NIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fotocitotoxicidade proveniente do sinergismo de oxigênio singlete e óxido nítrico gerado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)(ftalocianina)]

Zumira Aparecida carneiro

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fotocitotoxicidade proveniente do sinergismo de oxigênio singlete e óxido nítrico gerado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)(ftalocianina)]

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós Graduação em ciências farmacêuticas, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e sintéticos

Orientada: Zumira Aparecida carneiro

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Ribeirão Preto

2011

RESUMO

CARNEIRO, Z. A. Fotocitotoxicidade proveniente do sinergismo de oxigênio singlete e óxido nítrico gerado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)(ftalocianina)], 2011. 132 Folhas. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A síntese, aspectos estruturais, fotoquímica, fotofísica, atividade farmacológica e a fotoatividade citotóxica *in vitro* do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] (pc = ftalocianina) são descritas neste trabalho. O efeito biológico do complexo de rutênio foi estudado na presença e ausência de irradiação luminosa na janela terapêutica (600 - 850 nm), sob linhagem de células B16F10. Comparativamente, a atividade citotóxica de [Ru(NO)(ONO)pc] foi muito maior que [Rupc], sob diferentes níveis de potência do laser, sugerindo a liberação de óxido nítrico pós-produção de oxigênio singlete, após irradiação luminosa, pode ser um importante mecanismo pelo qual o complexo nitrosilo de rutênio apresenta maior atividade biológica, na linhagem de célula estudada. Após a ativação por irradiação luminosa, o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] apresentou diminuição da viabilidade celular na linhagem B16/F10, com eficácia dependente da potência do laser. O encapsulamento de [Ru(NO)(ONO)pc] em lipossoma aumentou em cerca de 25 % a atividade citotóxica do complexo nitrosilo, quando comparado com o mesmo, porém em solução de PBS. Esta eficácia foi diretamente proporcional à quantidade de rutênio no interior da célula, cuja concentração foi determinada por espectrometria de massa ICP-MS, evidenciando maior eficácia no mecanismo de transporte do complexo nitrosilo para o interior da célula. A atividade fotocitotóxica foi atribuída principalmente aos fenômenos de apoptose, cujo o mecanismo foi derivado da análise por citometria de fluxo. O mecanismo de liberação de NO dá-se por processo redutimétrico do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], haja vista que a vasodilatação estudada é dependente do NO, liberado do complexo nitrosilo, e independente da irradiação luminosa. Aliás, concentração da ordem de $1,0 \times 10^{-7}$ M do complexo de rutênio em PBS ocasionou 100 % de vasodilatação, cuja concentração é semelhante ao do nitroprussiato de sódio, medicamento utilizado em clínica médica com severas restrições. Em princípio, a liberação de óxido nítrico pós-produção de oxigênio singlete, oriundo da irradiação luminosa na janela terapêutica, do complexo nitrosilo de rutênio, pode constituir-se num poderoso mecanismo para aumentar a eficácia da terapia fotodinâmica, uma portentosa terapia clínica que encontra limitação dependente do tamanho da área cancerígena bem como da vascularização desta área.

Palavras Chaves: Ftalocianina, Óxido Nítrico, Rutênio, Lipossoma, Citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A dissertação de mestrado apresentada neste trabalho relata o uso de complexos de rutênio como precursor da produção de oxigênio singlete ($^1O_2$) e óxido nítrico (NO). A razão deste estudo visa entender a ação destes radicais contra células cancerígenas e quiçá contribuir para o desenvolvimento de metalo-fármaco contendo rutênio(II) como íon metálico central. Aspectos químicos, fotoquímicos e fotofísicos são descritos como parte do trabalho desenvolvido. O efeito sinergístico do $^1O_2$ e NO é pontuado como possibilidade de "renovação" da terapia fotodinâmica, modalidade clínica utilizada no combate ao câncer.

I.1. O CÂNCER

A terminologia câncer é frequentemente utilizada pelas pessoas, como sinônimo de todo tumor maligno (STEVENS; LOWE, 2002).

O câncer é atribuído a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos. Nesse sentido, o câncer é considerado uma doença degenerativa resultante de uma mutação genética, em que as células doentes manifestam uma tendência agressiva e incontrolável, dividindo-se mais rapidamente do que as células normais do tecido à sua volta, formando tumores pelo acúmulo de células cancerosas ou neoplasias malignas. Existem exceções, como as leucemias, em que as células doentes estão presentes no sangue e percorrem o corpo todo. Por outro lado, existem tumores benignos, que são massas localizadas de células que se multiplicam vagarosamente, semelhante ao tecido original e, raramente, representam riscos para a vida (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 1999).

Na fase de desenvolvimento, os tumores conseguem produzir substâncias que alteram o tecido ao redor do local onde se originaram, possibilitando o seu crescimento localizado. Muitos tumores têm habilidade para desenvolverem seus próprios vasos sanguíneos, que vão ser responsáveis por trazer nutrientes e oxigênio para que as células tumorais possam se desenvolver. Entretanto, a estrutura e arquitetura vascular do tumor é altamente desorganizada quando comparada a um tecido normal, resultando em uma irregular e ineficiente chegada de oxigênio ao tumor (PENNACCHIETTI, 2003). Muitos mecanismos biológicos têm sido propostos para explicar a correlação entre hipoxia e progressão acelerada do câncer. Finalmente, Pennacchietti e colaboradores fizeram uma conexão molecular precisa. Descobriram uma via que é ativada por baixos níveis de oxigênio e que poderia tornar os cânceres mais agressivos e capazes de invadirem outros tecidos (metástases).

Metástase é a capacidade de estas células cancerosas se desprenderem do tumor maligno e, através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, poderem migrar de seu local de origem e atingir outros órgãos, conseguindo invadir tecidos adjacentes e iniciar a formação de uma nova colônia de células, o que pode afetar órgãos nobres, causando a morte do indivíduo (FOLKMAN, 1990).

As células que formam metástase são semelhantes às células do tumor original, assim, é importante entender que, apesar de crescerem em outro órgão, as células malignas conservam características das células de seus tecidos originais. Por exemplo, células malignas que migram da mama, instalando-se em ossos, não constituem um câncer ósseo - que é uma doença diferente -, mas sim um câncer de mama metastático nos ossos. Nesses casos, usa-se um esquema de tratamento para câncer de mama e não para câncer ósseo (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 2007).

