UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas de liberação contendo um complexo nitrosilo de rutênio
como doador de NO para a terapia fotodinâmica tópica**

Danielle Cristine Almeida Silva de Santana

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas de liberação contendo um complexo nitrosilo de rutênio
como doador de NO para a terapia fotodinâmica tópica**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Danielle Cristine Almeida Silva
de Santana

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2010

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.

De Santana, Danielle Cristine Almeida Silva
Sistemas de liberação contendo um complexo nitrosilo
de rutênio como doador de NO para a terapia fotodinâmica
tópica. Ribeirão Preto, 2010.

149 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna.

1. Complexos nitrosilo de rutênio. 2. Óxido nítrico. 3. Aplicação
tópica. 4. Nanopartículas poliméricas. 5. Iontoforese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danielle Cristine Almeida Silva de Santana

Sistemas de liberação contendo um complexo nitrosilo de rutênio como doador de NO para a terapia fotodinâmica tópica

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Profa Dra Renata Fonseca
Vianna Lopez

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus **PAIS**, Djanyr e Denize, que sempre me incentivaram, aguentando firme os quase 3000 quilômetros de distância... Amo vocês.

Aos meus **IRMÃOS**, Beбето e Xando, amigos acima de tudo e para sempre.

Ao meu **MARIDO**, Fernando, por estar presente em minha vida, há quase onze anos.... Por ter aguentado meus sábados, domingos e feriados trabalhando, me apoiando, e me ajudando sempre. Por todo o sofrimento passado, ao ficarmos em cidades separados, afastando, mesmo que só fisicamente, a nossa família.... Sem você, eu não teria realizado esse sonho.

Aos, meus **FILHOTES**, João e Mariana, meus amores, os melhores presentes de Deus.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopez, não só por sua orientação, sempre com muita dedicação, mas por ter permitido a realização deste sonho. Agradeço a oportunidade e a confiança em mim prestada, sempre.

Às amigas Luciana e Stephânia, pela sincera amizade e agradável convivência, incluindo as nossas “calorosas” discussões, não necessariamente científicas.

A Franciane e Deise, não só por sua amizade, mas também por dividirem comigo diversas frustrações e conquistas, ao longo de praticamente toda a etapa experimental deste trabalho.

A Patrícia, Henrique e José Orestes, técnicos dos Laboratórios de Tecnologia Farmacêutica, sempre prontos a ajudar.

Aos demais colegas do laboratório, Guilherme, Taís, Joel e Paola, pelo convívio pessoal e profissional ao longo deste período.

As técnicas Ana Paula e Juliana do Laboratório de Química Analítica, pela ajuda imprescindível na parte química e fotoquímica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana, pelo incentivo, e por ser um exemplo de amor à pesquisa.

À Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca, por ter me cedido a infra-estrutura de seu laboratório, durante a realização dos estudos de cultura de células.

Aos amigos Vanessa, Tiago, Ana Carolina e Rodrigo, que ganhei em Ribeirão Preto e espero ter por perto, sempre.

Àqueles que nos deram um “gostinho” de casa, Marcela, Gabi, dona Teresinha e Luiz, nossa família ribeirão pretana.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca e às funcionárias Ana Lúcia, Eleni e Rosana pelo apoio e colaboração durante meu trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido, na forma de bolsa de doutorado.

RESUMO

DE SANTANA. D. C. A. S. **Sistemas de liberação contendo um complexo nitrosilo de rutênio como doador de NO para a terapia fotodinâmica tópica.** 2010. 149f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O NO é uma molécula endógena, envolvida em numerosos processos fisiológicos e patológicos. Diversas substâncias capazes de liberar NO *in vivo* têm sido estudadas, incluindo os complexos nitrosilo de rutênio, como o $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdqi-COOH})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$, capaz de liberar NO após fotoestímulo. Considerando que as funções específicas do NO dependem de sua localização e cinética de liberação, e que a sua aplicação tópica pode evitar possíveis efeitos colaterais, o objetivo deste trabalho foi estudar a absorção cutânea passiva e iontoforética do complexo $[\text{Ru}(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, assim como a do NO dele liberado. A atividade citotóxica do complexo também foi estudada em cultura de células tumorais A431 na presença e ausência de luz e de corrente elétrica. Foi desenvolvido e validado um método analítico para a quantificação do complexo de rutênio por CLAE e estudos de pré-formulação de solubilidade, coeficiente de partilha e estabilidade do complexo foram realizados antes dos estudos de penetração cutânea. O complexo de rutênio manteve-se estável em solução aquosa a temperatura ambiente até o período de 48h, mas instável em contato com a pele inteira, com a degradação de 61% após 8h. Em contato apenas com o estrato córneo (EC), no entanto, a degradação do complexo não foi considerada significativa após 4 h. A aplicação de uma corrente elétrica fraca a uma solução do complexo em pH fisiológico não alterou a estabilidade do mesmo, que não apresentou degradação significativa por 6h. Nos estudos de penetração passiva, observou-se por CLAE e por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado (ICP-MS) que o complexo foi capaz de penetrar o EC sem sofrer degradação, mas liberando parte do NO quando em contato com a epiderme viável. A aplicação da iontoforese aumentou significativamente a quantidade de rutênio na epiderme viável e solução receptora (6 e 15 vezes respectivamente), indicando maior penetração do complexo. O complexo Ru-NO assim como seu aquo complexo (formado após liberação do NO), não apresentaram citotoxicidade às células A431, na ausência de luz. A irradiação das células incubadas com o complexo, passivamente, em 377 e 532nm com diferentes doses também não acarretou morte celular significativa. No entanto, a aplicação de corrente elétrica constante ($0,3\text{mA cm}^{-2}$) seguida de incubação por 4h com o complexo levou a morte celular de aproximadamente 50% das células A431 após irradiação em 377 nm com a dose de 10J cm^{-2} . Para atingir este mesmo resultado com a irradiação em 532nm foi necessário aumentar o tempo de incubação com o complexo para 24h. Conclui-se, resumidamente, que a corrente elétrica aumentou a entrada do complexo na pele e nas células, levando a liberação de maior quantidade de NO dentro delas, com consequente morte celular. A liberação do NO do complexo estudado ocorre não apenas por estímulo luminoso mas também por reações de oxi-redução quando em contato com a pele ou com a cultura de células estudadas. Sendo assim, propõe-se a encapsulação deste complexo em sistemas de liberação com o intuito de controlar a liberação do NO. Experimentos preliminares de nanopartículas contendo o complexo estão descritos no Apêndice 1 desta tese.

Palavras chave: Complexos nitrosilo de rutênio; óxido nítrico; aplicação tópica; iontoforese

ABSTRACT

DE SANTANA, D. C. A. S. **Drug delivery system containig a nitrosyl ruthenium complex intended for topical photodinamyc therapy.** 2010. 149p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

NO is an endogenous molecule that is involved in numerous physiological and pathological processes. Several compounds capable of releasing NO in vivo have been studied, including nitrosyl ruthenium complexes such as the $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdqi-COOH})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ that is capable of releasing NO after photo-stimulus. Because the specific role of NO depends on its location and kinetics of release, and its topical application may avoid possible side effects, the aim of this work was to study the passive and the iontophoretic skin absorption of the $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdqi-COOH})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ complex, as well as its NO release. The cytotoxic activity of the complex was also studied in A431 tumor cells in the presence and absence of light and electrical current. An analytical method for the quantification of the ruthenium complex by HPLC was developed and validated; studies of pre-formulation such as solubility, partition coefficient and stability of the complex were also performed before the penetration studies. The ruthenium complex was stable in aqueous solution at room temperature for 48 hours, but unstable in contact with the full-thickness skin (61% was degraded after 8 h). However, the complex's contact for 4 h with the stratum corneum (SC) alone did not lead to the complex degradation. The application of a weak electric current in a solution of the complex at physiological pH did not affect its stability, which showed no significant degradation for 6 h. In the passive penetration studies it was observed, by HPLC and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), that the complex was able to penetrate the SC without degradation, but with some NO release when in contact with the epidermis. The application of iontophoresis significantly increased the amount of ruthenium in the viable epidermis and in the receiver solution (6 and 15 times, respectively), indicating greater complex penetration. The nitrosyl ruthenium complex and its aquo complex (formed after release of NO) showed no cytotoxicity to A431 cells in the absence of light. The irradiation of the cells incubated with the complex, passively, in 377 and 532 nm with different doses also did not cause significant cell death. However, the application of a constant electric current (0.3 mA cm^{-2}) for 30 min followed by incubation for 4 h with the complex led to approximately 50% of A431 cell death after irradiation at 377 nm with a dose of 10 J cm^{-2} . To achieve this same result with irradiation at 532 nm it was necessary to increase the incubation time with the complex for 24 hours. In summary, the electric current increased the nitrosyl ruthenium complex skin and cell penetration, leading to release of higher amounts of NO into them, with consequent cell death. Furthermore, the release of NO from the ruthenium complex is showed to happen not only by light stimuli but also by redox reactions when it is in contact with the skin or with the culture of cells studied. Therefore, we propose the encapsulation of this complex in delivery systems in order to control the release of NO. Preliminary experiments with nanoparticles containing the complex are described in Appendix 1.

