UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para
potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica
mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos,
bioquímicos e fotobiológicos**

Laísa Bonafim Negri

**Ribeirão Preto
2019**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LAÍSA BONAFIM NEGRI

Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos, bioquímicos e fotobiológicos

Ribeirão Preto

2019

LAÍSA BONAFIM NEGRI

Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos, bioquímicos e fotobiológicos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Química e
Física Biológica.

Orientador(a): Prof. Dr. Roberto
Santana da Silva

Ribeirão Preto

2019

LOMBADA

NEGRI, L.B.	Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos, bioquímicos e fotobiológicos	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO FCFRPUSP 2019
-------------	--	---	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos, bioquímicos e fotobiológicos. Ribeirão Preto, 2019.

215 p.: il. ; 30cm.

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

Orientador: Silva, Roberto Santana da.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Rutênio-Ftalocianina. 3. Óxido Nítrico. 4. Fotobiomodulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laísa Bonafim Negri

Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos, bioquímicos e fotobiológicos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*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
Por me ensinarem a sonhar
E a lutar pelos meus sonhos
Pela essência que sou e por tudo que conquistei!
Por mais uma batalha vencida,*

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, por mais esta caminhada!

“Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Santana da Silva,

“Comece pelo princípio, e, quando chegar ao fim, Pare!”

(Lewis Carroll)

Hoje encerro um ciclo de 12 anos no laboratório do Prof. Roberto Santana da Silva, entre iniciação científica, mestrado e doutorado. E penso que minhas palavras serão poucas para expressar toda a gratidão que eu sinto por tudo que vivi nesse laboratório. Uma retrospectiva desde o dia em que fui pedir um estágio de iniciação científica por ter perdido meu pai, e precisar ocupar minha cabeça, invade-me. Mal sabia eu que estava ganhando um outro “pai” científico, um orientador renomado, um “chefe” como poucos, com imensos caráter e humildade, que, apesar de tamanha sabedoria, nunca teve problemas em dividir e compartilhar todo seu conhecimento com a única finalidade de enriquecer o aprendizado de seus alunos. Ao meu querido chefe, obrigada por me ensinar amar a química e por fazer eu me apaixonar todos os dias pela ciência. Obrigada por toda a confiança, todos os puxões de orelha, por enxergar além das minhas limitações e por me desafiar para que eu me tornasse não só uma profissional, mas uma pessoa melhor a cada dia. Sou muito grata por todas as oportunidades que me proporcionou, por lutar tanto por mim e por viver comigo o meu grande sonho de Harvard! Enfim, acredito que cheguei ao “fim” de uma grande trajetória, que construí ao seu lado, e da qual tenho muito orgulho. Mas, ao contrário da frase de Lewis Carroll, ainda não será hora de “parar”! Apenas iniciar um novo ciclo, no qual levarei e compartilharei todos os seus ensinamentos para, quiçá, um dia, me tornar uma cientista tão brilhante quanto o meu orientador, pai, chefe e amigo. Com carinho, o meu eterno agradecimento!

Aos meus pais, Rosana Negri e Luiz Carlos Negri

"...Porém, saberás que cada vez que voem, sonhem, vivam, cantem e pensem... Estará a semente do caminho ensinado e aprendido!"

(Madre Teresa de Calcutá)

Agradeço aos meus pais por sempre terem me ensinado a sonhar e a lutar pelos meus sonhos! E me permitirem buscar voos sempre mais altos. Mas nada seria possível se eu não pudesse contar com vocês em todos eles. Obrigada pai, por estar sempre comigo como uma estrelinha dentro do meu coração, iluminando todos os meus dias. Obrigada mãe, por tanta, tanta, tanta ajuda, pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis, por se sacrificar tanto em detrimento das minhas lutas diárias e, principalmente, por me ajudar para que tudo se tornasse mais fácil e menos árduo. Obrigada por vibrarem comigo por cada conquista e por me conduzirem pelos mais belos caminhos sempre com muita paciência, amor e dedicação. Vocês são meus maiores exemplos de força e coragem. A vocês, meu eterno amor e gratidão...!

Ao meu Moção, Luiz César Justo,

*"Não importa a distância que nos separa,
Se há um céu que nos une"*

(Carlos Drummond de Andrade)

Obrigada meu amor pela sua parceria vivenciando comigo todos os momentos de alegrias e tristezas. Pela sua compreensão e paciência, principalmente ao longo do nosso interminável um ano separados. Pela sua companhia, seu sorriso, suas palavras e por todo seu amor! Minha eterna gratidão!

À minha mãe científica, Juliana Cristina Moraes,

*"O amigo: um ser que a vida não explica
Que só se vai ao ver o outro nascer
E o espelho da minha alma multiplica..."*

(Vinícius de Moraes)

Obrigada por ser a minha mãe científica, com todos os benefícios e puxões de orelha que só uma mãe tem. Mas acima de tudo, obrigada por ter contribuído com o meu desenvolvimento científico, com todo o seu caráter exemplar, profissionalismo e dedicação. Obrigada pelos

nossos anos de amizade e por você estar sempre disposta a me ajudar sem nunca precisar de nada em troca. Onde quer que eu esteja, vou te levar para vida toda. Sou muito grata a tudo que fez e faz por mim!

À minha família,

Agradecimento ao meu irmão Luiz Carlos Negri e minha cunhada Gheisa Negri. Pelo apoio incondicional e por estarem presentes em todos os momentos, torcendo pelo meu sucesso. E por terem me dado os meus maiores presentes, Lucas e Pedro, que enchem o coração da titia de alegria e amor.

A todos os meus familiares que me dão forças e torcem por mim. Em especial minhas madrinhas Tia Eliana e Tia Dinha, e minha Tia Estela pela paciência e disponibilidade em todos os momentos de dúvidas sobre a língua portuguesa.

Aos amigos de laboratório,

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina!”

(Cora Carolina)

Agradeço os amigos de laboratório Alexia, Bruna Possato, Camila Fontes, Cassia Dias, Carolina Prazias, Fabiana de Oliveira, Felipe Reis, Jacqueline Querino, Juliana Uzuelli, Juliana Moraes, Kelly Castro, Clóvis Junior, Laena Permonian, Leandro Máximo, Lilian Franco, Loyanne Ramos, Lucimara Aggarwal, Mariete Moreira, Natcha Cacita, Phamilla, Rafaella Rios, Renatinha, Renata Galvão, Simone Ciccilini, Tássia Joi e Tassiele Heinrich. Sem dúvida alguma, foram muito mais que companheiros de trabalho, foram como uma família, que eu convivi a maior parte do meu dia-a-dia. Obrigada por serem exemplos de coragem e determinação em abraçar um caminho que certamente não é o mais fácil, mas juntos conseguimos transformar esse caminho árduo, mais gratificante. Obrigada por me ensinarem tanta química, pelas discussões científicas, pelos momentos de risada e por me ajudarem tanto para o meu desenvolvimento científico. Eu não tenho palavras para agradecer e para dizer o quanto vocês foram importantes pra mim durante o meu desenvolvimento acadêmico. Sinto-me abençoada por trabalhar com pessoas que estão dispostas a ajudar todos os dias, tornando o ambiente de trabalho ainda mais prazeroso.

Agradeço em especial à Alexia Marques por toda ajuda e suporte no meu exame de qualificação.

À Kelly Castro por estar sempre disposta a ajudar e pelo apoio incondicional no desenvolvimento desse trabalho.

À Loyanne e Laena pelas inúmeras discussões biológicas e por estarem sempre dispostas a me ajudarem com minhas dúvidas.

Um agradecimento especial à amiga 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.

“I would like to say many thanks to my friends from Wellman Center for Photomedicine, Raquel Ferrer, Tia He, Ying Ying Huang, MingXin to helping me a lot in Boston, contributing my knowledge, scientific discussions and moments of relaxation. Thank you for introducing me to Chinese culture. I will always remember you. Thank you!”

A todos os meus amigos,

Agradeço a todos os meus amigos pelo apoio incondicional e por sempre torcerem por mim. Às minhas amigas de infância: Fernanda, Giovanna, Marília e Tiago (afilhados queridos) e Pauline e Ciro (afilhados queridos de coração). Aos meus queridos amigos: Mari Arieta e Vandão (afilhados queridos), Beatriz Mantovanini e Rafa Gomes (quase afilhados), Carol Bustamante e Daniel Franciscato (afilhados queridos), Ana Livia e Henrique Tostes (afilhados queridos), Jéssica, Marina Silveira, Fernanda Nasser e Luisa Rigitano (salvadora da pátria). Às minhas eternas amigas de faculdade, Janaína, Carol Catini, Maria Carolina, Paula Valim e Du (afilhados queridos), Luana, Gisely, Gabi e Verônica Cestari. 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 colaboradores deste trabalho,

“My special thanks to Dr. Michael Hamblin and his group, for his hospitality during my time at Wellman Center for Photomedicine/Harvard Medical School. Dr. Hamblin, I am grateful for all the scientific discussions with your team that contributed a lot to my development like a researcher. It was a great pleasure learns about your research and be part of your team. It was a privilege to develop my research with someone who is one of the bests names in PDT I already seen. Thank you so much for your time and your patience with me”.

À Laís Fugio pelo apoio incondicional e por partilhar comigo de maneira tão generosa toda experiência e conhecimento para os ensaios de *Western Blotting*.

A todos os professores, funcionários e técnicos da FCFRP, por sempre ser muito bem recebida por onde passei. Pelo profissionalismo, eficiência, dedicação, acolhida durante todos esses anos.

A todos os Técnicos de Laboratório pela paciência e disposição. 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.

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

*“Que os nossos esforços desafiem as
impossibilidades. Lembrai-vos de que as
grandes proezas da história foram
conquistas daquilo que parecia
impossível”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

NEGRI, L. B. **Fotobiomodulação e óxido nítrico como estratégias para potencializar a ação antitumoral da terapia fotodinâmica mediada por rutênio-ftalocianinas: Aspectos químicos, bioquímicos e fotobiológicos.** 2019. 245f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A irradiação luminosa tem sido utilizada por várias décadas em terapia clínica, entre elas destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD favorece a morte celular através da combinação do efeito de um fotossensibilizador, da luz e do oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). No entanto, quando um desses componentes é um fator limitante, as células tratadas, ao invés de morrerem, podem ativar vias bioquímicas de defesa que promovem o crescimento celular, propiciando a recorrência tumoral. Baseado nisso, a proposta deste trabalho é apresentar estratégias que possam potencializar a morte de células tumorais pela TFD, evitando a sobrevivência de fragmentos celulares e possível recidiva da doença. Uma das possibilidades é o desenvolvimento de fotossensibilizadores que além de produzir ERO, possam também produzir óxido nítrico (NO), uma molécula que além de um radical que propicia o stress oxidativo e nitrosativo celular, é um importante mensageiro biológico que apresenta um duplo papel na regulação de vias bioquímicas que controlam a recuperação celular. Dessa forma, este trabalho consiste no aprimoramento da síntese dos fotossensibilizadores do tipo rutênio-ftalocianina, *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]. A caracterização foi realizada por diferentes técnicas analíticas como UV-Vis, Infravermelho, RMN, EPR e espectrometria de massas que, em conjunto, permitiram avaliar a eficiência das rotas sintéticas utilizadas. Os aspectos fotoquímicos e fotofísicos foram avaliados em relação à produção de ERO e NO por irradiação luminosa em 660 nm e processos redutimétricos. A citotoxicidade dos complexos foi avaliada na ausência e presença de irradiação em 660 nm, tanto nas linhagens tumorais B16F10, A375 e MCF7 quanto nas linhagens não-tumorais 3T3, L929 e MCF10. O efeito sinérgico do NO e ERO produzidos pela fotoestimulação do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] foi avaliado e comparado com o efeito na citotoxicidade do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], que quando fotoestimulado produz apenas ERO. Os estudos de viabilidade celular mostraram que 1,0 µM dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], sob TFD 3,0 J.cm⁻², promoveram morte celular de 63% e 90% para A375 e 64% e 72% para MCF7, respectivamente. Os estudos se estenderam quanto à relevância da sublocalização celular dos complexos através da microscopia confocal, com diferentes marcadores biológicos, e o que esse resultado implica no processo de morte celular. O mecanismo de morte celular foi estudado por *Western Blotting*, constatando-se que há a expressão das proteínas caspase-3-clivada, BAX e citocromo c, quando as células tumorais são submetidas à TFD mediante os complexos, sugerindo o estímulo do processo apoptótico pela via intrínseca. O efeito sinérgico do NO na TFD foi estudado avaliando-se o papel do NO na recorrência celular pelos ensaios de *Scratch Wound* e na regulação dos mecanismos de sobrevivência relacionados à expressão do fator de transcrição anti-apoptótico NF-kB. O NO pareceu inibir o NF-kB, sugerindo que o efeito sinérgico se deu tanto pelo estímulo de proteínas pró-apoptóticas quanto pela inibição de proteínas anti-apoptóticas. Outra estratégia apresentada a fim de potencializar a TFD, é a fotoestimulação em duplo comprimento de onda, fazendo a aplicação de uma nova terapia chamada Fotobiomodulação (PBM) em 850 nm, seguida da TFD em 660 nm. No presente trabalho, discute-se como a PBM pode modular a via de sinalização, via produção de ROS, ATP e NO, e influenciar na internalização celular dos complexos favorecendo o efeito sinérgico na morte celular quando combinado à TFD.

Palavras chave: Terapia Fotodinâmica, Rutênio-Ftalocianina, Óxido Nítrico, Fotobiomodulação.

ABSTRACT

NEGRI, L. B. **Photobiomodulation and nitric oxide as strategies to potentiate the antitumor action of photodynamic therapy mediated by ruthenium-phthalocyanines: Chemical, biochemical and photobiological aspects.** 2019. 245f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Light irradiation has been used in clinical therapy, including Photodynamic Therapy (PDT), for several decades. PDT favors cell death by combining the effect of a photosensitizer, light, and oxygen to generate reactive oxygen species (ROS). However, when one of these components is a limiting factor, instead of dying, the treated cells can activate biochemical defense pathways that promote cell growth, causing the tumor to recur. This work aims to present strategies that can potentiate the tumor cell death elicited by PDT, avoiding cellular fragment survival and possible disease recurrence. One of the possibilities is to develop photosensitizers that can produce not only ROS, but also nitric oxide (NO), a radical molecule that underlies oxidative and nitrosative cellular stress and which is an important biological messenger that plays a dual role in regulating biochemical pathways controlling cell recovery. This work has improved the synthesis the ruthenium-phthalocyanine photosensitizers *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] and *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], which were characterized by different analytical techniques such as UV-Vis, Infrared, NMR, EPR, and mass spectrometry. Together, these techniques helped to evaluate the efficiency of the employed synthetic routes. Photochemical and photophysical aspects were examined in terms of ERO and NO production by light irradiation at 660 nm and reductimetric processes. The cytotoxicity of the photosensitizers was assessed in both the absence and presence of irradiation at 660 nm against the tumor lines B16F10, A375, and MCF7 and the non-tumor cell lines 3T3, L929, and MCF10. The synergistic effect between NO and ERO elicited by *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] photostimulation was evaluated and compared to the cytotoxic effect of *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)]—when photostimulated, the latter complex produces only ROS. The cell viability studies showed that 1.0 μM *trans*- [RuCl(Pc)(DMSO)] and *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] complexes under 3.0 J.cm⁻² PDT promoted 63% and 90% A375 cell death and 64% and 72% MCF7 cell death, respectively. The studies were extended regarding the relevance of the photosensitizer cellular sub-localization as assessed by confocal microscopy with different biological probes. The results implied cell death. The cell death mechanism was investigated by Western blot, which revealed expression of caspase-3-cleaved proteins, BAX, and cytochrome c when the tumor cells were submitted to PDT in the presence of the synthesized photosensitizers. This suggested that apoptosis was stimulated by the intrinsic pathway. The NO synergistic effect NO on PDT was studied by evaluating the role that NO plays in cell recurrence by the Scratch Wound assays and the regulation of survival mechanisms related to the expression of the anti-apoptotic transcription factor NF-kB. NO appeared to inhibit NF-kB, suggesting that the synergistic effect was due to pro-apoptotic protein stimulation and anti-apoptotic protein inhibition. Another strategy that seemed to potentiate PDT was double wavelength photostimulation by using a new therapy called Photobiomodulation (PBM) at 850 nm, followed by PDT at 660 nm. The way PBM can modulate the signaling pathway via ROS, ATP, and NO production and how the photosensitizer cellular internalization combined with PDT favors the synergistic effect on cell death are also discussed.

Keywords: Photodynamic Therapy, Ruthenium-phthalocyanine, Nitric Oxide, Photobiomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação do processo de desenvolvimento do câncer, no qual uma célula que sofreu uma mutação somática no material genético se reproduz desordenadamente dando origem a massa tumoral que invade tecidos saudáveis.....	4
Figura 1.2 - Representação da formação de tumores benignos e malignos, evidenciando o processo de metástase no qual há a invasão e disseminação das células do tumor maligno pela circulação sanguínea, acometendo outros órgãos e tecidos.	4
Figura 1.3 - Histórico do surgimento da TFD.....	10
Figura 1.4 - Princípios da TFD.....	11
Figura 1.5 - Penetração da luz no tecido.	11
Figura 1.6 - Diagrama de Jablonski.....	13
Figura 1.7 - Estrutura do derivado de hematoporfirina (HPD), Photofrin®.	17
Figura 1.8 - Estrutura química e espectro de absorção dos fotossensibilizadores porfirina (A), clorina (B) e bacterioclorina (C).	18
Figura 1.9 - Estrutura de porfirinas substituídas periféricamente.	19
Figura 1.10 - Conversão do Ácido 5-aminolevulínico em Protoporfirina IX.	20
Figura 1.11- Estrutura de FS derivados do ALA. Metil-aminolevulinato (MAL) e hexaminolevulinato (HAL), um éster n-hexílico.	21
Figura 1.12- Estrutura dos FS da família das clorinas.	21
Figura 1.13 - Estrutura de FS da família das ftalocianinas.	22
Figura 1.14 - Estrutura química das ftalocianinas. A: Ftalocianina de Base Livre B: Metaloftalocianina.....	26
Figura 1.15 - Diferença nas estruturas moleculares de complexos metálicos a base de platina para o tratamento antitumoral: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.	28
Figura 1.16 - Complexos de rutênio promissores na atividade anticâncer. A) NAMI-A e B) KP1019.....	29
Figura 1.17 - Comparação de porfirinas de rutênio e ródio sintetizadas por Schmitt e colaboradores.....	30
Figura 1.18 - Produção de NO a partir da oxidação da L-arginina produzindo L-citrulina e NO, catalisada pela enzima NOS.	32
Figura 1.19 - Representação do diagrama do orbital molecular do NO.....	33
Figura 1.20 - Efeitos tumorigênicos e tumoricida do óxido nítrico de acordo com a concentração.....	34

Figura 1.21 - Representação da cadeia respiratória mitocondrial que consiste em cinco complexos protéicos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo c redutase (complexo III), citocromo c oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V).....	37
Figura 1.22 - Esquema representativo da PBM estimulando a fotodissociação do NO do grupo heme do citocromo c oxidase, permitindo a coordenação do oxigênio para retomar a respiração mitocondrial e liberando NO para o meio intracelular.	38
Figura 1.23 - Estrutura química dos complexos rutênio-ftalocianina <i>trans</i> -[RuCl(Pc)(DMSO)] e <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(NO ₂)].	40
Figura 2.1 - Rota sintética do complexo <i>trans</i> -[RuCl(Pc)(DMSO)].....	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.2 - Mecanismo de reação <i>trans</i> -[RuCl(Pc)(DMSO)]..	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.3 - Purificação do complexo <i>trans</i> -[RuCl(Pc)(DMSO)] em coluna cromatográfica de sílica utilizando como fase móvel diclorometano:metanol (10:1).	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.4 - Esquema de síntese utilizado na obtenção de <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(NO ₂)].	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.5 - Diagrama do orbital molecular simplificado apresentando as transições eletrônicas de uma ftalocianina coordenada a um centro metálico, que dão origem as bandas B e Q, e que podem ser visualizadas no espectro eletrônico de UV-Vis.	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.6- Representação das transições eletrônicas da H ₂ Pc (acima) e espectro de absorção de UV-Vis de uma solução de 4,00 x 10 ⁻⁵ M em ácido sulfúrico concentrado (abaixo). ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.7 - Representação das transições eletrônicas (acima) do complexo <i>trans</i> -[RuCl(Pc)(DMSO)] e espectro de absorção de UV-Vis de uma solução 4,35 x 10 ⁻⁵ M em diclorometano.	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.8- Representação da simetria da H ₂ Pc com grupo de ponto D _{2h} e de uma Metaloftalocianina [M(Pc)] com grupo de ponto D _{4h}	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.9- Representação da retrodoação entre o íon metálico e o ligante nitrosil NO ⁺ . ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.10 - Comparação do espectro eletrônico do complexo <i>trans</i> -[RuCl(Pc)(DMSO)] (4,35 x 10 ⁻⁵ M) (em preto) com o <i>trans</i> -[Ru(NO)(Pc)(NO ₂)] (7,5 x 10 ⁻⁵ M) (em vermelho), observando-se o deslocamento batocrômico. Os espectros eletrônicos foram realizados em diclorometano.	Erro! Indicador não definido.

Figura 2.11 - Espectros de IV do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em preto) e da H₂Pc livre (Sigma-Aldrich) (em vermelho) obtidos em pastilha de KBr. Em A, a região do espectro é analisada entre 4000 a 400 cm⁻¹ enquanto que em B os dados são mostrados na região de 2000 a 400 cm⁻¹. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.12 - Espectros de IV em pastilha de KBr dos complexos *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] (em vermelho), [Ru(Pc)(DMSO)₂] (em preto) e *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em azul). Os espectros foram analisados 4000 a 400 cm⁻¹. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.13- Espectros de FIR dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em preto) e [Ru(Pc)(DMSO)₂] (em vermelho). As pastilhas foram realizadas em CsI. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.14 - Comparação dos espectros de IV dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em preto) e do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (em vermelho), com o aparecimento da banda em 1890 cm⁻¹ referente ao estiramento {Ru^{II}-NO⁺}. Os espectros foram analisados 4000 a 400 cm⁻¹ e em pastilhas de KBr. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.15- Espectrometria de massas através da técnica MALDI-TOF do complexo [RuCl(Pc)(DMSO)]. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.16 – Espectro de massas através da técnica de ionização por elétrons do dimetilsulfóxido (DMSO). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.17- Espectro de massas através da técnica de MALDI-TOF do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] mostrando a distribuição isotópica dos íons moleculares do rutênio. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.18- Distribuição isotópica para o dímero [Ru(Pc)]⁺² sugerindo a formação do fragmento {Ru^{III}-(Pc)-Ru^{II}(Pc)}⁺. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.19 – Espectro de RMN ¹H do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)]. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.20 - Espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(Pc)(DMSO)₂]. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.21 – Espectro de EPR dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em preto) e [Ru(Pc)(DMSO)₂] (em vermelho). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2.22 - Eletroforese em gel de agarose para os complexos de rutênio-ftalocianina no tempo 0 (A) e após 1 hora (B), a 100 V, 0.07 A e 0.7 W. Na sequência 1. complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] em estudo; 2. complexo Na₂[RuCl₂{Pc(COOH)}]; 3. complexo Na₂[RuCl₂{Pc(COOH)₄}]; 4. K₆[RuCl₂{Pc(COO⁻)₄}]; 5. K₄[RuNOCl{Pc(COO⁻)₄}]. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.1- Reações fotoquímicas que ocorrem durante a TFD. Vários tipos de reações

fotoquímicas primárias ou secundárias podem produzir ERO e causar danos celulares.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.2- Medida da produção das espécies reativas A) $\text{HO}^\bullet$, B) H_2O_2 e C) $\text{O}_2^{\bullet-}$ em função da dose de luz, após o fotoestímulo em 660nm dos fotossensibilizadores MB (-●-), *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (-■-) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (-▲-). . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.3- Formação do ácido 2-hidroxitereftálico (AHT) fluorescente em $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$) a partir da reação do ácido tereftálico (AT) com o radical hidroxila.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.4 - Espectro de emissão do produto resultante da irradiação em 660 nm dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em A) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (em B) na presença de AT. Banda de excitação em $\lambda_{\text{exc}}=310 \text{ nm}$ e de emissão em $\lambda_{\text{em}}=422 \text{ nm}$, fendas 5,5...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.5 - Medida da produção do $^1\text{O}_2$ em função da dose de luz após o fotoestímulo em 660nm dos fotossensibilizadores MB (-●-), *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (-■-) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (-▲-). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.6 – Mudança no espectro de absorção de uma solução contendo DPBF e complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] sob irradiação em 660 nm em intervalos de 1,0 segundo ($6,76 \times 10^{-5} \text{ M}$)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.7 – Mudança no espectro de absorção de uma solução contendo DPBF e o o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] sob irradiação em 660 nm em intervalos de irradiação de 2,0 segundos ($2,30 \times 10^{-5} \text{ M}$)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.8 - Espectro de fluorescência do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] em metanol com $\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$ **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.9 - Espectro de fluorescência do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em metanol com $\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$ **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.10 - Reação de fotodegradação do anel macrocíclico da [Zn(Pc)] com o oxigênio singlete. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.11 - Espectros de absorção do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] em DMSO após sucessivas irradiações em 660 nm ($6,59 \times 10^{-5} \text{ M}$). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.12 - Espectros de absorção do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em DMSO após sucessivas irradiações em 660 nm ($4,90 \times 10^{-5} \text{ M}$). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.13 - Mecanismo de liberação do NO a partir de complexos nitrosilos de rutênio. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.14 - Cronoamperograma do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (1mM) quando submetido à irradiação em 377 nm..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.15 - Espectro de absorção do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em metanol antes (-) e após (-) a irradiação em 377 nm. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.16 - Cronoamperograma do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (1mM) na presença do ambiente redutimétrico de células tumorais de melanoma humano, A375. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3.17 - Espectro de absorção do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (1% de DMSO em RPMI) na ausência (-) e presença (-) de células tumorais de melanoma humano, A375. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.1 - Efeito dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (A) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (B) na viabilidade celular das células A375. As células foram incubadas 24 horas com a concentração dos complexos variando de 0,10 para 1,00 µM e irradiadas em 660 nm com diferentes doses de luz 1,0, 3,0 e 6,0 J.cm⁻². Os dados são a média ± SEM com valor de p <0,05. “a” representa uma diferença significativa em relação aos controles; “b” representa diferença significativa em relação ao grupo 1,0 J.cm⁻²; e “c” representa diferença significativa em relação ao grupo 3,0 J.cm⁻². Todos os resultados nesta figura são representativos de seis experimentos independentes realizados em quintuplicata. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.2 - Curvas de concentração-efeito para os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] nas doses de luz de 1,0, 3,0 e 6,0 J.cm⁻². **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.3 - Estudo da viabilidade celular das células A375 na presença dos complexos de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], nas concentrações de 0,10 a 1,00 µM, nos tempos de incubação de 4 e 24 horas, na ausência e presença de irradiação em 660 nm com fluência de 3,0 J.cm⁻². Em A: Complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] incubado por 4h; B: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] incubado por 4 h; C: Complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] incubado por 24h; D: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] incubado por 24 h. Os dados são a média ± SEM. Um asterisco representa um valor de p <0,05 como uma diferença significativa em relação ao controle. Todos os resultados nesta figura são representativos de seis experimentos independentes realizadas em quintuplicata. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.4 - Avaliação da liberação do NO através da marcação com DAF a partir complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em função do processo redutimétrico em células A375. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.5 - Estudo da viabilidade celular das células MCF7 na presença dos complexos de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], nas concentrações de 0,10 a 1,00 µM, nos tempos de incubação de 4 e 24 horas, na ausência e presença de irradiação em 660 nm

com fluência de 3,0 J.cm⁻². Em A: complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] incubado por 4h; B: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] incubado por 4 h; C: complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] incubado por 24h; D: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] incubado por 24 h. Os dados são a média ± SEM. Um asterisco representa um valor de p <0,05 como uma diferença significativa em relação ao controle. Todos os resultados nesta figura são representativos de seis experimentos independentes realizadas em quintuplicata.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.6 - Estudo da viabilidade celular das células MCF7 na presença dos complexos de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 µM, no tempo de incubação de 24 horas, e na presença de irradiação em 660 nm em diferentes doses de luz: 3,0 e 6,0 J.cm⁻². Em A: Complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] B: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]. Os dados são a média ± SEM. Um asterisco representa um valor de p <0,05 como uma diferença significativa em relação ao controle. Todos os resultados nesta figura são representativos de três experimentos independentes realizadas em quintuplicata. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.7 - Efeitos dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] (em A) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (em B) na viabilidade celular da linhagem 3T3. As células foram incubadas por 4 horas nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 µM de cada complexo e irradiadas em 660 nm (3,0 J.cm⁻²). Os dados são a média ± SEM. Um asterisco representa um valor de p <0,05 como uma diferença significativa em relação ao controle. Todos os resultados nesta figura são representativos de três experimentos independentes realizadas em quintuplicata. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.8 - Estudo da viabilidade celular das células L929 na presença dos complexos de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 µM, nos tempos de incubação de 4 e 24 horas, na ausência e presença de irradiação em 660 nm com fluência de 3,0 J.cm⁻². Em A: Complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] incubado por 4h; B: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] incubado por 4 h; C: Complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] incubado por 24h; D: complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] incubado por 24 h. Os dados são a média ± SEM. Um asterisco representa um valor de p <0,05 como uma diferença significativa em relação ao controle. Todos os resultados nesta figura são representativos de três experimentos independentes realizadas em quintuplicata.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.9 - Estudo da viabilidade celular das células MCF10 na presença do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 µM, no tempo de incubação de 24 horas, na ausência e presença de irradiação em 660 nm com fluência de 3,0 J.cm⁻². Os dados

são a média $\pm$ SEM. Um asterisco representa um valor de $p < 0,05$ como uma diferença significativa em relação ao controle. Todos os resultados nesta figura são representativos de três experimentos independentes realizadas em quintuplicata. . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.10 - A sublocalização subcelular do FS em diferentes organelas (mitocôndrias, lisossomas, retículo endoplasmático, membrana plasmática, etc.) desempenha um papel importante no tipo de mecanismo de morte celular: apoptose, necrose ou autofagia.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.11 - Estudo da microscopia confocal para 10 μ M de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] utilizando as sondas “Mito-tracker Green”, “ER-tracker blue” e “Lysotracker Green” na linhagem de melanoma humano A375..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.12 - Estudo da microscopia confocal para 10 μ M de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] utilizando as sondas “Mito-tracker Green”, “ER-tracker blue” e “Lysotracker Green” na linhagem de carcinoma de mama humano MCF7..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.13 - Metodologia do ensaio do cometa mostrando o perfil de células saudáveis em formas circulares e células que tiveram o DNA fragmentado devido ao tratamento recebido revelando-se com formas similares a de um cometa. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.14 - Ensaio do cometa em células A375 para os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] na ausência de irradiação e após a TFD em 660 nm (3,0 J.cm⁻²). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.15 - Ensaio de recuperação da lesão (Scratch wound) para os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em células A375 nos tempos 0, 24 e 48 horas após a irradiação em 660 nm (3,0 J.cm⁻²). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.16 - Vias de apoptose intrínseca (a) e extrínseca (b). . **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.17 - Análise de Western Blotting para caspase-3 clivada. As células A375 foram tratadas com 1,0 μ M de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] ou *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] por 24 horas e a expressão de caspase-3 foi avaliada no escuro e sob irradiação em 660 nm (3,0 J.cm⁻²). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.18 - Análises por Western Blotting para as proteínas BCL-XL, Bax e Citocromo c. As células A375 foram incubadas com 1,0 μ M de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] ou *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] por 24 horas e a expressão das proteínas foi avaliada no escuro e sob irradiação em 660 nm (3,0 J .cm⁻²). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.19 - F Análises por Western Blotting para o NF- κ B total e p-NF- κ B. As células A375 foram incubadas com 1,0 μ M de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] ou *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]por 24 horas e a expressão dos fatores de transcrição foi avaliada no escuro e sob irradiação em 660 nm (3,0 J .cm⁻²). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.20 - Avaliação do efeito da PBM na TFD através dos estudos de viabilidade celular dos complexos $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$ e $\text{trans-[Ru(NO)(Pc)(NO}_2\text{)]}$ nas linhagens celulares A375 e MCF7; * representa um valor de $p < 0,05$ como uma diferença significativa em relação aos respectivos controles enquanto # representa um valor de $p < 0,05$ como uma diferença significativa em relação ao grupo TFD sozinho. Todos os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.21 - Curva de concentração-efeito comparando o efeito da PBM na TFD com a TFD sozinha para os complexos $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$ (A) e $\text{trans-[Ru(NO)(Pc)(NO}_2\text{)]}$ (B) nas células A375. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.22 - Estudo por microscopia de confocal sobre a influência da PBM (850 nm) na produção de NO intracelular. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4.23 - Influência da PBM na produção de ATP das células A375 tratadas com os complexos $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$ e $\text{trans-[Ru(NO)(Pc)(NO}_2\text{)]}$ **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- FS aprovados para uso clínico na TFD (ORMOND; FREEMAN, 2013).....	23
Tabela 2.1 - Reagentes utilizados para síntese, caracterização e análises químicas.....	59
Tabela 2.2- Comparação das bandas de absorção, B e Q, da H_2Pc com o complexo $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$, observando-se o deslocamento hipsocrômico. Erro! Indicador não definido.	
Tabela 2.3 – Propriedades eletrônicas de compostos metaloftalocianinas. Erro! Indicador não definido.	
Tabela 2.4 - Comparação das bandas de absorção, B e Q, do complexo $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$ com o complexo $\text{trans-[Ru(NO)(Pc)(NO}_2\text{)]}$ observando-se o deslocamento batocrômico. Erro! Indicador não definido.	