As causas do aparecimento do câncer são variadas, podendo ser de ordem externa ou interna do organismo, e estarem ou não inter-relacionadas. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente, aos hábitos ou costumes de uma sociedade e cultura. Tais fatores causais podem interagir de várias formas (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 1999). Os fatores ambientais estão relacionados a cânceres numa taxa que vai de 80% a 90% e alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão e a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele. Outros estão em estudos, tais como alguns componentes de alimentos que ingerimos (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 1999). Dentro os vários tipos de cânceres, aquele diretamente relacionado a fator externo-exposição a luz solar- merece atenção especial, em função do grande números de casos, em nível mundial, observado. É conhecido como câncer de pele e seu aparecimento leva em conta tanto a etnia como a idade.

I.2. CÂNCER DE PELE

O câncer de pele pode ser dividido em dois tipos, dependendo do tipo celular do qual se originou: o câncer de pele tipo não-melanoma, derivado de células epiteliais que não os melanócitos e o câncer de pele do tipo melanoma, originado de melanócitos. Os melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina (pigmento) residem sobre a membrana basal, que separa a derme da epiderme, no tecido cutâneo normal (Figura 1).

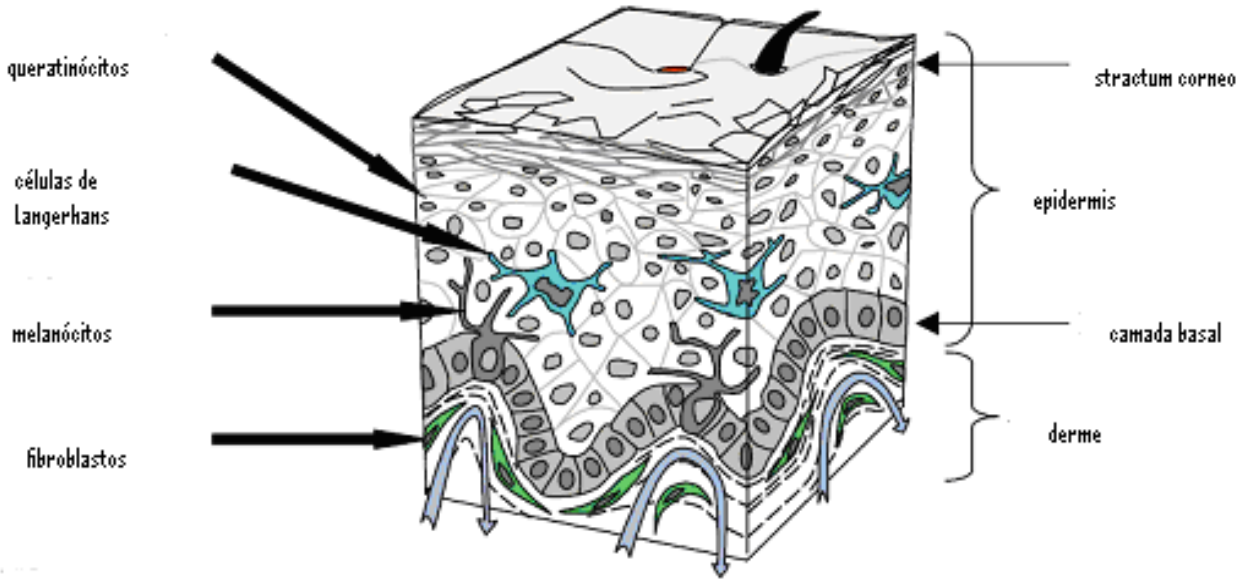


Figura 1: Diagrama simplificado das camadas superiores da pele. (CALS-RIERSON; ORMEROD, 2004).

I.2.1. Câncer de pele tipo Melanoma

O melanoma é um câncer que se origina nas células produtoras de pigmento da pele (melanócitos) (Figura 2).

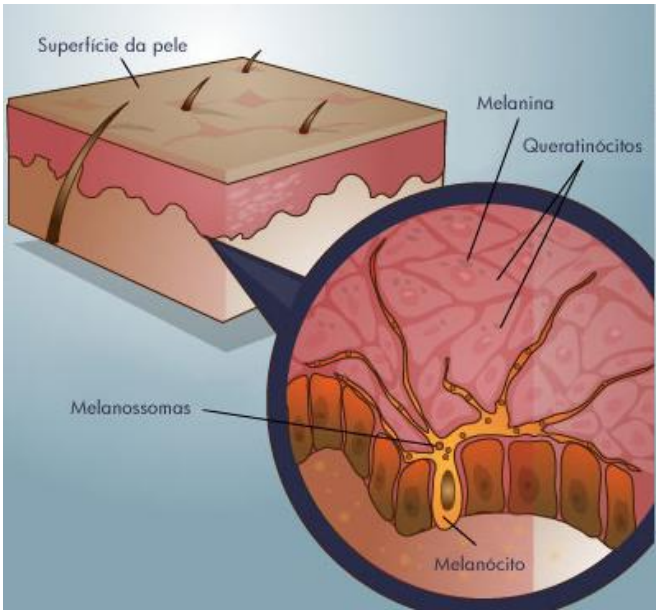


Figura 2: Esquema ilustrativo do câncer de pele tipo Melanoma. Fonte: www.diaadia.pr.gov.br.

O melanoma pode-se iniciar como um pequeno tumor cutâneo pigmentado sobre a pele normal, mais frequentemente em áreas expostas ao sol. A exposição à luz ultravioleta (UV) está fortemente relacionada ao desenvolvimento do melanoma cutâneo, assim como ao de outros tipos de câncer de pele. Entretanto, a formação do melanoma está mais relacionada com históricos de exposição intensas e esporádicas, enquanto que no caso de outros tipos de câncer de pele, um acúmulo de exposição frequentemente contribui mais para formação dos tumores (PERLIS; HERLYN, 2004). Isto pode ser explicado pela própria biologia dos melanócitos. No caso de exposições frequentes, os melanócitos aumentam a produção e distribuição de melanina, o que forma uma capa protetora na camada basal da epiderme, protegendo-os dos danos causados pelos raios UV. Já no caso de exposições muito intensas ao sol, os melanócitos não conseguem produzir quantidade suficiente de melanina, assim a pele fica exposta aos efeitos da radiação UV. Além disso, como os melanócitos possuem naturalmente uma grande quantidade de proteínas anti-apoptóticas ou pró-sobrevivência, são capazes, ao contrário dos queratinócitos, de resistir a grandes doses de radiação UV, podendo propagar as alterações genéticas adquiridas (PERLIS; HERLYN, 2004).

I.2.2. Câncer de pele tipo não-melanoma

O carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide, também chamados de câncer de pele não-melanoma, são os tipos de câncer de pele mais frequentes - 70% e 25%, respectivamente. Porém, apesar das altas taxas de incidência, o câncer de pele não-melanoma apresenta altos índices de cura, principalmente devido à facilidade do diagnóstico precoce.

