<sup>-1</sup>)..... 41
- FIGURA 4.16- Ensaio de viabilidade celular MTT, células Neuro 2a expostas aos complexos: (A) *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e (B) *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> ..... 43
- FIGURA 4.17- Imagens de fluorescência confocal de varredura laser de DIC, e da sobreposição de luminescência dos complexos com a marcação de núcleo Hoechst: (A) *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e (B) *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.  $\lambda_{exc} = 450$  nm e  $\lambda_{em} = 590$  nm..... 44
- FIGURA 4.18- Estudo cinético do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com eeAChE (A) Michaelis-Menten e (B) regressão de duplo recíproco... 48
- FIGURA 4.19- Estudo cinético do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com hAChE (A) Michaelis-Menten e (B) regressão de duplo recíproco.... 48

FIGURA 4.20- Estudo cinético do complexo $cis$ -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> com hBuChE (A) Michaelis-Menten e (B) regressão de duplo recíproco....	49
FIGURA 4.21- Representação de possíveis resíduos de interação da hAChE com os complexos do trabalho.....	49
FIGURA 4.22- Espectros (A) <i>off</i> -resonance e (B) STD do complexo $cis$ -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> na presença da hAChE.....	50
FIGURA 4.23- (A) Espectro de EPR do aduto DMPO-OH gerado <i>in situ</i> pela reação de Fenton (preto) e imediatamente após a adição de 132 μmol L <sup>-1</sup> de $cis$ -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> (vermelho); (B) Porcentagem de inibição do sinal do aduto DMPO-OH em função da concentração de complexo.....	52
FIGURA 4.24- Representação da estrutura do radical DPPH <sup>•</sup> .....	53
FIGURA 4.25- (A) Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis e (B) espectro de EPR do radical DPPH <sup>•</sup> .....	53
FIGURA 4.26- Representação da estrutura do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	53
FIGURA 4.27- Espectro de absorção no UV-Vis do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	54
FIGURA 4.28 - Espectro de EPR do radical DPPH <sup>•</sup> para o controle (vermelho) e na presença do complexo $cis$ -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> (1 mmol L <sup>-1</sup> ) em diferentes tempos de reação: 15 minutos (azul); 30 minutos (rosa); 45 minutos (verde) e 60 minutos (amarelo).....	55
FIGURA 4.29- Espectro de EPR do radical DPPH <sup>•</sup> para o controle (vermelho) e na presença do ligante livre 3,4-diaminopiridina (1 mmol L <sup>-1</sup> ) em diferentes tempos de reação: 3 minutos (azul); 15 minutos (rosa) e 30 minutos (verde).....	56
FIGURA 4.30- Monitoramento do processo de agregação do peptídeo βA <sub>1-40</sub> com os complexos e com a ThT, imagens obtidas em solução. (λ <sub>exc</sub> = 470 nm).....	61
FIGURA 4.31- Imagens obtidas em filme durante o processo de agregação do peptídeo βA <sub>1-40</sub> para os complexos: (A) 1 hora e (B) 3 horas. (λ <sub>exc</sub> = 470 nm).....	62

FIGURA 4.32- Imagens obtidas em solução (A)  $t = 0$  e (B)  $t = 24\text{h}$  de agregação do peptídeo  $\beta\text{A}_{22-35}$  para o complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ , (C) imagem de espalhamento. ( $\lambda_{\text{exc}} = 470\text{ nm}$ )..... 64

FIGURA 4.33- Imagens obtidas em solução (A)  $t = 0$  e (B)  $t = 24\text{h}$  de agregação do peptídeo  $\beta\text{A}_{15-21}$  para o complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ . ( $\lambda_{\text{exc}} = 470\text{ nm}$ )..... 64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1- Soluções utilizadas nos estudos de inibição enzimática.....	19
TABELA 3.2- Soluções utilizadas no estudo do radical hidroxila.....	21
TABELA 4.1- Análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> considerando a fórmula mínima C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> F <sub>12</sub> N <sub>10</sub> P <sub>2</sub> Ru.....	25
TABELA 4.2- Dados dos espectros de RMN <sup>1</sup> H, COSY e HSQC (600 MHz) para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> em DMSO-d <sub>6</sub> .....	26
TABELA 4.3- Dados dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis para complexos de Ru(II).....	29
TABELA 4.4- Tempos de vida de emissão para o complexo <i>cis</i> -Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> <sup>2+</sup> .....	33
TABELA 4.5- Dados do espectro de emissão e rendimento quântico de emissão do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> em diferentes solventes.	36
TABELA 4.6- Solubilidade dos complexos em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4).....	42
TABELA 4.7- Dados de inibição enzimática para uma série de compostos.	47
TABELA 4.8- Valores de IC <sub>50</sub> no estudo do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	56

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1- Representação do desenvolvimento do estresse oxidativo.....	5
ESQUEMA 3.1- Hidrólise do substrato acetiltiocolina catalisada pela enzima AChE.....	18
ESQUEMA 3.2- Formação do íon TNB.....	18
ESQUEMA 3.3- Hidrólise do substrato butiriltiocolina catalisada pela enzima BuChE.....	18
ESQUEMA 3.4- Esquema da metodologia empregada nos estudos de inibição.....	20
ESQUEMA 3.5- Esquema da metodologia usada no estudo do processo de agregação do peptídeo $\beta$ A.....	24
ESQUEMA 4.1- Reação de Fenton.....	51
ESQUEMA 4.2- Formação do aduto DMPO-OH.....	51
ESQUEMA 4.3- Possível modelo para redução do radical OH $\cdot$ pelo complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) $_2$ (3,4-Apy) $_2$ ] $^{2+}$ .....	57

## RESUMO

### COMPLEXOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO MULTIFUNCIONAIS PARA O TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Este trabalho descreve a síntese e caracterização dos complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(L)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, em que phen = 1,10-fenantrolina; L= 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina, assim como resultados *in vitro* para o diagnóstico e tratamento da DA. Os complexos são estáveis e solúveis em solução aquosa, absorvem ( $\lambda_{\text{máx}} = 480 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 9500 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) e emitem ( $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$ ,  $\tau = 129 \text{ ns}$ ;  $1,3 \text{ ns}$ ) na região do visível, e apresentam deslocamento de Stokes na ordem de  $5000 \text{ cm}^{-1}$ . A luminescência dos complexos foi incorporada no citoplasma de células Neuro 2a, e não apresentaram danos aparentes a integridade da membrana celular, a morfologia e citotoxicidade ( $\text{IC}_{50} \gg 50 \text{ }\mu\text{M}$ ). A atividade inibitória dos complexos foi avaliada para as enzimas acetilcolinesterase recombinante humana (hAChE) e butirilcolinesterase de soro humano (BuChE) empregando o método espectrofotométrico proposto por Ellman. Os complexos são quatro vezes mais potentes na inibição da enzima AChE do que da BuChE, e a análise de Lineweaver-Burk indicou uma inibição reversível e do tipo mista para os dois complexos. A capacidade antioxidante dos complexos foi investigada a partir da análise do sequestro do radical hidroxila, e também empregando os modelos de radicais estáveis DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]). O complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> apresentou boa habilidade antioxidante frente aos radicais testados. A luminescência dos complexos foi utilizada para monitorar em tempo real a agregação do  $\beta\text{A}_{1-40}$  com o uso da técnica FLIM. Sob as mesmas condições experimentais, os complexos se ligam ao  $\beta\text{A}_{1-40}$  e ao centro hidrofóbico  $\beta\text{A}_{15-21}$ , mas não ao  $\beta\text{A}_{22-35}$ , no qual os resíduos apolares Val18 e Phe20 estão ausentes, o que indica que os complexos podem reconhecer e alinhar locais específicos do peptídeo  $\beta\text{A}$ .

## ABSTRACT

### MULTIFUNCTIONAL TRANSITION METAL COMPLEXES TO TREATMENT AND DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

This work describes the synthesis and characterization of complexes *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(L)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, where phen = 1,10-phenanthroline; L = 3,4-diaminopyridine and 4-aminopyridine, as well results for *in vitro* AD diagnosis and treatment. The complexes are soluble and stable in aqueous solution, display absorption ( $\lambda_{\max}$  = 480 nm;  $\epsilon$  = 9500 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) and emission ( $\lambda_{\text{em}}$  = 650 nm;  $\tau$  = 129 ns, 1.3 ns) in the region visible, and Stokes shift about 5000 cm<sup>-1</sup>. The luminescence of the complexes was incorporated into the cytoplasm of Neuro 2a cells, and showed no apparent damage of cell membrane integrity, morphology, and cytotoxicity (IC<sub>50</sub> >> 50  $\mu$ M). The inhibitory activity of complexes was evaluated for human recombinant acetylcholinesterase (hAChE) and butyrylcholinesterase from human serum (hBuChE) using the spectrophotometric method proposed by Ellman. The complexes are 4-fold more potent to hAChE than hBuChE, and the Lineweaver-Burk analysis indicated a reversible and mixed-type inhibition for both complexes. The antioxidant capacity of complexes was evaluated from the analysis of hydroxyl radical scavenging, and using the stable radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) and the 2,2-azinobis-3ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (ABTS<sup>•+</sup>). The complex *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> showed a great antioxidant ability against the tested radicals. We used the luminescence of complexes to monitor in real time the self-aggregation of A $\beta$ <sub>1-40</sub> with the FLIM technique. Under the same experimental conditions, the complexes bind to A $\beta$ <sub>1-40</sub> and to central hydrophobic core A $\beta$ <sub>15-21</sub>, but not to A $\beta$ <sub>22-35</sub>, that lacks the apolar Val18 and Phe20 residues, this indicates that the complexes can recognize and align specific sites of the A $\beta$  peptide.

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1- A doença de Alzheimer</b> .....	1
<b>1.2- Causas da doença</b> .....	1
1.2.1- Fator colinérgico .....	2
1.2.2- Estresse oxidativo .....	5
1.2.3- Fator genético .....	6
<b>1.3- Proposta do trabalho</b> .....	10
<b>1.4- Justificativa</b> .....	10
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	11
<b>2.1 - Geral</b> .....	11
<b>2.2 - Específicos</b> .....	11
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	12
<b>3.1- Reagentes</b> .....	12
<b>3.2- Síntese dos complexos</b> .....	13
3.2.1- Preparação do precursor <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (phen) <sub>2</sub> ] .....	13
3.2.2- Preparação dos complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (Apy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	13
<b>3.3 - Equipamentos e Metodologia</b> .....	14
3.3.1- Análise Elementar .....	14
3.3.2- Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis .....	14
3.3.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	14
3.3.4- Luminescência .....	14
3.3.5- Rendimento quântico de emissão .....	14
3.3.6- Tempo de vida de emissão .....	15
3.3.7- Solubilidade .....	15

3.3.8- Citotoxicidade e distribuição no meio celular .....	16
3.3.9- Estudos de inibição das enzimas colinesterases .....	17
3.3.10- Avaliação da interação complexo-enzima por RMN- STD .....	20
3.3.11- Estudo da capacidade antioxidante.....	21
3.3.11.1- Radical hidroxila.....	21
3.3.11.2- Radical DPPH* .....	22
3.3.11.3- Radical ABTS <sup>+</sup> .....	22
3.3.12- Microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência (FLIM) .....	23
3.3.13- Estudos do processo de agregação do peptídeo $\beta$ A .....	23
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1- Caracterização por análise elementar .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2- Caracterização por RMN.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3- Propriedades Espectroscópicas .....</b>	<b>28</b>
4.3.1- Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis.....	28
4.3.2- Espectro de Emissão, Tempo de vida de emissão e Rendimento Quântico de Emissão.....	30
<b>4.4- Estabilidade do complexo .....</b>	<b>37</b>
4.4.1- Ausência de luz.....	37
4.4.2- Irradiação com luz contínua .....	39
<b>4.5- Solubilidade .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6- Citotoxicidade e distribuição no meio celular .....</b>	<b>42</b>
<b>4.7- Atividade terapêutica .....</b>	<b>44</b>
4.7.1- Inibição das enzimas colinesterases .....	44
4.7.2- Capacidade antioxidante.....	50
4.7.2.1- Capacidade sequestradora do radical hidroxila.....	51

4.7.2.2- Estudo dos radicais DDPH <sup>•</sup> e ABTS <sup>•+</sup> .....	52
<b>4.8- Diagnóstico</b> .....	<b>58</b>
4.8.1- Monitoramento do processo de agregação do peptídeo $\beta A_{1-40}$ .....	58
4.8.2- Monitoramento do processo de agregação dos fragmentos $\beta A_{15-21}$ e $\beta A_{22-35}$ .....	62
<b>5- CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>6- REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1- A doença de Alzheimer**

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e é responsável pelo declínio progressivo do funcionamento do organismo de uma pessoa.<sup>1</sup> Ela é caracterizada pelo déficit das funções cognitivas levando ao comprometimento da capacidade motora e raciocínio. Os danos neurais são lentos e progressivos, e geralmente iniciam-se pela perda de memória de curto prazo.<sup>2</sup> Os danos progridem até o momento que o paciente é incapaz de recordar de momentos de sua vida bem como de seus familiares e, assim, o paciente necessita de cuidados especiais por período integral.<sup>2</sup> Além do impacto na vida da família, também acarreta elevados gastos econômicos. Com o aumento da expectativa de vida, a incidência da DA também aumenta.<sup>3</sup> Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer, existe mais de um milhão de casos no Brasil, grande parte ainda não diagnosticada.<sup>4</sup> Esses fatores tornam relevante o estudo sobre a doença, e tanto o diagnóstico quanto o tratamento nos estágios iniciais da doença são os alvos de pesquisa que mais atraem a comunidade científica.<sup>5</sup>

### **1.2- Causas da doença**

Devido à natureza multifatorial da doença, as causas do desencadeamento da mesma não são claramente conhecidas,<sup>6</sup> mas três fatores se destacam: o fator colinérgico, o genético e o estresse oxidativo. Tais fatores são extensamente explorados na busca do tratamento e diagnóstico da doença, e são descritos a seguir.<sup>7,8,9</sup>

### 1.2.1- Fator colinérgico

O fator colinérgico é baseado na perda seletiva de neurônios colinérgicos e isto acarreta uma deficiência nos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh).<sup>10</sup> As enzimas colinesterases são responsáveis pelo controle dos níveis do neurotransmissor ACh no cérebro, degradando-o em acetato e colina. Duas enzimas colinesterases são encontradas no cérebro, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE), as quais se diferenciam principalmente quanto a especificidade pelo substrato acetilcolina. A enzima AChE é principalmente encontrada nos neurônios e é altamente específica ao substrato ACh, enquanto que a enzima BuChE está associada às células da glia e apresenta baixa especificidade ao substrato ACh.<sup>11</sup> Em um cérebro saudável, a AChE é responsável por 80% do controle dos níveis do neurotransmissor ACh, por outro lado, a BuChE tem uma pequena contribuição.<sup>11</sup> Estudos demonstraram que em estágios avançados da doença de Alzheimer a atividade da AChE é reduzida, e um aumento na atividade da BuChE é observado como uma ação de compensação.<sup>12</sup> As duas enzimas colinesterases possuem papéis importantes no desenvolvimento e progresso da DA.

A enzima AChE de origem do *Torpedo californica* (TcAChE) foi a primeira colinesterase que teve sua estrutura tridimensional determinada por difração de raio-X em 1991.<sup>13</sup> Geralmente, a estrutura da AChE de diferentes espécies são bastante conservadas, a TcAChE tem mais de 60% de identidade em comparação com a AChE de mamíferos.<sup>14</sup>

A enzima AChE é constituída por dois sítios de ligação, o ativo e o periférico. O sítio ativo de ligação é localizado na parte inferior de uma cavidade estreita e profunda, denominada “cavidade aromática”, a qual é composta principalmente por anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos Ser200, His440 e Glu327 (na TcAChE) constituintes do sítio ativo são essenciais para a atividade catalítica da enzima, e são denominados “tríade

catalítica”. O sítio aniônico periférico é localizado na parte superior da cavidade aromática, apesar de não participar diretamente da atividade catalítica da enzima, este está envolvido na ligação de inibidores a enzima.<sup>15</sup> As Figuras 1.1 e 1.2 representam as características estruturais das enzimas colinesterases e a estrutura tridimensional da TcAChE, respectivamente.

Cinco principais regiões podem ser destacadas na estrutura da enzima AChE humana (hAChE). O sítio aniônico periférico (resíduos Tyr72, Tyr 124, Tyr 341, Asp74 e Trp286), a bolsa acil (resíduos Phe297, Phe295 e Phe338), o sítio esterásico (resíduos Ser203, His447 e Glu202), o buraco oxianiônico (resíduos Gly121, Gly122 e Ala204) e o subsítio aniônico (resíduos Trp86 e Glu202).<sup>16</sup>

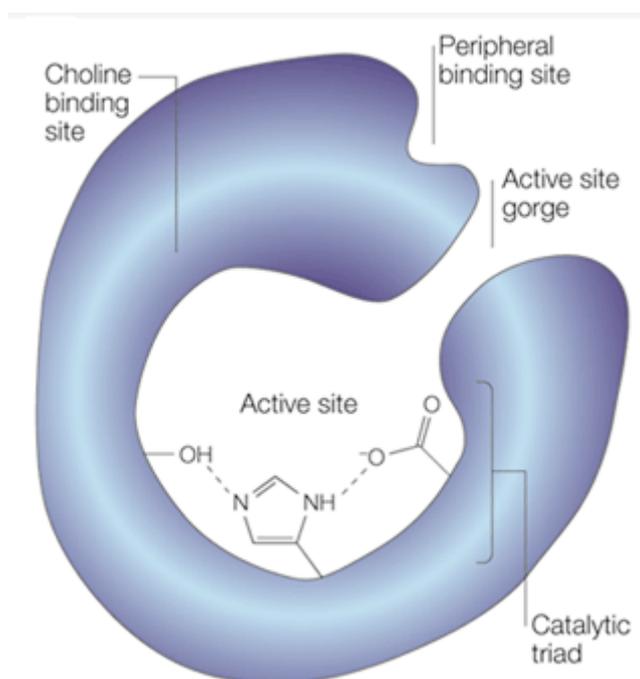


FIGURA 1.1- Características estruturais das enzimas colinesterases. Fonte: SOREQ, 2001, p 294.<sup>17</sup>

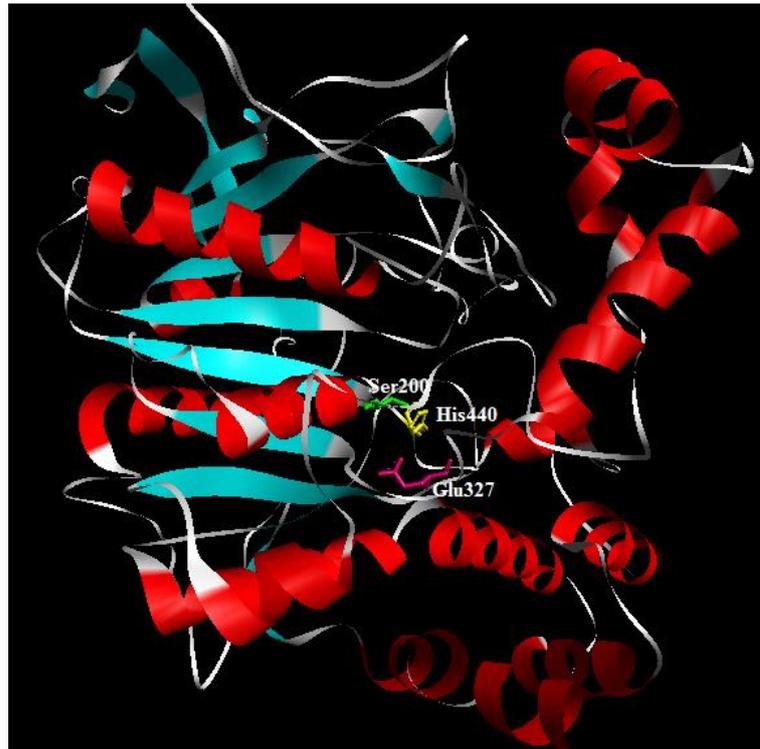


FIGURA 1.2- Estrutura tridimensional da AChE do Torpedo californica, em destaque a tríade catalítica (PDB 1EA5).

Além da função colinérgica, Inestrosa<sup>18</sup> e colaboradores demonstraram que a enzima AChE acelera a formação dos depósitos do peptídeo  $\beta$ -amilóide pela formação de um complexo estável  $A\beta$ -AChE. E que esta função não colinérgica da AChE envolve seu sítio aniônico periférico.

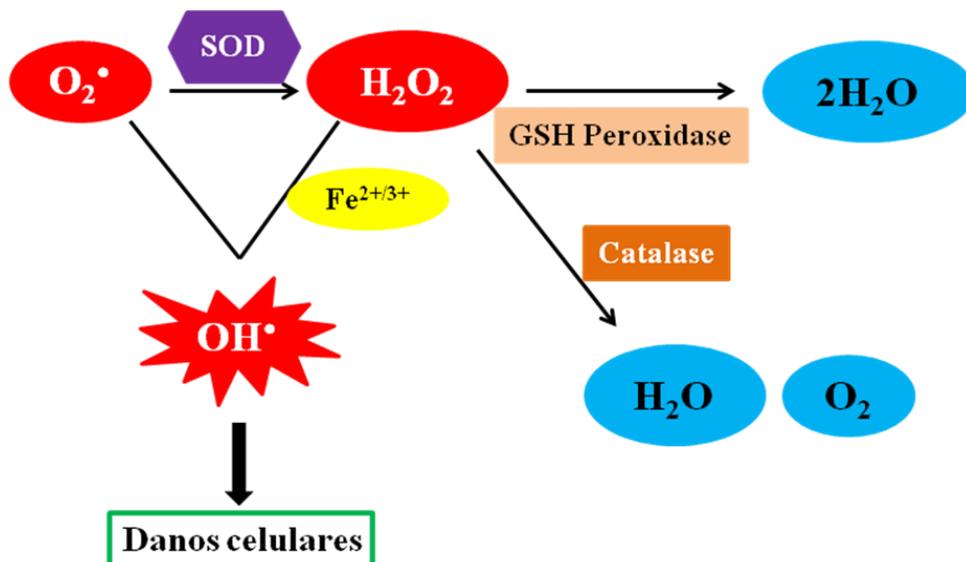
Uma estratégia para o tratamento da doença de Alzheimer é baseada na inibição das enzimas colinesterases, elevando os níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Inibidores comerciais das enzimas colinesterases como tacrina,<sup>19</sup> donepezil<sup>20</sup> e rivastigmina<sup>21</sup> são inibidores potentes, entretanto, apresentam inconvenientes como severos efeitos colaterais. Logo, a pesquisa por novos inibidores é de grande interesse.

### 1.2.2- Estresse oxidativo

O elevado consumo de oxigênio, alto teor de lipídeos e baixo nível de enzimas antioxidantes tornam o cérebro particularmente suscetível aos danos provocados pelos radicais livres.<sup>22</sup> O excesso da formação de radicais livres e seus produtos, ou falha no mecanismo de defesa antioxidante resulta no estresse oxidativo.<sup>22</sup> Sendo que esse estado pode ser estimado pelo acúmulo de produtos de oxidação, Esquema 1.1.

Os neurônios são células pós-mitóticas que acumulam danos oxidativos ao longo do tempo indicando uma relação direta entre o estresse oxidativo com as doenças neurodegenerativas.<sup>22</sup>

O papel do estresse oxidativo na doença de Alzheimer está relacionado com o desequilíbrio da homeostase de íons metálicos, em particular alterações nos níveis de zinco, ferro e cobre, os quais favorecem a produção das espécies reativas do oxigênio (ROS).<sup>23,24</sup> Em cérebros de pacientes de DA foram detectados um aumento considerável nos níveis destes íons metálicos quando comparados ao cérebro de pessoas com a mesma idade saudáveis.<sup>25</sup> Também, estes metais desempenham funções relevantes na agregação do peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A), assim como também favorecem a produção de ROS a partir da associação do  $\beta$ A com íons  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>26,27,28,29,30</sup>



ESQUEMA 1.1- Representação do desenvolvimento do estresse oxidativo.

### 1.2.3- Fator genético

Nos últimos anos, observa-se um grande esforço da comunidade científica em estudar as fases bioquímicas do processo de agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide devido as suas implicações no desenvolvimento e progresso da DA.<sup>31</sup> O papel desse peptídeo na DA é estabelecido pelo seu acúmulo ao longo do tempo como monômeros solúveis, oligômeros, protofibrilas e fibrilas maduras que se depositam como placas insolúveis em regiões específicas do cérebro, a Figura 1.3 representa um modelo do processo de agregação do  $\beta$ A.

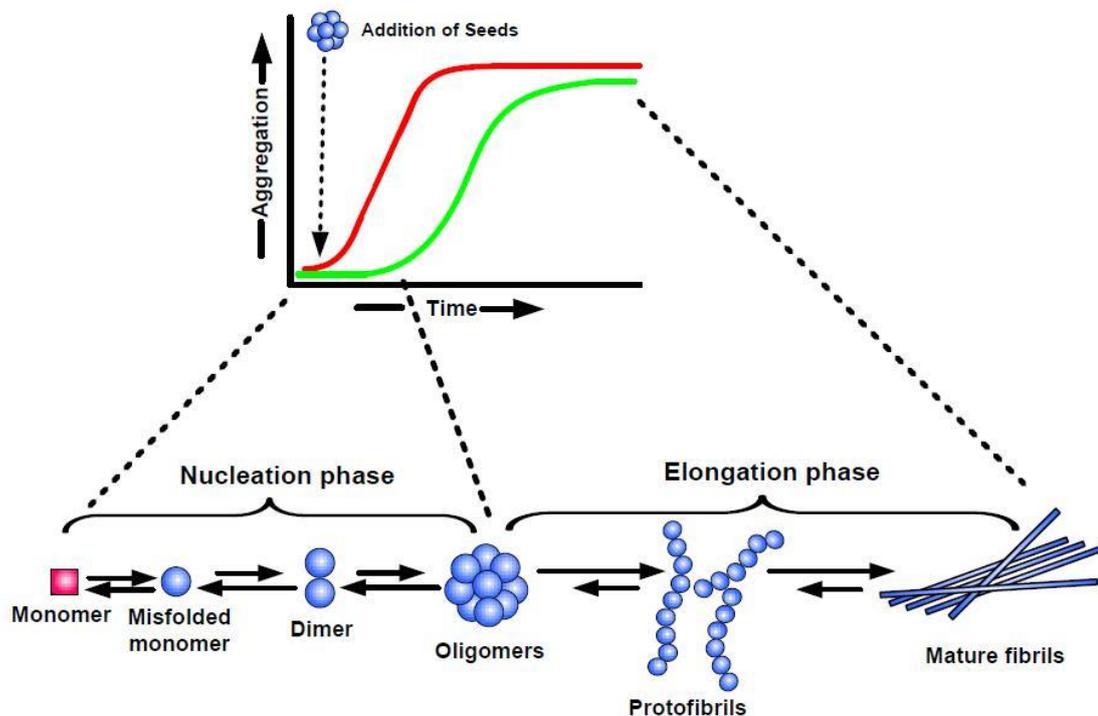


FIGURA 1.3- Modelo do processo de agregação do  $\beta$ A. Fonte: KUMAR, 2011, p. 298.<sup>32</sup>

As placas amilóides podem perturbar a função normal do cérebro alterando a plasticidade sináptica,<sup>31</sup> ou através da promoção de um processo inflamatório local da microglia e astrócitos,<sup>33</sup> danos oxidativos,<sup>9</sup> desregulação da homeostase<sup>34</sup> de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que leva a uma perda gradual e progressiva sináptica, a morte neuronal e declínio cognitivo.<sup>6</sup> O saldo líquido entre a produção e

remoção de depósitos do  $\beta$ A determina o grau de danos neuronais no cérebro e a fase da DA.<sup>35</sup>

Por esta razão, existe um grande interesse em estratégias para identificar os depósitos do peptídeo  $\beta$ -amilóide.<sup>8</sup> Esta é uma questão importante, uma vez que um diagnóstico definitivo da DA pode ser realizado apenas por biopsia ou autópsia.<sup>36</sup> Além disso, os compostos capazes de reconhecer as fases iniciais da agregação, em particular na forma oligomérica neurotóxica do  $\beta$ A<sup>5,37</sup> são de grande importância para a elucidação da dinâmica da agregação do  $\beta$ A e, conseqüentemente, para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes em estágios iniciais da doença.

