UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para
terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos**

Laísa Bonafim Negri

RIBEIRÃO PRETO
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para
terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientada: Laísa Bonafim Negri

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

RIBEIRÃO PRETO
2015

NEGRI, L. B.	Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos		MESTRADO FCFRPUSP 2015
--------------	---	--	------------------------------

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.

Negri, Laísa Bonafim

Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos

148p. 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Física e Química Biológica

Orientador: da Silva, Roberto Santana .

1. Rutênio-ftalocianina. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Oxigênio singleto. 4. Óxido nítrico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laísa Bonafim Negri

Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Física e Química
Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da
Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus, por mais esta caminhada!

Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

*À minha mãe, Rosana Negri,
Pela força e coragem.
Ao meu pai, Luiz Carlos Negri,
Pela honra e saudade.
Com todo carinho, aos meus queridos pais,
Pela compreensão e apoio incondicional
Pela essência que sou e por tudo que alcancei.
Por mais uma batalha vencida,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e À Nossa Senhora que estiveram à frente de mais esta caminhada, abrindo portas e portões, me conduzindo e me guiando em todos os momentos.

Aos meus pais, Luiz Carlos Negri (em memória) e Rosana Ap. Bonafim Negri. Por sempre apoiarem minha trajetória com carinho e incentivo nos momentos mais difíceis, e com alegria nos momentos vitoriosos. Por me ensinarem a ter respeito e agir com dignidade em todos os momentos. Não tenho palavras pra agradecer tamanha força e coragem que me deram para sempre seguir em frente, pensar alto, lutar e conquistar os meus sonhos. Esta obra é mais um pedaço do meu sonho e da minha trajetória. Cabe a vocês todos os meus passos e dedico a vocês todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão Luiz Carlos Negri e minha cunhada Gheisa Negri. Por estarem presentes em todos os momentos, torcendo pelo meu sucesso. Por terem me dado o meu maior presente, meu afilhado Lucas, que traz em toda a inocência de uma criança, o brilho e a alegria para seguir em frente, me fazendo aprender e crescer todos os dias. E agora mais um anjinho a caminho, para encher meu coração de alegria e amor.

A todos os meus familiares que contribuíram de alguma forma. Por me darem força e torcerem por mim. Agradeço em especial à Tia Eliana e Tia Dinha, minhas madrinhas do coração. À Tia Estela pela paciência e disponibilidade em todos os momentos de dúvidas sobre a língua portuguesa.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva pela oportunidade concedida, confiança e paciência desde os tempos de iniciação científica. Por todo o meu aprendizado e entusiasmo para o amadurecimento científico. Por ser uma pessoa ímpar, um líder como poucos, que sabe orientar, motivar e ensinar que o caráter é a verdadeira plataforma para o sucesso pessoal e profissional. Agradeço pela honra de poder aprender a ciência com aquele que tem verdadeira paixão por ela. Que um dia eu possa transmitir o conhecimento com a mesma essência que me foi doutrinada. Ao “chefe”, todo meu respeito, admiração e eterna gratidão.

Aos amigos de laboratório do grupo do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e do grupo da Profa. Dra. Sofia Nikolaou, Alexia, Ana Gaspari, Bruna Possato, Camila Fontes, Fabiana de Oliveira, Felipe Reis, Fernando Postalli, Jacqueline Querino, Jorge Nasser, Joicy Santamalvina, Juliana Moraes, Juliana Uzuelli, Clóvis Junior, Leandro Máximo, Lilian Franco, Loyanne Ramos, Mariete Moreira, Natcha Cacita, Natalia Levin, Renatinha, Renata Galvão, Simone Ciccilini, Tássia Joi e Tassiele Heinrich. Sem duvida alguma, são muito mais que companheiros de trabalho, são como uma família, que eu convivo a maior parte do meu dia, e que eu quero ter sempre por perto. Obrigada por me ensinarem tanta química, pelas discussões científicas, pelos momentos de risada e por me ajudarem tanto para o desenvolvimento deste trabalho. Eu não tenho palavras para agradecer e para dizer o quanto vocês foram importantes pra mim durante o meu mestrado. Sinto-me abençoada por trabalhar com pessoas que estão dispostas a ajudar todos os dias, tornando o ambiente de trabalho ainda mais prazeroso.

À queridíssima amiga e “mãe”, Juliana Biazotto, que me acolheu desde o primeiro momento que comecei a trabalhar no laboratório ainda como iniciação científica.

Um agradecimento especial à amiga doutoranda, Tassia Joi Martins, que contribuiu em todas as etapas no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todo o meu aprendizado sobre a química de ftalocianinas, por todos os momentos no laboratório que muitas vezes pareciam não ter fim, por me acompanhar na maioria dos experimentos, pela força de quando eles não davam certo, pelos momentos de risada, de estudo, de seminários, de congressos e pela paciência de quando as coisas se tornaram tão difíceis pra mim. Agradeço enfim, pela amizade e pela parceria de sucesso.

Ao Professor Dr. Kleber Thiago de Oliveira, pelas contribuições no exame de Qualificação, pelas valiosas discussões e por ter disponibilizado seu laboratório, na Universidade Federal de São Carlos, para diversos experimentos realizados neste trabalho. Sou muito grata por esta oportunidade, que foi bastante enriquecedora para o meu aprendizado. Agradeço em especial ao aluno de doutorado Nicholas Gobo, ao qual sou extremamente grata por tudo que me ensinou, pela amizade, atenção e, principalmente, pela paciência!

Às minhas amigas de infância, Fernanda, Giovanna, Marília (afilhada querida) e Pauline. Às minhas queridas Mari Arieta, Beatriz Mantovanini, Carol Bustamante (afilhada querida), Ana Livia, Jéssica, Marina Silveira, Fernanda Nasser e Luisa Rigitano. Às minhas eternas amigas de faculdade, Carol Guerreiro, Janaína, Maria Carolina, Trícia, Paula Valim, Rafaella M., Luana, Gisely e Gabi. Por estarem presentes em todos os momentos, alegres e tristes, e que muito torcem pelo meu sucesso, mesmo que de longe. A todas minhas amigas de Bauru e Ribeirão Preto que de alguma forma participaram de forma positiva para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da grande família Jabuti e Quelônias. Por estarem sempre presentes na minha vida, me acolhendo como irmãos. Por todas as risadas e momentos de descontração.

Às Professoras Dra. Yara Maria Lucisano Valim e Dra. Marilda das Dores Assis por levantarem questões pertinentes no exame de Qualificação que contribuíram muito para o desenvolvimento e enriquecimento do trabalho.

À Profa. Dra. Sofia Nikolaou pela sua disponibilidade e por contribuir com seu conhecimento científico para o progresso do meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes por disponibilizar equipamentos do laboratório de Química Orgânica e pelas discussões científicas que muito contribuíram para melhor entendimento dos resultados.

À Profa. Dra. Rose Naal, e ao Prof. Dr. Zeki Naal, pelo primeiro contato que tive com a química durante a graduação, fazendo com que eu me encantasse por ela. Agradeço também pelos momentos de distração e conversas no corredor.

A todos os Técnicos de Laboratório pela paciência e disposição. José Carlos Thomaz e Jacqueline Mendonça pelas análises por espectrometria de massas. Às técnicas e amigas Laila e Maria Perpétua pelos cafés de todos os dias e momentos de distração.

Aos profissionais da Sessão de Pós-graduação pela paciência e atenção. À FAPESP, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...”*

*Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

NEGRI, L. B. **Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos.** 2015. 148p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Síntese, aspectos estruturais, propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotoindução para avaliação citotóxica *in vitro* de derivados de [Ru (Pc)] (PC = ftalocianina) são descritos neste trabalho. O desenvolvimento ftalocianinas utilizando anéis macrocíclicos, substituídos e não substituídos simetricamente, coordenados com o centro metálico de rutênio permitiu a obtenção de diferentes compostos. Coordenação de ligantes derivados de óxido nítrico (NO) na posição axial do rutênio (II) permitiu obter [Ru(NO)(Pc)(NO₂)], um complexo liberador de NO quando submetido ao processo de redução. Os complexos foram caracterizados por FTIR, UV-Vis, ¹H RMN e espectrometria de massas. As propriedades fotoquímicas de complexos como ftalocianinas de rutênio (II) têm sido investigadas por fotólise a laser em diferentes comprimentos de onda. Na irradiação de luz em 660 nm em solução aquosa aerada, observamos o fotoprocessos com a produção de oxigênio singlete. Pode-se observar a relação do rendimento quântico de oxigênio singlete e dos fotossensibilizadores utilizados para sua produção. O oxigênio singlete para [Ru (Pc-R)] segue a ordem [Ru(Pc)] > [Ru (Pc-DCBz)] > [Ru(Pc-DMX)] com DCBz = ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico e DMX = 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi) ftalonitrilo. Estudos fotobiológicos são destacados com particular enfoque na irradiação de luz em 660 nm com interesse para aplicações de terapia fotodinâmica (TFD). Neste contexto, temos também a avaliação citotóxica em linhagens de células B16F10 do efeito sinérgico entre NO e oxigênio singlete quando comparado ao complexo [Ru(Pc)], um composto que é apenas produtor de oxigênio singlete. O NO parece potencializar a ação de oxigênio singlete uma vez que em ensaios de viabilidade celular, o complexo [Ru(NO)(Pc)(NO₂)] é pelo menos 40% mais ativo que [Ru(Pc)], considerando 8,93 J / cm² como uma potência. Considerando apenas a produção de oxigênio singlete encontramos a espécie [Ru(Pc-DCBz)] mais citotóxica nas linhagens B16F10 e MCF-7, sob irradiação em 660nm. Com base em todos os estudos, concluímos que citotoxicidade é dependente tanto da localização subcelular quanto do rendimento quântico de oxigênio singlete. A citotoxicidade pode ser reforçada pela produção de NO, seguido por irradiação de luz na janela terapêutica.

Palavras-chave: Rutênio-ftalocianina, terapia fotodinâmica, oxigênio singlete, óxido nítrico.

ABSTRACT

NEGRI, L. B. Ruthenium-phthalocyanines complexes such as photosensitizer in photodynamic therapy. Photochemical and photobiological aspects. 2015. 148p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Synthesis, structural aspects, photochemistry, photophysical and in vitro photoinduced cytotoxic properties of [Ru(Pc)] (pc = phthalocyanine) derivatives are described in this work. Use of an unsubstituted or symmetrically substituted phthalocyanine ring coordinated to the central ruthenium allowed to obtain different compounds. Coordination of nitric oxide (NO) derivative ligands on axial position of ruthenium(II) ion permitted to obtain [Ru(NO)(Pc)(NO₂)] a NO deliver agent under reduction process. The complexes were characterized by FTIR, UV-Vis, ¹H NMR and mass spectrometry. The photochemical properties of (phthalocyanine)ruthenium(II) like complexes have been investigated by laser photolysis at different wavelengths. At 660 nm light irradiation in aerated aqueous solution we observed photoprocesses with singlet oxygen production. We have addressed the relationship of the singlet oxygen quantum yield and the photosensitizers used in its generation. The singlet oxygen for [Ru(Pc-R)] follows the order [Ru(Pc)] > [Ru(Pc-DCBz)] > [Ru(Pc-DMX)] with DCBz = 4-(3,4-dicianofenoxy)benzoic acid and DMX = 4,5-bis (2,5-dimethylfenoxy)ftalonitrile. Photobiological studies are highlighted with particular focus on light irradiation on 660 nm with interest for photodynamic therapy (PDT) applications. In this way we also have compared the synergism effect of NO and singlet oxygen production with [Ru(Pc)] as a compound producer of singlet oxygen only by means of cytotoxicity in B16F10 cell line. The NO seems to leverage the singlet oxygen action once [Ru(NO)(NO₂)(Pc)] cell viability is at least 40 % more active than [Ru(Pc)] considering 8.93 J/cm² as a potency. Considering only singlet oxygen production we found [Ru(Pc-DCBz)] more cytotoxic specie in B16F10 and MCF7 cell lines, under irradiation in 660 nm. Based on all studies, we have concluded that citotoxycity is dependent on subcellular localization as well singlet oxygen quantum yield. The cytotoxicity could be enhanced by NO production followed by light irradiation on the therapeutic window.

Keywords: Ruthenium-phthalocyanine, photodynamic therapy, singlet oxygen, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo seletivo da TFD (Adaptado de AGOSTINIS, et al., 2011).	5
Figura 2: Ilustração do processo de sensibilização de um fotossensibilizador após absorção da luz, baseado no Diagrama de Jablonski. FS: Fotossensibilizador ISC: Conversão intersistemas (adaptado de AGOSTINIS et al., 2011).	6
Figura 3: Mecanismos de geração de ROS e oxigênio singlete que ocorrem na combinação do FS, Luz e oxigênio molecular. Adaptado de (RIBEIRO et al., 2007).	7
Figura 4: Desenho esquemático de um tumor sólido mostrando as regiões de hipóxia devido à falta de vascularização (DE OLIVEIRA, ALVES, 2002).	8
Figura 5: Estrutura de um dímero do Photofrin®. Fonte: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020451s020lbl.pdf	10
Figura 6: Conversão do Ácido 5-aminolevulínico em Protoporfirina IX (SIMPLICIO,2002).	11
Figura 7: Estrutura do Metil-aminolevulinato (MAL), um derivado metilado do ALA. Fonte: http://dermnetnz.org/procedures/metvix-pdt.html	11
Figura 8: Estrutura do derivado da clorina meta-tetra hidroxifenilclorina (Foscan®).	12
Figura 9: Estrutura da ftalocianina de alumínio sulfonada (Photosens®).	12
Figura 10: Estrutura de Raio - X elucidada por Robertson (adaptado de ROBERTSON, 1936).	14
Figura 11: Estrutura Química das Ftalocianinas. A: Ftalocianina de Base Livre B: Metaloftalocianina (MATLABA, 2002).	15
Figura 12: Monômeros geralmente utilizados para a síntese de ftalocianinas (GOBO,2006).	16
Figura 13: Estrutura Química do complexo rutênio-ftalocianina ([Ru(Pc)]).	16
Figura 14: Representação ilustrativa dos níveis de energia eletrônica que dão origem às transições eletrônicas (A) referentes às bandas Q e B nos espectros de ftalocianinas (B). (Adaptado de MATLABA, 2002).	17
Figura 15: Representação esquemática das interações π -stacking, responsáveis pelo fenômeno de agregação das ftalocianinas (GOBO, 2013).	18
Figura 16: Diagrama ilustrativo adaptado de LEVER,1989. Perturbação dos orbitais moleculares da ftalocianina quando há o deslocamento hipsocrômico devido à agregação tipo H.	19
Figura 17: Posições α e β da estrutura molecular da ftalocianina (GOBO, 2013).	19

Figura 18: Representação das substituições que podem ocorrer nos compostos ftalocianícos (WANG,2012).	20
Figura 19: Possibilidades de ftalocianinas substituídas formadas pelo método de condensação estatística com substituições do tipo- A ₃ B.	21
Figura 20: Esquema ilustrativo da produção de NO a partir da conversão da L-argininina em L-citrulina, catalisada pela enzima NOS (ZAGO, ZANESCO, 2006).	22
Figura 21: Efeitos diretos e indiretos produzidos pelo Óxido Nítrico (Adaptado de (MIRANDA, et. al., 2000).	23
Figura 22: Efeitos tumorigênicos e tumoricida do óxido nítrico dependentes da concentração (WINK, 2008).	24
Figura 23: Exemplos de complexos de rutênio em estudo para atividade anticâncer. A) NAMI-A e B) KP1019 (adaptado de SADLER, RIJT, 2009).	27
Figura 24: Estrutura dos complexos de rutênio-ftalocianinas e ftalonitrilos idealizados neste trabalho.	30
Figura 25: Sistema utilizado para a destilação do pentanol.	33
Figura 26: Sistema utilizado para síntese do complexo [Ru(Pc)].	34
Figura 27: Sistema de borboulhamento de óxido nítrico no precursor [Ru(Pc)] para a formação do complexo trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)].	35
Figura 28: Processo sintético do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.	36
Figura 29: Estrutura molecular do complexo [Ru(Pc-R ₁)].	37
Figura 30: Sistema utilizado para o processo da síntese do complexo trans-[Ru(Pc-R ₁)].	39
Figura 31: Estrutura molecular do complexo [Ru(Pc-R ₄)].	41
Figura 32: Estrutura molecular do complexo [Ru(Pc-R ₁ -R ₃)] (R ₁ = DCBz e R ₃ = DMX).	42
Figura 33: Tubo falcon contendo meio RPMI e pellet de células B16F10.	46
Figura 34: Representação da reação de redução do MTT a formazan.	48
Figura 35: Processo de redução do rutênio, presente em vários estados de oxidação (Ru ^{II} , Ru ^{III} , Ru ^{IV}) para Ru ^{II} . Nota-se a mudança de coloração de marrom para verde para azul.	50
Figura 36: Estudos de purificação do complexo [(Ru(Pc))]. Em A, temos uma coluna preparativa de alumina na qual foi testada diferentes fases móveis. Em B, temos uma coluna de alumina na qual utilizou-se a fase móvel CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH (10:1).	52

- Figura 37:** Estrutura de possíveis formações do complexo [Ru(Pc-R)] mono, di, tri e tetra substituídos. _____ 55
- Figura 38:** Estudos de purificação em cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária sílica e a fase móvel TFA : (CH₃OH) (0,05% TFA), obtendo-se 39 frações que foram analisadas por espectro de absorção de UV-Visível. _____ 56
- Figura 39:** Diagrama do orbital molecular do complexo de Ru (II), representando as possíveis transições eletrônicas quando coordenado com ligantes insaturados (Adaptado de CARNEIRO, 2011). _____ 59
- Figura 40:** Diagrama do orbital molecular de uma ftalocianina coordenada a um centro metálico, mostrando as bandas Q, B, LMCT e MLCT. _____ 60
- Figura 41:** Comparação dos espectros de absorção de UV-visível da Ftalocianina de base livre (H₂Pc) (A) e do complexo [Ru(Pc)] (B). _____ 62
- Figura 42:** Esquema ilustrativo da retrodoação entre o metal (M) e o óxido nítrico (NO) (RICHTER-ADDO, 1992). _____ 63
- Figura 43:** Comparação dos espectros eletrônicos de UV-visível dos complexos [(Ru(Pc))] (A) e trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] (B). _____ 64
- Figura 44:** Espectro eletrônico de UV-visível ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (A) e do precursor nitroftalonitrila (B). _____ 65
- Figura 45:** Espectro eletrônico dos complexos cis-[RuCl₂(DMSO)₄] (em preto) e cis-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] (em vermelho) em solvente DMSO. _____ 66
- Figura 46:** Espectros eletrônicos de UV-visível em clorofórmio para o complexo [Ru(Pc-R₁)] sintetizado pela rota 1 (em preto) e rota 2 (em vermelho). _____ 67
- Figura 47:** Espectros eletrônicos de UV-visível em clorofórmio para o complexo [Ru(Pc-R₁-R₃)] em vermelho e [Ru(Pc-R₄)] em preto. _____ 68
- Figura 48:** Espectros de infravermelho em pastilha de KBr. Análise entre 4000 e 500 cm⁻¹ A: Espectro da H₂Pc livre (SIGMA-ALDRICH); B: Espectro da [Ru(Pc)] sintetizada neste estudo. _____ 71
- Figura 49:** Espectros de infravermelho em pastilha de KBr. Análise entre 1700 e 600 cm⁻¹ A: Espectro da H₂Pc livre (Sigma-Aldrich); B: Espectro da [Ru(Pc)] sintetizada neste estudo. _____ 72
- Figura 50:** Espectros de infravermelho em pastilha de KBr. Análise entre 2200 e 500 cm⁻¹ A: Espectro do complexo [Ru(Pc)] sintetizado neste trabalho; B: Espectro do complexo trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] sintetizada neste trabalho. _____ 74
- Figura 51:** Estrutura do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico. _____ 75
- Figura 52:** Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do precursor nitroftalonitrila. _____ 76

Figura 53: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do Ácido 4 - Hidroxibenzóico.	77
Figura 54: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.	78
Figura 55: Estruturas Químicas dos complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R ₁)] com destaque ao grupamento carboxílico e éter presentes no complexo e [Ru(Pc-R ₁)].	79
Figura 56: Espectro de infravermelho do complexo [Ru(Pc-R ₁)] (em pastilha de KBr), destacando os grupos funcionais ácido carboxílico e éter.	79
Figura 57: Espectrometria de massas por ESI/MS em modo negativo do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.	82
Figura 58: Espectrometria de massas por ESI/MS em modo negativo do complexo cis-[RuCl ₂ (DCBz)(DMSO) ₂], m/z, 592,9156.	83
Figura 59: Espectro de massas do complexo [Ru(Pc-R ₁)] com m/z em 749,890.	84
Figura 60: Espectro de massas do complexo [Ru(Pc-R ₁)] com distribuição isotópica do metal rutênio.	84
Figura 61: Espectro de massas do complexo [Ru(Pc-R ₄)] com m/z em 1574,490.	85
Figura 62: Espectro de RMN de ¹ H do composto ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz). RMN - ¹ H (DMSO-d ₆ , 400,15 MHz), δ(ppm): 7,25 (t, 1H, J ₁ =2,7 Hz); 7,27 (t, 1H, J ₁ =2,7 Hz); 7,54 (dd, 2H, J ₁ =8,7 Hz, J ₂ = 2,6 Hz); 7,94 (d, 1H, J ₁ =2,5 Hz); 8,02 (t, 1H, J ₁ =2,7 Hz); 8,04 (t, 1H, J ₁ =2,7 Hz); 8,15 (d, 1H, J ₁ = 8,8 Hz); 13,04 (s, 1H).	86
Figura 63: Espectro de RMN de ¹ H do ftalonitrilo DMX.	87
Figura 64: Espectro de RMN de ¹ H do complexo [Ru(Pc-R ₁ -R ₃)].	88
Figura 65: Espectro de RMN de ¹ H do complexo [Ru(Pc-R ₄)].	89
Figura 66: Decréscimo da banda de absorção do DPBF em 410 nm à medida que o complexo [(Ru(Pc))] foi irradiado em 660 nm em intervalos de 1 segundo.	91
Figura 67: Decréscimo da banda de absorção do DPBF em 410 nm à medida que o complexo [(Ru(Pc-R ₁)] (R ₁ = DCBz) foi irradiado em 660 nm em intervalos de 1 segundo.	93
Figura 68: Decréscimo da banda de absorção do DPBF em 410 nm à medida que o complexo [(Ru(Pc-R ₄)] (R ₄ = DMX) foi irradiado em 660 nm em intervalos de 4 segundos.	94
Figura 69: Efeito citotóxico dos complexos [Ru(Pc)] e trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] em linhagem de células tumorais B16F10, na concentração de 10 µM, com 4 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 2 experimentos realizados de forma independente.	96

Figura 70: Efeito citotóxico dos complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] em linhagem de células tumorais B16F10 e MCF7, na concentração de 10 µM, com 24 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso durante (8.93 J/cm²). Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 2 experimentos realizados de forma independente. ____ 98

Figura 71: Microscopia de Fluorescência das células B16F10 (A, B e D) e MCF7 (C) tratadas com os complexos [Ru(Pc)], trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] e [Ru(Pc-R₁)] durante 4 horas. ____ 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos FS _____	10
Tabela 2: Nomes comerciais dos medicamentos utilizados para TFD, indicação clínica e países onde foram aprovados (DA SILVA, 2009). _____	13
Tabela 3: Procedência dos reagentes utilizados durante a síntese e caracterização dos complexos. _____	31
Tabela 4: Fases móveis e estacionárias utilizadas na cromatografia de camada delgada no processo de purificação do complexo [Ru(Pc-R ₁)]. _____	54
Tabela 5: Fases móveis utilizadas na cromatografia de camada delgada no processo de purificação do isômero [Ru(Pc-R ₁)]. _____	55
Tabela 6: Comparação das bandas de absorção, B e Q, da ftalocianina de base livre com a [Ru(Pc). Observa-se o deslocamento hipsocrômico. _____	61
Tabela 7: Comparação das bandas de absorção, B e Q, da rutênio-ftalocianina com a complexo trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)]. _____	63
Tabela 8: Comparação dos comprimentos de onda de absorção eletrônica dos complexos [Ru(Pc-R ₁ -R ₃)] e [Ru(Pc-R ₄)]. _____	68
Tabela 9: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc)]. _____	70
Tabela 10: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o complexo trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)]. _____	73
Tabela 11: Relação da estrutura química dos precursores (Nitroftalonitrila e Ácido 4 – Hidróxibenzóico) e produto final (Ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico) com as respectivas bandas de infravermelho características dos grupos funcionais presentes (PAVIA, et. al., 2010). _____	76
Tabela 12: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o ácido 4-(3,4-dicianofenoxi)benzóico. _____	77
Tabela 13: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc-R ₁)]. _____	80
Tabela 14: Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo [(Ru(Pc))], sendo que o experimento foi realizado em triplicata. _____	92
Tabela 15: Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo [(Ru(Pc-R ₁))] (R ₁ = DCBz), sendo que o experimento foi realizado em triplicata. _____	93
Tabela 16: Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo [(Ru(Pc-R ₄))] (R ₄ = DMX), sendo que o experimento foi realizado em triplicata. _____	94

Tabela 17: Relação da viabilidade celular para os complexos [Ru(Pc)] e trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] nos diferentes tempos de irradiação. _____ 97