Os carcinomas basocelulares são originários da epiderme e dos apêndices cutâneos acima da camada basal, como folículos pilosos, por exemplo. Já os carcinomas epidermóides têm origem no queratinócitos da epiderme, podendo também surgir no epitélio escamoso das mucosas (Figura 3).

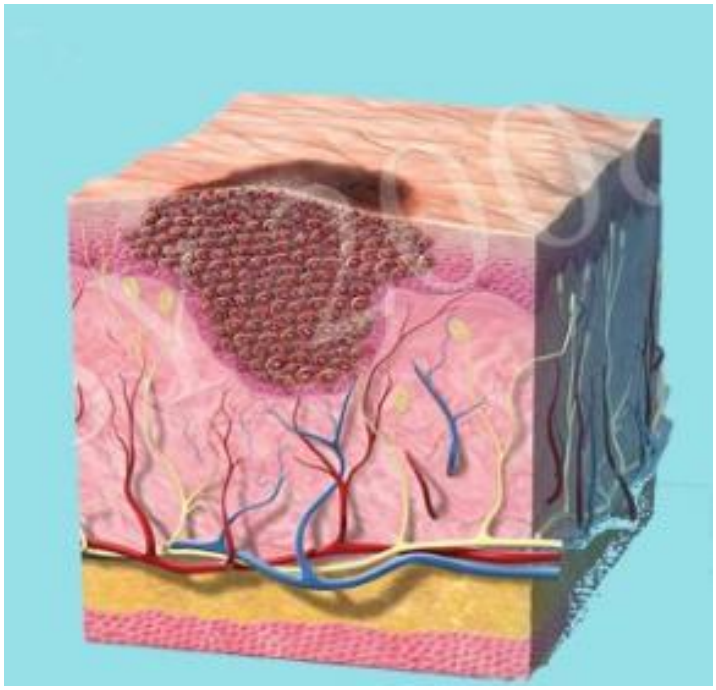


Figura 3: Esquema ilustrativo do câncer de pele tipo não-Melanoma. Fonte www.diaadia.pr.gov.br.

Indivíduos que trabalham expostos diretamente ao sol são mais vulneráveis ao câncer de pele não-melanoma. Esse tipo de câncer é mais comum em adultos, com picos de incidência por volta dos 40 anos. Porém, com a constante exposição de jovens aos raios solares, a média de idade dos pacientes vem diminuindo. Pessoas de pele clara, que ficam vermelhas com exposição ao sol, estão mais sujeitas a desenvolverem este tipo de câncer. A maior incidência deste tipo de câncer de pele se dá na região da cabeça e pescoço, que são justamente os locais de exposição direta aos raios solares.

I.3. TERAPIA DO CÂNCER

Após a Segunda Guerra Mundial, a medicina obteve progressos memoráveis que culminaram na cura de diversas doenças, melhorando a expectativa média de vida das pessoas. Dessa forma, passou a utilizar métodos de diagnósticos e tratamentos altamente sofisticados, porém, agressivos para o paciente, prolongando a vida, mas aumentando o sofrimento (SOFFIATTI, 2000).

Os tratamentos básicos para o câncer são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, sendo a cirurgia e a radioterapia consideradas como tratamentos locais, e a quimioterapia, como tratamento sistêmico. No câncer, essas terapêuticas são usadas de forma isolada ou associada (BONASSA, 1998).

A quimioterapia é descrita por Bonassa (1998) e é definida como o uso de substâncias químicas isoladas, ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. De acordo com Silva (p.1, 2001):

> [...] essas drogas atuam a nível celular, interferindo no seu processo de crescimento e divisão, contudo sem especificidade, não destruindo seletivamente ou exclusivamente às células tumorais; assim, agridem as células normais que possuem características semelhantes às tumorais.

A quimioterapia desencadeia uma série de efeitos colaterais, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Efeitos tóxicos dos quimioterápicos, conforme a época em que se manifestam após a aplicação.

Precoces* **(de 0 a 3 dias)**	**Imediatos** **(de 7 a 21 dias)**	**Tardios** **(meses)**	**Ultra-Tardios** **(meses ou anos**
• Vômitos • Náusea	• Mielossupressão granulocitopenia plaquetopenia anemia	• Miocardiopatia	• Infertilidade
• Mal estar	• Mucosites	• Hiperpigmentação	• Carcinogênese
• Artralgias	• Cistite hemorrágica devida à ciclofosfamida	• Alopecia	• Mutagênese
• Adinamia	• Imunossupressão	• Pneumonite devida à bleomicina	• Distúrbio do crescimento em crianças
• Agitação		• Imunossupressão	• Seqüelas no sistema nervoso central

• Exantemas	• Neurotoxidade	
		• Fibrose/cirrose hepática
• Flebites		

*Síndrome da toxicidade precoce (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2007)

Hoje em dia, muitos medicamentos novos são postos à disposição dos oncologistas com o objetivo de reduzir a toxicidade dos quimioterápicos. No entanto, os efeitos colaterais severos ainda diminuem muito a qualidade de vida do paciente.

A radioterapia induz morte celular por ação de radiações ionizantes, que podem ser eletromagnéticas, raios X ou gama, e particulada, partículas γ e B, prótons e nêutrons, que eliminam o tecido neoplásico. Mas, por outro lado, estudos mostram que a radioterapia pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares na mesma parte do corpo, por exemplo, o paciente tem mais chances de sofrer um infarte após tratamento de tumores na mama esquerda (HALLE et al, 2010).

A cirurgia é utilizada para a retirada de tecidos neoplásicos localizados e não é indicada para casos de metástase.

Esses tratamentos clássicos são demorados, além de causar desgaste e sofrimento ao paciente (SIBATA et al, 2000; OCHSNER, 1996). Diante dos graves efeitos colaterais e da eficiência limitada das terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), outras alternativas estão sendo constantemente propostas na área de oncologia (cancerologia). Dentre estas, destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD), uma modalidade relativamente nova no tratamento de câncer. Apesar de boa parte do uso da TFD ser centrada nesta doença, outras moléstias, tais como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, entre outras, têm como característica comum um crescimento anormal de tecidos, igualmente ao câncer (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). Assim a TFD está sendo usada e investigada mundialmente no tratamento dessas e de outras doenças.

I.4. TERAPIA FOTODINÂMICA

A TFD é um tratamento médico em que se emprega uma combinação de luz e de fármaco a fim de obter um efeito citotóxico ou um efeito modificador no câncer ou em qualquer outro tecido indesejável (DOUGHERTY et al, 1978; DOUGHERTY, POTTER,

WEISHAUPT 1984; DOUGHERTY, 1995). Uma das principias vantagens da TFD está no fato de o fármaco não apresentar citotoxicidade, exceto quando submetido à irradiação. O mecanismo de ação da TFD está ilustrado na figura 4.

