

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio-nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagens de células tumorais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de **Doutor em Ciências**

Área de Concentração: **Química e Física Biológica**

Orientada: Tassiele Andréa Heinrich

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Heinrich, Tassiele Andréa

Compostos doadores de óxido nítrico com centro metálico de rutênio: caracterização química, fotoquímica e avaliação da atividade de morte celular mediada pela terapia fotodinâmica em linhagem de células tumorais.

Ribeirão Preto, 2013.

159 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: da Silva, Roberto Santana

1. Óxido nítrico. 2. Morte celular. 3. Complexos rutênio-nitrosilo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tassiele Andréa Heinrich

Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio-nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagens de células tumorais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Lauri Júlio Heinrich e Rita Cortese Heinrich e ao meu irmão, Tassiano A. Heinrich, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Vocês são meu exemplo de perseverança, dignidade e coragem de sempre. Obrigada pela confiança depositada em mim, pelo amor e pela certeza de estarem ao meu lado em qualquer circunstância. Amo vocês!

Ao meu namorado, Vinicius Santos Carossini, pelo conforto de poder sentir em cada abraço, em cada momento juntos, a certeza de um companheiro para todas as horas. Pela paciência, confiança, amizade e amor. Você é muito importante para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Santana da Silva pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pelas oportunidades que me foram concedidas, pela orientação, pelo exemplo da consciência crítica científica e pelo entusiasmo pela pesquisa que nunca nos deixa abater. Muito obrigada.

Aos colaboradores deste trabalho: Profa. Dra. Renata Vianna Lopez (FCFRP) e alunos, pela colaboração do desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas. Ao Prof. Dr. Anderson de Oliveira (FFCLRP) e alunos pela colaboração nos ensaios de metabolismo. À Profa. Dra. Andréia Leopoldino (FCFRP) e alunas, em especial a Camila Matsumoto, pela colaboração nos experimentos de sinalização celular. Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco e alunos pela colaboração e discussão dos experimentos. Aproveito para agradecer pelas discussões sempre proveitosas e contribuições científicas acerca dos resultados obtidos. Obrigada também por cederem gentilmente o espaço de seus laboratórios para que fosse possível a realização dos experimentos.

My special thanks to Dr. Jon Fukuto and his wife, Kate Farrell for the wonderful hospitality during my time spent at Sonoma State University. Dr. Fukuto, I'm grateful for all the group meetings and discussion with you, your students and Dr. Joseph Lin that contributed a lot to my research experience. It was a great pleasure be around and learn about your research. I thank all Chemistry Department of Sonoma State University and Cathi, secretary of the Department, for all support. Thanks so much.

Às minhas eternas amigas-irmãs Cristiane de Oliveira, Diane Guzi e Vanessa Martins Hissanaga pelo incentivo de sempre e, acima de tudo, por acreditarem em mim (mesmo a quilômetros de distância!). À minha querida amiga Maurette dos Reis Vieira Fernandes, pelo apoio de sempre em toda a fase do doutorado. O caminho foi muito mais bonito com a sua amizade ao meu lado. Obrigada pelos momentos de descontração. É para sempre, amiga!

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório, as pós-doutorandas Andréia Maurin, Joicy Santamalvina, Fabiana de Oliveira, Simone Cicillini, por todo o apoio. Aos mestrandos e doutorandos Jorge Fernandes, Laísa Negri, Lilian Franco, Loyanne Ramos e Maíta Santos e às alunas de iniciação científica Stephanie Zoltay, Mariana Costa e, em especial às IC's Camila Vieira e Renata da Silveira com quem tive a oportunidade de trabalhar em colaboração e aprender também. Obrigada sempre pela disposição em ajudar, pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração.

À Juliana Cristina Moraes e ao Clóvis Júnior pela colaboração, organização e administração técnica do laboratório para a realização dos experimentos.

A todos os professores, funcionários e técnicos da FCFRP – RP.

À Coordenação do Programa e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FCFRP, em especial à Rosana Florêncio e Eleni Angeli pelos esclarecimentos acerca da pós-graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, CAPES, CNPq pelo apoio financeiro essencial para a concretização deste trabalho.

À FAPESP pela concessão das minhas bolsas de doutorado (Processo 2008/09935-4) e doutorado sanduíche (Processo 2011/21882-6).

RESUMO

HEINRICH, T. A. Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio-nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagens de células tumorais. 2013. 159f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro biológico que tem importância vital em muitos processos fisiológicos, tais como o controle cardiovascular, sinalização neural e defesa contra microrganismos e tumores. No entanto, a formação de outras espécies reativas, resultantes de reações químicas do NO com o ambiente biológico, impõe limites para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos em possíveis respostas biológicas. Devido ao potencial farmacológico e aos benefícios do NO, é de interesse o desenvolvimento de compostos que, quando estimulados, possam liberar esta molécula de forma controlada. Uma das possibilidades envolve complexos rutênio-nitrosilo termodinamicamente estáveis, mas que possam ser ativos sob estimulação. Este trabalho apresenta observações recentes de complexos rutênio-nitrosilo como agentes liberadores de NO e seus efeitos sobre linhagens de células B16-F10, L929 e Jukart. Para entender melhor o efeito NO como agente anticancerígeno o complexo $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]Cl_3$ foi utilizado como agente doador de NO. O efeito biológico do composto, bem como o do seu produto após liberação de NO - $[Ru(H_2O)(bdqi)(terpy)]^{2+}$ - foi avaliado pelos aspectos químicos e fotoquímicos. Os resultados mostraram que o NO, oriundo deste sistema, apresentou baixa citotoxicidade em células B16-F10. A atividade citotóxica foi maior quando o complexo foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas, diminuindo a viabilidade celular para cerca de 50 %. Além disso, sugere-se um efeito sinérgico da espécie aquo-rutênio, cuja viabilidade celular foi diminuída para 25% após 24 horas de incubação com este complexo. O efeito sinérgico do oxigênio singuleto e NO foi também avaliado mediante a possibilidade de aplicação em terapia clínica. A produção de espécies radicalares de oxigênio tem sido utilizada para o tratamento do câncer, numa técnica conhecida como terapia fotodinâmica (TFD). O sucesso dessa terapia depende da concentração de oxigênio, e quando em hipoxia, geralmente culmina na formação reduzida de espécies reativas de oxigênio e consequente limitação clínica da TFD. Um dos objetivos deste trabalho é a avaliação do efeito sinérgico entre oxigênio singuleto e NO. Para fins destes estudos, a espécie trinuclear $\{[Ru(NO)(bpy)_2\}_2RuPc(pz)_2\}(PF_6)_6$ (**I**) foi sintetizada e proposta como fotogeradora de oxigênio singuleto e NO. Ensaios fotobiológicos utilizando (**I**) a 0,4 μM , em células B16-F10, resultaram na diminuição da viabilidade celular para 30% sob irradiação luminosa em 660 nm, ao final de 4 horas. Por outro lado, sem fotoestímulo e na mesma concentração do composto (**I**), a viabilidade celular foi de 90%. Estudos relacionados ao mecanismo de morte celular em consequência da ação do oxigênio singuleto e NO gerados pelo composto (**I**) também foram discutidos neste trabalho. A possibilidade de aplicação de um sistema como o descrito em (**I**) no tratamento contra o câncer pode ser considerado interessante na terapia fotodinâmica.

Palavras-chaves: óxido nítrico, morte celular, complexos rutênio-nitrosilo, fotobiologia.

ABSTRACT

HEINRICH, T. A. **Chemical, photochemical and photobiological aspects of a nitrosyl ruthenium complex as a nitric oxide precursor. Principles of application as cytotoxic agent for tumor cell lines.** 2013. 159f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Nitric oxide (NO) is a biological messenger that has vital importance in many physiological processes, such as cardiovascular control, the neural signaling and defense against microorganisms and tumors. However, the formation of other reactive species, resulting from chemical reactions of NO with the biological environment, imposes limits on the understanding of the possible cellular mechanisms involved in biological responses. Due to potential pharmacological and benefits of NO, there is a need for development of compounds that can stabilize the NO until it's released. One possibility involves nitrosyl ruthenium complexes thermodynamically stable but activated under stimulation. In this work, the focus is on our recent investigations of nitrosyl ruthenium complexes as NO-delivery agents and their effects on B16-F10, L929 and Jukart cell lines. The high affinity of ruthenium for NO is a marked feature of its chemistry. To better understand the NO effect as anticancer agent it was used $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$ complex as NO delivery agent. The biological effect of that nitrosyl compound and its subproduct after NO release - $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ - was evaluated as well as their chemical and photochemical studies. The results lead to the conclusion that NO released from $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ has low cytotoxicity effect in B16-F10 cell line but, when it is entrapped in solid lipid nanoparticles, this system is improved and cell viability decreases to 50 %. This effect seems to be dependent on cellular uptake of nitrosyl ruthenium complex. It is also suggested the synergistic activity of the aquoruthenium species once its cell viability decreases to around 25 % after 24 h of incubation with this complex. Synergistic effect of NO and singlet oxygen was also evaluated as a possibility to clinical therapy. Radical oxygen species generation has been used for cancer treatment in clinical therapy known as Photodynamic Therapy (PDT). The success of this therapy depends on oxygen concentration, and hypoxia usually culminates in diminished formation of reactive oxygen species triggering clinical failure of PDT. One of the aims of this thesis is propose synergistic effect of singlet oxygen and NO since it displays antitumor character depending on the NO concentration as an attempt to improve PDT. To this end, the trinuclear species $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\}(\text{PF}_6)_6$ (**I**) was synthesized and it has been proposed as NO and singlet oxygen photogenerator. Photobiological assays using (**I**) at 0,4 μM in B16F10 cell line decreases cell viability to around 30 % under light irradiation at 660 nm, while at the same concentration of compound, without light (**I**) shows 90 % of cell viability. Studies concerning to cell death mechanism of this compound is also discussed in this work. The potential application of a system like (**I**) in clinical therapy against cancer must be considered an upgrade for photodynamic therapy.

Keywords: nitric oxide, cell death, nitrosyl ruthenium complexes, photobiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos gerais do melanoma. O melanoma deriva dos melanócitos (em detalhe à esquerda), células da pele responsáveis pela produção de melanina relacionada à pigmentação da pele. À direita, quando se comparam as camadas da pele normal e a com melanoma, percebe-se que a pele normal, o tecido adiposo e o músculo são saudáveis. Na imagem com melanoma (direita inferior), é mostrado o melanoma em estágio invasivo	3
Figura 2. Localização seletiva do fotossensibilizador para uso em Terapia Fotodinâmica.....	5
Figura 3. Ilustração do processo de sensibilização de um fotossensibilizador após absorção de luz, baseado no Diagrama de Jablonski. FS = fotossensibilizador; ISC = conversão intersistema	6
Figura 4. Características do processo de morte celular por apoptose, necrose e autofagia, induzidas pelo dano oxidativo em decorrência da Terapia Fotodinâmica. Apoptose inclui condensação da cromatina, retração celular e uma formação marginal na periferia nuclear com eventual formação de corpos apoptóticos, que contêm organelas, citosol e fragmentos nucleares e são fagocitados sem causar inflamação. As células necróticas tornam-se porosas e são rompidas com extravasamento do seu conteúdo resultando em inflamação	14
Figura 5. Representação esquemática das vias de morte celular possíveis, após Terapia Fotodinâmica. Os alvos moleculares das EROs geradas pela TFD são dependentes da localização do fotossensibilizador. Quando na membrana, o fotossensibilizador leva à ativação de caspase-8 que ativa a liberação de citocromo c do interior mitocondrial para o citoplasma, com posterior ativação de caspases, o que pode levar à clivagem de PARP, na fase final da apoptose. Se na mitocôndria, o fotossensibilizador pode levar à apoptose por ativação das caspases de maneira rápida. Bcl-2 pode regular as respostas que levam também à clivagem de PARP, na fase final da apoptose	16
Figura 6. Efeitos pró- e antiapoptóticos do óxido nítrico dependentes da concentração desta molécula.....	20
Figura 7. Curva de calibração do NOmeter para solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4.....	35
Figura 8. Representação estrutural dos compostos derivados de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) após a geração de oxigênio singuleto	36
Figura 9. Representação de uma partícula lipídica sólida.....	39
Figura 10. Curva de concentrações do complexo rutênio-nitrosilo para comparativo nos cálculos de eficiência de encapsulação.....	41
Figura 11. Representação da reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais	46

Figura 12. Representação da reação de redução do MTS a formazan por enzimas mitocondriais	47
Figura 13. Caminho percorrido por DAF-2DA para ser incorporado à célula. DAF-2DA é permeável a membrana celular e rapidamente entra na célula. No citoplasma celular é hidrolisada por esterases liberando o DAF-2 livre.....	48
Figura 14. Espectro de absorção na região do UV-visível do precursor [RuCl ₃ (terpy)], em tampão fosfato salino pH 7,4.....	56
Figura 15. Espectro de absorção na região do UV-visível do precursor [Ru(H ₂ O)(bdqi)(terpy)] ²⁺ , tampão fosfato salino pH 7,4.....	56
Figura 16. Espectro de absorção na região do UV-visível do produto final [Ru(NO)(bdqi)(terpy)] ³⁺ , em tampão fosfato salino pH 7,4	58
Figura 17. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo [Ru(NO)(bdqi)(terpy)] ³⁺ (1,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹), em solução tampão fosfato salino pH 7,4, irradiado em 532 nm durante, aproximadamente, 13 minutos	60
Figura 18. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo [Ru(NO)(bdqi)(terpy)] ³⁺ (1,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹), em solução tampão fosfato salino pH 7,4, irradiado em 447 nm durante, aproximadamente, 6 minutos	60
Figura 19. Variação espectral na região do UV-visível do complexo [Ru(NO)(bdqi)(terpy)] ³⁺ , em solução tampão fosfato salino pH 7,4, durante a fotólise em 447 nm	62
Figura 20. Cromatograma do complexo de [Ru(H ₂ O)(bdqi)(terpy)] ²⁺ . Coluna C18 e fase móvel composta por solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 :70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Concentração do complexo 1,0 mg.mL ⁻¹	65
Figura 21. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra controle 1. É denominado controle a amostra da reação que contém todos os reagentes, exceto os cofatores. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL.....	67
Figura 22. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra controle 2. É denominado controle a amostra da reação que contém todos os reagentes, exceto os cofatores. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL.....	68
Figura 23. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra controle 3. É denominado controle a amostra da reação que contém todos os reagentes, exceto os cofatores. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Temperatura Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL	69

Figura 24. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra 1, depois da reação conforme descrito no esquema 5. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL.....	70
Figura 25. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra 2, depois da reação conforme descrito no esquema 5. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1%) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL.....	71
Figura 26. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra 3, depois da reação conforme descrito no esquema 5. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1%) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL.....	72
Figura 27. Avaliação do efeito citotóxico dos complexos mononucleares de rutênio $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, aqui denominado Terpy(H_2O) e $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, aqui denominado Terpy(NO), em linhagem de células tumorais B16-F10. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * p< 0,05, ** p< 0,01 quando comparados ao controle.....	75
Figura 28. Concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) em células de melanoma murino B16-F10 carregadas com DAF-2 DA (5 µM) após tratamento com $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$. Imagens sequenciais da fluorescência de DAF-2T nas células tumorais foram gravadas depois da adição do composto $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ aos 100 segundos. A intensidade das cores indica a maior $[\text{NO}]_c$ (como mostrada na barra a esquerda) de n=5.....	77
Figura 29. Efeito citotóxico do complexo mononuclear de rutênio $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ em solução e encapsulado em NLS (5 µM) em linhagem de células tumorais B16-F10. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * p< 0,05 e ** p< 0,01.....	82
Figura 30. Fragmento $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]^{+1}$, m/z 775,14, no espectro de massas em modo positivo com ionização por elétron spray (ESI -MS ⁺).	86
Figura 31. Fragmento $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bpy})_2\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]\text{H}_2\text{O}$, m/z 1223,14, no espectro de massa no modo positivo com ionização por elétron spray (ESI-MS ⁺).	87
Figura 32. Representação da estrutura molecular ORTEP para complexo precursor $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$	88
Figura 33. Espectro de absorção na região do UV- visível para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$..	93
Figura 34. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$	94

Figura 35. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$	95
Figura 36. Espectros na região do infravermelho, em pastilha de KBr, dos complexos $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ (preto) e $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$ (vermelho).....	96
Figura 37. Representação esquemática baseado no Diagrama de Jablonski ilustrando os processos de transição do fotossensibilizador após a absorção da luz. A= absorção de energia, F= fluorescência, ISC = cruzamento intersistemas, P = fosforescência, FS = fotossensibilizador.	98
Figura 38. Espectros de absorbância (verde), excitação (azul; $\lambda_{\text{máx}}= 645 \text{ nm}$) e emissão (vermelho; $\lambda_{\text{máx}}= 690 \text{ nm}$), fendas de λ_{ex} e $\lambda_{\text{em}}= 5 \text{ nm}$, do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$ em acetonitrila.....	98
Figura 39. Curva de decaimento de fluorescência do estado excitado para o complexo trinuclear $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$ em acetonitrila; $\lambda_{\text{em}}= 630 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{ex}}= 665 \text{ nm}$	99
Figura 40. Espectros sucessivos obtidos na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$, em clorofórmio, após pulso de energia em 660 nm. Tempo de fotólise: 0 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s e 60 s.	101
Figura 41. Variação espectral na região do UV-visível do complexo e $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$, em $\text{H}_2\text{O:DMSO}$ (5:2) após pulso de energia em 660 nm. Tempo de fotólise: 0 s, 30 s, 60 s, 90 s e 120 s..	102
Figura 42. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo e $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$. [complexo] $\cong 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em solução $\text{H}_2\text{O:DMSO}$ (5:2), durante 20 minutos de irradiação em λ_{irr} 660 nm.	104
Figura 43. Análises qualitativas da liberação cronoamperométrica de NO a partir da ação redutimétrica do amalgama de Cd (em A) do ácido ascórbico (em B) para complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$	105
Figura 44. Espectro de absorção do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$ em acetonitrila e na presença de DPBF após sucessivas irradiações (2 segundos) com laser de diodo em 660 nm.	106
Figura 45. Efeito do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$ na viabilidade celular de células não tumorais de fibroblasto murino (L929), avaliado por MTT. As células foram tratadas e pré-incubadas por 4 horas e 24 horas com o complexo trinuclear de rutênio nas concentrações de 0,04; 0,4 e 4 μM . Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicita e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle.....	108
Figura 46. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$, em DMSO:RPMI. Tempo de irradiação aleatório $\lambda_{\text{irr}}= 390 \text{ nm}$ (luz LED).	110

- Figura 47.** Efeito citotóxico do complexo $[\{Ru(NO)(bpy_2)\}_2RuPc(pz)_2]^{6+}$ em linhagem de células tumorais Jurkat. As células de leucemia humana foram tratadas com o composto e incubadas por diferentes períodos com o composto e sem fotoestímulo. Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * p< 0,05; ** p< 0,01 e *** p< 0,001 em relação ao controle..... 111
- Figura 48.** Efeito citotóxico do complexo $[\{Ru(NO)(bpy_2)\}_2RuPc(pz)_2]^{6+}$ em linhagem de células tumorais Jurkat. As células de leucemia foram tratadas com o composto e imediatamente irradiadas com fonte luminosa descrita para cada situação (A, B, C e D). Após 4 horas de contato com a droga, adicionou-se MTS para a avaliação de viabilidade celular. Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * p< 0,05 de C e D em relação a A na concentração de 0,4 μ M..... 113
- Figura 49.** Efeito citotóxico do complexo $[\{Ru(NO)(bpy_2)\}_2RuPc(pz)_2]^{6+}$ em linhagem de células tumorais Jurkat. As células de leucemia foram tratadas com o composto e imediatamente irradiadas com fonte luminosa em 390 nm. Após o período de 4 horas, as células foram irradiadas com a luz em 650 nm na dose de 5 J/cm². Após este período, adicionou-se MTS para a avaliação de viabilidade celular. Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * p< 0,05 em relação ao controle..... 114
- Figura 50.** Estrutura química do SNAP, um doador clássico de óxido nítrico..... 115
- Figura 51.** Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo das células Jurkat submetidas ao tratamento com o veículo (DMSO), com os compostos trinuclear e o doador de óxido nítrico SNAP. As células foram tratadas, irradiadas com luz em 650 nm e incubadas por 4 horas para avaliação dos efeitos celulares das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. Leitura de 10.000 eventos..... 116
- Figura 52.** Estrutura química do dietilamina NONOate (DEA/NO), um doador de óxido nítrico..... 117
- Figura 53.** Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo das células Jurkat submetidas ao tratamento com o veículo (DMSO), com os compostos trinuclear e o doador de óxido nítrico DEA/NO. As células foram tratadas, irradiadas com luz em 650 nm e incubadas por 4 horas para avaliação dos efeitos celulares das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. Leitura de 10.000 eventos..... 118
- Figura 54.** Efeito citotóxico do complexo $[\{Ru(NO)(bpy_2)\}_2RuPc(pz)_2]^{6+}$ em linhagem de células tumorais B16-F10. As células de melanoma murino foram tratadas e pré-incubadas com o complexo por 4 horas antes do fotoestímulo. O tempo de resposta no escuro foi de 4, 24 ou 48 horas. Fotoestímulo em comprimento de onda de 660 nm e dose de 5 J/cm². Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. ** p< 0,01 para comparação entre os grupos com e sem fotoestímulo..... 120

Figura 55. *Western blotting* para análise do nível e *status* de fosforilação das proteínas PTEN, Akt e ERK após TFD nas células B16-F10, modelo de melanoma murino. Os anticorpos primários usados no WB são indicados para cada figura, na qual: CC – células irradiadas, mas sem composto; CD – células irradiadas e tratadas com o veículo DMSO; CT – células irradiadas e tratadas com o composto na concentração de 0,4 μ M; EC – células sem fotoestímulo e sem composto; ED – células sem fotoestímulo e tratadas com o veículo DMSO; ET – células sem fotoestímulo e tratadas com o composto na concentração de 0,4 μ M. A proteína β -actina foi usada como proteína constitutiva (controle de carregamento no gel)..... 124

Figura 56. *Western blotting* para determinação da clivagem/ativação da caspase-3 e da PARP após TFD em células B16-F10, modelo de melanoma murino. Os anticorpos primários usados no WB são descritos para cada figura, na qual: To – células sem tratamento e sem fotoestímulo. As demais amostras equivalem ao tempo (30 e 120 minutos) de incubação após a TFD no caso do fotoestímulo e amostras sem fotoestímulo. A concentração do composto usado em todos os tratamentos foi de 0,4 μ M; CC – células com fotoestímulo e sem composto; CD – células com fotoestímulo e tratadas com o veículo DMSO; ED – células sem fotoestímulo e tratadas com veículo DMSO..... 126

Figura 57. Microscopia confocal das células B16-F10 expostas ao tratamento do complexo $[\{Ru(NO)(bpy_2\}^{\text{2+}})_2RuPc(pz)_2]^{6+}$. Em A) células sem tratamento, ou seja, o controle. Em B) Células com 4 horas de incubação, sem fotoestímulo. Em C) Células após 1 hora de TFD, fotoestimuladas com laser em 660 nm. Em D) células ampliadas com características apoptóticas (corpos apoptóticos) e com indícios da presença do composto em tom vermelho. 128

Figura 58. Microscopia de FLIM (imagem de tempo de vida de fluorescência, em inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) das células B16-F10 expostas ao tratamento do complexo $[\{Ru(NO)(bpy_2\}^{\text{2+}})_2RuPc(pz)_2]^{6+}$. Em A) amostra controle, ou seja, células não tratadas com o composto. Em B) células tratadas com o complexo por 4 horas. Em C) células 1 hora após TFD com estímulo luminoso em 660 nm.... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de reagentes para a síntese dos complexos de rutênio	25
Tabela 2 – Dados de UV-visível para os complexos mononucleares [Ru(H ₂ O)(bdqi)(terpy)] ²⁺ e [Ru(NO)(bdqi)(terpy)] ³⁺	58
Tabela 3 – Condições avaliadas para cromatografia de alta eficiência	64
Tabela 4 – Diâmetro médio, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta obtidos para NLS com e sem complexo rutênio-nitrosilo. Resultados representativos de uma das três sínteses das NLSs	80
Tabela 5 – Resultados de microanálise para os complexos de rutênio	84
Tabela 6 – Dados dos parâmetros cristalográficos de [Ru(Pc)(pz) ₂] a 25 °C.....	89
Tabela 7 – Comprimento as ligações [Å] e ângulos [°] para o complexo [Ru(Pc)(pz) ₂].....	89
Tabela 8 – Resultados de análises de espectros na região UV-visível para os complexos de rutênio.....	95
Tabela 9 – Dados espectrais de absorção, emissão e excitação para o complexo [{Ru(NO)(bpy) ₂ } ₂ RuPc(pz) ₂] ⁶⁺	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
bdqi	Benzoquinonadiimina
bpy	2, 2'-bipiridina
BSA	Albumina de Soro Bovino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAF-2DA	Diaminofluoresceina – 2 diacetato
DEA	Dietilamina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , meio de cultura
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracetato
EE	Eficiência de encapsulação
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	Espectroscopia de massas por ionização de eletrospray
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FRED	Fator de relaxamento endotélio dependente
FS	Fotosensibilizador

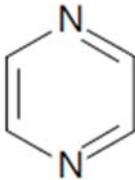
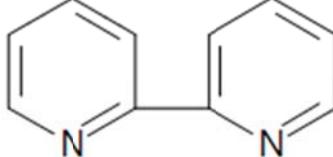
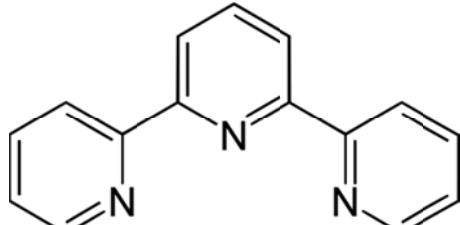
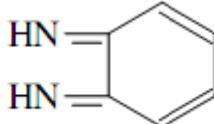
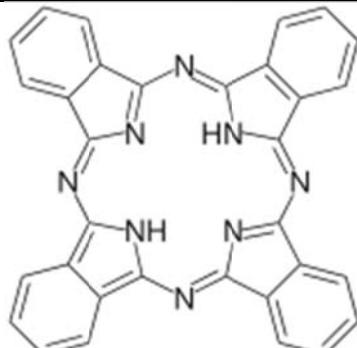
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
IGG	Imunoglobulina G
ISC	Conversão intersistemas
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
NOSn	Óxido nítrico sintase neural
ns	Nanossegundos
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	Solução fosfato salino tamponada
Pc	Ftalocianina
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
pz	Pirazina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; meio de cultura
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicilamina
SPAD	<i>Single Photon Avalanche Diodes</i>

TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCML	Transferência de carga metal ligante
terpy	2,2': 6'', 2'' - terpiridina
TFD	Terapia fotodinâmica
vs	<i>versus</i>
WB	<i>Western Blotting</i>

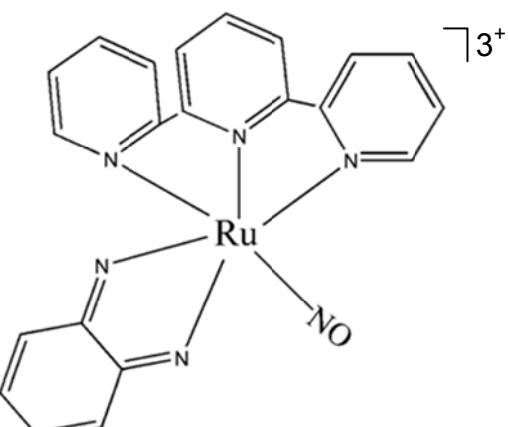
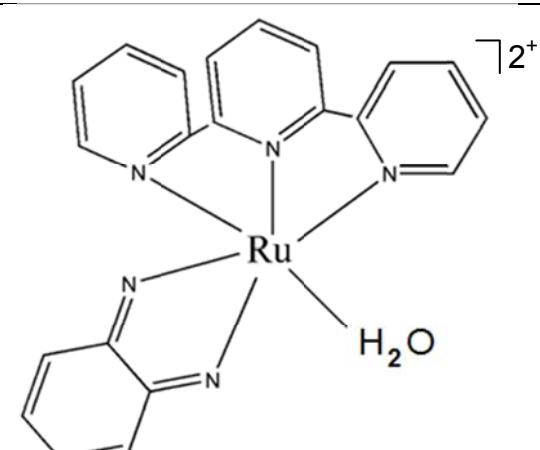
LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar ($\text{mol cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$)
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singlet
λ	Comprimento de onda (nm)
λ_{irr}	Comprimento de onda de irradiação (nm)
τ_F	Tempo de meia vida de fluorescência
$\nu(\text{NO})$	Frequência da banda de estiramento da ligação N-O na região do infravermelho (cm^{-1})
$[\text{NO}]_c$	Concentração citosólica de NO

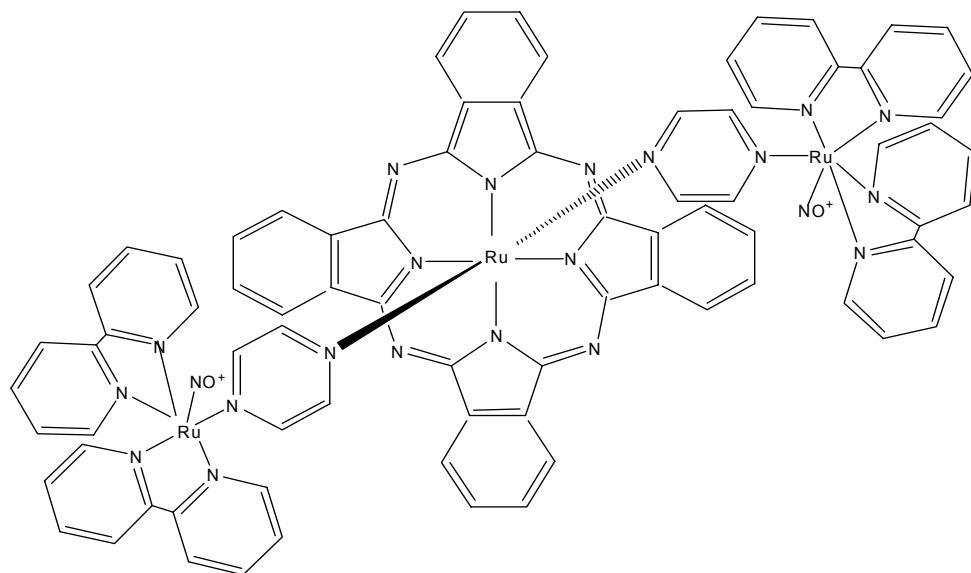
ESTRUTURA QUÍMICA DOS LIGANTES

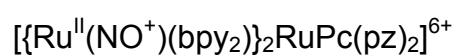
Estrutura	Nome e Abreviatura
	pirazina (pz)
	2, 2'-bipyridina (bpy)
	2,2': 6'', 2'' – terpiridina (terpy)
	benzoquinonadiimina (bdqi)
	ftalocianina (Pc)

ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPLEXOS MONONUCLEARES ESTUDADOS

ESTRUTURA	FÓRMULA
	$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^+)(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$
	$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$

ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPLEXO TRINUCLEAR ESTUDADO

ESTRUTURA

FÓRMULA

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais do câncer.....	2
1.2 Terapias contra o câncer	3
1.2.1 A Terapia Fotodinâmica para o tratamento do câncer.....	4
1.3 Complexos metálicos (compostos de coordenação).....	8
1.4 Agentes doadores de óxido nítrico.....	10
1.5 Morte celular	13
1.5.1 Morte celular e a terapia fotodinâmica.....	17
1.5.2 Efeitos do óxido nítrico na morte celular.....	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Reagentes	25
3.1.1 Síntese do complexo mononuclear [Ru(NO)(bdqi)(terpy)]Cl ₃	26
3.1.2 Síntese do complexo trinuclear [{Ru(bpy) ₂ }NO] ₂ (pz)RuPc(pz)][PF ₆] ₆	28
3.2 Medidas de pH.....	31
3.3 Análise elementar	31
3.4 Espectrometria de massas	31
3.5 Determinação das estruturas cristalinas	32
3.6 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível	32
3.7 Espectroscopia na região do infravermelho	32
3.8 Espectroscopia de luminescência e tempo de meia vida.....	32

3.9	Estudos fotoquímicos e fotofísicos.....	33
3.9.1	Irradiação dos complexos	33
3.9.2	Determinação amperométrica do NO liberado (NOmeter).....	34
3.9.3	Calibração do NOmeter	34
3.10	Determinação da produção de oxigênio singlet.....	35
3.11	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	37
3.11.1	Materiais e equipamentos utilizados na separação do complexo [Ru(H ₂ O)(bdqi)(terpy)] ²⁺ por CLAE	37
3.11.2	Estudos preliminares de metabolismo <i>in vitro</i>	37
3.12	Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....	39
3.12.1	Espectroscopia de espalhamento de luz	40
3.12.2	Determinação do potencial zeta	40
3.12.3	Eficiência de encapsulação	40
3.13	Estudos de atividades biológicas	42
3.13.1	Cultura de células	42
3.13.2	Ensaios de citotoxicidade	44
3.13.3	Análise da viabilidade celular	45
3.14	Determinação da concentração citosólica de NO	47
3.15	Avaliação da indução de morte celular por citometria de fluxo	49
3.16	Ensaio de extração de proteínas totais e <i>Western Blotting</i> (WB)	49
3.17	Sublocalização celular	51
3.18	Análise estatística	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
	Parte I: Complexos mononucleares de rutênio.....	55
4.1	Caracterização dos complexos mononucleares de rutênio.....	55
4.1.1	Espectroscopia na região do UV-visível	55
4.1.2	Medida de liberação de NO	59
4.1.3	Cálculo da concentração de NO liberada	61
4.1.4	Fotólise	62
4.2	Ensaios de biotransformação (metabolismo <i>in vitro</i>)	64
4.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	64
4.3	Citotoxicidade dos compostos mononucleares	74
4.4	Desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....	78
4.4.1	Espectroscopia de espalhamento de luz e determinação do potencial zeta...	80

4.4.2	Eficiência de encapsulação	81
4.4.3	Citotoxicidade do composto nanoencapsulado	81
	Parte II: Complexo nitrosilo trinuclear de rutênio-ftalocianina.....	84
4.5	Síntese e caracterização do complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina	84
4.5.1	Análise elementar	84
4.5.2	Espectrometria de massas	85
4.5.3	Espectroscopia por Raios-X	88
4.5.4	Espectroscopia na região do UV-visível	92
4.5.5	Espectroscopia na região do infravermelho.....	96
4.5.6	Espectroscopia de luminescência.....	97
4.5.7	Tempo de vida de fluorescência no estado excitado	99
4.5.8	Estudos fotoquímicos	101
4.5.9	Análise redutimétrica da liberação do NO	104
4.5.10	Determinação da geração de oxigênio singuleto	105
4.6	Citotoxicidade	107
4.6.1	Células L929.....	107
4.6.2	Células Jurkat.....	109
4.6.3	Células B16-F10	119
4.7	Ensaios de sublocalização celular	127
	5 CONCLUSÕES.....	132
	REFERÊNCIAS.....	135
	APÊNDICES	158

Este trabalho de doutorado tem como objetivo contribuir com o entendimento da síntese, caracterização e aplicação biológica de compostos contendo rutênio como íon metálico de transição. Nesta experiência, um novo complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina, como um protótipo de composto para ser usado na Terapia Fotodinâmica, foi sintetizado. Paralelamente, outras espécies contendo rutênio, cujas atividades biológicas não são centradas no efeito da irradiação luminosa, também foram exploradas com estudos concernentes aos seus efeitos como doadores de óxido nítrico, citotoxicidade e avaliação em sistemas de nanopartículas. Essas espécies químicas serão importantes para compreensão de como as espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio podem contribuir para a morte de células tumorais. O caráter multidisciplinar desses estudos proporcionou o intercâmbio de conhecimentos com pesquisadores de diferentes universidades, as quais se incluem Sonoma State University (SSU) e University of California (UCSF) nos EUA, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), Faculdade de Ciências Filosofia e Letras de Ribeirão Preto (FCFLRP) e Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer

O processo de sobrevivência dos organismos é dado por uma série de reações de divisão e multiplicação das células, a partir de células preexistentes. A multiplicação celular é uma sequência de eventos ordenados que a natureza, em situações normais, é capaz de regular de maneira eficaz, desde a divisão até a morte celular. A sobrevivência de cada espécie dos organismos vivos abrange uma cascata de eventos celulares complexos que envolvem proteínas, enzimas, ativação de fatores de crescimento, regulação na expressão de oncogenes e controle de genes supressores de tumores. Entretanto, quando dessa divisão surgem células anormais, cuja multiplicação é descontrolada, sem que haja um mecanismo de controle dessa proliferação, por meio da morte celular programada (apoptose), pode haver a formação de aglomerados celulares com capacidade para se expandirem para tecidos vizinhos, formando tumores (ou neoplasmas) (ALBERTS et al., 2002). Essa massa de células malignas contorna os mecanismos de defesa do organismo, podendo desencadear o câncer.

Uma das formas bastante agressivas de câncer de pele, que tem se agravado nos últimos anos, é o melanoma, neoplasia derivada dos melanócitos. Embora esse seja o câncer responsável por aproximadamente 4 % de todos os casos, ele causa cerca de 79 % de morte relacionadas a essa patologia (BALDEA; FILIP, 2012) e 1 % do total de mortes no Brasil (MENDES; KOIFMAN; KOIFMAN, 2010). A ocorrência do melanoma se processa inicialmente na pele, razão pela qual a estrutura deste órgão deve ser observada nos processos de difusão do câncer. Apesar das causas oriundas do melanoma, o número de casos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (INCA, 2013). Sua principal forma de tratamento ainda é a remoção cirúrgica, uma vez que melanomas apresentam resistência para alguns tipos de drogas usadas na quimioterapia (intervenção por compostos químicos). Nesse sentido, a terapia fotodinâmica mostra-se interessante até mesmo como uma terapia coadjuvante, uma vez que seus efeitos adversos esperados são mínimos.

A camada de células da parte basal da epiderme, células essas chamadas melanócitos, produzem um pigmento de cor marrom a preto (melanina) que determina a cor da pele, do cabelo e pelos dos organismos vivos (Figura 1). A

melanina também ajuda a proteger contra os raios solares, principais fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento do melanoma. Dentre eles, o raio UVA (320 – 400 nm) apresenta-se entre os raios solares que mais conseguem penetrar na pele, desencadeando respostas mais agressivas (GARIBYAN; FISHER, 2010). Quando os melanócitos crescem controladamente, dá-se início a uma lesão benigna, conhecida como mancha ou nevos. Entretanto, os melanócitos podem crescer de maneira descontrolada, podendo se transformar em uma lesão maligna, o melanoma.

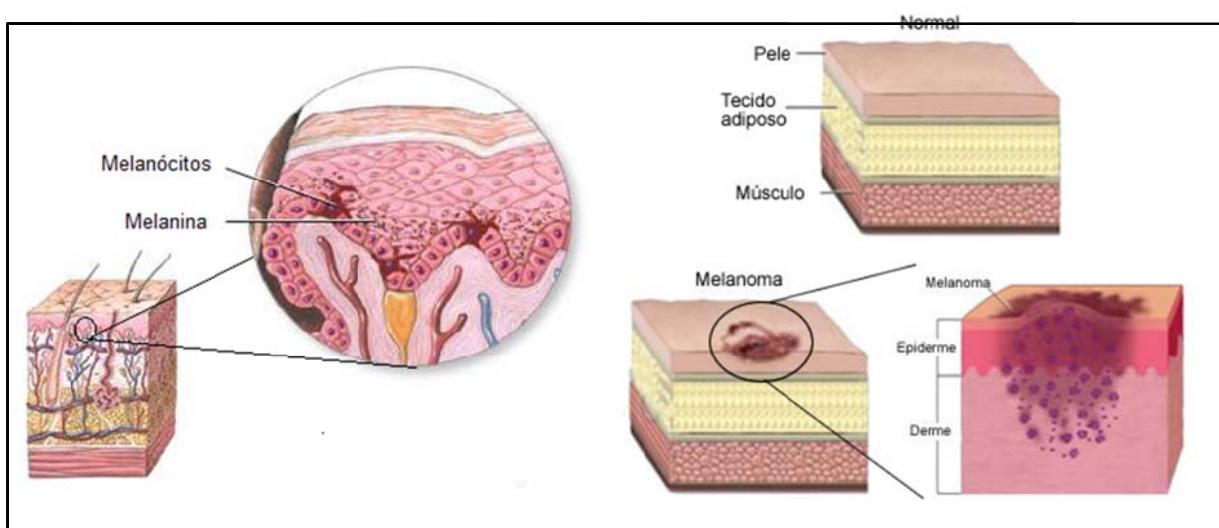


Figura 1. Aspectos gerais do melanoma. O melanoma deriva dos melanócitos (em detalhe à esquerda), células da pele responsáveis pela produção de melanina relacionada à pigmentação da pele. À direita, quando se comparam as camadas da pele normal e a com melanoma, percebe-se que a pele normal, o tecido adiposo e o músculo são saudáveis. Na imagem com melanoma (direita inferior), é mostrado o melanoma em estágio invasivo

Fonte: adaptado de *Nucleus Medical Media* (2013).

1.2 Terapias contra o câncer

No decorrer dos últimos anos, o câncer tem sido uma das maiores causas de morte, ultrapassando outras enfermidades como as doenças cardiovasculares e as infecciosas. As causas para essa tendência são a soma de vários fatores, entre eles os hábitos de vida, como tabagismo e alcoolismo, além do aumento da expectativa de vida da população, que vem contribuindo para essas evidências. Dentre as alternativas para o tratamento de outros tipos de câncer, além do melanoma,

destacam-se a radioterapia, a remoção cirúrgica e a quimioterapia (DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Ainda, pesquisas têm mostrado grande interesse e também preocupação pela busca por novas metodologias e novos compostos que possam ser usados na terapia contra o câncer. Dentre essas, pode-se destacar a Terapia Fotodinâmica (TFD), que é descrita como uma técnica pouco invasiva e que pode apresentar efeitos colaterais mínimos (DAVIDS; KLEEMANN, 2011; OCHSNER, 1996; TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003). Por suas vantagens, a TFD já foi aprovada pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) como tratamento não só para o câncer mas, também, para outras doenças como vitiligo (COLUCCI; LOTTI; MORETTI, 2012), psoríase (COLLINS et al., 1997), infecções virais e bacterianas na pele, assim como seus processos inflamatórios relacionados, como a acne (BABILAS et al., 2010; RIDDLE et al., 2009). Além disso, tem sido bastante explorado o uso dessa terapia para tratamentos estéticos como no rejuvenescimento e na dermatologia cosmética (BRUSCINO et al., 2010).

1.2.1 A Terapia Fotodinâmica para o tratamento do câncer

A TFD é uma modalidade médica de terapia de neoplasias que emprega combinação de luz e fármaco, a fim de se obter um efeito citotóxico ou um efeito modificador ao câncer, ou a qualquer outro tecido indesejável (DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY, 1984; DOUGHERTY, 1995). Isso se deve ao modo de ação duplo-seletivo, ou seja, uma droga fotossensibilizante e de baixa toxicidade é administrada ao organismo. Quando a droga atinge uma razão apropriada de acúmulo em tecidos lesados, em relação ao tecido saudável, uma dose de luz regulada na faixa de 600 a 850 nm (chamada janela terapêutica) é incidida sobre o tecido lesado. A luz ativa a droga e desencadeia sua ação tóxica (DAVIDS; KLEEMANN, 2011; PLAETZER et al., 2009).

A TFD tem sido relatada como uma terapia de sucesso e clinicamente aprovada para o tratamento de neoplasias não malignas (TAUB, 2007) e malignas, em diferentes regiões do organismo, tais como cabeça e pescoço, esôfago, pulmão, bexiga e também no tratamento de câncer de pele, inclusive casos recorrentes e metastáticos (AYARU; BOWN; PEREIRA, 2005; BALDEA; FILIP, 2012; NAVA et al., 2011; QUON et al., 2011).

Considera-se a TFD uma modalidade seletiva já que se faz necessária a existência simultânea de três componentes: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular (AGOSTINIS et al., 2011; DAVIDS; KLEEMANN, 2011). A efetividade da TFD é dependente da concentração de oxigênio e pode decair em condições de hipóxia tecidual. A ausência de qualquer um dos três fatores descritos inviabiliza a toxicidade da TFD, tornando essa modalidade de terapia segura, com efeitos adversos mínimos ao paciente e com fácil controle de um três fatores, se necessário. Sendo assim, as principais vantagens da TFD sobre os outros tratamentos do câncer como a quimioterapia, cirurgia, radioterapia e imunoterapia é o fato de que aquela terapia clínica agrupa as seguintes características: i) baixa toxicidade sistêmica, com fácil eliminação do organismo; ii) capacidade para destruir seletivamente o tumor, salvando as células saudáveis que o circundam e iii) pode ser usada como uma terapia única ou em combinação com outras terapias usadas e citadas acima (DAVIDS; KLEEMANN, 2011).

O mecanismo de atuação da TFD pode ocorrer por meio de dano oxidativo a componentes celulares como consequência da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), principalmente o oxigênio singuleto (${}^1\text{O}_2$). Após a injeção endovenosa ou aplicação local do fotossensibilizador há acúmulo no tecido tumoral (Figura 2), podendo haver internalização do mesmo para o ambiente intracelular ou ficar aderido à membrana plasmática das células.

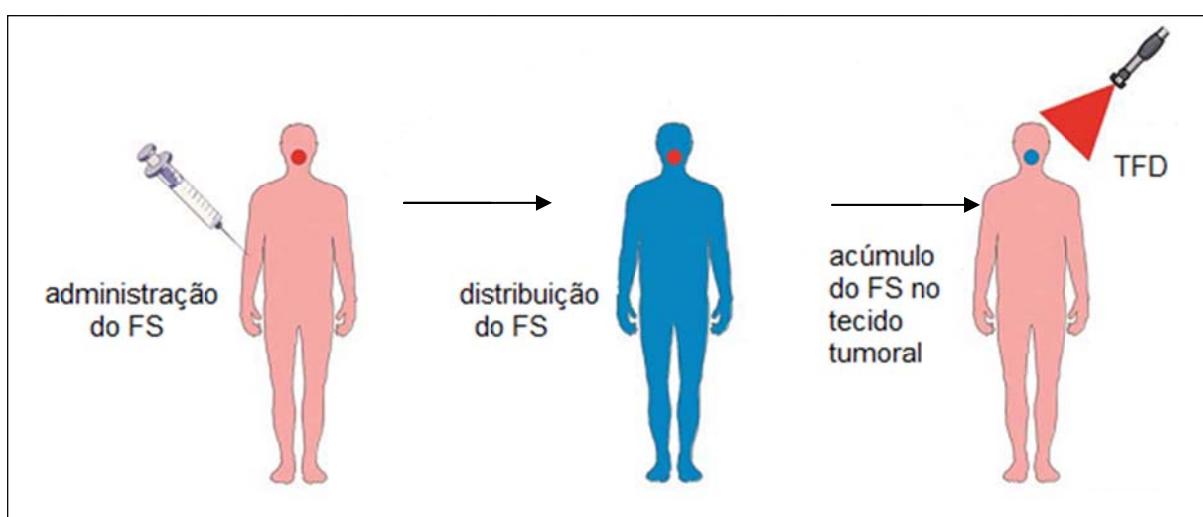


Figura 2. Localização seletiva do fotossensibilizador para uso em Terapia Fotodinâmica.

Fonte: adaptado de Agostinis et al. (2011).

Nesse estágio, o fotossensibilizador encontra-se no estado fundamental, estável, sendo conhecido como estado singlet (${}^1\text{FS}$), quando não está reagindo com componentes celulares. Assim que ocorre a irradiação tecidual em comprimento de onda específico, normalmente na região vermelha da janela terapêutica, o FS que se encontra acumulado nas células tumorais absorve a energia fornecida pela fonte luminosa, em forma de fôtons, atingindo um estado excitado tripleto (${}^3\text{FS}$) de maior energia (AGOSTINIS et al., 2011). Nesse momento, de forma muito rápida, o fotossensibilizador pode sofrer dois tipos de reações fotoenergéticas (Figura 3):

- Reação do Tipo I - o fotossensibilizador pode reagir diretamente com substratos como membrana celular ou moléculas, onde transfere um próton ou um elétron para formar radicais aniónicos ou catiônicos, respectivamente. Esses radicais podem interagir com oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Reação do Tipo II - o fotossensibilizador pode transferir sua energia diretamente ao oxigênio molecular (que, em seu estado fundamental, é tripleto), para formar oxigênio singlet excitado (${}^1\text{O}_2$).

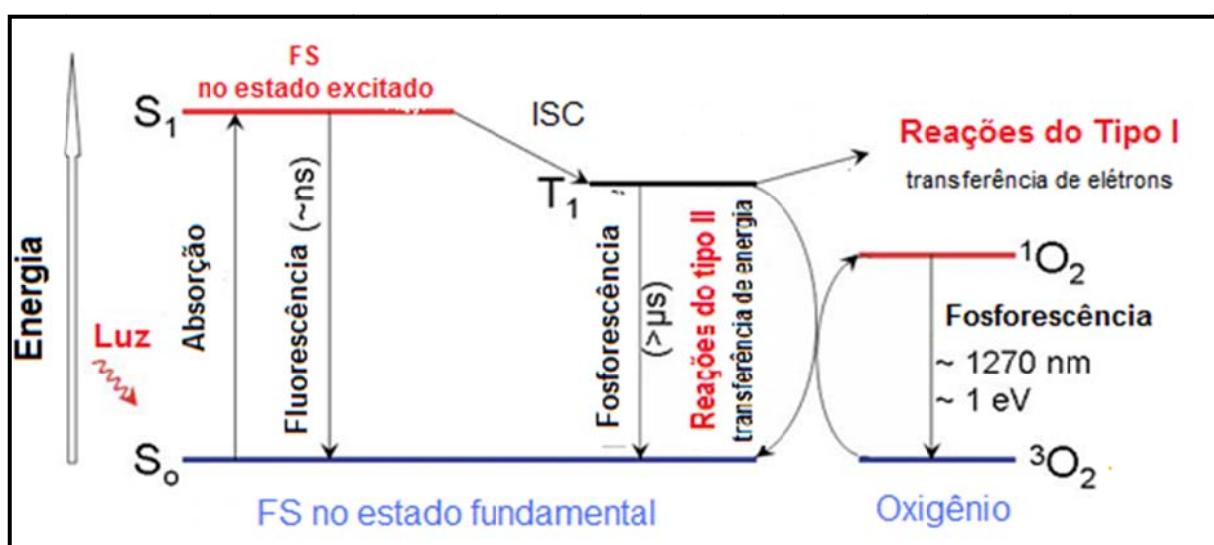


Figura 3. Ilustração do processo de sensibilização de um fotossensibilizador após absorção de luz, baseado no Diagrama de Jablonski. FS = fotossensibilizador; ISC = conversão intersistema.

Fonte: modificado de Agostinis et al. (2011).