Keywords: nitrosyl ruthenium complexes, nitric oxide, topical application, iontophoresis

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>2. REVISÃO DA LITERATURA</u>	3
2.1 FOTOTERAPIA.....	3
2.2 ÓXIDO NÍTRICO.....	5
2.3 COMPLEXOS DE RUTÊNIO E $[\text{Ru}(\text{BDQI-COOH})(\text{TERPY})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	6
2.4 PELE.....	9
2.5 IONTOFORESE.....	13
2.6 CULTURA DE CÉLULAS	15
2.6.1 APLICAÇÕES E TESTE CITOTOXICIDADE	17
2.6.2 APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA EM ESTUDOS DE CULTURA DE CÉLULAS – ELETROPORAÇÃO	19
2.7 NO EM CULTURA DE CÉLULAS	20
<u>3. CONCLUSÕES</u>	23
<u>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	25

1. Introdução

O Óxido Nítrico (NO) é uma molécula endógena, envolvida em numerosos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas. Dessa forma, diversas substâncias capazes de liberar NO *in vivo* têm sido estudadas, incluindo os complexos nitrosilos de rutênio, como o [Ru(bdqj-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃, capaz de liberar NO após estímulo luminoso ou eletroquímico.

Considerando que as funções específicas do NO são definidas por sua localização e cinética de liberação, e que a sua aplicação tópica, no local de ação requerida pode evitar possíveis efeitos colaterais, a administração tópica do complexo [Ru(bdqj-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃ pode ser uma alternativa interessante visto que a própria pele pode ser o local de ação do NO, devido às suas relatadas ações antimicrobiana (ORMEROD *et al.*, 1999; WELLER *et al.*, 2001; GHAFARI *et al.*, 2005; GHAFARI *et al.*, 2006), no processo de cicatrização (BOHL-MASTERS *et al.*, 2002; WITTE *et al.*, 2002) e antitumoral, concentração-dependente (WINK *et al.*, 1998; TRIKHA *et al.*, 2001).

Entretanto, as características físico-químicas deste complexo, como o seu alto peso molecular (947 g mol⁻¹) e a presença de carga residual positiva em sua estrutura, devem dificultar a sua penetração através da pele. Uma estratégia interessante para transpor essas adversidades é empregar a iontoforese, método físico baseado na passagem de uma corrente elétrica constante de baixa intensidade para aumentar a penetração de uma substância através da pele.

Neste contexto específico, além da necessidade do desenvolvimento de um sistema transportador adequado para o complexo em estudo (como a aplicação da iontoforese p. ex.), existe também a necessidade de avaliar tanto a liberação e penetração cutânea do complexo [Ru(bdqj-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃ quanto a liberação controlada do NO. Considerando que a aplicação tópica dos sistemas desenvolvidos pode ser promissora para o tratamento de câncer de pele do tipo não-melanoma, a ação do complexo nitrosilo de rutênio assim como do NO liberado a partir deste em estudo de cultura de células, empregando a linhagem celular A-431, de células de carcinoma epidermóide também é uma abordagem importante.

Portanto, neste trabalho foi estudado o emprego da iontoforese na penetração cutânea do complexo nitrosilo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e a ação deste complexo e do NO liberado por fotoindução em cultura de células A-431 foi também avaliada.

2. Revisão da Literatura

2.1 Fototerapia

A Fototerapia pode ser definida pelo emprego da luz visível ou próxima ao visível como agente terapêutico na clínica médica (CARLOS, 2007; LEDO & LEDO, 2003), e tem sido usada há séculos para o tratamento de doenças de pele (ROELANDTS, 2002; ZANOLLI, 2003; KEMÉNY & KORECK, 2007; SERRANO-PÉREZ *et al.*, 2007). Atualmente, a Fototerapia é de fato considerada a principal estratégia terapêutica em Dermatologia (SERRANO-PÉREZ *et al.*, 2007).

As modalidades terapêuticas mais amplamente utilizadas em Fototerapia incluem: (i) a Terapia UVB, (ii) a Fotoquimioterapia, incluindo a Terapia Fotodinâmica, (iii) a Terapia UVA – 1 e (iv) as intervenções terapêuticas empregando laser em vários comprimentos de onda. Estas diferentes alternativas terapêuticas podem apresentar alguns mecanismos bioquímicos em comum, como a produção de oxidantes na pele e nas membranas mitocondriais, mas diferem nos cromóforos empregados como alvos para os fótons de energia (ZANOLLI, 2003).

A Fotoquimioterapia é uma das formas mais efetivas de Fototerapia para o tratamento da psoríase e de diversas outras doenças da pele (ZANOLLI, 2003). Nela, a administração de uma substância que atua como fotosensibilizador é combinada com a aplicação de luz (ZANOLLI, 2003; SERRANO-PÉREZ *et al.*, 2007). O fotosensibilizador deve apresentar toxicidade negligenciável no escuro e ser ativo com a absorção de radiação ultravioleta, visível ou no infravermelho próximo (CARLOS, 2007; SERRANO-PÉREZ *et al.*, 2007). A absorção de luz por este cromóforo inicia uma cadeia de eventos fotoquímicos, com conseqüências terapêuticas (SERRANO-PÉREZ *et al.*, 2007).

A administração tópica de substâncias naturais, combinada à exposição à luz solar para a produção de efeitos terapêuticos e reações fototóxicas têm sido descrita há séculos. Os egípcios já empregavam o psoralen tópico, na forma de extrato de plantas, no tratamento de doenças pigmentares (ROELANDTS, 2002; ZANOLLI, 2003). No entanto, o primeiro uso médico moderno da Fotoquimioterapia é creditado à El Mofty, que usou o 8-metoxipsoralen como molécula isolada, aplicada topicamente (ROELANDTS, 2002; ZANOLLI, 2003). O desenvolvimento da Fotoquimioterapia sistêmica ocorreu com a descoberta de que a administração oral do psoralen, inicialmente usada para tratar

vítiligo, era capaz de promover efeitos positivos também no tratamento da psoríase (ZANOLLI, 2003).

Na Fotoquimioterapia, dois mecanismos fotoquímicos básicos são responsáveis pela atividade fototerapêutica: (i) o fotossensibilizador pode reagir diretamente com as bases do DNA, formando adutos estáveis que interferem na atividade genética ou (ii) o fotossensibilizador pode transferir seu excesso de energia para o oxigênio molecular disponível no ambiente celular, gerando oxigênio singlete altamente reativo, capaz de destruir tecidos-alvo, sendo este protocolo conhecido como Terapia Fotodinâmica (TFD) (SERRANO-PÉREZ *et al.*, 2007).

Atualmente, uma ampla variedade de tumores envolvendo vários órgãos, incluindo cabeça e pescoço, sistema nervoso central, pulmão, olho, esôfago, trato gastrointestinal e trato geniturinário têm sido tratados com TFD (DE ROSA & BENTLEY, 2000). Também recentemente, a TFD tem sido empregada para combater o câncer de pele do tipo não-melanoma, e quando comparada com os outros tratamentos, oferece a vantagem de ser um método efetivo e seletivo, destruindo o tecido doente e preservando os tecidos saudáveis (KONAN *et al.*, 2002). Dentre as neoplasias existentes, é no tratamento de câncer de pele que a TFD preconiza excelentes resultados devido à facilidade de exposição desse órgão à luz (DE ROSA & BENTLEY, 2000).

A eficiência da TFD depende das características do fotossensibilizante, da formulação farmacêutica, da localização física e da quantidade acumulada de fotossensibilizante no tumor, do tempo de ativação com luz, da dose de luz incidida e da quantidade de oxigênio presente (KONAN *et al.*, 2002). Desta forma, os pré-requisitos para um fotossensibilizante ideal incluem sua pureza química, curto tempo de intervalo requerido entre a sua administração e o acúmulo máximo no tecido tumoral, a ativação em comprimento de luz com penetração adequada no tecido e rápida eliminação do organismo (DE ROSA & BENTLEY, 2000; STOCHER *et al.*, 1998). As principais classes de sensibilizantes são os derivados da porfirina, as clorinas, as ftalocianinas e os porfírenos. Embora um razoável número de fotossensibilizantes tenha sido testado na TFD clínica e experimental, *in vivo* e *in vitro*, nenhum mostra ainda propriedades ideais.

Em vários centros de pesquisa, 80% do estudo do tratamento de tumores com a TFD é baseado na utilização do oxigênio singlete como espécie reativa (DE ROSA &

CRUTCHLEY, 2002). A hipoxia das neoplasias de grande porte é, portanto, grande barreira para o sucesso da TFD como terapia efetiva na fase clínica. Com isso, há uma constante procura por outras espécies reativas úteis, como radicais livres derivados dos fotossensibilizantes utilizados, bem como outras espécies radicalares independentes do oxigênio. Uma possibilidade é utilizar compostos, como os nitrosilo de rutênio, que tenham a propriedade de liberar NO quando estimulados fotoquimicamente. O NO além de possuir natureza radicalar, reage com o ânion superóxido (O_2^-) presente no meio e forma o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é uma espécie altamente reativa e faz parte de uma classe de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONS) (HEROLD & KOPPENOL, 2005; IGNARRO, 2000).