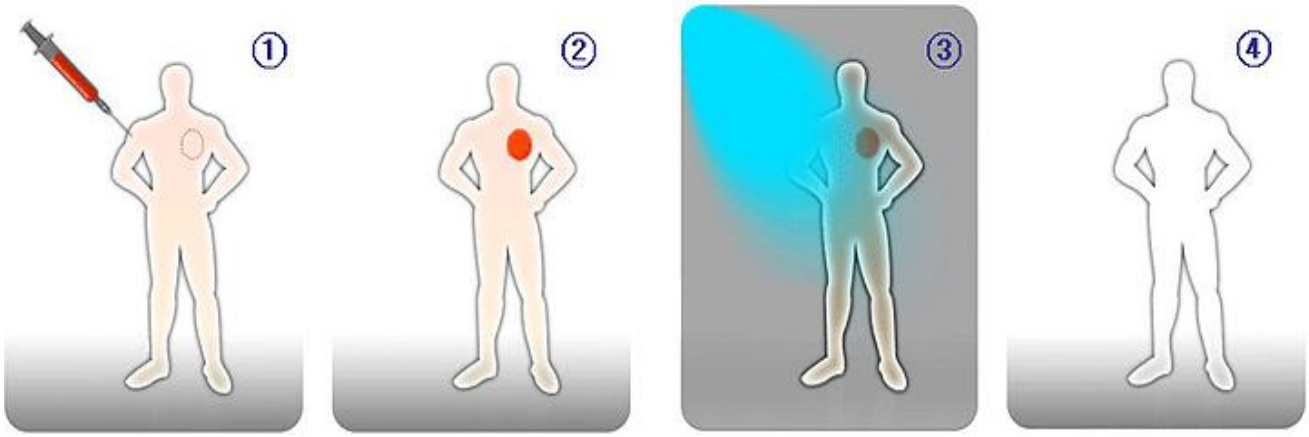


Figura 4: Princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD). (DOUGHERTY et al, 1998)

Um complexo fotossensível e de toxicidade desprezível é introduzido no paciente (1), sendo que esse se acumula preferencialmente em células que se replicam de modo acelerado (2). Esta seletividade se deve à presença significativa de receptores de proteínas de baixo peso molecular, à presença de macrófagos e à diminuição do pH nos tecidos tumorais que favorece a atração das drogas fotossensíveis, o que já atribui a esta técnica uma grande vantagem comparada às terapias convencionais (DOUGHERTY et al, 1998). Posteriormente, uma faixa de luz com energia na faixa de 16660 – 12500 cm^{-1} (600 - 800 nm), a chamada janela terapêutica, é incidida sobre o tecido lesado (3), cuja penetração nos tecidos atinge cerca de 2-3 mm, com radiação na região de 630 nm e de 5-6 mm na faixa de 700 - 800 nm. A luz ativa o fármaco e resulta em produtos que necrosam ou afetam o tumor (4). É importante destacar que a energia luminosa deve ser adequada para causar a ação do fármaco irradiado, porém com intensidade que tenha efeito desprezível ou nulo sobre os tecidos saudáveis que possam ser atingidos pela luz.

A TFD é utilizada no tratamento de neoplasias, em diferentes partes do corpo, tais como sistema gastrointestinal, sistema nervoso central, cabeça, pescoço, esôfago e pulmões. A grande eficácia da TFD é no tratamento de câncer de pele, pela facilidade de exposição desse órgão à luz (de ROSA; BENTLEY, 2000).

A base da TFD é o processo fotofísico dos fotossensibilizadores exógenos presentes nos tecidos celulares. Para um melhor entendimento da TFD, uma fundamentação sobre os processos fotofísicos e fotoquímicos é importante e está contemplada a seguir.

A absorção de luz na região do visível ou ultravioleta por uma espécie química pode levá-la a um estado eletronicamente excitado (A*) (equação 1), cujo tempo de vida é variável e tem propriedades químicas diferentes da espécie inicial. A energia absorvida pode ser dissipada quimicamente (equação 2) ou fisicamente (equações 3 e 4) (PORTER, 1983, ALLEN; VAN LIER, 2000, MAcDONALD; DOUGHERTY, 2001).

$$A + hv \rightarrow A^* \qquad (1)$$

$$A^* \rightarrow \text{produtos} \qquad (2)$$

$$A^* \rightarrow A + hv \qquad (3)$$

$$A^* \rightarrow A + \text{calor} \qquad (4)$$

Esses processos (fotofísicos e fotoquímicos) podem ser avaliados através de um esquema denominado diagrama de Jablonsky (Figura 5). Uma determinada substância no estado fundamental (S_0), quando excitada ao primeiro estado singlete (S_1) geralmente segue quatro caminhos de desativação: (1) decaimento não radiativo; (2) reação química originando uma outra espécie no estado fundamental; (3) emissão de fluorescência, ou (4) cruzamento intersistema para o mais baixo estado triplete (T_1). O estado triplete gerado (T_1) pode voltar ao estado fundamental também por decaimento não radiativo, ou emitir fosforescência, ou ter uma reação química com formação de outras espécies no estado fundamental (DEMAS, 1983).

Como colocado anteriormente, o princípio para TFD é a existência de um fármaco fotossensível (fotossensibilizador-FS) capaz de fazer a absorção da radiação na janela terapêutica. Assim com o fóton de luz absorvido, o FS pode atingir o estado triplete excitado T_1 (Figura 5) e, quando em presença de oxigênio molecular, origina espécies reativas de oxigênio ($^1O_2$, $O_2^{-\cdot}$, $OH^{\cdot}$, H_2O_2), definidas como EROs.