Na reação de tipo II, as moléculas do fotossensibilizador funcionam como verdadeiros catalisadores fotoativados para a produção de ${}^1\text{O}_2$. Ressalta-se, porém,

que outras espécies podem ser formadas devido a irradiação luminosa. Uma destas possibilidades é a formação de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) (REEVES; REED; BROWN, 2009), podendo isto ter efeito corroborativo ao do ${}^1\text{O}_2$ na terapia clínica.

Os dois tipos de reações (tipo I e tipo II) podem ocorrer simultaneamente e são dependentes do fotossensibilizador utilizado, da concentração dos substratos e concentração de oxigênio. Devido à alta reatividade e ao curto período de meia-vida do ${}^1\text{O}_2$ e de outros radicais formados, as moléculas e estruturas que estão próximas às áreas de produção são diretamente afetadas durante a irradiação luminosa (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). A geração massiva de EROs promove o disparo de diversos mecanismos celulares que induzirão a morte celular direta por diferentes vias: apoptose, necrose e/ou autofagia. Isto depende do tipo de célula tratada, da concentração de fotossensibilizador empregado, da dose de fotoestímulo e da localização intracelular do fotossensibilizador. A localização intracelular do fotossensibilizador é um fator determinante importante, já que o curto tempo de vida do ${}^1\text{O}_2$, de aproximadamente 20 nanosegundos, determina o sítio primário de dano oxidativo, que corresponde a aproximadamente 40 nm de distância da sua localização intracelular inicial (HILF, 2007).

A localização intracelular pode ainda predizer a sua via de morte. Acúmulos de fotossensibilizadores em mitocôndrias estão associados à indução de apoptose celular pela liberação de citocromo c e indução de resposta, por meio da cascata de caspases. Fotossensibilizadores localizados em membranas de organelas e lisossomos tendem a ocasionar necrose devido à perda rápida de integridade de membrana, bem como à rápida depleção intracelular de ATP. Mroz e colaboradores (2011) relatam que altas doses na TFD, com alta concentração do FS e uma dose de luz alta tendem a causar necrose. É descrito, ainda, que viabilidade celular menor que 70 % é preditiva de apoptose, enquanto que a necrose é encontrada em citotoxicidade de mais de 90%.

Embora os estudos para o uso clínico da TFD estejam avançados, algumas limitações ainda são encontradas em relação ao seu uso. Dentre as desvantagens pode-se citar a baixa penetrabilidade da luz a ser usada na terapia. Dependendo do local onde o tumor se encontra, a maneira como se dará a aplicação da luz poderá ser impeditivo. Há também o fato de essa terapia não ser eficiente em casos de câncer que já tenham entrado em metástase, o que pode levar o paciente à morte

(AGOSTINIS et al., 2011). Além disso, é relacionada ao ambiente intratumoral a baixa concentração de oxigênio, um dos componentes necessários para a formação da espécie $^1\text{O}_2$, fundamental para o efeito da TFD (FINGAR et al., 1992; FREITAS; BARONZIO, 1991; HENDERSON; FINGAR, 1989). Nesse sentido, é de grande interesse a busca por alternativas para tornar essa terapia melhor aproveitada como, por exemplo, fazer uso de outros radicais (por exemplo ERNs) que possam ser gerados no tecido doente. Nesse contexto, complexos metálicos desenhados quimicamente para esse fim podem viabilizar este procedimento, sendo usados como carreadores de diferentes radicais livres.

Neste contexto e no âmbito de ampliar o conhecimento para aplicação de outros radicais em TFD, sistemas que combinam diversidade de aplicação sem grandes alterações estruturais parecem ser interessantes para estes estudos. Compostos de coordenação, dada a sua controlada reatividade, podem ser uma grande possibilidade para este fim.

1.3 Complexos metálicos (compostos de coordenação)

Os químicos definem complexos metálicos, também conhecidos como compostos de coordenação, como compostos contendo um (ou mais) metal(is) de transição, circundado por diferentes grupos de átomos ou moléculas chamados ligantes. Os ligantes estão, geralmente, ligados ao metal por uma ligação covalente coordenada, doando um par de elétrons livre para um orbital vazio do metal (IUPAC, 2013). Dessa forma, esses ligantes podem ser compostos orgânicos que ligados a um metal, geram novas estruturas que podem desempenhar diferentes atividades biológicas, como atividades citotóxicas, apoptóticas, anti-inflamatórias e bactericidas. Dependendo da estrutura química, resultante da união do ligante ao centro metálico, diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas ao complexo formado, sendo estas dependentes do tipo de metal e da natureza química do ligante.

É relatado que desde a antiguidade os metais são usados para fins terapêuticos. Desde a era antes de Cristo, o cobre era usado pelos egípcios para esterilizar a água. Árabes e chineses, há mais de 3.500 anos, usavam o ouro para tratamento de certas patologias por acreditarem que, por ser um metal precioso, traria benefícios para a saúde. O ferro já era usado como remédio no Egito, em 1.500 a.C., e o zinco para o tratamento de feridas (ORVIG; ABRAMS, 1999; SCOTT;

ORVIG, 2009). Dentro da abordagem das possíveis ações que os diferentes metais demonstram, unidos ou não a ligantes, ou em forma de sais, estão o ouro para atividade bactericida (ex.: tuberculose) e anti-inflamatória (Auranofin®); o ferro na atividade antitumoral (ex.: bleomicina) e sais de lítio para o tratamento do transtorno bipolar (COHEN, 2007; ORVIG; ABRAMS, 1999).

Em relação aos compostos sintetizados quimicamente para a terapia do câncer, o interesse pela busca por novas drogas com centros metálicos aumentou com a descoberta da ação da cisplatina [*cis*-diclorodiaminaplatina(II)], por Rosenberg e colaboradores, em 1965. Esse composto também sofreu alterações químicas em sua estrutura, com a finalidade de se formarem outras espécies (exemplo: carboplatina) que pudessem diminuir os efeitos adversos causados pela cisplatina (ANG; DYSON, 2006; KALUDEROVIĆ; PASCHKE, 2011). Desde então, complexos metálicos com centro de platina tornaram-se alvos de grande interesse pela investigação de atividade citotóxica e antitumoral. Entretanto, o conhecimento sobre a relação entre a estrutura do ligante e a citotoxicidade de complexos baseados em platina ainda não é totalmente esclarecido, mesmo que algumas regras gerais tenham sido propostas. Descobriu-se por exemplo, que a cisplatina reage com várias biomoléculas no nosso organismo, especialmente com aquelas que contêm grupos de nitrogênio e enxofre. Dessa maneira, acredita-se que deve ocorrer formação de um complexo cíclico com o DNA (HOU et al., 2009; JAMIESON; LIPPARD, 1999), o que seria responsável pela sua ação antitumoral.

Apesar do esforço dispensado pelos pesquisadores para entender como se dá o mecanismo de ação da cisplatina, desde sua interação com biomoléculas até sua possível ação intracelular, há também a preocupação com as limitações do uso desse composto devido aos seus efeitos adversos como nefro e hepatotoxicidade (LU; CEDERBAUM, 2006). A resistência desenvolvida por alguns tipos de câncer contra a cisplatina impulsionou as pesquisas pela busca por complexos que sejam constituídos por outros tipos de metais. Vários complexos com a fórmula geral $ML_2L_2'X_2$ e ou ML_2X_2 (sendo M o átomo metálico, L o ligante inerte e X o grupo lábil ou abandonador) foram sintetizados, caracterizados e testados biologicamente (LIPPARD; BERG, 1994). Dentre estes destacam-se compostos de titânio (Ti), vanádio (V), molibdênio (Mo), rênio (Re), ferro (Fe), rutênio (Ru), ósmio (Os), cobalto (Co), níquel (Ni), paládio (Pd), cobre (Cu), ouro (Au) e bismuto (Bi) (ESPÓSITO;

NAJJAR, 2002; FRIEBOLIN et al., 2005; OTT; GUST, 2007; TAN et al., 2010; VAN RIJT; SADLER, 2009).

Dentre os complexos que têm sido estudados, os compostos com rutênio como centro metálico têm recebido atenção especial. A habilidade dos complexos de rutênio em mimetizar a ligação do ferro a moléculas de importância biológica, e assim explorar os mecanismos que o corpo desenvolveu para o transporte não tóxico do ferro, é uma particularidade atrativa destes complexos (BRABEC; NOVÁKOVÁ, 2006). Em 1999, o complexo de rutênio NAMI-A (*trans*-imidazoldimetsulfoxidotetraclororutenato(II)) entrou em fase clínica de testes por demonstrar atividade antimetastática. Atualmente, completou a fase I de estudos para o ajuste de dose, estudos farmacocinéticos e análise toxicológica em 24 pacientes com diferentes tipos de câncer que não foram curados com cirurgia e quimioterapia (ALESSIO et al., 2004; BERGAMO et al., 2012; RADEMAKER-LAKHAI et al., 2004; SAVA et al., 1998). Em 2003, estudos com KP1019 [H_2ind][*trans*-RuCl₄(Hind)₂], coordenado pelo grupo de B. Keppler (Universidade de Viena, Áustria) entrou em fase I de testes clínicos por demonstrar atividade antitumoral contra câncer de cólon e consequentes metástases. Diferentes mecanismos de ação para a atividade antitumoral deste composto foram descritos como, por exemplo, a ligação com a proteína transferrina, indução apoptose pela via mitocondrial e geração de EROs (BERGAMO et al., 2012; HARTINGER et al., 2006; HARTINGER; PHILLIPS; NAZAROV, 2011).

Embora o efeito dos compostos de coordenação na citotoxicidade de células tumorais seja quase sempre condicionado ao metal, a contribuição dos ligantes parece ser um objetivo iminente. Dentre estes ligantes, o óxido nítrico é tido como de interesse para esses estudos.

1.4 Agentes doadores de óxido nítrico

Complexos metálicos podem ser desenhados e utilizados para que liberem, controladamente, a molécula de óxido nítrico. De maneira geral, isso pode se dar de duas formas: a partir de estímulos luminosos ou por ações redutimétricas, como consequência do microambiente do sistema biológico estudado (TFOUNI et al., 2012; FRY; MASCHARAK, 2011).

A hipóxia das neoplasias de grande porte constitui-se na maior barreira quanto ao sucesso da TFD como terapia efetiva na fase clínica. Com isso, há constante procura por outras espécies úteis, como radicais livres derivados dos fotossensibilizadores utilizados, bem como outras espécies radicalares independentes do oxigênio (VAUPEL; KELLEHER; HÖCKEL, 2001; FINGAR et al., 1992; YUE et al., 2013). Uma possibilidade é a utilização de compostos, como os complexos rutênio-nitrosilo, que tenham a propriedade de liberar NO (óxido nítrico), quando estimulados fotoquimicamente. O NO, além de possuir natureza radicalar, reage com o ânion superóxido (O_2^-) presente no meio e forma o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é uma espécie altamente reativa e faz parte de uma classe de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HEROLD; KOPPENOL, 2005; IGNARRO, 2000; MONCADA; BOLANOS, 2006).

O NO apresenta surpreendente onipresença em seres vivos. É a única molécula endógena conhecida que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível e de agente citotóxico. Essa molécula possui ação na regulação da pressão sanguínea, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (CULOTTA; KOSHLAND, 1992; FELDMAN; GRIFFITH; STUEHR, 1993; IGNARRO, 2000; KOVALEVA et al., 2013; REEVES et al., 2009; RICHTER-ADDO; LEGZDINS, 1992). O NO, uma das moléculas mais versáteis produzidas pelo organismo, tornou-se recentemente, matéria-prima de novos materiais destinados a serem empregados como fármacos. Como exemplo, é descrito um anti-inflamatório não esteroidal doador de NO que demonstra inibição do crescimento celular de células de câncer de pâncreas, por liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que atuam em uma via clássica de proliferação celular, a via das MAP quinases (MAPK) (ZHOU et al., 2008). Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são parte do grupo de enzimas que regulam sobrevivência, desenvolvimento e proliferação celular.

Uma das áreas de pesquisa sobre a bioquímica do NO que mais se desenvolveu nas últimas décadas é relacionada à sua ação vasodilatadora (BENDHACK et al., 2009; BONAVENTURA et al., 2006; BONAVENTURA et al., 2007; BONAVENTURA et al., 2008; BONAVENTURA et al., 2009; da ROCHA et al., 2008; da SILVA et al., 2007; de GAITANI et al., 2009; de LIMA et al., 2005; de LIMA et al., 2006; de LIMA et al., 2007; FEREZIN et al., 2005; LUNARDI et al., 2007; LUNARDI; SILVA; BENDHACK, 2009; OLIVEIRA et al., 2007; RODRIGUES et al.,

2008). Em 1987, constatou-se ser o NO um Fator de Relaxamento Endotélio Dependente (FRED). Nas células endoteliais, o NO é produzido pela isoforma da enzima constitutiva Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOSe) (MUIJSERS et al., 2001). Resumidamente, essa enzima produz NO e o aminoácido L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina e de oxigênio (O_2) presentes no meio. Há três isoformas da enzima óxido nítrico sintase: isoenzima constitutiva neuronal (NOSn), isoenzima constitutiva endotelial (NOSe) e isoenzima indutível (NOSi) (CALS-GRIERSON; ORMEROD, 2004).

Relatos demonstram que a atuação do NO em carcinogênese, progressão tumoral e terapia do câncer depende de uma variedade de condições no meio intracelular (WELLER, 2003; CHIANG et al., 2005). Sabe-se que o NO possui tanto efeito tumorigênico quanto tumoricida (KOVALEVA et al., 2013). Esse último é favorecido quando existe elevada concentração de NO no meio celular (IGNARRO, 2000; RIDNOUR et al., 2008; WINK et al., 2008). A atividade antitumoral do NO inclui inibição da proliferação, da promoção e da diferenciação de células tumorais. A ação apoptótica do NO é modulada por interações diretas e indiretas, como já descrito, sendo dose-dependente e tipo celular específica. No entanto, ao mesmo tempo em que altas concentrações de NO promovem o efeito tumoricida (morte celular), mecanismos de proteção celular antiapoptóticos (efeito tumorigênico), mediado pelo NO, vêm sendo estudados, embora ainda não completamente elucidados, como a fosforilação de ERK (proteína regulada por sinais extracelulares e membro da família das MAPK) mediada pelo aumento de GMPc em concentrações inferiores a 50 nM de NO (RIDNOUR et al., 2008; THOMAS et al., 2008).

Sob influência citotóxica do NO, as células tumorais podem morrer por apoptose ou necrose, dependendo do tipo de célula (KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Dentre as hipóteses para a elucidação dos mecanismos que envolvem o processo de apoptose, ocasionado pelo NO, destacam-se: indução da expressão de Bcl-2 que é um inibidor do processo de ativação das caspases (CALS-GRIERSON; ORMEROD, 2004), inativação de enzimas que reparam o DNA (LAVAL; WINK; LAVAL, 1997; WINK; LAVAL, 1994) e indução do fator de transcrição p53 (HOFSETH et al., 2003; THOMAS et al., 2004). Sendo assim, em algumas células o NO pode promover a apoptose enquanto em outros tipos celulares pode inibir o processo de morte celular programada (CHUNG et al., 2001; REEVES; REED; BROWN, 2009).

Em 1998, Gupta e colaboradores demonstraram a produção de NO durante o processo de fotossensibilização de células de tumor, utilizando uma ftalocianina como sensibilizador. As ftalocianinas são consideradas fotossensibilizadores de segunda geração em terapia fotodinâmica (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001). Seu uso é considerado em terapia clínica em função da alta absorvividade molar observada na região de 650 nm e longo tempo de vida no estado excitado (ordem de μ s), o que propicia formação de grande quantidade de oxigênio singuleto (NYOKONG, 2011; PLAETZER et al., 2009). Gupta e colaboradores (1998), em estudos envolvendo o uso de ftalocianina em TFD sugeriram, pela primeira vez, o envolvimento de NO em apoptose mediada pela TFD, acreditando na eficácia terapêutica da TFD com o uso de moduladores farmacológicos de NO ou NOS (Óxido Nítrico Sintase). Estudos que relacionam complexos de ftalocianina e doadores de NO têm sido relatados como importantes compostos a serem usados na TFD, uma vez que podem fazer uso de irradiação de luz em comprimentos de onda na janela terapêutica (600 a 850 nm), auxiliando na liberação do NO e aumentando a penetração na pele, o que faz da TFD uma terapia não invasiva (CARNEIRO et al., 2011; CICILLINI et al., 2009; da ROCHA et al., 2008; MARANHO et al., 2009).

1.5 Morte celular

Uma das consequências da ação de substâncias quimioterápicas pode ser o dano ao DNA para levar à morte celular. Na TFD, os fotossensibilizadores, após absorverem luz, produzem espécies reativas excitadas que, na presença de oxigênio, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio ($^1\text{O}_2$, O_2^\cdot , OH^\cdot , H_2O_2 , definidas como EROs). Essas espécies podem ter como alvo biomoléculas específicas, como lipídeos, proteínas e DNAs, podendo desencadear a morte de tais tecidos por necrose, apoptose ou autofagia celular (SANABRIA et al., 2013).

Esses eventos são, muitas vezes, relacionados ao efeito de citotoxicidade em células tumorais por diferentes drogas. No contexto de respostas do organismo às ações de quimioterápicos, há estímulos de múltiplos fatores que reconhecem a ação destas drogas, sendo que a primeira tentativa da célula é a busca pela reparação aos danos causados por estas drogas. Um importante mecanismo de ação desse tipo de droga é a indução de apoptose (morte celular programada). A morte celular

programada caracteriza-se por uma série de alterações celulares morfológicas e bioquímicas. O organismo usufrui da apoptose em diferentes momentos, fisiológicos e patológicos, sendo que o desequilíbrio entre fatores pró e antiapoptóticos contribui para o agravamento de várias doenças, como é o caso do câncer (ELMORE, 2007; MILLER; MARX, 1998). O equilíbrio entre esses fatores é de grande importância para que o organismo possa se desenvolver e se defender em situações desfavoráveis.

Múltiplos sinais modulam a proliferação, sobrevida e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência. Entretanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, levando ao desenvolvimento de tumores. Assim, aumenta a cada dia a busca por novas drogas que possam regular ou levar à morte celular programada das células tumorais. Drogas que conduzam à morte celular podem agir por estímulos tóxicos ou deletérios à célula que podem desencadear a morte celular por necrose, apoptose ou autofagia, as quais são diferenciadas pela morfologia (Figura 4) e vias bioquímicas.

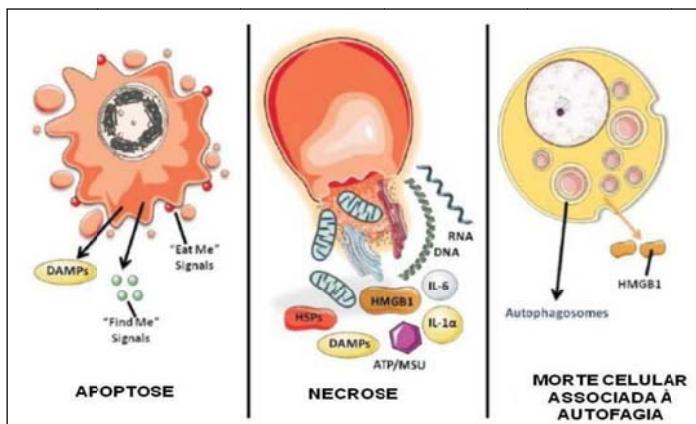


Figura 4. Características do processo de morte celular por apoptose, necrose e autofagia, induzidas pelo dano oxidativo em decorrência da Terapia Fotodinâmica. Apoptose inclui condensação da cromatina, retração celular e uma formação marginal na periferia nuclear com eventual formação de corpos apoptóticos, que contêm organelas, citosol e fragmentos nucleares e são fagocitados sem causar inflamação. As células necróticas tornam-se porosas e são rompidas com extravasamento do seu conteúdo resultando em inflamação
Fonte: modificado a partir de Agostinis et al. (2011).

A apoptose é uma forma de morte celular regulada por diferentes proteínas e é observada em resposta a numerosos estímulos (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005), dentre eles, a ação citotóxica de algumas drogas. Ela é caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de corpos apoptóticos, ativação de caspases, mas sem resposta inflamatória (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; YASUHARA et al., 2003), já que os macrófagos envolvem estas células e as eliminam. Ela pode ser desencadeada por vários estímulos, endógenos ou exógenos como, por exemplo, pela ligação de moléculas a receptores na superfície celular, pelo dano ao DNA, tratamento com agentes citotóxicos ou irradiação, pela falta de sinais antiapoptóticos, por sinais desordenados do ciclo celular ou pelo desenvolvimento de sinais pró-apoptóticos. Esses sinais que induzem a morte, vindos de formas diferentes, parecem ativar uma via comum de maquinaria celular que leva à morte celular. De maneira geral, a apoptose pode desencadear respostas celulares por duas vias (Figura 5): a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é desencadeada por sinais advindos de dentro das células ou por um estresse ao qual a célula foi submetida, como no caso de dano ao DNA. Ainda, no caso da via intrínseca, há envolvimento da mitocôndria que, pela ação de proteínas pró-apoptóticas, ativa a via das caspases que levará à morte celular (AGOSTINIS et al., 2011).

A via extrínseca é ativada quando ligantes pró-apoptóticos se ligam a receptores de morte na superfície das células (HAIL et al., 2006; HAJRA; LIU, 2004). As vias intrínseca e extrínseca convergem numa via comum de ativação de caspases (família de cisteína proteases que desempenham papel fundamental na apoptose) que levam à morte celular pela clivagem de proteínas, que são importantes para a sobrevivência das células.

A morte celular por necrose é descrita como forma agressiva de morte celular, afetando boa parte das estruturas celulares e caracterizada por inchaço da célula, destruição das organelas e extravasamento do citoplasma, tendo como uma das consequências a inflamação. Esta forma de morte tem sido, diferentemente da apoptose, relatada como um processo de morte desprogramada e acidental, geralmente causada por danos químicos e físicos à célula. A necrose, como resposta à TFD, é dependente do tipo de célula, da dose de luz empregada e da sublocalização celular do fotossensibilizador (MORZ et al., 2011; NOWIS et al., 2005).

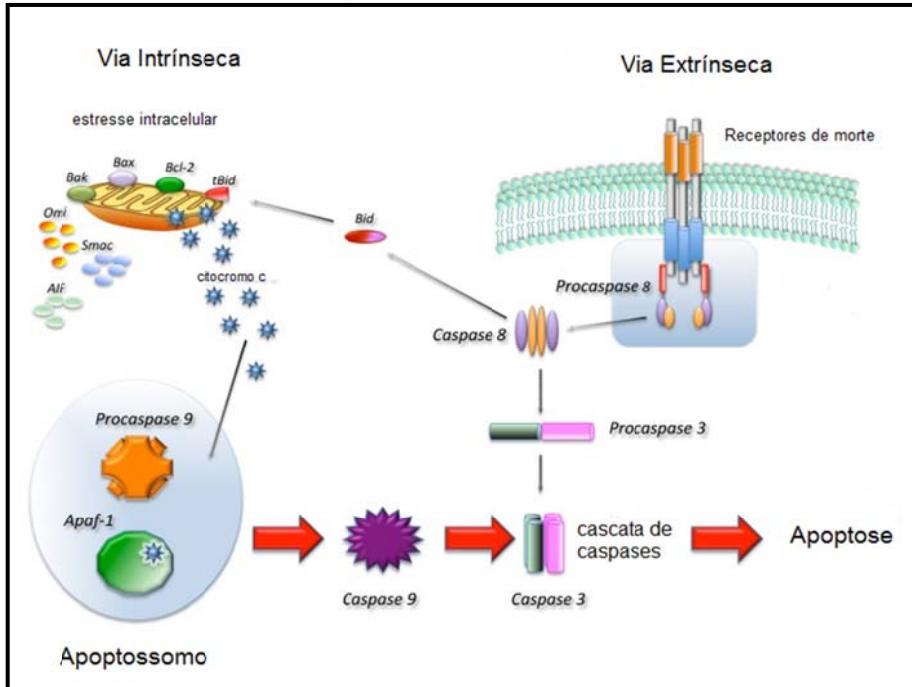


Figura 5. Representação esquemática das vias de morte celular possíveis, após Terapia Fotodinâmica. Os alvos moleculares das EROs geradas pela TFD são dependentes da localização do fotossensibilizador. Quando na membrana, o fotossensibilizador leva à ativação de caspase-8 que ativa a liberação de citocromo c do interior mitocondrial para o citoplasma, com posterior ativação de caspases, o que pode levar à clivagem de PARP, na fase final da apoptose. Se na mitocôndria, o fotossensibilizador pode levar à apoptose por ativação das caspases de maneira rápida. Bcl-2 pode regular as respostas que levam também à clivagem de PARP, na fase final da apoptose.

Fonte: adaptado de Moor (2000) e Favaloro et al. (2012).

Outro tipo de morte celular descrita é a autofagia, processo celular que permite à célula manter o equilíbrio entre a síntese, degradação e reaproveitamento dos produtos celulares. Autofagia é definida como um processo que a célula tem que destruir componentes celulares por ação de enzimas ativadas pela mesma célula, o que pode levar à morte celular. O processo envolve a formação de uma vesícula com o auxílio do retículo endoplasmático liso, sendo o alvo celular envolto por uma dupla membrana chamada de autofagossoma, criando uma vesícula que separa o que há dentro desta nova vesícula do restante do citoplasma. Essa vesícula é, então, transportada e há uma fusão com o lisossoma, cujo conteúdo é degradado pelas hidrolases lisossomais (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). A autofagia está ligada ao câncer porque descobriu-se que há uma proteína, a Beclin 1, essencial para a autofagia que é também um supressor de tumor (KANG et al., 2011). Quando relacionada à TFD, a autofagia se torna importante, principalmente no que diz

respeito à defesa das células contra os produtos celulares gerados por ações danosas das espécies reativas, geradas durante a TFD. Dependendo das espécies reativas geradas e do grau da injúria oxidativa, a TFD pode estimular a autofagia (MORZ et al., 2011).

1.5.1 Morte celular e a terapia fotodinâmica

Há anos sabe-se que a resposta de morte celular por efeito da TFD se dá via apoptose ou via necrose, embora a literatura ainda não descreva, de forma clara, como é o mecanismo de morte celular por ação da terapia fotodinâmica. Os possíveis mecanismos de morte podem estar associados ao dano direto da célula, quando há dano em suas organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático, desintegração da membrana celular, por exemplo. O dano à vasculatura que envolve o tumor também pode ser um mecanismo de morte da TFD, por falta de suprimento de nutrientes e oxigênio ao tumor (MORZ et al., 2011).

As respostas celulares, em consequência da TFD, podem ser mediadas por diferentes sinais como, por exemplo, fosforilação e desfosforilação de proteínas, alterações em mensageiros secundários como o Ca^{2+} e o AMPc e ativação de proteínas por proteases (MOOR, 2000). Como descrito anteriormente, a localização do fotossensibilizador é fator determinante para o tipo de morte e a via de sinalização a ser ativada pela resposta à TFD. Fotossensibilizadores com regiões hidrofóbicas são descritos por terem afinidade pela mitocôndria (DUMMIN; CERNAY; ZIMMERMANN, 1997), diminuindo o potencial de membrana desta organela, além de permitir a liberação do citocromo c e Ca^{2+} para o citoplasma (KESSEL; LUO, 1998; GRANVILLE et al., 1998; KESSEL; LUO, 1999; VARNES et al., 1999).

Embora não muito evidenciado e elucidado, a TFD pode causar danos ao DNA, responsável pela codificação dos genes. Qualquer dano ao DNA causa danos graves à integridade da célula. Mas, a não ser que a geração de oxigênio singuleto se dê nas proximidades do material genético, é difícil que esta espécie reativa cause dano direto ao DNA. Entretanto, como já descrito, outras espécies reativas formadas – como é o caso do radical hidroxil, peróxido de hidrogênio e o superóxido – podem ser as principais causas do dano oxidativo ao DNA. Acredita-se, porém, que os mecanismos de morte estejam mais ligados aos danos causados por essas espécies

às proteínas citoplasmáticas e à mitocôndria do que propriamente ao DNA (NOWIS et al., 2005).

Alguns pesquisadores afirmam que, dependendo do tipo de fotossensibilizador utilizado, devido à sua parte estrutural hidrofóbica, esse tem afinidade por determinada organela dentro da célula como, por exemplo a membrana mitocondrial. É descrito que fotossensibilizadores presentes na mitocôndria da célula levam à morte celular rápida por apoptose, diferentemente daqueles localizados nos lisossomas e na membrana plasmática (KESSEL, 2004). Isso porque os fotossensibilizadores presentes na mitocôndria levam à morte celular por vias específicas, como liberação de citocromo c e clivagem de caspase-3, proteína-chave para os eventos apoptóticos, além de ser responsável pela clivagem de outras proteínas que também levarão à morte celular (YOO; HA, 2012), como é o caso da PARP (poli-ADP-ribose-polimerase) envolvida nas etapas finais da apoptose. A clivagem de PARP já foi descrita para tratamento feito por uma ftalocianina de alumínio (AlPc) (MOOR, 2000).

A ativação de proteínas quinases, responsáveis pela fosforilação de outras proteínas, também pode ser uma das vias de sinalização pós-TFD. A fosforilação é uma alteração pós-traducional das proteínas e é importante mecanismo de regulação das respostas celulares. Entretanto, o entendimento da fosforilação de proteínas, após tratamento com TFD, é bastante incompleto (XUE; HE; OLEINICK, 1999). Uma das vias mais estudadas é a das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos). ERK (quinase regulada por sinais extracelulares) faz parte da família das MAPK e tem sido descrita para respostas celulares relacionadas à terapia fotodinâmica, embora os estudos ainda se mantenham inconclusivos. O descontrole do crescimento celular é um fator importante para a formação do câncer, como no caso do melanoma, por exemplo, um defeito na via das MAP/ERK é determinante para a proliferação descontrolada dessas células. Por isso, compostos que possam inibir a via das MAP/ERK podem ser considerados interessantes para serem usados como drogas antitumorais, por interferirem na inibição da proliferação das células cancerosas (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

As respostas celulares, atreladas à terapia fotodinâmica, não são simples. O estresse oxidativo, ocasionado pela resposta da ativação de fotossensibilizadores, pode desencadear respostas de diferentes genes, podendo gerar como resposta a inflamação, angiogênese, resposta imune e morte celular. Outra proteína que pode

estar associada à resposta de sobrevivência e proliferação celular de células tumorais é a Akt (BOZKULAK et al., 2007). A inativação ou ativação, por meio da fosforilação, de proteínas envolvidas na morte celular tem sido relatada como resposta ao tratamento da terapia fotodinâmica.

Dentro da complexidade das respostas celulares relacionadas à TFD, há muito que ser explorado no que tange às respostas celulares ligadas à TFD. Muitos são os interferentes nas respostas em meio biológico como, por exemplo, o fotossensibilizador a ser utilizado, a concentração do composto, a organela celular onde o composto está sublocalizado, quais as espécies reativas geradas por ele, o tempo de vida dessas espécies e seus efeitos.

1.5.2 Efeitos do óxido nítrico na morte celular

Os efeitos pró- e antiapoptóticos do NO ainda são controversos na literatura (Figura 6) (RIDNOUR et al., 2008; THOMAS et al., 2008; WINK; MITCHELL, 1998; WINK et al., 1996). Os efeitos apoptóticos parecem estar mais relacionados a condições patológicas onde o NO é produzido, endogenamente, por enzimas específicas (NOS), em concentrações altas. Os efeitos pró- e antiapoptóticos do NO parecem ser celular dependentes. Células de mastocitomas, sarcomas, melanomas e a L929 (linhagem celular de tecido conjuntivo de camundongo) são conduzidas à apoptose quando expostas ao NO, contudo, outras linhagens celulares, como A549 (linhagem celular humana de carcinoma de pulmão), exibem limitadas porcentagens de apoptose (5 a 20 %), quando expostas aos doadores químicos de NO (WINK et al., 1998).

No que tange à ação do NO em vias de morte celular, Wink e Mitchell (1998) classificaram dois tipos de ação do NO: indireta e direta. A via direta consiste na interação do NO com proteínas. A via indireta está relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro nos processos biológicos. Nessa função, o NO não depende de transportadores específicos nem de canais e passagem intracelulares; ele se difunde pela célula, com a mesma facilidade, em meio hidrofílico e em meio lipofílico. Sua ação fisiológica depende mais de suas propriedades físico-químicas do que de sua conformação espacial (FELDMAN; GRIFFITH; STUEHR, 1993). Além dessas propriedades, as ações bioquímicas são atribuídas à diversidade de suas

espécies, ou seja, a espécie NO^+ (íon nitrosônio) e a espécie NO^- (ânion nitróxido), formada pela adição de um elétron ao orbital π - antiligante (WINK et al., 1993).

Relatos demonstram que a atuação do NO em carcinogênese, progressão tumoral e terapia do câncer depende de uma variedade de condições no meio intracelular (WELLER, 2003; CHIANG et al., 2005). Sabe-se que o NO possui tanto efeito tumorigênico quanto tumoricida. Este último é favorecido quando existe uma elevada concentração de NO no meio celular (IGNARRO, 2000).

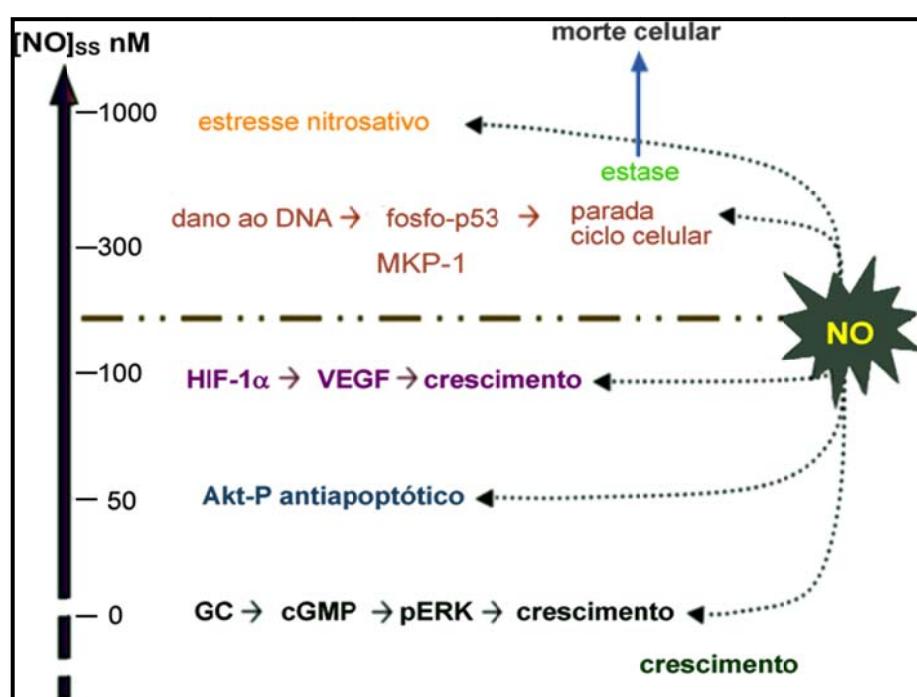


Figura 6. Efeitos pró- e antiapoptóticos do óxido nítrico dependentes da concentração desta molécula
Fonte: adaptado de Ridnour et al. (2008).

O NO pode afetar a expressão e a atividade de proteínas críticas no ciclo celular e, por sua vez, também ser alvo das mutações do DNA celular. A exposição das células aos doadores de NO pode resultar em supraregulação do gene supressor de tumor, o p53, possivelmente em resposta ao dano do DNA mediado pelo NO (WINK; MITCHELL, 1998).

Com base no exposto, é de grande interesse a pesquisa por compostos que demonstrem atividades citotóxicas (*in vitro*), antitumorais (*in vivo*) e que possam desencadear uma resposta de morte celular das células neoplásicas. Há, ainda, muito a ser estudado para o completo entendimento dos mecanismos de ação dos

diferentes compostos que vêm sendo desenhados para pesquisa de diferentes atividades biológicas, dentre eles complexos de rutênio que possuem em sua esfera de coordenação a molécula de NO. Essas investigações levam a crer que complexos metálicos doadores de NO possam ser futuros agentes usados, senão na terapia antitumoral como importantes ferramentas bioquímicas e farmacológicas, se caracterizados e entendidos os mecanismos de ação moleculares e as vias bioquímicas envolvidas na atividade de cada um desses compostos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar espécies que possam atuar como agentes doadores de NO, em ação quimioterápica e/ou ação sinérgica com outros radicais, contra o câncer. Estes complexos, quando irradiados nesta região, propiciariam a formação de espécies radicalares de oxigênio e nitrogênio o que levaria a possibilidade de aplicação clínica através da Terapia Fotodinâmica.

2.2 Objetivos Específicos

1. Obtenção dos complexos $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{benzoquinonadimina})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$ e $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$;
2. Caracterização dos compostos: determinação de medidas de NO, oxigênio singuleto e seus derivados produzidos pelos compostos, quando possíveis;
3. Análise de métodos fotofísicos e de reatividade no intuito de descrever o processo de transferência eletrônica e de energia fotoinduzida;
4. Avaliação do potencial citotóxico dos compostos e das espécies EROs e ERNs antes e depois da irradiação luminosa em linhagens de células tumorais;
5. Avaliação da encapsulação do complexo rutênio-nitrosilo em nanopartículas como promotor de acúmulo destas espécies em células tumorais;
6. Análise dos metabólitos *in vitro* dos complexos de rutênio utilizando microssomos hepáticos de ratos;
7. Estudo das possíveis vias celulares envolvidas na atividade antitumoral destes compostos, como a fosforilação/desfosforilação de proteínas chaves no controle da proliferação e morte celular.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A Tabela 1 resume os reagentes e solventes utilizados nas sínteses dos complexos rutênio-nitrosilo.

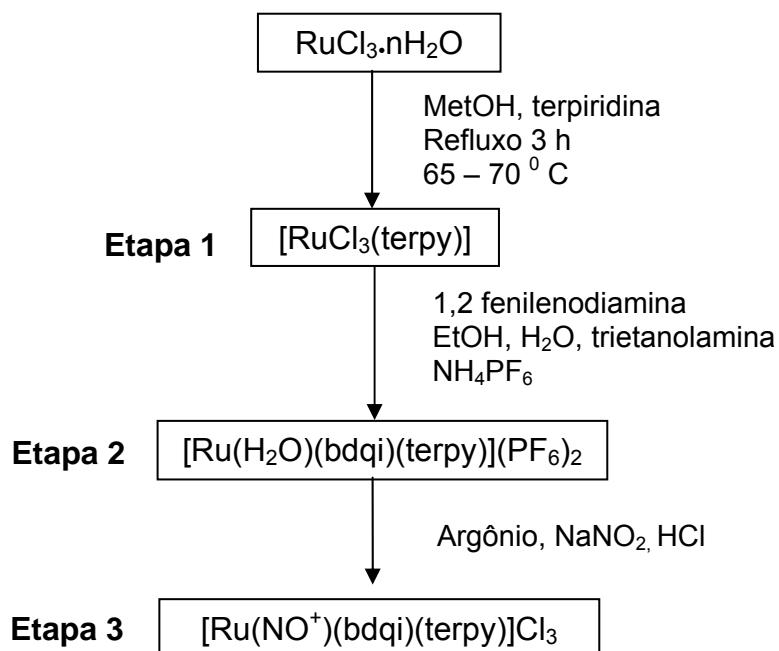
Tabela 1 - Lista de reagentes para a síntese dos complexos de rutênio

Reagentes	Procedência
1,2-dicianobenzeno	Aldrich
1,8 Diazabicyclo [5.4.0] undec- 7 ene- DBU	Aldrich
2, 2'-bipiridina	Aldrich Chemicals
Acetona	Synth
Acetonitrila	Burdick & Jackson
Ácido acético	Synth
Ácido clorídrico	Synth
Ácido esteárico 95%	Vetec, Brasil
Ácido hexafluorfosfórico	Aldrich
Azida de sódio	Aldrich
Ácido nítrico	Synth
Cloreto de rutênio(III)	Aldrich
Cloreto de tetrabutilamônio	Aldrich
Dimetilformamida	Synth
Dimetilsulfóxido	Aldrich
Etanol	Vetec
Éter etílico	Merck

Tabela 1 - Continua

Reagentes	Procedência
Lecitina 100%	Lipoid, Alemanha
Metanol	Synth
Nitrito de sódio	Merck
Pentanol	Aldrich
Pirazina	Aldrich
Terpiridina	Aldrich
1,2-fenilenodiamina	Aldrich
trietanolamina	Aldrich
NH_4PF_6	Aldrich

3.1.1 Síntese do complexo mononuclear $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$



Esquema 1. Rota sintética do composto $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$.

Etapa 1: Síntese do [RuCl₃(terpy)]

Em um balão de 50 mL adicionou-se 0,326 g de RuCl₃.nH₂O e 0,291 g do ligante terpiridina previamente dissolvido em 40 mL de metanol. A mistura foi deixada em refluxo a 65 – 70 °C por 3 horas. Após este período a reação foi desligada e foi guardada por 1 hora a temperatura ambiente. Ao final, o sólido marrom obtido foi filtrado a vácuo, lavado com éter etílico e deixado secar em dessecador. Rendimento: 60,0 %

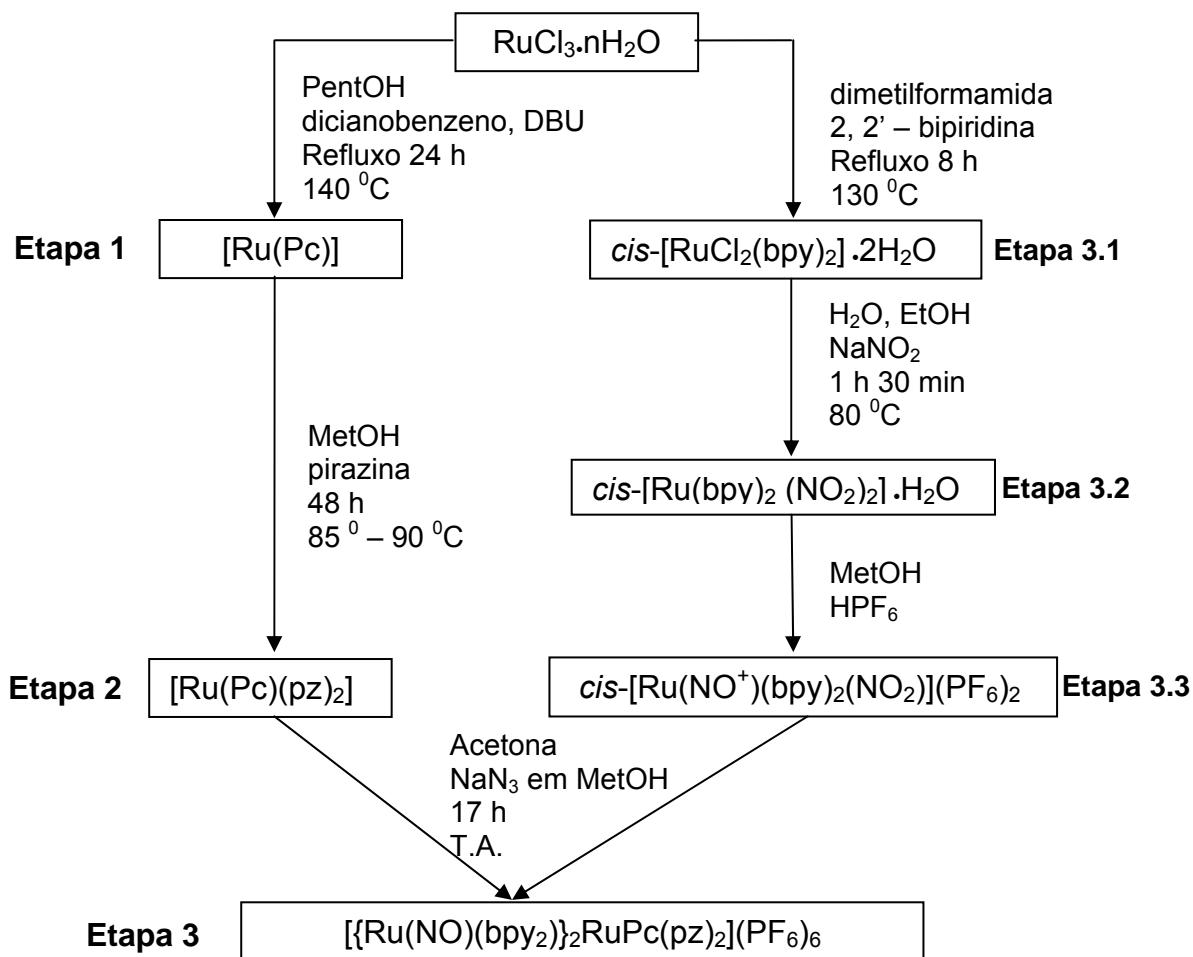
Etapa 2: Síntese do [Ru(H₂O)(bdqi)(terpy)](PF₆)₂

Em um balão de 100 mL foram adicionados 0,300 g de [RuCl₃(terpy)], 60 mL de etanol, 20 mL de água, 0,103 g de 1,2-fenilenodiamina e 0,500 mL de trietanolamina. A mistura reacional foi mantida em refluxo (80 – 85 °C) por 4 horas. Ao final da reação, após a mistura atingir a temperatura ambiente, reduziu-se o volume do solvente até cerca de 10 mL em rotaevaporador e adicionou-se 1,008 g de NH₄PF₆, previamente dissolvido em 1 mL de água. A solução foi deixada sob refrigeração por 24 horas. Em seguida, a solução foi filtrada e o sólido vermelho obtido foi lavado com pequena porção de etanol e éter etílico e colocado em dessecador. Rendimento: 91,5 %

Etapa 3: Síntese do [Ru(NO)(bdqi)(terpy)]Cl₃

Em um balão de 100 mL foi adicionado 0,200 g de [Ru(H₂O)(bdqi)(terpy)](PF₆)₂ e 70 mL de água. Borbulhou-se argônio por 15 minutos e em seguida adicionou-se 0,087 g de NaNO₂. Deixou-se em refluxo (100 – 105 °C) por 1 hora sob argônio. Após este tempo, esperou-se a mistura reacional atingir a temperatura ambiente e foram adicionados 2 mL de HCl. Deixou-se esta mistura sob refrigeração por 48 horas. A solução foi filtrada e o sólido de cor marrom intenso foi lavado com pequena porção de água e éter etílico e posteriormente mantida em dessecador. Com o sólido [Ru(NO)(bdqi)(terpy)]Cl₃ obtido repetiu-se o procedimento da etapa 3 para garantir a coordenação do NO⁺. Rendimento: 39,7 %

3.1.2 Síntese do complexo trinuclear $[\{\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{NO}\}_2(\text{pz})\text{RuPc}(\text{pz})](\text{PF}_6)_6$



Esquema 2. Rota sintética para o composto $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$.

Etapa 1: Síntese do complexo rutênio ftalocianina $[\text{Ru}(\text{Pc})]$

O complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ refere-se ao precursor do complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina e foi preparado com base no método descrito por Hanack e colaboradores (2000) com algumas modificações (da ROCHA et al., 2008). Em um balão de três bocas de 100 mL foram dissolvidos 0,600 g de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$ em 25 mL pentanol previamente destilado e em peneira molecular. Colocou-se o sistema sob refluxo a 140 °C e após a solução adquirir uma coloração azul, que evidencia a formação de um complexo de rutênio(II), 3,400 g de 1,2 dicianobenzeno foram adicionados cautelosamente na forma de pó à reação. Imediatamente, 10 gotas de

1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7ene (DBU) foram adicionadas à mistura que foi mantida sob agitação, refluxo e fluxo controlado de argônio por 24 horas. Após o resfriamento da solução formou-se um sólido azul que foi coletado por filtração. O volume do filtrado foi reduzido através da evaporação do solvente por rotaevaporação e outra porção de sólido se formou. Para a obtenção do sólido final, foi efetuada pela lavagem do pó com solução acidificada (ácido acético e água 1:2) e filtrado a vácuo. O sólido isolado foi mantido no dessecador. Rendimento de 53,0 – 58,0 %

Etapa 2: Síntese do precursor $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$

A síntese do precursor $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ foi realizada segundo método descrito por Kobel e Hanack (1986), com algumas modificações. Foram colocados para reagir, em um tubo de ensaio grande, a proporção de $1,0 \times 10^{-3}$ mol de $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ para $2,0 \times 10^{-4}$ mols de pirazina em banho de glicerina ($85 - 90^\circ\text{C}$) e sob agitação. Como o ligante foi adicionado em excesso, e também pelo fato da pirazina sublimar com facilidade, o tubo de ensaio foi envolto em papel alumínio e tampado com um septo com agulha, formando um sistema aberto para a reação. A reação foi mantida por 48 horas sob agitação e sem adição de solvente. Após o término da reação, para a obtenção do sólido final, adicionou-se metanol ao tubo de ensaio. Formou-se um sólido azul que foi coletado por filtração e deixado no dessecador. Rendimento de 40,0 %.

Etapa 3: Síntese do complexo nitrosilo trinuclear de rutênio $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$

Para a síntese do composto trinuclear de rutênio, outras três etapas foram necessárias para a coordenação do composto $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ a outros dois centros metálicos de rutênio contendo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]^{+3}$ como fragmentos. Para isso seguem as seguintes subetapas:

Etapa 3.1 – *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] · 2H₂O (DWYER; GOODWIN; GYARFAS, 1963)

Em um balão de 3 bocas de 50 mL foram adicionados 8 mL de dimetilformamida. Adicionou-se 1,000 g de cloreto de rutênio (RuCl₃.nH₂O) e 1,200 g de 2, 2'-bipiridina (bpy). Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento em banho de glicerina. A solução atingiu o refluxo a uma temperatura de 130 °C e a reação ocorreu durante 8 horas. Ao término do tempo de reação, desligou-se o aquecimento e após o resfriamento, foram adicionados 50 mL de acetona. O balão foi levado à geladeira por 1 hora. A solução foi filtrada e o sólido escuro recuperado foi lavado com várias porções de éter. Rendimento de 53,0 %.

Etapa 3.2 – *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂] · H₂O (GODWIN; MEYER, 1971)

Em um balão de 3 bocas de 250 mL foram colocados 60 mL de água destilada e 10 mL de etanol. O sistema foi submetido a aquecimento (80 °C) e borbulhamento de argônio durante 15 minutos para retirada de oxigênio. Foram dissolvidos neste balão 0,300 g do composto *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O (Etapa 3.1). Após 15 minutos, a solução quente foi filtrada e ao filtrado adicionou-se 0,900 g de NaNO₂ previamente dissolvido em 7 mL de água destilada e desaerada. Deixou-se reagir, a 80 °C, durante 1 hora e 30 minutos. O balão foi colocado sob refrigeração por 2 horas, a reação foi filtrada e obteve-se um sólido vermelho intenso, que foi lavado primeiramente com água, depois etanol e em seguida com éter. O sólido coletado foi seco a vácuo. Rendimento de 75,0 %.

Etapa 3.3 – *cis*-[Ru(NO)(NO₂)(bpy)₂](PF₆)₂ (GODWIN; MEYER, 1971)

Em um béquer de 50 mL, adicionou-se 31 mL de metanol e uma massa de 0,235 g do complexo *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O (Etapa 3.2). Sem aquecimento e sob agitação, gotejou-se 2 mL de HPF₆ concentrado até o desaparecimento do composto vermelho da etapa anterior. Após aproximadamente 30 minutos há a formação de um sólido amarelo. Filtrou-se a solução e o sólido amarelo retido foi lavado com metanol e éter. Rendimento de 98,0 %.