Tabela 18: Relação da viabilidade celular para os complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R1)] na linhagem B16F10. _____ 98

Tabela 19: Relação da viabilidade celular para os complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R1)] na linhagem MCF7. _____ 99

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema sintético do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)_____	35
Esquema 2: Síntese do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (DCBz)(DMSO) ₂]_____	38
Esquema 3: Síntese do 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX)_____	39
Esquema 4: Representação da síntese da ftalocianina [Ru(Pc-R ₁) a partir do complexo precursor <i>cis</i> -RuCl ₂ (DCBz)(DMSO) ₂]_____	57
Esquema 5: Reação de fotodegradação DBPF, ao reagir com o oxigênio singlete produzido por fotossensibilizadores sob fotoestímulo, formando a espécie <i>o</i> -dibenzoilbenzeno_____	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
Ar	Argônio
CL	Campo ligante
DBU	1,8-Diazobiciclo [5.4.0] undec-7eno
DCBz	Ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico
DHB	2,5 – ácido hidroxibenzóico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMX	4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo
DPBF	1,3-difenilsobenzofurano
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neural
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
ERONs	Espécies reativas de óxido de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fármaco Fotossensível
HEME	Grupo prostético que consiste de um átomo de ferro contido dentro de um anel orgânico porfirínico
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPV	Papilomavírus humano
HPD	Derivado de Hematoporfirina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ISC	Conversão interssistemas
IL	Intraligante
L	Ligante
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
M	Metal
MAL	Metil-aminolevulinato

MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
¹O₂	Oxigênio Singleto
³O₂	Oxigênio molecular no estado tripleto
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pc	Ftalocianina
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
PpIX	Protoporfirina IX
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; meio de cultura
TCML	Transferência de carga metal ligante
TCLM	Transferência de carga ligante metal
TA	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoracético
TFD	Terapia fotodinâmica
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV-vis	Ultravioleta Visível
ZnPc	Zincoftalocianina
ZnAAPPc	Zincoftalocianina monossubstituída

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar ($\text{mol cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$)
λ	Comprimento de onda (nm)
ν_{NO}	Frequência da banda de estiramento da ligação N-O na região do infravermelho (cm^{-1})
®	Marca Registrada
π	Interação eletrônica
α	Posição de ligação na estrutura química
β	Posição de ligação na estrutura química
S_0	Estado fundamental
S_1	Estado singleto excitado
δ	Deformação
ν	Estiramento
Φ_{Δ}	Rendimentos quânticos de oxigênio singleto
$\Phi_{\Delta}^{\text{std}}$	Rendimento quântico de oxigênio singleto para a ftalocianina padrão
R	Taxa de fotodegradação do fotossensibilizador
R_{std}	Taxa de fotodegradação do fotossensibilizador padrão
I_{abs}	Taxa de absorção de luz do fotossensibilizador
$I_{\text{abs}}^{\text{std}}$	Taxa de absorção de luz do fotossensibilizador do padrão

LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS NA DISSERTAÇÃO

NOME DO COMPOSTO QUÍMICO	FÓRMULA ESTRUTURAL
Complexo [Ru(Pc)]
<i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(ONO)]
Ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)
Complexo [Ru(pc-R ₁)] (R ₁ = DCBz)

NOME DO COMPOSTO QUÍMICO	FÓRMULA ESTRUTURAL
<p>Complexo <i>cis</i>- [RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂]</p>
<p>4,5-bis(2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX)</p> <p>Complexo [Ru(Pc-R₄)] (R₄ = DMX)</p>

NOME DO COMPOSTO QUÍMICO	FÓRMULA ESTRUTURAL
<p data-bbox="252 607 604 696">Complexo [Ru(Pc-R₁-R₃)] (R₁= DCBz e R₃ = DMX)</p>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais do câncer	1
1.2 Terapias do câncer	2
1.3 Terapia Fotodinâmica	3
1.3.1 Histórico	3
1.3.2 Mecanismo de ação	4
1.3.3 Propriedades Fotofísicas e Fotofísicas de Fotossensibilizadores	5
1.4 Fotossensibilizadores	9
1.5 Ftalocianinas	14
1.5.1 Ftalocianinas: Histórico	14
1.5.2 Ftalocianinas: Características gerais	15
1.5.3 Ftalocianinas: Propriedades Eletrônicas	16
1.5.4 Ftalocianinas: Fenômeno da Agregação	17
1.5.5 Ftalocianinas Substituídas	19
1.6 Importância biológica do óxido nítrico	21
1.7 Complexos metálicos e suas aplicações farmacêuticas	25
2. OBJETIVO	29
2.1 Objetivos Específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Reagentes	31
3.2 Síntese dos complexos de rutênio e precursores	32
3.2.1 Destilação do Pentanol	32
3.2.2 Síntese do complexo ftalocianinarutênio(II) {[Ru(Pc)]}	33
3.2.3 Síntese do complexo trans-[Ru(NO)(Pc)(ONO)]	34
3.2.4 Síntese do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)	35
3.2.5 Síntese do complexo [Ru(pc-R ₁)] (R ₁ = DCBz)	36
3.2.6 Síntese 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX).	39
3.2.7 Síntese do complexo [Ru(Pc-R ₄)] (R ₄ = DMX)	40
3.2.8 Síntese do complexo [Ru(Pc-R ₁ -R ₃)] (R ₁ = DCBz e R ₃ = DMX)	41
3.3 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis)	42
3.4 Espectroscopia na região do infravermelho	42
3.5 Espectroscopia de Luminescência	42
3.6 Espectrometria de Massas	43
3.7 Determinação indireta de Oxigênio Singleto - ¹ O ₂	43
3.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	44
3.9 Estudos preliminares da atividade biológica	44
3.9.1 Equipamentos	44
3.9.2 Reagentes	44
3.9.3 Materiais	45
3.9.4 Métodos	46
3.9.4.1 Manutenção das células B16F10 e MCF7	46
3.9.4.2 Ensaios de Citotoxicidade	47
3.9.4.3 Determinação da citotoxicidade na ausência e presença de luz	47

3.9.4.4	Análise da viabilidade celular: ensaio por MTT	48
3.9.4.5	Localização Subcelular: Microscopia de Fluorescência	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Síntese e purificação dos complexos de rutênio	50
4.1.1	[Ru(Pc)]	50
4.1.2	Síntese do complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(ONO)]	52
4.1.3	Complexo [Ru(pc-R ₁)] (R ₁ = DCBz)	53
4.1.4	Síntese do complexo [Ru(Pc-R ₄)] (R ₄ = DMX)	57
4.1.5	Síntese do complexo [Ru(Pc-R ₁ -R ₃)] (R ₁ = DCBz e R ₃ = DMX)	58
4.2	Caracterização espectroscópica dos complexos de rutênio na região do UV-visível	58
4.2.1	Propriedades eletrônicas para complexos de rutênio com ligantes insaturados	58
4.2.2	Espectroscopia na região do UV-visível para o complexo rutênio(II) ftalocianina {[Ru(Pc)]}	60
4.2.3	Espectroscopia na região do UV-visível para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(ONO)]	63
4.2.4	Espectroscopia na região do UV- visível do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico	64
4.2.5	Espectroscopia na região de UV- visível do complexo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (DCBz)(DMSO) ₂]	66
4.2.6	Espectroscopia na região de UV- visível do complexos de rutênio-ftalocianinas substituídas	67
4.3	Caracterização espectroscópica dos complexos de rutênio: Análise por infravermelho	69
4.3.1	Espectroscopia na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc)]	69
4.3.2	Espectroscopia na região do infravermelho para o complexo <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(ONO)]	72
4.3.3	Espectroscopia na região do infravermelho para o ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)	75
4.3.4	Espectroscopia na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc-R ₁)] (DCBz)	78
4.4	Espectrometria de Massas	81
4.4.1	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (DCBz)(DMSO) ₂]	81
4.4.2	Espectrometria de massas para o complexo [Ru(Pc-R ₁)] (R ₁ =DCBz)	83
4.4.3	Espectrometria de massas para o complexo [Ru(Pc-R ₄)] (R ₄ = DMX)	85
4.5	Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	85
4.5.1	Complexo ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)	85
4.5.2	4,5- <i>bis</i> (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX)	86
4.5.3	Complexo [Ru(Pc-R ₁ -R ₃)] (R ₁ = DCBz e R ₃ = DMX)	87
4.5.4	Complexo [Ru(Pc-R ₄)] (R ₄ = DMX)	88
4.6	Determinação da produção de Oxigênio Singleto	89
4.6.1	Determinação de Oxigênio Singleto para [Ru(Pc)]	91
4.6.2	Cálculo de Oxigênio Singleto para [Ru(Pc-R ₁)] (R ₁ = DCBz) e [Ru(Pc-R ₄)] (R ₄ = DMX)	92
4.7	Estudos biológicos	95
4.7.1	Viabilidade celular por MTT	95
4.7.1.1	Complexos [Ru(Pc)] e <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(ONO)]	96
4.7.1.2	Complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R ₁)]	97
4.7.2	Imagem	99
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
6.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Os animais são constituídos de sistemas biológicos organizados como uma sociedade, tendo as células como principais integrantes que se reproduzem, se diferenciam ou morrem, quando necessário, mantendo o sistema em equilíbrio. Alterações moleculares que perturbam essa harmonia podem comprometer o bem-estar do organismo, dando origem a células cancerosas (ALBERTS *et al.*, 2006).

O desenvolvimento do câncer é dependente dos ciclos repetidos de mutação, competição e seleção natural que fazem parte do processo de evolução de todos os seres vivos. Uma única célula pode sofrer uma mutação somática e sucessivas mutações adicionais resultando em uma proliferação descontrolada, crescimento autônomo e perda de diferenciação celular. Consequentemente, há o crescimento de uma massa de células anormais, denominada tumor (ou *neoplasma*). O fenômeno da progressão tumoral desafia o controle normal da proliferação celular, pois as células cancerosas se reproduzem, invadem e colonizam espaços ocupados por outras células, havendo um desequilíbrio no balanço de células mutantes e não mutantes (ALBERTS *et al.*, 2006).

Trata-se de um processo microevolucionário, que pode ocorrer em meses ou anos, e pode ser acelerado por processos mutagênicos (iniciadores tumorais) ou agentes não-mutagênicos (promotores de tumores), os quais estimulam a proliferação celular através da alteração da expressão gênica.

Os agentes carcinogênicos podem ser químicos, físicos ou biológicos (FILHO *et al.*, 1994), tendo uma relação bastante clara com a mutagênese. Os carcinógenos químicos, por exemplo, atuam causando uma alteração na sequência de nucleotídeos. Já a radiação ionizante, como os raios X, promovem quebras cromossômicas e translocações. E, ainda, alguns tipos de vírus podem introduzir DNA exógenos nas células normais, alterando a homeostase das mesmas (ALBERTS *et al.*, 2006).

Um tumor pode ser denominado maligno ou benigno, dependendo das características das células tumorais. Se as células neoplásicas se agruparem em massa única, é considerado um tumor benigno e pode ser retirado através da remoção cirúrgica. Enquanto um tumor maligno é mais invasivo, pois as células neoplásicas têm habilidade de atingir a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos, invadindo outros tecidos. Nesse caso, tumores secundários

em outros órgãos podem ser formados, o que é conhecido como metástase. (ALBERTS *et al.*, 2006).

De acordo com o projeto Globocan 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015), o câncer acometeu 14,1 milhões de novos casos no mundo em 2012 levando a óbito 8,2 milhões de pessoas da população mundial. O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2014) estima que para os anos de 2014 e 2015, haverá 576 mil novos casos de câncer no Brasil sendo que o câncer de pele não-melanoma será o mais incidente na população brasileira com 182 mil novos casos, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (15 mil).

Considerando a relevância do perfil epidemiológico que esta doença vem apresentando, é de extrema importância ações estratégicas de implementação da política de prevenção com diagnóstico precoce, tratamento em tempo oportuno, ações profiláticas como campanhas anti-tabagismo (câncer de pulmão) e vacinação contra o vírus Papilomavírus humano (HPV-câncer de colo de útero). Buscam-se ainda esforços para o controle da doença através do aprimoramento de tratamentos já existentes e pesquisas científicas para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes.

1.2 TERAPIAS DO CÂNCER

Sabemos que um dos maiores desafios da ciência é a cura do câncer. As terapias anticâncer atualmente conhecidas utilizam-se da instabilidade genética das células cancerosas, já que estas perderam a capacidade dos mecanismos de reparo do DNA (ALBERTS *et al.*, 2006).

As tradicionais formas de tratamento das neoplasias envolvem quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica (DAVIDS, KLEEMANN, 2011). Essas terapias podem ser associadas, ou não, dependendo das características da doença.

A quimioterapia é um método de tratamento que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos antineoplásicos, que interferem no mecanismo celular, impedindo a proliferação do tumor (BONASSA, 1998). A radioterapia é uma técnica que emprega um feixe de radiações ionizantes capazes de danificar o material genético celular, sendo citotóxicas às células tumorais. Essas radiações podem ser eletromagnéticas (raios X ou gama) ou corpusculares (partículas α e β), que ao interagir com o ambiente celular, geram

espécies carregadas, ganhando ou perdendo elétrons, o que gera efeitos químicos como a ruptura das cadeias de DNA (HALLE *et al.*, 2010).

Tanto a quimioterapia como a radioterapia afetam as células normais, desencadeando uma série de efeitos colaterais como dores abdominais, diarreia, úlcera, emese, queda de cabelo e reações inflamatórias. O processo cirúrgico é indicado quando é possível a retirada dos tecidos neoplásicos inteiros. Porém, é um processo invasivo, não é eficaz em casos de metástase e, ainda, se apenas poucas células tumorais permanecerem, poderá haver proliferação e uma recidiva da doença. Esses tratamentos convencionais apresentam algumas desvantagens: são demorados, podem causar dor e desconforto, o que compromete o bem-estar dos pacientes (SIBATA *et al.*, 2000; OCHSNER, 1997).

Buscando melhorar a qualidade de vida dos pacientes, há grande interesse no desenvolvimento de terapias com efeito citotóxico seletivo às células cancerosas. Dentro desta perspectiva temos o desenvolvimento de novas terapias como a Imunoterapia, Bioquimioterapia, Terapia Gênica e Terapia Fotodinâmica. Dentre essas, será destacada a Terapia Fotodinâmica (TFD), a qual pode ser associada às terapias convencionas e apresenta a vantagem de ser pouco invasiva com mínimos efeitos colaterais (DAVIDS, KLEEMANN, 2011; OCHSNER, 1996; TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003).

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

1.3.1 Histórico

Em 1900 foram realizados, por Oscar Raab, os primeiros estudos que deram origem a TFD, nos quais observou-se que o corante acridina quando combinado com a luz se tornava citotóxico ao microorganismo *paramecium* (RAAB, 1900). Esse efeito da luz foi denominado de “efeito fotodinâmico” nos estudos de Tappeiner, em 1903, o qual juntamente com Jesionek, iniciaram os primeiros ensaios clínicos da TFD, descobrindo que esta poderia atuar no tratamento do câncer de pele (TAPPEINER, JESIONEK, 1903). Blum (BLUM, 1964) sugeriu que este “efeito fotodinâmico” deveria ser aplicado apenas às reações fotoquímicas em que houvesse consumo de oxigênio molecular. Mais tarde, na década de 60, estudos realizados por RL Lipson e S. Schwartz, relataram que a aplicação via injetável de preparações em bruto de hematoporfirina tornou lesões neoplásicas fluorescentes, e essas poderiam ser visualizadas durante o processo cirúrgico. Schwartz obteve uma mistura de

porfirina tratando a hematoporfirina com ácido acético e ácido sulfúrico. A esta mistura denominou-se “derivado de hematoporfirina” (HPD), a qual foi empregada por Lipson *et al.* para estudos que visavam a detecção tumoral. A partir de estudos realizados por Thomas Dougherty e seus colaboradores, a Terapia Fotodinâmica passou a ser reconhecida como uma terapia inovadora no tratamento do câncer (DOUGHERTY, *et al.*, 1992; RIBEIRO, 2005).

Atualmente, pesquisas relatam que a TFD pode ser utilizada tanto para o tratamento de neoplasias não malignas (TAUB, 2007) quanto para neoplasias malignas, tais como câncer de pele, cabeça, pescoço, pulmão e esôfago (AYARU; BOWN; BALDEA; FILIP, 2012; NAVA *et al.*, 2011; QUON *et al.*, 2011). Outras indicações para TFD são doenças como degeneração macular (síndrome oftálmica), psoríase, parasitoses cutâneas (Leishmaniose), acne severa e periodontite (CHATTERJEE *et al.*, 2008; GOLD, 2008; MOLLIE, MACCORMACK, 2008.).

Há cerca de duas décadas, a TFD foi aprovada pelo órgão US Food and Drug Administration (FDA) (AGOSTINIS *et al.*, 2011). O primeiro medicamento aprovado para essa terapia foi o Photofrin®, uma mistura complexa de monômeros, dímeros e oligômeros de hematoporfirina (ALISON, SIBATA, 2010). No entanto, devido ao elevado tempo de meia vida (250 horas) e absorção eletrônica numa região inferior a 600 nm, o paciente submetido ao tratamento com esse medicamento pode apresentar reações de fotossensibilidade e deve ficar protegido da luz solar durante oito semanas (DA SILVA, 2009). Para contornar essa limitação, novas gerações de fármacos para a TFD foram desenvolvidas e serão discutidas posteriormente.

No Brasil, o início da TFD se deve a colaboração entre o Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo), o Hospital Amaral Carvalho em Jaú e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo – FMRP) (BAGNATO, *et al.*, 2005) (RIBEIRO, 2005).

1.3.2 Mecanismo de ação

O princípio da TFD consiste em matar a célula tumoral ao mesmo tempo em que as células normais permanecem intactas.

O mecanismo de ação relaciona-se com a combinação de três componentes essenciais: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio. O FS é um composto que apresenta a propriedade eletrônica de absorver luz na região do visível ou do infravermelho próximo, ou seja, bom fotossensibilizador absorve na região de maior penetração da luz na pele (AGOSTINIS *et al.*, 2011; MAESTRIN *et al.*, 2004). Uma vez aplicado via injetável ou tópica, o FS pode

acumular-se preferencialmente no tecido tumoral. Os fatores relacionados com a seletividade dos FS não estão completamente elucidados. A proposta que explica o acúmulo do FS às células tumorais envolvem o baixo pH localizado no tumor, a abundância de receptores de proteínas de baixo peso molecular nessas células e ainda as alterações que comprometem a drenagem linfática dessa região, o que torna o tumor mais ávido ao FS que o tecido normal.

Após aplicação e acúmulo do FS no tecido lesado, é necessária a irradiação luminosa para promover a ativação do fármaco, a qual ocorre em comprimento de onda específico. Normalmente buscam-se fármacos que atuem na região da janela terapêutica, entre 600 e 800 nm, de modo que sejam citotóxicos às células tumorais ao mesmo tempo em que não apresentam toxicidade às células saudáveis.

O FS desencadeia uma reação fotoquímica que, devido à presença do oxigênio molecular, leva a produção de oxigênio singleto, uma espécie altamente reativa que provoca o efeito citotóxico e consequente morte celular via necrose ou apoptose (Figura 1) (AGOSTINIS *et al*, 2011).

Figura 1: Mecanismo seletivo da TFD (Adaptado de AGOSTINIS, *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação da TFD pode ser explicado por processos fotoquímicos e fotofísicos, nos quais há absorção de luz, transferência de energia e transferência de elétrons.

1.3.3 Propriedades Fotofísicas e Fotofísicas de Fotossensibilizadores

O processo de fotossensibilização na TFD pode ser explicado através do Diagrama de Jablonski ilustrado na figura 2. O FS após irradiado, absorve luz em seu comprimento de onda de absorção, o que promove a excitação dos elétrons do estado fundamental (S_0) e

transferência eletrônica para um orbital molecular de maior energia, chamado de primeiro estado excitado singlete (S_1). Em S_1 , os elétrons podem perder energia e voltar ao estado S_0 , emitindo fluorescência. Alternativamente, pode haver um cruzamento interistemas (ISC), no qual há inversão de spin de um elétron. Para formar um estado de energia mais estável, os elétrons vão para o estado Tripleto (T_1), um nível mais baixo de energia do estado excitado. No estado T_1 , os elétrons podem voltar ao S_0 , emitindo fosforescência ou, ainda, pode haver dois tipos de reações: reações do tipo I e reações do tipo II (Figura 3).

As reações do tipo I consistem na **transferência de elétrons** do estado T_1 para substratos como a membrana celular ou biomoléculas, transferindo um próton ou um elétron para formar radical ânion ou radical cátion, respectivamente. Esses radicais reagem com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que são espécies altamente oxidantes (CASTANO, *et al.*, 2005). Nas reações do tipo II, há **transferência de energia** do estado T_1 para o oxigênio molecular, o qual está presente no meio biológico em seu estado fundamental tripleto (3O_2). Ao capturar esta energia, o 3O_2 é excitado, há uma inversão de spin de seus elétrons e são transferidos para um orbital molecular de maior energia, o estado singlete, formando o oxigênio singlete (1O_2), uma espécie altamente reativa e citotóxica às células cancerígenas. Além disso, o 1O_2 pode reagir com outras espécies presentes no meio biológico e formar espécies reativas de oxigênio (EROS), que também vão desencadear o disparo de diversos mecanismos bioquímicos induzindo a morte celular (FOOTE, 1991; AGOSTINIS *et al.*, 2011; HEINCH, 2013).

Figura 2: Ilustração do processo de sensibilização de um fotossensibilizador após absorção da luz, baseado no Diagrama de Jablonski. FS: Fotossensibilizador ISC: Conversão intersistemas (adaptado de AGOSTINIS *et al.*, 2011).

Figura 3: Mecanismos de geração de ROS e oxigênio singlete que ocorrem na combinação do FS, Luz e oxigênio molecular. Adaptado de (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Ambos os mecanismos, tipo I e II, podem ocorrer simultaneamente nas células e tecidos. Estudos demonstram que as reações do tipo I são favorecidas quando há baixa concentração de oxigênio e estruturas moleculares que podem ser oxidadas e reduzidas facilmente. Já em meios em que a concentração de oxigênio molecular é maior, as reações do tipo II são favorecidas. As reações de transferência de energia também ocorrem preferencialmente em meios hidrofóbicos, já que há o aumento do tempo de meia vida e da solubilidade do 1O_2 (BONNETT, 1995; SOBOLEV *et al.*, 2000; OCHSNER, 1997).

Em vários centros de pesquisa, mais de 80 % dos estudos em TFD se baseiam na utilização do oxigênio singlete (1O_2) como espécie reativa (DEROSA & CRUTCHLEY, 2002).

A eficácia da TFD de maneira geral está centrada, portanto, em um processo fotofísico. Depende do rendimento quântico do estado T_1 e da concentração de oxigênio presente no meio. Quanto maior é o tempo de vida no estado T_1 , maior é a transferência de energia para o oxigênio molecular e formação do oxigênio singlete. A irradiação no comprimento de onda de absorção ($\lambda_{\max}$) do FS é de extrema importância. Deverá ocorrer na região da janela terapêutica, entre 600 e 800 nm, de modo que um $\lambda_{\max} < 600$ nm poderia resultar em reações de fotossensibilidade e um $\lambda_{\max} > 800$ nm não produziria uma energia

suficientemente alta para excitação do oxigênio molecular, de modo que o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ não seria eficaz para a TFD.

O sucesso dessa terapia se dá porque as espécies reativas geradas ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet}$, H_2O_2) são capazes de reagir com componentes biológicos fundamentais para a organização celular, como lipídeos, DNA's e proteínas, e quando produzidos em excesso podem desencadear uma série de mecanismos intrínsecos que resultam na morte celular por necrose, apoptose e/ou autofagia (CASTANO, *et al.*, 2005).

Embora seja proeminente o êxito alcançado pela TFD, há certas limitações. No sistema biológico, os tumores sólidos tem a capacidade de desenvolver novos vasos sanguíneos a partir da vascularização pré-existente, processo conhecido como angiogênese. Porém esses vasos apresentam muitas ramificações, são tortuosos e seguem direções imprevisíveis. Consequentemente, algumas regiões do tumor são altamente vascularizadas enquanto outras apresentam pouca ou nenhuma vascularização, o que permite a variação da concentração de oxigênio no ambiente tumoral. Portanto, os tumores sólidos apresentam células anóxicas (sem presença de oxigênio), em processo de necrose, e regiões de hipóxia (pouca concentração de oxigênio), o que comprometeria o mecanismo de ação da TFD (Figura 4).

Figura 4: Desenho esquemático de um tumor sólido mostrando as regiões de hipóxia devido à falta de vascularização (DE OLIVEIRA, ALVES, 2002).

Neste caso, há a busca do uso alternativo de drogas fotossensibilizadoras que produzam outras espécies radicalares independentes de oxigênio. Uma possibilidade é utilizar compostos que liberem fotoquimicamente óxido nítrico (NO), o qual além de possuir uma natureza radicalar pode reagir com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) presente no meio biológico e formar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) com ação citotóxica em culturas

de células (KORBELIK *et al.*, 2000).

Dentro desta perspectiva, complexos metálicos podem ser desenhados como moléculas fotossensibilizadoras, produtoras de oxigênio singleto ao mesmo tempo em que atuam como espécies doadoras de NO, contornando as limitações da TFD e promovendo um efeito sinérgico tumoricida entre ambas as espécies.