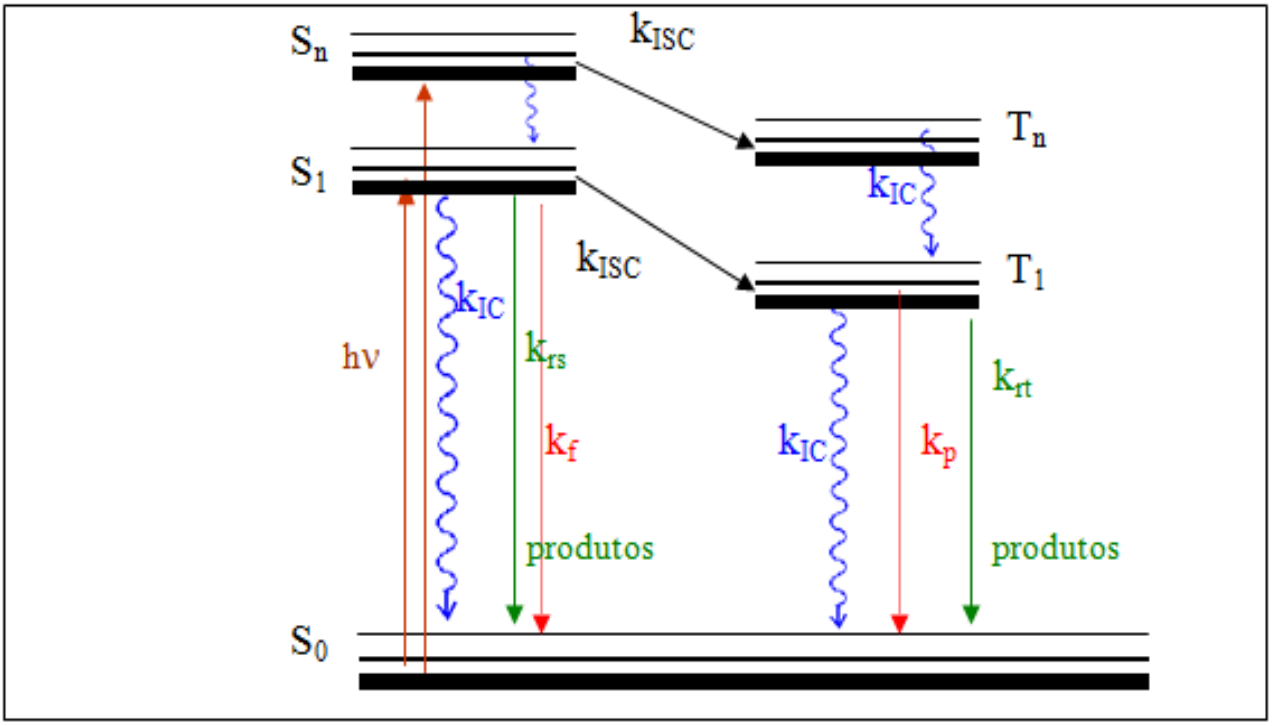


Figura 5: Diagrama de Jablonsky. hν = absorção, k_{IC} = decaimento não radiativo, k_f = decaimento radiativo (fluorescência), k_{rs} = reação fotoquímica a partir do estado singlete excitado, k_{ISC} = conversão intersistema, k_p = decaimento radiativo (fosforescência) e k_{rt} = reação fotoquímica a partir do estado triplete excitado.

I.5. FOTOSSENSIBILIZADORES

A busca de fármacos fotossensíveis para serem aplicados na TFD tem sido objeto de inúmeros estudos (DOUGHERTY et al, 1978; DOUGHERTY, 1995; JOSEFSEN, 2008) e vários são os complexos que apresentam potencialidade para atuarem como fotossensibilizadores. O primeiro fotossensibilizante que foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (*FDA*) para o tratamento de câncer através da TFD foi um derivado de hematoporfirina (Photofrin") produzido pela QLT Inc. Atualmente há outras variantes comerciais dessa droga, que são: Photosan", Photogem" e Photocarcinorin"(RIBEIRO et al, 2007).

O estágio atual da pesquisa tem como meta propor um fotossensibilizador que seja mais efetivo que o photofrin. Nesse sentido, verificam-se inúmeras investigações para compreender a relação da estrutura-atividade de novos complexos, de modo a contemplar as seguintes características:

a- Baixa ou nenhuma toxicidade no escuro.

b- Ter propriedades farmacocinéticas adequadas, como alta afinidade com os tecidos tumorais e fácil eliminação do corpo.

c- Alto rendimento quântico de produção de oxigênio singlete, com tempo de vida triplete superior a 500 ns e absorção na região na janela terapêutica.

As ftalocianinas (pcs) são uma classe da segunda geração de fotosensibilizadores, que vêm sendo estudadas como alternativa ao uso das porfirinas na TFD. As ftalocianinas geralmente não são tóxicas, são resistentes à degradação química e fotoquímica e apresentam bandas de absorção de alta absortividade dentro da janela terapêutica (600 - 850 nm) (ROCHA, 2008)

Verifica-se que grande parte (80 - 90%) do estudo da TFD é baseada na utilização do oxigênio singlete ($^1O_2$) como espécie reativa (de ROSA; CRUTCHLEY, 2002). A hipoxia das neoplasias de grande porte reduz a eficiência do tratamento à base da TFD como terapia efetiva na fase clínica. Assim, a investigação de busca de fotossensibilizadores que, quando ativados, resultam como produtos radicais livres, bem como outras espécies radicalares independentes de oxigênio, tem sido prioridade em vários centros de pesquisa. Uma possibilidade é utilizar complexos, como os complexos nitrosilo de rutênio com ftalocianinas, que possam liberar óxido nítrico (NO) quando estimulados fotoquimicamente. O NO, além de possuir natureza radicalar, reage com o ânion superóxido (O^-_2) presente no meio e forma o peroxininitrito ($ONOO^-$), que é uma espécie altamente reativa e faz parte de uma classe de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERONs) (HEROLD; PUPPO, 2005; IGNARRO, 2000). O NO é uma das mais versáteis moléculas produzidas pelo organismo e tornou-se, recentemente, matéria prima de novos materiais destinados a serem empregados como fármacos. Sabe-se que o NO possui tanto efeito tumorogênico quanto tumoricida. Este último é favorecido quando no meio celular existe uma elevada concentração de NO (IGNARRO, 2000). A atividade antitumoral do NO inclui inibição da proliferação de células tumorais.

I.6. IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO apresenta surpreendente onipresença em seres vivos. É a única molécula endógena conhecida que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível e de agente citotóxico. A molécula possui ação na regulação da pressão sanguínea, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (MIRANDA, 2003; BONAVENTURA, 2008; GAITANI, 2009;).

A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro nos processos biológicos. Nessa função, o NO não depende de transportadores específicos nem de canais de passagem intracelulares. Ele difunde-se pela célula, com a mesma facilidade em meio hidrofílico e em meio lipofílico. Sua ação fisiológica depende muito mais de suas propriedades físico-químicas do que de sua conformação espacial (FELDMAN; GRIFFITH, 1993).

Talvez a área de pesquisa sobre a bioquímica do NO que mais se desenvolveu nas ultimas décadas esteja relacionada com sua ação vasodilatadora. Em 1987, constatou-se ser o NO o fator de relaxamento endotélio dependente (FRED). Nas células endoteliais, o NO é produzido pela isoforma constitutiva do Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOSe) (MUIJSERS et al, 2001). Simplificadamente, esta enzima produz NO e o aminoácido L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina e de oxigênio (O_2) presente no meio. As isoformas das enzimas constitutivas do óxido nítrico estão subdivididas em: isoenzima neuronal (nNOS), isoenzima endotelial (eNOS) e isoenzima induzida (iNOS) (CALS-GRIERSON; ORMEROD, 2004).

