

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

**Complexos Do Tipo *cis*-[Ru(phen-L)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> Com  
Interesse No Tratamento Do Mal De Alzheimer:  
Propriedades Físico-Químicas E Estudos De Inibição Da  
Acetil Colinaesterase**

**Guilherme Luiz Chinini\***

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

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

\*Bolsista FAPESP

**SÃO CARLOS - SP**

**2011**

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

C539ct

Chinini, Guilherme Luiz.

Complexos do tipo cis-[Ru(L-phen)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com interesse no tratamento de Mal de Alzheimer: propriedades físico-químicas e estudos de inibição da Acetilcolina Esterase / Guilherme Luiz Chinini. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

108 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3. Química bioinorgânica I. Título.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato **Guilherme Luiz Chinini**, realizada em 15 de abril de 2011:*



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Rose Maria Carlos



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Bertolucci



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi



*Dedico este trabalho integralmente  
à minha mãe, pela dedicação e zelo  
e a minha companheira Simone  
pelo amor e companheirismo  
durante este difícil período*

“Na minha opinião existem dois tipos de viajantes: os que viajam para fugir e os que viajam para buscar”  
(Érico Veríssimo)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Maria Goreti, meu pai Chinini e meu irmão Gabriel, pela dedicação, apoio, carinho, pelos bons dias de conversa, pela valiosa educação nesses anos de vida e pelo amor incondicional.

Agradeço a Simone pelo amor, amizade, por todo o tempo de dedicação e paciência, assim como os bons momentos inesquecíveis.

Agradeço a Profa. Dra. Rose Maria Carlos, pela orientação, amizade e por tornar possível o contato com a incrível química das iminas de rutênio.

Agradeço os meus amigos e irmãos de coração Glaudeston, Félix e Adalberto pela amizade em toda a extensão desses últimos 6 anos. Agradeço também os companheiros de laboratório Fernando, Caio, Mariana, Carol, Márcia, Regina, Inara e os companheiros de conversa Yuri, Nyccolaz e Andrezinho.

A todos os funcionários do departamento de química DQ/UFSCar, aos professores Ademir Camargo (UEG), Wanda Pereira (Unicamp), Maria Tereza (UFC), Marcelo Lancellotti (Unicamp) pela grande contribuição com o trabalho, a Dr. Christina Pavani (USP-SP) e ao Prof. Dr. Maurício Baptista pelo auxílio nas medidas de Microscopia Confocal.

Agradeço a banca examinadora Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Bertolucci (UNIFESP) e ao Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (Unicamp) e um agradecimento em débito ao Prof. Dr. Ricardo Mercadante.

Agradeço a FAPESP pela bolsa concedida (processo 2009/01384-1) e as agências de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram com seriedade e comprometimento para o bom andamento desse projeto de pesquisa.

## RESUMO

Complexos Do Tipo  $cis$ -[Ru(phen-L)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> Com Interesse No Tratamento Do Mal De Alzheimer: Propriedades Físico-Químicas E Estudos De Inibição Da Acetil Colinaesterase

No seguinte trabalho está relatado a síntese, caracterização e propriedades fotoquímicas e fotofísicas do complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em que 4apy = 4-aminopiridina. Este complexo é termicamente estável em solução aquosa ou mesmo em solventes orgânicos, o espectro de absorção desta espécie é caracterizado por uma banda intensa em 450 nm, e uma banda de emissão bastante intensa em 640 nm. Este complexo é susceptível a fotólise em solução, determinado por técnicas espectroscópicas (UV-Vis, Luminescência e <sup>1</sup>H-RMN), em água, o processo de fotólise é caracterizado pela liberação do ligante 4apy seguido pela formação de três diferentes produtos,  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>,  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e  $trans$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, que também foram sintetizados e caracterizados por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas (voltametria cíclica e de pulso diferencial), e o mecanismo de fotólise envolvido neste sistema foi estudado por meio de cálculos computacionais em nível de aproximação TD-DFT. Considerando a hipótese colinérgica envolvida no estudo para fármacos aplicados para o tratamento do mal de Alzheimer, foram efetuados estudos de inibição da enzima acetil colinaesterase AChE usando o método de Ellman e o método fluorimétrico. Em ambos os casos os resultados de inibição foram comparados com o inibidor padrão Tacrina (clorohidrato de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina). Avaliou-se a citotoxicidade destes compostos frente as células do tipo 3T3 e NG97. A atividade inibitória obtida para o complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> foi de IC<sub>50</sub>= 1,38 μM, determinou-se que a inibição da enzima AChE por este complexo ocorre por um mecanismo reversível competitivo, e que a atividade citotóxica frente as células do tipo NG97 decai a medida que ocorre a substituição dos ligantes 4apy por ligantes aquo. Comprovou-se a atividade emissiva *in situ* do complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> pelo experimento de microscopia confocal. Os resultados obtidos indicam que o fotosistema em estudo apresenta um grande potencial como um metalofármaco bastante versátil.



## ABSTRACT

*Cis*-[Ru(L-phen)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> Complexes, With Interest In The Treatment Of Alzheimer's Disease: Physicochemical Properties And Acetylcholinesterase Enzyme Inhibition.

The photochemical and photophysical properties of the *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> complex where 4apy= 4-aminopyridine are reported. In this work the complexes are thermally stable throughout the course of many hours in non-aqueous and aqueous solution and highly colored (red solution in the most of solvents). The absorption is characterized by two broad shoulders and an intense emission is found at 640 nm. Upon photolysis in aqueous solution, accompanied by spectroscopic techniques (UV-vis, luminescence, <sup>1</sup>H NMR, HPLC) *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> complex loses the 4apy ligand to give the aquo complexes: *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> and *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. The aquo complexes have been synthesized and characterized using <sup>1</sup>H NMR, FTIR and UV-vis spectroscopy. The photochemical mechanism is confirmed by TD-DFT calculations. Considering the role of acetylcholinesterase inhibitors in the Alzheimer disease treatments, the prepared complexes were tested for AChE inhibition using the Ellman and fluorimetric methods. In these studies Tacrine (hydrochloride-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine) was used for comparison purposes. The complexes were also evaluated for their toxicity towards to 3T3 and NG97 cells. The *cis*-complex binds with micromolar affinity to AChE and display an IC<sub>50</sub> of 1.38. The *cis*-complex is a reversible competitive inhibitor while Tacrine gives mixed and uncompetitive inhibition with acetylcholine as the substrate. Citotoxicity studies showed that the *cis* complex presents a higher citotoxicity against NG97 cells (IC<sub>50</sub>= 39.84 μmol.mL<sup>-1</sup>) and a lower citotoxicity toward 3T3 cell. We evaluated the *in situ* emissive activity of the complex *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> through confocal microscopy, obtaining the expected contrast as well as the emissive loss resulting from the photolysis process. Overall, these results are of particular interest for designing intelligent metallodrugs based on photochemical and photophysical processes and offer promising potentials for the treatment of Alzheimer diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**6-31G(d)** – Conjunto de funções de base gaussianas com polarizabilidade *d*

**AChE** – Acetil Colinaesterase

**AChI** – Iodeto de Acetil Colina

**AChS** – Acetil Colinasintase

**ACol** – Acetato de Indoxila

**apy** – aminopiridina

**4apy** – 4-aminopiridina

**BChE** – Butil Colinaesterase

**CM** – Centradas no Metal

**DFT** – *Density Functional Theory* (Teoria do Funcional de Densidade)

**DGDVZP** – pseudopotencial de funções Dgauss com valência duplo zeta e função *p*

**DTNB** – ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

**F20Tetraphenylporphirin** – 3,10,15,20-tetrakis-(pentafluorfenil)porfina

**F20TPPFeCl** – cloreto de 3,10,15,20-tetrakis-(pentafluorfenil)porfina ferro(II)

**HOMO** – *Highest Occupied Molecular Orbital* (Orbital Molecular de Mais Alta Energia Preenchido)

**KI** – Constante de Inibição Enzimática

**K<sub>m</sub>** – Constante de Michaelis-Menten

**LanL2DZ** – Pseudopotencial Los Alamos com valência duplo zeta

**LUMO** – *lowest Unoccupied Molecular Orbital* (Orbital Molecular de Mais Baixa Energia Não Preenchido)

**MA** – Mal de Alzheimer

**MPA** – *Mülliken Populational Analyse* (Análise Populacional de Mülliken)

**NBO** – *Normal Bonding Orbital* (Orbitais Normais de Ligação)

**ONIOM** – Algoritmo de tratamento em camada para moléculas OM/MM (**O**ur own **N**-layered **I**ntegrated Molecular **O**rbital and Molecular **M**echanics)

**phen** – 1,10-fenantrolina

**PCM** – *Polarizable Continuum Model* (Modelo Contínuo de Polarizabilidade)

**RB3PW91** – *Restricted Beck3 Perdew and Wang's 1991* (Funcional Restrito de Correlação e Troca desenvolvido por Perdew e Wang's)

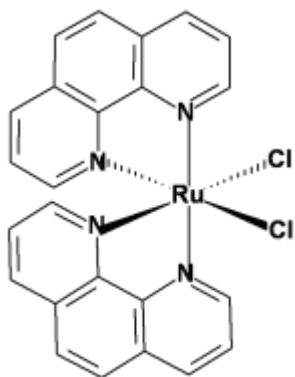
**SCN** – Sistema Nervoso Central

**TCML** – Transferência de Carga do Metal para o Ligante

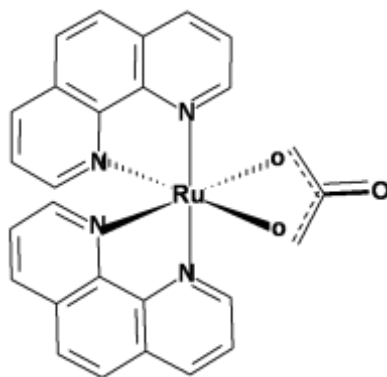
**TD-DFT** – *Time Dependency Density Functional Theory*

**UB3LYP** – *Unrestricted Beck3 Lee Yang and Parr* (Funcional não Restrito de troca e correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr)

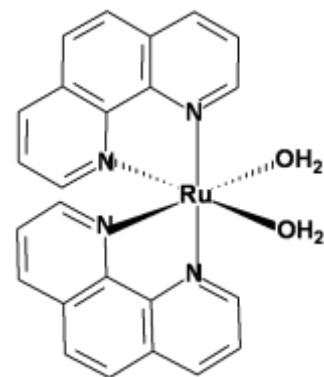
## LISTA DE ESTRUTURAS



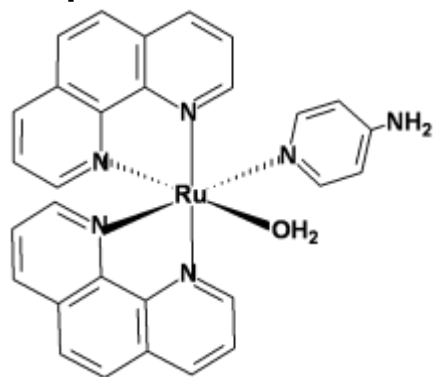
Complexo I



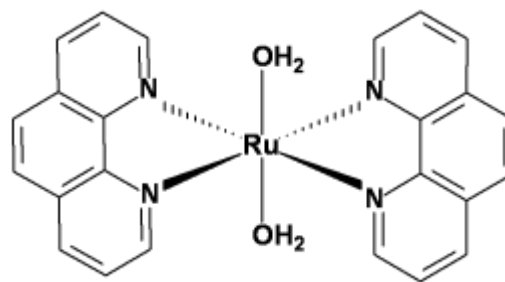
Complexo II



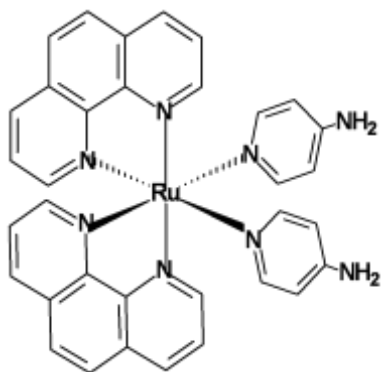
Complexo III



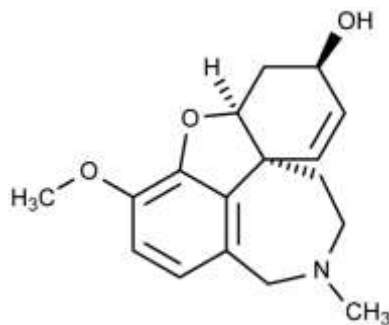
Complexo IV



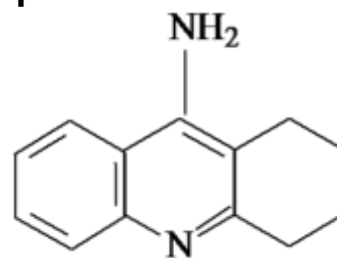
Complexo V



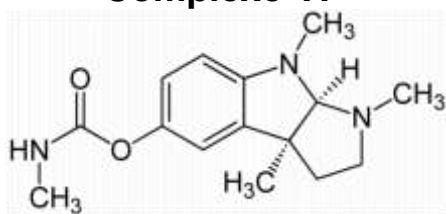
Complexo VI



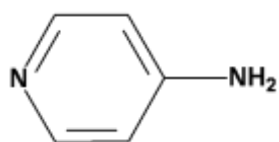
Galantamina



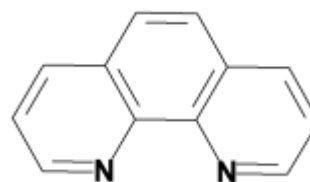
Tacrina



Fisostgmina



4-aminopiridina



1,10-fenantrolina

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Valores de $\lambda_{M\acute{A}X}$ (nm) e de $\epsilon$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) em N,N'-DMF, obtidos pelos espectros de absorção UV-Vis para os seis complexos em estudo. ....	43
<b>Tabela 2</b> Valores de $E_{ox}$ e $E_{red}$ (mV) para os complexos de III à VI em solução de acetonitrila e 0,1 M de TBAPF <sub>6</sub> . ....	51
<b>Tabela 3</b> Valores de deslocamento químico $\delta$ (ppm), acoplamento (Hz) e multiplicidade para os complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> e <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....	54
Tabela 4 Valores de deslocamento químico $\delta$ (ppm), acoplamento (Hz) e multiplicidade para os complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN)(4apy)] <sup>2+</sup> e <i>trans</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....	55
<b>Tabela 5</b> Valores de ordem de ligação, cargas de Mülliken e de densidade de spin para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> , no estado fundamental e no estado excitado TCML <sup>3</sup> (obtidos por UB3LYP/LanL2DZ). ....	58
<b>Tabela 6</b> Valores de contribuição orbital de cada fragmento destes complexos para os orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas (CM, TCML) para os complexos de III à VI em nossos estudos. ....	62
<b>Tabela 7</b> Dados de carga parcial por NBO para alguns átomos de interesse dos complexos III à VI. ....	67
<b>Tabela 8</b> Valores de KI (constante de inibição) para o complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> calculado, em comparação com os valores extraídos da literatura para inibidores reconhecidos, e outros derivados de porfirina. ....	80

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotólise do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  em acetonitrila, irradiado em 420 nm; (a) mudança no espectro de absorção (destaque para o decaimento temporal da absorbância medido em 480 nm); (b) mudança no espectro de absorção referente a primeira parte da equação 1; (c) mudança no espectro de absorção (2ª parte da equação 2); (d) mudança no espectro de emissão (destaque ao gráfico do máximo de absorção contra o máximo de emissão medidos durante a fotólise do complexo,  $R^2=0,997$ ).....22
- Figura 2** Espectro de emissão da fotólise do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ , em tampão Trisma\HCl 0,1M pH=7,4,  $\lambda_{\text{Exc}}= 450$  nm, contendo 1% de BSA (soroalbumina bovina) irradiado em reator fotoquímico de 420 nm. ....24
- Figura 3.a** Voltamograma cíclico do processo de isomerização do complexo  $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  em  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  (0,1 M de TBAPF<sub>6</sub>, CH<sub>3</sub>CN) e **3.b** Espectro de absorção na região do UV-Vis referênte ao mesmo processo de isomerização. ....25
- Figura 4** Descrição simplificada das etapas de síntese envolvidas no trabalho e a estrutura dos compostos de I a III obtidos. ....34
- Figura 5** Figura representativa das reações fotoquímicas e térmicas envolvidas nos complexos (III a VI) envolvidos no sistema em estudo. ....35
- Figura 6** Modelo das reações envolvidas no método de inibição enzimática (método de Ellman) utilizado neste trabalho. ....37
- Figura 7** Reações envolvidas no método fluorimétrico de inibição enzimático utilizado no trabalho. ....38
- Figura 8** Espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos de I a VI em N,N'-DMF; absorvidade molar ( $10^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) eixo y em função do comprimento de onda (nm) eixo x. ....42
- Figura 9** Em 9.a complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$  em água, tampão trisma 0,1M pH=12,2; pH=2,0. Em 9.b espectros UV-Vis em acetonitrila, dimetil-sulfóxido e dimetil-formamida.....45
- Figura 10** Espectros de absorção no infravermelho para os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{CO}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  obtidos em pastilhas de KBr. ....47
- Figura 11** Espectro de absorção no infravermelho do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$  em pastilhas de KBr. ....48
- Figura 12** Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo  $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$  em pastilhas de KBr.....48
- Figura 13** Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)(4\text{apy})](\text{PF}_6)_2$  obtido em pastilha de KBr.....49
- Figura 14** Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2](\text{PF}_6)_2$  obtido em pastilha de KBr. ....49
- Figura 15** Voltamograma cíclico obtido para os complexos de III a VI, com intervalo de potencial de 0-1800mV (referência Ag|AgCl), velocidade de varredura de 150 mV.s<sup>-1</sup> e eletrólito de suporte TBAPF<sub>6</sub>. ....52
- Figura 16** Estrutura com hidrogênios enumerados referentes aos valores da Tabela 3 e Tabela 4 para os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  e  $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$ . ....54
- Figura 17** RMN de <sup>1</sup>H para os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)(4\text{apy})]^{2+}$  e  $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  em CD<sub>3</sub>CN. ....56
- Figura 18** Comparação entre os espectros eletrônico do complexo VI teórico obtido pelo método TD-DFT UB3LYP\LanL2DZ (linha vermelha) e experimental (linha preta).....57

<b>Figura 19</b> Diagrama de energias simplificado e superfícies de contorno para os estados triplete e singlete do complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ .....	60
<b>Figura 20</b> Estrutura 3D otimizada para as 3 moléculas $cis-[Ru(phen)_2(OH_2)_2]^{2+}$ (complexo III), $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(OH_2)]^{2+}$ (complexo IV), $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ (complexo VI) e $trans-[Ru(phen)_2(OH_2)_2]^{2+}$ (complexo V).....	62
<b>Figura 21</b> Superfícies de contorno dos 4 complexos estudados no sistema fotoquímico de interesse.....	64
<b>Figura 22</b> Gráficos de distribuição orbital em função da energia dos orbitais moleculares para cada um dos complexos de III à VI, em destaque as regiões envolvidas nas transições TCML, CM e TCLL.....	66
<b>Figura 23</b> espectros individuais, 23.b projeção em 3D e c gráfico em função do tempo para $\lambda=412$ nm.....	69
<b>Figura 24</b> Em 24.a todos os espectros medidos com 3,7 $\mu$ M de 4apy e em 24.b a curva média em função do tempo.....	70
<b>Figura 25</b> Espectros contínuos em 25.a, e curva média e triplicata em função do tempo em 25.b.....	71
<b>Figura 26</b> Espectros contínuos em 26.a e curva média em função do tempo para o complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ em 26.b.....	71
<b>Figura 27</b> Espectros contínuos para o teste de inibição com o complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(OH_2)]^{2+}$ em 27.a, medidas em função do tempo, e curva média em 27.b.....	72
<b>Figura 28</b> Espectros contínuos para o composto $cis-[Ru(phen)_2(OH_2)_2]^{2+}$ estão representados em 28.a e a curva média e triplicata em função do tempo em 28.b.....	72
<b>Figura 29</b> Espectros contínuos para o complexo $cis-[Ru(5Cl-phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ e, em 29.b, evolução da absorbância em 412 nm em função do tempo.....	73
<b>Figura 30</b> Espectros contínuos, em 30.a, usando como inibidor padrão a Tacrina e, em 30.b, evolução temporal da absorbância para o comprimento de onda de 412 nm.....	73
<b>Figura 31</b> No gráfico 31.a, as curvas de reação enzimática usando diferentes fragmentos e o complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ , como inibidores em comparação com a Tacrina. Em 31.b, comparação entre com os 3 complexos estudados como inibidores na curva de reação de hidrólise enzimática.....	74
<b>Figura 32</b> Gráfico de barras para a velocidade de reação enzimática para os diferentes inibidores comparados com o inibidor comercial Tacrina e com a reação enzimática livre de inibidor.....	75
<b>Figura 33</b> Gráfico de delta taxa de reação segundo variação no tempo de incubação do complexo III com a enzima AChE.....	76
<b>Figura 34</b> Gráfico de delta taxa de reação segundo variação no tempo de incubação do complexo IV com a enzima AchE.....	77
<b>Figura 35</b> Gráfico de delta taxa de reação segundo variação no tempo de incubação do complexo IV com a enzima AChE.....	77
<b>Figura 36</b> Gráfico de Linear-Buck para obtenção dos parâmetros de cinética de inibição segundo as equações de Michaelis-Menten.....	78
<b>Figura 37</b> Representação das estruturas utilizadas como comparação com relação aos valores de constante de inibição KI.....	79
<b>Figura 38</b> Valores de atividade enzimática normalizada em função da concentração de inibidor (Complexo VI). Os pontos representam os valores obtidos pelo método de Ellman e a linha azul representa a regressão logarítmica com limite no intervalo dos pontos traçados.....	81
<b>Figura 39</b> Gráfico adaptado <sup>88</sup> da porcentagem de inibição da atividade enzimática (AChE) segundo a pequena biblioteca de 28 complexos polipiridínicos, à 1 $\mu$ M de inibição, a linha	

vermelha representa o limite delimitado pela porcentagem de inibição referente ao complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ .....	82
<b>Figura 40</b> Complexos com maior atividade inibitória $IC_{50}$ (estruturas <b>e</b> e <b>t</b> ), e complexos com valores de $IC_{50}$ inibitório mais próximo do complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ (estruturas <b>p</b> , <b>q</b> e <b>d</b> ) adaptados da referência <b>Figura 39</b> .....	83
<b>Figura 41</b> função do tempo (em destaque a triplicata para a reação padrão livre de inibidor, e a reação contendo $3,7\mu M$ do composto $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ ).....	84
<b>Figura 42</b> Espectros de emissão obtidos, para a reação de hidrólise enzimática utilizando $3,7\mu M$ do complexo $cis-[Ru(phen)_2(OH_2)_2]^{2+}$ em 42.a. $cis-[Ru(phen)_2(OH_2)(4apy)]^{2+}$ 42.b e $trans-[Ru(phen)_2(OH_2)_2]^{2+}$ no gráfico 42.c.....	85
<b>Figura 43</b> Gráfico de barras, contendo a taxa de reação enzimática obtida pelo método de fluorescência, utilizando $3,7\mu M$ para cada protótipo inibidor. ....	86
<b>Figura 44</b> Em a, curva média para as medidas de inibição enzimática acompanhados fotoquimicamente e, em b, comparação da curva média com e sem fotoquímica (método de Ellman). ....	87
<b>Figura 45</b> Curvas do experimento combinado para o complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(OH_2)]^{2+}$ em a. Curva média comparada com e sem o processo de fotólise em b. Comparação dos experimentos com fotoquímica entre os complexos $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ e $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(OH_2)]^{2+}$ em c e comparação com e sem a fotoquímica para os mesmos complexos em d.....	88
<b>Figura 46</b> Gráficos e viabilidade celular em função da concentração da espécie no meio de cultura (complexos III, IV e VI) para as células do tipo 3T3. ....	90
<b>Figura 47</b> Gráficos e viabilidade celular em função da concentração da espécie no meio de cultura (complexos III, IV, VI e o ligante 4-aminopiridina livre) para as células do tipo NG97. ....	91
<b>Figura 48</b> Fotos tiradas do meio de cultivo celular contendo a espécie em estudo (complexos III, IV, VI e o ligante 4-aminopiridina livre) em placas de 96 poços utilizado na medida espectrofotométrica. ....	91
<b>Figura 49</b> Gráfico contendo os valores de $IC_{50}$ de citotoxicidade para os complexos (III, IV e VI) e o ligante 4-aminopiridina, frente às células 3T3 e NG97.....	92
<b>Figura 50</b> Imagens de microscopia confocal obtidas com o contraste emissivo do complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ . Em 50.a contraste emissivo antes da irradiação e em 50.b perda do contraste após 1 minuto de irradiação contínua.....	94
<b>Figura 51</b> Imagens com o contraste do complexo VI em vermelho. 51.a imagem sem irradiação, em 51.b após 40 segundos de irradiação contínua, e em 51.c ao final de 1 minuto de irradiação, sem o contraste emissivo do complexo VI.....	94
<b>Figura 52</b> Gráfico de Intensidade de Emissão Relativa em função do Tempo, em destaque o decaimento da emissão do complexo $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ em meio celular, para dois diferentes pontos da lâmina fotografados e acompanhados da irradiação em pulsos de 5 segundos. ....	95



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	27
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	27
<b>2.PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	28
2.1.Materiais e Equipamentos.....	28
2.2.Procedimento Experimental .....	30
2.2.1.Síntese do <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].2H <sub>2</sub> O.....	30
2.2.2.Síntese do [Ru(phen) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ].2H <sub>2</sub> O .....	31
2.2.3.Síntese do <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	31
2.2.4.Síntese do <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy)(H <sub>2</sub> O)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	32
2.2.5.Síntese Fotoquímica do <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy)(H <sub>2</sub> O)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	32
2.2.6.Síntese do <i>trans</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	32
2.2.7.Síntese do <i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	33
2.3.Estudos de Inibição Enzimática (AChE).....	36
2.3.1.Preparo de Soluções e Reagentes .....	36
2.3.2.Metodologia dos Experimentos de Inibição .....	36
2.4.Estudos Combinados de Inibição Enzimática e Fotoquímica.....	39
<b>3.ESTUDOS TEÓRICOS</b> .....	39
3.1.Métodos Teóricos.....	39
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1.Preparação dos Complexos Polipiridínicos de Ru(II) .....	41
4.2.Espectros de Absorção na Região do UV-Vis.....	42
4.3.Espectros de Absorção no Infravermelho .....	45
4.4.Comportamento Eletroquímico.....	50
4.5.RMN- <sup>1</sup> H.....	53
4.6.Análise dos Estudos Teóricos .....	57
4.6.1.Avaliação do Mecanismo da Reação Fotoquímica .....	57
4.6.2. Cálculos Computacionais Realizados para os Fotoprodutos.....	60
4.6.2.Análise NBO. ....	66
4.7.Experimentos de Inibição Enzimática (AChE).....	67
4.7.1.Experimentos de Inibição Enzimática (método de Fluorescência).....	84

4.8.Experimentos Combinados (Fotoquímica e Inibição Enzimática) .....	87
4.9.Experimento de Citotoxicidade e IC <sub>50</sub> .....	89
4.10 Experimentos de Emissão <i>in situ</i> .....	93
<b>5.CONCLUSÃO</b> .....	<b>96</b>
<b>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>98</b>
<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>105</b>
<b>APÊNDICE 2</b> .....	<b>106</b>

# 1.INTRODUÇÃO

O Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que atinge cerca de 1 milhão e meio de brasileiros, e afeta uma em cada vinte pessoas acima de 65 anos, segundo estimativa da ABRAZ<sup>1</sup> – (Associação Brasileira de Alzheimer). A evolução temporal do Mal de Alzheimer (MA) preocupa cada vez mais a comunidade científica. Atualmente o MA gera um custo total de 172 bilhões de dólares com pesquisa, gastos previdenciários e investimento em infraestrutura. Para o ano de 2025, esse montante pode ultrapassar o valor de 307 bilhões de dólares e chegar a 1,078 trilhões de dólares em 2050<sup>2,3</sup>.

Por se tratar de uma doença neurodegenerativa, propor uma cura para o MA envolve um processo extremamente complexo uma vez que não é conhecido o mecanismo de iniciação, mas apenas os processos fisiológicos e sintomáticos em estágio de andamento da doença, o que torna factível apenas o desenvolvimento de fármacos e terapias que possam retardar a progressão do MA. Com base em diferentes hipóteses, hoje existe uma série de fármacos comerciais e em fase clínica de testes que tem mostrado respostas satisfatórias na qualidade de vida de portadores da MA, dentre essas hipóteses, tem-se a hipótese colinérgica que envolve estratégias de compensação do neurotransmissor Acetil Colina (ACh)<sup>4,5</sup>, inibição das enzimas Acetil Colinaesterase (AChE)<sup>6,7,8,9</sup> e Butil Colinaesterase (BChE)<sup>7,9,10,11</sup>, hipótese da agregação do peptídeo Beta Amilóide<sup>12,13,14,15</sup>, e hipótese da proteína *Tau*<sup>16</sup>.

De todas as hipóteses anteriormente citadas, a hipótese colinérgica possui a maior aplicabilidade comercial<sup>7,9,10,15</sup>, e grande volume de pesquisa e investimento. Essa hipótese está baseada no déficit do neurotransmissor ACh observado em pacientes portadores do MA<sup>17,18,19</sup>, este déficit ainda de natureza desconhecida pode ser atribuído tanto a deficiência na atividade da enzima Acetil Colinasintase (AChS), envolvida na síntese da ACh, ou mesmo, na ação descontrolada das enzimas AChE, BChE presentes na fase de degradação do ACh após sua atuação nos canais de  $K^{+20,21,22,23}$ .

Devido à dificuldade em modelar fármacos para atuar como cofatores, a melhor estratégia para desenvolvimento de drogas para o MA, segundo a hipótese colinérgica, é elaborar compostos que possam manter a concentração média temporária do neurotransmissor ACh. Comercialmente, boa parte dos fármacos é

dedicada a atuar como inibidores da enzima AChE, dentre esses estão a Tacrina<sup>23,24</sup>, Fisostigmina<sup>25</sup>, Galantamina<sup>26</sup>, Rivastigmina<sup>27</sup>, sendo que só os dois primeiros já foram retirados do mercado em muitos países, devido ao baixo tempo de vida útil<sup>22,23,25</sup>, e a alta taxa de pacientes com efeitos colaterais, reforçando assim a necessidade da busca por novos fármacos mais eficazes e menos danosas. Uma classe de compostos que tem despertado bastante interesse, devido a boa resposta em testes clínicos, são as aminopiridinas<sup>28,29,30</sup>. Em especial a 4-aminopiridina (4apy) que já se encontra em fase clínica 3<sup>28,31,32,33</sup>. A 4apy atua como bloqueadora dos canais de potássio presentes nas células neurais do sistema nervoso central (SNC)<sup>34,35,36,37</sup>, aumentando assim a concentração de ACh livre na região pré-sináptica.

O interesse nas propriedades bioquímicas e reatividade no sistema neurológico da 4-aminopiridina esta descrito na literatura desde a década de 80. Por exemplo, vários trabalhos sugerem que muitas desordens neurológicas ocorrem devido a mutações na seqüência dos canais de íon K<sup>+</sup> bem como a disfunções nesse canal<sup>29,30</sup>. Por exemplo, várias lesões na medula espinhal resultam da compressão ou contusão do nervo espinhal, deixando partes variáveis do nervo intactas após a lesão. Estas contusões podem levar a destruição da bainha de mielina, expondo os canais de K<sup>+</sup> paranodais.

Em 1981, BOSTOCK e colaboradores<sup>33</sup> demonstraram que a condução poderia ser restaurada usando 4-aminopiridina. Nesta época, a 4apy já estava em uso clínico para a terapia da síndrome miastênica de Lambert-Eatone conhecido como botulismo. A demonstração experimental que a 4apy poderia restaurar a condução dos nervos lesados levou a uma série de testes clínicos em pacientes com esclerose múltipla<sup>34</sup>, lesões graves na medula espinhal<sup>35</sup>, epilepsia<sup>34,36</sup> e Mal de Alzheimer<sup>34</sup>. Melhoras comportamentais atribuídas ao tratamento com a 4apy incluem: controle motor e sensorial voluntário, continência, controle respiratório com decréscimos da espasticidade e dor idiopática.

A maioria das aplicações clínicas da 4apy utiliza liberação intravenosa ou oral em cápsulas de gelatina contendo este ligante puro ou misturado com lactose ou celulose. Esse método leva ao deslocamento imediato do fármaco com picos curtos de tempo/concentração do principio ativo no soro fisiológico (2-3 horas). Dessa forma, apesar das melhoras comportamentais expressivas detectadas em vários pacientes, em muitos casos a dose máxima permitida não tóxica é insuficiente

para produzir o máximo recobrimento benéfico<sup>29</sup>. Esta estreita janela terapêutica faz com que sua administração seja efetuada sob rigoroso controle clínico<sup>29</sup>.

O maior inconveniente encontrado na família das aminopiridinas é o baixo tempo de permanência no organismo, exigindo a administração de altas doses dessa molécula acarretando em uma série de efeitos colaterais. Uma solução já usada a bastante tempo para moléculas com baixo tempo de atividade é utilizar moléculas ou matrizes carreadoras<sup>38,39,40,41</sup>, esses sistemas mantêm o fármaco por mais tempo e pode, por consequência, melhorar a ação local. Uma solução para entrega de fármacos que vem mostrando bastante aplicabilidade é a coordenação do princípio ativo a complexos de metais de transição<sup>42,43,44,45,46</sup>, formando compostos de labilidade controlada.

O uso de compostos sensíveis à luz para a análise de processos neurológicos vem sendo reportado desde a década de 70<sup>47,48</sup>. Para que um composto luminescente possa atuar como um sensor biológico é necessário que ele se ligue seletivamente e reversivelmente à substância de interesse resultando na alteração da sua luminescência. A luminescência do sensor deve ser intensa e acima de 350 nm para facilitar o uso de lentes microscópicas e evitar danos à célula devido a luz ultravioleta. Em particular, emissão acima de 500 nm previne a interferência por autofluorescência das espécies nativas nas células.

A sensibilidade das propriedades luminescentes dos complexos polipiridínicos de Ru(II) frente a parâmetros tais como pH, liberação ou alterações nos ligantes coordenados, caráter hidrofílico/hidrofóbico ou eletrônico, combinada com as funções neurológicas da apy, reforçam esta proposta de trabalho<sup>49,50,51</sup>. Em geral, os estados excitados de TCML ( $d\pi \rightarrow \pi^*$ ) dos complexos de Ru(II) são sensíveis em relação aos ligantes coordenados, pH, temperatura e presença de eletrólitos, enquanto as energias dos estados excitados MC ( $d \rightarrow d$ ) não são alteradas pelo meio. Portanto, neste trabalho buscou-se obter complexos que apresentem os estados excitados com características dissociativas MC e os estados excitados luminescentes com características de TCML próximos em energia, de forma a promover a liberação da apy e mapear as interações da apy pelas alterações na luminescência.

Cabe salientar que vários trabalhos na literatura descrevem as propriedades farmacológicas dos complexos de Ru(II) e a baixa toxicidade dos mesmos em meio biológico<sup>52,53</sup>. Os benefícios de explorar complexos de rutênio

como carregadores de fármacos incluem: a simplicidade de sínteses, velocidades de trocas de ligantes comparáveis às observadas para os complexos de Pt(II) e que podem ser sintonizadas por coordenações de ligantes ancilares adequados, geometrias octaédricas e estados de oxidação +2 e +3 acessíveis sob condições fisiológicas. Os fármacos baseados em Ru(II) são menos tóxicos que aqueles baseados na Pt(II)<sup>39</sup>. Em parte, estas características estão relacionadas à interação dos complexos de Ru(II) com as proteínas do soro particularmente albumina e transferrina (proteínas em maior porcentagem no soro fisiológico). De acordo com estudos farmacológicos, a distribuição, metabolismo e eficiência de muitos fármacos podem ser alteradas pela afinidade com essas proteínas<sup>53</sup>. Esse fato combinado com a geometria octaédrica dos compostos de Ru(II) favorecem o transporte dos compostos no plasma e a passagem para o interior da célula via endocitose, usando transferrina como receptor.

A espectroscopia de fluorescência é a técnica ideal para observar alterações conformacionais em proteínas e em compostos luminescentes, uma vez que permite a determinação de baixas concentrações de substâncias sob condições fisiológicas por meio de medidas não-invasivas<sup>54,55</sup>. Em adição, o uso de fluoróforos intrínsecos para essas investigações evita complicações pela adição de corantes externos os quais podem interferir nos resultados.

Com base no sistema microcontrolado e seletivo para entrega de fármacos, nosso grupo de pesquisa iniciou estudos para desenvolver uma forma de terapia de ações múltiplas almejando a entrega seletiva e controlada de moléculas bioativas e diagnóstico. Nosso laboratório vem trabalhando no desenvolvimento de compostos de metais de transição luminescentes para uso terapêutico, buscando fármacos menos tóxicos e mais seletivos.

Nossos estudos iniciaram-se com a obtenção do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, em que (phen = 1,10-fenantrolina). Este complexo é estável termicamente tanto no estado sólido como em solução aquosa (pH 2-10) e em meio orgânico. É altamente colorido (solução vermelho alaranjado) e quando excitado com luz visível apresenta emissão intensa a 660 nm. Estas propriedades tornam este complexo interessante para atuar no sistema fisiológico.