Tabela 2.5 - Atribuições das bandas de absorção (cm^{-1}) na região do IV para o complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] da H₂Pc livre (Sigma-Aldrich) (ZIMINOV et al., 2006)..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2.6 - Atribuições das bandas de absorção (cm^{-1}) na região do IV para o complexo [Ru(Pc)] sintetizado pelo método de Hanack por Negri, 2015, *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] sintetizado neste trabalho, [Ru(Pc)(DMSO)₂] (KOBEL; HANACK, 1986) e o complexo precursor *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] que também foi sintetizado neste trabalho e teve as atribuições de acordo com Evans, et.al.(EVANS; SPENCER; WILKINSON, 1973)**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2.7 - Atribuições das bandas de absorção (cm^{-1}) na região do infravermelho para os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)].**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2.8 - Estudo da condutividade ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) de diferentes compostos em metanol. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3.1- Reagentes utilizados para os estudos fotofísicos e fotoquímicos.....73

Tabela 3.2 - Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)]. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3.3 - Parâmetros encontrados para o cálculo do Φ_{Δ} para o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3.4 - Rendimento quântico de fluorescência para diferentes ftalocianinas (MARTINS, 2017). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4.1- Equipamentos utilizados para cultivo celular.....88

Tabela 4.2 - Reagentes utilizados para cultivo celular e análises biológicas.89

Tabela 4.3- Linhagens tumorais estudadas neste projeto.90

Tabela 4.4 - Relação da % viabilidade celular em B16F10 para o complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] em diferentes concentrações, nos tempos de incubação de 4 e 24 horas e nas doses de irradiação de 3,0 J.cm⁻² e 6,0 J.cm⁻². **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4.5 - Análise da internalização celular dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] através da concentração de rutênio (ppb) em células A375 em diferentes tempos de incubação. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4.6 - Diferentes condições experimentais das sondas e dos complexos usados no estudo de microscopia confocal..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4.7 - Concentração de rutênio (ppb) no interior celular das células A375 após incubação dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] após 2h e 4h de incubação, na presença e ausência da PBM em 850 nm..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AKT	Proteína Quinase B
ALA	Ácido 5-aminolevulínico

APAF-1	Apoptosis Activating Factor 1
ATP	Adenosina trifosfato
Ar	Argônio
CL	Campo ligante
DAF-FM	4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína
DBU	1,8-Diazobiciclo [5.4.0] undec-7eno
DCBz	Ácido 4-(3,4-dicianofenoxi) benzóico
DHB	2,5 – ácido hidroxibenzóico
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium – Meio de cultura celular
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPBF	1,3-difenilsobenzofurano
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neural
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
EPR	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fotossensibilizador
HEME	Grupo prostético que consiste de um átomo de ferro contido dentro de um anel orgânico porfirínico
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPD	Derivado de Hematoporfirina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ISC	Conversão intersistemas
IL	Intraligante
L	Ligante
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
M	Metal
MAL	Metil-aminolevulinato
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
¹O₂	Oxigênio Singlete
³O₂	Oxigênio molecular no estado tripleto
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pc	Ftalocianina
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear
RE	Retículo Endoplasmático
PpIX	Protoporfirina IX
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; Meio de cultura celular
SFB	Soro fetal bovino
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
WHO	World Health Organization
ZnPc	Zincoftalocianina

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar (mol cm ⁻¹ L ⁻¹)
λ	Comprimento de onda (nm)
®	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
Φ_Δ^{std}	Rendimento quântico de oxigênio singleto para a ftalocianina padrão
Φ_f	Rendimento quântico de fluorescência
$\Phi_{f\text{std}}$	Rendimento quântico de fluorescência do 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
TM	Trademark
F	Área sob a curva
A	Absorbância
n^2	Índice de refração do solvente

LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS

NOME DO COMPOSTO QUÍMICO	FÓRMULA ESTRUTURAL
Complexo <i>trans-</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
LISTA DE ESTRUTURAS APRESENTADAS	xv
INTRODUÇÃO	1

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 Aspectos gerais do câncer	3
1.2 Terapias para o tratamento do câncer	6
1.3 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	8
1.3.1 Histórico	8
1.3.2 Mecanismo de ação	10
1.4 Fotossensibilizadores	15
1.4.1 Ftalocianinas	24
1.5 Complexos metálicos no tratamento do câncer.....	26
1.6 Óxido Nítrico: importância biológica e atuação em tumores.....	31
1.7 Fotobiomodulação (PBM).....	36
2. HIPÓTESE.....	39
3. OBJETIVO GERAL	39
3.1 Objetivos Específicos.....	40
4. REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1 Reagentes.....	59
2.2 Sínteses	60
2.2.1 Síntese do complexo cis-diclorotetrakis(dimetilsulfóxido)rutênio(II) cis- [RuCl ₂ (DMSO) ₄]	60
2.2.2 Síntese do complexo rutênio (III)-ftalocianina trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]	60
2.2.3 Síntese do complexo nitrosilo de rutênio-ftalocianina trans-[Ru(NO)(Pc)(NO ₂)] ..	61
2.3 Equipamentos	61
2.3.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	61

2.3.2	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	61
2.3.3	Espectroscopia na região do infravermelho distante (FIR)	62
2.3.4	Espectrometria de Massas	62
2.3.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	62
2.3.6	Eletroforese em gel de agarose	62
2.3.7	Condutividade	63
2.3.8	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	63
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
3.1	Síntese e purificação dos complexos de rutênio-ftalocianina	Erro! Indicador não definido.
3.1.1	Síntese do complexo trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]	Erro! Indicador não definido.
3.2	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)	Erro! Indicador não definido.
3.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	Erro! Indicador não definido.
3.4	Espectrometria de massas	Erro! Indicador não definido.
3.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Erro! Indicador não definido.
3.6	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	Erro! Indicador não definido.
3.7	Eletroforese em gel de agarose	Erro! Indicador não definido.
3.8	Estudos de Condutividade	Erro! Indicador não definido.
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

CAPÍTULO 3

1.	INTRODUÇÃO	72
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	73
2.1	Reagentes	73
2.2	Determinação indireta de Oxigênio Singlete (1O_2)	74
2.2.1	Ensaio de oxigênio singlete (1O_2) em meio aquoso:	74
2.2.2	Ensaio de oxigênio singlete (1O_2) em meio orgânico:	75
2.3	Medidas de espécies reativas de oxigênio (ERO)	75
2.3.1	Ensaio para radical hidroxila ($HO^\bullet$) utilizando HPF:	75
2.3.2	Ensaio para radical hidroxila ($HO^\bullet$) utilizando AT:	76
2.3.3	Ensaio para ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$):	76
2.3.4	Ensaio para peróxido de hidrogênio (H_2O_2):	77
2.4	Estudos fotoquímicos de liberação de NO	77

2.5	<i>Espectroscopia de Fluorescência</i>	78
2.6	<i>Estudos de fotodegradação</i>	78
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
3.1	<i>Medidas de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)</i>	Erro! Indicador não definido.
3.1.1	<i>Determinação de oxigênio singlete</i>	Erro! Indicador não definido.
3.2	<i>Estudos fotofísicos</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3	<i>Fotodegradação</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4	<i>Estudos fotoquímicos de liberação de NO</i>	Erro! Indicador não definido.
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

CAPÍTULO 4

1.	INTRODUÇÃO	86
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	88
2.1	<i>Equipamentos</i>	88
2.2	<i>Reagentes</i>	88
2.3	<i>Fonte de luz</i>	88
2.4	<i>Linhagens estudadas</i>	89
2.5	<i>Cultivo celular</i>	91
2.6	<i>Análise da viabilidade celular através do método de MTT</i>	91
2.7	<i>Ensaio de viabilidade celular na ausência e presença da TFD</i>	92
2.8	<i>Internalização celular (“Uptake” celular)</i>	92
2.9	<i>Microscopia confocal</i>	93
2.10	<i>Avaliação da liberação do óxido nítrico através da microscopia de confocal</i>	93
2.11	<i>Avaliação por microscopia confocal da produção de óxido nítrico intracelular pela PBM</i>	94
2.12	<i>Ensaio do cometa</i>	94
2.13	<i>Western Blotting</i>	95
2.14	<i>Ensaio de recuperação da lesão (Scratch wound)</i>	96
2.15	<i>Ensaio de viabilidade celular após fotobiomodulação e terapia fotodinâmica</i>	96
2.16	<i>Ensaio do ATP</i>	97
2.17	<i>Influência da PBM na internalização celular (“uptake” celular)</i>	97
2.18	<i>Análise estatística</i>	98
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
3.1	<i>Ensaio de viabilidade celular em melanoma murino (B16F10)</i>	Erro! Indicador não definido.

3.2	Ensaio de viabilidade celular em melanoma humano (A375).....	Erro! Indicador não definido.
3.3	Ensaio de viabilidade celular em carcinoma de mama humano (MCF7).....	Erro! Indicador não definido.
3.4	Ensaio de viabilidade celular em células não-tumorais	Erro! Indicador não definido.
3.5	Internalização celular dos complexos de rutênio-ftalocianina (“Uptake celular”) Erro! Indicador não definido.	
3.6	Microscopia confocal	Erro! Indicador não definido.
3.7	Ensaio do cometa.....	Erro! Indicador não definido.
3.8	Ensaio de recuperação da lesão (Scratch wound)	Erro! Indicador não definido.
3.9	Western Blotting	Erro! Indicador não definido.
3.10	Ensaio de viabilidade celular após fotobiomodulação (PBM) e terapia fotodinâmica (TFD).....	Erro! Indicador não definido.
3.11	Estudo da influência da PBM na produção intracelular de ATP e NO.....	Erro! Indicador não definido.
3.12	Influência da PBM na internalização celular dos complexos de rutênio-ftalocianina.....	Erro! Indicador não definido.
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
	CONCLUSÃO FINAL	107
	APÊNDICE	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

A fim de facilitar a leitura e melhorar a compreensão, a Tese de Doutorado aqui apresentada está organizada em capítulos compostos por sua própria Introdução, Metodologia, Resultados e Discussões, e Considerações finais voltados às características peculiares de cada assunto.

O capítulo 1 consiste em uma Introdução Geral, contendo uma revisão bibliográfica dos principais tópicos que norteiam todo o trabalho e abrangendo os aspectos mais importantes relacionados ao tratamento do câncer, através de complexos de rutênio-ftalocianina como candidatos a fotossensibilizadores (FS) na Terapia Fotodinâmica (TFD). Baseado nos fatos apresentados, ao final do capítulo são traçadas a hipótese e o objetivo do trabalho.

O capítulo 2 intitulado “Síntese e Caracterização de Complexos Rutênio-ftalocianina” discute, principalmente, a elaboração de métodos sintéticos mais eficientes para obtenção dos complexos de rutênio-ftalocianina e as propriedades químicas e espectroscópicas específicas destes.

O capítulo 3 denominado “Estudos fotofísicos e fotoquímicos dos complexos rutênio-ftalocianina” aborda aspectos importantes relacionados à interação dos complexos de rutênio-ftalocianina com a irradiação luminosa.

O capítulo 4, “Estudos fotobiológicos dos complexos rutênio-ftalocianina”, discute o potencial de complexos de rutênio-ftalocianina como FS na TFD, avaliando a citotoxicidade desses complexos sob fotoestímulo em diferentes linhagens celulares, bem como o mecanismo de ação de morte celular. Ainda são apresentadas estratégias que podem potencializar a TFD, avaliando-se o efeito sinérgico do óxido nítrico e da fotobiomodulação.

Por fim, baseado nas discussões realizadas nos capítulos anteriores, o capítulo 5 traz as considerações finais e perspectivas futuras deste trabalho.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica, Hipótese e

Objetivos

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos gerais do câncer

O sistema biológico dos organismos é controlado por uma série de eventos celulares, nos quais as células se reproduzem, diferenciam-se e morrem, mantendo o sistema em equilíbrio. Entretanto, alterações moleculares que desregulam esse equilíbrio, podem dar origem à proliferação celular de forma desordenada, com crescimento autônomo e perda da diferenciação celular. Consequentemente, há o crescimento de uma massa de células anormais, denominada tumor (ou *neoplasma*). Uma única mutação somática no processo de divisão celular pode ser o gatilho para sucessivas mutações adicionais e multiplicação celular desordenada (ALBERTS et al., 2002; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas (INCA, 2018).

Essas células mutadas são capazes de serem resistentes às vias bioquímicas que sinalizam para morte celular, evoluindo independente dos mecanismos que controlam a proliferação e diferenciação celular, se reproduzindo descontroladamente e invadindo tecidos ocupados por células saudáveis (FILHO, 1994) (Figura 1.1).

Um tumor pode ser denominado maligno ou benigno, dependendo das características das células tumorais. Nos tumores benignos, as células se agrupam em massa única, delimitada, não invadindo tecidos próximos, podendo ser removidos em cirurgia. O tumor maligno apresenta delimitação irregular sendo mais invasivo e capaz de atingir o tecido adjacente. Suas células neoplásicas podem atingir a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos, e crescer em locais distantes de sua origem, formando outro tumor maligno. Este processo é conhecido como metástase (Figura 1.2). (ALBERTS et al., 2002; FOLKMAN, 1990).

Figura 1.1 - Representação do processo de desenvolvimento do câncer, no qual uma célula que sofreu uma mutação somática no material genético se reproduz desordenadamente dando origem a massa tumoral que invade tecidos saudáveis.

Fonte: <https://www.tuasaude.com/>

<https://muralcientifico.com/2017/10/12/o-que-e-o-cancer-por-que-e-tao-dificil-curalo/>.

Figura 1.2 - Representação da formação de tumores benignos e malignos, evidenciando o processo de metástase no qual há a invasão e disseminação das células do tumor maligno pela circulação sanguínea, acometendo outros órgãos e tecidos.

Fonte: Adaptado de Alan Niemiens

https://www.topicosdesaude.com/tumores-benignos-tiposcausasetratamentos/#Diferenca_Entre_Tumor_Benigno_e_Maligno_cancer.

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, pode levar meses ou anos para que uma célula cancerosa passe pelos estágios de iniciação,

progressão e proliferação até dar origem a um tumor visível. A carcinogênese é determinada pela exposição aos agentes cancerígenos ou carcinógenos, os quais juntamente com as características genéticas individuais de cada organismo, facilitam ou dificultam a instalação do dano celular (INCA 2018).

Os agentes carcinogênicos podem ser fatores ambientais ou genéticos sendo que 90-95% dos casos ocorre por fatores ambientais enquanto 5-10% dos casos ocorrem devido à hereditariedade genética (ANAND et al., 2008). Os fatores ambientais podem ser químicos, físicos ou biológicos. Os carcinógenos químicos, por exemplo, podem promover uma alteração na sequência de nucleotídeos. Os raios X, que são radiações ionizantes, desencadeiam quebras cromossômicas e translocações. E, ainda, alguns tipos de vírus podem introduzir DNA exógenos no material genético de células normais, alterando a homeostase das mesmas (ALBERTS et al., 2002).

O aumento do número de incidência e mortalidade da doença na atualidade nos leva a pensar que, anteriormente, a doença não se manifestava da mesma forma ou, até mesmo, não existia. No entanto, segundo o oncologista indiano Siddhartha Mukherjee, autor do livro “O Imperador de Todos os Males” sobre a história do câncer, antes as pessoas não viviam o suficiente para serem expostas aos fatores carcinogênicos a tal ponto que a doença se manifestasse de maneira significativa na sociedade. Assim, a relação do câncer com a longevidade é direta, de modo que há uma relação contraditória entre os avanços da vida moderna e a qualidade de vida (HOSPITAL DO CANCER DE BARRETOS, 2012).

Vários fatores são levados em consideração para o aumento e intensificação da doença. O aumento da população e o envelhecimento levam a propagação dos fatores de risco associados à globalização e a urbanização. Hábitos de vida, sedentarismo, estresse, alimentação desbalanceada e industrializada, consumo do álcool, exposição contínua a poluentes e a radiação ultravioleta, tabagismo, dentre outros, influenciam de forma direta para o aumento do número de casos (TOMATIS, 1990).

De acordo com o projeto Globocan 2018 (GLOBOCAN, 2018) da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer acometeu 18,1 milhões de novos casos no mundo em 2018, com 9,6 milhões de mortes da população mundial, o que significa que ao redor de 50% dos casos de câncer ainda são levados a óbito. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo são de pulmão, mama, colorretal, próstata e estômago, sendo o câncer de pulmão o que apresenta maior índice de mortalidade (WHO, 2019).

O câncer é uma das doenças mais devastadoras da atualidade e apesar dos esforços mundiais no combate e na prevenção, a incidência tem aumentado consideravelmente, de modo que são estimados 29 milhões de novos casos até 2040 (STEWART; WILD, 2014; ZHOU; LIANG; DAI, 2016).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) houve 582 mil novos casos de câncer em 2018 com aproximadamente 197 mil mortes. O câncer de pele não-melanoma é o mais incidente na população brasileira com 170 mil novos casos em 2018, seguido pelos tumores de próstata (68 mil), mama feminina (60 mil), coloretal (35 mil), pulmão (31 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (16 mil) (INCA 2018).

A abrangência dessa doença que atinge pessoas de todas as nacionalidades, idades, raças e classes sociais, fez com que ela se popularizasse como nenhuma outra durante o século XX e XXI (HOSPITAL DO CANCER DE BARRETOS, 2012).

Considerando a relevância do perfil epidemiológico e o impacto econômico relevante desta doença no cenário mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outros órgãos governamentais vêm trabalhando em ações estratégicas de implementação da política de prevenção com diagnóstico precoce como campanhas do Outubro Rosa para conscientização do câncer de mama, ações profiláticas como campanhas anti-tabagismo (câncer de pulmão) e vacinação contra o vírus Papilomavírus humano (HPV-câncer de colo de útero) para, dessa forma, elaborar o tratamento em tempo oportuno (STEWART; WILD, 2014).

Reitera-se assim esforços para o controle da doença, aprimoramento de tratamentos já existentes e pesquisas científicas para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes de modo que possam erradicar o câncer sem prejudicar a qualidade de vida dos pacientes.

1.2 Terapias para o tratamento do câncer

Atualmente o maior desafio da ciência vai além de apenas o tratamento das células tumorais, tendo como maior dificuldade a inibição do processo metastático e a erradicação total das células cancerígenas de modo que não haja recidiva da doença.

As terapias anticâncer até hoje desenvolvidas e aplicadas na clínica apresentam como estratégia a instabilidade genética das células cancerosas, já que estas perderam a capacidade dos mecanismos de reparo do DNA (ALBERTS et al., 2002).

Os tratamentos tradicionais existentes na clínica para o combate às neoplasias envolvem quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica (DAVIDS, KLEEMANN, 2011). Dependendo das características da doença, essas terapias podem ser associadas ou não.

A quimioterapia é um método de tratamento que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos antineoplásicos, que inibem a divisão celular por interferirem nas bases nitrogenadas do DNA, impedindo a proliferação do tumor (BONASSA, 1998; ALMEIDA et al., 2005). O primeiro quimioterápico descoberto foi a cisplatina, um complexo metálico a base de platina, que intercala com as bases nitrogenadas do DNA e impede a proliferação celular. A cisplatina teve seu mecanismo de ação elucidado em 1960 por Rosenberg e foi aprovada em 1978 pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico (MONRO et al., 2018; FONTES, 2005). A partir disso, outros complexos de platina passaram a ser estudados como quimioterápicos. No entanto, como a interferência no ciclo celular dessa classe terapêutica ocorre de maneira inespecífica, células sadias também podem ser acometidas, trazendo muitos efeitos colaterais e comprometendo a qualidade de vida dos pacientes (SALMONM et al., 1998).

A radioterapia é outra modalidade de tratamento amplamente empregada. Consiste em um feixe de radiações ionizantes, que podem ser radiações eletromagnéticas (raios X ou gama) ou corpusculares (partículas α e β), que são capazes de danificar o material genético porque, uma vez que interagem com o ambiente celular, geram espécies carregadas, ganhando ou perdendo elétrons, o que gera efeitos químicos e, consequentemente, desencadeia na ruptura das cadeias de DNA (HALLE et al., 2010). É uma terapia bastante indicada no combate a tumores localizados que apresentam difícil acesso para remoção cirúrgica (BARTELINK et al., 1997; STEEL; PECKHAM, 1979; ALBAIN et al., 2009; JAMES et al., 2012). Embora seja considerado que as células não tumorais apresentem mecanismos de reparo no DNA mais eficazes que as células tumorais, o acometimento do tecido sadio ocasiona uma série de efeitos colaterais como processos inflamatórios localizados, reações cutâneas, queimadura, náuseas, vômitos, fadiga e dificuldade de deglutição (JHAM; FREIRE, 2006; MEIROW; NUGENT, 2001).

O processo cirúrgico é indicado quando o tumor é localizado sendo possível a retirada dos tecidos neoplásicos inteiros. Com os avanços da medicina em relação à versatilidade de equipamentos disponíveis, fármacos mais eficazes e seguros para anestesia, e a tecnologia na fabricação de materiais cirúrgicos, é possível realizar cirurgias com alto grau de complexidade de maneira mais segura, reduzindo possíveis complicações, tempo de recuperação e hospitalização (SIBATA et al., 2000; OCHSNER, 1997). Porém, é um processo invasivo, não é eficaz em casos de metástase e a principal limitação é a retirada do tecido tumoral em sua totalidade, pois se apenas uma única célula tumoral permanecer, poderá haver proliferação e assim recidiva da doença.

Embora bastante utilizados na clínica, os tratamentos convencionais apresentam diversas desvantagens por serem demorados, desencadearem uma série de efeitos colaterais, dor, desconforto e diminuírem o bem-estar dos pacientes (SIBATA et al, 2000; OCHSNER, 1997). Nesse sentido, há o grande interesse no desenvolvimento de novas terapias que erradiquem o tumor em sua totalidade e possibilitem uma ação direcionada e seletiva às células tumorais, de modo que os tecidos normais não sejam acometidos, diminuindo os efeitos colaterais, melhorando a eficácia do tratamento e proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Nesse cenário, observa-se um crescente número de pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias como a Imunoterapia, Bioquimioterapia, Terapia Gênica e Terapia Fotodinâmica (TFD). Dentre essas, será destacada a TFD, uma modalidade relativamente recente no tratamento do câncer, pouco invasiva e com poucos efeitos colaterais, a qual pode ser associada às terapias convencionas e potencializada por estratégias desenvolvidas e apresentadas neste trabalho (DAVIDS, KLEEMANN, 2011; OCHSNER, 1996; TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003).

1.3. Terapia Fotodinâmica (TFD)

1.3.1 Histórico

As propriedades terapêuticas da luz já são conhecidas há milhares de anos, mas apenas no século passado que a TFD foi desenvolvida (DANIELL; HILL, 1991; ACKROYD, R.; KELTY; BROWN; REED, 2001). Civilizações do Egito antigo, indianas e chinesas já usavam luz no tratamento de algumas doenças como raquitismo, vitiligo, psoríase e câncer de pele (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; FITZPATRICK; PATHAK, 1959). O termo “fototerapia” se referindo ao uso da luz para tratar doenças surgiu na Dinamarca no final do século XIX, quando Niels Finsen descobriu que a luz vermelha impedia a formação e descarga de pústulas de varíola (FINSSEN, 1901). Ele também usou a luz ultravioleta do sol para tratar a tuberculose cutânea. Essas descobertas marcaram o início da terapia com luz, rendendo a Finsen o Prêmio Nobel em 1903 (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

Há mais de um século atrás, pesquisadores observaram que a morte celular poderia ser induzida através da combinação de luz com alguns compostos químicos. Em 1900, Oscar Raab relatou que o corante acridina quando combinado com a luz se tornava citotóxico ao microorganismo *paramecium* (RAAB, 1900). No mesmo ano, um neurologista francês chamado J.Prime (1900) verificou que pacientes com epilepsia que eram tratados com eosina desenvolveram dermatite em áreas expostas ao sol (PRIME, 1900). Alguns anos depois, Herman Von Tappeiner e A. Jesionek (1903) testaram a combinação da eosina tópica e luz

branca para o tratamento do câncer de pele, o que foi descrito por eles como “ação fotodinâmica” (VON TAPPEINER, 1903; VON TAPPEINER; JODLBAUER, 1907).

Assim, experimentos que testavam a combinação da luz com compostos químicos levaram ao desenvolvimento da moderna TFD. W. Hausmann (1911) realizou os primeiros estudos com a hematoporfirina, reportando que a combinação da luz com hemácias era capaz de matar as células do paramécio. Ainda descreveu o efeito de fotossensibilidade e fotocitotóxico na pele de ratos que foram expostos à luz após a administração de hematoporfirina (HAUSMANN, 1911). Em 1913, Friedrich Meyer-Betz realizou o primeiro estudo de TFD com hematoporfirinas em humanos, aplicando-as em suas próprias mãos (MEYER-BETZ, 1913).

Mais tarde na década de 60, Schwartz (1955) desenvolveu uma mistura de hematoporfirina, tratando a hematoporfirina com ácido acético e ácido sulfúrico, promovendo sua acetilação e redução. A esta mistura denominou-se “derivado de hematoporfirina” (HPD), a qual foi empregada por Lipson et al. (1961) para estudos que visavam a detecção tumoral (LIPSON et al., 1960; LIPSON et al., 1961; SCHWARTZ; ABSOLON; VERMUND, 1955). Em 1972, I. Diamond mostrou a fototoxicidade da hematoporfirina em gliomas *in vivo* e *in vitro* (DIAMOND et al., 1972).

Um significativo avanço ocorreu em 1975 quando Thomas Dougherty obteve sucesso no tratamento do câncer de pele em humanos e J.F. Kelly obteve sucesso no tratamento do câncer de bexiga em humanos, ambos utilizando como FS o HPD combinado com a exposição à luz na região do vermelho. A partir disso, outros pesquisadores começaram a ter resultados positivos com a TFD em pacientes com outros tipos de câncer em estágio inicial, como câncer de pulmão (HAYATA et al., 1982), câncer de esôfago (MCCAUGHAN et al., 1984), carcinoma gástrico (HAYATA et al., 1985), câncer de mama (DOUGHERTY et al., 1979), tumores intra-oculares (GOMER et al., 1983), tumores cerebrais (SANDEMAN 1986), tumores de cabeça e pescoço (SCHWEITZER 1990), câncer de colorretal (BARR et al., 1990), malignidades cutâneas (ALLISON; MANG; WILSON, 1998), tumores intraperitoneais (DELANEY et al., 1993) e tumores pancreáticos (BOWN et al., 2002).