O NO também atua em carcinogenesis, progressão tumoral e na terapia do câncer, dependendo das condições no meio intracelular, do tipo de célula alvo, concentração de NO e presença de outras espécies radicalares (WELLER, 2003; CHIANG et al, 2005). A resposta apoptótica celular parece depender significativamente do potencial redox da célula, que é influenciado pelos níveis de óxido nítrico. No entanto, ao mesmo tempo em que altas concentrações de NO promovem o efeito tumoricida (morte celular), mecanismos de proteção celular antiapoptose (efeito tumorogênico) mediados pelo NO vêm sendo estudados, mas ainda não foram elucidados. Sob influência citotóxica do NO, as células tumorais podem morrer por apoptose ou necrose, dependendo do tipo de célula (KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Dentre as hipóteses para elucidação dos mecanismos que envolvem o processo de apoptose ocasionado pelo NO, destacam-se: indução da expressão de Bcl-2, que é um inibidor do processo de ativação das caspases (CALS-GRIERSON; ORMEROD, 2004), inativação de enzimas que reparam o DNA e indução do fator de transcrição p53 (KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997).

Em 1998, Gupta e colaboradores demonstraram a produção de NO durante o processo de fotossensibilização de células tumorais utilizando-se de uma ftalocianina como sensibilizador. O mecanismo de formação do NO durante a terapia fotodinâmica foi explicado com base no fato de que a TFD resulta em um aumento rápido e significativo da isoforma da enzima óxido nítrico *sintase* (NOS), que é dependente do Ca^{2+} presente nos tecidos cerebrais

e neurônais (NOS I). O aumento da isoforma (NOS I) pode ser explicado pelo fato de que o processo de TFD leva à liberação intracelular de Ca^{2+} a partir dos seus estoques dentro das células, o que, por sua vez, resulta em um aumento da produção de NO responsável pela indução do apoptose.

Estas descobertas recentes têm estimulado o interesse, na química e na bioquímica, pelo NO, levando ao desenvolvimento de novas drogas para a medicina (SADLER et al, 1998; IGNARRO, 2000; TOGNIOLO et al, 2001). Devido à extrema instabilidade das moléculas de NO em meio biológico e a seu curto tempo de meia vida (aproximadamente 5 seg), torna-se difícil o estudo de seus efeitos fisiológicos. Assim, existe um grande interesse por complexos químicos que possam servir de pró-drogas para a liberação controlada do NO nos sistemas biológicos. Esses complexos devem apresentar algumas propriedades características, como: ser de fácil preparação em uma forma pura e estável, de preferência hidrossolúveis; gerar NO quantitativamente; e os produtos da saída do NO devem ser complexos atóxicos. Dessa forma, o desenvolvimento de complexos que possam agir como doadores de NO em um organismo biológico é de interesse para a clínica médica, haja vista a possibilidade de se controlar a liberação do óxido nítrico por reações fotoquímicas e/ou redutimétricas (SAUAIA et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2004; BONAVENTURA et al, 2004; SAUIAIA et al, 2005; de LIMA et al, 2005).

I.7. APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS DE COMPLEXOS METÁLICOS

A modelagem molecular de complexos metálicos para fins terapêuticos envolve o delineamento de algumas etapas que possibilitam a absorção da droga pelo organismo, como: hidrólise do complexo, ligação em sítio protêico, transporte pela membrana celular e interação com alvo molecular (SCHWIETERT; McCUE, 1999). O desenvolvimento dessas etapas possibilitou aplicação farmacológica, e, entre outros exemplos, podem-se citar os complexos de platina, utilizados no tratamento de câncer, assim como os complexos de ouro, no tratamento de artrite reumatóide, os complexos de prata, usados como agentes antimicrobianos e os complexos de mercúrio, utilizados como diuréticos (BERNERS-PRICE, 1996; ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Alguns complexos nitrosilos com aplicação médica são também conhecidos desde o século XIX e muitos deles continuam sendo utilizados (SZCEPURA; TAKEUCHI, 1990). O nitroprussiato de sódio, $Na_2[Fe(CN)_5(NO)]. 2H_2O$, vasodilatador útil no controle da pressão arterial, especialmente em casos de emergência, é um exemplo de complexo metálico que carrega um ligante ativo (ligante nitrosil) (MONCADA et al, 1991). O uso destes complexos

encontra, às vezes, limitação devido às reações secundárias àquela de interesse. No caso dos complexos nitrosilos, a reação desejada é a liberação de óxido nítrico.

Algumas alternativas para o controle da liberação seletiva de NO a partir de complexos de coordenação são viáveis clinicamente, como a indução luminosa e a redução eletroquímica do NO^+ coordenado. Ambas as técnicas levam em consideração a baixa afinidade observada entre o ligante NO^0 e alguns íons metálicos. Isso mostra que a fotoquímica e os processos eletroquímicos podem ser utilizados para modelar diferentes processos bioquímicos.

Com alguns metais de transição, o óxido nítrico tende a reagir rapidamente. A ligação entre o metal e a molécula de óxido nítrico é estável porque existe uma doação de densidade eletrônica dos orbitais tipo σ do NO para o metal. A princípio, a molécula de NO pode ligar-se ao metal (M) tanto pelo átomo de nitrogênio (M—NO) como pelo átomo de oxigênio (M—ON), originando as formas nitrosil ou isonitrosil, respectivamente. A forma nitrosil é a mais comum, sendo que a forma isonitrosil deve ocorrer com metais mais eletropositivos, como Li e Na (RICHTER-ADDO; LEGZDINS, 1992).

Metalo-drogas, cujo centro metálico é o rutênio, possuem boa aplicação clínica, principalmente por ser baixa a toxicidade do metal. Isto se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste metal com as do ferro. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados por um excesso de ferro através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina. Alguns autores acreditam que o mecanismo de proteção contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

A busca de métodos capazes de liberar óxido nítrico nos organismos a partir de complexos nitrosilo de rutênio é bastante intensa. Uma estratégia é utilizar complexos que sejam fotoquimicamente ativos, ou seja, liberam NO quando submetidos a algum tipo de estímulo fotoquímico (CARLOS et al, 2004; FORD; LAVERMAN, 2005). Visando esta perspectiva, Togniolo et al. (2001) descreveram estudos espectroscópicos e fotoquímicos do complexo *cis*-$[RuCl(bpy)_2(NO)](PF_6)_2$. Esse trabalho mostrou a liberação de NO em meio aquoso quando irradiado com laser em 355 nm (ϕ_{NO} = 0,98 mol einstein^{-1}). Recentemente, Oliveira et al. (2004) relataram a síntese e as propriedades físico-químicas e fotoquímicas da espécie *trans*-$[RuCl([15]aneN_4)NO](PF_6)_2$em tampão fisiológico (pH = 7,4). Este complexo, quando irradiado com laser em 355 nm, produz NO e a espécie *trans*-$[RuCl([15]aneN_4)H_2O]^+$. O rendimento quântico encontrado para a liberação do NO foi 0,61 mol einstein^{-1}.