1.4 FOTOSSENSIBILIZADORES

Fotossensibilizadores (FS) são compostos que tem a capacidade de absorver a luz em comprimento de onda específico, e utilizam a energia gerada nesse processo para produzir espécies citotóxicas na presença de oxigênio molecular (AGOSTINIS *et al.*, 2011; MAESTRIN *et al.*, 2004).

Um FS ideal deve apresentar diversas propriedades: (SHARMAN, *et al.*, 1999; TRIESSCHEJIN, *et al.*, 2006; ZEITOUNI, *et al.*, 2003).

- **Físico-químicas:** alto grau de pureza, alto coeficiente de absorção de luz, alta solubilidade e baixa tendência à agregação no meio biológico.
- **Fotofísicas:** absorção eletrônica na região do vermelho e do infravermelho próximo ($600\text{nm} < \lambda < 800\text{nm}$), tempo de vida no estado T_1 capaz de gerar $^1\text{O}_2$, alto rendimento de produção de $^1\text{O}_2$ quando irradiado em λ específico.
- **Farmacológicas:** direcionamento seletivo e eficiente para o tecido canceroso, eliminação rápida do organismo, ausência de toxicidade sistêmica, ausência de efeitos colaterais.
- **Fototerapêuticas:** baixa toxicidade no escuro, citotoxicidade na presença de luz em λ específico, destruição preferencial de células cancerosas, ausência de potencial mutagênico e carcinogênico.

Fundamentalmente, a estrutura dos FS é constituída de compostos aromáticos altamente conjugados que podem ser explorados quimicamente nos processos de síntese e através de modificações estruturais para melhoria e aumento de suas atividades na TFD (ALLISON, SIBATA, 2010). São classificados em diferentes classes de acordo com a estrutura química que apresentam (Tabela 1) (DA SILVA, *et al.*, 2009):

Tabela 1: Classificação dos FS

Classes	Fotossensibilizadores	Fármacos
Derivados da Porfirina	Hematoporfirina	Photofrin®
	Benzoporfirina	
	Ácido 5-aminolevulínico	Levulan® Kerastick®
	Metil-Aminolevulinato	Metvix®
Derivados da Clorofila	Clorinas e Bacterioclorinas	Foscan®
Corantes	Ftalocianinas e Naftalocianinas	Photosens®

A primeira geração de FS é representada pelos derivados de hematoporfirinas (HPD). Os medicamentos HPD disponíveis no mercado são Photofrin®, Photosan® e Photogen® (ALLISON, *et al.*, 2004). O Photofrin® foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA para ser utilizado na TFD. Trata-se de uma mistura complexa de monômeros, dímeros e oligômeros de um derivado da Hematoporfirina (HPD). Sua estrutura pode ser observada na figura 5. Devido as suas propriedades eletrônicas e farmacológicas, apresentou efeitos de fotossensibilidade à pele dos pacientes submetidos ao tratamento. O Photofrin® absorve fracamente na região de 630 nm e apresenta tempo de meia-vida elevado de 250 horas, exigindo que o paciente fique até oito semanas protegido da exposição da luz (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MAESTRIN, 2004). Mesmo com essas limitações o Photofrin® é muito utilizado mundialmente até os dias de hoje (SIMPLICIO, 2002).

Figura 5: Estrutura de um dímero do Photofrin®. Fonte:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020451s0201bl.pdf

A fim de melhorar essas desvantagens buscaram-se novos compostos dando início a segunda geração, que é representada pelos derivados de porfirinas, porfirinas modificadas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e naftalocianinas (AGOSTINIS, *et al.*, 2011; ALLISON, SIBATA, 2010; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um derivado de porfirina sintético utilizado para o tratamento do câncer de pele não-melanoma. Os nomes comerciais dos medicamentos que contém o ALA como princípio ativo é Levulan® e Kerastick®. O ALA é um pró-fármaco que quando aplicado por via tópica, é convertido *in situ* por uma enzima em Protoporfirina IX (PpIX) (fotossensibilizador endógeno) através do ciclo bioquímico do HEME (Figura 6) (SIMPLICIO,2002). A fim de melhorar a lipofilicidade e penetração cutânea do ALA, pesquisadores desenvolveram seu derivado metilado chamado metil-aminolevulinato (MAL), cujo medicamento comercial é o Metvix®. Também é um pró-fármaco com o mesmo mecanismo de ação do ALA, sendo convertido a PpIX após três horas de aplicação tópica (Figura 7).

Figura 6: Conversão do Ácido 5-aminolevulínico em Protoporfirina IX (SIMPLICIO,2002).

Figura 7: Estrutura do Metil-aminolevulinato (MAL), um derivado metilado do ALA. Fonte: <http://dermnetnz.org/procedures/metvix-pdt.html>

Como representante da classe das clorinas pode-se citar o Foscan®, que tem como princípio ativo um derivado da clorina chamado meta-tetra hidroxifenilclorina (Figura 8). É um fármaco administrado por via endovenosa, porém, gera uma reação de fotossensibilidade cutânea ligeiramente menor que o Photofrin® (DA SILVA, *et al.*, 2009).

Figura 8: Estrutura do derivado da clorina meta-tetra hidroxifenilclorina (Foscan®).

As ftalocianinas vêm ganhando importância devido às suas propriedades não tóxicas, alta estabilidade, resistência à degradação química e fotoquímica, propriedades fluorescentes e ainda por possuírem fortes bandas de absorção na região do visível e infravermelho próximo, não desencadeando as reações de fotossensibilização dos fármacos derivados de porfirinas (ROCHA, 2008). Muitas ftalocianinas estão sendo pesquisadas para posterior aplicação em pacientes com diversos tipos de câncer. Atualmente, foi aprovado na Rússia o Photosens®, um fotossensibilizador que tem como princípio ativo uma mistura de ftalocianinas de Alumínio sulfonadas substituída em diversas posições (Figura 9) (LACEY, PHILLIPS, 2002).

Figura 9: Estrutura da ftalocianina de alumínio sulfonada (Photosens®).

A terceira geração surgiu com o objetivo de melhorar a seletividade desses FS já desenvolvidos, direcionando-os de maneira específica para o tecido tumoral. Assim, nela estão incluídos compostos da primeira e segunda geração conjugados com alguns veículos biológicos, como anticorpos, nanopartículas, proteínas e peptídeos (AGOSTINIS, *et al.*, 2011; ALLISON, SIBATA, 2010; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Os Principais FS utilizados atualmente, disponíveis comercialmente para TFD se encontram na tabela 2 com a indicação terapêutica bem como o país onde tem seu uso clínico aprovado:

Tabela 2: Nomes comerciais dos medicamentos utilizados para TFD, indicação clínica e países onde foram aprovados (DA SILVA, 2009).

Medicamentos	Indicação Clínica	Países
Levulan® Kerastick® Metvix®	Queratose Actínica	União Européia
Photofrin® Photogem® Photosan®	Esôfago de Barret	União Européia Estados Unidos
Photofrin®	Displasia Cervical	Japão
Levulan® Metvix®	Carcinoma de células basais Carcinoma de células escamosas	União Européia
Photofrin®	Câncer cervical	Japão
Photofrin®	Câncer endobronquial	Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Irlanda, Japão, Reino Unido, EUA
Photofrin®	Câncer esofágico	Canadá, França, Alemanha, Japão, Reino Unido, EUA
Photofrin®	Câncer gástrico	Japão
Foscan®	Câncer de cabeça e pescoço Câncer de pele não-melanoma	União Européia
Photofrin®	Câncer de bexiga	Canadá
Photosens®	Câncer de pele não-melanoma Câncer de mama	Rússia Índia

1.5 FTALOCIANINAS

1.5.1 Ftalocianinas: Histórico

A primeira síntese de ftalocianinas foi reportada em 1907 por Braun e Tcherniac, quando se observou um produto de coloração azul após o aquecimento em alta temperatura do composto *orto*-cianobenzamida (LEVER, 1989).

Em 1928, químicos da *Scottish Dyes Ltd.* observaram a formação de traços de compostos azuis durante a preparação da ftalimida, a partir da reação entre anidrido ftálico e amônia preparados em um recipiente de ferro (Fe). Mais tarde descobriu-se que se tratava de uma ftalocianina de ferro, sendo que a procedência do átomo de Fe se deu através do recipiente utilizado para o meio reacional (MATLABA, 2002).

A estrutura geométrica da ftalocianina de base livre foi compreendida e elucidada anos mais tarde pelo professor e pesquisador Linstead do *London Imperial College* em conjunto com o pesquisador Robertson através da difração de Raio-X (Figura 10) (ROBERTSON, 1936; LEVER, 1989).

Figura 10: Estrutura de Raio - X elucidada por Robertson (adaptado de ROBERTSON, 1936).

As ftalocianinas receberam esse nome por Linstead por serem originadas do anidrido ftálico (*ftalo*), e por apresentarem a coloração azul-esverdeada (*ciano*) (Linstead, 1934).

A partir deste período as ftalocianinas passaram a ser utilizadas na indústria têxtil e de corantes (GOBO, 2013) e atualmente são vistas como boas candidatas a FS na TFD por apresentarem baixa toxicidade, alta estabilidade e ótima absorção na janela terapêutica.

1.5.2 Ftalocianinas: Características gerais

Os compostos ftalocianínicos podem ser definidos como policiclos aromáticos com quatro unidades isoindol, ou seja, um anel benzeno fundido a um pirrol. As unidades isoindóis estão unidas através de uma ponte “aza”. A ponte “aza” é definida como compostos aromáticos que apresentam alguns dos átomos de carbonos (C) substituídos por átomos de nitrogênios (N).

Os anéis aromáticos conferem ao composto um arranjo planar de 18 elétrons conjugados, conferindo uma alta densidade eletrônica e a presença de ligações π . Devido a essas características, há uma forte absorção da ftalocianina na região do vermelho, o que confere a cor azul intensa e permite sua aplicação dentro da janela terapêutica (OUGH, 1994). Assim, o anel macrocíclico com alta densidade eletrônica, pode doar pares de elétrons coordenando-se com um centro metálico. Ftalocianinas podem conter no interior do macrociclo metais de transição como zinco, silício, alumínio, rutênio e, uma vez coordenadas com um centro metálico, são chamadas de metaloftalocianinas (Figura 11). (CARNEIRO, 2011; ALLISON, SIBATA, 2010; MATLABA, 2002).

Figura 11: Estrutura Química das Ftalocianinas. A: Ftalocianina de Base Livre B: Metaloftalocianina (MATLABA, 2002).

A síntese desses compostos, de modo geral, parte de monômeros geralmente derivados da ftalimidas, isoindóis, anidrido ftálico e ftalonitrilas em um processo conhecido como ciclotetramerização (GOBO,2013) (Figura 12).

Figura 12: Monômeros geralmente utilizados para a síntese de ftalocianinas (GOBO,2006).

Devido à importância das ftalocianinas como fotossensibilizadores na TFD, este trabalho propõe a síntese de ftalocianinas coordenadas com o rutênio no interior do anel macrocíclico, formando os complexos de rutênio-ftalocianinas [Ru(Pc)] (Figura 13). Variações na estrutura molecular do composto poderão conduzir ao melhor efeito antitumoral e constituir-se uma nova geração de fármacos.

Figura 13: Estrutura Química do complexo rutênio-ftalocianina ([Ru(Pc)]).

1.5.3 Ftalocianinas: Propriedades Eletrônicas

As ftalocianinas caracterizam-se por possuírem ligações π , ciclos aromáticos e altas conjugações e transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (HENRIKSSON, SUNDBOM, 1972). Sua cor azul intensa ocorre devido à presença de uma forte banda na região do visível de 670 nm, chamada de banda Q, com absorvidade molar (ϵ) da ordem $10^5 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (LEVER, 1989). Há transições de mais alta energia, na região de 350 nm, referente à banda Soret (banda B), com uma absorvidade molar (ϵ) da ordem $10^4 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Essas bandas intensas ocorrem devido

às transições do orbital ligante para o orbital antiligante ($\pi \rightarrow \pi^*$) (OUGH, 1994; KOZLOWSKI *et al*, 2006; GROBOSCH *et al*, 2010).

De acordo com a Figura 14-A ilustrada, podemos analisar que a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ que envolve a transferência eletrônica de $a_{1u}(\pi)$ para $e_g(\pi^*)$, da origem a banda Q. A banda Soret (banda B) tem origem da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, que ocorre a partir da transferência eletrônica entre os orbitais $a_{2u}(\pi)$ e/ou $b_{2u}(\pi)$ para $e_g(\pi^*)$. Essas transições podem ser analisadas no espectro de absorção da ftalocianina mostrado na Figura 20-B. As ftalocianinas podem agregar-se e o acoplamento entre dois ou mais sistemas π do anel macrocíclico, podem dar origem a um desdobramento da banda Q. Portanto, a banda Q apresenta duas bandas de absorção, referente à presença de espécies monoméricas e diméricas. Figura 14-B (MATLABA, 2002).

Figura 14: Representação ilustrativa dos níveis de energia eletrônica que dão origem às transições eletrônicas (A) referentes às bandas Q e B nos espectros de ftalocianinas (B).

(Adaptado de MATLABA, 2002).

1.5.4 Ftalocianinas: Fenômeno da Agregação

O fenômeno da agregação é comumente observado nos compostos ftalocianícos. Há uma associação coplanar dos anéis benzênicos favorecidos por interações π -stacking, o que faz a estrutura progredir de monômeros para dímeros e complexos de ordem maior (KADISH, *et al.*, 2010; GOBO, 2013) (Figura 15).

Figura 15: Representação esquemática das interações π -stacking, responsáveis pelo fenômeno de agregação das ftalocianinas (GOBO, 2013).

O processo de agregação é dependente da concentração, natureza do solvente, natureza dos substituintes, íon metálico complexado e temperatura (KADISH, *et al.*, 2010). No estado agregado a estrutura eletrônica dos anéis da ftalocianina pode ser perturbada e é influenciada pelo tipo de aproximação dos anéis, sobreposição e do ângulo de inclinação que os anéis vão adotar (LEVER, 1989).

Existem dois tipos de agregação: agregação tipo H e agregação tipo J. A agregação tipo H é mais comum e nela as moléculas estão dispostas face a face com um ângulo de inclinação de 90° entre elas, sendo possíveis as interações π -stacking. Nesse caso, há uma perda de degenerescência dos orbitais do estado excitado, aumentando a transferência de energia e propiciando um deslocamento hipsocrômico do dímero em relação ao monômero, que pode ser observada na ilustração da figura 16. As transições apresentadas em linhas pontilhadas são transições de menor energia e são proibidas. A agregação do tipo J, ocorre com menor frequência quando o ângulo entre as moléculas é menor que o ângulo crítico de $54,7^\circ$, ocorrendo interações π -stacking nas extremidades dos anéis benzênicos. Nesse caso, há um deslocamento batocrômico do dímero em relação ao monômero. (LEVER 1989; KADISH, *et al.*, 2010).

Figura 16: Diagrama ilustrativo adaptado de LEVER, 1989. Perturbação dos orbitais moleculares da ftalocianina quando há o deslocamento hipsocrômico devido à agregação tipo H.

Quando as ftalocianinas estão agregadas, há o comprometimento do rendimento quântico de oxigênio singlete produzido, diminuindo a eficácia da TFD (KADISH, *et al.*, 2010). Para diminuir essas interações é importante substituir as posições α e β do anel aromático do grupo isoindol, o que além de dificultar a agregação, propicia um aumento de solubilidade desses compostos em solventes orgânicos (Figura 17).

Figura 17: Posições α e β da estrutura molecular da ftalocianina (GOBO, 2013).

1.5.5 Ftalocianinas Substituídas

As ftalocianinas substituídas surgiram com o objetivo de melhorar algumas características desses compostos, como eficiência na TFD, redução da agregação e aumento da solubilidade. A partir da modificação dos anéis isoindóis é possível fazer conjugações com

moléculas biológicas, como anticorpos e peptídeos, e produzir ftalocianinas de 3ª geração que apresentam seletividade ao tecido alvo de interesse (AGOSTINIS, *et al.*, 2011; ALLISON, SIBATA, 2010; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

De modo geral, as ftalocianinas podem apresentar as seguintes substituições: tipo-A₃B, tipo-ABAC, tipo-ABAB, tipo-AABB como representado na Figura 18 (WANG,2012).

Figura 18: Representação das substituições que podem ocorrer nos compostos ftalocianícos (WANG,2012).

A substituição do tipo-A₃B será abordada neste trabalho e por isso será destacada. Normalmente, para a síntese desses compostos (tipo-A₃B) utiliza-se o método de condensação estatística na razão 3:1 ou 9:1, partindo de três subunidades isoindóis iguais (A) e uma diferente (B), podendo obter seis possibilidades de produtos finais (Figura 19). A razão estatística entre os reagentes pode variar dependendo das propriedades do substituinte utilizado. Embora este método tenha sido bastante reportado na literatura, há uma grande dificuldade de purificação do produto formado, já que se trata de uma mistura de estruturas químicas similares.

Figura 19: Possibilidades de ftalocianinas substituídas formadas pelo método de condensação estatística com substituições do tipo- A₃B.

1.6 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um mediador endógeno que tem sido bastante estudado devido sua função na química de inúmeros processos fisiológicos do organismo e suas aplicações terapêuticas. Está presente em atividades do sistema imunológico, regulação cardiovascular, participação como neurotransmissor em células de memória e ainda apresenta citotoxicidade às células tumorais dependendo da concentração (Dawson, *et. al.*, 1992; Feldman, *et. al.*, 1993; Ignarro, *et. al.*, 1989; MONCADA, *et. al.*, 1991; HIGGS, *et. al.*, 1991; MacMicking, *et. al.*, 1997).

A produção endógena de NO se dá a partir da conversão do aminoácido L-arginina para L-citrulina, sob ação catalítica da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), na qual há a liberação de NO (MONCADA, HIGGS, 1993; ZAGO, ZANESCO, 2006) (Figura 20). A enzima NOS possui diferentes isoformas, constitutivas e indutível. As isoformas constitutivas são a Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS), presente na regulação da vasodilatação e a Óxido Nítrico Sintase Neural (nNOS), envolvida nos processos de memória. Essas isoformas geram baixas concentrações de NO de maneira constante no ambiente celular. Já a isoforma Óxido Nítrico Sintase Indutível (iNOS), pode produzir NO em mais altas concentrações,

durante um intervalo de tempo maior e é expressa em uma variedade de células em resposta a estímulos inflamatórios (MIRANDA, et. al., 2000).

Figura 20: Esquema ilustrativo da produção de NO a partir da conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima NOS (ZAGO, ZANESCO, 2006).

Uma vez produzido, o NO pode sofrer uma série de reações químicas, o que frequentemente resulta na formação de Espécies Reativas de Nitrogênio e Oxigênio (ERONs), gerando diversos efeitos no sistema biológico que podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos. Nos efeitos diretos o NO interage diretamente com biomoléculas como a enzima guanilato ciclase solúvel, enzima catalase, citocromo P-450 e o DNA. Normalmente a interação que ocorre é entre o NO e o grupo heme (Fe^{+2}) dessas moléculas, é rápida e provoca diferentes tipos de respostas *in vivo*. Já os efeitos indiretos, envolvem outros ERONs, que são derivados de reações entre NO e O_2 ou ânion superóxido (O_2^-), que por sua vez produzem outros radicais livres e provocam o estresse oxidativo e nitrosativo celular. Para ocorrer os efeitos indiretos é necessária maior concentração de NO que para os efeitos diretos. Portanto o NO produzido em baixa concentração e em curtos intervalos de tempo vão favorecer os efeitos diretos, enquanto que os efeitos indiretos irão ocorrer em uma região onde a concentração de NO é maior e sustentado por um período de tempo prolongado (MIRANDA, et. al., 2000) (Figura 21).

Figura 21: Efeitos diretos e indiretos produzidos pelo Óxido Nítrico (Adaptado de (MIRANDA, *et. al.*, 2000).

Conforme observado, é necessária a regulação intracelular da concentração do NO para que não ocorra oxidação de outras moléculas quando este está presente em altas concentrações (FRANCO, 2014). A concentração é controlada pelo consumo mitocondrial e por moléculas sequestradoras (“*scavengers*”) como a oxiemoglobina (WINK, 1996).

A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro nos processos biológicos. Difunde-se pelas células tanto em meio lipofílico quanto hidrofílico, não dependendo de transportadores específicos e nem de canais de passagem intracelulares. Sua ação fisiológica se dá devido suas propriedades físico-químicas (FELDMAN *et al.*, 1993).

Sua ação rápida com as moléculas orgânicas ocorre devido à configuração eletrônica do NO, $(\sigma_{1s})^2(\sigma_{1s}^*)^2(\sigma_{2s})^2(\sigma_{2s}^*)^2(\sigma_{2p}, \pi_{2p})^6(\pi_{2p}^*)^1$, uma espécie diatômica, paramagnética e com um elétron desemparelhado no orbital pi antiligante (π^*), o que torna a molécula extremamente passível de reagir com radicais orgânicos que apresentem elétrons desemparelhados (FRANCO, 2014).

Atribuem-se as ações bioquímicas do óxido nítrico à diversidade de suas espécies, ou seja, a espécie NO^+ (íon nitrosônio), que é formada pela retirada do elétron desemparelhado no orbital π^* , e a espécie NO^- (ânion nitróxido), que é formada pela adição de um elétron ao orbital. O ânion nitróxido é isoeletrônico ao gás oxigênio (O_2) e pode existir no estado singleto, de maior energia ou no estado tripleto, de menor energia. O íon nitrosônio é isoeletrônico ao monóxido de carbono (CO) e reage rapidamente com água e outros nucleófilos (WINK *et al.*, 1993).

Uma área de pesquisa bastante explorada sobre a bioquímica do NO nas últimas décadas está relacionada com sua ação vasodilatadora. Em 1987, constatou-se ser o NO o

fator de relaxamento endotélio dependente (FRED). Uma vez produzido pela eNOS, o NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel e provoca uma cascata reacional que culmina no relaxamento do endotélio (ZAGO, ZANESCO, 2006).

Atualmente, estudos estão sendo realizados para se compreender o mecanismo de ação do NO no câncer. Dependendo da variedade das condições do meio intracelular, do tipo de célula alvo, da concentração de NO e da presença de outras espécies radicalares, o NO pode ter atuação tanto na carcinogênese e progressão tumoral quanto na terapia anticâncer (WELLER, 2003; CHIANG, *et al.*, 2005). A atividade biológica parece depender diretamente dos níveis de NO na célula, já que a resposta apoptótica celular parece influenciar significativamente o potencial redox celular. Estudos verificaram que altas concentrações de NO promovem um efeito tumoricida (morte celular), enquanto que baixas concentrações podem ativar mecanismos de proteção celular anti-apoptose provocando um efeito tumorogênico (WINK, 2008) (Figura 22). Sob influência citotóxica do NO, as células tumorais podem morrer por apoptose ou necrose dependendo do tipo de célula (KRÖNCKE *et al.*, 1997).

Figura 22: Efeitos tumorigênicos e tumoricida do óxido nítrico dependentes da concentração (WINK, 2008).

Em 1998, GUPTA e colaboradores demonstraram a produção de NO a partir do processo de fotossensibilização de células tumorais utilizando-se uma ftalocianina como sensibilizador, e sugeriram o mecanismo de apoptose que a TFD pode estar envolvida. A TFD pode levar a um aumento da liberação intracelular de Ca^{+} . A enzima NOS é cálcio-dependente e, portanto, com a TFD, há um aumento rápido e significativo da enzima NOS proveniente do

aumento da concentração de Ca^{+} . Consequentemente, há uma maior produção de NO intracelular, que por sua vez, induzirá o processo de apoptose (GUPTA, 1998).

Estas descobertas recentes têm estimulado o interesse na química e bioquímica do NO levando ao desenvolvimento de novas drogas para a medicina. Como foi visto a atividade biológica do NO é dependente da sua concentração. Porém, apresenta como fator limitante a instabilidade em meio biológico e um curto tempo de meia vida (aproximadamente 5 segundos), tornando-se difícil o estudo de seus efeitos fisiológicos. Assim, há a necessidade iminente de compostos químicos que possam servir de pró-drogas para controlar sua liberação nos sistemas biológicos (WORKS *et al.*, 2002). Complexos de coordenação são compostos bastante promissores para este fim, uma vez que podem ser produzidos de forma pura e estável e apresentam a propriedade de liberar o NO através de processos fotoquímicos e/ou redutimétricos (ROY *et al.*, 1994; IGNARRO, 2000; IGNARRO *et al.*, 1999, TOGNIOLO *et al.*, 2001; SAUAIA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; BONAVENTURA *et al.*, 2004; SAUIAIA *et al.*, 2005 a,b; DE LIMA *et al.*, 2005a,b).

1.7 COMPLEXOS METÁLICOS E SUAS APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS

No contexto da química, o termo “complexo” significa um átomo central rodeado por uma série de ligantes. O átomo central é um centro metálico que exerce a função de um ácido de Lewis capaz de receber elétrons, o qual se combina com ligantes que atuam como base de Lewis capazes de doar elétrons. Os elementos metálicos são os mais abundantes entre os elementos e são representados pelos blocos *s*, *d*, *f* e alguns elementos do bloco *p* (alumínio, gálio, índio, tálio, estanho, chumbo e bismuto). De modo geral, uma das características mais importantes dos metais é a tendência na estabilidade dos estados de oxidação dentro de cada bloco, o que permite a obtenção desses metais a partir de seus minérios e o manuseio em laboratório. Os metais do bloco *d* apresentam estrutura rígida e uma ampla gama de estados de oxidação, conduzindo a extensa formação de compostos de coordenação e organometálicos bem como o importante papel em processos bioquímicos (SHRIVER, ATKINS, 2003).