Em 1993, o Photofrin® foi aprovado como primeiro fotossensibilizador para TFD no Canadá pelo órgão US Food and Drug Administration (FDA) (CELLI et al., 2010). Dessa forma, a TFD é um tipo de terapia recente para o câncer, sendo aprovada como forma de tratamento há cerca de três décadas. Embora o Photofrin® seja até os dias de hoje o FS mais utilizado no mundo todo, apresenta muitas desvantagens, incluindo reações de fotossensibilidade da pele que podem durar semanas ou meses, absorção eletrônica numa

região inferior a 600 nm e elevado tempo de meia vida (DA SILVA et al., 2009; AGOSTINIS et al., 2011).

Devido a essas limitações, novas gerações de fotossensibilizadores surgiram posteriormente e, nos dias de hoje, muitos estudos são realizados para o desenvolvimento de novos FS mais seletivos e potentes bem como para o aprimoramento de protocolos e equipamentos a fim de melhorar a eficácia da TFD tanto no tratamento do câncer como de infecções e outras doenças (MCBRIDE, 2002) (Figura 1.3).

No Brasil, a experiência clínica da TFD começou em 1998 com os estudos em 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 et al., 2005).

Figura 1.3 - Histórico do surgimento da TFD.

Fonte: (MONRO et al., 2018).

1.3.2 Mecanismo de ação

A TFD é baseada na reação fotoquímica entre luz, FS e oxigênio molecular (DOUGHERTY; HENDERSON, 1992; DOLMANS et al., 2003). Nenhum desses elementos apresenta toxicidade separadamente, mas juntos iniciam reações fotofísicas e fotoquímicas que culminam na produção de espécies altamente reativas que causam stress oxidativo e resultam na morte celular tanto de células cancerígenas quanto de agentes microbianos. (AGOSTINIS et al., 2011; DOUGHERTY et al., 1998).

Assim, a TFD é um processo que consiste em dois estágios. Primeiramente o FS é administrado via tópica, intravenosa ou intraperitoneal e, após o período de internalização e acúmulo do FS nas células tumorais, a região tumoral é exposta à luz em comprimento de onda específico para ativação do FS. Este procedimento, em duas etapas, reduz

significativamente os efeitos colaterais, uma vez que o FS é apenas ativado na presença da luz resultando em destruição tecidual local (Figura 1.4) (AGOSTINIS et al., 2011).

Figura 1.4 - Princípios da TFD.

Fonte: Adaptado de AGOSTINIS et al., 2011.

O FS é uma molécula capaz de absorver luz em determinado comprimento de onda e iniciar as reações fotofísicas e fotoquímicas. Uma importante consideração envolve as propriedades ópticas do tecido. Existe uma região denominada janela terapêutica, entre 600 e 800 nm, onde a penetração da luz no tecido é máxima. A absorção e espalhamento da luz no tecido são mais intensos na região do azul, inferior a 600 nm, porque os principais cromóforos biológicos como hemoglobina e melanina apresentam bandas de absorção na região do azul. Dessa forma, comprimentos de onda menores que 600 nm apresentam menor penetrabilidade no tecido (Figura 1.5) (ALLISON; SIBATA, 2010; MAESTRIN et al., 2004).

Figura 1.5 - Penetração da luz no tecido.

Fonte: Adaptado de AGOSTINIS et al., 2011; HUANG et al., 2009.

Assim, buscam-se FS que absorvam na região do visível ou infravermelho próximo, pois a absorção do FS em uma região menor que 600 nm poderia resultar em reações de fotossensibilidade enquanto que, a absorção em uma região maior que 800 nm não produziria uma energia suficientemente alta para excitação do oxigênio molecular, processo fundamental para a eficácia da TFD (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

O FS não é seletivo apenas à célula tumoral, podendo ser internalizado tanto em células tumorais quanto em células saudáveis. Porém, algumas teorias baseadas em mecanismos celulares mostram que alguns fatores influenciam o acúmulo preferencial do FS no tecido neoplásico (HAMBLIN; NEWMAN, 1994). Essas teorias não são totalmente compreendidas e são fortemente influenciadas pelas características do FS (hidrofobicidade /hidrofilicidade), tipo de tumor, dosagem do FS, entre outros aspectos (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Estudos sugerem que FS são retidos por mais tempo no tecido tumoral em comparação aos tecidos saudáveis devido à drenagem linfática comprometida na região tumoral. Este fenômeno é chamado de efeito de Permeabilidade e Retenção Aprimorada (EPR) e é frequentemente utilizado na terapêutica do câncer (MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013). Outras teorias são baseadas nas diferenças morfológicas entre tecidos saudáveis e tumorais que sugerem a expressão aumentada de certos receptores nas células tumorais, a diminuição do pH intratumoral e a diminuição de Macrófagos Associados ao Tumor (TAM) que fagocitam moléculas de FS (BOYLE; DOLPHIN, 1996). Esses fatores levam a alguma retenção do FS no tecido tumoral, que combinado com a ativação localizada por irradiação específica, confere à TFD alguma seletividade (VAN STRATEN et al., 2017).

O mecanismo de ação da TFD consiste em processos fotoquímicos e fotofísicos que são desencadeados quando o FS absorve luz e pode ser explicado através do Diagrama de Jablonski (Figura 1.6).

Figura 1.6 - Diagrama de Jablonski.

Fonte: Adaptado de ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017.

Nele podemos observar que os FS apresentam dois elétrons de spin opostos no estado fundamental, S_0 . Quando o FS absorve luz, em comprimento de onda específico um desses elétrons vai para um estado de maior energia, o estado singlete excitado, S_1 . O S_1 é bastante instável e por este motivo os elétrons tendem a perder energia e voltar para S_0 rapidamente através do decaimento radiativo, emitindo fluorescência, ou não-radiativo, liberando calor. Alternativamente, pode haver um cruzamento intersistemas (ISC), no qual há a inversão de spin de um dos elétrons e devido a isso os elétrons vão para um estado de menor energia e mais estável, o estado excitado tripleto T_1 . O estado tripleto excitado é muito mais estável que o estado singlete excitado, tendo um tempo de vida na ordem de microsegundos comparado à nanosegundos do estado singlete. A partir do T_1 , os elétrons podem voltar ao estado fundamental S_0 emitindo fosforescência ou pode haver dois tipos de reações que são fundamentais para a formação de ERO: reações do tipo 1 e reações do tipo 2 (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; MAESTRIN et al., 2004).

Nas reações do tipo 1, há a transferência de elétrons que eventualmente forma ERO e oxida substratos como biomoléculas (ácidos nucleicos, ácidos graxos, aminoácidos) e membrana plasmática. Esse processo envolve a aquisição ou doação de um elétron, formando

radical ânion ou cátion. O radical ânion pode reagir com oxigênio molecular para produzir o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A redução de um elétron de $O_2^{\cdot-}$ pode formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode sofrer redução de um elétron para formar o poderoso radical hidroxila oxidante ($HO\cdot$) (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017; VAN STRATEN et al., 2017).

Já nas reações tipo 2, há a transferência de energia do estado tripleto T_1 para o oxigênio molecular presente em ambiente biológico, o qual é a única molécula que se apresenta como tripleto em seu estado fundamental, 3O_2 . Assim, quando o oxigênio molecular absorve essa energia ele é excitado do seu estado fundamental 3O_2 para o estado singlete excitado 1O_2 , formando o oxigênio singlete 1O_2 , uma espécie altamente reativa e citotóxica às células tumorais, bactérias, vírus, fungos e parasitas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017; VAN STRATEN et al., 2017).

Além disso, o 1O_2 pode reagir com outras espécies presentes no meio biológico e formar mais espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais também vão contribuir para o stress oxidativo desencadeando o estímulo de mecanismos bioquímicos para induzir a morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (FOOTE, 1991; AGOSTINIS et al., 2011; HEINRICH, 2013).

Ambos os mecanismos, tipo 1 e 2, podem ocorrer simultaneamente nas células e tecidos. Estudos mostram que as reações do tipo 2 são favorecidas quando há alta concentração de oxigênio e em ambiente hidrofóbico, uma vez que há o aumento do tempo de vida e da solubilidade do 1O_2 (BONNETT, 1995; SOBOLEV; JANS; ROZENKRANZ, 2000; OCHSNER, 1997). Acredita-se que a maioria dos FS usados para TFD anticâncer operam predominantemente através do mecanismo tipo 2, baseando-se na utilização do oxigênio singlete (1O_2) como espécie reativa (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017; DEROSA & CRUTCHLEY, 2002).

O sucesso dessa terapia se dá porque as espécies reativas geradas (1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $OH\cdot$, H_2O_2) são capazes de reagir com biomoléculas fundamentais para o equilíbrio celular, como lipídeos, DNA, proteínas, membrana celular e diferentes organelas. Assim, o stress oxidativo gerado estimula diferentes vias bioquímicas que sinalizam para morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

O efeito antitumoral da TFD é proveniente de três mecanismos interrelacionados causados pelo stress oxidativo: o efeito citotóxico direto na célula tumoral, danos na vascularização tumoral reduzindo a angiogênese e indução da resposta inflamatória que pode levar ao estímulo do sistema imune (AGOSTINIS et al., 2011).

A eficácia da TFD, de maneira geral, depende tanto do tempo de vida do estado T_1 do FS quanto da concentração de oxigênio presente no meio biológico. Quanto maior é o tempo de vida no estado T_1 , maior é a colisão com o oxigênio molecular para a transferência de energia e formação do oxigênio singlete (MONRO, 2018). Portanto, uma das principais limitações para o uso dessa terapia é a falta de oxigênio molecular em algumas regiões do ambiente tumoral. Os tumores sólidos são capazes de estimular a angiogênese, a qual consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para a irrigação do tumor. Porém, essa irrigação ocorre nas extremidades da região tumoral, enquanto as regiões mais internas apresentam pouca ou nenhuma vascularização, o que conseqüentemente, proporciona regiões de hipóxia (pouca concentração de oxigênio) e anóxia (sem oxigênio), comprometendo a eficácia da TFD (DE OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Nesse sentido, busca-se o desenvolvimento de novos FS e novas terapias que produzam espécies radicalares e causem sensibilidade nas células tumorais independente da presença de oxigênio. Uma das alternativas é o desenvolvimento de FS que produzam 1O_2 na TFD, e simultaneamente, sejam capazes de liberar fotoquimicamente o óxido nítrico, o qual é uma espécie radicalar e um mensageiro biológico envolvido em várias vias bioquímicas no processo de morte celular (KORBELIK et al., 2000).

Dentro desta perspectiva, complexos de rutênio ftalocianina podem ser coordenados ao NO e atuarem como moléculas fotossensibilizadoras, que quando estimuladas pela TFD possam produzir as duas espécies radicalares ao mesmo tempo, contornando as limitações da TFD e promovendo um efeito sinérgico na citotoxicidade das células tumorais (CARNEIRO et al, 2011; HEINRICH et al., 2014).

Outra estratégia é combinar a TFD com outras terapias capazes de estimular mecanismos endógenos de produção de NO intracelular e promover novamente o efeito sinérgico na morte celular através da produção de 1O_2 e NO. É o caso de uma nova terapia chamada de Fotobiomodulação (PBM) que será discutida nas próximas sessões.

1.4 Fotossensibilizadores

Atualmente, busca-se o desenvolvimento de compostos fotossensíveis para serem aplicados como fotossensibilizadores e aumentar a eficiência da TFD. Embora na literatura sejam reportados muitos candidatos a FS, poucos obtêm sucesso nos estudos fotobiológicos e chegam até a fase clínica (ROBERTSON, C. A.; HAWKINS, D. E.; ABRAHAMSE, 2009).

As características de um FS ideal estão relacionadas às suas propriedades físico-químicas, fotofísicas, fotoquímicas, fotobiológicas e farmacológicas. Primeiramente, deve

apresentar um processo sintético eficiente e confiável para permitir excelente rendimento de produtos idênticos de lote para lote, com alto grau de pureza, baixo custo, alta estabilidade no armazenamento e transporte (ALLISON; SIBATA 2010). Como a penetração da luz aumenta com o comprimento de onda, um FS eficaz deve apresentar bandas de absorção na região do vermelho e infravermelho próximo, na região da janela terapêutica entre 600 e 800 nm. O tempo de vida no estado T_1 deve ser suficiente para gerar um alto rendimento de 1O_2 e outras espécies reativas (PANDEY; HERMAN, 1998; STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998). Porém, ao contrário do que se pensa, a alta produção de 1O_2 não garante uma alta eficiência da TFD. Para promover alta citotoxicidade, um FS deve ser internalizado e ter a capacidade de se acumular em organelas específicas, como mitocôndrias, lisossomos ou retículo endoplasmático, as quais devido ao stress oxidativo estimulam vias bioquímicas específicas que sinalizam para morte celular (VAN STRATEN, 2017). Portanto, ao idealizar um FS, deve-se levar em consideração a solubilidade, anfifilicidade e a carga, o que permitem a internalização e a baixa tendência de agregação em meio biológico. Além disso, um FS não deve apresentar toxicidade no escuro e potencial mutagênico e carcinogênico (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Embora ainda não exista na aplicação clínica, um FS ideal deveria apresentar direcionamento seletivo e eficiente para o tecido tumoral, sem atingir as células saudáveis, com eliminação rápida do organismo, garantindo a ausência de efeitos colaterais.

A maioria dos FS utilizados na terapia do câncer são baseados na estrutura tetrapirrólica, semelhante à protoporfirina contida na hemoglobina. Fundamentalmente, os FS são 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). Em geral, apresentam espectro de absorção eletrônica com bandas de absorção características, denominadas banda B, também chamada de Soret, na região de 300 e 400 nm e, dependendo do FS, uma ou mais bandas Q na região do visível (DOUGHERTY et al., 1998).

Os primeiros FS utilizados na TFD foram eosina e acridina, que por apresentarem alta toxicidade, logo caíram em desuso (SIMPLICIO et al., 2002). O primeiro FS a ser estudado clinicamente para a TFD no tratamento do câncer foi uma mistura solúvel em água de porfirinas, com estruturas monoméricas, diméricas e oligoméricas, chamado “derivado de hematoporfirina (HPD)”, o qual mais tarde, em 1993, foi aprovado pelo FDA para uso clínico e comercialização e ficou conhecido como Photofrin[®] (Figura 1.7) (DOUGHERTY et al., 1998; DOUGHERTY, 2002).

Figura 1.7 - Estrutura do derivado de hematoporfirina (HPD), Photofrin®.

Fonte: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17301313>.

Até os dias atuais, o Photofrin® é o FS mais amplamente empregado no mundo todo (KATAOKA et al., 2017), porém, apresenta algumas desvantagens incluindo reações de fotossensibilização na pele de longa duração, com 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). Além disso, apresenta uma banda de absorção com baixa absorvidade molar na região do vermelho, em 630 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (ORMOND; FREEMAN, 2013). Devido a essas limitações pensou-se em explorar quimicamente o HPD de modo a produzir estruturas semelhantes que pudessem deslocar a absorção pra região do vermelho e aumentar a absorbância nessa região, aumentando assim a eficácia do efeito fotodinâmico. Dessa maneira, houve um grande esforço para o desenvolvimento de FS com essas modificações, que ficaram conhecidos como a segunda geração de FS (ORMOND; FREEMAN, 2013).

Os FS são classificados de acordo com o período de tempo em que foram descobertos e de acordo com suas estruturas químicas. Os fotossensibilizadores de primeira geração compreendem exclusivamente a classe das porfirinas e foram descobertos na década de 1910. Dessa classe apresentam-se disponíveis no mercado Photofrin®, Photosan®, Photosan®-3 e Photogen® (HAGE et al., 2012; TRINDADE et al., 2012). A segunda geração, considerada a partir dos estudos de 1980, é representada pelas porfirinas substituídas periféricamente, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e naftalocianinas (AGOSTINIS et al., 2011; ALLISON; SIBATA, 2010; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; KATAOKA et al., 2017).

A diferença química entre a porfirina, a clorina e a bacterioclorina é relacionada à estrutura do anel tetrapirrólico. O anel aromático da porfirina sofre uma redução dando

origem à clorina, a qual sofre outra redução e dá origem à bacterioclorina. Consequentemente, a chamada banda Q é deslocada para região do vermelho e há o aumento de sua absortividade molar, o que possibilita a irradiação luminosa em uma região que tenha maior penetração no tecido biológico. A banda Q da porfirina é em 630 nm com $\epsilon_{\text{max}} \sim 3000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, enquanto para a clorina há o deslocamento para 640-700 nm com $\epsilon_{\text{max}} \sim 40000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e, ainda, para a bacterioclorina a região de absorção é de 740-800 nm com $\epsilon_{\text{max}} \sim 50000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ORMAND; FREEMAN, 2013) (Figura 1.8).

Figura 1.8 - Estrutura química e espectro de absorção dos fotossensibilizadores porfirina (A), clorina (B) e bacterioclorina (C).

Fonte: Adaptado de ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2017.

Da família das porfinas substituídas, podemos citar a *m*-THPP (meta-tetra(hidroxifenil) porfirina) (WAINWRIGHT, 2004), e a TPPS4 (5,10,15,20-tetraquis(4-sulfanatofenil)-21H,23H-porfirina) (LEDO; LEDO, 2000) (Figura 1.9). A *m*-THPP foi 25 a 30 vezes mais potente que o HPD em fotonecrose tumoral quando irradiada a 648 nm (BONNETT,1995). No entanto, a *m*-THPP, causou fototoxicidade na pele embora não tão severamente quanto o isômero orto. A irradiação do TPPS4 em 645 nm mostrou que este FS é um candidato com potencial para o tratamento de células de carcinoma basal (SANTORO et al., 1990).

Figura 1.9 - Estrutura de porfirinas substituídas periféricamente.

Fonte: ORMOND; FREEMAN, 2013.

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) também é considerado um FS de segunda geração, atuando como uma pró-droga, a qual é metabolicamente convertida em Protoporfirina IX (PpIX) (fotossensibilizador endógeno) através do ciclo bioquímico do grupo HEME (Figura 1.10) (SIMPLICIO, 2002). O ALA é um derivado da porfírina sintética, que apresentou sucesso no tratamento do câncer de pele não-melanoma, queratose actínica e ainda na detecção de tumores de bexiga, pele, pulmão e trato gastrointestinal (PENG et al., 1997). Para tratamento, é administrado por via tópica enquanto para detecção tumoral é administrado por via intravesical. O nome comercial do medicamento que contém o ALA como princípio ativo é Levulan Kerastick[®] (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Figura 1.10 - Conversão do Ácido 5-aminolevulínico em Protoporfirina IX.

Fonte: ORMOND; FREEMAN, 2013.

O hexaminolevulinato, o éster n-hexílico do ALA, (HAL, Hexvix®, Cysview®, 10) foi aprovado em 2010 pela FDA no diagnóstico de câncer de bexiga (FDA, 2010). HAL é convertido em PpIX 50 a 100 vezes mais eficientemente do que o ALA (FURRE et al, 2005). Outro pró-fármaco também de segunda geração é o metil-aminolevulinato (MAL), cujo nome comercial é Metvix® (FDA, 2004), um derivado do ALA que sofreu metilação a fim de aumentar a lipofilicidade e penetração cutânea (Figura 1.11).

Figura 1.11- Estrutura de FS derivados do ALA. Metil-aminolevulinato (MAL) e hexaminolevulinato (HAL), um éster n-hexílico.

Fonte: ORMOND; FREEMAN, 2013.

Os FS da família da clorina são representados pelo BPD-MA, um FS com anéis monoácidos derivados da benzoporfirina A, cujo nome comercial é Visudyne® (KOSTRON, et al., 2007), meta-tetra (hidroxifenil) clorina (m-THPC) conhecido como Foscan® (PATRICE, 2003), etiopurpurina de estanho (SnET2, Rostaporfin, Purlytin™) e N-aspartil clorina e6 (NPe6, Talaporfin, Laserphyrin®) que é derivado de clorofila a (EVENSEN, 1995) (Figura 1.12).

Figura 1.12- Estrutura dos FS da família das clorinas.

Fonte: ORMOND; FREEMAN, 2013.

O BPD-MA (Visudyne®) apresentou uma farmacocinética mais rápida e, devido a isso, ocasionou menos reações de fotossensibilidade e é aprovado para o tratamento de degeneração macular em oftalmologia e câncer de pele não-melanoma (LUI et al., 2004). O m-THPC (Foscan®) é aprovado para tratamento de câncer de pescoço, mama, próstata e pâncreas, o qual é muito eficaz e, ainda, pequenas doses de m-THPC são necessárias durante o tratamento. No entanto, alguns pacientes apresentaram reações de fotossensibilidade (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

As ftalocianinas (Pc) apresentam os anéis tetrapirrólicos fundidos aos anéis de benzeno, o que aumenta a deslocalização e promove um deslocamento da banda Q para a região de 660 nm com alta absortividade molar ($\epsilon_{\text{max}} \sim 200000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), não ocasionando as reações de fotossensibilidade observadas para os FS derivados de porfirinas. Além disso, as ftalocianinas apresentam alta estabilidade, baixa toxicidade e resistência à degradação química e fotoquímica (da ROCHA, 2008). Um derivado de Pc usado comercialmente é o tetrassulfonato de ftalocianina de alumínio, AlPcS4, Photosens®, que apresenta λ_{max} em 676 nm (STABLES; ASH, 1995). O Photosens® foi aprovado na Rússia para tratar câncer de estômago, pele, lábios, oral e mama. No entanto, o Photosens® é uma mistura de ftalocianinas substituídas em diversas posições e produziu reação de fotossensibilidade por várias semanas. A ftalocianina de silício 4 (Pc4) é uma ftalocianina que absorve em 675 nm e completou Ensaios de Fase I para o tratamento de queratose actínica, doença de Bowen, câncer de pele e micoses de estado I ou II fungoides (NCT00103246) (Figura 1.13) (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; ORMOND; FREEMAN, 2013).

Figura 1.13 - Estrutura de FS da família das ftalocianinas.

Fonte: ORMOND; FREEMAN, 2013.

A fim de direcionar seletivamente os fotossensibilizadores às células tumorais, evitando o acúmulo em células sadias e possíveis efeitos colaterais, surgiu a terceira geração de FS, a qual consiste em 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; SANTOS et al., 2019).

Os principais FS aprovados para uso clínico na TFD podem ser visualizados na tabela 1.1, relacionando a classe do fotossensibilizador com o nome comercial e aplicação clínica.

Tabela 1.1- FS aprovados para uso clínico na TFD (ORMOND; FREEMAN, 2013).

(continua)

Composto	Nome comercial	$\lambda_{\max}$ (nm) $\epsilon_{\max}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Aplicação
<i>“Porphirmer sodium”</i>	Photofrin	632 (3000)	Canadá (1993) – câncer de bexiga; EUA (1995) – câncer de esôfago; EUA (1998) câncer de pulmão; EUA (2003) – câncer de Barret; Japão-câncer cervical; Europa, Canadá, Japão, EUA, UK - câncer endobraquial
ALA	Levulan	632 (5000)	EUA (1999) - queratose actínica
MAL	Metvix	-	EUA (2004) - queratose actínica
HAL	Cysview	-	EUA (2010) – diagnóstico câncer de bexiga
BPD-MA	Visudyne	689 (34000)	EUA (1999) - degeneração macular
m-THPc	Foscan	652 (35000)	Europa – câncer de cabeça e pescoço
etiopurpurina de estanho (SnET2)	Purlytin	664 (30000)	Ensaios clínicos – adenocarcinoma de mama; carcinoma basal; sarcoma de Kaposi; degeneração macular

(conclusão)

Composto	Nome comercial	$\lambda_{\max}$ (nm) $\epsilon_{\max}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Aplicação
N-aspartil clorina e6 (NPe6)	Laserphyrin	664 (40000)	Japão – câncer de pulmão
AlPcS4	Photosens	676 (200000)	Rússia – câncer de estômago, pele, boca, cavidade oral, língua e mama.
Pc4	-	675 (200000)	Ensaio clínicos - queratose actínica, doença de Bowen, câncer de pele, micoses

1.4.1 Ftalocianinas

As ftalocianinas (tetraazatetrabenzoporfirinas) são pigmentos orgânicos de origem sintética, estruturalmente formadas por policiclos aromáticos com quatro unidades isoindol. Cada grupo isoindol consiste em um anel benzênico fundido a um pirrol. As unidades isoindóis são interligadas através de átomos de nitrogênio, denominada ponte “aza” (BEATRIZ; ALVES, 2014).

A descoberta das ftalocianinas se deu a partir dos estudos de Braun e Tcherniac, em 1907, quando observaram que o aquecimento da *orto*-cianobenzamida sob alta temperatura resultava na produção de um composto insolúvel e de coloração azul (Linstead, 1934; LEVER, 1984; BRAUN; TCHERNIAC, 1907).

Em 1927, Diesbach e Von der Weid, obtiveram acidentalmente a primeira ftalocianina de cobre, quando tentavam sintetizar a ftalonitrila 1,2-dicianobenzeno (DIESBACH; WEID, 1927).

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. Mais tarde descobriu-se que se tratava de uma ftalocianina de ferro, sendo que a procedência do átomo de ferro se deu através do recipiente utilizado para o meio reacional (MATLABA, 2002).

A descoberta das ftalocianinas em escala industrial também ocorreu de forma acidental, em 1928. Na fábrica Grangemouth Works of Messrs Scottish Dyes, Ltd (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKOL, 2002), durante a produção da ftalimida, a partir da

reação entre anidrido ftálico e amônia preparados em um recipiente de ferro, observou-se uma impureza de coloração azul.

Mais tarde, em 1933, o pesquisador Linstead denominou esse composto azul como ftalocianina, por ser originada do anidrido ftálico (*ftalo*) e por apresentar a coloração azul-esverdeada (*ciano*). Linstead em colaboração com Robertson elucidaram pela primeira vez a estrutura geométrica da ftalocianina de base livre através da difração de Raio-X. (Linstead, 1934; Robertson, 1936; Lever, 1984).

A partir disso, foi possível fazer considerações a respeito das características químicas desse composto que passou primeiramente a ser utilizado na indústria têxtil e de corantes (GOBO, 2013). Anos mais tarde descobriu-se o potencial para aplicação desses compostos em diversas áreas, como células solares, funcionando como antenas captadoras de luz solar e ainda, como dispositivos moleculares (CLAESSENS; HAHN; TORRES, 2008).

Atualmente inúmeras pesquisas relatam bons resultados das ftalocianinas como FS na TFD para o tratamento do câncer e na ação antimicrobiana (YURT et al., 2017).

O alto potencial desses compostos como fotossensibilizadores se dá devido suas propriedades químicas e espectroscópicas, apresentando baixa toxicidade, alta estabilidade e ótima absorção na janela terapêutica. A estrutura formada por heterociclos aromáticos interligados pela ponte “aza” confere ao composto um arranjo planar de 18 elétrons π conjugados com alta densidade eletrônica e devido a essas propriedades, as ftalocianinas apresentam uma banda B (Soret) entre 300 e 400 nm e uma banda Q entre 600 e 700 nm com alta absortividade molar. (OUGH; MARTIN, 1994).

Além disso, devido ao anel macrociclo altamente conjugado, é possível doar densidade eletrônica coordenando-se as ftalocianinas a centros metálicos, formando as metaloftalocianinas. Existem inúmeros exemplos de ftalocianinas coordenadas a diferentes centros metálicos como zinco, silício, alumínio, rutênio, entre outros (Figura 1.14) (HANACK; KANG, 1992; YURT, et al., 2017; CARNEIRO et al., 2011; ALLISON; SIBATA, 2010; MATLABA, 2002).

Figura 1.14 - Estrutura química das ftalocianinas. A: Ftalocianina de Base Livre B: Metaloftalocianina.

Fonte: Autora.

Baseado no potencial terapêutico das ftalocianinas como fotossensibilizadores na TFD, este trabalho propõe a síntese de ftalocianinas coordenadas ao íon metálico Ru(II) e Ru(III) no intuito de entender suas propriedades, as benesses adquiridas com o novo sistema em relação a outras ftalocianinas e quiçá sua aplicação clínica baseado em ensaios pré-clínicos.

A vantagem de se usar o rutênio no interior do anel macrociclo é a versatilidade que se pode atribuir a esses sistemas, como a possibilidade de diferentes ligantes coordenados no mesmo composto, diferentes estados de oxidação e geometrias mais estáveis. A modificação dessas propriedades pode trazer diversos benefícios como aumento da solubilidade, aumento da internalização celular e direcionamento pra organelas específicas do sistema biológico, o que de fato, contribuem para melhor eficiência da TFD (MARI et al., 2015).

1.5 Complexos metálicos no tratamento do câncer

Complexos metálicos, conhecidos também como compostos de coordenação, são aqueles que apresentam um (ou mais) centros metálicos rodeados por ligantes. Os ligantes funcionam como base de Lewis capazes de doar elétrons para o orbital vazio do centro metálico, que funciona como ácido de Lewis, capaz de receber elétrons (SHRIVER, ATKINS, 2003).

A grande vantagem de se trabalhar com complexos metálicos é a versatilidade no desenvolvimento de compostos químicos que se pode explorar uma vez que os metais apresentam diferentes estados de oxidação podendo ser coordenados a diferentes ligantes, com diferentes geometrias e números de coordenação (BARRY; SADLER, 2013). A obtenção de diferentes estruturas químicas permite funcionalizar o complexo químico para diferentes

finalidades biológicas como alteração da biodisponibilidade, liberação de moléculas, inibição de enzimas, ligação com proteínas direcionadoras, marcador de macromoléculas biológicas como o DNA, catalisadores, co-fatores, entre outros (MJOS; ORVIG, 2014; STORR; THOMPSON; ORVIG, 2006).