Uma das primeiras sondas luminescentes desenvolvidas para o diagnóstico do  $\beta$ A foi a Tioflavina (ThT),<sup>38</sup> Figura 1.4(A). A propriedade fluorescente “light-switching” na presença do  $\beta$ A é rotineiramente utilizada para caracterização das fibrilas do  $\beta$ A em células e tecidos por medidas de fluorescência no estado estacionário, Figura 1.4(B).<sup>39</sup> Entretanto, essa sonda não é capaz de detectar os oligômeros e protofibrilas, os quais são considerados responsáveis pela neurotoxicidade do peptídeo  $\beta$ A.<sup>40</sup> Suas propriedades espectroscópicas como absorção e emissão na região do UV, pequeno deslocamento de Stokes e tempo de vida de emissão curto são fatores limitantes para aplicação biológica. Além disso, a baixa absorção pela barreira cerebral e problemas sobre especificidade limitam sua aplicação em ensaios *in vivo*.<sup>41</sup>

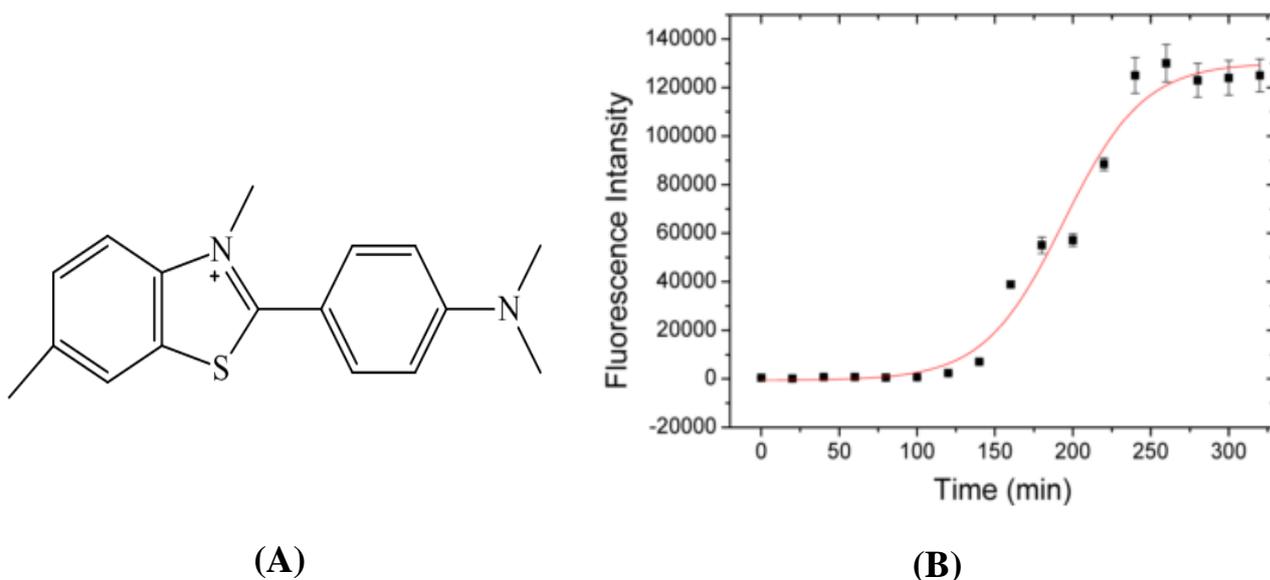


FIGURA 1.4- (A) Representação da estrutura da tioflavina; (B) Identificação das fibrilas do  $\beta$ A a partir das propriedades de emissão no estado estacionário da ThT. Fonte: AMDURSKY, 2012, p. 1549.<sup>42</sup>

Nos últimos anos, derivados mais sensíveis da ThT ligados a isótopos radioativos de carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ) e flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ) têm sido investigados a partir da técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET).<sup>43,44,45,46</sup> Entre eles, o composto-B de Pittsburgh, ( $^{11}\text{C}$ -PIB),<sup>47,48</sup> e os compostos ( $^{18}\text{F}$ -AZD4694),<sup>49</sup>  $^{18}\text{F}$ -FPIB,<sup>50</sup> ( $^{123}\text{I}$ -IMPY)<sup>51</sup> demonstraram bons resultados em ensaios clínicos.  $^{18}\text{F}$ -FPIB (visamyl<sup>TM</sup>) foi aprovado pela FDA para diagnóstico por imagem do  $\beta$ A e estimativa da densidade de placas neuríticas.<sup>52,53,54,55,56,57,58,59</sup>

Muitos exemplos de compostos radioativos baseados em complexos metálicos, tais como de  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}$ ,  $\text{Re}^{\text{V}}$  e  $^{64}\text{Cu}$  também foram investigados como uma alternativa aos radionuclídeos C-11 e F-18.<sup>60</sup>

O bis(aminoetanotiol) e complexos quelatos de ditiol monoamina-monoamida de centro metálico radionuclídeo  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}$  e  $\text{Re}^{\text{V}}$  contendo derivados de benzotiazol,<sup>61</sup> benzofurano,<sup>62</sup> chalconas, flavonas,<sup>63</sup> naftaleno,<sup>64</sup> aurona e dibenzilidenoacetona<sup>65</sup> foram sintetizados para se ligarem às placas do  $\beta$ A, e a maioria deles exibem alta absorção pela barreira cerebral. Complexos de

radionuclídeo de cobre,  $^{64}\text{Cu}$ , combinados com ligantes tiosemicarbazona<sup>66</sup> e benzotiazola ou estirilpiridina, marcadores fluorescentes, também foram relatados para diagnóstico por imagem e toxicidade das placas do  $\beta\text{A}$ .<sup>67</sup>

Complexos carbonílicos de  $\text{Re(I)}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc(I)}$  e  $^{99}\text{Tc(I)}$  contendo um grupo pentadentado conjugado com um quelato tridentado, por exemplo, benzotiazola, curcumina e um ligante lábil coordenado ao centro metálico, tais como água ou grupos fosfinas, também foram investigados.<sup>68,69</sup>

Resultados semelhantes têm sido encontrados para complexos não-radiativos de amina tetra coordenada de  $\text{Cu(II)}$  e  $\text{Pt(II)}$  com ligantes lábeis cloreto. Os locais de ligação preferidos para estes centros metálicos são os resíduos de imidazol em His6, His13, e His14 do  $\beta\text{A}$ , possivelmente devido à perda de um ou mais ligantes cloreto.<sup>70,71,72</sup>

Tendo em vista estas propriedades, complexos de  $\text{Ru(III)}$  como NAMI-A, ( $[\text{Him}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{im})]$ , im = imidazol), KP1019, ( $[\text{Hind}][\text{trans-RuCl}_4(\text{ind})_2]$ , ind = indazole) e o seu análogo de  $\text{Na}^+$  (KP1339) têm sido investigados.<sup>73</sup> Embora NAMI-A e KP1339 estejam atualmente em ensaios clínicos devido às suas propriedades antitumorais,<sup>74,75,76,77</sup> eles foram inativos ou exibiram baixa atividade contra ligação e toxicidade do  $\beta\text{A}$ .

Em contraste, o complexo de  $\text{Ru(II)}$ , *fac*- $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2\text{thz}]$ , em que thz = 1,3-tiazol, interage fortemente com  $\beta\text{A}_{1-28}$  produzindo uma ligação estável  $\text{Ru-}\beta\text{A}_{1-28}$  a partir da perda dos ligantes cloreto e thz.<sup>78</sup>

Complexos polipiridínicos de  $\text{Ru(II)}$  são particularmente interessantes devido as suas propriedades espectroscópicas únicas, as quais podem fornecer oportunidades valiosas para aplicações como sonda e bio-imagem.<sup>79,80,81,82,83</sup>

Um estudo recente explora isto em detalhes para o complexo  $\text{Ru}(\alpha\text{-diimina})\text{dppz}$ ,  $\alpha\text{-diimina}$  = 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina e dppz = dipirido [3,2-a: 2', 3'-c]-fenazina.<sup>84,85</sup> Em particular, Marti e colaboradores, propuseram, a partir de um modelo experimental cinético de três estágios para a fibrilização

do  $\beta A_{1-40}$  e uma modelagem computacional, que o Ru liga-se a uma fenda hidrofóbica, formada sobre a superfície das fibrilas do  $\beta A$  entre os resíduos Val18 e Phe20. Esta interação é responsável pela propriedade “light-switching” do complexo na presença das fibrilas do  $\beta A$  em solução aquosa.

### 1.3- Proposta do trabalho

Diante da natureza multifatorial da doença de Alzheimer, a melhor estratégia é abordar os diferentes fatores na busca de um composto teranóstico, ou seja, para o tratamento e diagnóstico da doença, e em particular que atue nos estágios iniciais da doença. Neste contexto, a proposta deste trabalho consistiu no desenvolvimento de complexos de Ru(II) luminescentes para o diagnóstico e tratamento da DA. Para isso, coordenou-se ao centro metálico Ru(II) duas moléculas do ligante bidentado 1,10-fenantrolina (phen) e duas moléculas da família das aminopiridinas (3,4-diaminopiridina ou 4-aminopiridina).

### 1.4- Justificativa

A natureza multifatorial da doença de Alzheimer tem despertado um extenso interesse no desenvolvimento de agentes terapêuticos que atuem em diferentes níveis da patologia.<sup>7,86</sup> Grande parte do interesse tem se concentrado sobre os inibidores das colinesterases,<sup>87,88,89,90,91,92</sup> e danos oxidativos, embora os agentes anti-agregação do amiloide, a modulação da proteína tau e colesterol também têm sido extensivamente estudadas. Neste contexto, a função desempenhada pelas aminopiridinas no sistema cognitivo e colinérgico,<sup>93,94</sup> nos motivou a investigar os efeitos dos complexos sobre a atividade das colinesterases.

A escolha do fragmento  $\{Ru(phen)_2\}^{2+}$  foi planejada considerando a estrutura hidrofóbica e planar da fenantrolina que pode contribuir para interações hidrofóbicas com alvos biológicos. Este fragmento oferece também

transições eletrônicas de natureza de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT,  $\text{Ru(II),}\pi\rightarrow\text{phen},\pi^*$ ) favorecendo propriedades de luminescência ao complexo.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 - Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de complexos de Ru(II) luminescentes para o diagnóstico nos estágios iniciais da doença de Alzheimer e seu tratamento.

### 2.2 - Específicos

- Sintetizar os complexos  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{Apy})_2]^{2+}$ , em que phen = 1,10-fenantrolina, Apy = 3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina;
- Caracterizar os complexos por análise elementar e RMN de  $^1\text{H}$ ;
- Investigar as propriedades espectroscópicas;
- Avaliar a solubilidade e estabilidade dos complexos em solução aquosa;
- Investigar o potencial de inibição dos complexos frente às enzimas colinesterases;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos complexos;
- Investigar a interação dos complexos com o peptídeo  $\beta$ -amilóide.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Reagentes

Os compostos  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , cloreto de lítio ( $\text{LiCl}$ ), 1,10-fenantrolina (phen), 3,4-diaminopiridina (3,4-Apy), 4-aminopiridina (4-Apy) e hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ) todos de procedência Sigma-Aldrich, foram utilizados como reagentes nas sínteses dos complexos. Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e fosfato de potássio tribásico ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ), todos de procedência Sigma-Aldrich foram utilizados no preparo das soluções tampão. Os solventes orgânicos usados são de grau de pureza HPLC e as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q.

Os compostos Trizma cloridrato (Tris/HCl), Soro albumina bovina (BSA), iodeto de acetiltiocolina (ATChI), iodeto de butiriltiocolina (BuTChI), acetilcolinesterase da espécie *Electrophorus electricus* (eeAChE), acetilcolinesterase recombinante humana (hAChE), butirilcolinesterase de soro humano (hBuChE), ácido 5,5'-ditiobis(nitrobenzóico) (DTNB) de procedência Sigma-Aldrich foram empregados nos estudos de inibição enzimática.

Os compostos 5,5-dimetil-1-pirrolidina-N-óxido (DMPO, Sigma-Aldrich), sulfato de ferro(II) (Merck), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), sal de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), Sigma-Aldrich], persulfato de potássio (Sigma-Aldrich) foram utilizados na avaliação da capacidade antioxidante dos complexos.

No monitoramento do processo de agregação do  $\beta\text{A}$  todos os peptídeos utilizados são de procedência GenScript. Foram empregados os fragmentos  $\beta(1-40)$ ,  $\beta(22-35)$  e  $\beta(15-21)$ .

## 3.2- Síntese dos complexos

### 3.2.1- Preparação do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>]

O complexo precursor foi preparado pelo procedimento descrito na literatura.<sup>95</sup> 0,38 mmols de RuCl<sub>3</sub>•3H<sub>2</sub>O, 0,76 mmols de 1,10-fenantrolina e 2,6 mmols de cloreto de lítio foram solubilizados em 15 mL de dimetilformamida previamente desaerado. A mistura reacional foi mantida em refluxo por oito horas em atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência de luz. Após esse período o sistema foi resfriado a temperatura ambiente. Na sequência, adicionou-se 200 mL de acetona previamente destilada e resfriada. A mistura foi conservada sob refrigeração por uma noite para assegurar a precipitação total. O sólido obtido foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada até que a água mãe ficasse incolor. O complexo de coloração roxa foi seco e o rendimento calculado foi de 58%.

### 3.2.2- Preparação dos complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(Apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>

Os complexos foram preparados a partir de 0,1 mmol do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>] e 0,2 mmols de ligante aminopiridina (3,4-diaminopiridina ou 4-aminopiridina) solubilizados em 10 mL de uma mistura etanol/água (1:1) previamente desaerada e sob agitação contínua. O sistema foi mantido sob refluxo por oito horas sob atmosfera de nitrogênio puro, agitação e ausência de luz. Após esse período o sistema foi resfriado e adicionou-se 0,2 mmols do contra íon hexafluorfosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>). A mistura permaneceu sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo. Este foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. O complexo vermelho foi seco e o rendimento calculado foi de 65%.

### **3.3 - Equipamentos e Metodologia**

#### 3.3.1- Análise Elementar

Para a determinação da porcentagem (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio foi utilizado um analisador de C, H e N modelo EA 1108 da FISOONS, na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

#### 3.3.2- Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro Agilent 8453A. Utilizaram-se celas de quartzo de 10,0 mm de caminho óptico e 3,5 mL de capacidade.

#### 3.3.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz e 600 MHz pertencentes ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

#### 3.3.4- Luminescência

Os espectros de emissão e de excitação foram obtidos por meio da utilização de um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

#### 3.3.5- Rendimento quântico de emissão

O rendimento quântico de emissão é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos por um

determinado composto. Este pode ser determinado por comparação com um padrão conhecido na literatura,<sup>96</sup> como  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , a partir da equação<sup>97</sup>:

$$\Phi_{\text{am}} = \Phi_{\text{std}} (I_{\text{am}}/A_{\text{am}}) (A_{\text{std}}/I_{\text{std}}) (\eta_{\text{am}}/\eta_{\text{std}})^2$$

em que  $A_{\text{am}}$ ,  $A_{\text{std}}$  são as absorvâncias da amostra e do padrão em um mesmo comprimento de onda;  $I_{\text{am}}$ ,  $I_{\text{std}}$  são as intensidades integradas de emissão da amostra e do padrão;  $\eta_{\text{am}}$ ,  $\eta_{\text{std}}$  são os índices de refração dos solventes<sup>98,99</sup> usados no preparo das soluções da amostra e do padrão.

### 3.3.6- Tempo de vida de emissão

Os experimentos de tempo de vida de emissão foram realizados no laboratório de Fotobiofísica da FFCLRP – USP junto ao grupo do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito. A fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami 3950* (*Spectra Physics*) de titânio-safira (Ti:sapphire) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*), de Nd:YVO<sub>4</sub>, que tem saída com potência máxima de 10W no comprimento de onda 350 nm. O método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) foi usado para determinar o tempo de vida de emissão. O software F900 foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais de decaimento a funções multiexponenciais, baseado no método de ajustes de funções não lineares por mínimos quadrados. A qualidade do ajuste realizado pelo software foi avaliado pelo parâmetro estatístico  $\chi^2$  (chi-square).

### 3.3.7- Solubilidade

A solubilidade dos complexos em meio aquoso (tampão fosfato, pH 7,4) foi determinada a  $37 \pm 0,5$  °C pelo método Shake Flask.<sup>100</sup> Neste experimento uma quantidade apropriada de complexo para a saturação foi adicionada a 2 mL de solução tampão. As soluções foram agitadas durante 24 horas a 50 rpm até o equilíbrio. Na sequência, as amostras foram centrifugadas

por 5 minutos em uma centrífuga a 220 rpm. A concentração do complexo filtrado foi determinada com o uso do espectrofotômetro no UV-Vis.

### 3.3.8- Citotoxicidade e distribuição no meio celular

Os experimentos de citotoxicidade e distribuição no meio celular foram realizados no laboratório de Neurobiologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal de São Paulo junto ao grupo do Prof. Dr. Manoel Arcisio-Miranda.

#### 3.3.8.1- Cultura e diferenciação celular

Células de neuroblastoma de camundongos, Neuro 2a (ATCC: CCL-131, gentilmente cedidas pelo Dr. Isaias Glessner, Unifesp) foram rotineiramente cultivadas em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C em DMEM (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com FBS a 10% (Invitrogen, EUA) e 1% de penicilina / estreptomicina (Invitrogen, EUA). Antes de cada ensaio as células foram induzidas a diferenciação e desenvolvimento de neuritos pela substituição do meio de cultura pelo meio de diferenciação (DMEM suplementado com 2% de FBS e 20µM de ácido retinóico) durante 72 horas.<sup>101</sup>

#### 3.3.8.2- Microscopia Confocal de Varredura Laser

A localização celular foi obtida seguindo a luminescência intrínseca dos complexos de rutênio do trabalho. As células foram cultivadas em meio de diferenciação em placas de cultura de 40 mm. Após 48 horas, as células foram incubadas com os complexos do trabalho (0,5µM) durante 24 horas. O núcleo celular foi marcado por incubação das células com Hoechst-33374 (Molecular Probes, EUA) durante 15 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes e mantidas em solução de tampão fosfato (PBS) durante os experimentos. As imagens foram obtidas em um Microscópio Confocal de Varredura Laser invertido Zeiss LSM 780 (Confocal INFAR e Facilidade de Citometria de fluxo,

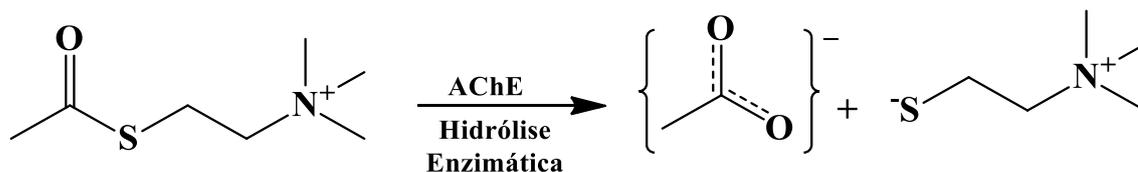
Unifesp). Os complexos foram excitados em 450 nm e emitidos em 590 nm. O espectro do Hoechst-33374 foi excitado em 346 nm e emitido em 460 nm. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ.<sup>102</sup>

### 3.3.8.3- Ensaio de viabilidade MTT

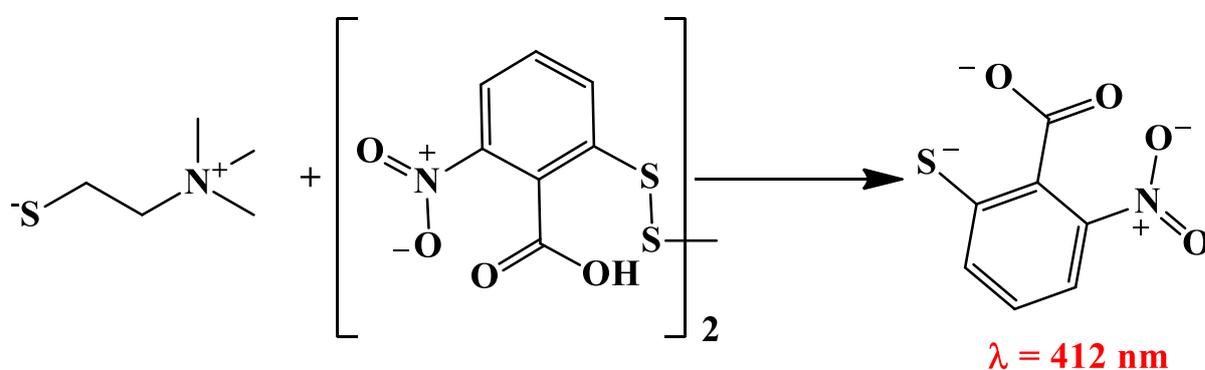
A toxicidade celular dos complexos foi avaliada pelo ensaio de inibição da redução do MTT.<sup>103</sup> As células foram plaqueadas a uma densidade de 5000 células/poço em placas de 96 poços em meio de cultura sem penicilina/estreptomicina. Depois de 48 horas, as células foram incubadas durante 24 horas com a concentração desejada de complexo. Em seguida, 10 µl de MTT (10 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados a cada poço. Após 2h, a solução de cada poço foi cuidadosamente aspirada e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada amostra, que foi incubada à temperatura ambiente até a completa lise celular. A absorbância do formazan foi medida em 570 nm no leitor de microplacas Ultra EL 808 (Bio-Tek Instruments). A porcentagem de células viáveis foi calculada como a razão entre a absorbância das células tratadas com a absorbância de grupos controle. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

### 3.3.9- Estudos de inibição das enzimas colinesterases

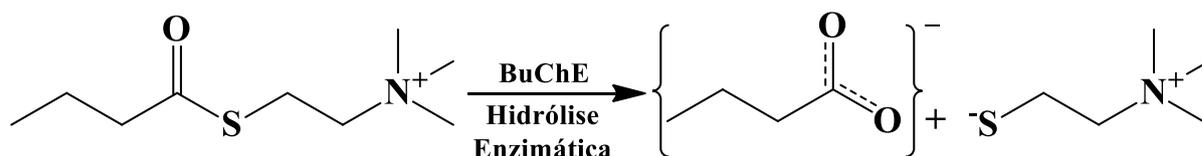
Os experimentos de inibição enzimática foram realizados com base no método de Ellman modificado.<sup>104</sup> Esse método baseia-se na hidrólise do substrato acetiltiocolina (ATChI) pela enzima AChE, formando acetato e tiocolina, representado no Esquema 3.1. O íon tiocolina é capaz de reagir com o indicador DTNB por interação de pontes de dissulfeto e formar um composto amarelo (5-tio-nitrobenzoato), com máximo de absorção em 412 nm, Esquema 3.2. De forma que a reação enzimática pode ser acompanhada pelo aumento do máximo de absorção do íon TNB. No estudo de inibição da enzima BuChE o substrato utilizado foi o butiriltiocolina (BuTChI), representado no Esquema 3.3.



ESQUEMA 3.1- Hidrólise do substrato acetiltiocolina catalisada pela enzima AChE.



ESQUEMA 3.2- Formação do íon TNB.



ESQUEMA 3.3- Hidrólise do substrato butiriltiocolina catalisada pela enzima BuChE.

Os reagentes empregados são de procedência Sigma-Aldrich e as concentrações das soluções usadas nos estudos de inibição enzimática são apresentadas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1- Soluções utilizadas nos estudos de inibição enzimática.

<b>Soluções</b>	<b>Concentração</b>
Solução de tampão Trizma (pH 8)	0,05 mol L <sup>-1</sup>
Solução eletrolítica (NaCl/MgCl <sub>2</sub> )	0,1/0,02 mol L <sup>-1</sup>
Solução de BSA	15 µmol L <sup>-1</sup>
Solução de DTNB	347,5 µmol L <sup>-1</sup>
Soluções de ATChI e BuTChI	0,03 - 0,09 mol L <sup>-1</sup>
Solução de eeAChE	5U/mL
Solução de hAChE	2 µmol L <sup>-1</sup>
Solução de hBuChE	1 µmol L <sup>-1</sup>

A solução de tampão Trizma (pH 8) foi usada no preparo da solução eletrolítica e da solução de BSA. A solução de DTNB foi preparada a partir da solução eletrolítica.

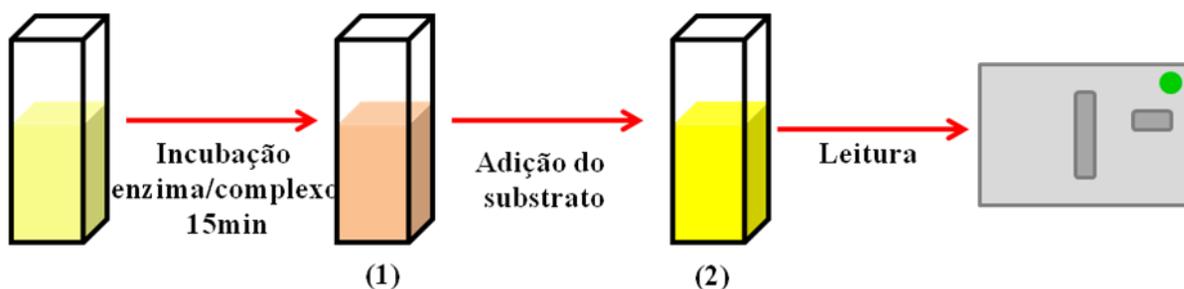
As soluções das enzimas colinesterases foram preparadas na solução de BSA. As soluções dos substratos ATChI e BuTChI foram preparadas em água deionizada Milli-Q. E as soluções dos complexos foram preparadas em metanol. De modo que, a porcentagem de metanol em todos os experimentos foi sempre inferior a 0,5%.

O Esquema 3.4 representa a sequência realizada no experimento: a uma cubeta foram adicionados 2,875 mL de solução de DTNB, 100 µL de solução de inibidor ou metanol, 15 µL da solução de enzima incubando por 15 minutos a temperatura ambiente (1). Após esse período a reação foi iniciada pela adição de 10 µL de substrato (2). A reação foi acompanhada pelo comprimento de onda do máximo de absorção, em 412 nm.

Na determinação do IC<sub>50</sub> (concentração necessária para reduzir a atividade da enzima em 50%), a concentração de inibidor foi avaliada entre 0 e 100 µmol L<sup>-1</sup>, sendo a concentração do substrato mantida constante. A porcentagem de inibição foi calculada através da comparação da atividade da

enzima na presença do inibidor com a atividade da enzima na ausência do inibidor, sendo esta estabelecida como 100% de atividade. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram tratados no software GraphPad Prism.

Estudos cinéticos foram realizados para avaliar o tipo de inibição, em que as concentrações de inibidor e substrato são variáveis. As concentrações de inibidor avaliadas foram entre 0 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e as concentrações de substrato entre 50 e 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A velocidade de reação enzimática foi determinada pela razão entre a absorbância no máximo de absorção (412 nm), pelo tempo de reação e coeficiente de absorvidade molar do íon TNB (13600  $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ ). Os dados foram tratados no software GraphPad Prism e foram obtidos os valores de  $K_i$  e a regressão de duplo-recíproco.



ESQUEMA 3.4- Esquema da metodologia empregada nos estudos de inibição.

### 3.3.10- Avaliação da interação complexo-enzima por RMN-STD

O complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  e a enzima acetilcolinesterase humana (hAChE) foram solubilizados em uma solução de tampão fosfato de sódio pH 7,4 (0,075  $\text{mol L}^{-1}$ ; NaCl 0,150  $\text{mol L}^{-1}$ ). Em um tubo de quartzo de 2,5 mm foram adicionados 184  $\mu\text{L}$  da solução do complexo e 16  $\mu\text{L}$  da solução de enzima 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o peso molecular da enzima foi considerado 68 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A relação entre enzima e complexo usada neste estudo foi de 1:100. Para simular o meio biológico, os experimentos foram

realizados a 37 °C. Os espectros on e off-resonance foram obtidos após 256 scans, pela irradiação em -400 Hz e 20 000 Hz, respectivamente.

### 3.3.11- Estudo da capacidade antioxidante

#### 3.3.11.1- Radical hidroxila

As concentrações das soluções utilizadas nos ensaios para avaliar a habilidade de sequestro do radical hidroxila são apresentadas na Tabela 3.2. Todas as soluções foram preparadas em água deionizada Milli-Q. O seqüestrador DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolidina-N-óxido) foi purificado e sua concentração foi determinada por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis ( $\lambda_{\text{máx}} = 236 \text{ nm}$ ;  $\epsilon = 7200 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) como descrito na literatura.<sup>105</sup>

TABELA 3.2- Soluções utilizadas no estudo do radical hidroxila.

<b>Soluções</b>	<b>Concentração</b>
Solução de FeSO <sub>4</sub>	0,0015 mol L <sup>-1</sup>
Solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,01 mol L <sup>-1</sup>
Solução de DMPO	1,67 mol L <sup>-1</sup>
Complexos e ligantes	Variável

Em um tubo de eppendorf foram adicionados 158  $\mu\text{L}$  da solução de complexo ou ligante, 66  $\mu\text{L}$  da solução de FeSO<sub>4</sub>, 66  $\mu\text{L}$  da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10  $\mu\text{L}$  da solução de DMPO. Imediatamente após o preparo da mistura, foram realizadas as medidas de EPR.