O uso de metais em aplicações na medicina teve início há muitos anos atrás. O cobre era utilizado para esterilizar água há 3000 anos a.C. e o ouro era empregado na fabricação de medicamentos na Arábia e na China há 3500 anos (THOMPSON, ORVIG, 2003). A Química Inorgânica Medicinal teve suas origens em 1908 quando Paul Ehrlich, fundador da quimioterapia, recebeu o prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia, introduzindo os primeiros

estudos de relação estrutura atividade, utilizando complexos metálicos de Arsênio. As principais características das estruturas geométricas dos complexos de metais *d* foram elucidadas por Alfred Werner, o primeiro químico inorgânico a receber um prêmio Nobel em 1913 (SHRIVER, ATKINS, 2003; BERALDO, 2005).

O desenvolvimento de complexos metálicos para fins terapêuticos envolve a modelagem molecular com o delineamento de algumas etapas como a hidrólise do composto, ligação com sítio protéico, transporte pela membrana e a interação com o alvo molecular. Essas etapas são de extrema importância para a absorção do fármaco no organismo, possibilitando sua aplicação farmacológica (SCHWIETERT & McCUE, 1999). Exemplos que podem ser citados para esta finalidade incluem compostos de ouro no tratamento de artrite reumatóide, antidiabéticos constituídos de vanádio, zinco e cobre, compostos de prata utilizados como agentes antimicrobianos, carbonato de lítio para transtorno bipolar e compostos de mercúrio aplicados como diuréticos (BERNERS-PRICE & SADLER, 1996; BAKHTIAR & OCHIAI, 1999; ALLARDYCE & DYSON, 2001; SHRIVER, ATKINS, 2003).

Além disso, pode-se destacar compostos de platina como a cisplatina e seus análogos (carboplatina e oxaliplatina), utilizados no tratamento de câncer de ovário, cabeça e pescoço, bexiga, cervical e linfomas (SADLER, RIJT, 2009). Atualmente os compostos de platina são bastante utilizados como agente quimioterápico, cujo mecanismo de ação se deve à sua ligação ao DNA da célula tumoral, promovendo uma cascata de reações que culminarão na morte celular por apoptose. Apesar de bastante empregada no tratamento do câncer, a terapia com esses compostos apresenta severos efeitos colaterais ao paciente, como náusea, supressão da medula óssea e toxicidade aos rins (SADLER, RIJT, 2009). Devido a essas limitações, novos complexos metálicos anticâncer têm sido estudados.

Metalodrogas que apresentam o rutênio no centro metálico vêm ganhando importância devido à baixa toxicidade do metal e à habilidade de atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico, o que confere uma boa aplicação clínica. Alguns autores acreditam que semelhança das propriedades físico-químicas do rutênio com as do ferro permite o organismo se proteger dos efeitos causados por um excesso destes metais. Acredita-se que proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina, podem regular o excesso desses metais no organismo, evitando a toxicidade. (ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Além disso, compostos contendo Ru^{II} e Ru^{III} são considerados ótimos candidatos anticâncer por exibirem uma cinética de ligação semelhante a da platina, podendo atuar no DNA das células tumorais com o mesmo mecanismo de ação da cisplatina. Alguns complexos

de rutênio (III) em fase de estudo que podem ser citados como agentes promissores anticâncer são o *trans*-[RuCl₄(DMSO)(Im)]ImH (NAMI-A, onde Im=imidazol, figura 23-A) e *trans*-[RuCl₄(Ind)₂]IndH (KP1019, onde Ind=indazol, figura 23-B). NAMI-A é mais ativo contra metástase que tumores primários enquanto KP1019 apresenta maior atividade contra tumores primários. Acredita-se que a atividade desses complexos é dependente da redução *in vivo* do Ru(III) para a espécie mais ativa Ru(II) (SADLER, RIJT, 2009).

Figura 23: Exemplos de complexos de rutênio em estudo para atividade anticâncer. A) NAMI-A e B) KP1019 (adaptado de SADLER, RIJT, 2009).

Alguns complexos nitrosilos também apresentam aplicação terapêutica e têm sido pesquisados desde o século XIX. (SZCZEPURA & TAKEUCHI, 1990). O nitroprussiato de sódio, Na₂[Fe(CN)₅(NO)].2H₂O, é um exemplo de complexo metálico que contém o ligante nitrosil na esfera de coordenação do metal, o qual uma vez liberado, apresenta ação vasodilatadora tendo importante papel no controle da pressão arterial (MONCADA *et al.*, 1991; STOCHEL *et al.*, 1998). No entanto, este composto é aplicado apenas em casos de emergência, pois tem como fator limitante a liberação do cianeto (CN⁻), uma reação secundária àquela de interesse (STOCHEL, 2009).

Buscam-se alternativas para o controle da liberação seletiva de NO a partir de compostos de coordenação para que se tornem viáveis clinicamente. A indução luminosa e a redução eletroquímica do NO⁺ coordenado são importantes estratégias que levam em consideração a baixa afinidade observada entre o ligante NO⁰ e alguns íons metálicos. Nesse sentido, a fotoquímica e os processos eletroquímicos são fundamentais para modular diferentes processos bioquímicos.

A procura de complexos nitrosilos de rutênio capazes de liberar NO no organismo através de um fotoestímulo é bastante intensa (CARLOS *et al.*, 2004; FORD & LAVERMAN, 2005). Visando esta perspectiva, FLITNEY *et al.* (1996) conduziram experimentos fotoquímicos a uma classe especial de complexos metálicos, clusters do tipo $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{NO})_4]$ e $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$. Nesse experimento, os complexos foram submetidos à irradiação em determinados comprimentos de onda e foi demonstrado que o mecanismo de liberação do NO dependia da presença de oxigênio no meio. TOGNIOLO *et al.* (2001) descreveram estudos espectroscópicos e fotoquímicos do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_2^+$, mostrando a liberação de NO em meio aquoso quando irradiado com laser em 355 nm ($\phi_{\text{NO}} = 0,98 \text{ mol einstein}^{-1}$). OLIVEIRA *et al.* (2004) relataram a síntese e as propriedades físico-químicas e fotoquímicas da espécie *trans*- $[\text{RuCl}([15]\text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$ em tampão fisiológico (pH = 7,4), a qual quando irradiada em 355 nm, produzia NO e a espécie *trans*- $[\text{RuCl}([15]\text{aneN}_4)\text{H}_2\text{O}]^+$.

A fim de aplicar essas metalodrogas para uso terapêutico, é preciso relacionar as propriedades químicas com o mecanismo de ação desses complexos em sistemas biológicos. Neste contexto, o trabalho desenvolvido pelo grupo do Prof. Roberto Santana da Silva (TFOUNI *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005; SAUAIA *et al.*, 2005; BONAVENTURA *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2005; FERREZIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2004; SAUAIA *et al.*, 2003a; SAUAIA *et al.*, 2003b; SAUAIA & SILVA, 2003; TOGNIOLO *et al.*, 2001) visa contribuir para a descrição das propriedades físico-químicas de complexos nitrosilos de rutênio, para o controle da liberação do NO bem como sua importância nos processos fisiológicos. A grande limitação no uso desses complexos é que a grande maioria não apresenta bandas intensas na região de interesse clínico. Dentro desta perspectiva, uma boa alternativa é utilizar compostos já descritos para uso clínico e fazer a associação a compostos doadores de NO. Uma das possibilidades é utilizar ftalocianinas que apresentam o rutênio como centro metálico, propiciando a coordenação do ligante nitrosil dentro da esfera de coordenação.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo sintetizar diferentes espécies de ftalocianinas de rutênio, simétricas e assimétricas, a fim de estudar a produção de oxigênio singleto e sua citotoxicidade em células tumorais. Estes complexos aqui propostos, quando irradiados na região da janela terapêutica, propiciam a formação de espécies radicalares de oxigênio e nitrogênio o que levaria a possibilidade de aplicação clínica através da Terapia Fotodinâmica. Ainda, a presente proposta visa utilizar os complexos de rutênio-ftalocianina como doadores de NO, promovendo um efeito sinérgico entre a liberação do NO e a produção de oxigênio singleto aumentando a eficiência citotóxica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e purificação dos complexos rutênio-ftalocianina {[Ru(Pc-R)]} e ftalonitrilos da figura 24.
- Caracterização espectroscópica dos compostos sintetizados (Figura 24) por:
 - Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível
 - Espectroscopia na região do Infravermelho
 - Espectrometria de massas
 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
- Reatividade fotoquímica dos compostos rutênio-ftalocianina descritos na figura 24.
- Avaliação fotobiológica *in vitro* em linhagem de células celulares, dos compostos rutênio-ftalocianinas descritos na figura 24.
- Análise de internalização dos compostos em estudos por microscopia de fluorescência.

Figura 24: Estrutura dos complexos de rutênio-ftalocianinas e ftalonitrilos idealizados neste trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

A tabela 3 representa os reagentes e solventes utilizados para os procedimentos experimentais.

Tabela 3: Procedência dos reagentes utilizados durante a síntese e caracterização dos complexos.

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Acetato de etila	Sigma-Aldrich
Ácido nítrico	Synth
Ácido acético	Synth
Ácido 4-hidroxibenzóico	Sigma-Aldrich
Ácido trifluoracético (TFA)	Sigma-Aldrich
Alumina (Al_2O_3)	Sigma-Aldrich
1,2-dicianobenzeno	Sigma-Aldrich
Carbonato de potássio anidro (K_2CO_3)	Synth
Cloreto de rutênio(III) ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Clorofórmio (CHCl_3)	Synth
Cobre metálico (Cu^0)	-----
1,8-Diazobiciclo [5.4.0] undec-7eno (DBU)	Sigma-Aldrich
Diclorometano (CH_2Cl_2)	Sigma-Aldrich
4,5-dicloroftalonitrila	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich
2,5-dimetilfenol	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth
Etanol	Synth
Hexano	Synth
Hidróxido Potássio	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich

Pentanol	Synth
Metanol (CH ₃ OH)	Synth
4-02,Nitroftalonitrila	Sigma-Aldrich
Sílica Gel (SiO ₂)	Sigma-Aldrich
Sílica Flash (SiO ₂)	Sigma-Aldrich
Sulfato de Sódio (Na ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofurano (THF)	Sigma-Aldrich
Tolueno	Sigma-Aldrich

3.2 SÍNTESE DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO E PRECURSORES

3.2.1 Destilação do Pentanol

O solvente pentanol deve ser destilado a fim de se eliminar qualquer molécula de água presente no meio reacional. Para isso, utilizou-se o esquema de destilação fracionada demonstrado na figura 25. Em um balão de 250 mL foi adicionado 100 mL de pentanol P.A. O balão com o solvente foi acoplado a um termômetro e ao sistema de destilação, composto por uma coluna de Vigreux e um condensador. Esse sistema foi coberto com papel alumínio para evitar a perda de calor. Ao final do condensador, deverá ser acoplado quatro balões coletores (3 balões de 25 mL e 1 balão de 100 mL). Nos 3 balões de 25 mL serão coletados a água, enquanto que no balão de 100 mL será coletado o pentanol. Todo o sistema foi submetido a vácuo. A temperatura de aquecimento foi 130 °C.

O pentanol destilado foi armazenado em um frasco contendo peneira molecular previamente ativada.

Figura 25: Sistema utilizado para a destilação do pentanol.

3.2.2 Síntese do complexo ftalocianinarutênio(II) {[Ru(Pc)]}

O complexo ftalocianinarutênio(II) {[Ru(Pc)]} é o precursor do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] e teve sua síntese primeiramente descrita por HANACK E KOBEL (1986). O método foi então aprimorado por ROCHA *et al.*(2008), e reproduzida e estudada em nosso laboratório por CARNEIRO *et al.* (2011), e HEINRICH *et.al.* (2013). Foi montado um sistema de refluxo acoplado a um balão de 100 mL de 3 bocas (Figura 26). A este balão foram adicionados 0,6000 g (2,3 mmol) de cloreto de rutênio (RuCl₃.3H₂O) e 25 mL de pentanol previamente destilado (descrito em 3.2.1) sob atmosfera de argônio. O sistema foi aquecido a uma temperatura de 140 °C até que a coloração da solução que inicialmente é marrom mudasse para verde e, em seguida, azul. Foram adicionados com cautela e rapidamente, 3,4000 g (26,5 mmol) de 1,2 - dicianobenzeno e 10 gotas de 1,8-Diazobiciclo [5.4.0] undec-7eno (DBU). A mistura continuou sob agitação, temperatura de 140 °C, sob atmosfera de argônio durante 24 horas. Após o resfriamento obteve-se um produto impuro com uma mistura de sólido marrom e sólido esverdeado que foram filtrados a vácuo. A mistura foi lavada com clorofórmio, e apenas, o sólido esverdeado foi solubilizado, obtendo-se uma solução que posteriormente foi submetida à rotaevaporação, formando outra porção de sólido. Lavou-se sucessivas vezes tal sólido com uma solução de água:ácido acético (2:1) e filtrou-se novamente a vácuo. Para obtenção de um produto final purificado, utilizou-se uma coluna cromatográfica de alumina com a fase móvel diclorometano:metanol (10:1). Rendimento: 45,0 %.

Figura 26: Sistema utilizado para síntese do complexo [Ru(Pc)].

3.2.3 Síntese do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)]

Para a formação do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)], foram utilizados três balões (balão 1, de 50,0 mL e duas bocas; balão 2, de 50,0 mL e duas bocas; e balão 3, de 100 mL e 3 bocas) interligados como é mostrado na figura 27. No balão 1, colocou-se 25 mL de uma solução de 50 % HNO₃. No balão 2, 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH). No último balão, adicionou-se 0,1000 g ($1,63 \times 10^{-1}$ mol) do precursor [Ru(Pc)] e 32,0 mL de uma mistura de solventes clorofórmio:etanol:água (1:5:0,4). Todo o sistema foi fechado e submetido à atmosfera de argônio durante 20 minutos. Após esse período foram adicionadas 3 pastilhas de cobre no balão 1. Houve a reação entre o Cu e o HNO₃ produzindo o NO, o qual foi borbulhado no balão 2, e, conseqüentemente, no balão 3, onde se coordenou ao precursor. Terminada a produção de gás, o balão 3 foi desconectado do 2 e imediatamente tampado. A solução permaneceu sob agitação por 4 horas. Esse procedimento foi repetido três vezes em cada um dos três dias consecutivos. Ao término da reação, o solvente foi removido sob vácuo, e obteve-se um sólido isolado. Rendimento: 90,0 %.

Figura 27: Sistema de borbulhamento de óxido nítrico no precursor $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ para a formação do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$.

3.2.4 Síntese do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)

Esquema 1: Esquema sintético do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz).

O ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz) é precursor para a síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{pc-R}_1)]$. A síntese deste ligante foi adaptada de CHIDAWANYIKA, NYOKONG (2009) e o processo sintético pode ser visualizado no esquema 1. Em um balão

de duas bocas de 100 mL adicionou-se 40 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 3,5088g (25mmol) de carbonato de potássio anidro (K_2CO_3), 2,3604g (17,1 mmol) de ácido 4-hidroxibenzóico e 2,0020 g (11,5 mmol) de nitroftalonitrila. A solução permaneceu sob agitação, atmosfera de argônio e temperatura ambiente. Após 4 horas, foram adicionados mais 3,5 g (25 mmol) de K_2CO_3 . Após 20 horas a partir da primeira adição, foi adicionada a mesma quantidade novamente de K_2CO_3 à solução. A mistura ficou sob agitação, atmosfera de argônio e temperatura ambiente por mais 4 dias. Ao final da reação obteve-se um precipitado amarelo claro que foi filtrado. O sólido foi solubilizado em 600 mL de água formando uma solução, que teve o pH ajustado para 1 através da adição de HCl P.A. Houve formação de um sólido bege claro. Rendimento: 45% (Figura 28).

Figura 28: Processo sintético do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.

3.2.5 Síntese do complexo $[Ru(pc-R_1)]$ ($R_1 = DCBz$)

A síntese do complexo $[Ru(Pc-R_1)]$ foi idealizada com base em duas rotas sintéticas, sendo que a primeira foi denominada de Rota 1 e a segunda denominada Rota 2. Sua estrutura química pode ser visualizada na figura 29.

Figura 29: Estrutura molecular do complexo $[Ru(Pc-R_1)]$.

3.2.3.1 Síntese do complexo $[Ru(Pc-R_1)]$: Rota 1

A rota 1 foi desenvolvida de modo similar àquela descrita por D'SOUZA, ANTUNES, NYOKONG (2011). Em um balão de 3 bocas de 50 mL foi adicionado 0,0671 g (0,306 mmol) de cloreto de rutênio ($RuCl_3 \cdot 3H_2O$) em 15 mL de pentanol previamente destilado. A mistura permaneceu sob agitação, argônio e a 140 °C. Foi adicionado 0,1100 g (0,84 mmol) de 1,2-dicianobenzeno, 0,0660 g (0,28 mmol) do ácido 4-(3,4-dicianofenoxy) benzóico (DCBz) e 2 mL de DBU rapidamente. A reação ficou sob atmosfera de argônio, agitação e temperatura de 140 °C durante 24 horas. Após o término da reação, resfriou-se a mistura reacional e adicionou-se metanol, precipitando uma impureza. A solução foi filtrada e ao filtrado adicionou-se água destilada formando uma mistura azeotrópica (pentanol, metanol e água) que foi rotaevaporada. Após a redução até cerca de 1 mL, foi adicionado cerca de 10 mL de uma solução água:ácido acético (2:1), formando um precipitado azul esverdeado, o qual foi lavado sucessivas vezes com essa solução ácida (200 mL) e centrifugado, obtendo-se um sólido azul esverdeado. Este composto foi submetido à uma primeira purificação em coluna cromatográfica de sílica, utilizando-se a fase móvel diclorometano:metanol (10:1). Posteriormente, utilizou-se uma segunda coluna cromatográfica de sílica, com a fase móvel metanol com 0.005 % de TFA. A espécie $[Ru(Pc-R_1)]$ foi isolada pela eluição de uma fração azul, a qual foi submetida a rotaevaporação até secura. Rendimento: 3 %.

3.2.5.2 Síntese do complexo $[Ru(Pc-R_1)]$: Rota 2

Idealizou-se esta síntese a fim de se conseguir maior seletividade para a formação de uma ftalocianina substituída. A síntese consiste em duas etapas. Primeiramente na formação

de um reagente precursor, complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] , o qual será utilizado na próxima etapa que será de formação do complexo [Ru(Pc-R₁)].

3.2.5.2.1 Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂]

O esquema 2 representa a síntese do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂]. Em 10 mL de etanol seco adicionou-se 0,2000 g (4,12 mmol) de *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄], 0,1100 g (4,18 mmol) de ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico. Deixou-se sob refluxo e argônio por 8 horas. Após o término da reação deixou-se na geladeira por 12 horas, obtendo-se precipitado amarelo, o qual foi filtrado e lavado com 10 mL de éter e seco sob vácuo. Rendimento: 52 %

Esquema 2: Síntese do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂].

3.2.5.2.2 Síntese do complexo [Ru(Pc-R₁)] a partir do complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂]

Pesou-se 0,0450 g (0,076 mmol) do complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] sintetizado neste trabalho e solubilizou-o em 15 mL de pentanol previamente destilado aquecido. Deixou-se sob aquecimento e atmosfera de argônio por 30 minutos. Adicionou-se 0,0300 g (0,23 mmol) de 1,2-dicianobenzeno e 2 mL de DBU. Deixou-se sob refluxo (130 °C), agitação e argônio por 24 horas (Figura 30). Após o término da reação foi adicionado metanol suficiente para precipitação do produto. Obteve-se um sólido azul esverdeado, o qual foi lavado com uma solução de 50 mL de água:ácido acético (2:1). Foi feita a purificação em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando-se uma fase móvel em gradiente. A primeira fase móvel utilizada foi tetrahidrofurano(THF):tolueno (8:2), a segunda THF:tolueno (8:2)

com adição de 30 % de dimetilformamida (DMF) e a última fração foi eluída apenas com DMF. Rendimento: 10 %

Figura 30: Sistema utilizado para o processo da síntese do complexo *trans*-[Ru(Pc-R₁)].

3.2.6 Síntese 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX).

Esquema 3: Síntese do 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX).

O composto 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX) é precursor dos complexos [Ru(Pc-R₄)] e [Ru(Pc-R₁-R₃)] (descritos nos itens 3.2.7 e 3.2.8). Sua síntese pode ser representada no esquema 3 e foi idealizada a partir de MAREE AND NYOKONG, 2001, e realizada no Laboratório de Química Bio-orgânica (LQBO) da Universidade Federal de São

Carlos em colaboração com o Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira e o aluno de Doutorado Nicholas Roberto da Silva Gobo. Em um balão reacional de duas bocas, adicionou-se 0,4000 g (2,03 mmol) de 4,5-dicloroftalonitrila, 0,9920 g (8,12 mmol) de 2,5-dimetilfenol e 12 mL de DMSO anidro. Deixou-se o meio reacional a 90 °C e adicionaram-se 0,6000 g (4,34 mmol) de K₂CO₃ a cada cinco minutos por oito vezes. Neste ponto a solução foi deixada sob agitação, por 5 horas, a 90 °C, sob atmosfera de argônio.

Ao término do período reacional, a solução foi lavada com uma mistura de 1 mol/L de NaOH (100 mL) e CH₂Cl₂, sendo o produto extraído na fase orgânica. Utilizou-se Na₂SO₄ para secagem, filtrou-se e o solvente foi removido sob vácuo. O material obtido foi purificado por coluna cromatográfica com sílica flash utilizando gradiente de CH₂Cl₂ e Hexano (6:4) → CH₂Cl₂ como eluente, fornecendo um sólido branco. Rendimento: 89 %.

3.2.7 Síntese do complexo [Ru(Pc-R₄)] (R₄ = DMX)

Para a síntese do complexo [Ru(Pc-R₄)] (R₄ = DMX) (Figura 31), pesou-se 0,0660 g (0,136 mmol) de [RuCl₂(DMSO)₄] em 10 mL de pentanol anidro. Após atingir a temperatura de 130 °C, adicionou-se 0,2000 g (0,54 mmol) do composto DMX e 1,5 mL de DBU rapidamente. A reação permaneceu sob agitação, aquecimento (130 °C) e atmosfera de argônio durante 24 horas. Ao término da reação, adicionou-se metanol e observou-se a formação de um precipitado azul esverdeado. O sólido foi filtrado, coletado e purificado em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando-se como fase móvel o gradiente diclorometano:acetato de etila. Iniciou-se a eluição apenas com diclorometano, em seguida utilizou-se a proporção diclorometano:acetato de etila (9,5:0,5), de modo que a proporção de acetato de etila aumentasse gradativamente até que ao final da eluição fosse utilizado apenas acetato de etila. Rendimento: 60 %.

Figura 31: Estrutura molecular do complexo [Ru(Pc-R₄)].

3.2.8 Síntese do complexo [Ru(Pc-R₁-R₃)] (R₁= DCBz e R₃ = DMX)

A síntese do complexo [Ru(Pc-R₁-R₃)] (R₁= DCBz e R₃ = DMX) (Figura 32) foi desenvolvida de modo similar àquela descrita por D'SOUZA, ANTUNES, NYOKONG (2011). Em um tubo selado adicionou-se 2 mL de pentanol anidro, 0,0205 g (0,099 mmol) de RuCl₃.3H₂O. Deixou-se agitando por 1 hora, a 130°C, sob atmosfera de argônio até que a solução ficasse azul. Adicionou-se 0,1000 g (0,27 mmol) do ftalonitrilo DMX e 0,0240 g (0,09 mmol) do ftalonitrilo DCBz, ambos sintetizados neste trabalho e descritos anteriormente, e 5 gotas de DBU. Após adição dos reagentes, o sistema foi rapidamente fechado com o septo específico para o tubo selado. Deixou-se reagindo por 24 horas a 130 °C.

Após este período, formou-se um produto de coloração esverdeada, o qual foi extraído com a mistura tolueno:H₂O (1:2). A fase orgânica foi coletada, seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente orgânico foi removido sob vácuo. O material obtido foi purificado em coluna cromatográfica com sílica flash, utilizando a fase móvel por gradiente. Primeiro a eluição foi realizada com diclorometano apenas. Após coletar a primeira fração, utilizou-se a fase móvel diclorometano:acetato de etila (9,5:0,5) e após, coletar a segunda fração, a proporção de acetato de etila foi aumentando gradativamente, até que se chegasse a 100% de acetato de etila para coletar a terceira fração. Rendimento: 5 %.

Figura 32: Estrutura molecular do complexo $[Ru(Pc-R_1-R_3)]$ ($R_1 = DCBz$ e $R_3 = DMX$).

3.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

A caracterização dos compostos sintetizados neste trabalho foi realizada no equipamento de espectrofotômetro Agilent 8453, com varredura na região de 200 e 800 nm. Utilizou-se como material uma cubeta de quartzo de 1,0000 cm de caminho óptico.