O uso de metais na medicina teve início desde a antiguidade. Na Idade Antiga, há 3500 a.C., a civilização egípcia usava o cobre para a esterilização da água enquanto que na Árabia e na China já se usavam o ouro na fabricação de medicamentos, pois acreditavam que por ser um metal precioso poderia trazer benefícios para a saúde (THOMPSON; ORVIG, 2003). Em 1500 a.C o ferro já era usado como remédio e o zinco para tratamento de feridas no Egito (ORVIG; ABRAMS, 1999).

A Química Inorgânica Medicinal teve suas origens em 1908 quando Paul Ehrlich, chamado pai da quimioterapia (prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia), realizou os primeiros estudos de estrutura atividade de um complexo metálico de Arsênio, o salvarsan, para o tratamento da sífilis. Mais tarde, Alfred Werner, elucidou as principais características das estruturas geométricas dos metais do bloco *d* (SHRIVER; ATKINS, 2003; BERALDO, 2005), lhe rendendo o prêmio Nobel em 1913.

Essas atribuições permitiram o delineamento da estrutura química dos complexos metálicos possibilitando a aplicação farmacológica, o que envolve a modelagem molecular direcionada ao aprimoramento de etapas de absorção, hidrólise, ligação com sítio protéico, transporte pela membrana e interação com alvo molecular (SCHWIETERT; McCUE, 1999).

A aplicação de complexos metálicos no tratamento do câncer teve um grande impulso com a descoberta ocasional do complexo de platina *cis*-diaminodicloroplatina(II) $\{cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]\}$, denominado cisplatina, a qual foi primeiramente sintetizada em 1844 por Michel Peyrone, ficando com a designação de cloreto de Peyrone. Apenas um século depois, em 1960, em Michigan State University, Barnett Rosenberg e colaboradores redescobriram acidentalmente esse composto e seu potencial de ação. Durante o estudo do efeito da corrente elétrica no crescimento da bactéria *Escherichia coli* chegaram à conclusão que o que inibia a mitose das bactérias era um agente químico e não, de fato, a corrente elétrica. Observou-se então a formação da cisplatina através da reação da platina (Pt), proveniente do eletrodo, com sais de amônio, proveniente do meio de cultura (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965). Mais tarde, descobriu-se que a atividade antitumoral da cisplatina é atribuída à intercalação ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais. O seu efeito citotóxico é, assim, causado pela inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose (JAMIESON; LIPPARD, 1999; MORAES, 2011). Dessa forma, a cisplatina foi aprovada pelo FDA em

1978 e até hoje é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de diversos tipos de câncer (FDA,1978; MONNERET, 2011).

Depois da descoberta da cisplatina, abriu-se então uma nova perspectiva para o uso de complexos metálicos como agentes terapêuticos. No entanto, apesar do sucesso terapêutico, esse composto não é seletivo apenas às células tumorais, apresentando diversos efeitos indesejáveis como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, anemia e ainda pode gerar quimioresistência. Nesse sentido, a fim de superar essas desvantagens outros complexos de platina de segunda e terceira geração foram desenvolvidos como a carboplatina, oxaloplatina e nedaplatina (Figura 1.15), sendo que a carboplatina e oxaloplatina também são aprovados para uso clínico (KOSTOVA, 2006).

Figura 1.15 - Diferença nas estruturas moleculares de complexos metálicos a base de platina para o tratamento antitumoral: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.

Fonte: Adaptado de ALI et al, 2013.

Embora os complexos de platina de segunda e terceira geração tenham efeitos colaterais reduzidos comparados à cisplatina, ainda apresentam quimioresistência e por isso há a busca no desenvolvimento de novos complexos com diferentes metais na terapêutica do câncer.

Complexos metálicos de rutênio têm se destacado devido a diversas propriedades desse metal como baixa toxicidade, alta estabilidade, vários estados de oxidação sendo os mais comuns o Ru(II) e Ru(III) e, geometria de coordenação octaédrica possibilitando, assim, a associação com até seis ligantes (THANGAVEL; VISWANATH; KIM, 2017). Além disso, acredita-se que o rutênio mimetiza o ferro em algumas propriedades, podendo se ligar a proteínas captadoras de ferro como albumina e transferrina, o que elimina a toxicidade do metal no organismo (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Alguns complexos de rutênio III, o *trans*-[RuCl₄(DMSO)(Im)]ImH conhecido como NAMI-A (Im=imidazol) e o *trans*-[RuCl₄(Ind)₂]IndH conhecido como KP1019 (Ind=indazol) se destacaram como agentes promissores anticâncer por serem ativos inclusive contra o processo metastático. Ambos os complexos atuam como pró-drogas, pois apresentam o Ru com número de oxidação III, que se encontra inativo. Em regiões tumorais de hipóxia, o Ru(III) é reduzido para Ru(II), tornando o complexo ativo. O NAMI-A foi o primeiro complexo de rutênio testado em humanos e obteve sucesso na fase clínica I, porém foi constatada sua toxicidade na fase clínica II, tendo sido reprovado para próxima etapa. Já o KP1019 ainda está em estudo clínico (ALESSIO, 2017) (Figura 1.16).

Figura 1.16 - Complexos de rutênio promissores na atividade anticâncer. A) NAMI-A e B) KP1019.

Fonte: Adaptado de VAN RIJT; SADLER, 2009.

Ademais, complexos de rutênio apresentam características fotofísicas e fotoquímicas que os tornam bons candidatos como fotossensibilizadores na TFD. São capazes de aumentar o acoplamento spin-órbita aumentando o tempo de vida do estado excitado tripleto, e consequentemente aumenta a produção de oxigênio singlete (MONRO et al., 2018). Como exemplo podemos citar o complexo polipiridínico de rutênio [Ru(bpy)₃]²⁺ (sendo bpy = 2,2'-bipiridina), o qual além de produzir um bom rendimento quântico de oxigênio singlete, $\Phi_{\Delta} = 0,22$, é passível de clivar o DNA plasmídico através da interação com o ligante piridínico (KAIZU et al., 1985; KNOLL; TURRO, 2015)

Outros complexos de rutênio que apresentam os ligantes fenantrolina e dipiridofenazina (dppz) na esfera de coordenação vêm apresentando uma estratégia interessante para a aplicação na TFD por se tratarem de ligantes intercaladores do DNA, com

um potencial efeito fotoquimioterápico (MAHESWARI; PALANIANDAVAR, 2004; SCHATZSCHNEIDER et al., 2008).

A fim de avaliar as propriedades biológicas do rutênio em porfirinas substituídas, Schmitt e colaboradores (SCHMITT et al., 2008) sintetizaram complexos porfirínicos rutênio-arenos e seus análogos utilizando o metal ródio (Figura 1.17) e compararam a citotoxicidade de ambos os complexos em células de melanoma humano Me300 (FERREIRA et al., 2017).

Figura 1.17 - Comparação de porfirinas de rutênio e ródio sintetizadas por Schmitt e colaboradores.

Fonte: Adaptado de SCHMITT et al., 2008.

Como resultado os pesquisadores encontraram que as porfirinas de rutênio promoveram maior citotoxicidade, em torno de 60-80%, em comparação às porfirinas de ródio, sem citotoxicidade expressiva, nas mesmas condições experimentais (concentração de 10,0 μM , com irradiação em 652 nm e doses de 5,0 a 30,0 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Segundo autores, o trabalho sugeriu que o papel do rutênio, nesse caso, foi auxiliar no processo de internalização celular, que não ocorreu com as porfirinas de ródio (SCHMITT et al., 2008).

No que se refere ao desenvolvimento de metalofalocianinas, o uso do rutênio na esfera de coordenação tem se tornado promissor por ser capaz de aumentar o cruzamento intersistemas, aumentando o rendimento do estado tripleto e consequentemente o rendimento

de oxigênio singlete. Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2017) mostraram que complexos de rutênio ftalocianina com ligantes axiais polietilenglicol modificados não foram tóxicos para células de câncer de bexiga HT-1376 na ausência de estímulo luminoso. No entanto, na presença de TFD a viabilidade celular foi em torno de 40% com 5,0 μ M desses compostos, o que mostra que complexos de rutênio-ftalocianina apresentam potencial como fotossensibilizadores e devem ser mais explorados.

Além disso, utilizar o rutênio em fotossensibilizadores pode ser uma estratégia para ligar essas moléculas a espécies que aumentem a eficiência da TFD. Uma dessas possibilidades é coordenar o complexo de rutênio-ftalocianina ao óxido nítrico (NO), uma espécie radicalar que vem recebendo atenção devido a propriedades singulares que o mesmo apresenta e será discutido a seguir.

1.6 Óxido Nítrico: importância biológica e atuação em tumores

O Óxido Nítrico (NO) é um importante mensageiro biológico descoberto na década de 80 por Ferid Murad, Robert F. Furchgott e Louis Ignarro. Ficou conhecido como “molécula do ano” em 1992 pelo número de funções que desempenha surpreendendo toda a comunidade científica. O NO está envolvido em inúmeros processos fisiológicos como regulação cardiovascular, atividades do sistema imunológico regulando inflamação, participação como neurotransmissor em células de memória e, ainda, apresenta um importante papel na regulação tumoral (FELDMAN; GRIFFITH; STUEHR, 1993; IGNARRO, 2000; MONCADA; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

O NO é uma molécula endógena produzida a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina. Trata-se de uma reação de oxidação do aminoácido L-arginina, catalisada por uma enzima chamada Óxido Nítrico Sintase (NOS), que envolve a doação de elétrons pela forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), oxigênio molecular e outros co-fatores, tendo como produto a L-citrulina e o NO (Figura 1.18) (MONCADA; HIGGS, 1993; ZAGO; ZANESCO, 2006). A enzima NOS se apresenta em diferentes isoformas: constitutiva e indutível. As isoformas constitutivas costumam gerar baixas concentrações de NO de maneira constante e são representadas pela Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS), responsável pela regulação cardiovascular e pela Óxido Nítrico Sintase Neural (nNOS), envolvida nos processos de memória (CULOTTA; KOSHLAND, 1992; QUEIROZ; BATISTA, 1999; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). A isoforma indutível, chamada Óxido Nítrico Sintase Indutível, é capaz de gerar NO em maiores concentrações e é estimulada em processos inflamatórios (MIRANDA et al., 2000).

Figura 1.18 - Produção de NO a partir da oxidação da L-arginina produzindo L-citrulina e NO, catalisada pela enzima NOS.

Fonte: BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005.

Quando produzido, o NO é um gás que se difunde rapidamente entre os ambientes celulares lipofílicos e hidrofílicos, não dependendo de transportadores específicos e nem de canais de passagem intracelulares. É a menor molécula conhecida que atua como mensageiro biológico em mamíferos (CULOTTA; KOSHLAND, 1992). É uma espécie radicalar que devido as suas propriedades físico químicas reage rapidamente no ambiente intracelular apresentando tempo de vida curto em torno de 5 segundos (WORKS et al, 2002; FELDMAN; GRIFFITH; STUEHR, 1993)

Sua alta reatividade se dá devido a sua configuração eletrônica $(\sigma_{1s})^2(\sigma_{1s}^*)^2(\sigma_{2s})^2(\sigma_{2s}^*)^2(\sigma_{2p}, \pi_{2p})^6(\pi_{2p}^*)^1$, representada no diagrama de orbital molecular na figura 1.19, sendo uma espécie diatômica, paramagnética com um elétron desemparelhado no orbital π antiligante (FRANCO, 2014). Assim o NO é uma espécie radicalar que devido à instabilidade tem facilidade em reagir rapidamente com outras moléculas paramagnéticas, tais como o oxigênio molecular (O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formando outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) no ambiente celular e aumentando o stress oxidativo (QUEIROZ; BATISTA, 1999; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

Além disso, visando estabilizar o elétron desemparelhado, o NO tem a capacidade de doar densidade eletrônica aos metais através do orbital σ , se coordenando aos complexos metálicos. Dependendo da natureza do íon metálico também pode haver doação eletrônica do orbital $d\pi$ do metal para o orbital π^* do NO ($d\pi (M) \rightarrow \pi^* (NO)$), o que é chamado de retrodoação (RICTHER-ADDO; LEGZDINS, 1992). A capacidade do NO em se coordenar a íons metálicos é muito importante para diversas atividades biológicas, uma vez que o NO interage com o grupo heme (Fe^{+2}) de diversas biomoléculas, como no caso da guanilato

ciclase solúvel regulando a vasodilatação e do citocromo P450 ativando a hemooxigenase em hepatócitos (STADLER et al., 1994).

Figura 1.19 - Representação do diagrama do orbital molecular do NO.

Fonte: CENTELLES; ESTEBAN; IMPERIAL, 2004.

Nas últimas décadas, um dos efeitos bioquímicos bastante explorados do NO relaciona-se à sua ação vasodilatadora. Uma vez produzido no endotélio pela eNOS, o NO se difunde até o músculo liso e ativa a guanilato ciclase solúvel, a qual estimula a conversão do GTP (trifosfato de guanosina) em GMPc (monofosfato de guanosina cíclico), o que resulta no relaxamento do endotélio (ZAGO; ZANESCO, 2006).

Esse efeito biológico somado às propriedades do NO em se coordenar a íons metálicos estimularam o desenvolvimento de complexos nitrosilos como estratégia terapêutica para promover a vasodilatação (SZCZEPURA; TAKEUCHI, 1990). Assim, surgiu o nitroprussiato de sódio, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, um complexo metálico que libera NO apresentando potente efeito vasodilatador sendo usado quando é necessário o controle da pressão arterial (MONCADA et al., 1991; STOCHEL et al., 1998). Porém, devido à liberação exacerbada de NO e a produção de cianeto (CN^-) como subproduto, é um fármaco utilizado apenas em casos de emergência (STOCHEL, 2009).

Um outro efeito importante do NO é seu mecanismo de ação no câncer que é objeto de muitos estudos. O NO parece estar envolvido em uma dupla função nas células tumorais, tanto influenciando a carcinogênese e progressão tumoral, quanto ativando vias bioquímicas para sinalizar apoptose, aumentando citotoxicidade (WELLER, 2003; CHIANG, et al., 2005). A atividade biológica parece depender das condições do meio intracelular, do tipo de linhagem celular, da concentração de NO e de outras espécies radicalares.

Assim, segundo estudos de Wink et al. (2008), baixas concentrações de NO parecem favorecer a proliferação de células tumorais evidenciando o processo tumorigênico enquanto altas concentrações propiciam a citotoxicidade estimulando o processo tumoricida (WINK et al., 2008) (Figura 1.20).

Figura 1.20 - Efeitos tumorigênicos e tumoricida do óxido nítrico de acordo com a concentração.

Fonte: WINK et al., 2008.

Estudos sugerem que concentrações de NO de 1,0 a 30,0 nM estimulam a angiogênese com proliferação de células endoteliais e que concentrações de 30,0 a 100,0 nM estimulam a fosforilação de proteínas Akt (*protein kinase B*) e da ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), que sinalizam para resposta proliferativa e anti-apoptótica. Ainda por volta de 100 nM, há a estabilização do fator induzido por hipóxia-1- α (HIF-1- α), o que aumenta a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), aumentando ainda mais a angiogênese e promovendo proliferação celular e progressão tumoral (RIDNOUR et al., 2008; RIDNOUR et al., 2006; WINK et al., 2008).

Em contraproposta, concentrações acima de 300,0 nM tendem a aumentar a fosforilação do gene supressor tumoral p53 e inativação de proteínas de reparo no DNA, estimulando o processo apoptótico e aumentando a morte celular (RIDNOUR et al., 2008; RIDNOUR et al., 2006; WINK, et al., 2008).

Estudos reportados por Sikora (2010) relataram que a inibição da síntese da iNOS reprimiu o crescimento de melanoma humano “*in vivo*” em sinergismo ao efeito da cisplatina. Eyler et al. (2011) relataram que células-tronco de glioblastoma expressaram níveis mais altos de iNOS do que as células-tronco normais e que inibindo a iNOS, reduziu-se a proliferação celular “*in vitro*”. Ainda em estudo “*in vivo*” em camundongos, demonstraram que utilizando um inibidor da iNOS retardou-se a progressão tumoral e os animais tiveram sobrevida prolongada. Esses estudos sugerem que as células cancerígenas tendem a usar baixos níveis de NO a partir da iNOS para reduzir apoptose e estimular proliferação celular (RUBBO et al., 1994; RAPOZZI; DELLA PIETRA; BONAVIDA, 2015).

Assim, o papel duplo do NO tem sido amplamente estudado e há crescente interesse quanto à aplicação desta molécula em terapias antitumorais. Giles et al. (2012) projetaram dois pró-fármacos, terc-butil-S-nitrosotiol e tert-dodecaire-S-nitrosotiol, que liberam NO através do estímulo fotoquímico. Comparando-os com os nitrosotióis já disponíveis, os estudos relataram que ambos os pró-fármacos apresentaram melhor cinética de liberação de NO, maior estabilidade na ausência de irradiação e maior citotoxicidade em carcinoma de pulmão A549 (GILES et al., 2012).

A fim de aprimorar as aplicações clínicas, buscam-se estratégias para o desenvolvimento de compostos de coordenação que possam liberar NO de maneira controlada e seletiva. Uma das possibilidades é estimular a redução eletroquímica do NO^+ à NO^0 , através da indução luminosa do complexo nitrosil. O NO^0 tem baixa afinidade pelo metal e assim pode ser liberado.

Baseado nisso, compostos de coordenação fotoquimicamente ativos podem ser desenhados a fim de liberarem NO de maneira controlada nas regiões tumorais, aumentando as concentrações de NO no sítio de ação, estimulando cascatas bioquímicas que promovem o efeito tumoricida.

Dentro dessa perspectiva, o grupo do Prof. Roberto Santana da Silva tem trabalhado desenvolvendo diferentes complexos nitrosilos de rutênio visando contribuir com a descrição dos processos fotoquímicos e eletroquímicos que são fundamentais para o controle da liberação de NO e para a modulação de diferentes processos bioquímicos (TFOUNI et al., 2005; DE LIMA et al., 2005; DE LIMA et al., 2006; SAUAIA et al., 2005; BONAVENTURA et al., 2004; BONAVENTURA et al., 2011; FERREIRA et al., 2005;

FEREZIN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004; FERREIRA et al., 2004; SAUAIA et al., 2003; SAUAIA; SILVA, 2003; TOGNILO et al., 2001).

Além disso, o grupo do Prof. Silva vem se destacando no desenvolvimento de complexos metálicos coordenados ao NO que atuam como fotossensibilizadores na TFD, como é o caso dos complexos nitrosilos de rutênio-ftalocianina (CARNEIRO et al, 2011; HEINRICH et al., 2014). Esse tipo de fotossensibilizador quando fotoestimulado é capaz de produzir ao mesmo tempo $^1\text{O}_2$ e NO provocando um efeito sinérgico no processo de morte celular potencializando a TFD.

1.7 Fotobiomodulação (PBM)

A fotobiomodulação (PBM), também conhecida como “*low level light therapy (LLLT)*” é a aplicação da luz geralmente utilizando lasers de baixa potência na região do vermelho ou do infravermelho próximo, entre 600 a 10000 nm, com uma irradiância entre 1,0 mW a 5,0 W.cm⁻². Ao contrário de outros procedimentos na medicina que utilizam laser, a PBM não é um mecanismo ablativo ou térmico, mas sim um mecanismo fotoquímico no qual a luz é absorvida e promove reações fotoquímicas, assim como ocorre em plantas durante a fotossíntese (HUANG et al., 2009).

O fenômeno foi observado pela primeira vez por Endre Mester na Universidade de Semmelweis na Hungria, Budapeste, em 1967 (MESTER; SZENDE; TOTA, 1967). Mester et al. (1967) conduzia um experimento para testar se a radiação do laser induzia células tumorais em camundongos. Para isso, raspou o pêlo das costas dos animais e dividiu-os em dois grupos, deixando um grupo sem irradiação e outro que recebeu irradiação de baixa potência em 694 nm. Foi observado, que o grupo que foi irradiado não desenvolveu o câncer, porém surpreendentemente teve o processo de crescimento dos pêlos de forma mais acelerada que o grupo que não recebeu irradiação. Esse procedimento foi chamado de “Bioestimulação a laser” (HUANG et al., 2009; HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

A partir disso, muitos ensaios clínicos de fase III envolvendo o uso da luz em diversas patologias tiveram resultados positivos como osteoartrite (BERTOLUCCI; GREY, 1995; OZDEMIR; BIRTANE; KOKINO, 2001), tendonopatias (BJORDAL; LOPES-MARTINS; IVERSEN, 2006; STERGIOULAS et al. 2008), feridas (CAETANO et al. 2009; GUPTA et al. 1998), dor nas costas (BASFORD et al. 1999), cervicalgia (CHOW; HELLER; BARNESLEY, 2006), fadiga muscular (LEAL JUNIOR et al. 2008), lesões nos nervos periféricos (ROCHKIND et al. 2007) e AVC (ZIVIN et al. 2009);

Atualmente, a PBM desempenha um papel importante em três principais áreas da medicina: (i) cicatrização de feridas, reparação de tecidos e prevenção da morte celular; (ii)

alívio da inflamação em doenças crônicas e lesões com dor e edema associados; (iii) alívio da dor neurogênica e alguns problemas neurológicos (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006)

Apesar de muitos relatos positivos em experimentos conduzidos “in vitro”, em modelos “in vivo” e em ensaios clínicos controlados randomizados, a PBM permanece controversa no uso terapêutico, uma vez que os mecanismos bioquímicos subjacentes aos efeitos positivos não são completamente entendidos.

Vários estudos mostram que a mitocôndria é a responsável pela resposta celular após a absorção de luz na região do infravermelho. Sabe-se que um dos principais mecanismos a nível celular envolvidos na PBM é a absorção de luz pelos componentes da cadeia respiratória da mitocôndria levando ao aumento de ATP (KARU, 1989). Estudos envolvendo irradiações em mitocôndrias isoladas de fígado de rato mostraram o aumento do potencial eletroquímico de prótons, aumentando o transporte de elétrons na cadeia respiratória, o que aumenta a síntese de ATP (PASSARELLA et al.1984), de RNA, de NADH, da síntese protéica e do consumo de oxigênio (GRECO et al. 1989) (Figura 1.21).

Figura 1.21 - Representação da cadeia respiratória mitocondrial que consiste em cinco complexos protéicos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo c redutase (complexo III), citocromo c oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V).

Fonte: HUANG et al., 2009.

Quando a luz incide sobre o tecido biológico ela pode ser absorvida por alguns cromóforos como hemoglobina, mioglobina, citocromo c oxidase (Cox), flavinas, flavoproteínas e porfirinas (KARU, 1999). Acredita-se que o citocromo c oxidase é o primeiro fotoceptor da luz quando as células são irradiadas na PBM (KARU; KOLYAKOV, 2005).

Normalmente o NO é produzido em condições de stress celular ou condições de hipóxia. Nesse caso, o NO é capaz de deslocar o oxigênio coordenando-se ao grupo heme presente no citocromo c oxidase inibindo a respiração mitocondrial (BROWN, 2001). Acredita-se que a PBM provoca a fotodissociação do NO que está coordenado ao grupo heme da Cox revertendo a inibição da respiração mitocondrial, permitindo assim um influxo imediato de oxigênio e a retomada da respiração, o que leva a liberação de NO para o meio intracelular e gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Figura 1.22) (LANE, 2006). Assim, o NO liberado pode provocar todos os efeitos biológicos já descritos anteriormente.

Figura 1.22 - Esquema representativo da PBM estimulando a fotodissociação do NO do grupo heme do citocromo c oxidase, permitindo a coordenação do oxigênio para retomar a respiração mitocondrial e liberando NO para o meio intracelular.

Fonte: HUANG et al., 2009.

Dessa forma, a PBM provoca a produção de ERO e ERN os quais induzem uma mudança no potencial redox celular provocando stress oxidativo que podem estimular a morte celular, mas podem também ativar mecanismos de defesa (ALEXANDRATOU et al., 2002; ZHANG et al. 2008; LAVI et al., 2003). Vários fatores de transcrição são regulados por alterações no estado redox na tentativa de recuperação celular, mas o mais importante é o

fator nuclear NF- κ B, que é fundamental para a transcrição de genes de reparo (CHEN et al., 2011).

Embora o mecanismo subjacente da PBM ainda não esteja completamente entendido, estudos “*in vitro*”, experimentos com animais e estudos clínicos indicam que a PBM quando administrado em baixas doses pode prevenir a apoptose, melhorar a proliferação e a migração celular em vários tipos de células como fibroblastos (LUBART et al. 1992)

Nesse sentido, torna-se extremamente controverso usar esse tipo de terapia no tratamento do câncer. Porém estudos prévios demonstraram que a manutenção de um nível de ATP suficientemente alto é necessária para indução eficiente da execução de etapas de apoptose após TFD (TSAI et al., 2015).

Estudos na literatura mostraram o efeito antitumoral da TFD mediada pelo FS éter monometílico de hematoporfirina em diferentes linhagens celulares de sarcoma. Os estudos tanto “*in vitro*” quanto em modelo de sarcoma de rato sugeriram que a morte celular ocorria por via de apoptose dependente de caspase-3, e que a manutenção de um nível de ATP suficientemente alto através de células tratadas com glicose aumentou a atividade da caspase-3 e aumentou a fragmentação nuclear após a TFD (ZENG et al., 2013; OBERDANNER et al., 2002).

Em estudos recentes no trabalho reportado por Tsai et al. (2015), encontrou-se que a TFD mediada por NPe6 combinada com a PBM em 810 nm levou a maior morte celular da linhagem de osteossarcoma humano MG-63 devido ao aumento de ATP e de internalização celular do FS provocado pela PBM.

Nesse sentido a PBM combinada com a TFD é outra estratégia para produzir ao mesmo tempo NO e $^1\text{O}_2$, produzindo efeito sinérgico para morte celular, além de proporcionar o alto nível de ATP para o processo apoptótico. Assim o uso da PBM para potencializar a TFD parece ser uma estratégia extremamente promissora que deve ser explorada para possível aplicação clínica.

2. HIPÓTESE

Uso de compostos de coordenação como estratégia de potencializar a TFD por sinergismo de múltiplos radicais produzidos a partir de processos fotoinduzidos.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho consiste em aprimorar a síntese de complexos de rutênio-ftalocianina, estudar seus aspectos químicos, fotoquímicos, fotofísicos e ainda avaliar os aspectos fotobiológicos, de modo a apresentar estratégias que possam promover o efeito

sinérgico da TFD fazendo uso desses complexos como fotossensibilizadores. Desta forma, o uso de outros radicais – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) – e da PBM serão abordados no intuito de potencializar a TFD.

3.1 Objetivos Específicos

Visando alcançar o objetivo geral descrito acima, constituíram-se objetivos específicos deste trabalho:

- Desenvolver estratégias sintéticas para a produção dos complexos de rutênio-ftalocianina apresentados neste trabalho: $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$ e $\text{trans-[Ru(NO)(Pc)(NO}_2\text{)]}$ (Figura 1.23).

Figura 1.23 - Estrutura química dos complexos rutênio-ftalocianina $\text{trans-[RuCl(Pc)(DMSO)]}$ e $\text{trans-[Ru(NO)(Pc)(NO}_2\text{)]}$.

Fonte: Autora.

- Caracterizar os complexos de rutênio-ftalocianina através de técnicas espectroscópicas, espectrometria de massas, eletroforese e condutividade;

- Investigar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos complexos sintetizados;

- Avaliar a produção de ERO, oxigênio singlete e NO em função de processos fotoquímicos e redutimétricos;

- Avaliar o efeito fotobiológico em diferentes linhagens de células cancerígenas (B16F10, A375, MCF7) e não-cancerígenas (L929, 3T3 e MCF10);

- Avaliar as vias bioquímicas envolvidas no processo de morte celular provocada pela fotoestimulação dos complexos sintetizados neste trabalho;
- Avaliar se a produção de NO e ERO a partir de um complexo de rutênio-ftalocianina doador de NO poderia promover um efeito sinérgico na morte celular de células tumorais.
- Avaliar o papel do NO nas vias bioquímicas ativadas pela TFD mediada pelo complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] e analisar como a produção de NO e ERO podem estimular o efeito sinérgico no processo de morte celular.
- Avaliar como a fotoestimulação em duplo comprimento de onda (PBM em 850 + TFD em 660 nm) poderia potencializar o efeito da TFD em células tumorais.

4. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

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.

ALAN NIEMIENS. Doenças, exames, procedimentos, medicamentos, notícias. Disponível em: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:IAf4_2usmJEJ:https://medsimples.com/cancer/+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em 29 Maio 2019.

ALBAIN, K. S.; SWANN, R. S.; RUSCH, V. W.; TURRISI, A. T.; SHEPHERD, F. A.; SMITH, C.; FRY, W. A. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 374, n. 9687, p. 379-386, 2009.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the cell**. 4ª Ed. New York and London: Garland Science, 2002. p. 401.

ALESSIO, E. Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective. **European journal of inorganic chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1549-1560, 2017.

ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; HANDRIS, P.; KLETSAS, D.; LOUKAS, S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 8, p. 547-552, 2002.

ALI, I.; WANI, W. A.; SALEEM, K.; HAQUE, A. Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 296-306, 2013.

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

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

ALLISON, R. R.; MANG, T. S.; WILSON, B. D. Photodynamic therapy for the treatment of nonmelanomatous cutaneous malignancies. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, p. 153-163, 1998.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 7, n. 2, p. 61-75, 2010.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; LAI, SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death, **International Journal of Molecular Science**, 16, 20523-20559, 2015.

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.

BARR, H.; KRASNER, N.; BOULOS, P. B.; CHATLANI, P.; BOWN, S. G. Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study. **British Journal of Surgery**, v. 77, n. 1, p. 93-96, 1990.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido Nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BARRY, N.P.E.; SADLER, P.J. Challenges for metals in medicine: how nanotechnology may help to shape the future. **ACS nano**, v. 7, n. 7, p. 5654-5659, 2013.

BARTELINK, H.; ROELOFSEN, F.; ESCHWEGE, F.; ROUGIER, P.; BOSSET, J. F.; GONZALEZ, D. G.; PIERART, M. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. **Journal of clinical oncology**, v. 15, n. 5, p. 2040-2049, 1997.