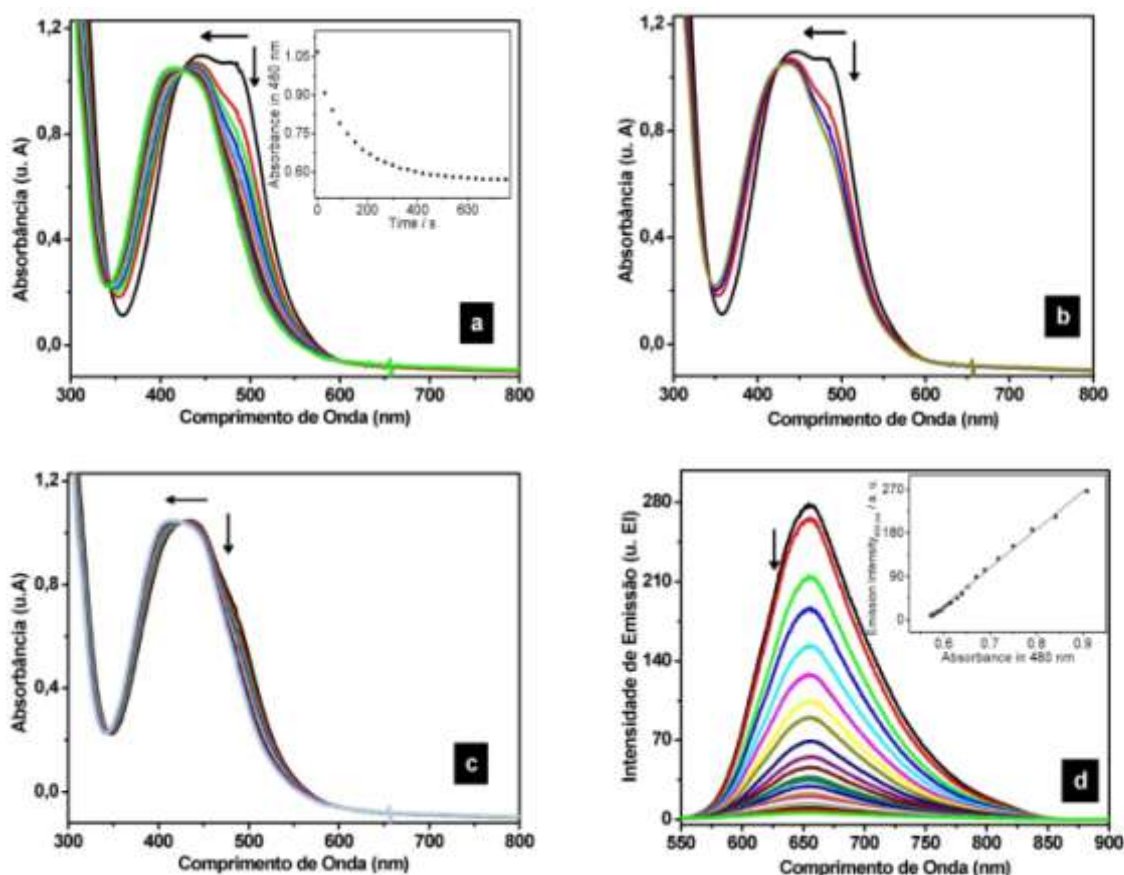
Os estudos das propriedades fotoquímicas e fotofísicas do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, em meio aquoso e a diferentes pH's, frente a liberação da 4apy, vem sendo realizados em nosso laboratório. Por exemplo, os experimentos de

fotólise contínua, com luz de 420 nm, do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ , em acetonitrila, levam a um consumo contínuo do máximo de absorção a 490 nm com um deslocamento da absorção para 440 nm (**Figura 1b**, **eq. 1**) e na sequência para 420 nm (**Figura 1c**, **eq. 2**) sendo que o produto final apresentou absortividade molar muito menor que o complexo precursor coerente com a formação de um produto final como sendo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$  ( $\epsilon_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ ;  $\epsilon_{\text{max}} = 8700 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L cm}^{-1}$ ) de acordo com as **eqs 1 e 2**.



Os valores de rendimento quântico para liberação fotoquímica do ligante 4apy ( $\Phi_{\text{subs}}$ ) calculados com base nas alterações nos espectros de absorção eletrônica durante a fotólise foram iguais a 0,23 e 0,012 para a primeira (**eq. 1**) e segunda (**eq. 2**) fotolabilização da 4apy.

Quando a fotólise a 420 nm é acompanhada por espectroscopia de luminescência observou-se um consumo contínuo do máximo de emissão a 660 nm (**Figura 1b**). As mudanças espectrais UV-vis desta mesma solução também foram avaliadas. O gráfico obtido das alterações no máximo de emissão versus máximo de absorção foram lineares, indicando um consumo quantitativo da 4apy com a emissão (**Figura 1b**). Estes dados são relevantes uma vez que indicam a viabilidade do complexo atuar como diagnóstico para a liberação seletiva e controlada da 4apy<sup>56</sup>.



**Figura 1** Fotólise do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  em acetonitrila, irradiado em 420 nm; (a) mudança no espectro de absorção (destaque para o decaimento temporal da absorbância medido em 480 nm); (b) mudança no espectro de absorção referente a primeira parte da equação 1; (c) mudança no espectro de absorção (2ª parte da equação 2); (d) mudança no espectro de emissão (destaque ao gráfico do máximo de absorção contra o máximo de emissão medidos durante a fotólise do complexo,  $R^2=0,997$ ).

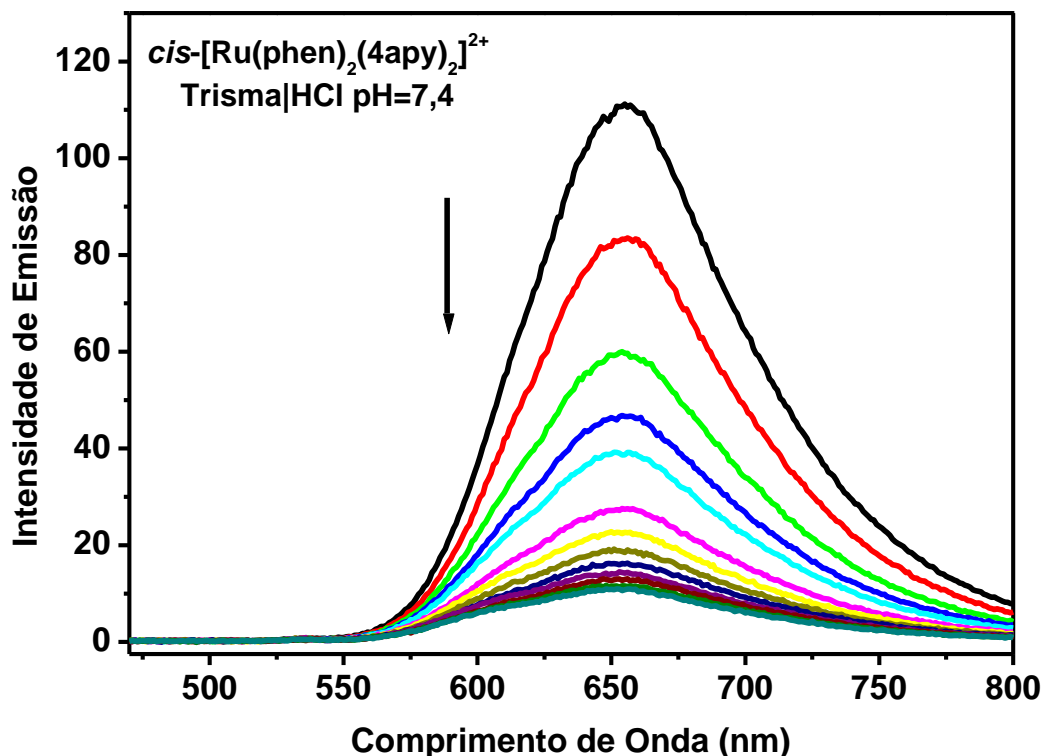
A liberação fotoquímica de duas moléculas de 4apy da esfera de coordenação do centro metálico de Ru(II) sugerem que a substituição fotoquímica da 4apy ocorre pela população dos estados excitados dissociativos centrados no metal ou de um conjunto de estados excitados com energias muito próximas ou que apresentam uma barreira de ativação para dissociação bastante baixa. Um candidato provável são os estados excitados centrados no metal (CM) ou a população simultânea dos estados excitados (CM/TCML). Cabe salientar que a 4apy é um ligante de campo relativamente fraco ( $pK_a \sim 9,4$ ), portanto, espera-se que esta molécula seja bastante lábil em complexos que apresentam estados excitados centrados no metal de baixa energia, como é o caso de complexos polipiridínicos de Ru(II)<sup>56</sup>.



Para avaliarmos o mecanismo da reação fotoquímica, neste projeto pretendemos realizar cálculos computacionais usando a aproximação do método DFT e o método Multiconfiguracional TD-DFT, para os estados excitados singleto e tripleto dos complexos  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  e  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(CH_3CN)]^{2+}$ . Os resultados obtidos são mostrados detalhadamente neste trabalho.

Os experimentos de fotólise contínua realizados em meio aquoso não levaram a alterações significativas nos espectros de absorção eletrônica uma vez que os possíveis produtos da fotólise em solução aquosa, os aquocomplexos de Ru(II),  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(H_2O)]^{2+}$ ,  $cis-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  e  $trans-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$ , apresentam absorções intensas na mesma região do complexo de partida. Este fato dificultou a análise da reatividade fotoquímica destes complexos em solução aquosa pela técnica de espectroscopia UV-vis. Para avaliarmos o comportamento fotoquímico do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  em solução aquosa acompanhamos a reação fotoquímica pela técnica de luminescência. A **Figura 2** mostra os experimentos fotoquímicos do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  em solução aquosa (Tris/HCl, pH 7.4), em água pura e na presença da proteína do soro, soroalbumina acompanhadas por medidas de luminescência<sup>42</sup>. Os resultados obtidos foram similares: o máximo de emissão do complexo é continuamente consumido até a formação do fotoproduto, aquocomplexo, que não apresenta luminescência. É interessante notar que a mudança de solvente  $CH_3CN$  para água e as condições do meio: solução tamponada ou a presença de albumina não alteraram as propriedades fotoquímicas do complexo. Estes dados são relevantes para a possível aplicação deste complexo em meio fisiológico e viabilizam a liberação seletiva e controlada da 4apy no meio fisiológico<sup>57</sup>.

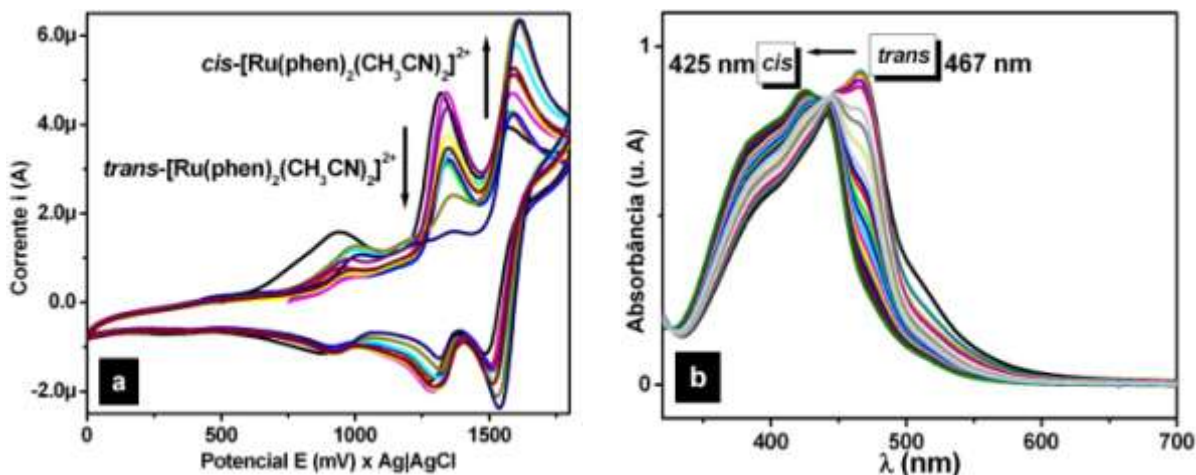
A soroalbumina é a proteína em maior concentração no plasma apresentando várias funções fisiológicas e farmacológicas; sendo responsável pelo transporte e disposição de ligantes endógenos e exógenos presentes no sangue. Esse é um dos motivos pelos quais a indústria farmacêutica tem desenvolvido e estabelecido protocolos para os estudos envolvendo a interação dessa proteína com as drogas em desenvolvimento já na primeira etapa de desenvolvimento de drogas.



**Figura 2** Espectro de emissão da fotólise do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ , em tampão Tris-HCl 0,1M pH=7,4,  $\lambda_{Exc}= 450$  nm, contendo 1% de BSA (soroalbumina bovina) irradiado em reator fotoquímico de 420 nm.

Para confirmarmos os produtos da fotólise em meio aquoso, neste trabalho foram preparados e caracterizados os complexos  $cis-[Ru(phen)_2(4Apy)(H_2O)]^{2+}$ ,  $cis-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  e  $trans-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  em meio aquoso e investigar o comportamento térmico, espectroscópico, eletroquímico e fotoquímico destes complexos. O complexo  $trans-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  está presente no sistema fotoquímico em estudo, devido a reação fotoinduzida de isomerização do produto de fotólise em meio aquoso  $cis-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  com comprimento de onda de excitação muito semelhante (fotólise 450 nm e fotoisomerização 420 nm), porém o complexo de geometria *trans* de baixa estabilidade, meio aquoso e solvente orgânico, retorna via reação térmica ao isômero *cis* (cerca de 2 horas em  $CH_3CN$ ,  $N,N'$ -DMF e aproximadamente 8 horas em água), esse processo de fotosimerezição está descrito na **Figura 3.a** com o

voltamograma cíclico em acetonitrila e em **3.b** espectro de absorção na região do UV-Vis.



**Figura 3.a** Voltamograma cíclico do processo de isomerização do complexo  $trans$ - $[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  em  $cis$ - $[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$  (0,1 M de  $TBAPF_6$ ,  $CH_3CN$ ) e **3.b** Espectro de absorção na região do UV-Vis referente ao mesmo processo de isomerização.

O processo de fotólise envolvido neste sistema em estudo é de fundamental importância, uma vez que, responde pelo processo de entrega das aminopiridinas e por este motivo, com o intuito de compreender a natureza desse processo, utilizou-se do grande potencial dos cálculos computacionais para elucidar o mecanismo da reação fotoquímica a partir dos cálculos de OM (orbitais moleculares) dos estados excitados tripleto e singleto para o complexo  $cis$ - $[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ .

Outro aspecto fundamental da química da 4apy está relacionado à atividade inibidora dos canais de íon potássio:  $K_V$ ,  $K_{Na+}$  e  $K_{ATP}$  que vem sendo demonstrada ser intermediada por suas ligações aos poros dos canais abertos. Apesar destas investigações, muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas. Por exemplo, pouco se sabe sobre os sítios de interação e os mecanismos de ação da 4apy no sistema nervoso central. Essa é uma questão essencial uma vez que ela pode contribuir na elucidação das funções neurológicas da 4apy, na sua aplicação como fármaco e no mapeamento de várias doenças neurodegenerativas.

Considerando a hipótese colinérgica, como um possível mecanismo de ação da 4apy no sistema nervoso central e em particular, para o tratamento da MA, neste trabalho avaliamos experimentalmente pelo método espectrofotométrico de

ELLMAN<sup>58</sup>, e pelo método de fluorescência desenvolvido por GUILBALT & KRAMER<sup>59</sup>, a atividade inibidora-enzimática do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e dos produtos da reação fotoquímica em meio aquoso *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> bem como da apy livre. Esses estudos serão estendidos para a substância tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacrinidina) que é o princípio ativo do fármaco comercial Tacrinal®.

Os resultados experimentais serão corroborados por cálculos computacionais de dinâmica (mecânica molecular) e cálculos quânticos DFT (método ONIOM), avaliando a interação da acetil colinaesterase com o complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e com os produtos da reação fotoquímica em meio aquoso *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> procurando determinar o sítio de interação complexo/enzima.

A fim de avaliar as propriedades como protótipo a sonda luminescente foram efetuados estudos de emissão *in situ* do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, utilizando a técnica de microscopia confocal, em que o sistema foi previamente incubado em células cancerosas de colo de útero, além disso, o sistema foi fotolisado utilizando como fonte de excitação o LASER do próprio equipamento, sendo irradiado de maneira contínua e sequenciada.

Espera-se que os estudos propostos neste trabalho permitam o acompanhamento da interação/liberação composto/enzima e a análise da dosagem do fármaco, bem como uma avaliação da cinética e mecanismo de reação da apy no meio fisiológico e nos sítios alvos na enzima acetil colinaesterase. Estes estudos são relevantes para a avaliação das funções neurológicas da apy.

## OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar, caracterizar e avaliar as atividades biológicas de interesse do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> assim como os produtos de fotólise em meio aquoso.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar o complexo de Ru(II), *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, onde phen = 1,10'-fenantrolina-) e apy = 4-aminopiridina e os possíveis produtos da reação fotoquímica: *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.
- Estudar as propriedades térmicas destes compostos em diferentes meios (solvente e pH).
- Estudar a atividade terapêutica desses compostos da apy livre e da substância Tacrina quanto a atividade inibidora-enzimática da enzima acetil colinaesterase .
- Estudar a citotoxicidade desses compostos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, da 4apy livre e da substância tacrina frente a células 3T3 (tecido adiposo) e NG97 (células do sistema nervoso central).
- Realizar cálculos computacionais de orbital molecular, população orbital e espectros de absorção eletrônicos para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, nos estados excitados triplete para elucidarmos o mecanismo da reação fotoquímica e as propriedades luminescentes deste complexo.
- Realizar os estudos das propriedades emissivas *in situ* do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> através dos experimentos de microscopia confocal.

## 2.PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1.Materiais e Equipamentos

- **Reagentes:**  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 1,10-fenantrolina (phen), 4-aminopiridina (4apy), hexafluorofosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ), hexafluorofosfato de hidrogênio ( $\text{HPF}_6$ ) 60% (v/v), cloreto de tetrabutilamônio (sol. de *tert*-butanol 86%) utilizados nas sínteses dos complexos, todos de procedência Sigma-Aldrich, sem tratamento prévio, mantidos sobre atmosfera de nitrogênio (99,999% de pureza) com exceção do  $\text{HPF}_6$ . cloreto de lítio (LiCl), dimetil-formamida (N,N'-DMF), ambos de procedência Synth (para síntese) e Tedia teor HPLC (medidas eletroquímicas e espectroscópicas). Também foram utilizados nas etapas de síntese sem qualquer tratamento.  $\text{NaCO}_3$  J. T. Baker utilizado em precursor de síntese, foi mantido 48 horas em estufa a  $90^\circ$ . Os demais solventes de síntese; acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) e etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) (Chemis) foram tratados com  $\text{CaCl}_2$  e previamente destilados.

Para as medidas eletroquímicas, foi utilizado hefluorofosfato de tetrabutilamônio ( $(\text{But})_4\text{NPF}_6$ ) > 99,9% de pureza) (Aldrich) como eletrólito, mantido em atmosfera inerte e previamente recristalizado em metanol (Tedia) teor HPLC. Todos os solventes utilizados, acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (Tedia) grau HPLC, não passaram por processos de purificação. Para medidas em meio aquoso, utilizou-se água deionizada Milli-Q/Milli-Pore adquirida nas dependências do departamento de química DQ/UFSCar e, neste caso, o eletrólito utilizado foi KCl (Synth) mantido 48 horas em estufa à  $90^\circ$ .

Para medidas de absorção na região do UV-Vis, foram utilizados os mesmo solventes citados anteriormente: acetonitrila, água e diclorometano. Os espectros de absorção no infravermelho foram todos obtidos em pastilhas de KBr (Spectrum) mantidos em estufa  $70^\circ$ . Nas medidas de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN), foram usados os solventes deuterados acetonitrila, diclorometano e água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (Cambridge Isotopes Laboratory).

Nos experimentos de inibição da enzima AChE, utilizou-se enzima acetil colinaesterase (AChE) liofilizada, substrato iodeto de acetiltocolina (AChI) e acetato de indoxila (AcOI), reagente de Ellman ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), ambos de pureza HPLC e procedência Aldrich, peptídeo soro albumina

bovina (BSA) de procedência INLAB. Como padrão de inibição utilizou-se o princípio ativo hidrocloreto de 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacrinidina 99% de pureza, conhecido comercialmente como Tacrina<sup>®</sup>. Para a preparação das soluções tampões, utilizou-se o tampão comercial Trizma<sup>®</sup> Sigma, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e NaCl de procedência J. T. Baker, mantidos em estufa por 12 horas, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (dihidrogeno fosfato de potássio) Chemis, e hidróxido de sódio Synth, para a solução tampão fosfato monobásico e por fim solvente Dioxana Sigma-Aldrich 99,8%.

- **Comportamento Eletroquímico:** Todas as medidas eletroquímicas (Voltametria cíclica e de pulso), foram feitas utilizando um potenciostato/galvanostato  $\mu$ AUTOLAB modelo Type III, com célula eletroquímica de 5 mL e eletrodos, de referência de Ag/AgCl saturado em solução de KCl, trabalho de Pt com diâmetro de 2 mm, e eletrodo auxiliar de 0,5 cm de Pt.

- **Espectroscopia UV-Vis:** Utilizou-se o espectrofotômetro Agilent modelo 8453, com cubetas de quartzo Hëllman de cano longo e 1cm de caminho ótico, para medidas de caracterização, e cubetas de plástico para medidas de inibição enzimática. Em experimentos de fotólise contínua, utilizou-se também reatores fotoquímicos UNITEC-LAB de 420 nm de 8 lâmpadas.

- **Espectroscopia IR:** Foram conduzidas em um espectrometro de infravermelho BOMEM Michael-102 com transformada de Fourier, em celas de suporte para pastilha de KBr.

- **<sup>1</sup>H-RMN:** Medidas de ressonância magnética nuclear foram executadas em um RMN BRUKER DRX-400MHz e ARX-200MHz, disponível no laboratório de ressonância magnética nuclear nas dependências do departamento de química DQ/UFSCar.

- **Espectroscopia de Luminescência:** Os estudos de luminescência conduzidos neste projeto foram feitos em um espectrofluorofotômetro Shimadzu RF-5301 pc de banho termostaticado. Foram utilizados cubetas de quartzo de quatro faces Hëllmam, com 1 cm de caminho ótico.

- **Cálculos Computacionais:** Todos os cálculos computacionais até o momento desenvolvidos foram executados em dois computadores com 2 Gb de memória RAM, e processador Pentium Dual-Core E5200 2.50 GHz em plataforma Linux Fedora, utilizando o software Gaussian 03<sup>60</sup>. O visualizador molecular utilizado foi o Gabedit 2.2.0.<sup>61</sup> para melhor elucidação dos resultados e superfícies de contorno. Para os estudos de dinâmica molecular, foram utilizados computadores

com processador Pentium Quad-Core Q8200 2.33 GHz, memória RAM de 4 Gb, alocados no laboratório do QTEA/UEG Anápolis – GO.

- **Estudos de Citotoxicidade:** as culturas de células 3T3 e NG97 foram preparadas em placas de petri e previamente encubadas em atmosfera de CO<sub>2</sub> com temperatura constante de 37<sup>0</sup> C, por 72 horas, para a posterior adição da solução tampão pH= 7,4 dos complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> e o ligante 4-aminopiridina, deixadas por mais 48 horas. Utilizou-se o método do violeta cristal para a leitura espectrofotométrica dos ensaios, utilizou-se a leitora de placas ASYS UVM 340. Todas as medidas foram feitas em triplicata utilizando placas contendo 96 poços.

- **Estudos de Microscopia Confocal:** preparou-se uma solução 0,5 mM do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em meio de cultura livre de corante contendo 1% de DMSO, o sistema junto com a cultura de células (células cancerosas de colo do útero) foi previamente mantido em uma incubadora de CO<sub>2</sub> por 3 horas. As medidas foram feitas em um microscópio confocal Zeiss modelo: LSM 510 Meta com LASER de excitação de Ar (477 nm) do instituto de química IQUSP-SP, com a colaboração da Dr. Christiane Pavani.

## 2.2.Procedimento Experimental

### 2.2.1.Síntese do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O

Em um balão de 25 mL, foram adicionados 15 mL de N,N'-DMF (dimetil-formamida) mantidos sobre aquecimento brando em atmosfera de N<sub>2</sub> e refluxo por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 mg de RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O, seguidos pela adição de 220 mg de 1,10-fenantrolina, e 240 mg de LiCl (cloreto de lítio anidro). O sistema foi mantido sobre refluxo por 8 horas em atmosfera inerte. Ao término da reação foram adicionados 250 mL de acetona previamente destilada e o sistema foi mantido por 12 horas em 0<sup>0</sup>C até a precipitação do complexo. Essa síntese foi adaptada de SULLIVAN *et al.* 1978<sup>62</sup>.

O precipitado foi filtrado sob pressão reduzida em um funil de vidro sinterizado e lavado várias vezes com água, etanol e éter. A massa de complexo final obtida foi de 150 mg, e o rendimento da síntese foi de 35% (**Complexo 1**).

**Nomenclatura Oficial:**

***cis*-diclorobis(1,10-fenantrolina)rutênio(II)**



### **2.2.2.Síntese do [Ru(phen)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>].2H<sub>2</sub>O**

O seguinte método foi baseado na síntese adaptada de JOHNSON *et al.* 1977<sup>63</sup>. Adicionou-se 140 mg do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O em 10 mL de água previamente aquecida e desairada sobre atmosfera de N<sub>2</sub>. O sistema foi aquecido e mantido em refluxo por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 428 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de sódio anidro) e a reação foi mantida nas mesmas condições por mais 2 horas. Obteve-se uma solução avermelhada com um precipitado vinho que foi filtrado sob pressão reduzida em um funil de vidro sinterizado. O sólido foi lavado 3 vezes com água gelada. A massa final do complexo obtida foi de 128 mg e o rendimento da síntese foi de 94% (**Complexo 2**).

**Nomenclatura Oficial:**

**carbonatobis(1,10-fenantrolina)rutênio(II)**

### **2.2.3.Síntese do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**

A síntese do seguinte complexo foi baseada no método modificado de BONNESON *et al.* 1983<sup>64</sup>. Foram adicionados 120 mg do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)].2H<sub>2</sub>O em 3 mL de água e 5 mL de uma solução de HPF<sub>6</sub> 30%. O sistema foi aquecido durante 5 minutos em um balão de reação de 25 mL. A solução foi filtrada e o sólido foi lavado várias vezes com água. O filtrado e a água de lavagem foram misturados e tiveram seus volumes reduzidos em um evaporador rotativo. A mistura foi novamente precipitada e o sólido obtido foi dissolvido em 3 mL de água fervente. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de HPF<sub>6</sub> 60% e o precipitado foi filtrado em um sistema a baixa pressão. Obteve-se ao final 87 mg de complexo e o rendimento da síntese foi de 51% (**Complexo 3**).

**Nomenclatura Oficial:**

***cis*-hexafluorofato de diaquobis(1,10-fenantrolina)rutenio(II)**

#### **2.2.4. Síntese do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**

A síntese do seguinte composto foi realizada com base no método modificado de WATSON et al. 1996<sup>65</sup>. Adicionou-se 20 mg do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em um balão de reação de 25 mL contendo 10 mL de uma solução 1:1 água e etanol. Esse sistema foi mantido em aquecimento brando sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub> por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mg de 4-aminopiridina (4apy), previamente dissolvidos em 5 mL de etanol quente. O sistema reacional foi mantido em refluxo e atmosfera inerte por cerca de 6 horas até a total precipitação do produto final, posteriormente filtrado a baixa pressão em um funil de vidro sinterizado e lavado várias vezes com água Milli-Q gelada. A massa final obtida foi de 8 mg e o rendimento final da síntese foi de 34,4% (**Complexo 4**).

#### **Nomenclatura Oficial:**

***cis*-hexafluorofosfato de (4-aminopiridina)aquobis(1,10-fenantrolina)rutenio(II)**

#### **2.2.5. Síntese Fotoquímica do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**

A via de síntese fotoquímica para este composto, apresenta uma alternativa, mais rápida e seletiva que a síntese convencional, embora apresente a limitação na quantidade de matéria que pode ser utilizada como material de partida. Metodologia adaptada de BONNISON et al. 1980<sup>64</sup>: em um balão de 50 mL foram dissolvidos 80 mg do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em 20 mL de acetona, seguido pela adição de mais 10 mL de uma solução saturada de cloreto de tetrabutylamônio em acetona, o precipitado foi filtrado em um funil de vidro sinterizado sob pressão reduzida e lavado com dietil éter. O sólido obtido foi redissolvido em 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M e irradiado em um reator fotoquímico contendo 6 lâmpadas de mercúrio de 86 watt cada com  $\lambda_{\text{máx}} = 420$  nm, durante um período de 2,5 horas. Ao final da reação adicionou-se 2,005 em equivalentes mol de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, seguiu-se a filtração do sólido, lavado 3 vezes com 2-propanol e posteriormente com dietil éter, rendimento final de 48%.

#### **2.2.6. Síntese do *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**

A síntese do complexo *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> também segue um roteiro fotoquímico, uma vez que, essa forma é bastante instável em solução, e

quando formado, retorna térmicamente a forma isomérica *cis*. A metodologia utilizada foi modificada partindo-se do roteiro original de BONNESON *et al.* 1980<sup>64</sup>. Foram dissolvidos 60 mg do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>)]·2H<sub>2</sub>O em 40 mL de HPF<sub>6</sub> (3%), mantidos sob agitação constante durante 15 minutos e posteriormente filtrado. A solução coletada foi irradiada por 3 horas em um reator fotoquímico contendo 6 lâmpadas de mercúrio de 86 watt cada com  $\lambda_{\text{máx}} = 420$  nm, o precipitado resultante foi filtrado e lavado 3 vezes com água e 2 vezes com dietil éter, o rendimento dessa reação foi de 46% (**Complexo 5**).

**Nomenclatura Oficial:**

***trans*-hexafluorofosfato de diaquobis(1,10-fenantrolina)rutenio(II)**

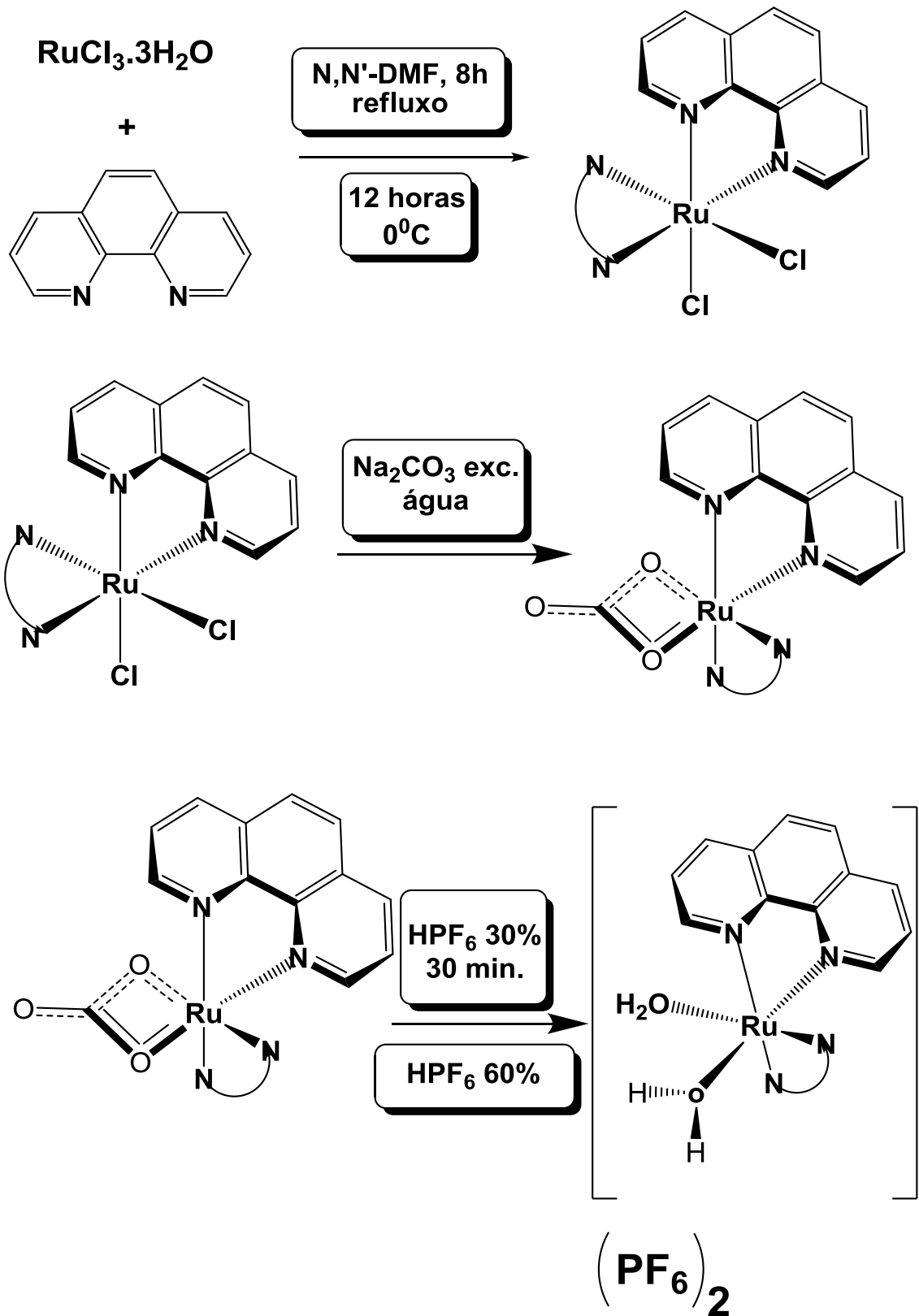
**2.2.7. Síntese do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>**

Em um balão de reação de 25 mL contendo 15 mL da solução de 1:1 água/etanol, foram adicionados 82 mg do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> mantido sob atmosfera inerte e aquecimento brando por cerca de 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 39 mg do ligante 4-aminopiridina, previamente dissolvido em 5 mL de etanol quente. O sistema reacional foi mantido em refluxo por 8 horas. Ao final do tempo, foram adicionados 12 mg de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> para forçar a precipitação do produto de reação que foi filtrado a pressão reduzida e lavado várias vezes com água Milli-Q gelada, em seguida, seco em vácuo por 12 horas. Ao final do processo obteve-se uma massa total de 87 mg e o rendimento obtido foi de 35% (**Complexo 6**).

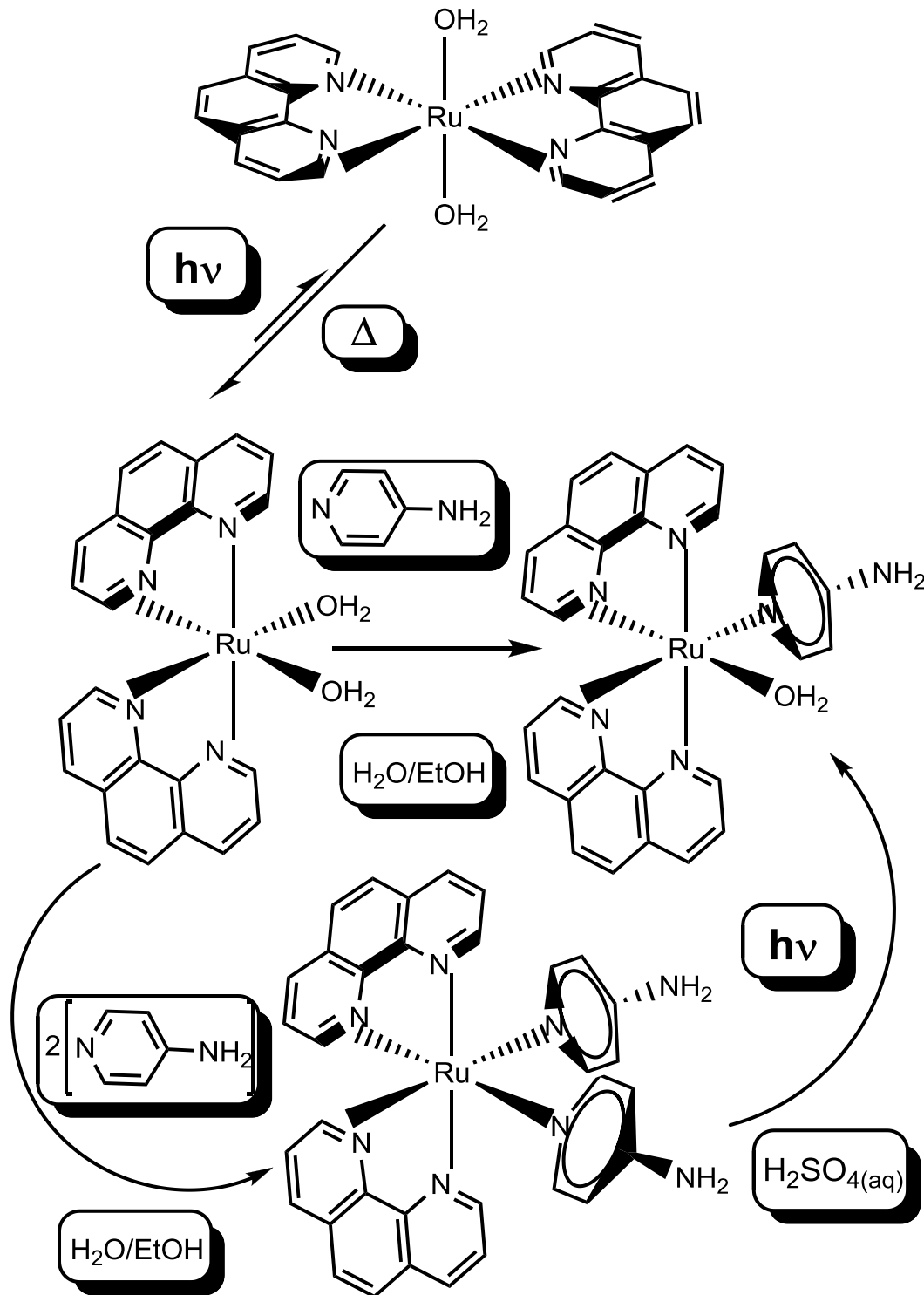
**Nomenclatura Oficial:**

***cis*-hexafluorofosfato de bis(4-aminopiridina)bis(1,10-fenantrolina)rutenio(II)**

A **Figura 4** mostra o esquema das reações envolvidas nas sínteses dos complexos de I a III e a **Figura 5** mostra a síntese de todos os complexos envolvidos no sistema fotoquímico em estudos (complexos de III a VI) incluindo as reações fotoquímicas.