2.2 Óxido Nítrico

Em 1987, IGNARRO *et al.* e MONCADA *et al.* identificaram experimentalmente o “fator de relaxamento endotélio-dependente” como sendo o óxido nítrico (NO), conforme originalmente proposto em 1986 por Furchgoff e Ignarro *et al.* (LANCASTER JR, 1997). A descoberta do papel do NO no organismo rendeu então aos cientistas norte-americanos Robert Furchgoff, Ferid Murad e Louis Ignarro o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1998, multiplicando as pesquisas relacionadas a essa molécula (ERENO, 2003).

O NO é um gás incolor, com solubilidade de $2-3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ em água (WANG *et al.*, 2002), de natureza radicalar, sendo altamente reativo (VALLANCE & COLLIER, 1994; JANERO, 2000; SAUAIA *et al.*, 2003b). Possui tempo de meia vida de poucos segundos, e tem reação muito favorável com outros radicais (VALLANCE & COLLIER, 1994). É uma molécula endógena, que está presente em numerosos processos biológicos, incluindo além da regulação do tonus vasomotor, a inibição da agregação plaquetária e a modulação da resposta imune e endócrina (WANG *et al.*, 2002; SAUAIA *et al.*, 2003b). Está também implicado na indução da apoptose e em numerosas funções neuronais e não neuronais do sistema nervoso central e em tecidos periféricos (SHISHIDO *et al.*, 2003). Além disso, o NO é a menor molécula classificada como mensageiro biológico. Nesta função, ele não depende de transportadores específicos nem de canais intracelulares – a molécula de NO difunde livremente pela célula, com a mesma facilidade em meio

hidrofílico e em meio lipofílico. Seus efeitos biológicos são dependentes do local e origem de produção, assim como de sua concentração, e sua atuação biológica deve-se à interação química com outras moléculas biológicas, dependendo muito mais de suas propriedades físico-químicas do que de sua conformação espacial (SAUAIA, 2001; SAUAIA *et al*, 2003b; SAUAIA *et al*, 2003c; NAPOLI & IGNARRO, 2003).

O excesso ou a falta de NO no organismo pode ocasionar diversas patologias (SHISHIDO *et al*, 2003). Sendo assim, fármacos a base de NO têm sido usados há mais de um século. A nitroglicerina, por exemplo, utilizada há muitos anos para o tratamento da aterosclerose coronária acompanhada de hipertensão e dor no peito (angina), contém o NO como substância ativa (VALLANCE & COLLIER, 1994).

O uso de compostos doadores de NO, capazes de produzi-lo *in situ*, como a nitroglicerina (nitrato orgânico), é uma estratégia utilizada para evitar a instabilidade e inconvenientes na manipulação de soluções aquosas de NO. Além dos nitratos orgânicos, mais utilizados, muitas outras substâncias podem originar NO *in vitro* ou *in vivo*, como os metalonitrosil complexos, as N-nitrosaminas e os nitrosotióis, dentre outros (WANG *et al*, 2002). O principal objetivo da síntese de diferentes doadores de NO é modular a cinética de liberação do mesmo (SAUAIA & SILVA, 2003). A maioria dos sistemas doadores envolve a formação de NO por simples dissociação ou por uma complexa série de reações, freqüentemente requerendo metabolismo celular. No entanto, para controlar o local e o momento da liberação é importante produzir compostos capazes de liberar NO quando submetidos a algum estímulo externo ou interno. Uma estratégia é empregar indução luminosa em comprimento de onda apropriado para liberação do NO de metalonitrosil complexos, como tem sido observado para alguns complexos de rutênio-NO (SAUAIA *et al*, 2003c, BERTOLINI *et al*, 2003). Geralmente, fármacos baseados neste metal exibem menor toxicidade, quando comparados a outros metais (SAUAIA & SILVA, 2003).

2.3 Complexos de rutênio e [Ru(bdqj-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃

Dentre os estudos realizados com complexos de rutênio, observa-se que é bastante intensa a busca de métodos capazes de liberar NO no organismo a partir de complexos nitrosilo de rutênio. Uma das estratégias utilizadas para isso é a liberação

fotoquímica do NO, de forma que diversos complexos de rutênio tiveram seu comportamento fotoquímico amplamente investigado.

Alguns metalonitrosil complexos têm sido estudados como liberadores de NO (TOGNILO *et al.*, 2001; SAUAIA & SILVA, 2003; SAUAIA *et al.*, 2003b; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Muitos destes estudos são relacionados aos complexos nitrosilo de rutênio, como as espécies *cis*-[RuL(bpy)₂(NO)]³⁺, onde L = piridina, 4-picolina ou acetilpiridina, que apresentam estabilidade térmica, e sob estímulo luminoso ou eletroquímico são capazes de liberar NO (SAUAIA & SILVA, 2003; SAUAIA *et al.*, 2003b). Estes complexos podem interagir com o íon hidroxila para a formação do respectivo nitro complexo (SAUAIA & SILVA, 2003) que também tem potencial como liberadores de NO em condições fisiológicas (DE LIMA *et al.*, 2005).

O complexo de rutênio [Ru(bdqj-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃ (Figura 1), por exemplo, apresenta estabilidade química em pH fisiológico e térmica na ligação Ru^{II}-NO⁺, além de capacidade de liberar NO com indução luminosa (Fototerapia) ou por redução eletroquímica do NO⁺ coordenado (DE LIMA, 2006; DE LIMA *et al.*, 2006).

Figura 1: Estrutura química do complexo [Ru(bdqj-COOH)(terpy)(NO)] (P. M. 947 g mol⁻¹)

Os dados espectrofotométricos na região do UV-visível deste complexo, estudado no presente trabalho estão relatados no Quadro 1. Durante sua fotólise, ocorre uma diminuição da banda na região de 360 nm e o aparecimento de uma na região de 500 nm, devido ao processo de saída do ligante NO⁰ e conseqüente

substituição do NO por uma molécula de H₂O dando origem às espécies [Ru^{II}(H₂O)(bdqi-COOH)(terpy)]²⁺ e [Ru^{III}(H₂O)(bdqi-COOH)(terpy)]³⁺ (Esquema 1) (DE LIMA *et al.*, 2006).

Quadro 1: Dados espectrofotométricos na região do UV-visível para o complexo de rutênio [Ru(bdqi-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃ em solução aquosa.

Complexo	λ nm (log ϵ)
[Ru(bdqi-COOH)(terpy)(NO)] ³⁺	285(4,39); 324(4,27); 358(4,15); 510(3,65)

Esquema 1: Reatividade fotoquímica do complexo [Ru(bdqi-COOH)(terpy)(NO)](PF₆)₃ sob irradiação em 355nm.

Diante do exposto, a administração tópica desses compostos visando a penetração controlada do NO parece ser uma proposta promissora.

A administração deste e de outros compostos doadores de NO é, no entanto, limitada devido não só à instabilidade de alguns desses compostos em meios biológicos mas também a falta de especificidade, resultando em numerosos efeitos colaterais (WELLER, 2003). O desenvolvimento de sistemas de liberação adequados para os doadores de NO, bem como o local correto de administração dos mesmos, são estratégias farmacotécnicas que podem diminuir ou até evitar os problemas anteriormente citados. Por exemplo, a administração tópica, direcionada, desses compostos tem sido proposta para (i) o tratamento de infecções fúngicas e virais (WELLER *et al* 2001, WELLER, 2003), (ii) o tratamento da Síndrome de Raynaud, como vasodilator, revertendo a vasoconstrição característica desta síndrome (TUCKER *et al*, 1999), (iii) outras condições de fluxo sanguíneo diminuído, como em enxertos de pele (WELLER, 2003), (iv) a cicatrização em diabéticos, inclusive com infecções associadas (WITTE *et al*, 1999; HARDWICK *et al*, 2001; BOHL MASTERS *et al*, 2002), (v) o auxílio no bronzeamento, com alguns estudos indicando a prevenção da morte celular por radiação UV (WELLER, 2003). Para que o NO chegue, no entanto, no local da pele onde a patologia se encontra, com mínimos efeitos colaterais e com concentração suficiente para que os efeitos desejados sejam alcançados, o desenvolvimento de sistemas de

liberação (nanopartículas poliméricas, por exemplo) e de técnicas de administração (iontoforese), que mantenham o doador de NO estável e não tóxico à pele até o momento da ação são necessários.

DE SANTANA *et al* (2010), com o objetivo de estudar a aplicação tópica do NO, demonstraram que o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(4-pic)](PF₆), incorporado em gel de hidroxietilcelulose, foi capaz de penetrar a camada do estrato córneo e possibilitar a liberação fotoinduzida do NO nas camadas da pele.