BASFORD, J. R.; SHEFFIELD, C. G.; HARMSSEN, W. S. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low-intensity Nd: YAG laser irradiation on musculoskeletal back pain. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 80, n. 6, p. 647-652, 1999.

BEATRIZ, A.; ALVES, W. A. **Série Química: Ciência e Tecnologia - Química supramolecular e nanotecnologia**. 1 ed. ATHENEU, 2014. cap. 20.

BERTOLUCCI, L. E.; GREY, T. Clinical analysis of mid-laser versus placebo treatment of arthralgic TMJ degenerative joints. **CRANIO®**, v. 13, n. 1, p. 26-29, 1995.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; IVERSEN, V. V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. **British journal of sports medicine**, v. 40, n. 1, p. 76-80, 2006.

BONASSA, E. M. A. **Enfermagem em quimioterapia**, São Paulo, Atheneu, 1998.

BONAVENTURA, D.; LIMA, R. G.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁺ channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **NO Life Sciences** (1973), v. 89, 595-602, 2011.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, V.; TOGNILO, 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.

BOWN, S. G.; ROGOWSKA, A. Z., WHITELAW, D. E., LEES, W. R., LOVAT, L. B., RIPLEY, P.; HATFIELD, A. W. R. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. **Gut**, v. 50, n. 4, p. 549-557, 2002.

BOYLE, R. W.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochemistry and photobiology**, v. 64, n. 3, p. 469-485, 1996.

BRAUN, A.E.; TCHERNIAC, J. "Phthalocyanines: Synthesis", v. 40, Ann. Ber., p. 2709-2718, 1907.

BROWN, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1504, n. 1, p. 46-57, 2001.

CAETANO, K. S.; FRADE, M. A. C.; MINATEL, D. G.; SANTANA, L. Á.; ENWEMEKA, C. S.. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 111-118, 2009.

CARNEIRO, Z. A; DE MORAES, J. C. B.; RODRIGUES, F. P.; DE LIMA, R. G.; CURTI, C.; DA ROCHA, Z. N.; DA SILVA, R. S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex—A system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 8, p. 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.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three — photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization

and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.

CELLI, J. P.; SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; EVANS, C. L.; SAMKOE, K. S.; VERMA, S.; HASAN, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chemical reviews**, v. 110, n. 5, p. 2795-2838, 2010.

CENTELLES, J.J.; ESTEBAN, C.; IMPERIAL S. Óxido nítrico: Un gás tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. **Âmbito Farmacêutico Bioquímica**, v. 23, n.11, p.96-102, 2004.

CHEN, A. C., ARANY, P. R., HUANG, Y. Y., TOMKINSON, E. M., SHARMA, S. K., KHARKWAL, G. B., SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, F. E.; BLACKWELL, T. S.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22453, 2011.

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.

CHOW, R. T.; HELLER, G. Z.; BARNESLEY, L. The effect of 300 mW, 830 nm laser on chronic neck pain: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Pain**, v. 124, n. 1-2, p. 201-210, 2006.

CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: from outstanding electronic properties to emerging applications. **The Chemical Record**, 8, 75–97, 2008.

CULOTTA, E.; KOSHLAND JUNIOR, D. E. NO news is good news. **Science**, v. 258, p. 1862-1865, 1992.

DA ROCHA, Z. N.; de LIMA, R. G.; DORO, F. G.; TFOUNI, E.; da SILVA, R. S. Photochemical production of nitric oxide from a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex by irradiation with light in the phototherapeutic window. **Inorganica Chemistry Communications**, v. 11, p. 7370, 2008.

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

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340-348, 1991.

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

DELANEY, T. F.; SINDELAR, W. F.; TOCHNER, Z.; SMITH, P. D.; FRIAUF, W. S.; THOMAS, G.; GLATSTEIN, E. Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 25, n. 3, p. 445-457, 1993.

DIAMOND, I.; MCDONAGH, A.; WILSON, C.; GRANELLI, S.; NIELSEN, S.; JAENICKE, R. Photodynamic therapy of malignant tumours. **The Lancet**, v. 300, n. 7788, p. 1175-1177, 1972.

DIESBACH, H.E.; WEID, E. Phthalocyanines: An X-Ray study. **Helvetica Chimica Acta**, v.10, p.886-896, 1927.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380, 2003.

DOUGHERTY, T. J. An update on photodynamic therapy applications. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 20, n. 1, p. 3-7, 2002.

DOUGHERTY, T. J.; LAWRENCE, G.; KAUFMAN, J. H.; BOYLE, D.; WEISHAUP, K. R.; GOLDFARB, A. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 62, n. 2, p. 231-237, 1979.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER CH. J.; HENDERSON B.W.; JORI G.; KESSEL D.; KORBELIK M.; MOAN J.; PENG Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institue**, v. 90, p. 889-905, 1998.

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., 1992. P. 1-15.

EVENSEN, J. F. The use of porphyrins and non-ionizing radiation for treatment of cancer. **Acta Oncologica**, v. 34, n. 8, p. 1103-1110, 1995.

EYLER, C. E.; WU, Q.; YAN, K.; MACSWORDS, J. M.; CHANDLER-MILITELLO, D.; MISURACA, K. L.; GOLDMAN, S.A. Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 53-66, 2011.

FDA (U.S. Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation and Research. Cysview NDA 22555 approval letter, 31 March 2010; Retrieved 5 January 2013. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2010/022555s000ltr.pdf>. Acesso em: 03 Junho 2019).

FDA (U.S. Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation and Research. Metvixia NDA 21-415 approval letter, 25 May 2004; Retrieved 5 January 5 2013. Disponível

em:<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/021415s000_Metvixia_Aprov.pdf> Acesso em 03 de Junho de 2019.

FDA (U.S. Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation and Research. Cisplatin NDA 018057 approval letter, 19 December 1978; Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=018057>> Acesso em 04 de Junho de 2019.

FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. The surprising life of Nitric Oxide. **Chemical & Engineering News**, v. 20, n. 51, p. 26-38, 1993.

FEREZIN, C. Z.; OLIVEIRA, F. S.; da SILVA, R.S.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L. M. The complex trans-[RuCl([15]aneN₄NO)]⁺² induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 3, 170-175, 2005.

FERREIRA, J. T.; PINA, J.; RIBEIRO, C.A.F.; FERNANDES, R.; TOMÉ, J. P. C.; RODRÍGUEZ-MORGADE, M. S.; TORRES, T.; PEG-containing ruthenium phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, characterization and in vitro evaluation, **Journal of Materials Chemistry B**, 5, 5862-5869, 2017.

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 (cyclen) 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., 1994. Cap. 8, p. 144-186

FINSEN, Niels. **Phototherapy**. Edward Arnold, 1901.

FITZPATRICK, T. B.; PATHAK, M. A. Part IV: Basic Considerations of the Psoralens: Historical Aspects of Methoxsalen and Other Furocoumarins. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 32, n. 2, p. 229-231, 1959.

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

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 6, p. 13-18, 2005.

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

FRANCO, L. P.; Acoplamento quantum dot/complexos nitrosilos de rutênio dem transferência eletrônica vetorial e em análise de imagem. Aspectos químicos e biológicos à produção de óxido nítrico. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, 2014.

FURRE, I. E.; SHAHZIDI, S.; LUKSIENE, Z.; MØLLER, M. T.; BORGES, E.; MORGAN, J.; PENG, Q. Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. **Cancer research**, v. 65, n. 23, p. 11051-11060, 2005.

GILES, N. M.; Kumari, S.; Gang, B. P.; Yuen, C. W.; Billaud, E. M.; Giles, G. I. The Molecular Design of S-Nitrosothiols as Photodynamic Agents for Controlled Nitric Oxide Release. **Chemical biology & drug design**, v. 80, n. 3, p. 471-478, 2012.

GOBO, N. R. S. Estratégias Sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas. Dissertação de Mestrado, São Carlos-SP: Universidade Federal de São Carlos, 173p, 2013.

GOMER, C. J.; DOIRON, D. R.; JESTER, J. V.; SZIRTH, B. C.; MURPHREE, A. L. Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy for the treatment of intraocular tumors: examination of acute normal ocular tissue toxicity. **Cancer research**, v. 43, n. 2, p. 721-727, 1983.

GONZALEZ, D. G.; PIERART, M. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. **Journal of clinical oncology**, v. 15, n. 5, p. 2040-2049, 1997.

GRECO, M.; GUIDA, G.; PERLINO, E.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 163, n. 3, p. 1428-1434, 1989.

GUPTA, A. K.; FILONENKO, N.; SALANSKY, N.; SAUDER, D. N. The use of low energy photon therapy (LEPT) in venous leg ulcers: a double-blind, placebo-controlled study. **Dermatologic surgery**, v. 24, n. 12, p. 1383-1386, 1998.

HAGE, R.; FERREIRA, J.; BAGNATO, V. S.; VOLLET-FILHO, J. D.; PLAPLER, H. Pharmacokinetics of photogem using fluorescence spectroscopy in dimethylhydrazine-induced murine colorectal carcinoma. **International Journal of Photoenergy**, v. 2012, 2012.

HALLE, M.; GABRIELSEN, A.; PAULSSON-BERNE, G.; GAHM, C.; AGARDH, H.; FARNEBO, F.; TORNVALL, P. Sustained Inflammation Due to NF-Kappa B Activation in Irradiated Human Arteries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, p. 1227, 2010.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. In: **Mechanisms for low-light therapy**. International Society for Optics and Photonics, v. 6140, p. 01, 2006.

HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. New trends in photobiology: On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-8, 1994.

HANACK, M.; KANG, Y-G. Synthesis and properties of aromatic amine-bridged PcRu(II) coordination compounds, **Synthetic Metals**, 48, 79-90, 1992.

HAUSMANN, W. Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. **Biochemie. Zeitung**, v.30, p. 276–316, 1911.

HAYATA, Y.; KATO, H.; KONAKA, C.; ONO, J.; TAKIZAWA, N. Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. **Chest**, v. 81, n. 3, p. 269-277, 1982.

HAYATA, Y.; KATO, H.; OKITSU, H.; KAWAGUCHI, M.; KONAKA, C. Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in cancer of the upper gastrointestinal tract. **Seminars in surgical oncology**, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1985. p. 1-11.

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.

HEINRICH, T. A.; TEDESCO, A. C.; FUKUTO, J. M.; DA SILVA, R. S. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex as a strategy for cancer treatment. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 10, p. 4021-4025, 2014.

HOSPITAL DO CANCER DE BARRETOS, 2012. Disponível em <<https://www.hcancerbarretos.com.br/82-institucional/noticias-institucional/368-cancer-uma-doenca-e-sua-historia>>. Acesso em: 06 Janeiro 2019.

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C. H.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-response**, v. 7, n. 4, p. 9-27, 2009.

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

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2018. Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em:< <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 05 Janeiro 2019.

JAMES, N. D.; HUSSAIN, S. A.; HALL, E.; JENKINS, P.; TREMLETT, J. RAWLINGS, C.; LEWIS, R. Radiotherapy with or without chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 16, p. 1477-1488, 2012.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin– DNA adducts. **Chemical reviews**, v. 99, n. 9, p. 2467-2498, 1999.

JHAM, B. C.; FREIRE, A. R. S. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 5, p. 704-708, 2006.

KAIZU, Y.; OHTA, H.; KOBAYASHI, K.; KOBAYASHI, H.; TAKUMA, K.; MATSUO, T. Lifetimes of the lowest excited state of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) and its amphipathic derivative in micellar systems, **Journal of Photochemistry**, 30, 93-103, 1985.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.

KARU, T.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 4, p. 355-361, 2005.

KARU, T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 3, n. 4, p. 638-638, 1989.

KATAOKA, H.; NISHIE, H.; HAYASHI, N.; TANAKA, M.; NOMOTO, A.; YANO, S.; JOH, T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 8, 2017.

KNOLL, J. D.; TURRO, C. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, 282–283, 110–126, 2015.

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.

KOSTOVA, I. Platinum Complexes as Anticancer Agents. **Recent Patentes of Anti-Cancer Drug Discovery**, v.1, p. 1-22, 2006.

KOSTRON, H.; GOMER, C. J.; SUTEDJA, T. G.; BRASSEUR, N.; HASAN, T.; FRITSCH, C.; MOAN, J. **Photodynamic therapy**. Royal Society of Chemistry, 2007.

LANE, N. Cell biology: power games. 2006.

LAVI, R., SHAINBERG, A., FRIEDMANN, H., SHNEYVAYS, V., RICKOVER, O., EICHLER, M., KAPLAN, D.; LUBART, R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 40917-40922, 2003.

LEAL JUNIOR, E. C. P.; LOPES-MARTINS, R. Á. B.; ROSSI, R. P.; DE MARCHI, T.; BARONI, B. M.; DE GODOI, V.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M.. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 41, n. 8, p. 572-577, 2009.

LEDO, E.; LEDO, A. Phototherapy, photochemotherapy, and photodynamic therapy: unapproved uses or indications. **Clinics in dermatology**, v. 18, n. 1, p. 77-86, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Principles of Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

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

LINSTEAD, R. P. 212. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1016-1, 1934.

LIPSON, RICHARD L.; BALDES, EDWARD J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **Archives of dermatology**, v. 82, n. 4, p. 508-516, 1960.

LIPSON, RICHARD L.; BALDES, EDWARD J.; OLSEN, ARTHUR M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 1961.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIEDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 12, n. 3, p. 305-310, 1992.

LUI, H.; HOBBS, L.; TOPE, W. D.; LEE, P. K.; ELMETS, C.; PROVOST, N.; HAMZAVI, I. Photodynamic Therapy of Multiple Nonmelanoma Skin Cancers With Verteporfin and Red Light-Emitting Diodes: Two-Year Results Evaluating Tumor Response and Cosmetic Outcomes. **Archives of dermatology**, v. 140, n. 1, p. 26-32, 2004.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 71-79, 2013.

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.

MAHESWARI, P. U.; PALANIANDAVAR, M. DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium (II) complexes of modified 1, 10-phenanthrolines—effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 219-230, 2004.

MARI, C.; PIERROZ, V.; FERRARI, S.; GASSER, G. Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy, **Chemical Sciences**, 6, 2660-2686, 2015.

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

MCBRIDE, G. Studies expand potential uses of photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 23, p. 1740-1742, 2002.

MCCAUGHAN J. S.; HICKS, W.; LAUFMAN, L.; MAY, E.; ROACH, R. Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy. **Cancer**, v. 54, n. 12, p. 2905-2910, 1984.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Human reproduction update**, v. 7, n. 6, p. 535-543, 2001.

MESTER, E.; MESTER, E.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. (1967). Effect of laser on hair growth of mice. *Kiserl Orvostud*, 19, 628-631. Effect of laser on hair growth of mice. **Kiserl Orvostud**, v. 19, p. 628-631, 1967.

MEYER-BETZ, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. **Deutsches Archiv für klinische Medizin**, v. 112, p. 476-503, 1913.

MIRANDA, K. M., ESPEY, M. G., JOURD'HEUIL, D., GRISHAM, M. B., FUKUTO, J. M., FEELISCH, M., & WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide. In: **Nitric Oxide**. Academic Press, p. 41-55, 2000.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.

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 pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109, 1991.

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. **Annales pharmaceutiques francaises**, p. 286-295, Elsevier Masson, 2011.

MONRO, S.; COLÓN, K. L.; YIN, H.; ROQUE III, J.; KONDA, P.; GUJAR, S.; MCFARLAND, S. A. Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: Challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433. **Chemical reviews**, v. 119, n. 2, p. 797-828, 2018.

MONRO, S.; COLÓN, K.T.; YIN, H.; ROQUE, J.; KONDA, P.; GUJAR, S.; THUMMEL, R. P.; LILGE, L.; CAMERON, C. G.; McFarland, S. Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: Challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433. **Chemical reviews**, v. 119, n. 2, p. 797-828, 2018.

MORAES, R. S. Síntese e caracterização de ligantes binucleantes derivados da isoniazida e seus complexos binucleares de cobre(II). 2011. Dissertação de Mestrado. Pontífice Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

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

OBERDANNER, C. B.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Glucose is Required to Maintain High ATP-levels for the Energy-utilizing Steps During PDT-induced Apoptosis. **Photochemistry and photobiology**, v. 76, n. 6, p. 695-703, 2002.

OCHSNER, M. Light 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.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKOL, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA, F.S.; TOGNIOLO, 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.

ORMOND, A.; FREEMAN, H. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 1999.

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

OZDEMIR, F.; BIRTANE, M.; KOKINO, S. The clinical efficacy of low-power laser therapy on pain and function in cervical osteoarthritis. **Clinical rheumatology**, v. 20, n. 3, p. 181-184, 2001.

PANDEY, R. K.; HERMAN, C. K. Shedding some light on tumours. **Chemistry and industry**, n. 18, p. 739-43, 1998.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS letters**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.

PATRICE, T. (Ed.). **Photodynamic therapy**. Royal Society of Chemistry, 2003.

PENG, Q.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; NESLAND, J. M. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. **Photochemistry and photobiology**, v. 65, n. 2, p. 235-251, 1997.

PRIME, J. Les accidents toxiques par l'eosinate de sodium. Jouve and Boyer, Paris, 1900.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

RAAB, O. Über die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. **Zeitschrift für Biologie**, v. 39, p. 524-546, 1900.

RAPOZZI, V.; DELLA PIETRA, E.; BONAVIDA, B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. **Redox biology**, v. 6, p. 311-317, 2015.

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.

RIDNOUR, L. A.; THOMAS, D. D.; DONZELLI, S.; ESPEY, M. G.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A.; ISENBERG, J. S. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. **Antioxidant & Redox Signaling** v. 8, p. 1329-1337, 2006.

RIDNOUR, L. A.; THOMAS, D. D.; SWITZER, C.; FLORES-SANTANA, W.; ISENBERG, J. S.; AMBS, S.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 73-76, 2008.

ROBERTSON, C. A.; HAWKINS, D. E.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 96, 1-8, 2009.

- 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.
- ROCHKIND, S., LEIDER-TREJO, L., NISSAN, M., SHAMIR, M. H., KHARENKO, O., ALON, M. Efficacy of 780-nm laser phototherapy on peripheral nerve regeneration after neurotube reconstruction procedure (double-blind randomized study). **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 3, p. 137-143, 2007.
- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.
- RUBBO, H.; RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26066-26075, 1994.
- SALMON, R. J.; LEVY, C.; PLANCHER, C.; DORVAL, T.; DESJARDINS, L.; LEYVRAZI, S.; ASSELAIN, B. Treatment of liver metastases from uveal melanoma by combined surgery—chemotherapy. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 24, n. 2, p. 127-130, 1998.
- SANDEMAN, D. R. Photodynamic therapy in the management of malignant gliomas: a review. **Lasers in Medical Science**, v. 1, n. 3, p. 163-174, 1986.
- SANTORO, O.; BANDIERAMONTE, G.; MELLONI, E.; MARCHESINI, R.; ZUNINO, F.; LEPERA, P.; DE PALO, G. Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonate tetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinomas. **Cancer research**, v. 50, n. 15, p. 4501-4503, 1990.
- SANTOS, A. F. D.; LABRIOLA, L.; ALMEIDA, D. R. Q. D.; TERRA, L. F.; BAPTISTA, M. D. S. Photodynamic therapy in cancer treatment—an update review. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 5, p. 1-20 art. 25, 2019.
- 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.
- SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, p. 254-9, 2003.
- 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.
- SCHATZSCHNEIDER, U.; NIESEL, J.; OTT, I.; GUST, R.; ALBORZINIA, H.; WÖLFL, S. Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Metabolic Profiling of Human Cancer Cells Treated with Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes [Ru(bpy)₂(N-N)]Cl₂ with N-N=bpy, phen, dpq, dppz, and dppn. **ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery**, v. 3, n. 7, p. 1104-1109, 2008.
- SCHMITT, F.; GOVINDASWAMY, P.; SÜSS-FINK, G.; ANG, W.H.; DYSON, P. J.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; THERRIEN, B.; Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer, **Journal of Medicinal Chemistry**, 51(6), 1811–1816, 2008.

SCHWARTZ, S.; ABSOLON, K.; VERMUND, H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. **Univ. Minn. Med. Bull.**, v. 27, p. 7-8, 1955.

SCHWEITZER, V. G. Photodynamic therapy for treatment of head and neck cancer. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 102, n. 3, p. 225-232, 1990.

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

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. *Química Inorgânica*, (2003).

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.

SIKORA, A. G.; GELBARD, A.; DAVIES, M. A.; SANO, D.; EKMEKCIOGLU, S.; KWON, J.; OVERWIJK, W. W. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 6, p. 1834-1844, 2010.

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.

SMITH, C.; FRY, W. A. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 374, n. 9687, p. 379-386, 2009.

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

STABLES, G. I.; ASH, D. V. Photodynamic therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 21, n. 4, p. 311-323, 1995.

STADLER, J.; TROCKFELD, J.; SCHMALIX, W. A.; BRILL, T.; SIEWERT, J. R.; GREIM, H.; DOEHMER, J. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 9, p. 3559-3563, 1994.

STEEL, G. G.; PECKHAM, M. J. Exploitable mechanisms in combined radiotherapychemotherapy: the concept of additivity. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 5, n. 1, p. 85-91, 1979.

STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. **The American journal of sports medicine**, v. 36, n. 5, p. 881-887, 2008.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.

STEWART, B.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **World**, 2016.

STOCHEL, G.; Stasicka, Z.; Brindell, M.; Macyk, W.; Szacilowski, K. **Bioinorganic photochemistry**. John Wiley & Sons, 2009.

- STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and metal complexes in medicine. **Coordination Chemical Review**, v. 171, 203-20, 1998.
- STORR, T.; THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 6, p. 534-544, 2006.
- SZCEPURA, L.F.; TAKEUCHI, K.J. Synthesis and characterization of novel (cyclopentadienyl) nitroruthenium complexes. **Inorganic chemistry**, v. 29, p. 1772, 1990.
- 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.; 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.
- THANGAVEL, P.; VISWANATH, B.; KIM S. Recent developments in the nanostructured materials functionalized with ruthenium complexes for targeted drug delivery to tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2749-2759, 2017.
- THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 936-939, 2003.
- TOGNILOLO, 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.
- TOMATIS, Lorenzo. Cancer: causes occurrence and control. **IARC Scientific publications**, 1990.
- TRINDADE, F. Z.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E.; DE SOUZA COSTA, C. A. Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem®: An in vivo study. **Lasers in medical science**, v. 27, n. 2, p. 403-411, 2012.
- TSAI, S. R.; YIN, R.; HUANG, Y. Y.; SHEU, B. C.; LEE, S. C.; HAMBLIN, M. R. Low-level light therapy potentiates NPe6-mediated photodynamic therapy in a human osteosarcoma cell line via increased ATP. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 12, n. 1, p. 123-130, 2015.
- VAN RIJT, S. H.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug discovery today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009.
- VAN STRATEN, D.; MASHAYEKHI, V.; DE BRUIJN, H.; OLIVEIRA, S.; ROBINSON, D. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.
- VON TAPPEINER, H. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. **Münchener medizinische Wochenschrift**, v. 1, p. 2042-2044, 1903.
- VON TAPPEINER, H.; JODLBAUER, A. Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung: aus dem pharmakologischen. Institute der K. Universität München. Verlag von FCW Vogel, 1907.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic therapy-from dyestuffs to high-tech clinical practice. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, v. 34, p. 95-109, 2004.

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

WHO (World Health Organization), 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 06 Janeiro 2019.

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.

YURT, F.; INCE, M.; COLAK, S. G.; OCAKOGLU, K.; ER, O.; SOYLU, H. M.; GUNDUZ, C.; AVCI, C. B.; KURT, C. C. Investigation of in vitro PDT activities of zinc phthalocyanine immobilised TiO₂ nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics** 524, 467-474, 2017.

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

ZENG, H.; SUN, M.; ZHOU, C.; YIN, F.; WANG, Z.; HUA, Y.; CAI, Z. Hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy selectively kills sarcomas by inducing apoptosis. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77727, 2013.

ZHANG, J.; XING, D.; GAO, X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. **Journal of cellular physiology**, v. 217, n. 2, p. 518-528, 2008.

ZHOU, Y.; LIANG, X.; DAI, Z. Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics, **Nanoscale**, 8, 12394-12405, 2016.

ZIVIN, J. A.; ALBERS, G. W.; BORNSTEIN, N.; CHIPPENDALE, T.; DAHLOF, B.; DEVLIN, T.; FISHER, M.; HACKE, W.; HOLT, W.; ILIC, S.; KASNER, S.; LEW, R.; NASH, M.; PEREZ, J.; RYMER, M.; SCHELLINGER, P.; SCHNEIDER, D.; SCHWAB, S.; VELTKAMP, R.; WALKER, M.; STREETER, J. Effectiveness and safety of transcranial laser therapy for acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 40, n. 4, p. 1359-1364, 2009.

Capítulo 2

Síntese e caracterização de complexos

rutênio-ftalocianina

1. INTRODUÇÃO

O uso de metais de transição com aplicação terapêutica encontra relatos que data o antigo Egito (THOMPSON; ORVIG, 2003). No entanto, somente a partir de 1965, com a descoberta da cisplatina (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965), houve um desenvolvimento sistematizado da aplicação clínica de compostos de coordenação, principalmente relacionado ao tratamento de câncer. Neste contexto, talvez a técnica que menos tenha alcançado aplicação terapêutica esteja relacionada à TFD. Essencialmente a TFD envolve uso de fotossensibilizador, oxigênio e irradiação luminosa. Embora compostos de coordenação sejam considerados uma classe de fármacos amplamente utilizados em clínica médica (ex: complexos derivados de platina contra câncer), seu uso como FS não tem sido aplicado em experimentos fotobiológicos. Dentre as várias possibilidades, as ftalocianinas parecem compostos adequados para este fim e exploração. As metaloftalocianinas têm atraído atenção como potenciais fotossensibilizadores na TFD devido às suas características físico-químicas, e por apresentarem alta absorvidade na região da janela terapêutica (THOMAS, 1990). Dentre as várias possibilidades do uso de metaloftalocianinas como FS, os compostos contendo rutênio, parecem ser *sui generis*. O metal de transição rutênio tem uma química rica e variada, apresentando diferentes estados de oxidação e podendo se coordenar a diferentes ligantes, formando complexos com alta estabilidade (WILKINSON; GILLARD; MCCLEVERTY, 1987; MCCLEVERTY; MEYER, 2004). Neste contexto, tornou-se extremamente relevante o desenvolvimento de complexos de rutênio-ftalocianina como novos fotossensibilizadores na TFD para o tratamento do câncer.

A primeira síntese do complexo de rutênio-ftalocianina foi descrita por Krueger e Kenney, em 1963. Consiste na reação entre RuCl_3 e 2-cianobenzamida, através do método de fusão na ausência de solvente, formando o produto denominado pelos autores de “RuPc crude” (KRUEGER; KENNEY, 1963). O termo “RuPc crude” se refere a uma mistura de rutênio-ftalocianina com diferentes ligantes axiais. Hanack e Kobel (1986) descreveram a síntese do complexo rutênio-ftalocianina a partir da reação entre $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e ftalonitrilo, na presença de uma base, obtendo como produto final também o “RuPc crude” (KOBEL; HANACK, 1986).

Atualmente, diferentes estratégias são descritas na literatura para a produção de rutênio-ftalocianina com diferentes ligantes axiais e estados de oxidação do rutênio (RAWLING; MCDONAGH, 2007). Porém, o método sintético mais utilizado é a reação de ciclotetramerização, a qual consiste na reação do $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ com diferentes precursores como 1,2-dicianobenzeno, 2-cianobenzamida e anidrido ftálico.

Embora várias metodologias sintéticas sejam relatadas para esses complexos, ainda é um grande desafio a síntese de um complexo de rutênio-ftalocianina com alto rendimento e alto grau de pureza. Nesse sentido, este trabalho visa apresentar uma nova rota sintética para o complexo rutênio-ftalocianina *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e partir dele produzir o complexo nitrosilo de rutênio-ftalocianina, *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]. Portanto, neste capítulo serão abordados e discutidos aspectos da nova rota sintética proposta, bem como a caracterização química desses complexos através de técnicas espectroscópicas na região do UV-Visível (UV-Vis), infravermelho (IV), infravermelho distante (FIR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia paramagnética eletrônica (EPR), espectrometria de massas, eletroforese em gel de agarose e condutividade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados para síntese, caracterização e análises químicas.