Para aumentar a possibilidade da utilização destes complexos como metalo-drogas, é preciso conhecer mais sobre seu comportamento químico e seu mecanismo de ação em sistemas biológicos. Neste contexto, o trabalho desenvolvido pelo grupo do Prof. Roberto Santana da Silva (TFOUNI et al, 2005; GAITANI, 2009; SANTANA, 2010; TFOUNI, 2010) visa contribuir para o conhecimento e descrição das propriedades físico-químicas de complexos nitrosilos de rutênio. Embora se tenha um bom conhecimento e controle da liberação de óxido nítrico utilizando complexos nitrosilos de rutênio, a perspectiva para uso clínico destas espécies ganha ainda limitação em função de a grande maioria destes complexos não apresentarem bandas intensas na região de interesse clínico. De fato, esta é uma das áreas de pesquisa do grupo do Prof. Silva dentre as quais o processo de transferência fotoinduzida tem propiciado obtenção de bons resultados em função da produção de NO. Baseado nisto, parece-nos uma boa alternativa utilizar complexos que já encontram descrição em uso clínico e a associação a complexos doadores de NO. Uma das possibilidades são os complexos contendo ftalocianina na esfera de coordenação do metal.

Com objetivo de minimizar os possíveis efeitos indesejados dos agentes fotossensibilizadores na TFD, vencer a baixa seletividade do tumor e a baixa solubilidade em água destes complexos, determinada quase sempre pela natureza hidrofóbica, muitas pesquisas estão sendo realizadas no sentido de incorporar essas espécies em sistemas de liberação controlada, como ciclodextrinas, lipossomos, nanopartículas e microemulsões, o que constitui a terceira geração de fotossensibilizadores utilizados na TFD (OCHSNER, 1996; DeROSA; CRUTCHLEY, 2002; TEDESCO et al, 2003). No caso de propostas de veículos de fármacos para uso tópico, torna-se necessária a compreensão quanto à estrutura física e química da pele, já que esta tem um papel fundamental de barreira natural do organismo.

I.8. VEÍCULOS DE FÁRMACOS: LIPOSSOMA ULTRAFLEXÍVEL

A pele normal é impermeável a muitos tipos de substâncias. Sua fina espessura contribui para 80% da sua resistência a permeação (CEVC; SCHATZLEIN; RICHARDSEN, 2002).

Tendo em vista as propriedades naturais da pele (epiderme e strato córneo), para se ter sucesso na administração tópica de diferentes fármacos, é necessário que penetrem na pele, atravessando os corneocitos e espaços das vias intracelulares. Os parâmetros de difusiabilidade e solubilidades dos fármacos em relação à epiderme são importantes para sua penetração na pele (HIRUTA et al, 2006). Além disso, existe a redução de níveis sistêmicos

de fármaco no local de ação em virtude da necessidade da utilização de altas concentrações de fármacos (HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005).

Sendo assim, algumas estratégias podem ser utilizadas na tentativa de melhorar as características de absorção de um fármaco na pele, como, por exemplo: modificações químicas na estrutura do fármaco (BONINA et al, 1995); modificações estruturais na forma farmacêutica (LAUGEL et al, 1996; LOPEZ et al, 2003a); uso de agentes solubilizantes (VIANNA, 1998); aplicação de iontoforese (LOPEZ et al, 2001; LOPEZ et al, 2003b; HERAI et al, 2004); e uso de alteradores da permeabilidade cutânea, chamados de promotores de absorção cutânea (LOPEZ et al, 2004; de ROSA et al, 2004).

Além da importância dos promotores de absorção cutânea nas formulações de uso tópico, no caso de tratamento tumoral, a seletividade é um fator muito importante (MAZIÈRE; MORLIÈRE; SANTUS, 1991). Neste caso, a seletividade pode ser melhorada através do uso de formulações lipossomais.

A maioria dos fotossensibilizadores que exibem uma boa afinidade com os tecidos tumorais são fármacos associados a sistemas lipídicos de liberação, como os lipossomas, que reduzem significativamente o espalhamento do fármaco no corpo e aumentam sua concentração nos tecidos tumorais (REDDI et al, 1990).

As formulações lipossomais são extensivamente utilizadas para inúmeros fármacos tumorais hidrofílicos e lipofílicos (ALLEN, 1997), pois melhoram a eficiência e a seletividade tumoral destes fotossensibilizadores, após sua incorporação na bicamada lipídica. Os lipossomos têm vantagens sobre outros sistemas de liberação de fármacos, já que são biodegradáveis, não-tóxicos e não-imunogênicos.

Em casos de utilização de lipossomas em tratamentos da pele, as vesículas lípidicas necessitam atravessar pequenos poros da camada strato córneo com diâmetros inferiores a 50 nm (CEVC, 2004). Uma das possibilidades é a utilização de lipossomas utraflexíveis (Figura 6). Tais sistemas possuem a capacidade de penetrar na pele intacta (CEVC; VIERL, 2010).

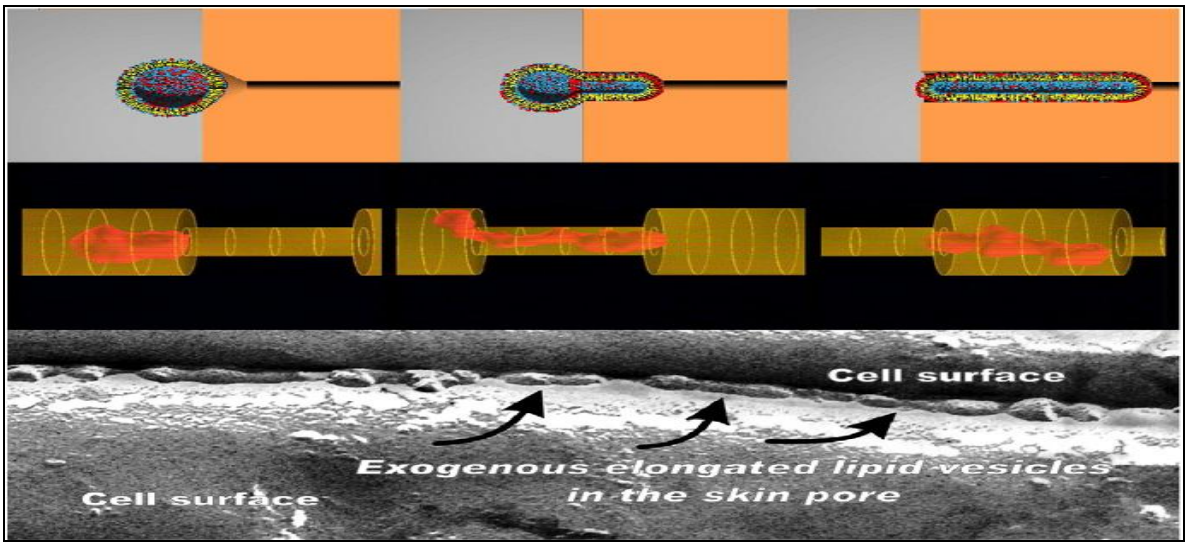


Figura 6: Ilustração de lipossoma ultraflexível (CEVC; VIERL, 2010).