2.4 Pele

Além de ser considerado o maior órgão do corpo humano, a pele também é um órgão complexo, com no mínimo cinco tipos diferentes de células contribuindo para a sua estrutura, e outros tipos de células temporariamente presentes a partir dos sistemas circulatório e imunológico (MENON, 2002). Sua função natural é proteger as estruturas internas do organismo contra o ambiente externo hostil, incluindo as várias formas de poluição, temperatura, umidade e radiação, limitando a passagem de substâncias para o interior ou exterior do corpo, estabilizando a pressão e temperatura e mediando as sensações de calor, frio, toque e dor (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002; AULTON, 2005). A pele humana, representada na Figura 2, é composta de três camadas distintas: a epiderme celular, estratificada e avascular; a derme subjacente, formada por tecido conectivo e a hipoderme, camada de gordura subcutânea (MENON, 2002; AULTON, 2005).

Figura 2: Ilustração esquemática da pele e suas camadas (http://www.besthealth.com/besthealth/bodyguide/reftext/html/skin_sys_fin.html)

A camada subcutânea localiza-se abaixo da derme, e funciona como depósito de gordura além de isolante térmico e amortecedor mecânico. A derme (3 a 5mm de espessura) é composta por uma matriz extracelular (formada por mucopolissacarídeos) e fibras de colágeno e elastina. Nesta camada, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos estão presentes, além dos apêndices cutâneos (glândulas sudoríparas e unidades pilosebáceas), que aí se originam e se estendem até a superfície da pele. As glândulas sudoríparas produzem o suor, que tem a principal função de regular a temperatura. Os folículos pilosos desenvolvem-se praticamente por toda a pele, com exceção dos lábios, palmas e solas, e uma ou mais glândulas sebáceas abre-se dentro do folículo piloso (MENON, 2002; AULTON, 2005).

Acima da derme localiza-se a epiderme, constituída de queratinócitos (95%), melanócitos, células de Langerhans e mecanorreceptores. A epiderme estratificada (150 µm) pode ser dividida em quatro camadas distintas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e estrato córneo (MENON, 2002)

A **camada germinativa ou basal** origina as células epiteliais. É composta de uma única camada de células basais e células originadas a partir destas, transitoriamente.

Na **camada espinhosa**, corpos lamelares estão presentes, e é perfeitamente notável o aumento nos filamentos de queratina, em comparação à camada basal. Nas suas camadas celulares mais superiores, as células começam a achatar e alongar, assemelhando-se a camada granulosa.

Na **camada granulosa**, podem ser observados grânulos de queratina, que vão se tornando maiores nas camadas superiores, refletindo o aumento da síntese de queratina. A diferenciação celular progressiva, evidente pelo aumento da síntese protéica também é acompanhada do aumento da síntese de lipídeos. Ocorre então um processo de transição para a formação da primeira camada de corneócitos, que envolve uma maior produção de corpos lamelares, a condensação dos filamentos de queratina e a dissolução das organelas celulares.

Estas transformações químicas culminam na formação do **estrato córneo**, e se iniciam a partir da primeira camada (camada basal), onde as células mais jovens vão empurrando as células imediatamente superiores, até estas se depositarem na camada mais externa (MENON, 2002).

O estrato córneo é formado de corneócitos (queratinócitos diferenciados) mergulhados numa matriz lipídica, que representa a principal barreira na passagem de solutos através da pele (BARRY, 1983; LANGER, 1993; ROBERTS, 1997; BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002; AULTON, 2005).

Ao chegar à pele intacta, uma substância tem três vias potenciais de entrada no tecido viável: pelos folículos pilosos com suas glândulas sebáceas associadas, via ductos sudoríparos ou pelo estrato córneo contínuo existente entre estes apêndices, conforme pode ser observado na Figura 3 – A. Através do estrato córneo, as substâncias podem ser absorvidas a partir de duas microrrotas, as rotas inter e transcelular (Figura 3 – B). Pela rota transcelular, os solutos passam diretamente através das células córneas e da matriz lipídica intercelular, enquanto que pela rota intercelular, os solutos difundem-se ao redor dos corneócitos de uma maneira tortuosa, permanecendo constantemente no interior da matriz lipídica.

Figura 3: Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: (A) através dos apêndices cutâneos (adaptado de GERAS, 1990) e (B) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) (adaptado de MOSER et al., 2001).

Com a aplicação tópica de um dispositivo de liberação de fármacos, vários estágios devem ser transpostos para que ocorra a ação tópica ou ainda a absorção percutânea. Inicialmente, o fármaco precisa difundir através da formulação ou dispositivo aplicado em direção à pele. Em seguida, precisa particionar entre o dispositivo e o estrato córneo, para difundir através deste último, onde a substância pode ligar-se a um sítio de depósito e/ou continuar difundindo até a epiderme viável. Na epiderme, o fármaco pode ser metabolizado, ou interagir com o seu receptor (ação tópica). Após atravessar a derme, regiões de depósito adicionais e sítios metabólicos podem intervir à medida que o fármaco move-se para um capilar, para a remoção sistêmica. Uma parte da substância ativa pode ainda chegar à gordura subcutânea, dando origem a outro depósito. Uma porção do fármaco pode também alcançar camadas musculares mais profundas (AULTON, 2005). Vários fatores biológicos e físico-químicos podem interferir neste processo.

2.5 Iontoforese

A iontoforese é uma técnica não-invasiva, baseada na aplicação de um potencial elétrico que mantém uma corrente elétrica constante de baixa intensidade através da pele para facilitar a liberação de uma variedade de fármacos, carregados ou não, através de membranas biológicas, rumo à corrente sanguínea (WANG *et al.*, 2005).

Esta técnica, que se baseia no princípio geral da eletricidade de que cargas iguais se repelem e cargas opostas se atraem, é capaz de expandir a variedade de compostos que podem ser administrados através da via tópica e transdérmica. Dentre suas vantagens, podem ser citados: a possibilidade de liberação constante ou pulsátil do fármaco; o melhor controle da quantidade de fármaco liberado, uma vez que a liberação depende da corrente elétrica aplicada, da duração de aplicação desta corrente e da área exposta à corrente; a habilidade para ser usada visando ação sistêmica ou local; o aumento na permeação de moléculas polares assim como de compostos de alto peso molecular; a redução considerável na variabilidade inter e intra-pessoal, já que a taxa de penetração do fármaco é mais dependente da corrente elétrica aplicada do que das características do estrato córneo (WANG *et al.*, 2005).

A iontoforese consiste na passagem de uma corrente elétrica fraca ($\sim 0,5 \text{ mA/cm}^2$) por uma solução eletrolítica contendo o fármaco em contato com a pele. Um contra-eletródo colocado em qualquer lugar do corpo completa o circuito elétrico (AULTON, 2005). Com a aplicação da corrente, os cátions presentes na solução em contato com o ânodo (eletrodo positivo) se movem em direção ao cátodo (eletrodo negativo), enquanto os ânions presentes no cátodo se movem na direção oposta (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática da movimentação de íons e as reações eletroquímicas durante a iontoforese (adaptado de Kalia *et al.*, 2004).

Assim, de maneira geral, se o fármaco apresenta carga elétrica na formulação em contato com o eletrodo, ele atravessará a pele principalmente por **eletrorepulsão**. Além da eletrorepulsão, um outro mecanismo envolvido no transporte iontoforético de fármacos através da pele é a **eletrosmose**. Ela pode ser descrita como o fluxo convectivo de solvente, induzido pela passagem da corrente elétrica, no sentido do ânodo para o cátodo (GUY *et al.*, 2000). Este fluxo de solvente ocorre porque, quando em contato com uma formulação com pH acima de 4, a pele apresenta-se carregada negativamente (GUY *et al.*, 2000, KALIA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005), devido à ionização dos grupamentos carboxilatos dos aminoácidos nela presentes (KALIA *et al.*, 2004). Isto significa que espécies carregadas positivamente, como os íons Na^+ , são mais facilmente transportadas, na tentativa de neutralizar as cargas negativas da pele (WANG *et al.*, 2005). Para cada cátion transportado, um contra-íon, por exemplo, o Cl^- , move-se na direção oposta, do cátodo para o ânodo, para manter a eletroneutralidade do sistema. Entretanto, como o número de transporte do íon Na^+ é maior que o do Cl^- , há a diminuição da concentração de NaCl no compartimento catódico e um conseqüente aumento deste sal no ânodo, provocando uma diferença de gradiente

eletroquímico. Esta diferença gera o fluxo osmótico de água no sentido do ânodo para o cátodo, e pode assim permitir o transporte de moléculas neutras presentes no ânodo (WANG *et al*, 2005). Além disso, os cátions se beneficiam desta segunda força adicional à eletrorrepulsão. A importância relativa da eletrorrepulsão e da eletrosmose no transporte de fármacos depende das características físico-químicas e elétricas da membrana (pele) e do permeante (fármaco) (GUY *et al.*, 2000). Parâmetros como a concentração do fármaco na formulação, a intensidade da corrente elétrica aplicada e o pH também têm influência direta no fluxo iontoforético (KALIA *et al.*, 2004).