3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

As análises dos compostos na região do infravermelho foram realizadas no equipamento de Espectrofotômetro IR Prestige 21 Shimadzu. Para preparação das amostras, que foram analisadas no estado sólido, utilizou-se pastilhas de Brometo de Potássio (KBr).

3.5 ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA

Os espectros de excitação e emissão dos compostos foram realizados no espectrofluorímetro RF – 5301PC Shimadzu, utilizando-se cubetas de quartzo com 1,000 cm de caminho óptico e com as quatro faces polidas. As condições experimentais, tais como solvente, fenda e varredura, variaram de acordo com o composto estudado e serão apresentados nos resultados e discussão.

3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

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

Algumas amostras foram realizadas no equipamento MALDI-TOF/TOF Ultraflexreme (Bruker Daltonics). A matriz utilizada foi o ácido 2,5-diidróxibenzóico (DHB), o qual foi preparado na concentração de 20 mg/mL em acetonitrila e água deionizada contendo 0,1 % de ácido trifluoroacético na proporção de 3:7 (v/v). Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros foram: 1000 laser shots por espectro, PIE (*Pulsed ion extraction*) de 100 ns, modo positivo, frequência de laser de 1000 Hz e modo negativo de ionização. A voltagem de IS1 e IS2 aplicadas foram de 20 kV e 18,05 kV, respectivamente. O modo refletor foi utilizado, sendo aplicado as voltagem em RV1 e RV2 de 21,3 kV e 10,7 kV. Para a calibração externa e do equipamento foi utilizado uma mistura de peptídeos da marca Bruker.

3.7 DETERMINAÇÃO INDIRETA DE OXIGÊNIO SINGLETO - $^1\text{O}_2$

A detecção do oxigênio singleto foi realizada por um método espectrofotométrico de forma indireta. Utilizou-se 1,3-difenilsobenzofurano (DPBF) como sonda (TADA et. al. 2007). As amostras foram preparadas imediatamente no momento do experimento. Soluções contendo os complexos de rutênio-ftalocianinas foram preparadas em 2 mL de DMSO, de modo que a absorção na região em 660nm dessas soluções fossem 0,3. Foi preparada também uma solução estoque de DPBF (8,00 mM). Houve a transferência de 10,0 μL da solução estoque de DPBF para a solução de 2 mL de rutênio-ftalocianina, e o espectro de absorção eletrônica inicial dessa solução foi medido. A solução foi irradiada em um comprimento de onda de 660 nm, em cubeta de quartzo, durante intervalos de tempo de 1 segundo para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ e $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ e 4 segundos para $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$. A cada irradiação o espectro de absorção eletrônica era medido novamente. O experimento foi realizado em triplicata, em temperatura ambiente e sala escura. O laser utilizado foi o laser de diodo marca Colibri da Quantum tech, e os espectros de absorção foram obtidos através de um espectrofotômetro UV-visível-NIR Hitachi modelo U-3501.

3.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H foram realizados num espectrômetro do tipo Bruker Avance 400 a 400,15 MHz, utilizando CDCl_3 e DMSO-d_6 como solvente sendo o TMS a referência interna.

3.9 ESTUDOS PRELIMINARES DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.9.1 Equipamentos

3.9.A. Fluxo laminar vertical Pachane® Equipamentos para Laboratório Ltda, modelo: Pa 300. S/N: 30511, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.9.B. Estufa Thermo Fisher Scientific, modelo: 3110 S/N: 319400-36444.

3.9.C. Leitor de Elisa Thermo Plate TP-READER S/N: 501314037 FSE.

3.9.D. Banho-Maria modelo CT 245-9, S/N: 1101005, Cientec Equipamentos para Laboratório Ltda. Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.9.E. Centrífuga modelo KC4 S/N: 0910001058, Kindly Indústria e Comércio de Equipamentos Médicos – Jaguaré, São Paulo, Brasil.

3.9.F. Microscópio Biológico invertido binocular modelo 67301, S/N: 09080057, QUIMIS®, Diadema, São Paulo, Brasil.

3.9.2 Reagentes

Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline (PBS)

Para o preparo do PBS foram necessários 2,0000 g de KH_2PO_4 ; 17,8000 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou 14,2000 g de Na_2HPO_4 ; 2,0000 g de KCl; 80,0000 g de NaCl. Os sais foram adicionados a um becker de 1 L, adicionou-se aproximadamente 900 mL de H_2O destilada sob agitação para total dissolução dos sais. O pH foi então ajustado ($\text{pH} = 7.4$) por meio do uso de solução de HCl 1M ou NaOH. Feito isso, a solução foi transferida para um

balão volumétrico de 1L e completou-se com água destilada. Todo procedimento fora realizado em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (RAMOS, 2012).

Solução de [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (MTT)

[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] 5 mg para 1mL de água destilada (RAMOS, 2012).

Tripsina-EDTA

Tripsina-EDTA (0,125% de tripsina e 0,02% de EDTA Gibco, USA) (RAMOS, 2012).

3.9.3 Materiais

3.9.3.1 Material biológico ou material celular

Para a realização dos ensaios *in vitro* apresentados nesse estudo utilizou-se diferentes linhagens tumorais, as células de cancro de mama humano (MCF7) e melanoma murino (B16F10) as quais foram adquiridas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

No presente estudo as células da linhagem B16F10 foram utilizadas como modelo de células tumorais, uma vez que essa linhagem constitui um modelo biológico muito útil no estudo do melanoma, devido a facilidade de cultivo *in vitro* bem como a possibilidade de ser avaliadas quando injetadas por diferentes vias *in vivo*.

Por apresentar a capacidade de invadir a circulação e induzir metástases, o uso das células B16F10 possibilita o acompanhamento da evolução e contribui para o estudo de alternativas de tratamento do melanoma maligno metastático (RAMOS, 2012).

Considerando a influência do tipo celular para o efeito citotóxico avaliou-se também os diferentes complexos sintetizados sobre as células MCF7.

3.9.3.2 Meios de cultivos de cultura de células

No cultivo das células das linhagens B16F10 e MCF7 utilizou-se o meio de Cultura RPMI-1640 (Sigma-aldrich® com 25 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio). Para o preparado do meio o conteúdo de um envelope foi adicionado em aproximadamente 900 mL de água, posteriormente foi feita a adição de 4,5000 g de glicose e 1,5000 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, o pH da solução foi ajustado a 7.4,

acrescentados penicilina (10.000 Ui) e estreptomicina (10 mg/mL) como antibióticos, anfotericina B (Gibco, USA) como antimicótico (25 µg/mL) e 5 % de soro fetal bovino (SFB-Gibco, USA), e o volume completado para 1 L. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm filtro e recolhido em frasco estéril.

3.9.4 Métodos

3.9.4.1 Manutenção das células B16F10 e MCF7

A partir de uma garrafa de cultura de 25 cm³ contendo uma monocamada de células confluentes, outras garrafas foram preparadas para manutenção do cultivo celular com base no seguinte procedimento: retirou-se o meio da garrafa, adicionou-se 4 mL de PBS 1 X (0,01 M) para lavagem, o qual foi retirado sendo adicionados posteriormente 4 mL de solução de Tripsina-EDTA 1 X. Em seguida a garrafa foi levada à estufa, na qual permaneceu por tempo padronizado de 5 minutos.

Após esse período avaliou-se por meio do uso do microscópio se o processo de desprendimento das células que se encontravam aderidas na parede da garrafa de cultura fora de fato efetivo.

A suspensão celular obtida foi recolhida em tubo falcon de 15 mL contendo meio RPMI completo e centrifugadas por 5 minutos a 1000 r.p.m. a fim de colher-se um *pellet* de células (Figura 33), descartando-se todo o sobrenadante.

Figura 33: Tubo *falcon* contendo meio RPMI e pellet de células B16F10.

O *pellet* formado foi novamente suspenso em meio RPMI com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e alíquotas dessa suspensão celular foram por fim transferidas para novas garrafas de cultura já contendo o meio cultura utilizado no cultivo.

Os cultivos celulares foram mantidos em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂. Estas condições foram padronizadas para o cultivo das células durante todos os ensaios. As garrafas foram supervisionadas diariamente em microscópio e a troca do meio de cultura realizada a cada 2 dias.

O número de garrafas de cultura preparadas variou de acordo com o tipo e concomitância dos experimentos realizados.

3.9.4.2 Ensaios de Citotoxicidade

Quando as células atingiram aproximadamente 90 % de confluência nas garrafas de cultura foram realizados os seguintes procedimentos: retirou-se o meio de cultivo e adicionou-se 5 mL de PBS 0,01 M para lavagem, feito isso o PBS foi retirado e adicionou-se 5 mL de solução de Tripsina-EDTA (0,125 % de tripsina e 0,02 % de EDTA Gibco, USA) para que as células fossem soltas, após essa adição as garrafas permaneceram em estufa a 37 °C por 5 minutos. A suspensão celular obtida foi recolhida e centrifugada com quantidade equivalente de meio RPMI completo por 10 minutos a 1000 r.p.m. Posteriormente a centrifugação foi realizada a contagem do número de células em câmara de Neubauer, as células foram distribuídas em 200 µL de meio com 2×10^4 células em cada poço em placas de cultura celular com 96 poços cada. Após 24 horas de incubação em estufa para a adesão das células retirou-se o meio e foram adicionados os tratamentos com os diferentes complexos rutênio-ftalocianinas para o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.

3.9.4.3 Determinação da citotoxicidade na ausência e presença de luz

A fim de se avaliar a influência do estímulo luminoso sob a citotoxicidade dos compostos utilizou-se o seguinte procedimento: as células foram distribuídas em placas de cultura celular com 96 poços (2×10^4 células em cada poço) e em seguida incubadas por 24 horas em estufa, após esse período as placas foram retiradas da estufa, o meio de cultura foi trocado e adicionado o meio RPMI sem vermelho de fenol juntamente com os complexos a serem avaliados.

Após 4 horas de incubação as placas foram retiradas da estufa e submetidas à irradiação utilizando-se um sistema constituído por um conjunto de LEDs distribuídos uniformemente no formato da placa de cultura, cuja intensidade de irradiação foi determinada

pelo radiômetro USB4000 (Ocean Optics, USA) no Laboratório de Radiometria Ótica e Dosimetria do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Os tempos de irradiação foram ajustados de modo a obter fluências de 2,97; 5,95 e 8,93 J/cm². Os tempos de irradiação, incubação, dose e comprimentos de onda de irradiação utilizados encontram-se descritos para cada ensaio no item 4.7.

Cabe destacar que para cada experimento utilizou-se um controle seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, avaliando os compostos na ausência de estímulo luminoso.

3.9.4.4 Análise da viabilidade celular: ensaio por MTT

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico comumente utilizado para avaliar a capacidade das enzimas mitocondriais em reduzir o [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] - MTT ($\lambda_{\text{máx}} = 600 \text{ nm}$; cor amarelada) ($\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$; cor amarelada) a formazan, um produto de coloração violácea ($\lambda_{\text{máx}} = 470 \text{ nm}$), solúvel em solventes orgânicos (Figura 34).

O princípio deste método consiste no fato de que células vivas, em crescimento têm mitocôndrias competentes (promovendo a respiração celular), portanto irão converter o MTT em um produto corado violeta. Já nas células mortas, ou em processo de morte celular essa função mitocondrial encontra-se comprometida, não havendo, portanto, conversão do MTT a formazan.

Com base nessas considerações a intensidade de coloração permite a determinação da quantidade de células viáveis.

Figura 34: Representação da reação de redução do MTT a formazan.

Para a determinação do efeito dos complexos de rutênio sob a viabilidade celular das células tumorais após o tratamento com os mesmos, a cada um dos poços, foram adicionados

20 μL de solução de MTT na concentração final de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, após essa adição 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 sendo adicionados posteriormente 200 μL de DMSO para solubilizar o precipitado formado pela redução do MTT.

A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) e a porcentagem de viabilidade celular calculada de acordo equação 1.

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{D.O. experimento} / \text{D.O. controle}) \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

3.9.4.5 Localização Subcelular: Microscopia de Fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas em Microscópio Nikon Eclipse Ti Microscópio Nikon Eclipse (Modelo TI-FL). Para realização desses experimentos os complexos de rutênio foram avaliados em células B16F10 e MCF7, na concentração de 20 μM por 4 horas de incubação. Para a marcação foram utilizados o Hoechst (marcador de núcleo, Sigma-Aldrich®) e a Rodamina 123 (marcador de mitocôndrias, Sigma-Aldrich®) ambos na concentração de 5 Mm .

As imagens foram obtidas em campo claro e de fluorescência utilizando-se os filtros cianina 5 (Cy5) com excitação em 620/660 nm e emissão 662,5/737,5 nm e DAPI com excitação 340/380 nm e emissão 435/485 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho consiste essencialmente na síntese, purificação, caracterização e aplicação biológica de compostos que produzem oxigênio singlete para atuarem na terapia contra o câncer. A presente proposta é sintetizar compostos do tipo rutênio-ftalocianinas substituídas para, além de avaliar a citotoxicidade, comparar o rendimento de produção de oxigênio singlete produzido por essas espécies. Efeito sinérgico do NO e oxigênio singlete fora também avaliado, para um dos compostos sintetizados, na expectativa de compreender se há efeito corroborativo dos radicais produzidos, no que tange a aumento da eficiência citotóxica.

4.1 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

4.1.1 [Ru(Pc)]

Complexo [Ru(Pc)]: Síntese

A síntese do complexo [Ru(Pc)] foi obtida através da reação entre o $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,2 – dicianobenzeno e DBU, a 140°C e sob atmosfera de argônio. A formação da ftalocianina se deve ao ataque nucleofílico de uma base (pentanol) ao carbono da nitrila do ftalonitrilo que estará em excesso no meio reacional, propiciando uma reação de ciclotetramerização. O DBU é utilizado como catalisador da reação. Para a obtenção do produto desejado, é muito importante que o metal esteja no estado de oxidação Ru(II) . Para isso, antes da adição dos reagentes, o $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ é deixado sob agitação, atmosfera de argônio e aquecimento com o solvente pentanol até que a coloração da reação passe de marrom para azul. Essa mudança colorimétrica ocorre devido à reação de redução do rutênio, na presença de pentanol, como agente redutor, e em uma atmosfera livre de oxigênio (sob argônio). O cloreto de rutênio comercial que utilizamos não está totalmente purificado, apresentando-se em vários estados de oxidação Ru^{II} , Ru^{III} , Ru^{IV} . Uma vez submetido ao processo de redução, todo rutênio presente no meio reacional passa a ser Ru^{II} , o que é importante para a formação do complexo [Ru(Pc)] (Figura 35).

Figura 35: Processo de redução do rutênio, presente em vários estados de oxidação (Ru^{II} , Ru^{III} , Ru^{IV}) para Ru^{II} . Nota-se a mudança de coloração de marrom para verde para azul.

A maior dificuldade da reação é a obtenção de um produto final puro. O 1,2 – dicianobenzeno é colocado em excesso para que a reação ocorra. De acordo com a síntese descrita na literatura (HEINRICH et.al., 2013; CARNEIRO, 2011), o processo de purificação envolve sucessivas lavagens com uma solução de água:ácido acético (2:1). Porém, foram feitas inúmeras lavagens e não foram eficientes para total purificação do produto. Assim, foi

feito um estudo para realização da purificação através de um processo de purificação em coluna cromatográfica.

Complexo [Ru(Pc)]: Purificação

Para o processo de purificação foram feitos alguns testes em cromatografia de camada delgada para escolha da fase móvel a ser utilizada na separação da amostra. A fase estacionária da placa cromatográfica utilizada para este estudo foi alumina (Al_2O_3). Foram preparadas as seguintes soluções de fases móveis:

- 1 - Diclorometano (CH_2Cl_2)
- 2 - Diclorometano (CH_2Cl_2) : Metanol (CH_3OH) (20:1)
- 3 - Diclorometano (CH_2Cl_2) : Metanol (CH_3OH) (15:1)
- 4 - Diclorometano (CH_2Cl_2) : Metanol (CH_3OH) (10:1)

O produto analisado foi colocado na placa cromatográfica em duplicata e foram comparadas com uma amostra pura de $[(\text{Ru}(\text{pc}))]$ sintetizada anteriormente e publicada na literatura (HENRICH, 2013). O melhor resultado de separação obtido foi a amostra que eluiu na fase móvel CH_2Cl_2 : CH_3OH (10:1). Sendo assim, foi realizada a separação em coluna cromatográfica em alumina, utilizando-se a fase móvel CH_2Cl_2 : CH_3OH (10:1) (Figura 36). Foram coletadas 19 frações, as quais foram analisadas por espectroscopia de absorção de UV-vis. As frações de 1 a 8 apresentaram espectros condizentes com aquele descrito na literatura para complexos de rutênioftalocianina, que serão discutidos a seguir (item 4.2). Essas frações foram reunidas e submetidas à secagem a vácuo para obtenção da $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ isolada e purificada.

Figura 36: Estudos de purificação do complexo $[(Ru(Pc))]$. Em A, temos uma coluna preparativa de alumina na qual foi testada diferentes fases móveis. Em B, temos uma coluna de alumina na qual utilizou-se a fase móvel $CH_2Cl_2 : CH_3OH$ (10:1).

O produto de interesse obtido foi analisado por espectroscopia na região Uv-visível e infravermelho e apresentou-se com características de acordo com a literatura.

4.1.2 Síntese do complexo *trans*- $[Ru(NO)(Pc)(ONO)]$

A formação do complexo *trans*- $[Ru(NO)(Pc)(ONO)]$ se deve à coordenação do NO ao centro metálico do precursor $[Ru(Pc)]$. Para isso, é elaborado um sistema gerador de NO, que consiste na produção do gás NO, a partir da reação entre Cobre metálico (Cu^0) e ácido nítrico 50% (HNO_3) (Reação 1):

Para assegurar que apenas o NO seja borbulhado no precursor $[Ru(Pc)]$, para coordenar-se com o Ru, é colocado um balão (balão 2) com uma solução concentrada de NaOH para reter qualquer espécie de NO_2 que possa estar sendo formada.

O produto obtido foi analisado por espectroscopia de absorção na região do Uv-vis e infravermelho, apresentando suas características condizentes com a literatura.

4.1.3 Complexo [Ru(pc-R₁)] (R₁ = DCBz)

A síntese do complexo [Ru(Pc-R₁)] foi idealizada com base em duas rotas sintéticas, sendo que a primeira foi denominada de Rota 1 e a segunda denominada Rota 2.

4.1.3.1 Complexo [Ru(Pc-R₁)] : Síntese ROTA 1

A rota sintética 1 do complexo [Ru(Pc-R₁)] foi idealizada baseando-se na síntese de zincoftalocinanas monossustituídas descrita na literatura por D'SOUZA, ANTUNES, NYOKONG (2011). Para isso foi utilizado o ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxy) benzóico, que também teve sua síntese desenvolvida neste trabalho. Assim, a síntese do complexo [Ru(Pc-R₁)] foi obtida através da reação entre o RuCl₃.3H₂O, 1,2-dicianobenzeno, ácido 4-(3,4-dicianofenoxy) benzóico e DBU a 140 °C e sob atmosfera de argônio durante 24 horas. Após isolar o produto, verificou-se por espectroscopia na região do Uv-vis, que se apresentava impuro com a presença de reagentes precursores em excesso. Foi feito um estudo do processo de purificação em cromatografia em coluna.

Complexo [Ru(Pc-R₁)] : Purificação

Para escolha de uma fase estacionária e fase móvel adequada no processo de purificação foram feitos vários testes em cromatografia de camada delgada, utilizando-se placas cromatográficas de alumina (Al₂O₃) e sílica (SiO₂), com diferentes fases móveis como podem ser verificadas na tabela 4:

Tabela 4: Fases móveis e estacionárias utilizadas na cromatografia de camada delgada no processo de purificação do complexo [Ru(Pc-R₁)].

FASE MÓVEL	FASE ESTACIONÁRIA	
	ALUMINA	SÍLICA
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (20 : 1)	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (20 : 1)
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (10 : 1)	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (10 : 1)
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (5 : 1)	
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (2 : 1)	
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (1 : 1)	
	(CH ₂ Cl ₂)	
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (1 : 2)	
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (1 : 5)	
	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (1 : 10)	

Os resultados obtidos utilizando-se a fase estacionária alumina não foram eficazes. O melhor resultado de separação em cromatografia de camada delgada foi observado utilizando sílica (SiO₂), com a fase móvel (CH₂Cl₂) : (CH₃OH) (10 : 1). Foi então realizada uma coluna preparativa pequena para verificar a reprodutibilidade dessas condições em cromatografia em coluna. Foram coletadas oito frações e analisadas por espectroscopia de UV-visível, sendo que as frações 1 e 2 apresentaram espectros característicos do composto puro. Assim, uma coluna cromatográfica maior foi preparada utilizando-se sílica como fase estacionária e a fase móvel (CH₂Cl₂) : (CH₃OH) (10 : 1). Obtiveram-se vinte e cinco frações, as quais foram analisadas por espectroscopia de UV-visível, onde foi observado que as frações de 1 a 6 apresentavam-se puras. Essas foram reunidas e secas à vácuo para obtenção do produto sólido purificado.

Porém, acredita-se que este produto obtido é uma mistura de um complexo de Ru(Pc-R), o qual durante o processo de síntese pode ser substituído em várias posições, podendo formar complexos mono, di, tri e tetra substituídos (Figura 37).

Figura 37: Estrutura de possíveis formações do complexo [Ru(Pc-R)] mono, di, tri e tetra substituídos.

Dessa maneira, foi necessário estudar outro método de separação para obter-se apenas o complexo de interesse, [Ru(Pc-R₁)]. Iniciou-se os estudos com a cromatografia em camada delgada para escolha da fase estacionária e fase móvel para eluir o produto. A fase estacionária escolhida foi sílica (SiO₂), enquanto que as fases móveis testadas encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Fases móveis utilizadas na cromatografia de camada delgada no processo de purificação do isômero [Ru(Pc-R₁)].

FASE ESTACIONÁRIA – SÍLICA

FASE MÓVEL	(CH ₂ Cl ₂) : (CH ₃ OH) (10 : 1)
	TFA : (CH ₃ OH) (0,025% TFA)
	TFA : (CH ₃ OH) (0,05% TFA)
	TFA : (CH ₃ OH) (0,1% TFA)
	TOLUENO : THF (8 : 2)

A separação mais eficaz foi obtida utilizando-se a fase móvel ácido trifluoracético (TFA):(CH₃OH) (0,05 % TFA). Uma vez encontrada a fase móvel, preparou-se uma coluna maior com as mesmas condições, da qual foram obtidas 39 frações (Figura 38). As frações

coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada, nas mesmas condições descritas anteriormente, e por espectroscopia de UV-visível.

Figura 38: Estudos de purificação em cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária sílica e a fase móvel TFA : (CH₃OH) (0,05% TFA), obtendo-se 39 frações que foram analisadas por espectro de absorção de UV-Visível.

Analizando os resultados, verificamos que frações diferentes foram obtidas. As frações que apresentaram as mesmas características espectroscópicas foram reunidas.

Entretanto, não podemos inferir que a purificação do complexo [Ru(Pc-R₁)] por esta rota sintética foi eficiente, já que as análises dos resultados de caracterização não demonstraram que houve purificação do produto de interesse. Baseado neste resultado, outra rota sintética, a rota 2, foi proposta.

4.1.3.2 Complexo [Ru(Pc-R₁)] : Síntese ROTA 2

A rota 2 aqui proposta envolveu a síntese de um complexo intermediário precursor, *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] (Esquema 4). A síntese do complexo [Ru(Pc-R₁)] foi obtida através da reação entre o precursor *cis*-RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂, 1,2-dicianobenzeno, e DBU a 130 °C e sob atmosfera de argônio durante 24 horas.

Esquema 4: Representação da síntese da ftalocianina $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ a partir do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{DCBz})(\text{DMSO})_2]$.

Após a precipitação do produto, utilizou-se uma coluna cromatográfica de sílica gel para purificação. A eluição ocorreu com uma fase móvel em gradiente. A primeira fase móvel foi tetrahydrofurano(THF):tolueno (8:2), a segunda THF:tolueno (8:2) com adição de 30% de dimetilformamida (DMF) e a última fração foi eluída apenas com DMF, coletando-se três frações respectivamente. As frações foram analisadas por espectroscopia de UV-visível, infravermelho e espectrometria de massas, dando indícios que a fração 1 trata-se da $[\text{Ru}(\text{Pc})]$, a fração 3 seria o produto de interesse, o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ e a fração 2, a mistura de ambos.

4.1.4 Síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ ($\text{R}_4 = \text{DMX}$)

Devido à dificuldade de purificação das ftalocianinas sintetizadas a partir do precursor 1,2-dicianobenzeno, sintetizou-se uma ftalocianina que tem como precursor um ftalonitrilo que apresenta várias posições de substituições com metilas. É proposto que sintetizando uma ftalocianina a partir do ftalonitrilo DMX, o rendimento da reação pode aumentar ao mesmo tempo em que o fenômeno da agregação pode apresentar-se menor, melhorando a eficiência de produção de oxigênio singlete.

Para a síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ ($\text{R}_4 = \text{DMX}$), reagiu-se o complexo $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$ com o composto DMX em pentanol anidro, utilizando DBU como catalisador. A reação permaneceu sob agitação, aquecimento (130°C) e atmosfera de argônio durante 24 horas. Após a obtenção do produto sólido, houve purificação em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando-se a fase móvel por gradiente diclorometano:acetato de etila. Iniciou-se a eluição apenas com diclorometano, em seguida utilizou-se a proporção diclorometano:acetato de etila (9,5:0,5), de modo que a proporção de acetato de etila aumentasse gradativamente até que ao final da eluição fosse utilizado apenas acetato de etila.