Etapa 3.4 – $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc(pz)}_2\right](\text{PF}_6)_6$

Em um balão foi adicionada a massa de 0,100 g do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ dissolvido em cerca de 13,5 mL de acetona. Gotejou-se uma solução de 0,008 g de azida de sódio (NaN_3) dissolvida em 1 mL de metanol. Deixou-se reagir por 20 minutos e acrescentou-se à solução 0,020 g do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ (Etapa 2) em pó. O balão foi coberto com papel alumínio e deixou-se a solução sob agitação por 17 horas a temperatura ambiente. Ao término do tempo de reação, acrescentaram-se 10 gotas de HPF_6 e 0,5 mL de etanol. O etanol ajuda na formação do precipitado. Colocou-se o balão na geladeira por 3 dias, filtrou-se a solução e o sólido azul intenso escuro retido no filtro foi lavado com porções de éter, purificado e colado em dessecador. Rendimento de 45,5 %.

3.2 Medidas de pH

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se o pHmetro Digimed modelo DM-20. Antes das medidas de pH nas amostras, o pHmetro foi calibrado com solução padrão comprada do fabricante do equipamento.

3.3 Análise elementar

Os estudos de análise elementar dos complexos foram realizados pela Central Analítica do Instituto de Química da USP de São Paulo. A responsável pelas análises foi a analista Luzia Narimatsu. As análises foram feitas no equipamento Perkin Elmer, modelo CHN 2400.

3.4 Espectrometria de massas

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massa modelo ultrOTOFQ - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), nas seguintes condições experimentais: bomba de infusão 300 $\mu\text{l}/\text{h}$; móvel de solubilização foi $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$; voltagem do cone: 30 V e modo de detecção positivo para as amostras. O aparelho é de alta resolução e usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10 mg.mL^{-1} (TOF).

3.5 Determinação das estruturas cristalinas

A coleta foi realizada em um difratômetro Bruker APEX II Duo, utilizando-se radiação Kalpha do Mo, com monocromador de grafite, segundo procedimentos padronizados. A solução dos dados foi feita com o programa SHELXS-97 e o refinamento anisotrópico de todos os átomos, exceto os de hidrogênio, foi feito com o programa SHESLXL-97. Os átomos de hidrogênio foram calculados em posições idealizadas, utilizando o programa SHELXL-97.

3.6 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

Os espectros eletrônicos apresentados foram obtidos em um espectrofotômetro UV-visível-NIR – Hitachi modelo U-3501, com varredura na região de 200 nm a 800 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) por curva analítica.

3.7 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com Espectrofotômetro Prestige-21 Schimazur 02190. As análises foram feitas no estado sólido utilizando pastilha de brometo de potássio (KBr).

3.8 Espectroscopia de luminescência e tempo de meia vida

Os espectros de excitação e emissão dos compostos foram efetuados no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC, usando cubetas de quartzo com os quatro lados polidos e com 1,0 cm de caminho óptico. Os parâmetros experimentais tais como solvente, temperatura, comprimento de onda e fendas usadas nos estudos foram determinados de acordo com o composto estudado, sendo relatadas as condições nos resultados e discussão.

O tempo de vida característico da emissão do composto trinuclear foi medido no equipamento EasyLife V da Optical Building Block Corporation. Utilizou-se LED pulsado de 630 nm como fonte de excitação e filtro VIS de 665 nm (transmite mais

que 90 % acima de 665 nm) para selecionar o comprimento de onda de emissão do composto. O tempo de vida foi calculado pelo equipamento através do programa EasyLife II e a qualidade da regressão linear foi acompanhada segundo os valores estatísticos de chi-quadrado, Durbin Watson e Z.

3.9 Estudos fotoquímicos e fotofísicos

Nos experimentos de fotólise foi utilizado o laser de diodo da marca Colibri QuantumTech®. As soluções preparadas dos complexos, assim como o comprimento de onda de irradiação (λ_{irr}) serão descritos para cada composto em particular, no item de resultados e discussão.

As soluções foram colocadas em cubetas de quartzo (para posterior análise espectrofotométrica), com alíquotas de 3 mL, sob agitação magnética. A incidência de luz foi feita a uma distância de 5 cm da fenda do laser. A potência de luz (em mW) é dada pelo próprio software (Colibri, QuantumTech®) utilizado para a irradiação no comprimento de onda escolhido, sendo que também foi determinada, durante o conjunto de pulsos, através de um equipamento medidor de potência de laser/energia FieldMastII-TOP (Coherent®) utilizando-se uma cabeça para detecção, posicionado a pelo menos 5 cm de distância da luz incidente.

3.9.1 Irradiação dos complexos

Foram realizados dois tipos diferentes de experimentos de fotólise: um com acompanhamento da variação espectroscópica na região UV-visível e o outro com registro amperométrico *in situ* da liberação de NO gasoso (amiNO-700).

A fotólise com acompanhamento da variação do espectro na região do UV-visível foi realizada segundo o procedimento:

As amostras dos complexos foram preparadas em solução tampão. Foi realizado um espectro UV-visível inicial, e as variações nos espectros foram acompanhados em intervalos de tempo (minutos) até que não houvesse mais variação no espectro da amostra.

A fotólise com acompanhamento *in situ* da liberação de NO gasoso foi realizada pelo acoplamento do eletrodo seletivo para NO (NOmeter) na cubeta a ser irradiada.

3.9.2 Determinação amperométrica do NO liberado (NOmeter)

A liberação fotoinduzida de NO gasoso foi detectada diretamente por um sensor amperométrico (amiNO-700), desenvolvido pela World Precision Instruments. Este sensor possui uma membrana seletiva de NO gasoso, com sensibilidade na faixa de 1 nM a 20 μ M, e com tempo de resposta relativamente curto, compatível com o sistema pulsado de irradiação proposto.

O sinal analógico do amiNO-700 (Innovative Instruments, Inc.) é digitalizado e registrado temporalmente utilizando um sistema de detecção CR-7 da Shimadsu e convertido ao PC pelo programa DUO.18 v 1.1. Esse sensor foi calibrado segundo o item a seguir.

3.9.3 Calibração do NOmeter

A calibração do eletrodo amiNO-700 foi realizada através de uma solução aquosa padrão preparada com NO gasoso (KUDO et al., 1997). Em uma quantidade de 10 mL de tampão borbulhou-se argônio durante 30 minutos a fim de remover todo o oxigênio presente no meio. O gás NO foi gerado por uma solução de ácido nítrico 50,0 %, na qual se mergulharam pedaços de cobre metálico (Cu^0). Antes de borbulhar a solução padrão, o gás passou por uma solução de KOH, para remover possíveis traços de NO_2 presentes na mistura gasosa. O óxido nítrico gasoso foi borbulhado durante 1 hora, tempo suficiente para saturar a solução aquosa. Admitiu-se que o valor da concentração dessa solução saturada de óxido nítrico é $2,1 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, conforme trabalho de Mori e Bertotti (2000). Esse aparato foi construído em uma capela.

Assim, a partir dessa solução padrão de concentração conhecida de NO gasoso, o aparelho foi calibrado. Acoplou-se o eletrodo seletivo amiNO-700 em 10,0 mL de tampão, após borbulhar argônio durante 30 minutos, ajustou-se o aparelho no zero. Este tampão apresentava o mesmo pH do tampão que foi utilizado para dissolver o composto no momento da fotólise. A seguir, uma concentração conhecida de NO na solução foi preparada pela adição de um volume conhecido da solução padrão de NO. Após alguns segundos, quando o valor da corrente de NO na solução permaneceu constante, adicionou-se uma nova quantidade da mesma

solução padrão. O aumento de corrente observado mostrou-se diretamente proporcional à concentração de NO, conforme Figura 7.

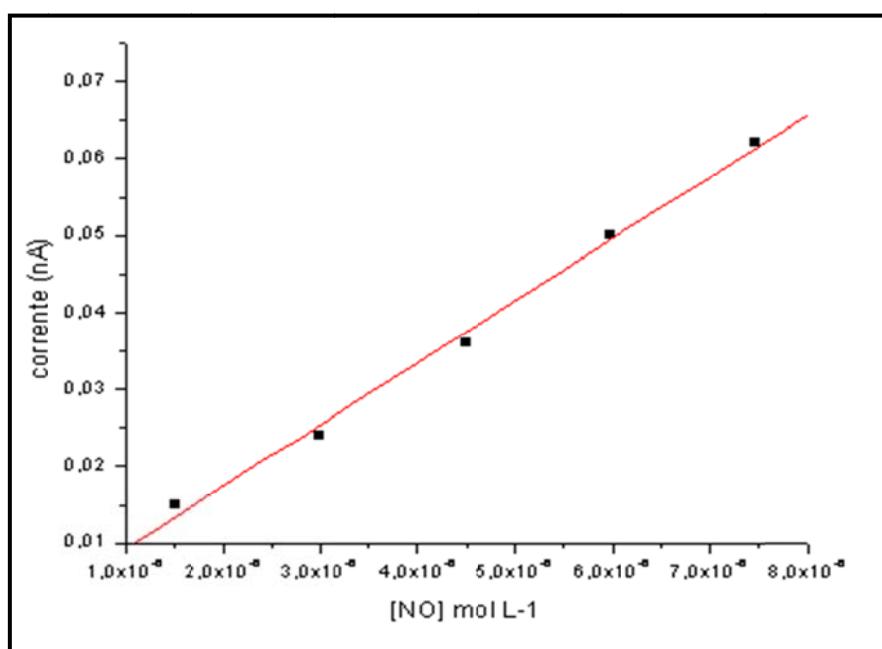


Figura 7. Curva de calibração do NOmeter para solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4.

3.10 Determinação da produção de oxigênio singlet

Para a determinação da geração de oxigênio singlet (${}^1\text{O}_2$) pelo complexo ftalocianina, foi utilizado o composto 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como sonda. O consumo do DPBF foi analisado por um método espectrofotométrico indireto (TADA et al.; 2007). Esta sonda, de cor amarela intensa apresenta banda de absorção perto de 410 nm cuja intensidade diminui por ocasião da reação deste composto com o ${}^1\text{O}_2$ produzido pela substância em teste, no caso o complexo trinuclear. Nesta reação, o DPBF passa para uma forma intermediária de endoperóxido e forma, como produto final, o orto-dibenzoilbenzeno, uma substância sem cor, cuja diminuição da intensidade da banda deve-se ao consumo do reagente inicial e pode ser determinado espectrofotometricamente (Figura 8).

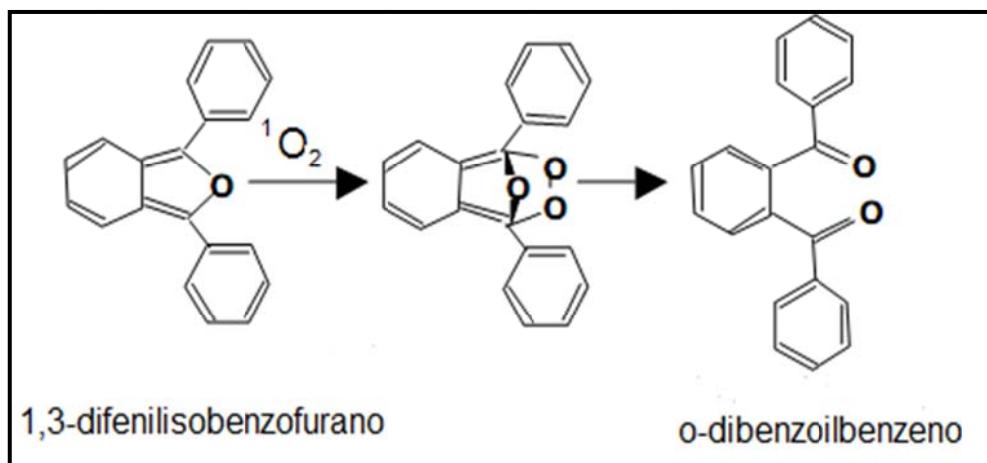


Figura 8. Representação estrutural dos compostos derivados de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) após a geração de oxigênio singlet
Fonte: adaptado de Caine et al. (2002).

Para a determinação da produção de oxigênio singlet pelo complexo, foram adicionados 10 μl da solução estoque (8 mM) de DPBF a 2 mL da solução de $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$, a 25 $^{\circ}\text{C}$ em acetonitrila. A mistura destas soluções foi irradiada a λ_{irr} 660 nm utilizando o laser de diodo, em intervalos de 2 segundos, em uma cubeta de quartzo sob agitação magnética. Os cálculos para determinação do rendimento quântico do oxigênio singlet formado foram feitos a partir da equação:

$$\Phi(\lambda) = \frac{dx / dt}{q_{n,p}^0 [1 - 10^{-A(\lambda)}]}$$

na qual: dx/dt é taxa da mudança espectral; $q_{n,p}^0$ quantidade de fótons incidentes por intervalo de tempo (equivalente em einstein); $A(\lambda)$ é a absorbância no comprimento de onda de estudo (IUPAC, 2012).

3.11 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.11.1 Materiais e equipamentos utilizados na separação do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ por CLAE

As condições experimentais para CLAE foram escolhidas com base em estudos de separação de complexos de rutênio anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa (de OLIVEIRA et al., 2009). O equipamento utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu é composto de uma bomba LC-20AT de duplo pistão, um injetor Shimadzu modelo 7725i com amostrador de 20 µL, um detector de arranjo de diodo, modelo SPD-M20A operando no intervalo entre 190 a 800 nm, uma controladora CBM-20A. As injeções foram realizadas manualmente e o programa empregado na aquisição dos dados foi o Lab Solution Shimadzu – LC Solution. Foi utilizada uma coluna Shimpack® de sílica modificada VP-ODS (4,6 x 250 mm), Shimadzu, constituída de partículas de 4,6 µm de diâmetro. Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus *Millipore/Millipore Corporation* forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções e fases móveis.

Os solventes empregados foram metanol, grau HPLC (Mallinckrodt), água Milli-Q e ácido trifluoracético (grau analítico) para preparação das soluções usadas como fase móvel.

3.11.2 Estudos preliminares de metabolismo *in vitro*

Os ensaios de metabolismo foram realizados em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Pierina Bonato, da FCFRP e do Prof. Dr. Anderson de Oliveira, do departamento de química da FFCLRP.

Obtenção da fração microssomal do fígado de ratos

Os animais, ratos machos Wistar, ambientados a 25 °C com ciclos de luz de 12 horas foram submetidos a jejum na noite anterior aos experimentos. Após decapitação do animal, o fígado foi retirado, picado em pequenos pedaços e lavado com solução tampão *tris-HCl* 50×10^{-3} mol.L⁻¹/ KCl 0,154 mol.L⁻¹ pH 7,4. Em

seguida, o fígado foi adicionado a esse mesmo tampão e triturado em homogeneizador tipo “Potter” em 3 ciclos, sendo que cada ciclo compreende 3 triturações de um minuto cada com velocidade de 1000 rpm. Posteriormente, houve o isolamento da fração microssomal (LAKE, 1987).

Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas nas frações microssomais foi determinada segundo o método Biureto (sulfato de cobre pentahidratado 0,15 % e tartarato de sódio e potássio 0,6 % em hidróxido de sódio 0,750 mol.L⁻¹). Foram feitas a curva padrão com diferentes concentrações de Soro Albumina Bovina e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 545 nm. A concentração de proteínas foi calculada segundo as equações:

$$Fc = Cp/Ap \quad Ct = Fc \times At \times 10 \text{ (proteínas em mg.mL}^{-1}\text{)}$$

No qual Fc é o Fator de correção, Cp concentração de proteínas do padrão, Ap absorbância do padrão, Ct concentração de proteínas do teste e At absorbância do teste.

Procedimento preliminar de incubação para os estudos de biotransformação

Para a incubação foram utilizados tubos âmbar com tampa esmerilhada. Inicialmente a solução do complexo de rutênio [Ru(H₂O)(bdqi)(terpy)]²⁺ (25 µL) na concentração de 1 mg.mL⁻¹ preparada em metanol foi adicionada aos tubos. Posteriormente, adicionava-se 250 µL da solução de incubação – NRS (do inglês, NADPH regenerating system) contendo NADP⁺, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase, resultando em concentrações no meio de incubação de 2,5 × 10⁻⁴ mol, 5,0×10⁻³ mol e 0,5×10⁻³ mol, respectivamente. O meio microssomal foi pré-incubado na presença do substrato e do sistema de regeneração de NADPH a 37 °C durante 5 minutos. Finalmente, a fração microssomal do fígado de rato foi acrescentada e completava-se o volume do meio de incubação com 184 µL tampão fosfato 1 mol.L⁻¹ pH 7,4. A incubação foi realizada sob agitação a 37 °C. Depois de 1

hora e 30 minutos de incubação, a reação era encerrada com a adição de 1225 µL de metanol gelado, os tubos centrifugados por 10 minutos a 2400 rpm e o sobrenadante coletado para análise. Controles foram realizados sem a adição do sistema de regeneração de NADPH. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.12 Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

Nanopartículas lipídicas podem ser uma alternativa aos tradicionais sistemas carreadores coloidais de substâncias ativas, como as emulsões, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas (ABDELBARY et al., 2009; BATTAGLIA et al., 2010). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (Figura 9), são constituídas por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e a sua superfície é coberta por uma camada externa de tensoativo que estabiliza a dispersão (IQBAL et al., 2012; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; JORES et al., 2005), com tamanhos que variam de 50 a 1000 nm.

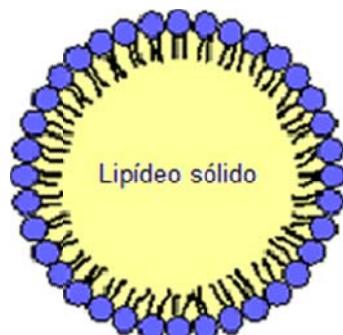


Figura 9. Representação de uma partícula lipídica sólida.

Para o desenvolvimento das NLS, os experimentos foram feitos em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof. Dra. Renata Vianna Lopez da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Seguiu-se o método de microemulsão, descrito anteriormente por Ruckmani e colaboradores (2006) com pequenas modificações. No preparo empregou-se ácido esteárico como fase interna, lecitina de soja como tensoativo, ácido taurodeoxicólico de sódio como co-tensoativo, e água purificada como fase contínua. A microemulsão foi preparada da seguinte maneira: ácido esteárico (400 mg) foi aquecido 10 °C acima do seu ponto

de fusão ao qual lecitina foi adicionada (200 mg). Após completa solubilização, o aquecimento foi mantido a 80 °C, e o complexo rutênio-nitrosilo (8 mg) foi adicionado e agitado por 10 minutos. Fase aquosa (1250 µL) contendo cossurfactante (50 mg) foi aquecida a 80 °C e adicionada à mistura de lipídeo/fármaco. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética a 80 °C até formação da microemulsão. A microemulsão obtida foi então vertida em água purificada mantida entre 2-5 °C sob agitação mecânica com Turrax (17500 rpm) por 12 minutos. Após o preparo, as amostras foram liofilizadas com 8 % de sacarose (crioprotetor) e guardadas em dessecadores protegidas da luminosidade, ou foram mantidas em suspensão a 4 °C.

Para a caracterização das NLS foram feitas medidas de diâmetro médio e o índice de polidispersividade (Pdl) o que reflete a distribuição do tamanho da população de partículas. A mobilidade eletroforética e o potencial zeta das NLS foram medidos no analisador Malvern Zetasizer Nano ZS90 e se mostraram de acordo com a metodologias descrita por Marquele-Oliveira e colaboradores (2010).

3.12.1 Espectroscopia de espalhamento de luz

O diâmetro médio e o índice de polidispersividade (Pdl) das nanopartículas lipídicas sólidas foram medidas por espectroscopia de espalhamento de luz com laser 50 mV.

Então 20 µL das suspensões foram diluídos em 2 mL de água purificada. As medidas foram realizadas a 25 °C em ângulo fixo de 173°. O tempo de medida foi de 60 segundos. O índice de polidispersividade reflete a distribuição do tamanho da população de partículas.

3.12.2 Determinação do potencial zeta

A mobilidade eletroforética e o potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas foram medidos no analisador Malvern Zetasizer Nano ZS90.

3.12.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) corresponde à porcentagem do complexo rutênio-nitrosilo encapsulado e adsorvido na superfície das partículas e foi

determinada pela diferença entre a quantidade total do fármaco presente na suspensão e na porção livre (PATTANI et al., 2006; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2010). Desta forma, foram pesadas massas iguais de nanopartículas liofilizadas com e sem o fármaco nanoencapsulado, foram dissolvidas em 1 mL de etanol e as suspensões transferidas para a câmara superior do tubo de centrífuga AMICON ultra com membrana com limite de corte de 100KD. Os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos. O filtrado das amostras foi analisado para determinação do complexo rutênio-nitrosilo não encapsulado empregando espectroscopia de UV-visível (SHAH et al., 1992).

A eficiência de encapsulação foi calculada pela seguinte equação:

Onde “ $M_{\text{fármaco total}}$ ” é a massa total do fármaco na suspensão e “ $M_{\text{fármaco livre}}$ ” é a massa do fármaco livre detectado no filtrado da dispersão. A quantidade total do fármaco na suspensão das NLSs foi obtida solubilizando uma alíquota da dispersão em etanol, seguida por diluição em água purificada e então analisada por UV-visível. Foi feita uma curva analítica ($5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ – $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sendo que o ensaio foi linear ($R^2 = 0,9988$) para medidas em 328 nm (Figura 10) utilizando a equação da curva analítica de calibração: $y = 0,2276x - 0,1484$.

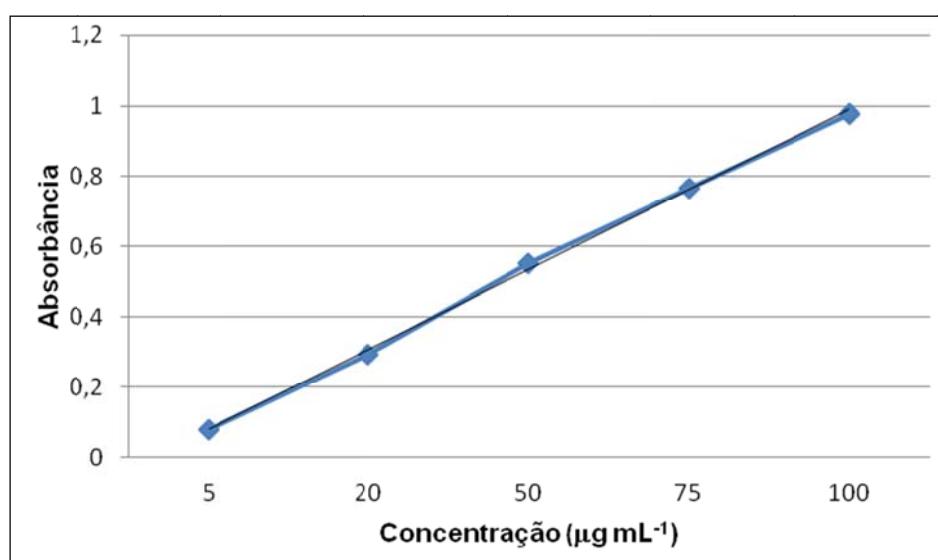


Figura 10. Curva de concentrações do complexo rutênio-nitrosilo para comparativo nos cálculos de eficiência de encapsulação.

3.13 Estudos de atividades biológicas

3.13.1 Cultura de células

As células usadas para os experimentos biológicos podem ser divididas em aderentes – melanoma murino B16-F10 e fibroblasto de camundongo L929 – e células em suspensão – Jurkat, linhagem de células de leucemia humana. B16-F10 e L929 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/>). As células Jurkat foram adquiridas da ATCC. Todas as linhagens foram mantidas em estufa de cultura celular a 37 °C com tensão de 5 % de CO₂ e 95 % de ar, e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo meio de cultura que será descrito a seguir para cada linhagem em particular. Os meios de cultura celular foram suplementados com soro fetal bovino (SFB), previamente inativado, e como antibiótico foi usado a gentamicina (10 µg.mL⁻¹). A esterilização dos meios foi realizada por filtração através de filtro Millipore® com poro de 0,22 µm.

Para os ensaios de fototoxicidade, foram usados meios de cultura sem a adição do indicador de pH vermelho de fenol. Entretanto, todos os meios foram suplementados nas mesmas condições já descritas, com o diferencial de não apresentarem cor para que não interferisse no procedimento experimental durante as irradiações das células.

A solução fosfato salino (PBS) era constituída de (8,1 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM, pH 7,4) e foi submetida a esterilização por autoclavagem (121 °C, 45 minutos a 1 atm). A solução de Tripsina-EDTA foi adquirida da Sigma® e diluída para 1X para uso.

- **Células de melanoma murino: B16-F10**

Para o cultivo das células da linhagem B16-F10 usou-se o meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich® com 25 mM de HEPES, sem bicarbonato de sódio) e a ele foram adicionados 2 mM de glutamina. O meio foi filtrado com filtro estéril para sua esterilização em capela de fluxo laminar e recolhido em frasco estéril. Para verificar eventuais contaminações, foram retiradas duas alíquotas de 5 mL as quais permaneceram incubadas por 48 horas em estufa (5 % CO₂) a 37 °C. Antes do meio de usado para o crescimento das células B16-F10, foram adicionados antibiótico e

antimicótico na concentração final de 1 % (10.000 unidades penicilina e 10 mg de estreptomicina como antibióticos; 25 µg de anfotericina B como antimicótico) e 10 % de soro fetal bovino inativado. As células foram mantidas em cultura fazendo-se o repique ou a troca de meio a cada 3 dias, em média.

- **Células de fibroblasto de camundongos: L929**

Células L929 são células de fibroblasto de camundongos, com características não tumorais. Para o cultivo destas células, usou-se o meio de cultura DMEM. O meio foi preparado em cerca de 900 mL de água, onde foi adicionado o conteúdo do envelope e acrescentados 3,700 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, o pH da solução foi ajustado a 7,2 e o volume completado para 1 L. O meio foi filtrado com filtro estéril em capela de fluxo laminar para sua esterilização e recolhido em frasco estéril. Antes do meio ser usado para o crescimento das células L929, foram adicionados antibiótico e antimicótico na concentração final de 1 % (10.000 unidades penicilina e 10 mg de estreptomicina como antibióticos; 25 µg de anfotericina B como antimicótico) e soro fetal bovino inativado (10 %), previamente esterilizados. As células da linhagem fibroblasto de camundongo foram mantidas em cultura fazendo-se o repique ou a troca de meio a cada 3 dias, em média.

- **Células tumorais de leucemia humana : Jurkat**

Para o cultivo das células de leucemia humana (Jurkat) foi usado o meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-aldrich® com 25 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio). Antes da utilização deste meio para o crescimento das células Jurkat, foi acrescentado gentamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) como antibiótico e 10 % de soro fetal bovino, previamente esterilizado.

As células da linhagem Jurkat, foram cultivadas em garrafas de cultura, em meio RPMI e foram mantidas em atmosfera úmida com concentração controlada de 5 % CO_2 , com troca de meio a cada 3 dias, em média.

3.13.2 Ensaios de citotoxicidade

- **Células B16-F10 e L929**

Por serem células aderentes, quando aproximadamente 90 % das células estavam confluentes nas garrafas de cultura, foram soltas utilizando-se uma solução de Tripsina/EDTA 1x. Após centrifugação (1000 rpm, 5 minutos) foram ressuspensas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em 200 µL de meio com $2,0 \times 10^4$ células em cada poço, em 2 placas de 96 poços. Posteriormente, ao completar 24 horas de incubação em estufa nas condições anteriormente descritas, para que as células ficassem aderidas às placas, o meio de cultura das mesmas foi trocado, e foram adicionadas as soluções do veículo (solvente no qual os compostos são dissolvidos) e dos compostos de forma que as concentrações finais fossem determinadas e serão descritas para cada composto estudado. Depois desta etapa, as células tratadas foram colocadas em estufa por diferentes períodos de tempo. Após a incubação com os compostos e/ou veículo, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT.

Para os ensaios de fototoxicidade, as células foram mantidas por igual período em contato com o composto e/ou veículo, porém foram irradiadas em comprimentos de onda específicos que serão descritos para cada situação. O laser (Colibri – QuantumTech) utilizado para os experimentos foi ajustado para a dose de luz do tratamento enquanto a outra placa permaneceu nas mesmas condições, porém protegida da irradiação, em ambiente escuro. Após esse procedimento, as placas ficaram novamente incubadas na estufa nas condições descritas, por período de tempos diferentes e que serão descritos. Posteriormente, foi analisada a resposta citotóxica por ação dos compostos, tanto nas condições de fotoestímulo quanto no escuro. A análise da viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT.

- **Células Jurkat**

Células Jurkat são células cultivadas em suspensão e quando estavam aproximadamente 90 % confluentes nas garrafas de cultura, foram contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em 200 µL de meio com $5,0 \times 10^4$ células em cada poço, em 2 placas de 96 poços. Posteriormente, ao completar 24 horas de

incubação em estufa nas condições semelhante às já descritas, o meio de cultura foi cuidadosamente trocado e foram adicionadas soluções do veículo e/ou composto de forma que as concentrações finais fossem obtidas. Depois desta etapa, uma das placas de cultura foi irradiada no comprimento de onda de interesse, enquanto a outra placa permaneceu nas mesmas condições, porém protegida da irradiação. A dose de irradiação e o tempo de incubação para a resposta citotóxica do fotoestímulo estão descritos para cada experimento em particular. Posteriormente ao período de incubação, a resposta citotóxica foi analisada pelo ensaio do MTS para verificação da viabilidade celular.

3.13.3 Análise da viabilidade celular

- **Ensaio do MTT**

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico comumente usado como medida de capacidade das enzimas mitocondriais reduzirem o MTT (cor amarelada) à formazan, um sal de cor púrpura solúvel em solventes orgânicos. É um ensaio de medida de viabilidade celular diretamente proporcional, cuja intensidade da cor permite a determinação da quantidade de células viáveis partindo da quantidade de enzimas presentes nas mitocôndrias das células vivas, capazes de realizarem a reação (Figura 11).

Após o último período de incubação que foi diferente para cada experimento, a cada um dos poços, foram adicionados 20 µL de solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] na concentração final nos poços de 0,5 mg.mL⁻¹. Após a adição do sal, as células foram incubadas em estufa, nas mesmas condições já descritas, por mais 3 horas (MOSMANN, 1983). Em seguida o meio de cultura foi removido, os poços lavados 2 vezes com PBS 1X e foi adicionado um volume de 200 µL de DMSO para solubilidade do precipitado formado pela redução do sal. As absorbâncias foram obtidas 570 nm em leitor de ELISA – KC4 (*Power Wave*). A porcentagem viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{D.O. experimento}/\text{D.O. controle}) \times 100 \%$$

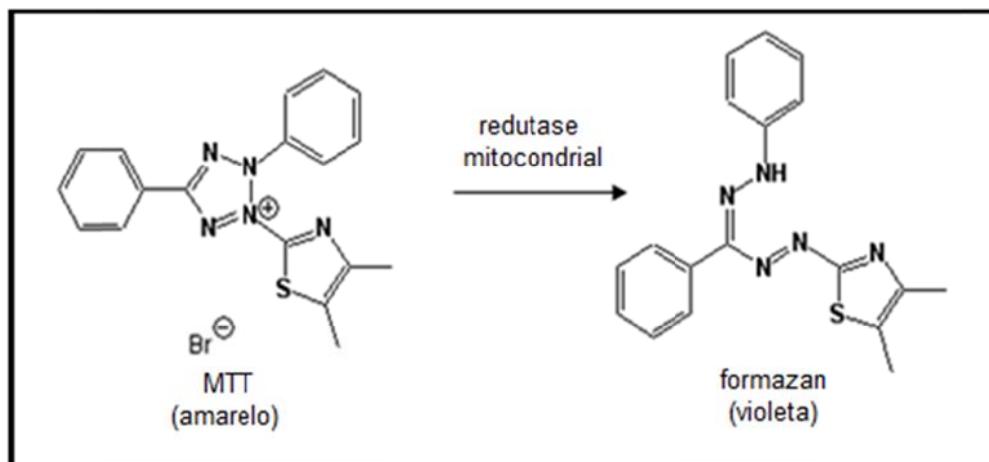


Figura 11. Representação da reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais.

- **Ensaio do MTS**

O fato de as células Jurkat serem células não aderentes trouxe uma limitação ao uso do sal MTT para avaliação da viabilidade celular nessas células. O MTT precisa do uso de um solvente orgânico para a sua solubilidade, o que faz necessário a troca do meio de cultura pelo DMSO para solubilizar o sal, fazendo com que as células também fossem retiradas junto com o meio de cultura. Por isso, para a avaliação da viabilidade celular da linhagem celular de leucemia humana usou-se o MTS, cujo mecanismo é bastante semelhante ao do MTT, mas por ser solúvel em meio aquoso, não há necessidade de troca do meio, sem a perda no número de células. Após o tratamento com o veículo e/ou com os compostos, por diferentes períodos de incubação, a cada um dos poços foram adicionados 15 μL de solução de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio em 200 μL final de meio de cultura nos poços. O ensaio de MTS é um teste colorimétrico usado como medida da capacidade das enzimas mitocondriais reduzirem o sal (cor amarelada) à formazan (cor vermelha), solúvel no próprio meio de cultura e com leitura de absorbância em 490 nm. Os procedimentos para esta metodologia foram seguidas conforme as especificações do kit do fabricante Promega®. Da mesma forma que o MTT, este é um ensaio de medida de viabilidade celular diretamente proporcional, cuja intensidade da cor permite a determinação da quantidade de células viáveis partindo da quantidade de enzimas presentes nas mitocôndrias das células vivas, capazes de realizarem a reação (Figura 12).

Após a adição do MTS, as células foram incubadas em estufa, nas mesmas condições já descritas, por mais 3 horas. Em seguida, as absorbâncias foram obtidas em 490 nm em leitor de ELISA. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{D.O. experimento}/\text{D.O. controle}) \times 100\%$$

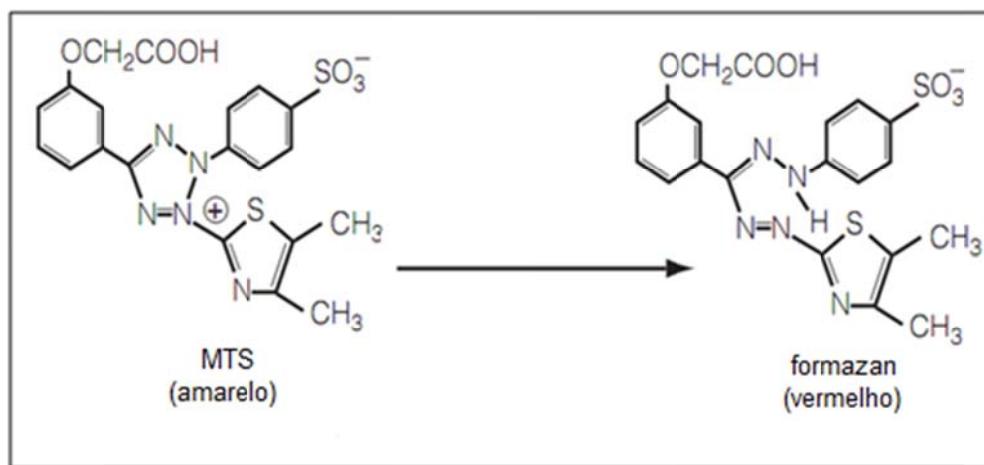


Figura 12. Representação da reação de redução do MTS a formazan por enzimas mitocondriais.

3.14 Determinação da concentração citosólica de NO

As medidas da concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) nas células de melanoma murino B16-F10 foram analisadas por microscopia confocal. Para isso, as células foram carregadas com 5 μM da sonda fluorescente sensível ao NO, diaminofluoresceina – 2 diacetato (DAF-2DA) durante 30 minutos em temperatura ambiente, antes do experimento (KOJIMA et al., 1998). O DAF-2 DA foi preparado em meio de cultura RPMI sem indicador de pH (vermelho de fenol) e o excesso da sonda foi removida trocando o meio RPMI, deixando por mais 30 minutos a 37 °C para que fosse completado o processo de desesterificação intracelular da sonda. A sonda fluorescente DAF-2 DA (Figura 13) foi excitada com a linha do laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 515 nm. Foi utilizado o software de análise temporal (*time course*) para capturar as imagens das células em intervalos de 2 segundos ao longo do tempo. Para as imagens no microscópio confocal primeiramente foi localizado um campo na

lamínula onde estavam presentes pelo menos duas células, usando uma objetiva com imersão em água (aumento 63x). As células foram analisadas e fotografadas em meio RPMI (pH 7,4). A medida da $[NO]_c$ foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à $[NO]_c$. Foi calculada a diferença entre IF inicial (IF_i) e IF final (IF_f), sendo esta diferença convertida em %. IF_i foi considerado como basal que corresponde a 100 % da IF (RODRIGUES et al., 2008).

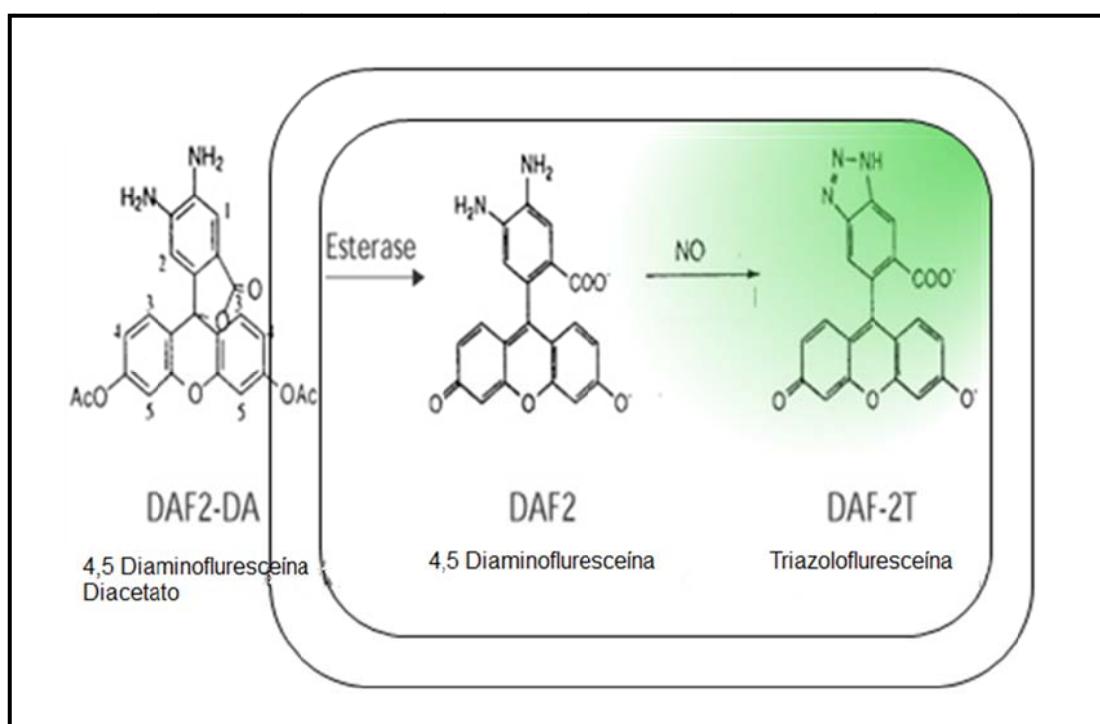


Figura 13. Caminho percorrido por DAF-2DA para ser incorporado à célula. DAF-2DA é permeável a membrana celular e rapidamente entra na célula. No citoplasma celular é hidrolisada por esterases liberando o DAF-2 livre. Em pH fisiológico (7,4), o DAF-2 não é fluorescente, mas na presença de NO há a formação de DAF-2T, que é fluorescente.

Sendo assim, a medida da $[NO]_c$ foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência (% IF), a qual indica aumento na $[NO]_c$ calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial foi obtida antes da adição do $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ na concentração final de 200 μM , calculada conforme a equação:

$$\% \text{ IF} = (\text{IF}_f - \text{IF}_i / \text{IF}_f) \times 100$$

3.15 Avaliação da indução de morte celular por citometria de fluxo

Para as análises de indução de morte celular pelo método de citometria de fluxo foram usadas as células Jurkat. Após confluência, 1 mL de meio com $5,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas em placas de 24 poços, tratadas e incubadas durante 4 horas na estufa. Foram feitos experimentos usando fotoestímulo e sem fotoestímulo (escuro), cujas condições serão descritas para cada experimento no item de Resultados e Discussão. Após as 4 horas de incubação, as células foram coletadas dos poços para microtubos, centrifugadas a 3500 rmp por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de ligação fornecido pelo kit do fabricante Promega®. Depois de ressuspensas, 100 μL foram transferidos para um novo microtubo e a este volume foram adicionados 2,5 μL de anexina V-FITC e 10 μL de 7-AAD. A anexina V-FITC auxilia na observação da morte celular por apoptose, em sua fase inicial, quando as células externalizam a proteína fosfatidilserina. Quando esta proteína está na superfície das células, ela pode ser detectada pelo conjugado fluorescente da anexina V, uma proteína que tem alta afinidade pela fosfatidilserina. O 7-AAD (7-amino actinomicina D) é um marcador fluorescente de células mortas. Este marcador exclui as células viáveis, mas penetra em células com membranas rompidas para marcação dos ácidos nucleicos o que o caracteriza como uma ferramenta viável para estudos de citotoxicidade.

Após a adição desses dois marcadores, as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e a elas foram adicionadas mais 400 μL de tampão de ligação – fornecida pelo fabricante – antes da leitura no citômetro de fluxo (HEINRICH, 2009). As suspensões das diferentes concentrações do composto foram transferidas para tubos de leitura de FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) e processadas para análise. Os experimentos foram realizados na UCSF (University of California San Francisco).

3.16 Ensaio de extração de proteínas totais e *Western Blotting* (WB)

A incubação com o composto foi realizada de maneira semelhante aos ensaios de citotoxicidade: as células foram incubadas com o composto na concentração de 0,4 μM por 4 horas e foram fotoestimuladas. Após o fotoestímulo, foram incubadas por 4 horas, tempo da resposta no escuro. Terminado o período de incubação de resposta no escuro, as placas foram imediatamente colocadas em gelo e lavadas duas vezes com PBS. Em

seguida, foram acrescentados 100 µL de tampão de lise (*CellLytic™ M Cell Lysis Reagent*, SIGMA – C2978) com 1X inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail*) da SIGMA e 1 mM de ortovanadato de sódio, 1 mM de beta-glicerol fosfato e 2,5 mM de pirofosfato de sódio. O lisado celular foi recuperado e centrifugado por 15 minutos, a 4 °C, 14.000 rpm. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford, utilizando o reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* e 30 µg de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de *Hybond-P (polyvinylidene fluoride – PVDF; GE Healthcare)*. O bloqueio da membrana foi realizado com uma solução 0,1 M Tris pH 7,5, 0,9 % NaCl, 0,1 % Tween-20 (TBS/T) com 5 % *nonfat dry milk*, e a membrana incubada por uma hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi incubada em solução TBS/T e anticorpo primário na diluição de 1:1000 (adicionada, em alguns casos de albumina bovina (BSA), dependendo do anticorpo), por 16 horas a 4 °C sob agitação suave. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS/T e incubada por 1 hora em solução TBS/T adicionada de 5 % *nonfat dry milk* e anticorpo secundário anticorpo secundário marcado com peroxidase na diluição de 1:5000. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS/T antes da revelação. As bandas foram reveladas utilizando solução de ECL (1 M tris-HCl pH 8,5; 0,1 M ácido p-couumárico; 0,25 M luminol) e 0,03 % de peróxido de hidrogênio. Anticorpos:

Akt (Cell Signaling - #9272) 1:1000 em TBS-T

phospho-Akt (Thr380) (Cell Signaling - #2965) 1:1000 em TBS-T e 2% BSA

Beta-actina (Sigma-aldrich – SAB2500963) 1:500 em TBS-T

MAPK, ERK1/2 (Sigma-aldrich – M5670) 1:10.000 em TBS-T e 5% de leite

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling - #4377)

1:1000 em TBS-T e 3% BSA

phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) (Cell Signaling - #9549) 1:1000 em TBS-T e 5% BSA

PTEN (Sta Cruz – sc-9145) 1:500 em TBS-T

Caspase-3 (8G10) (Cell Signaling - #9665) 1:1000 em TBS-T e 5% de leite

PARP (46D11) (Cell Signaling - # 9532) 1:500 em TBS-T e 5% de leite

anti-rabbit IGG Peroxidase Conjugate (Sigma-aldrich – A9169)

anti-mouse IGG Peroxidase-Labeled (KPL – 04-18-06)

3.17 Sublocalização celular

- **Microscopia confocal**

Para as imagens no microscópio confocal primeiramente foi localizado um campo na lamínula onde estivessem presentes células em boa conservação, usando uma objetiva com imersão em água (aumento 63x). As células foram analisadas e fotografadas em meio RPMI (pH 7,4) sem indicador de pH vermelho de fenol. O laser utilizado para a excitação do composto foi de HeNe 633 nm. Os dados foram coletados no software LAS-AF com os módulos de colocalização.

- **RT-confocal**

As imagens de microscopia FLIM (imagem de tempo de vida de fluorescência, do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) foram feitas com o equipamento MicroTime 200, da PicoQuant. O equipamento é um microscópio resolvido no tempo, consistindo de um microscópio invertido (Olympus IX-71) com objetiva de imersão em água UPlanSApo 60X, NA 1,2 com um feixe de laser de diodo na faixa de 640 nm direcionado por um espelho dicroico (z638rdc AHF/Chroma) em direção à objetiva. A emissão fluorescente é coletada pela mesma objetiva e transmitida pelo espelho dicroico, passando por um tubo de lentes que foca a emissão de fluorescência coletada em um pinhole de 50 µm (micrometro), o qual seleciona o plano da imagem e rejeita luz originada fora de foco. O feixe então é direcionado por espelhos para um detector do tipo SPAD (*Single Photon Avalanche Diodes*, ou seja, detector de fóton único por fotodiodo de avalanche) passando antes através de um filtro que barra qualquer reflexão da excitação (filtro passa banda de emissão HQ690/70m AHF/Chroma). A aquisição e análise dos dados foram feitos no software SymPhoTime v. 5.2.4. Para as medidas de FLIM, a amostra é varrida com o movimento da objetiva monodirecional em uma área de 80 × 80 µm², com uma precisão de posicionamento nominal de 1 nm.

3.18 Análise estatística

Os resultados de citotoxicidade foram expressos pela média dos dados e normalizados em relação ao controle utilizando-se o programa GraphPad – Prism (5.0). As análises estatísticas dos experimentos em células foram feitas comparando-se os diferentes grupos pelo método de análise de variância ANOVA (pós-teste de Bonferroni). Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho consiste essencialmente na síntese, caracterização e avaliação do uso de compostos de rutênio como agentes liberadores de NO com possíveis atividades biológicas, principalmente contra o câncer. Por se tratarem de compostos diferentes quanto às estruturas químicas, o item de Resultados e Discussão será dividido em duas partes, para melhor entendimento.

A Parte I descreverá a síntese dos complexos mononucleares de rutênio. Serão abordados resultados dos experimentos feitos com o complexo rutênio-nitrosilo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})\text{NO}]\text{Cl}_3$ e com seu precursor, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})](\text{PF}_6)_2$

Na Parte II serão descritas a síntese, a caracterização, os estudos fotoquímicos e fotofísicos, assim como os ensaios biológicos de atividade antitumoral de um novo complexo trinuclear de rutênio $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$.

Parte I: Complexos mononucleares de rutênio

Os estudos com os complexos mononucleares de rutênio tiveram como base dados já obtidos pelo grupo. A reprodução das sínteses destes complexos foram seguidas conforme de Lima (2006) e caracterizadas de acordo com aquela descrição. Os estudos foram mais centrados nos ensaios biológicos com estes compostos, com o objetivo de entender melhor o papel do óxido nítrico na atividade citotóxica contra células tumorais.

Nesta parte serão discutidas a síntese e a caracterização destes compostos, a parte farmacotécnica de encapsulação em nanopartículas do complexo rutênio-nitrosilo e também ensaios biológicos que envolvem a atividade citotóxica dos complexos $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})](\text{PF}_6)_2$.

4.1 Caracterização dos complexos mononucleares de rutênio

4.1.1 Espectroscopia na região do UV-visível

Os espectros na região do UV-visível para a espécies mononucleares $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})](\text{PF}_6)_2$ estão descritas nas Figuras 14 a 16.

A síntese foi realizada e acompanhada por espectrofotometria UV-visível, sendo que, ao fim de cada etapa, foram feitos espectros de cada produto formado. Na primeira etapa, partindo-se de cloreto de rutênio e do ligante terpiridina, chegou-se ao complexo $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$, cujo espectro está representado na Figura 14. Observam-se duas bandas intensas, uma em 276 nm e outra em 318 nm. As bandas na região do ultravioleta, observadas nas Figuras 14 são atribuídas à transição interna $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante insaturado, decorrente da ligação do ligante terpiridina ao metal rutênio. As bandas na região do visível são, provavelmente, de campo ligante com provável contribuição de banda de transferência de carga ligante-metal (TCLM), do ligante insaturado para orbitais d_{π} do íon metálico.

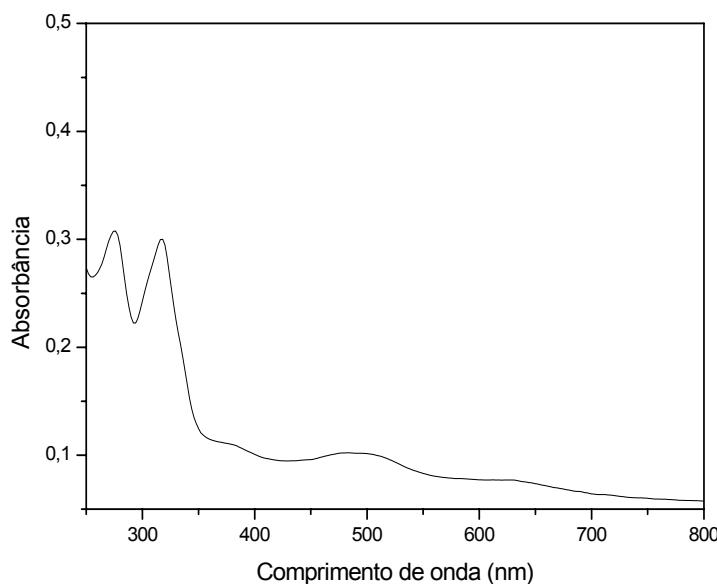


Figura 14. Espectro de absorção na região do UV-visível do precursor $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$, em tampão fosfato salino pH 7,4. [complexo] $\approx 1, \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Na segunda etapa da síntese, partindo do produto obtido na primeira etapa, obteve-se o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})](\text{PF}_6)_2$, cujo espectro está representado pela Figura 15. O espectro caracteriza-se pelo aparecimento de uma banda intensa em 498 nm. A presença desta banda na região do visível é característica de uma banda de transferência de carga metal-ligante (TCML), provavelmente devido à transição $d_{\pi}(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{bdqi})$.