2.6 Cultura de células

Os estudos iniciais com culturas de tecido, creditados a Ross Harrison, em 1907, foram inicialmente planejados como artifício para estudar o comportamento de células animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir, durante a homeostase ou sob o stress de um experimento. Esta técnica foi inicialmente elaborada com fragmentos não dissociados de tecido, e o seu crescimento estava restrito a mitoses ocasionais de células migrantes deste fragmento. Entretanto, apenas com a introdução do uso profilático de antibióticos nas culturas celulares, o desenvolvimento de novas técnicas para remover as células dos frascos de cultura e de meios de cultura padronizados, quimicamente definidos, (tornando mais fácil a proliferação celular), na segunda metade do século 20, a cultura de células se tornou uma ferramenta amplamente disponível para diversos campos de pesquisa (FRESHNEY, 2005).

A partir de um fragmento de tecido, após sua adesão em um substrato sólido (cultura de explante primário), na interface substrato – meio de cultura pode ocorrer a migração espontânea de células, no plano deste substrato sólido. Para a obtenção de uma cultura de células primária, é necessária a dispersão (mecânica ou enzimática) desta excrescência do explante primário ou mesmo de um fragmento do tecido, em uma suspensão de células, que será então cultivada em monocamada aderida a um substrato sólido ou em suspensão no meio de cultura (FRESHNEY, 2005).

As amostras de tecido são invariavelmente heterogêneas e tem uma fração de baixo crescimento, mas são mais representativos dos tipos de células no tecido do qual foram derivados e na expressão das propriedades de tecidos específicos. A obtenção

de uma cultura primária é o primeiro de uma série de processos seletivos que pode culminar em uma linhagem de células relativamente uniforme. Depois do isolamento e obtenção da cultura primária, a primeira subcultura deve ser obtida, e após o primeiro subcultivo (ou passagem), a cultura primária torna-se conhecida como uma linha celular e pode ser propagada e subcultivada várias vezes. A cada passagem sucessiva, o componente da população com a capacidade de proliferar mais rapidamente irá gradativamente predominar, enquanto que as células com menor capacidade proliferativa vão sendo diluídas e conseqüentemente, eliminadas da linhagem. (MASTERS, 2000). Considerando que sob condições de cultivo *in vitro* as células passam por alterações acentuadas da sua atividade metabólica, mesmo uma cultura primária não pode ser considerada como verdadeiramente representativa do tecido de origem (SCHINDLER, 1969).

Para que se desenvolvam em cultura, as células necessitam de nutrientes específicos que são promovidos pelo meio de cultura celular (EAGLE, 1955). Em seu estudo pioneiro, Harrison (1907) utilizou plasma sanguíneo como substrato e meio de crescimento para fragmentos de fibras nervosas (FRESHNEY, 2005). O meio de cultura deve fornecer às células, nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e outros substratos essenciais a expressão de funções especializadas das células, sustentando o seu crescimento contínuo além de todos os nutrientes essenciais, reproduzindo, o melhor possível um ambiente que se assemelhe ao máximo àquele que elas dispunham *in vivo* (CRUZ *et al.*, 2009). Dentre os nutrientes essenciais, estão as matérias primas necessárias a síntese de novas células, substratos para o metabolismo energético, vitaminas, traços de minerais com função primordialmente catalítica e íons inorgânicos brutos, que possuem tanto função catalítica como fisiológica. Existem limites aceitáveis para cada um destes componentes, a fim de manter a osmolaridade e o pH adequados (FRESHNEY, 2005).

Também para a manutenção das células em cultura é necessário que a incubação ocorra numa atmosfera apropriada e controlada quanto à temperatura, a umidade e a composição da fase gasosa. A maioria das células requer uma atmosfera pobre em oxigênio, embora variável de acordo com as necessidades específicas das células em estudo. A concentração de CO₂, superior a da atmosfera normal, é

igualmente fundamental para o sucesso das culturas celulares, sendo frequentemente necessário adicionar este gás a atmosfera em que as células se encontram (CRUZ *et al.*, 2009)

2.6.1 Aplicações e teste citotoxicidade

O estudo em cultura de células oferece a possibilidade de observar as células em um ambiente artificial, sem a interferência nervosa e humoral, fatores presentes no organismo intacto. Além disso, durante a obtenção de uma cultura primária, as células são liberadas da arquitetura do tecido e assim, a influência do contato intercelular é muito reduzida ou completamente abolida (SCHINDLER, 1969). Assim, os estudos em cultura de células são particularmente úteis em diversas áreas, como na produção de vacinas antivirais, nas áreas de pesquisa relacionadas ao câncer, genética, imunologia, englobando as interações entre células ou com o ambiente e os mecanismos de controle celular na sua diferenciação e desenvolvimento, dentre diversas outras áreas (FRESHNEY, 2005).

A American Type Culture Collection (ATCC) é uma entidade privada, de pesquisa, sem fins lucrativos cuja missão centra-se na aquisição, autenticação, produção, preservação, desenvolvimento e distribuição de microrganismos padrão de referência, linhagens celulares e outros materiais para a pesquisa nas áreas das ciências da vida. Como um centro de recursos biológicos, o ATCC autentica as linhagens celulares e gerencia a logística de sua preservação a longo prazo e a distribuição das culturas celulares para a comunidade científica. A Figura 5 exemplifica a linhagem celular A 431, cultivada em monocamada, catalogada na ATCC.

Figura 5: Células aderentes de linhagem A-431 (ATCC: CRL 1555), originadas de carcinoma de células escamosas (<http://www.atcc.org>).

O cultivo de células é extremamente útil ao estudar fármacos cujos efeitos podem ser reconhecidos no nível molecular, uma vez que em comparação com os sistemas mais complexos (*in vivo*, por exemplo), o estudo em cultura de células oferece diversas vantagens, como o acesso mais fácil do fármaco às células, sem mudanças na concentração devido aos mecanismos de excreção, além da homogeneidade da população celular em um ambiente estritamente controlado (SCHINDLER, 1969). A fim de avaliar os danos celulares devido aos efeitos de fármacos, vários testes de toxicidade, podem ser aplicados (SCHINDLER, 1969).

Considerando que a toxicidade é um evento complexo *in vivo*, e devido a dificuldade de monitorar os efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro*, a maioria dos ensaios determina os efeitos no nível celular, ou citotoxicidade (FRESHNEY, 2005). Os ensaios de citotoxicidade determinam alterações nas vias metabólicas ou na integridade estrutural, induzidas por fármacos, que podem estar ou não diretamente relacionados à morte celular, enquanto que os ensaios de sobrevivência determinam o resultado final de tais alterações, que pode ser a recuperação celular ou sua morte. Teoricamente, o único índice de sobrevivência confiável em células proliferativas é a demonstração da sua integridade reprodutiva, como evidenciado pelos ensaios clonogênicos. Os parâmetros metabólicos podem também ser usados para determinação da sobrevivência se empregados após o tempo necessário para a recuperação metabólica da população celular, depois da exposição ao fármaco (MASTERS, 2000).

Alguns ensaios de citotoxicidade fornecem a possibilidade de interpretação instantânea dos resultados, ou mesmo após poucas horas, como, por exemplo, nos testes de integridade da membrana celular (por exemplo, de exclusão com corantes). Estes são denominados testes de viabilidade, e tem o intuito de prever a sobrevivência celular, ao invés de medi-la diretamente. De uma maneira geral, estes testes são adequados para identificar as células mortas, mas podem superestimar a sobrevivência a longo prazo (MASTERS, 2000; FRESHNEY, 2001).

Dentre os ensaios de viabilidade, a introdução dos ensaios empregando microplacas pode ser considerada estratégica, revolucionária. Além de fáceis de executar, estes testes são econômicos e de fácil automação, e um grande número de amostras pode ser manipulada simultaneamente, com relativamente poucas células por amostra (FRESHNEY, 2001). O teste de viabilidade verificado com MTT é o mais amplamente utilizado, e envolve o uso de um sal amarelo de tetrazol (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que é metabolizado no sal insolúvel azul de Formazan apenas pela atividade enzimática mitocondrial, nas células viáveis (MASTERS, 2000).

2.6.2 Aplicação de corrente elétrica em estudos de cultura de células – Eletroporação

Na década de 80, a permeabilização transitória de membranas celulares por aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem foi introduzida como técnica para facilitar a entrada de substâncias extrínsecas na célula (HAPALA, 1997). Nos experimentos de eletroporação, a suspensão de células é colocada entre dois eletrodos conectados a um gerador de alta voltagem. Com a aplicação de um pulso elétrico, ocorre a permeabilização das membranas celulares e sua extensão é regulada pela intensidade e duração do pulso elétrico. Conseqüentemente, esta abordagem tem sido rotineiramente empregada em biologia celular e molecular (TEISSIE *et al.*, 2005), para aumentar a captação celular de moléculas como DNA, anticorpos, enzimas e corantes (NICKOLOFF, 1995; CEZAMAR *et al.*, 2001).