**Figura 4** Descrição simplificada das etapas de síntese envolvidas no trabalho e a estrutura dos compostos de I a III obtidos.



**Figura 5** Figura representativa das reações fotoquímicas e térmicas envolvidas nos complexos (III a VI) envolvidos no sistema em estudo.

## 2.3. Estudos de Inibição Enzimática (AChE)

### 2.3.1. Preparo de Soluções e Reagentes

- **Solução de meio:** A solução utilizada no experimento consiste de um meio aquoso tamponado de pH fisiológico ou o mais próximo do pH ótimo da enzima. Para este experimento, o tampão utilizado foi o tampão Trizma<sup>®</sup> na concentração de 50 mM, pH=8,0 contendo 0,1% (m/m) de soro albumina bovina (BSA).

- **Reagente de Ellman:** O indicador do experimento consiste na espécie medida pela técnica espectrofotométrica na região do UV-Vis. A forma ionizada do ácido DTNB possui coeficiente de absorvidade molar de  $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para um comprimento de onda máximo em 412 nm. Preparado pela dissolução do ácido DTNB 1 mM na solução de meio contendo 0,1 M de NaCl e 0,02 M de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

- **Substrato AChI:** Este substrato é um tioéster de estrutura bastante semelhante ao neurotransmissor acetilcolina, é usado sem restrições pois a enzima AChE é seletiva apenas a hidrólise de ésteres, e apenas a forma tioéster ionizada é capaz de reagir com o indicador DTNB. É preparado pela dissolução do iodeto de acetilcolina em água deionizada Milli-Q, para a concentração final de 1mM.

- **Solução de 5 U/mL de AChE:** A enzima liofilizada foi dissolvida até a concentração de 50 U/mL em tampão pH=8,0 e as posteriores diluições a concentração de 5 U/mL foram feitas com a solução tampão contendo 0,1% de BSA.

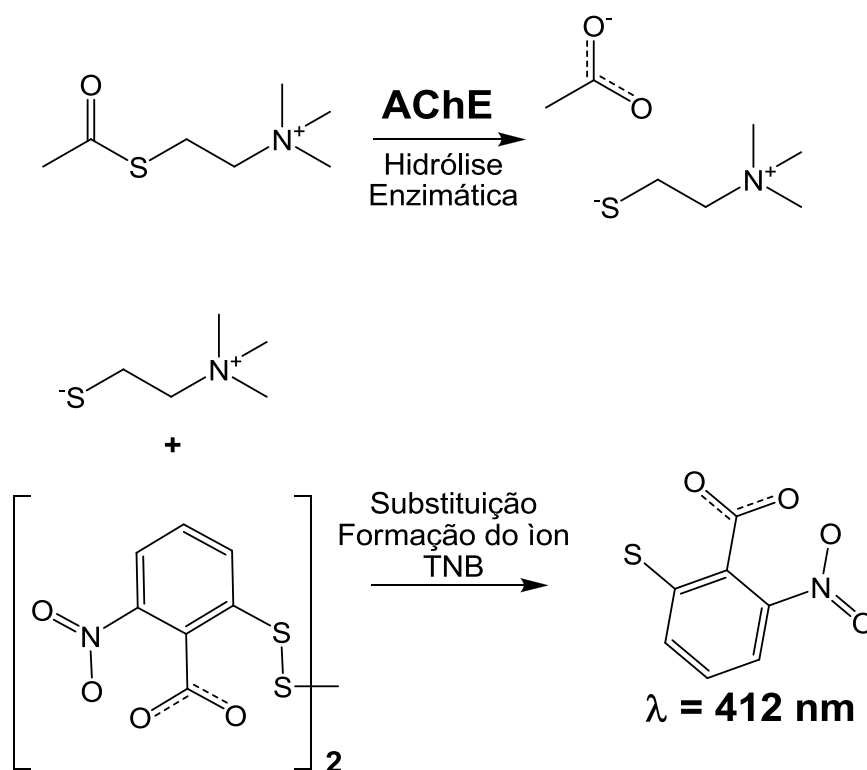
- **Solução 0,083 M de Acetato de Indoxila:** O substrato utilizado no método de emissão foi preparado pela dissolução (145 mg) de acetato de indoxila em 10 mL de Dioxana.

- **Solução Tampão  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$  0,1M pH = 7,4:** Essa solução é o solvente utilizado para as medidas de inibição enzimática pelo método de fluorescência. 4,3859 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dissolvidos em 200 mL de água Milli-Q, e o pH da solução foi corrigido até o valor padrão com solução 6,0 M de NaOH, foi acrescentado então ácido ascórbico (3,0 mM) a solução então foi mantida na ausência de luz.

### 2.3.2. Metodologia dos Experimentos de Inibição

Os experimentos de inibição enzimática foram executados com base no método de Ellman<sup>58,66</sup> adaptado uma vez que nos experimentos pioneiros foi

usado um fotocolorímetro de limite de detecção e sensibilidade bastante inferior aos espectrofotômetros modernos. Este método baseia-se na hidrólise do substrato AChI pela enzima AChE. O substrato hidrolisado é capaz de reagir com o indicador DTNB por interação de pontes de dissulfeto e gerar uma espécie aniônica com  $\lambda_{\text{máx}} = 412\text{nm}$  que deve ser detectada pelo espectrofotômetro. A **Figura 6** mostra as reações envolvidas neste método de inibição enzimática.

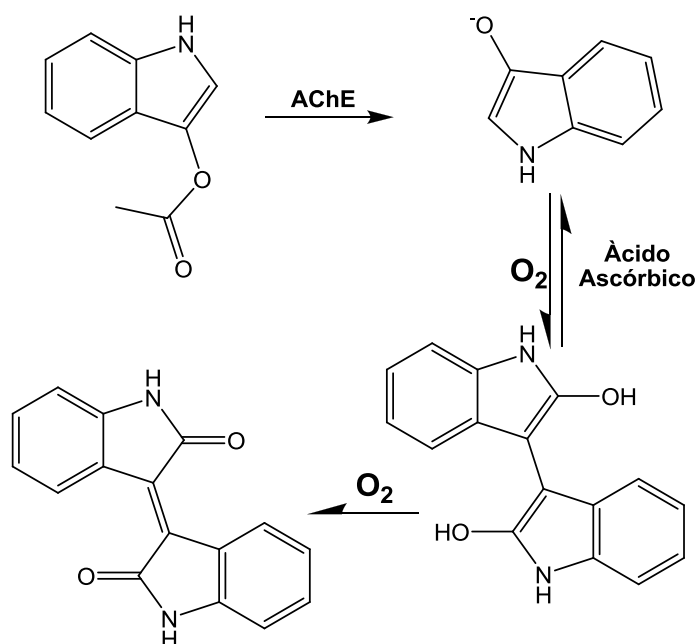


**Figura 6** Modelo das reações envolvidas no método de inibição enzimática (método de Ellman) utilizado neste trabalho.

Nestes experimentos utilizou-se cubetas de plástico de 1 cm de caminho ótico contendo 3 mL de solução, em que a concentração de substrato e a de indicador foram mantidas sempre em 0,16 mM e 0,025 U/mL de enzima AChE, para os experimentos sem a presença de inibidor e para os demais 3,7  $\mu\text{M}$  de inibidor. Todas as medidas foram feitas em triplicata e acompanhadas a cada minuto, variando o tempo total de acordo com o inibidor utilizado. Ao final, todas as curvas foram corrigidas com base na taxa de hidrólise não enzimática do substrato AChI.

O segundo método utilizado neste trabalho refere-se ao trabalho desenvolvido por GUILBAULT & KRAMER<sup>59</sup>, baseado na técnica de fluorescência. O

substrato acetato de indoxila é hidrolisado enzimaticamente pela AChE gerando o íon indoxilato que possui o comprimento máximo de emissão em 470 nm para  $\lambda_{Exc} = 395$  nm. As medidas foram executadas utilizando cubetas de 4 faces transparentes, contendo um volume total de 3 mL, e a concentração de 3,7  $\mu$ M para cada um dos inibidores. Foram utilizados fendas de 3 e 5 nm para excitação e emissão respectivamente, os espectros foram obtidos em intervalos de 1 minuto. A velocidade de reação enzimática foi obtida pelo quociente entre a diferença de intensidade de emissão relativa, em função do tempo (descontando a velocidade de hidrólise não enzimática). A **Figura 7** mostra as reações envolvidas no método de fluorescência utilizado neste trabalho.



**Figure 7** Reações envolvidas no método fluorimétrico de inibição enzimática utilizado no trabalho.

Neste experimento o uso do ácido ascórbico é imprescindível, devido a formação paralela de dois subprodutos *in situ*, sendo que o último destes é não luminescente e irreversível. A reação de formação destes dois produtos acontece pela reação do indoxilato com oxigênio e a presença de ácido ascórbico impede a evolução dessas reações.



## 2.4. Estudos Combinados de Inibição Enzimática e Fotoquímica

De forma a complementar e validar todos os estudos de inibição enzimática feitos para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, os experimentos combinados de inibição enzimática acompanhados por fotólise contínua foram executados seguindo o mesmo protocolo mostrado anteriormente para os ensaios *in vitro* da enzima AChE. Porém, no intervalo entre cada medida obtida pelo espectrofotômetro UV-Vis, a amostra foi irradiada em um reator fotoquímico de 420 nm com duas lâmpadas. O mesmo experimento foi confrontado com testes de inibição não irradiados de modo a obter a relação da fotoquímica com a interação dos complexos com a enzima AChE. Este experimento procurou mimetizar a melhor maneira *in vitro* e as condições de terapia a qual se pretende obter no final do trabalho.

## 3. ESTUDOS TEÓRICOS

### 3.1. Métodos Teóricos

Todos os estudos teóricos até o momento realizados foram com o objetivo de fornecer um maior número de informações estruturais sobre as moléculas envolvidas neste trabalho. Com o objetivo final de obter informações adicionais sobre a interação do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com a enzima AChE, pelos estudos de dinâmica molecular e pelo método ONIOM.

Primeiramente, as moléculas dos complexos 3, 4, 5 e 6 foram previamente otimizados pelo método DFT (Density Functional Theory) utilizando o funcional híbrido Becke3 de Lee, Yang e Par B3LYP<sup>67,68</sup> e o conjunto de pseudo-potenciais LanL2DZ<sup>69,70</sup> como funções de bases atômicas. Nenhuma condição de simetria foi imposta. No final, com as 4 moléculas otimizadas, efetuou-se um refinamento dos cálculos iniciais, aplicando um conjunto de pseudo-potenciais

DGDZVP e o funcional B3PW91. Assim, foram obtidas as superfícies de contorno dos orbitais de fronteira (HOMO-1, HOMO, LUMO e LUMO+1), cargas de NBO (Normal Bonding Orbital), análise de população atômica NPA, análise de decomposição de cargas (para o estudo da contribuição orbital, e sobreposição orbital), valores de ordem de ligação (segundo os índices de Wiberg) e espectros vibracionais IR, e para este caso específico, utilizou-se o método ONIOM com o funcional B3LYP e conjunto LanL2DZ para o átomo de Ru e o conjunto de bases gaussianas 6-31G(d) para os átomos de H, O, C e N. Para os espectros infravermelho teórico, utilizou-se o fator de escalonamento 0,9614 referente ao nível de aproximação utilizado neste trabalho, sabendo que a teoria do DFT prevê superestimativas nos valores de frequência das transições vibracionais<sup>71,72</sup>. Todo o estudo teórico foi conduzido com ferramentas do software Gaussian 03<sup>60</sup> e os arquivos de input, output e visualizadores foram executados no programa Gabedit 2.2.0<sup>61</sup>. Para os estudos de análise de decomposição de cargas, utilizou-se o software GaussSum 2.0<sup>73</sup>.

O estudo de dinâmica com a enzima AChE, iniciou-se com a edição da estrutura da enzima obtida pelo código pdb 1QTI<sup>74</sup>, para retirar as moléculas de água e o ligante galantamina da estrutura cristalográfica obtida. Foi então construído um modelo de caixa cúbica de 10,695 nm de aresta contendo 38145 moléculas de água, e 20 átomos de sódio para a neutralização do sistema. A simulação foi executada em 2 ns com integração de 0,002 ps. Neste estudo o software utilizado foi o GROMACS 4.3.1.<sup>75</sup>

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.Preparação dos Complexos Polipiridínicos de Ru(II)

A primeira síntese descrita neste trabalho envolve a coordenação de dois quelantes bidentados 1,10-fenantrolina bastante favorecida com a saída dos ligantes cloretos lábeis. Neste caso a adição de LiCl faz com que não ocorra a coordenação de três ligantes phen. A geometria *cis* é favorecida, uma vez que os ligantes cloreto ( doadores  $\pi$  ) estão em posição oposta trans ao N do ligante phen (receptor  $\pi^*$ ).

A síntese do complexo do intermediário  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{CO}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  leva, com maior facilidade, a formação do aqua complexo isolável, já que este é formado por um curto período de tempo em solução. Entretanto, raramente pode ser separado e, portanto, o ligante bidentado carbonato garante uma forma segura de isolar um bom intermediário de reação.

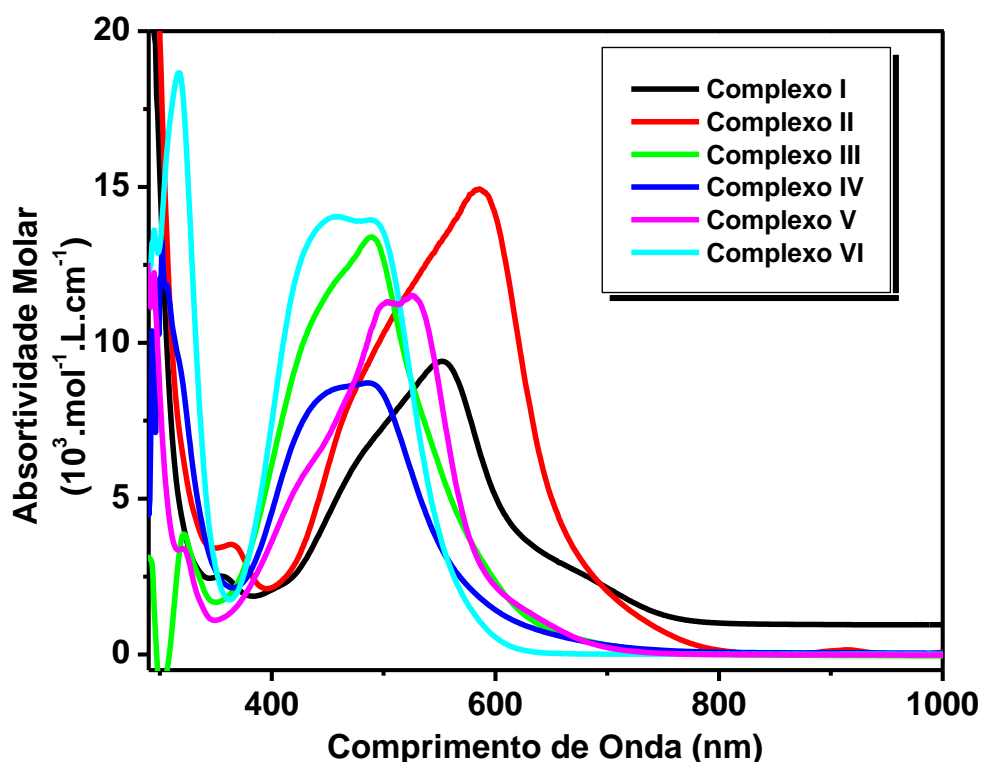
A etapa de síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$  é relativamente rápida devido à facilidade em retirar o ligante carbonato em meio ácido pela formação de água e dióxido de carbono garantindo assim, a entrada de dois ligantes aquo nos sítios de coordenação octaédrica do complexo de rutênio. Este complexo é bastante interessante para os fins deste trabalho, pois além de ser um dos produtos da fotólise em meio aquoso também é um bom precursor para a síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)(4\text{apy})](\text{PF}_6)_2$ , um segundo produto da fotólise contínua do complexo bis-piridínico. A viabilidade das sínteses dos complexos contendo um e dois ligantes 4apy segue a mesma lógica da primeira síntese. O ligante aquo (devido à sua alta estabilidade cinética, porém baixa estabilidade termodinâmica) facilita a troca com ligantes  $\pi^*$  receptores.

O complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$  foi obtido como síntese fotoquímica, por meio da irradiação do isômero *cis*, em meio aquoso. A forma *trans* possui baixa estabilidade em solução, por isso a síntese fotoquímica apresenta-se como uma das únicas alternativas para a obtenção deste complexo.

## 4.2. Espectros de Absorção na Região do UV-Vis

O princípio desta técnica consiste na interação da matéria (moléculas contidas na espécie da amostra) com a radiação eletromagnética na região de 190 a 1200 nm (com variações discretas de faixa de energia dependendo do equipamento utilizado) essa faixa de energia do espectro é responsável por promover transições eletrônicas de uma determinada espécie. Neste trabalho, os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos com o intuito de caracterizar os complexos obtidos e conhecer informações relacionadas às transições TCML (transferência de carga metal ligante), CM (centradas no metal) e TLL (Transferência de carga ligante/ligante). Essas transições são fundamentais para compreender propriedades reacionais e estruturais dos complexos de metais de transição<sup>63,64</sup>.

A **Figura 8** exibe os espectros de absorção na região do UV-Vis obtidos para os seis complexos em solvente N,N'-DMF (dimetil-formamida) sintetizados e estudados neste trabalho.



**Figura 8** Espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos de I a VI em N,N'-DMF; absortividade molar ( $10^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) eixo y em função do comprimento de onda (nm) eixo x.

A maior característica destes espectros de absorção é o alto coeficiente de absorvidade molar da banda TCML na região visível do espectro eletromagnético. Essa propriedade é consequência da transferência de carga do centro metálico de Ru(II)<sup>76,77</sup> para o sistema conjugado polipiridínico (predominantemente 1,10-fenantrolina) e, em termos de orbital, é uma transição  $nd \rightarrow \pi^*$ ; A grande mudança no momento de dipolo envolvido nessa transição explica o alto  $\epsilon$  para estes complexos. As transições  $d \rightarrow d$ , nestes compostos, raramente podem ser observadas pois a proximidade em energia das transições TCML acaba por sobrepor as transições centradas no metal que são todas proibidas por simetria. Na **Tabela 1** estão descritos os principais valores de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  e  $\epsilon$  para as principais transições dos espectros mostrados anteriormente.

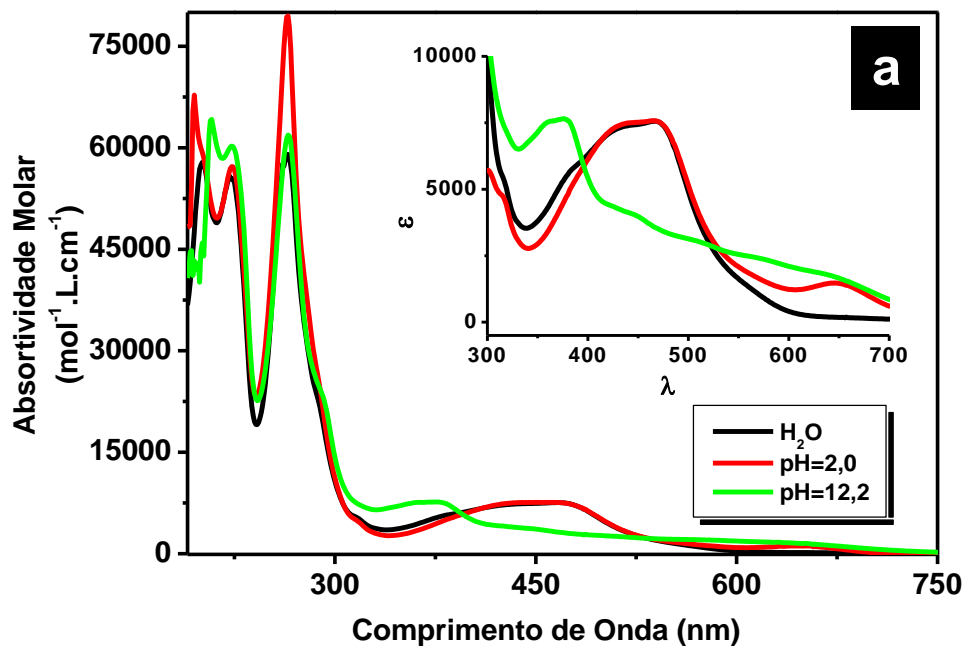
**Tabela 1** Valores de  $\lambda_{M\acute{A}X}$  (nm) e de  $\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) em N,N'-DMF, obtidos pelos espectros de absorção UV-Vis para os seis complexos em estudo.

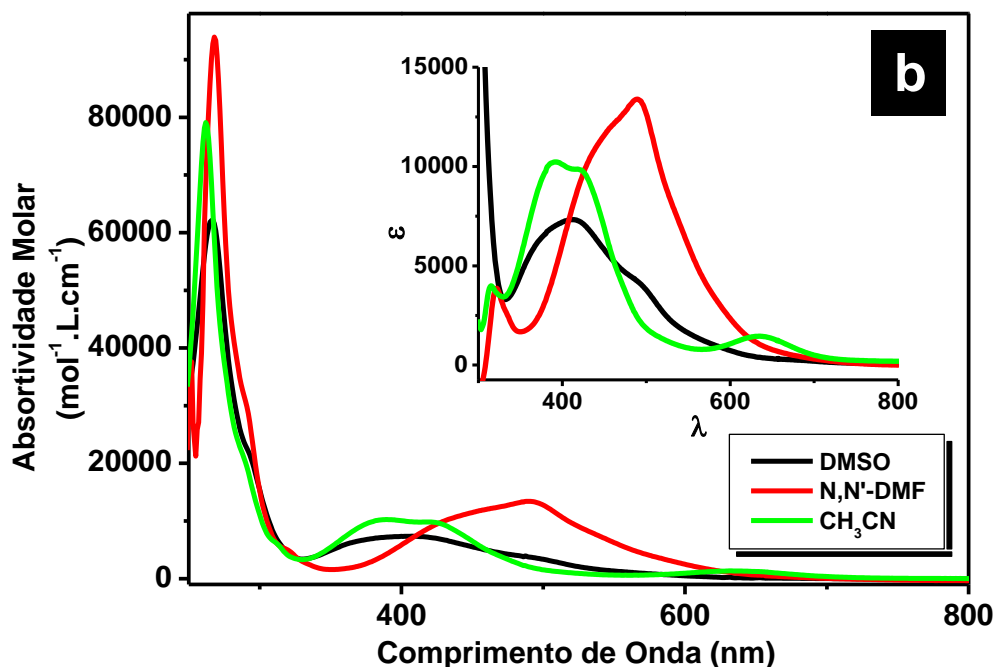
Complexo	Transição Ru( $d\pi \rightarrow \pi^*$ )	
	$\lambda_{M\acute{A}X}$	$\epsilon$
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].2H <sub>2</sub> O	552	9412
Ru(phen) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	586	14936
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ].(PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	489	13395
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> )(4apy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	486	8714
<i>trans</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	525	11527
<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	457	14048

Com base nos dados mostrados na **Tabela1**, a troca de ligantes de caráter predominantemente  $\pi$  doador para ligantes  $\sigma$  doador, favorece a ligação Ru-N(phen), como consequência ocorre o deslocamento da banda TCML para maiores valores de energia.

O complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>].(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> apresenta dois ligantes aquo altamente labéis, em solventes coordenantes como acetonitrila, DMSO, piridina e entre outros. Outra propriedade do aquacomplexo é a desprotonação do ligante aquo em meio básico para a formação do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)(OH)]<sup>+</sup>. O mesmo complexo na forma *cis* quando irradiado com  $\lambda \approx 450$  nm, ocorre a

isomerização, tendo como produto o complexo *trans* que retorna térmicamente a forma *cis*<sup>63,65</sup> em cerca de 8 horas em meio aquoso, e pouco menos de 2 horas em acetonitrila e DMF. Foram obtidos espectros de absorção na região do UV-Vis em CH<sub>3</sub>CN, N,N'-DMF, DMSO, tampão 0,1M Trisma pH=12,2; 2,0 e em água Milli-Q. A **Figura 9.a** mostra o espectro UV-Vis do aquacomplexo obtido em água, tampão trisma 0,1M pH=12,2 e pH=2,0, e na **Figura 9.b** os espectros obtidos em CH<sub>3</sub>CN, N,N'-DMF e DMSO.





**Figura 9** Em **9.a** complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>].(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em água, tampão trisma 0,1M pH=12,2; pH=2,0. Em **9.b** espectros UV-Vis em acetonitrila, dimetil-sulfóxido e dimetil-formamida.

O complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)(4apy)].(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> também possui um ligante lábil em sua estrutura, no entanto devido a presença do ligante 4-aminopiridina, a labilidade do ligante aquo só ocorre diante de ligantes básicos como acetonitrila, piridina e outros.

### 4.3. Espectros de Absorção no Infravermelho

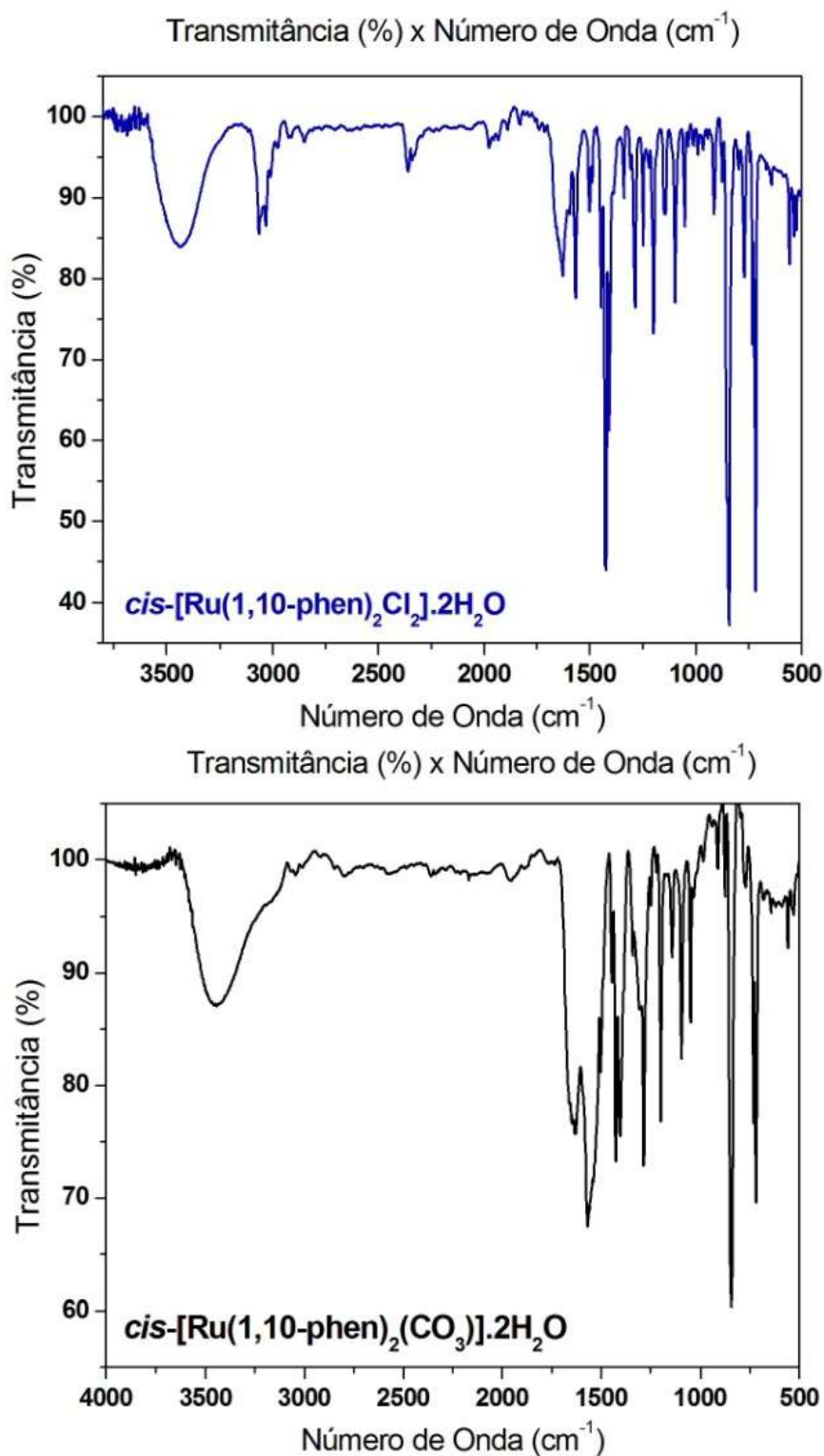
Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentam uma série de informações importantes a respeito de um sistema com base nos movimentos vibracionais com mudança de dipolo associada<sup>78,79,80</sup>. Em complexos de metais de transição existem duas diferentes classes de transições vibracionais<sup>80,81</sup>, uma associada aos movimentos vibracionais dos ligantes, e a segunda classe

relativa as transições por simetria que dependem diretamente do número de átomos e do grupo pontual em que está contido a molécula.

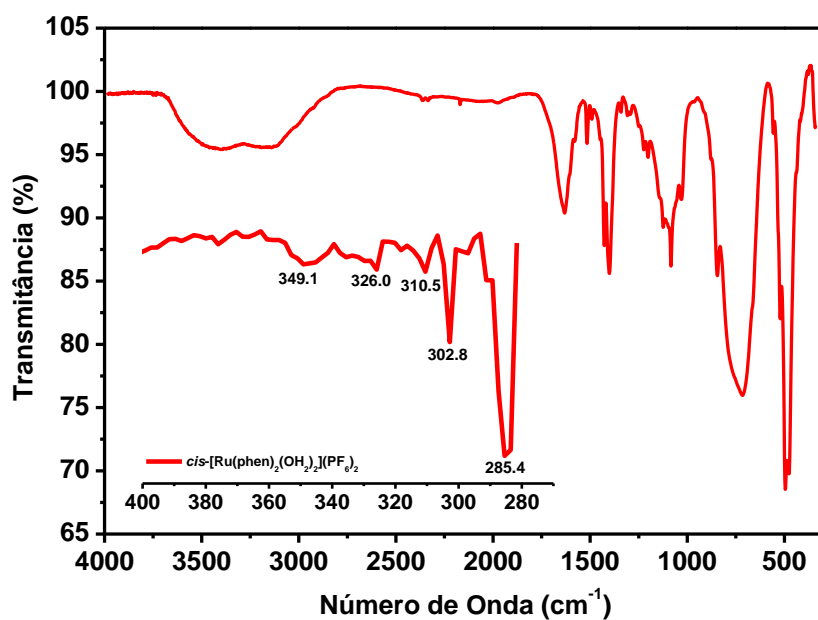
Os compostos estudados neste trabalho são todos de geometria octaédrica distorcida devido à assimetria na disposição dos ligantes. A análise feita foi com base no deslocamento e na localização das bandas de estiramento simétrico, assimétrico e de deformação angular para os ligantes, além das bandas relacionadas aos estiramentos simétrico e assimétrico entre os átomos de Ru e os átomos de nitrogênio e oxigênio dos ligantes aquo e 4-aminopiridina.

A **Figura 10** mostra os espectros de absorção no infravermelho (em pastilhas de KBr) obtidos para os complexos I e II.

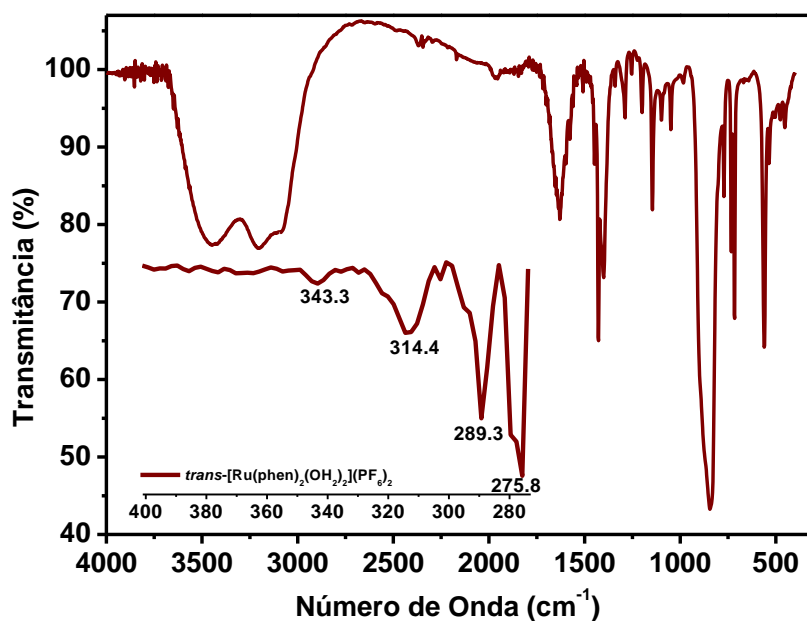




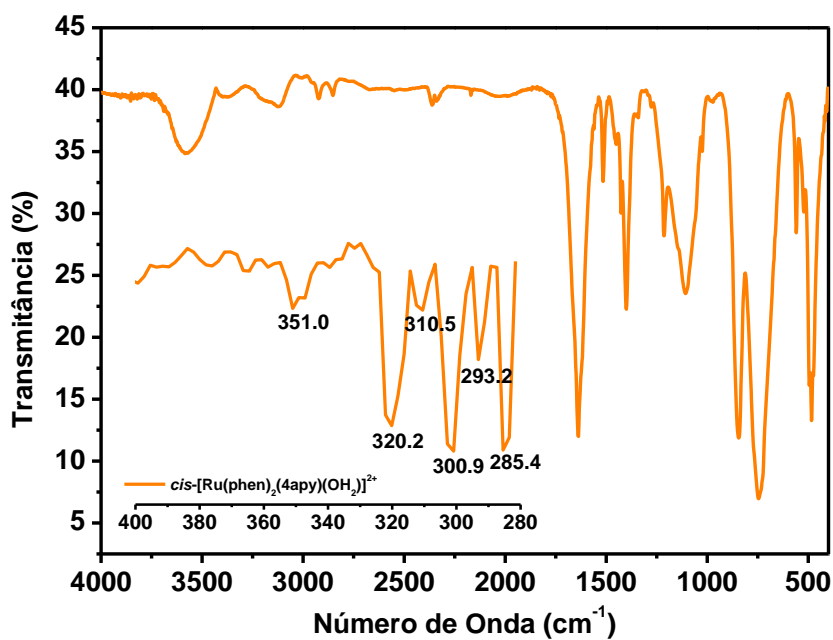
**Figura 10** Espectros de absorção no infravermelho para os complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{CO}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  obtidos em pastilhas de KBr.



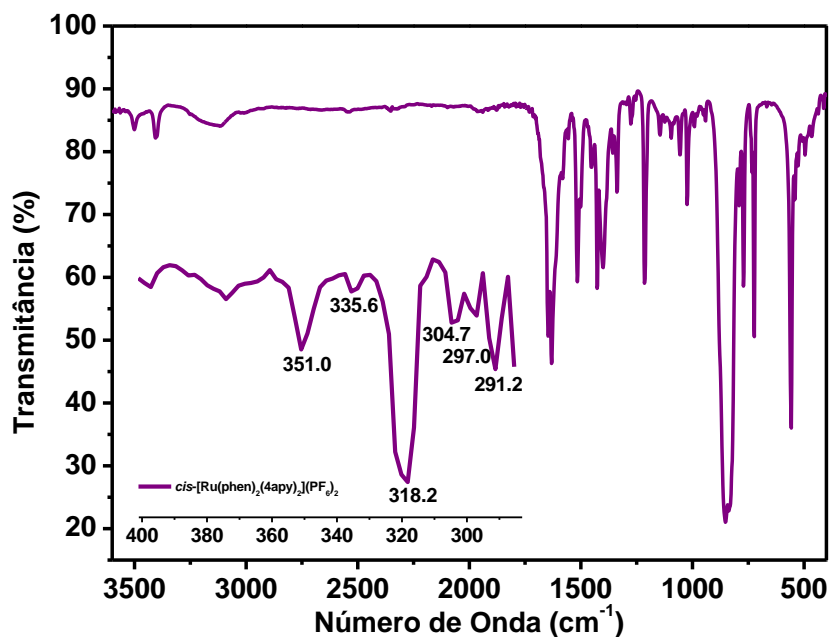
**Figura 11** Espectro de absorção no infravermelho do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em pastilhas de KBr.