As medidas de EPR foram realizadas com um espectrômetro Bruker, modelo ESP300E junto ao grupo do Prof. Dr. Douglas Wagner Franco. Durante os experimentos, foi empregado um sistema de fluxo contínuo composto por uma bomba peristáltica, cânula de teflon para condução das

soluções e capilar de quartzo (diâmetro interno = 1 mm,  $V = 80 \mu\text{L}$ ) como cela para aquisição dos espectros.

### 3.3.11.2- Radical DPPH<sup>•</sup>

Foram preparadas soluções de DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e dos complexos em metanol, nas concentrações de  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Em um tubo de eppendorf foram adicionados  $50 \mu\text{L}$  da solução de complexo ou ligante, e  $50 \mu\text{L}$  da solução de DPPH<sup>•</sup>. As medidas de EPR foram realizadas empregando o mesmo sistema do estudo do radical hidroxila. A reação entre o radical DPPH<sup>•</sup> e os complexos foi acompanhada em diferentes intervalos de reação por medidas de EPR, até que o sinal fosse totalmente inibido.

### 3.3.11.3- Radical ABTS<sup>•+</sup>

O radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado a partir da reação entre o sal de ABTS e persulfato de potássio. Uma solução  $0,007 \text{ mol L}^{-1}$  do sal ABTS e  $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$  de persulfato de potássio foi preparada em água destilada, em seguida, essa solução foi mantida em repouso no escuro por 16 horas para a completa formação do radical. Após esse período, a solução do radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em tampão fosfato (pH 7,4) com ajuste da absorbância em 734 nm para  $(0,7 \pm 0,02)$ , assumindo  $\epsilon_{734} = 15000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ . As soluções de complexo e ligante foram preparadas em metanol.

Em uma cubeta foram adicionados  $900 \mu\text{L}$  da solução de radical ABTS<sup>•+</sup> e  $100 \mu\text{L}$  da solução do complexo ou ligante. A mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, e em seguida, foi realizada a leitura das amostras por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis.

O valor de  $\text{IC}_{50}$  (concentração de composto necessária para reduzir a concentração inicial do radical ABTS<sup>•+</sup> em 50%) foi determinado alterando a

concentração de inibidor entre 0 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Assumindo que a absorvância na ausência do inibidor corresponde a 100% da atividade do radical, a porcentagem de capacidade antioxidante dos complexos foi calculada com a comparação ao controle.<sup>106</sup> Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados foram tratados no software GraphPad Prism.

### 3.3.12- Microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência (FLIM)

As imagens por tempo de vida de fluorescência foram obtidas em um sistema de medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal MT 200 – PicoQuant, microscópio invertido de detecção Olympus junto ao grupo do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito. Para excitar a amostra foi empregado o laser de diodo pulsado de 470 nm (LDH-D-C-470), e para a emissão foi utilizado o filtro BLP-488R. As imagens foram detectadas por um software operacional do microscópio, SymPhoTime, e as resoluções foram mantidas em 256x256 ou 512x512 pixels.

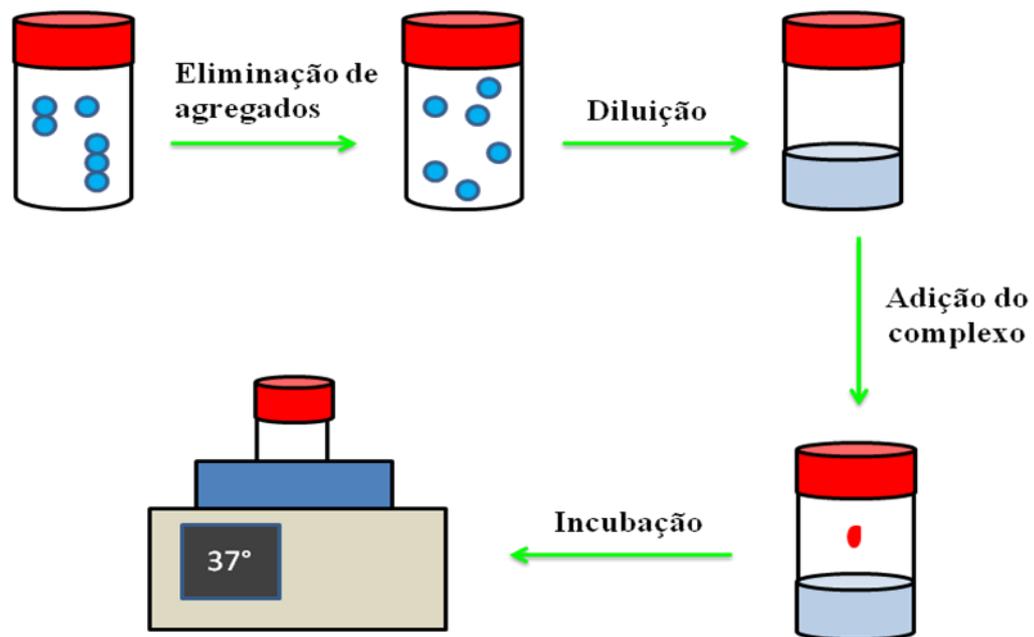
### 3.3.13- Estudos do processo de agregação do peptídeo $\beta\text{A}$

A primeira etapa do preparo das soluções do peptídeo  $\beta\text{A}$  é a eliminação de possíveis agregados. Para isso, o peptídeo foi solubilizado em 200  $\mu\text{L}$  de solução de NaOH (150  $\mu\text{L}$  de uma solução de 2mmol  $\text{L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de 100 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). Essa solução foi sonicada por 2 minutos em um banho de ultrassom, e em seguida, filtrada em filtros de centrifuga (VWR) de porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ . A segunda etapa consiste na diluição do peptídeo em tampão fosfato de sódio (100 mmol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 7,4; NaCl 150 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).

Após o preparo do peptídeo  $\beta\text{A}$ , a concentração da solução do peptídeo foi ajustada para 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Foram preparadas diferentes amostras de soluções do peptídeo  $\beta\text{A}$  com o complexo, mantendo-se sempre a concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o  $\beta\text{A}$  e 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o complexo. As amostras foram

incubadas a 37 °C em um “thermo shaker” sob agitação a 900 rpm. As amostras foram recolhidas em diferentes intervalos de tempo de agregação para a obtenção das imagens por luminescência.

O Esquema 3.5 representa a sequência da metodologia realizada no estudo de monitoramento do processo de agregação do peptídeo  $\beta$ A.



ESQUEMA 3.5- Esquema da metodologia usada no estudo do processo de agregação do peptídeo  $\beta$ A.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

O complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> foi anteriormente caracterizado, e seu comportamento espectroscópico discutido pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores.<sup>107</sup> Assim, os tópicos a seguir de caracterização e discussão das propriedades espectroscópicas são resultados para o complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

### 4.1- Caracterização por análise elementar

A Tabela 4.1 apresenta os dados referentes à porcentagem em massa de C, N e H para o complexo [Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> obtidos por análise elementar. Observa-se uma boa concordância entre os dados experimentais e teóricos, o que confirma a fórmula mínima proposta para o complexo: C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>F<sub>12</sub>N<sub>10</sub>P<sub>2</sub>Ru.

TABELA 4.1- Análise elementar dos teores de C, H e N para o complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> considerando a fórmula mínima C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>F<sub>12</sub>N<sub>10</sub>P<sub>2</sub>Ru.

M.M (g/mol)	Análise elementar experimental (teórica) %		
	C	H	N
969,67	42,29 (42,11)	3,46 (3,12)	14,21 (14,44)

### 4.2- Caracterização por RMN

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H para o complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e ligantes 1,10-fenantrolina e 3,4-diaminopiridina obtidos em DMSO-d<sub>6</sub> são apresentados na Figura 4.1. Os espectros de RMN <sup>13</sup>C, Cosy e HSQC foram também obtidos para auxiliar na investigação da geometria do complexo, e são apresentados no anexo deste trabalho. Os sinais referentes à fenantrolina encontram-se na região entre 7,58 e 9,45 ppm, e os sinais referentes a 3,4-

diaminopiridina estão na região entre 4,68 e 7,48 ppm. A atribuição de todos os sinais é apresentada na Tabela 4.2. Os resultados obtidos são consistentes com dois ligantes fenantrolina e dois 3,4-diaminopiridina na esfera de coordenação do Ru(II) com geometria octaédrica *cis*-. A ausência de sinais referentes ao precursor ou ligante livre indica o grau de pureza do complexo observado por análise elementar. Vale à pena destacar que os experimentos foram realizados em DMSO-d<sub>6</sub> a fim de atribuir os sinais referentes aos grupos amino do complexo, uma vez que, essa análise não pode ser realizada em D<sub>2</sub>O.

TABELA 4.2- Dados dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, COSY e HSQC (600 MHz) para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em DMSO-d<sub>6</sub>.

<b>H</b>	<b>δ<sub>H</sub> (ppm), <i>mult.</i> (J em Hz), H</b>	<b>COSY</b>	<b>HSQC (δ<sub>C</sub>)</b>
d,d'	4,68; s; 4	-----	-----
c,c'	5,88; s; 4	-----	-----
b,b'	6,25; d (6,2); 2	7,31	109,45
a,a'	7,31; d (6,2); 2	6,25	142,38
e,e'	7,48; s; 2	-----	136,36/ 136,50
7,7'	7,58; m; 2	7,97; 8,48	126,25/126,67
8,8'	7,97; dd (5,3/1,2); 2	7,58	153,86/ 154,06
5,5'	8,20; d (8,8); 2	8,31	128,10/ 128,44
2,2'	8,27; m; 2	8,85; 9,45	126,25/ 126,67
4,4'	8,31; d (8,8); 2	8,20	128,10/128,44
6,6'	8,48; dd (8,2/1,2); 2	7,58	135,75
3,3'	8,85; dd (8,2/1,2); 2	8,27	136,36/136,50
1,1'	9,45; dd (5,3/1,2); 2	8,27	153,86/154,06

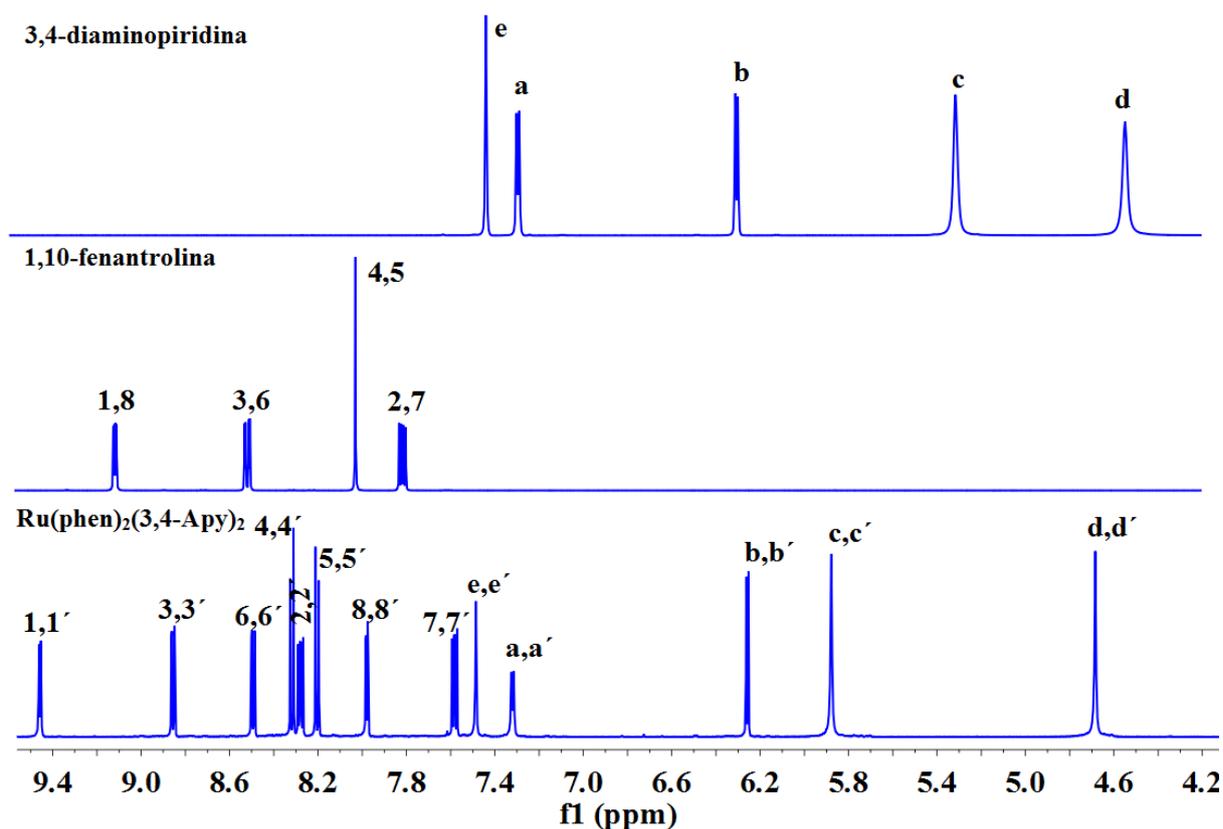
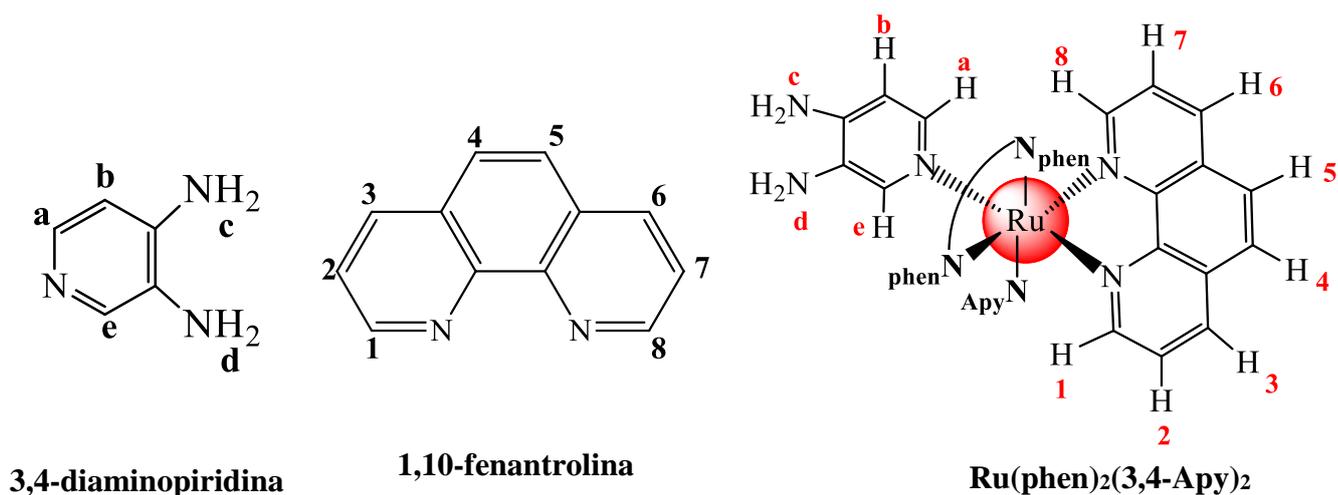


FIGURA 4.1- Espectros de RMN <sup>1</sup>H 600 MHz em DMSO-d<sub>6</sub> para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, 400 MHz em DMSO-d<sub>6</sub> para 1,10-fenantrolina e 3,4-diaminopiridina.

### 4.3- Propriedades Espectroscópicas

#### 4.3.1- Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis

A Figura 4.2 apresenta o espectro de absorção eletrônico do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> obtido em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). O espectro é caracterizado por duas bandas de absorções intensas: uma fina no ultravioleta (máximo em 267 e um ombro em 320 nm) e outra larga na região de 400-500 nm, característica de uma transferência de carga do metal para o ligante, MLCT ( $d\pi, Ru \rightarrow \pi^*, phen$ ). A banda de absorção na região do UV é de alta intensidade sendo típica de transições eletrônicas atribuídas a ligantes aromáticos insaturados (ILCT).<sup>108</sup> A natureza das transições eletrônicas presentes no complexo na região do visível podem ser comparadas às absorções presentes em uma série de complexos de Ru(II)-fenantrolina descritos na literatura,<sup>107,109</sup> Tabela 4.3.

O máximo da banda MLCT do complexo é deslocado para menor comprimento de onda quando comparado ao precursor RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>. Isso ocorre devido à estabilidade obtida quando os ligantes cloretos são substituídos pelos ligantes aminopiridina. Os ligantes cloretos atuam como doadores  $\sigma$  e  $\pi$ . Por outro lado, os ligantes aminopiridina são coordenadas ao metal através do par de elétrons livres no N do anel por uma ligação  $\sigma$  e orbitais  $\pi$  vazios atuam como receptores  $\pi$ .

Para complexos de Ru(II) espera-se também transições centradas no metal Ru(II)  $\rightarrow$  Ru(II) ( $d\pi \rightarrow d\pi^*$ ), as quais não podem ser visualizadas devido sua baixa intensidade (absortividades molares baixas) quando comparadas as transições de transferência de carga.

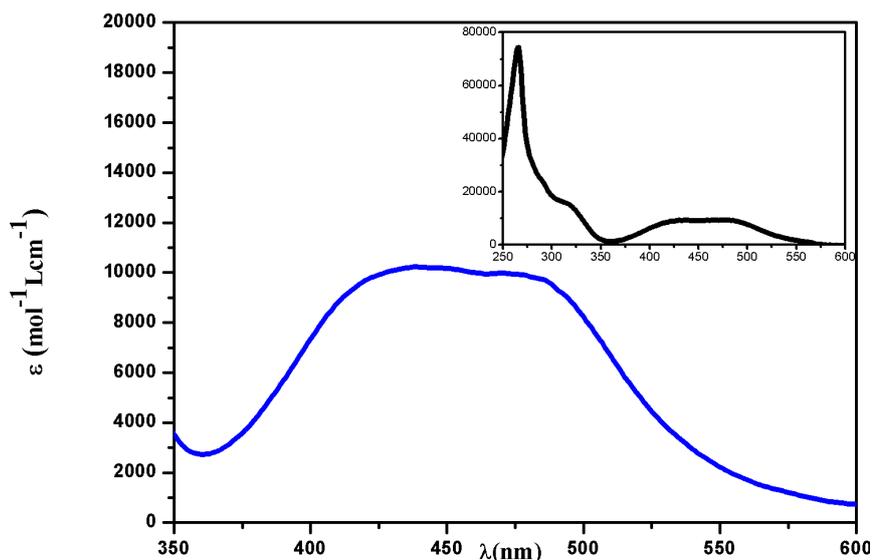


FIGURA 4.2- Espectro de absorção em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4) do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

TABELA 4.3- Dados dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis para complexos de Ru(II).

Complexo	LLCT	MLCT	Referência
	(phen,π→phen,π*)	(Ru,dπ→phen*)	
	λ,nm;ε, mol <sup>-1</sup> Lcm <sup>-1</sup>	λ,nm; ε, mol <sup>-1</sup> Lcm <sup>-1</sup>	
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	263; 99 000	446; 16 000	110
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]		544; 8 200	111
<i>cis</i> -Ru(phen) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	265; 65 000	414; 11 000 445; 10 100	109
<i>cis</i> -Ru(phen) <sub>2</sub> (4-Apy) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	266; 93 325	438; 13 803 483; 13 489	107
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	267; 72 577 320; 14 683	480; 9 360 430; 9 339	Este trabalho
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	261; 65 000	383; 9 400 420; 8 600	109
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	223; 55 000 264; 83 000	469; 10 700	109

#### 4.3.2- Espectro de Emissão, Tempo de vida de emissão e Rendimento Quântico de Emissão

O complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> apresenta uma banda de emissão larga e intensa com máximo em 655 nm em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4), Figura 4.3. Os espectros de excitação e de absorção são similares indicando que a emissão tem origem da transição eletrônica de MLCT, Figura 4.3. Apesar do espectro de emissão ser independente do comprimento de onda de excitação (280 a 500nm), observa-se uma maior intensidade quando a excitação ocorre na região do visível. Essa observação também sugere que a emissão é gerada a partir de um estado excitado de menor energia com característica MLCT, Figura 4.4.

Para analisar efeitos de agregação que podem resultar na supressão da emissão, foi realizado o estudo da influência da concentração do complexo (na faixa de 1x10<sup>-5</sup> a 1x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) na intensidade de emissão em tampão fosfato (pH 7,4). Como pode ser observado na Figura 4.5, a partir da concentração 8x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> ocorre a supressão da emissão, o que indica a agregação do complexo. Assim, nos estudos de emissão, a concentração utilizada deve ser menor que 8x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> a fim de eliminar esses efeitos.

O tempo de vida de emissão ( $\tau_e$ ) do complexo foi avaliado em acetonitrila e solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). A partir de um ajuste biexponencial foram obtidos dois tempos de vida de emissão, apresentados na Tabela 4.4 e Figura 4.6. Isto indica a presença de dois estados emissivos, sendo o  $\tau_e$  longo fortemente predominante.

A região de comprimento de onda de emissão, o tempo de vida de emissão e o deslocamento de Stokes de um complexo são propriedades de grande relevância para sua aplicação como sonda luminescente, em particular para aplicação biológica. Componentes biológicos importantes emitem luz quando excitados na região de 300 a 600 nm, Figura 4.7. Estas biomoléculas

apresentam também tempos de vida de emissão curtos típicos de moléculas orgânicas.

Como foi apresentado, o complexo do trabalho emite luz em 655 nm fora da janela de absorção das biomoléculas, com deslocamento de Stokes maior que  $5000\text{ cm}^{-1}$ , indicado na Figura 4.3, e  $\tau_e$  longo de 130 ns não comparável ao das biomoléculas. Essas propriedades minimizam processos de auto-fluorescência das biomoléculas, assim como efeitos de auto-absorção do complexo. Os tempos de vida longos quando comparados aos das biomoléculas permitem monitorar a fosforescência dos complexos por medidas de tempo de vida sem a interferência das biomoléculas.

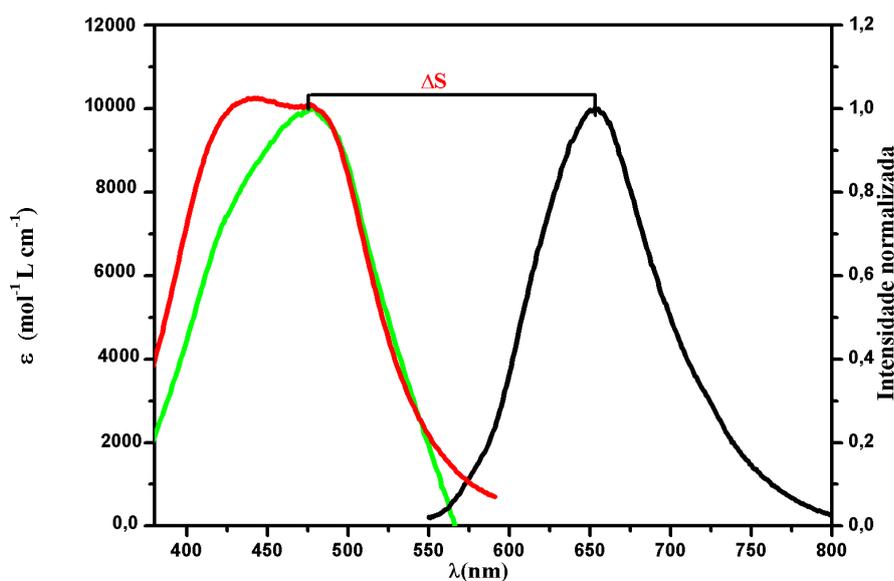


FIGURA 4.3- Espectros de: excitação (verde), absorção UV-Vis (vermelho), e emissão a temperatura ambiente (preto,  $\lambda_{exc} = 480\text{ nm}$ ) do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). O coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) se aplica apenas ao espectro de absorção.

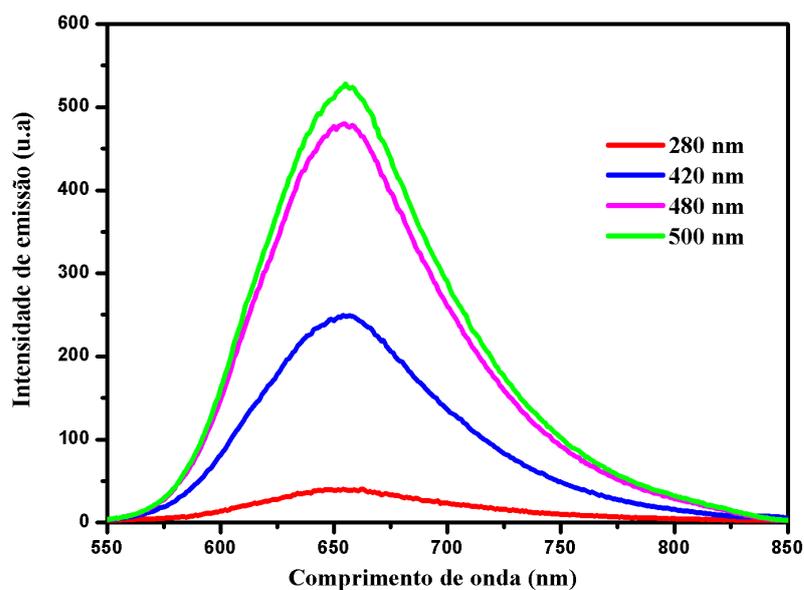


FIGURA 4.4- Espectro de emissão do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em solução aquosa em diferentes comprimentos de onda de excitação.

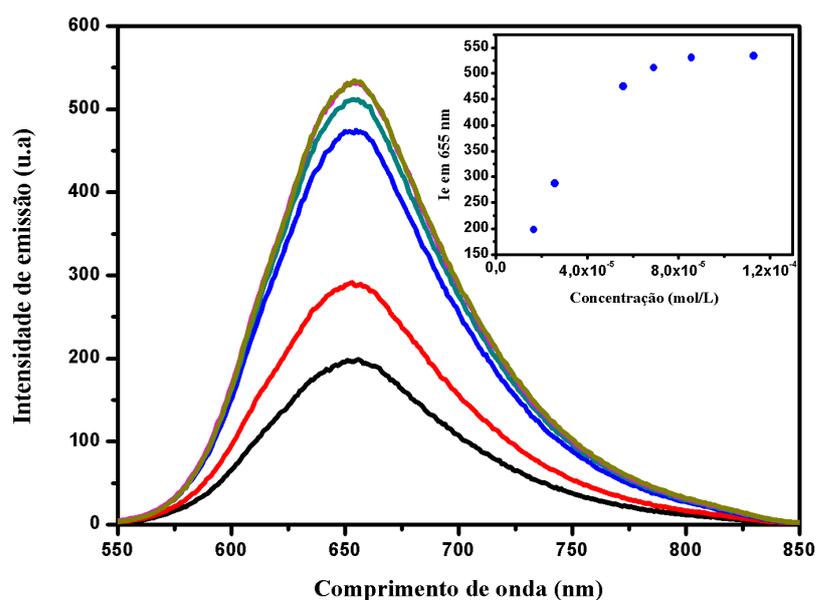


FIGURA 4.5- Estudo de agregação do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4;  $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ ).

TABELA 4.4- Tempos de vida de emissão para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

	$\tau_1$ , ns	$\tau_2$ , ns	$\chi^2$
<b>Acetonitrila</b>	150 (99,64%)	5,7 (0,36%)	1,12
<b>Tampão</b>	129,3 (99,73%)	1,23 (0,27%)	1,1

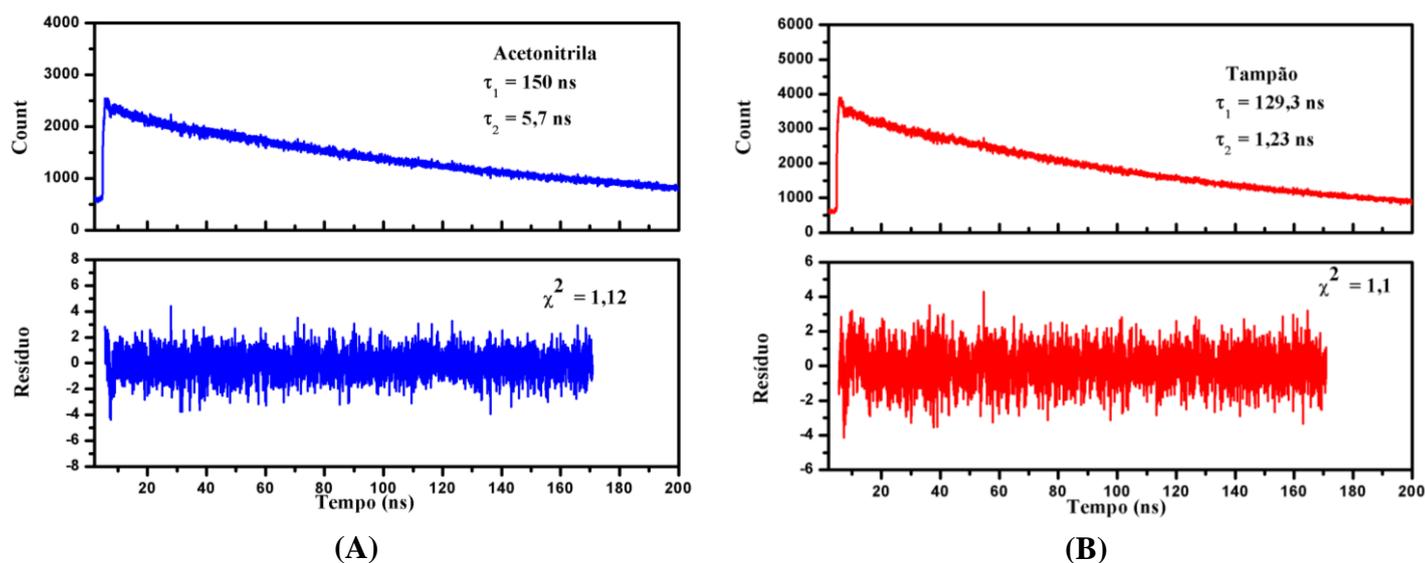


FIGURA 4.6- Curvas de decaimento de emissão para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em: (A) acetonitrila e (B) solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). Os gráficos de resíduos indicam a qualidade do ajuste.