Uma aplicação bastante interessante da eletroporação é a eletroquimioterapia, que consiste em aplicar pulsos elétricos de alta voltagem para permeabilizar células

tumorais e assim potencializar a ação de substâncias intrinsicamente citotóxicas, ao facilitar a sua penetração em direção aos alvos intracelulares, no local de aplicação dos pulsos elétricos (DENET, VANBEVER e PRÉAT, 2004; ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2009). A eletroquimioterapia tem sido investigada em modelos animais de tumores induzidos subcutaneamente, com efetividade em torno de 70 a 85% dos animais testados (MIR *et al.*, 1991; SERSA, CEZAMAR e MIKLAVCIC, 1995; HELLER *et al.*, 1995). Em estudos clínicos de Fase I e II, a eletroquimioterapia tem sido avaliada para o tratamento de melanoma, carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HELLER *et al.*, 1996; GLASS *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 1997). Nestes casos, a eletroquimioterapia tem se mostrado mais eficiente do que a quimioterapia sozinha na eliminação de tumores locais (DENET, VANBEVER e PRÉAT, 2004).

2.7 NO em Cultura de células

Nos últimos anos, foi demonstrado que os radicais livres e outras moléculas desempenham múltiplas funções, em condições fisiológicas e patológicas. O melhor exemplo é o radical livre óxido nítrico (NO), que pode apresentar propriedades citotóxicas ou citoprotetoras (WINK *et al.*, 1998), dependendo de sua concentração e local de ação. De uma maneira geral, baixas concentrações de NO, como as encontradas nas células endoteliais regulam os processos fisiológicos normais, enquanto que níveis mais altos desse mediador desempenham função citotóxica/citostática no organismo. Entretanto, as respostas biológicas são dependentes não só da sua concentração, mas também do tempo de duração da exposição das células ao NO.

Considerando que o NO é um gás, e assim difunde facilmente no meio biológico, sua concentração pode ser considerada em função da distância percorrida a partir do local de produção e também em função do ambiente redox presente, uma vez que o NO reage prontamente com outras espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, sugerindo que provavelmente a taxa de produção de NO seja um determinante crítico para as respostas celulares (THOMAS *et al.*, 2008).

Assim, diversos estudos avaliando a ação do NO em cultura de células bacterianas ou epidermóides, considerando a concentração e o fluxo de NO liberado estão descritos na literatura.

NABLO & SCHOENFISCH (2003) descreveram a ação antibacteriana do NO contra o microrganismo *P. aeruginosa* mantido em cultura, devido a uma diminuição na adesão do patógeno à superfície de um filme do tipo sol-gel contendo diazeniodiolato, após a liberação de NO com o fluxo inferior a $1\text{pmol s}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

GHAFFARI e colaboradores (2005) desenvolveram um dispositivo para liberar óxido nítrico diretamente em cultura de células bacterianas ou de fibroblastos. Empregando este dispositivo, o NO liberado ao fluxo de 200ppm demonstrou significativa atividade bactericida contra diversos patógenos comumente presentes em infecções de pele, como *P. aeruginosa* e *S. aureus* (GHAFFARI *et al*, 2006). Considerando a taxa de difusão de 200ppm de NO de aproximadamente $88,4\mu\text{mol L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ no meio de cultura, a concentração acumulada de NO após 8 horas de exposição equivale a menos que 1mmol L^{-1} (GHAFFARI *et al*, 2007). Adicionalmente, empregando as mesmas condições de fluxo de NO, a viabilidade e proliferação de fibroblastos (linhagem L929) mantidos em cultura de células não foi alterada (GHAFFARI *et al*, 2006; GHAFFARI *et al*, 2007).

Ainda considerando à ação antibacteriana do NO, HETRICK *et al*. (2008) desenvolveram nanopartículas capazes de liberar NO com tempo de meia-vida de 18 minutos e fluxo máximo de NO de aproximadamente 21700ppb mg^{-1} após 8 minutos. O NO liberado a partir de $800\mu\text{g mL}^{-1}$ destas nanopartículas demonstrou ser significativamente efetivo contra *P. aeruginosa* e não citotóxico para os fibroblastos de linhagem L929.

Embora não tenha sido demonstrada ação citotóxica do NO para as células de fibroblastos nas concentrações e fluxos descritos anteriormente, JANCZYK e colaboradores (2004) demonstraram fototoxicidade NO-dependente do sal preto de Roussin (RBS) contra células de melanoma (linhagem humana SK-MEL 188 e de camundongo S91) após irradiação na região do UVA. Este sal apresenta a fórmula $\text{NaFe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7$ e é conhecidamente um doador de óxido nítrico. A concentração máxima

de NO liberado nos estudos de JANCZYK e colaboradores foi de 37nmol L^{-1} , suficiente para ocasionar sérios danos celulares às linhagens testadas.

3. Conclusões

- Os métodos analíticos empregados para a quantificação do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ por CLAE mostraram-se adequados, apresentando valores de precisão, exatidão, linearidade e seletividade dentro daqueles pré-estabelecidos pelo FDA.
- Os estudos de solubilidade e de $K_{O/A}$ do complexo indicaram sua hidrossolubilidade e provável dificuldade em atravessar a pele passivamente.
- O complexo $[\text{Ru}(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ em solução aquosa não tamponada se mostrou estável à temperatura ambiente por até 48 horas, e em contato com o estrato córneo, por até 4 horas; assim, foi possível realizar de maneira adequada a extração do complexo a partir desta camada da pele. Entretanto, em contato com a pele inteira, após apenas 8h, foi observada uma degradação de quase 70%. Adicionalmente, a liberação de NO ao contato do complexo em solução com a pele foi demonstrada.
- O complexo de rutênio é estável em solução aquosa nos diferentes pHs estudados, por pelo menos 6h. Entretanto, para os pHs 5 e 4, em torno de 10% do composto foi degradado na presença da corrente elétrica.
- Os estudos de irradiação do complexo incorporado nas formulações mostraram a liberação direta e indireta do NO, com a formação de seu aquo composto, quando o mesmo foi irradiado na região do visível (532nm) e do UV (355nm).
- Foi possível determinar a penetração passiva do complexo nitrosilo de rutênio em solução aquosa não tamponada através do EC, por CLAE e ICP-MS, confirmando a estabilidade do complexo em contato com o EC por até 4 horas.
- Após experimentos de permeação passiva e iontoforética do complexo nitrosilo de rutênio em solução aquosa não tamponada, foi possível determinar sua penetração nas camadas mais profundas da pele e o aumento desta penetração com a aplicação da iontoforese.
- Embora o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})(\text{NO})]^{3+}$ não tenha se mostrado tóxico às células de carcinoma epidermoide humano (A431) na ausência de luz, com a aplicação combinada de uma corrente elétrica constante de baixa

intensidade, e irradiação, para liberação intracelular do NO, foi possível observar efeito citotóxico significativo em torno de 50%. Também foi comprovada a necessidade de evitar a perda do NO liberado com a fotoindução para o meio, durante estes experimentos.

- Não foi possível desenvolver um modelo experimental de tumor cutâneo adequado para tratamento antitumoral, com a linhagem de animais testada.

4. Referências Bibliográficas

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1818-1825, 2004

ANVISA, Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, Porto Alegre, 2005, Cap 20, p. 504-536.

BANGA, A. K.; BOSE, S.; GHOSH, T. K. Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 179, p. 1-19, 1999.

BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**, Marcel Dekker, New York, 1983, 480p.

BATH, B. D.; SCOTT, E. R.; PHIPPS, J. B.; WHITE, H. S. Scanning electrochemical microscopy of iontophoretic transport in hairless mouse skin: analysis of the relative contributions of diffusion, migration, and electrosmosis to transport in hair follicles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 89, p. 1537-1549, 2000.

BATISTA, U.; MIKLAVICIC, D.; SERSA, G. Low level direct current – cell culture fibroblast model **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. V. 35, p. 99-101, 1994.

BERTOLINI, W. L. H. M.; MARCHESI, M. S. P.; LOPEZ, R. F. V.; SILVA, R. S. The application of electron-reduction technique in the NO release from ruthenium nitrosyl complexes as new metal-based drug. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 39, n. 2, p. 262-262, 2003.

BOHL MASTERS, K. S.; LEIBOVICH, J.; BELEM, P.; WEST, J. L.; POOLE-WARREN, L. A. Effects of Nitric Oxide releasing Poly (vinil alcohol) hydrogel dressings on dermal wound healing in diabetic mice. **Wound Repair and Regeneration**. v. 10, n. 5, p.286-294, 2002.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54 Suppl. 1, p. S41–S55, 2002

CAI, B.; LI, J. Evaluation of trifluoroacetic acid as ion-pair reagent in the separation of small ionizable molecules by reversed-phase liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. V. 399, p. 249-258, 1999.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**. V.689, p.175-180, 1997.

CEMAZAR, M.; PARKINS, C. S.; HOLDER, A. L.; CHAPLIN, D. J.; TOZER, G. M.; SERSA, G. Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. **British Journal of Cancer**. V. 84, p. 565-570, 2001.