**Figura 12** Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> em pastilhas de KBr.



**Figura 13** Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(OH_2)(4apy)](PF_6)_2$  obtido em pastilha de KBr.



**Figura 14** Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2](PF_6)_2$  obtido em pastilha de KBr.

O espectro de absorção na região do infravermelho do *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O mostra as bandas referentes a água de hidratação da molécula ~ 3500cm<sup>-1</sup>, assim como, para as outras moléculas hidratadas ou com o ligante aquo diretamente ligado no metal Nesse caso, aparece sinal de impurezas muito provavelmente do solvente de síntese N,N'-DMF, comprovado pelo sinal próximo de 3000 cm<sup>-1</sup> para o estiramento simétrico e assimétrico C<sub>sp3</sub>-H das metilas. As bandas com sinal mais pronunciado na região de 1500 cm<sup>-1</sup> são referentes aos estiramento C<sub>sp2</sub>=C<sub>sp2</sub> da fenantrolina e esses sinais também estão presentes nas demais estruturas.

Para o composto *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>].2H<sub>2</sub>O, aparecem duas bandas entre 1550~1750 cm<sup>-1</sup> para o estiramento da carbonila no ligante bidentado carbonato. Esse sinal é bastante característico e mostra um deslocamento significativo (~100 cm<sup>-1</sup>) com relação ao ligante carbonato livre<sup>63</sup>.

Todos os outros complexos exibem características semelhantes quanto às transições vibracionais mais pronunciadas em ~870 cm<sup>-1</sup> onde o estiramento assimétrico do contra-íon PF<sub>6</sub><sup>-1</sup> está presente em ambos os compostos. O sinal sobreposto dos estiramentos simétrico e assimétrico aparece nos dois casos contendo o ligante aquo e no complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. Na região de 3400-3300 cm<sup>-1</sup>, duas bandas de estiramento simétrico e assimétrico estão presentes da ligação N-H do grupo amino ligado ao anel piridínico. Nesse caso, não é observado deslocamento significativo devido à grande distância (4 ligações) entre o ponto de coordenação e o amino substituído.

Os sinais que aparecem abaixo de 400 cm<sup>-1</sup> serão discutidos posteriormente, uma vez que, para a análise e interpretação destes dados, utilizou-se os dados de infravermelho teórico obtidos pelos estudos teóricos envolvidos no trabalho.

#### 4.4.Comportamento Eletroquímico

Os estudos eletroquímicos efetuados neste trabalho foram baseados em medidas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. Todos os seis complexos foram caracterizados com base nos valores de E<sub>1/2</sub>, E<sub>ox</sub>, E<sub>red</sub> obtidos e

comparados com o referencial extraído da literatura, além da análise do perfil voltamétrico de cada um dos complexos.

A **Tabela 2** contém os valores de  $E_{ox}$  e  $E_{red}$  (mV) de todos os sinais obtidos, referêntes aos complexos formados em solução de acetonitrila (devido a lãbilidade do ligante aquo).

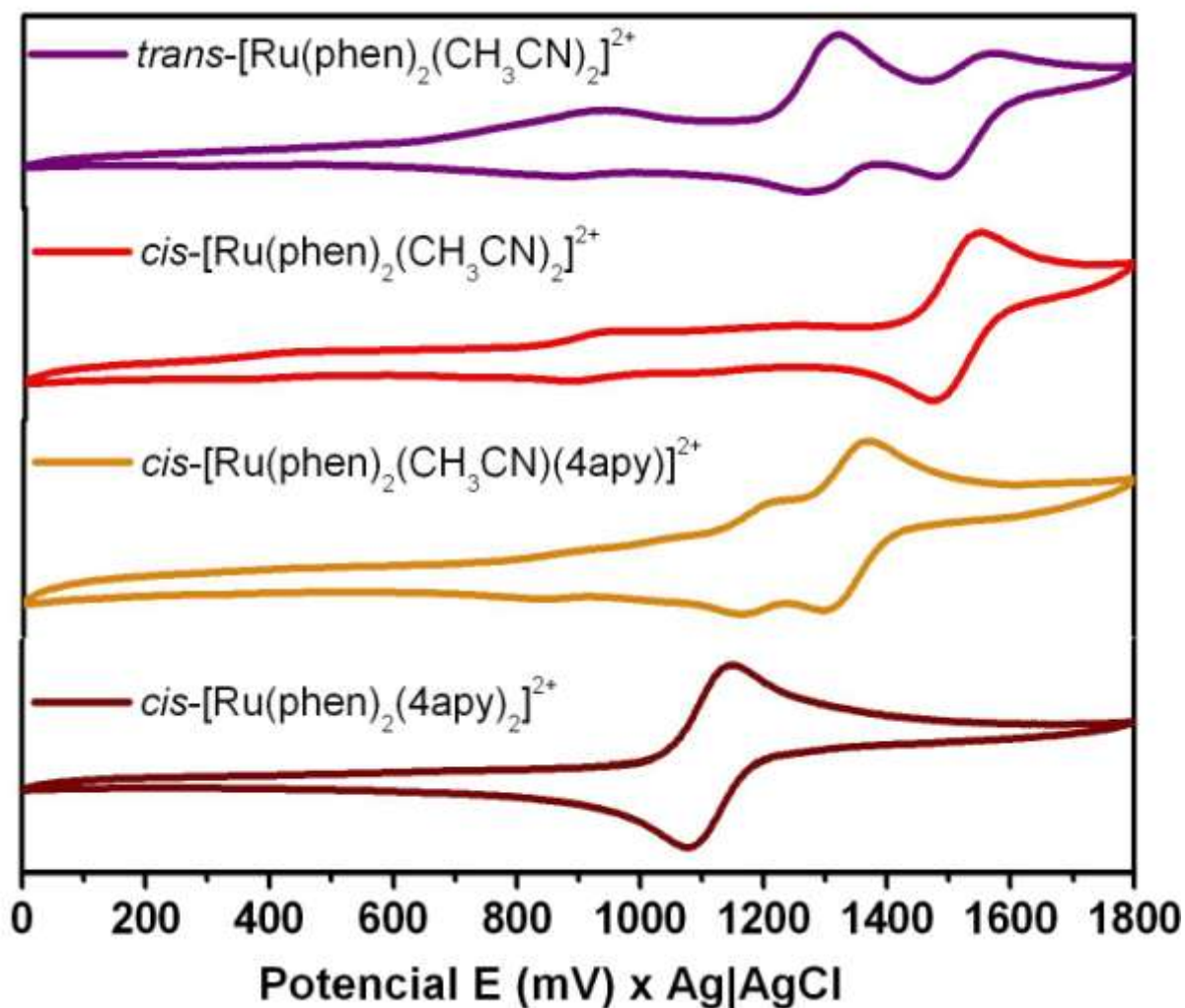
**Tabela 2** Valores de  $E_{ox}$  e  $E_{red}$  (mV) para os complexos de III à VI em solução de acetonitrila e 0,1 M de TBAPF<sub>6</sub>.

Complexo	Espécies em Solução	$E_{ox}$	$E_{red}$
Complexo V	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CNCH <sub>3</sub> )(OH <sub>2</sub> )] <sup>2+</sup>	942	859
	<i>trans</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CNCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	1319	1272
	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CNCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	1569	1482
Complexo III	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CNCH <sub>3</sub> )(OH <sub>2</sub> )] <sup>2+</sup>	976	886
	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CNCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	1555	1477
Complexo IV	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy)(OH <sub>2</sub> )] <sup>2+</sup>	1221	1165
	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CNCH <sub>3</sub> )(4apy)] <sup>2+</sup>	1367	1296
Complexo VI	<i>cis</i> -[Ru(phen) <sub>2</sub> (4apy) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	1147	1078

A **Figura 15** exibe os voltamogramas cíclicos determinados para complexos de III a VI, obtidos no intervalo de 0 a 1800 mV (eletrodo de referência de Ag|AgCl), com velocidade de varredura de 150 mV.s<sup>-1</sup>. O solvente utilizado foi CH<sub>3</sub>CN e o eletrólito de suporte o sal hexafluorofosfato de tetrabutilamônio.

Dentre as quatro estruturas mostradas o complexo com dois ligantes 4-aminopiridina, apresenta o mais baixo, e reversível par redox, essa propriedade é consequência direta dos efeitos retirador e doador dos ligantes piridínicos, para os outros 3 casos, em solução, ambos apresentam mais que um par redox, devido a substituição parcial dos ligantes aquo por moléculas de solvente CH<sub>3</sub>CN. A medida que aumenta a substituição, ocorre um ganho significativo em potencial efeito retirador de elétrons altamente pronunciado no ligante acetonitrila, torna mais difícil a abstração de um elétron do centro metálico de rutênio, e consequentemente o aumento do potencial redox. Com a evolução do tempo, os complexos *trans* e *cis*-

$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  tornam-se totalmente substituídos, e o voltamograma destes complexos apresentaria o mesmo perfil, relativo ao composto *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CNCH}_3)_2]^{2+}$ .



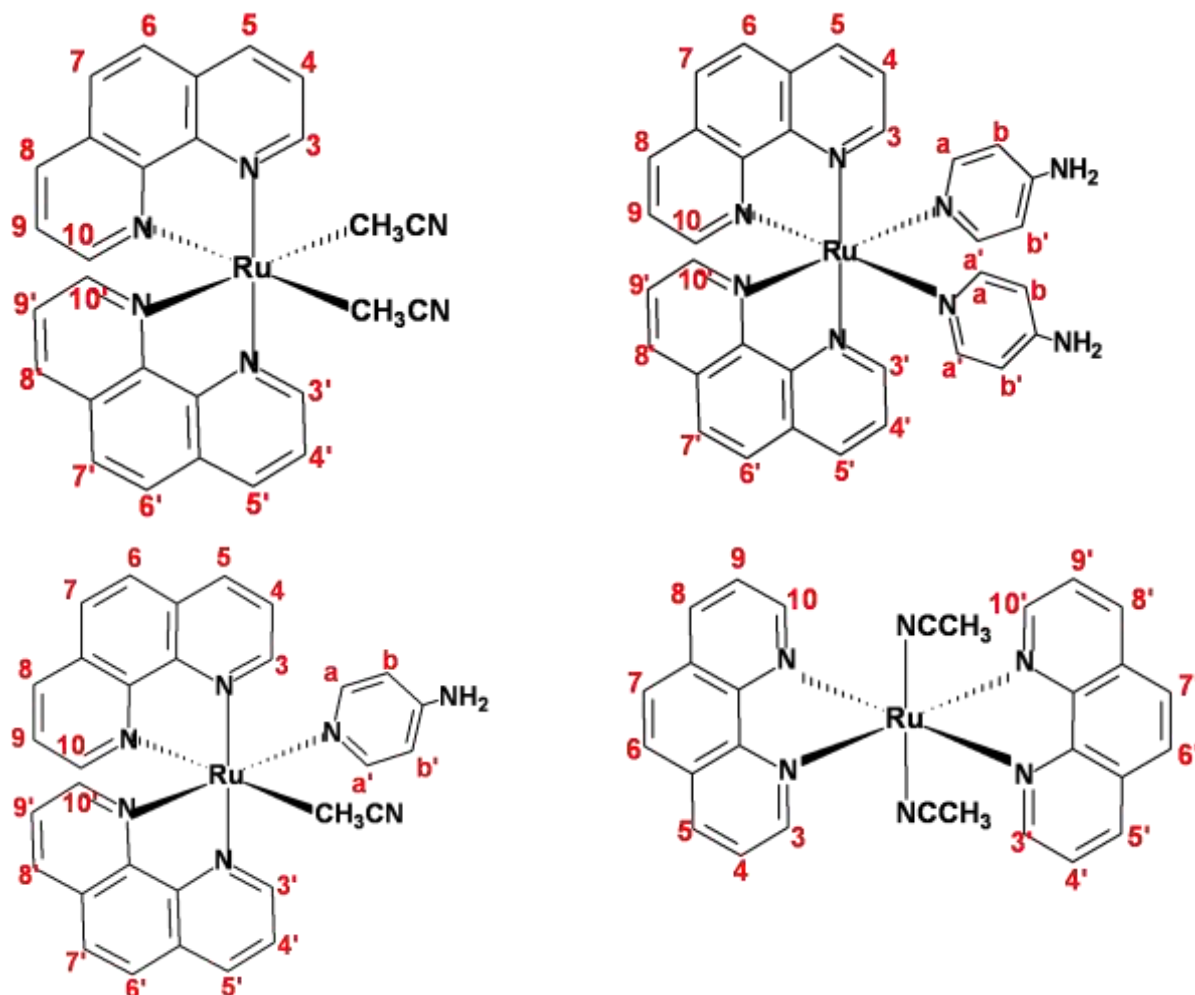
**Figura 15** Voltamograma cíclico obtido para os complexos de III a VI, com intervalo de potencial de 0-1800mV (referência Ag|AgCl), velocidade de varredura de  $150 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e eletrólito de suporte  $\text{TBAPF}_6$ .

Como observado na **Figura 15**, a remoção de um elétron do orbital  $d\pi$  do Ru(II) para gerar Ru(III) é influenciado pela natureza do ligante. Uma vez que a densidade eletrônica localizada sobre o metal está diretamente relacionada as propriedade  $\sigma$  e  $\pi$  doadora e receptora de elétrons dos ligantes coordenados, a natureza dos ligantes coordenados afeta os potenciais Ru(II/III)<sup>76,77</sup>. Para ligantes da

mesma série, a presença de substituintes retiradores de elétrons aumenta o potencial de oxidação enquanto o oposto ocorre para substituintes doadores de elétrons<sup>82</sup>. Desta forma a substituição dos íons cloretos, que são ligantes doadores  $\pi$  de elétrons pelos ligantes aminopiridínicos, promovem uma diminuição na densidade eletrônica sobre o centro metálico, com conseqüente deslocamento do potencial do Ru para regiões mais anódicas. Nos voltamogramas cíclicos também estão presentes varias reduções que ocorrem a potenciais negativos e todas são centradas no ligante fenantrolina (**Figura 15**).

#### 4.5.RMN-<sup>1</sup>H

Neste trabalho, os estudos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) foram usados com ferramenta para auxiliar na elucidação estrutural dos complexos, e como técnica para acompanhamento dos estudos fotoquímicos. Neste tópico segue descrito os espectros de RMN de <sup>1</sup>H para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)(4apy)]<sup>2+</sup> que são as principais estruturas envolvidas no processo de fotólise contínua no processo terapêutico, alvo do trabalho, neste tópico também está descrito a elucidação por espectro de RMN-<sup>1</sup>H do complexo *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> produto da fotoisomerização do aquocomplexo. Na descrição a seguir os valores de deslocamento químico, acoplamento assim como os espectros de RMN são referentes aos complexos com o ligante acetonitrila substituído, devido a alta labilidade dos ligantes aquo neste meio. Para facilitar a visualização, a **Figura 16** apresenta as estruturas dos complexos que estão com os valores de deslocamento químico descritos na **Tabela 3** e **Tabela 4**.



**Figura 16** Estrutura com hidrogênios enumerados referentes aos valores da Tabela 3 e Tabela 4 para os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  e  $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$ .

**Tabela 3** Valores de deslocamento químico  $\delta$  (ppm), acoplamento (Hz) e multiplicidade para os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$  e  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ .

H	$cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$	$cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$
	$\delta$ , ppm (multiplicidade; J, Hz)	$\delta$ , ppm, (multiplicidade; J, Hz)
3,3'	9,73 (d; 5,1)	9,35 (dd; 5,4; 1,1)
4,4'	8,22 (dd; 8,4; 5,2)	8,09 (dd; 8,4; 5,2)
5,5'	8,87 (d; 8,4)	8,67 (dd; 8,4; 1,1)
6,6'	8,30 (d; 8,9)	8,15 (d; 8,9)
7,7'	8,17 (d; 8,9)	8,05 (d; 8,9)
8,8'	8,45 (d, 8,4)	8,32 (dd; 8,4; 1,1)
9,9'	7,43 (dd; 8,4; 5,2)	7,42 (dd; 8,4; 5,2)



10,10'	7,77 (d; 5,1)	7,97 (dd; 5,4; 1,1)
$\alpha, \alpha'$	-	7,77 (dd; 5,4; 1,1)
$\beta, \beta'$	-	6,34 (dd; 5,4; 1,1)

**Tabela 4** Valores de deslocamento químico  $\delta$  (ppm), acoplamento (Hz) e multiplicidade para os complexos  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)(4apy)]<sup>2+</sup> e  $trans$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

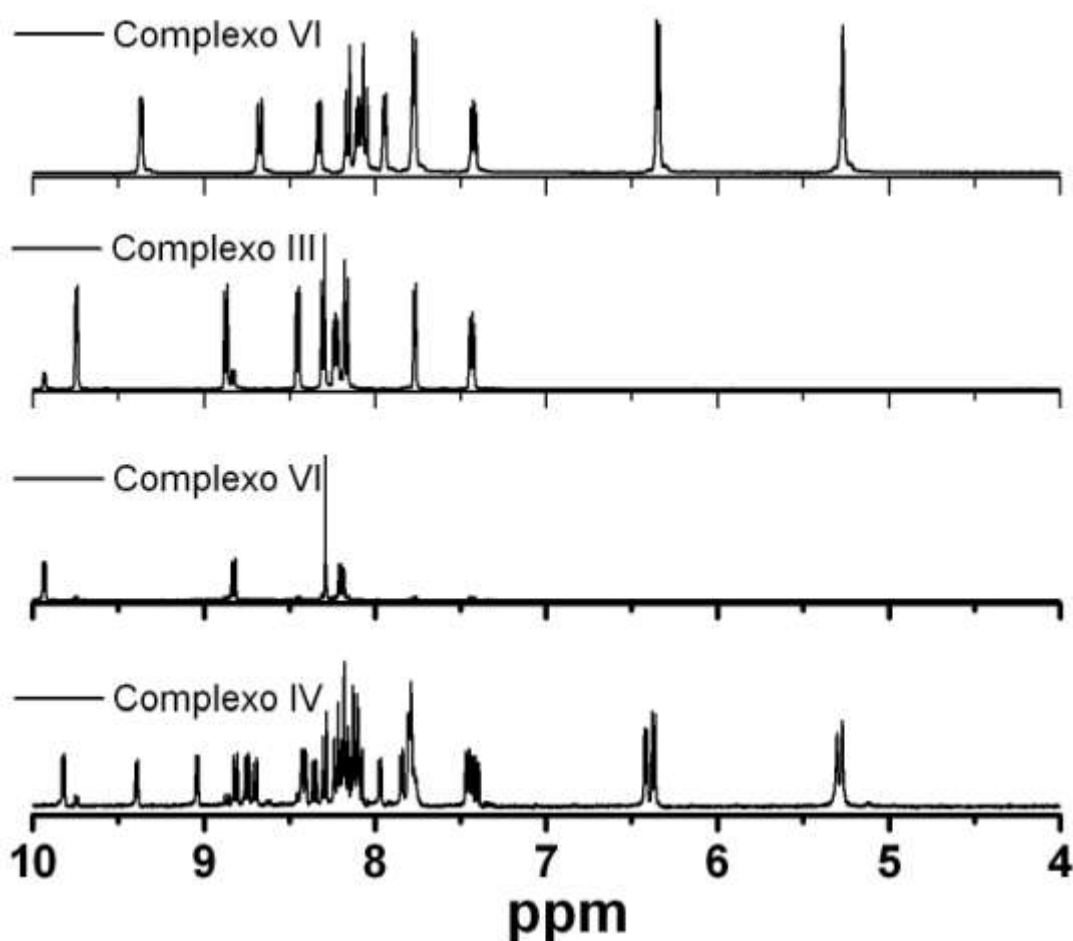
H	$cis$ -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN)(4apy)] <sup>2+</sup> $\delta$ , ppm (multiplicidade)	H	$trans$ -[Ru(phen) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> $\delta$ , ppm, (multiplicidade; J, Hz)
3,3'	9,82 (d)	3,10'	9,94 (d; 1,2)
4,4'	8,36 (dd)	3',10	8,92 (d; 1,2)
5,5'	9,04 (d)	4,4'	8,19 (dd; 5,5; 3,0)
6,6'	8,43 (d)	9,9'	8,19 (dd; 5,5; 3,0)
7,7'	8,30 (d)	5,8'	8,83 (d; 1)
8,8'	8,71 (d)	5',8	8,31 (d; 1)
9,9'	7,47 (dd)	6,6'	8,29 (s)
10,10'	7,85 (d)	7,7'	8,29 (s)
$\alpha, \alpha'$	6,42 (dd)	-	-
$\beta, \beta'$	5,34 (dd)	-	-

Comparando-se os dois complexos  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, podemos observar que a presença de um ligante básico como a 4-apy, desloca os sinais referentes aos prótons do ligante phen para regiões com menor deslocamento químico no espectro de <sup>1</sup>H. Com isso o centro metálico requer uma menor contribuição eletrônica do ligante phen no caso do complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, fazendo com que o ligante phen permaneça com uma maior densidade eletrônica e por isso mais blindado.

Outra constatação é a geometria  $cis$  para os complexos III, IV e VI. Como o ligante phen é simétrico, seria esperada a presença de quatro sinais referentes aos oito prótons de cada anel, como ocorre para a molécula  $trans$ . Pois na geometria  $trans$  tem-se apenas N(phen)  $trans$  N(phen) com distorção não pronunciada que altera a integração dos sinais. No entanto a geometria  $cis$  faz com que se tenha N(phen)  $trans$  N(phen) e N(phen)  $trans$  N(4-apy/CH<sub>3</sub>CN). Essa diferença do ligante que está  $trans$  ao N(phen), faz com que a molécula perca sua simetria e dá origem a oito sinais distintos (H<sub>3</sub>-H<sub>10</sub>) referentes aos oito hidrogênios de

cada phen. Devido a rápida interconversão do complexo *trans* em *cis*, o espectro de RMN-<sup>1</sup>H do complexo *trans* exibe sinais de baixa intensidade referentes aos hidrogênios do isômero que é formado em solução.

O complexo IV apresenta o maior número de sinais no espectro devido a formação em equilíbrio de duas diferentes estruturas *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(CH<sub>3</sub>CN)]<sup>2+</sup> e *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> resultando a não identificação dos valores de acoplamento, a maior basicidade do ligante acetonitrila com relação ao ligante aquo, provocou o deslocamento dos valores de deslocamento químico para região de maior blindagem, com uma diferença média de 0,2 ppm para cada um dos sinais de hidrogênio.



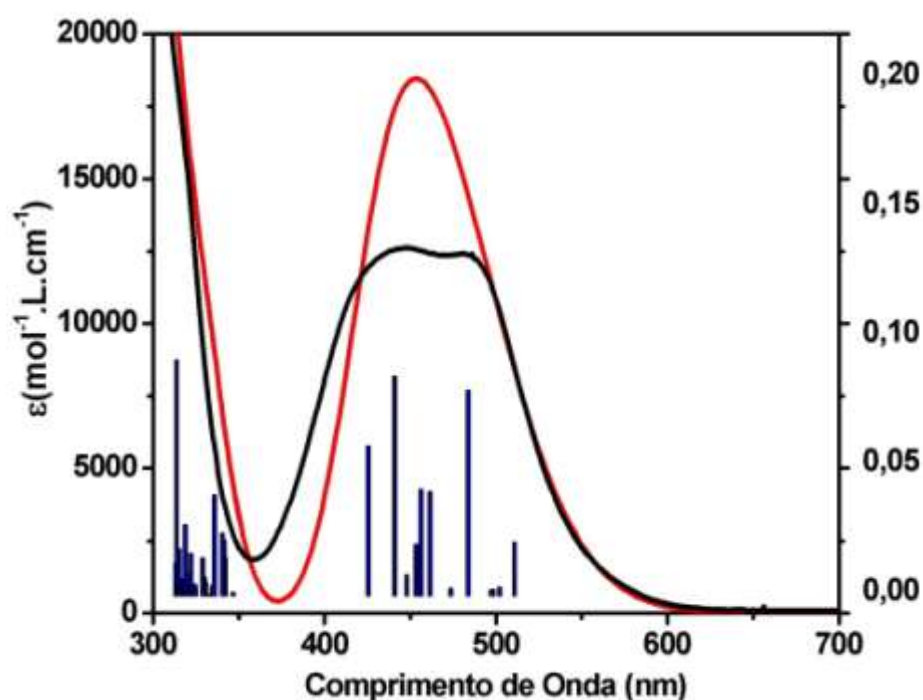
**Figura 17** RMN de <sup>1</sup>H para os complexos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)(4apy)]<sup>2+</sup> e *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em CD<sub>3</sub>CN.

## 4.6. Análise dos Estudos Teóricos

### 4.6.1. Avaliação do Mecanismo da Reação Fotoquímica

Para os estudos de avaliação do mecanismo de reação fotoquímica, foram calculados estados singletos e tripletos do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, implementando o modelo PCM para solventes, e neste caso foi escolhido o solvente acetonitrila. Todos os cálculos de tripleto foram estudados pelo método não restrito UB3LYP\LanL2DZ, e também pelo método multiconfiguracional TD-DFT, em que também foi obtido o espectro eletrônico (**Figura 18**).

Para a elucidação da estrutura eletrônica do estado tripleto do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, efetuou-se a análise da densidade de spin sobre os fragmentos da molécula (centro metálico de Ru (II), 1,10-fenantrolina e 4apy), para o estado TCML<sup>3</sup> e o estado fundamental, assim como, a análise da carga de Mülliken. Essa comparação está descrita na **Tabela 5**.



**Figura 18** Comparação entre os espectros eletrônico do complexo VI teórico obtido pelo método TD-DFT UB3LYP\LanL2DZ (linha vermelha) e experimental (linha preta).

**Tabela 5** Valores de ordem de ligação, cargas de Mülliken e de densidade de spin para o complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ , no estado fundamental e no estado excitado TCML<sup>3</sup> (obtidos por UB3LYP/LanL2DZ).

Ordem de Ligação, cargas de Mülliken, e Densidade de Spin para o estado fundamental e o primeiro estado tripleto excitado						
Espécie	Ordem de Ligação			Carga MPA (Spin)		
	Ru-N(4apy)	N(phen)-Ru-N(phen)	N(phen)-Ru-N(4apy)	Ru	Phen/	4apy
Estado Fundamental	0,932	1,224	0,294	0,90	0,48	0,62
TCML <sup>3</sup>	0,496 $\alpha$ 0,573 $\beta$	0,653 $\alpha$ 0,742 $\beta$	0,157 $\alpha$ 0,169 $\beta$	0,98 (0,87)	0,67 (1,09)	0,34 (0,05)

Segundo os dados da **Tabela 5** foi observado que os valores de ordem de ligação apresentaram uma redução significativa entre os dois estados. Todas as ligações mostradas na tabela acima apresentaram uma fragilização quando o primeiro estado excitado tripleto é populado, e com relação a carga parcial, o centro metálico de rutênio sofre um acréscimo ao mesmo tempo que o ligante 4apy apresenta um decréscimo de 50% com relação a carga pontual, isso indica a formação de um estado dissociativo, envolvendo o átomo de Ru(II) e o ligante piridínico, como consequência o desdobramento da densidade de Spin, localizada sobre os dois grupos.

O espectro de absorção eletrônica no estado fundamental, teórico e experimental obtidos para o complexo VI, ambos em CH<sub>3</sub>CN, são bastante concordantes, viabilizando a análise teórica deste complexo que esta descrita a seguir. Para analisar a fotossustituição das duas 4apy, foram otimizadas a geometria dos complexos  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  e  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(CH_3CN)]^{2+}$  no estado excitado singleto e realizado o cálculo para restrito TD/DFT considerando o solvente CH<sub>3</sub>CN para 20 estados excitados tripleto, **Figura 19**.

As variações na estrutura dos ligantes polipiridínicos pela introdução de grupos  $\sigma$ -doadores e/ou  $\pi$ -receptores são estratégias geralmente usadas para sintonizar as propriedades fotoquímicas e/ou fotofísicas de complexos de Ru(II)<sup>82,83</sup>. Estas modificações são realizadas de forma a se obter um complexo com propriedades particulares.

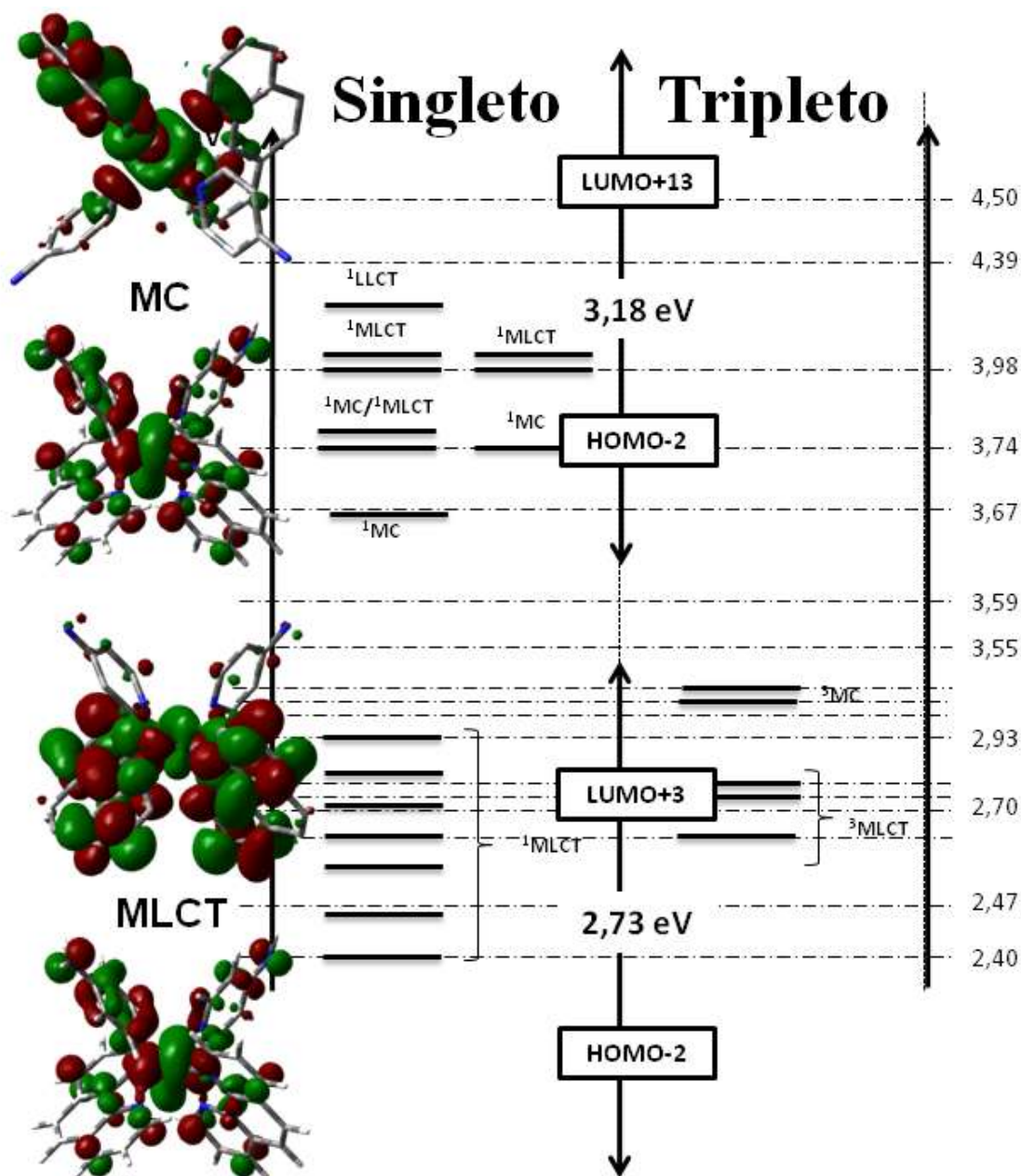
Neste trabalho esta estratégia foi empregada com sucesso. Isto pode ser notado quando comparamos as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  reativo fotoquimicamente e luminescente,

desenvolvidos em nosso laboratório, e o complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  o qual é considerado um padrão fotoquímico pela sua inércia quanto a reatividade fotoquímica e luminescência intensa proveniente da população significativa (100%) dos estados excitados  $^3\text{TCML}$ .

As propriedades  $\sigma$ -doadoras/ $\pi$ -receptoras dos ligantes phen (pKa 4,68) e 4apy (pka 9,4) quando comparadas as propriedades  $\sigma$ -doadoras/ $\pi$ -receptoras do ligante bipyridina (bpy, pKa 3,5) no complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  desestabilizam os estados excitados de  $^3\text{CM}$  levando a uma diferença de energia entre os estados  $^3\text{TCML}/^3\text{CM}$  de apenas 0,45 eV. Desta maneira, os estados emissivos de  $^3\text{TCML}$  podem ser facilmente populados a partir dos estados excitados de  $^1\text{TCML}$  e os estados excitados dissociativos  $^3\text{CM}$  responsáveis pela fotodissociação da 4apy podem ser competitivamente e termicamente ativados a partir do cruzamento dos estados excitados de  $^3\text{TCML}$  para os estados excitados centrados no metal  $^3\text{CM}$ .

A energia calculada para os estados excitados  $^3\text{CM}$  do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  (3,18 eV) e as energias dos estados excitados  $^3\text{CM}$  calculadas para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$  (3,21 eV) são muito próximas favorecendo a dissociação da segunda molécula de 4apy consistente com as observações experimentais.

As transições obtidas a partir do cálculo do espectro eletrônico teórico mostram que no estado fundamental, a separação entre as transições CMLT e CM é bastante aparente, porém quando levada ao estado tripleto, essa separação praticamente inexistente, e então, os estados TCML e CM podem ser igualmente populados, sendo que o estado CM apresenta como contribuição dos ligantes 4apy, uma interação  $\sigma^*$  que contribui para o déficit na ordem de ligação entre Ru-N(4apy), e assim em um processo dinâmico, ocorra a fotólise desse ligante. A **Figura 18** apresenta o diagrama simplificado com as principais transições para os estados singleto e tripleto do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ , assim como a superfície de contorno (isovalor=0,02), dos orbitais moleculares envolvidos nessas transições.



**Figura 19** Diagrama de energias simplificado e superfícies de contorno para os estados tripleto e singleto do complexo  $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

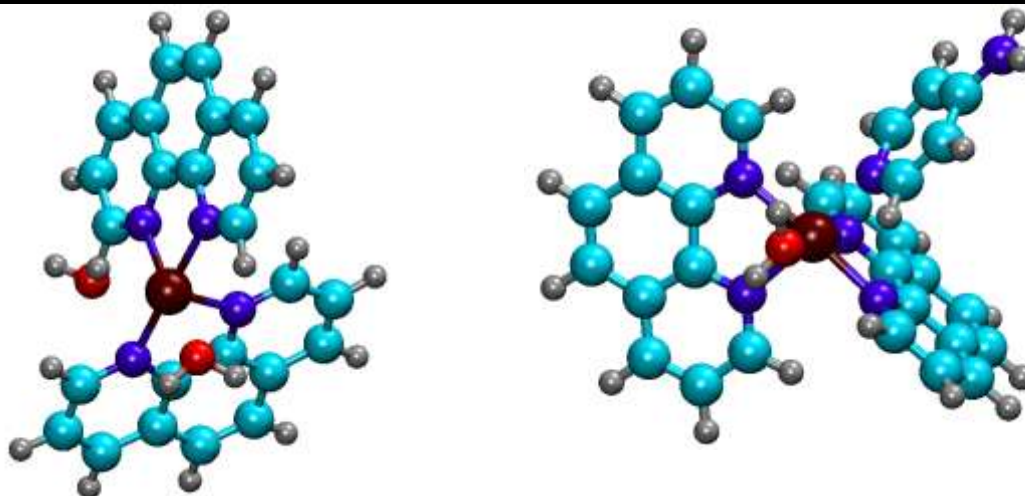
#### 4.6.2. Cálculos Computacionais Realizados para os Fotoprodutos

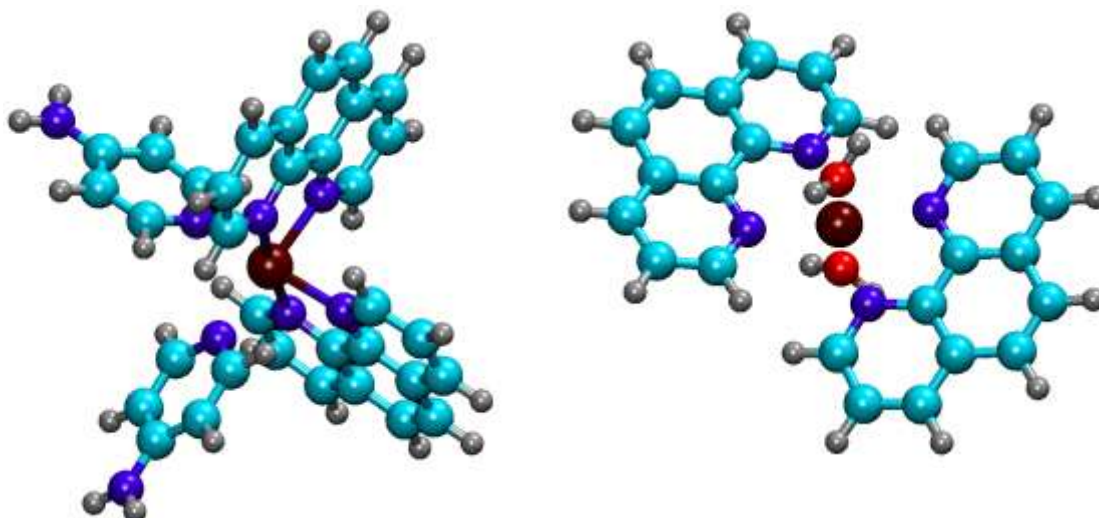
O foco dos estudos teóricos deste trabalho foram dedicados aos 4 complexos já mencionados ( $cis$ -[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>) e seus derivados da fotólise contínua em meio aquoso (monoaqua, bisaqua *cis* e *trans*), com o objetivo de poder compreender melhor as atividades fotoquímicas e fotofísicas deste sistema, e

também para o uso nos estudos de dinâmica com a enzima AChE. Inicialmente todas as estruturas foram otimizadas segundo o nível de aproximação UB3LYP/LanL2DZ sem quaisquer consideração de simetria e nenhum modelo de aproximação para solvente. Em seguida, as moléculas otimizadas foram refinadas utilizando um método mais robusto a fim de se obter um melhor detalhamento da estrutura eletrônica dos compostos. Para tal, utilizou-se o funcional RB3PW91 com o conjunto de pseudopotenciais DGDZVP.