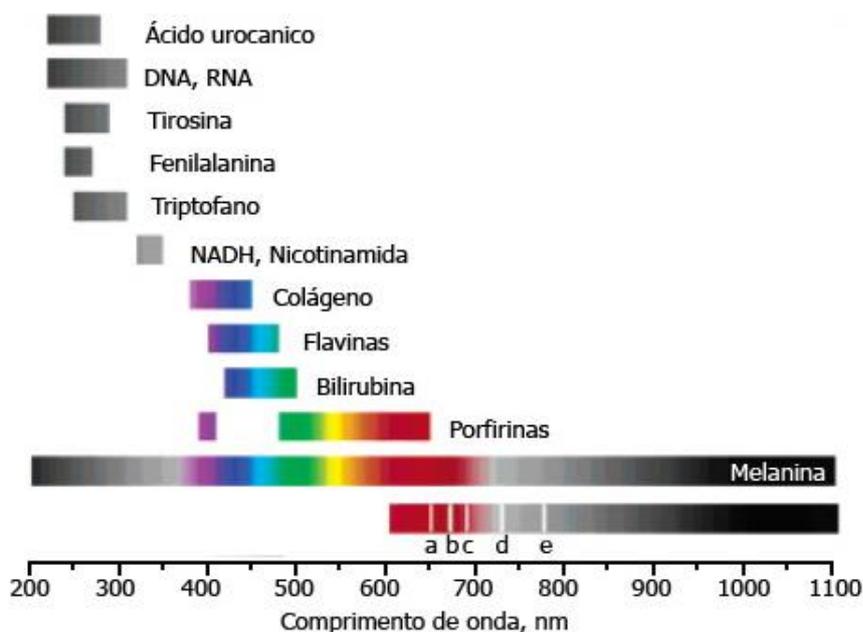


FIGURA 4.7- Janela fototerapêutica de componentes biológicos.

A emissão e excitação do complexo foram avaliadas em solventes apresentando diferenças na polaridade, viscosidade<sup>112</sup> e caráter doador de prótons, Figura 4.8. Não observamos variação dos espectros de excitação com a alteração do solvente, sugerindo que o mesmo estado excitado emissivo está sendo populado. Em conjunto todos esses fatores influenciam na emissão do complexo. Por exemplo: comparando diclorometano (pouco polar aprótico) com acetonitrila (polar aprótico) observa-se um deslocamento de 21 nm no máximo de emissão do complexo. Entretanto, ao comparar a água (polar prótico) com a acetonitrila não observamos alterações na emissão. Por outro lado, ao comparar dois solventes polares apróticos com viscosidades diferentes, acetonitrila e dimetilsufóxido, observa-se um deslocamento de 17 nm no máximo de emissão. Nota-se também uma relação quase que direta entre a viscosidade do solvente e o deslocamento do máximo de emissão: deslocamento de 10 nm de acetonitrila para dimetilformamida ( $1,17/0,397 = 3$ ) e 20 nm de acetonitrila para dimetilsufóxido ( $2,47/0,397 = 6$ ). Com base nesses resultados, calculamos o rendimento quântico de emissão do complexo para esses solventes. A Tabela 4.5 apresenta o comprimento máximo de emissão para cada solvente estudado e os resultados de rendimento quântico de emissão.

As propriedades luminescentes dos complexos  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  e  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  também são sensíveis ao solvente.<sup>96,113</sup> Para o complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  a variação do solvente altera os processos de decaimento radiativo e não-radiativo. Para o complexo  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  as alterações são relacionadas com a capacidade do solvente estabelecer ligação de hidrogênio com os nitrogênios da fenazina.

Nossos resultados sugerem uma terceira opção, a qual pode estar relacionada com a presença de dois confôrmeros, como foi observado para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Apy})_2]^{2+}$ .<sup>107</sup> Como mostrado na Figura 4.9, o plano do ligante 4-aminopiridina em relação ao ligante fenantrolina no complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Apy})_2]^{2+}$  pode estar localizado no centro da molécula ou no centro

do ligante fenantrolina. O confômero A é mais estável no estado fundamental e o confômero B no estado excitado.

Os dois tempos de vida de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> podem ser provenientes da presença desses dois confômeros, os quais são mais estabilizados para esse complexo devido ao efeito estérico dos ligantes na esfera de coordenação. Os deslocamentos nos máximos de emissão com o solvente podem ser resultado da interconversão entre os confômeros com o solvente, o que leva a maior estabilidade de um dos confômeros no estado excitado.

Um estudo do comportamento da emissão do complexo em tampão fosfato com a variação nos valores de pH também foi realizado. Como pode ser observado na Figura 4.10, o comprimento máximo de emissão do complexo não é alterado entre valores de pH 3 e 11.

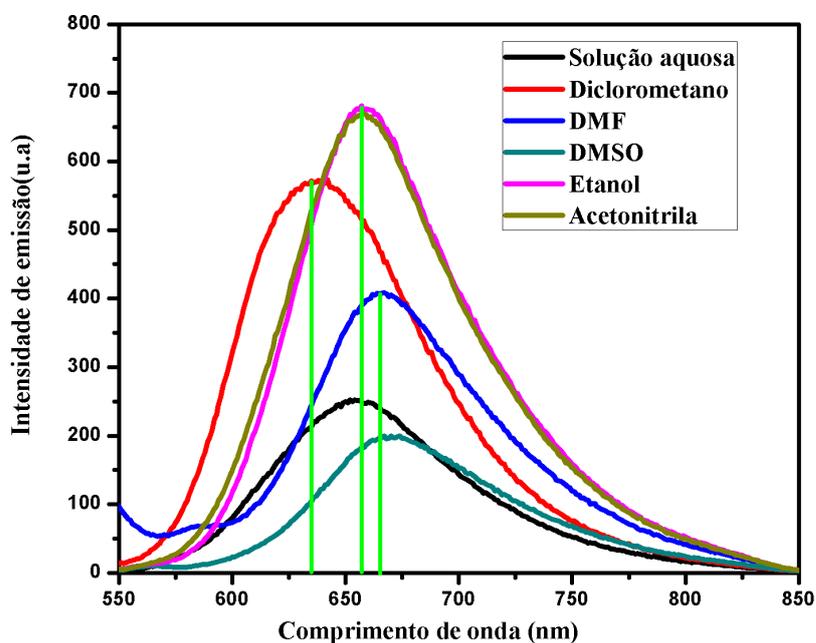


FIGURA 4.8- Espectros de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em diferentes solventes ( $\lambda_{exc} = 480$  nm).

TABELA 4.5- Dados do espectro de emissão e rendimento quântico de emissão do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em diferentes solventes.

Solvente	Polaridade solvente/ Caráter doador de H <sup>+</sup>	Viscosidade (mN s m <sup>-2</sup> )	λ <sub>máx</sub> de emissão (nm)	Φ <sub>e</sub>
Diclorometano	0,22/ aprótico	0,533	635	0,0056
Água	0,32/ prótico	1,000	655	0,0023
Etanol	0,29/ prótico	1,786	658	0,0148
Acetonitrila	0,31/ aprótico	0,397	656	0,0129
Dimetilformamida	0,28/ aprótico	1,170	667	0,0081
Dimetilsufóxido	0,26/ aprótico	2,470	673	0,0045

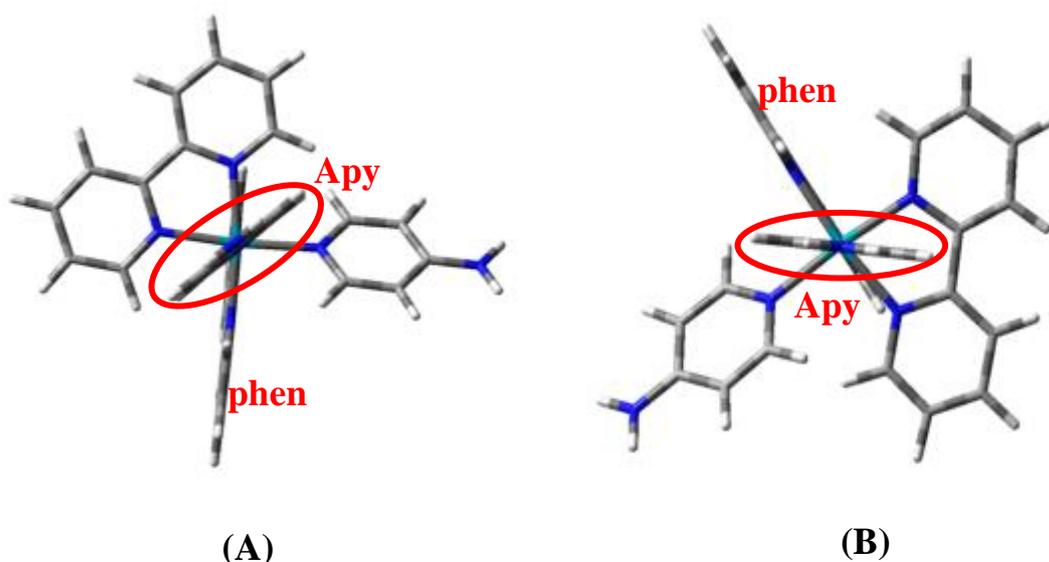


FIGURA 4.9- Orientações dos planos do ligante 4-aminopiridina: (A) Plano do ligante localizado no centro da molécula; (B) Plano do ligante no centro do ligante fenantrolina. Fonte: CAMILO, 2014, p. 3699.

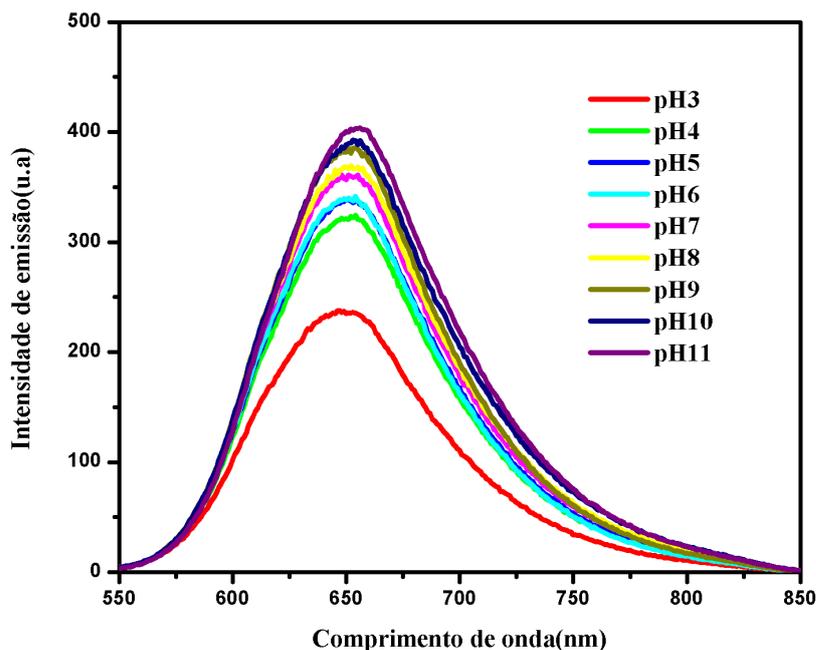


FIGURA 4.10- Comportamento da emissão do complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em soluções aquosas com diferentes valores de pH ( $\lambda_{exc} = 480$  nm).

#### 4.4- Estabilidade do complexo

##### 4.4.1- Ausência de luz

A estabilidade térmica do complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> foi investigada em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H obtidos imediatamente após o preparo da solução e após 24 horas inalterados, enunciam a estabilidade do complexo, Figura 4.11.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H do complexo em soluções de pH entre 2 e 12 (tampão fosfato) foram investigados por um período de 24 horas. Os espectros permaneceram inalterados durante este período para os valores de pH entre 5 e 12, Figuras 4.12 e 4.13. Entretanto, no pH 2 após 24 horas são observados novos sinais, indicando a hidrólise do complexo.

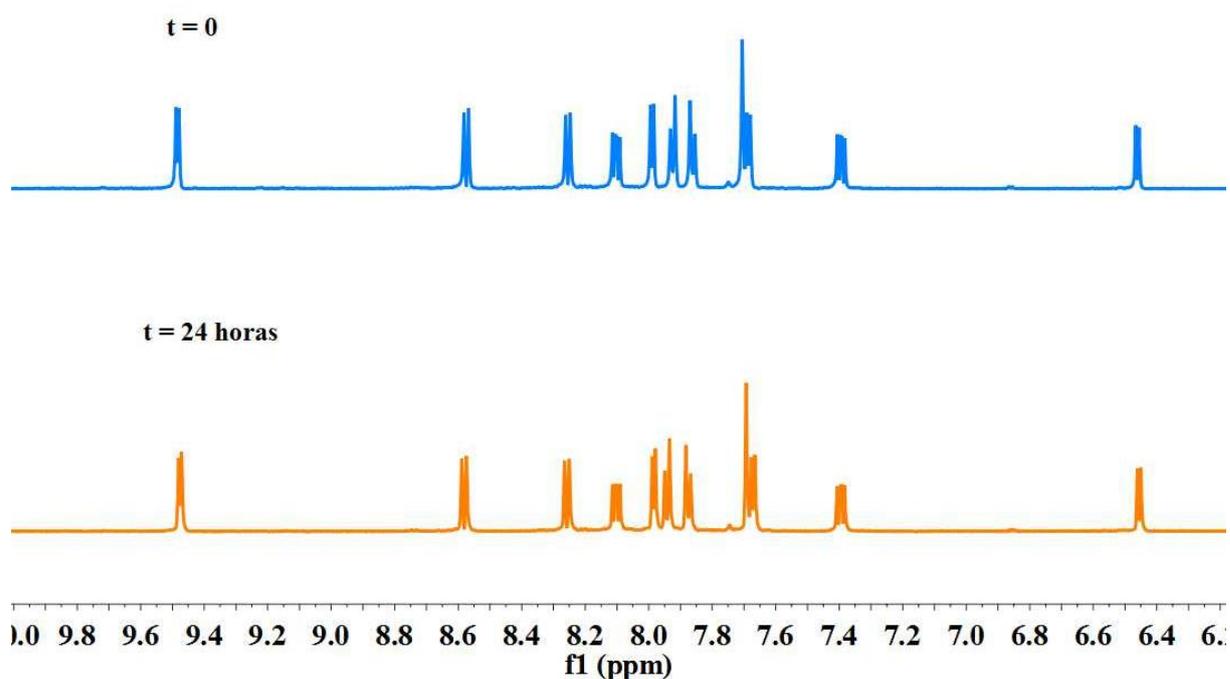


FIGURA 4.11- Estabilidade do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  acompanhada por RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa (tampão fosfato pH 7,4).

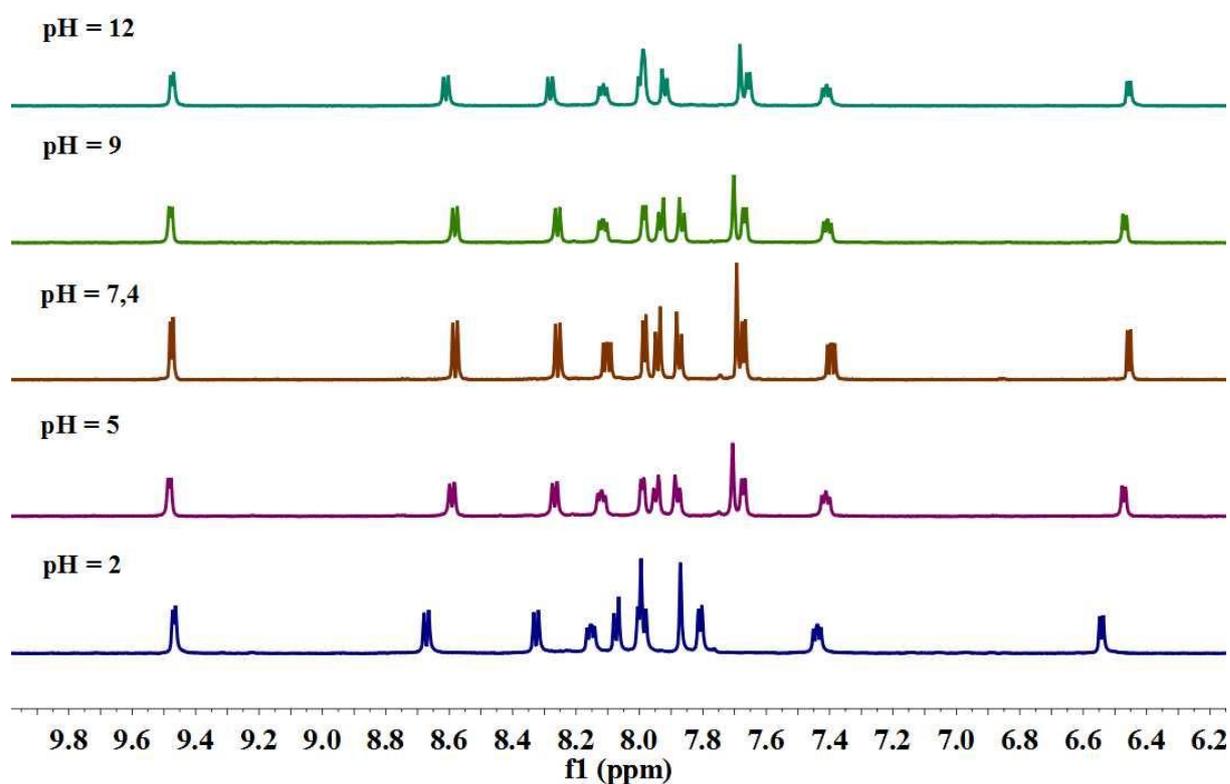


FIGURA 4.12- Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em diferentes valores de pH obtidos imediatamente após o preparo das soluções.

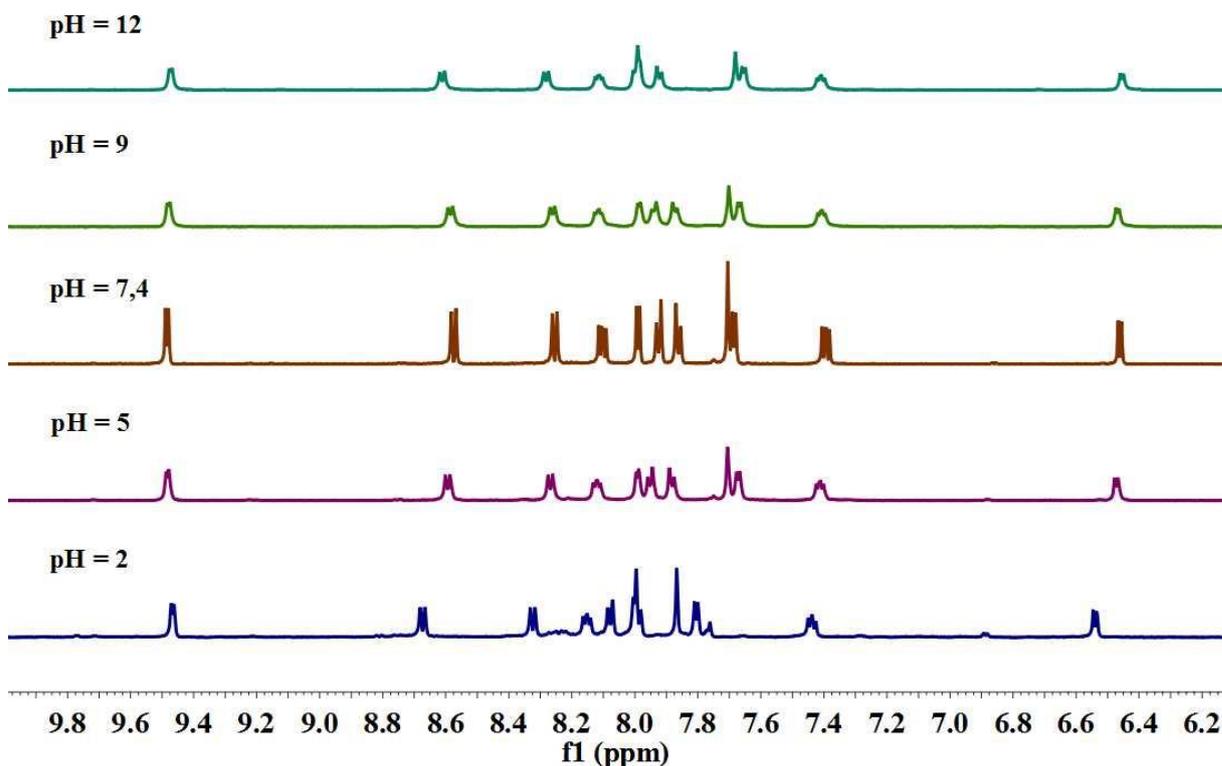


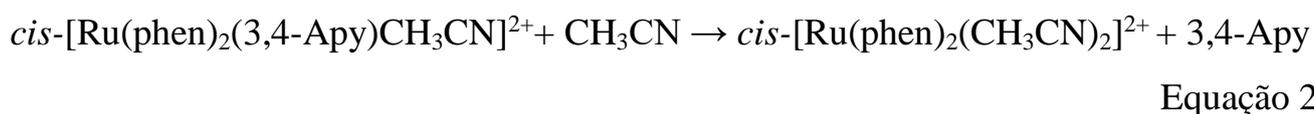
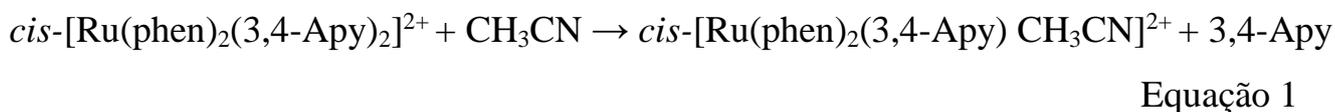
FIGURA 4.13- Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em diferentes valores de pH obtidos após 24 h do preparo das soluções.

#### 4.4.2- Irradiação com luz contínua

O comportamento fotoquímico do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  foi investigado em acetonitrila e em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). Os resultados obtidos são consistentes com a substituição de duas moléculas do ligante 3,4-diaminopiridina pelo solvente (Equações 1 e 2) em concordância com estudos anteriores do grupo<sup>107,114,115</sup> e sistemas relacionados  $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})\text{Cl})^{116}$ . A Figura 4.14 mostra as alterações no espectro de absorção do complexo durante a irradiação exaustiva do complexo com luz de 480 nm, tempo total de irradiação = 39 minutos,  $I_0 = 1 \times 10^{-8}$  einsten  $\text{s}^{-1}$ . Observa-se um decaimento contínuo do máximo de absorção em 480 nm concomitante com o deslocamento do máximo para 416 nm e a formação de um ponto isobéptico em 430 nm. Essas alterações no espectro de absorção indicam a liberação dos ligantes 3,4-diaminopiridina, com a formação do fotoproduto  $\text{cis-}$

$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$ , o qual apresenta o máximo de absorção em 420 nm e absorptividade molar de  $8\,600\text{ mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$ , conforme indicado na literatura.<sup>109</sup> Quando a fotólise é monitorada pela emissão do complexo, observa-se o decaimento contínuo do máximo de emissão em 655 nm até seu desaparecimento, indicando que o fotoproduto não emite luz. Assim, a irradiação contínua é consistente com um processo fotoquímico dissociativo, proveniente dos estados excitados tripleto centrados no metal,  $^3\text{MC}$ . A liberação fotoquímica da segunda Apy ocorre por um processo fotoquímico secundário do fotoproduto  $\text{cis}-[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Apy}(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$  provavelmente pela população de um segundo estado tripleto centrado no metal,  $^3\text{MC}$ .

Vale ressaltar que se a fotólise for interrompida em qualquer tempo de irradiação, nem o complexo inicial nem o primeiro fotoproduto são regenerados, o que mostra o potencial do complexo para a liberação controlada e seletiva dos ligantes aminopiridina no meio biológico.



O comportamento fotoquímico do complexo também foi avaliado em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4), Figura 4.15. Não foram observadas alterações no espectro de absorção, uma vez que o fotoproduto  $\text{cis}-[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  apresenta uma banda de absorção intensa com absorptividade molar alta na mesma região do complexo inicial ( $\lambda_{\text{máx}} = 469\text{ nm}$  e  $\epsilon_{\text{máx}} = 10\,700\text{ mol}^{-1}\text{ Lcm}^{-1}$ ).<sup>109</sup> Assim, a fotólise em solução aquosa foi acompanhada pelas alterações no espectro de emissão. Durante a fotólise, observou-se a redução na intensidade de emissão devido à perda dos ligantes aminopiridinas e formação do fotoproduto não-emissivo. O que também permite a liberação controlada e seletiva dos ligantes aminopiridina no meio biológico.

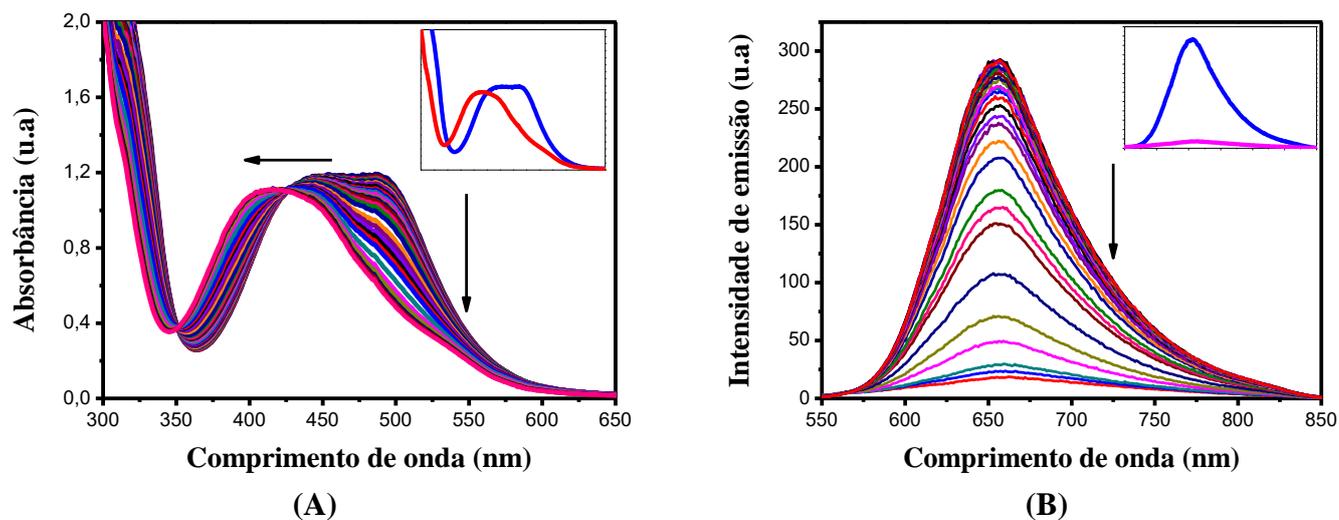


FIGURA 4.14- Estabilidade fotoquímica do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em acetonitrila: (A) espectro de absorção e (B) espectro de emissão (Tempo total de irradiação = 39 minutos,  $I_0 = 1 \times 10^{-8}$  einstens  $\text{s}^{-1}$ ).