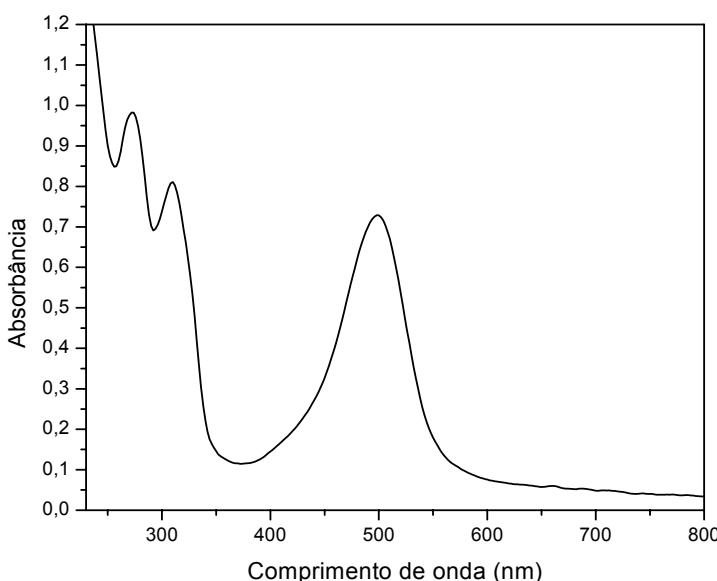


Figura 15. Espectro de absorção na região do UV-visível do precursor $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, tampão fosfato salino pH 7,4. [complexo] $\approx 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Já a terceira etapa, consiste na substituição da molécula de H₂O pela molécula de NO no complexo, através da ligação do NO com o metal de transição. Há diferentes metodologias de coordenação do ligante NO em complexos com centros metálicos de rutênio, como por exemplo, o borbulhamento de NO gasoso em uma solução aquosa de uma espécie precursora que contenha o fragmento Ru-H₂O (CHENEY; ARMOR, 1977; NAGAO et al., 1999). Nesse trabalho, os complexos nitrosilos foram obtidos a partir de precursores com o íon nitrito coordenado ao Ru(II). Para isso, no término da síntese de [Ru(H₂O)(bdqi)(terpy)]²⁺, apesar de já ter sido adicionado o ligante NO, o espectro obtido continuou a apresentar uma banda em 498 nm, a qual é característica complexo do [Ru(H₂O)(bdqi)(terpy)]²⁺. Isso provavelmente se deve ao fato de nem todo o NO ter se ligado ao complexo e, portanto, ainda poderia haver um pouco do produto da segunda etapa da síntese deste complexo mononuclear. Por esta razão, na quarta etapa da síntese, foram repetidos os procedimentos da terceira etapa, a fim de minimizar resquícios do complexo [Ru(H₂O)(bdqi)(terpy)]²⁺ e garantir a obtenção do complexo [Ru(NO)(bdqi)(terpy)]³⁺, o que pode ser confirmado através do espectro obtido (Figura 16). Ao observá-lo, é possível notar o desaparecimento da banda em 498 nm, bem como o aparecimento de banda menos intensa entre em 400 nm e 500 nm. Além disso, há uma banda em 328 nm, possivelmente devido à presença do NO ligado ao íon metálico Ru(II) no complexo [Ru(NO)(bdqi)(terpy)]³⁺. Em todos os complexos as bandas de maior energia foram atribuídas à transição $\pi - \pi^*$, características de ligantes insaturados.

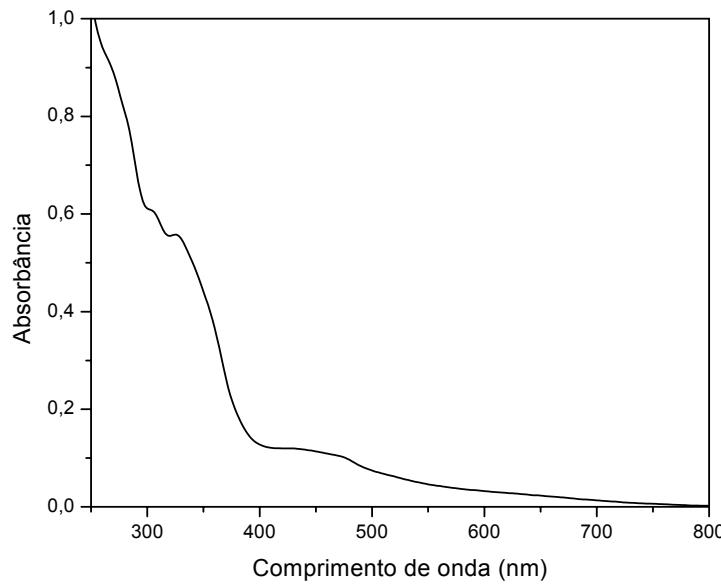


Figura 16. Espectro de absorção na região do UV-visível do produto final $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, em tampão fosfato salino pH 7,4 [complexo] $\cong 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A caracterização espectroscópica dos complexos mononucleares estudados nesta etapa do trabalho está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados de UV-visível para os complexos mononucleares $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$

Complexo	λ , ($\log \epsilon$, $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)	Caracterização
$[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$	272 nm (4,36)	$\pi \rightarrow \pi^*$
	310 nm (4,29)	$\pi \rightarrow \pi^*$
	498 nm (4,23)	$d_{\pi} \rightarrow \pi^*(\text{dbqi})$
$[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$	285 nm (4,39)	$\pi \rightarrow \pi^*$
	304 nm (4,31)	$\pi \rightarrow \pi^*$
	328 nm (4,27)	$d_{\pi} \rightarrow \pi^*(\text{NO})$
	444 nm (3,61)	$d_{\pi} \rightarrow \pi^*(\text{dbqi})$

4.1.2 Medida de liberação de NO

A liberação de NO conseguido por estímulo externo é vista como de interesse em termos de aplicabilidade clínica (de SANTANA et al., 2010; SAUAIÁ et al., 2003; SUZUKI et al., 2005). Uma das possibilidades está relacionada ao uso de irradiação luminosa, uma vez que esta técnica já encontra resultados em terapias (MARANHO et al., 2009), e constitui-se de interesse por ser um método não invasivo no tratamento de diferentes tipos de doenças. O comprimento de onda de excitação utilizado nos processos é, em sua grande maioria, localizado entre 600 – 850 nm (conhecido como janela terapêutica), em função de se tratar de uma região em que não há absorção de biomoléculas no espectro visível (PLAETZER et al., 2009). Entretanto, em alguns tratamentos como é o caso da psoríase (UVB) (MUDIGONDA; DABADE; FELDMAN, 2012; STEIN; PEARCE; FELDMAN, 2008), vitiligo (UVA) (EL-MOFTY et al., 2006), dentre outros tratamentos, faz-se uso de comprimento de ondas de alta energia de absorção. Neste contexto, e em relação à prova conceitual da possibilidade de utilizar irradiação luminosa para liberar NO e a utilização desta técnica para o tratamento de doenças, é que o processo de produção de NO a partir do $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ foi estudado.

A fim de saber em qual comprimento de onda de irradiação (λ_{irr}), 532 nm ou 447 nm – lasers disponíveis para irradiação em nosso laboratório –, que o complexo $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ irradiado liberaria maior quantidade de NO, foi realizada uma determinação amperométrica do NO durante a fotólise do composto rutênio-nitrosilo (Figuras 17 e 18).

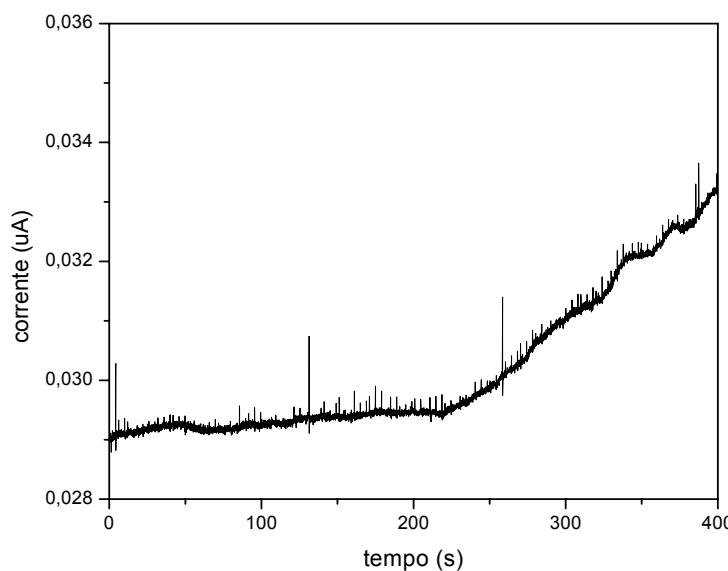


Figura 17. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$), em solução tampão fosfato salino pH 7,4, irradiado em 532 nm durante, aproximadamente, 13 minutos.

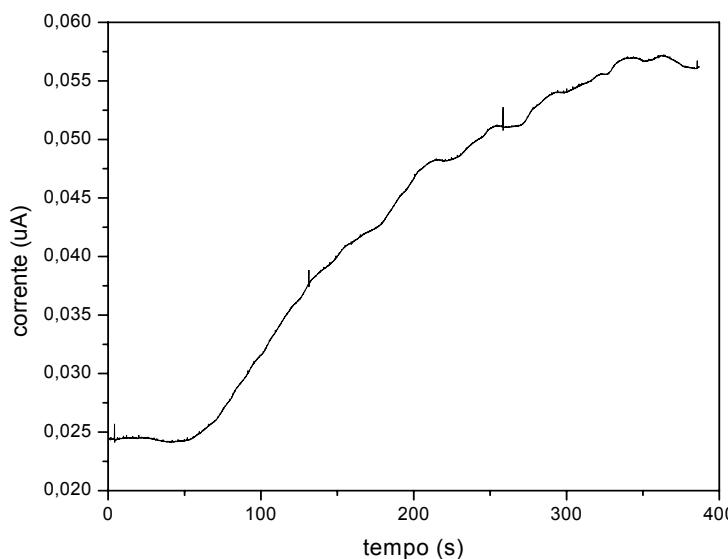


Figura 18. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$), em solução tampão fosfato salino pH 7,4, irradiado em 447 nm durante, aproximadamente, 6 minutos.

Quando irradiado em 447 nm, o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ apresenta maior Δi , coerente com maior liberação de NO do que em 532 nm. Isto se deve, provavelmente, ao fato de a região irradiada (447 nm) ter um caráter de contribuição maior do ligante NO na composição dos orbitais moleculares deste complexo, do que a outra região irradiada. Baseado em estudos anteriores com complexos

contendo o fragmento $\{\text{Ru}^{II} - \text{NO}^+\}^{3+}$ (da SILVA et al., 2007), a liberação do NO por fotoestímulo pode ser devido à transferência eletrônica fotoinduzida ou por irradiação na banda TCML de característica $d_{\pi} \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$. A julgar pela intensidade da banda em 444 nm, é mais plausível a produção de NO ser devido ao primeiro dos processos citados.

O tempo de irradiação em λ_{irr} 532 nm foi aproximadamente duas vezes maior do que o tempo em λ_{irr} 447 nm, mesmo assim a quantidade de NO liberado ainda é menor. Logo, a partir desta observação, o λ_{irr} 447 nm foi o selecionado para a realização dos ensaios de citotoxicidade do complexo. A quantidade de NO liberado em cada um dos comprimentos de onda foi calculada e será apresentada a seguir.

4.1.3 Cálculo da concentração de NO liberada

A calibração do NOmeter forneceu uma curva relacionando a corrente elétrica detectada pelo sensor e a concentração de NO liberado (Figura 7). A partir desta curva de calibração, obteve-se a equação da reta, dada por:

$$y = 0,00134 + 8037,40780 x$$

Sendo que y representa a corrente, enquanto x representa a concentração de NO. Assim, calculando a variação da corrente durante as irradiações em 532 nm (Figura 17) e 447 nm (Figura 18), obteve-se para cada uma delas $\Delta i^1 = 0,00907$ e $\Delta i = 0,0033$, respectivamente. Através da substituição desses valores na equação, por regressão linear, concluiu-se que a concentração de NO liberado em cada uma das irradiações, levando-se em conta que a concentração inicial do complexo nitrosilo era de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$:

Para o comprimento de onda de irradiação de 532 nm, $[\text{NO}] \approx 9,62 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

Para o comprimento de onda de irradiação de 447 nm, $[\text{NO}] \approx 3,94 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

¹ Δi = corrente final – corrente inicial (cronoamperograma)

Logo, como pôde-se observar nos cronoamperogramas, os cálculos comprovaram a fotolabilização mais intensa quando o comprimento de onda de irradiação utilizado é 447 nm.

4.1.4 Fotólise

O experimento foi realizado a fim de confirmar e acompanhar a liberação do NO através de alterações no NOmeter e no perfil espectrofotométrico. A variação espectral na região do UV-visível está representada na Figura 19. Os perfis de corrente registrados pelo NOmeter também foram detectados para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ nos mesmos intervalos de tempo.

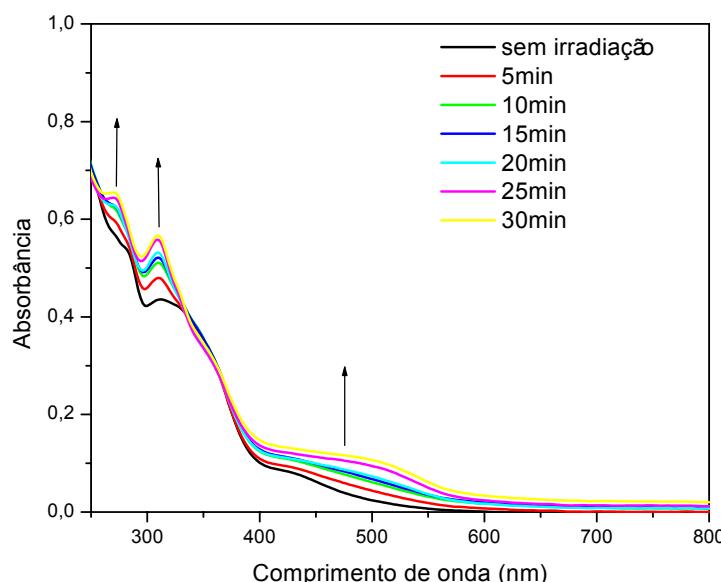
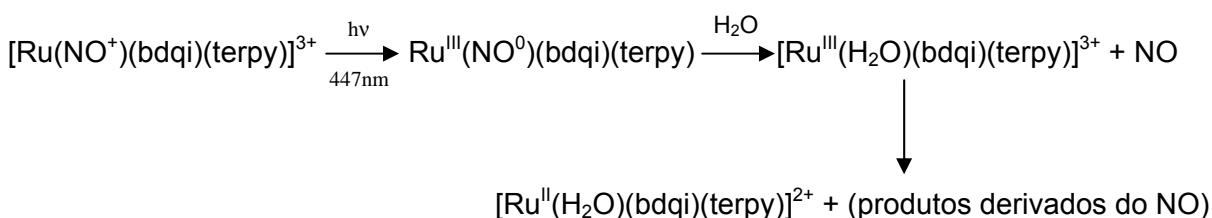


Figura 19. Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ ($2,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), em solução tampão fosfato salino pH 7,4, durante a fotólise em 447 nm.

Durante a fotólise, houve variação espectral para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, conforme indicado pelas setas na Figura 19. Pode-se observar a aumento na intensidade da banda entre 400 nm e 500 nm o que caracteriza a formação do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ conforme se dá a saída de NO. Isto também é demonstrado pelo aumento na intensidade das bandas próximas a 285 nm e 304 nm.

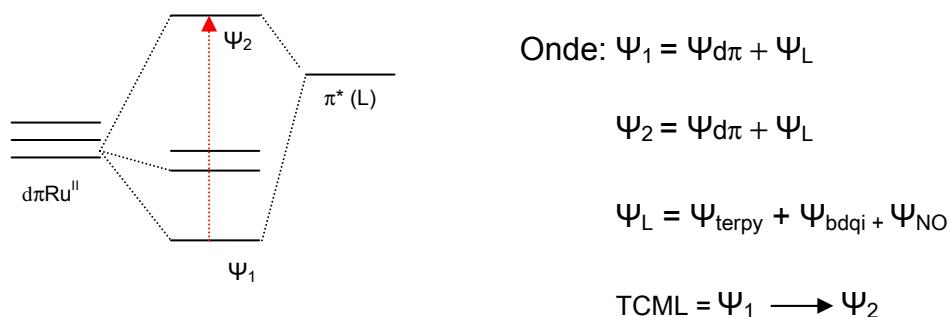
Observando-se os cronoamperogramas obtidos, pode-se confirmar que houve realmente a liberação do NO e que tal liberação foi intensa durante as primeiras irradiações. Pelos cálculos de curva de calibração de NO, chegou-se a conclusão que com uma irradiação de 5 minutos, a concentração NO liberado é na ordem de 10^{-6} mol.L⁻¹.

Baseando-se na variação espectroscópica e nos dados cronoamperométricos, pode-se inferir o mecanismo fotoquímico, conforme apresentado no Esquema 3 a seguir:



Esquema 3. Sugestão de mecanismo de fotólise em 447 nm para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$.

Simplificadamente, a fotorreatividade do complexo mononuclear de rutênio-nitrosilo pode ser explicada baseada no diagrama de orbitais moleculares, como no esquema a seguir:



Esquema 4. Diagrama simplificado dos orbitais moleculares do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$.

4.2 Ensaios de biotransformação (metabolismo *in vitro*)

No intuito de se observar um possível sinergismo na atividade citotóxica do complexo mononuclear $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ em função da formação desta espécie oriunda da liberação do ligante NO do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, estudos de matbolismo também foram abordados neste trabalho. Os resultados podem contribuir com o entendimento dos efeitos de citotoxicidade das espécies rutênio-nitrosilo em cultura de células de câncer. Baseado em experiência prévia de estudos de metabolismo, ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados.

4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Após síntese e caracterização do composto $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, deu-se início ao desenvolvimento de um método para identificação e quantificação do complexo por CLAE. Para isso, tomou-se como princípio a separação do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})]^{3+}$, a qual já foi descrita por Oliveira (2009).

Na análise cromatográfica, foram avaliadas diversas condições de separação de uma solução $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ (Tabela 3), sendo a mais adequada a que consistia em uma fase móvel composta por metanol:solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (TFA) 1 % (pH = 7,0), na proporção 7:3, empregando uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 20 mostra o cromatograma conseguido nas melhores condições testadas.

Tabela 3 – Condições avaliadas para cromatografia de alta eficiência

Fase estacionária ^a	Fase móvel	Proporção (v/v)	Vazão (mL min^{-1})
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	50:50	1,2
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	55:45	1,2
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	60:40	1,2
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	65:35	1,2
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	70:30	1,2
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	70:30	1,0
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	70:30	0,8
C18	Metanol: solução aquosa de TFA 1% (pH=7)	75:25	1,2

^aC18 octadecilsiloxano

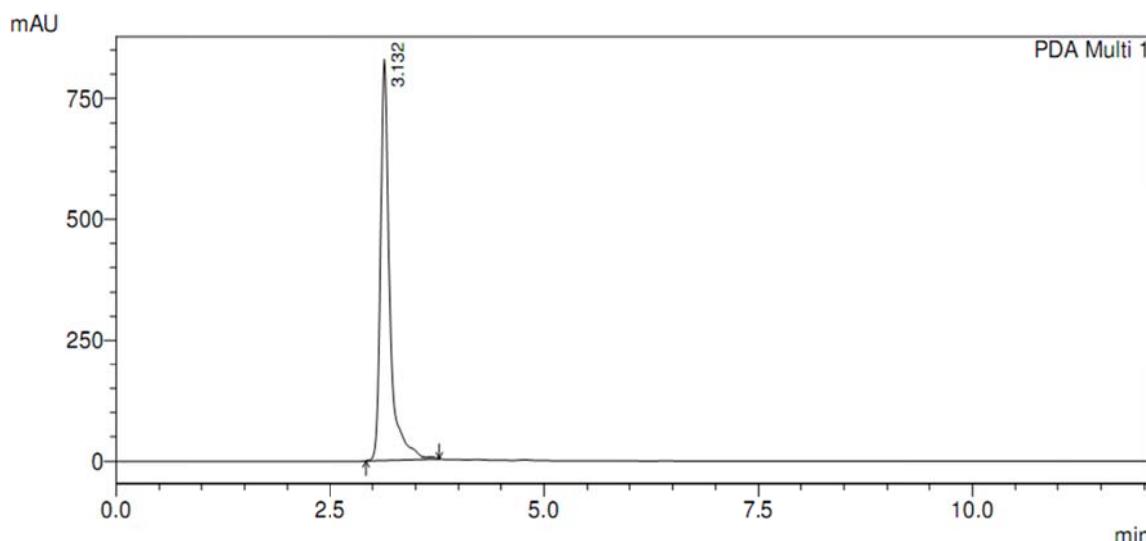


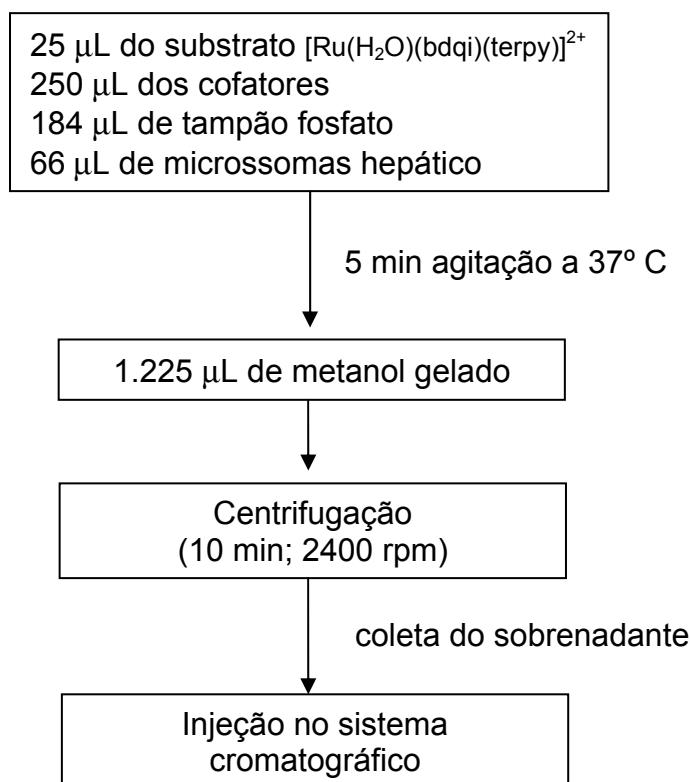
Figura 20. Cromatograma do complexo de $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$. Coluna C18 e fase móvel composta por solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 :70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Concentração do complexo 1,0 mg.mL⁻¹.

O detector escolhido foi do UV-visível (180 a 800 nm) com arranjo de diodos. Portanto, cada pico obtido possuía um espectro de absorção característico e analisando os espectros apresentados foi possível concluir que pico correspondia ao complexo estudado, com uma banda de absorção intensa próxima a 498 nm, como já mostrado para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$.

Foram feitas soluções estoques das amostras em metanol, solvente escolhido devido aos resultados apresentados no estudo de biotransformação. Antes das injeções, duas alíquotas foram retiradas dessa solução (25 µL). Uma delas foi seca com ar comprimido, ressuspandida em 1,0 mL de fase móvel e injetada no sistema cromatográfico. A outra alíquota foi ressuspandida em 1,0 mL de metanol (70 %) e PBS 1x (30 %) de forma que mimetizasse as condições experimentais do ensaio de biotransformação. O objetivo do teste era saber se haveria diferença no perfil cromatográfico destas amostras para saber se após o ensaio de metabolismo *in vitro* seria necessário secar as amostras com ar comprimido antes de injetar. Não houve diferenças nos chromatograms o que nos permitiu injetar as amostras logo após a precipitação das proteínas, ou seja, o sobrenadante. Estes estudos são importantes na tentativa de mimetizar as condições do ensaio biológico para tentar amenizar as mudanças no tempo de retenção do analito e também assimetria do pico cromatográfico.

O comprimento de onda 498 nm foi escolhido para dar continuidade ao trabalho já que a absorção neste comprimento de onda foi atribuída à transição de transferência de carga metal ligante $d_{\pi} \rightarrow \pi^*$ (terpy + bdqi).

Estabelecidas as condições para CLAE para identificação e quantificação do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, foi dado prosseguimento para os ensaios de biotransformação por complexo de enzimas hepáticas. Com a fase estacionária, fase móvel, vazão e concentração da amostra ajustados, iniciou-se o ensaio preliminar de incubação para os estudos de biotransformação com o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, conforme esquema 5 a seguir:



Esquema 5. Procedimento de incubação para os estudos de biotransformação.

As Figuras a seguir mostram os cromatogramas das amostras após os ensaios de metabolismo e seus espectros eletrônicos após aplicação na coluna cromatográfica. Nestes estudos, todas as amostras foram preparadas em triplicatas, amostras controle (com microssomas e sem cofatores) (Figuras 21, 22 e 23) e amostras para o estudo de biotransformação (contendo os microssomas e os cofatores) (Figuras 24, 25 e 26).

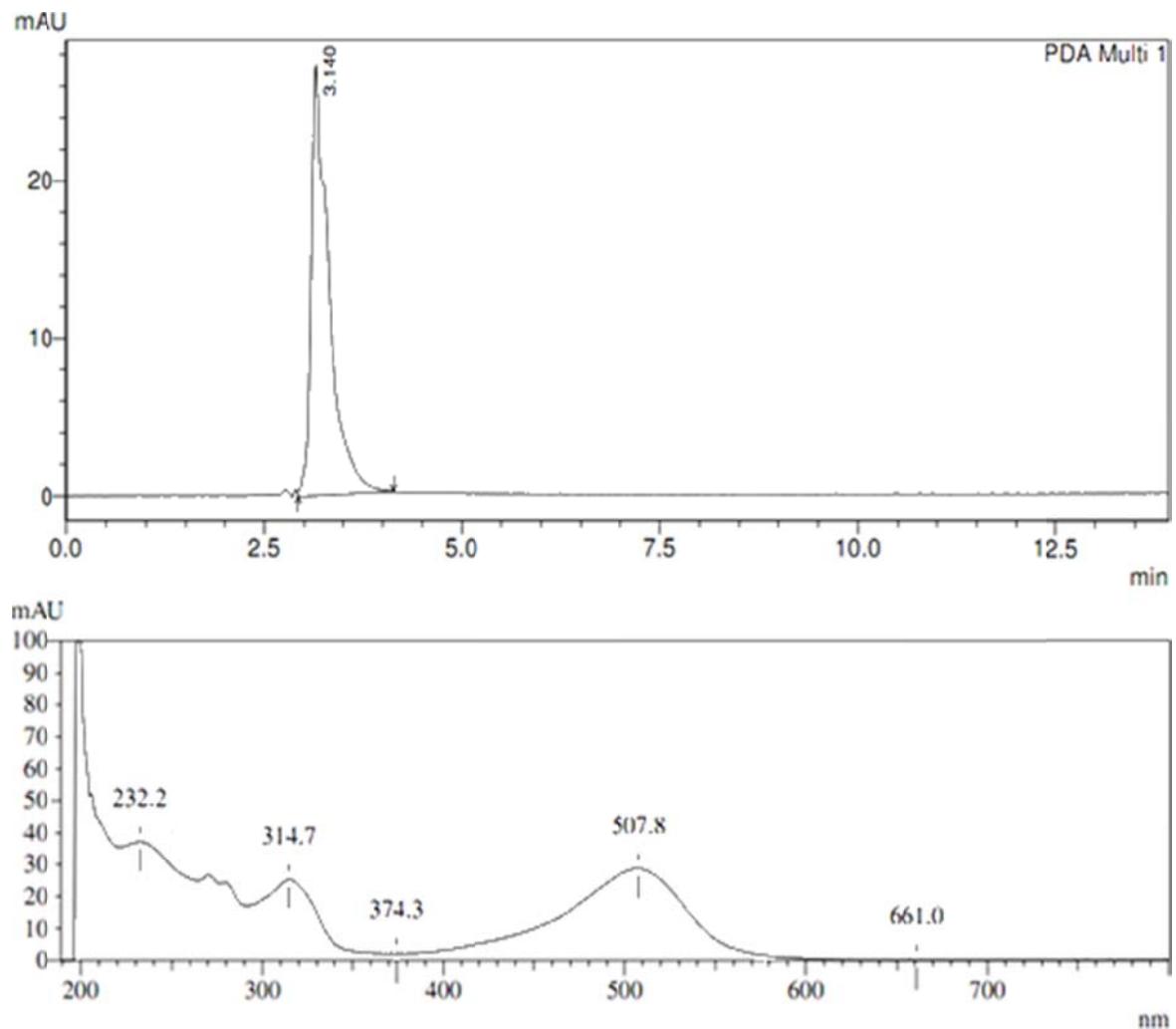


Figura 21. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra controle 1. É denominado controle a amostra da reação que contém todos os reagentes, exceto os cofatores. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

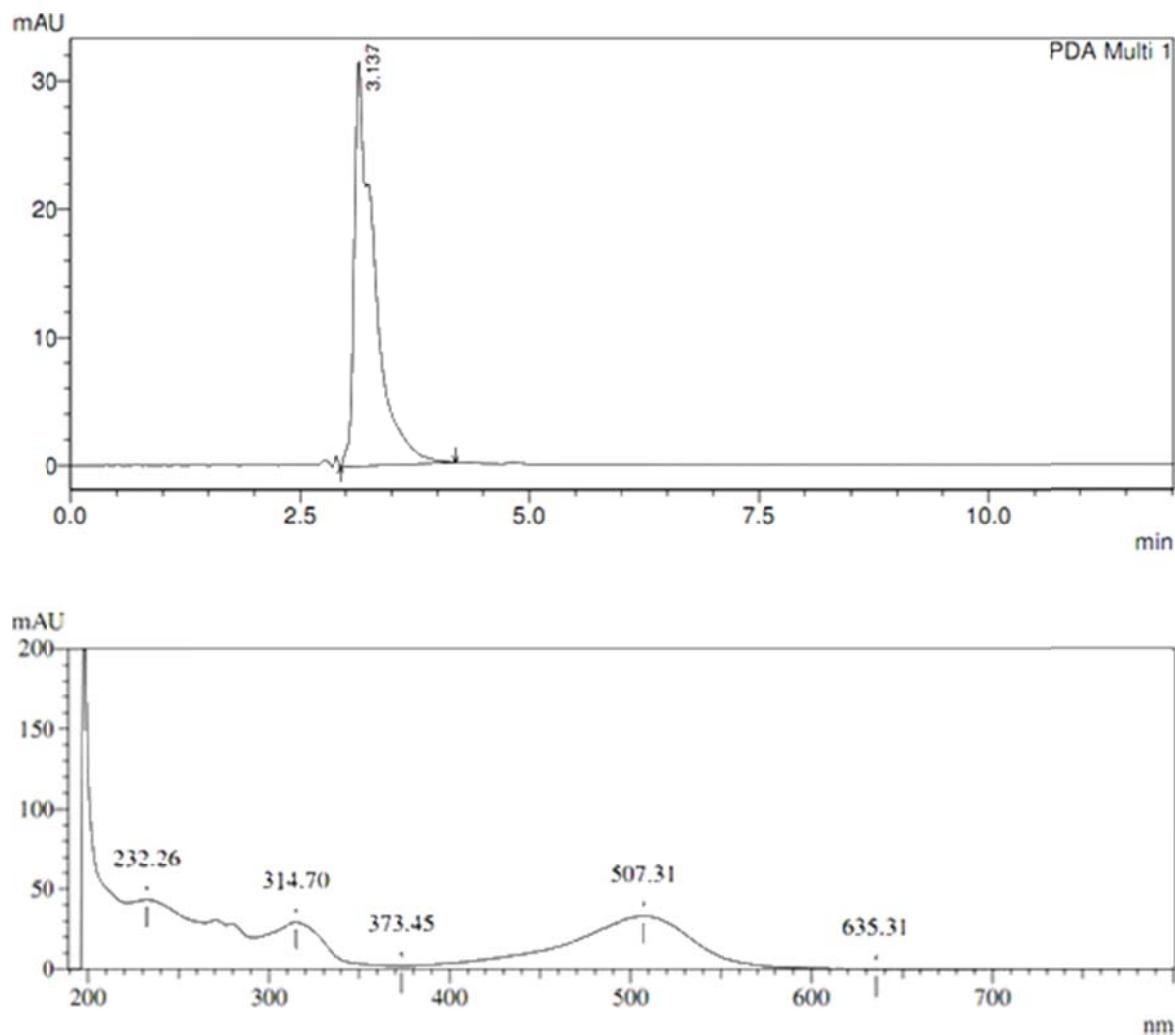


Figura 22. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra controle 2. É denominado controle a amostra da reação que contém todos os reagentes, exceto os cofatores. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

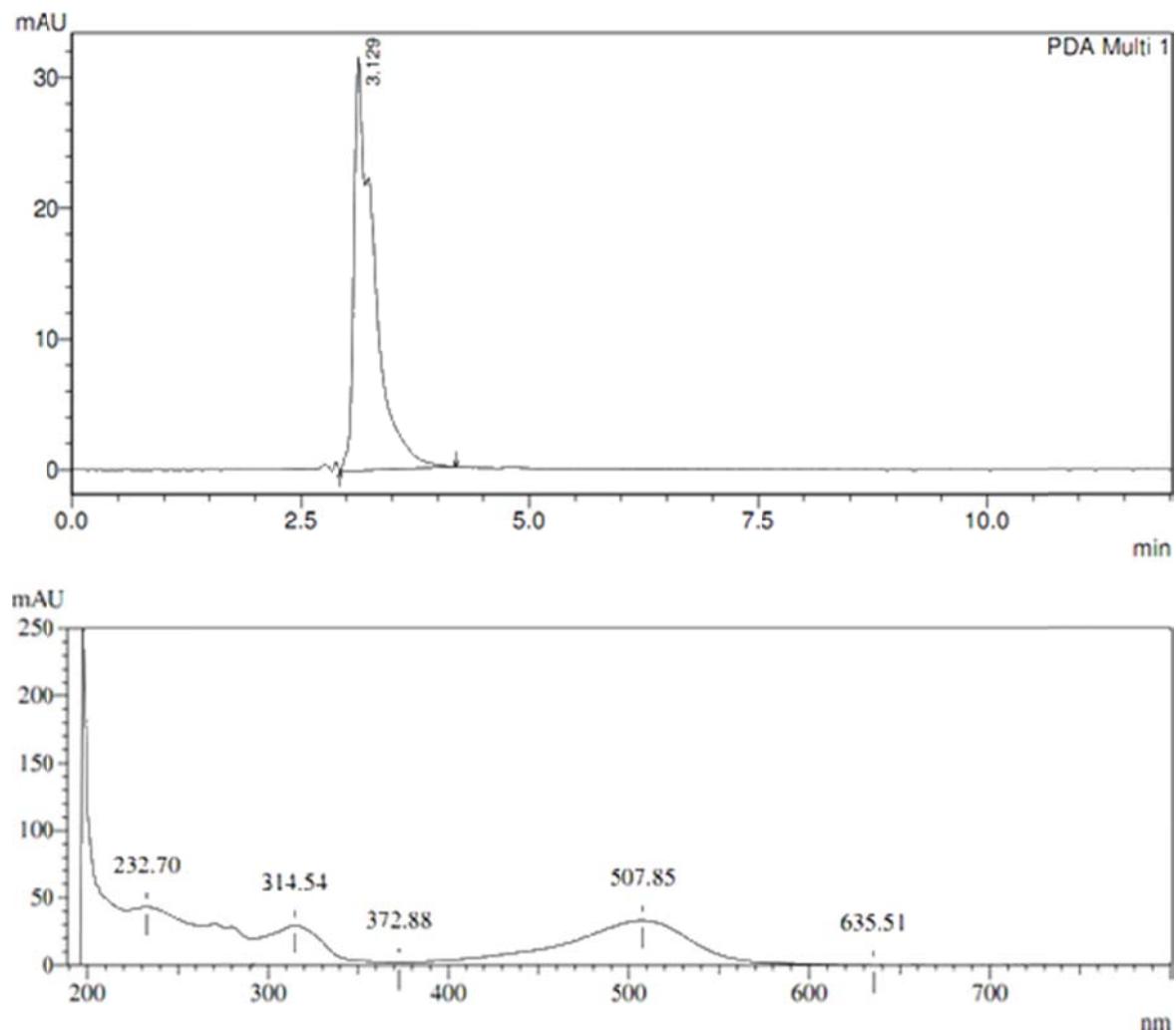


Figura 23. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra controle 3. É denominado controle a amostra da reação que contém todos os reagentes, exceto os cofatores. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Temperatura Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

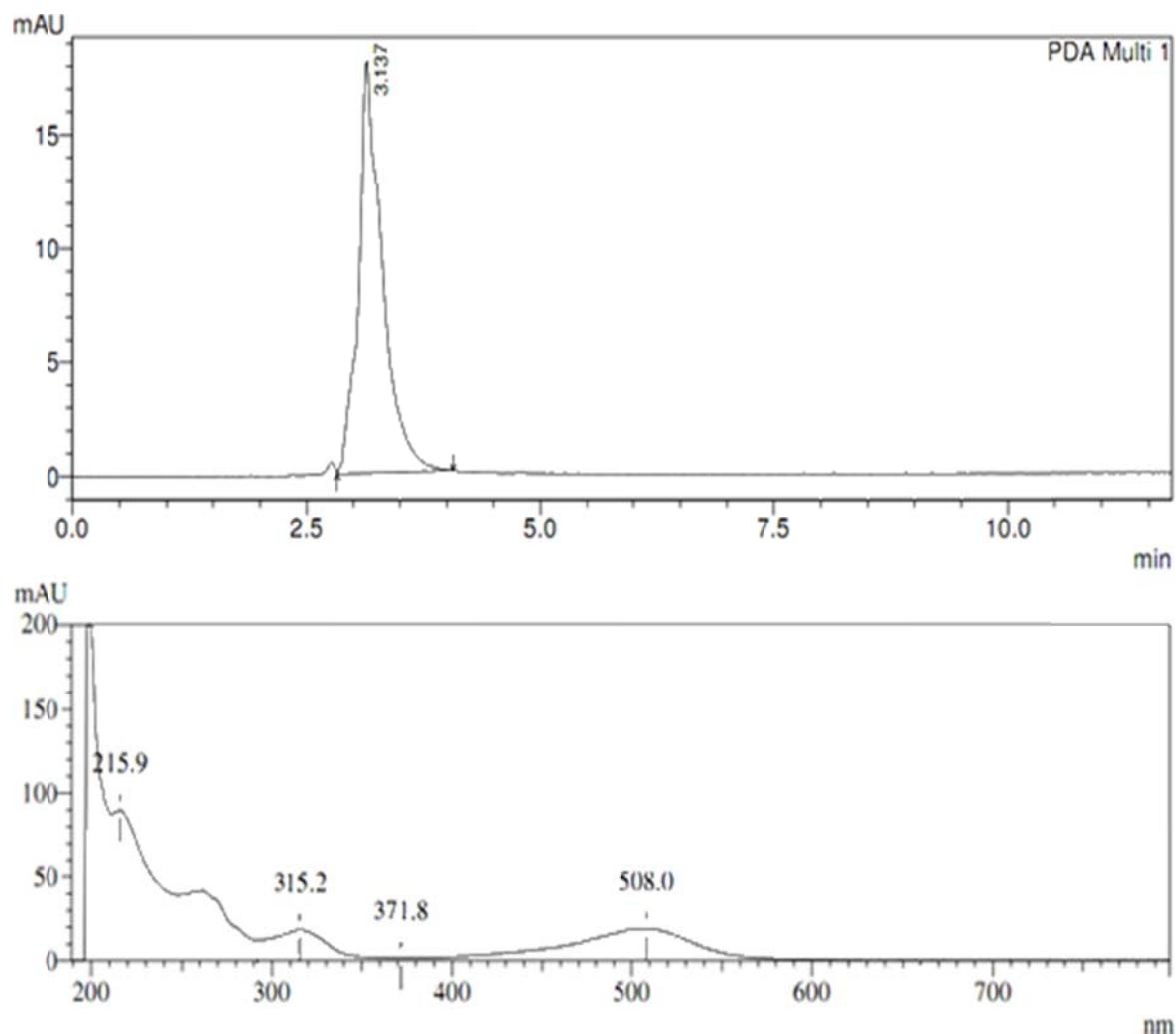


Figura 24. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra 1, depois da reação conforme descrito no esquema 5. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1 %) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

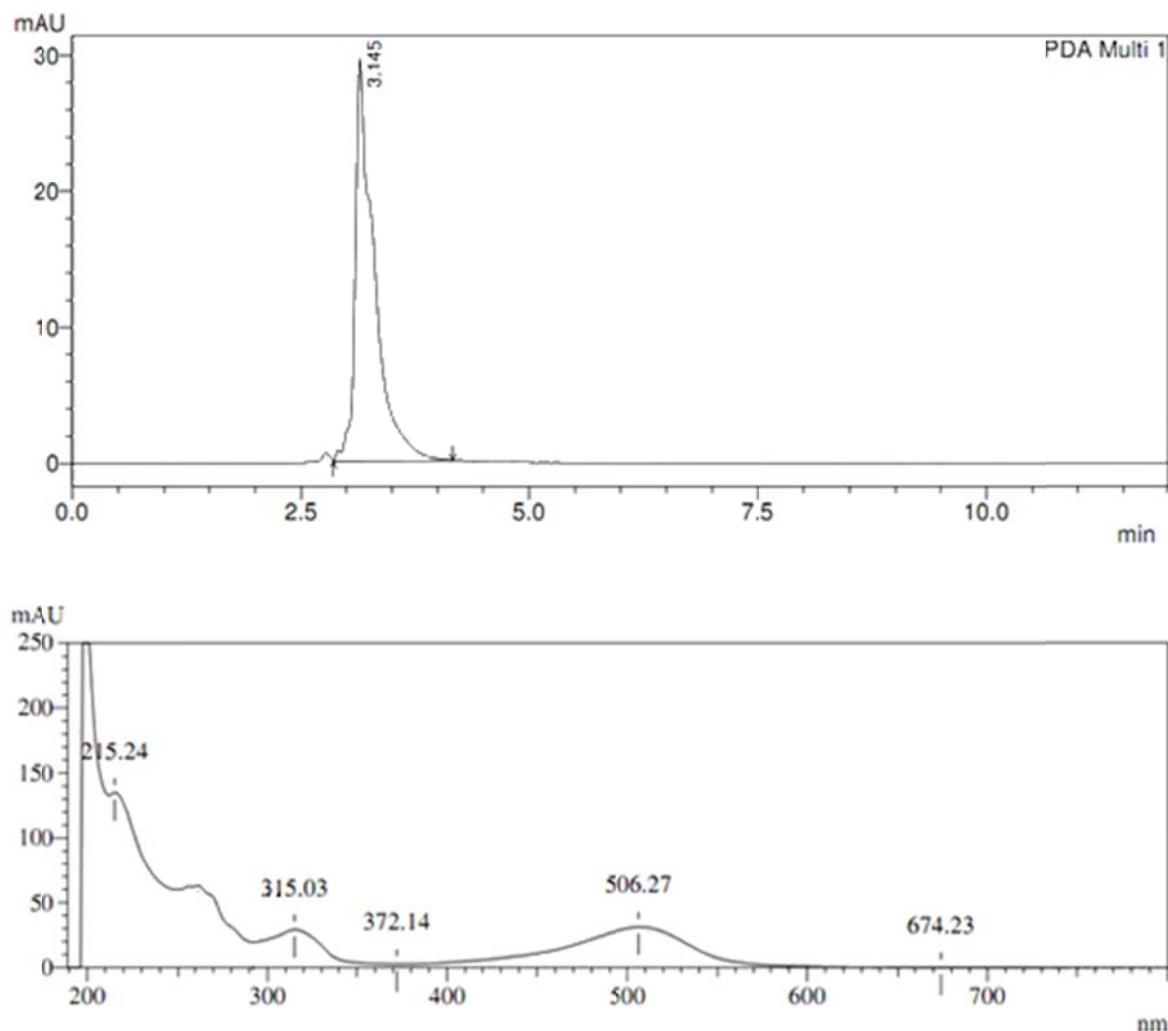


Figura 25. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra 2, depois da reação conforme descrito no esquema 5. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1%) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

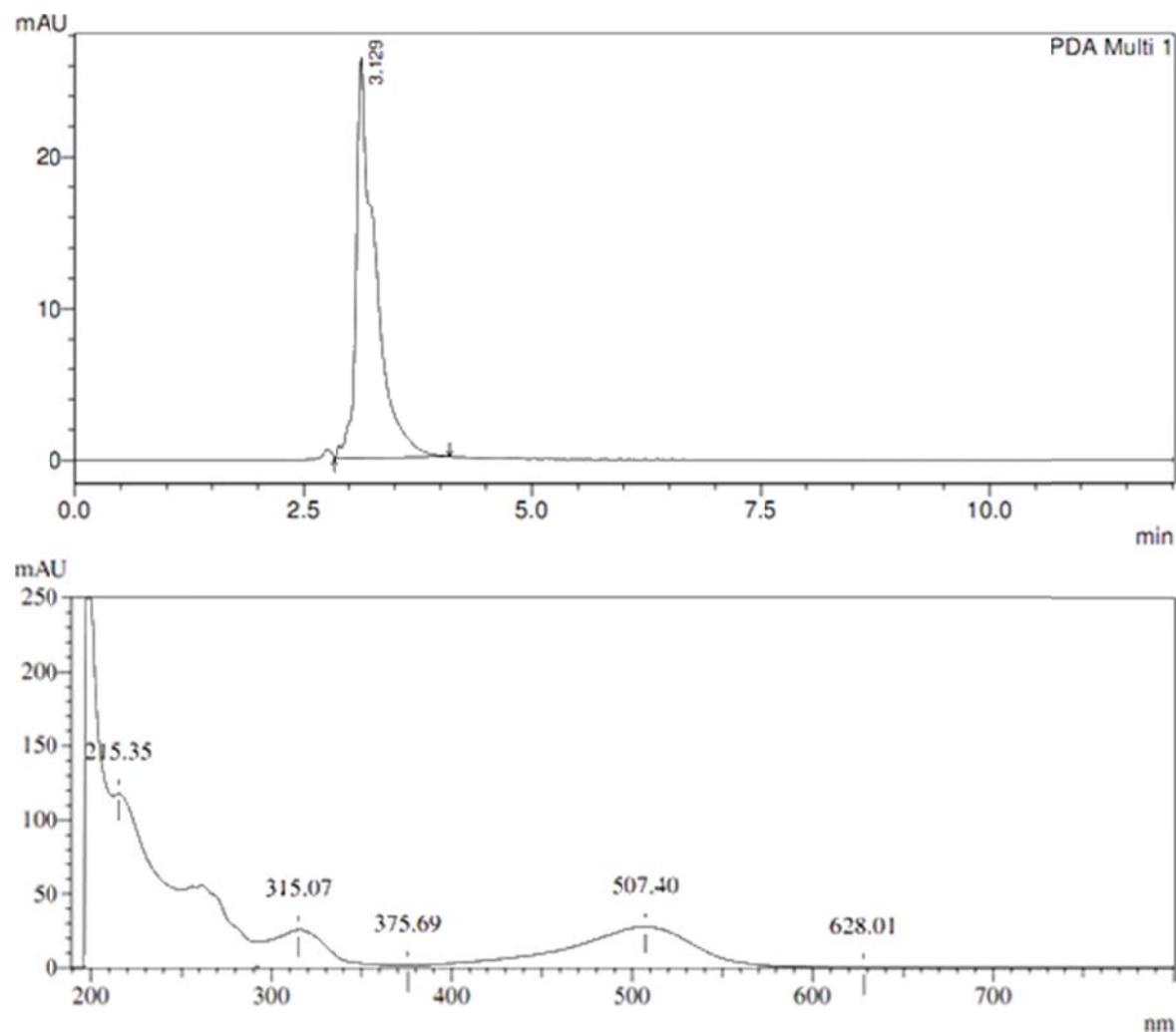


Figura 26. Cromatograma e espectro eletrônico referente a amostra 3, depois da reação conforme descrito no esquema 5. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução aquosa de trifluoroacetato de sódio (1%) pH 7,0 : metanol (30 : 70, v/v). Detecção em 498 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

Em todas as análises pôde-se observar a presença de um ombro (3,266 minutos) no cromatograma. Espectros eletrônicos tanto do pico quanto do ombro foram observados e tratam-se do mesmo espectro. Entretanto, quando comparadas as áreas dos cromatogramas das amostras (Figuras 24, 25 e 26) de biotransformação em relação aos controles (Figuras 21, 22 e 23), há diminuição da área do pico cromatográfico. Isto sugere que o complexo foi consumido pelas enzimas contidas no meio microssomal (CYP 450), pois as amostras que continham o cofator (NADPH, necessário para ativação das enzimas) apresentaram uma diminuição do pico de cerca de $10,44 \pm 0,45\%$, sugerindo que a biotransformação deste composto pelo complexo enzimático estudado é muito pequena. A biotransformação ocorre em diversos tecidos, sendo o fígado o mais importante. Contudo, os rins, a pele, os pulmões e intestino também podem estar envolvidos. A rota de biotransformação de uma substância é mediada pela fase I², fase II³ ou uma combinação de ambas. A superfamília de enzimas do citocromo P450 (CYP) tem um papel determinante nas biotransformações de fase I; estas enzimas estão presentes principalmente no fígado (RANG; DALE; RITTER, 2001).

No decorrer da realização dos experimentos, ao se perceber o aparecimento do ombro nos cromatogramas, passou-se a conduzir as análises injetando-se amostras e controles, tais como se segue: controle 1 (Figura 21), amostra 1 (Figura 24), controle 2 (Figura 22), amostra 2 (Figura 25), controle 3 (Figura 23), amostra 3 (Figura 26). Análises posteriores permitiram deduzir que, de fato, o ombro seria resultante do processo cinético envolvendo o meio reacional e o complexo de rutênio utilizado nos estudos. Como no meio reacional, dentre outras coisas, continha fosfato e outros sais (ver item 3.11.2), é lícito supor esta reatividade. Acredita-se que provavelmente tenha ocorrido reação entre o aquo (benzoquinona)terpiridinarutênio(II) com ânions existentes no meio.

Neste contexto, pensando-se num protótipo para uso como quimioterápico, o fato de o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ não ter sofrido biotransformação pelo

² Fase I – é a fase de modificação quando várias enzimas agem para a introdução de grupos reativos e polares aos seus substratos. As reações de Fase I podem ocorrer por oxidação, redução, hidrólise, adição de oxigênio ou de remoção de hidrogênio, dentre outras. Estas reações oxidativas, na sua maioria, acontecem no fígado e normalmente envolvem o citocromo P450, NADPH e oxigênio.