Para todas as etapas do estudo teórico utilizou-se o software Gaussian 03 em plataforma Linux, para efetuar os cálculos computacionais. Como visualizador e renderizador de superfícies de contorno e estruturas 3D, foi utilizado o software Gabedit 2.2.0.

Foram obtidos também a distribuição de carga parcial por NBO (Normal Bonding Orbital) e os dados de população atômica NPA para os três complexos. A **Figura 20** mostra a estrutura 3D otimizada para as 3 moléculas *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (**complexo III**), *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup> (**complexo IV**), *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (**complexo VI**) e *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (**complexo V**).





**Figura 20** Estrutura 3D otimizada para as 3 moléculas  $cis\text{-[Ru(phen)}_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  (complexo III),  $cis\text{-[Ru(phen)}_2(4\text{apy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (complexo IV),  $cis\text{-[Ru(phen)}_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  (complexo VI) e  $trans\text{-[Ru(phen)}_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  (complexo V).

Na **Tabelas 6** estão descritos os valores de contribuição orbital de cada fragmento destes complexos para os orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas (CM, TCML) para os complexos de III à VI em nossos estudos.

**Tabela 6** Valores de contribuição orbital de cada fragmento destes complexos para os orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas (CM, TCML) para os complexos de III à VI em nossos estudos.

OM	Complexo												
	Complexo III			Complexo IV				Complexo V			Complexo VI		
	Ru	phen	H <sub>2</sub> O	Ru	phen	H <sub>2</sub> O	4apy	Ru	phen	H <sub>2</sub> O	Ru	phen	4apy
H-2	78	21	1	80	18	2	0	85	100	0	83	13	4
H-1	77	21	2	79	19	0	2	57	97	3	62	10	39
H	67	31	2	49	13	0	39	80	95	4	53	14	32
L	4	96	0	3	96	0	1	2	0	95	3	97	0
L+1	6	93	1	6	93	0	1	5	95	0	6	93	1
L+2	1	99	0	1	98	0	1	1	99	0	1	98	1
L+3	0	100	0	0	100	0	0	-	-	-	0	100	0

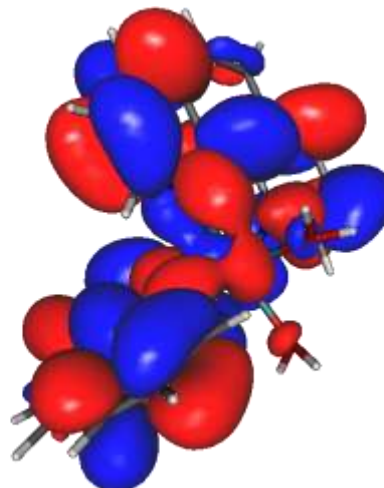
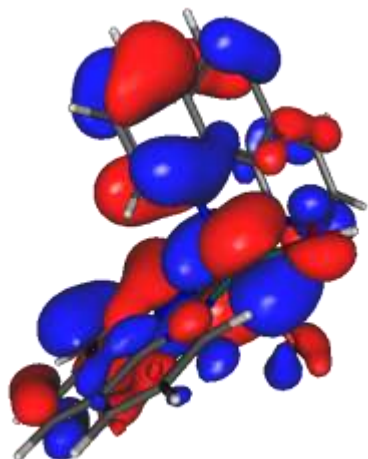


L+4	20	78	2	1	94	0	5	74	5	20	1	96	3
L+5	50	40	10	10	84	2	4	3	97	0	4	80	16
L+7	66	20	14	-	-	-	-	66	34	0	-	-	-
L+8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L10	72	0	38	3	95	0	2	84	0	16	-	-	-
L11	-	-	-	65	27	0	8	-	-	-	-	-	-
L12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66	28	6
L13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72	17	18

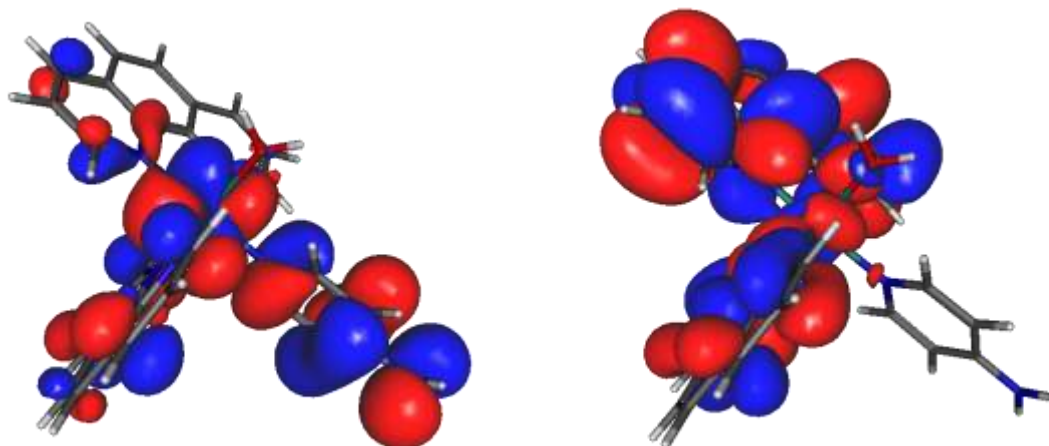
Na **Figura 21**, estão apresentadas as superfícies de contorno dos orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO), referente aos complexos de **III** a **VI**. Na figura a superfície azul referente  $\psi^+$  e superfície vermelha para  $\psi^-$  com um isovalor de 0.015.

HOMO

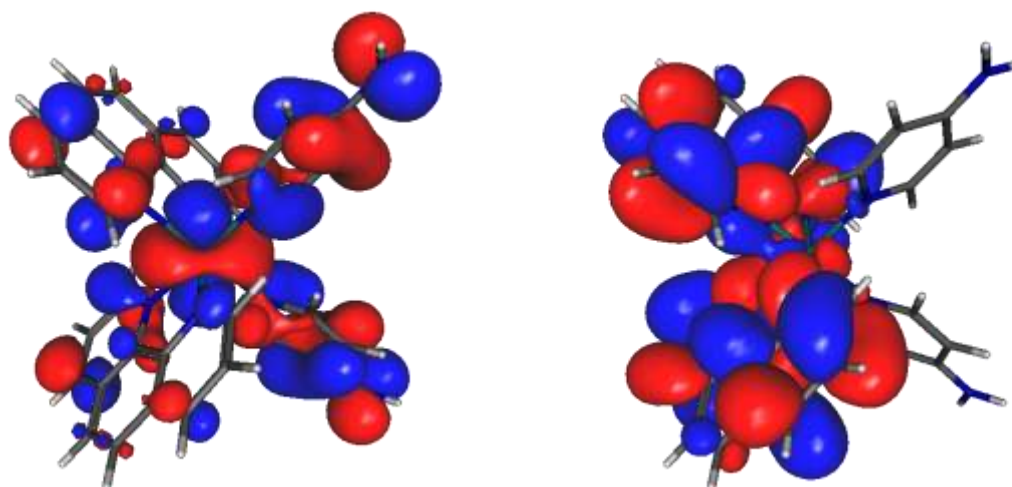
LUMO



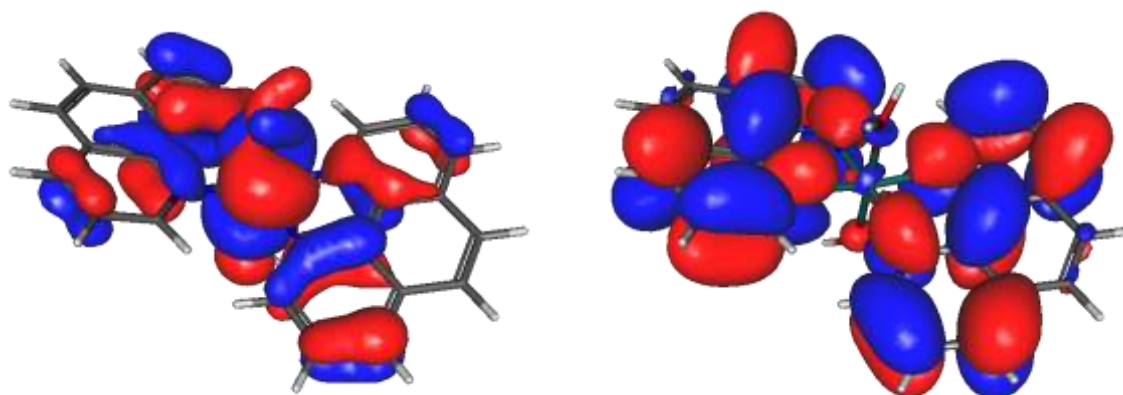
*cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>



*cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)(4apy)]<sup>2+</sup>



*cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>



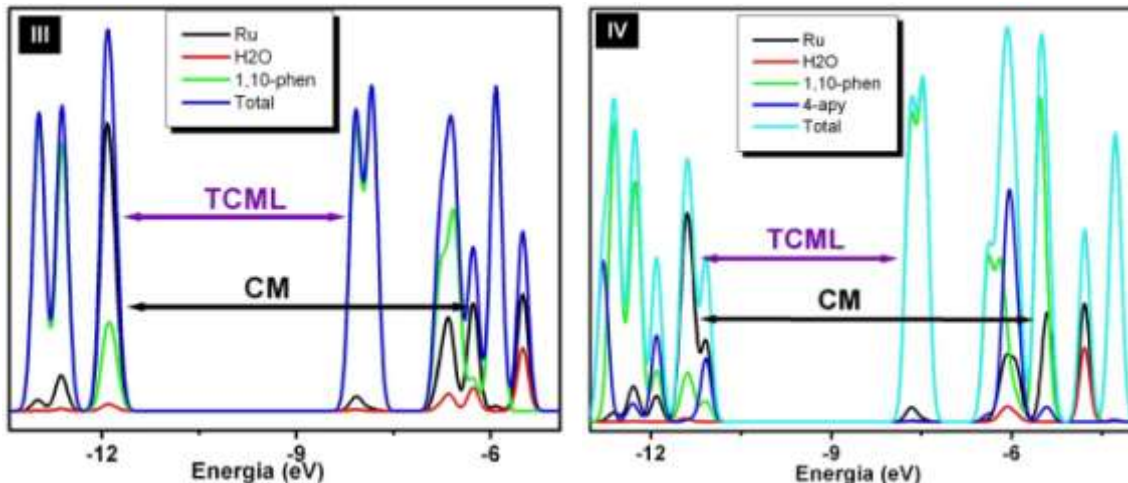
*trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>

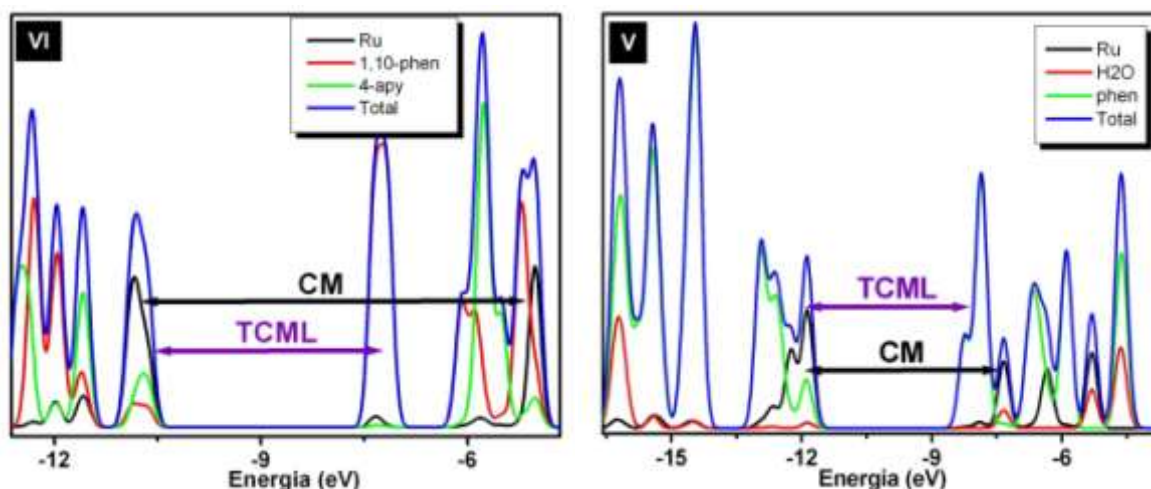
---

**Figura 21** Superfícies de contorno dos 4 complexos estudados no sistema fotoquímico de interesse

Uma característica importante deste sistema fotoquímico, que é explicado pela análise de composição orbital, é a localização das transições eletrônicas no diagrama de energia e conseqüentemente, a atividade fotoquímica das espécies envolvidas. Os orbitais de fronteira, e os orbitais mais próximos em termos energéticos (HOMO-2 até o LUMO+5) são os orbitais em que se localizam as transições TCML destes complexos, devido à maior contribuição orbital do centro metálico de rutênio nos orbitais moleculares preenchidos, e o caráter predominante dos ligantes 1,10-fenantrolina nos orbitais moleculares não preenchidos. Com esse mesmo patamar energético também podem ocorrer transições do tipo **d-d** centradas no metal (HOMO-2; HOMO-1)  $\rightarrow$  (LUMO+7, LUMO+10), ao mesmo tempo essas transições **d-d** são seguidas de uma população de estado em orbitais moleculares que envolvem uma contribuição significativa de orbitais  $\sigma^*$ , ocorre então um decaimento vibracional de estiramento das ligações Ru-N(anel piridinico) levando a quebra da ligação.

Na **Figura 22** estão representados os gráficos de distribuição orbital em função da energia dos orbitais moleculares para cada um dos complexos de III à VI, em destaque as regiões envolvidas nas transições TCML, CM e TCLL.





**Figura 22** Gráficos de distribuição orbital em função da energia dos orbitais moleculares para cada um dos complexos de III à VI, em destaque as regiões envolvidas nas transições TCML, CM e TCLL.

#### 4.6.2. Análise NBO.

A análise de carga parcial por NBO pode fornecer uma série de informações indiretas, tais como, efeito dos orbitais moleculares das ligações químicas sobre as espécies<sup>82,83</sup> e a ordem de ligação.

Os dados mostrados na **Tabela 7**, mostram que a substituição da 4apy pela água na esfera de coordenação do centro metálico de Ru(II) diminui a carga positiva sobre o metal e como consequência ocorre a diminuição do caráter iônico das ligações Ru-L, (L = H<sub>2</sub>O e 4apy).

A pequena diferença de cargas entre os átomos do grupo amino, ligado aos anéis piridínicos nos complexos III e VI, indicam que a coordenação de um ou dois ligantes ao Ru(II), na posição *cis*, altera significativamente a acidez dos grupos NH<sub>2</sub>.

No complexo IV, o átomo de nitrogênio do ligante fenantrolina adjacente ao ligante aquo está com uma carga parcial mais negativa que o mesmo átomo adjacente ao ligante 4apy. Essa assimetria tem implicação direta nos espectros de infravermelho e UV-Vis onde a variação do momento de dipolo das transições determina se uma transição pode ou não ocorrer.

**Tabela 7** Dados de carga parcial por NBO para alguns átomos de interesse dos complexos III à VI.

Átomo	Complexo			
	Complexo III	Complexo IV	Complexo VI	Complexo V
Ru	0,899	0,842	0,783	0.904
N(phen)-t(OH <sub>2</sub> ) <sup>Γ</sup>	-0,481/-0.476	-0,463		-0.512
N(phen)-t(4apy) <sup>**</sup>		-0,504	-0.481	-0.511
N(phen)-t(phen)	-0,528	-0,517	-0,494	-0.517
N(phen)-t(phen)*	-0,513	-0,495	-0,494	-0.524
O (aquo)	-0,948	-0,946		-0.929
H (aquo)	0,536	0,535		-0.540
N(apy)-(Ru)		-0,536	-0,562	
N (NH <sub>2</sub> )		-0,799	-0,796	
H (NH <sub>2</sub> )		0,429	0,422	

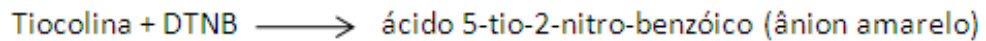
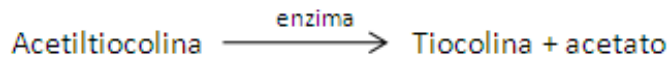
\* 'phen' adjacente ao ligante aquo para o complexo IV, \*\* no caso do complexo V, refere-se ao N(phen)-tN(phen).

#### 4.7. Experimentos de Inibição Enzimática (AChE)

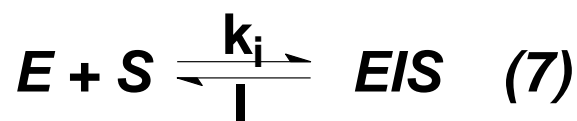
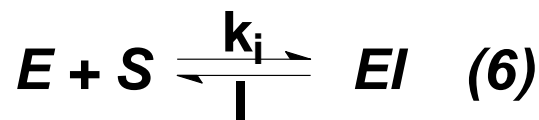
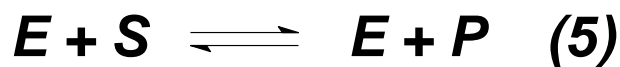
Nossos estudos de inibição da enzima AChE pelo complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e seus fotoprodutos *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em meio fisiológico tem como interesse a obtenção de compostos que sejam inibidores seletivos desta enzima para o tratamento da MA, porém evitando os efeitos colaterais indesejáveis do fármaco comercialmente já estabelecido Tacrinal<sup>®</sup>. Esse fármaco foi um dos primeiros inibidores da enzima AChE disponibilizados comercialmente, mas apresenta uma série de efeitos colaterais e, em muitos países, já foi proibido.

Por este motivo, usamos nos nossos experimentos, para efeitos de comparação, como um inibidor padrão comercial, a Tacrina (hidroclorato de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina), que é o princípio ativo do fármaco comercial Tacrinal<sup>®</sup>. Os experimentos de inibição enzimática foram baseados no método de Ellman<sup>58</sup> descrito para absorção UV-vis usando acetilcolina como substrato. Neste método a atividade enzimática é medida pelo aumento da absorção a 412 nm produzida pela

formação do ânion amarelo quando a tiocolina presente no meio reacional reage com o DTNB ( $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$ )<sup>42</sup>, equações 3 e 4.



Para o estudo inibitório da reação de hidrólise enzimática mostrada acima, considerando o uso de um inibidor reversível, este pode atuar de duas formas diferentes, inibição competitiva e não competitiva (sendo que para muitas espécies inibidoras, as duas formas ocorrem concomitantemente). As reações hipotéticas envolvidas são mostradas na equação 5, 6 e 7.

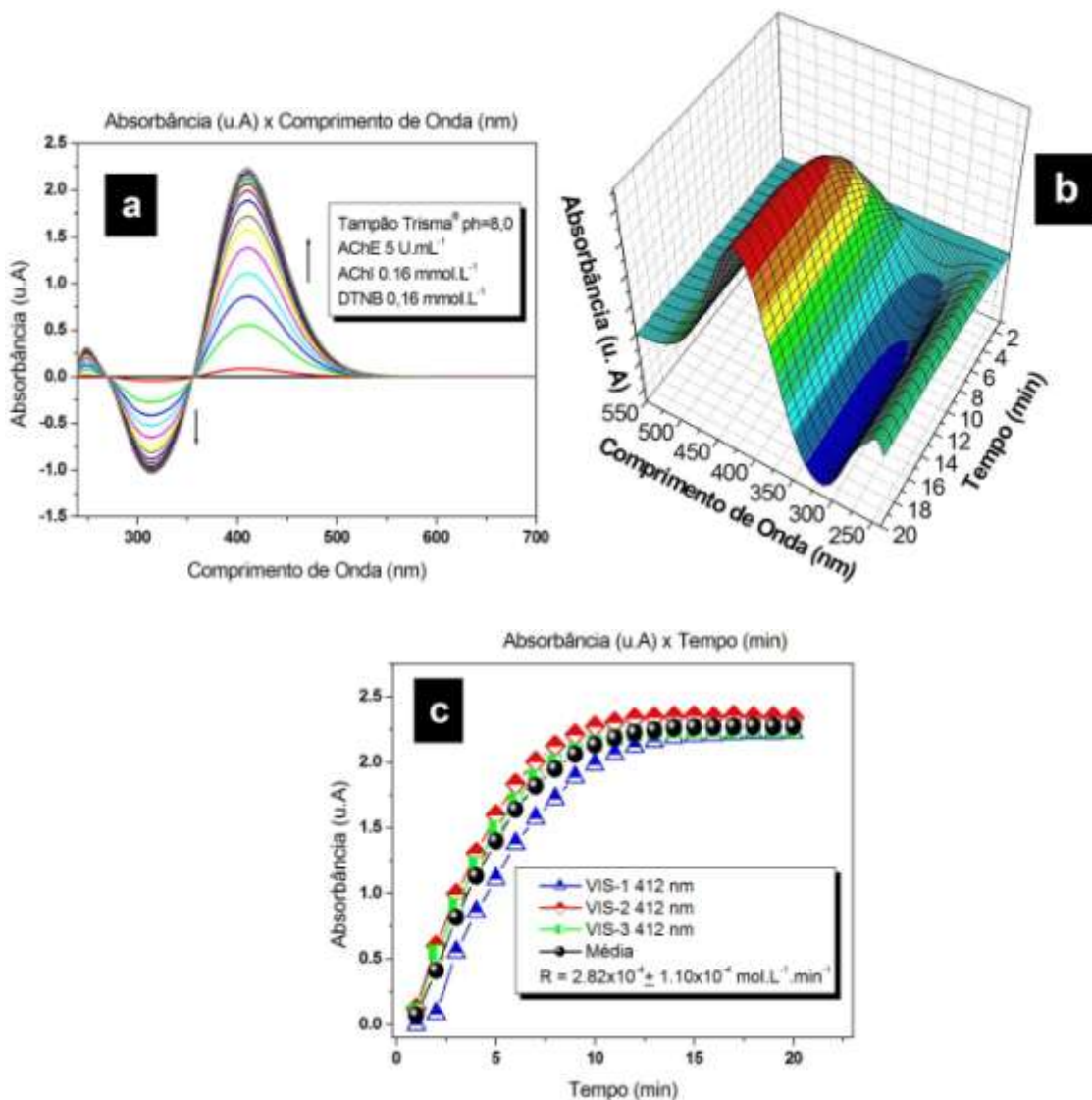


Neste esquema o complexo inicialmente formado enzima-substrato (ES) pode produzir um intermediário enzima-acila (EA) com uma constante de velocidade  $k_2$ . O inibidor (I) pode ligar-se a enzima livre E ou a EA com constantes de equilíbrio  $K_I$ , os valores para cada constante são crescentes ou decrescentes conforme o inibidor, e a forma de interação deste com a enzima.

Na **Figura 23.a** todos os espectros foram obtidos para a curva padrão, livre de inibidor, e a **Figura 23.b** apresenta a curva 3D dos mesmos espectros. A **Figura 23.c** mostra o gráfico com o perfil obtido da variação da absorvância em função do tempo para o comprimento de onda de 412 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  do indicador dissociado).

Os experimentos de inibição enzimática estudados até o momento foram baseados no método de Ellman adaptado. Um modelo simples das reações

envolvidas nesse método foi descrito na **Figura 23**, em que descreve as duas etapas: hidrólise enzimática e simples dissociação. Na **Figura 23.a** todos os espectros foram obtidos para a curva padrão livre de inibidor, a **23.b** apresenta a curva 3D dos mesmos espectros e a **23.c** o gráfico com o perfil obtido da variação da absorbância em função do tempo para o comprimento de onda de 412 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  do indicador dissociado).



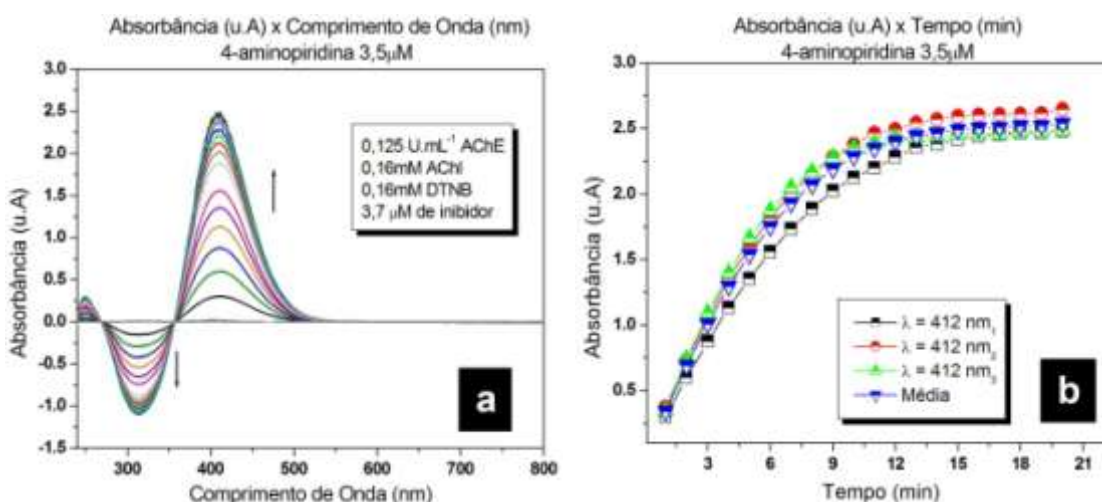
**Figura 23** espectros individuais, 23.b projeção em 3D e c gráfico em função do tempo para  $\lambda=412$  nm.

A projeção em 3D mostrado em **23.b** mostra o decréscimo da banda em 315 nm na medida em que ocorre o aumento da banda em 412 nm. Esse efeito é consequência do consumo parcial da solução contendo ao mesmo tempo o substrato e o indicador, nesse caso, em 315 nm é a banda em que absorve o

indicador não dissociado DTNB. Na **Figura 23.c**, estão plotadas 4 diferentes curvas sobrepostas, sendo que cada curva corresponde a uma réplica do experimento e a curva média obtida a partir da triplicata.

Com a curva padrão efetuou-se, em seguida, vários experimentos onde foi avaliado o potencial inibidor dos complexos envolvidos no trabalho, dos ligantes livres, todos comparados com relação ao inibidor padrão Tacrina. A concentração utilizada para cada experimento foi de  $3,7 \mu\text{M}$  que, como será mostrado nos próximos tópicos, corresponde à uma atividade enzimática próxima de 20% e representa o triplo do valor de  $\text{IC}_{50}$  para  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o padrão de inibição para cada um dos experimentos foi avaliado a partir da curva média.

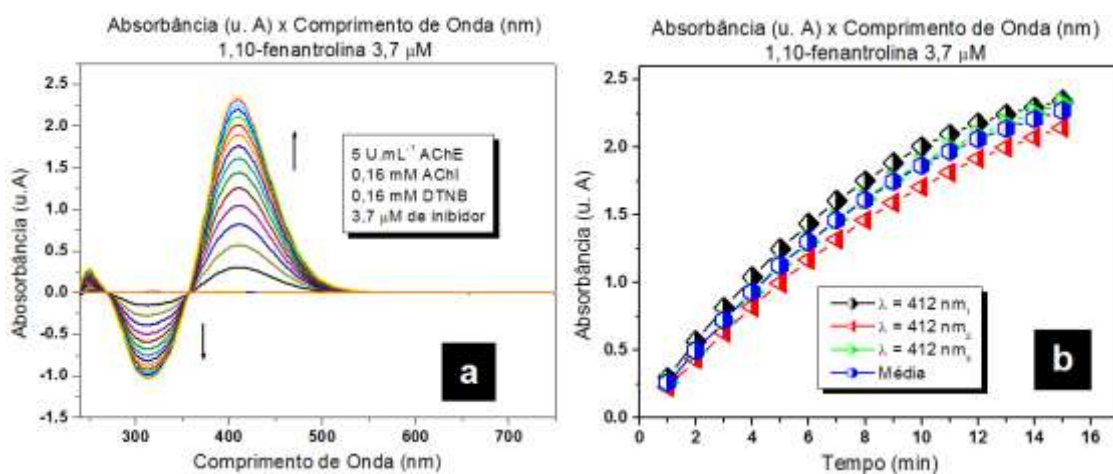
Nas **Figuras 24.a e 24.b**, estão representados os gráficos obtidos dos espectros contínuos e a curva média em função do tempo para o ligante livre 4-aminopiridina.



**Figura 24** Em **24.a** todos os espectros medidos com  $3,7 \mu\text{M}$  de 4apy e em **24.b** a curva média em função do tempo.

As **Figuras 25.a e 25.b** apresentam os gráficos para o mesmo experimento com teste de protótipo inibidor para o ligante 1,10-fenantrolina.

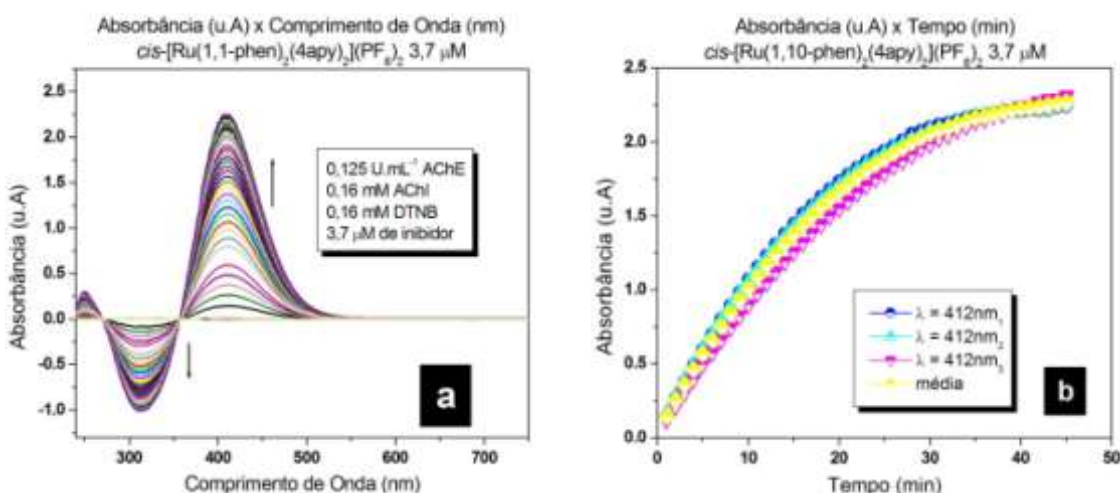




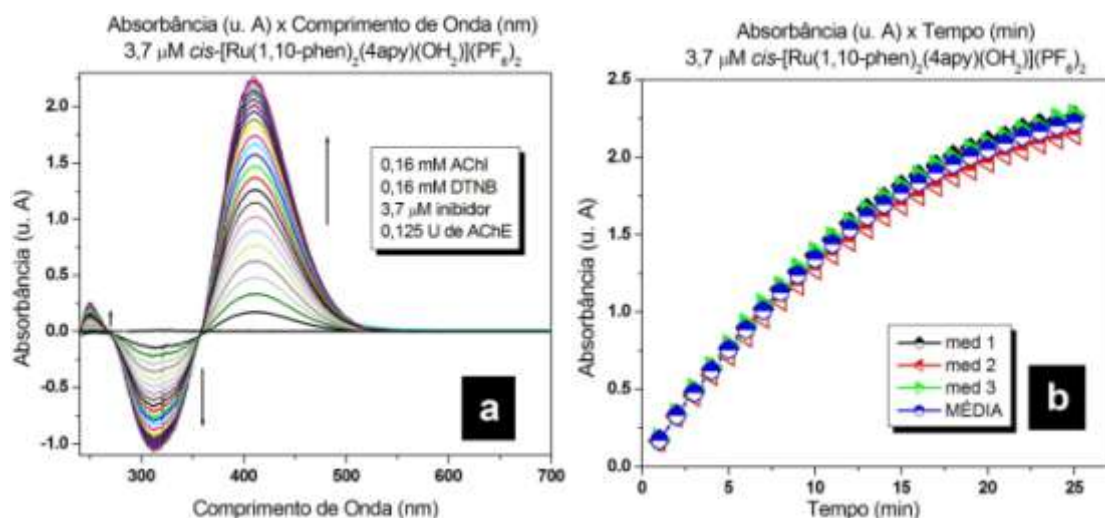
**Figura 25** Espectros contínuos em **25.a**, e curva média e triplicata em função do tempo em **25.b**.

As próximas **Figuras 26, 27, 28 e 29** referem-se aos mesmos experimentos, agora para os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ ,  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  e  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  respectivamente.

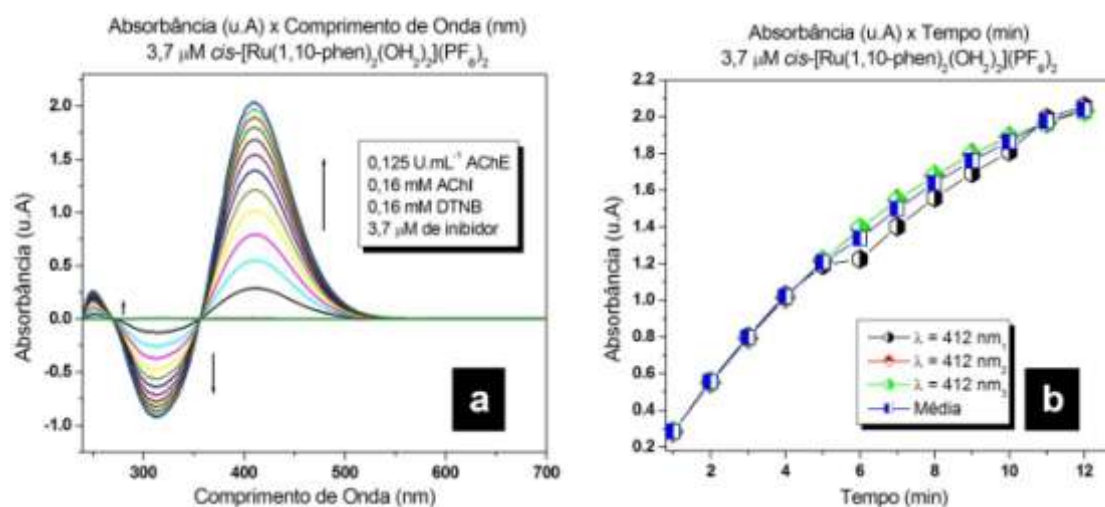
A fim de avaliar os efeitos dos substituintes ligados diretamente ao ligante fenantrolina, efetuou-se experimentos com o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{Cl-phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  para avaliar o efeito do substituinte Cl no ligante phen sobre a atividade inibidora enzimática da AChE. A fenantrolina substituída com um Cl apresenta um pka (3,73) mais ácido do que o fenantrolina não substituída, pka (4,68). A **Figura 29** contém os dois gráficos para esse complexo, seguindo a mesma metodologia usada nos compostos anteriores.



**Figura 26** Espectros contínuos em **26.a** e curva média em função do tempo para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  em **26.b**.