Obteve-se 16 frações, que foram analisadas por espectroscopia de UV-visível e espectrometria de massas.

4.1.5 Síntese do complexo [Ru(Pc-R₁-R₃)] (R₁= DCBz e R₃ = DMX)

A síntese do complexo [Ru(Pc-R₁-R₃)] (R₁= DCBz e R₃ = DMX) foi desenvolvida de modo similar àquela descrita por D'SOUZA, ANTUNES, NYOKONG (2011). Em um tubo selado, reagiu-se em pentanol anidro, RuCl₃.3H₂O, ftalonitrilo DMX e o ftalonitrilo DCBz, ambos sintetizados neste trabalho e descritos anteriormente, na presença de DBU. A reação ocorreu por 24 horas a 130 °C, sob agitação e atmosfera de argônio.

O produto formado foi extraído com a mistura tolueno:H₂O (1 : 2). A fase orgânica foi coletada, seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente orgânico foi removido sob vácuo. O material obtido foi purificado em coluna cromatográfica com sílica flash, utilizando a fase móvel por gradiente. Primeiro a eluição foi realizada com diclorometano apenas. Após coletar a primeira fração, utilizou-se a fase móvel diclorometano:acetato de etila (9,5:0,5) e após, coletar a segunda fração, a proporção de acetato de etila foi aumentando gradativamente, até que se chegasse a 100 % de acetato de etila para coletar a terceira fração. As frações foram submetidas a placas cromatográficas preparativas utilizando-se como fase móvel diclorometano:acetato de etila (9,5:0,5). As frações foram extraídas das placas cromatográficas, separadas da sílica por filtração. As frações de interesse foram analisadas por RMN, e verificou-se que a fração 1 tratava-se do complexo [Ru(Pc-R₄)] e a fração 2, o produto de interesse [Ru(Pc-R₁-R₃)].

4.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

4.2.1 Propriedades eletrônicas para complexos de rutênio com ligantes insaturados

Complexos de rutênio coordenados com ligantes insaturados apresentam bandas de absorção na região do visível e do ultravioleta. Essas possíveis transições eletrônicas podem ser representadas de forma simplificada no diagrama de orbital molecular de um complexo de rutênio (II), quando este sofre influência de ligantes insaturados (Figura 39):

ultravioleta, entre 300-400 nm, atribuída a transição eletrônica a_{2u} para eg antiligante. Tanto a banda Q quanto a banda B são transições intraligante (IL). Neste diagrama, pode-se observar também as transições de transferência de carga metal-ligante (MLCT1 e MLCT2) e ligante-metal (LMCT1, LMCT2 e LMCT3). Essas transições são de baixa energia, podendo ser observadas na região do visível e do infravermelho próximo, dependendo do centro metálico. Portanto, muitas vezes elas não são visualizadas por não explorarem-se regiões do infravermelho próximo ou por aparecerem muito próximas a banda Q, evidenciando somente um alargamento desta banda no espectro eletrônico. A baixa energia dessas transições se deve ao fato dos orbitais moleculares do metal estarem situados entre os orbitais HOMO e LUMO da ftalocianina (NETO, 2010). Já as transições de Campo-Ligante (CL) para ftalocianinas coordenadas a metais, muitas vezes não são observadas por serem transições proibidas por Laporte. Entretanto, no espectro de absorção de algumas ftalocianinas, ela pode ser apresentada, mas com uma intensidade baixa.

Figura 40: Diagrama do orbital molecular de uma ftalocianina coordenada a um centro metálico, mostrando as bandas Q, B, LMCT e MLCT.

4.2.2 Espectroscopia na região do UV-visível para o complexo rutênio(II) ftalocianina {[Ru(Pc)]}

Conforme apresentado, as ftalocianinas possuem alta densidade eletrônica devido à presença do anel macrocíclico. Quando ela está coordenada ao rutênio (II), formando o complexo [Ru(Pc)], é possível observar algumas alterações no espectro UV-visível da ftalocianina decorrente da doação de densidade eletrônica ao centro metálico.

O orbital molecular do complexo é estabilizado e a energia do estado fundamental diminui, fazendo com que a diferença de energia entre os orbitais responsáveis pela transição eletrônica aumente. Esse aumento de energia, confere um deslocamento hipsocrômico no espectro eletrônico de UV-visível do complexo [Ru(Pc)] quando comparado com o espectro eletrônico da ftalocianina de base livre (Figura 41).

O deslocamento hipsocrômico descrito é devido ao efeito do metal no centro macrocíclico e pode ser observado no espectro eletrônico de UV-visível do complexo [Ru(Pc)] sintetizado e purificado neste trabalho. Podemos observar que a banda Soret sofreu um deslocamento de 430 nm para 315 nm, enquanto que a banda Q deslocou de 790 nm para 642 nm. O deslocamento das bandas para menor comprimento de onda pode ser observado na tabela 6. Portanto, as bandas de absorção do composto sintetizado condizem com a literatura (DA ROCHA, 2008).

Tabela 6: Comparação das bandas de absorção, B e Q, da ftalocianina de base livre com a [Ru(Pc)]. Observa-se o deslocamento hipsocrômico.

	Ftalocianina Base Livre (H ₂ Pc)	[Ru(Pc)]
Banda Soret (B)	430 nm	315 nm
Banda Q	745 nm e 790 nm	583 nm 642 nm

A.

B.

Figura 41: Comparação dos espectros de absorção de UV-visível da Ftalocianina de base livre (H₂Pc) (A) e do complexo [Ru(Pc)] (B).

4.2.3 Espectroscopia na região do UV-visível para o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)]

O espectro eletrônico do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] sofre influência dos ligantes axiais NO⁺ e NO₂⁻. Isso porque há uma retrodoação $d\pi - \pi^*(NO)$ que confere ao ligante um caráter π receptor muito forte (GORELSKY *et al*, 2000; TFOUNI *et al*, 2003), o que promove uma diminuição da densidade eletrônica do centro metálico (Figura 42).

Figura 42: Esquema ilustrativo da retrodoação entre o metal (M) e o óxido nítrico (NO) (RICHTER-ADDO, 1992).

Com a retirada de densidade eletrônica do metal, a ftalocianina doará ainda mais densidade eletrônica para o rutênio, o que era para estabilizar ainda mais o orbital molecular do estado fundamental, aumentando a energia do sistema e sofrendo um deslocamento hipsocrômico quando comparado com a [Ru(Pc)]. Porém, isso não ocorre.

Podemos observar no espectro eletrônico que a banda Soret (B) se desloca de 315 nm para 355 nm enquanto que a banda Q se desloca de 642 nm para 682 nm. Portanto, sofre um deslocamento batocrômico, ou seja, para a região do vermelho (Tabela 7). Isso ocorre porque a presença da coordenação de ligantes axiais influencia na planaridade da molécula, alterando a energia dos orbitais moleculares do macrociclo, o que promove uma diminuição de energia do sistema (CARNEIRO, 2011).

Dessa forma, o espectro eletrônico de UV-visível apresentado do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] sintetizado neste trabalho está condizente com a literatura (Figura 43).

Tabela 7: Comparação das bandas de absorção, B e Q, da rutênio-ftalocianina com a complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)].

	[Ru(Pc)]	<i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(ONO)]
Banda Soret (B)	315 nm	355 nm
Banda Q	583 nm e 642 nm	613 nm 682 nm

A.

B.

Figura 43: Comparação dos espectros eletrônicos de UV-visível dos complexos [(Ru(Pc)] (A) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] (B).

4.2.4 Espectroscopia na região do UV- visível do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico

O espectro eletrônico do ligante ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico não apresenta bandas na região do visível. Apresenta uma banda de absorção em 267 nm e 307 nm. Porém,

apresenta um espectro eletrônico de UV-visível idêntico ao precursor nitroftalonitrila (Figura 44), e, portanto, este composto será caracterizado por espectroscopia de infravermelho.

A.

B.

Figura 44: Espectro eletrônico de UV-visível ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (A) e do precursor nitroftalonitrila (B).

4.2.5 Espectroscopia na região de UV- visível do complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂]

O complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] foi sintetizado a fim de ser utilizado como precursor de uma nova proposta sintética para ftalocianinas substituídas. A espectroscopia de absorção na região do UV-vis foi uma das técnicas utilizadas para sua caracterização. Na figura 45 observa-se o espectro eletrônico deste complexo e o do complexo *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] precursor para sua síntese, sendo este já bem descrito em literatura (DUTTA, 1999; EVANS, SPENCER, 1973).

Figura 45: Espectro eletrônico dos complexos *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] (em preto) e *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] (em vermelho) em solvente DMSO.

O composto *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] possui duas bandas de absorções em 263 nm e 362 nm, atribuídas a transferência de carga metal ligante. Um pequeno ombro também é observado em 312 nm, atribuído a transição intraligante (DMSO). Pode-se observar que após a coordenação do ligante ácido 4-(3,4-dicianofenoxi)benzóico houve um pequeno deslocamento para menores comprimentos de onda, de 362 nm para 348nm, além de um pronunciado alargamento desta. Além disso, o ombro localizado em 312 nm não é mais observado. Essa mudança no espectro eletrônico sugere que as transições eletrônicas referentes à transferência de carga metal ligante e intraligante foram afetadas após a formação do composto, possivelmente evidenciando a formação deste (DUTTA, 1999).

4.2.6 Espectroscopia na região de UV- visível do complexos de rutênio-ftalocianinas substituídas

O espectro de absorção dos complexos rutênio ftalocianina substituídas, apresenta as mesmas características discutidas quando uma ftalocianina possui no interior do anel macrocíclico um centro metálico Ru(II). O anel macrociclo doa densidade eletrônica ao metal e influencia as transições eletrônicas dos orbitais moleculares.

Quando o complexo rutênio-ftalocianina passa a ter um grupo assimetricamente substituído, a molécula diminui sua simetria, deixando de ter simetria D_{4h} . O abaixamento da simetria altera a energia e níveis eletrônicos do macrociclo, e como consequência, observa-se o deslocamento da Banda Soret ou mesmo o aparecimento de duas bandas Q no espectro eletrônico (D'SOUZA, ANTUNES, NYOKONG, 2010; TASSO, 2011).

Os espectros eletrônicos dos complexos de ftalocianinas [Ru(Pc-R₁)] sintetizados tanto pela rota 1 quanto pela rota 2 (Figura 46), apresentaram banda Q em 644 nm e Soret em 312 nm, absorções características para este tipo de composto conforme já discutido anteriormente. A banda em 586 nm pode ser atribuída a uma componente vibrônica da banda Q (SAINI, *et. al.*, 2004). Pode-se observar ainda o aparecimento de uma banda em 624 nm evidenciando a perda de simetria para estes compostos monossustituídos. De modo geral, as ftalocianinas sintetizadas pelas duas rotas não apresentaram diferenças significativas no espectro de absorção eletrônica, sugerindo que o mesmo produto foi obtido utilizando rotas sintéticas diferentes.

Figura 46: Espectros eletrônicos de UV-visível em clorofórmio para o complexo [Ru(Pc-R₁)] sintetizado pela rota 1 (em preto) e rota 2 (em vermelho).

Para ftalocianinas monossustituídas espera-se um desdobramento da banda Q. Porém, em alguns casos este desdobramento não é observado e a perda de simetria sugere apenas um alargamento para a banda Q. Esse alargamento pode ser observado tanto para a espécie monossustituída $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ quanto para $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$, figuras 46 e 47, respectivamente. Nyokong e colaboradores (2009) também relataram que não foi observado desdobramento no espectro eletrônico do complexo monossustituído (4-aminofenoxi)zincoftalocianina, molécula esta de natureza assimétrica e similar ao composto em análise.

Quando se compara o espectro de absorção eletrônica na região de UV-visível dos complexos $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ e $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ (Tabela 8), observa-se o deslocamento das bandas Q e B da $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ em relação à $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ (Figura 47), devido a diminuição de simetria do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$.

Figura 47: Espectros eletrônicos de UV-visível em clorofórmio para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ em vermelho e $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ em preto.

Tabela 8: Comparação dos comprimentos de onda de absorção eletrônica dos complexos $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ e $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$.

	$[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$	$[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$
Banda Soret (B)	312 nm	327 nm
Banda Q	583 e 642 nm	572 nm 627 nm

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO: ANÁLISE POR INFRAVERMELHO

4.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc)]

Outro método de caracterização de complexos metálicos é a espectroscopia de absorção na região do infravermelho, a qual aliada à espectroscopia eletrônica de UV-visível é de grande relevância na caracterização de complexos tetrapirrólicos.

Os espectros de infravermelho devem refletir as mudanças de configuração dos macrociclos de ftalocianinas quando um metal é introduzido no centro do anel. Com a inserção do metal, há um aumento de simetria da molécula, podendo haver um deslocamento e/ou supressão de suas bandas vibracionais (MARTINS, 2012).

Estes efeitos podem ser observados comparando-se um espectro de infravermelho da ftalocianina de base livre com a ftalocianina metalada. Porém, nota-se que pode haver pouca ou nenhuma alteração nos modos vibracionais de ftalocianinas livres ou coordenadas ao íon metálico.

A tabela 9 apresenta a comparação do número de onda (cm^{-1}) entre: ftalocianinas de base livre (H_2Pc), caracterizada por ZIMINOV, *et al.*; H_2Pc adquirida comercialmente (SIGMA-ALDRICH); [Ru(Pc)] sintetizada e caracterizada por CARNEIRO, *et al.*; e [Ru(Pc)] sintetizada e caracterizada neste projeto de estudo. Os espectros de infravermelho comparativos entre H_2Pc (Sigma-Aldrich) e [Ru(Pc)] podem ser analisados nas Figuras 48 e 49.

Analisando a Tabela 9 e as Figuras 48 e 49, podemos verificar as principais bandas da ftalocianina livre (ZIMINOV, 1006) que sofrem alterações quando há a coordenação com o rutênio. A banda em 1005 cm^{-1} ($\delta \text{ N-H}$ no plano) é referente à protonação do anel macrociclo, o que não ocorre quando a ftalocianina está coordenada ao metal. Assim, quando há a coordenação ao rutênio, a banda em 1005 cm^{-1} desaparece. As bandas em 1334 cm^{-1} e 1305 cm^{-1} , são referentes à deformação do grupo pirrol enquanto que a banda em 1505 cm^{-1} é referente a deformação de C-N=C observadas em aminas secundárias cíclicas. As três bandas apresentadas sofrem deslocamento para menor número de onda quando há a presença do metal no anel macrociclo. Isso ocorre porque a ftalocianina doa densidade eletrônica ao metal, fortalecendo a ligação metal-nitrogênio e, conseqüentemente, enfraquecendo as demais.

Tabela 9: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc)].

H ₂ Pc (ZIMINOV)	H ₂ Pc (Sigma-Aldrich)	[Ru(Pc)] (CARNEIRO)	[Ru(Pc)] sintetizada neste projeto	ATRIBUIÇÕES
3287	3431	-	-	ν (N-H)
3049	----	-	3054	ν (C-H) (aromático)
1607	1634	-	1601	ν (C=C)
1596	1596	-	1582	ν (C=C)
1502	1502	1490	1490	ν (-N=)
1477	1474	1464	1464	ν (C-H) (isoindol)
1459	1458	-	1445	ν (C-H) (isoindol)
1437	1436	-	1414	ν (C-H) (isoindol)
1334	1334	1323	1326	ν pirrol
1303	1302	1288	1288	δ (C-H) (no plano)
1158	1158	1168	1168	δ (C-H) (no plano + isoindol)
1118	1118	1120	1122	Isoindol simétrico
1044	1093	1066	1065	δ (C-H) (no plano + isoindol)
1005	1005	-----	----	δ (N-H) (no plano)
873	873	913	914	δ (C-H) (isoindol + mesoatomos de N)
750	750	755	755	δ (C-H) (fora do

				plano)
734	732	-	736	δ (anel Pc)
716	717	-	---	δ (C-H) (fora do plano)

---- Não se observa banda

- Não descrito na literatura

Figura 48: Espectros de infravermelho em pastilha de KBr. Análise entre 4000 e 500 cm^{-1} A: Espectro da H_2Pc livre (SIGMA-ALDRICH); B: Espectro da $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ sintetizada neste estudo.

Figura 49: Espectros de infravermelho em pastilha de KBr. Análise entre 1700 e 600 cm^{-1} A: Espectro da H_2Pc livre (Sigma-Aldrich); B: Espectro da $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ sintetizada neste estudo.

Comparando-se os modos vibracionais da literatura com o complexo sintetizado e purificado neste trabalho, e ainda analisando os espectros de UV-visível (item 4.2.2), podemos concluir que as bandas observadas no espectro de infravermelho apresentaram-se condizentes e, portanto, no processo sintético obteve-se o produto desejado.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho para o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$

A eletronegatividade de substituintes pode afetar significativamente a frequência e intensidade de absorção das bandas do espectro de infravermelho. De acordo com experimentos realizados no trabalho de ZIMINOV, *et al.*, a ligação de um grupo metileno ao macrociclo de uma ftlocianina de cobre (CuPc), quase não afeta as frequências e intensidades vibracionais quando comparado ao mesmo complexo de cobre livre de substituintes. Porém, quando substituintes com forte caráter de elétron doador ou de elétron receptor são introduzidos, as frequências e intensidades das bandas de absorção podem ser alteradas.

O ligante NO^+ tem um caráter π receptor muito forte devido a presença de uma retrodoação $d\pi - \pi^*(\text{NO})$ (Figura 42) já discutida anteriormente (sessão 4.2.3). Isso confere um aumento da densidade eletrônica dos orbitais π antiligante do ligante nitrosil. Assim, com a introdução deste ligante na esfera de coordenação da $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ poderá ser observado significativos deslocamentos nas frequências de deformação de algumas bandas próximas ao sítio de coordenação com o metal rutênio (GORELSKY *et al*, 2000; TFOUNI *et al*, 2003).

Podemos observar na tabela 10 e na figura 50, a caracterização do complexo nitrosilo de rutênio, quanto ao fragmento $\{\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+\}$, que normalmente apresenta intensas bandas de estiramento na região entre 1800 e 1970 cm^{-1} (SAUAIA *et al*, 2003, de LIMA *et al*, 2006). Comparando os espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$, claramente observa-se o aparecimento da banda em 1888 cm^{-1} para o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$, o que caracteriza a frequência de estiramento do NO, indicando que o ligante NO^+ foi coordenado no precursor formando a espécie de interesse.

Tabela 10: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$.

[Ru(Pc)]	<i>trans</i>- [Ru(NO)(Pc)(ONO)]	ATRIBUIÇÕES
3054	3120	ν (C-H) (aromático)
----	1888	$\nu \text{ NO}^+$
1601	1662	ν (C=C)
1582	1597	ν (C=C)
1490	1485	ν (-N=)
1464	1467	ν (C-H) (isoindol)
1445	1450	ν (C-H) (isoindol)
1414	1411	ν (C-H) (isoindol)
1326	1328	ν pirrol
1288	1288	δ (C-H) (no plano)

1168	1168	δ (C-H) (no plano + isoindol)
1122	1122	Isoindol simétrico
1065	1062	δ (C-H) (no plano + isoindol)
----	----	δ (N-H) (no plano)
914	906	δ (C-H) (isoindol + mesoatomos de N)
755	725	δ (C-H) (fora do plano)
736	(encoberta)	δ (anel Pc)

Figura 50: Espectros de infravermelho em pastilha de KBr. Análise entre 2200 e 500 cm^{-1} A: Espectro do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ sintetizado neste trabalho; B: Espectro do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$ sintetizada neste trabalho.

4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho para o ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)

O espectro de infravermelho do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico foi realizado e suas bandas de absorção foram atribuídas de acordo com a caracterização descrita em CHIDAWANYIKA, W., NYOKONG, T., (2009).

Analisando sua estrutura (Figura 51), verifica-se a presença dos grupos funcionais ácido carboxílico, nitrila e éter, que, segundo a literatura (PAVIA, *et. al.*, 2010) apresentam bandas de absorção características nas regiões de 3400-2400 e 1730-1650 cm^{-1} , 2300-2200 cm^{-1} , e 1300-1000 cm^{-1} , respectivamente.

Figura 51: Estrutura do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.

Para a síntese deste ftalonitrilo são utilizados os precursores 4-nitroftalonitrila e ácido 4- hidróxibenzóico. Os grupos funcionais dos precursores são parecidos com os do ligante sintetizado neste trabalho, o que poderia dificultar a caracterização por espectroscopia na região do infravermelho. A 4-nitroftalonitrila possui os grupos nitro e nitrila, ausente e presente neste composto, respectivamente. Já o ácido 4-hidróxibenzóico possui os grupos funcionais álcool e ácido carboxílico, que também estão presentes no ftalonitrilo em estudo. Sendo assim, uma forma de caracterizar o composto ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico é a presença das bandas características do grupamento éter (1300-1000 cm^{-1}), e ausência das bandas características para o grupo nitro, o que pode indicar que o produto de interesse foi formado. As estruturas químicas do ligante e dos reagentes precursores com seus respectivos grupos funcionais podem ser comparadas na tabela 11. As bandas características dos precursores podem ser analisadas no espectro de infravermelho nas figuras 52 e 53.

Tabela 11: Relação da estrutura química dos precursores (Nitroftalonitrila e Ácido 4 – Hidróxibenzóico) e produto final (Ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico) com as respectivas bandas de infravermelho características dos grupos funcionais presentes (PAVIA, *et. al.*, 2010).

Nome	Ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico	4-Nitroftalonitrila	Ácido 4-hidróxibenzóico
Estrutura Química
Grupos funcionais	Ácido carboxílico (3400-2400 cm^{-1} ; 1730-1650 cm^{-1})	-	Ácido carboxílico (3400-2400 cm^{-1} ; 1730-1650 cm^{-1})
	Nitrila (2300-2200 cm^{-1})	Nitrila (2300-2200 cm^{-1})	-
	-	Nitro (1600-1500 cm^{-1} ; 1400-1300 cm^{-1})	-

Figura 52: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do precursor nitroftalonitrila.

Figura 53: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do Ácido 4 - Hidroxibenzóico.

O espectro na região do infravermelho do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (Figura 54), apresenta características peculiares a seus precursores (Tabela 12) e condizente com aquela descrita na literatura por CHIDAWANYIKA, W., NYOKONG, T., (2009).

Tabela 12: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o ácido 4-(3,4-dicianofenoxi)benzóico.

Literatura	ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico	ATRIBUIÇÕES
CHIDAWANYIKA, W., NYOKONG, T.,2009		
3088	3088	vC-H
2231	2231	Ncn
1678	1687	vC=O
1591	1591	vC=O
1491	1490	vC-O-C
1254	1253	vC-O-C
851	850	vC-H

Figura 54: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.

4.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ (DCBz)

O espectro de infravermelho do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ sintetizado neste trabalho foi comparado com as bandas de absorção na região do infravermelho do complexo de Ftalocianina monossubstituída (ZnAPPc), descrita na literatura (D'SOUZA, *et al.*, 2011). Convém salientar que a espécie ZnAPPc , é monossubstituída com o grupo 4 aminofenoxi, possuindo um grupo amina na extremidade, enquanto que a rutênio-ftalocianina aqui proposta é monossubstituída com o ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico, apresentando um grupo funcional de ácido carboxílico na extremidade.

A avaliação estrutural das espécies $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ e $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ (Figura 55), difere especialmente pela presença dos grupos funcionais, éter e ácido carboxílico, existente em $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$. Ácidos carboxílicos apresentam absorção na região de $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, devido ao estiramento da ligação O-H. Além disso, apresentam absorção na região entre $1730\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento da carbonila (C=O). Ainda o grupo funcional éter apresenta absorção entre $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, devido ao estiramento C-O (PAVIA, *et al.*, 2010).

Figura 55: Estruturas Químicas dos complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] com destaque ao grupamento carboxílico e éter presentes no complexo e [Ru(Pc-R₁)].

A tabela 13 apresenta as bandas de absorção na região de infravermelhos dos complexos ZnAPPc (D'SOUZA, *et al.*, 2011) , [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] sintetizados. Comparando os espectros de infravermelho (Figura 56) e analisando a Tabela 13, podemos observar o aparecimento das bandas de absorção em 3444 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹ e 1254 cm⁻¹, mostrando a presença dos grupos funcionais álcool, carboxila e éter, respectivamente, os quais são ausentes no espectro de infravermelho da [Ru(Pc)].

Figura 56: Espectro de infravermelho do complexo [Ru(Pc-R₁)] (em pastilha de KBr), destacando os grupos funcionais ácido carboxílico e éter.

Tabela 13: Atribuições das bandas de estiramento na região do infravermelho para o complexo [Ru(Pc-R₁)].