(continua)

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Ácido nítrico	Synth®
Ácido sulfúrico	Synth®
Acetona	Synth®
1,2-dicianobenzeno	Sigma-Aldrich®
Cloreto de rutênio (III) - (RuCl ₃ .3H ₂ O)	Sigma-Aldrich®
Clorofórmio (CHCl ₃)	Synth®
Cobre metálico (Cu ⁰)	-----
1,8-Diazobiciclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU)	Sigma-Aldrich®
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	Sigma-Aldrich®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth®
Etanol	Synth®
Éter etílico	Synth®
Ftalocianina de base livre (H ₂ Pc)	Sigma-Aldrich®

(conclusão)	
REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich®
Pentanol	Synth®
Metanol (CH ₃ OH)	Synth®
Sílica Flash (SiO ₂)	Sigma-Aldrich®
Sulfato de Sódio (Na ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich®
Tolueno	Sigma-Aldrich®

2.2 Sínteses

2.2.1 Síntese do complexo *cis*-diclorotetrakis(dimetilsulfóxido)rutênio(II)

cis-[RuCl₂(DMSO)₄]

A síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] foi realizada de acordo com Evans et al. (1973). Em um balão de 50 mL adicionou-se 10 mL de DMSO e deixou-se sob atmosfera de argônio por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se RuCl₃.nH₂O (1,4600 g, 5,60 mmol) e deixou-se sob refluxo por 5 minutos após atingir a temperatura de 140 °C, protegendo da luz. A coloração passou rapidamente de marrom para amarelo-alaranjado. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o balão foi colocado em banho de gelo havendo a precipitação do complexo. O sólido amarelo foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico e acetona, obtendo-se cristais amarelos do complexo desejado. Rendimento: 97%

2.2.2 Síntese do complexo rutênio (III)-ftalocianina *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)]

A síntese do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] foi realizada baseada no método sintético desenvolvido neste trabalho, a qual teve a patente depositada recentemente por esta autora (BR 10 2016 004732-3). Em um balão de 3 bocas foi adicionado 10 mL de pentanol previamente destilado e seco em peneira molecular. Adicionou-se 0,1984 g (0,41 mmol) de *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] e esperou-se por 30 minutos até a temperatura atingir 80 °C e a coloração passar de amarelo para laranja-avermelhado. Adicionou-se 0,3149 g (2,46 mmol) de 1,2 - dicianobenzeno e 0,50 mL de 1,8-Diazobiciclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU). Deixou-se sob atmosfera de argônio e refluxo a 140 °C por 24 horas. Após o término da reação, adicionou-se metanol e rotaevaporou-se até a secura. Extraíu-se com tolueno:água por três vezes. A fase orgânica foi coletada, seca por rotaevaporação e o produto foi submetido à coluna cromatográfica de sílica flash, utilizando-se a fase móvel diclorometano:metanol

(10:1). O complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] isolado tem coloração azul e foi caracterizado por espectroscopia de absorção no UV-Vis e no infravermelho, espectroscopia de ressonância nuclear magnética, espectroscopia paramagnética nuclear e espectrometria de massas. Rendimento: 65%

2.2.3 Síntese do complexo nitrosilo de rutênio-ftalocianina *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]

Para a formação do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] foi utilizado um sistema acoplado com três balões reacionais interligados (balão 1: de 50 mL e duas bocas; balão 2: de 50 mL e duas bocas; e balão 3: de 100 mL e 3 bocas). No balão 1, adicionou-se 50 mL de uma solução 50% de HNO₃ (25 mL HNO₃ + 25 mL H₂O). No balão 2, adicionou-se 25 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio concentrado (NaOH). No balão 3, adicionou-se 0,1000 g (0,16 mmol) do precursor *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e 32 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. Em seguida, foram adicionadas 3 pastilhas de cobre (Cu⁰) no balão 1. Houve a formação de um gás marrom referente à formação de NO e NO₂, produtos da reação entre o Cu⁰ e o HNO₃. Esses gases foram então borbulhados no balão 2, onde o NO₂ é retido e o NO é então borbulhado no balão 3, coordenando-se ao precursor *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], para a formação do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]. Ao término da produção de gás, os balões são desconectados e imediatamente tampados. A solução do balão 3 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 obtendo-se o produto. Rendimento: 90%.

2.3 Equipamentos

2.3.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A caracterização dos compostos por espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis) foi realizada em um espectrofotômetro Agilent modelo 8453 e Hitachi modelo U-3501, com varredura na região de 200 a 800 nm. Utilizou-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As análises dos compostos por espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas em um espectrofotômetro IR modelo Prestige 21 da Shimadzu. Os parâmetros

utilizados foram resolução de 4 cm^{-1} , 32 scans, região de 400 a 4000 cm^{-1} . As amostras foram analisadas em estado sólido, utilizando-se como agente dispersante pastilhas de Brometo de Potássio (KBr).

2.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho distante (FIR)

As análises dos compostos por espectroscopia na região do infravermelho distante (FIR) foram realizadas em um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON FT-102 na região compreendida 200 a 4000 cm^{-1} . As amostras foram analisadas em estado sólido, utilizando-se como agente dispersante pastilhas de Iodeto de Césio (CsI). As análises foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos, no laboratório do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista.

2.3.4 Espectrometria de Massas

Os complexos de rutênio foram analisados por espectrometria de massas no equipamento MALDI-TOF/TOF Ultraflex extreme (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. As voltagens de IS1 e IS2 aplicadas foram de 20 kV e 18,05 kV, respectivamente. O modo refletor foi utilizado, sendo aplicada a 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.

2.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Registrou-se o espectro de RMN do composto *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] em um Espectrômetro BRUKER® Avance III 400 a 400,15 Hz, utilizando CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna. As amostras foram preparadas dissolvendo 0,0050 g de composto em 0,5 mL do solvente apropriado.

2.3.6 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado na concentração de 0,8% em tampão TAE 0,01 M (pH = 8,00), com 10 poços de espessura de 1,0 mm. O gel foi colocado na cuba eletroforética e coberto com o tampão TAE 0,01 M (pH = 8,00). As amostras foram preparadas para um total de 15 µL por poço, de modo que cada amostra continha 11 µL do complexo em estudo em 1% de DMSO + 4 µL de glicerol 50%. A corrida eletroforética ocorreu em

aproximadamente uma hora e os parâmetros da fonte BIO-RAD (amperagem, voltagem e potência) foram ajustados conforme protocolo experimental (100,0 V; 0,07 A e 7,0 W).

2.3.7 Condutividade

A medida da condutividade molar de diferentes compostos foi realizada utilizando o condutivímetro HMCDB-150 (Highmed) em diferentes concentrações e solventes relacionados na tabela 2.8 apresentada em Resultados e Discussões.

2.3.8 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica foi realizada em onda contínua, a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) em um espectrômetro Jeol JES-FA200 operando em banda-X (9,4 GHz). Soluções contendo complexos de rutênio-ftalocianina foram analisadas em tubos capilares específicos para EPR. Todos os espectros de EPR foram registrados com os seguintes parâmetros experimentais: faixa de campo de 100 G, tempo de varredura igual a 4 minutos, frequência de microondas de 9,4 GHz, frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 100 kHz e potência de microondas de 10 mW. Os espectros de EPR foram processados utilizando o software OriginPro8.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de metaloftalocianinas na TFD vem ganhando importância como uma nova classe de fotossensibilizadores uma vez que há uma infinidade de centros metálicos com que se pode trabalhar dependendo da finalidade terapêutica. Complexos de rutênio-ftalocianinas têm se mostrado promissores devido ao efeito nefelauxético do rutênio, o que permite com que o rutênio realize até seis ligações e apresente diferentes estados de oxidação, podendo se coordenar a diferentes ligantes axiais.

A maior dificuldade da síntese de rutênio-ftalocianinas é a formação de subprodutos, a purificação e o baixo rendimento. Neste trabalho foi proposta uma nova rota sintética para um complexo de rutênio-ftalocianina tendo como precursor o complexo *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄], o que propiciou uma síntese partindo-se de Ru⁺² com menor formação de subprodutos, menos etapas de purificação e maior rendimento. Nessa síntese poderia se esperar várias possibilidades de ligantes axiais no complexo de rutênio-ftalocianina como produto final, sendo elas:

Como foi mostrado nos resultados de espectroscopia de UV-Visível e IR, o complexo de rutênio-ftalocianina apresentou propriedades eletrônicas condizentes com as características específicas de ftalocianinas que possuem rutênio no centro metálico. Devido à inserção do rutênio no anel macrocíclico, foi observado o deslocamento hipsocrômico no espectro de absorção do complexo, com banda B em $\lambda = 310 \text{ nm}$ ($\epsilon = 2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e banda Q em $\lambda = 642 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), quando foi comparado ao espectro de absorção da ftalocianina de base livre (banda B em $\lambda = 430 \text{ nm}$ e duas bandas Q em $\lambda = 747 \text{ nm}$ e $\lambda = 793 \text{ nm}$). Ainda no espectro de IR, bandas referentes ao estiramento δ (N-H) em 3287 cm^{-1} e 1005 cm^{-1} devido à protonação do anel macrocíclico quando este se encontra desmetalado, como no caso da H_2Pc , desapareceram no espectro de IR do complexo coordenado ao rutênio. O estudo através do infravermelho distante nos deu indícios de que o rutênio se apresentou coordenado ao DMSO com bandas em 420 cm^{-1} atribuída ao δ_s (CSO) e em 396 cm^{-1} atribuída ao δ_{ass} (CSO). Ainda uma banda em 295 cm^{-1} referente ao ν_{ass} (Ru-Cl) nos deu indícios de que o rutênio esteja coordenado com o cloreto.

O espectro de massas mostrou o íon molecular com relação m/z em 614,088, o qual é condizente com o $[\text{Ru}(\text{Pc})]^+$, cuja Massa Molecular é 614,05 g/mol e, ainda, apresentou o padrão isotópico característico de rutênio. Analisando a distribuição isotópica foi possível observar a diferença +1 entre os fragmentos dos isótopos, o que deu indícios do estado de oxidação +3 para o rutênio.

O espectro de RMN mostrou os sinais correspondentes aos hidrogênios α aromáticos em $\delta = 9,25 \text{ ppm}$ e hidrogênios β -pirrólicos $\delta = 7,95 \text{ ppm}$, ambos na forma de duplo dubletos e com intensidade relativa a 8 prótons cada, o que é condizente com a estrutura da molécula proposta. Apresentou ainda, o sinal em $\delta = -1,05 \text{ ppm}$ que de acordo com a literatura pode ser atribuído ao DMSO coordenado axialmente ao rutênio.

O estudo de EPR, de eletroforese e de condutividade foram fundamentais para a elucidação da estrutura do complexo. O resultado do EPR mostrou a presença do metal paramagnético, confirmando o estado de oxidação +3 para o rutênio. Isso, somado aos resultados de eletroforese e condutividade, que mostraram carga neutra para o complexo, nos norteou a concluir que a única possibilidade para o complexo formado nessa síntese seria o complexo *trans*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{Pc})(\text{DMSO})]$.

A síntese do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] se deu através coordenação do NO no precursor *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], através da produção do gás NO e um sistema de borbulhamento realizado em nosso laboratório. O complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] foi caracterizado por UV-Vis, apresentando apresentando banda B e banda Q em $\lambda = 350$ nm ($\epsilon = 2,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e $\lambda = 678$ nm ($\epsilon = 2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), respectivamente. Comparando-o ao complexo precursor, *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], apresentou um deslocamento batocrômico devido ao caráter π receptor dos ligantes axiais NO⁺ e NO₂⁻. O espectro de IV para o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] além de ter apresentado as bandas de estiramento dos grupos isoindol e pirrol, referentes ao anel macrocíclico de rutênio-ftalocianina, apresentou bandas de alta intensidade dos ligantes axiais NO⁺ em 1890 cm⁻¹ e NO₂⁻ em 1668 e 1381 cm⁻¹, confirmando a formação do complexo nitrosil de rutênio-ftalocianina.

Dessa forma, os complexos de rutênio ftalocianina, *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], propostos neste trabalho, foram sintetizados e suas estruturas foram confirmadas pelas diferentes técnicas analíticas descritas neste capítulo. Nos próximos capítulos serão discutidas propriedades fotoquímicas e fotofísicas desses complexos bem como estudos fotobiológicos na aplicação desses complexos na TFD para diferentes linhagens tumorais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, N.; YADAVA, S. Some novel manganese (III) porphyrins with catalytic properties. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 71, n. 19, p. 3090-3098, 2018.
- BASSO, L. G. M. Interação de Fármacos Anti-Malária com modelos de membrana. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2009.
- CARLIN, R. L. Inorganic electronic spectroscopy (Lever, A. B. P.). **Journal of Chemical Education**, v. 46, n. 9, 1969, p. A628.
- CARNEIRO, Z. A. Fotocitotoxicidade provenientes do sinergismo de oxigênio singlete e óxido nítrico gerado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)(ftalocianina)]. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.
- CARNEIRO, Z. A.; DE MORAES, J. C. B.; RODRIGUES, F. P.; DE LIMA, R. G.; CURTI, C.; DA ROCHA, Z. N.; DA SILVA, R. S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex—A system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 8, p. 1035-1043, 2011.
- CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. **The Chemical Record**, v. 8, n. 2, p. 75-97, 2008.

COSTA FILHO, A. J. Interações magnéticas em sais de (Cobre-Dipeptídeos) Cu^{2+} : Gly-Trp e Cu^{2+} : Trp-Gly. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 1997.

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 Communications**, v. 11, p. 7370, 2008.

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 Communications**, v. 11, p. 7370, 2008.

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.

DUDNIK, A. S.; IVANOV, A. V.; TOMILOVA, L. G.; ZEFIROV, N. S. Synthesis and Study of Ruthenium Phthalocyanine Complexes. **Russian Journal of Coordination Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 110-14, 2004.

E. BOSSARD, G.; J. ABRAMS, M.; C. DARKES, M.; F. VOLLANO, J.; C. BROOKS, R. Convenient synthesis of water soluble, isomerically pure ruthenium phthalocyanine complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 1524-1527, 1995.

EVANS, I. P.; SPENCER, A.; WILKINSON, G. Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 2, p. 204-09, 1973.

FARRELL, N. P.; MURRAY, A. J.; THORNBACKE, J. R.; DOLPHIN, D. H.; JAMES, B. R. Phthalocyanine complexes of ruthenium (II). **Inorganica Chimica Acta**, v. 28, p. L144-L146, 1978.

GOBO, N. R. S. Estratégias Sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 173p, 2013.

GORBUNOVA, Y. G.; ENAKIEVA, Y. Y.; SAKHAROV, S. G.; TSIVADZE, A. Y. Synthesis and spectral properties of ruthenium (II) complexes with tetra-15-crown-5-phthalocyanine and N-donor ligands. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 7, n. 12, p. 795-800, 2003.

GORELSKY, S. I.; DA SILVA, S.C.; LEVER A.B.P.; FRANCO, D.W. Electronic spectra of trans- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})\text{NO}]^{3+/2+}$ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 300, p. 698, 2000.

GRISHIN, I. D. MALDI TOF mass spectrometry for the investigation of the structure of ruthenium carborane complexes, **Journal of Analytical Chemistry**, 68(13), 1123-1129, 2013.

HANACK, M.; KANG, YG. Synthesis and Properties of (Phthalocyaninato) ruthenium (II) with Bisaxially Coordinated Azanaphthalenes. **Chemische Berichte**, v. 124, n. 7, p. 1607-1612, 1991.

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.

KHAN, M. T.; SRINIVAS, D.; KURESHY, R. I.; KHAN, N. H. Synthesis, characterization, and EPR studies of stable ruthenium (III) Schiff base chloro and carbonyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2320-2326, 1990.

KOBEL, W.; HANACK, M. Bis axially coordinated (phthalocyaninato) ruthenium (II) compounds. **Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 103-107, 1986.

KOZLOWSKI, P. M.; KUTA, J.; OHTA, T.; 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, n. 4, p. 744-50, 2006.

KRUEGER, P. C.; KENNEY, M. E. Phthalocyaninoruthenium derivatives. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 303-304, 1963.

LEDSON, D. L.; TWIGG, M. V. Acid-base behaviour of phthalocyanine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 13, p. 43-46, 1975.

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

LEVER, A. B. P.; PICKENS, S. R.; MINOR, P. C.; LICOCCHIA, S.; RAMASWAMY, B. S.; MAGNELL, K. Charge-transfer spectra of metallophthalocyanines: correlation with electrode potentials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 23, p. 6800-06, 1981.

LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. **Phthalocyanines: Properties and Applications**, New York: VCH Publishers, v.1, 1989, p.436.

LIU, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; JIANG, J. Theoretical investigation of the molecular, electronic structures and vibrational spectra of a series of first transition metal phthalocyanines. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 67, n. 5, p. 1232-46, 2007.

MARTINS, T. J. Complexos rutênio-ftalocianinas como candidatos a fotossensibilizadores: estudos fotoquímicos, fotofísicos, fotobiológicos e avaliação do efeito “teranóstico” da interação com pontos quânticos. Tese (Doutorado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2017.

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

MCCLEVERTY, J. A.; MEYER, T. J. **Comprehensive Coordination Chemistry II: From biology to nanotechnology**, Elsevier Ltd., Oxford, v. 5, 2004.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, 2006.

NASCIMENTO, F. B. Síntese e caracterização de ftalocianinas ligadas ao ácido láctico e ao ácido glicólico: potencial aplicação como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. Tese de Doutorado, Santo André-SP: Universidade Federal do ABC, 176p, 2016.

National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67685&Mask=200#Mass-Spec>> Acesso em: 13 de Junho de 2019.

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

NEGRI, L. B.; MARTINS, T. J. SILVA, R. S. **Processo de obtenção de ftalocianinas substituídas e seus usos**. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201600473, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

NEGRI, L. B.; MARTINS, T. J.; GOBO, N.R.S; DE OLIVEIRA, K. T.; HAMBLIN, M. R.; da Silva, R. S. Design, synthesis and photobiological activity of novel ruthenium phthalocyanine complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 99, p. 60-63, 2018.

NEGRI, L. B.; MARTINS, T. J.; RAMOS, L. C.; DA SILVA, R. S. Nitric oxide derivative ruthenium compounds as NO-based chemotherapeutic and phototherapeutic agents. In: **Nitric Oxide Donors**. Academic Press, 2017, p. 1-24.

OGUNSIPE, A.; NYOKONG, T. Effects of substituents and solvents on the photochemical properties of zinc phthalocyanine complexes and their protonated derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 689, n. 1-2, p. 89-97, 2004.

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

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**: A guide for students of organic chemistry, New York: Saunders College Publishers, 2nd. Edition, 1996, p. 511.

POOLE, C. P.; FARACH, H. A. **The theory of magnetic resonance**. Wiley, 1972.

RAMOS, L. C. B. Avaliação do efeito sinérgico de óxido nítrico e oxigênio singlete produzidos por complexo rutênio-ftalocianina em células tumorais. Estudos fotoquímicos, fotofísicos e medida de atividade citotóxica in vitro. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016.

RAWLING, T.; MCDONAGH, A. Ruthenium phthalocyanine and naphthalocyanine complexes: synthesis, properties and applications. **Coordination chemistry reviews**, v. 251, n. 9-10, p. 1128-1157, 2007.

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

RODRÍGUEZ-MORGADE, M. S.; PLONSKA-BRZEZINSKA, M. E.; ATHANS, A. J.; CARBONELL, E.; DE MIGUEL, G.; GULDI, D. M.; ECHEGOYEN, L.; TORRES, T. Synthesis, Characterization, and Photoinduced Electron Transfer Processes of Orthogonal

Ruthenium Phthalocyanine–Fullerene Assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 30, p. 10484-96, 2009.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.

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.

SEDDON, K. R. Ruthenium. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 41, p. 79-157, 1982.

SIEVERTSEN, S.; WEIDEMANN, M.; TSANTZIKRAUSE, O.; HOMBORG, H. Ruthenium (iii) phthalocyanines-synthesis and properties of di (halo) phthalocyaninato (1-) ruthenium (iii). **Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie**, v. 621, n. 9, p. 1567-1572, 1995.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, Rio de Janeiro: LTC Editora, 2006, p. 530.

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.

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, n. 1-2, p. 57-69, 2003.

THOMAS, A. L. **Phthalocyanine research and applications**. CRC Press, 1990.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 936-939, 2003.

VAN LEEUWEN, M.; BEEBY, A.; FERNANDES, I.; ASHWORTH, S. H. The photochemistry and photophysics of a series of alpha octa(alkyl-substituted) silicon, zinc and palladium phthalocyanines. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 62-69, 2014.

VELHO, R. G. Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2006.

WHALLEY, M. 182. Conjugated macrocycles. Part XXXII. Absorption spectra of tetrazaporphins and phthalocyanines. Formation of pyridine salts. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 866-869, 1961.

WILKINSON, G.; GILLARD, R. D.; MCCLEVERTY, J. A. Comprehensive coordination chemistry. The synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds. Pergamon Press, Oxford, v. 3. Main group and early transition elements. 1987.

ZHANG, X.; YANG, X. Singlet oxygen generation and triplet excited-state spectra of brominated BODIPY. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 18, p. 5533-5539, 2013.

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.

Capítulo 3

Estudos fotofísicos e fotoquímicos dos complexos rutênio-ftalocianina

1. INTRODUÇÃO

O surgimento da TFD e sua aplicação clínica é relativa a 1900 (figura 1.3 - Capítulo 1). Estudos da TFD no tratamento do câncer vêm sendo realizados desde 1975 (PLAETZER et al., 2009). Embora muitos estudos sejam realizados para o desenvolvimento de sínteses de novos fotossensibilizadores, poucos deles são aprovados em todas as fases de estudos clínicos para se tornarem novos fármacos (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI et al., 2006). Um fotossensibilizador ideal deve ser estável em solução, não-tóxico, apresentar absorção na região da janela terapêutica, produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) em quantidade suficiente para causar efeito e ter uma sublocalização celular que cause stress oxidativo no local correto, para promover morte celular. Dessa forma, no desenvolvimento de um fotossensibilizador, estudos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos são imprescindíveis para se entender a interação da luz com tecido, a interação da luz com o fotossensibilizador e a resposta celular que essas interações causam (ULIANA et al., 2014).

Como já foi mencionada, a TFD é uma combinação de um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular. Quando a luz é propagada através do tecido, alguns processos como refração, reflexão, absorção e dispersão atenuam a incidência da energia luminosa. Os efeitos da refração e reflexão são reduzidos através da aplicação perpendicular da luz no tecido, enquanto que a absorção pode ser minimizada pela escolha de um fotossensibilizador que absorva na região da janela terapêutica. Nesse contexto, as ftalocianinas possuem alta absorção na região entre 600 e 800 nm e, por isso, são classificadas como fotossensibilizadores de segunda geração (PLAETZER et al., 2009; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; PRASAD, 2003).

Uma vez que o fotossensibilizador absorve a luz em um comprimento de onda específico podem ocorrer dois tipos de reações fotoquímicas que causam dano celular oxidativo. As reações do tipo I, que consistem na transferência de elétrons (ou prótons) para biomoléculas ou para o oxigênio formando ERRO e as reações do tipo II, na qual há a transferência de energia para o oxigênio molecular que está no estado tripleto fundamental, excitando-o ao estado singleto, produzindo espécies de oxigênio singleto (Figura 1.6 - Capítulo 1). Ambas as reações produzem espécies reativas que são altamente citotóxicas às células tumorais (AGOSTINIS et al., 2011).

Assim, a pressão parcial de oxigênio na região tumoral é de extrema importância para a eficácia da TFD. No entanto, sabe-se que a vascularização desorganizada na região tumoral resulta no suprimento ineficiente de oxigênio, gerando regiões de baixa concentração de oxigênio conhecida como hipóxia (TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003; DE ROSA; CRUTCHLEY, 2002; OCHSNER, 1996; DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY, 1984;

DOUGHERTY, 1995). Nesse sentido, buscam-se estratégias que promovam o aumento da concentração de oxigênio na região tumoral a fim de diminuir a hipóxia e, conseqüentemente, aumentar a produção de espécies citotóxicas pela TFD. Uma das possibilidades é o desenvolvimento de fotossensibilizadores doadores de óxido nítrico, que sob fotoestímulo possam produzir $^1\text{O}_2$ e NO.

Estudos envolvendo a ação do NO tornam-se relevantes uma vez que já se sabe que a concentração de NO pode influenciar o fluxo de oxigênio na região tumoral (WELLER, 2003; CHIANG et al., 2005; IGNARRO, 2000; WINK et al., 2008). Embora a ação do NO esteja relacionada com o desenvolvimento de neovascularização de tumores conhecida como angiogênese, o aumento da irrigação tumoral poderia propiciar o aumento da oxigenação na região tumoral sensibilizando as células malignas para a TFD, principalmente em tumores sólidos de grande área (PINHO, 2005; WANG et al., 2005; POON et al., 2001).

Além disso, outro fator a ser considerado é a observável fotodegradação de fotossensibilizadores causada por auto-oxidação. Neste contexto, estratégias sintéticas podem ser utilizadas para modular as propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos fotossensibilizadores, melhorando a estabilidade, a solubilidade, o rendimento quântico de oxigênio singleto, modulando a liberação do NO e, assim, aumentando a eficiência da TFD (MEHRABAN; FREEMAN, 2005).

Dessa forma, este capítulo tem por objetivo apresentar os resultados dos estudos fotoquímicos e fotofísicos para os complexos de rutênio-ftalocianina, *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], sintetizados e caracterizados neste trabalho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Tabela 3.1- Reagentes utilizados para os estudos fotofísicos e fotoquímicos.

(continua)

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Ácido tereftálico (TA)	Sigma-Aldrich®
Azul de metileno	Synth®

(conclusão)

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Clorofórmio (CHCl ₃)	Synth®
1,3-difenilisobenzofurano (DPBF)	Sigma-Aldrich®
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	Sigma-Aldrich®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth®
Etanol	Synth®
Ftalocianina de zinco - [Zn(Pc)]	Sigma-Aldrich®
Metanol (CH ₃ OH)	Synth®
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)	Sigma-Aldrich®
<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i> (SOSG)	Invitrogen™
3'-(p-hidroxifenil) fluoresceína (HPF)	Invitrogen™
Cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT)	Sigma-Aldrich®
Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit	Invitrogen™
Solução tampão fosfato (PBS)	Sigma-Aldrich®

2.2 Determinação indireta de Oxigênio Singleto (¹O₂)

2.2.1 Ensaio de oxigênio singleto (¹O₂) em meio aquoso:

Em uma placa de 96 poços contendo 50 µL do reagente *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG) (10,00 µM) em PBS, foram adicionados 50 µL dos complexos em estudo (10,00 µM) em metanol. Foi realizado um controle positivo com azul de metileno (MB) nas mesmas condições (50 µL de 10,00 µM de MB + 50 µL de 10,00 µM de SOSG). A mistura foi deixada por 30 minutos no escuro. A fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 504 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) foi medida no tempo 0 e após a irradiação em 660 nm a cada 60 segundos. Para irradiação foi utilizada uma microplaca de 96 poços com 96 LEDs em 660 nm da marca Elétron Comercial, BRA. As

soluções dos reagentes e compostos foram preparadas imediatamente antes do uso. O experimento foi realizado em quintuplicata.

2.2.2 Ensaio de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) em meio orgânico:

Soluções contendo as amostras de complexos de rutênio-ftalocianinas em estudo foram preparadas em 2 mL de DMSO, de forma que o valor da absorbância correspondesse aproximadamente a 0,3 no $\lambda = 660$ nm. Uma solução estoque de 1,3-difenilsobenzofurano (DPBF) de 8,00 mM foi preparada em DMSO e protegida da luz. Em uma cubeta de quartzo contendo a solução de rutênio-ftalocianina, foi adicionado 10 μL da solução estoque de DPBF e espectro de absorção eletrônica inicial foi registrado. A solução de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] foi irradiada em comprimento de onda de 660 nm a cada 1 segundo enquanto que a solução de *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] foi irradiada em 660 nm a cada 2 segundos. A cada irradiação, as soluções foram mantidas sob agitação e os espectros de absorção eletrônica foram registrados monitorando-se a diminuição da banda em 416 nm referente ao DPBF. O experimento foi realizado em triplicata, em temperatura ambiente e sala escura. O experimento, nas mesmas condições, também foi realizado para o padrão de zinco-ftalocianina [Zn(Pc)]. Todas as soluções dos reagentes e compostos foram preparadas imediatamente antes do uso. 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. Ao final de cada experimento, gerou-se um gráfico de logaritmo neperiano da absorbância em 416 nm *versus* tempo de irradiação (em segundos).

2.3 Medidas de espécies reativas de oxigênio (ERO)

2.3.1 Ensaio para radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) utilizando HPF:

O radical hidroxila foi identificado utilizando-se a sonda 3'-(p-hidroxifenil) fluoresceína (HPF), a qual consiste em uma fluoresceína, que segundo o fabricante, na presença do $\text{HO}^\bullet$, torna-se fluorescente com $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm. Porém, ainda segundo o fabricante, é uma sonda que não é específica apenas para $\text{HO}^\bullet$, podendo marcar outros radicais como por exemplo peroxinitrito. Para o experimento, 50 μL das amostras de complexos em estudo (10,00 μM) em metanol foram adicionados a 50 μL de 3'-(p-hidroxifenil) fluoresceína (HPF) (10,00 μM) em PBS em uma placa de 96 poços. Foi realizado um controle positivo com azul de metileno (MB) nas mesmas condições (50 μL de 10,00 μM de MB + 50 μL de 10,00 μM de HPF). A mistura foi deixada por 30 minutos no escuro. A fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm) foi medida no tempo 0 e após a

irradiação em 660 nm a cada 60 segundos. Para irradiação foi utilizada uma microplaca de 96 poços com 96 LEDs em 660 nm da marca Elétron Comercial, BRA. As soluções dos reagentes e compostos foram preparadas imediatamente antes do uso. O experimento foi realizado em quintuplicata.

2.3.2 Ensaio para radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) utilizando AT:

Solubilizou-se 0,0050 g de ácido tereftálico (AT) em 10 mL de uma solução NaOH, pH=12,00 (5×10^{-3} g/mL). Preparou-se uma solução de 150,00 μM do complexo de rutênio-ftalocianina a ser estudado em metanol. Em uma cubeta de quartzo contendo a solução de AT foi adicionado 100 μL da solução do complexo resultando em uma concentração final de 5,00 μM . Irradiou-se em 660 nm por 25 minutos, utilizando-se o laser diodo da marca Colibri da Quantum tech. Em seguida, passou-se a solução em coluna de sílica gel e o eluído foi analisado por espectroscopia de fluorescência no espectrofluorímetro RF – 5301PC Shimadzu, λ_{exc} =310 nm e fendas 5,5. As soluções dos reagentes e compostos foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.3.3 Ensaio para ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$):

Para o ensaio do ânion superóxido foi utilizado como sonda o cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT), na presença de Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A avaliação da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ ocorreu através do aumento da densidade óptica em 580 nm, uma vez que o $\text{O}_2^{\bullet-}$ oxida o NBT, na presença de NADH, formando um produto que apresenta absorção nessa região.