³ Fase II – as reações de fase II normalmente resulta em compostos inativos e envolvem a conjugação, isto é, fixação de um grupo substituinte (sulfato, metil, acetil, glicil, glutationa). O conjugado resultante é quase sempre inativo farmacologicamente e menos lipossolúvel do que seu precursor.

complexo enzimático estudado leva a crer que, nos ensaios de atividade antitumoral (item a seguir) a espécie responsável pela perda da viabilidade celular é o $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, e não um dos seus possíveis metabótitos.~

4.3 Citotoxicidade dos compostos mononucleares

A atividade citotóxica dos complexos mononucleares foi avaliada pela análise da viabilidade celular obtida para cada um dos dois compostos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ em diferentes concentrações e tempos de tratamento. Os ensaios de atividade citotóxica em diferentes tempos de incubação sem fotoestímulo foram realizados para a determinação do período de incubação e da concentração da composta que diminuiria mais de 50 % da viabilidade celular. Observa-se na Figura 27 que o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ com 24 horas de incubação na concentração de 250 μM diminui para $23,5 \pm 3,6$ % a viabilidade celular. Com 48 horas, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ apresenta maior atividade citotóxica que $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, diminuindo para $36,7 \pm 1,4$ % a viabilidade celular na concentração de 100 μM , enquanto que para o composto $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ é necessária uma concentração maior que 250 μM para se observar $49,8 \pm 4,9$ % da viabilidade.

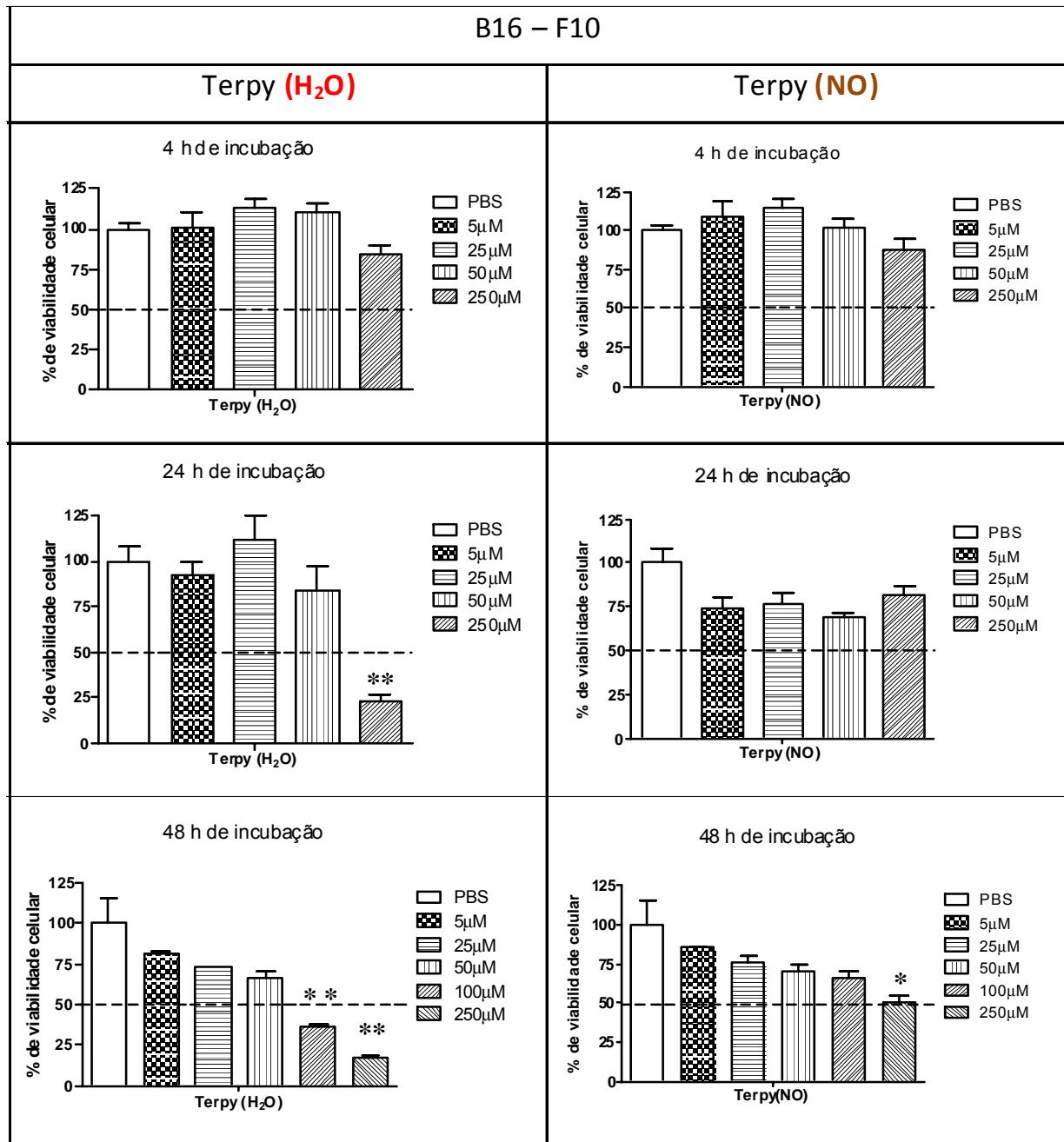


Figura 27. Avaliação do efeito citotóxico dos complexos mononucleares de rutênio $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, aqui denominado Terpy(H_2O) e $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, aqui denominado Terpy(NO), em linhagem de células tumorais B16-F10. Os dados apresentados representam as médias \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparados ao controle.

Acredita-se que pelo resultado de atividade do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$, este possa estar contribuindo com um possível efeito sinérgico, ou seja, a atividade citotóxica ocorreria, supostamente, não só pela ação de liberação do NO do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, mas por algum outro mecanismo que envolve a estrutura do composto. Várias podem ser as possibilidades que levam o complexo aquo coordenado mostrar maior atividade citotóxica que o complexo nitrosilo. Dentre elas, que o mecanismo de ação deste composto se dê, talvez, por dano a alguma biomolécula como o DNA, por exemplo, mecanismo que já descrito para outros quimioterápicos como a cisplatina (JAKUPEC; GALANSKI; KEPPLER, 2003; JAMIESON; LIPPARD, 1999) e outros complexos de rutênio com NO coordenado (HEINRICH et al., 2011). Desta forma, acredita-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ possa também causar alterações bioquímicas através de alterações no DNA, acarretando na perda de viabilidade das células tumorais estudadas. Contudo, estudos para a definição do mecanismo de ação deste composto ainda devem ser desenvolvidos, assim como estudos da análise da concentração de rutênio que permeou a membrana destas células para resultar em tal atividade.

Diante do exposto, buscou-se entender o porquê de o complexo doador de NO ter demonstrando um efeito, aparentemente, citoprotetor quando comparado ao efeito do seu precursor aquo. Como já descrito, o NO é uma molécula multifacetada, ou seja, dependendo da sua concentração no sistema biológico estudado, ele poder ter atividade tanto proliferativa quanto citotóxica. Além disso, esta atividade é dose dependente e celular específica (HUERTA; CHILKA; BONAVIDA, 2008; REEVES; REED; BROWN, 2009; WINK et al., 2008).

Dentro deste contexto pesquisou-se, com o auxílio da microscopia confocal, qual seria a concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) logo após a adição de 200 μM do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$, uma das maiores concentrações estudadas para os ensaios de citotoxicidade em células de melanoma murino B16-F10. Os resultados demonstram que 50 segundos após a adição do complexo a sonda fluoresce na presença do NO citosólico e que 200 segundos após a adição, há um aumento ainda maior na intensidade da fluorescência (pontos verdes apontadas pelas setas brancas), principalmente na região perinuclear da célula (Figura 28). O aumento $[\text{NO}]_c$ em resposta a adição do composto mononuclear em relação à $[\text{NO}]_c$ basal da célula foi de $\Delta\% F: 16, 5 \pm 1,8\%$.

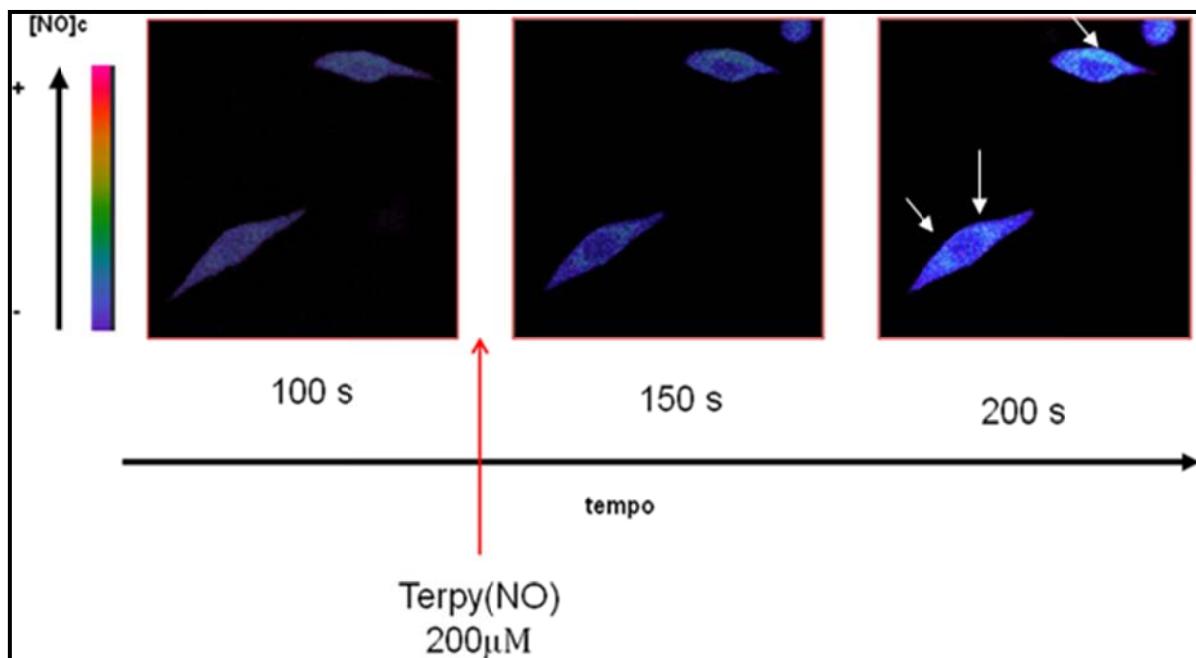


Figura 28. Concentração citosólica de NO ($[NO]_c$) em células de melanoma murino B16-F10 carregadas com DAF-2 DA ($5 \mu M$) após tratamento com $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$. Imagens sequenciais da fluorescência de DAF-2T nas células tumorais foram gravadas depois da adição do composto $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ aos 100 segundos. A intensidade das cores indica a maior $[NO]_c$ (como mostrada na barra a esquerda) de $n=5$.

Estes resultados sugerem que, a liberação do NO pelo composto $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ ocorre por ação redutimétrica do meio. Ou seja, o ambiente das células tumorais pode facilitar a liberação do NO, porém, não em concentração suficiente para a ação citotóxica do complexo. Esta resposta abre outras perspectivas para diferentes abordagens quanto à resposta celular frente a baixas concentrações de NO liberado, como por exemplo, no tratamento clínico de cicatrização de feridas se envolvido em vias de proliferação celular (FRANK et al., 2002; KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997; LUO; CHEN, 2005; WINK; MITCHELL, 1998; WITTE; BARBUL, 2002).

Dentro deste contexto, buscou-se uma alternativa de sistema de liberação que combinasse nanotecnologia e complexos de rutênio doadores de NO que pudesse auxiliar no aumento da concentração destes complexos, e consequentemente do NO, dentro das células. Em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

4.4 Desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

A primeira geração de nanopartículas lipídicas foi descrita no início da década de 90, como uma alternativa para os tradicionais sistemas carreadores coloidais, assim como emulsões, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas (ABDELBARY; FAHMY, 2009; BATTAGLIA et al., 2010). Atualmente, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) têm sido intensivamente estudadas, as quais são constituídas por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e a sua superfície é coberta por uma camada externa de surfactante que estabiliza a dispersão (MÜLLER; MADER; GOHLA, 2002; JORES et al., 2005), com tamanho que varia de 50 a 1000 nm.

O controle da liberação de NO de fármacos em sítios de ação específicos através de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa com elevado potencial de aplicação no tratamento de tumores e malignidade localizada (MARANHO et al, 2009).

O alto custo do desenvolvimento de novas moléculas ativas torna os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos uma das áreas da indústria farmacêutica em maior expansão. Isso porque um novo veículo poderia resgatar fármacos promissores descartados devido à descoberta de potenciais efeitos adversos ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes (ROSSI-BERGMANN, 2008). Desta forma, as NLS podem ser uma opção viável para melhorar a permeabilidade celular, pois os lipídeos são componentes celulares e as NLS, ao se ligarem à superfície das células, por exemplo, podem permitir a troca de lipídeo entre as camadas o que facilitaria sua permeabilidade.

As NLS reúnem as principais vantagens encontradas em outros sistemas de liberação de fármacos como lipossomas e micro e nanopartículas poliméricas (OLBRICH et al., 2001). Da mesma forma que lipossomas, as NLS são sistemas compostos por substâncias fisiologicamente bem toleradas e que já possuem aprovação para a aplicação farmacológica em seres humanos (MULLER; MADER; GOHLA, 2000). De maneira similar as nanopartículas poliméricas, a sua matriz sólida protege as substâncias ativas contra degradações químicas e permite modular a velocidade de liberação do fármaco. Além disso, seus componentes possuem

baixa citotoxicidade e possibilitam sua obtenção sem o uso de solventes (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008).

É possível verificar na literatura relatos de princípios ativos que tiveram sua atividade biológica melhorada ou modificada quando encapsuladas em NLS. Os primeiros estudos com estes sistemas descrevem a administração endovenosa de fármacos nanoencapsulados com o intuito de sustentar sua liberação durante sua permanência no sistema circulatório. Estudos mais recentes demonstram a administração tópica das NLS. Por exemplo, Liu e colaboradores (2007) observaram que a administração tópica da isotretinoína encapsulada em NLS levou a um aumento de sua retenção na pele além da melhora da estabilidade deste fármaco. Outro exemplo de aplicação das NLS é o estudo encapsulando a doxorubicina, a qual apresentou melhores resultados terapêuticos, além da boa eficiência de encapsulação e estabilidade (SUBEDI et al., 2009).

Além do exposto, as NLS também têm sido usadas para encapsular fármacos hidrofílicos e/ou carregados (MIGLIETTA et al., 2000; WONG et al., 2004; RUCKMANI; SIVAKUMAR; GENESHKUMAR, 2006), como na grande maioria dos compostos nitrosilos de rutênio. Desta forma, este sistema é adequado para tal encapsulação, pois permitem o controle da velocidade de liberação do fármaco, assim como os protegem de eventuais degradações, aumentando sua estabilidade e garantindo a eficácia das formulações dermatológicas (NESSEM, 2001; PAOLINO et al., 2002).

Com base no exposto, é de grande interesse a pesquisa por compostos que demonstrem atividades citotóxicas (*in vitro*), antitumorais (*in vivo*) e que possam desencadear uma resposta de morte celular das células neoplásicas. Há ainda muito a ser estudado para o completo entendimento dos mecanismos de ação dos diferentes compostos que vêm sendo desenhados para pesquisa de diferentes atividades biológicas, dentre eles, complexos de rutênio que possuem em sua esfera de coordenação a molécula de NO. Essas investigações levam a crer que complexos metálicos doadores de NO possam ser futuros agentes usados, senão na terapia antitumoral, como importantes ferramentas bioquímicas e farmacológicas, se caracterizados e entendidos os mecanismos de ação moleculares e as vias bioquímicas envolvidas na atividade de cada um destes compostos.

Ensaios de citotoxicidade com solução do complexo rutênio-nitrosilo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ mostram atividade citotóxica com diminuição de 50 % da

viabilidade celular numa concentração de 200 µM incubados por 48 horas. Com o objetivo de aumentar a potencialidade citotóxica deste complexo, entende-se que as NLSs podem ser efetivamente utilizadas para que este complexo possa alcançar sítios-alvos quando nanoencapsulado.

As NLSs foram preparadas por microemulsificação de lipídio fundido (fase interna), e subsequente dispersão da microemulsão em meio aquoso (frio) sob agitação mecânica. Uma rápida recristalização da gotícula de óleo no meio de dispersão frio produz nanopartículas com matriz sólida. Ácido esteárico, um triglicerídeo monoácido foi empregado como matriz sólida na qual o complexo foi incorporado. Lecitina de soja, um fosfolipídio, foi empregada como tensoativo. Ácido taurodeoxicolato de sódio, um sal biliar, foi usado como cotonsoativo, permitindo a formação de uma microemulsão balanceada (RUCKMANI; SIVAKUMAR; GENESHKUMAR, 2006).

4.4.1 Espectroscopia de espalhamento de luz e determinação do potencial zeta

O diâmetro médio, o índice de polidispersividade (Pdl) e o potencial Zeta obtidos para as nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas podem ser resumidamente observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Diâmetro médio, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta obtidos para NLS com e sem complexo rutênio-nitrosilo. Resultados representativos de uma das três sínteses das NLSs

NLS	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersividade (Pdl)	Potencial Zeta (mV)
NLS sem complexo (branca)	209	0,322	-21,9
NLS com complexo	202	0,340	-18,3

As partículas obtidas foram de escala nanométrica e, embora os índices de polidispersividade tenham sido maiores de 0,2 ainda indicam uma distribuição não muito alta do tamanho de partícula. A análise do Potencial Zeta, que é o potencial

elétrico na superfície da partícula, é uma ferramenta útil para prever a estabilidade física durante o armazenamento de sistemas coloidais. Potenciais Zetas maiores que -30mV mostram boa estabilidade física, sendo otimizados quando alcançam aproximadamente -60mV, exibindo uma boa estabilidade física durante um tempo de prateleira (TEERANACHAIDEEKUL; MUELLER; JUNYAPRASERT, 2007). No presente estudo as NLS com e sem o complexo, apresentaram potencial Zeta na faixa de -18 a -21 mV, apresentando potencial Zeta inferiores a -30 mV, o que indicaria uma possível instabilidade física durante o tempo de prateleira. Para evitar degradações, as NLSs foram guardadas em dessecadores protegidos da luz e testadas tão brevemente possível. Para tentar amenizar os efeitos de degradação, as amostras foram liofilizadas com a adição de um crioprotetor, para que pudéssemos utilizá-las em pelo menos três experimentos independentes de citotoxicidade contra células de B16-F10.

4.4.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE), que corresponde à porcentagem do complexo encapsulado e adsorvido na superfície das partículas foi determinada pela diferença entre a quantidade total e livre do fármaco depois de as NLSs liofilizadas terem sido ressuspensas em 1 mL de água ultra pura (PATTANI; MANDAWGADE; PATRAVALE, 2006; SHAH et al., 2007). Foi observada uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 73,9 % para NLS que está de acordo com o descrito por Marquele-Oliveira e colaboradores (2010) que foi de $78,32 \pm 4,41$ %.

4.4.3 Citotoxicidade do composto nanoencapsulado

A atividade citotóxica dos complexos foi avaliada por análise da viabilidade celular obtida para o composto mononuclear $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ solubilizado em PBS e comparado com o mesmo encapsulado em nanopartícula lipídica sólida. A Figura 29 mostra que o composto quando nanoencapsulado é capaz de inibir em mais de 50 % a viabilidade celular quando incubado por apenas 4 horas. Um efeito semelhante é percebido quando este mesmo complexo, em solução, é incubado por 48 horas na concentração de 250 μM . Desta forma, os resultados de viabilidade celular destes compostos nos levam a crer que, quando em solução, o óxido nítrico

pode estar sendo liberado do complexo $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ em concentrações não suficientes para contribuir de maneira efetiva para a diminuição da viabilidade celular. Depois de liberado o NO, seu precursor $[Ru(H_2O)(bdqi)(terpy)]^{2+}$ é formado, como mostrado pelos ensaios de fotólise deste complexo rutênio-nitrosilo. Acredita-se que quando o $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ é nanoencapsulado sua estrutura química seja conservada e a facilidade de internalização da nanopartícula permita a liberação do composto doador de NO dentro das células, contribuindo para os efeitos de perda de viabilidade celular das células tumorais B16-F10. Estudos que mostram a efetividade da atividade citotóxica de complexos rutênio-nitrosilo em sistemas lipossomais já foram relatados (CARNEIRO et al., 2011; MARANHO et al., 2009), sendo a incorporação destes compostos em sistemas de liberação uma alternativa interessante para o delineamento dos sítios alvos de ação de novos compostos contra o câncer.

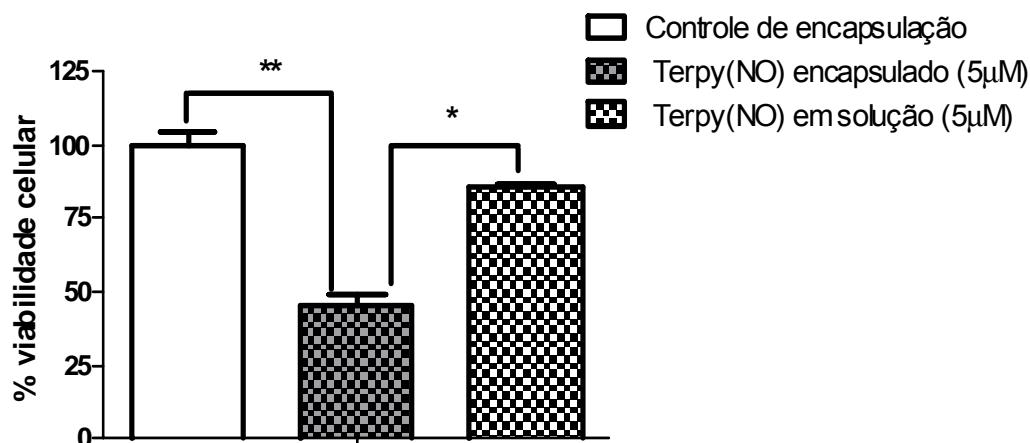


Figura 29. Efeito citotóxico do complexo mononuclear de rutênio $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ em solução e encapsulado em NLS (5 μ M) em linhagem de células tumorais B16-F10. Os dados apresentados representam as médias \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplo. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Diante dos resultados, e tendo em vista a vasta descrição na literatura sobre as propriedades citotóxicas e citoprotetoras da molécula de NO (WINK et al., 2008; HUERTA; CHILKA; BONAVIDA, 2008; REEVES; REED; BROWN, 2009), buscamos aumentar a potencialidade citotóxica deste complexo nitrosilo encapsulando este complexo em NLS. Resultados descritos nos itens anteriores mostram a eficiência

de encapsulação destes complexos em NLS (73,9 %), que dentre outras vantagens, apresenta estabilidade e capacidade destas nanopartículas facilitarem a entrada do complexo na célula, uma vez que se trata de uma nanopartícula lipídica, com características que se assemelham a estrutura da membrana celular. Os resultados de eficiência de encapsulação permitiram saber que a concentração do composto rutênio-nitrosilo dentro das NLS foi de aproximadamente 5 µM. Quando comparadas as atividades citotóxicas do composto em solução e nanoencapsulado na concentração de 5 µM, percebe-se que quando o complexo $[Ru(NO)(bdqi)(terpy)]^{3+}$ é encapsulado em NLS, as células diminuem a viabilidade celular para $44,88 \pm 3,8$ %, enquanto que para o complexo Terpy(NO) em solução, a viabilidade celular das células é de $85,79 \pm 0,84$ % quando foram tratadas na concentração final de 5 µM do composto.

Parte II: Complexo nitrosilo trinuclear de rutênio-ftalocianina

A terapia fotodinâmica (TFD) é um procedimento bem caracterizado para tratamento de outras desordens fisiológicas. Além de ser reconhecida como um método não invasivo de tratamento, ela é também considerada seletiva para tratamento de tumores, oferecendo pouco dano a tecidos saudáveis (YSLAS et al., 2010).

Ftalocianinas são fotossensibilizadores considerados de segunda geração para uso em terapia fotodinâmica, cujas estruturas permitem atividade de TFD dentro da janela terapêutica, entre 600 – 850 nm.

Nesta parte será relatada a síntese, a caracterização e estudos das atividades biológicas contra linhagens celulares tumorais e não tumorais de um novo complexo nitrosilo trinuclear de rutênio-ftalocianina, que para fins de praticidade, será tratado a partir de agora como complexo trinuclear de rutênio.

4.5 Síntese e caracterização do complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina

4.5.1 Análise elementar

Os complexos precursores para a rota de síntese do complexo trinuclear de rutênio foram submetidos à análise elementar para comprovação da estrutura proposta. Os resultados de microanálise de carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos de rutênio estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados de microanálise para os complexos de rutênio

Complexo	% C		% N		% H	
	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.
[Ru(Pc)]	62,43	66,97	18,20	16,64	2,95	4,18
[Ru(Pc)(pz) ₂]	62,93	63,55	21,66	19,75	3,38	4,51
{[Ru(NO)(bpy) ₂] ₂ RuPc(pz) ₂ }(PF ₆) ₆	39,00	41,22	12,17	12,14	2,64	2,80

Teor. = valor teórico calculado. Exp.= resultados experimentais.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5, os resultados de análise elementar foram satisfatórios e de acordo com estrutura proposta para os complexos.

4.5.2 Espectrometria de massas

O complexo trinuclear $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\right](\text{PF}_6)_6$ foi submetido a análise de espectroscopia de massas para confirmação da estrutura proposta.

Um espectro de massa separa individualmente os íons de forma que um íon de um composto elementar contém um ou mais isótopos deste elemento químico que fornecerão um número de picos isótopos. Estes picos apresentam um padrão característico de intensidade e espaçamento de acordo com a massa dos isótopos e a sua abundância no meio. A distribuição isotópica além de indicar qual o principal elemento que o fragmento contém através de seu perfil fornece também a carga do íon. Pode-se concluir qual é a carga do fragmento através da diferença de massa/carga ($\Delta m/z$) entre os isótopos, sendo que quando $\Delta m/z = 1$, carga dos fragmentos = +1; $\Delta m/z = 0.5$, carga dos fragmentos = +2; $\Delta m/z = 0.33$, carga dos fragmentos = +3; $\Delta m/z = 0.25$, carga dos fragmentos = +4 (BECKER, 2007).

Existem diferentes técnicas que podem ser usadas para determinar o espectro de massa de uma substância. A técnica utilizada para a análise do complexo trinuclear foi a ionização por spray eletrostático (do inglês *electron spray ionization* - ESI), onde primeiro ioniza-se a amostra para depois levá-la a fase gasosa. O tempo que cada íon leva para atingir o detector depende da sua massa molecular (m) e carga (z), sendo proporcional à razão m/z ; portanto, é possível determinar a massa molecular do composto. Para analisar uma amostra através do ESI-MS deve-se utilizar um solvente polar ou de polaridade intermediária para formar uma solução diluída da substância. O solvente utilizado para a análise do complexo trinuclear foi uma mistura água: metanol, de forma que não se precisa de altas temperaturas para serem removidas as microgotas carregadas produzidas no processo ESI. No entanto, nem sempre todas as moléculas de solventes são eliminadas, e, por isso, é importante que durante a interpretação dos espectros seja considerada a possibilidade de formação de íons que apresentem adutos com moléculas do solvente na fase gasosa.

Antes de realizarmos as análises com o complexo trinuclear, foi realizado um espectro de massa de um composto que tem em sua esfera de coordenação uma ftalocianina. A zinco ftalocianina (ZnPc) tem peso molecular de 577,90 g/mol. Feito nas mesmas condições em que o composto trinuclear foi submetido, o espectro de massa da ZnPc mostrou que o resultado dado pelo equipamento estava de acordo com a referência de espectro de massa da ZnPc (NIST, 2011). Sendo assim, procedeu-se a análise com o complexo trinuclear. Os espectros representados pelas Figuras 30 e 31 mostram alguns dos fragmentos esperados na detecção em fase gasosa a partir do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]\}_2\text{RuPc(pz)}_2](\text{PF}_6)_6$.

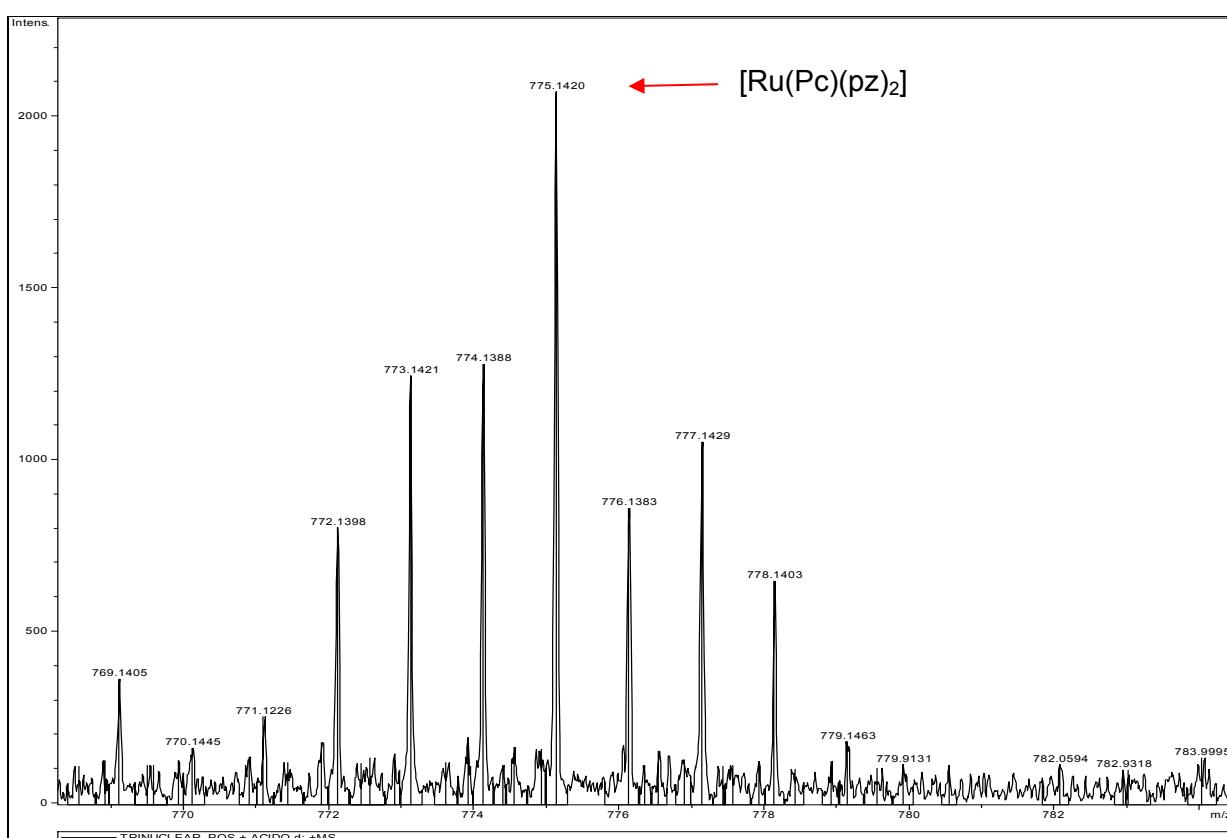


Figura 30. Fragmento $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]^{+1}$, m/z 775,14, no espectro de massas em modo positivo com ionização por elétron spray (ESI -MS $^{+}$).

O espectro da Figura 30 mostra um pico centrado em m/z , com carga +1, que corresponde ao fragmento $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$. É possível perceber também a distribuição isotópica esperada para o metal rutênio, com picos que carregam a identidade de picos m/z adjacentes e se referem à distribuição isotópica de ^{104}Ru , ^{102}Ru , ^{101}Ru , ^{100}Ru , ^{99}Ru , ^{98}Ru and ^{96}Ru (SLOCIK; SOMAYAJULA; SHEPHERD, 2001). Os

valores de m/z são muito próximos do valor teórico calculado para o composto $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$, cuja massa molar é de 775,79 g/mol.

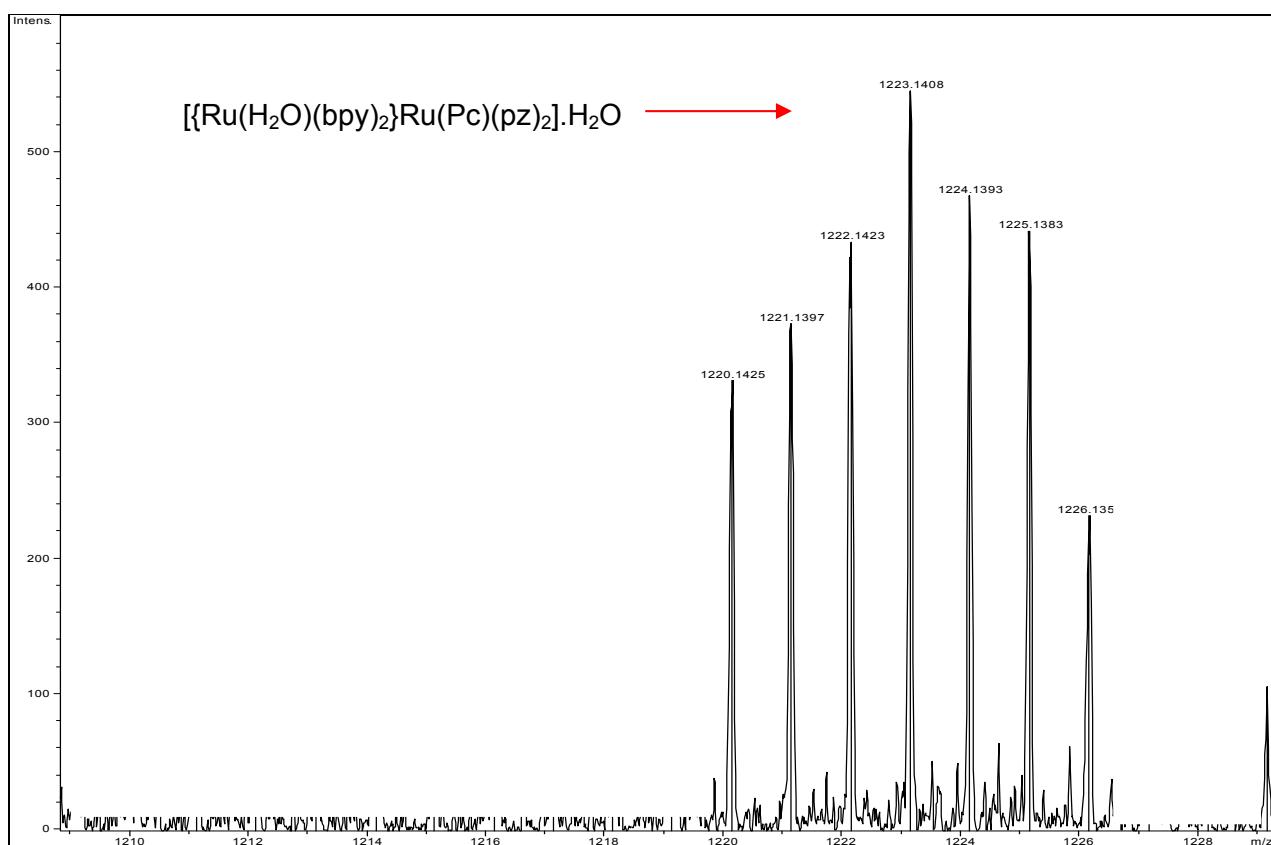


Figura 31. Fragmento $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bpy})_2]\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2\text{H}_2\text{O}$, m/z 1223,14, no espectro de massa no modo positivo com ionização por elétron spray (ESI-MS $^+$).

A Figura 31 mostra um espectro de massa no qual se detectou um fragmento de m/z 1223,14 de boa intensidade e com características da distribuição isotópica do metal rutênio. Este dado suportaria a expectativa de ser um dos fragmentos do complexo trinuclear se for considerado que possivelmente a estrutura sofreu algum tipo de interferência inerente da metodologia do ESI-MS, como por exemplo, a alta voltagem usada no cone para detecção. Considerando-se que moléculas inorgânicas são de difícil detecção por espectroscopia de massa, a massa molar esperada para o complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$ seria de 2532,47 g/mol. Ao analisar a Figura 31, detecta-se um pico centrado em m/z 1223,14. Considerando que o espectrômetro de massa usa altas energias para as fragmentações, acredita-se que a molécula de NO tenha sido liberada da estrutura durante o processo. Como

o solvente para solubilização era uma mistura que continha água, possivelmente estas moléculas tenham sido coordenadas e detectadas durante a fragmentação.

O resultado, entretanto, permite inferir que há a formação pelo menos do intermediário binuclear $\{[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bpy})_2]\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2\}\text{H}_2\text{O}$ proposto pela síntese do complexo trinuclear. Como relatado, as condições experimentais podem ter influenciado na fragmentação das outras partes da molécula. A espectrometria de massas, juntamente com os resultados de espectroscopia de infravermelho e os resultados de análise elementar suportam a expectativa da coordenação do complexo de rutênio *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ ao complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ para a formação do complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$.

4.5.3 Espectroscopia por Raios-X

Uma das estruturas sintetizadas foi confirmada pela cristalografia de raios-X, realizada no Instituto de Química da USP de São Carlos em colaboração com o Prof. Dr. Victor Deflon. A análise revela a estrutura de um dos precursores da síntese do complexo trinuclear, o composto $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ (Figura 32).

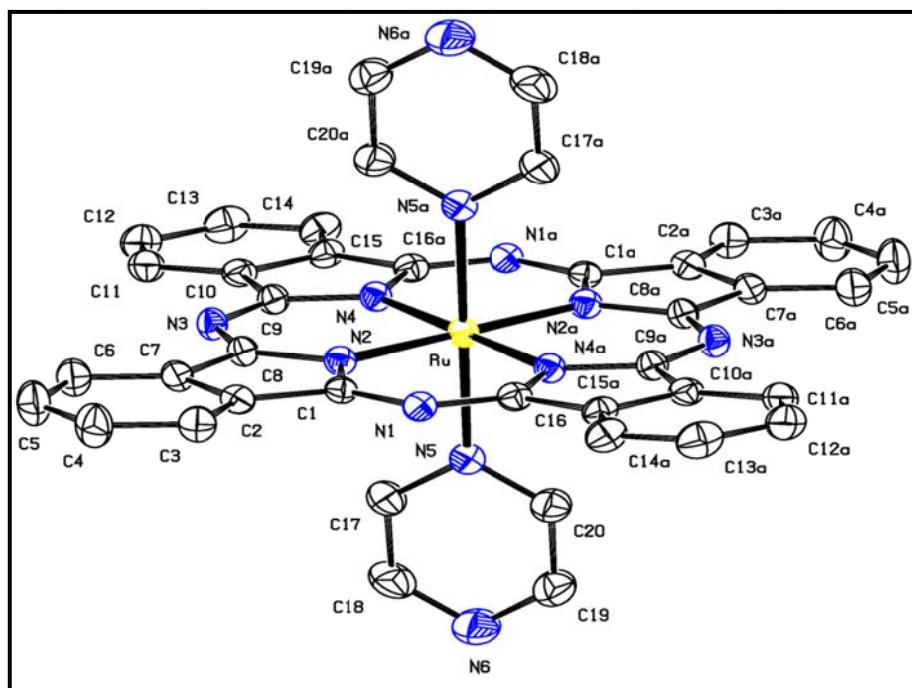


Figura 32. Representação da estrutura molecular ORTEP para complexo precursor $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$.

Os parâmetros cristalográficos para $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ estão listados nas Tabelas a seguir (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 – Dados dos parâmetros cristalográficos de $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ a 25 °C

Fórmula empírica	$\text{C}_{22} \text{H}_{15} \text{N}_7 \text{Ru}_{0.50}$
Peso molecular	427.95
Sistema de cristal	Monoclinico
Espaço de grupo	P21/n
Dimensões da unidade de célula	$a = 10.1642(2) \text{\AA}$ $b = 11.6401(2) \text{\AA}$ $c = 15.7839(3) \text{\AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 93.2320(10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Z	4
Densidade (calculada)	1.525 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	0.476 mm ⁻¹
Reflexões coletadas	11203
Goodness-of-fit on F2	1.023
Índices de R finais [$I > 2\sigma(I)$]	$R^1 = 0.0335, wR^2 = 0.0733$
Índice de R de todos os dados	$wR^2 = 0.0815$

Tabela 7 – Comprimento as ligações [Å] e ângulos [°] para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$

Ru-N(2)#1	1.991(2)	Ru-N(2)	1.991(2)
Ru-N(4)	1.991(2)	Ru-N(4)#1	1.991(2)
Ru-N(5)#1	2.093(2)	Ru-N(5)	2.093(2)
N(5)-C(20)	1.332(4)	N(5)-C(17)	1.338(4)
N(2)-C(8)	1.377(3)	N(2)-C(1)	1.379(3)
C(1)-N(1)	1.322(3)	C(1)-C(2)	1.456(4)
C(16)-N(1)#1	1.328(3)	C(16)-N(4)	1.377(3)
C(16)-C(15)	1.453(4)	N(4)-C(9)	1.375(3)
C(9)-N(3)	1.335(3)	C(9)-C(10)	1.457(4)

Tabela 7 – Continua

N(3)-C(8)	1.334(3)	C(8)-C(7)	1.458(4)
C(10)-C(11)	1.386(4)	C(10)-C(15)	1.401(4)
C(15)-C(14)	1.392(4)	C(14)-C(13)	1.378(4)
C(14)-H(14)	0.9300	C(13)-C(12)	1.383(5)
C(13)-H(13)	0.9300	C(12)-C(11)	1.379(4)
C(12)-H(12)	0.9300	C(11)-H(11)	0.9300
C(7)-C(6)	1.385(4)	C(7)-C(2)	1.399(4)
C(2)-C(3)	1.386(4)	C(3)-C(4)	1.385(4)
C(3)-H(3)	0.9300	C(4)-C(5)	1.374(5)
C(4)-H(4)	0.9300	C(5)-C(6)	1.384(4)
C(5)-H(5)	0.9300	C(6)-H(6)	0.9300
C(17)-C(18)	1.370(5)	C(17)-H(17)	0.9300
C(20)-C(19)	1.382(4)	C(20)-H(20)	0.9300
N(6)-C(19)	1.316(4)	N(6)-C(18)	1.326(5)
C(19)-H(19)	0.9300	C(18)-H(18)	0.9300
N(1)-C(16)#1	1.328(3)	C(21)-N(21)	1.090(6)
C(21)-C(22)	1.399(7)	C(22)-H(22A)	0.9600
C(22)-H(22B)	0.9600	C(22)-H(22C)	0.9600
N(2)#1-Ru-N(2)	180.00(6)		
N(2)#1-Ru-N(4)	90.81(9)	N(2)-Ru-N(4)	89.19(9)
N(2)#1-Ru-N(4)#1	89.19(9)	N(2)-Ru-N(4)#1	90.81(9)
N(4)-Ru-N(4)#1	180.00(14)	N(2)#1-Ru-N(5)#1	90.56(9)
N(2)-Ru-N(5)#1	89.44(9)	N(4)-Ru-N(5)#1	90.59(9)
N(4)#1-Ru-N(5)#1	89.41(9)	N(2)#1-Ru-N(5)	89.44(9)
N(2)-Ru-N(5)	90.56(9)	N(4)-Ru-N(5)	89.41(9)
N(4)#1-Ru-N(5)	90.59(9)	N(5)#1-Ru-N(5)	180.00(17)
C(20)-N(5)-C(17)	115.0(3)	C(20)-N(5)-Ru	121.9(2)
C(17)-N(5)-Ru	123.2(2)	C(8)-N(2)-C(1)	109.5(2)
C(8)-N(2)-Ru	126.18(18)	C(1)-N(2)-Ru	124.30(19)
N(1)-C(1)-N(2)	127.8(2)	N(1)-C(1)-C(2)	124.0(2)
N(2)-C(1)-C(2)	108.2(2)	N(1)#1-C(16)-N(4)	127.3(3)
N(1)#1-C(16)-C(15)	124.0(2)	N(4)-C(16)-C(15)	108.6(2)

Tabela 7 – Continua

C(9)-N(4)-C(16)	108.9(2)	C(9)-N(4)-Ru	126.37(18)
C(16)-N(4)-Ru	124.64(18)	N(3)-C(9)-N(4)	126.9(2)
N(3)-C(9)-C(10)	124.1(3)	N(4)-C(9)-C(10)	108.9(2)
C(8)-N(3)-C(9)	124.2(2)	N(3)-C(8)-N(2)	127.1(2)
N(3)-C(8)-C(7)	124.6(3)	N(2)-C(8)-C(7)	108.4(2)
C(11)-C(10)-C(15)	120.2(3)	C(11)-C(10)-C(9)	133.4(3)
C(15)-C(10)-C(9)	106.4(2)	C(14)-C(15)-C(10)	121.0(3)
C(14)-C(15)-C(16)	131.8(3)	C(10)-C(15)-C(16)	107.2(2)
C(13)-C(14)-C(15)	117.7(3)	C(13)-C(14)-H(14)	121.1
C(15)-C(14)-H(14)	121.1	C(14)-C(13)-C(12)	121.5(3)
C(14)-C(13)-H(13)	119.3	C(12)-C(13)-H(13)	119.3
C(11)-C(12)-C(13)	121.1(3)	C(11)-C(12)-H(12)	119.5
C(13)-C(12)-H(12)	119.5	C(12)-C(11)-C(10)	118.5(3)
C(12)-C(11)-H(11)	120.8	C(10)-C(11)-H(11)	120.8
C(6)-C(7)-C(2)	120.7(3)	C(6)-C(7)-C(8)	132.5(3)
C(2)-C(7)-C(8)	106.8(2)	C(3)-C(2)-C(7)	121.3(3)
C(3)-C(2)-C(1)	131.6(3)	C(7)-C(2)-C(1)	107.1(2)
C(4)-C(3)-C(2)	117.2(3)	C(4)-C(3)-H(3)	121.4
C(2)-C(3)-H(3)	121.4	C(5)-C(4)-C(3)	121.7(3)
C(5)-C(4)-H(4)	119.2	C(3)-C(4)-H(4)	119.2
C(4)-C(5)-C(6)	121.6(3)	C(4)-C(5)-H(5)	119.2
C(6)-C(5)-H(5)	119.2	C(5)-C(6)-C(7)	117.6(3)
C(5)-C(6)-H(6)	121.2	C(7)-C(6)-H(6)	121.2
N(5)-C(17)-C(18)	121.7(3)	N(5)-C(17)-H(17)	119.2
C(18)-C(17)-H(17)	119.2	N(5)-C(20)-C(19)	122.1(3)
N(5)-C(20)-H(20)	118.9	C(19)-C(20)-H(20)	118.9
C(19)-N(6)-C(18)	114.5(3)	N(6)-C(19)-C(20)	123.1(3)
N(6)-C(19)-H(19)	118.5	C(20)-C(19)-H(19)	118.5
N(6)-C(18)-C(17)	123.7(3)	N(6)-C(18)-H(18)	118.2
C(17)-C(18)-H(18)	118.2	C(1)-N(1)-C(16)#1	125.1(2)
N(21)-C(21)-C(22)	177.5(7)	C(21)-C(22)-H(22A)	109.5
C(21)-C(22)-H(22B)	109.5	H(22A)-C(22)-H(22B)	109.5

Tabela 7 – Conclusão

C(21)-C(22)-H(22C)	109.5	H(22A)-C(22)-H(22C)	109.5
H(22B)-C(22)-	109.5		
H(22C)			

Ao que tudo indica, o átomo de rutênio parece planar à estrutura do ligante ftalocianina, com os ligantes pirazina coordenados de maneira axial. Estes resultados mostram-se coerentes com os publicados por Yu e colaboradores (2013), que descrevem a estrutura de um cristal de rutênio-ftalocianina com ligantes axiais. Em relação ao comprimento de ligação Ru-N(pirazina), o valor de 2,093 Å é semelhante para aquele de outras espécies de Ru(II), como por exemplo [Ru(bpy)(terpy)(pz)](PF₆)₂, cujo valor é de 2,091 Å (GULYAS; HUMBLEY; LAY, 1996). Considerando-se que esta medida é coerente com a força da retrodoação Ru-pirazina, pode-se inferir ser esta ligação no complexo [RuPc(pz)₂] de força de ligação semelhante àquela espécie e portanto, a população eletrônica sobre o ligante pirazina similar entre elas.

4.5.4 Espectroscopia na região do UV-visível

Os espectros eletrônicos na região do UV-visível das metalo-ftalocianinas apresentam, de uma maneira geral, bandas de absorção com absorтивidades relativamente altas, na ordem de 10⁴ mol⁻¹Lcm⁻¹. Na região de 600-800 nm as bandas são atribuídas à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (Banda Q) e em região de mais alta energia têm-se as chamadas bandas B (NOYOKONG, 2012).

Para a síntese do complexo trinuclear, foram necessárias pelo menos 3 etapas da síntese de seus precursores, como descrito em materiais e métodos.

O espetro na região do UV-visível em CHCl₃, resultante da síntese do complexo [Ru(Pc)], apresentou bandas na região do UV em 318 nm e um ombro em 376 nm e também bandas na região do visível, com absorção intensa em 632 nm e banda em 576 nm (Figura 33).

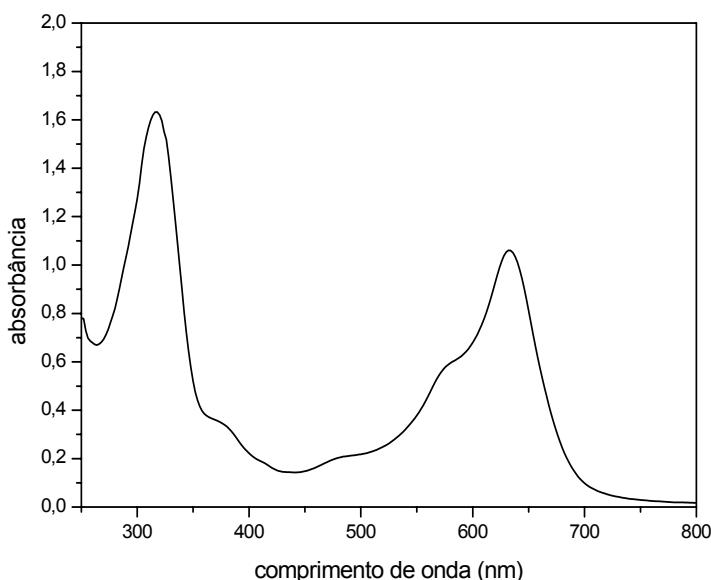


Figura 33. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo [Ru(Pc)]. $[complexo] \cong 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em CHCl_3 .

O espetro do complexo [Ru(Pc)] (Figura 33) é condizente com características espetrais de complexos rutênio(II)-ftalocianina, os quais exibem bandas de absorção na região do UV atribuídas a banda B (310 nm) e também a banda Q, com intensa absorção em 690 nm (da ROCHA et al., 2008; MACK; STILLMAN, 2003).

A reação de [Ru(Pc)] com pirazina gerou [Ru(Pc)(pz)₂], cujas características espetrais estão de acordo com os dados previamente publicados por Kobel e Hanack (1986) (Figura 34). Uma nova banda surgiu em 442 nm após a coordenação da pirazina, característica de banda de transferência de carga metal-ligante (TCML) $d_{\pi}(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{pz})$ (442 nm), comparável a outros compostos de rutênio ligados à pirazina (HINTZE; FORD, 1975).