ZnAPPc (D'SOUZA)	[Ru(Pc)] sintetizada neste projeto	[Ru(Pc-R₁)]	ATRIBUIÇÕES
----	----	3444	N (OH-CH=O)
3414	----	----	NH ₂
-	3273	3242	v (N-H)
-	3054	-	v (C-H) (aromático)
2924	2924	2925	v (C=C)
1647-1596	----	----	v (N-H)
-	----	1670	v (C=O)
-	1601	1612	v (C=C)
-	1582	----	v (C=C)
1484	1490	1488	v (-N=)
-	1464	1463	v (C-H) (isoindol)
-	1445	----	v (C-H) (isoindol)
-	1414	----	v (C-H) (isoindol)
1327	----	1254	v (-O-)
-	1326	1325	v pirrol
-	1288	1288	δ (C-H) (no plano)
-	1168	1165	δ (C-H) (no plano + isoindol)
-	1122	1120	Isoindol simétrico
-	1065	1061	δ (C-H) (no plano + isoindol)
1114-1060	----	1021	(CN)

-	----	----	δ (N-H) (no plano)
913	914	888	δ (C-H) (isoindol + mesoatomos de N)
731	----	----	(Zn-H)
755	755	755	δ (C-H) (fora do plano)
-	736	726	δ (anel Pc)

4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.4.1 *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂]

O complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] e seu reagente precursor ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico foram submetidos a análise de espectrometria de massas por ionização por eletrospray (ESI/MS), para confirmação da estrutura proposta (Figura 57 e 58).

O ligante ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico, obtido neste trabalho, apresentou pico, cuja relação $m/z = 263,0449$. Este valor é similar àquele definido como $\{M - H\}^-$, haja visto que o ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico apresenta Massa Molecular = 264,04 g/mol. Neste mesmo espectro observa-se ainda pico cuja relação m/z é 527,1048. Este valor é consistente com aquele relativo a dimerização do ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico, peculiar à técnica de espectrometria de massas, para espécies similares.

Para o composto de rutênio, a técnica de espectrometria de massas caracteriza-se pelo número de isótopos encontrados nos fragmentos contendo este íon metálico. Este aparece como sete fragmentos ¹⁰⁴Ru, ¹⁰²Ru, ¹⁰¹Ru, ¹⁰⁰Ru, ⁹⁹Ru, ⁹⁸Ru, ⁹⁶Ru (SLOCIK, SOMAYAJULA, SHEPHERD, 2001). O complexo *cis*-[RuCl₂(DCBz)(DMSO)₂] analisado apresenta Massa Molecular calculada igual a 593,48 g/mol. Experimentalmente observou-se espectro com m/z em 592,9156, o qual é acompanhado pela característica isotópica de espécies contendo rutênio (Figura 59). Semelhante ao espectro de massas do ligante ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico, observa-se também pico $m/z = 527,1048$, o que pode nos permitir concluir a processo de labilização do ligante advindo do processo de eletrospray. Em suma, os fragmentos encontrados para as espécies estudadas, condizem com a Massa Molecular de ambos os compostos sintetizados.

Figura 57: Espectrometria de massas por ESI/MS em modo negativo do ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico.

Figura 58: Espectrometria de massas por ESI/MS em modo negativo do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{DCBz})(\text{DMSO})_2]$, m/z , 592,9156.

4.4.2 Espectrometria de massas para o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ ($\text{R}_1=\text{DCBz}$)

A técnica utilizada para realização da espectrometria de massas do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ foi MALDI-TOF, em modo negativo. A matriz utilizada para tal análise foi 2,5 – ácido hidroxibenzóico (DHB – MM = 154,12 g/mol).

No espectro é possível observar o íon molecular com relação m/z em 749,890, referente ao complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$, de interesse, que apresenta Massa Molecular igual a 749,6979 g/mol. Observa-se também a relação m/z em 1498,918 que é referente ao dímero desse complexo. Os outros íons moleculares que aparecem são referentes ao complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1)]$ acoplado a matriz DHB utilizada, o que é comum no procedimento experimental. Isso pode ser observado, por exemplo, para o íon molecular em 1056,21, referente ao íon molecular do complexo somado a duas moléculas de DHB ($\text{M-H}+2\text{DHB}$) (Figura 59). Na

figura 60 observa-se a distribuição isotópica para o metal rutênio, se referindo a íons moleculares (m/z) adjacentes.

Figura 59: Espetro de massas do complexo $[Ru(Pc-R_1)]$ com m/z em 749,890.

Figura 60: Espetro de massas do complexo $[Ru(Pc-R_1)]$ com distribuição isotópica do metal rutênio.

4.4.3 Espectrometria de massas para o complexo [Ru(Pc-R₄)] (R₄ = DMX)

A técnica utilizada para realização da espectrometria de massas do complexo [Ru(Pc-R₄)] foi MALDI-TOF, em modo negativo. A matriz utilizada para tal análise foi 2,5 – ácido hidroxibenzóico (DHB – MM = 154,12 g/mol).

O íon molecular referente à m/z 1574,490 é condizente com a massa molecular do complexo (MM=1574,7812) e pode ser observado na figura 61. Análise similar a do item 4.4.2 pode ser considerada para este composto.

Figura 61: Espetro de massas do complexo [Ru(Pc-R₄)] com m/z em 1574,490.

4.5 CARACTERIZAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

4.5.1 Complexo ftalonitrilo ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz)

A técnica de ressonância magnética nuclear foi utilizada neste trabalho para caracterização espacial dos compostos obtidos. Parte fundamental desta análise leva em conta a sensibilidade da técnica, no que tange a variação da densidade eletrônica sobre átomos de carbono e, conseqüentemente, o reflexo sobre o hidrogênio ligado diretamente a este átomo. Embora a espectrometria de massas permita elocubrar sobre a estrutura proposta, não há

informações por aquela técnica, da estrutura espacial do composto. Desta feita a técnica de RMN de ^1H foi utilizada para ter informações estruturais sobre as espécies sintetizadas.

Ao se analisar o RMN de ^1H na figura 62 pode-se verificar um sinal em 13,04 ppm, característico de hidrogênio da carboxila de ácido. A presença desse sinal, juntamente com a dos hidrogênios aromáticos tanto do anel do ftalonitrilo em 7,54; 7,92 e em 8,15 ppm quanto do substituinte fenílico em 7,25; 7,27; 8,02 e 8,04 ppm corroboram para estrutura seja a sugerida.

Figura 62: Espectro de RMN de ^1H do composto ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico (DCBz). RMN - ^1H (DMSO- d_6 , 400,15 MHz), δ (ppm): 7,25 (t, 1H, $J_1=2,7$ Hz); 7,27 (t, 1H, $J_1=2,7$ Hz); 7,54 (dd, 2H, $J_1=8,7$ Hz, $J_2=2,6$ Hz); 7,94 (d, 1H, $J_1=2,5$ Hz); 8,02 (t, 1H, $J_1=2,7$ Hz); 8,04 (t, 1H, $J_1=2,7$ Hz); 8,15 (d, 1H, $J_1=8,8$ Hz); 13,04 (s, 1H).

4.5.2 4,5-bis (2,5-dimetilfenoxi)ftalonitrilo (DMX)

Ao se analisar o RMN de ^1H do composto DMX destaca-se a simplicidade do espectro devido à simetria da molécula. Verificou-se a presença dos hidrogênios pertencentes às metilas fenílicas em 2,14 e 2,34 ppm, indicando que ocorreu a substituição nucleofílica nas duas posições desejadas. Pode-se notar também os sinais dos hidrogênios do anel do ftalonitrilo em 6,96 ppm e os demais sinais pertencentes aos anéis do substituinte fenílico (Figura 63).

Figura 63: Espectro de RMN de ^1H do ftalonitrilo DMX.

4.5.3 Complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ ($\text{R}_1 = \text{DCBz}$ e $\text{R}_3 = \text{DMX}$)

O espectro RMN de ^1H para o composto $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ ($\text{R}_1 = \text{DCBz}$ e $\text{R}_3 = \text{DMX}$) apresenta-se de uma complexidade maior, em função do número de hidrogênios existentes e sua variabilidade de posição em função da estrutura espacial da ftalocianina assumida. Ao se analisar o composto acima por RMN de ^1H (Figura 64), verifica-se a presença das metilas fenílicas entre 2,25 e 2,30 ppm, integrando 36 hidrogênios, ou seja, um composto com 12 grupos metila. Há a presença de multipletos de hidrogênios na região dos aromáticos 6,92 ppm, 7,20-7,26 ppm, 8,44 e 8,49 ppm e em 8,69 ppm. Entretanto, não foi possível distinguir a qual hidrogênio cada um pertencia e verificar nas condições de análise o sinal do hidrogênio da carboxila. Apesar da superficialidade da análise é possível inferir que o composto $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$ ($\text{R}_1 = \text{DCBz}$ e $\text{R}_3 = \text{DMX}$) fora obtido com relativo sucesso.

Figura 64: Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_1\text{-R}_3)]$.

4.5.4 Complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ ($\text{R}_4 = \text{DMX}$)

O complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$ ($\text{R}_4 = \text{DMX}$) apresenta RMN de ^1H conforme observado na figura 65. Verifica-se a presença de duas metilas fenílicas entre 2,24 e 2,30 ppm integrando para 48 hidrogênios, ou seja, se trata de um composto com 16 grupos metila. Há a presença de multipletos de hidrogênio na região de hidrogênios aromáticos, ou seja, do núcleo ftalocianínico e dos anéis substituintes dos ftalonitrilos utilizados como blocos construtores, entre 6,90-7,01 ppm, 7,09-7,22 ppm, 8,43-8,51 ppm, 8,61-8,71 ppm. Entretanto, não foi possível distinguir a qual hidrogênio cada sinal pertencia.

Figura 65: Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Ru}(\text{Pc-R}_4)]$.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETEO

Existem dois métodos que são utilizados para o estudo fotoquímico de quantificação de oxigênio singlete: método direto SOLM (*singlet oxygen luminescence method*) e o método indireto, no qual utiliza-se uma sonda de supressão química (SPILLER, *et al.*, 1998).

O método escolhido para o estudo dos complexos sintetizados neste trabalho foi o método indireto, utilizando-se o DPBF como sonda. O DPBF apresenta uma banda de absorção eletrônica em 410 nm, a qual é suprimida uma vez que reage com o oxigênio singlete produzido pelo fotossensibilizador submetido à irradiação. A supressão ocorre devido à formação da espécie *o*-dibenzoilbenzeno, que não apresenta absorção na região do visível (Esquema 5). A fotodegradação é acompanhada pelo monitoramento da banda de absorção em 410 nm do DPBF.

Esquema 5: Reação de fotodegradação DPBF, ao reagir com o oxigênio singleto produzido por fotossensibilizadores sob fotoestímulo, formando a espécie *o*-dibenzoilbenzeno.

Cálculo de Oxigênio Singleto

Para a quantificação de oxigênio singleto produzido, primeiramente é traçado um gráfico do logarítmo neperiano ($\ln$) da absorbância do DPBF versus o tempo, obtendo-se a equação da reta, no qual o coeficiente angular é o valor de **R**. O rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) foi calculado utilizando-se a equação matemática abaixo (GOBO, 2012):

$$\Phi_{\Delta} = \frac{\Phi_{\Delta}^{\text{std}} \cdot \mathbf{R} \cdot \mathbf{I}_{\text{abs}}^{\text{std}}}{\mathbf{R}_{\text{std}} \cdot \mathbf{I}_{\text{abs}}}$$

Onde,

$\Phi_{\Delta}^{\text{std}}$ = rendimento quântico de oxigênio singleto para a ftalocianina padrão. Foi utilizado como padrão a Zinco-ftalocianina (ZnPc) ($\Phi_{\Delta}^{\text{std}} = 0,67$ em DMSO).

R e $\mathbf{R}_{\text{std}}$ = Taxa de fotodegradação do fotossensibilizador e do padrão, respectivamente, ou seja é a velocidade de formação de oxigênio singleto ($\mathbf{R}_{\text{std}} = 0,1542$).

$\mathbf{I}_{\text{abs}}$ e $\mathbf{I}_{\text{abs}}^{\text{std}}$ = Taxa de absorção de luz do fotossensibilizador e do padrão ZnPc, respectivamente ($\mathbf{I}_{\text{abs}} = 1 - 10^{-a}$, onde a é média das absorbâncias. $\mathbf{I}_{\text{abs}}^{\text{std}} = 0,5391$).

Padrão ZnPc (Sigma-Aldrich) = Os parâmetros do padrão ZnPc foram calculados em laboratório nas mesmas condições experimentais que os fotossensibilizadores em análise.

4.6.1 Determinação de Oxigênio Singleto para [Ru(Pc)]

A medida do rendimento quântico de oxigênio singleto para o composto [Ru(Pc)] é ilustrado na figura 66. O decaimento da absorbância da banda em 410 nm, relativo à absorção do DPBF, atesta a formação do oxigênio singleto gerado pela irradiação do composto [Ru(Pc)] em 660 nm. Aparentemente, pela análise da banda em 642 nm, nenhum processo relacionado à decomposição do ciclo ftalocianina, pode ser observado durante pelo menos 10 s de irradiação com a potência de irradiação de 39 mW. Os parâmetros encontrados para esse composto ao traçar os gráficos, em triplicata, do logaritmo neperiano ($\ln$) da absorbância do DPBF versus o tempo podem ser visualizados na tabela 14. O rendimento quântico de oxigênio singleto observado foi de 0,35.

Figura 66: Decréscimo da banda de absorção do DPBF em 410 nm à medida que o complexo [Ru(Pc)] foi irradiado em 660 nm em intervalos de 1 segundo.

Tabela 14: Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo $[(Ru(Pc))]$, sendo que o experimento foi realizado em triplicata.

Gráfico 1 - Curva 1 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = -0,5627 - 0,0897x$

$$R^2 = 0,98534$$

Taxa de fotodegradação $R_a = 0,0897$

Gráfico 2 - Curva 2 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = -0,43718 - 0,0771x$

$$R^2 = 0,98912$$

Taxa de fotodegradação $R_b = 0,0771$

Gráfico 3 - Curva 3 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = -0,80138 - 0,0709x$

$$R^2 = 0,98991$$

Taxa de fotodegradação $R_c = 0,0709$

Rmédio = 0,0792

$\Phi_{\Delta} = 0,35$

4.6.2 Cálculo de Oxigênio Singleto para $[Ru(Pc-R_1)]$ ($R_1 = DCBz$) e $[Ru(Pc-R_4)]$ ($R_4 = DMX$)

Resultados do decaimento da banda de absorção do DPBF em 410 nm sugerindo a formação de oxigênio singleto para os complexos $[Ru(Pc-R_1)]$ e $[Ru(Pc-R_4)]$ são mostrados nas figuras 67 e 68, respectivamente. Os parâmetros encontrados para os cálculos do Φ_{Δ} de ambos os compostos podem ser verificados nas tabelas 15 e 16. O rendimento quântico para $[Ru(Pc-R_1)]$ encontrado foi de 0,24 enquanto para $[Ru(Pc-R_4)]$ foi 0,04.

Figura 67: Decréscimo da banda de absorção do DPBF em 410 nm à medida que o complexo $[(Ru(Pc-R_1))]$ ($R_1 = DCBz$) foi irradiado em 660 nm em intervalos de 1 segundo.

Tabela 15: Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo $[(Ru(Pc-R_1))]$ ($R_1 = DCBz$), sendo que o experimento foi realizado em triplicata.

Gráfico 1 - Curva 1 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = 0,44551 - 0,04872x$

$$R^2 = 0,99828$$

Taxa de fotodegradação $R_a = 0,04872$

Gráfico 2 - Curva 2 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = 0,4852 - 0,06042x$

$$R^2 = 0,99867$$

Taxa de fotodegradação $R_b = 0,06042$

Gráfico 3 - Curva 3 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = 0,34977 - 0,05345x$

$$R^2 = 0,98925$$

Taxa de fotodegradação $R_c = 0,05345$

$R_{\text{médio}} = 0,0542$

$\Phi_{\Delta} = 0,24$

Figura 68: Decréscimo da banda de absorção do DPBF em 410 nm à medida que o complexo $[(Ru(Pc-R_4))]$ ($R_4 = DMX$) foi irradiado em 660 nm em intervalos de 4 segundos.

Tabela 16: Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo $[(Ru(Pc-R_4))]$ ($R_4 = DMX$), sendo que o experimento foi realizado em triplicata.

Gráfico 1 - Curva 1 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = 0,05999 - 0,00705x$

$$R^2 = 0,9947$$

Taxa de fotodegradação $R_a = 0,00705$

Gráfico 2 - Curva 2 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = 0,33888 - 0,00601x$

$$R^2 = 0,97603$$

Taxa de fotodegradação $R_b = 0,00601$

Gráfico 3 - Curva 3 (ln x tempo)

Equação da reta $\rightarrow y = 0,11866 - 0,01435x$

$$R^2 = 0,93396$$

Taxa de fotodegradação $R_c = 0,01435$

$R_{\text{médio}} = 0,00914$

$\Phi_{\Delta} = 0,04$

Comparando os valores de Φ_{Δ} das ftalocianinas de rutênio analisadas, podemos verificar que as ftalocianinas substituídas apresentam valores inferiores às ftalocianinas não substituídas. Os grupos substituintes podem estar agindo como supressores de oxigênio singlete. Por outro lado, as ftalocianinas com grupos substituintes, mesmo com um Φ_{Δ} baixo, podem apresentar menor tendência de agregação e maior facilidade de internalização celular, o que favorece o efeito na citotoxicidade e eficiência na TFD.

O valor Φ_{Δ} encontrado para o complexo $[(Ru(Pc-R_4))]$ ($R_4 = DMX$), é condizente com valores encontrados na literatura para ftalocianinas com substituintes alquílicos periféricos (GOBO, 2012). Porém, nota-se que no espectro de absorção eletrônica na região do UV-visível deste composto, há uma banda na região entre 300 e 400 nm, que pode estar coincidindo com a banda em 410 nm do DPBF, interferindo na supressão.

Deve-se ressaltar que valor de Φ_{Δ} depende de vários fatores: rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico do estado tripleto, tempo de vida no estado tripleto, metal coordenante, presença de ligantes axiais, agregação, tipo de substituintes (doadores ou retiradores de elétrons). Em princípio o baixo valor Φ_{Δ} observado para $[(Ru(Pc-R_4))]$ ($R_4 = DMX$) pode ser devido a aspectos estruturais ou fenômenos fotoquímicos. A resposta fotobiológica pode prover subsídios a esta discussão, haja visto que a citotoxicidade comparativa deste composto com outros similares pode relatar sobre a fotoprodução de oxigênio singlete em meio biológico.

4.7 ESTUDOS BIOLÓGICOS

4.7.1 Viabilidade celular por MTT

A citotoxicidade dos compostos sintetizados neste trabalho foi avaliada quanto a sua capacidade anticancerígena. Neste contexto, além do aspecto estrutural relacionado a alguns dos compostos discutidos e avaliados quanto à viabilidade celular, efeito sinérgico de combinação de radicais também foi avaliado. Valendo-se da capacidade anticancerígena do NO (WINK, 2008), nos pareceu *sui generis* combinar este radical com oxigênio singlete, e avaliar o sinergismo contra linhagem celular cancerígena. Para isto valeu-se da característica hexacoordenada do íon metálico rutênio (II). Desta feita as espécies $[Ru(Pc)]$ e *trans*- $[Ru(NO)(Pc)(ONO)]$ foram preparadas. Aquela contendo NO e seus derivados produziria NO seguida da produção de oxigênio singlete.

4.7.1.1 Complexos [Ru(Pc)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)]

A atividade biológica dos complexos [Ru(Pc)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] foi avaliada pela análise da viabilidade celular. Ambos os compostos foram utilizados na concentração de 10 μ M, e irradiados no comprimento de $\lambda = 660$ nm por tempos diferentes, 4, 8 e 10 minutos (2.97, 5.95 and 8.93 J/cm², respectivamente). Sendo assim, estes foram comparados com aqueles que não foram submetidos à irradiação durante os mesmos intervalos de tempo.

Os ensaios de atividade citotóxica em diferentes tempos com e sem fotoestímulo foram realizados para observar o efeito sinérgico do complexo *trans* - [Ru(pc)(ONO)(NO)] pela ação do óxido nítrico liberado por processo redutimétrico e pela produção de oxigênio singleto quando o composto é irradiado na região da janela terapêutica (Figura 69). A relação da viabilidade celular para os dois compostos pode ser melhor visualizada na tabela 17.

Figura 69: Efeito citotóxico dos complexos [Ru(Pc)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] em linhagem de células tumorais B16F10, na concentração de 10 μ M, com 4 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso. Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 2 experimentos realizados de forma independente.

Tabela 17: Relação da viabilidade celular para os complexos [Ru(Pc)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] nos diferentes tempos de irradiação.

	MORTE CELULAR					
	ESCURO			CLARO		
Tempo de irradiação	4 min	8 min	12 min	4 min	8 min	12 min
[Ru(Pc)]	2 %	4 %	2%	26 %	33 %	43 %
<i>trans</i> - [Ru(NO)(Pc)(ONO)]	71%	74 %	70 %	75 %	78 %	81 %

Analizando a Figura 69 e a tabela 17, podemos observar que para o complexo [Ru(Pc)], a viabilidade celular diminuiu quando as células tratadas com este composto foram submetidas à irradiação quando comparadas com aquelas que não sofreram fotoestímulo (A e B). E ainda a citotoxicidade foi maior conforme se aumentou os tempos de irradiação. Podemos dizer que este efeito foi observado devido à produção do oxigênio singlete pela terapia fotodinâmica através do composto de rutênio-ftalocianina.

Quando comparamos os complexos [Ru(Pc)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] sem irradiação (A e C), verificamos que houve citotoxicidade para o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] mesmo na ausência de fotoestímulo. Isso deve ocorrer devido à presença de redutores biológicos presentes no interior celular que provocam o processo redutimétrico, liberando o óxido nítrico e causando efeito citotóxico.

Quando se compara o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] na ausência e presença de irradiação (C e D), nota-se um aumento significativo de morte celular apenas para o tempo de 12 minutos, podendo sugerir um efeito sinérgico que deverá ser melhor avaliado futuramente.

4.7.1.2 Complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)]

A atividade biológica dos complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] foi avaliada pela análise da viabilidade celular. Ambos os compostos foram utilizados na concentração de 10 µM, e irradiados no comprimento de $\lambda = 660$ nm por tempos diferentes. Sendo assim, estes foram comparados com aqueles que não foram submetidos à irradiação, durante diferentes intervalos de tempo.

Os estudos de viabilidade celular foram realizados através do método de MTT no sentido de avaliar a atividade citotóxica dos complexos sintetizados em diferentes tempos

com e sem fotoestímulo, bem como avaliar o efeito de morte celular do complexo [Ru(Pc-R₁)] pela produção de oxigênio singlete, quando o composto é irradiado na região da janela terapêutica. O estudo foi realizado em duas linhagens celulares: melanoma murino (B16F10) e carcinoma de mama humano (MCF7). Os resultados de viabilidade celular podem ser observados na figura 70 e comparados nas tabelas 18 e 19.

Figura 70: Efeito citotóxico dos complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] em linhagem de células tumorais B16F10 e MCF7, na concentração de 10 μ M, com 24 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso durante (8.93 J/cm²). Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 2 experimentos realizados de forma independente.

Tabela 18: Relação da viabilidade celular para os complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] na linhagem B16F10.

B16F10	MORTE CELULAR	
	Escuro	Claro
Tempo de irradiação	12 min	12 min
[Ru(Pc)]	7 %	47 %
[Ru(Pc-R1)]	7 %	51 %

Tabela 19: Relação da viabilidade celular para os complexos [Ru(Pc)] e [Ru(Pc-R₁)] na linhagem MCF7.

MCF7	MORTE CELULAR	
	Escuro	Claro
Tempo de irradiação	12 min	12 min
[Ru(Pc)]	9 %	14 %
[Ru(Pc-R₁)]	0 %	88 %

Nota-se que o complexo [Ru(Pc-R₁)] apresentou maior citotoxicidade que o complexo [Ru(Pc)], na presença de fotoestímulo, em ambas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho. É interessante ressaltar que ambos complexos sintetizados, quando submetidos à irradiação luminosa, apresentaram maior atividade citotóxica sobre a linhagem MCF7 que a cisplatina, droga padrão de uso quimioterápico (LIPPERT, 1999). Com base nos resultados de citotoxicidade obtidos é possível observar maior ação do composto [Ru(Pc-R₁)], quando avaliado sob fotoestímulo sobre a linhagem MCF7. Para a concentração de 10 μ M, o complexo [Ru(Pc-R₁)] apresentou morte celular de cerca de 88 % para MCF7, enquanto fora de cerca de 51 % para B16F10.

Diante do exposto, busca-se entender o porquê, aparentemente, o complexo de ftalocianina substituída tem um efeito mais citotóxico quando comparada à ftalocianina não substituída, mesmo apresentando um $\Phi\Delta$ de oxigênio singleto menor, já demonstrados anteriormente ($\Phi\Delta_{\text{RuPc}} = 0,35$ $\Phi\Delta_{\text{RuPcR1}} = 0,24$). Uma possível explicação é que, em meio biológico, a diferença de cargas entre as ftalocianinas, [Ru(Pc-R₁)] (carga negativa) e [Ru(Pc)] (carga neutra) possa influenciar na localização subcelular dos complexos, influenciando na atividade citotóxica.

4.7.2 Imagem

A sublocalização celular das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é muito importante, pois uma vez sabendo o sítio de ação que elas atuam, há uma melhor compreensão de como a atividade citotóxica ocorre. Os complexos de rutênio, [Ru(Pc)], *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] e [Ru(Pc-R₁)] apresentam propriedades fluorescentes, e portanto, podem ser especulados no interior celular por Microscopia de Fluorescência.