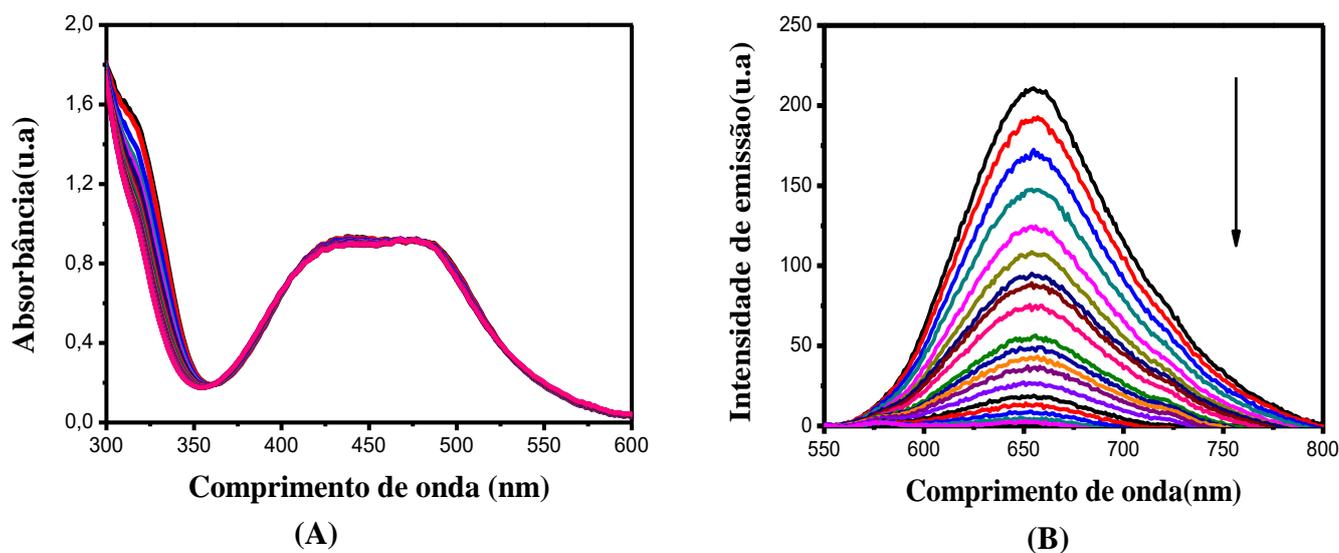


FIGURA 4.15- Estabilidade fotoquímica do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4): (A) espectro de absorção e (B) espectro de emissão (Tempo total de irradiação = 39 minutos,  $I_0 = 1 \times 10^{-8}$  einstens  $\text{s}^{-1}$ ).

#### 4.5- Solubilidade

A solubilidade dos complexos foi avaliada em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4) pelo método de Shake-Flask,<sup>100</sup> resultados na Tabela 4.6. Observa-se que a coordenação do ligante 3,4-diaminopiridina confere uma maior solubilidade quando comparado ao ligante 4-aminopiridina. Esses resultados caracterizam os complexos como hidrofílicos.

TABELA 4.6- Solubilidade dos complexos em solução aquosa (tampão fosfato, pH 7,4).

Complexo	Tampão fosfato (pH 7,4) (mg/mL)
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	0,8436
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	0,5544

#### 4.6- Citotoxicidade e distribuição no meio celular

Como foi descrito, os complexos apresentam propriedades muito promissoras para aplicação como sondas luminescentes no meio biológico, como absorção e emissão na região do visível, tempo de vida de emissão longo e grande deslocamento de Stokes. Neste contexto, a viabilidade celular e distribuição no meio celular foram analisadas.

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de redução do MTT. Células Neuro 2a foram incubadas durante 24 horas com diferentes concentrações dos complexos, e a formação do sal de formazan foi acompanhada no máximo de absorção em 570 nm, os resultados deste ensaio são apresentados na Figura 4.16. Ao decorrer do experimento, efeitos adversos não parecem ocorrer com viabilidade celular maior do que 90% para concentrações até 50  $\mu$ M.

A absorção celular e a localização dos complexos *in vitro* nas células Neuro 2a foram investigadas por microscopia confocal de varredura laser, com a utilização das propriedades luminescentes dos complexos como sondas. Neste ensaio, as células Neuro 2a foram tratadas de forma independente com 0,5  $\mu\text{M}$  de complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  e  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em meio de diferenciação durante 24 horas numa incubadora humidificada a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . A Figura 4.17 apresenta as imagens de contraste de interferência diferencial (DIC) e da sobreposição de luminescência para cada complexo com a marcação de núcleo Hoechst-33374. A partir destas imagens, observou-se que ambos os complexos se acumularam na região do citoplasma e parecem não penetrar no núcleo das células. Mais importante, os complexos preservam suas propriedades luminescentes nas células Neuro 2a, o que indica que a morfologia e a integridade dos complexos e das células são resguardadas, uma vez que, produtos aquo/hidroxi ou Ru(III) que, em princípio, poderiam ser formados não são emissivos.

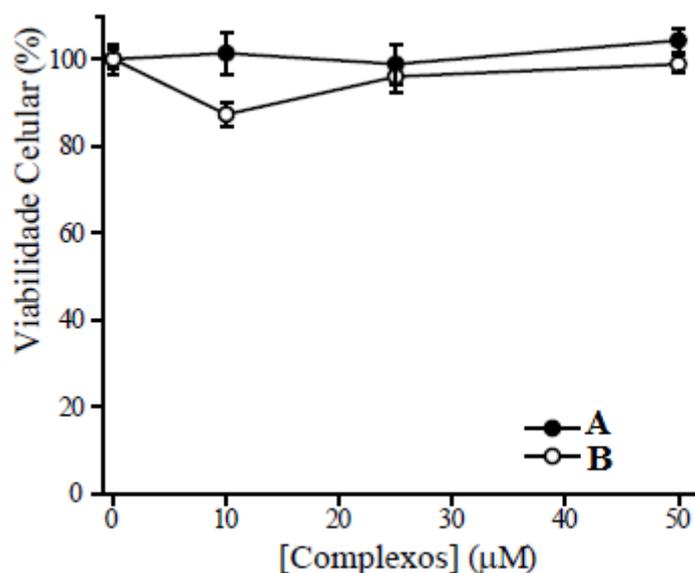


FIGURA 4.16- Ensaio de viabilidade celular MTT, células Neuro 2a expostas aos complexos: (A)  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  e (B)  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Apy})_2]^{2+}$ .

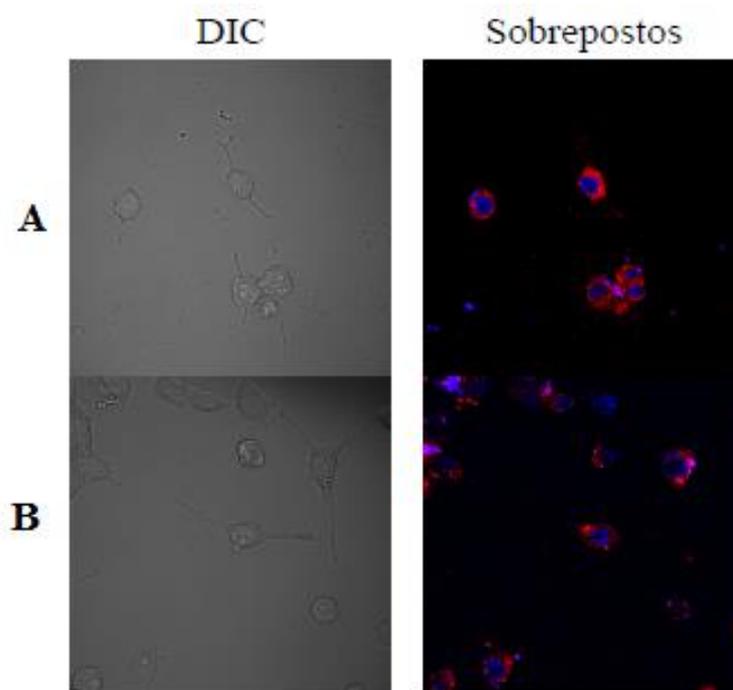


FIGURA 4.17- Imagens de fluorescência confocal de varredura laser de DIC, e da sobreposição de luminescência dos complexos com a marcação de núcleo Hoechst: (A)  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e (B)  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.  $\lambda_{exc}$  = 450 nm e  $\lambda_{em}$  = 590 nm.

## 4.7- Atividade terapêutica

### 4.7.1- Inibição das enzimas colinesterases

O potencial de inibição dos complexos foi avaliado para as enzimas acetilcolinesterase recombinante humana (hAChE) e butirilcolinesterase de soro humano (hBuChE), utilizando o método espectrofotométrico proposto por Ellman.<sup>104</sup> Para fins de comparação, o ensaio foi também realizado para os ligantes livres e para o complexo precursor RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>. A atividade inibitória dos complexos frente a acetilcolinesterase da espécie *electrophorus electricus* (eeAChE), para a qual muitos inibidores potenciais tem sido extensivamente descritos também foi investigada.<sup>91,117</sup> A constante de inibição K<sub>i</sub> entre os complexos e a enzima e os valores de IC<sub>50</sub> são descritos na Tabela 4.7.

Os complexos inibiram a atividade da eeAChE, com eficiência significativamente maior em relação ao iodeto de propídio<sup>91</sup> e com potência similar a tacrina.<sup>117</sup> O aumento da potência de inibição da série RuApy> Ruphen >>>Apy demonstrou que a coordenação dos ligantes aminopiridinas e fenantrolina ao centro metálico Ru (II) aumenta as interações complexo-enzima a partir de um efeito sinérgico.<sup>118,119</sup> Por exemplo: o ligante aminopiridina livre não afetou a atividade da enzima, assim, a coordenação ao centro Ru(II) estabiliza a forma protonada da aminopiridina, e impede os efeitos de solvatação aquosa que competem com interações do tipo  $\pi$ -cátion com a AChE.<sup>120,121</sup> A planaridade e aromaticidade do ligante 1,10-fenantrolina favorecem interações de empilhamento- $\pi$  com a enzima.

Não há diferenças significativas entre os complexos de Ru(II) investigados, porém, estes são inibidores cerca de quatro vezes mais potentes da hAChE do que da hBuChE. As análises cinéticas indicam uma inibição reversível do tipo mista para os dois complexos, Figuras 4.18 a 4.20, a reversibilidade e seletividade a AChE são características de fármacos comerciais como Donepezil,<sup>122</sup> Huperzina A<sup>123</sup> e Galantamina.<sup>124</sup>

O modo de inibição observado para os complexos sugere que a interação enzima-complexo pode ser estabelecida no sítio ativo de ligação, como também no sítio periférico da enzima. Este resultado é de especial interesse, uma vez que, inibidores dos dois sítios das colinesterases são amplamente investigados para tratamento DA por atuarem na melhora da cognição e, simultaneamente, na diminuição da agregação do peptídeo  $\beta$ A.<sup>125</sup> O sítio predominante da interação é indicado pelo parâmetro alfa ( $\alpha$ ), onde  $\alpha > 1$  indica uma inibição com maior caráter competitivo.<sup>126</sup> Nossos resultados ( $\alpha > 1$ ) sugerem que os complexos apresentem uma maior afinidade pelo sítio ativo de ligação da enzima.

Diante desses resultados, uma comparação entre os complexos desse trabalho e inibidores comerciais pode ser apresentada. Como descrito na

literatura, a ligação do inibidor donepezil<sup>127</sup> com a enzima é dependente de interações de empilhamento- $\pi$  com os resíduos Phe295 do sítio ativo de ligação e Trp286 do sítio periférico da AChE. De modo que, a alta seletividade para a AChE é justificada pela ausência desses dois resíduos na BuChE. Assim, nossos resultados indicam que esses resíduos também são importantes para a interação com os complexos do trabalho, uma vez que a estrutura planar e aromática do ligante fenantrolina pode estabelecer interações de empilhamento- $\pi$  com a AChE. Por outro lado, o inibidor comercial tacrina<sup>128</sup> estabelece forte interações apenas com o sítio ativo de ligação, através de interações de empilhamento- $\pi$  do anel indólico com o resíduo Trp86, e de ligações de hidrogênio com o resíduo His447. Os complexos do trabalho também podem estabelecer ligações de hidrogênio a partir do nitrogênio protonado do grupo amino com resíduos do sítio ativo de ligação.

Neste contexto, os complexos podem estar envolvidos em interações de empilhamento- $\pi$  com o sítio aniônico periférico da enzima através da estrutura planar e aromática do ligante 1,10-fenantrolina, ao passo que, os grupos amino protonado do ligante aminopiridina são capazes de interagir com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo de ligação.

A enzima AChE é conhecida por acelerar a formação dos agregados do peptídeo beta-amilóide pela formação de um complexo estável A $\beta$ -AChE, envolvendo seu sítio periférico.<sup>18</sup> Diferenças nesse sítio na BuChE,<sup>129</sup> como a ausência do resíduo Trp286, impedem sua interação com o peptídeo. De forma que, a BuChE não desempenha um papel de importância no processo de agregação desse peptídeo. A interação de inibidores com o sítio periférico da AChE impede sua interação com o peptídeo, conseqüentemente desaceleram o processo de agregação. A tacrina<sup>117</sup> é mais potente na inibição da enzima BuChE interagindo com o sítio ativo de ligação, como conseqüência não tem efeitos na interação  $\beta$ A-AChE. Por outro lado, o inibidor iodeto de propídio<sup>130</sup> é conhecido

por interagir exclusivamente com o sítio periférico da AChE, não apresentando atividade contra a BuChE e inibe fortemente a interação  $\beta$ A-AChE.

O modo misto de inibição observado para os complexos do trabalho sugerem que os complexos também possam atuar na inibição da interação  $\beta$ A-AChE. A Figura 4.21 apresenta os possíveis resíduos de interação da hAChE com os complexos do trabalho.

TABELA 4.7 - Dados de inibição enzimática para uma série de compostos.

	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			K <sub>i</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		
	eeAChE	hAChE	BuChE	eeAChE	hAChE	BuChE
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	0,73	8,72	39,75	1,37	2,52	22,08
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	1,58	9,64	50,34	1,4	2,64	-----
Iodeto de propídio	15,75	-----	-----	-----	-----	-----
<sup>91</sup> [Ru(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	9,23	-----	-----	4,1	-----	-----
<sup>91</sup> [Ru(phen) <sub>2</sub> (bxbg)] <sup>2+</sup>	0,3	-----	-----	0,04	-----	-----
<sup>131</sup> Donepezil	-----	0,0116	7,273	-----	-----	-----
<sup>117</sup> Tacrina	0,18	0,147	0,036	-----	-----	-----
<sup>132</sup> Rivastigmina	-----	3,03	0,30	-----	-----	-----

bxbg = bis(o-xylene)bipyridine glycoluril;

eeAChE= acetilcolinesterase da espécie *electrophorus electricus*;

hAChE = acetilcolinesterase humana; BuChE = butirilcolinesterase humana.

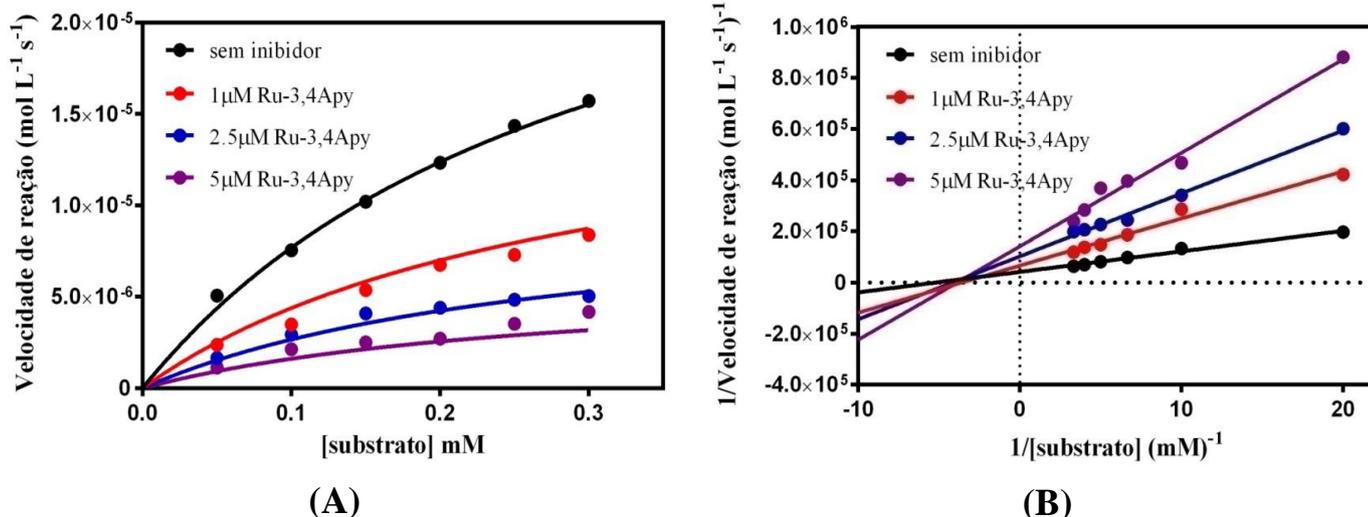


FIGURA 4.18- Estudo cinético do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  com eeAChE (A) Michaelis-Menten e (B) regressão de duplo recíproco.

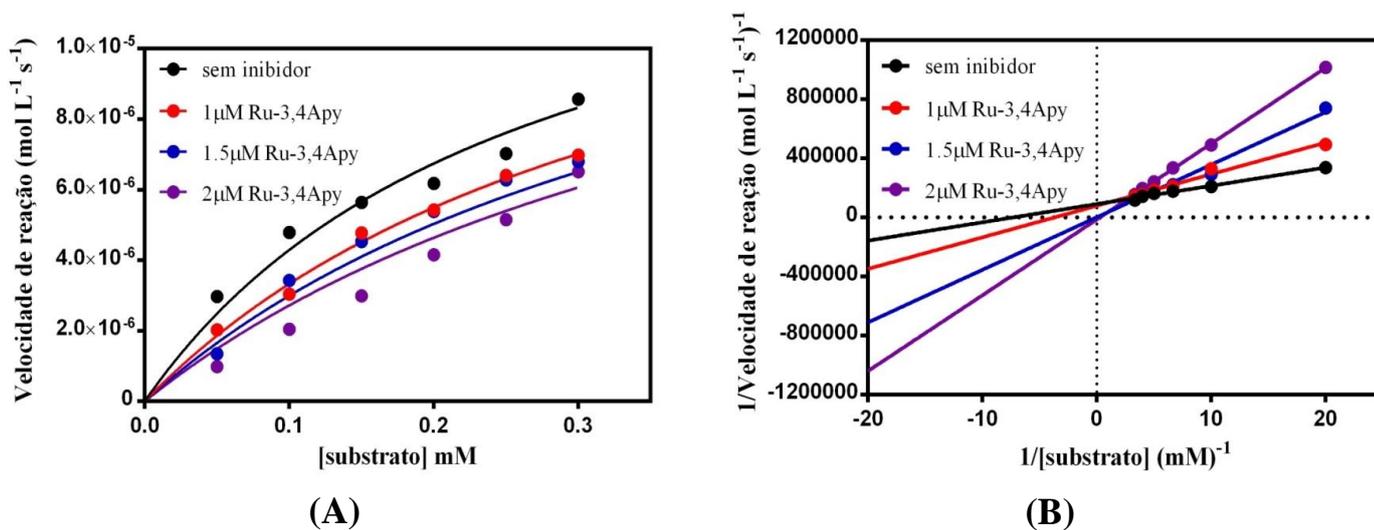


FIGURA 4.19- Estudo cinético do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  com hAChE (A) Michaelis-Menten e (B) regressão de duplo recíproco.

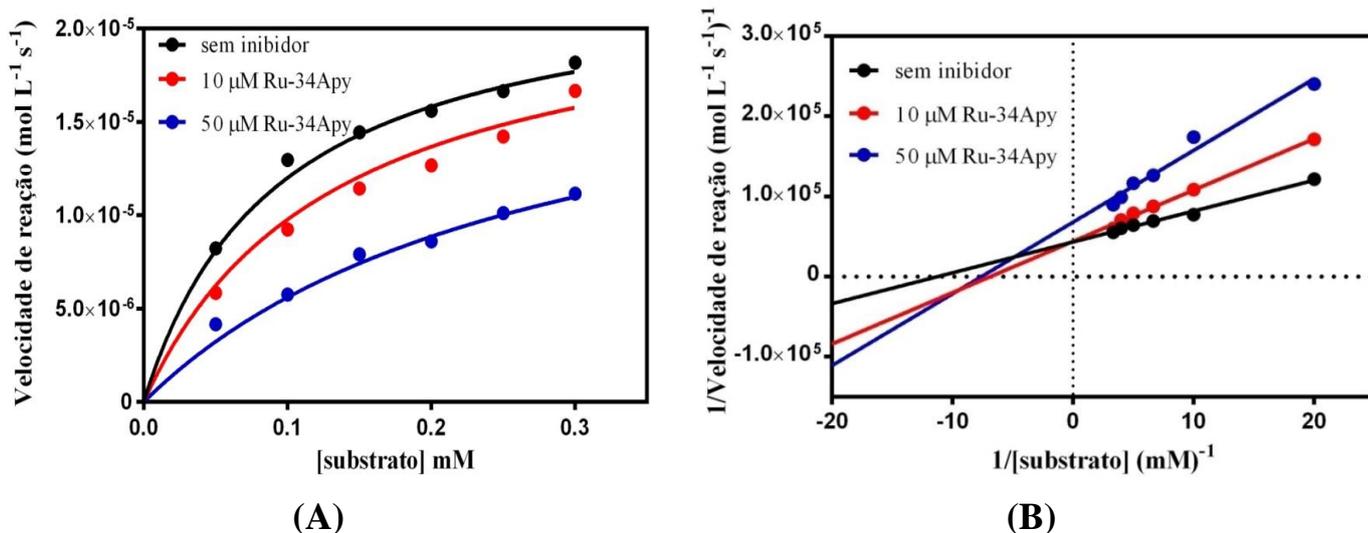


FIGURA 4.20- Estudo cinético do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  com hBuChE (A) Michaelis-Menten e (B) regressão de duplo recíproco.

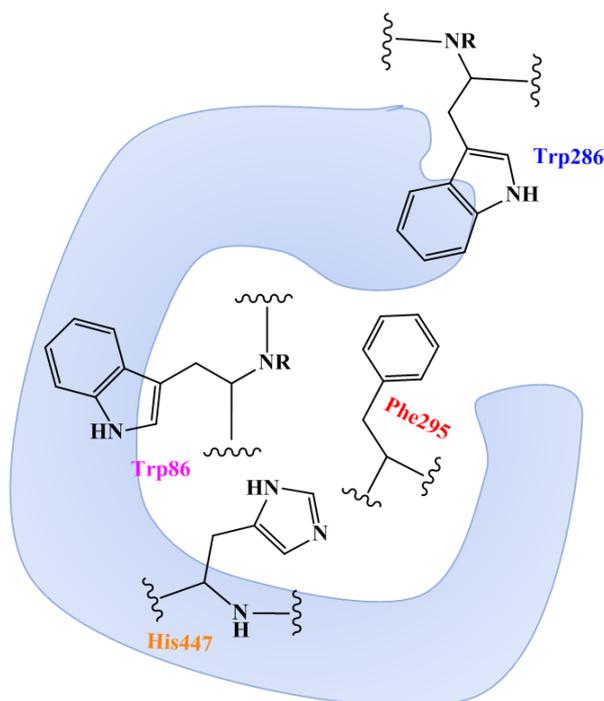


FIGURA 4.21- Representação de possíveis resíduos de interação da hAChE com os complexos do trabalho.

Uma visão mais aprofundada da interação do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  com a hAChE foi abordada pelo estudo por RMN-STD<sup>133</sup>, Figura 4.22. Os sinais presentes no espectro RMN-STD são resultados da interação dos prótons do complexo com a enzima. O mapa de epitopo mostra

que os prótons da fenantrolina estão mais próximos da enzima, tão bem como a contribuição do ligante 3,4-diaminopiridina. Esses resultados estão em conformidade ao que foi sugerido para o modo de inibição dos complexos do trabalho.

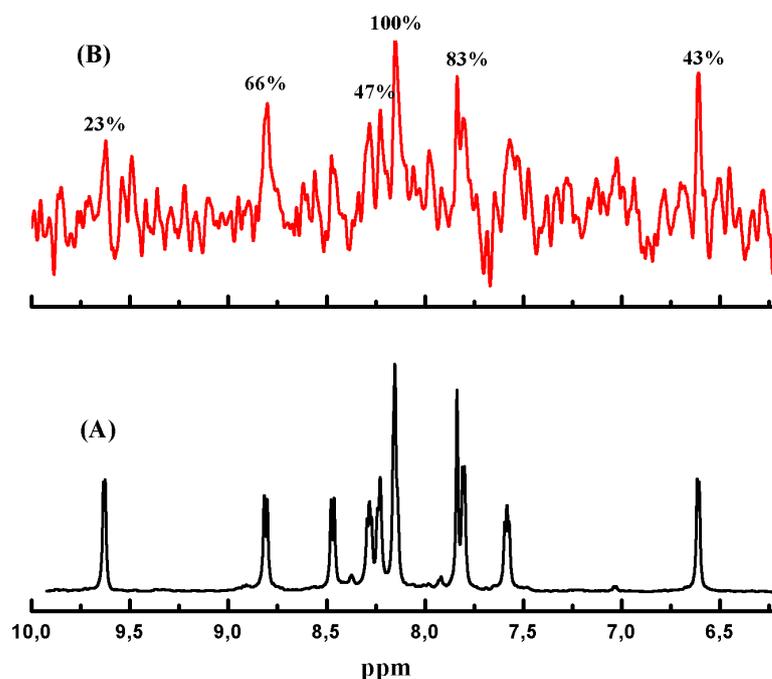


FIGURA 4.22- Espectros (A) *off-resonance* e (B) STD do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> na presença da hAChE.

#### 4.7.2- Capacidade antioxidante

O potencial de inibição dos complexos frente às enzimas colinesterases estimulou o planejamento de experimentos para avaliar a capacidade dos complexos sobre o estresse oxidativo, uma vez que se conhece que o excesso da produção de radicais livres<sup>134,135,136,137</sup> está envolvido na patologia da doença de Alzheimer.<sup>138</sup> Entre os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (ROS) se destacam, e entre estas espécies o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) é o mais agressivo, o qual reage com a maioria das moléculas (proteínas, lípidos, carboidratos e ácidos nucleicos) envolvidas no metabolismo

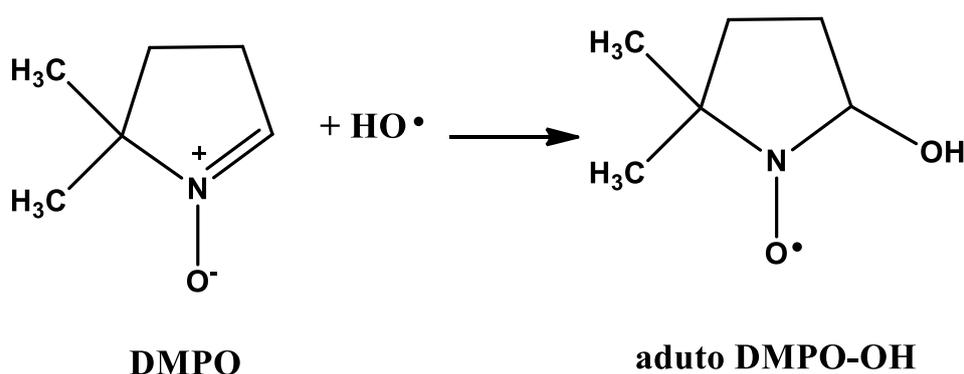
humano. Conseqüentemente, na busca de um novo agente antioxidante a avaliação da eliminação direta do radical  $\text{OH}^\bullet$  é altamente relevante.

#### 4.7.2.1- Capacidade sequestradora do radical hidroxila

A capacidade dos complexos em sequestrar o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) foi avaliada por espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR). O radical  $\text{OH}^\bullet$  foi gerado pela reação de Fenton,<sup>139</sup> o qual apresenta um tempo curto de duração, Esquema 4.1. Por este motivo, o sequestrador DMPO<sup>105</sup> foi usado para formar o aduto DMPO-OH, que apresenta um tempo de duração mais longo e pode ser detectado por EPR, Esquema 4.2. O espectro de EPR do aduto formado é caracterizado por quatro linhas apresentando razão de intensidades 1:2:2:1 com constante de acoplamento hiperfino de 14,9 G ( $a^n$  e  $a^h$ )<sup>140</sup>.



ESQUEMA 4.1- Reação de Fenton.



ESQUEMA 4.2- Formação do aduto DMPO-OH.

A Figura 4.23 apresenta o espectro de EPR do aduto DMPO-OH na ausência e na presença do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Este complexo compete com o DMPO pelo radical de forma dependente a concentração: 52,3%

(33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); 46,7% (66  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 31,24% (132  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Por outro lado, o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e os ligantes livres (3,4-diaminopiridina e 4-aminopiridina) não foram capazes de competir com o DMPO pelo radical. Isso indica que o grupo amino na posição meta do anel piridina do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> é fundamental para a atividade antioxidante do complexo.