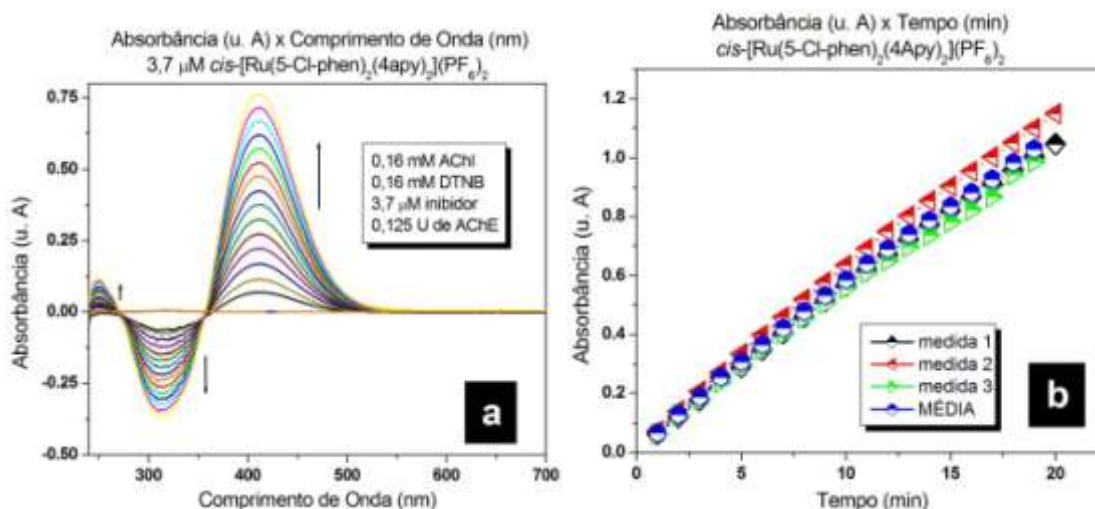


**Figura 27** Espectros contínuos para o teste de inibição com o complexo  $\text{cis-[Ru(phen)}_2(4\text{apy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  em **27.a**, medidas em função do tempo, e curva média em **27.b**.



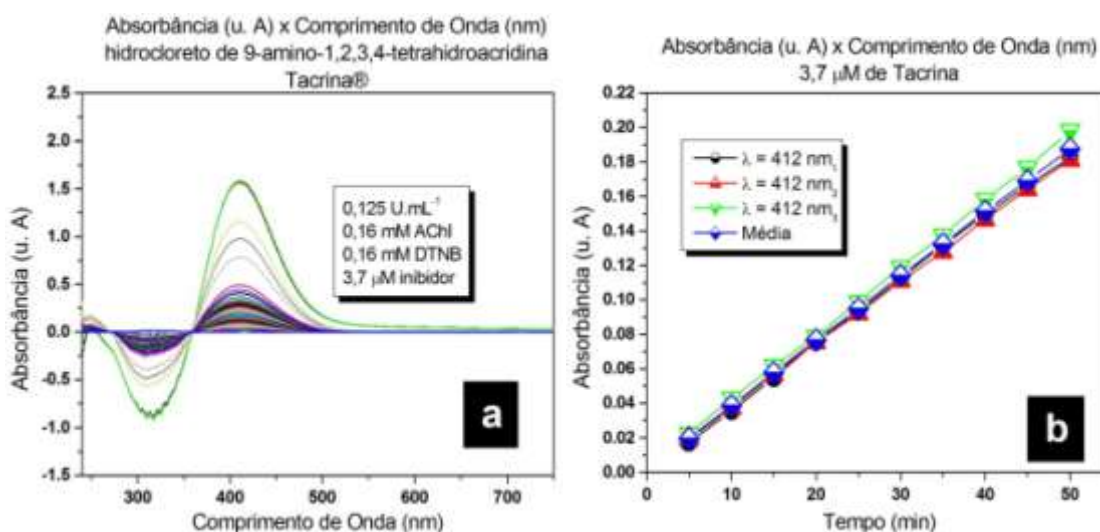
**Figura 28** Espectros contínuos para o composto  $\text{cis-[Ru(phen)}_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  estão representados em **28.a** e a curva média e triplicata em função do tempo em **28.b**.

A fim de avaliar os efeitos dos substituintes ligados diretamente ao ligante fenantrolínico, efetuou-se um experimento com o complexo contendo o substituinte Cl, que apresenta um pka mais baixo do que o pka da fenantrolina não substituída. A **Figura 29** contém os dois gráficos para esse complexo, seguindo a mesma metodologia utilizada nos compostos anteriores.



**Figura 29** Espectros contínuos para o complexo  $cis-[Ru(5Cl-phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  e, em **29.b**, evolução da absorbância em 412 nm em função do tempo.

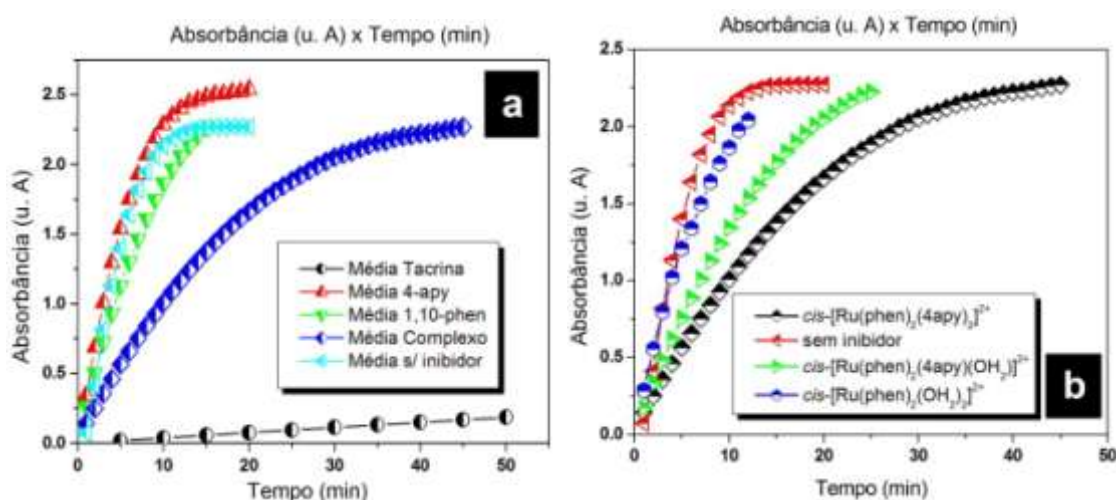
Com relação ao padrão usando a Tacrina, a curva **30.b** mostra apenas os 50 primeiros minutos de reação enzimática. O experimento total foi de 12 horas, porém não foi feito o registro total, pois, depois de 3 horas, o efeito da hidrólise não enzimática do substrato acetilcolina no pH=8,0 sobrepõe os efeitos da hidrólise enzimática e, então, os dados coletados não são mais significativos.



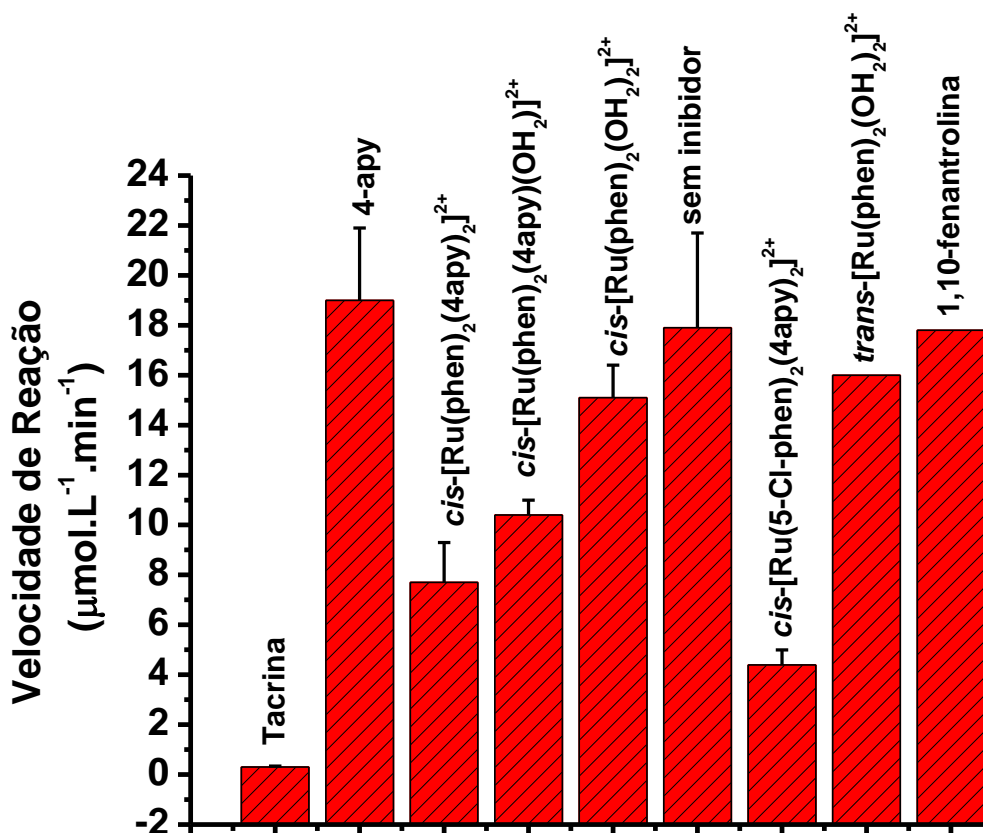
**Figura 30** Espectros contínuos, em **30.a**, usando como inibidor padrão a Tacrina e, em **30.b**, evolução temporal da absorbância para o comprimento de onda de 412 nm.

Os dados obtidos (Abs vs Tempo) foram tratados em termos de velocidade de reação, determinado pelo quociente da variação da absorbância pelo

tempo, que então é dividido pelo coeficiente de absorvidade molar do indicador ionizado (íon TNB), **Figura 31**. Tomou-se o cuidado para que o intervalo de tempo selecionado mantivesse a relação com melhor linearidade possível, uma vez que, uma curva não linear pode mascarar efeitos que não são considerados no cálculo da velocidade de reação. O intervalo de tempo das medidas também foi minimizado para evitar a interferência provocada pela inibição não enzimática.



**Figura 31** No gráfico **31.a**, as curvas de reação enzimática usando diferentes fragmentos e o complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ , como inibidores em comparação com a Tacrina. Em **31.b**, comparação entre com os 3 complexos estudados como inibidores na curva de reação de hidrólise enzimática.

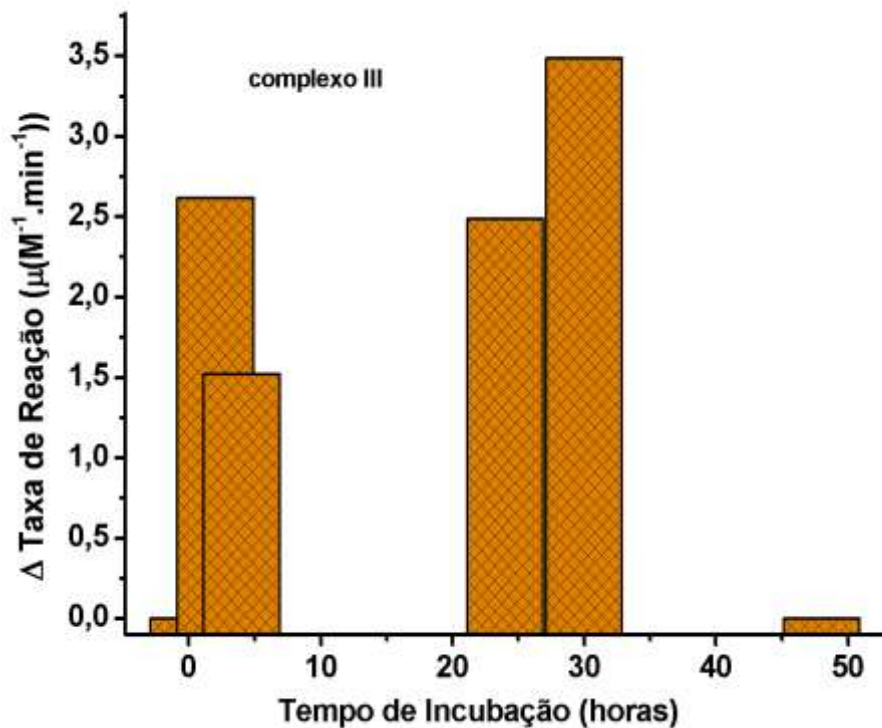


**Figura 32** Gráfico de barras para a velocidade de reação enzimática para os diferentes inibidores comparados com o inibidor comercial Tacrina e com a reação enzimática livre de inibidor.

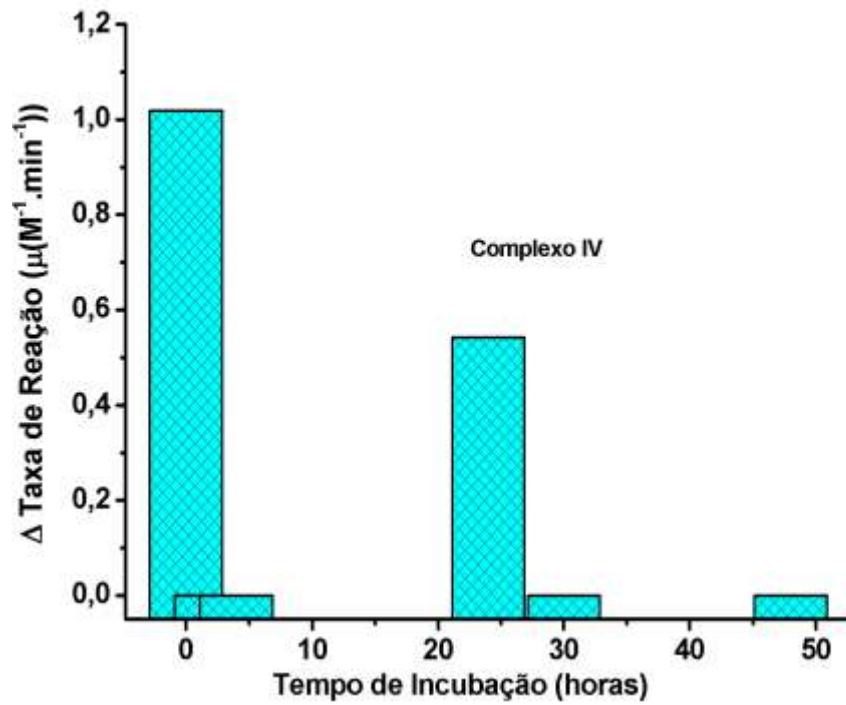
Os resultados obtidos mostram que os complexos inibem a atividade da enzima AChE enquanto a molécula bioativa livre 4apy e o ligante phen não atuam como inibidores desta enzima (segundo método de Ellman aplicado). Ainda, a inibição enzimática segue a ordem de aquação do complexo precursor: *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> > *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> > *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> > *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

Esta ordem mostra que a coordenação da 4apy ao fragmento [Ru(phen)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> favorece a inibição da AChE. Ao mesmo tempo cabe lembrar que a 4apy não inibe a enzima AChE mas atua na MA promovendo o aumento no nível de acetilcolina. Estes resultados sugerem que o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> apresenta características estruturais que são essenciais para a interação com a enzima AChE.

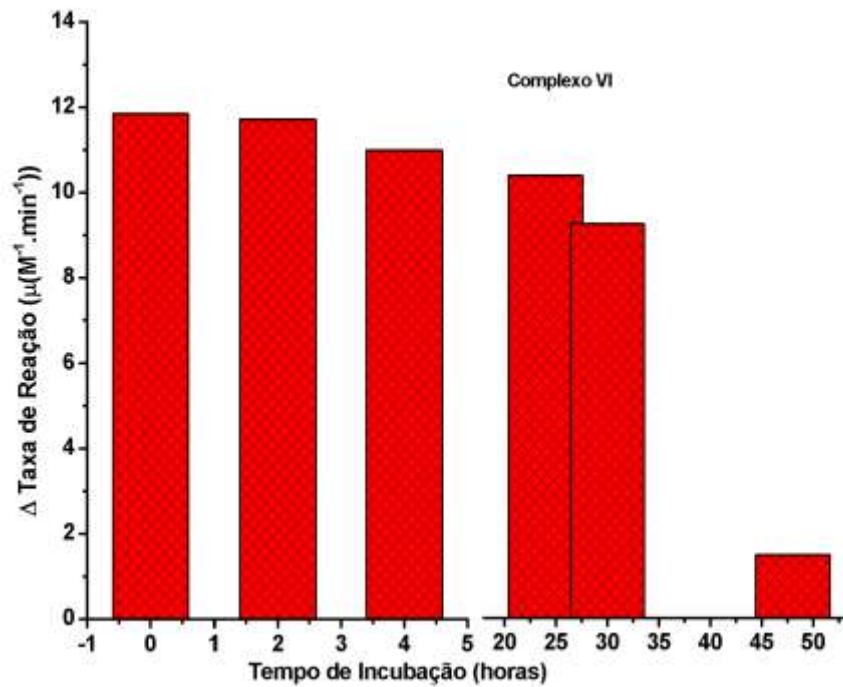
Nestes estudos avaliamos também o efeito do tempo de incubação do complexo com a atividade inibidora enzimática, **Figuras 33, 34 e 35**. Os resultados obtidos mostram que o complexo precursor não apresentou alteração da atividade inibidora com o tempo de incubação. Entretanto o complexo III apresentara um aumento da atividade inibitória com o tempo de incubação, sugerindo a participação direta destes complexos no processo catalítico provavelmente pela troca da água coordenada por um sitio de ligação na enzima, o complexo V, não foi testado, pois com o tempo de experimento ocorre a conversão total da forma *trans* para *cis*.



**Figura 33** Gráfico de delta taxa de reação segundo variação no tempo de incubação do complexo III com a enzima AChE.



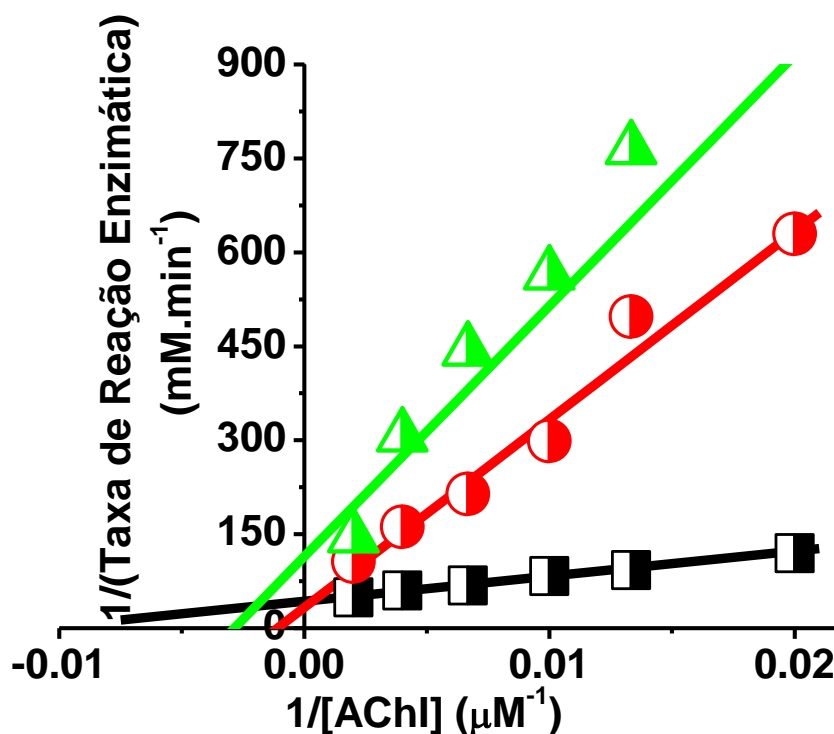
**Figura 34** Gráfico de delta taxa de reação segundo variação no tempo de incubação do complexo IV com a enzima AChE..



**Figura 35** Gráfico de delta taxa de reação segundo variação no tempo de incubação do complexo IV com a enzima AChE.

Neste contexto determinamos as constantes de velocidade de Michaelis-Menten da hidrólise do substrato catalisada pela enzima, para o inibidor,  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  seguindo as equações 5, 6 e 7.

Os resultados estão apresentados na **Figura 36** e **Tabela 8**. Visto que o valor de  $K_m$  aumenta com o aumento da concentração do complexo sugere-se que a inibição da atividade da enzima acetil colinesterase pelo complexo ocorre por um mecanismo de inibição competitiva reversível.  $K_m = 93,362 \mu M$ ;  $K_m = 903,342 \mu M$  e  $K_m = 1382,704 \mu M$  para as concentrações de 0; 1,85 e 7,4  $\mu M$  do complexo VI. No **Apêndice 1**, estão os gráficos de regressão linear, assim como a equação da reta obtidos para o complexo VI, referentes ao gráfico na **Figura 36**.

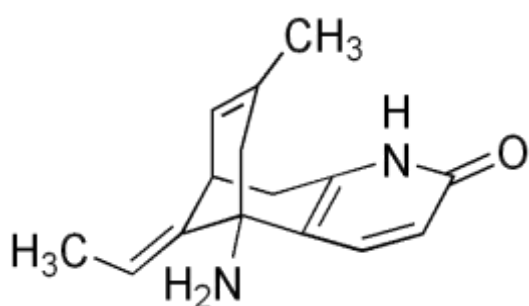


**Figura 36** Gráfico de Linear-Buck para obtenção dos parâmetros de cinética de inibição segundo as equações de Michaelis-Menten.

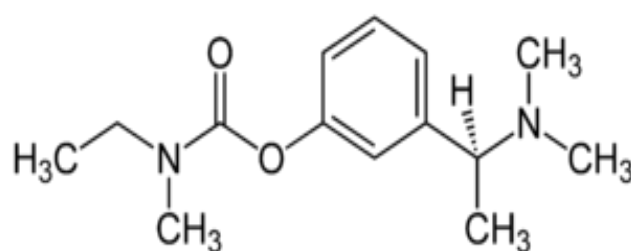
A extensão da inibição da AChE determina se o inibidor é tóxico ou farmacológico. A eficiência de inibição da AChE por uma dada substância pode ser avaliada pela constante de inibição ( $k_i$ ) que pode ser calculada pelo gráfico  $k_M/V_{max}$  VS [inibidor].



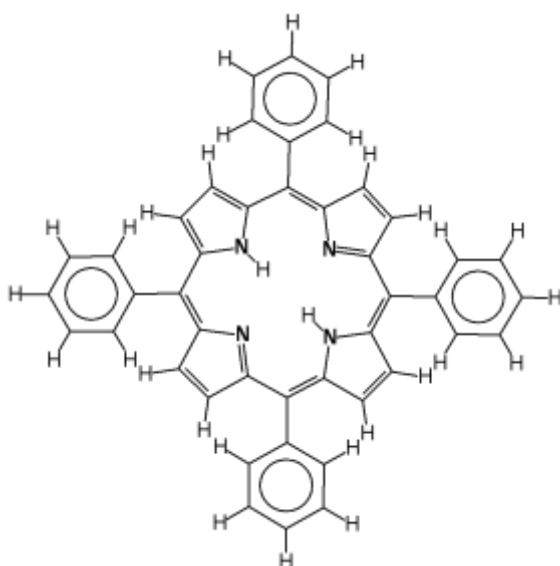
A **Tabela 8** mostra o valor obtido para a constante de inibição ( $k_i$ ), do complexo *cis* em relação a uma série de compostos descritos na literatura. Espera-se que um bom inibidor apresente tanto um baixo valor de  $k_i$  como um baixo valor de citotoxicidade. Para maior clareza a **Figura 37** contém a estrutura das estruturas comparadas na **Tabela 8**, com exceção do Complexo VI e da Tacrina já exibidas na lista de estrutura.



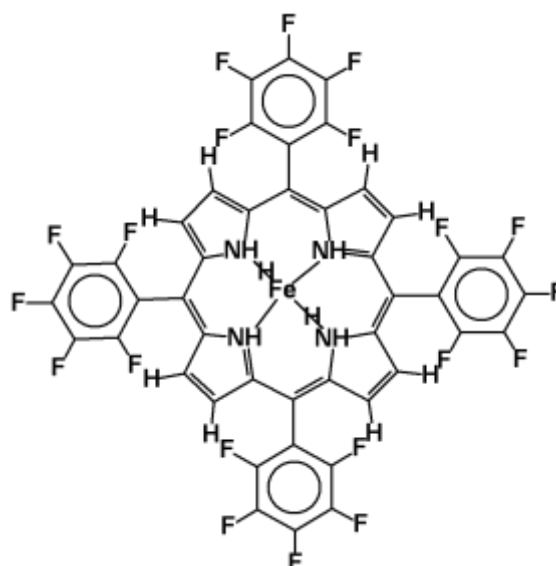
**Huperzine-A**



**Rivastigmina**



**F20tetrafenilporfirina**



**F20TPPFeCl**

**Figura 37** Representação das estruturas utilizadas como comparação com relação aos valores de constante de inibição  $K_i$ .

**Tabela 8** Valores de KI (constante de inibição) para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  calculado, em comparação com os valores extraídos da literatura para inibidores reconhecidos, e outros derivados de porfirina.

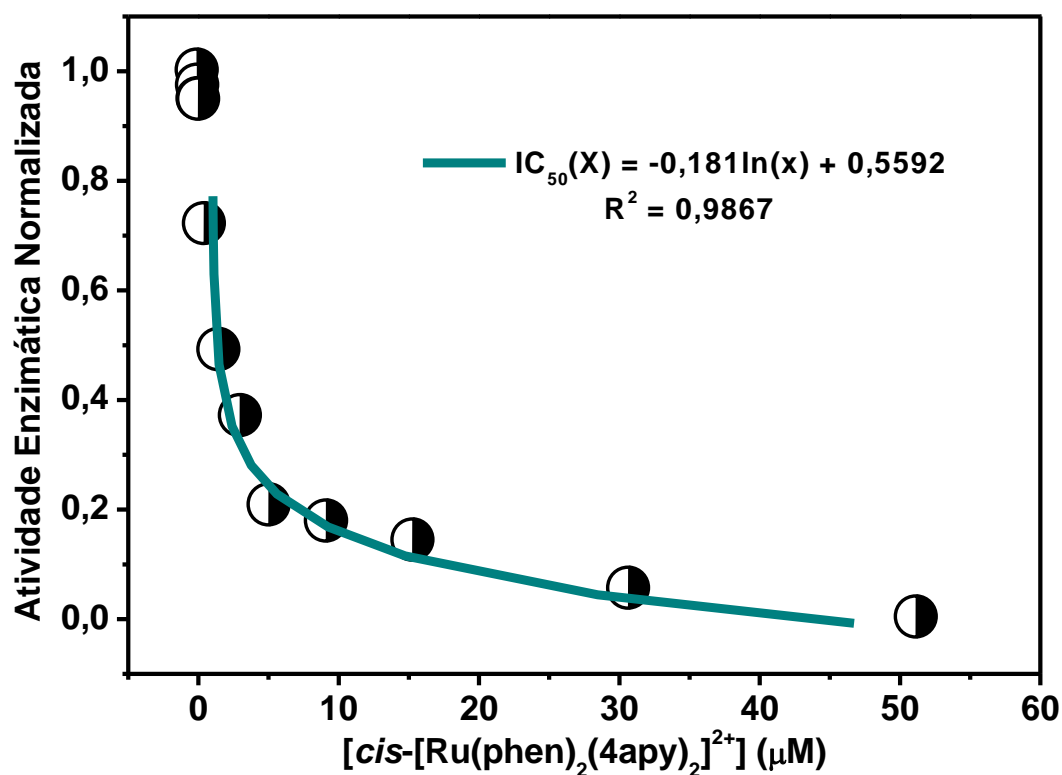
Inibidor	KI ( $\mu\text{M}$ )
Tacrina <sup>85</sup>	0,031
Huperzina-A <sup>85</sup>	0,0046
Rivastigmina <sup>86</sup>	0,5
F20Tetrafenilporfirina <sup>87</sup>	15
F20TPPFeCl <sup>87</sup>	2,21
$cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$	20

Os resultados da **Tabela 8** mostram que tanto a huperzina-A como a Tacrina são os mais eficientes inibidores da AChE enquanto o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  apresenta inibição similar as porfirinas. É descrito na literatura<sup>85</sup> que a Tacrina atua como um inibidor da AChE na presença de acetilcolina como substrato tanto como inibidor competitivo como não competitivo. A constante de inibição considerando apenas a inibição competitiva é de 65  $\mu\text{M}$  (três vezes maior que o obtido para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ ) o que leva a concluirmos que em termos de um mecanismo de ação competitivo e reversível o complexo é superior a Tacrina com a vantagem de não levar ao comprometimento da enzima e substrato pelo mecanismo de inibição não competitivo, o que pode ser responsável pela alta toxicidade da Tacrina.

Desde a década de 50 vários trabalhos demonstram a habilidade inibidora enzimática dos complexos polipiridínicos de Ru(II)<sup>88</sup>. O complexo  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  por exemplo liga-se a enzima AChE com afinidade da ordem de micromolar da constante de inibição.

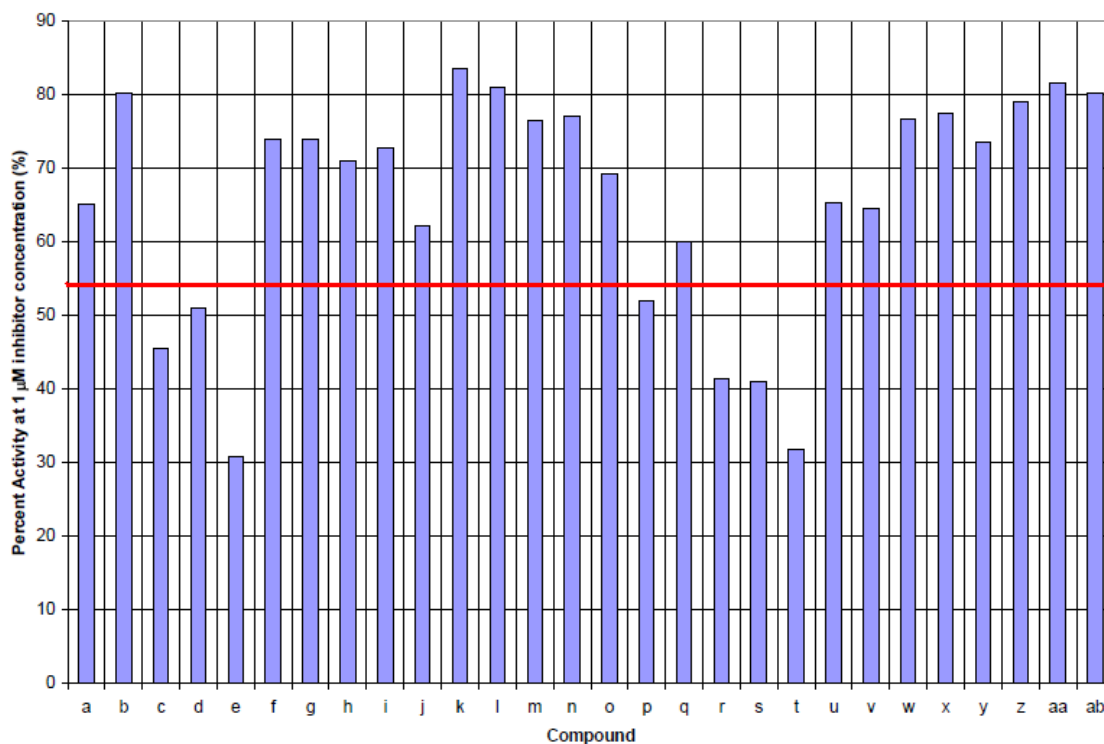
MULCAHY e colaboradores<sup>88</sup>, por exemplo, reuniram os dados de inibição da AChE para 28 complexos polipiridínicos de Ru(II) em um diagrama de inibição da atividade enzimática vs complexo, **Figura 38**. Para localizarmos a atividade do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  neste diagrama refizemos nossos experimentos de inibição da AChE usando as mesmas condições experimentais descritas por Mucalhy. Para isso foram realizadas 12 medidas de velocidade de reação enzimática pelo método de Ellman utilizando concentrações de 0,025 até 51  $\mu\text{M}$  do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ , em uma concentração de 0,3 mM de

substrato iodeto de acetilcolina. As velocidades de hidrólise enzimática em função da concentração de inibidor estão mostradas no gráfico normalizado de atividade enzimática.



**Figura 38** Valores de atividade enzimática normalizada em função da concentração de inibidor (Complexo VI). Os pontos representam os valores obtidos pelo método de Ellman e a linha azul representa a regressão logarítmica com limite no intervalo dos pontos traçados.

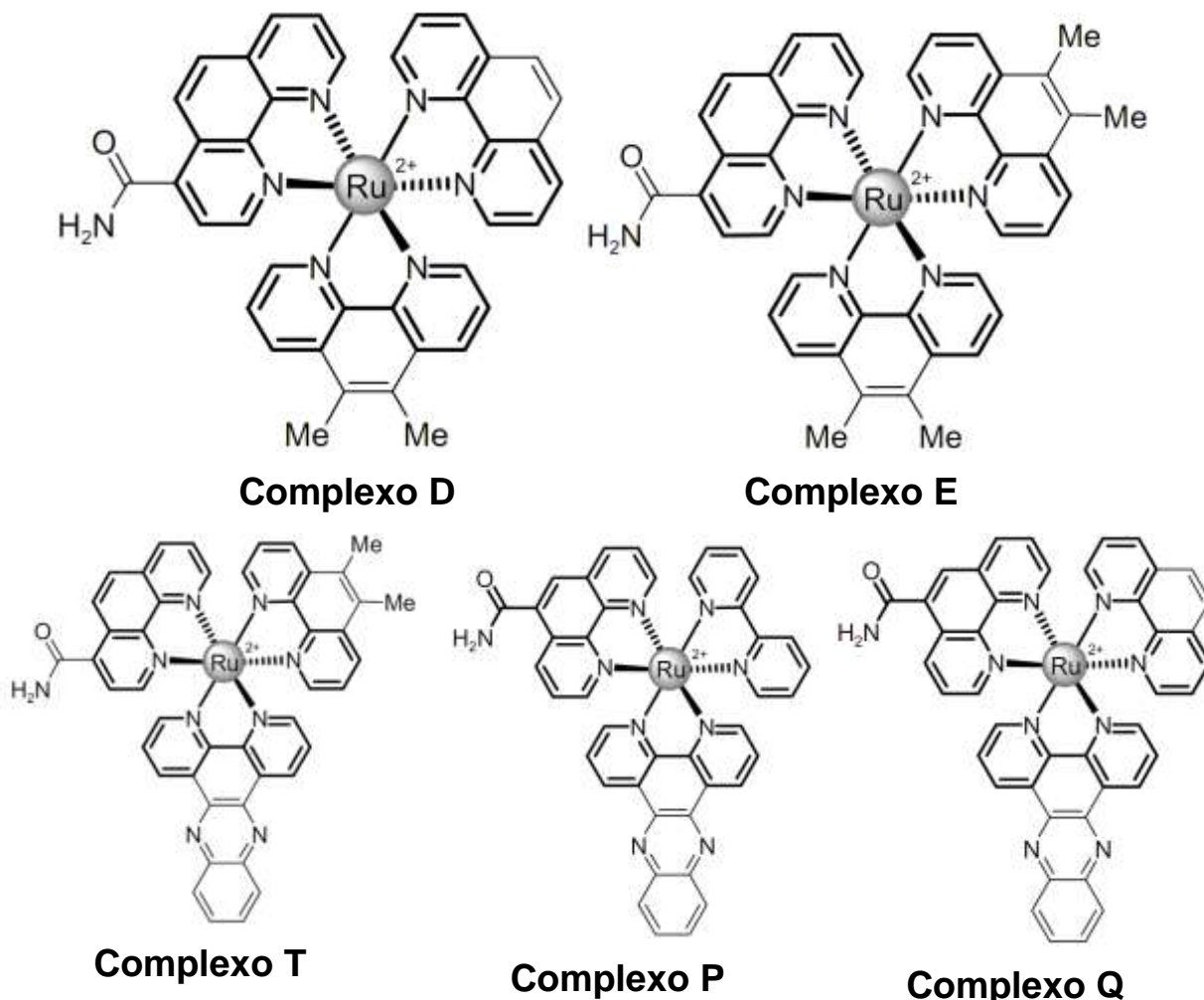
O complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 1,38 µ molL<sup>-1</sup>. A atividade enzimática determinada para 1 µM de inibição enzimática determinada em termos de porcentagem equivale a 55,92 %. Quando comparado aos 28 complexos polipiridínicos de Ru(II), o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> posiciona-se entre os 8 compostos com menor concentração para atividade enzimática (**Figura 39**).



**Figura 39** Gráfico adaptado<sup>88</sup> da porcentagem de inibição da atividade enzimática (AChE) segundo a pequena biblioteca de 28 complexos polipiridínicos, à 1 μM de inibição, a linha vermelha representa o limite delimitado pela porcentagem de inibição referente ao complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

É interessante notar que moléculas grandes e hidrofóbicas como as porfirina (**Tabela 8** e **Figura 37**) e complexos de Ru(II) como [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> são bons inibidores da AChE<sup>89</sup>. Sugimoto e colaboradores 1995 propuseram um modelo de sitio ativo para AChE. De acordo com este modelo, a enzima apresenta quatro sítios ativos: sitio para ligação hidrogênio, um sítio de carga negativa, e dois sítios hidrofóbicos. Portanto, o efeito inibitório dos complexos estudados podem ser explicados por uma adsorção hidrofóbica do complexo no centro ativo da enzima e/ou em termos de similaridades conformacionais que favorecem a interação complexo/enzima. O complexo *cis* tem as características necessárias para interagir com estes sítios: a phen pode ligar-se aos sítios hidrofóbicos, a carga positiva total do complexo e o grupo amino protonado da 4apy podem interagir com o sitio negativo. Estas observações estão de acordo com estudos de lipofilicidade realizados recentemente em nosso laboratório para o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> logP= -1,11 e para o ligante 4apy livre logP= -0,97.