A figura 71, apresenta um ensaio em microscopia de fluorescência, no qual utilizou-se o filtro cianina 5 (Cy5) com excitação em 620/660 nm, próximo do comprimento de absorção

máxima dos compostos que é 642 nm para [Ru(Pc)], 682 nm para *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] e 647nm para [Ru(Pc-R₁)]. A concentração utilizada para os compostos foi de 20 µM e foram deixados incubando por 4 horas. Após a incubação dos compostos, as células observadas nas figuras A e B foram incubadas por 15 minutos com o marcador de núcleo Hoesch. As imagens foram obtidas no campo claro e escuro.

Em A, células B16F10 foram tratadas com o complexo [Ru(Pc)], B as células B16F10 foram tratadas com o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] e em C e D as células foram tratadas com o complexo Ru(Pc-R₁), sendo que em C trata-se da linhagem MCF7 e em D, B16F10. Os núcleos celulares foram marcados e podem ser observados na coloração azul (A e B). A luminescência dos compostos pode ser observada em vermelho e sobrepõe-se as células, mostrando que estes complexos de rutênio-ftalocianina foram internalizados pelas mesmas.

Embora destes resultados, ainda não é possível afirmar sobre a concentração internalizada dos compostos, que por certo influenciaria na citotoxicidade.

Figura 71: Microscopia de Fluorescência das células B16F10 (A, B e D) e MCF7 (C) tratadas com os complexos [Ru(Pc)], *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] e [Ru(Pc-R₁)] durante 4 horas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os complexos de rutênio, $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$, reproduzidos neste trabalho foram sintetizados e caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas. O método de purificação foi bastante estudado com o propósito de obter um produto final com elevado grau de pureza, para a posterior aplicação celular.

Uma vez compreendida as etapas sintéticas e as propriedades eletrônicas de complexos de rutênio-ftalocianina, os estudos foram dedicados para o desenvolvimento dos complexos de rutênio-ftalocianinas substituídas idealizados neste trabalho, $[\text{Ru}(\text{Pc}-\text{R}_1)]$, $[\text{Ru}(\text{Pc}-\text{R}_1-\text{R}_3)]$ e $[\text{Ru}(\text{Pc}-\text{R}_4)]$. As rotas sintéticas desses compostos bem como seus precursores, DCBz, DMX e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{DCBz})(\text{DMSO})_2]$, foram elucidadas. Entretanto, nota-se que houve uma grande dificuldade no processo de purificação de ftalocianinas assimétricas e por isso, verifica-se um baixo rendimento nas reações químicas.

As caracterizações realizadas forneceram subsídios para elucidação das estruturas iniciais propostas para tais compostos.

Os resultados preliminares de viabilidade celular mostraram que os compostos $[\text{Ru}(\text{Pc})]$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$ apresentaram citotoxicidade nas linhagens de células B16F10 e as células que foram irradiadas apresentaram menor viabilidade em relação aquelas que não foram submetidas à irradiação. Além disso, podemos observar que o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Pc})(\text{ONO})]$ foi mais citotóxico que o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$, sugerindo a liberação do NO por processo redutimétrico e sugerindo um possível efeito sinérgico através da irradiação da luz. O complexo $[\text{Ru}(\text{Pc}-\text{R}_1)]$ apresentou maior citotoxicidade quando comparou-se com o complexo $[\text{Ru}(\text{Pc})]$, na presença de luz em comprimento de onda específico, em ambas linhagens de células tumorais, B16F10 e MCF7.

Nos ensaios de imagem por microscopia de fluorescência foi possível observar que os complexos foram internalizados. A relação entre a internalização do composto que atravessa a membrana celular e atividade citotóxica é inerente à diminuição da viabilidade celular e isso poderá ser futuramente explorado.

Como perspectivas futuras, pretende-se explorar mais precisamente a atividade citotóxica desses complexos bem como o mecanismo bioquímico de ação para a morte celular.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

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: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, 250-281, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the cell**. 4. Ed. New York and London: Garland Science, 2002.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Journal Platinum Metals Review**, v. 45, p. 62, 2001.

ALLEN, T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, 750–763, 2002.

ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C.J.H. & SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, 27-42, 2004.

ALLISON, R. R., SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, 61-75, 2010.

AYARY, L; BOWN, S.G.; PEREIRA, S.P. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract carcinoma. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 35, n.1, 1-13. 2005.

BAGNATO, V.S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L. G.; SIBATA, C.H. & ALLISON, R.R. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, 107-118, 2005.

BALDEA, I.; FILIP, A.G. Photodynamic therapy in melanoma – un update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n.2, 109-118,2012.

BAKHTIAR , R.; OCHIAI, E. I. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, v. 32, 525-40, 1999.

BERNERS-PRICE, S.J.; BARNHAM, K.J.; FREY, U.; SADLER, P.J. Kinetic analysis of the stepwise platination of single- and double-stranded GG oligonucleotides with cisplatin and $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$. **Chemistry - A European Journal**, v. 2, p. 1283, 1996.

BLUM, H. F.; Photodynamic action and diseases caused by light. New York: Reinhold, 1941. Reprinted. New York: Hafner, 1964.

BONAVENTURA, D.; LIMA, R. G. ; SILVA, Roberto Santana da ; BENDHACK, L. M. . NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K^+ channels and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **NO Life Sciences** (1973), v. 89, 595-602, 2011.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, V.; TOGNIOLO, V.; TEDESCO, A. C.; SILVA, R. S., BENDHACK, L. M. A macrocyclic ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide- Chemistry and Biology**, v.10, p. 83, 2004.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, 19-33, 1995.

CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide-Chemistry and Biology**, v. 10, p. 179, 2004.

CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G.; POLLEFEYT, S.; KIECKENS, L.; GERTSENSTEIN, M.; FAHRIG, M.; VANDENHOECK, A.; HARPAL, K.; EBERHARDT, C.; DECLERCQ, C.; PAULING, J.; MOONS, L.; COLLEN, D.; RISAU, W.; NAGY, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v. 380, 435-439, 1996.

CARLOS, R. M.; FERRO, A. A.; SILVA, A. S.; GOMES, M. G.; FORD, P. C.; FRANCO, D. W. Photochemistry reactions of trans-[Ru(NH₃)₄L(NO)]₃⁺ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, p. 1381, 2004.

CARNEIRO, ZA ; BIAZZOTTO JC ; RODRIGUES FP ; LIMA, R. G. ; CURTI, C. ; DA ROCHA, ZN ; PAULO, M. ; BENDHACK, L. M. ; TEDESCO, A. C.; SILVA, R. S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex - a system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen (In Press). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, 1035-1043, 2011.

CASTANO A. P.; DEMIDOVA T. N.; HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizer, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, 279-293, 2004.

CASTRO, P.F.S.; BATISTA, A.C.; PEREIRA, A.C.; RODRIGUES, G. J. ; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.; ROCHA, M.L. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, 370-377, 2011.

CHATTERJEE, D.K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, 1627-1637, 2008.

CHERRINGTON, J.M.; STRAWN, L.M.; SHAWVER, L.K. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. **Advances in Cancer Research**, 79: 1-38, 2000.

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 Research**, v. 15, p. 3, 2005.

CHIDAWANYIKA, W., NYOKONG, T. The synthesis and photophysicochemical properties of low-symmetry zinc phthalocyanine analogues. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** 206, 169-176, 2009.

COLLINS, I.; WORKMAN, P. New approaches to molecular cancer therapeutics. **Nature Chemical Biological**, v. 2, 689–700, 2006.

CULOTTA, E.; KOSHLAND JUNIOR, D. E. NO news is good news. **Science**, v. 258, 1862-5, 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. **Inorganica Chemistry Communcations**, v. 11, p. 7370, 2008.

DA SILVA, R.S.; MARCHESI M.S.P.; KHIN, C.; LUNARDI C. N.; BENDHACK, L. M.; FORD, P. C. The photoinduced electron transfer between the cationic complexes $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pz}^{2+}$ e *trans*- $\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}^{2+}$ mediated by phosphate ion. Visible light generation of nitric oxide for biological targets. **Journal of Physical Chemistry, A, Molecules, Spectroscopy, Kinetics, Environment & General Theory**, v. 111, 6962-6968, 2007.

DA SILVA, E. R.; DOS SANTOS, E. P.; RICCI-JUNIOR, E.; Photodynamic therapy in the skin câncer treatment: concepts, utilizations and limitations. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, 211-217, 2009.

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

DE OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, São Paulo, 2002.

DE LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; BENDHACK, L. ; DA SILVA, R. S. Controlled Nitric Oxide Photo-release from Nitro Ruthenium Complexes: The Vasodilator Response Produced by UV light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 643, 2005.

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 Photo-Release by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 2543, 2006.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**. 233, 351-71, 2002.

D'SOUZA, S., ANTUNES, E., NYOKONG T. Synthesis and photophysical studies of CdTe quantum-dot monosubstituted zinc phtalocyanine conjugates. **Inorganica Chimica Acta**, 367, 173-181, 2011.

DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAAPT, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photo radiation therapy for treatment of malignant-tumors. **Cancer Research**, v. 38, p. 2628, 1978.

DOUGHERTY, T. J.; POTTER, W. R.; WEISHAAPT, K. R.; The structure of the active component of hematoporphyrin derivative, **Progress Clinical Biological Research**. v. 170, p. 301, 1984.

DOUGHERTY, T.J; HENDERSON, B. Historical perspective: Schwartz S, Winkelman JW, Lipson RL. In: Henderson BW, Dougherty TJ, editors. **Photodynamic therapy**. New York: Marcel Dekker Inc., 1–15, 1992.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy: Part II. **Seminars in Surgery Oncology**, v. 11, p. 333, 1995.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W. The surprising life of nitric oxide. **Chemical and Engineering News**, v. 26, 1993.

FEREZIN, C. Z.; OLIVEIRA, F. S.; da SILVA, R.S.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L. M. The complex $\text{trans-[RuCl([15]aneN}_4\text{NO)]}^{+2}$ induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 3, 170-175, 2005.

FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H.; DOWD, M.; LU, L.; O'SHEA, K. S.; POWELL-BRAXTON, L.; HILLAN, K. J.; MOORE, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, v. 380, 439-442, 1996.

FERREIRA, K.Q.; CARDOSO, L.N.; NIKOLAOU, D.; DA ROCHA, Z.N.; SILVA, R.S.; TFOUNI, E. Solvent dependent conformational isomerism and ligand oxidation of novel Ru (II) cyclen complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 44, 5544-5546, 2005.

FERREIRA, K.Q.; SANTOS, F.G.; DA ROCHA, Z.N.; GUARATINI, T.; TFOUNI, E. ; DA SILVA, R.S. Conformational isomers of cis-chloro(nitrosyl)(1,4,7,10-tetraazacyclododecene)ruthenium(II), cis-[(RuCl)-Cl-II(imcyclen)(NO⁺)](2⁺). Oxidation of the coordinated 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclem) ligand. **Chemical Communications**, v. 7, n. 2, 204-208, 2004.

FILHO, G. B. **Distúrbios do crescimento e diferenciação celular**. Belo Horizonte: Guanabara-Koogan S.A, 5 ed. Cap. 8, 144-186, 1994.

FLITNEY, F. W.; MEGSON, I. L.; THOMSON, J. L. M.; KENNOVIN, G. D.; BUTLER, A. R. BR. Vasodilator responses of rat isolated tail artery enhanced by oxygen-dependent, photochemical release of nitric oxide from iron-sulphur-nitrosils. **Journal of Pharmacology**, v. 117, 1549-1557, 1996.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England of Journal Medicine**, v. 285, 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumours are angionenesis dependent? **Journal National Cancer Institute**, v. 82, p. 4, 1990.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, p. 659, 1991.

FORD, P. C.; LAVERMAN, L. E. Reaction Mechanisms Relevant to the Formation of Iron and Ruthenium Nitric Oxide Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 391, 2005.

FRY, N.L.; MASCHARAK, P.K.; Photoactive ruthenium nitrosyls as NO donors: how to sensitize them toward visible light. **Accounts of Chemistry Research**, v. 44, n.4, 289-98, 2011.

GRAEBER, T.G.; OSMANIAN,C.; JACKS,T.; DE HOUSMAN.; KOCH, C.J.; LOWE, S. W.; GIACCIA, A.J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. **Nature**, v. 379(6560), 88-91, 1996.

HANACK, M.; KOBEL, W. Bisaxially Coordinated (Phthalocyanato)ruthenium(II) Compounds. **Inorganic Chemistry**, v. 25, p. 103, 1986.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, 646–674, 2011.

HÖCKEL, M.; SCHLENGER, K.; ARAL, B.; MITZE, M.; SCHAFFER, U.; VAUPEL, P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. **Cancer Research**, v. 56, 4509–4515, 1996.

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

GUPTA, S.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Involvement of Nitric Oxide during Phthalocyanine (Pc4) Photodynamic Therapy-mediated Apoptosis. **Cancer Research**, v. 58, p. 1785, 1998.

GROBOSCH, M.; SCHMIDT, C.; NABER, W. J. M.; VAN DER WIEL, W. G.; KNUPFER, M. A. Photoemission study of interfaces between organic semiconductors and Co as well as Al₂O₃/Co contacts. **Synthetic Metals**, v.160, p. 238, 2010.

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. **Inorganica Chimica Acta**, v. 300, p. 698, 2000.

GOLD, M.H. Photodynamic Therapy: Indications and Treatment Aesthetic Surgery. **Journal Aesthetic Surgery Jpras**, v. 28, n. 5, 545-52, 2008.

IGNARRO L. Nitric Oxide: Biology and Photobiology. **Academic Press**. San Diego, California, USA, 1. d, 2000.

JAIN, R.K; DUDA, D.G.; CLARK, J.W.; LOEFFER, J.S.; Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 3, 24–40, 2006.

KADISH, K.M.; SMITH, K.M.; GUILARD, R. Physiochemical Characterization. **The Porphyrin Handbook-World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.**, v. 7, cap. 34, 2010.

KOLAROVA H.; NEVRELOVA P.; BAJGAR R.; HROVA D.; KEJLOVA K.; STRNAD M.; In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phtalocyanine.**Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 249, 2007.

KORBELIK, M.; PERKINS, C.S.; SHIBUYA, H.; CECIC, I.; STRATFORD, M.R.L.; CHAPLIN, D.J. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 11, 1835-1843, 2000.

KOZLOWSKI, P. M.; KUTA, J.; OHTA, T.; E KITAGAWA, T. Resonance Raman enhancement of FeIV = O stretch in high-valent iron porphyrins: An insight from TD-DFT calculations. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 744, 2006.

KRAUSE, D.S.; VAN ETTEN, R.A. Tyrosine kinases as targets for cancer cells. **New England Journal of Medicine**, v. 353, 172–187, 2005.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection. How, why, when, and where?, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, p. 107, 1997.

LACEY, J.A. & PHILLIPS, D. The photobleaching of disulfonated aluminium phthalocyanine in microbial system. **Photochemistry Photobiology Science**, v. 1, 120-25, 2002.

LAMMERS, T.; HENNINK, W.E.; STORM, G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. **British Journal of Cancer**, v. 99, 392–397, 2008.

LAMMERS, T.; KIESSLING, F.; HENNINK, W.E.; STORM, G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. **Journal of Controlled Release**, v. 161, 175–187, 2012.

LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**, 2nd ed., New York, Elsevier, 1984.

LUNARDI, C. N.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, 87-93, 2009.

MAESTRIN, A.P.J.; TEDESCO, A.C.; NERI, C.R.; GANDINI, M.E.F; SERRA, O.A.; IAMAMOTO, Y. Synthesis, spectroscopy and photosensitizing properties of hydroxynitrophenylporphyrins. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.15, n. 5, 708-713, 2004.

MARANHO, D.; de LIMA, R.G.; PRIMO, F.L.; da SILVA, R.S.; TEDESCO, A. C. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, 705-713, 2009.

MARCUCCI, F.; LEFOULON, L. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. **Drug Discovery Today**, v. 9, 219–228, 2004.

MARQUELE-OLIVEIRAS, F.; SANTANA, D.C.A.S.; TAVEIRA, S.F.; VERMEULEN, D.M.; OLIVEIRA, A.M.; da SILVA, R. S.; LOPEZ, R.F.V. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 391, 21-28, 2010.

MATLABA, P. M. Synthesis of zinc phthalocyanine derivatives for possible use in photodynamic therapy. Dissertação de Mestrado, Rhodes University, 2002.

MARTINS, T. J.; Síntese e Caracterização de Heteropentâmeros formados por Cobaltoftalocianina e Cobaltotetrafenilporfirina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2012.

MITTAL, K. L.; Polyimides and other high-temperature polymers: Synthesis, Characterization and Applications. **Koninklijke Brill NV**, Leiden, Netherlands, v. 5, p. 78, 2009.

MIQUEROL, L.; LANGILLE B.L.; NAGY, A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. **Development**, v. 127, 3941–3946, 2000.

MOLLIE, A. & MACCORMACK, C. Photodynamic Therapy in Dermatology: An Update on Applications and Outcomes. **Seminars Cutaneous Medicine Surgery**, v.27, 52-62, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **The New England Journal of Medicine**, v.329, n.27, 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, R. A. Nitric oxide: physiology photophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, 55-63, 1983.

MUIJSERS, R.B.R.; TEN HACKEN, N. H. T.; VAN ARK, I.; FOLKERTS, G.; NIJPAM, F. P.; POSTMA, D. S. L-Arginina is not be limiting factor for nitric oxide synthesis by human alveolar macrophages in vitro. **European Respiratory Journal**, v. 18, p. 667, 2001.

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 in Surgery and Medicine**, v.43, n.7, 705-12, 2011.

NEUMAN, D.; OSTROWSKI, A.D.; ABSALONSON, R.O.; STROUSE, G.F.; FORD, P.C. Photosensitized NO release from water soluble nanoparticle assemblies. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 129, p. 4146, 2007.

OLIVEIRA, F.S.; TOGNILOLO, V.; PUPO, T.T.; TEDESCO, A.C.; da SILVA, R.S. Nitrosyl Ruthenium Complex as Nitric Oxide Delivery Agent: Synthesis, Characterization and Photochemical Properties. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 7, p. 160, 2004.

OCHSNER, M. Ligth scattering of human skin: A comparison between Zinc(II) phthalocyanine and photofrin II. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 32, 3-9, 1996.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological properties in photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 39, 1-18, 1997.

OUGH, E. A.; MARTIN, J. Stillman Analysis of the absorption and magnetic circular dichroism spectra of iron(II) phthalocyanine. **Inorganic Chemistry**, v. 33, p. 573, 1994.

QUON, H.; GROSSMAN, C.E.; FINLAY, J.C.; ZHU, T.C.; CLEMMENS, C.S.; MALLOY, K.M.; BUSH, T.M. Photodynamic therapy in the management of pre-malignant head and neck mucosal dysplasia and microinvasive carcinoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, 75-85, 2011.

POON, R.T.; NG, I.O.; LAU, C.; YU, W.C.; FAN, S.T.; WONG, J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. **The American Journal of Surgery**, v. 182, 298-304, 2001.

RIBEIRO, J.N.; FLORES, A.V.; MESQUITA, R.C.; NICOLA, J. H.; NICOLA, E.M.D. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. **Physicae**, Ano 5, n. 5, 2005.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. **Metal nitrosyls**. Nova Iorque, Oxford University Press, Inc., 1992.

ROBERTSON, J.M. An X-ray study of the phthalocyanines. Part II. Quantitative structure determination of the metal-free compound. **Journal of Chemical Society**, 1195-1209, 1936.

RODRIGUES G.J.; LUNARDI C.N.; LIMA R.G.; SANTOS C.X.; LAURINDO F.R.; DA SILVA R.S. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 18, 176-183, 2008.

RODRIGUES, G.J.; CICILLINI, S.A.; da SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. **Nitric Oxide**, 331-337, 2011.

ROY, B.; DHARDEMARE, A.D.; FONTECAVE, M. New thionitrites - synthesis, stability, and nitric-oxide generation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 23, 7019-7026, 1994.

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M. & VANLIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, 507-17, 1999.

SCHWIETERT, C. W.; McCCUE, J. P. Coordination compounds in medical chemistry. **Coordination Chemical Review**, v. 184, p. 67, 1999.

SAUAIA, M. G.; OLIVEIRA F. S.; TEDESCO, A. C.; da SILVA, R. S. Control of NO release by from ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 355, p. 191, 2003.

SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 44, p. 9946, 2005.

SENGER, D.R.; GALLI S.J.; DVORAK A.M.; PERRUZZI C.A.; HARVEY V.S.; DVORAK H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, 983–985, 1983.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Medical and Biological Research**, v. 33, 869-880, 2000.

SIERRA, M. M. S.; GIOVANELA, M. A. Utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: Evolução e perspectivas. **Química Nova**, v. 19, p. 294, 1995.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F. & HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, 801-07, 2002.

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

SOBOLEV , A. A.; JANS, D.A.; ROZENKRANZ, A. A. Target intacellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 73, n. 1, 51-90, 2000.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WOHRLE, D.; HACKBARTH, S.; RODER, B. & SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of diferent photo-sensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal Porphyrin Phtalocyanine**, v. 2, n. 2, 145-158, 1998.

STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and metal complexes in medicine. **Coordination Chemical Review**, v. 171, 203-20, 1998.

SZCEPURA, L.F.; TAKEUCHI, K.J. Synthesis and characterization of novel (cyclopentadienyl) nitroruthenium complexes. **Inorganic chemistry**, v. 29, p. 1772, 1990.

TASSO, T.T.; Síntese, Caracterização e Estudo das Propriedades eletrônicas de Heterocomplexos formados por 4,4',4'',4''', Tetrassulfoftalocianina de Cobalto (II) e Tetrakis (N-metil-4-piridil)porfirina de Cobalto (II) e Formação de Filmes Layer-by-Layer. Dissertação Mestrado, 2011.

TAUB, A.F. Photodynamic therapy: other uses. Review. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.25, n.1, 101-9, 2007.

TEDESCO, A.C.; ROTTA, J.C.; LUNARDI, C.N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry**, v. 7, p. 187, 2003.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W.; Structure chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 57, 2003.

TFOUNI, E.; FERREIRA, K.Q.; DORO, F.G.; da SILVA, R.S.; da ROCHA, Z. N. Ru(II) and Ru(III) complexes with cyclam and related species. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 405, 2005.

TOGNIOLO, V.; da SILVA, R.S.; TEDESCO, A.C. Photo-induced nitric oxide release from chlobis(2,2'-bipyridine) nitrosylruthenium(II) in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v. 316, p. 7, 2001.

TRIESSCHEJIN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, H.M. & STEWART, F.A. Photodynamic Therapy in Oncology. **The Oncologist**, v. 11, 1034- 44, 2006.

VAUPEL, P.; HARRISON, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. **Oncologist**, v. 9 (suppl 5), 4-9, 2004.

WANG, A.; LONG, L.; ZHANG, C. Synthesis of unsymmetrical phthalocyanines: a brief overview. **Tetrahedron**, v. 68, 2433-2451, 2012

WANG L, SHI GG, YAO JC, GONG W, WEI D, WU TT, AJANI JA, HUANG S, XIE K. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 8, n. 1, 18-28, 2005.

WECKSLER, S. R.; MIKHAILOVSKY A.; KORYSTOV D.; FORD P.C. A two-photon antenna for photochemical delivery of nitric oxide from a water-soluble, dye-derivatized iron nitrosyl complex using NIR light. **Journal of Chemical Society**, v. 128 , p. 3831, 2006.

WELLER, R. Nitric Oxide: a key mediator in cutaneous physiology. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, p. 511, 2003.

WINK, D. A.; DARBYSHIRE, J. F.; NIMS, R. W.; SAAVEDRA, J. E.; FORD, P. C. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, p. 23, 1993.

WINK, D. A.; GRISHAM, M. B.; MITCHELL, J. B.; FORD, P. C. In: Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. In: PACKER, L. (ed.) Nitric Oxide. Part A: sources and detection of NO; NO synthase. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 12, 1996.

WINK, D. A.; RIDNOUR, L.; THOMAS, D.; SWITZER, C.; FLORES-SANTANA, W.; ISENBERG, J.; AMBS, S.; ROBERTS, D. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. **Nitric Oxide- Chemistry and Biology**. v. 19, p. 73, 2008.

WORKS, C.F.; JOCHER, C.J.; BART, G.D.; BU, X.H.; FORD, P.C. Photochemical nitric oxide precursors: synthesis, photochemistry, and ligand substitution kinetics of ruthenium salen nitrosyl and ruthenium salophen nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 14, 3728-3739, 2002.

WU H.C.; LI, P.C. Proteins expressed on tumor endothelial cells as potential targets for anti-angiogenic therapy. **Journal of Cancer Molecules**, v. 4, n. 1, 17-22, 2008.

ZAGO, Anderson Saranz and ZANESCO, Angelina. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.87, n.6, 264-270, 2006.

ZEITOUNI, N.C.; OSEROFF, A.R. & SHIEH, S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers: current review and update. **Molecular Immunology**, v. 39, 1133-36, 2003.

ZIMINOV, A.V.; RAMSH, S.M.; TERUKOV, E.I.; TRAPEZNIKOVA, I.N.; SHARMANIN, V.V.; YURRE, T.A. Correlation Dependences in Infrared Spectra of Metal Phthalocyanines. **Semiconductors**, v. 40, p. 1131, 2006.