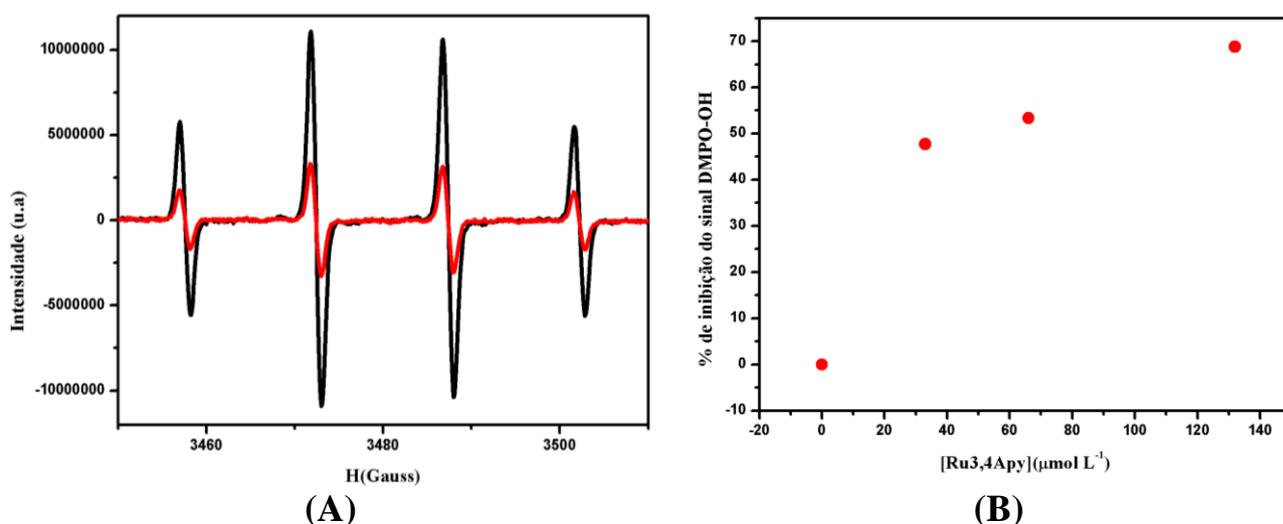


FIGURA 4.23- (A) Espectro de EPR do aduto DMPO-OH gerado *in situ* pela reação de Fenton (preto) e imediatamente após a adição de 132  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (vermelho). (B) Porcentagem de inibição do sinal do aduto DMPO-OH em função da concentração de complexo.

#### 4.7.2.2- Estudo dos radicais DDPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>

Dois métodos amplamente empregados na investigação da capacidade antioxidante de moléculas em geral são DDPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>.<sup>141</sup> Estes radicais não são biológicos, mas devido à simplicidade do método são extensivamente aplicados em estudos biológicos.

O radical DDPH<sup>•</sup> representado na Figura 4.24, apresenta um máximo de absorção em 518 nm e um espectro de EPR característico contendo cinco linhas com constante de acoplamento hiperfino ( $a_N$ ) de 9 G,<sup>142</sup> Figura 4.25.

O radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  está representado na Figura 4.26. Esse radical apresenta o espectro de absorção no UV-Vis apresentado na Figura 4.27, com máximo de absorção em 734 nm.<sup>106</sup>

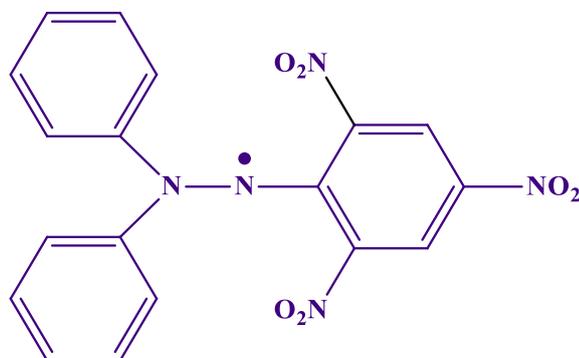


FIGURA 4.24- Representação da estrutura do radical  $\text{DPPH}^{\cdot}$ .

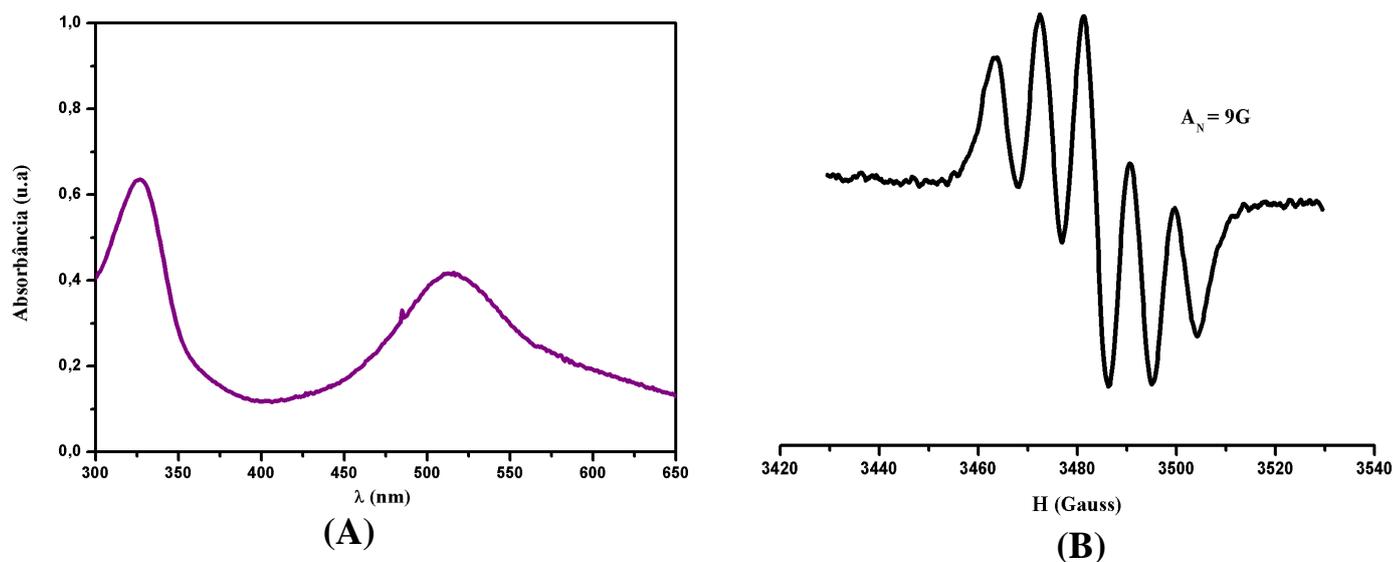


FIGURA 4.25- (A) Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis e (B) espectro de EPR do radical  $\text{DPPH}^{\cdot}$ .

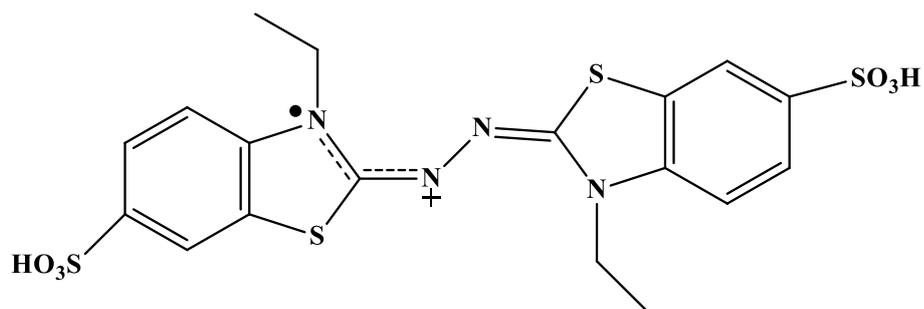


FIGURA 4.26- Representação da estrutura do radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ .

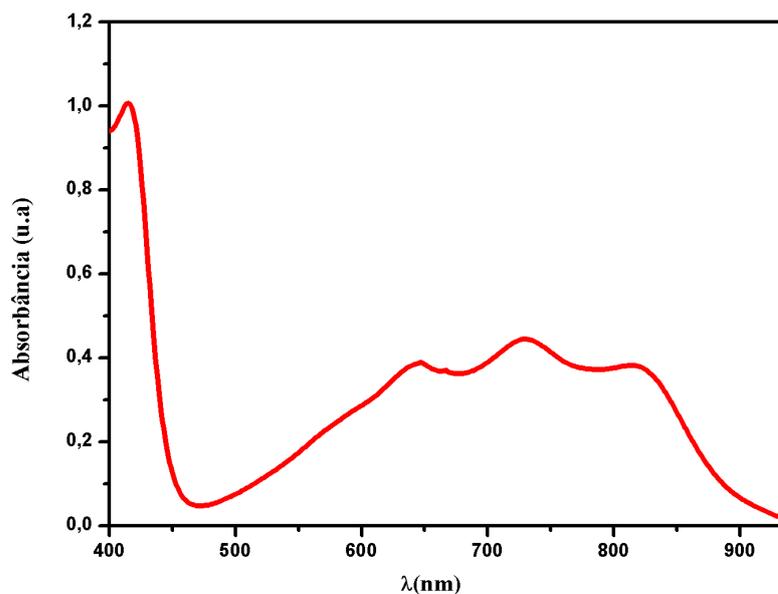


FIGURA 4.27- Espectro de absorção no UV-Vis do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

O estudo do radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  foi realizado por espectroscopia de ressonância paramagnética. A reação entre o radical e os compostos foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo.

As Figuras 4.28 e 4.29 apresentam o decaimento da intensidade do sinal de EPR do radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  em função do tempo na presença do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  e do ligante livre 3,4-diaminopiridina. O complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{-Apy})_2]^{2+}$  e o ligante 4-aminopiridina não foram capazes de reagir com o radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ . Ao analisar a velocidade de reação dos compostos com o radical, o ligante livre inibe por completo o sinal do radical em um tempo menor de reação, em aproximadamente 30 minutos. Enquanto que o complexo inibe completamente o sinal após 60 minutos.

O estudo do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi conduzido por espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis, a partir do decaimento do máximo de absorção em 734 nm. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para os complexos e ligantes livres estão descritos na Tabela 4.8. Trolox e ácido ascórbico foram utilizados como controle positivo. Resultados similares foram obtidos em relação ao radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , onde o complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  e o ligante livre 3,4-

diaminopiridina apresentaram potencial antioxidante, com resultados inferiores ao ácido ascórbico e trolox.

Os resultados contraditórios estão relacionados a acessibilidade aos radicais, o que leva a maior eficiência do ligante 3,4-diaminopiridina frente aos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> em comparação ao complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Estudos recentes descrevem as limitações do estudo do radical DPPH<sup>•</sup> para a avaliação da capacidade antioxidante de moléculas grandes.<sup>143,144</sup>

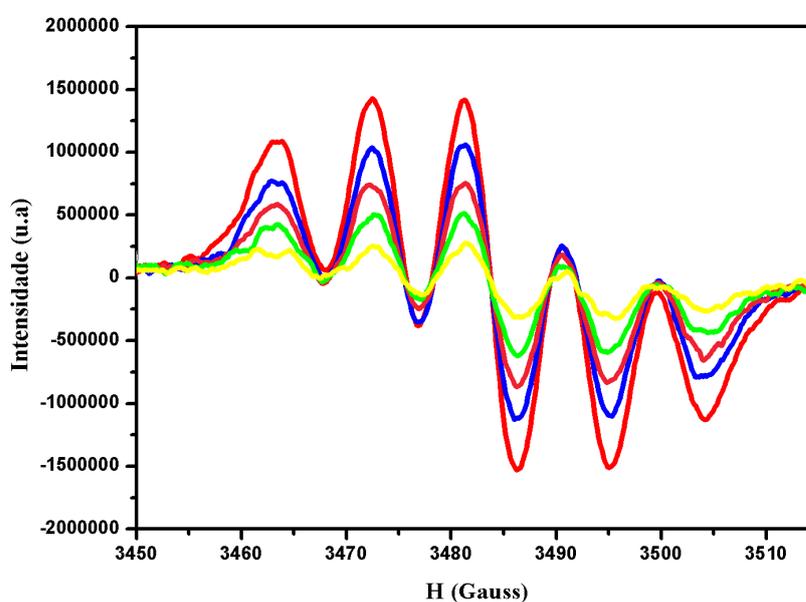


FIGURA 4.28- Espectro de EPR do radical DPPH<sup>•</sup> para o controle (vermelho) e na presença do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (1 mmol L<sup>-1</sup>) em diferentes tempos de reação: 15 minutos (azul); 30 minutos (rosa); 45 minutos (verde) e 60 minutos (amarelo).

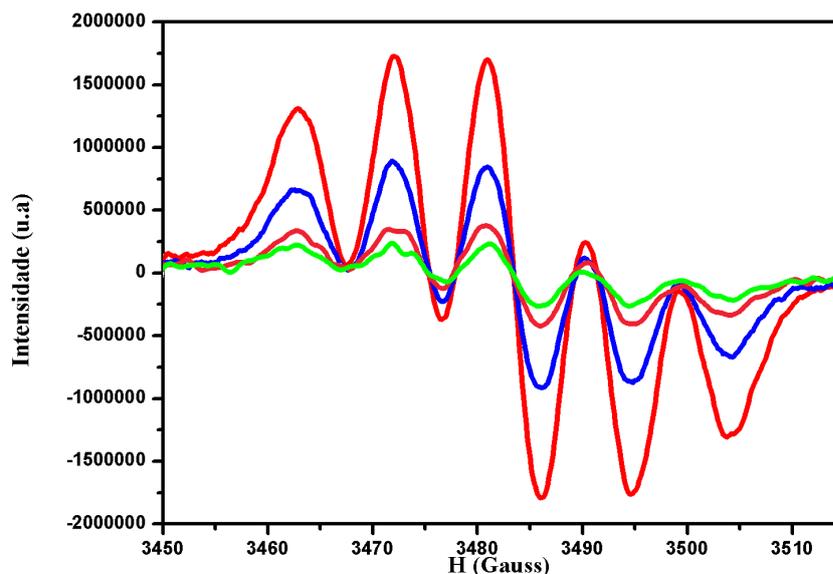


FIGURA 4.29- Espectro de EPR do radical DPPH• para o controle (vermelho) e na presença do ligante livre 3,4-diaminopiridina (1 mmol L<sup>-1</sup>) em diferentes tempos de reação: 3 minutos (azul); 15 minutos (rosa) e 30 minutos (verde).

TABELA 4.8– Valores de IC<sub>50</sub> no estudo do radical ABTS<sup>•+</sup>.

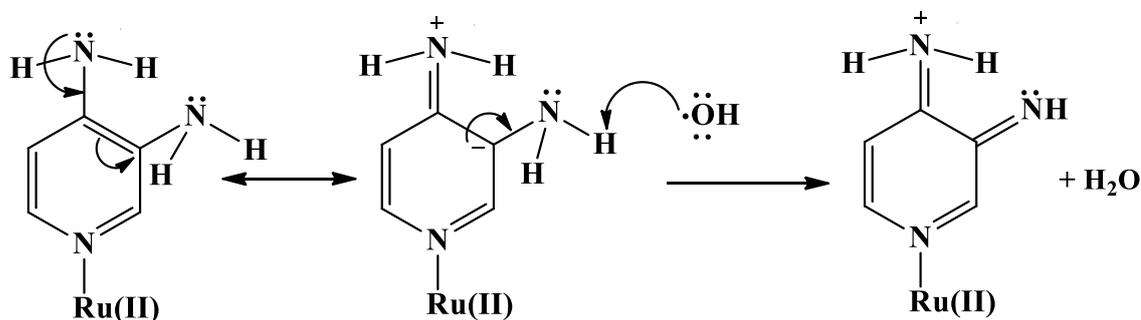
	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (3,4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	64,5
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4-Apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	>>100
3,4-diaminopiridina	31,5
4-aminopiridina	>>100
Trolox	17,92
Ácido ascórbico	18,24

Estes resultados reforçam as propostas obtidas com o estudo do radical OH•, o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> apresentou boa capacidade de eliminar todos os radicais testados a partir da doação de um átomo de H do grupo NH<sub>2</sub> do anel piridina coordenado ao centro Ru(II) para o radical livre. O

ligante 3,4-diaminopiridina livre não é doador de hidrogênio, assim, a reatividade do complexo está relacionada principalmente à influência da coordenação do ligante 3,4-diaminopiridina ao centro Ru(II), e seus efeitos sobre o grupo NH<sub>2</sub> na posição meta. A coordenação do ligante 3,4-diaminopiridina ao Ru(II) diminui o caráter básico do anel aromático gerando uma deslocalização do par de elétrons do grupo NH<sub>2</sub> na posição orto e, conseqüentemente, aumenta a força doadora de elétrons do grupo NH<sub>2</sub> na posição meta, o que facilita o ataque do radical OH• através do caminho típico de abstração de hidrogênio.

De forma similar, Zhanyong Guo<sup>145</sup> relatou a atividade antioxidante de uma série de inulinas derivadas com aminopiridinas como substituintes. Neste estudo os compostos derivados apresentaram melhor atividade antioxidante do que a inulina, e aqueles com dois grupos aminos apresentaram melhor efeito de eliminação do que os derivados com apenas um grupo amino.

Um mecanismo de acordo com estas observações é descrito no Esquema 4.3, no qual a redução do radical OH• pelo DMPO compete com a capacidade de eliminação do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> a partir da transferência de um átomo de hidrogênio (HAT).



ESQUEMA 4.3- Possível modelo para redução do radical OH• pelo complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

## 4.8- Diagnóstico

### 4.8.1- Monitoramento do processo de agregação do peptídeo $\beta A_{1-40}$

A interação entre os complexos do trabalho e o peptídeo  $\beta A_{1-40}$  durante seu processo de agregação foi investigada por medidas de imagem luminescente dos complexos utilizando a técnica espectroscópica por microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência (FLIM). Para fins comparativos, os ensaios também foram conduzidos para o composto tioflavina (ThT), o qual é amplamente usado como padrão de imagem fluorescente na identificação de fibrilas do  $\beta A$ .

As imagens foram obtidas em solução nos tempos de agregação, 0 hora, 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas. As imagens obtidas para os complexos do trabalho e para a ThT são apresentadas na Figura 4.30.

As imagens revelam as mudanças na conformação do  $\beta A_{1-40}$ , retratando desde os monômeros até a formação das fibrilas. É importante ressaltar que o próprio  $\beta A_{1-40}$  apresenta uma fluorescência intrínseca que é visível como o fundo da imagem mostrada na Figura 4.30, 1 hora de agregação para ThT. Este comportamento está de acordo com trabalhos anteriores com imagens fluorescentes de fibrilas amilóides do tipo poli(ValGlyGlyLeuGly) em solução aquosa por microscopia confocal.<sup>146</sup> No entanto, os complexos apresentam luminescência suficiente forte para diferenciar claramente da fluorescência de fundo do  $\beta A_{1-40}$  e permitir o monitoramento do processo de agregação  $\beta A$ .

Nas imagens obtidas no tempo zero de agregação,  $t = 0$ , apenas a fosforescência dos complexos foi observada. Após 1 hora de agregação, pequenos agregados foram observados, os quais são resultado da associação entre os monômeros formando os oligômeros. Com as imagens obtidas após 3 horas de agregação foram observados agregados maiores, os quais apresentam

uma conformação ordenada. Imagens obtidas em filme, Figura 4.31, revelaram que os oligômeros observados em 1 hora de agregação, apresentam uma distribuição alinhada. Os quais passam por uma etapa de crescimento e alinhamento entre si para formar estruturas lineares e alongadas, as protofibrilas. Essas imagens também revelaram que as protofibrilas observadas em 3 horas de agregação são lineares e alinhadas, como também a presença dos oligômeros. Em seis horas de agregação foi observada uma mistura de agregados, como oligômeros, protofibrilas e fibrilas. Após 24 horas de agregação apenas as fibrilas foram observadas.

Em parte, os resultados para os complexos do trabalho estão de acordo com os obtidos para ThT, onde o processo de agregação do peptídeo  $\beta A_{1-40}$  pode ser acompanhado pela luminescência dos compostos. A principal diferença é que os complexos são mais eficientes para seguir as fases iniciais do processo de agregação. Estes resultados são muito promissores, uma vez que as espécies mais tóxicas estão presentes nestas etapas.<sup>147</sup>

Todas as imagens mostram que a luminescência dos complexos segue uma distribuição ordenada que acompanha o crescimento dos agregados, sugerindo que os complexos podem reconhecer e alinhar locais específicos entre as estruturas.

O ligante fenantrolina livre interage de forma fraca com  $\beta A$  através de interações não covalentes com os anéis aromáticos Phe4, Tyr10, e Phe19.<sup>148</sup> Porém, nos complexos  $\{Ru(phen)_2(dppz)\}$ <sup>84,85</sup> e  $Pt(phen)_2Cl_2$ ,<sup>70</sup> os ligantes fenantrolina e dppz favorecem a interação com  $\beta A$  a partir de interações de empilhamento- $\pi$ , de modo que estes complexos interagem fortemente com o peptídeo.

A estrutura rígida do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  em comparação a estrutura flexível da ThT<sup>38</sup> pode explicar as diferenças no modo de ligação com o  $\beta A$ . Comparado a ThT, o complexo  $cis-[Ru(phen)_2(3,4-Apy)_2]^{2+}$  é incapaz de entrar em contato com todas as regiões hidrofóbicas

expostas do  $\beta$ A, mas pode estabilizar os agregados que retêm suficiente hidrofobicidade exposta. Um candidato potencial seriam as pequenas estruturas proto-fibrilares ricas em folhas  $\beta$  que estão diretamente envolvidas na formação das fibrilas.<sup>148</sup> E o alvo candidato mais provável seria a fenda hidrofóbica do  $\beta$ A. Esta hipótese foi suportada pelo estudo com os fragmentos  $\beta$ A<sub>15-21</sub> e  $\beta$ A<sub>22-35</sub>, estes resultados estão descritos a seguir.

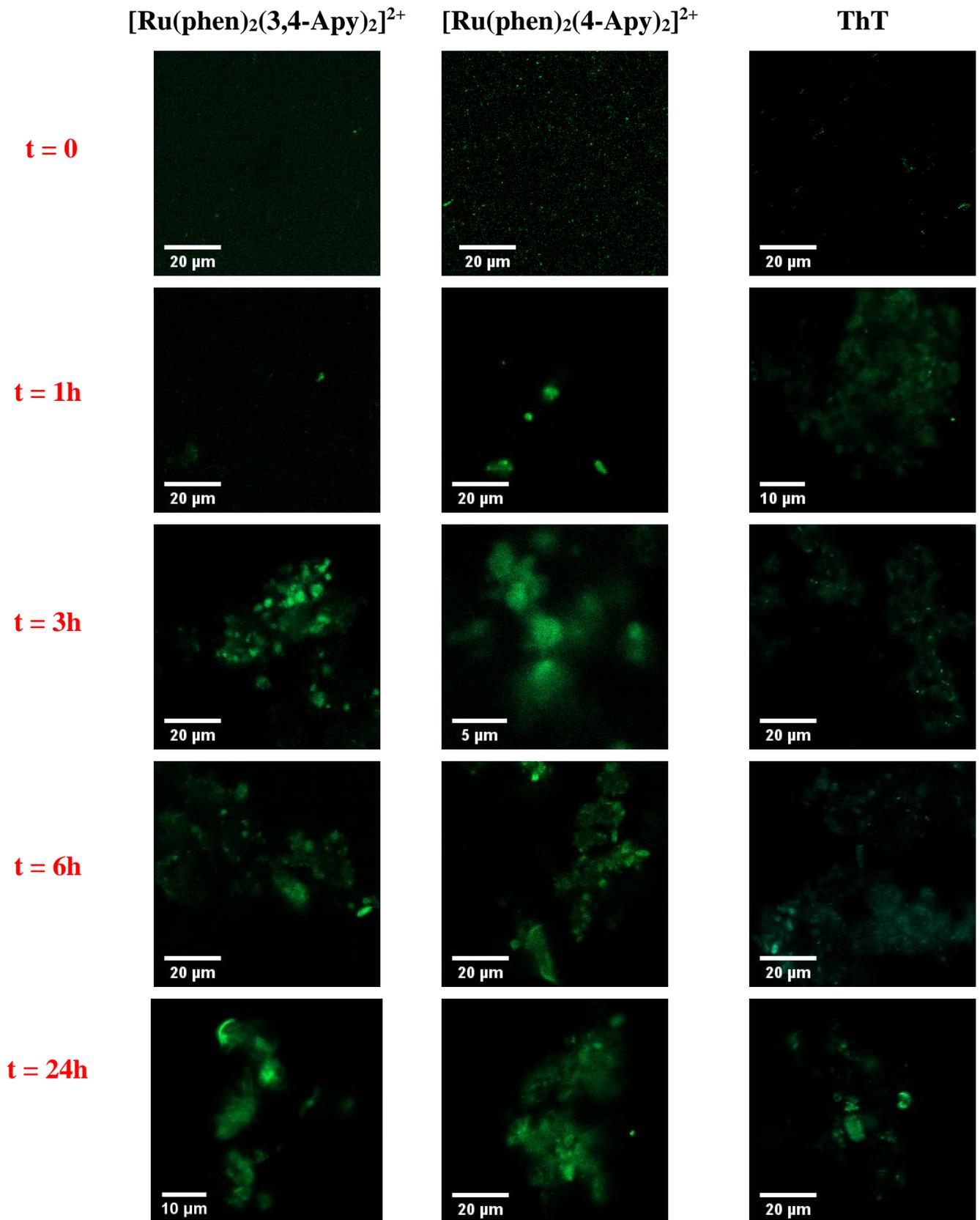


FIGURA 4.30- Monitoramento do processo de agregação do peptídeo  $\beta\text{A}_{1-40}$  com os complexos e com a ThT, imagens obtidas em solução. ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ )

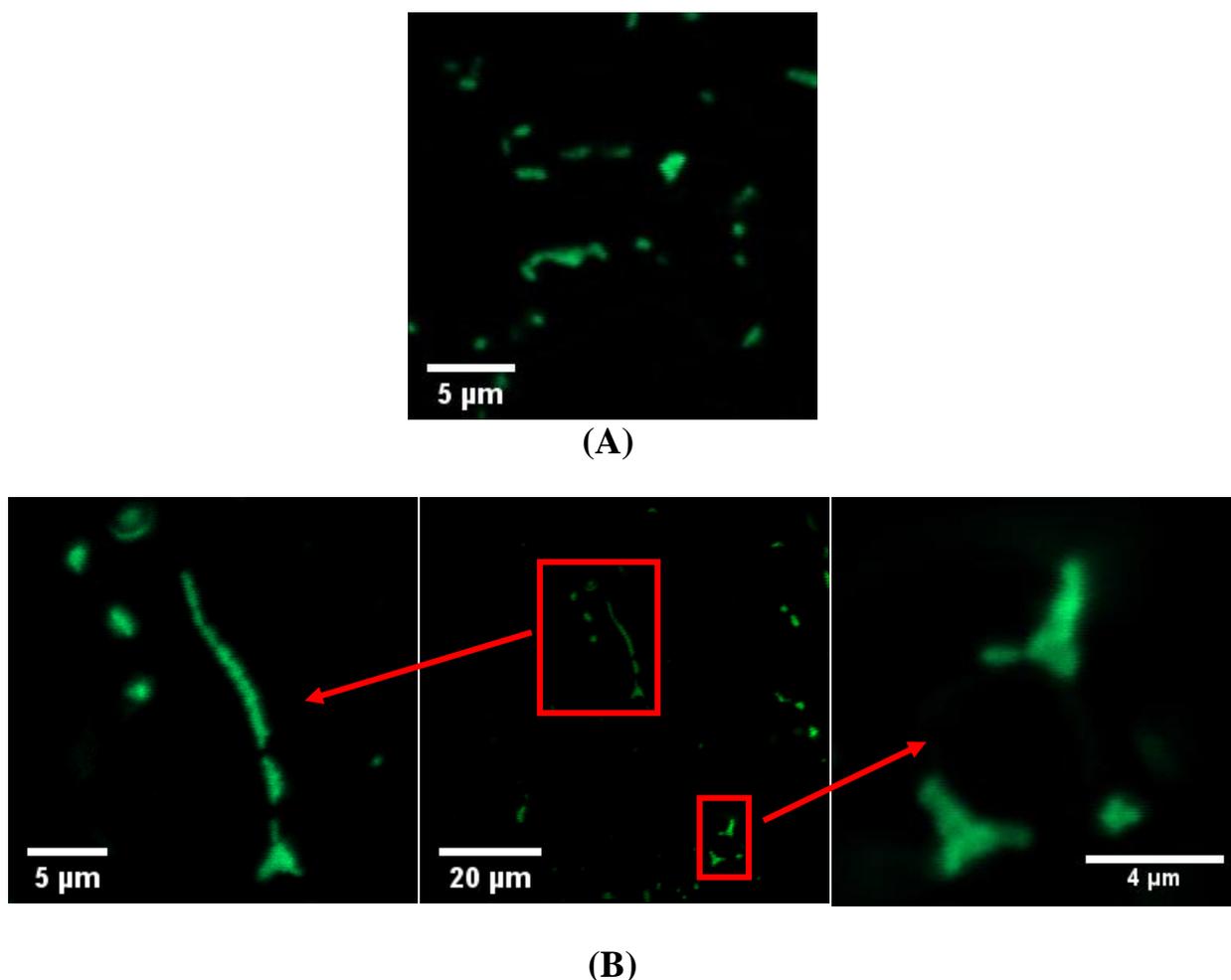


FIGURA 4.31- Imagens obtidas em filme durante o processo de agregação do peptídeo  $\beta A_{1-40}$  para os complexos: (A) 1 hora e (B) 3 horas. ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ )

#### 4.8.2- Monitoramento do processo de agregação dos fragmentos $\beta A_{15-21}$ e $\beta A_{22-35}$

No peptídeo  $\beta A_{22-35}$ , os aminoácidos apolares Val18 e Phe20 não estão presentes impedindo a interação do complexo com o  $\beta A$  por uma interação hidrofóbica. Como esperado o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  não interagem com este peptídeo, Figura 4.32. Estes resultados indicam que a interação é estabelecida com a fenda hidrofóbica do  $\beta A$ , em particular com os resíduos Val18 e Phe20 nas posições 3 e 5 do fragmento  $\beta A_{16-22}$  (KLVFFAE).