Para auxiliar a análise estrutural dos dados plotados na **Figura 39** (adaptado da literatura), a **Figura 40** exhibe os complexos que apresentaram a melhor atividade inibitória (complexos “e” e “t”) com base nos valores de IC<sub>50</sub> de inibição, assim como os três compostos com atividade inibitória mais próxima do valor de IC<sub>50</sub> do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (complexos “d”, “p” e “q”).



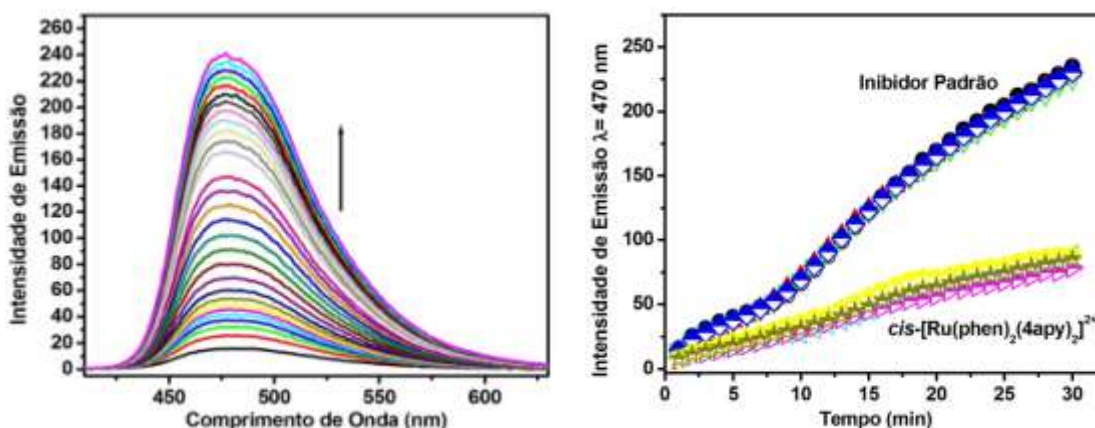
**Figura 40** Complexos com maior atividade inibitória IC<sub>50</sub> (estruturas **e** e **t**), e complexos com valores de IC<sub>50</sub> inibitório mais próximo do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (estruturas **p**, **q** e **d**) adaptados da referência **Figura 39**.

Para efeitos de comparação realizamos estudos de inibição da AChE por espectroscopia de luminescência. Este método possibilita maior sensibilidade, pois o sistema envolve apenas a reação enzimática e está livre de contratempos como a hidrólise não enzimática. Estes experimentos são descritos a seguir.

#### 4.7.1. Experimentos de Inibição Enzimática (método de Fluorescência).

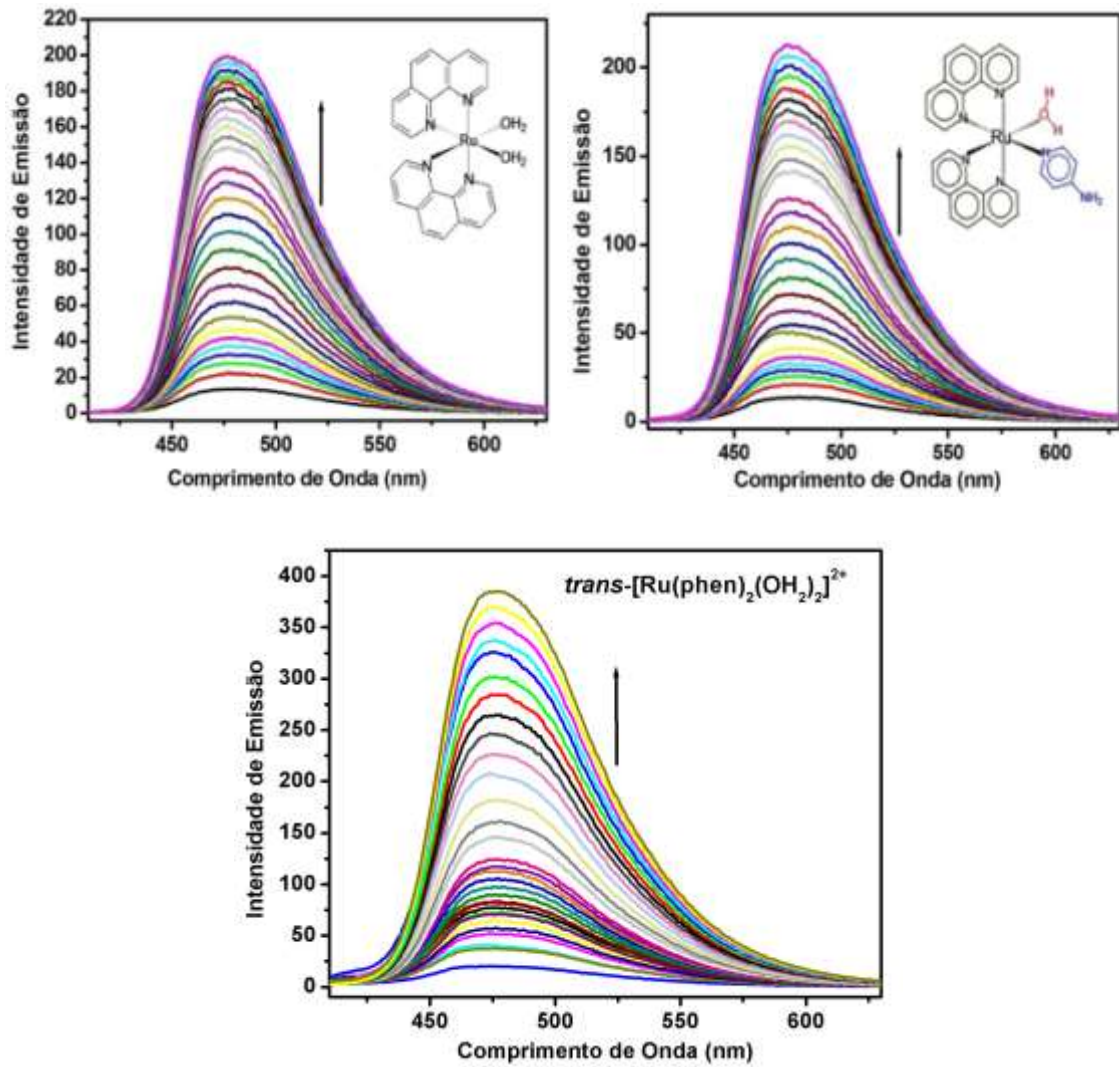
Como citado anteriormente, este método baseia-se, na detecção do íon indoxilato, gerado em solução pela hidrólise do substrato acetato de indoxila. Primeiramente foram efetuados uma série de testes para adequar as melhores condições experimentais as condições dos compostos de nosso interesse. As medidas foram realizadas por acompanhamento da reação enzimática em um espectrofluorofotômetro, com leituras em intervalos de 60 segundos, ao final da reação (cerca de 20 a 30 minutos), a taxa de reação é dada em função do quociente do delta intensidade de emissão relativa em função do tempo, estes testes foram feitos com e sem a presença dos inibidores, além do uso do inibidor comercial Tacrina®.

A **Figura 41.a e 41.b** mostra todos os espectros projetados, e o gráfico contendo o máximo de emissão em função do tempo para a medida em triplicata respectivamente.

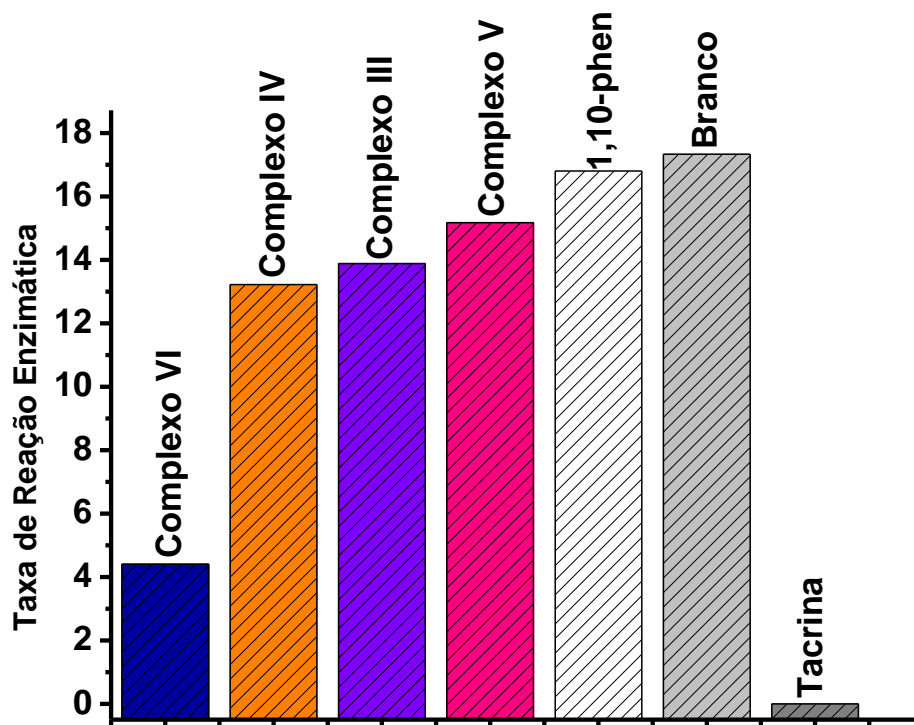


**Figura 41** função do tempo (em destaque a triplicata para a reação padrão livre de inibidor, e a reação contendo  $3,7\mu\text{M}$  do composto  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ ).

O mesmo protocolo foi seguido para os demais complexos envolvidos no mesmo sistema fotoquímico, na **Figura 42.a, 42.b e 42.c**, são mostrados os espectros obtidos em um tempo de reação para cada um dos complexos testados como inibidor, complexo III, IV e V respectivamente.



**Figura 42** Espectros de emissão obtidos, para a reação de hidrólise enzimática utilizando 3,7  $\mu$ M do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(OH)_2]^{2+}$  em **42.a**,  $cis-[Ru(phen)_2(OH)_2(4apy)]^{2+}$  **42.b** e  $trans-[Ru(phen)_2(OH)_2]^{2+}$  no gráfico **42.c**.



**Figura 43** Gráfico de barras, contendo a taxa de reação enzimática obtida pelo método de fluorescência, utilizando 3,7  $\mu\text{M}$  para cada protótipo inibidor.

Ambos os métodos de inibição utilizados neste trabalho mostraram uma concordância quanto ao padrão de inibição, frente aos diferentes substratos e as condições exigidas para cada experimento. No geral o complexo de partida no sistema fotoquímico foi o que apresentou o maior padrão de inibição, e na medida em que ocorre a troca dos ligantes piridínicos pelos ligantes aquo, ocorre a perda na eficiência da interação do complexo (produto formado) com a enzima AChE. O próximo experimento idealizado mostra resultados do estudo de inibição enzimática acompanhado da liberação dos ligantes piridínicos por meio da fotólise contínua, a fim de verificar se essa liberação dos ligantes *in situ* apresenta o mesmo padrão observado anteriormente.

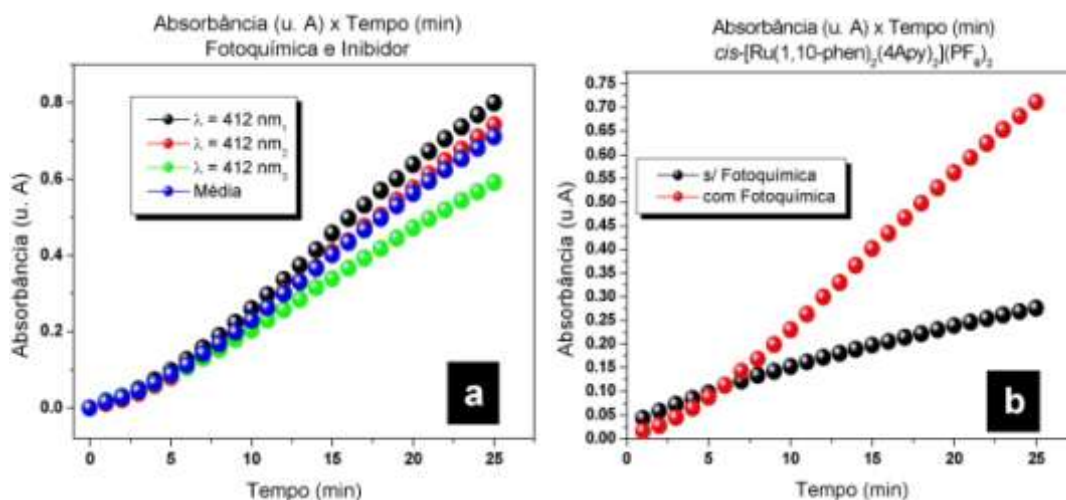


## 4.8. Experimentos Combinados (Fotoquímica e Inibição Enzimática)

Estes experimentos combinados de fotoquímica e de inibição enzimática visam simular da melhor maneira as condições de terapia *in vitro* dos compostos estudados. Os experimentos foram conduzidos da mesma forma que os estudos de inibição anteriormente mencionados, porém a cada intervalo de medida a amostra foi irradiada em um reator fotoquímico de 420 nm.

Para melhor visualização dos resultados utilizou-se uma concentração de 0,03 mM de inibidor e foram efetuadas medidas com e sem fotoquímica (para revalidar as curvas de hidrólise enzimática para novas concentrações). Foram efetuadas também as medidas de inibição enzimática usando apenas a fotoquímica sem qualquer inibidor, a fim de avaliar se a fotoquímica não altera a natureza da reação.

Na **Figura 44**, estão plotados os gráficos de inibição enzimática com fotoquímica para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ .

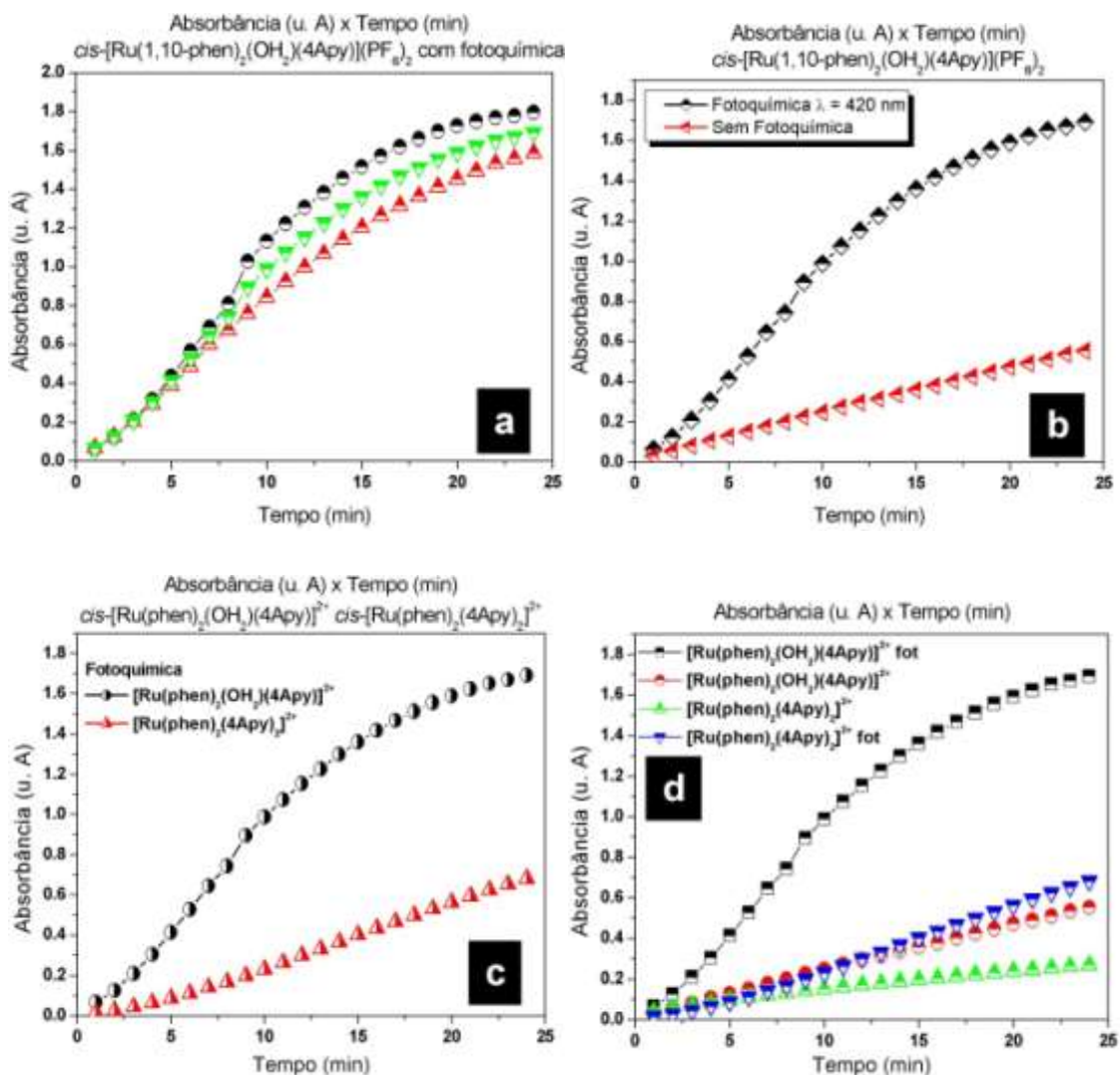


**Figura 44** Em a, curva média para as medidas de inibição enzimática acompanhados fotoquimicamente e, em b, comparação da curva média com e sem fotoquímica (método de Ellman).

Segundo os dados referentes aos gráficos da **Figura 44.a** e **44.b**, o processo de fotólise contínua altera de maneira significativa a forma de interação da enzima AChE com o complexo e os dados acima estão de acordo com os dados de

inibição no item 4.7, onde os produtos da fotoquímica possuem uma inibição menor que o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$ .

Na **Figura 45**, são apresentados os gráficos de inibição acompanhados pelo processo de fotólise contínua para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  com e sem fotoquímica e também os gráficos de fotoquímica e inibição comparados para estes dois complexos.



**Figura 45** Curvas do experimento combinado para o complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  em a. Curva média comparada com e sem o processo de fotólise em b. Comparação dos experimentos com fotoquímica entre os complexos  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  e  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  em c e comparação com e sem a fotoquímica para os mesmos complexos em d.

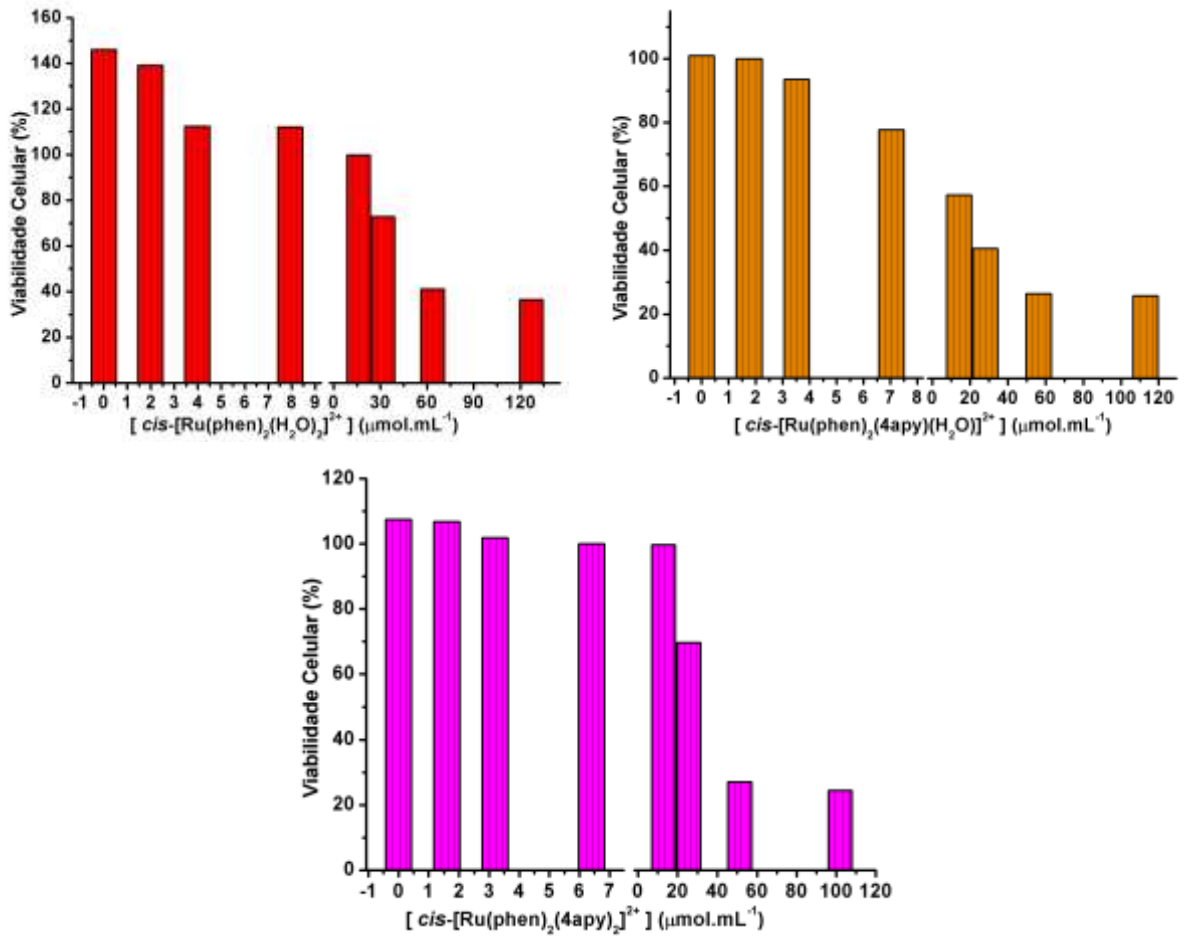
Com base nos gráficos mostrados na **Figura 45**, o processo de fotólise também minimiza a interação do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  com a

enzima AChE e, quando comparado com os dados da reação enzimática para o complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ , observou-se que a medida que a fotólise atua sobre o complexo VI o perfil da curva para reação de hidrólise enzimática se aproxima dos dados obtidos para o complexo IV sem a fotoquímica, reforçando os resultados obtidos para o experimento anterior.

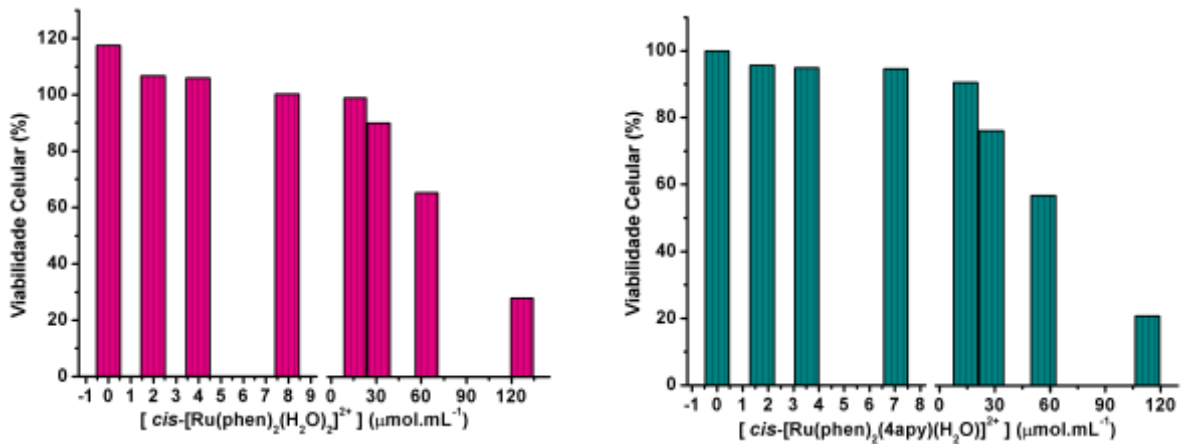
#### 4.9. Experimento de Citotoxicidade e $IC_{50}$

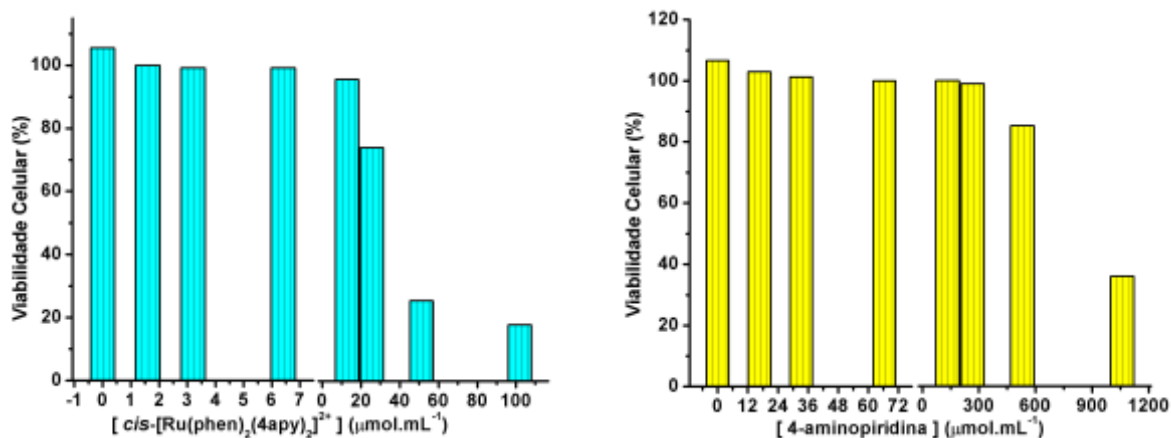
As culturas de células 3T3 e NG97 foram preparadas em placas de *Petri* e previamente encubadas em atmosfera de  $CO_2$  com temperatura constante de  $37^{\circ} C$ , por 72 horas, para a posterior adição da solução tampão  $pH= 7,4$  dos complexos  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ ,  $cis-[Ru(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$ ,  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)(H_2O)]^{2+}$  e o ligante 4-aminopiridina, deixadas por mais 48 horas. Utilizou-se o método do violeta cristal para a leitura espectrofotométrica dos ensaios, utilizou-se a leitora de placas ASYS UVM 340. Todas as medidas foram feitas em triplicata utilizando placas contendo 96 poços.

Todas as medidas obtidas foram confrontadas com o controle celular, a **Figura 46** exibe os gráficos e viabilidade celular em função da concentração da espécie no meio de cultura (complexos III, IV e VI) para as células do tipo 3T3 e na **Figura 47** os gráficos obtidos para as medidas de viabilidade celular em função da concentração dos complexos III, IV, VI e do ligante 4-aminopiridina livre para células do tipo NG97. Para obter os valores de  $IC_{50}$  de citotoxicidade para cada uma das espécies estudadas, foram obtidos gráficos com a viabilidade celular em função da concentração das espécies seguido pela regressão polinomial de segunda ordem. Estes gráficos assim como a função obtida por meio da regressão polinomial são exibidos no **Apêndice 2**.



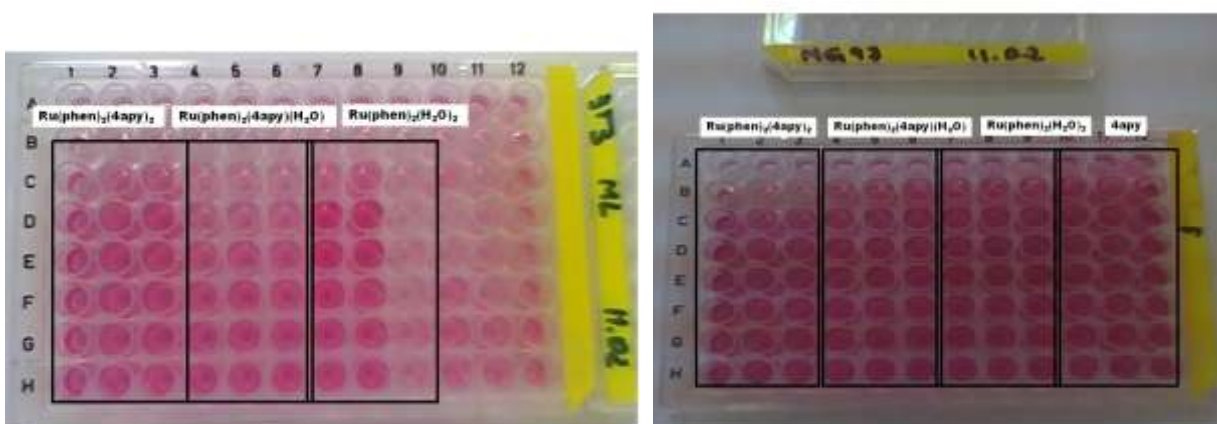
**Figura 46** Gráficos e viabilidade celular em função da concentração da espécie no meio de cultura (complexos III, IV e VI) para as células do tipo 3T3.





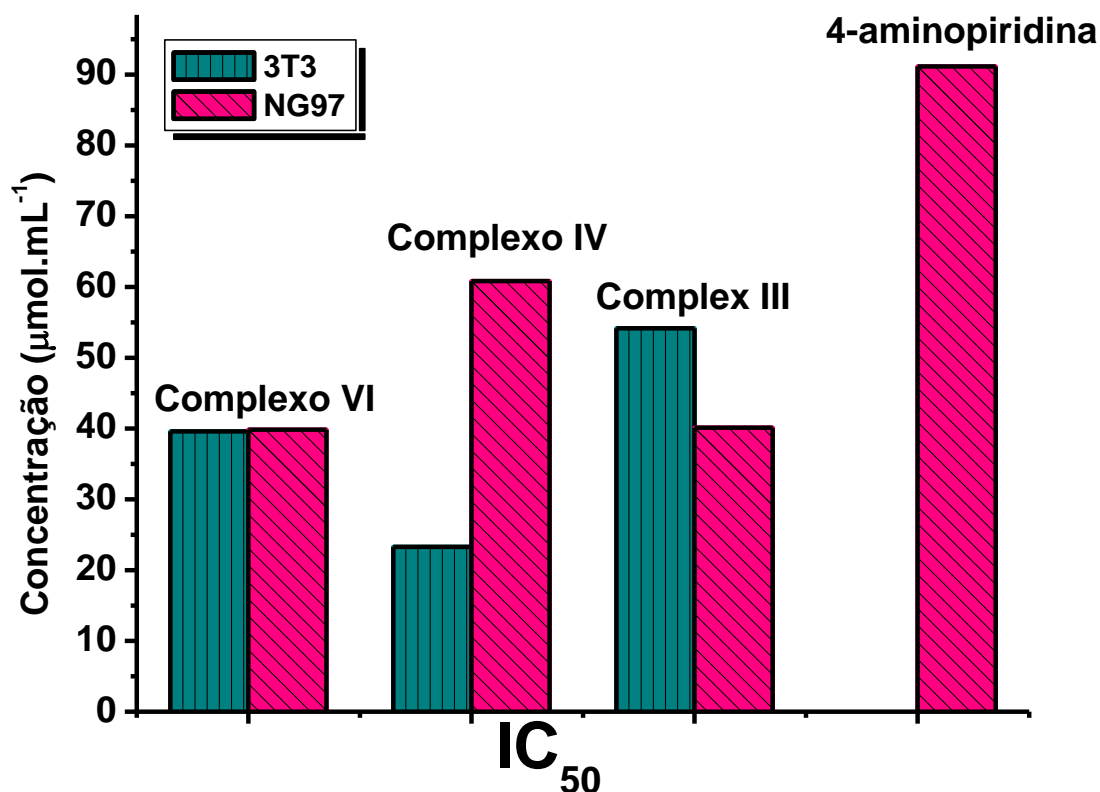
**Figura 47** Gráficos e viabilidade celular em função da concentração da espécie no meio de cultura (complexos III, IV, VI e o ligante 4-aminopiridina livre) para as células do tipo NG97.

A **Figura 48** traz as fotos tiradas do meio de cultivo das células contendo a espécie em estudo (complexos III, IV, VI e o ligante 4-aminopiridina livre) em placas de 96 poços utilizado na medida espectrofotométrica.



**Figura 48** Fotos tiradas do meio de cultivo celular contendo a espécie em estudo (complexos III, IV, VI e o ligante 4-aminopiridina livre) em placas de 96 poços utilizado na medida espectrofotométrica.

Para melhor visualização dos dados de citotoxicidade, a **Figura 49**, contém o gráfico dos valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos pelas curvas de regressão polinomial de segunda ordem (**Apêndice 2**).

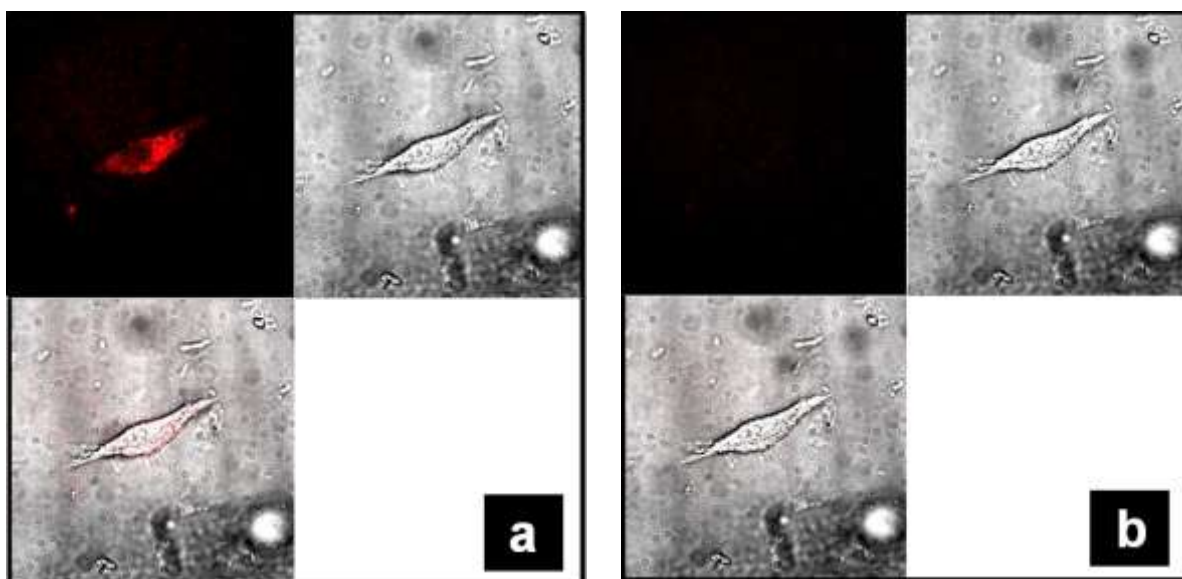


**Figura 49** Gráfico contendo os valores de IC<sub>50</sub> de citotoxicidade para os complexos (III, IV e VI) e o ligante 4-aminopiridina, frente às células 3T3 e NG97.

Estes valores de citotoxicidade IC<sub>50</sub>= 39,59; 39,84 para o complexo VI, IC<sub>50</sub>= 23,3; 60,83 para o complexo IV, IC<sub>50</sub>= 54,18; 40,13, para o complexo III mostram que os produtos de fotólise IV e III, apresentam em média uma toxicidade mais baixa que o composto *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. O valor mais alto de IC<sub>50</sub> do ligante livre 4-aminopiridina, associado à variação dos complexos, indica que a fotólise neste caso também pode ser usada em terapia como proposta a regular a toxicidade do sistema como tudo, aliando a atividade inibitória do complexo VI, com a atividade bloqueadora da 4-aminopiridina, e redução dos efeitos citotóxicos.

#### 4.10 Experimentos de Emissão *in situ*

Preparou-se uma solução 0,5 mM do complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em meio de cultura livre de corante contendo 1% de DMSO, o sistema junto com a cultura de células (células cancerosas de colo do útero) foi previamente mantido em uma incubadora de CO<sub>2</sub> por 3 horas. As medidas de emissão *in situ* foram obtidas em um microscópio confocal Zeiss modelo LSM 510 Meta, com comprimento de onda de excitação de 477 nm (LASER de Ar) e faixa de leitura de emissão de 600-700 nm. Na primeira etapa foram feitas apenas duas leituras inicial e após 1 minuto de irradiação contínua com o LASER Ar (477 nm), em decorrência do perfil qualitativo da perda de emissão do complexo VI em meio celular, efetuou-se um segundo experimento acompanhando o decaimento emissivo de dois diferentes pontos da lâmina de leitura, neste caso utilizou-se um tempo total de leitura de cerca de 7 minutos com excitação em intervalos de 5 segundos. Na **Figura 50** as fotografias obtidas para o primeiro experimento, em destaque uma única célula aderente marcada pelo contraste da emissão do complexo VI (em ambas as figuras, destaque para a fotografia da emissão, transmitida e a sobreposição das duas imagens).



**Figura 50** Imagens de microscopia confocal obtidas com o contraste emissivo do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$ . Em **50.a** contraste emissivo antes da irradiação e em **50.b** perda do contraste após 1 minuto de irradiação contínua.

Na **Figura 51** as imagens do contraste emissivo do complexo VI para uma fração da lâmina contendo 2 células aderentes, com irradiação contínua total de 1 minuto.