Para o experimento, foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços: 284 μL de uma solução de NBT (170,00 μM), 300 μL de uma solução de 20,00 mM de NADH em PBS, e 6 μL de uma solução da amostra do FS em análise (0,5 mM). As soluções foram preparadas de modo que a concentração final para cada reagente em solução fosse: 85,00 μM de NBT, 10,00 mM de NADH e 5,00 μM de FS contendo 1% de DMSO no volume total. Foi realizado um controle positivo com azul de metileno (MB) nas mesmas condições. A mistura foi deixada por 30 minutos no escuro e a absorbância do produto azul de formazan que é formada, foi medida em 580 nm no tempo 0 e a cada 60 segundos de irradiação com laser em 660 nm. Para irradiação foi utilizada uma microplaca de 96 poços com 96 LEDs em 660 nm da marca Elétron Comercial, BRA. O experimento foi realizado em quintuplicata. As soluções dos reagentes e compostos foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.3.4 Ensaio para peróxido de hidrogênio (H₂O₂):

Para este ensaio foi utilizado o kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay. Inicialmente preparou-se a solução reagente 100,00 µM de Amplex® Red e 0,2 U/mL de HRP. Para isso, adicionar a um frasco 50 µL de solução estoque de reagente Amplex® Red (10,00 mM), 100 µL de solução estoque de HRP a 10 U / mL e 4,85 mL de 1X Tampão de reação. Em cada poço da placa de 96 poços, foi adicionado 50 µL de cada amostra a ser analisada. As amostras analisadas foram: controle positivo 1 (solução de 10,00 µM de H₂O₂ em tampão de reação); azul de metileno como outro controle positivo 2; controle negativo (apenas tampão de reação); complexo [RuCl(Pc)(DMSO)] (10,00 µM) em DMSO; *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (10,00 µM) em DMSO. Nas amostras adicionou-se 50 µL da solução reagente 100,00 µM Amplex® Red e 0,2 U / mL de HRP, previamente preparada. Incubou-se a temperatura ambiente protegendo da luz por 30 minutos. A fluorescência ($\lambda_{exc} = 530$ nm e $\lambda_{em} = 590$ nm) foi medida no tempo 0 e após a irradiação em 660 nm a cada 60 segundos. Para irradiação foi utilizada uma microplaca de 96 poços com 96 LEDs em 660 nm da marca Elétron Comercial, BRA. As soluções dos reagentes e compostos foram preparadas imediatamente antes do uso. O experimento foi realizado em quintuplicata.

2.4 Estudos fotoquímicos de liberação de NO

Nos experimentos de fotólise, foi utilizado laser de diodo marca Colibri da Quantum tech. A liberação de NO a partir do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] foi estudada em três experimentos: com irradiação em 377 nm; com irradiação em 660 nm; e na presença de células de melanoma humano (A375), sem irradiação. Em todos os casos o monitoramento da liberação de NO foi realizado através do equipamento NOmeter (InNO-T, Innovative Instruments, Inc) com o sensor amINO-700, o qual mede a concentração de NO através da técnica de amperometria.

Para os experimentos que se avaliou a liberação do NO a partir da irradiação luminosa, 3 mL da uma solução contendo 1% de DMSO do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] foi adicionada a uma cubeta e o sensor foi estabilizado. Em seguida, iniciou-se a irradiação nos comprimentos de onda específicos, 377 ou 660 nm, e monitorou-se a liberação de NO. Os estudos foram acompanhados com espectroscopia de absorção de UV-Visível antes e após a exposição à irradiação.

O experimento que se avaliou a liberação do NO do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] na presença das células A375 aconteceu da seguinte maneira: Primeiramente, as células A375 foram tripsinadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI.

Em seguida, 3 mL da suspensão de células foi colocada na cubeta de quartzo e após a estabilização do sensor de NO, adicionou-se 30 μL de uma solução estoque de *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] (1,00 mM) em DMSO, monitorando-se a liberação de NO. Os estudos foram acompanhados com espectroscopia de absorção de UV-Visível antes e após a exposição às células. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Agilent 8453 e Hitachi U-3501, com varredura na região de 200 a 800 nm. Utilizou-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

2.5 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão dos compostos foram obtidos no espectrofluorímetro RF – 5301PC Shimadzu, utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 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.

2.6 Estudos de fotodegradação

Foram preparadas soluções dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] ($6,59 \times 10^{-5}$ M) e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] ($4,90 \times 10^{-5}$ M) em DMSO. As soluções foram irradiadas a cada 5 minutos no comprimento de onda de 660 nm, com potência de 39 mW. Os espectros foram registrados no equipamento de espectrofotômetro Agilent 8453, com varredura na região de 200 e 800 nm. Foram realizados 12 espectros durante o intervalo de 3600 segundos (60 minutos).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foram apresentadas e discutidas as propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], a fim de se avaliar o potencial destes como FS na TFD.

O mecanismo de decaimento do estado tripleto dos complexos para o estado fundamental foi estudado e as reações do tipo I e tipo II que formam as espécies reativas foram avaliadas. Os produtos dessas reações foram identificados utilizando sondas específicas para essas espécies e foi observado que os complexos não produziram H₂O₂ e O₂^{•-} quando irradiados em 660 nm. No entanto, os resultados para o radical HO[•] sugeriram a sua produção por ambos os complexos quando avaliado pelo ácido tereftálico.

O oxigênio singleto foi determinado pelo método indireto, utilizando-se duas sondas diferentes: SOSG e DPBF. O SOSG é mais utilizado em ambiente aquoso, o que significa que o ideal seria que os complexos fossem solúveis em água. O resultado com o SOSG mostrou que apenas o complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] produziu oxigênio singleto. Neste caso, sugere-se que o ambiente aquoso pode ter limitado a detecção do oxigênio singleto a partir do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], uma vez que a presença dos ligantes axiais NO⁺ e NO₂⁻ já pressupõe uma menor produção, a qual em meio aquoso pode sofrer maior redução, não sendo possível a identificação.

Devido a isso, foram realizados experimentos de quantificação de rendimento quântico de oxigênio singleto com a sonda DPBF, uma sonda que funciona em meio orgânico e foi utilizada em DMSO. Nesse experimento, o complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] apresentou $\Phi_{\Delta} = 0,62$ o que é alto quando comparado ao padrão [Zn(Pc)] que possui $\Phi_{\Delta} = 0,67$. Acredita-se que o tamanho do rutênio contribua para o acoplamento spin-órbita favorecendo o tempo de vida no estado tripleto e assim aumente o rendimento quântico de oxigênio singleto. No entanto, o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] apresentou $\Phi_{\Delta} = 0,11$, o qual é considerado um valor baixo. Porém, é importante ressaltar que o rendimento quântico de oxigênio singleto é um valor relativo e depende da sublocalização celular que o complexo se encontra para causar efeito citotóxico. Assim, estudos fotobiológicos serão discutidos no capítulo a seguir e maiores conclusões serão elaboradas a respeito do oxigênio singleto produzido por esses complexos.

O baixo valor de rendimento quântico de fluorescência do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], $\Phi_f = 0,007$, corrobora com o resultado de alto rendimento quântico de oxigênio singleto que o complexo apresentou. Como já discutido anteriormente, um alto Φ_{Δ} , favorece o cruzamento intersistemas das moléculas e desativa o mecanismo de decaimento da fluorescência. Já o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] apresentou baixa fluorescência de modo que não pudesse ser quantificada. Os ligantes axiais NO⁺ e NO₂⁻ parecem influenciar o acoplamento spin-órbita de modo que favoreça o decaimento por processo não radiativo.

Pode se afirmar que ambos os complexos apresentaram alta fotoestabilidade quando irradiados em 660 nm.

O complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] não apresentou liberação do NO em 660 nm. Porém, o NO foi liberado em 377 nm e em ambiente redutimétrico celular, o que, considerando este último, será relevante para os estudos fotobiológicos.

Assim, os estudos demonstraram que o complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] quando irradiado em 660 nm produz predominantemente oxigênio singleto enquanto que o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], em ambiente celular redutimétrico e sob fotoestímulo em 660 nm

produz tanto o oxigênio singleto quanto o óxido nítrico. Dessa forma, estudos fotobiológicos serão conduzidos para investigar se a produção de ambas as espécies produzidas pelo complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] promove um efeito sinérgico de morte celular tumoral quando comparado ao complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] que produz apenas o oxigênio singleto.

Desta forma, as análises fotofísicas e fotoquímicas demonstraram que esses complexos se apresentaram como candidatos promissores a fotossensibilizadores na TFD, nos fornecendo subsídios para explorar mais profundamente a citotoxicidade em células tumorais e seus mecanismos de morte celular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

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.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death, **International Journal of Molecular Science**, 16, 20523-20559, 2015.

BERGAMINI, C. M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELLATI, C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 14, p. 1611-1626, 2004.

BIGNOZZI, C. A.; CHIORBOLI, C.; MURTAZA, Z.; JONES, W. E.; MEYER, T. J. Photophysical and photochemical behavior of nitro complexes of ruthenium (II). **Inorganic Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1036-1038, 1993.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, V.; TOGNILO, 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.

CARNEIRO, Z. A. Fotocitotoxicidade provenientes do sinérgico de oxigênio singleto e óxido nítrico gerado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)(ftalocianina)]. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 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.

- 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.
- D'SOUZA, S., ANTUNES, E., NYOKONG T. Synthesis and photophysical studies of CdTe quantum-dot monosubstituted zinc phthalocyanine conjugates. **Inorganica Chimica Acta**, 367, 173-181, 2011.
- DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**. 233, 351-71, 2002.
- DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy: Part II. **Seminars in Surgery Oncology**, v. 11, n. 5, p. 333-340, 1995.
- DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy (PDT) of Malignant Tumors, **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 2, p. 83-116, 1984.
- DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, p. 2628-2635, 1978.
- FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W. The surprising life of nitric oxide. **Chemical and Engineering News**, v. 26, 1993.
- 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-nytrosils. **Journal of Pharmacology**, v. 117, 1549-1557, 1996.
- FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, p. 659, 1991.
- GOBO, N. R. S. Estratégias Sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas. Dissertação de Mestrado, São Carlos-SP: Universidade Federal de São Carlos, 173p, 2013.
- GUEZ, D.; MARKOVITSI, D.; SOMMERAUER, M.; HANACK, M. Photophysical properties of a ruthenium(II)phthalocyanine, **Chemical Physics Letters**, 249, 309-313, 1996.
- HALLIWELL, B. Manganese ions, oxidation reactions and the superoxide radical. **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 113-117, 1984a.
- HALLIWELL, B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. **Medical biology**, v. 62, n. 2, p. 71, 1984b.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. Role of iron in oxygen radical reactions. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 47-56.
- HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.
- IGNARRO L. **Nitric Oxide: Biology and Photobiology**, San Diego, California, USA, 1. d., Academic Press, 2000.

JARVI, M. T.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements, **Biophysical Journal**, 102(3), 661–671, 2012.

JORI G.; FABRIS C.; SONCIN M.; FERRO S.; COPPELLOTTI O.; DEI D.; FANTETTI L.; CHITI G.; RONCUCCI G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

JUZENIENE, A.; NIELSEN, K. P.; MOAN, J. Biophysical aspects of photodynamic therapy. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology**, v. 25, n. 1-2, 2006.

KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. **Physiochemical Characterization**. The Porphyrin Handbook. World Scientific Publishing, VII - cap. 34, 2010.

KANAZAWA, S.; FURUKI, T.; NAKAJI, T.; AKAMINE, S.; ICHIKI, R. Measurement of OH radicals in aqueous solution produced by atmospheric-pressure LF plasma jet. **Department of electrical and electronic engineering, Oita University, Japan**, 2012.

LAWRENCE, D. S.; WHITTENT, D. G. Photochemistry and photophysical properties of novel, unsymmetrically substituted metallophthalocyanines, **Photochemistry and Photobiology**, 64(6), 923-935, 1996.

LIANG, X.; WANG, K. K-h.; ZHUA, T. C. Singlet oxygen dosimetry modeling for photodynamic therapy, **Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering**, 13, 1-14, 2012.

MARTINS, T. J. Complexos rutênio-ftalocianinas como candidatos a fotossensibilizadores: estudos fotoquímicos, fotofísicos, fotobiológicos e avaliação do efeito “teranóstico” da interação com pontos quânticos. Tese (Doutorado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2017.

MEHRABAN, N.; FREEMAN, H. S. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production, **Materials**, 8, 4421-4456, 2015.

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

NEGRI, L. B.; MARTINS, T. J.; RAMOS, L. C.; DA SILVA, R. S. Nitric oxide derivative ruthenium compounds as NO-based chemotherapeutic and phototherapeutic agents. In: **Nitric Oxide Donors**. Academic Press, 2017, p. 1-24.

OCHSNER, M. Light 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.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, p. 396-402, 2005.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

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, p. 298-304, 2001.

PRASAD, P. N. Introduction to biophotonics. 2003.

RAMOS, L. C. B. Avaliação do efeito sinérgico de óxido nítrico e oxigênio singlete produzidos por complexo rutênio-ftalocianina em células tumorais. Estudos fotoquímicos, fotofísicos e medida de atividade citotóxica in vitro. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016.

ROLLMANN, L. D.; IWAMOTO, R. T. Electrochemistry, electron paramagnetic resonance, and visible spectra of cobalt, nickel, copper, and metal-free phthalocyanines in dimethyl sulfoxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 6, p. 1455-1463, 1968.

SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. *Transition Metal Chemistry*, v. 28, p. 254-9, 2003a.

SAUAIA, M. G.; DE LIMA, R. G.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14718-14719, 2003b.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2000. p. 376-400.

SŁOTA, R.; DYRDA, G. UV Photostability of Metal Phthalocyanines in Organic Solvents, **Inorganic Chemistry**, 42(18), 5743-5750, 2003.

TADA, D. B.; VONO, L. L. R.; DUARTE, E. L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P. K.; BAPTISTA, M.S.; ROSSI, L.M. Methylene Blue-Containing Silica-Coated Magnetic Particles: A Potential Magnetic for Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemistry Society*, v. 23, p.8194, 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.

TEKDAS, D. A.; DURMUS, M.; YANIK, H.; AHSEN, V. Photodynamic therapy potential of thiol-stabilizes CdTe quantum dot-group 3^a phthalocyanine conjugates (QD-Pc), **Spectrochimica Acta Part A**, 93, 313-320, 2010.

TFOUNI, E.; DORO, F. G.; GOMES, A. J.; SILVA, R.S.; METZKER, G.; BENINI, P. G. Z.; FRANCO, D. W. Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 355-371, 2010.

TFOUNI, E.; FERREIRA, K. Q.; DORO, F. G.; SILVA, R. S.; ROCHA, Z. N. Ru(II) and Ru(III) complexes with cyclam and related species. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 405-418, 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.

ULIANA, M. P.; PIRES, L.; PRATAVIEIRA, S.; BROCKSOM, T. J.; DE OLIVEIRA, K. T.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1137-1145, 2014.

VINCETT, P. S.; VOIGT, E. M.; RIECKHOFF, K. E. Phosphorescence and fluorescence of phthalocyanines, **The Journal of Chemical Physics**, 55, 4131-4140, 1971.

WANG, L.; SHI, G. G.; YAO, J. C.; GONG, W.; WEI, D.; WU, T. T.; AJANI, J. A.; 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, p. 18-28, 2005.

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

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.

ZHANG, X.; YANG, X. Singlet oxygen generation and triplet excited-state spectra of brominated BODIPY. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 18, p. 5533-5539, 2013.

Capítulo 4

Estudos fotobiológicos dos complexos

rutênio-ftalocianina

1. INTRODUÇÃO

A TFD é uma terapia para o câncer clinicamente aprovada. A irradiação luminosa utilizando compostos de coordenação constitui-se de uma área incipiente, cuja aplicação clínica ainda não é observada. Embora compostos de coordenação como a *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] sejam usados como quimioterápicos desde 1978, estudos recentes mostram que haveria um aumento da eficiência da citotoxicidade se a luz fosse utilizada como coadjuvante (BEDNARSKI; MACKAY; SADLER, 2007).

Este princípio norteia a possibilidade de múltipla função de compostos de rutênio como FS, tal como esses discutidos neste trabalho. Essencialmente, poderia haver a produção de várias espécies citotóxicas utilizando luz visível como ação primária na citotoxicidade.

A resposta celular ao fotodano é fortemente dependente de múltiplos fatores dos quais a sublocalização intracelular do FS é um ponto chave (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992). O local de ação intracelular é dependente do FS e desempenha um papel importante no destino da célula. Dependendo de suas características, um FS geralmente se localiza em organelas, como a membrana plasmática, lisossomos, mitocôndrias, complexo de Golgi ou retículo endoplasmático (RE) (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Dependendo da sublocalização celular do FS, a morte celular pode ser induzida por três principais mecanismos: apoptose, necrose e autofagia (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Desde a sua regulamentação aprovada, há mais de 30 anos, a TFD tem sido objeto de numerosos estudos e provou ser uma forma eficaz de terapia contra o câncer (VAN STRATEN et al., 2017).

Apesar do sucesso clínico relatado, a TFD ainda é subutilizada atualmente na clínica devido às suas limitações. Dentre as limitações da TFD estão reações de fotossensibilidade que dependem do comprimento de onda de absorção, solubilidade, concentração e agregação do FS (FINK; ENK; GHOLAM, 2015), penetrabilidade da luz que pode não atingir tecidos tão profundos (YANO et al., 2012), e ainda, a presença de regiões de hipóxia no tumor comprometendo a formação de ERO pela TFD (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). Além disso, a recorrência tumoral é frequentemente relatada em ensaios clínicos, uma vez que o stress oxidativo gerado pela TFD ativa uma

variedade de moléculas que atuam em mecanismos bioquímicos de sobrevivência tumoral (VAUPEL; THEWS; HOECKEL, 2001; CASAS et al., 2011).

Assim sendo há grande interesse em entender as vias bioquímicas que tornam as células resistentes à TFD e desenvolver terapias combinadas que contornem os mecanismos de sobrevivência e potencialize a TFD contra tumores sólidos (ĜB et al., 2003).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que ocupa um duplo papel na regulação da resposta tumoral e resistência à TFD (RAPOZZI; DELLA PIETRA; BONAVIDA, 2015). Dependendo da concentração de NO pode-se tanto estimular quanto inibir moléculas anti-apoptóticas, podendo causar tanto um efeito tumorigênico quanto tumoricida. Uma alta concentração de NO, por exemplo, pode inibir o fator de transcrição NF- κ B anti-apoptótico, inibindo o processo de sobrevivência celular (MARSHALL; STAMLER, 2001).

Baseado nisso, uma das estratégias do nosso trabalho para potencializar a TFD é o desenvolvimento do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], um fotossensibilizador que ao mesmo tempo que produz ¹O₂ na TFD, libera NO em ambiente redutimétrico.

Outra estratégia desenvolvida neste trabalho para potencializar a TFD foi o uso da terapia combinada de luz, na qual primeiramente as células são estimuladas na região do infravermelho próximo em um processo denominado fotobiomodulação (PBM) para em seguida, serem tratadas com a TFD. A PBM modula a via de sinalização, via produção de ERO, ATP, Ca⁺² e NO, o que se tornou uma ferramenta interessante em combinação com a TFD (TSAI et al., 2015).

Dessa forma, após os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] serem sintetizados e caracterizados pelas análises físico-químicas, fotofísicas e fotoquímicas, investigou-se os mecanismos fotobiológicos desses complexos como fotossensibilizadores na TFD e em terapias combinadas.

Assim, este capítulo relata um estudo sobre um possível efeito sinérgico do *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em relação ao *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] durante a TFD, avaliando a citotoxicidade de ambos os complexos em diferentes linhagens celulares bem como estudos de internalização e sublocalização celular, e ainda, avaliando como o NO pode influenciar nos mecanismos bioquímicos de morte e sobrevivência celular.

Ainda neste capítulo é apresentado um estudo de como a PBM pode potencializar a TFD, avaliando-se a influência da PBM na internalização celular dos FS, na produção de ATP e na produção de NO intracelular, e como todos esses fatores se relacionam no processo de morte celular.

Os estudos fotobiológicos foram realizados tanto na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, no Brasil, sob orientação do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, quanto no Wellman Center for Photomedicine no Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School durante o período de doutorado sanduíche nos EUA, sob orientação do Prof. Dr. Michael Hamblin.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Tabela 4.1- Equipamentos utilizados para cultivo celular.

EQUIPAMENTOS	MARCA/MODELO
Banho-Maria	Cientec Equipamentos para Laboratório Ltda / CT 245-9, S/N: 1101005
Centrífuga	Kindly Indústria e Comércio de Equipamentos Médicos / KC4 S/N: 0910001058
Estufa Thermo Fisher Scientific	3110 S/N: 319400-36444
Fluxo laminar vertical Pachane®	Cientec Equipamentos para Laboratório Ltda /Pa 300. S/N: 30511
Leitor de Elisa Thermo Plate	TP-READER S/N: 501314037 FSE
Microscópio Biológico invertido binocular	QUIMIS® / 67301, S/N: 09080057

2.2 Fonte de luz

Utilizou-se uma barra de luz de LED infravermelho LEDLB-24E-IR (Larson Electronics, USA) para a PBM em 850 nm. A potência média foi de 1,0 mW e a irradiância foi de 0,3180 mW/cm². Para o ensaio da TFD, utilizou-se um arranjo de LED vermelho de 660 nm de 96 poços (Elétron Comercial, BRA) com a potência média de 7,0 mW e a irradiância de 2,3000 mW/cm². As densidades de potência de ambas as fontes de luz foram medidas com um powermeter (Thorlab, EUA).

2.3 Reagentes

Tabela 4.2 - Reagentes utilizados para cultivo celular e análises biológicas.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA
Ácido Nítrico	Sigma-Aldrich®
Antibiótico Penicilina-Streptomicina	Sigma-Aldrich®
Antibiótico Penicilina-Streptomicina	Invitrogen, USA
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich®
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco®
RPMI 1640 com “phenol red”	Gibco®
RPMI 1640 branco (sem “phenol red”)	Gibco®
Tampão fosfato-salino (PBS - “phosphate buffered saline”)	Sigma-Aldrich®
Soro fetal bovino (SFB)	Gibco®
Solução padrão de rutênio	Inorganic Ventures™
Tripsina 10X	Sigma-Aldrich®
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (sal de MTT)	Sigma-Aldrich®

2.4 Linhagens estudadas

Para a realização dos ensaios *in vitro* apresentados nesse estudo, utilizou-se tanto linhagens tumorais (B16F10, A375 e MCF7) quanto linhagens não tumorais (3T3, L929 e MCF10). As diferentes linhagens celulares estudadas estão apresentadas na tabela 4.3. As linhagens B16F10, MCF7, L929 e MCF10 foram adquiridas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e as linhagens A375 e 3T3 foram adquiridas por ATCC, Mannassas, VA, EUA.

Tabela 4.3- Linhagens tumorais estudadas neste projeto.

LINHAGEM TUMORAL	IMAGEM	TIPO DE CÉLULA
A375		Melanoma humano
B16F10		Melanoma murino
L929		Fibroblasto murino proveniente do tecido conjuntivo
MCF7		Carcinoma de mama humano (receptor de estrógeno positivo)
MCF10		Célula de mama humana não neoplásica
3T3		Fibroblasto murino proveniente do tecido embrionário

A375: <https://imanislife.com/products/a375-fluc-puro/>.

B16F10: <http://www.elec-intro.com/cms/plus/view.php?aid=119643.2.4> Cultivo das culturas celulares.

L929: <http://www.gibraltarlabsinc.com/gibraltarblog/wpcontent/uploads/2011/05/CHO-Cells.jpg%3E>.

MCF7: <http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/mcf-7.php>

MCF10: https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-1000-SOP-052814_508.pdf.

3T3: <http://www.atcc.org>.

2.5 Cultivo celular

As linhagens tumorais B16F10, A375 e MCF7 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³, com meio de cultura RPMI 1640 completo (Gibco® com 25,0 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Foram mantidas em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. As garrafas foram supervisionadas diariamente em microscópio e a troca do meio de cultura realizada a cada dois dias.

As linhagens não-tumorais 3T3, L929 e MCF10 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³, com meio de cultura DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco®), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Foram mantidas em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. As garrafas foram supervisionadas diariamente em microscópio e a troca do meio de cultura realizada a cada dois dias.

Todas as linhagens foram cultivadas em monocamadas e uma vez estando confluentes foram submetidas ao processo de tripsinação. Nesse processo, o meio de cultura presente na garrafa foi removido e a garrafa contendo as células foi lavada por três vezes utilizando-se 3 mL de PBS 1X em cada lavagem. Foram adicionados 1 mL de tripsina 1X e deixou-se a garrafa na estufa por 5 minutos a 37 °C. Após esse período avaliou-se o desprendimento das células da parede da garrafa por meio do uso do microscópio. A suspensão celular foi colocada em tubo falcon de 15 mL contendo meio de cultura completo, e centrifugada por 5 minutos a 1100 rpm. Obteve-se um *pellet* que foi ressuspensionado em meio de cultura completo e adicionado em outra garrafa de cultivo contendo meio de cultura completo. A nova garrafa foi cultivada em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂ até as células atingirem confluência novamente e o processo se reiniciar.

Essas condições foram padronizadas para o cultivo das células durante todos os ensaios.

2.6 Análise da viabilidade celular através do método de MTT

O método de MTT é um ensaio colorimétrico e consiste na conversão, através de enzimas redutimétricas mitocondriais, do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (MTT) de cor amarelada ($\lambda_{\text{máx}} = 600 \text{ nm}$) a formazan, um sal de coloração coloração violácea ($\lambda_{\text{máx}} = 470 \text{ nm}$), solúvel em solventes orgânicos.

O princípio deste método consiste no fato de que células vivas apresentam as mitocôndrias em atividade, podendo converter o MTT em formazan. Já as células mortas não apresentam função mitocondrial e, portanto, a conversão não ocorre.

Com base nessas considerações, a absorbância do sal de formazan é medida em 570

nm e a intensidade de coloração permite a determinação da quantidade de células viáveis através da Equação 4-1.

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{D.O. experimento} / \text{D.O. controle}) \times 100\% \quad \text{Equação 4-1}$$

2.7 Ensaios de viabilidade celular na ausência e presença da TFD

Após 80% de confluência nas garrafas de cultivo, as células em análise foram tripsinizadas, contadas na câmara de Neubauer e, posteriormente, semeadas em placas de 96 poços (KASVI) na concentração de 1×10^5 células/mL (2×10^4 células/poço). Após o período de incubação de 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos de rutênio-ftalocianina *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em meio de cultura RPMI branco (sem “phenol red”) e com 1% de DMSO. Alguns parâmetros como concentração (0,10 – 1,00 μM), dose de luz em $\lambda = 660 \text{ nm}$ (1,0 J.cm⁻², 3,0 J.cm⁻² e 6,0 J.cm⁻²) e tempo de incubação (4 ou 24 horas) foram analisados e serão discutidos nos resultados e discussões.

Após o período de incubação estudado, um grupo de células foi lavado e submetido à TFD enquanto que o outro grupo foi lavado e permaneceu sem irradiação. Após 20 horas da exposição à TFD, foi adicionada uma solução de MTT (0,5 mg/mL). Deixou-se reagir por 3 horas. A solução de MTT foi então retirada e adicionou-se 200 μL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais do sal formado. Foi realizada a leitura de absorbância dessa solução no leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) e a porcentagem de viabilidade celular calculada de acordo com a Equação 4.1. Os resultados de viabilidade celular dos grupos sem irradiação e com irradiação foram comparados.

Cabe destacar que para cada experimento utilizou-se um controle seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, e o resultado foi avaliado comparando-se os complexos na ausência e presença de estímulo luminoso.

2.8 Internalização celular (“Uptake” celular)

O estudo de internalização celular, ou “uptake” celular, para os complexos na linhagem A375, foi avaliado utilizando o sistema de ICP-MS Agilent 7900 (espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado), com potência 1100 W, com o fluxo de gás nebulizador de 0,52 L.min⁻¹. A internalização celular foi avaliada através da concentração de Ru (ppb) que internaliza nas células após diferentes períodos de incubação dos complexos. Assim, as células foram semeadas na garrafa T-25 na densidade de 7×10^5 células. Após 24

horas, as células foram tratadas com 1,00 μM dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], incubando-os por 2, 4, 8, 12 e 24h. Em seguida, cada garrafa foi lavada com PBS e as células foram coletadas com tripsina 1X. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* formado foi digerido com 50 μL de ácido nítrico puro. Como controle positivo, foi adicionado a cada amostra uma solução de rênio de 1 ppb com 2% de ácido nítrico. O experimento foi realizado em triplicata. Uma curva de calibração utilizando uma solução de rutênio padrão (Inorganic VenturesTM) foi realizada utilizando-se as concentrações: 1000 ppm, 1000 ppb, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb, 100 ppt e 10 ppt.

2.9 Microscopia confocal

Para determinar a localização intracelular dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] nas linhagens A375 e MCF7, foi usado o microscópio confocal (Olympus FV1000, Japan). As células foram semeadas na densidade de 3×10^5 células na placa de 35,0 mm (Corning, USA) e após o tempo de incubação de 24 horas, ambas as linhagens foram tratadas com 10,00 μM de cada complexo por 4 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e marcadas com sondas fluorescentes específicas para cada organela (Invitrogen, USA). A mitocôndria foi marcada com MitoTrackerTM Green FM (0,20 μM , 30 min, 37 °C), o lisossomo com LysoTrackerTM Green DND-26 (0,20 μM , 30 min, 37 °C) e o retículo endoplasmático com ER-TrackerTM blue (0,50 μM , 30 min, 37 °C). Após o tempo de incubação específico de cada sonda, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado RPMI branco. As células foram então analisadas pelo microscópio confocal. Os comprimentos de onda de excitação e emissão das sondas foram: MitoTrackerTM Green FM $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$; LysoTrackerTM Green DND-26 $\lambda_{\text{exc}} = 504 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 511 \text{ nm}$; ER-TrackerTM blue $\lambda_{\text{exc}} = 359 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$; e os complexos $\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 660\text{-}760 \text{ nm}$.

2.10 Avaliação da liberação do óxido nítrico através da microscopia de confocal

Para avaliar a liberação do NO a partir do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], a linhagem A375 foi incubada com a sonda fluorescente DAF-FMTM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorescein) (Invitrogen-USA) e analisada pelo microscópio confocal (Olympus FV1000, Japan). As células foram semeadas na densidade de 3×10^5 células na placa de 35,0 mm (Corning, USA) e após o tempo de incubação de 24 horas, as células foram tratadas com 10,00 μM do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] por 4 horas. Em seguida, as

células foram lavadas com PBS e incubadas com 5,00 μM de DAF-FMTM por 30 minutos a 37 °C. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado RPMI branco. As células foram então analisadas pelo microscópio confocal. Os comprimentos de onda de excitação e emissão da sonda foi $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$.