Este fragmento é a base hidrofóbica central do  $\beta A$  e é essencial para a polimerização de “full-length” do  $\beta A$ .<sup>149</sup> Além disso, em oligômeros do  $\beta A_{16}$ -

22 as interações hidrofóbicas inter-peptídeo assim como os contatos eletrostáticos, são importantes para a formação da estrutura anti-paralela de folhas  $\beta$ .<sup>149</sup> O direcionamento desta sub-região para a ligação com uma sonda pode aumentar as chances de contatos com “zíper estérico” das fibrilas amilóides. Por este motivo a capacidade do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em monitorar o processo de agregação de  $\beta$ A<sub>15-21</sub> foi investigada.

A Figura 4.33 apresenta os resultados obtidos para o fragmento  $\beta$ A<sub>15-21</sub>. As imagens apresentam um aumento do número de pontos luminescentes do complexo com o tempo, o qual está diretamente relacionado com o progresso da agregação. Os agregados observados foram pequenos, uma vez que os aminoácidos presentes no fragmento  $\beta$ A<sub>25-35</sub> são conhecidos por favorecerem a agregação, os quais não estão presentes nesse fragmento.<sup>150</sup>

Assim, com base nas estruturas ordenadas observadas nas imagens, sugerimos que o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(3,4-Apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> liga-se as cadeias- $\beta$  a partir de um caminho pré-organizado. A interação deve surgir através de empilhamento- $\pi$  entre a porção {Ru(phen)<sub>2</sub>}<sup>2+</sup> e as superfícies hidrofóbicas dos oligômeros do  $\beta$ A a partir dos resíduos Val18 e Phe20. A carga positiva do complexo pode favorecer interações eletrostáticas, e ligações de hidrogênio podem ser estabelecidas entre os grupos amino do anel piridina do ligante 3,4-diaminopiridina e grupos carbonil do peptídeo, as quais também são fundamentais para estabilizar a interação do complexo e do  $\beta$ A, pois permite o alinhamento do complexo a peptídeos adjacentes através de interações de empilhamento- $\pi$  com o ligante fenantrolina.

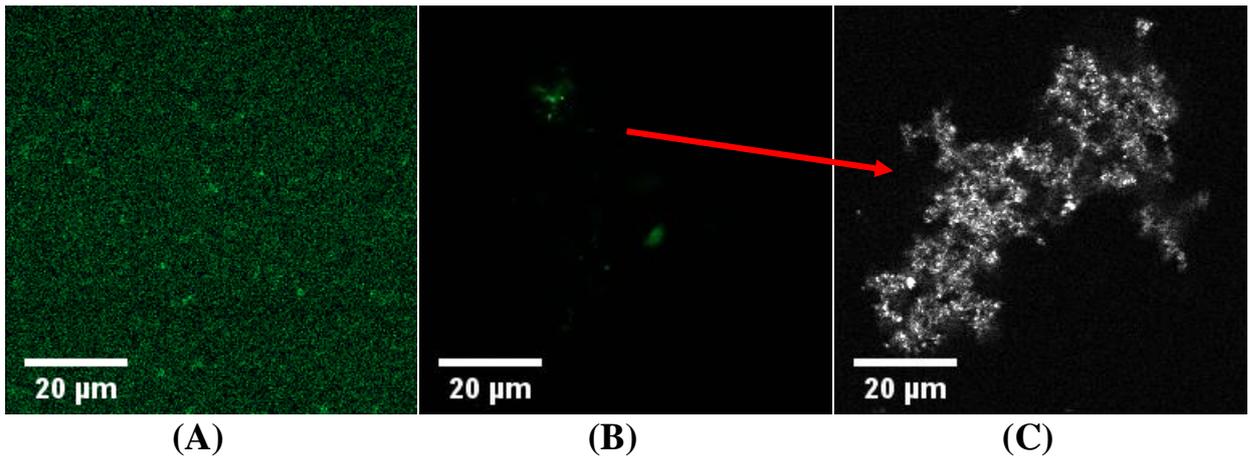


FIGURA 4.32- Imagens obtidas em solução (A)  $t = 0$  e (B)  $t = 24\text{h}$  de agregação do peptídeo  $\beta A_{22-35}$  para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ , (C) imagem de espalhamento. ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ )

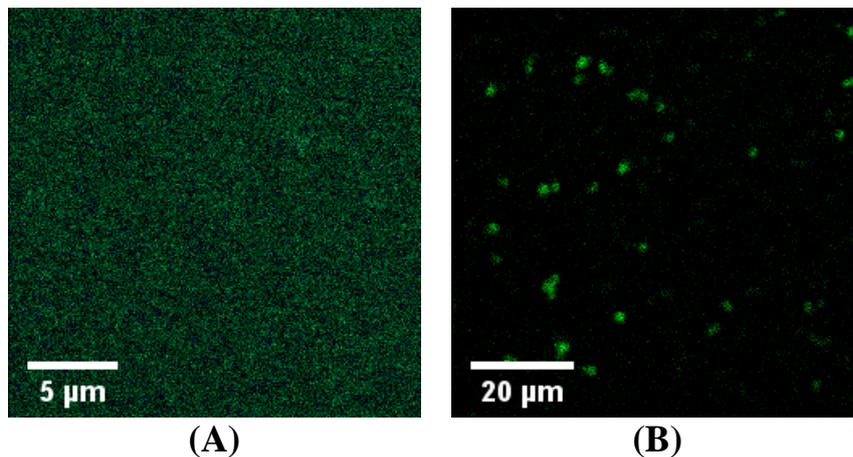


FIGURA 4.33- Imagens obtidas em solução (A)  $t = 0$  e (B)  $t = 24\text{h}$  de agregação do peptídeo  $\beta A_{15-21}$  para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$ . ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ )

Estes resultados mostram o potencial do complexo como diagnóstico por imagem luminescente nos estágios iniciais da doença de Alzheimer, ou seja, na formação das espécies oligoméricas tóxicas.

## 5- CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que os complexos apresentam propriedades teranósticas importantes para a doença de Alzheimer. A simplicidade de síntese dos complexos, assim como solubilidade e estabilidade em solução aquosa são convenientes para aplicação no meio biológico.

As propriedades espectroscópicas, absorção e emissão na região do visível, tempo de vida de emissão longo, como também grande deslocamento Stokes são adequadas para aplicação como sondas luminescentes.

A inibição das enzimas colinesterases e a capacidade antioxidante demonstram o potencial terapêutico dos complexos.

As imagens luminescentes do processo de agregação do  $\beta A_{1-40}$  obtidas por microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM) demonstraram o potencial dos complexos na investigação das origens e mudanças conformacionais importantes para o diagnóstico da doença de Alzheimer.

Os resultados obtidos demonstram o potencial do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})^2]^{2+}$  como candidato a agente teranóstico para o diagnóstico por imagem luminescente nas fases iniciais da doença de Alzheimer e tratamento terapêutico.

## 6- REFERÊNCIAS

- 
- <sup>1</sup> BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D.; JONES, E. "Alzheimer's disease". *Lancet*, 377, 1019–1031, 2011.
- <sup>2</sup> QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. "Alzheimer's disease". *The New England Journal of Medicine*, 362, 329–344, 2010.
- <sup>3</sup> <http://www.alz.co.uk/sites/default/files/pdfs/dementia-in-the-americas-BRAZILIAN-PORTUGUESE.pdf>. Acessado em: 31/01/2016.
- <sup>4</sup> <http://www.abraz.org.br/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer>
- <sup>5</sup> WILLIAMS, S. C. P. "Alzheimer's imaging agents struggle to find a market outside trials". *Nature Publishing Group*, 19, 12, 1551, 2013.
- <sup>6</sup> KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update". *Pharmacological Reports*, 195–203, 2014.
- <sup>7</sup> YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. "Current and future treatments for Alzheimer's disease". *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6, 1, 19–33, 2013.
- <sup>8</sup> KARRAN, E.; MERCKEN, M.; STROOPER, B. DE. "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics". *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 9, p. 698–712, 2011.
- <sup>9</sup> NUNOMURA, N.; PERRY, G.; ALIEV, G.; HIRAI, K.; TAKEDA, A.; BALRAJ, E. K.; JONES, P. K.; GHANBARI, H.; WATAYA, T.; SHIMOHAMA, S.; CHIBA, S.; ATWOOD, C. S.; PETERSEN, R. B.; SMITH, M. A. "Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease". *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60, 8, 759-767, 2001.
- <sup>10</sup> FRANCIS, P. T.; PALMERB, A. M.; SNAPEB, M.; WILCOCKC, G. K. "The cholinergic hypothesis of Alzheimer ' s disease : a review of progress". *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66, 137–147, 1999.
- <sup>11</sup> GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; YU, Q.-S.; ZHU, X.; HOLLOWAY, H. W.; PERRY, T.; LEE, B.; INGRAM, D. K.; LAHIRI, D. K. "A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase". *Current Medical Research and Opinion*, 17, 3, 159–165, 2001.

- 
- <sup>12</sup> GIACOBINI, E. "Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives". *Pharmacological Research*, 50, 4, 433–440, 2004.
- <sup>13</sup> SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. "Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein". *Science*, 253, 872–879, 1991.
- <sup>14</sup> TAYLOR, P. "The Cholinesterases". *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 7, 281–320, 1991.
- <sup>15</sup> DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. "Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 3, 407–428, 2009.
- <sup>16</sup> SALGA, S. M.; ALI, H. M.; ABDULLAH, M. A.; ABDELWAHAB, S. I.; WAI, L. K.; BUCKLE, M. J. C.; SUKUMARAN, S. D.; HADI, A. H. A. "Synthesis, characterization, acetylcholinesterase inhibition, molecular modeling and antioxidant activities of some novel Schiff bases derived from 1-(2-ketoiminoethyl)piperazines". *Molecules*, 16, 9316–9330, 2011.
- <sup>17</sup> SOREQ, H.; SEIDMAN, S. "Acetylcholinesterase-new roles for an old actor". *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 4, 294–302, 2001.
- <sup>18</sup> INESTROSA, N. C.; ALVAREZ, A.; PÉREZ, C. A.; MORENO, R. D.; VICENTE, M.; LINKER, C.; CASANUEVA, O. I.; SOTO, C.; GARRIDO, J. "Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- $\beta$ -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme". *Neuron*, 16, 881–891, 1996.
- <sup>19</sup> CRISMON, M. L. "Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease". *Annals of Pharmacotherapy*, 28, 6, 744-751, 1994.
- <sup>20</sup> SUGIMOTO, H.; IIMURA, Y.; YAMANISHI, Y.; YAMATSU, K. "Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds". *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 24, 4821-4829, 1995.
- <sup>21</sup> GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A.; VEROFF, A. E.; CUTLER, N. R. "Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit". *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 109, 1053-1065, 2002.

- 
- <sup>22</sup> MARKESBERY, W. R.; CARNEY, J. M. "Oxidative alterations in Alzheimer's disease". *Brain pathology*, 9, 133–146, 1999.
- <sup>23</sup> SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. "Oxidative Stress and Neurotoxicity". *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1, 172–188, 2008.
- <sup>24</sup> POPESCU, B.F.; NICHOL, H. "Mapping brain metals to evaluate therapies for neurodegenerative disease". *CNS Neuroscience Therapy*. 17, 256–268, 2011.
- <sup>25</sup> LOVELL, M. A.; ROBERTSON, J. D.; TEESDALE, W. J.; CAMPBELL, J. L.; MARKESBERY, W. R. "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques". *Journal of the Neurological Sciences*, 158, 47–52, 1998.
- <sup>26</sup> ATWOOD, C.S.; HUANG, X.; KHATRI, A.; SCARPA, R. C.; KIM, Y. S.; MOIR, R. D.; TANZI, R. E.; ROHER, A. E.; BUSH, A. I. "Copper catalyzed oxidation of Alzheimer A $\beta$ ". *Cellular and Molecular Biology*, 46, 777–783, 2000.
- <sup>27</sup> ATWOOD, C.S.; SCARPA, R. C.; HUANG, X.; MOIR, R. D.; JONES, W. D.; FAIRLIE, D. P.; TANZI, R. E.; BUSH, A. I. "Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42". *Journal of Neurochemistry*, 75, 1219–1233, 2000.
- <sup>28</sup> CURTAIN, C.C.; ALI, F.; VOLITAKIS, I.; CHERNY, R. A.; NORTON, R. S.; BEYREUTHER, K.; BARROW, C. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I.; BARNHAM, K. J. "Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits". *Journal of Biological Chemistry*, 276, 20466–20473, 2001.
- <sup>29</sup> DANIELSSON, J.; PIERATTELLI, R.; BANCI, L.; GRASLUND, A. "High-resolution NMR studies of the zinc-binding site of the Alzheimer's amyloid beta-peptide". *The FEBS Journal*, 274, 46–59, 2007.
- <sup>30</sup> SYME, C.D., VILES, J.H. "Solution <sup>1</sup>H NMR investigation of Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> binding to amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) of Alzheimer's disease". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764, 246–256, 2006.
- <sup>31</sup> SAURA, C.A.; PARRA-DAMAS, A.; ENRIQUEZ-BARRETO, L. "Gene expression parallels synaptic excitability and plasticity changes in Alzheimer's disease". *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 1–14, 2015.

- 
- <sup>32</sup> KUMAR, S.; WALTER, J. “Phosphorylation of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides - A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer’s disease”. *Aging*, 3, 8, 803–812, 2011.
- <sup>33</sup> HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. “Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease”. *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 6, 358–372, 2015.
- <sup>34</sup> ZÜNDORF, G. REISER, G. “Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection”. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14, 7, 1275-1288, 2011.
- <sup>35</sup> LIU, C-C.; KANEKIYO, T.; XU, H.; BU, G. “Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy”. *Nature Reviews Neurology*, 9, 2, 106–118, 2013.
- <sup>36</sup> ENGELBORGHES, S.; DE VREESE, K.; VAN DE CASTEELE, T.; VANDERSTICHELE, H.; VAN EVERBROECK, B.; CRAS, P.; MARTIN, J-J.; VANMECHELEN, E.; DE DEYN, P. P. “Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia”. *Neurobiology of Aging*, 29, 8, 1143–1159, 2008.
- <sup>37</sup> LIANG, H. C.; RUSSELL, C.; MITRA, V.; CHUNG, R.; HYE, A.; BAZENET, C.; LOVESTONE, S.; PIKE, I.; WARD, M. “Glycosylation of Human Plasma Clusterin Yields a Novel Candidate Biomarker of Alzheimer’s Disease”. *Journal of Proteome Research*, 14, 12, 5063–5076, 2015.
- <sup>38</sup> LEVINE, H. III. “Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer’s disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution”. *Protein science*, 2, 404–410, 1993.
- <sup>39</sup> LeVine, H. III. “Quantification of  $\beta$ -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T”. *Methods in Enzymology*, 309, 274–284, 1999.
- <sup>40</sup> REINKE, A. A.; ABULWERDI, G. A.; GESTWICKI, J. E. “Quantifying prefibrillar amyloids in vitro by using a “thioflavin-like” spectroscopic method”. *ChemBioChem*, 11, 13, 1889–1895, 2010.
- <sup>41</sup> GROENNIN, M. “Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status”. *Journal of Chemical Biology*, 3, 1, 1–18, 2010.

- 
- <sup>42</sup> AMDURSKY, N.; EREZ, Y.; HUPPERT, D. “Molecular rotors: What lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker”. *Accounts of Chemical Research*, 45, 9, 1548–1557, 2012.
- <sup>43</sup> KLUNK, W. E.; WANG, Y.; HUANG, G. F.; DEBNATH, M. L.; HOLT, D. P.; MATHIS, C. A. “Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain”. *Life Sciences*, 69, 13, 1471-1484, 2001.
- <sup>44</sup> MATHIS, C. A.; BACSKAI, B. J.; KAJDASZ, S. T.; MCLELLAN, M. E.; FROSCHE, M. P.; HYMAN, B. T.; HOLT, D. P.; WANG, Y.; HUANG, G. F.; DEBNATH, M. L.; KLUNK, W. E. “A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12, 3, 295-298, 2002.
- <sup>45</sup> KUNG, M. P.; ZHUANG, Z. P.; HOU, C.; KUNG, H. F. “Development and evaluation of iodinated tracers targeting amyloid plaques for SPECT imaging”. *Journal of Molecular Neuroscience*, 24, 1, 49-53, 2004.
- <sup>46</sup> CAI, L.; INNIS, R. B.; PIKE, V. W. “Radioligand development for PET imaging of b-amyloid (Ab) – current status”. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1, 19-52, 2007.
- <sup>47</sup> MATHIS, C. A.; WANG, Y.; HOLT, D. P.; HUANG, G-F.; DEBNATH, M. L.; KLUNK, W. E. “Synthesis and evaluation of <sup>11</sup>C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents”. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 13, 2740-2754, 2003.
- <sup>48</sup> KLUNK, W. E.; ENGLER, H.; NORDBERG, A.; WANG, Y.; BLOMQUIST, G.; HOLT, D. P.; BERGSTRÖM, M.; SAVITCHEVA, I.; HUANG, G. F.; ESTRADA, S.; AUSÉN, B.; DEBNATH, M. L.; BARLETTA, J.; PRICE, J. C.; SANDELL, J.; LOPRESTI, B. J.; WALL, A.; KOIVISTO, P.; ANTONI, G.; MATHIS, C. A.; LÅNGSTRÖM, B. “Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B”. *Annals of Neurology*, 55, 3, 306–319, 2004.
- <sup>49</sup> CSELÉNYI, Z.; JÖNHAGEN, M. E.; FORSBERG, A.; HALLDIN, C.; JULIN, P.; SCHOU, M.; JOHNSTRÖM, P.; VARNÄS, K.; SVENSSON, S.; FARDE, L. “Clinical validation of <sup>18</sup>F-AZD4694, an amyloid-b-specific PET radioligand”. *Journal of Nuclear Medicine*, 53, 3, 415-424, 2012.
- <sup>50</sup> MASON, N. S.; MATHIS, C. A.; KLUNK, W. E. “Positron emission tomography radioligands for *in vivo* imaging of A $\beta$  plaques”. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56, 89-95, 2013.

- 
- <sup>51</sup> NEWBERG, A. B.; WINTERING, N. A.; PLÖSSL, K.; HOCHOLD, J.; STABIN, M. G.; WATSON, M.; SKOVRONSKY, D.; CLARK, C. M.; KUNG, M. P.; KUNG, H. F. "Safety, Biodistribution, and Dosimetry of <sup>123</sup>I-IMPY: A Novel Amyloid Plaque-Imaging Agent for the Diagnosis of Alzheimer's Disease". *Journal of Nuclear Medicine*, 47, 5, 748-754, 2006.
- <sup>52</sup> LANG, L.; JAGODA, E.; SCHMALL, B.; SASSAMAN, M.; MA, Y.; ECKELMAN, W. C. "Fluoro analogues of WAY-100635 with varying pharmacokinetic properties". *Nuclear Medicine and Biology*, 27, 5, 457-462, 2000.
- <sup>53</sup> PIKE, V. W.; HALLDIN, C.; WIKSTRÖM, H.; MARCHAIS, S.; MCCARRON, J. A.; SANDELL, J.; NOWICKI, B.; SWAHN, C. G.; OSMAN, S.; HUME, S. P.; CONSTANTINOU, M.; ANDRÉE, B.; FARDE, L. "Radioligands for the study of brain 5-HT<sub>1A</sub> receptors: *in vivo* development of some new analogues of WAY". *Nuclear Medicine and Biology*, 27, 449-455, 2000.
- <sup>54</sup> PIKE, V. W.; HALLDIN, C.; MCCARRON, J. A.; LUNDKVIST, C.; HIRANI, E.; OLSSON, H.; HUME, S. P.; KARLSSON, P.; OSMAN, S.; SWAHN, C. G.; HALL, H.; WIKSTRÖM, H.; MENSONIDAS, M.; POOLE, K. G.; FARDE, L. "[Carbonyl-<sup>11</sup>C] Desmethyl-WAY 100635 (DWAY) is a potent and selective radioligand for the central 5-HT<sub>1A</sub> receptors *in vitro* and *in vivo*". *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 25, 338-346, 1998.
- <sup>55</sup> WILSON, A. A.; INABA, T.; FISCHER, N.; DIXON, L. M.; NOBREGA, J.; DASILVA, J. N.; HOULE, S. "Derivatives of WAY 100635 as potential imaging agents for 5-HT<sub>1A</sub> receptors: syntheses, radiosyntheses, and *in vitro* and *in vivo* evaluation". *Nuclear Medicine and Biology*, 25, 8, 769-776, 1998.
- <sup>56</sup> PIKE, V. W.; MCCARRON, J. A.; LAMMERTSMA, A. A.; OSMAN, S.; HUME, S. P.; SARGENT, P. A.; BENCH, C. J.; CLIFFE, I. A.; FLETCHER, A.; GRASBY, P. M. "Exquisite delineation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in human brain with PET and [carbonyl-<sup>11</sup>C] WAY 100635". *European Journal of Pharmacology*, 301: R5-R7, 1996.
- <sup>57</sup> ROWE, C. C.; PEJOSKA, S.; MULLIGAN, R. S.; JONES, G.; CHAN, J. G.; SVENSSON, S.; CSELÉNYI, Z.; MASTERS, C. L.; VILLEMAGNE, V. L. "Head-to-head comparison of <sup>11</sup>C-PiB and <sup>18</sup>F-AZD4694 (NAV4694) for  $\beta$ -amyloid imaging in aging and dementia". *Journal of Nuclear Medicine*, 54, 6, 880-886, 2013.

- 
- <sup>58</sup> KUNG, H. F.; CHOI, S. R.; QU, W.; ZHANG, W.; SKOVRONSKY, D. "18F stilbenes and styrylpyridines for PET imaging of A beta plaques in Alzheimer's disease: a miniperspective". *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 3, 933-941, 2010.
- <sup>59</sup> F. A. D. A. On Oct. 25, the U.S. Food and Drug Administration approved Vizamyl (flutemetamol F 18 injection), a radioactive diagnostic drug for use with positron emission tomography (PET) imaging of the brain in adults being evaluated for Alzheimer's disease (AD) and dementia. 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm372261.htm>>.
- <sup>60</sup> HAYNE, D. J.; LIM, SINCHUN.; DONNELLY, P. S. "Metal complexes designed to bind to amyloid- $\beta$  for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease". *Chemical Society Reviews*, 43, 6701-6715, 2014.
- <sup>61</sup> CHEN, X.; YU, P.; ZHANG, L.; LIU, B. "Synthesis and biological evaluation of <sup>99m</sup>Tc, Re-monoamine-monoamide conjugated to 2-(4-aminophenyl)benzothiazole as potential probes for  $\beta$ -amyloid plaques in the brain". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 4, 1442-1445, 2008.
- <sup>62</sup> CHENG, Y.; ONO, M.; KIMURA, H.; UEDA, M.; SAJI, H. "Technetium-99m Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives as Single Photon Emission Computed Tomography Imaging Probes for  $\beta$ -Amyloid Plaques in Alzheimer's Brains". *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 5, 2279- 2286, 2012.
- <sup>63</sup> ONO, M.; IKEOKA, R.; WATANABE, H.; KIMURA, H.; FUCHIGAMI, T.; HARATAKE, M.; SAJI, H.; NAKAYAMA, M. "<sup>99m</sup>Tc/Re complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral  $\beta$ -amyloid plaques". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 19, 5743-5748, 2010.
- <sup>64</sup> CUI, M.; TANG, R.; LI, Z.; REN, H.; LIU, B. "<sup>99m</sup>Tc- and Re-labeled 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as imaging probes for b-amyloid plaques". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21, 3, 1064-1068, 2011.
- <sup>65</sup> YANG, Y.; CUI, M.; JIN, B.; WANG, X.; LI, Z.; YU, P.; JIA, J.; FU, H.; JIA, H.; LIU, B. "<sup>99m</sup>Tc-labeled dibenzylideneacetone derivatives as potential SPECT probes for *in vivo* imaging of  $\beta$ -amyloid plaque". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 90-98, 2013.
- <sup>66</sup> ACKERMAN, L. J.; WEST, D. X.; MATHIAS, C. J.; GREEN, M. A. "Synthesis and evaluation of copper radiopharmaceuticals with mixed bis(thiosemicarbazone) ligands". *Nuclear Medicine and Biology*, 26, 5, 551-554, 1999.

- <sup>67</sup> LIM, SINCHUN.; PATERSON, B. M.; FODERO-TAVOLETTI, M. T.; O'KEEFE, G. J.; CAPPAL, R.; BARNHAM, K. J.; VILLEMAGNE DE, V. L.; DONNELLY, P. S. A. "A copper radiopharmaceutical for diagnostic imaging of Alzheimer's disease: a bis(thiosemicarbazonato)copper(II) complex that binds to amyloid- $\beta$  plaques". *Chemical Communications*, 46, 5437-5439, 2010.
- <sup>68</sup> SAGNOU, M.; BENAKI, D.; TRIANTIS, C.; TSOTAKOS, T.; PSYCHARIS, V.; RAPTOPOULOU, C. P.; PIRMETTIS, I.; PAPADOPOULOS, M.; PELECANOU, M. "Curcumin as the OO bidentate ligand in "2 + 1" complexes with the  $[M(CO)_3]^+$  (M=Re,  $^{99m}Tc$ ) tricarbonyl core for radiodiagnostic applications". *Inorganic Chemistry*, 50, 1295-1303, 2011.
- <sup>69</sup> TRIANTIS, C.; TSOTAKOS, T.; TSOUKALAS, C.; SAGNOU, M.; RAPTOPOULOU, C.; TERZIS, A.; PSYCHARIS, V.; PELECANOU, M.; PIRMETTIS, I.; PAPADOPOULOS, M. "Synthesis and Characterization of fac- $[M(CO)_3(P)(OO)]$  and cis-trans- $[M(CO)_2(P)_2(OO)]$  Complexes (M=Re,  $^{99m}Tc$ ) with Acetylacetonone and Curcumin as OO Donor Bidentate Ligands". *Inorganic Chemistry*, 52, 12995-13003, 2013.
- <sup>70</sup> BARNHAM, K. J.; KENCHE, V. B.; CICCOTOSTO, G. D.; SMITH, D. P.; TEW, D. J.; LIU, X.; PEREZ, K.; CRANSTON, G. A.; JOHANSEN, T. J.; VOLITAKIS, I.; BUSH, A. I.; MASTERS, C. L.; WHITE, A. R.; SMITH, J. P.; CHERNY, R. A.; CAPPAL, R. "Platinum-based inhibitors of amyloid-beta as therapeutic agents for Alzheimer's disease". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19, 6813-6818, 2008.
- <sup>71</sup> STRELTSOV, V. A.; EPA, V. C.; JAMES, S. A.; CHURCHES, Q. I.; CAINE, J. M.; KENCHE, V. B.; BARNHAM, K. J. "Structural insights into the interaction of platinum-based inhibitors with the Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptide". *Chemical Communications*, 49, 97, 11364-11366, 2013.
- <sup>72</sup> LAKATOS, A.; GYURCSIK, B.; NAGY, N. V.; CSENDES, Z.; WÉBER, E.; FÜLÖP, L.; KISS, T. "Histidine-rich branched peptides as Cu(II) and Zn(II) chelators with potential therapeutic application in Alzheimer's disease". *Dalton Transactions*, 41, 6, 1713-1726, 2012.
- <sup>73</sup> MESSORI, L.; CAMARRI, M.; FERRARO, T.; GABBIANI, C.; FRANCESCHINI, D. "Promising in Vitro anti-alzheimer properties for a ruthenium(III) complex". *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4, 3, 329-332, 2013.
- <sup>74</sup> RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. "A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent". *Clinical Cancer Research*, 10, 3717-3727, 2004.