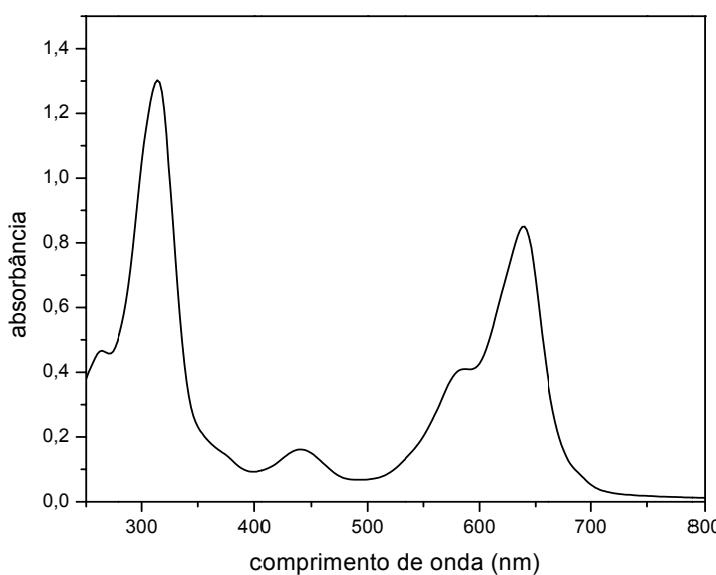


Figura 34. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$. $[\text{complexo}] \approx 1,84 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em CHCl_3 .

Para a caracterização deste composto (Figura 34), análise microanalítica de carbono (Tabela 5) e análise de raios-X foram obtidas e confirmam a estrutura proposta.

A síntese do complexo trinuclear de rutênio se deu pela adição de $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ ao complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2]^{2+}$ em solução. No meio reacional, o ligante NO^+ da espécie *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2]^{2+}$ é reduzido pela adição de azida de sódio, seguido de liberação de NO^0 do sistema $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^0$. Subsequentemente houve coordenação do ligante de ponte pirazina do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ (SAUAIÁ; da SILVA, 2003) àquele contendo Ru-bpy que originou a espécie $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$.

O espectro na região do UV-visível do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$ (Figura 35) apresenta uma banda Q $\pi \rightarrow \pi^*$ da $\text{Pc}^{(2-)}$ coordenada em 634 nm e, portanto, deslocada para menor energia quando comparada a banda Q do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$. Verifica-se neste complexo nitrosilo, diferentemente dos seus outros dois precursores $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ e $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$, uma banda na região do UV em aproximadamente 320 nm a qual, como já descrito para outros complexos com NO coordenado, é atribuída a uma transferência de carga do metal para o ligante (TCML) $d_{\pi}\text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$ (da ROCHA et al., 2008;

GORELSKY et al., 2000; TFOUNI et al., 2003). Os dados espectrofotométricos para os complexos de rutênio na região do UV-visível estão relatados na Tabela 8. O complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]\}_2\text{RuPc(pz)}_2](\text{PF}_6)_6$ é inédito, e suas características de espectro de absorção encontram-se na Figura 35.

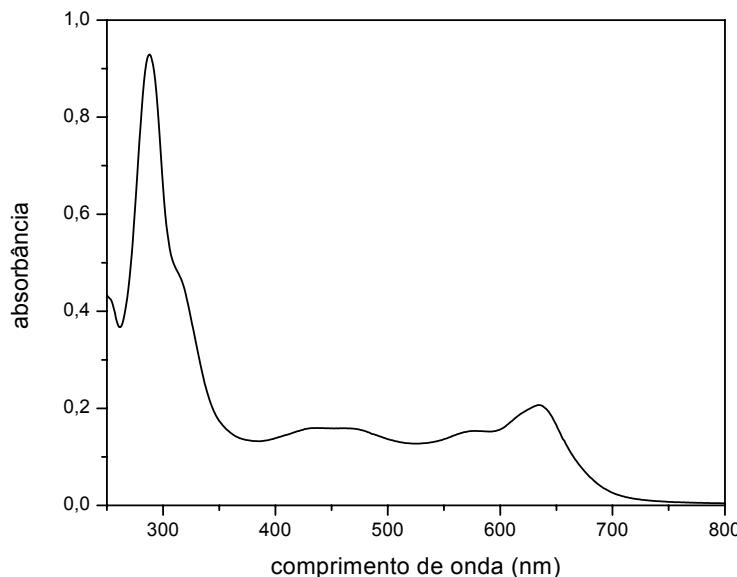


Figura 35. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$. [complexo] $\approx 6,0 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ em acetonitrila.

Tabela 8 – Resultados de análises de espectros na região UV-visível para os complexos de rutênio

Complexo	λ , nm ($\log \epsilon$, mol $^{-1}$ L cm $^{-1}$)
$[\text{Ru}(\text{Pc})]^a$	318 (4,3); 576 (3,9); 632 (4,2)
$[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]^a$	314 (4,87); 442 (3,96); 586 (4,35); 640 (4,66)
$\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^b$	290 (5,17); 318 (4,89); 576 (4,39); 634 (4,52)

^a em CHCl_3 ; ^b em acetonitrila.

4.5.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Para complexos rutênio-nitrosilo, a espectroscopia na região do infravermelho é uma importante ferramenta para verificar se há coordenação do NO⁺ no íon metálico Ru(II). Em trabalhos já descritos, quando há coordenação do NO⁺ ao rutênio, geralmente o espectro na região do infravermelho apresenta bandas intensas de estiramento no intervalo de 1800 cm⁻¹ a 1970 cm⁻¹ (MARCHESI, 2008; de LIMA et al., 2006; FERREIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004). A variação da frequência de estiramento $\nu(\text{NO})$ em compostos de coordenação depende do metal, dos co-ligantes e da estereoquímica do ligante NO (FORD et al., 1998).

Na Figura 36 estão representados os espectros na região do infravermelho, obtidos em pastilhas de KBr, para os complexos [Ru(Pc)(pz)₂] e [{Ru(NO)(bpy)₂}₂RuPc(pz)₂](PF₆)₆.

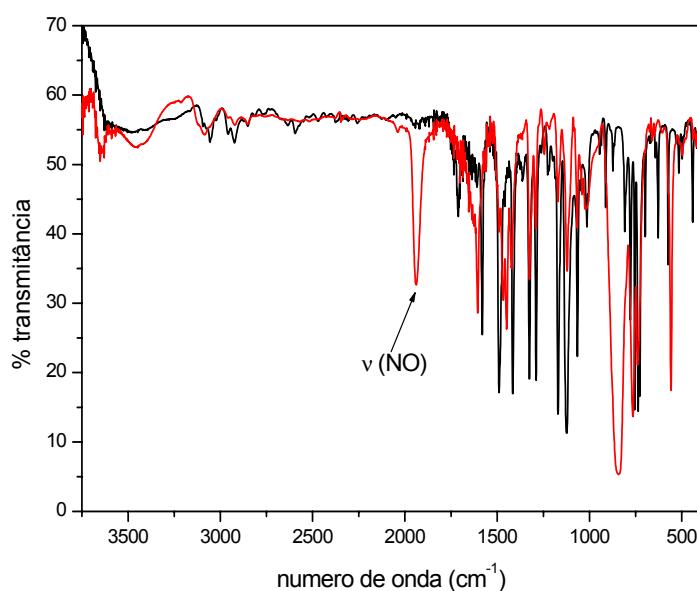


Figura 36. Espectros na região do infravermelho, em pastilha de KBr, dos complexos [Ru(Pc)(pz)₂] (preto) e [{Ru(NO)(bpy)₂}₂RuPc(pz)₂](PF₆)₆ (vermelho).

Observa-se, no espectro do complexo trinuclear (vermelho) quando comparado ao espectro do seu precursor (preto), que há semelhanças nas bandas de estiramento abaixo de 1750 cm⁻¹. Entretanto, há uma banda bastante evidente abaixo de 1000 cm⁻¹ para o complexo [{Ru(NO)(bpy)₂}₂RuPc(pz)₂](PF₆)₆, característica dos picos intensos de PF₆. Em 1940 cm⁻¹ foi observada uma banda de

estiramento do NO⁺ para o composto nitrosilo, o que é um indicativo da coordenação do NO⁺ ao Ru(II).

Este resultado se assemelha aos apresentados por Sauaia e da Silva (2003) que relata para o composto *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂(pz)](PF₆)₃ a energia vibracional do NO⁺ em 1950 cm⁻¹. Deste modo, o comportamento do ligante nitrosil no espectro de infravermelho depende dos orbitais envolvidos na interação Ru(II)-NO⁺, e também de outros fatores, como a estereoquímica do complexo, a força de ligação e as interações intermoleculares do metal com seus ligantes.

4.5.6 Espectroscopia de luminescência

Compostos de ftalocianinas possuem propriedades luminescentes que podem ser úteis para a caracterização química e para a avaliação da atividade biológica destes compostos, como, por exemplo, auxiliando na localização do composto dentro de uma estrutura viva como culturas celulares (FABRIS et al., 2006), fungos ou bactérias.

Com o intuito de entendermos a colocalização do composto nos ensaios biológicos, foram determinadas os comprimentos de onda de excitação e emissão do complexo trinuclear de rutênio [{Ru(NO)(bpy)₂}₂RuPc(pz)₂](PF₆)₆. As propriedades fotoquímicas das ftalocianinas são importantes para seu uso na Terapia Fotodinâmica. O diagrama de Jablonski, representado esquematicamente abaixo (Figura 37), é usado para representar e explicar as propriedades fotofísicas da TFD.

Na ausência de fotoativação ($h\nu$), o fotossensibilizador (FS) está no estado fundamental (S_0). Quando o FS absorve a luz no comprimento de onda apropriado, ele é excitado a um estado de vida curta (~1-100 ns), chamado primeiro estado singuleto (S_1). Do S_1 , o FS pode tanto voltar ao seu estado fundamental (S_0) – via fluorescência, ou ir para um estado tripleto (T_1), um processo chamado de conversão intersistema (ISC). A volta para o estado fundamental (S_0) do estado T_1 é proibida pela regra de spin e isto resulta em um tempo de meia vida maior (≥ 500 ns) do FS no estado tripleto, permitindo com que o FS possa reagir com o oxigênio molecular que está no meio (NOMBONA, 2012a). Este tempo de meia vida mais longo no estado tripleto é essencial para a eficiência das reações fotossensibilizadas.

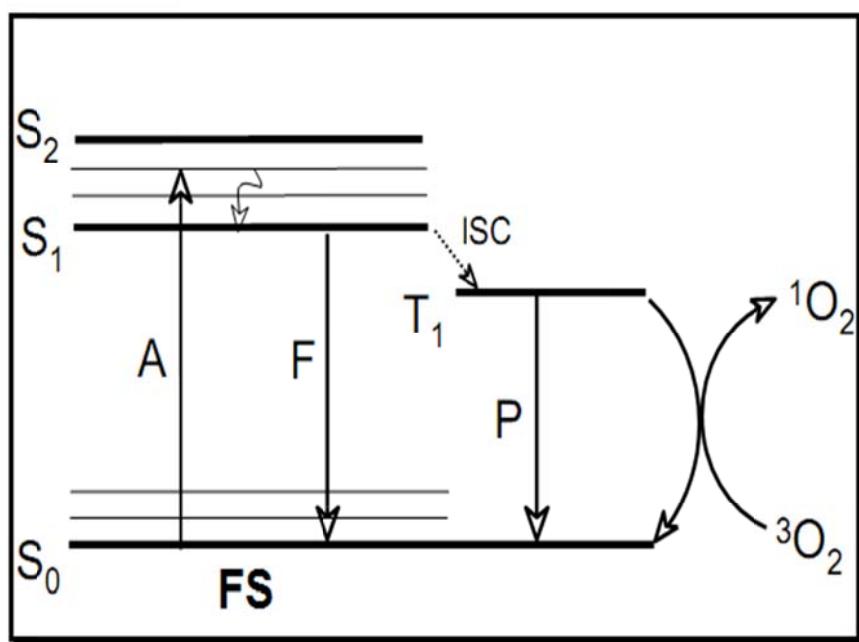


Figura 37. Representação esquemática baseado no Diagrama de Jablonski ilustrando os processos de transição do fotossensibilizador após a absorção da luz. A= absorção de energia, F= fluorescência, ISC = cruzamento intersistemas, P = fosforescência, FS = fotossensibilizador.

Fonte: Nombona (2012 a).

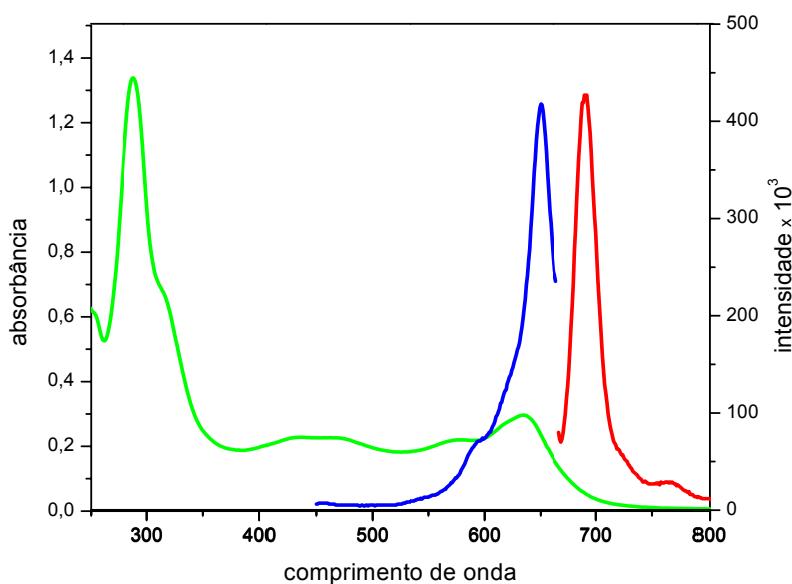


Figura 38. Espectros de absorbância (verde), excitação (azul; $\lambda_{\text{máx}}= 645 \text{ nm}$) e emissão (vermelho; $\lambda_{\text{máx}}= 690 \text{ nm}$), fendas de λ_{ex} e $\lambda_{\text{em}}= 5 \text{ nm}$, do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]_2\text{RuPc}(\text{pz})_2^{6+}$ em acetonitrila. [composto] $\approx 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Os espectros de emissão do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$ em acetonitrila estão mostrados na Figura 38. Podemos observar que o espectro de emissão apresenta banda com máximo em 690 nm, quando excitado a 645 nm. Estes resultados obtidos para o complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina assemelham-se aos relatados por Durmus e Nyokong (2007) para outras metalo-ftalocianinas, com centro metálico de gálio, cujos $\lambda_{\text{ex}} = 660$ nm e λ_{em} acima de 700 nm. Estes resultados também estão próximos dos comprimentos de onda de excitação e emissão encontrados para diferentes ZnPc substituídas no trabalho de González-Cabello e colaboradores (2003). Nombona e colaboradores (2012b) relatam para outra ZnPc substituída λ_{ex} em 694 nm e λ_{em} em 704 nm. Sugere-se portanto, que os λ_{ex} e λ_{em} encontrados para este novo complexo trinuclear de rutênio estão de acordo com os dados relatados para diferentes metalo-ftalocianinas.

4.5.7 Tempo de vida de fluorescência no estado excitado

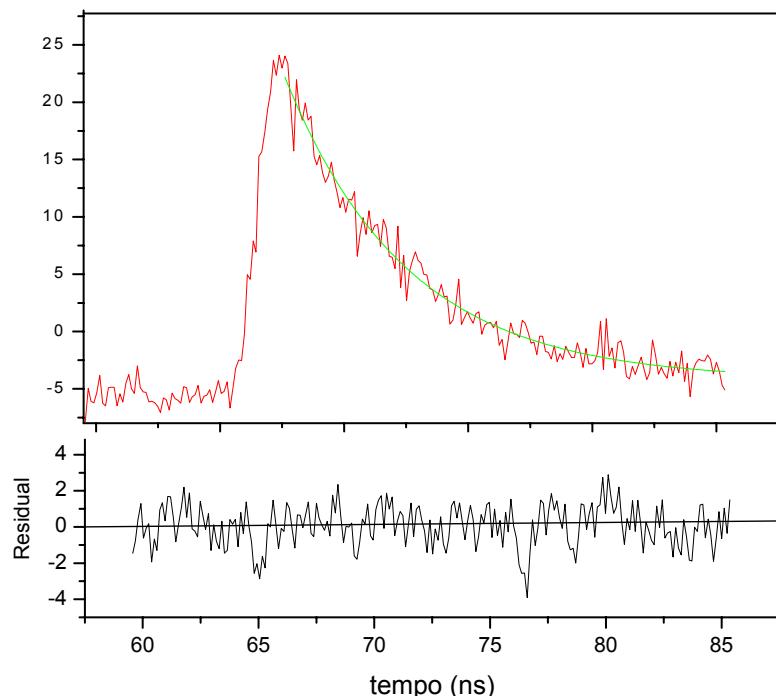


Figura 39. Curva de decaimento de fluorescência do estado excitado para o complexo trinuclear $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$ em acetonitrila; $\lambda_{\text{em}} = 630$ nm e $\lambda_{\text{ex}} = 665$ nm.

O tempo de vida no estado excitado pode influenciar a transferência de energia para o estado tripleto e consequentemente, a geração de oxigênio singuleto a partir do oxigênio molecular.

A Figura 39 mostra a curva de decaimento da fluorescência para o complexo rutênio-ftalocianina. Para este novo complexo trinuclear, nas condições avaliadas, foi encontrado um tempo de meia vida de fluorescência (τ_F) de $4,978 \pm 9,407 \times 10^{-2}$ nanossegundos. A qualidade da regressão linear foi acompanhada segundo os valores estatísticos de chi-quadrado, que foi de 1,224, Durbin Watson: 1,862 e Z: -0,08326, que foram determinados pelo próprio aparelho. Estes valores estão de acordo com os parâmetros estipulados para que se tenha um valor de τ_F satisfatório.

Comparando-se a outros compostos contendo íon metálico coordenado à ftalocianinas, observa-se que para o complexo trinuclear o tempo de vida de fluorescência é relativamente maior que os citados para complexos de gálio-ftalocianina, cujos τ_F estão na faixa de 0,72 a 2,05 nanossegundos (DURMUS; NYOKONG, 2007). É relatado que para compostos de ftalocianina com diferentes íons metálicos o τ_F varia entre 1 e 7 nanossegundos (CHEN et al., 2002; GUO et al., 2012; PAULO; COSTA, 2010).

O valor de τ_F determinado para o composto trinuclear é consistente com o maior rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$. Considerando-se que a geração desta espécie reativa (Figura 37) deve-se a transferência de energia do estado tripleto da ftalocianina para o $^3\text{O}_2$, o resultado obtido parece peculiar para a espécie trinuclear. Sugere-se que o maior tempo de vida pode estar ligado a deslocalização eletrônica entre os ligantes bipiridina, pirazina e ftalocianina.

Sendo assim, a Tabela 9 resume os dados de caracterização do novo complexo trinucelar de rutênio-ftalocianina em acetonitrila.

Tabela 9 – Dados espectrais de absorção, emissão e excitação para o complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$

Complexo	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{ex}	τ_F
$[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$	634 nm	690 nm	645 nm	4,97 ns

$\lambda_{\text{abs}} =$ absorção máxima da banda Q, $\lambda_{\text{em}} =$ emissão máxima da banda Q, $\lambda_{\text{ex}} =$ excitação máxima da banda Q, $\tau_F =$ tempo de meia vida de fluorescência em nanossegundos.

4.5.8 Estudos fotoquímicos

Foram realizados dois tipos diferentes de experimentos de fotólise: um com acompanhamento da variação espectroscópica na região UV-visível e o outro com registro cronoamperométrico da liberação de NO gasoso. Os estudos de fotólise foram realizados com o precursor $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ e com o complexo trinuclear de rutênio, já contendo em sua esfera de coordenação o NO coordenado. Os estudos fotoquímicos foram realizados em CHCl_3 para $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$ e em $\text{H}_2\text{O:DMSO}$ (5:2) para $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$ buscando mimetizar as condições em que este composto seria utilizado nos ensaios biológicos. As espécies foram irradiadas com laser no comprimento de onda de irradiação (λ_{irr}) de 660 nm.

A Figura 40 mostra que ao ser irradiado, não se observa variações no espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$.

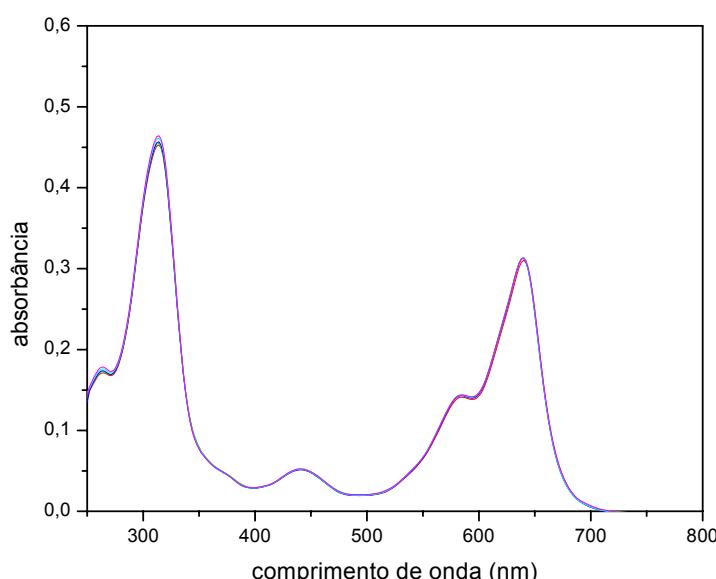


Figura 40. Espectros sucessivos obtidos na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})(\text{pz})_2]$, em clorofórmio, após pulso de energia em 660 nm. Tempo de fotólise: 0 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s e 60 s. [complexo] $\cong 6,78 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$.

Em contrapartida, pode-se observar que o complexo trinuclear de rutênio apresenta mudanças no espectro de absorção na região do UV-visível. Ao ser irradiado em 660 nm, e com $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2]^{6+}$ as bandas da região do visível diminuem a absorção, conforme pode ser observado melhor no espectro do detalhe (Figura 41).

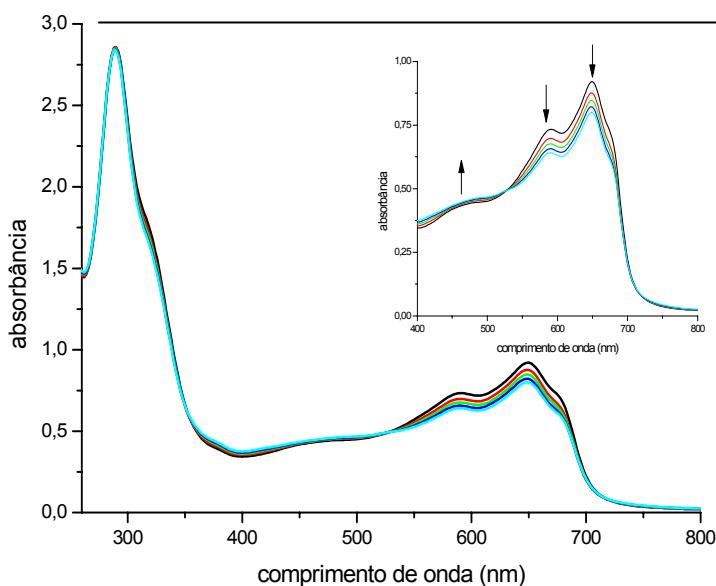
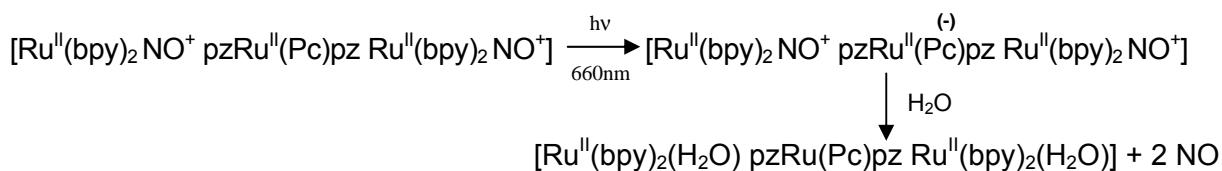


Figura 41. Variação espectral na região do UV-visível do complexo e $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}\text{RuPc}(\text{pz})_2\right]^{6+}$, em $\text{H}_2\text{O:DMSO}$ (5:2) após pulso de energia em 660 nm. Tempo de fotólise: 0 s, 30 s, 60 s, 90 s e 120 s. [complexo] $\cong 3,0 \times 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$.

A Figura 41, o composto trinuclear apresenta um ponto isosbético em 532 nm. De maneira sutil, há ainda um aumento de intensidade de absorbância entre os comprimentos de onda de 400 e 500 nm. Quando comparado ao espectro inicial do complexo trinuclear, os complexos nitrosilo não apresentam essa banda devido à forte retrodoação existente entre o metal e o ligante nitrosil (NO^+). Acredita-se que medida que ocorre a liberação do NO e a sua substituição por uma molécula de solvente (H_2O), ocorra aumento da intensidade nesta região. Um outro indicativo de liberação do NO quando λ_{irr} em 660 nm é que na banda em 318 nm, característica de transferência de carga $d_\pi\text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$, também há uma pequena diminuição de intensidade. Isto é descrito pois bandas de absorção próximas a 350 nm são atribuídas como sendo TCML $d_\pi(\text{Ru}(\text{II})) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$, assim coerentes com outras espécies contendo Ru-NO (de LIMA et al., 2005). À medida que ocorre a liberação do NO, há a coordenação de uma molécula de solvente (H_2O), o que condiz com o aumento de bandas próximas a 470 nm. Como a irradiação se dá em 660 nm, acredita-se que há um caminho que o elétron tem que percorrer para ocasionar a liberação do NO. Sugere-se que o mecanismo envolvido neste processo de fotólise é caracterizado por ser uma transferência eletrônica fotoinduzida (TEF), que envolve um composto que absorve luz na região do visível apresentando forte característica

redutora no estado excitado, e um composto receptor que tenha ligante nitrosil na esfera de coordenação, o qual libera NO ao sofrer redução (da SILVA et al., 2007; SAUAIÁ et al., 2005a; SAUAIÁ et al., 2005b). Reações de TEF são encontradas na natureza, como é o caso da fotossíntese, onde a luz é convertida em energia química a partir dos processos de transferências de cargas por indução da luz.

O Esquema 6 representa o mecanismo fotoquímico proposto neste processo de liberação de NO:



Esquema 6. Mecanismo de fotólise em 660 nm sugerido para o complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$.

Considerando que o estado excitado da TCML do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$ é centrado no ligante ftalocianina, podemos dizer que ocorreu a formação do intermediário $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2\text{NO}^+ \text{pzRu}^{\text{II}}(\text{Pc})\text{pzRu}^{\text{II}}(\text{bpy})_2\text{NO}^+]^{(-)}$, propondo que a transferência eletrônica acontece da ftalocianina para o ligante nitrosil.

Concomitantemente aos estudos da variação espectral, acompanhou-se a concentração de óxido nítrico liberada a partir da irradiação em 660 nm (Figura 42). Percebe-se que, há uma pequena mudança na corrente de detecção do NO pelo eletrodo após irradiação do complexo $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$ em 660 nm. Isto é consistente com uma liberação muito baixa do ligante NO no complexo trinuclear.

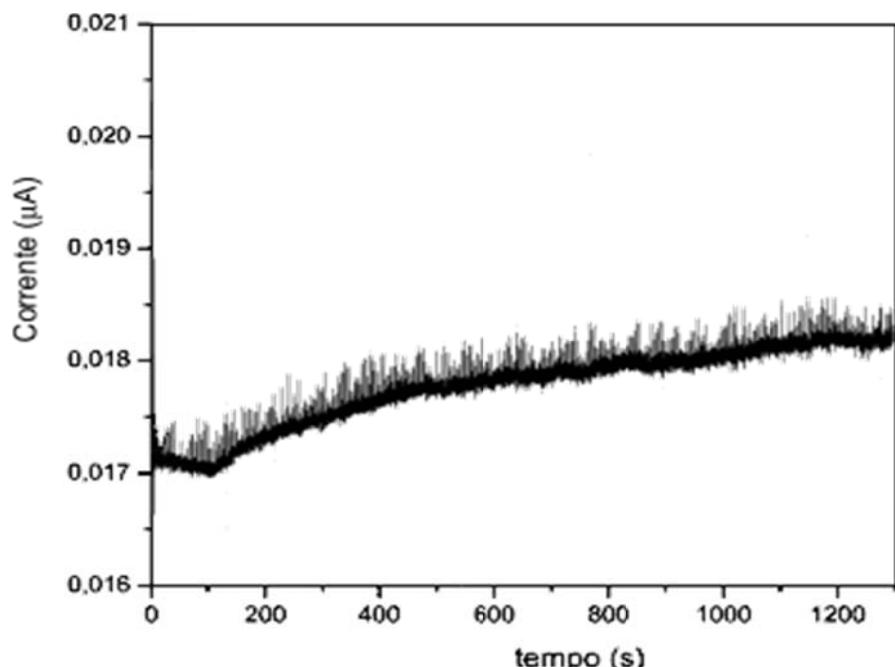


Figura 42. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo e $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\right]^{6+}$. [complexo] $\cong 3,0 \times 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$, em solução H₂O:DMSO (5:2), durante 20 minutos de irradiação em λ_{irr} 660 nm.

4.5.9 Análise redutimétrica da liberação do NO

Ao se planejar a estrutura de um complexo, procura-se por compostos termodinamicamente estáveis para que os compostos sintetizados possam sofrer menos interferentes indesejáveis que possam levar a sua degradação. No entanto, fisiologicamente, muitas são as condições que influenciam a estabilidade do composto. Em se tratando de complexos liberadores de NO, estes podem ser controlados de maneira a manter o NO coordenado ou liberá-lo conforme o alvo de interesse para a atividade biológica do óxido nítrico. Compostos que podem ser clinicamente viáveis, além de liberarem o NO por estímulo luminoso, também podem liberar o NO por redução química do NO^+ coordenado. O processo se vale de baixa afinidade do ligante NO^0 a Ru(II) (LUNARDI; da SILVA; BENDHACK, 2009).

As Figuras 43 A e 43 B mostram a liberação de óxido nítrico do complexo trinuclear $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\right]^{6+}$ na presença de dois diferentes agentes redutores: amalgama de cádmio e ácido ascórbico. Percebe-se que a concentração de óxido nítrico liberado nos dois experimentos é muito maior que a liberação

observada pelo estímulo luminoso quando o complexo foi irradiado em 660 nm (Figura 42).

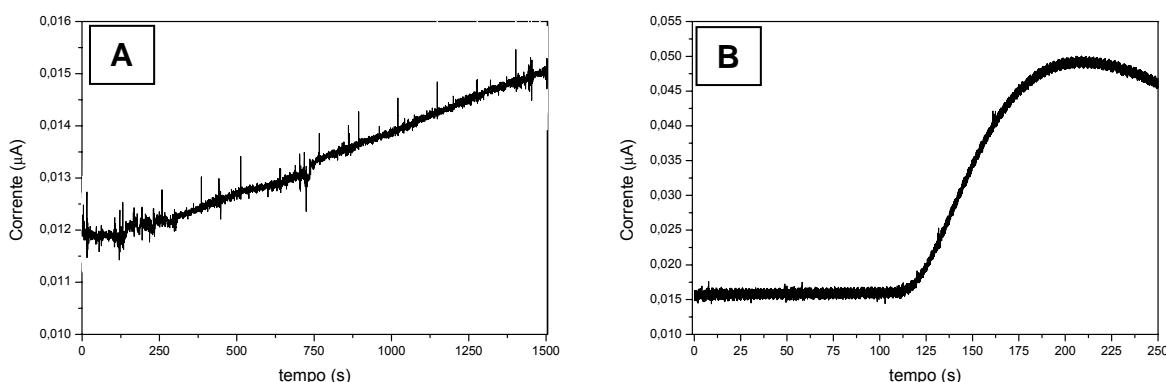


Figura 43. Análises qualitativas da liberação cronoamperométrica de NO a partir da ação redutimétrica do amalgama de Cd (em A) do ácido ascórbico (em B) para complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc(pz)}_2\}^{6+}$.

É descrito que para o nitroprussiato de sódio, composto capaz de liberar óxido nítrico e usado para tratar doenças cardiovasculares, o uso de agentes redutores facilitam a liberação de óxido nítrico para a sua ação biológica (BATES et al., 1991; SMITH; DASGUPTA, 2002). Dentro deste contexto, o ambiente intratumoral descrito como de baixo pH (WAHL et al., 2002; WOJTKOWIAK et al., 2012), poderia auxiliar o composto trinuclear com um efeito citotóxico sinérgico: de liberação da molécula de óxido nítrico quando o ambiente é redutor e na geração de oxigênio singlet, quando fotoestimulado.

4.5.10 Determinação da geração de oxigênio singlet

Uma vez que o fotossensibilizador tenha sido absorvido pela massa tumoral, sob um fotoestímulo na região da luz visível, ele é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio tais como o oxigênio singlet ${}^1\text{O}_2$ e outros radicais livres como HO^\bullet , $\text{H}_2\text{O}_2^\bullet$ e ${}^\bullet\text{O}_2^-$. Essas espécies podem agir em conjunto ou isoladamente, dependendo das condições de tratamento do tumor e podem danificar estruturas das membranas, o DNA e outras estruturas celulares que podem levar a célula tumoral à morte (DOUGHERTY et al., 1978, AGOSTINIS et al., 2011).

Dentro deste contexto, o estudo da geração de oxigênio singlet pelo novo complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina foi realizado (Figura 44). A

estrutura química deste complexo permite a geração tanto ERNs, como detectado nos estudos de liberação de NO, quanto EROs. Os mecanismos de geração de EROs, durante o tratamento com TFD, podem ser dos tipos I e/ou II (SIBATA et al., 2000). O radical superóxido ($O_2\cdot^-$) é gerado no mecanismo tipo I através da transferência de elétrons (Te) da ftalocianina quando excitada pela luz, para o oxigênio no estado fundamental. No entanto, o mecanismo que gera 1O_2 (tipo II), de transferência de energia, é mais comumente relatada na TFD (OCHSNER, 1996). Isto se deve às reações de TEF serem mais rápidas do que as reações de transferência de energia observadas no mecanismo tipo I (MACHADO, 2000).

Há dois métodos principais que podem ser usados para a determinação de oxigênio singuleto: as sondas químicas ou medida de luminescência em 1270 nm. O DPBF (1,3-difenilisobzenofurano) é conhecido como uma sonda, usada em solventes orgânicos, que capta o oxigênio singuleto formado e foi usado para a determinação do oxigênio singuleto gerado pelo novo complexo trinuclear de rutênio. Usou-se comprimento de onda de excitação em 660 nm. O desaparecimento da banda de absorção da sonda (410 nm), que é consumida conforme o oxigênio singuleto é formado, foi medido por espectroscopia sendo mostrado na Figura 44.

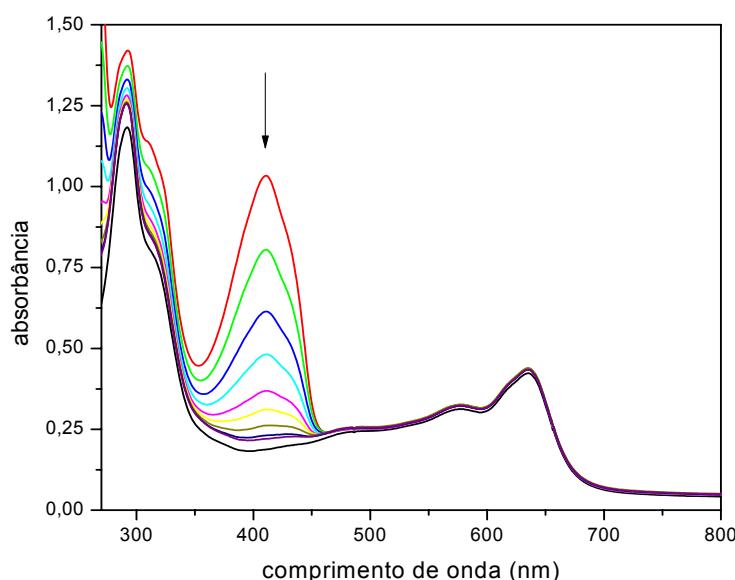


Figura 44. Espectro de absorção do complexo $\{[Ru(NO)(bpy)_2]_2RuPc(pz)\}^{6+}$ em acetonitrila e na presença de DPBF após sucessivas irradiações (2 segundos) com laser de diodo em 660 nm.

A maioria das drogas que combinam fotossensibilizadores, como as ftalocianinas, são bastante eficientes na produção de ${}^1\text{O}_2$ (DeROSA; CRUTCHLEY, 2002). O rendimento quântico de geração de oxigênio singlet para o novo complexo trinuclear foi de $\Phi_{\Delta} = 0,81$. Este é um valor bastante considerável quando comparado com outros compostos de ftalocianina usados para a terapia fotodinâmica, que costumam apresentar um rendimento quântico próximo a $\Phi_{\Delta} = 0,50$ (BAYRAK et al., 2012). A literatura relata que outro composto com rutênio-ftalocianina capaz de liberar óxido nítrico tem um rendimento quântico de formação de ${}^1\text{O}_2$ de $\Phi_{\Delta} = 0,22$ (CARNEIRO et al., 2011).

4.6 Citotoxicidade

O novo complexo trinuclear é capaz de gerar ${}^1\text{O}_2$ quando irradiado em comprimento de onda na janela terapêutica – 660 nm, como já descrito nos estudos fotofísicos. Como o tempo de vida do ${}^1\text{O}_2$ é muito curto, cerca de aproximadamente 2 μs , acredita-se que esta espécie reaja no seu sítio de formação. Esta característica é muito importante do ponto de vista biológico, já que o raio de ação do oxigênio singleto fica restrito à região do tumor, diminuindo as chances de lesões em tecidos vizinhos saudáveis. O oxigênio singlet é mais agressivo que as demais EROs e pode reagir instantaneamente com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácido nucleicos. Como os principais constituintes de membranas biológicas podem ser alvo destas espécies, as reações fotoxidativas podem ocasionar alterações da permeabilidade celular provocando a morte do tecido tumoral (MacDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Com base nestes conhecimentos, foram realizados estudos de fototoxicidade com o composto trinuclear de rutênio com as células Jurkat, B16-F10 e L929. A linhagem L929 foi usada como modelo de célula não tumoral para os estudos de citotoxicidade do complexo. As células Jurkat e B16-B10 foram os modelos de células tumorais usadas para os ensaios.

4.6.1 Células L929

A linhagem de células L929 (fibroblasto de camundongo) foi usada como modelo de células não tumorais para os estudos de fototoxicidade do complexo trinuclear de rutênio.

Os estudos com estas células foram realizados com o intuito de determinar o período de incubação e a concentração do complexo trinuclear a ser utilizada para avaliação do efeito de perda da viabilidade. A Figura 45 mostra o efeito concentração e tempo dependente da atividade do complexo trinuclear em células L929.

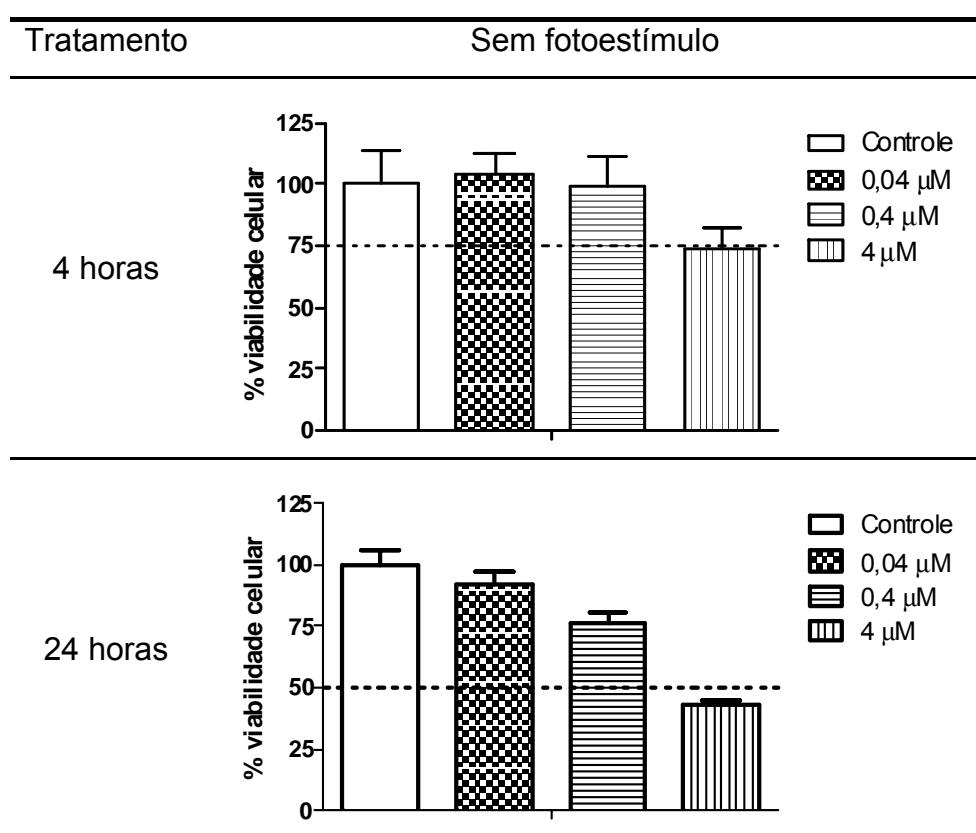


Figura 45. Efeito do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\}^{6+}$ na viabilidade celular de células não tumorais de fibroblasto murino (L929), avaliado por MTT. As células foram tratadas e pré-incubadas por 4 horas e 24 horas com o complexo trinuclear de rutênio nas concentrações de 0,04; 0,4 e 4 μM . Os dados apresentados representam as médias \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicita e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle.

Nos estudos de citotoxicidade com os complexos de rutênio, efeitos de perda da viabilidade celular foram considerados quando a diminuição da viabilidade mostrava-se maior que 25 %. Na Figura 45, no modelo avaliado como células não tumorais, o complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina não mostrou atividade citotóxica maior que 25 % com 4 horas de incubação na concentração de 4 μM . No

entanto, quando aumentado o tempo de exposição ao composto, a perda de viabilidade celular na concentração de 4 μM aumenta, passando de 72,67 % quando incubado por 4 horas, para 48,25 % quando incubado por 24 horas. Neste sentido, os estudos concernentes à atividade citotóxica dos compostos foram centrados em 4 horas de incubação com o composto trinuclear e na concentração de 0,4 μM , que não mostrou atividade citotóxica com 4 horas de tratamento com o composto na ausência de fotoestímulo.

4.6.2 Células Jurkat

Com o objetivo de entender se a molécula de óxido nítrico liberada pelo composto teria efeito sinérgico ao do oxigênio singuleto na citotoxicidade, a linhagem celular derivada de leucemia de células T humana (Jurkat) foi tratada com o composto trinuclear. Para este fim, as células foram tratadas e logo após a adição das drogas, as mesmas foram irradiadas. Foram usados dois tipos de fonte luminosa para os estudos com as células Jurkat: uma lanterna com luz UV (LED, *Light-Emitting Diode*), com comprimento de onda em 390 nm e potência de 2 mW e outra lanterna com luz vermelha, com laser em 650 nm e potência de 38 mW. Estes experimentos foram realizados na Sonoma State University.

As células foram irradiadas durante 1 minuto com luz UV, tempo que não causa dano às células apenas com a irradiação, porém suficiente para se observar a mudança espectral de uma solução contendo a espécie trinuclear, quando avaliada por UV-visível (Figura 46). A liberação do NO pelo composto foi postulada como parte do processo e posteriormente confirmada qualitativamente por medida de corrente elétrica no NOmeter. Já a luz vermelha, em 650 nm, foi usada para irradiar as células com dose de 5 J/cm^2 , o que conforme discutido anteriormente, não ocasionaria a liberação de NO em concentrações significativas.

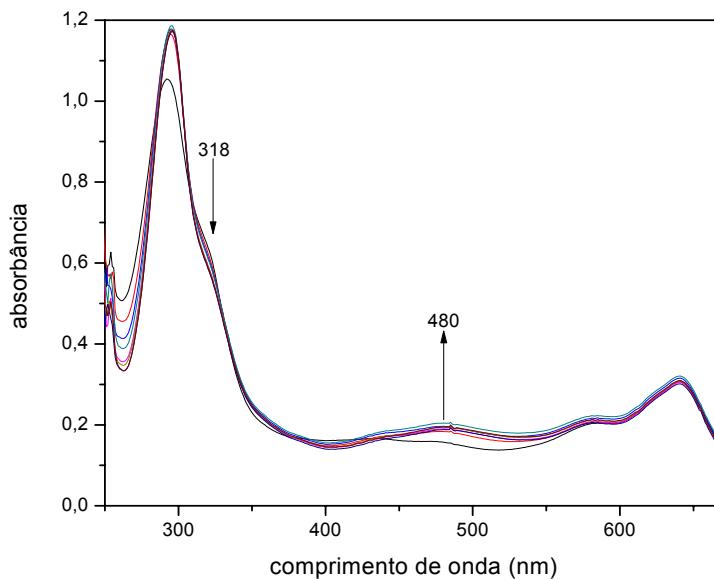


Figura 46. Espectro de absorção na região do UV-visível para o complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]_2\text{RuPc(pz)}_2\}^{6+}$, em DMSO:RPMI. Tempo de irradiação aleatório $\lambda_{\text{irr}} = 390$ nm (luz LED).

Os ensaios de citotoxicidade foram avaliados por medida da viabilidade celular. Foram realizados ensaios para determinar o tempo de incubação e a concentração do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]_2\text{RuPc(pz)}_2\}^{6+}$ de forma que, sem fotoestímulo (escuro), não fosse capaz de diminuir a viabilidade celular em mais de 25 %.

Determinada a condição na qual o complexo não mostrava citotoxicidade no escuro, com quatro horas de incubação, as células foram fotoestimuladas neste mesmo período com o composto. O efeito esperado para um composto desenhado para a TFD é a baixa toxicidade na ausência do fotoestímulo e, sob o uso da luz, espera-se a morte das células tumorais.

É o que pode ser observado na Figura 47. A Figura apresenta o efeito concentração e tempo dependente da ação do complexo trinuclear de rutênio. Com 4 horas de incubação o composto não apresenta citotoxicidade sem fotoestímulo em nenhuma das concentrações testadas (0,04; 0,4 e 4 μM). Após 8 horas de incubação, o composto apresenta citotoxicidade na maior concentração testada (4 μM) e com 24 horas, a citotoxicidade é verificada na concentração intermediária de 0,04 μM .

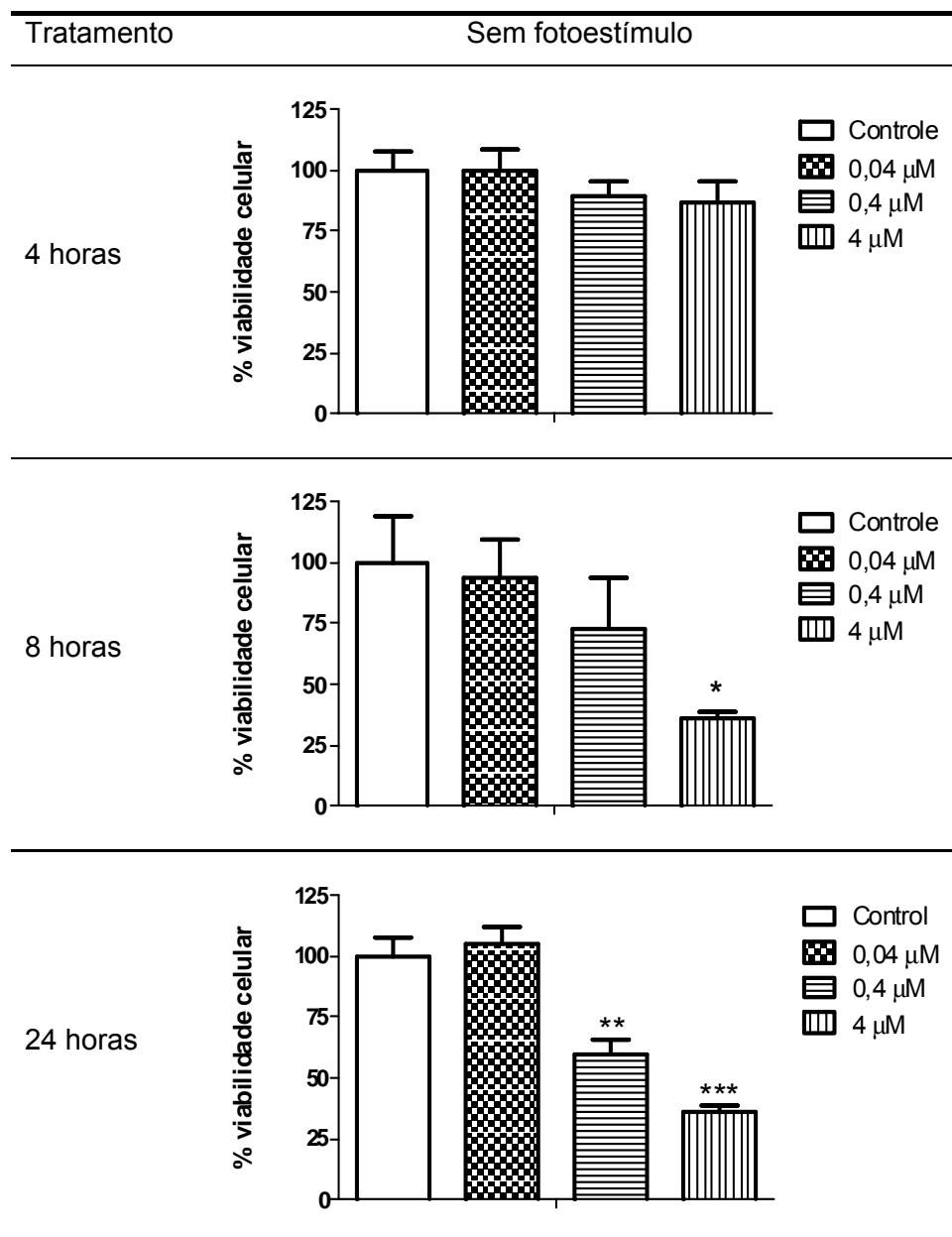


Figura 47. Efeito citotóxico do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc(pz)}_2\}^{6+}$ em linhagem de células tumorais Jurkat. As células de leucemia humana foram tratadas com o composto e incubadas por diferentes períodos com o composto e sem fotoestímulo. Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Sendo assim, para averiguação do uso deste composto para a TFD, ou seja, sob irradiação, o tempo de incubação estabelecido foi de 4 horas de incubação. O motivo da escolha se deu porque as condições de estudos permitiram o uso de uma baixa concentração do composto e também de uma baixa dose de luz empregada no fotoestímulo, quando comparado com outros compostos com

fotossensibilizadores relatados na literatura (CARNEIRO et al., 2011; CICCILINI, et al., 2009; MARANHO et al., 2009).

Jeannin e colaboradores (2008) descreveram as diferentes maneiras que o óxido nítrico pode contribuir para os efeitos de morte celular como, por exemplo, pela interação desta biomolécula com membros da família de receptor de morte celular TNF (fator de necrose tumoral); ou como o efeito sinérgico deste gás com quimioterápicos como a doxorubicina e a cisplatina, além de corroborar com o efeito de morte celular de radiação ionizantes.