2.11 Avaliação por microscopia confocal da produção de óxido nítrico intracelular pela PBM

Para avaliar a produção de NO intracelular pelo estímulo da PBM, as células A375 foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-FMTM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein) (Invitrogen, USA) e analisadas pelo microscópio confocal (Olympus FV1000, Japan). Para isso, as células foram semeadas na densidade de 3×10^5 células na placa de 35 mm (Corning, USA). Após o tempo de incubação de 24 horas, as células foram incubadas com 5,00 μM de DAF-FMTM por 20 minutos e em seguida foram irradiadas em 850 nm por 23 minutos ($4,6 \text{ J.cm}^{-2}$). O grupo controle permaneceu no escuro sem irradiação. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado RPMI branco. As células foram então analisadas pelo microscópio confocal. O filtro utilizado foi o FITC com comprimentos de onda de excitação e emissão em $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$.

2.12 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado utilizando-se o kit Comet Assay® Kit e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Trevigen®).

As células A375 foram previamente tratadas com 0,50 μM dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] no tempo de incubação de 4 horas. Após o tempo de incubação, grupos de células que receberam os tratamentos com ambos os compostos foram lavados e irradiados em 660 nm com fluência de $3,0 \text{ J.cm}^{-2}$, enquanto que outros grupos com os tratamentos foram lavados e permaneceram sem irradiação.

Uma solução de lise foi preparada e resfriada em gelo por pelo menos 20 minutos antes do uso. A LMAgarose foi derretida em um béquer de água fervente por 5 minutos, com a tampa afrouxada. A garrafa foi colocada em banho-maria a 37 °C durante pelo menos 20 minutos. A temperatura da agarose é crítica ou as células podem sofrer choque térmico. As células previamente tratadas com os complexos, na concentração de 1×10^5 células/mL foram combinadas com LMAgarose fundida (a 37°C) numa proporção de 1:10 (v/v) e imediatamente 75 μL foi pipetado para o CometSlideTM. A lâmina foi colocada a 4 °C no escuro (na geladeira) por 10 a 30 minutos. Um anel transparente de 0,5 mm aparece na borda

da área do CometSlide™. A lâmina foi imersa em solução tampão de lise pré-resfriada e deixada a 4 °C durante 30 a 60 minutos. O tampão em excesso foi retirado da lâmina e imerso em solução alcalina recém preparada, pH > 13,00 (200,00 mM de NaOH e 1,00 mM de EDTA). O CometSlide™ foi deixado em solução alcalina por 20 a 60 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Esta solução promove a libertação de histonas e o desnovelamento do DNA. A lâmina foi transferida da Solução Alcalina para um aparelho de eletroforese horizontal e a tensão foi de cerca de 1,0 Volt/cm. A corrente foi de aproximadamente 300 mA e a eletroforese foi realizada por 20 a 40 minutos. Sob campo eletroforético, segmentos do DNA livre, produto de quebras, migram em direção do cátodo, dando origem a formação de uma cauda, semelhante a um cometa. O excesso de solução de eletroforese foi suavemente lavado, enxaguado por imersão várias vezes em dH₂O e depois mergulhado em etanol a 70% durante 5 minutos. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente para secar por 2 horas. Em seguida 20 µl de SYBR® Green diluído previamente preparado foi adicionado em cada círculo de agarose seca e corou-se por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Bateu-se a lâmina suavemente para remover o excesso de solução SYBR® Green e lavou-se brevemente com água. Deixou-se a lâmina secar completamente a 37 °C. A lâmina foi analisada por microscopia de fluorescência. A excitação máxima e a emissão do SYBR® Green são, respectivamente, de 494 nm / 521 nm.

2.13 Western Blotting

As células A375 foram semeadas numa placa de seis poços (KASVI) na densidade de 3×10^5 células e foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período as células foram incubadas com 1,00 µM dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] durante 24 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas e submetidas a tratamento com TFD a 660 nm com 3,0 J.cm⁻². O mesmo procedimento foi realizado sob irradiação de luz e no escuro. As células tratadas foram tripsinadas, centrifugadas e coletadas. Para extração de proteínas foram colocadas em tampão de lise Cellytic (Sigma-Aldrich®) e foi adicionado o cocktail de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich®). O lisado foi centrifugado a 13500 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a quantificação da proteína total foi avaliada através do método de Bradford (Bio-Rad). As amostras foram então separadas eletroforéticamente em um gel desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de PVDF. Esta membrana foi bloqueada com uma solução de TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 h, e incubada com anticorpos específicos overnight a 4 °C. Os anticorpos utilizados foram anti-histone-H3 (#9715), anti-acetyl-histone H3 Lys9 (#9649), anti-p-NFkB Ser536 (#3033), anti-

cleaved-caspase-3 (#9661), anti-Bax (#2774), anti-cytochrome-c (#11940), anti-COX IV (#4850), anti-calnexin (#2433) anti- β -tubulin (#2128), anti-GAPDH (#2118) (Cell Signaling Technology), anti-NF κ B (sc-372) (Santa Cruz). Após realização de 3 lavagens de 10 minutos com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpos secundários (anti-mouse e anti-rabbit) por 1h. A reação foi revelada utilizando o reagente ECL (GE) e exposição da membrana em filmes de Raio-x ou utilizando o equipamento Bio-Rad ChemiDoc Imager.

2.14 Ensaio de recuperação da lesão (*Scratch wound*)

As células A375 foram semeadas numa placa de seis poços (KASVI) na densidade de 3×10^5 células e foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com 1,00 μ M de *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] durante 24 h. Depois disso, as células foram lavadas com PBS. Um risco através de uma ponteira 1-10 μ L estéril foi realizado na porção mediana de cada poço de maneira que a área riscada foi lesionada e, assim, teve suas células removidas. Os poços foram lavados com PBS e após a adição de RPMI branco completo as células foram irradiadas em 660 nm (3,0 J.cm⁻²). Em seguida, imagens foram tiradas com um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) em diferentes tempos t₀ (imediatamente após a irradiação), t₂₄ (24 horas após a irradiação) e t₄₈ (48 horas após a irradiação).

2.15 Ensaio de viabilidade celular após fotobiomodulação e terapia fotodinâmica

As células A375 e MCF7 foram semeadas na concentração de 1×10^5 células/mL (2×10^4 /poço) na placa de 96 poços (Fisher Scientific, USA) por 24 h a 37 °C sob 5% CO₂. As células foram então incubadas com os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] com diferentes concentrações (0,10 – 1,00 μ M). O experimento foi realizado em 4 grupos de tratamentos diferentes:

- 1) Escuro: as células foram incubadas com os complexos e não receberam irradiação.
- 2) TFD: as células foram incubadas com os complexos por 4 horas. Após o período de incubação as células foram lavadas e irradiadas em 660 nm (3,0 J.cm⁻²)
- 3) PBM: as células foram incubadas com os complexos por 4 horas e durante o período de incubação as células ficaram expostas à PBM em 850 nm (4,6 J.cm⁻²).
- 4) PBM+TFD: as células foram incubadas com os complexos durante 4 horas sob estímulo da PBM em 850 nm (4,6 J.cm⁻²). Após esse período, as células foram lavadas e submetidas à TFD em 660 nm (3,0 J.cm⁻²).

Após todos os grupos receberem tratamento, foram mantidos na estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 20 horas a viabilidade celular foi avaliada através do método de MTT.

2.16 Ensaio do ATP

O ensaio de atividade de ATP foi realizado de acordo com o kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Promega). As células A375 foram semeadas com 5×10^4 células em placas de 96 poços (Fisher Scientific, USA) de cultura e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. As células foram tratadas com 1,00 µM dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] por 4 horas. Um grupo para cada composto recebeu a PBM com irradiação em 850 nm durante o tempo de incubação de 4 horas (4,6 J.cm⁻²) enquanto os outros grupos permaneceram sem irradiação. O nível de ATP foi avaliado na presença e ausência de PBM. Para avaliação do ATP, adicionaram-se 50 µl do Reagente CellTiter-Glo® a 50 µl de RPMI branco. O conteúdo foi misturado durante 2 minutos num agitador para induzir a lise celular. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos para estabilizar o sinal luminescente e a luminescência foi registrada.

2.17 Influência da PBM na internalização celular (“uptake” celular)

A influência da PBM na internalização celular, ou “uptake” celular, para os complexos na linhagem A375 foi avaliada utilizando o sistema de ICP-MS Agilent 7900 (espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado), com potência 1100 W, com o fluxo de gás nebulizador de 0,52 L.min⁻¹. A internalização celular foi avaliada através da concentração de Ru (ppb) que internaliza nas células após 2 e 4 horas de incubação dos complexos, na presença e ausência da PBM em 850 nm. Assim, as células foram semeadas na garrafa T-25 na densidade de 7×10^5 células. Após 24 horas, as células foram tratadas com 1,00 µM dos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], incubando-os por 2 e 4 horas, na ausência e presença de irradiação em 850 nm. Os grupos que receberam irradiação foram estimulados durante todo o período de incubação. Dessa forma as células que foram incubadas por 2 horas receberam uma dose de 2,3 J.cm⁻² enquanto que as células que foram incubadas por 4 horas receberam a dose de 4,6 J.cm⁻². Em seguida cada garrafa foi lavada com PBS e as células foram coletadas com tripsina 1X. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* formado foi digerido com 50 µL de ácido nítrico puro. Como controle positivo, foi adicionado a cada amostra uma

solução de rênio de 1 ppb com 2% de ácido nítrico. O experimento foi realizado em triplicata. Uma curva de calibração utilizando uma solução de rutênio padrão (Inorganic VenturesTM) foi realizada utilizando-se as concentrações: 1000 ppm, 1000 ppb, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb, 100 ppt e 10 ppt.

2.18 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas usando Two-way ANOVA e correção de Bonferroni para avaliar a interação de fatores; A significância estatística foi obtida pelo teste One-way ANOVA e Newman-Keuls post-hoc ($p < 0,05$).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foi apresentado o uso de complexos de rutênio-ftalocianina como fotossensibilizadores na TFD para o tratamento de diversas linhagens tumorais. O estudo de citotoxicidade iniciou-se em melanoma murino B16F10 e devido ao resultado promissor com ausência de morte celular no escuro e alta morte celular após a TFD, mesmo com baixas concentrações do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], deu-se início a um estudo mais aprofundado em células tumorais de linhagem humana: melanoma humano (A375) e carcinoma de mama humano (MCF7).

Os estudos em A375 e MCF7 mostraram que os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] quando estimulados em 660 nm foram altamente citotóxicos também nas linhagens humanas e com baixa toxicidade no escuro. Um fator interessante é que os estudos de internalização celular pela técnica de ICPMS mostraram que uma porcentagem muito baixa dos complexos de rutênio é internalizada nas células, revelando um alto potencial citotóxico desses complexos como fotossensibilizadores.

A avaliação do efeito dos complexos na viabilidade celular em células não tumorais, 3T3, L929 e MCF10 mostraram que na ausência de irradiação não houve alta citotoxicidade, o que é interessante para a seletividade uma vez que esse tipo de terapia direciona a luz apenas para a região tumoral. Embora os complexos tenham apresentado citotoxicidade na presença da TFD para essas linhagens, observou-se que a morte celular foi um pouco menor quando se comparou com as células tumorais, sugerindo que as células não tumorais foram capazes de ativar mecanismos de resistências à TFD. No entanto, vale destacar que um estudo mais aprofundado sobre a menor vulnerabilidade das células não tumorais à TFD em relação às células tumorais deve ser realizado para maiores conclusões.

Comparando os estudos de viabilidade celular de ambos os complexos verificou-se que o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] provocou maior morte celular que o complexo

trans-[RuCl(Pc)(DMSO)], em ambas as linhagens tumorais, quando incubados por 24 horas e na fluência de $3,0 \text{ J.cm}^{-2}$ e $6,0 \text{ J.cm}^{-2}$ em 660 nm. Acredita-se que o *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] é capaz de potencializar a TFD devido à liberação do NO em ambiente redutimétrico, o qual sensibiliza as células que, em seguida, são submetidas à TFD sofrendo maior efeito do stress oxidativo. Assim, há um efeito sinérgico após a TFD promovido pela produção do NO e ¹O₂ a partir do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] comparado à produção de apenas ¹O₂ a partir do complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)]. De fato, a liberação de NO a partir do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] em ambiente celular foi comprovada tanto nos estudos fotoquímicos, utilizando sensor de NO, quanto nos ensaios de microscopia confocal utilizando o DAF como marcador de NO no interior celular durante a incubação com o composto.

Baseado nesses resultados, deu-se início à investigação do mecanismo de morte celular que esses complexos estimulam quando submetidos à TFD. E ainda, avaliou-se o efeito do NO nas vias bioquímicas para promover o efeito sinérgico na morte celular.

Assim, os estudos de sublocalização celular mostraram que o *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], e muito provavelmente o *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], se encontram no retículo endoplasmático. Uma vez que há stress oxidativo no RE, há a liberação de Ca⁺², ativando proteínas mitocondriais que estimulam vias bioquímicas para a apoptose. Os resultados apresentados para o ensaio do cometa mostraram que houve fragmentação do DNA quando as células A375 foram tratadas com os complexos e submetidas à TFD, o que também permitiu inferir que o mecanismo de morte celular para ambos os complexos mediante a TFD é predominantemente apoptose.

Esta hipótese foi confirmada pelos ensaios de *Western Blotting*, nos quais foi verificado em estudos com A375 que ambos os complexos matam as células mediante a TFD via apoptose intrínseca, uma vez que foi encontrado o aumento de caspase-3 clivada e aumento da expressão do citocromo c no citoplasma. Além disso, a expressão dessas proteínas foi maior para as células que foram tratadas com *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] do que aquelas que foram tratadas com *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], o que sugere que a liberação do NO concomitante com ¹O₂ ativa mais as células para o processo apoptótico que somente a presença do ¹O₂.

Foi discutido que o NO ocupa um duplo papel na regulação dos mecanismos de sobrevivência celular, podendo provocar um efeito tumoricida ou tumorigênico, dependendo de sua concentração. Dessa forma, investigou-se a influência do NO no processo de recorrência celular.

Os estudos de *Scratch Wound* mostraram que as células que foram tratadas *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], foram capazes de repopular a lesão 48 horas após a TFD, o que não foi

observado para as células que foram tratadas com complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)]. Esse resultado sugere que, de alguma forma, o NO está inibindo os mecanismos de sobrevivência celular, evitando a recorrência.

Baseado nessa observação, a expressão do NF-κB total e p-NF-κB foi avaliada por *Western Blotting* e foi observado que ambos diminuem nas células tratadas com TFD mediada pelos complexos. E ainda, a diminuição é ainda mais acentuada para as células que foram tratadas com o complexo nitrosil. Esse resultado evidencia que o NO inibe a ativação dos mecanismos de sobrevivência e por esse motivo não há recuperação celular.

Estes dados demonstram que o NO desempenha um papel importante no efeito sinérgico de morte celular quando se compara o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] com o *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], promovendo tanto a inibição do processo anti-apoptótico quanto ativando de maneira mais acentuada proteínas pró-apoptóticas.

Outro efeito sinérgico foi observado quando duas terapias envolvendo luz em dois comprimentos de ondas diferentes foram aplicadas concomitantemente nas células A375 e MCF7: PBM em 850 nm e TFD em 660 nm. Verificou-se que a PBM potencializou a TFD mediada pelos complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] via aumento da síntese de ATP que promove o aumento da internalização celular dos complexos e aumento da energia para o processo apoptótico e, via produção de NO que sensibiliza as células para o aumento do stress oxidativo na TFD, estimulando mais a via apoptótica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. H.; WOO, V. H.; HARLIN-JONES, C.; HESELI, A.; FROHNS, F. Application and possible mechanisms of combining LLLT (low level laser therapy), infrared hyperthermia and ionizing radiation in the treatment of cancer. In: **Mechanisms for Low-Light Therapy IX**. International Society for Optics and Photonics, 2014. p. 893202.

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

ADAM-KLAGES, S.; ADAM, D.; JANSSEN, O.; KABELITZ, D. Death receptors and caspases. **Immunologic research**, v. 33, n. 2, p. 149-166, 2005.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 9, p. 1053-1061, 1999.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 190, p. 15-28, 2014.

ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis. The role of the

endonuclease. **The American journal of pathology**, v. 136, n. 3, p. 593, 1990.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death, **International Journal of Molecular Science**, 16, 20523-20559, 2015.

BEDNARSKI, P. J.; MACKAY, F. S.; SADLER, P. J. Photoactivatable platinum complexes. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 7, n. 1, p. 75-93, 2007.

BEN-HURT, E.; DUBBELMAN, T. M. A. R. Cytoplasmic free calcium changes as a trigger mechanism in the response of cells to photosensitization. **Photochemistry and photobiology**, v. 58, n. 6, p. 890-894, 1993.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CANDIDO, N. M.; DE MELO, M. T.; FRANCHI, L. P.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; RAHAL, P.; CALMON, M. F. Combining Photodynamic Therapy and Chemotherapy: Improving Breast Cancer Treatment with Nanotechnology. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 994-1008, 2018.

CASAS, A.; DI VENOSA, G.; HASAN, T.; BATLLE, A. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 16, p. 2486-2515, 2011.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.

CHEN, A. C.; ARANY, P. R.; HUANG, Y. Y.; TOMKINSON, E. M.; SHARMA, S. K.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22453, 2011.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. **Trends in cell biology**, v. 18, n. 4, p. 157-164, 2008.

CHRISTIE, C.; POMEROY, A.; NAIR, R.; BERG, K.; HIRSCHBERG, H. Photodynamic therapy enhances the efficacy of gene-directed enzyme prodrug therapy. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 140-48, 2017.

DI PAOLO, C. *Aplicação do Ensaio do Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, Centropomus parallelus (Poey, 1860) expostos a β -naftoflavona. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.*

DYKSTRA, M.; CHERUKURI, A.; SOHN, H. W.; TZENG, S. J.; PIERCE, S. K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1,

p. 457-481, 2003.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FINK, C.; ENK, A.; GHOLAM, P. Photodynamic therapy—aspects of pain management. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 1, p. 15-22, 2015.

GANGOPADHYAY, M.; SINGH, T.; BEHARA, K. K.; KARWA, S.; GHOSH, S. K.; SINGH, N. D. Coumarin-containing-star-shaped 4-arm-polyethylene glycol: targeted fluorescent organic nanoparticles for dual treatment of photodynamic therapy and chemotherapy. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 14, n. 7, p. 1329-36, 2015.

GARG, A. D.; NOWIS, D.; GOLAB, J.; AGOSTINIS, P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 15, n. 9, p. 1050-71, 2010.

ĞB, J. G., NOWIS, D., SKRZYCKI, M., CZECZOT, H., BARAŃCZYK-KUŹMA, A., WILCZYŃSKI, G. M., MAKOWSKI, M.; MRÓZ, P.; KOZAR, K.; KAMIŃSKI, R.; JALILI, A.; KOPEĆ, M.; GRZELA, T.; JAKÓBISIAK, M. Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol A SUPEROXIDE DISMUTASE INHIBITOR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 407-414, 2003.

GUO, Y.; JIANG, K.; SHEN, Z.; ZHENG, G.; FAN, L.; ZHAO, R.; SHAO, J. A Small Molecule Nanodrug by Self-Assembly of Dual Anticancer Drugs and Photosensitizer for Synergistic near-Infrared Cancer Theranostics. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 50, p. 43508-19, 2017.

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.*

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work?. **Photochemistry and photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277, 2002.

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E.. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO journal**, v. 14, n. 22, p. 5579-5588, 1995.

KLEINOVINK, J. W.; VAN DRIEL, P. B.; SNOEKS, T. J.; PROKOPI, N.; FRANSEN, M. F.; CRUZ, L. J.; MEZZANOTTE, L.; CHAN, A.; LOWIK, C. W.; OSSENDORP, F. Combination of Photodynamic Therapy and Specific Immunotherapy Efficiently Eradicates Established Tumors. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 6, p. 1459-68, 2016.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nature medicine**, v. 6, n. 5, p. 513, 2000.

KWITNIEWSKI, M.; JUZENIENE, A.; GLOSICKA, R.; MOAN, J. Immunotherapy: a way to improve the therapeutic outcome of photodynamic therapy? **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 7, n. 9, p. 1011-7, 2008.

LESSENE, G.; CZABOTAR, P. E.; COLMAN, P. M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 12, p. 989, 2008.

LIU, Y.; MIYOSHI, H.; NAKAMURA, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. **International journal of cancer**, v. 120, n. 12, p. 2527-37, 2007.

LUO, T.; ZHANG, Q.; LU, Q. B. Combination of Near Infrared Light-Activated Photodynamic Therapy Mediated by Indocyanine Green with Etoposide to Treat Non-Small-Cell Lung Cancer. **Cancers**, v. 9, n. 6, 2017.

MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Inhibition of NF- κ B by S-nitrosylation. **Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1688-1693, 2001.

MARTINEZ-CABALLERO, S.; DEJEAN, L. M.; KINNALLY, M. S.; OH, K. J.; MANNELLA, C. A., & KINNALLY, K. W. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12235-12245, 2009.

MEDINA, L. P. *Modulação da morte mediada por FAZ em células tipo I e tipo II. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.*

MOHAMMAD, Ramzi M. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S78-S103.

NICOTERA, P.; LEIST, M.; FAVA, E.; BERLIOCCI, L.; VOLBRACHT, C. Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. **Brain Pathology**, v. 10, n. 2, p. 276-282, 2000.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOŁAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, v. 52, n. 2, p. 339-52, 2005.

OBERDANNER, C. B.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Glucose is Required to Maintain High ATP-levels for the Energy-utilizing Steps During PDT-induced Apoptosis. **Photochemistry and photobiology**, v. 76, n. 6, p. 695-703, 2002.

OKU, N.; ISHII, T. Antiangiogenic photodynamic therapy with targeted liposomes. **Methods in enzymology**, v. 465, p. 313-30, 2009.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral

photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. **Ultrastructural pathology**, v. 20, n. 2, p. 109-129, 1996.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; HAMMERL, P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS 4-PDT. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 172-177, 2002.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

RAPOZZI, V.; DELLA PIETRA, E.; BONAVIDA, B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. **Redox biology**, v. 6, p. 311-317, 2015.

RAPOZZI, V.; DELLA PIETRA, E.; ZORZET, S.; ZACCHIGNA, M.; BONAVIDA, B.; XODO, L. E. Nitric oxide-mediated activity in anti-cancer photodynamic therapy. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 30, p. 26-35, 2013.

RAPOZZI, V.; UMEZAWA, K.; XODO, L. E. Role of NF- κ B/Snail/RKIP loop in the response of tumor cells to photodynamic therapy. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 575-585, 2011.

REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 5, p. 1415-1430, 2000.

SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; XU, N.; HASAN, T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 14, n. 8, p. 1476-91, 2015.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 621-32, 2010.

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

TSAI, S. R.; YIN, R.; HUANG, Y. Y.; SHEU, B. C.; LEE, S. C.; HAMBLIN, M. R. Low-level light therapy potentiates NPe6-mediated photodynamic therapy in a human osteosarcoma cell line via increased ATP. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 12, n. 1, p. 123-130, 2015.

VAN STRATEN, D.; MASHAYEKHI, V.; DE BRUIJN, H.; OLIVEIRA, S.; ROBINSON, D. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.

VAUPEL, P.; THEWS, O.; HOECKEL, M. Treatment resistance of solid tumors. **Medical oncology**, v. 18, n. 4, p. 243-259, 2001.

WEBER, G.; CHARITAT, T.; BAPTISTA, M. S.; UCHOA, A. F.; PAVANI, C.;

JUNQUEIRA, H. C.; YACHONG G.; VLADIMIR A. B.; ROSANGELA I.; CARLOS M. M.; SCHRODER, A. P. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. **Soft Matter**, v. 10, n. 24, p. 4241-4247, 2014.

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.

YANO, T., MUTO, M., MINASHI, K., IWASAKI, J., KOJIMA, T., FUSE, N., TOSHIHIKO DOI, T.; KANEKO, K.; OHTSU, A. Photodynamic therapy as salvage treatment for local failure after chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma: a phase II study. **International journal of cancer**, v. 131, n. 5, p. 1228-1234, 2012.

Capítulo 5

Conclusão

CONCLUSÃO FINAL

O trabalho aqui desenvolvido veio corroborar com o desenvolvimento da TFD preconizada por vários grupos científicos ser a técnica clínica de maior amplitude no que tange o tratamento do câncer.

Os resultados obtidos a partir dos compostos rutênio-ftalocianina estudados neste trabalho mostraram que a rota sintética desenvolvida (PATENTE: BR 10 2016 004732-3), partindo-se de complexo *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] como precursor, mostrou ser eficiente para se obter produtos com maior rendimento, grau de pureza e, ainda, pode ser utilizada para a obtenção de uma gama enorme de compostos contendo ftalocianinas substituídas.

Os complexos propostos, *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], foram caracterizados por diversas técnicas analíticas, as quais em conjunto, mostraram que as propriedades dos compostos sintetizados foram condizentes com as características específicas de ftalocianinas coordenadas com rutênio no interior do anel macrociclo e com a presença dos ligantes axiais, nos confirmando a estrutura dos compostos.

No que diz respeito às propriedades fotofísicas e fotoquímicas, verificou-se que ambos os complexos apresentaram alta estabilidade em 660 nm, o que é vantajoso para aplicabilidade da TFD. Em relação à produção de ERO sob fotoestímulo, ambos os compostos produziram OH• e ¹O₂ quando irradiados em 660 nm. O complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] apresentou Φ_Δ= 0,67 enquanto o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(ONO)] apresentou Φ_Δ= 0,11. Esta segunda espécie foi capaz de liberar NO em ambiente intracelular, além de produzir ¹O₂ sob fotoestímulo, o que foi de extrema relevância para os estudos fotobiológicos.

Assim, os estudos fotobiológicos mostraram que os complexos *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)] e *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] apresentaram alta citotoxicidade, mesmo em baixas concentrações nas linhagens tumorais B16F10, A375 e MCF7 sob irradiação no comprimento de onda de 660 nm. Ressalta-se ainda que estas espécies apresentaram baixas ou nenhuma citotoxicidade na ausência de irradiação, tanto nas linhagens tumorais, quanto nas linhagens não tumorais 3T3, L929 e MCF10. A seletividade observada torna-se propícia para experimentos *in vivo* visando aplicação deste sistema clinicamente, uma vez que a TFD é aplicada direcionando a luz apenas para a região tumoral.

No que tange à investigação da hipótese inicial, verificou-se que o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] apresentou maior citotoxicidade em ambas as linhagens A375 e MCF7 em comparação ao complexo *trans*-[RuCl(Pc)(DMSO)], quando incubados em 24 horas e irradiados por 3,0 J.cm⁻² e 6,0 J.cm⁻² em 660 nm. Esses resultados confirmaram que foi

possível potencializar a TFD a partir do efeito sinérgico do NO e $^1\text{O}_2$ produzidos pelo complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] sob fotoestímulo em 660 nm.

Baseado nesses resultados, o mecanismo de morte celular que esses complexos são capazes de ativar mediante a TFD foi investigado e verificou-se que os complexos se encontram sublocalizados no retículo endoplasmático, o que estimula proteínas mitocondriais a ativarem o processo apoptótico. Essa evidência foi comprovada nos ensaios de *Western Blotting* uma vez que foi encontrado o aumento de caspase-3 clivada e aumento da expressão de citocromo c no citoplasma, quando as células foram tratadas com os complexos e fotoestimuladas em 660 nm. Destaca-se ainda que a presença do NO parece ativar vias bioquímicas pelas quais o processo apoptótico é mais pronunciado, o que foi verificado nos ensaios utilizando a espécie *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)].

O papel do NO em processo de sensibilização das células para promover o efeito sinérgico observado foi avaliado. Os estudos de *Scratch Wound* mostraram que o NO apresentou algum efeito na inibição dos mecanismos de sobrevivência celular, uma vez que as células tratadas com o complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] não foram capazes de repopular a lesão mesmo 48 horas após a TFD. Dessa forma, a expressão de NF-κB total e p-NF-κB relacionados com a ativação da sobrevivência celular foi avaliado por *Western Blotting* e verificou-se que ambos os complexos, após a TFD, são capazes de inibir tais fatores de transcrição, sendo que a inibição pelo complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)] é mais acentuada.

Portanto, acredita-se que o efeito sinérgico na morte celular do complexo *trans*-[Ru(NO)(Pc)(NO₂)], na TFD, é devido a sensibilização que o NO promove nas células tumorais, tanto ativando de maneira mais acentuada a cascata de sinalização pró-apoptótica quanto inibindo o processo anti-apoptótico que resultaria na recuperação celular.

Outra estratégia apresentada para potencializar a TFD foi a fotoestimulação em duplo comprimento de onda (PBM em 850 nm + TFD em 660 nm). O efeito sinérgico na morte celular nas linhagens A375 e MCF7 foi observado quando a PBM foi aplicada previamente à TFD mediante o uso de complexos rutênio-ftalocianina. Aparentemente, os resultados mostraram que a PBM foi capaz de potencializar a TFD por estimular a síntese de ATP, aumentando a internalização celular dos complexos e produzindo energia para o processo apoptótico. Além disso, foi comprovado que a PBM estimula a produção de NO endógeno, o qual, conforme discutido, possui uma importante participação no processo de sensibilização celular, promovendo o aumento do stress oxidativo e nitrosativo durante a TFD.

No que concerne a proposta inicial concluiu-se que, em conjunto, estes resultados demonstraram que o uso de metal-fotosensibilizador é *sui generis* em relação à aplicação clínica, tanto pelo ponto de vista de fotoestabilidade quanto de efeito sinérgico baseado na

produção de ERON. Desta feita, a combinação de terapia por irradiação luminosa, descrita neste trabalho, é uma estratégia potencialmente promissora, que poderia ser relevante para a TFD no futuro.