CHIZMADZHEV, Y. A.; INDENBOM, A. V.; KUZMIN, P. I.; GALICHENKO, S. V.; WEAVER, J. C.; POTTS, R. O. Electrical properties of skin at moderate voltages: contribution of appendageal macropores. **Biophysical Journal**. V. 74, p. 843-856, 1998.

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A. B. S. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. V. 15, p. 669-682, 2009.

CULLANDER, C.; GUY, R. H. Sites of iontophoretic current flow into the skin: Identification and characterization with the vibrating probe electrode. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, p. 55-64, 1991.

DE LIMA, R. G. Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{L})(\text{NO})]^{n+}$. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006. Tese (Doutorado).

DE LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; BENDHACK, L. M.; SILVA, R. S. Influence of ancillary ligand I in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{I})(\text{tpy})\text{no}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**. V. 359, p. 2543-2549, 2006.

DE LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; BENDHACK, L. M.; 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, n. 9, p. 2643-2650, 2005.

DE OLIVEIRA, A. R. M. ; MARQUELE-OLIVEIRA, F. ; DE SANTANA, D. C. A. S. ; NIKOLAOU, S. ; BONATO P. S.; SILVA, R. S. HPLC separation, NMR and QTOF/MS/MS structure elucidation of a prominent nitric oxide donor agent based on an isomeric composition of a nitrosyl ruthenium complex. **Inorganic Chemistry Communications**. v. 12, p. 343-346, 2009.

DE ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B. photodynamic therapy of skin cancer: Sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharmaceutical Research**. V. 17, n. 12, p. 1447-1455, 2000.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**. V. 233, p.351-371, 2002.

DE SANTANA, D. C. A. S.; PUPO, T. T.; SAUAIA, M. G.; SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. Nitric oxide photorelease from hydrogels and from skin containing a nitro-ruthenium complex. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 391, p. 21-28, 2010.

DENET, A. R.; VANBEVER, R.; PRÉAT, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. **Adv drug delivery reviews**. V. 56, p. 659-674, 2004.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p. 501-504,1955.

ERENO, D. Molécula poderosa. **Pesquisa FAPESP**, v. 94, p. 80-83, 2003.

ESCOBAR-CHAVEZ, J. J.; BONILLA-MARTINEZ, D.; VILLEGAS-GONZ'ALES, M. A.; REVILLA-VASQUEZ, A. L. Electroporation as an Efficient Physical Enhancer for Skin Drug Delivery. **Journal of Clinical Pharmacology**. V. 49, p. 1262-1283, 2009.

FORD, P. C.; WINK, D.A.; STANBURY, D. M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. **Febs. Lett**. V. 326, p. 1-3, 1993.

FRESHNEY, R. I. Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**.V. 17, p. 213–230, 2001.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells – A manual of basic technique. Third edition. Wiley-liss, New York, 1994.

GHAFFARI, A., MILLER, C. C., McMULLIN, B., GHAHARY, A. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. **Nitric Oxide**. v. 14, 21-29, 2006.

GHAFFARI, A., NEIL, D. H., ARDAKANI, A., ROAD, J., GHAHARY, A., MILLER, C. C. A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. **Nitric Oxide**. v. 12, 129-140, 2005.

GHAFFARI, A.; JALILI, R.; GHAFFARI, M.; MILLER, C.; GHAHARY, A. Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections. **Wound Repair and Regeneration**. v. 15, p. 368-377, 2007.

GLASS, L. F.; FENSKE, N. A.; JAROSZESKI, M.; PERROTT, R.; HARVEY, D. T.; REINTGEN, D. S.; HELLER, R. Bleomycin-mediated electrochemotherapy of basal cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**. V. 34, p. 82-86, 1996.

GLASS, L. F.; JAROSZESKI, M.; GILBERT, R.; REINTGEN, D. S.; HELLER, R. Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**. V. 37, p. 596-599, 1997.

GLIKFELD, P.; CULLANDER, C.; HINZ, R. S.; GUY, R. H. A New System for *In Vitro* Studies of Iontophoresis. **Pharmaceutical Research**. V. 5, p.443-446, 1988.

GOMES, A. J. Avaliação de micropartículas de PLGA como sistemas de liberação de fármacos na terapia fotodinâmica. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003.

GUY, R. H.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; MERINO, V.; LÓPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *Journal of Controlled Release*. V. 64, p. 129-132, 2000.

HAPALA, I. Breaking the Barrier: Methods for Reversible Permeabilization of Cellular Membranes. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 17, p. 105-122, 1997.

HARDWICK, J. B. J.; TUCKER, A. T.; WILKS, M.; JOHNSTON, A.; BENJAMIN, N. A novel method for the delivery of Nitric Oxide therapy to the skin of human subjects using a semi-permeable membrane. **Clinical Science**. v. 100, p.395-400, 2001.

HELLER, R.; JAROSZESKI, M. J.; GLASS, L. F.; MESSINA, J. L.; PERROT, R.; VOORHIS, V.; REINTGEN, D. S, GILBERT, R.A. Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electroporabilization and chemotherapy. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. V. 36, p. 83-87, 1995.

HELLER, R.; JAROSZESKI, M. J.; GLASS, L. F.; MESSINA, J. L.; RAPAPORT, D.P.; DECONTI, R. C.; FENSKE, N. A.; GILBERT, R.A.; MIR, L. M.; REINTGEN, D. S. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. **Cancer**. V. 77, p. 964-971, 1996.

HEROLD, S.; KOPPENOL, W. H. Peroxynitritometal complex. **Coordination Chemistry Reviews**. V. 249, p. 499-506, 2005.

HETRICK, E. M., SHIN, J. H., STASKO, N. A., JOHNSON, C. B., WESP, D. A., HOLMUHAMEDOV, E., SCHOENFISCH, M. H. Bactericidal efficacy of Nitric Oxide-releasing silica nanoparticles. **ACS Nano**. v. 2, 235-246, 2008.

IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E., CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, 9265-9269, 1987.

IGNARR, L. **Nitric Oxide: Biology and Photobiology**, San Diego, Califórnia, USA, 1. ed, Academic Press, 2000.

JANCZYK A., WOLNICKA-GLUBISZ, A., CHMURA, A., ELAS, M., MATUSZAK, Z., STOCHEL, G., URBANSKA, K. NO-dependent phototoxicity of Roussin's black salt against cancer cells. **Nitric Oxide**. v. 10, 42-50, 2004.

JANERO, D. R. Nitric Oxide (NO)- related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n.10, p.1495-1506, 2000.

KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R.H. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, V.56, p.619-58, 2004.

KEMÉNY, L.; KORECK, A. Ultraviolet light phototherapy for allergic rhinitis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V, 87, p. 58–65, 2007.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of art in the delivery of photosensizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. V. 66, p. 89-106, 2002.

KOPPENOL, W. H. Thermodynamics of reactions involving nitrogen-oxygen compounds. In: PACKER, L. (ed.) Nitric Oxide. Part A: sources and detection of NO; NO synthase. Methods in Enzimology. Califórnia, Academic Press. V. 268, Cap. 2, p. 7-12, 1996.

KUDO, S.; BOURASSA, J. L.; BOGGS, S. E.; SATO, Y.; FORD, P. C. *In situ* nitric oxide (NO) measurement by modified electrodes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes. **Anal. Biochem.** V. 247, p. 193-202, 1997.

LAN, E. L.; UGWU, S.O.; BLANCHARD, J; FANG, X.; HRUBY, V.J.; SHARMA, S. Preformulation studies with melanotan-II: a potential skin cancer chemopreventive peptide. **Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 83, n. 8, p. 1081-1084, 1994.

LANCASTER JR, J. R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free Nitric Oxide. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry.** v. 1,p.18-30, 1997.

LANGER, R. Polymer-controlled drug delivery systems. **Accounts of Chemical Research.** v. 26, p. 537-542, 1993.

LAUER, A.C.; RAMACHANDRAN, C.; LIEB, L. M.; NIEMIEC, S.; WEINER, N. D. Targeted delivery to the pilosebaceous unit via liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews.** V. 18, p. 311-324,1996.

LEDO, E.; LEDO, A. Phototherapy, Photochemotherapy, and Photodynamic Therapy: unapproved uses or indications. *Clinics in Dermatology.* V. 18, p. 77-86, 2000.

LOPEZ, R. F. V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2000. Tese (Doutorado).

MASTERS, J. R. W. (Ed). *Animal cell culture: a practical approach.* 3 ed. OXFORD UNIVERSITY PRESS. 2000.

MCCARTHY, J. R.; PEREZ, J. M.; BRUCKNER, C.; WEISSLEDER, R. Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. **Nano Letters**. V. 5, p. 2552-2556, 2005.

MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHINIAK, B. B. Transfollicular drug delivery—is it a reality? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, p. 1–14, 2005.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54, supl 1, p. S3-S17, 2002.

MERINO, V.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends in Biotechnology**. v. 15, p. 288-290, 1997.