- 
- <sup>75</sup> BLUNDEN, B. M.; RAWAL, A.; LU, H.; STENZEL, M. H. "Superior Chemotherapeutic Benefits from the Ruthenium-Based Anti-Metastatic Drug NAMI-A through Conjugation to Polymeric Micelles". *Macromolecules*, 47, 5, 1646-1655, 2014.
- <sup>76</sup> ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G. "Ruthenium-antimetastatic-agents". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4, 15, 1525-1535, 2004.
- <sup>77</sup> HEFFETER, P.; BÖCK, K.; ATIL, B.; HODA, M. A. R.; KÖRNER, W.; BARTEL, C.; JUNGWIRTH, U. KEPPLER, B. K.; MICKSCHE, M.; BERGER, W.; KOELLENSPERGER, G. "Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339". *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15, 5, 737-748, 2010.
- <sup>78</sup> VALENSIN, D.; ANZINI, P.; GAGGELLI, E.; GAGGELLI, N.; TAMASI, G.; CINI, R.; GABBIANI, C.; MICHELUCCI, E.; MESSORI, L.; KOZLOWSKI, H.; VALENSIN, G. "fac- $\{Ru(CO)_3\}^{2+}$  Selectively Targets the Histidine Residues of the  $\beta$ -Amyloid Peptide 1-28. Implications for New Alzheimer's Disease Treatments Based on Ruthenium Complexes". *Inorganic Chemistry*, 49, 11, 4720-4722, 2010.
- <sup>79</sup> LUTTERMAN, D. A.; LAZINSKI-MELANSONA, L. A.; ASHERA, Y.; JOHNSTON, D. H.; GALLUCCI, J. C.; TURRO, C. "Effect of intraligand-delocalization on the photophysical properties of two new Ru(II) complexes". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 217, 100-107, 2011.
- <sup>80</sup> DIXON, I. M.; LEBON, E.; SUTRA, E.; IGAU, A. "Luminescent ruthenium-polypyridine complexes & phosphorus ligands: anything but a simple story". *Chemical Society Review*, 38, 1621-1634, 2009.
- <sup>81</sup> DURR, H.; BOSSMANN, S. "Ruthenium Polypyridine Complexes. On the Route to Biomimetic Assemblies as Models for the Photosynthetic Reaction Center". *Accounts of Chemical Research*, 34, 11, 905-917, 2001.
- <sup>82</sup> ZHANG, S.; DING, Y.; WEI, H. "Ruthenium Polypyridine Complexes Combined with Oligonucleotides for Bioanalysis: A Review". *Molecules*, 19, 8, 11933-11987, 2014.
- <sup>83</sup> ZAYAT, L.; FILEVICH, O.; BARALDO, L. M.; ETCHENIQUE, R. "Ruthenium polypyridyl phototriggers: from beginnings to perspectives". *Philosophical Transactions A*, 371, 2013.

- 
- <sup>84</sup> COOK, N. P.; TORRES, V.; JAIN, D.; MARTÍ, A. A. "Sensing Amyloid- $\beta$  Aggregation Using Luminescent Dipyridophenazine Ruthenium(II) Complexes". *Journal of the American Chemical Society*, 133, 29, 11121-11123, 2011.
- <sup>85</sup> COOK, N. P.; OZBIL, M.; KATSAMPES, C.; PRABHAKAR, R.; MARTÍ, A. A. "Unraveling the photoluminescence response of light-switching ruthenium(II) complexes bound to amyloid- $\beta$ ". *Journal of the American Chemical Society*, 135, 29, 10810-10816, 2013.
- <sup>86</sup> PRATI, F.; ULIASSI, E.; BOLOGNESI, M. L. "Two diseases, one approach: multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases". *Medicinal Chemical Communications*, 5, 853-861, 2014.
- <sup>87</sup> LÓPEZ-IGLESIAS, B.; PÉREZ, C.; MORALES-GARCÍA, J. A.; ALONSO-GIL, S.; PÉREZ-CASTILLO, A.; ROMERO, A.; LÓPEZ, M. G.; VILLARROYA, M.; CONDE, S.; RODRÍGUEZ-FRANCO, M. I. "New Melatonin-*N,N*-Dibenzyl(*N*-methyl)amine Hybrids: Potent Neurogenic Agents with Antioxidant, Cholinergic, and Neuroprotective Properties as Innovative Drugs for Alzheimer's Disease". *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 9, 3773-3785, 2014.
- <sup>88</sup> CHEN, X.; WEHLE, S.; KUZMANOVIC, N.; MERGET, B.; HOLZGRABE, U.; KÖNIG, B.; SOTRIFFER, C. A.; DECKER, M. "Acetylcholinesterase inhibitors with photoswitchable inhibition of  $\beta$ -amyloid aggregation". *ACS Chemical Neuroscience*, 5, 5, 377-389, 2014.
- <sup>89</sup> ELSINGHORST, P. W.; HÄRTIG, W.; GOLDHAMMER, S.; GROSCHE, J.; GÜTSCHOW, M. "A gorge-spanning, high-affinity cholinesterase inhibitor to explore  $\beta$ -amyloid plaques". *Organic and Biomolecular Chemistry*, 7, 3940-3946, 2009
- <sup>90</sup> VELOSO, A. J.; CHOW, A. M.; DHAR, D.; TANG, D. W. F.; GANESH, H. V. S.; MIKHAYLICHENKO, S.; BROWN, I. R.; KERMAN, K. "Biological Activity of sym-Triazines with Acetylcholine-like Substitutions as Multitarget Modulators of Alzheimer's Disease". *ACS Chemical Neuroscience*, 4, 924-929, 2013.
- <sup>91</sup> VYAS, N. A.; BHAT, S. S.; KUMBHAR, A. S.; SONAWANE, U. B.; JANI, V.; JOSHI, R. R.; RAMTEKE, S. N.; KULKARNI, P. P.; JOSHI, B. "Ruthenium(II) polypyridyl complex as inhibitor of acetylcholinesterase and A $\beta$  aggregation". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 75, 375-81, 2014.

- 
- <sup>92</sup> MULCAHY, S. P.; LI, S.; KORN, R.; XIE, X.; MEGGERS, E. "Solid-Phase Synthesis of Tris-heteroleptic Ruthenium(II) Complexes and Application to Acetylcholinesterase Inhibition". *Inorganic Chemistry*, 47, 12, 5030-5032, 2008.
- <sup>93</sup> SINHA, S. K.; SHRIVASTAVA, S. K. "Design, synthesis and evaluation of some new 4-aminopyridine derivatives in learning and memory". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23, 10, 2984–2989, 2013.
- <sup>94</sup> SINHA, S. K.; SHRIVASTAVA, S. K. "Synthesis and evaluation of some new 4-aminopyridine derivatives as a potent anti-amnesic and cognition enhancing drugs". *Medicinal Chemistry Research*, 21, 12, 4395-4402, 2012.
- <sup>95</sup> SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. "Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium". *Inorganic Chemistry*, 17, 3334–3341, 1978.
- <sup>96</sup> CASPAR, J.V.; MEYER, T.J. "Photochemistry of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Solvent Effects". *Journal of the American Chemical Society*, 105, 5583-5590, 1983.
- <sup>97</sup> BARQAWI, K.R.; LLOBET, A.; MEYER, T.J. "Synthetic Design of MLCT Excited States. Ligand-Substituted, Mono-2,2'-bipyridine Complexes of Ru(II)". *Journal of the American Chemical Society*, 110, 7151-1159, 1988.
- <sup>98</sup> FLETCHER, K.A.; STOREY, I.A.; HENDRICKS, A.E.; PANDEY, S. "Behavior of the solvatochromic probes Reichardt's dye, pyrene, dansylamide, Nile Red and 1-pyrenecarbaldehyde within the room-temperature ionic liquid bmimPF<sub>6</sub>". *Green Chemistry*, 3, 210–215, 2001.
- <sup>99</sup> EL-DOSSOKI, F.I. Refractive Index and Density Measurements for Selected Binary Protic-Protic, Aprotic-Aprotic, and Aprotic-Protic Systems at Temperatures from 298.15 K to 308.15 K. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54, 1129-1137, 2007.
- <sup>100</sup> BAKA, E.; COMER, J. E. A; TAKÁCS-NOVÁK, K. "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46, 2, 335–341, 2008.
- <sup>101</sup> TETTAMANTI, G.; RIBONI, L.; PRINETTI, A.; BASSI, R.; ANTONELLA CAMINITI, A.; TETTAMANTI, G. "A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma neuro2a cell differentiation". *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26868-26875, 1995.

---

<sup>102</sup> SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods*, 9, 671-675, 2012.

<sup>103</sup> FREIMOSER, F. M.; CLAUDE A. JAKOB, C. A.; MARKUS AEBI, M.; TUOR, U. "The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities". *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3727-3729, 1999.

<sup>104</sup> ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR; FEATHERSTONE, R. M. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochemical Pharmacology*, 7, 88, 1961.

<sup>105</sup> METZKER, G.; DE AGUIAR, I.; SOUZA, M. L.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. "Reaction of ruthenium(II) complexes with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) and hydroxyl radicals". *Canadian Journal of Chemistry*, 92, 8, 788-793, 2014.

<sup>106</sup> RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay ". *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.

<sup>107</sup> CAMILO, M. R.; CARDOSO, C. R.; CARLOS, R. M.; LEVER, A. B. P. "Photosolvolytic of cis-[Ru( $\alpha$ -diimine)<sub>2</sub>(4-aminopyridine)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> Complexes: Photophysical, Spectroscopic, and Density Functional Theory Analysis". *Inorganic Chemistry*, 53, 3694-3708, 2014.

<sup>108</sup> JURIS, A.; BALZANI, V.; BARIGELLETTI, F.; CAMPAGNA, S.; BELSER, P.; ZELEWSKY, A. V. "Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium". *Coordination Chemical Reviews*, 84, 85-277, 1988.

<sup>109</sup> BONNESON, P.; WALSH, J. L.; PENNINGTON, W. T.; CORDES, A. W.; DURHAM, B. "Six-Coordinate Complexes with 1,10-Phenanthroline Ligands in the Trans Configuration. Preparation of trans-Bis(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) Complexes and Crystal Structure of trans-Bis(1,10-phenanthroline)bis(pyridine)ruthenium(II) Hexafluorophosphate". *Inorganic Chemistry*, 22, 1761-1765, 1983.

<sup>110</sup> DREYSE, P.; LOEB, B.; SOTO-ARRIAZA, M.; TORDERA, D.; ORTÍ, E.; SERRANO-PÉREZ, J. J.; BOLINK, H. J. "Effect of free rotation in

---

polypyridinic ligands of Ru(II) complexes applied in light-emitting electrochemical cells". Dalton Transactions, 42, 15502-15513, 2013.

<sup>111</sup> KALYANASUNDARAM, K. "Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes". Academic Press, 1<sup>a</sup> Ed., 1992, cap. 33.

<sup>112</sup> DEAN, J.A. "Lange's Handbook of Chemistry". McGraw-Hill, New York, 1992.

<sup>113</sup> NAIR, R.B.; CULLUM, B.M.; MURPHY, C.J. "Optical Properties of [Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> as a Function of Nonaqueous Environment". Inorganic Chemistry, 36, 962-965, 1997.

<sup>114</sup> CARDOSO, C. R.; DE AGUIAR, I.; CAMILO, M. R.; LIMA, M. V. S.; ITO, A. S.; BAPTISTA, M. S.; PAVANI, C.; VENÂNCIO, T.; CARLOS, R. M. "Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bidentate histamine ligand". Dalton Transactions, 41, 6726-6734, 2012.

<sup>115</sup> INGLEZ, S. D.; LIMA, F. C. A.; SILVA, A. B. F.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DANIEL, J. F. S.; LIMA-NETO, B. S.; CARLOS, R. M. "Photoinduced Electron-Transfer Processes Based on Novel Bipyridine-Ru(II) Complex: Properties of cis-[Ru(2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>(5,6-bis(3-amidopyridine)-7-oxanorbornene)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> and cis-[Ru(2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>(3-aminopyridine)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> Complexes". Inorganic Chemistry, 46, 14, 5744-5753, 2007.

<sup>116</sup> LITKE, S. V.; MEZENTSEVA, T. V.; LYALIN, G. N.; ERSHOV, A. Y. "Spectroscopy and photophysics of chloro-bis-bipyridyl complexes of ruthenium(II) with pyridine ligands". Optics and Spectroscopy, 95, 6, 917-924, 2003.

<sup>117</sup> MARCO-CONTELLES, J.; LEÓN, R.; DE LOSRÍOS, C.; SAMADI, A.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; HUERTAS, O.; BARRIL, X.; LUQUE, F. J.; RODRÍGUEZ-FRANCO, M. I.; LÓPEZ, B.; LÓPEZ, M. G.; GARCÍA, A. G.; CARREIRAS, MDO.C.; VILLARROYA, M. "Tacripyrines, the First Tacrine- Dihydropyridine Hybrids, as Multitarget-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease". Journal of Medicinal Chemistry, 52, 2724-2732, 2009.

<sup>118</sup> RADIC Z.; REINER E.; TAYLOR P. "Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: Inhibition by substrates and coumarin derivatives". Mol Pharmacol, 39, 98-104, 1991.

- 
- <sup>119</sup> BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; RADIC, Z.; MARCHOT, P. “Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site”. *The Embo Journal*, 22, 1–12, 2003.
- <sup>120</sup> CARLIER, P. R.; CHOW, E. S.; HAN, Y.; LIU, J.; EL YAZAL, J.; PANG, Y. P. “Heterodimeric Tacrine-Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Investigating Ligand–Peripheral Site Interactions”. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 20, 4225–4231, 1999.
- <sup>121</sup> KEARNEY, P. C.; MIZOUE, L. S.; KUMPF, R. A.; FORMAN, J. E.; MCCURDY, A.; DOUGHERTY, D. A. “Molecular recognition in aqueous media. New binding studies provide further insights into the cation- $\pi$  interaction and related phenomena”. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 22, 9907–9919, 1993.
- <sup>122</sup> VILLALOBOS, A.; BLAKE, J. F.; BIGGERS, C. K.; BUTLER, T. W.; CHAPIN, D. S.; CHEN, Y. L.; IVES, J. L.; JONES, S. B.; LISTON, D. R.; NAGEL, A. A. “Novel Benzisoxazole Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of Acetylcholinesterase”. *Journal of the Medicinal Chemistry*, 37, 17, 2721–2734, 1994.
- <sup>123</sup> BAI D.L.; TANG X.C.; HE X.C. “Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease”. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 3, 355-374, 2000.
- <sup>124</sup> GRANTHAM C.; GEERTS H. “The rationale behind cholinergic drug treatment for dementia related to cerebrovascular disease”. *Journal of the Neurological Sciences*, 203, 131-136, 2002.
- <sup>125</sup> CASTRO, A.; Martinez, A. “Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease”. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 1, 267-272, 2001.
- <sup>126</sup> COPELAND, R.A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. Wiley, p. 57, 2005.
- <sup>127</sup> CHEUNG, J.; RUDOLPH, M. J.; BURSHTEYN, F.; CASSIDY, M. S.; GARY, E. N.; LOVE, J.; FRANKLIN, M. C.; HEIGHT, J. J. “Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands”. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 22, 10282–10286, 2012.
- <sup>128</sup> SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I. “Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs”. *Chemical-Biological Interactions*, 87, 187-197, 1993.

- 
- <sup>129</sup> MASSOULIE, J.; SUSSMAN, J.; BON, S.; SILMAN, I. "Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase". *Progr. Brain Res*, 98, 139-146, 1993.
- <sup>130</sup> BARTOLINI, M.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V. "Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies". *Biochemical Pharmacology*, 65, 407-416, 2003.
- <sup>131</sup> CAMPS, P.; FORMOSA, X.; GALDEANO, C.; GÓMEZ, T.; MUÑOZ-TORRERO, D.; SCARPELLINI, M.; VIAYNA, E.; BADIA, A.; CLOS, M. V.; CAMINS, A.; PALLÀS, M.; BARTOLINI, M.; MANCINI, F.; ANDRISANO, V.; ESTELRICH, J.; LIZONDO, M.; BIDON-CHANAL, A.; LUQUE, F. J. "Novel donepezil-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced  $\beta$ -amyloid aggregation". *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 12, 3588–3598, 2008.
- <sup>132</sup> RIZZO, S.; RIVIERE, C.; PIAZZI, L.; BISI, A.; GOBBI, S.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; MORRONI, F.; TAROZZI, A.; MONTI, J. P.; RAMPA, A. "Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, beta amyloid aggregation, and abeta neurotoxicity". *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 10, 2883–2886, 2008.
- <sup>133</sup> MAYER, M.; MEYER, B. "Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor". *Journal of the American Chemical Society*, 123, 6108-6117, 2001.
- <sup>134</sup> SMITH, M. A.; HARRIS, P. L. R.; SAYRE, L. M.; PERRY, G. "Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9866–9868, 1997.
- <sup>135</sup> HUANG, X., MOIR, R. D.; TANZI, R. E.; BUSH, A. I.; J ROGER, J. T. "Redox-Active Metals, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease Pathology". *Annals New York Academy of Sciences*, 1012, 153–163, 2004.
- <sup>136</sup> KANTI DAS, T.; WATI, M. R.; FATIMA-SHAD, K. "Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease". *Archives of Neuroscience*, 2, 2, 1–8, 2014.
- <sup>137</sup> PACKER, L.; TRITSCHLER, H. J.; WESSEL, K. "Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid". *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 359–378, 1996.

- 
- <sup>138</sup> SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. "Oxidative Stress and Neurotoxicity". *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1, 172–188, 2008.
- <sup>139</sup> MERKOFER, M.; KISSNER, R.; HIDER, R. C.; BRUNK, U. T.; KOPPENOL, W. H. "Fenton Chemistry and Iron Chelation under Physiologically Relevant Conditions: Electrochemistry and Kinetics". *Chemical Research in Toxicology*, 19, 2006.
- <sup>140</sup> BUEYRNER, G. R.; FORSCHUNGSZENTRUM, G. S. F.; NEUHCRBERG, S. D. "Spin trapping : ESR parameters of spin adducts". *Free Radical Biology and Medicine*, 3, 259-303, 1987.
- <sup>141</sup> BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. "Technical Evaluation of Antioxidant Activity". *Medicinal Chemistry*, 4, 7, 517–522, 2014.
- <sup>142</sup> GÓMEZ-VIDALES, V., GRANADOS-OLIVEROS, G., NIETO-CAMACHO, A., REYES-SOLÍS, M., JIMÉNEZ-ESTRADA, M. "Cacalol and cacalol acetate as photoproducers of singlet oxygen and as free radical scavengers , evaluated by EPR spectroscopy and TBARS". *Royal Society of Chemistry*, 4, 1371-1377, 2014.
- <sup>143</sup> DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. "On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity)". *Food Chemistry*, 131, 3, 1037–1043, 2012.
- <sup>144</sup> FOTI, M. C. "The Use and Abuse of the DPPH• Radical". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8765–8776, 2015.
- <sup>145</sup> HU, Y.; ZHANG, J.; YU, C.; LI, Q.; DONG, F.; WANG, G.; GUO, Z. "Synthesis, characterization, and antioxidant properties of novel inulin derivatives with amino-pyridine group". *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 44–49, 2014.
- <sup>146</sup> DEL MERCATO, L. L.; POMPA, P. P.; MARUCCIO, G.; DELLA TORRE, A.; SABELLA, S.; TAMBURRO, A. M.; CINGOLANI, R.; RINALDI, R. "Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils". *PNAS*, 104, 46, 18019-18024, 2007.
- <sup>147</sup> HAASS, C.; SELKOE, D.J. "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8, 2, 101–112, 2007.

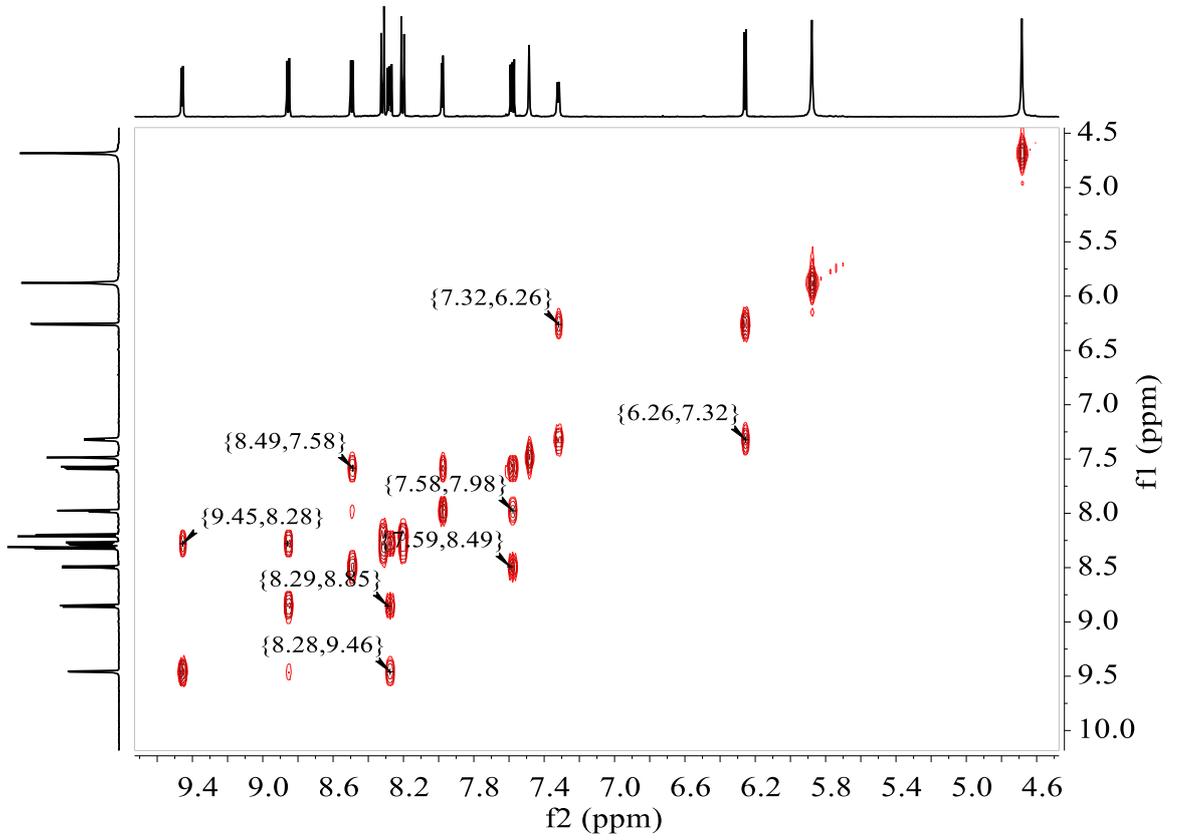
---

<sup>148</sup> YAO, S.; CHERNY, R. A.; BUSH, A. I.; MASTERS, C. L.; BARNHAM, K. J. "Characterizing bathocuproine self-association and subsequent binding to Alzheimer's disease amyloid beta-peptide by NMR". *Journal of Peptide Science*, 10, 4, 210-217, 2004.

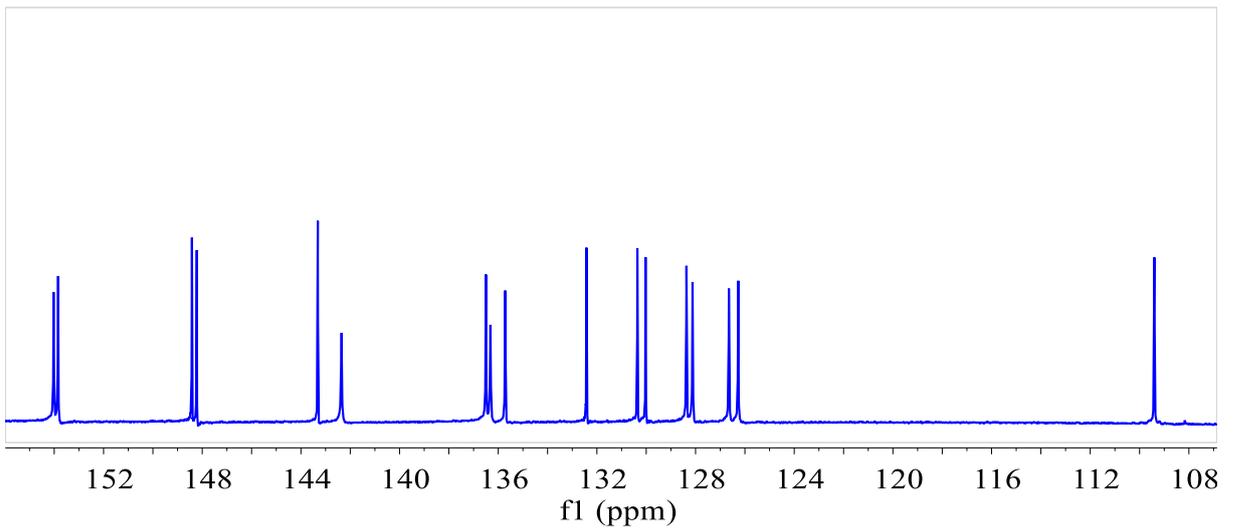
<sup>149</sup> KLIMOV, D. K.; THIRUMALAI, D. "Dissecting the assembly of A $\beta_{16-22}$  amyloid peptides into antiparallel  $\beta$  sheets". *Structure*, 11, 3, 295–307, 2003.

<sup>150</sup> HUGHES, E.; BURKE, R. M.; DOIG, A. J. "Inhibition of Toxicity in the  $\beta$ -Amyloid Peptide Fragment  $\beta$ -(25–35) Using N-Methylated Derivatives". *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 33, 25109–25115, 2000.

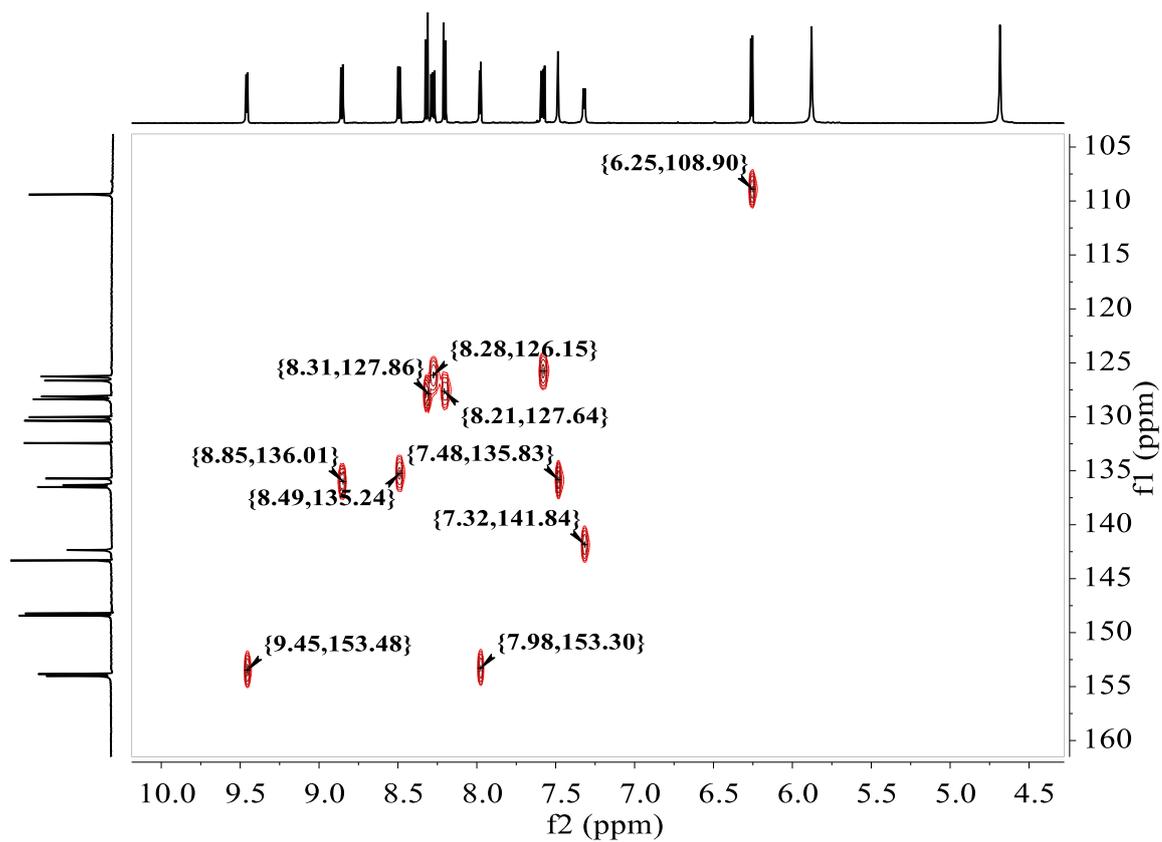
## ANEXO



(A)



(B)



(C)

Espectros de RMN (600 MHz) do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{-Apy})_2]^{2+}$  em  $\text{DMSO-d}_6$ : (A) COSY; (B)  $^{13}\text{C}$  e (C) HSQC.