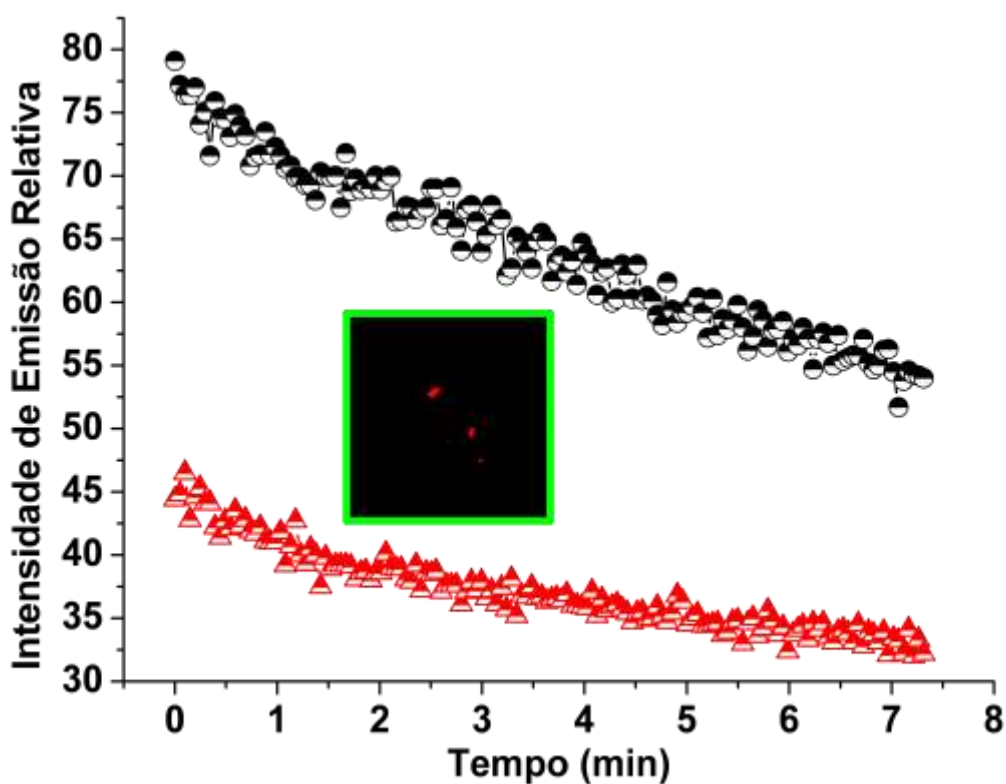
**Figura 51** Imagens com o contraste do complexo VI em vermelho. **51.a** imagem sem irradiação, em **51.b** após 40 segundos de irradiação contínua, e em **51.c** ao final de 1 minuto de irradiação, sem o contraste emissivo do complexo VI.

A **Figura 52** apresenta o gráfico de intensidade de emissão relativa em função do tempo para duas diferentes áreas da lâmina utilizada no experimento, a mesma figura exhibe em destaque a imagem com o contraste em vermelho para as áreas de leitura. Neste experimento o decréscimo em emissão do complexo  $cis-[Ru(phen)_2(4apy)_2]^{2+}$  intracelular é bastante expressivo, seja pela irradiação contínua como observando a irradiação em pulsos. Antes do início da irradiação do sistema, é



possível observar o forte contraste do complexo por toda a extensão da célula, com menor intensidade no núcleo, e maior intensidade na região extranuclear devido a maior facilidade em permear essa extensão das células. Apesar do coeficiente de partição em n-octanol ( $\log P_{\text{oct}}$ ) já obtido para este complexo indicar um sistema com caráter hidrofílico acentuado, com um baixo tempo de incubação (3 horas), foi possível obter uma distribuição detectável do complexo em meio celular, com um forte contraste emissivo.

Todos esses indícios (experimentos *in vitro* comprovados com os estudos de emissão *in situ*) reforçam o potencial em aplicação deste sistema como uma sonda emissiva, somando assim um sistema útil no controle e administração do fármaco em meio biológico.



**Figura 52** Gráfico de Intensidade de Emissão Relativa em função do Tempo, em destaque o decaimento da emissão do complexo  $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  em meio celular, para dois diferentes pontos da lâmina fotografados e acompanhados da irradiação em pulsos de 5 segundos.

## 5. CONCLUSÃO

Foram preparados e caracterizados o complexo *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(4apy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e os produtos de fotoquímica em meio aquoso *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)(4apy)]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e *trans*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, as estruturas e propriedades físico-química destes compostos foram estudados por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica) e técnicas espectroscópicas (absorção na região do UV-Vis, Infravermelho, espectroscopia de luminescência e RMN-<sup>1</sup>H).

As propriedades fotoquímicas deste sistema foram estudadas a nível teórico por meio de cálculos computacionais, implementando como nível de aproximação o método do funcional de densidade DFT, para o estado singlete de menor energia, e o primeiro estado tripleto excitado. Observou-se neste caso a degenerescência entre os níveis de energia que compreendem as transições TCML e CM (quando o complexo VI passa do estado singlete para o estado tripleto), e que o estado CM<sup>3</sup> possui uma grande contribuição do orbital σ\* no eixo de ligação, tal fato em um processo dinâmico (solvente básico e temperatura ambiente) leva a fotólise dos ligantes 4-aminopiridina, comprovando assim seu potencial em atuar como veículo destes ligantes.

Os experimentos de inibição enzimática efetuados por dois diferentes métodos (método colorimétrico de Ellman e método de emissão) revelaram que dentre as estruturas do sistema em estudo, apenas o complexo VI possui uma atividade inibitória apreciável (IC<sub>50</sub>= 1,87 μM) por um mecanismo de inibição do tipo competitivo, e que, à medida que ocorre a troca dos ligantes 4apy pelos ligantes aquo ocorre conseqüentemente uma redução da atividade inibitória. Com isso duas diferentes hipóteses podem ser aplicadas em uso terapêutico: inibição da enzima AChE (hipótese colinérgica) e bloqueio dos canais de potássio (estratégia compensatória).

Os estudos de citotoxicidade mostraram que o complexo VI apresenta em média a maior citotoxicidade frente as células (NG97 e 3T3), e que ocorre um decréscimo na atividade citotóxica a medida em que são liberados os produtos de fotólise em meio aquoso (devido a menor citotoxicidade tanto dos fotoprodutos como do ligante 4-aminopiridina livre). Essa relação entre as atividades citotóxicas indica

que essa propriedade também pode ser considerada para fins terapêuticos, utilizando como controle de dosagem a regulação tóxica do sistema.

A diminuição regular e significativa da emissão do complexo VI ( $\lambda_{em} = 640$  nm) com a liberação da aminopiridina (detectada por voltametria cíclica e por luminescência, assim como nos experimentos de emissão *in situ*) nos fornece indícios da viabilidade de uso destes complexos como sondas biológicas luminescentes. Estes experimentos mostram também que é possível o controle da dosagem do fármaco a ser liberado e a seleção do local de entrega no organismo.

Em síntese, uma análise quantitativa das atividades biológicas estudadas, observou-se que com a concentração de 0,5 mM o complexo VI apresentou atividade emissiva *in situ*, sem que isso implicasse em qualquer dano ao cultivo celular, essa mesma concentração equivale a uma viabilidade celular próxima de 100% (segundo os estudos de citotoxicidade para ambas as células NG97 e 3T3) e com relação a atividade inibitória, essa concentração é cerca de 250 vezes superior a concentração do  $IC_{50}$  inibitório obtido para o mesmo complexo. Essa relação sustenta o potencial promissor deste sistema metalofármaco multifuncional.

Do nosso conhecimento esta é a primeira vez que se observa um complexo de metal de transição atuando simultaneamente como sistema de entrega de fármaco e sonda luminescente. Para que isto fosse possível a energia da ligação e a cinética da reação deve estar em “sincronia”. Potencialmente esta tecnologia pode ser usada para acompanhar a associação das proteínas nos sistemas vivos em tempo real. Além do mais, a luminescência não é uma técnica invasiva nem destrutiva pelo menos nos comprimentos de onda em que estamos trabalhando.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <[www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod\\_pagina=1011](http://www.alzheimermed.com.br/m3.asp?cod_pagina=1011)> acessado em 25/03/2008 às 20:43 h.
2. RUAK, A. "The Chemistry Of Alzheimer's Disease" *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2698-2715, 2009.
3. <[www.alz.org/trajectory](http://www.alz.org/trajectory)> acessado em 20/06/2010 às 8:14 h.
4. LEVY, R.; LITTLE, A.; CHUAQUI, P.; REITH, M. "Early Results From Double Blind, Placebo Controlled Trial Of High Dose Phosphatidylcholine In Alzheimer's Disease" *Lancet.*, **1**, 987-988, 1983.
5. SAGNOLI, A.; LUCCA, U.; MENASCE, G.; BANDERA, L.; CIZZA, G.; FORLONI, G.; TETTAMANTI, M.; FRATTURA, L.; TIRABOSCHI, P.; COMELLI, M.; SENIN, U.; LONGO, A.; PETRINI, A.; BRAMBILLA, G.; BELLONI, A.; NEGRI, C.; CAVAZZUTI, F.; SALSI, A.; CALOGERO, P.; PARMA, E.; STRAMBA-BADIALE, M.; VITALI, S.; ANDREONI, G.; INZOLI, M. R.; SANTUS, G.; CAREGNATO, R.; PERUZZA, M.; FAVARETTO, M.; BOZEGlav, C.; ALBERONI, M.; DE LEO, D.; SERRAIOTTO, L.; BAIOCCHI, A.; SCOCCIA, S.; CULOTTA, P.; IERACITANO, D. "Long-Term Acetyl-L-Carnitine Treatment In Alzheimer's Disease *Neurology*" *Neurol.*, **41**, 1726-1732, 1991.
6. RHEE, K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. "Screening For Acetylcholinesterase Inhibitors From Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin-Layer Chromatography In Combination With Bioactivity Staining" *J. of Chrom. A*, **915**, (1-2), 217-223, 2001.
7. GIACOBINI, E. "Cholinesterase Inhibitors: New Roles And Therapeutic Alternatives" *Pharmacol. Res.*, **50**, (4), 433-440, 2004.
8. BAYER, K.; AHMADI, S.; ZEIHOFER, H. U. "Gabapentin May Inhibit Synaptic Transmission In The Mouse Spinal Cord Dorsal Horn Through A Preferential Block Of P/Q-Type  $Ca^{2+}$  Channels" *Neuropharm.*, **46**, (5), 743-749, 2004.
9. PELAYO, C.; FORMOSA, X.; GALDEANO, C.; GOMEZ, T.; MUÑOZ-TORRENO, D.; SCARPELLINI, M.; VIAYNA, E.; BADIA, A.; CLOS, M. V.; CAMINS, A.; PALLS, 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 B-Amyloid Aggregation" *J. Med. Chem.*, **51**, (12), 3588-3598, 2008.
10. DARVESH, S.; MCDONALD, R. S.; DARVESH, K. V.; MATAIJA, D.; CONRAD, S.; GOMEZ, G.; WALSH, R.; MARTIN, E. "Selective Reversible Inhibition Of Human Butyrylcholinesterase By Aryl Amide Derivatives Of Phenothiazine" *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, (19), 6367-6378, 2007.
11. FREITAS, H. F.; PAZ, O. S.; CASTILHO, M. S. "QSAR 3D Para Um Conjunto De Inibidores De Butirilcolinesterase Humana" *Quím. Nova*, **32**, (8), 2114-2121, 2009.
12. GLUSH, A. K.; KUMARAGURUBARAN, N.; HONG, L.; KULKARNI, S.; XU, X.; MILER, H. B.; REDDY, D. S.; WEERASENA, V.; TURNER, R.; CHANG, W.; KOELSH, G.; TANG, J. "Potent Memapsin 2 (B-Secretase) Inhibitors: Design,

*Synthesis, Protein-Ligand X-Ray Structure, And In Vivo Evaluation*” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, (3), 1031-1036, 2008.

13. HUSSAIN, I.; HAWKINS, J.; HARRISON, D.; HILLE, C.; WAYNE, G.; CUTLER, L.; BUCK, T.; WALTER, D.; DEMONT, E.; HOWES, C.; NAYLOR, A.; JEFFREY, P.; GONZALES, M. I.; DINGWALL, C.; MICHEL, A.; REDSHAW, S.; DAVIS, J. B. “*Oral Administration Of A Potent And Selective Non-Peptidic BACE-1 Inhibitor Decreases B-Cleavage Of Amyloid Precursor Protein And Amyloid-B Production*” *In Vivo*” *J. of Neurochem.*, **100**, (3), 802-809, 2007.
14. SCHUGAR, H.; GREEN, D. E.; BOWEN, M. L.; SCOTT, L. E.; STORR, T.; BÖHMERLE, K.; THOMAS, F.; ALLEN, D. D.; LOCKMAN, P. R.; MERKEL, M.; THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. “*Combating Alzheimer’s Disease With Multifunctional Molecules Designed For Metal Passivation*” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1716-1718, 2007.
15. JAKOB-ROETNE, R.; JACOBSEN, H. “*Alzheimer’s Disease: From Pathology To Therapeutic Approaches*” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 3030-3059, 2009.
16. BULIC, B.; PICKHARDT, M.; SCHMIDT, B.; MANDELKOW, E. M.; WALDMANN, H.; MENDELKOW, E. “*Development Of Tau Aggregation Inhibitors For Alzheimer’s Disease*” *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1740-1752, 2009.
17. ROGERS, S. L.; FARLOW, M. R.; DOODY, R. S.; MOHS, R.; FRIEDHOFF, L. T. “*A 24-Week, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial Of Donepezil In Patients With Alzheimer’s Disease*” *Neurol.*, **50**, 136-145, 1998.
18. CUMMINGS, J. L.; CYRUS, P. A.; BIEBER, F.; MAS, J.; ORAZEM, J.; GULANSKI, B. “*Metrifonate Treatment Of The Cognitive Deficits Of Alzheimer’s Disease*” *Neurol.*, **50**, 1214-1221, 1998.
19. MORRIS, J. C.; CYRUS, P. A.; ORAZEM, J.; MAS, J.; BIEBER, F.; RUZICKA, B. B.; GULANSKI, B. “*Metrifonate Benefits Cognitive, Behavioral, And Global Function In Patients With Alzheimer’s Disease*” *Neurol.*, **50**, 1222-1230, 1998.
20. PERRY, E. K. “*The Cholinergic Hypothesis – Ten Years On*” *Br. Med. Bull.*, **42**, (1), 63-69, 1986.
21. BRYENE, G. J. A. “*Treatment Of Cognitive Impairment In Alzheimer’s Disease*” *Aust. J. Hops. Pharm.*, **28**, 261-266, 1998.
22. TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; FILHO, R. B. “*Atividades Larvicida E Anticolinesterásica De Plantas Do Gênero Kalanchoe Larvicidas*” *Quím. Nova*, **29**, 3, 415-418, 2006.
23. KAUFER, D. I.; CUMMINGS, J. L.; CHRISTINE, D. “*Effect Of Tacrine On Behavioral Symptoms In Alzheimer’s Disease: An Open-Label Study*” *J. Geriatr. Psychiatry*, **9**, 1-6, 1996.
24. MELNIKOVA, I. “*Therapies For Alzheimer’s Disease*” *Nat. Rev. Drug. Discovery*, **6**, 341-342, 2007.
25. THAL, L. J.; SCHWARTZ, G.; SANO, M.; WEINER, M.; KNOPMAN, D.; HARRELL, L.; BODENHEIMER, S.; ROSSOR, M.; PHILPOT, M.; SCHOR, J.; GOLDBERG, A. “*A Multicenter Double-Blind Study Of Controlled-Release Physostigmine For The Treatment Of Symptoms Secondary To Alzheimer’s Disease*” *Neurol.*, **47**, 1389-1395, 1996.

26. MCCLELLAN, K. J.; BENFIELD, P. "Eptastigmine" *CNS Drugs*, **9**, (1), 69-75, 1998.
27. COREY-BLOOM, J.; ANAND, R.; VEACH, J. "A Randomized Trial Evaluating The Efficacy And Safety Of ENA 713 (Rivastigmine Tartrate), A New Acetylcholinesterase Inhibitor, In Patients With Mild To Moderately Severe Alzheimer's Disease" *Int. J. Geriatr. Psychopharmacol.*, **1**, 55-65, 1998.
28. HAYES, K. C. "The Use Of 4-Aminopyridine (Fampridine) In Demyelinating Disorders" *Drug Rev.*, **10**, 295-316, 2004.
29. MERT, T.; GUNES, Y.; GUNAY, I. "Role of 4-aminopyridine-sensitive Potassium Channels In Peripheral Antinociception" *Euro. J. of Pharm.*, **572**, (2-3), 138-141, 2007.
30. WULFF, H.; ZHOROV, B. "K<sup>+</sup> Channel Modulators For The Treatment Of Neurological Disorders And Autoimmune Diseases" *Chem. Rev.*, **108**, (5), 1744-1773, 2008.
31. HAN, Y. F.; CRYSTAL, P. L. L.; WANG, H.; PANG, Y. P.; CARLIER, P. R. "Dual-Site Binding Of Bivalent 4-Aminopyridine- And 4-Aminoquinoline-Based Ache Inhibitors: Contribution Of The Hydrophobic Alkylene Tether To Monomer And Dimer Affinities" *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, (11), 2569-2575, 1999.
32. MÜLLER, M.; DIERKES, P. W.; SCHLUE, W. R. "Ionic Mechanism Of 4-Aminopyridine Action On Leech Neuropile Glial Cells" *Brain Res.*, **826**, (1), 63-73, 1999.
33. BOSTOCK, H.; SEARS, T. A.; SHERRATT, R. M. "The Effects Of 4-Aminopyridine And Tetraethylammonium Ions On Normal And Demyelinated Mammalian Nerve Fibres" *J. Physiol.*, **313**, (1), 301-315.
34. TARG, F. E.; KOCSIS, J. D. "Action Potential Characteristics Of Demyelinated Rat Sciatic Nerve Following Application Of 4-Aminopyridine" *Brain Res.*, **363**, (1), 1-9, 1986.
35. STEFOSKI, F. A.; DAVIS, M. F.; SCHAUF, C. L. "4-Aminopyridine Improves Clinical Signs In Multiple Sclerosis" *Ann. Neurol.*, **21**, (1), 71-77, 1987.
36. POTTER, P. J.; HAYES, K. C.; HSIEH, J. T. C.; DELANEY, G. A.; SEGAL, J. L. "Sustained Improvements In Neurological Function In Spinal Cord Injured Patients Treated With Oral 4-Aminopyridine: Three Cases" *Spinal Cord.*, **36**, 147-155, 1998.
37. CARDENAS, D. D.; DITUNNO, J.; GRAZIANI, V.; JACKSON, A. B.; LAMMERTSE, D.; POTTER, P.; SIPSKI, M.; COHEN, R.; BLIGHT, A. R. "Phase 2 Trial Of Sustained-release Fampridine In Chronic Spinal Cord Injury" *Spinal Cord.*, **45**, 158-168, 2006.
38. MELLA, M.; IZZO, L. "Structural Properties Of Hydrophilic Polymeric Chains Bearing Covalently-Linked, Hydrophobic Substituents: Exploring The Effects Of Chain Length, Fractional Loading And Hydrophobic Interaction Strength With Coarse Grained Potentials And Monte Carlo Simulations" *Polymer*, **51**, (15), 3582-3589.
39. AMANN, L. C.; GANDAL, M. J.; LIN, R.; LIANG, Y.; SIEGEL, S. J. "In Vitro-In Vivo Correlations Of Scalable PLGA-Risperidone Implants For The Treatment Of Schizophrenia" *Pharm. Res.*, **27**, (8), 1730-1737, 2010.

40. DAS, M.; SANSON, N.; FAVA, D.; KUMACHEVA, E. "Microgels Loaded With Gold Nanorods: Photothermally Triggered Volume Transitions Under Physiological Conditions" *Langmuir*, **23**, (1), 196-201.
41. SCHROEDER, I. Z.; FRANKE, P.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M. "Development And Characterization Of Film Forming Polymeric Solutions For Skin Drug Delivery" *Euro. J. of Pharm. And Biopharm.*, **65**, (1), 111-121, 2007.
42. ANDERBERG, P. I.; HARDING, M. M.; LUCK, I. J.; TURNER, P. "Ruthenium Complexes Of Analogues Of The Antitumor Antibiotic Streptonigrin" *Inorg. Chem.*, **41**, (6), 1365-1371, 2002.
43. HOUTEN, B. V.; ILLENYE, S.; QU, Y.; FARRELL, N. "Homodinuclear (Pt,Pt) And Heterodinuclear (Ru,Pt) Metal Compounds As DNA-Protein Cross-Linking Agents: Potential Suicide DNA Lesions" *Biochem.*, **32**, (44), 11794-11801, 1993.
44. SRIDHAR, B.; RAVIKUMAR, K.; KRISHNAN, H.; SINGH, A. N. "Multicomponent Crystals Of Erlotinib" *Acta Crystallo. Sec. C*, **66**, (1), 33-38, 2010.
45. HE, H.; MORELY, J. E.; LOPEZ, E. S.; BOTTENUS, B.; MONTAJANO, M.; FUGATE, G. A.; TWAMLEY, B.; BENNY, P. D. "Synthesis And Characterization Of Nonsteroidal-Linked  $M(\text{CO})_3^+$  ( $M = {}^{99m}\text{Tc}$ , Re) Compounds Based On The Androgen Receptor Targeting Molecule Flutamide" *Bioconjugate Chem.*, **20**, (1), 78-86, 2009.
46. HUSIAN, k.; ABID, M.; AZAM, A. "Novel Pd(II) Complexes Of 1-N-Substituted 3-phenyl-2-pyrazoline Derivatives And Evaluation Of Antiamoebic Activity" *Euro. J. of Med. Chem.*, **43**, (2), 393-403.
47. KAPLAN, J. H.; FORBUSH, B.; HOFFMAN, J. F. "Rapid Photolytic Release Of Adenosine 5'-triphosphate From A Protected Analog: Utilization By The Sodium:Potassium Pump Of Human Red Blood Cell Ghosts" *Biochem.*, **17**, (10), 1929-1935, 1978.
48. GOROSTIZA, P.; ISACOFF, E. "Optical Switches And Triggers For The Manipulation Of Ion Channels And Pores" *Mol. BioSyst.*, **3**, 686-704, 2007.
49. JURIS, A.; BALZANI, V.; BARIGELLETTI, F.; CAMPAGNA, S.; BELSER, P.; ZELEWSKY, A. "Ru(II) Polypyridine Complexes: Photophysics, Photochemistry, Electrochemistry, And Chemiluminescence" *Coord. Chem. Rev.*, **84**, 85-277, 1988.
50. DURHAM, B.; WALSH, J. L.; CARTER, C. L.; MEYER, T. J. "Synthetic Applications Of Photosubstitution Reactions Of Poly(pyridyl) Complex Of Ruthenium (II)" *Inorg. Chem.*, **19**, (4), 860-865, 1980.
51. YANG, X. J.; JANIAC, C.; HEINZE, J.; DREPPER, F.; MAYER, P.; PIOTROWSKI, H.; KLÜFERS, P. "Heteroleptic 5,5'-Disubstituted-2,2'-Bipyridine Complexes Of Ruthenium(II): Spectral, Electrochemical, And Structural Investigations" *Inorg. Chim. Acta*, **318**, (1-2), 103-116, 2001.
52. CLARKE, M. J. "Ruthenium Metallopharmaceuticals" *Coord. Chem. Rev.*, **236**, (1-2), 209-233, 2003.
53. JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K. "Antitumour Metal Compounds: More Than Theme And Variations" *Dalton Trans.*, (12), 183-184, 2008.
54. GAO, H.; LEI, L.; LIU, J.; KONG, Q.; CHEM, X.; HU, Z. "The Study On The Interaction Between Human Serum Albumin And A New Reagent With Antitumour

Activity By Spectrophotometric Methods" *J. Photochem. and Photobiol A: Chem.*, **167**, (2-3), 213-221, 2004.

55. LEHRER, S. S. "Solute Perturbation Of Protein Fluorescence. Quenching Of The Tryptophyl Fluorescence Of Model Compounds And Of Lysozyme By Iodide Ion" *Biochem.*, **10**, (17), 3254-3263, 1971.

56. CAMILO, M. R. *Compostos de Metais de Transição Neuroativos: Investigação Fotoquímicas, Fotofísicas, Físico-Químicas e Citotoxicidade para Drogas Neuroativas em Fase III*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 120p.

57. CARDOSO, C. R. *Complexos de Metais de Transição para o Desenvolvimento de Novas Drogas Neuroativas*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 107p.

58. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. "A New And Rapid Colorimetric Determination Of Acetylcholinesterase Activity" *Biochem. Pharm.*, **7**, (2), 88-90, 1961.

59. GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N. "Resorufin Butyrate And Indoxyl Acetate As Fluorogenic Substrates For Cholinesterase" *Anal. Chem.* **37**, (1), 120-123, 1965.

60. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, *Gaussian, Inc.*, Pittsburgh PA, 2003.

61. ALLOUCHE, A. L.; *Gabedit 2.2.0 - A graphical user interface for computational chemistry softwares*, *J. of Comp. Chem.*, **110**, 2010.

62. SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. "Mixed Phosphine 2,2'-bipyridine Complexes of Ruthenium" *Inorg. Chem.*, **17**, (12), 3334-3341, 1978.

63. JOHNSON, E. C.; SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; ADEYEMI, S. A.; MEYER, T. L. "Synthesis And Properties Of The Chloro-Bridged Dimer  $[(bpy)_2RuCl]_2^{2+}$  And Its Transient 3+ Mixed-Valence Ion" *Inorg. Chem.*, **17**, (8), 2211-2215.

64. 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" *Inorg. Chem.*, **22** (12), 1761-1765, 1983.

65. WATSON, R. T.; JACKSON, J. L.; HARPER, J. D.; KANE-MAGUIRE, K. A.; KANE-MAGUIRE, L. A. P.; KANE-MAGUIRE, N. A. P. "The Resolution Of cis- $[Ru(phen)_2(CH_3CN)_2]^{2+}$  (phen = 1,10-phenanthroline), And Its Use In The Synthesis

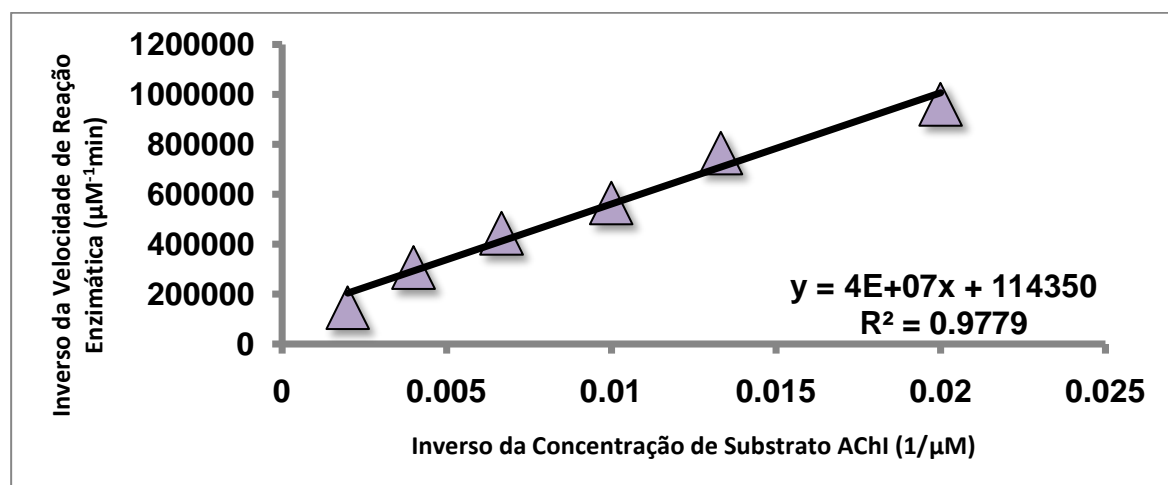
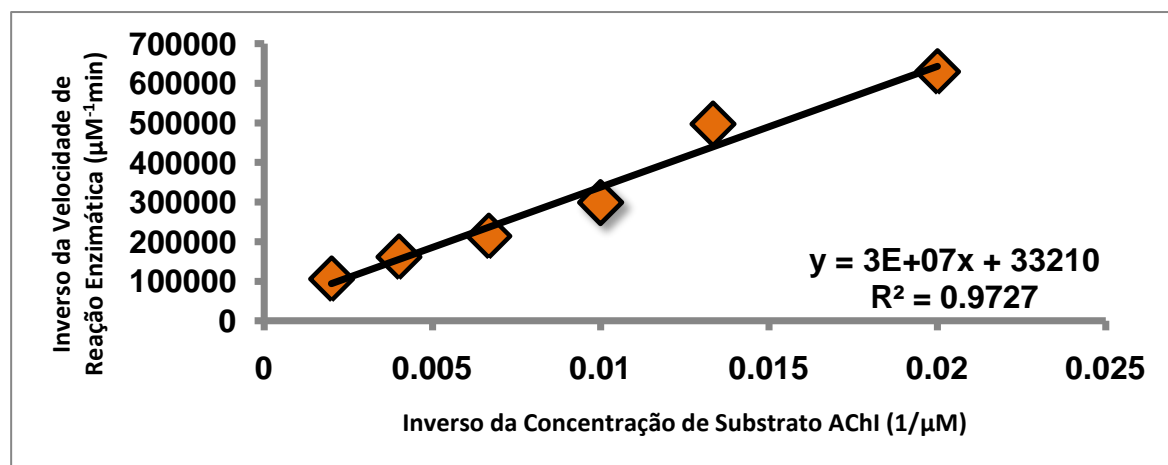
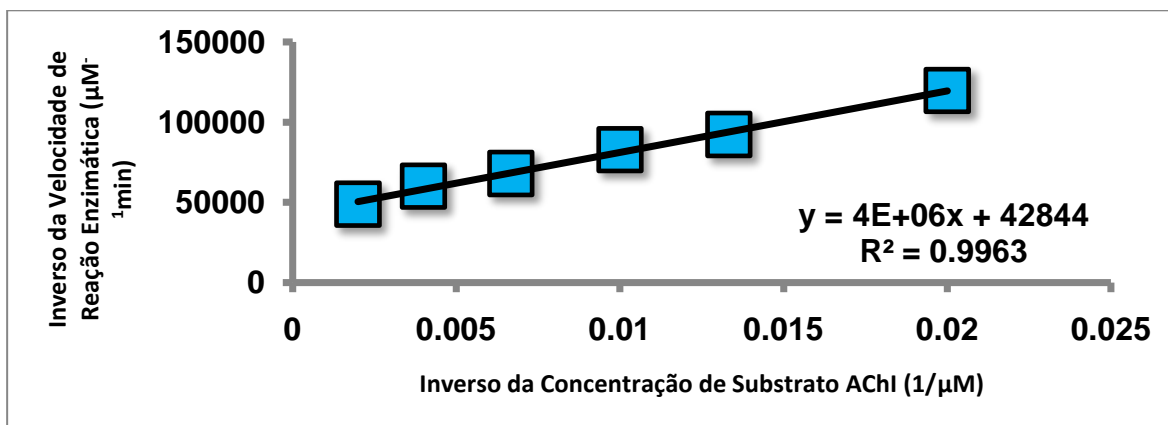


- Of Chiral *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>X<sub>2</sub>]<sup>N+</sup> Species (N = 0, 2; X = CN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, py)" *Inorg. Chim. Acta*, **249**, (1), 5-7, 1996.
66. ELLMAN, G. L. "Tissue Sulfhydryl Groups" *Arch. Of Biochem. And Biophys.*, **82**, (1), 70-77, 1959.
67. BECKE, A. D. "Density-Functional Exchange-Energy Approximation With Correct Asymptotic Behavior" *Phys. Rev.*, **38**, 3098-3100, 1988.
68. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. "Development Of The Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula Into A Functional Of The Electron Density" *Phys. Rev. B.*, **37**, 785-789, 1988.
69. HAY, J. P.; WADT, W. R. "Ab Initio Effective Core Potentials For Molecular Calculations. Potentials For The Transition Metal Atoms Sc To Hg" *J. Chem. Phys.*, **82**, 270-283, 1985.
70. HAY, J. P.; WADT, W. R. "Ab Initio Effective Core Potentials For Molecular Calculations. Potentials For The Transition Metal Atoms Na To Bi" *J. Chem. Phys.*, **82**, 284-298, 1985.
71. SCOTT, A. P.; RADOM, L. "Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation Of Hartree Fock, Møller Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, And Semiempirical Scale Factors" *J. Phys. Chem.*, **100**, 16502-16513, 1996.
72. LI, W.; WANG, Y.; YANG, L.; SZEGHALMI, A.; YE, Y.; MA, J.; LUO, M.; HU, J.; KIEFER, W. "Spectroscopic And Computational Studies On Self-Assembly Complexes Of bis(pyrrol-2-ylmethyleneamine) Ligands Linked By Alkyl Spacers With Cu(II)" *J. Raman Spectrosc.*, **38**, 483-495, 2007.
73. O'BOYLE, N. M.; TENDERHOLT, A. L.; LANGNER, K. M. "CCLIB: A Library For Package-Independent Computational Chemistry Algorithms" *J. of Comp. Chem.*, **29**, (5), 839-845.
74. <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1QTI>> acessado em 23 de Agosto de 2010.
75. BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D.; DRUNEN, R. "GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation" *Comp. Phys. Comm.*, **91**, (1-3), 43-56, 1995.
76. GERLOCH, M.; CONSTABLE, E. C. *Transition Metal Chemistry: The Valence Shell in d-Block Chemistry*, 1a ed. VCH, 1990. 219p.
77. KETLE, S. F. A. *Physical Inorganic Chemistry: A Coordination Chemistry Approach*, 1a ed. Oxford, Oxford University Press, 2001. 512p.
78. OLIVEIRA, G. M. "Espectroscopia Vibracional: Sistemática Para O Cálculo Dos Estiramentos CO De Complexos Carbonílicos E Determinação Da Sua Atividade IV e Raman" *Quím. Nova*, **25**, (4), 10845-10855.
79. ZOBI, F. "Parametrization Of The Contribution Of Mono And Bidentate Ligands On The Symmetric C≡O Stretching Frequency Of fac-[Re(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> Complexes" *Inorg. Chem.*, **48**, (22), 10845-10855.
80. RILLEMA, D. P.; ALLEN, G.; MEYER, T. J.; CONRAD, D. "Redox Properties Of Ruthenium(II) Tris Chelate Complexes Containing The Ligands 2,2'-bipyrazine, 2,2'-bipyridine, And 2,2'-bipyrimidine" *Inorg. Chem.*, **22**, (11), 1617-1622, 1983.

81. BUTLER, I. R.; CULLEN, W. R.; KIM, T. J.; RETTIG, S. J.; TROTTER, J. "1,1'-Bis(alkylarylphosphino)ferrocenes: Synthesis, Metal Complex Formation, And Crystal Structure Of Three Metal Complexes Of  $Fe(\eta^5-C_5H_4PPh_2)_2$ " *Organomet.*, **4**, (6), 972-980, 1985.
82. GUILLON, T.; BOGGIO-PASQUA, M.; ALARY, F.; HEULLY, J. L.; LEBON, E.; SUTRA, P.; IGAU, A. "Theoretical Investigation On The Photophysical Properties Of Model Ruthenium Complexes With Diazabutadiene Ligands  $[Ru(bpy)_{3-x}(dab)_x]^{2+}$  ( $x = 1-3$ )" *Inorg. Chem.*, **49**, (19), 8862-8872, 2010.
83. ALARY, F.; HEULLY, L.; BIJEIRE, L.; VICENDO, P. "Is The  $^3MLCT$  The Only Photoreactive State Of Polypyridyl Complexes?" *Inorg. Chem.*, **46**, (8), 3154-3165, 2007.
84. ALARY, F.; BOGGIO-PASQUA, M.; HEULLY, J. L.; MARSDEN, C. J.; VICENDO, P. "Theoretical Characterization Of The Lowest Triplet Excited States Of The Tris-(1,4,5,8-tetraazaphenanthrene) Ruthenium Dication Complex" *Inorg. Chem.*, **47**, (12), 5259-5266, 2008.
85. HODGE, A. S.; HUMPHREY, D. R.; ROSENBERRY, T. L. "Ambenonium Is A Rapidly Reversible Noncovalent Inhibitor Of Acetylcholinesterase, With One Of The Highest Known Affinities" *Mol. Pharmacol.*, **41**, 937-942.
86. DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; ROGERS, W. P.; KOCH, J. H. "Biological Activity Of Complex Ions" *Nature*, **170**, 190-191.
87. LEE, B. H.; PARK, M. B.; YU, B. S. "Inhibition Of Electrically Acetylcholinesterase By Porphin Compounds" *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, **8**, (12), 1467-1470, 1998.
88. 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" *Inorg. Chem.*, **47**, (12), 5030-5032, 2008.
89. SUGIMOTO, H.; LIMURA, 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" *J. Med. Chem.*, **38**, (24), 4821-4829, 1995.

## APÊNDICE 1

Segue abaixo o gráfico de regressão linear obtido para o experimento de determinação de parâmetros de Michaelis-Menten, para 0; 1,85 e 7,4  $\mu\text{M}$  do complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(4\text{apy})_2]^{2+}$  respectivamente.



## APÊNDICE 2

Os gráficos a seguir exibem os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os complexos III, IV, VI e 4-aminopiridina, a partir das medidas de regressão polinomial de segunda ordem. Respectivamente os complexos III, IV, VI para as células do tipo 3T3, e para os complexos III, IV, VI e 4-aminopiridina livre com células do tipo NG97.