Neste contexto, ao fazer uso de um composto trinuclear de rutênio, cuja estrutura combina um sensibilizador com a liberação da molécula de óxido nítrico, este composto pode ser uma ferramenta na contribuição para que as células tumorais possam se tornar mais susceptíveis à ação do oxigênio singuleto. Ou seja, o óxido nítrico seria uma agente sensibilizante destas células o que tornaria mais eficiente a ação do oxigênio singuleto.

Para entender este processo, as células Jurkat foram irradiadas primeiramente com a luz UV, quando se esperava a liberação do NO. Logo após este fotoestímulo, usou-se a luz vermelha, para geração do oxigênio singuleto (Figura 48). Quando as células foram previamente sensibilizadas pela luz UV (Figura 48 - B), seguida pelo tratamento com a luz vermelha (Figura 48 - D), não se observou diferença na contribuição esperada da espécie NO para com o efeito do ${}^1\text{O}_2$ nas condições testadas. Neste caso, a resposta de diminuição da viabilidade celular parece ser atribuída à ação do oxigênio singuleto (Figura 48 - C) gerado pelo complexo trinuclear quando irradiado na dose de 5 J/cm^2 , $\lambda_{\text{irr}} 650 \text{ nm}$.

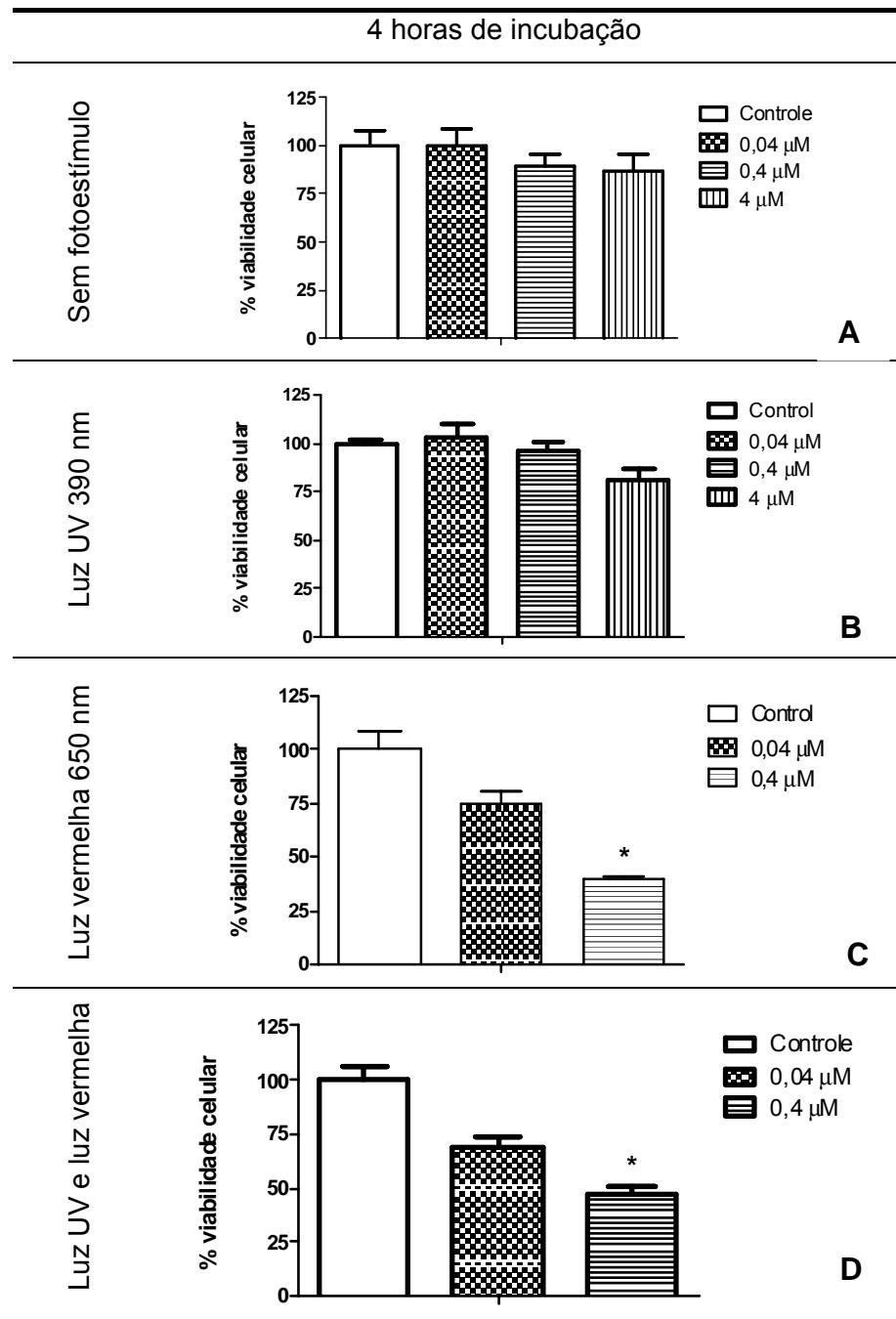


Figura 48. Efeito citotóxico do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc(pz)}_2\}^{6+}$ em linhagem de células tumorais Jurkat. As células de leucemia foram tratadas com o composto e imediatamente irradiadas com fonte luminosa descrita para cada situação (A, B, C e D). Após 4 horas de contato com a droga, adicionou-se MTS para a avaliação de viabilidade celular. Os dados apresentados representam as médias \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplícata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,05$ de C e D em relação a A na concentração de 0,4 μM .

Outra maneira de avaliar se o efeito prévio do NO nas células tumorais possa ter sido de sensibilização das células para posterior efeito do oxigênio singuleto, foi a avaliação do possível efeito genotóxico do óxido nítrico. É descrito que o óxido nítrico pode gerar uma resposta adaptativa nas células (CRAWFORD; DAVIES, 1994), ou seja, pela sua ação, seja ela citoprotetora ou citotóxica, pode contribuir para o aumento ou diminuição no efeito da viabilidade celular. Com o propósito de entender se havia a possibilidade de resposta ao efeito genotóxico do óxido nítrico nas células Jurkat, as células foram expostas à adição do composto trinuclear de rutênio e logo em seguida, submetidas à fotoestimulação para a liberação do NO com a luz UV (Figura 49).

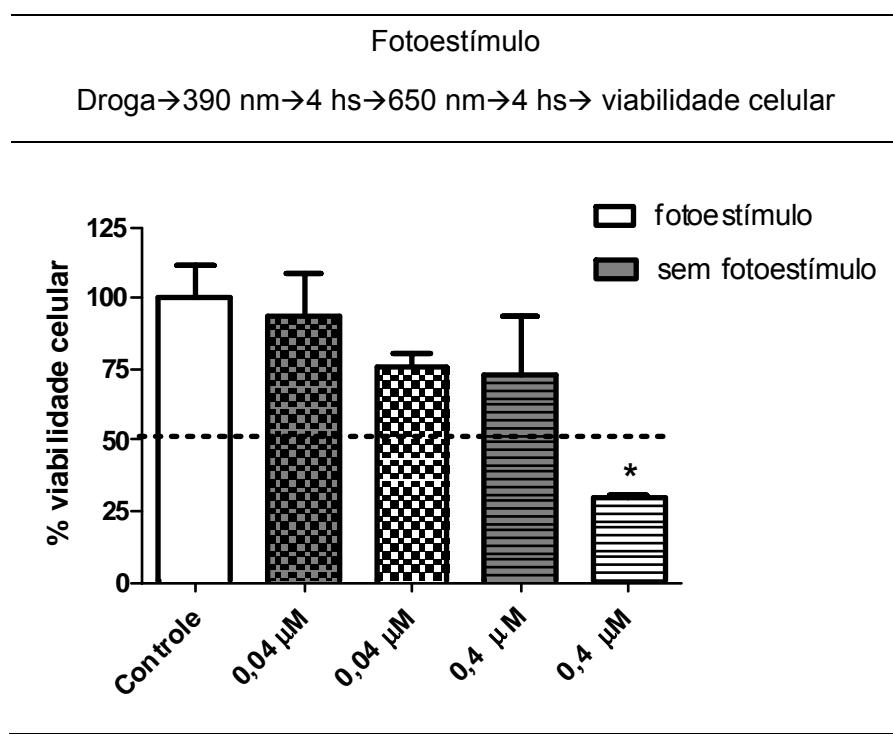


Figura 49. Efeito citotóxico do complexo $\{[Ru(NO)(bpy)_2]_2RuPc(pz)_2\}^{6+}$ em linhagem de células tumorais Jurkat. As células de leucemia foram tratadas com o composto e imediatamente irradiadas com fonte luminosa em 390 nm. Após o período de 4 horas, as células foram irradiadas com a luz em 650 nm na dose de 5 J/cm^2 . Após este período, adicionou-se MTS para a avaliação de viabilidade celular. Os dados apresentados representam as médias \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicata e os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Após a fotoestimulação, esperou-se 4 horas para avaliar a resposta celular por efeito do óxido nítrico, citotóxico ou citoprotetor. Em outro experimento, além da

luz UV, foi realizado fotoestímulo com luz vermelha para geração do oxigênio singuleto pelo composto. Experimentos controles, com as células tratadas apenas em condições sem fotoestímulo e as irradiadas nas mesmas condições também foram realizados. Observou-se que, nas condições e concentrações testadas, não houve efeito genotóxico por parte do NO liberado pelo composto, embora os experimentos de fotólise, acompanhados por espectroscopia de UV-visível (Figura 46) e acompanhamento pelo NOmeter mostrassem que havia liberação de NO quando o composto era irradiado com a luz UV em solução de meio de cultura celular.

Diante destes resultados, percebe-se que talvez a concentração de óxido nítrico liberado pelo composto não fosse suficiente para causar o dano celular por si, no período de tempo usado para a incubação. Buscando o entendimento de como a molécula do óxido nítrico poderia contribuir com efeito sinérgico à ação citotóxica do oxigênio singuleto, foram usados doadores externos de NO para os ensaios de citotoxicidade. SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicilamina) (Figura 50) é um doador clássico de NO da classe dos S-nitrosotióis, capaz de liberar óxido nítrico espontaneamente quando colocado em meio redutimétrico ou por estímulo luminoso.

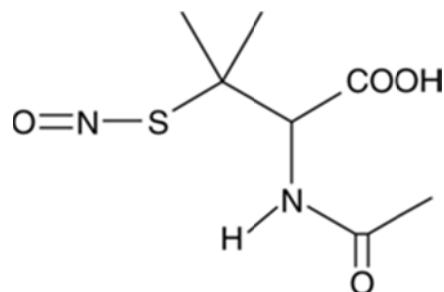


Figura 50. Estrutura química do SNAP, um doador clássico de óxido nítrico.

Os S-nitrosotióis são estruturados geralmente como RSNO (onde R é o principal grupo orgânico) e são uma classe de doadores tanto exógenos (SNAP) quanto endógenos. Dentre os doadores endógenos, podemos citar os aminoácidos componentes de proteínas e peptídeos como a cisteína (ELAHI; NASEEM; MATATA, 2007), que sofrem nitrosação (coordenação do átomo de N) formando os RSNOs, o que constituiria uma reserva endógena de NO. Os RSNOs podem ser degradados tanto por ações enzimáticas quanto por não enzimáticas para a liberação do NO para os tecidos-alvo, onde esta biomolécula desempenhará seu papel fisiológico (FUKUTO; CARRINGTON, 2010; FUKUTO et al., 2008).

Análises da citotoxicidade do complexo trinuclear do rutênio foram realizadas em combinação com doadores exógenos de óxido nítrico. As análises feitas por citometria de fluxo (Figura 51) mostram que o SNAP não mostrou atividade citotóxica quando aplicado nas células sem estar combinado ao complexo trinuclear nas duas condições: com e sem fotoestímulo. No entanto, quando usado em combinação com o complexo trinuclear de rutênio e com fotoestímulo em λ_{irr} 650 nm, o SNAP contribuiu para o aumento da atividade citotóxica do complexo trinuclear de rutênio, passando de 80 % para apenas 25 % de viabilidade quando da combinação SNAP (500 μM) + complexo trinuclear (4 μM). Quando comparamos o complexo trinuclear no fotoestímulo com o complexo + SNAP, percebe-se que há aumento na atividade citotóxica pelo composto.

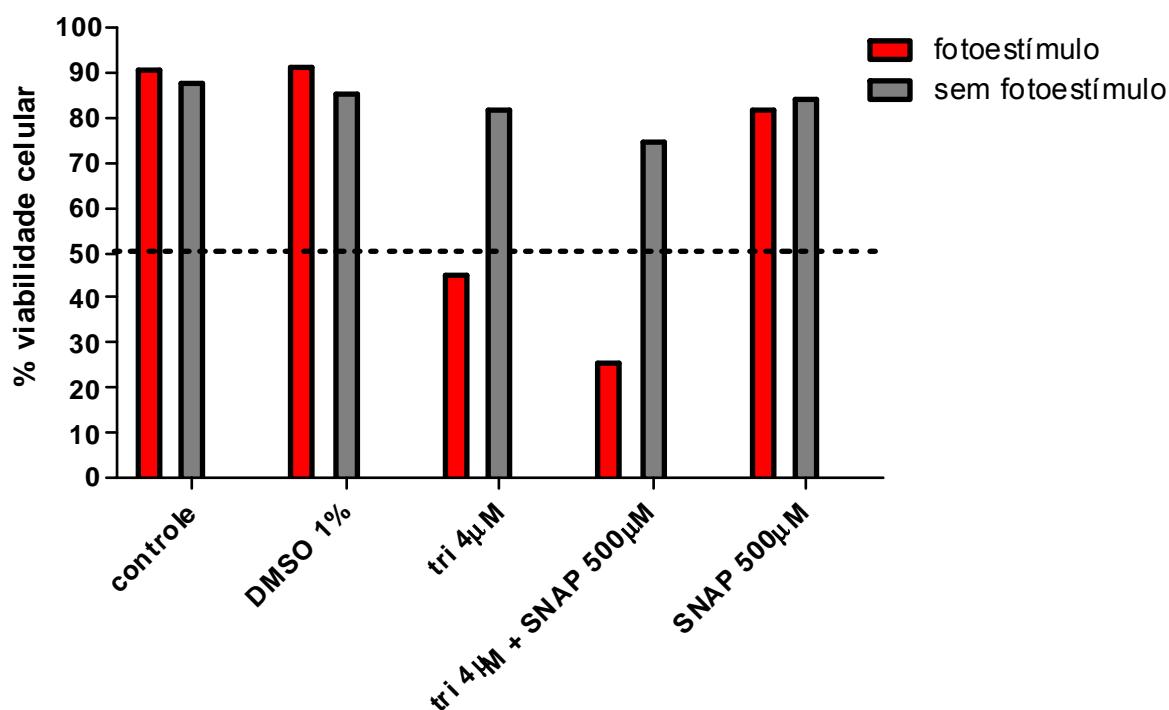


Figura 51. Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo das células Jurkat submetidas ao tratamento com o veículo (DMSO), com os compostos trinuclear e o doador de óxido nítrico SNAP. As células foram tratadas, irradiadas com luz em 650 nm e incubadas por 4 horas para avaliação dos efeitos celulares das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. Leitura de 10.000 eventos.

Embora os resultados venham ao encontro com a proposta da atividade sinérgica entre os efeitos celulares do óxido nítrico e do oxigênio singlet para o tratamento de células tumorais, há alguns pontos a serem considerados quando se

trata do composto SNAP. O SNAP é um S-nitrosotiol que além da molécula de óxido nítrico é capaz de gerar outros radicais que também podem reagir com o composto trinuclear de rutênio no meio celular. Os outros radicais também podem agir em conjunto com o NO liberado, colaborando para a diminuição da viabilidade celular. Neste sentido, foi usado outro doador exógeno de óxido nítrico, o DEA/NO (Dietilamina NONOate) (Figura 52) que libera espontaneamente o NO em pH fisiológico. A solução estoque foi preparada no dia do experimento e armazenada em solução básica de 0,01M de NaOH para evitar decomposição. DEA/NO é um doador de NO que se dissocia espontaneamente de maneira pH dependente em um processo de primeira ordem com o tempo de meia vida entre 2 a 16 minutos a 37º C (DRAGO; PAULIK, 1960).

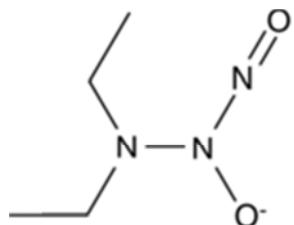


Figura 52. Estrutura química do dietilamina NONOate (DEA/NO), um doador de óxido nítrico.

As células foram previamente tratadas somente com NaOH e somente com DEA/NO para avaliação do efeito citotóxico deste último. DEA/NO e NaOH não mostraram efeitos citotóxicos quando testados de maneira independente nas células. Quando combinados o DEA/NO com o complexo trinuclear de rutênio, o efeito mostrado por citometria de fluxo parece ser atribuído ao efeito citoprotetor do NO. A Figura 53 corrobora com outros resultados mostrando que o complexo trinuclear quando fotoestimulado, apresenta efeito citotóxico maior nas concentrações de 0,4 µM (65,1 % de viabilidade) e 4 µM (35,4 % de viabilidade). Entretanto, quando combinado com o doador exógeno de NO no fotoestímulo, a viabilidade é recuperada para 72,5 % para a concentração de 0,4 µM e para 49,9 % na concentração de 4 µM.

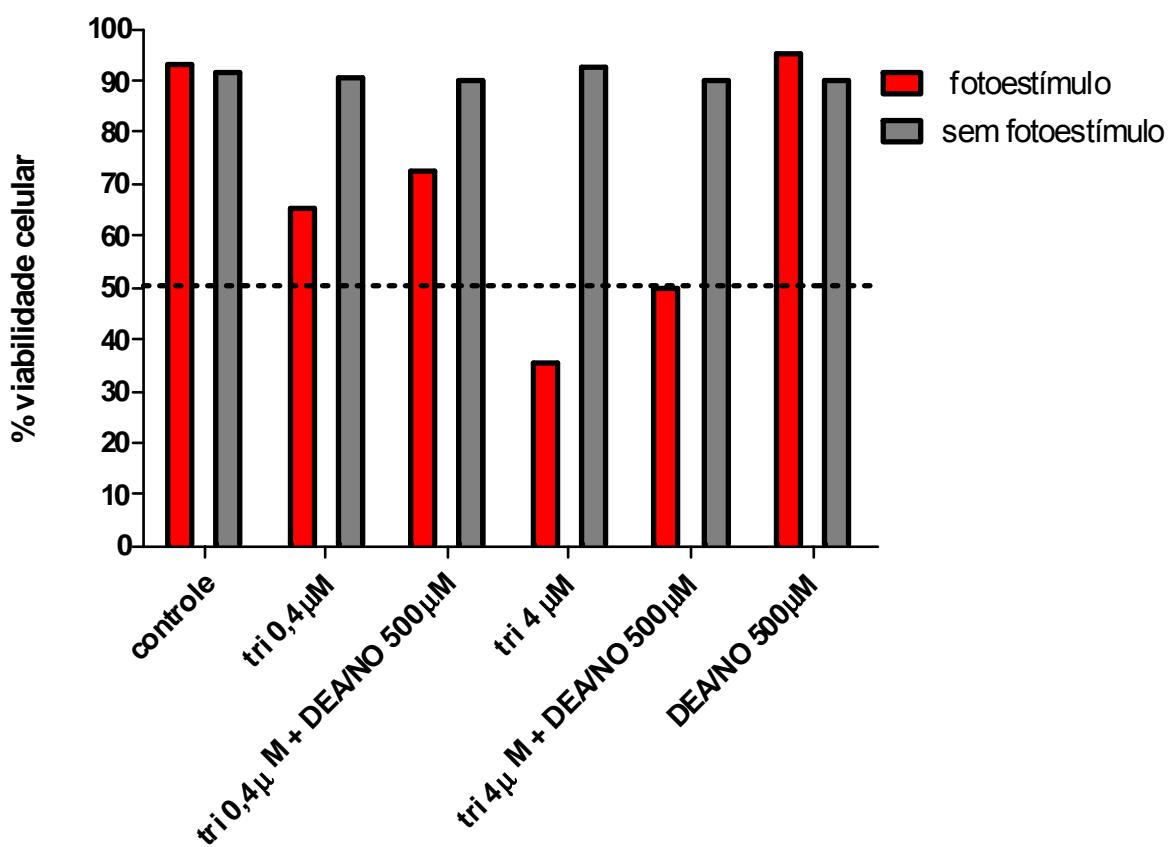


Figura 53. Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo das células Jurkat submetidas ao tratamento com o veículo (DMSO), com os compostos trinuclear e o doador de óxido nítrico DEA/NO. As células foram tratadas, irradiadas com luz em 650 nm e incubadas por 4 horas para avaliação dos efeitos celulares das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. Leitura de 10.000 eventos.

Embora não se conheça o mecanismo de ação pelo qual o óxido nítrico liberado dos agentes exógenos possa estar colaborando (no caso do SNAP) ou protegendo da ação do complexo trinuclear (no caso do DEA/NO), estes resultados conduzem a questões interessantes de como o óxido nítrico pode exercer tais efeitos. É descrito, por exemplo, que o óxido nítrico exerce papel importante na função mitocondrial das células (PESTANA et al., 2009), uma das principais organelas celulares envolvidas na avaliação da viabilidade celular. Srisook e colaboradores (2005) ao estudarem o efeito citotóxico por dano oxidativo do cloreto de cádmio ($CdCl_2$) em células de glioma de ratos, fizeram uso de um doador de NO da classe NONOate (SPER/NO) e perceberam o efeito citoprotetor do NO. Os estudos mostram que o NO liberado induz a expressão da enzima oxigenase e proporcionou um efeito protetor contra os danos oxidativos de $CdCl_2$ nas células de

glioma de rato. Outros estudos associam o efeito protetor do NO no efeito da TFD. Bhowmick e Girotti (2013) mostraram que em estudos de TFD fazendo o uso do ALA (um fotossensibilizador), há aumento da enzima que sintetiza NO, a iNOS. O uso de um inibidor desta enzima, diminuindo a produção de óxido nítrico, aumenta a morte de células tumorais sugerindo o efeito citoprotetor quando há presença do NO.

Os resultados revelam que nas condições testadas e com a linhagem celular de leucemia humana, o óxido nítrico liberado não parece sensibilizar as células para maximizar o efeito catalítico de dano às células tumorais por ação do oxigênio singuleto. Neste contexto, entende-se que as espécies reativas de nitrogênio formadas por cada composto podem colaborar para diferentes efeitos encontrados no sinergismo do efeito do óxido nítrico. O que se pode perceber, é que o óxido nítrico parece contribuir de maneira tanto citoprotetora quanto citotóxica (ALLEN; DEMCHENKO; PIANTADOSI, 2009; BHOWMICK; GIROTTI, 2013; IOANNIDIS et al., 1996; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; TOLEDO; AUGUSTO, 2012; WINK; MITCHELL, 1998) para os efeitos de viabilidade celular quando combinados os doadores exógenos de NO com o complexo trinuclear de rutênio.

4.6.3 Células B16-F10

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no País. Embora o melanoma represente apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, ele é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2013). Em 2012, previa-se que 6.230 novos casos de melanoma surgiram no Brasil. Destes, 1.580 seriam na região sul, enquanto 3.530 novos casos eram previstos para a região sudeste, as regiões com maior prevalência desta neoplasia no país (INCA, 2012).

O modelo de melanoma usado para os estudos de atividade citotóxica do complexo trinuclear de rutênio foram as células B16-F10, linhagem de células pigmentadas e derivadas da pele de camundongos. Os ensaios de citotoxicidade contra células tumorais de melanoma murino foram realizados para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)_2\text{RuPc(pz)}_2]^{6+}$ (Figura 54) e também para o seu precursor $[\text{Ru}(\text{NO}^+)(\text{bpy})_2(\text{pz})](\text{PF}_6)_2$ (Apêndices A e B). Em face da insolubilidade do complexo trinuclear em meio aquoso, uma massa do complexo trinuclear foi previamente dissolvida em dimetilsulfóxido, posteriormente diluída neste mesmo

solvente e ajustada a uma concentração final de DMSO de 1 %. Expressaram-se os resultados em porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração do complexo em relação ao controle.

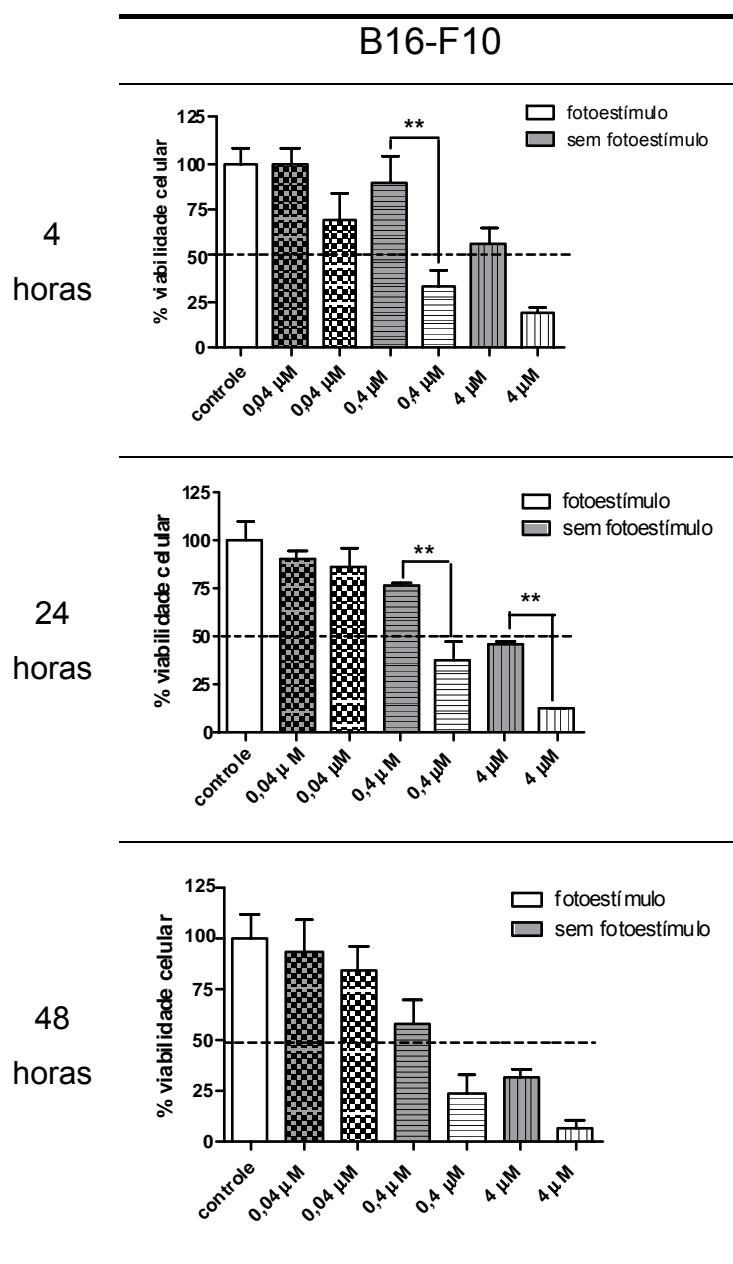


Figura 54. Efeito citotóxico do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc(pz)}_2\}^{6+}$ em linhagem de células tumorais B16-F10. As células de melanoma murino foram tratadas e pré-incubadas com o complexo por 4 horas antes do fotoestímulo. O tempo de resposta no escuro foi de 4, 24 ou 48 horas. Fotoestímulo em comprimento de onda de 660 nm e dose de 5 J/cm². Os dados apresentados representam as médias + S.E.M. de 3 experimentos independentes feitos em duplicata. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação ao controle. ** p < 0,01 para comparação entre os grupos com e sem fotoestímulo.

A Figura 54 mostra que a concentração de 0,4 µM causou perda de mais de 50% da viabilidade celular (com 4 horas de incubação) ao submeter as células à irradiação em 660 nm. Para as células que não foram fotoestimuladas (controle), observa-se que nas mesmas condições testadas, não houve perda da viabilidade celular nesta mesma concentração. Acredita-se que a diminuição da viabilidade celular para os tratamentos com fotoestímulo, seja atribuída ao efeito de irradiação luminosa que tanto pode gerar ERNs quanto EROs, espécies que podem estar agindo de maneira sinérgica. A partir destes experimentos, determinou-se que para o entendimento das vias envolvidas na morte celular, a concentração mais adequada a ser usada seria a de 0,4 µM por um período de incubação de 4 horas, cujos resultados não mostram perda da viabilidade celular nos tratamentos sem fotoestímulo.

As vias de sinalização celular são modificadas em resposta biológica a um estímulo (p.e. adição de uma droga, radiação), sendo um sistema complexo regulado por proteínas e receptores celulares. Isto envolve uma série de moléculas de sinalização intracelulares, na superfície das células, no citoplasma e em diferentes organelas, o que em conjunto determinam a resposta da célula causada por agentes externos. Há uma rede de proteínas que vai desde receptores celulares até fatores de transcrição, que são relacionadas tanto à sobrevivência quanto à morte das células (UZDENSKY, 2008). Cada célula define individualmente quais proteínas estão ligadas a seu estado fisiológico e quais estão associadas às respostas específicas, como por exemplo, frente a uma patologia. Na TFD, que faz uso de um conjunto composto por um fotossensibilizador e a luz como agentes externos, diferentes e complexas respostas celulares podem estar associadas aos seus efeitos. Neste sentido, buscou-se a colaboração com a Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino, do Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer, da FCFRP-USP, experiente na pesquisa de sinalização e resposta ao estresse oxidativo envolvidas no câncer, para a realização dos ensaios biológicos que envolvem as vias de sinalização celular.

De uma maneira geral, a morte celular causada pelo composto trinuclear de rutênio deve ocorrer por: i) inibição de vias de proliferação; e/ou ii) ativação de vias de morte celular. A morte celular resultante da TFD, neste caso poderia ser, por exemplo, apoptose, necrose ou autofagia (AGOSTINIS et al., 2011). Apesar de a morte celular ser induzida pela TFD por diferentes fotossensibilizadores e em

diferentes condições, cada mecanismo de morte pode ser específico dependendo do tipo de célula, tempo de incubação com o fotossensibilizador e da dose de luz empregada para a TFD. Neste sentido, foram analisados marcadores moleculares relacionados à morte celular por apoptose (caspase-3 e a clivagem de PARP). Além disso, outras vias foram estudadas e serão descritas a seguir, para um entendimento do possível mecanismo de ação envolvido na resposta celular por este novo complexo de rutênio-ftalocianina.

Ao se trabalhar com um composto que é capaz de gerar tanto espécies reativas de oxigênio (EROs) quanto de nitrogênio (ERNs), a cascata de sinalização da resposta celular por estes estímulos pode ser ainda mais complexa. O estresse oxidativo associado ao dano celular leva a ativação de proteínas que são consideradas “sensores” de EROs. A TFD ativa proteínas envolvidas na proteção celular a esses danos como, por exemplo, as chaperonas, superóxido dismutase, tireodoxina, glutationa, dentre outras. Há também algumas proteínas envolvidas com a sinalização celular, no controle da transcrição e na apoptose (KESSEL, 2012; YOO; HA, 2012). Um dos efeitos da TFD é, reconhecidamente, a geração de espécies reativas. Além do oxigênio singuleto $^1\text{O}_2$, que tem tempo de meia vida bastante curto, há outras espécies geradas com tempo de vida mais longos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-) (PRICE; TERLECKY; KESSEL, 2009), que são produzidos como subprodutos menores resultantes da fosforilação oxidativa em células normais, mas que em condições de estresse, a produção destas moléculas é aumentada (SKULACHEV, 1999). O $^1\text{O}_2$ é mais ativo que as moléculas de H_2O_2 and O_2^- , provavelmente devido ao fato de as células animais não terem moléculas que detectem naturalmente esta espécie reativa, já que não temos sistemas que produzem $^1\text{O}_2$ endogenamente. No entanto, a complexa resposta celular ao estresse oxidativo, envolvendo diversas vias de sinalização implica na presença de sensores de EROs que reagem às mudanças no potencial redox celular (MOSEROVA; KRALOVA, 2012; UZDENSKY, 2008), mas estes sensores não são completamente elucidados pela literatura.

Dentre os sensores de EROs, podemos citar a fosfatase lipídica, PTEN, uma das proteínas analisadas pelos ensaios de Western blotting (Figura 55). A PTEN é inativada por EROs e por mecanismos envolvidos no comportamento redox da célula. Seu papel na célula é relacionado com controle da parada do ciclo celular, apoptose, adesão celular, migração e diferenciação celular (CARNERO et al., 2008).

A fosforilação da porção C terminal da proteína PTEN (fosfo-PTEN) pode ser responsável pela sua estabilização, diminuindo assim sua atividade de fosfatase (SILVA et al., 2008). PTEN inibe a ativação de Akt dependente de PI3K (fosfatidil inositol quinase 3), uma das respostas a ser ativada pelo receptor de tirosina quinase, presente na membrana das células que respondem aos estímulos externos. PI3K e também a Akt (proteína quinase B) estão envolvidas na sobrevivência celular e apoptose. Akt é ativada pela fosforilação nos resíduos de treonina 308 e serina 473, também envolvida na proliferação e sobrevivência celular (CHUNG et al., 2009). A resposta celular investigada pelos ensaios de Western blotting, após tratamento das células com o complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina mostra que há diminuição na intensidade da banda de PTEN. Até o presente momento, não há dados na literatura que demonstrem estudos relacionando PTEN e Terapia Fotodinâmica. Entretanto, em conjunto com a avaliação das outras proteínas e comparado ao resultado da p-PTEN onde não houve alteração na intensidade das bandas da proteína, sugere-se que possivelmente a ativação de PTEN tenha ocorrido e houve uma consequente degradação desta proteína via proteossomo.

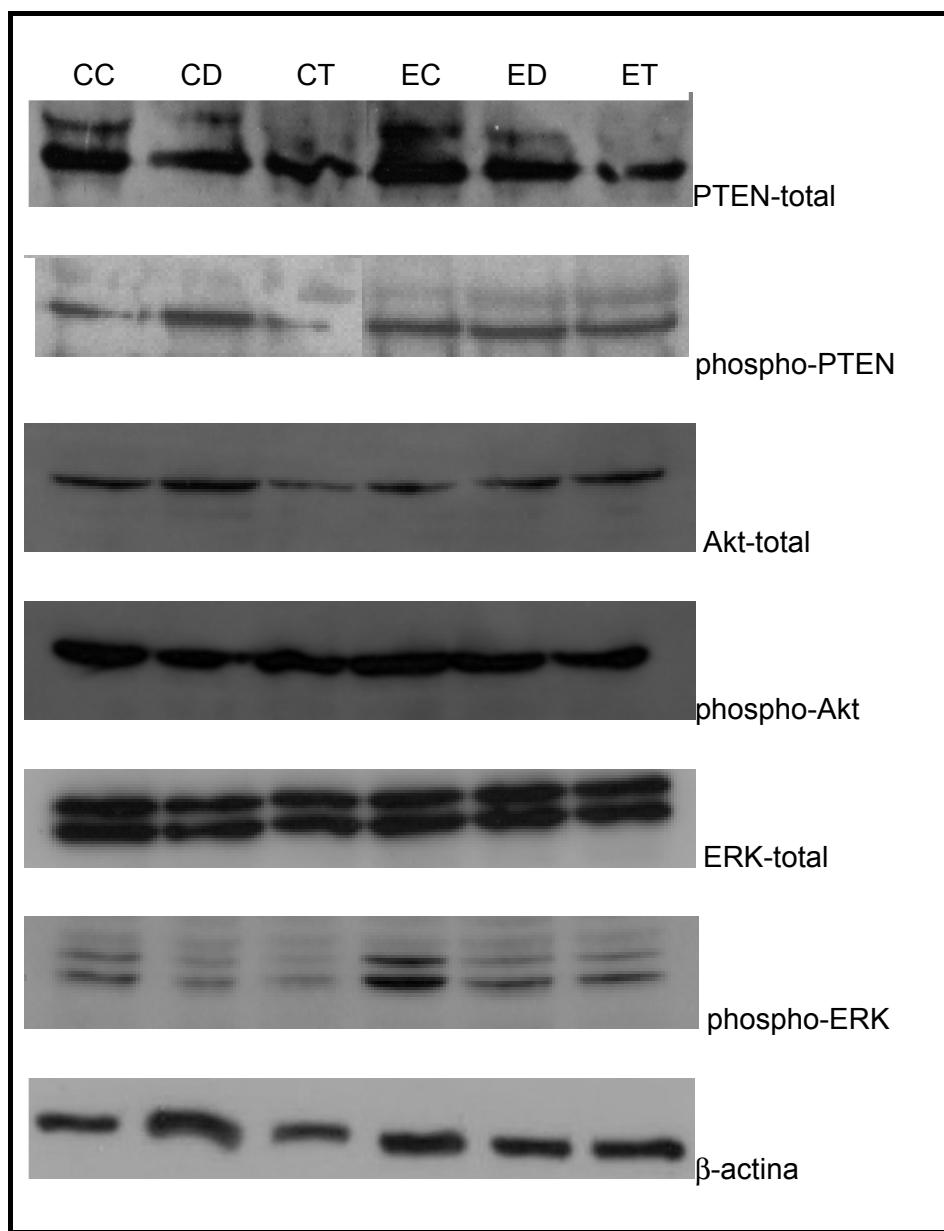


Figura 55. *Western blotting* para análise do nível e *status* de fosforilação das proteínas PTEN, Akt e ERK após TFD nas células B16-F10, modelo de melanoma murino. Os anticorpos primários usados no WB são indicados para cada figura, na qual: CC – células irradiadas, mas sem composto; CD – células irradiadas e tratadas com o veículo DMSO; CT – células irradiadas e tratadas com o composto na concentração de 0,4 μ M; EC – células sem fotoestímulo e sem composto; ED – células sem fotoestímulo e tratadas com o veículo DMSO; ET – células sem fotoestímulo e tratadas com o composto na concentração de 0,4 μ M. A proteína β -actina foi usada como proteína constitutiva (controle de carregamento no gel).

As proteínas ERK e Akt, que estão envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, também foram investigadas. Na Figura 55, pode-se perceber que não houve diferença nas proteínas ERK total, Akt total e p-Akt quando comparados controle e TFD. A proteína Akt/proteína quinase B é uma importante molécula sinalizadora que tem papel em respostas celulares por estímulo externo e fatores de crescimento e é uma importante quinase de estudo para o tratamento do câncer (BOZKULAK et al., 2007). Zhuang e Kochevar (2003) descrevem o envolvimento da Akt na sobrevivência celular em linhagem de fibroblasto murino e quando usado o fotossensibilizador Rosa Bengal para o tratamento em TFD. Alguns outros estudos têm relacionado a fosforilação da Akt (p-Akt) em resposta ao dano oxidativo (ZHUANG; KOCHEVAR, 2003). Entretanto, nas condições testadas para o complexo trinuclear de rutênio-ftalocianina, não houve alterações consideráveis nas proteínas Akt e p-Akt, sendo que neste caso, a morte celular mostra-se independente a esta via.

Em contrapartida, percebe-se diminuição na intensidade das bandas de p-ERK quando há tratamento da amostra pelo complexo e fotoestímulo (canaletas CT vs ET, Figura 55). Estes resultados sugerem que as células tratadas pelo composto quando são fotoativadas podem estar morrendo por inibição da proliferação celular relacionada a p-ERK. ERK é uma proteína da família das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno), uma família de proteínas envolvidas em vários eventos celulares como proliferação celular, diferenciação, migração e morte. Tong e colaboradores (2002) descreveram uma ativação da ERK em linhagem de células tratadas com terapia fotodinâmica usando o Fotofrin®, mostrando um efeito protetor desta proteína na TFD por Fotofrin®. Assim como a Akt, esta proteína tem sido alvo de pesquisas para o diagnóstico e tratamento de câncer (ROBERTS; DER, 2007; ALMEIDA et al., 2004; MOOR, 2000).

Outras proteínas envolvidas na sinalização de morte celular como PARP e caspase-3 também foram investigadas. Para estes experimentos, foram usados diferentes tempos de incubação do composto, e TFD menores que 4 horas de incubação. Estas variações nas condições de tratamento foram baseadas na observação por microscopia onde, após 30 minutos da TFD, foram visíveis as alterações na morfologia celular. Sendo assim, as proteínas foram avaliadas após 30 e 120 minutos de incubação a 37 °C em estufa após TFD (Figura 56).

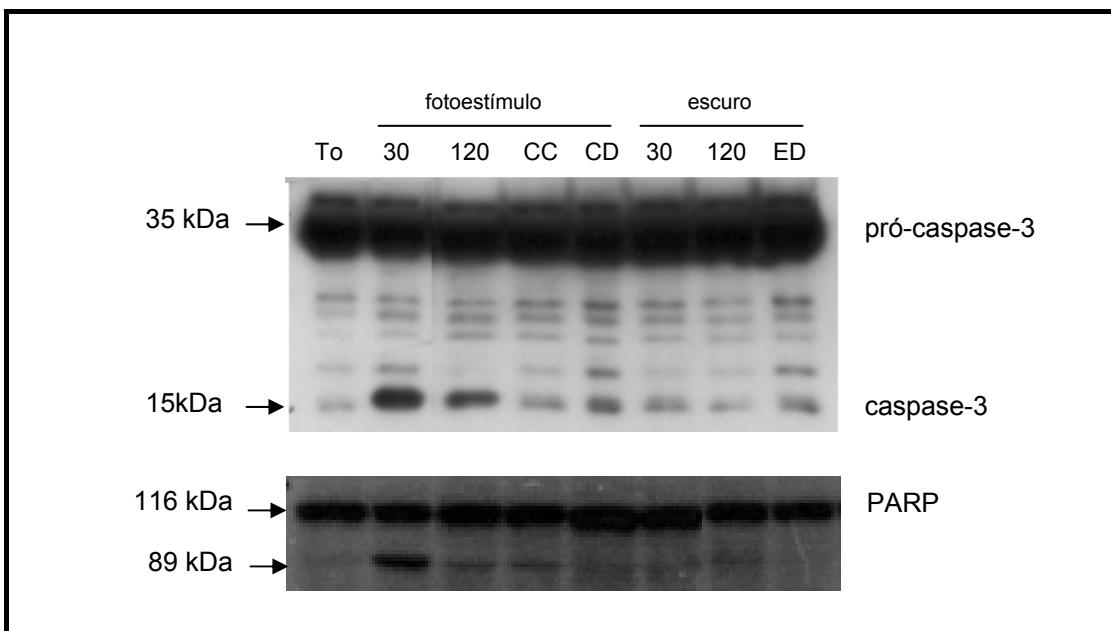


Figura 56. *Western blotting* para determinação da clivagem/ativação da caspase-3 e da PARP após TFD em células B16-F10, modelo de melanoma murino. Os anticorpos primários usados no WB são descritos para cada figura, na qual: To – células sem tratamento e sem fotoestímulo. As demais amostras equivalem ao tempo (30 e 120 minutos) de incubação após a TFD no caso do fotoestímulo e amostras sem fotoestímulo. A concentração do composto usado em todos os tratamentos foi de 0,4 µM; CC – células com fotoestímulo e sem composto; CD – células com fotoestímulo e tratadas com o veículo DMSO; ED – células sem fotoestímulo e tratadas com veículo DMSO.

A Figura 56 mostra a clivagem da pró-caspase-3 (35 kDa) em caspase-3 ativa (15 kDa), detectada em 30 e 120 minutos de incubação após TFD. Percebe-se que as amostras sem TFD não mostram alterações intensas nas bandas de caspase-3. Isto demonstra que, nas condições testadas, a TFD com o novo complexo de rutênio-ftalocianina leva a ativação de caspase-3 em células B16-F10. Os resultados de PARP, um substrato conhecido para caspase-3 também foi clivada após TFD com o novo complexo, mostrando maior ativação após 30 minutos da TFD, sobrepondo-se àquele observado para a ativação de caspase-3. Os resultados das proteínas sinalizadoras de apoptose (caspase-3 e PARP) conjuntamente com a microscopia que mostrou corpos apoptóticos após a TFD (Figura 57 – D) indicam que a morte celular é dada por apoptose. Estes resultados corroboram com os dados encontrados por Hsieh e colaboradores (2003) que relatam um processo apoptótico de morte de células de câncer epidermóide A431 a partir da ativação de caspase-3 e clivagem de PARP.

Diante do exposto, muitas são as vias que podem estar envolvidas no mecanismo de morte celular por ação da TFD com o novo complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina. Deve-se, neste contexto, considerar que o óxido nítrico e outros ERNs podem estar contribuindo com as diferentes respostas celulares encontradas nas condições testadas. Os resultados obtidos tanto para as proteínas envolvidas na sinalização celular quanto para a morfologia celular mostram a célula em processo apoptótico após a TFD. Portanto, nas condições avaliadas, propõe-se que a morte celular induzida pelo novo complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina e TFD é por apoptose, em parte associada à inibição da via de sinalização da ERK e ativação do supressor tumoral PTEN.

4.7 Ensaios de sublocalização celular

Para o melhor entendimento de como as espécies reativas estão agindo é importante que se saiba qual é o sítio de ação destas espécies derivadas de nitrogênio e oxigênio. O complexo trinuclear de rutênio apresenta luminescência, o que possibilitou a especulação da sublocalização celular deste composto a partir de microscopias de fluorescência e confocal.

A Figura 57 representa um ensaio independente realizado em microscopia confocal, com uso do laser com excitação em 633 nm, próximo do comprimento de onda de excitação máxima do composto, que é em 645 nm. Percebe-se que quando as células foram tratadas por 4 horas com o complexo trinuclear (Figura 57 – B), a luminescência é observada e sobrepõe-se às células, mostrando que o complexo foi internalizado pelas mesmas. Além disso, após a TFD (Figuras 57 – C e D) percebe-se a alteração morfológica nas células assim como a formação de corpos apoptóticos, confirmando os resultados já relatados que mostram que o mecanismo de ação de morte celular por este novo composto está relacionado à apoptose.

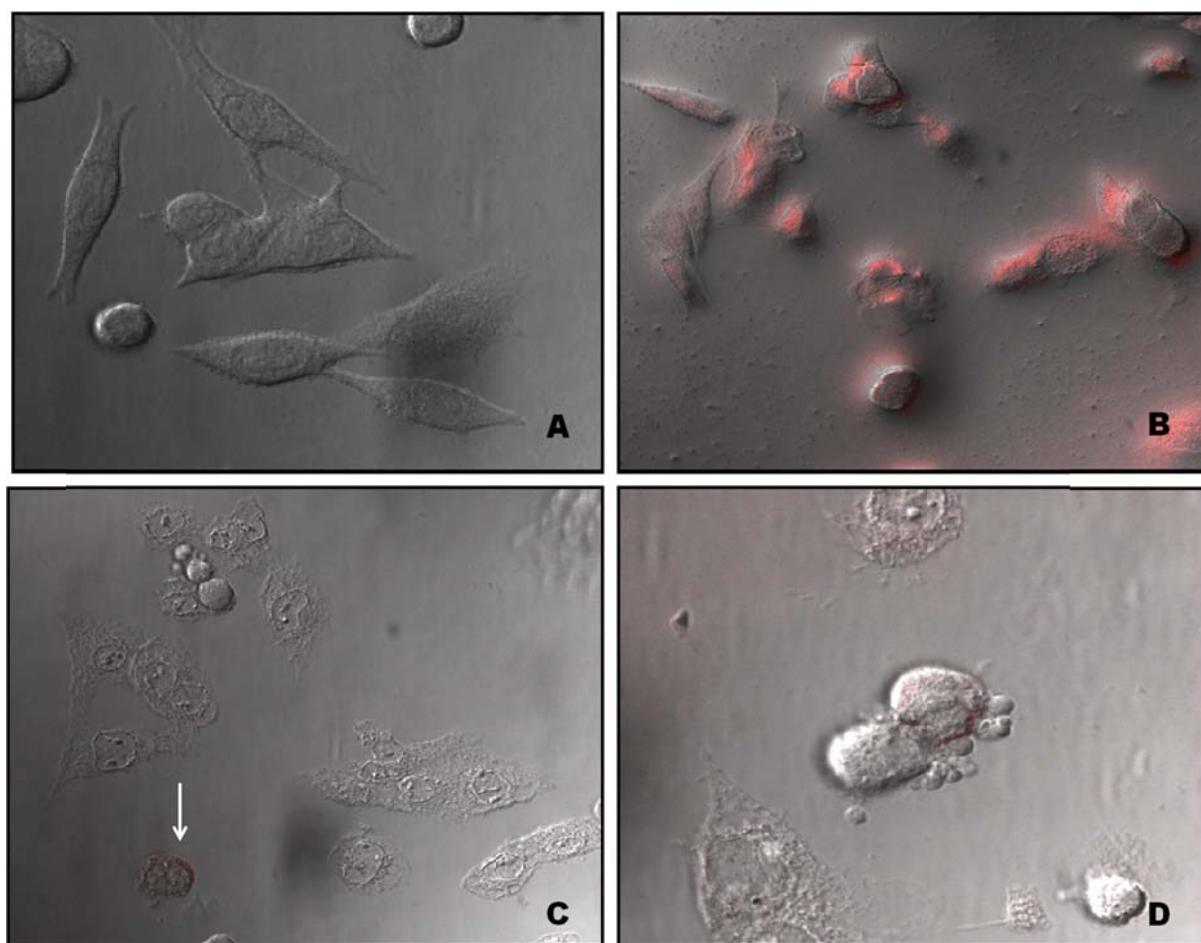


Figura 57. Microscopia confocal das células B16-F10 expostas ao tratamento do complexo $\{[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\}^{6+}$. Em A) células sem tratamento, ou seja, o controle. Em B) Células com 4 horas de incubação, sem fotoestímulo. Em C) Células após 1 hora de TFD, fotoestimuladas com laser em 660 nm. Em D) células ampliadas com características apoptóticas (corpos apoptóticos) e com indícios da presença do composto em tom vermelho.

Hsieh e colaboradores (2003) ao tratarem células de câncer epidermóide A431 com Fotofrin® na concentração de $28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 3 horas, observaram uma coloração vermelha principalmente na proximidade da membrana plasmática. Ao se prolongar o tempo de incubação para 24 horas, esses pesquisadores perceberam que outras alterações celulares surgiram, como a formação de vacúolos e outros indicativos de que o Fotofrin® estaria no citoplasma celular, sugerindo a internalização deste composto usado para a Terapia Fotodinâmica, o que dá suporte às respostas celulares serem dependentes do local de ação do fotossensibilizador utilizado no tratamento.

Outro experimento baseado nas características luminescentes do composto foi realizado em RT-confocal (Figura 58), que faz uma varredura comparativa entre as regiões que apresentam a luminescência em comparação a região que não apresenta. Nesta microscopia, é possível visualizar que onde as células se encontram há luminescência, enquanto que na região ao seu redor (onde não há células) há um fundo negro, confirmando que o composto trinuclear foi internalizado pelas células. É o que podemos observar nas Figuras 58 (B) e (C) a seguir.