MILOSOVICH, S.; HUSSAIN, A.; DITERT, L.; AUNGST, B.; HUSSAIN, M. Testosteranyl-4-dimethylaminobutyrate.HCl: a prodrug with improved skin penetration rate. **J.Pharm.Sci.**, V. 82, n. 2, p. 227-228, 1993.

MIR, L. M.; ORLOWSKI, S.; BELEHRADEK JR, J.; PAOLETTI, C. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer**. V. 27, p. 68-72, 1991.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology, **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MOREIRA, I. S.; SANTIAGO, M. O. Identification of the $[(bpy)_2Ru(Im)(H_2O)]^{2+}$ complex as an reaction intermediate by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**. V.43, n.5/6, p.322-326, 1996.

NABLO, B. J. AND SCHOENFISCH, M. H. Antibactericidal properties of nitric oxide-releasing sol-gels. **J. Biomed. Mater. Res. A.** v. 15, 1276-1283, 2003.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric Oxide-releasing drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p.97-123,2003.

NICKOLOFF, J. A. (Editor) **Methods in Molecular Biology. Vol. 48. Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols.** Humana Press Inc , Totowa, 1995.

OGISO, T.; IWAKI, M.; PAKU, T. Effects of various enhancers on transdermal penetration of Indomethacin and Urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. V. 84, n. 4, p. 482-488, 1995.

OLIVEIRA, F.S.; TOGNIOLO, V.; PUPO, T.T.; TEDESCO, A.C.; SILVA, R.S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. **Inorg. Chem. Commun.** v. 7, p.160-164, 2004.

ORMEROD, A. D., WHITE, M. I., SHAH, S. A. A., BENJAMIN, N. Molluscum contagiosum effectively treated with a topical acidified nitrite, nitric oxide liberating cream. **Br. J. Dermatol.** v. 141, 1051-1053, 1999.

PEREIRA, G. R. Estudo da Monoleína como promotor de absorção cutânea para a progesterona: Proposição de um sistema de liberação transdérmica. Ribeirão Preto, 1999. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

PETRITIS, K. N.; CHAIMBAULT, P.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Ion-Pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent. **Journal of Chromatography A**. V. 833, p. 147-155, 1999.

PRAUSNITZ, M. R.; BOSE, V. G.; LANGER, R.; WEAVER, J. C., Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 90, p. 10504-10508, 1993.

PUPO, T. T; SILVA, D. C. A; SAUAIA, M. G.; SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. Validation of an HPLC method for Ru-NO complexes released from topical formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 41. p. 472, 2005.

ROBERTS, M. S. Targeted drug delivery to the skin and deeper tissues: role of physiology, solute structure and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 24, p. 874-879, 1997.

ROEDLANTS, R. The history of phototherapy: Something new under the sun? **J. Am. Acad. Dermatol**. V. 46, p. 926-930, 2002.

SAUAIA, M. G *et al.* Use of HPLC in the identification of *cis* and *trans*-diaquabis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complexes: crystal structure of *cis*-[Ru(H₂O)₂(bpy)₂](PF₆)₂. **Inorganic Chemistry Communications**. V. 6, p. 864-868, 2003.

SAUAIA, M. G.; SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing Polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, n.3, p.254, 2003.

SAUAIA, M. G. Síntese, caracterização e estudo da reatividade de complexos nitrosilos de Rutênio contendo ligantes piridínicos. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado)

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

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

SCHINDLER, R. Use of cell culture in pharmacology. **Annual Review of Pharmacology**. V. 9, p. 393-406, 1969.

SERRANO-PÉREZ, J. J.; SERRANO-ANDRÉS, L.; MERCHÁN, M. Photosensitization and phototherapy with furocoumarins: A quantum-chemical study. **Chemical Physics**. V. 347, p. 422-435, 2008.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D. Antitumor Effectiveness of Electrochemotherapy with as-Diamminedichloroplatinum(II) in Mice. **Cancer Research**. V. 55, p. 3450-3455, 1995.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; YACOB, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPETOR, S. Analytical

methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies.

Journal of Pharmaceutical Sciences. V.81, n.3, p.309-314, 1992.

SHISHIDO, S. M.; SEABRA, A. B.; LOH, W.; DE OLIVEIRA, M. G. Thermal and photochemical Nitric Oxide release from S-Nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. **Biomaterials**, v. 24, p.3543-3553, 2003.

SILVA, D. C. A. Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica do óxido nítrico (NO) a partir de complexos $\{Ru^{II}-(NO_2)\}^+$. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006. Dissertação (Mestrado).

SILVA, D. C. A.; PUPO, T. T.; SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. In vitro release study of *cis*- $[Ru(NO_2)(bpy)_2(4-pic)]^{1+}$ through different saturated formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 41. p. 463, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997. 765p.

STINCHOMB, A. L.; DUA, R.; PALIWAL, A.; WOODARD, R. W.; FLYNN, G. L. A solubility and related physicochemical property comparison of buprenorphine and its 3-alkyl esters. **Pharmaceutical Research**. V. 12, n. 10, p. 1526-1529, 1995.

STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and metal complexes in medicine, **Coordin. Chem. Rev.** v. 171, p. 203-20, 1998.

TAVEIRA, S. F. Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo *in vitro* em cultura de células tumorais.

Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2007. Dissertação (Mestrado).

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release* v. 134, p. 35-40, 2009.

TEISSIE, J.; EYNARD, N.; GABRIEL, B.; ROLS, M. P. Electroporation of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 35, p. 3–19, 1999.

TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M. P. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1724, p. 270 – 280, 2005.

Thomas, D. D.; Ridnour, L. A.; Isenberg, J. S.; Flores-Santana, W.; Switzer, C. H.; Donzelli, S.; Hussain, P.; Vecoli, C.; Paolocci, N.; Ambis, S.; Colton, C. A.; Harris, C. C.; Roberts, D. D.; Wink, D. A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 45, p. 18-31, 2008.

TOGNIOLO, V.; SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photo-induced nitric oxide release from chlorobis(2,2'-bipyridine)nitrosylruthenium(II) in aqueous solution. **Inorg. Chim. Acta**. v. 316, p. 7-12, 2001.

TOMIDA, H.; TOUTSUYANAGY, T.; K. Solubilization of steroid hormones by polyoxyethylene lauryl ether. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**., v. 26, p. 2832-3837, 1978.

TOUNEKTI, O; PRON, G.; BELEHRADEK JR, J.; MIR, L. M. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. **Cancer Research**. V. 53, p. 5462-5469, 1993.

TRIKHA, P., SHARMA, S., ATHAR, M. Nitroglycerin: a NO donor inhibits TPA-mediated tumor promotion in murine skin. **Carcinogenesis**. v. 22, 1207-1211, 2001.

TUCKER, A. T.; PEARSON, R. M.; COOKE, E. D.; BENJAMIN, N. Effect of nitric-oxide-generating system on microcirculatory blood flow in skin of patients with severe Raynaud's syndrome: a randomized trial. *The Lancet*. V. 354, p.1670-1675, 1999.

VALLANCE, P.; COLLIER, J. Fortnightly review biology and clinical relevance of Nitric Oxide. **British Medical Journal**. v. 309, p.453-457, 1994.

VEIGA, V. F.; NIMRICHTER, L.; TEIXEIRA, C. A.; MORALES, M. M.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L.; HOLANDINO, C. Exposure of Human Leukemic Cells to Direct Electric Current. **Cell Biochemistry and Biophysics**. V. 42, p. 61-74, 2005.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X. P.; WU, X. J.; WEN, Z.; CAI, T. W.; JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**. V. 102, n. 4, p. 1091-1134, 2002.

WANG, Y.; THAKUR, R.; FAN, Q.; MICHINIAK, B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic delivery. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**. V. 60, p. 179-191, 2005.

WEINTEIN, G. D.; MC COLLOUGH, J. L.; OLSEN, E. Topical methotrexate therapy for psoriasis. **Archives of Dermatology**. v. 125, p. 227-230, 1989.

WELLER, R. Nitric Oxide donors and the skin: useful therapeutic agents? **Clinical Science**, v. 105, p.533-535, 2003.

WELLER, R.; PRICE, R. J.; ORMEROD, A. D.; BENJAMIN, N.; LEIFERT, C. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, p.648-652, 2001.

WELLS, J. I. Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances. Ellis Horwood, Hardcover, 1988, p. 21-85.

WINK, D., VODOVOTZ, Y., LAVAL, J., LAVAL, F., DEWHIRST, M. W., MITCHELL, J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**. v.19, 711-721, 1998.

WITTE, M. B., KIYAMA, T., BARBUL, A. Nitric Oxide enhances experimental wound healing in diabetes. **Br. J. Surg**. v. 89, 1594-1601, 2002.

ZANOLLI, M. The Modern Paradigm of Phototherapy. **Clinics in Dermatology**. V. 21, p. 398–406, 2003.

ZEITOUNI, N. C.; OSEROFF, A. R.; SHIEH, S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. **Molecular Immunology**. V. 39, p. 1133-1136, 2003.