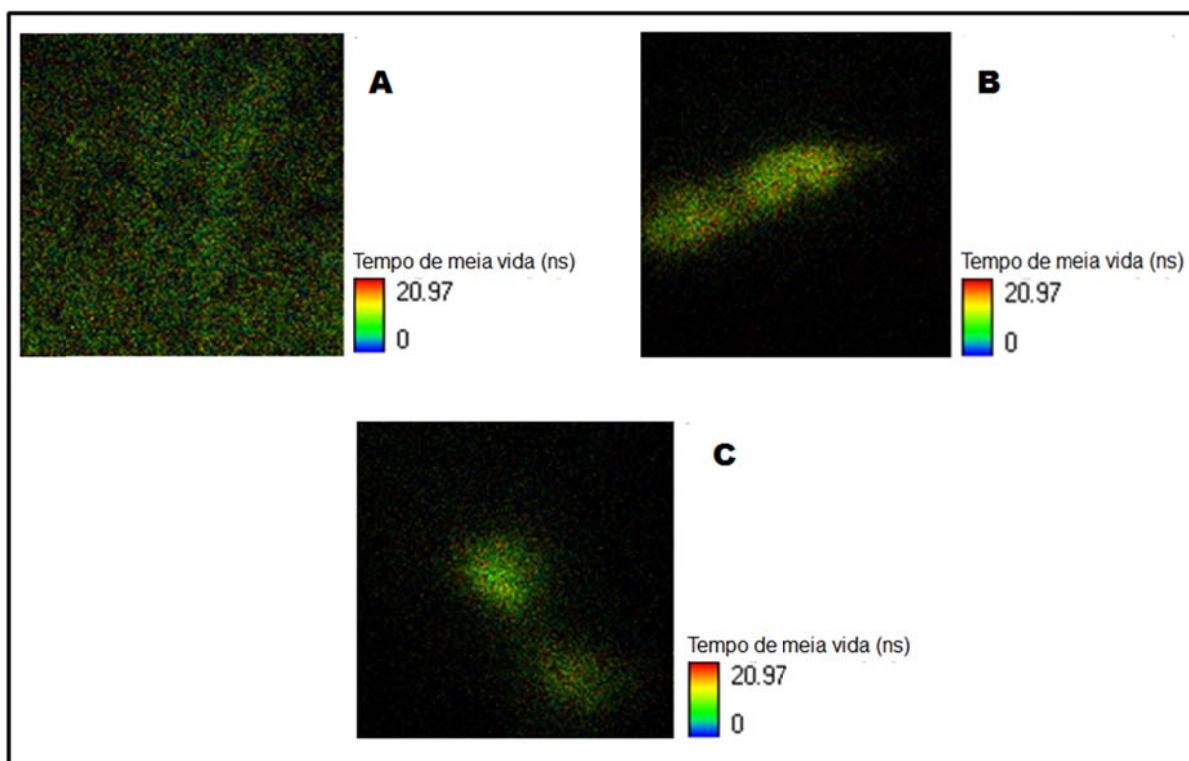


Figura 58. Microscopia de FLIM (imagem de tempo de vida de fluorescência, em inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) das células B16-F10 expostas ao tratamento do complexo $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\right]^{6+}$. Em A) amostra controle, ou seja, células não tratadas com o composto. Em B) células tratadas com o complexo por 4 horas. Em C) células 1 hora após TFD com estímulo luminoso em 660 nm.

Como podemos perceber na Figura 58, a amostra controle (A), na qual não há tratamento com o complexo $\left[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2\right]^{6+}$, não faz contraste com outras áreas no mesmo campo de visão para poder detectar a fluorescência. A emissão de fluorescência, portanto, é fora de foco da célula e toda contra o campo de visão. Como esta microscopia seleciona o plano da imagem e rejeita a luz originada fora de foco, ou seja, sem fluorescência, quando há tratamento com o complexo trinuclear (Figura 58 B e C), o composto internalizado nas células emite

fluorescência em comparação às áreas do campo de visão (*background*), o que permite sugerir que o composto foi internalizado, corroborando com os resultados mostrados na Figura 57.

Quando analisados em conjunto, os resultados de imagem apresentados permitem inferir que o complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina encontra-se dentro do microambiente celular, o que pode justificar os resultados bastante eficientes de morte celular relacionado à apoptose quando o composto é fotoestimulado, já que as espécies reativas formadas pelo composto podem ter suas biomoléculas alvos mais próximas do local de ação, potencializando este efeito.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os compostos rutênio-nitrosilo propostos para estudo neste trabalho foram isolados satisfatoriamente e se mostraram eficientes para a liberação de óxido nítrico. Entretanto, por se tratarem de sistemas distintos, houve diferença na eficiência da liberação de óxido nítrico pelas diferentes espécies, sendo dependentes do modo de estimulação.

Os métodos de caracterização utilizados para o novo complexo de rutênio-ftalocianina $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$ confirmaram a estrutura proposta. Além disso, pelos estudos fotoquímicos realizados, este composto é capaz de gerar oxigênio singuleto, uma característica importante para uso na TFD.

No sistema de complexos mononucleares de rutênio-nitrosilo, o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ apresentou atividade citotóxica contra células tumorais B16-F10, tornando-se mais eficiente nesta atividade quando encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Neste contexto, considerando a ação de compostos contendo rutênio, novas perspectivas também podem ser esperadas para as espécies rutênio-aquo, pois a ação citotóxica de $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ mostrou-se interessante em termos quimioterápicos.

O complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina apresentou atividade citotóxica contra as linhagens celulares tumorais Jurkat e B16-F10, causando perda de viabilidade celular em mais de 50 % na concentração de 0,4 μM e na dose de luz de 5 J/cm^2 . Não foi observado efeito citotóxico desta espécie, sem fotoestímulo na mesma concentração, no modelo de células não tumorais usadas como controle (L929). Este novo complexo ajusta-se à definição esperada para um protótipo a ser usado na Terapia Fotodinâmica: baixa citotoxicidade quando não se faz uso da luz, mas com atividade citotóxica evidente quando fotoestimulado na região da janela terapêutica, neste caso, em 660 nm. Além disso, mostrou-se uma espécie capaz de ser internalizada pelas células, com potencial de causar a morte celular de células tumorais por apoptose, após a TFD.

Os estudos relacionando aos efeitos de morte celular pelas espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio gerados pelo novo complexo trinuclear leva a crer que, de alguma maneira, o óxido nítrico liberado pelo composto possa sensibilizar as células dependendo da concentração intracelular do NO liberado. Estes resultados

vislumbram o uso em potencial de espécies que liberam tanto NO quanto $^1\text{O}_2$ como compostos a serem elucidados para aplicações clínicas em TFD.

Por fim, os resultados abrem perspectivas para inúmeras abordagens para o melhor entendimento de como estas espécies podem, de fato, estar agindo no ambiente celular. Uma vez compreendidas as características fotoquímicas e fotofísicas do novo complexo rutênio-ftalocianina, acredita-se que este trabalho de doutorado contribui para novas frentes de estudos quanto aos aspectos fotoquímicos e fotobiológicos de outros complexos rutênio-nitrosilo que possam contribuir para os efeitos bioquímicos das diferentes vias de morte celular de células tumorais.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, G.; FAHMY, R.H. Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 10, n. 1, p. 211-219, 2009.
- AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A.; FOSTER, T.H.; GIROTTI, A.W.; GOLLNICK, S.O.; HAHN, S.M.; HAMBLIN, M.R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B.C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J. Clin.**, v. 61, n. 4, p. 250-81, 2011.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Mol. Biol. of the Cell**. 4. ed. New York and London: Garland Science, 2002.
- ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium antimetastatic agents. **Curr. Top. Med.Chem.**, v. 4, n. 15, p. 1525-35, 2004.
- ALLEN, B.W.; DEMCHENKO, I.T.; PIANTADOSI, C.A. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. **J. Appl. Physiol**, v. 106, p. 662–667, 2009.
- ALLEN, C.M.; SHARMAN, W.M.; VAN LIER, J.E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **J. Porphyr. Phthal.**, v. 5, n. 2, p. 161-169, 2001.
- ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59-86, 2004.
- ANG, W.H.; DYSON, P.J. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. **Eur. J. Inorg. Chem.**, n. 20, p. 4003–4018, 2006.
- AYARU, L.; BOWN, S.G.; PEREIRA, S.P. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract carcinoma. **Int. J. Gastrointest. Cancer**, v. 35, n. 1, p. 1-13. 2005.
- BABILAS, P.; SCHREML, S.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.M. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photoderm. Photoim. Photom.**, v. 26, n. 3, 2010.
- BALDEA, I.; FILIP, A.G. Photodynamic therapy in melanoma - an update. **J. Physiol. Pharm.**, v. 63, n. 2, p. 109-118, 2012.

BATES, J.N.; BAKER, M.T.; GUERRA JR, R.; HARRISO, D.G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem. Pharm.**, v. 42, p. S157-S165, 1991.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M.; CAVALLI, R.; TROTTA, M. Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. **J. Microencap.**, v. 27, n. 1, p. 78–85, 2010.

BAYRAK, R.; AKCAY, H.T.; PISKIN, M.; DURMUS, M.; DEGIRMENCI OGLU, I. Azine-bridged binuclear metallophthalocyanines functioning photophysical and photochemical-responsive. **Dyes Pigm.**, v. 95, n. 2, p. 330-337, 2012.

BECKER, J. S. **Inorganic mass spectrometry: principles and applications**. Chichester, England; Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, 2007.

BENDHACK, L.M.; RODRIGUES, G.J.; DE LIMA, R.G.; MELO, M.C.; DA SILVA, R.S. Potential Hypotensive Compound Reduces Arterial Pressure Only in Hypertensive Rats. **J. Physiol. Sci.**, v. 59, p. 407-407, 2009.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.H.; BEIJNEN, J.H.; SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **J. Inorg. Biochem.**, v. 106, n. 1, p. 90-99, 2012.

BHOWMICK R.; GIROTTI A.W. Cytoprotective Signaling Associated with Nitric Oxide Upregulation in Tumor Cells Subjected to Photodynamic Therapy-like Oxidative Stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 57, p. 39–48, 2013.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharm.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; NETO, M.A.; VERCESI, J.A.; DE LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, n. 10, p. 1366-1374, 2009.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; NETO, M.A.; DE LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Endothelium modulates the vascular relaxation induced by the nitric oxide donor. **Basic Clin. Pharm. Toxic.**, v. 102, s. 1, p. 38-39, 2008.

- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide – Biol. Chem.**, v. 15, n. 4, p.387-394, 2006.
- BOZKULAK, O.; WONG, S.; LUNA, M.; FERRARIO, A.; RUCKER, N.; GULSOY, M.; GOMER, C.J. Multiple components of photodynamic therapy can phosphorylate akt. **Photochem. Photobiol.**, v. 83, n. 5, p. 1029-1033, 2007.
- BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resist. Update**, v. 9, n. 3, p. 111-22, 2006.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochem.**, v. 70, n. 2, p. 231-9, 2005.
- BRUSCINO, N.; ROSSI, R.; DINELLI, M.; GHERSETICH, I.; LOTTI, T. Therapeutic Hotline: Facial skin rejuvenation in a patient treated with photodynamic therapy for actinic keratosis. **Dermatol. Ther.**, v. 23, n. 1, p. 86-9, 2010.
- BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.
- CAINE, M.A.; MCCABE, R.W.; WANG, L.; BROWN, R.G.; HEPWORTH, J.D. The inhibition of triphenylmethane primary dye fading in carbonless copying paper systems by singlet oxygen quenching bis(dithiocarbamato)nickel(II) complexes. **Dyes and Pigm.**, v. 52, n. 1, p. 55-65, 2002.
- CALS-GRIERSON, M.M.; ORMEROD, A.D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide: Biol. Chem.**, v. 10, n. 4, p. 179-193, 2004.
- CARNEIRO, Z.A.; BIAZZOTTO, J.C.M.; POSTALLI, F.R.; DE LIMA, R.G.; CURTI, C.; DA ROCHA, Z.N.; PAULO, M.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A.C.; FORMIGA, A.L.B.; DA SILVA, R.S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex - A system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, n. 8, p. 1035-1043, 2011.
- CARNERO A.; BLANCO-APARICIO C.; RENNER O.; LINK W.; LEAL J.F. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 187-198, 2008.
- CHEN, Y.; SUBRAMANIAN, L.R.; FUJITSUKA, M.; ITO, O.; O'FLAHERTY, S.; BLAU, W.J.; SCHNEIDER, T.; DINI, D.; HANACK, M. Synthesis and optical limiting properties of axially bridged phthalocyanines: [(tBu₄PcGa)₂O] and [(tBu₄PcIn)₂O]. **Chemistry**, v.8, n. 18, p. 4248-54, 2002.

- CHENEY, R.P.; ARMOR, J.N. Reactivity of coordinated nitrosyls .6. Preparation, characterization, and reduction of nitrosylpentaaquoruthenium(³⁺) and reduction of various ruthenium ammine nitrosyls. **Inorg. Chem.**, v. 16, n. 12, p. 3338-3344, 1977.
- CHIANG, T.M.; SAYRE, R.M.; DOWDY, J.C.; WILKIN, N.K.; ROSENBERG, E.W. Sunscreen ingredients inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS): a possible biochemical explanation for the sunscreen melanoma controversy. **Melanoma Res.**, v. 15, n. 1, p. 3-6, 2005.
- CHUNG, H.T.; PAE, H.O.; CHOI, B.M., BILLIAR, T.R., KIM, Y.M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 282, n. 5, p. 1075-1079, 2001.
- CHUNG, J.; HONG, S.; CHOI, B.Y., CHO, H.; YU, E.; HEWITT, S.M. The Expression of Phospho-AKT, Phospho-mTOR, and PTEN in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. **Clin Cancer Res.**, v. 15, n. 2, p. 660-667, 2009.
- CICILLINI, S.A.; PRAZIAS, A.C.L.; TEDESCO, A.C., SERRA, O.A.; DA SILVA, R.S. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, n. 13, p. 2766-2770, 2009.
- COHEN, S.M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.11, n. 2, p. 115-20, 2007.
- COLLINS, P.; ROBINSON, D.J.; STRINGER, M.R.; STABLES, G.I.; SHEEHAN-DARE, R. A. The variable response of plaque psoriasis after a single treatment with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **Br. J. Dermatol.**, v. 137, p. 743–749, 1997.
- COLUCCI, R.; LOTTI, T.; MORETTI, S. Vitiligo: an update on current pharmacotherapy and future directions. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 13, n. 13, p. 1885-99, 2012.
- CRAWFORD, D.R.; DAVIES, K.J. Adaptive response and oxidative stress. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, n. 10, p. 25–28, 1994.
- CULOTTA, E.; KOSHLAND Jr., D.E. NO news is good news. **Science**, v. 18, n. 5090, p. 1862-1865, 1992.
- da ROCHA, Z.N.; de LIMA, R.G.; DORO, F.G.; TFOUNI, E.; da SILVA, R.S. Photochemical production of nitric oxide from a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex by irradiation with light in the phototherapeutic window. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 11, n. 7, p. 737-740, 2008.

da SILVA, R.S.; MARCHESI, M.S.P; KHIN, C.; LUNARDI, C.N.; BENDHACK, L.M.; FORD, P.C. Photoinduced electron transfer between the cationic complexes Ru(NH₃)₅pz(2+) and trans-RuCl([15]aneN(4))NO²⁺ mediated by phosphate ion: Visible light generation of nitric oxide for biological targets. **J. Phys. Chem. B**, v. 111, n. 24, p. 6962-6968, 2007.

DAVIDS, L.M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treat. Rev.**, v. 37, n. 6, p.465-475, 2011.

de GAITANI, C.M.; de MELO, M.C.C; LUNARDI, C.N.; OLIVEIRA, F.D.; da SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide – Biol. Chem.**, v. 20, n. 3, p. 195-199, 2009.

de LIMA R.G., SAUAIA M.G., BONAVENTURA D., TEDESCO A.C., LOPEZ R.F.V., BENDHACK L.M., DA SILVA R.S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 358, n. 9, p. 2643-2650, 2005.

de LIMA, R.G. **Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo [Ru(terpy)(L)NO]ⁿ⁺.** 2006. 259 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

de LIMA, R.G.; SAUAIA, M.G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L.M.; DA SILVA, R.S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO](3+) complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 359, n. 8, p. 2543-2549, 2006.

de LIMA, R.G.; SAUAIA, M.G.; FEREZIN, C.; PEPE, L.M.; JOSE, N.M.; BENDHACK, L.M.; DA ROCHA, Z.N.; DA SILVA, R.S. Photochemical and pharmacological aspects of nitric oxide release from some nitrosyl ruthenium complexes entrapped in sol-gel and silicone matrices. **Polyhedron**, v. 26, n. 16, p. 4620-4624, 2007.

de OLIVEIRA, A.R.M.; da FONSECA, P.; CURTI, C.; da SILVA, R.S.; BONATO, P.S. In vitro metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex [Ru(NH center dot NHq)(terpy)NO]⁽³⁺⁾ nitric oxide donor using rat microsomes. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 1, p. 14-19, 2009.

de SANTANA, D.C.; PUPO, T.T.; SAUAIA, M.G.; DA SILVA, R.S.; LOPEZ, R.F. Nitric oxide photorelease from hydrogels and from skin containing a nitro-ruthenium complex. **Int. J. Pharm.**, v. 391, n. 1-2, p. 21-28, 2010.

- DeROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coord. Chem. Rev.**, v. 233, p. 351-71, 2002.
- DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy: part II. **Sem. Surg. Oncol.**, v. 11, n. 5, p. 333-40, 1995.
- DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPP, K. R.; BOYLE, D.; MITTELMAN, A. Photoradiation therapy for treatment of malignant-tumors. **Cancer Res.**, v. 38, n. 8, p. 2628-33, 1978.
- DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors, **Critical Rev. Oncol./Hemat.**, v. 2, p. 83-90, 1984.
- DRAGO, R.S.; PAULIK, F.E. The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 82, n. 1, p. 96-98, 1960.
- DUMMIN, H.; CERNAY, T.; ZIMMERMANN, W.H. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II)phthalocyanines with lipophilic side-chains. **J. Photochem. Photobio. B: Biology**, v. 37, n. 3, p. 219-229, 1997.
- DURMUS, M.; NYOKONG, T. The synthesis, fluorescence behaviour and singlet oxygen studies of new water-soluble cationic gallium(III) phthalocyanines. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 10, p. 332–338, 2007.
- DWYER, F.P.; GOODWIN, H.A.; GYARFAS, E.C. Mono- And Bis-(2,2-Bipyridine) And (1,10-Phenanthroline) Chelates Of Ruthenium And Osmium .1. Monochelates Of Bivalent, Tervalent, And Quadrivalent Ruthenium. **Australian J. Chem.**, v. 16, n. 1, p. 42-&, 1963.
- ELAHI, M.M., NASEEM, K.M.; MATATA, B. M. Nitric oxide in blood - The nitrosativeoxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. **FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p. 906–923, 2007.
- EL-MOFTY, M.; MOSTAFA, W.; YOUSSEF, R.; EL-FANGARY, M.; ELRAMLY, A.Z.; MAHGOUB, D.; FAWZY, M. Ultraviolet A in vitiligo. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 22, n. 4, p. 214–216, 2006.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- ESPÓSITO, B.P.; NAJJAR, R. Interactions Of Antitumoral Platinum-Group Metallodrugs With Albumin. **Coord. Chem. Rev.**, v. 232, p. 137-149, 2002.

- FABRIS, C.; SONCIN, M.; MIOTTO, G.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; DEI, D.; RONCUCCI, G.; JORI, G. Zn(II)-phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 83, p. 48–54, 2006.
- FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330–349, 2012.
- FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. The surprising life of Nitric Oxide. **Chem. Engen. News**, v. 20, n. 51, p. 26-38, 1993.
- FEREZIN, C.Z.; OLIVEIRA, F.S.; DA SILVA, R.S.; SIMIONI, A.R.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L.M. The complex trans-[RuCl([15]aneN₄NO)]²⁺ induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 3, p. 170-175, 2005.
- FERREIRA, K.Q.; CARDOSO, L.N.; NIKOLAOU, S.; DA ROCHA, Z.N.; SILVA, R.S.; TFOUNI, E. Solvent dependent conformational isomerism and ligand oxidation of novel Ru(II) cyclen complexes. **Inorg. Chem.**, v. 44n. 16, p. 5544-5546, 2005.
- FINGAR, V.H.; WIEMAN, T.J.; PARK, Y.J.; HENDERSON, B.W. Implications of a pre-existing tumor hypoxic fraction on photodynamic therapy. **J. Surg. Res.**, v. 53, n. 5, p. 524-528, 1992.
- FORD, P.C.; BOURASSA, J.; MIRANDA, K.; LEE, B.; LORKOVIC, I.; BOGGS, S.; KUDO, S.; LAVERMAN, L. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coord. Chem. Rev.**, v. 171, p. 185-202, 1998.
- FRANK, S.; KÄMPFER, H.; WETZLER, C.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. **Kidney Int.**, v. 61, n. 3, p. 882-888, 2002.
- FREITAS, I.; BARONZIO, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 11, n. 1, p. 3-30, 1991.
- FRIEBOLIN, W.; SCHILLING, G.; ZOLLER, M.; AMTMANN, E. Antitumoral activity of non-platinum xanthate complexes. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 25, p. 7925-31, 2005.
- FRY, N.L.; MASCHARAK, P.K. Photoactive ruthenium nitrosyls as NO donors: how to sensitize them toward visible light. **Acc. Chem. Res.**, v. 44, n. 4, p. 289-98, 2011.

- FUKUTO, J.M.; CARRINGTON, S.J. HNO Signaling Mechanisms. **Antiox. Redox Signal.**, v. 14, n. 9, p. 1649-1657, 2011.
- FUKUTO, J.M.; JACKSON, M.I.; KALUDERCIC, N.; PAOLOCCI, N. Examining nitroxyl in biological systems. In: CADENAS, E.; PACKER, L. **Methods in Enzymology**. Nitric oxide, part F: Oxidative and nitrosative stress in redox regulation of cell signaling, v. 440, p. 411-431, 2008.
- GARIBYAN, L.; FISHER, D.E. How sunlight causes melanoma. **Cur. Oncol. Rep.**, v. 12, n. 5, p. 319-326, 2010.
- GODWIN, J.B.; MEYER, T.J. Preparation Of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine And 1,10-Phenanthroline. **Inor. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 471-&, 1971.
- GONZÁLEZ-CABELLO, A.; VÁZQUEZ, P.; TORRES, T.; GULDI, D. Highly Coupled Dyads Based on Phthalocyanine-Ruthenium(II) Tris(bipyridine) Complexes. Synthesis and photoinduced Processes. **J. Org. Chem.**, v. 68, p. 8635-8642, 2003.
- GORELSKY, S.I.; DA SILVA, S.C.; LEVER, A.B.P.; FRANCO, D.W. Electronic spectra of trans-[Ru(NH₃)₄(L)NO](3+/2+) complexes. **Inorg. Chim. Acta**, v. 300, p. 698-708, 2000.
- GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; JIANG, H.; SHORE, G.C.; McMANUS, B.M.; HUNT, D.W. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. **FEBS Lett.**, v. 437, p. 5–10, 1998.
- GULYAS, P.T; HUMBLEY, T. W.; LAY, P.A. The Crystal Structure of (2,2'-Bipyridine) (pyrazine) (2,2':6',2"- terpyridine) ruthenium(11) Hexafluorophosphate. **Aust. J. Chem.**, v. 49, p. 527-332, 1996.
- GUO, J.J.; WANG, S.R.; LI, X.G.; YUAN, M.Y. The synthesis, photophysical and thermal properties of novel 7-hydroxy-4-methylcoumarin tetrasubstituted metallophthalocyanines with axial chloride ligand. **Dyes and Pigm.**, v. 93, n. 1–3, p. 1463–1470, 2012.
- GUPTA, S.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. **Cancer Res.**, v. 58, n. 9, p. 1785-8, 1998.

- HAIL JR, N.; CARTER B.Z.; KONOPLAVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v.11, n.6, p. 889–904, 2006.
- HAJRA, K.M.; LIU, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691- 704, 2004.
- HANACK, M.; KAMENZIN, S.; KAMENZIN, C.; SUBRAMANIAN, L.R. Synthesis and properties of axially disubstituted monomeric and oligomeric phthalocyaninato ruthenium(II) compounds. **Synthetic Metals**, v. 110, n. 2, p. 93-103, 2000.
- HARTINGER, C.G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M.A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B.K. From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, n. 5-6, p. 891-904, 2006.
- HARTINGER, C.G.; PHILLIPS, A.D.; NAZAROV, A.A. Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, n. 21, p. 2688-2702, 2011.
- HEINRICH, T.A. **Avaliação de novos compostos metálicos com potencial ação citotóxica e antitumoral**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- HEINRICH, T.A.; VON POELHSITZ, G.; REIS, R.I.; CASTELLANO, E.E.; NEVES, A.; LANZNASTER, M.; MACHADO, S.P.; BATISTA, A.A.; COSTA-NETO, C.M. A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 9, p. 3616-3622, 2011.
- HENDERSON, B.W.; FINGAR, V.H. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. **Photochem. Photobiol.**, v. 49, n. 3, p. 299-304, 1989.
- HEROLD, S.; KOPPENOL, W.H. Peroxynitritometal complexes. **Coord. Chem. Rev.**, v. 249, n. 3-4, p. 499-506, 2005.
- HILF, R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 39, n. 1, p. 85-9, 2007.

HINTZE, R.E.; FORD, P.C. Photochemical Reaction Pathways Of Ruthenium(II) Complexes - Ultraviolet-Irradiation Of Pyridine Complex Ru(NH₃)₅py²⁺. **Inorg. Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1211-1213, 1975.

HOFSETH, L.J.; SAITO, S.; HUSSAIN, S.P.; ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; ARAKI, Y.; JHAPPAN, C.; HIGASHIMOTO, Y.; HE, P.; LINKE, S.P.; QUEZADO, M.M.; ZURER, I.; ROTTER, V.; WINK, D.A.; APPELLA, E.; HARRIS, C.C. Nitric Oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 1, p. 143-8, 2003.

HOU, X.M.; ZHANG, X.H.; WEI, K.J.; JI, C.; DOU, S.X.; WANG, W.C.; LI, M.; WANG, P.Y. Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 5, p. 1400-1410, 2009.

HSIEH, Y.J.; WU, C.C.; CHANG, C.J.; YU, J.S. Subcellular localization of Photofrin (R) determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. **J. Cell. Phys.**, v. 194, n. 3, p. 363-375, 2003.

HUERTA, S.; CHILKA, S.; BONAVIDA, B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). **Intern. J. Oncol.**, v. 33, n. 5, p. 909-927, 2008.

IGNARRO, L.J. **Nitric Oxide: Biology and Patobiology**, San Diego, California, U.S.A., 1. Ed., Academic Press, 2000.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2013. Câncer de pele tipo melanoma. Disponível em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_meloma>. Acesso em: 5 fev 2013.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2012. Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 15 jan 2012.

IOANNIDIS, I; BATZ M.; PAUL, T.; KORTH, H.; SUSTMANN, R.; DE GROOT, H. Enhanced release of nitric oxide causes increased cytotoxicity of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and sodium nitroprusside under hypoxic conditions. **Biochem. J.**, v. 318, p. 789-795, 1996.

IQBAL, M.A.; MD, S.; SAHNI, J.K.; BABOOTA, S.; DANG, S.; ALI, J. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. **J. Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 813-830, 2012.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). A.D. McNAUGHT, A.D.; WILKINSON, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Disponível em:<<http://www.iupac.org/goldbook/C01203.pdf>>. Acesso em: 19 fev 2013.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). A.D. McNAUGHT, A.D.; WILKINSON, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Disponível em:<<http://goldbook.iupac.org/Q04991.html>>. Acesso em: 4 nov 2012.

JAKUPEC M.A., GALANSKI M., KEPPLER B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 146, p. 1-5, 2003.

JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 9, p. :2467-98, 1999.

JEANNIN, J.F.; LEON, L.; CORDER, M.; SASSI, N.; PAUL, C.; BETTAIEB, A. Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 19, n. 2, p. 158-163, 2008.

JORES, K.; HABERLAND, A.; WATEWING, S.; MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorimetry and raman spectroscopy, **Prar. Res.**, v.22, n. 11, p.1887-1897, 2005.

KALUDEROVIĆ, G.N.; PASCHKE, R. Anticancer metallotherapeutics in preclinical development. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 31, p. 4738-4752, 2011.

KANG, R.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T.; TANG, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 18, n. 4, p. 571-580, 2011.

KESSEL, D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. **J. Porph. Phthaloc.**, v. 8, p. 1009-1014, 2004.

KESSEL, D. Subcellular Targets for Photodynamic Therapy: Implications for Initiation of Apoptosis and Autophagy. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, v. 10, p. S-56-S-59, 2012.

KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 42, p. 89–95, 1998.

- KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 28–35, 1999.
- KOBEL, W; HANACK, M. Bis axially coordinated (phthalocyaninato)ruthenium(II) compounds. **Inorg. Chem.**, v. 25, n. 1, p. 103–107, 1986.
- KOJIMA, H; NAKATSUBO, N; KIKUCHI, K; URANO, Y; HIGUCHI, T; TANAKA, J; KUDO, Y; NAGANO, T. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport.**, v. 9, n. 15, p. 3345–3348, 1998.
- KOVALEVA, V.D.; BEREZHNAIA, E.V.; KOMANDIROV, M.A.; RUDKOVSII, M.V., UZDENSKY, A.B. Involvement of nitric oxide in photodynamic injury of neurons and glial cells. **Nitric Oxide**, v. 29, p. 46–52, 2013.
- KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection - How, why, when, and where? **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 1, n. 2, p. 107-120, 1997.
- KUDO, S.; BOURASSA, J.L.; BOGGS, S.E.; SATO, Y.; FORD, P.C. *In situ* nitric oxide (NO) measurement by modified electrodes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes. **Anal. Biochem.**. v. 247, n. 2, p. 193-202, 1997.
- LAKE, B.G. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: Biochemical Toxicology – a practical approach. **Oxford, IRL Press**, cap. 8, p. 183-215, 1987.
- LAVAL, F.; WINK, D.A.; LAVAL, J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 131, p. 175-91, 1997.
- LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. **Biochem. J.**, v. 441, p. 523-540, 2012.
- LIPPARD, S.J.; BERG, J.M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**. University Science Books, 1994.
- LIU, J.; HE, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **Intern. J Pharm.**, v.328, n. 2, p. 191-195, 2007.
- LU, Y.; CEDERBAUM, A.I. Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1. **Toxicol. Scie.**, v. 89, n. 2, p. 515–523, 2006.

LUNARDI, C.N.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 1, Jan. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2009000100013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 Fev. 2013.

LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)2(NO)](PF6) is due to activation of K-Ca by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharm.**, v. 47, n. 2-3, p. 139-144, 2007.

LUO, J.D.; CHEN, A.F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26, n. 3, p. 259-64, 2005.

MacDonald, I.J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **J. Porph. Phthal.**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000200015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 Fev. 2013.

MACK, J.; STILLMAN, J.M. Electronic Structures of Metal Phthalocyanine and Porphyrin complexes from Analysis of the UV-Visible absorption and magnetic nuclear dichroism spectra and molecular orbital calculations. In: KADISH, K.M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. **The Porphyrin Hadbook**. Phthalocyanines: Spectroscopy and electrochemical Characterization, v. 16, 1. ed., San Diego: Elsevier Science, 2003.

MARANHO, D.S.; DE LIMA, R.G.; PRIMO, F.L.; DA SILVA, R.S.; TEDESCO A.C. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from ZnPC liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: synergistic effects in photodynamic therapy application. **Photochem. Photobiol.**, v. 85, p. 705–713, 2009.

MARCHESI, M.S.P. **Aspectos químicos e fotoquímicos de liberação controlada de óxido nítrico a partir de complexos nitrosilos de rutênio: ensaios farmacológicos e de citotoxicidade**. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; SANTANA, D.C.D.; TAVEIRA, S.F.; VERMEULEN, D.M.; de OLIVEIRA, A.R.M.; da SILVA, R.S.; LOPEZ, R.F.V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 53, n. 4, p. 843–851, 2010.

MENDES, G.L.Q.; KOIFMAN, R.J.; KOIFMAN, S. Mortality Frequency and Trends Attributed to Melanoma in Brazil from 1980-2005. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 73, n. 13-14, p. 850-7, 2010.

MIGLIETTA, A.; CAVALLI, R.; BOCCA, C.; GABRIEL, L.; GASCO, M. R. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin ar paclitaxel. **Int. J. Pharm.**, v. 210, n. 1-2, p. 61-67, 2000.

MILLER, L.J.; MARX, J. Apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1301, 1998.

MONCADA, S.; BOLANOS, J.P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration, **J. Neurochem.**, v. 97, n. 6, p. 1676–1689, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharm. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B – Biology**, v. 57, n. 1, p. 1-13, 2000.

MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standardisation by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. **Analyst**, v. 125, p. 1629-32, 2000.

MORZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G.B.; HAMBLIN, M.R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancer**, v. 3, p. 2516-2539, 2011.

MOSEROVA, I.; KRALOVA, J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immuno. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUDIGONDA T; DABADE T.S.; FELDMAN S.R. A review of targeted ultraviolet B phototherapy for psoriasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 66, n. 4, p. 664-72, 2012.

MUIJSERS, R.B.; TEN HACKEN, N.H.; VAN ARK, I.; FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P.; POSTMA, D.S. L-Arginine is not the limiting factor for nitric oxide synthesis by human alveolar macrophages in vitro. **Eur. Respir. J.**, v. 18, n. 4, p. 667-71, 2001.

- MULLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J Pharm. Biopharm.*, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.
- NAGAO, H.; ITO, K.; TSUBOYA, N.; OYAMA, D.; NAGAO, N.; HOWELL, F.S.; MUKAIDA M. Evidence for a new nitrosyl-to-nitro reaction and an acetamide formation in the {RuNO}(6)-type complex, cis-[Ru(NO)(CH₃CN)(bpy)(2)]³⁺. *Inorg. Chim. Acta*, v. 290, n. 1, p. 113-9, 1999.
- NAVA, H.R.; ALLAMANENI, S.S.; DOUGHERTY, T.J.; COOPER, M.T.; TAN, W.; WILDING, G.; HENDERSON, B.W. Photodynamic therapy (PDT) using HPPH for the treatment of precancerous lesions associated with barrett's esophagus. *Lasers Surg Med.*, v. 43, n. 7, p. 705-12, 2011.
- NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 26, n. 3, p. 387-399, 2001.
- NIST Mass Spec Data Center, in NIST ChemistryWebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, P. J. Linstrom and W. G. Mallard (Eds.) (2003), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. Disponível em:<<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C14320048&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>>. Acesso em: 2 mar 2011.
- NOMBONA, N. **Photophysical and photodynamic studies of Phthalocyanines conjugated to selected drug delivery agents.** 257 f. Thesis (Doctor of Philosophy). Rhodes University. 2012a.
- NOMBONA, N.; MADURAY, K.; ANTUNES, E.; KARSTEN, A.; NYOKONG, T. Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, v. 107, p. 35–44, 2012b.
- NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOŁAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim. Pol.*, v. 52, n. 2, p. 339-52, 2005.
- NUCLEUS MEDICAL MEDIA. Types for melanoma. Disponível em: <<http://catalog.nucleusmedicalmedia.com/chooseexhibit.php?A=2&I=2&TL=5889&ExhibitKeywords=melanoma&Action=Search>>. Acesso em: 18 ago 2010.
- NYOKONG, T. Desired properties of new phthalocyanines for photodynamic therapy. *Pure Appl. Chem.*, v. 83, n. 9, p. 1763–1779, 2011.

- OCHSNER, M. Light scattering of human skin: A comparison between zinc(II)—phthalocyanine and photofrin II®. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 32, n. 1-2, p. 3-9, 1996.
- OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M.; MULLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **J. Control. Release**, v.77, n.3, p.345-355, 2001.
- OLIVEIRA, F.S.; TOGNIOLLO, V.; PUPO, T.T.; TEDESCO, A.C.; SILVA, R.S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. **Inor. Chem. Comm.**, v. 7, n. 2, p.160-164, 2004.
- OLIVEIRA, F.D.; FERREIRA, K.Q.; BONAVENTURA, D.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A.C.; MACHADO, S.D.; TFOUNI, E.; DA SILVA, R.S. The macrocyclic effect and vasodilation response based on the photoinduced nitric oxide release from trans-[RuCl(tetraazamacrocycle)NO]⁽²⁺⁾. **J. Inorg. Biochem.**, v.101, n. 2, p. 313-320, 2007.
- OTT, I.; GUST, R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. **Arch. Pharm.**, v. 340, n. 3, p. 117-26, 2007.
- PAOLINO, D.; VENTURA, C.; NISTICO, S.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. **Intern. J. Pharm.**, v. 244, n. 1-2, p. 21-31, 2002.
- PATTANI, A.S.; MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development and comparative antimicrobial evaluation of lipid nanoparticles and nanoemulsion of Polymyxin B. **J. Nanosci. Nanotech.**, v. 6, n. 9-10, p. 2986-2990, 2006.
- PAULO, P.M.R.; COSTA, S.M.B. Single-Molecule Fluorescence of a Phthalocyanine in PAMAM Dendrimers Reveals Intensity-Lifetime Fluctuations from Quenching Dynamics. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, n. 44, 2010.
- PESTANA, C.R.; PHELIPPIN, D.P.S.; POLIZELLO, A.C.M.; DORTA, D.J.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A.C.; DORO, F.; RODRIGUES, F. P.; TFOUNI, E.; CURTI, C. Effects on mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. **Nitric Oxide. Biol. Chem.**, v. 20, p. 24-30, 2009.
- PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

- PRICE, M.; TERLECKY, S.R.; KESSEL, D. A Role for Hydrogen Peroxide in the Pro-apoptotic Effects of Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 85, n. 6, p. 1491-1496, 2009.
- QUON, H.; GROSSMAN, C.E.; FINLAY, J.C.; ZHU, T.C.; CLEMMENS, C.S.; MALLOY, K. M.; BUSCH, T. M. Photodynamic therapy in the management of premalignant head and neck mucosal dysplasia and microinvasive carcinoma. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, v. 8, n. 2, p. 75-85, 2011.
- RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; VAN DEN BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clin. Cancer. Res.**, v. 10, n. 11, p. 3717-27, 2004.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- REEVES, K.J.; REED, M.W.R.; BROWN, N.J. Is nitric oxide important in photodynamic therapy? **J Photochem. Photobiol. B – Biology**, v. 95, n. 3, p. 141-147, 2009.
- RICHTER-ADDO, G.B.; LEGZDINS, P. **Metal Nitrosyls**. Nova Iorque, Oxford University Press, Inc., 1992.
- RIDDLE, C.C.; TERRELL, S.N.; MENSER, M.B.; AIRES, D.J.; SCHWEIGER, E.S. A review of photodynamic therapy (PDT) for the treatment of acne vulgaris. **J. Drugs Dermatol.**, v. 8, n. 11, p. 1010-1019, 2009.
- RIDNOUR, L.A.; THOMAS, D.D.; SWITZER, C.; FLORES-SANTANA, W.; ISENBERG, J.S.; AMBS, S.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 73-6, 2008.
- ROBERTS, P.J.; DER, C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291-310, 2007.
- ROBERTSON, C.A.; EVANS, D.H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem. Photobiol. B.**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.
- RODRIGUES; G.J.; LUNARDI, C.N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C.X.; LAURINDO, F.R.M.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 18, n. 3, p. 176-183, 2008.

ROSENBERG, B.; VANCAMP L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-9, 1965.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 60, n. 2, 2008. Disponível em <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000200024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 fev 2013.

RUCKMANI, K.; SIVAKUMAR, M.; GENESHKUMAR, P. A. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma, **J. Nanosci. Nanotech.**, v. 6, n. 9-10, p. 2991-2995, 2006.

SANABRIA, L.M.; RODRÍGUEZ, M.E.; COGNO, I.S.; VITTAR, N.B.R.; PANSA, M.F.; LAMBERTI, M.J.; RIVAROLA, V.A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1835, n. 1, p. 36-45, 2013.

SAUAIA, M.G.; DE LIMA, R.G.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.S. Nitric oxide production by visible light irradiation of aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. **Inorg. Chem.**, v. 44, n. 26, p. 9946-9951, 2005b.

SAUAIA, M.G.; DA SILVA, R.S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Trans. Metal Chem.**, v. 28, n. 3, p. 254-259, 2003.

SAUAIA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; DE LIMA, R.G.; CACCIARI, A.L.; TFOUNI, E.; DA SILVA R.S. Syntheses, characterization and photochemical properties of new NO center dot-ruthenium(II) complexes. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 8, n. 4, p. 347-349, 2005a.

SAUAIA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; TEDESCO, A.C.; SILVA R.S. Control of NO release by light irradiation from nitrosyl-ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Inorg. Chim. Acta**, v. 355, p. 191–196, 2003.

SAVA, G.; CAPOZZI, I.; CLERICI, K.; GAGLIARDI, G.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 16, n. 4, p. 371-9, 1998.

SCOTT, L.E.; ORVIG, C. Medicinal inorganic chemistry approaches to passivation and removal of aberrant metal ions in disease. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 10, p. 4885-910, 2009.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.J.; YACOB, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; McDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SPETOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **J. Pharm. Sciences.**, v.81, n.3, p. 309-312, 1992.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SILVA, A.; YUNES, J.A.; CARDOSO, B.A.; MARTINS, L.R.; JOTTA, P.Y.; ABECASIS, M.; NOWILL, A.E.; LESLIE, N.R.; CARDOSO, A.A.; BARATA, J.T. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 11, p. 3762-3774, 2008.

SKULACHEV, V.P. Phenoptosis: Programmed death of an organism. **Biochem.-Moscow**, v. 64, n.12, p. 1418-1426, 1999.

SLOCIK, J.M.; SOMAYAJULA, K.V.; SHEPHERD, R.E. Electrospray mass spectrometry of trans-[Ru(NO)Cl(dpaH)₂]²⁺ (dpaH=2,2-dipyridylamine) and 'caged NO', [RuCl₃(NO)(H₂O)₂]:loss of HCl and NO from positive ions versus NO and Cl from negative ions. **Inor. Chim. Acta**, v. 320, p. 148–158, 2001.

SMITH, J.N.; DASGUPTA, T.P. Mechanism of Nitric Oxide Release. I. Two-electron Reduction of Sodium Nitroprusside by L-cysteine in Aqueous Solution. **Inorg. Reac. Mech.**, v, 3, n. 3, p. 181-195, 2002.

SRISOOK, K.; JUNG, N.H.; KIM, B.R.; CHA, S.H.; KIM, H.S.; CHA, Y.N. Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotective effect by NO on cadmium-induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. **Toxic. In vitro**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2005.

STEIN, K.R.; PEARCE, D.J.; FELDMAN, S.R. Targeted UV therapy in the treatment of psoriasis. **J. Dermatolog. Treat.**, v. 19, p. 141–145, 2008.

SUBEDI, R.K.; KANG, K.W.; CHOI, H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **Eur. J. Pharm. Scie.**, v. 37, n. 3-4, p. 508–513, 2009.

SUZUKI, T.; NAGAE, O.; KATO, Y.; NAKAGAWA, H.; FUKUHARA, H.; MIYATA, N. Photoinduced nitric oxide release from nitrobenzene derivatives. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, p. 1720–11726, 2005.

TADA, D.; VONO, L.L.R.; DUARTE, E.L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P.K.; BAPTISTA, M.S.; ROSSI, L.M. Methylene blue-containing silica coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 23, n. 15, p. 8194-8199, 2007.

TAN S.J.; YAN Y.K.; LEE P.P.; LIM K.H. Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. **Future Med. Chem.**, v. 2, v. 10, p. 1591-1608, 2010.

TAUB, A.F. Photodynamic therapy: other uses. Review. **Derm. Clin.** v. 25, n. 1, p. 101-9, 2007.

TEDESCO, A.C.; ROTTA, J.C.G.; LUNARDI, C.N. Synthesis, Photophysical and Photochemical aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Curr. Org. Chem.** v. 7, p. 187-196, 2003.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; MUELLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC) - Effects of formulation parameters on physicochemical stability. **Inter. J. Pharm.**, v. 340, n. 1-2, p. 198-206, 2007.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MUELLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). **J. Microencap.**, v. 25, n. 2, p. 111-120, 2008.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.R.; FRANCO, D.W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coord. Chem. Rev.**, v. 236, n. 1-2, p. 57-69, 2003.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D.R.; TAVARES, A.; GOMES, A.J.; FIGUEIREDO, L.E.; FRANCO, D.W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.

THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG J.S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C.H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C., PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C.A.; HARRIS, C.C.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, n. 1, p. 18-31, 2008.

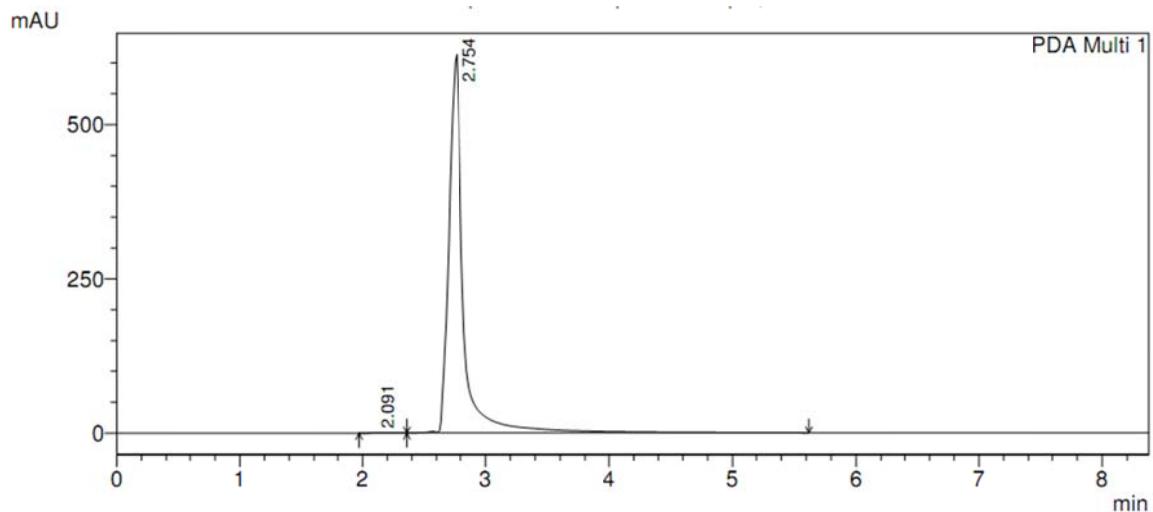
TOLEDO JR, J.C.; AUGUSTO O. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. **Chem. Res. Tox.**, v. 25, p. 975-989, 2012.

TONG, Z.; SINGH, G.; RAINBOW, A.J. Sustained activation of the extracellular signal regulated kinase pathway protects cells from Photofrin-mediated photodynamic therapy. **Cancer Res.**, n. 62, p. 5528– 5535, 2002.

- UZDENSKY, A.B. Signal transduction and photodynamic therapy. **Curr. Signal Trans. Therapy**, v. 3, n. 1, p.55-74, 2008.
- VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 4, p. 214-23, 2002.
- VAN RIJT, S.H.; SADLER, P.J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug. Discov. Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009.
- VARNES, M.E.; CHIU, S.M.; XUE, L.Y.; OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, p. 673–679, 1999.
- VAUPEL, P.; KELLEHER, D.K.; HÖCKEL, M. Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. **Sem. Oncol.**, v. 28, s. 8, p. 29-35, 2001.
- WAHL, M.L.; OWEN, J.A.; BURD, R.; HERLANDS, R.A.; NOGAMI, S.S.; RODECK, U.; BERD, D.; LEEPER, D.B; OWEN, C.S. Regulation of intracellular pH in human melanoma: Potential therapeutic implications. **Mol. Cancer Ther.**, v. 1, n. 8, p. 617-628, 2002.
- WELLER, R. Nitric Oxide: a key mediator in cutaneous physiology. **Clin Exp Dermatol.**, v. 28, n. 5, p.511-514, 2003.
- WINK D.A.; MITCHELL J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 25 n. 4-5, p. 434-456, 1998.
- WINK, D. A.; RIDNOUR L. A.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. The reemergence of nitric oxide and cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 65-67, 2008.
- WINK, D.A.; HANBAUER, I.; KRISHNA, M.C.; DEGRAFF, W.; GAMSON, J.; MITCHELL, J.B. Nitric-Oxide protects against cellular-damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. 21, p. 9813-9817, 1993.
- WINK, D.A.; LAVAL, J. The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2125-9, 1994.

- WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **Am. J. Surg.**, v. 183, n. 4, p. 406-12, 2002.
- WOJTKOWIAK, J.W.; ROTHBERG, J.M.; KUMAR, V.; SCHRAMM, K.J.; HALLER, E.; PROEMSEY, J.B.; LLOYD, M.C.; SLOANE, B.F.; GILLIES, R.J. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. **Cancer Res.**, v. 72, n. 16, p. 3938-3947, 2012.
- WONG, H.L., BENDAYAN, R., RAUTH, A.M., WU, X.Y. Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers. **J. Pharm. Scie.**, v. 93, n. 8, p. 1993-2008, 2004.
- XUE, L.Y.; HE, J.; OLEINICK, N.L. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by stress kinases. **Cell Death Differ.**, v. 6, n. 9, p. 855-864, 1999.
- YOO, J.O.; HA, K.S. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, v. 295, p. 139-74, 2012.
- YSLAS, E.I.; MILLA, L.N.; ROMANINI, S.; DURANTINI, E.N.; BERTUZZI, M.; RIVAROLA, V.A. Comparative photodynamic therapy study using two phthalocyanine derivatives. **Exp. Ther. Med.**, v. 1, n. 4, p. 713-718, 2010.
- YU, D.E.; KIKUCHI, A.; TAKETSUGU, T.; INABE, T. Crystal Structure of Ruthenium Phthalocyanine with Diaxial Monoatomic Ligand: Bis(Triphenylphosphine)Iminium Dichloro(Phthalocyaninato(2-))Ruthenium(III). **J. Chem.**, p. 6, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/486318>>. Acesso em: 1 fev 2013.
- YUE, X.; YANEZ, C.O.; YAO, S.; BELFIELD, K.D. Selective Cell Death by Photochemically Induced pH Imbalance in Cancer Cells. **J. Am. Chem. Soc.**, 2013. In press.
- ZHOU, H.; HUANG, L.; SUN, Y.; RIGAS, B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits the growth of pancreatic cancer cells through redox-dependent signaling. **Cancer Lett.**, v. 273, n. 2, p. 292-299, 2008.
- ZHUANG, S.; KOCHEVAR, I.E. Singlet oxygen-induced activation of Akt/protein kinase B is independent of growth factor receptors. **Photochem. Photobiol.**, v. 78, p. 361–371, 2003.

Apêndices

APÊNDICES**APÊNDICE A – Cromatograma do complexo *cis*-[Ru(NO⁺)(bpy)₂(pz)](PF₆)₂.**

Cromatograma do complexo *cis*-[Ru(NO⁺)(bpy)₂(pz)](PF₆)₂. Condições cromatográficas: Fase móvel: solução tampão fosfato salina, pH 7,4. Detecção em 285 nm. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL.

APÊNDICE B – Avaliação da atividade citotóxica do complexo *cis*-[Ru(NO⁺)(bpy)₂(pz)](PF₆)₂ em células de melanoma murino (B16-F10)