Ativadores de borda aumentam a elasticidade das bicamadas nos lipossomas devido a uma redistribuição de lipídios anfifílicos (HIRUTA et al, 2006). Um ativador de borda frequentemente utilizado são surfactantes de cadeia simples que desestabilizam a bicamada lipídica do lipossomo, aumentando assim sua deformabilidade pela diminuição da tensão superficial (HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005). Exemplos de ativadores de bordas incluem os tensoativos: colato de sódio, deoxicolato de sódio, Tween 80 e Span 80 (HIRUTA et al, 2006).

As vesículas ultraflexíveis possuem penetração na pele intacta via transdermal, por gradiente osmótico e forças de hidratação (CEVC; BLUME, 1992).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivos Gerais:

Estudar o efeito sinérgico envolvendo oxigênio Singlete ($^1O_2$) e óxido nítrico (NO), pelo estímulo luminoso do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] (Figura 7), em linhagem de células cancerígena B16/F10.

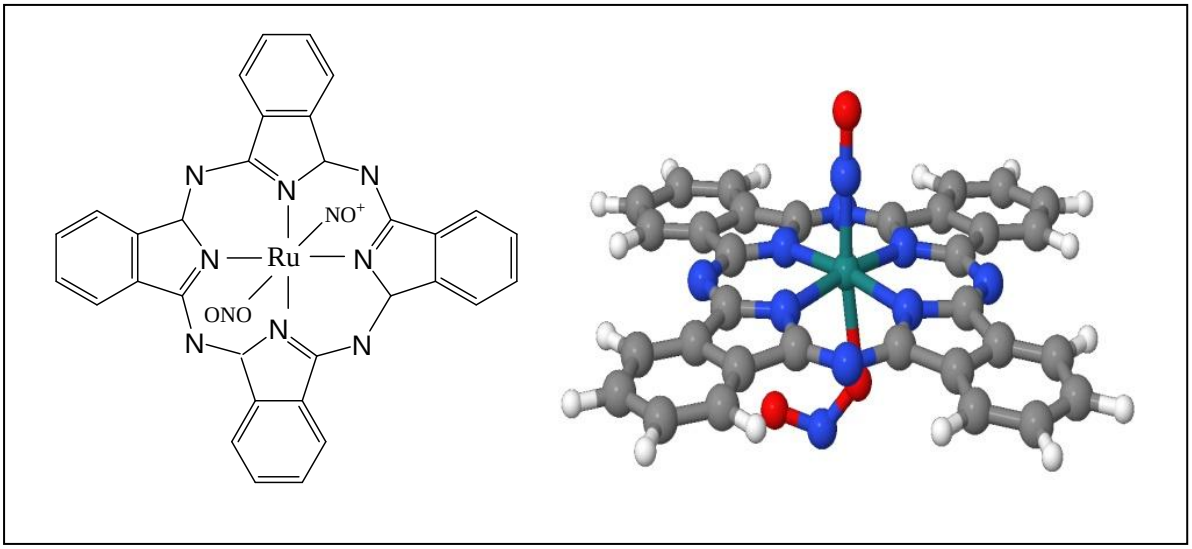


Figura 7: Estrutura química e espacial do complexo [Ru(NO)(ONO)pc].

II.2. Objetivos Específicos:

- Síntese e caracterização [Ru(NO)(ONO)pc].

- Estudo fotoquímico e fotofísico do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]; a proposta deste estudo será avaliar a capacidade do complexo de liberar NO (óxido nítrico) e produzir $^1O_2$ (oxigênio singlete) a partir de foto estímulo na região de 500 a 700 nm.
- Incorporação do complexo ftalocianinanitrosilonitritorutênio(II) em lipossoma e caracterização físico-química e avaliação como sistema de liberação do complexo.
- Ensaios Farmacológicos do complexo de rutênio como agente doador de NO.
- Estudos *in vitro* para avaliar os efeitos das espécies EROs e ERONs produzidas pelo complexo [Ru(NO)(ONO)pc], em linhagem de células de melanoma B16/F10.

MATERIAIS

E

MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. REAGENTES E SOLVENTES

A tabela 2 resume a procedência dos reagentes e solventes utilizados para procedimentos experimentais.

Tabela 2: Procedência dos reagentes utilizados durante a síntese e a caracterização do complexo.

Reagentes	Procedência
Ácido nítrico	Synth
1,2-dicianobenzeno	Aldrich
Cloreto de rutênio(III)	Aldrich
Clorofórmio	Synth
Cobre metálico	----------
1,8 Diazabicyclo [5.4.0] undec- 7 ene- DBU	Sigma-Aldrich
1,3-difenil-iso-benzofurano - DPBF	Acros organics
Dimetilsulfóxido- (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etanol	Synth
Hidróxido Potássio	F-maiaGold
Pentanol	Aldrich

III.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

III.2.1 Síntese dos complexos de rutênio

III.2.1.1 Síntese do precursor [Rupc]

O complexo [Rupc] é precursor do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]. A síntese de ftalocianinarutênio(II) analiticamente puro foi primeiramente relatada por Hanack e Kobel (1986) e atualmente é sintetizada em nosso laboratório com algumas modificações, segundo

Rocha e colaboradores (2008). Em um balão de três bocas de 100 mL foram dissolvidos 0.6000 g (2,90 x 10^{-3} mol) de $RuCl_3.3H_2O$ em 25 mL de pentanol previamente seco (destilado e mantido sobre peneira molecular). O sistema foi mantido em atmosfera de argônio e refluxo por 24 h a 140,0 ^{o} C. Após a solução adquirir uma coloração azul, que evidencia a formação de um complexo de rutênio(II), uma solução desaerada com excesso de 1,2 dicianobenzeno 3,4000 g (2,60 x 10^{-2} mol), previamente dissolvido em etanol, foi adicionada. Imediatamente, 10 gotas de 1,8 Diazabicyclo [5.4.0] undec- 7 ene (DBU) foram adicionadas à mistura, que foi mantida em refluxo e sob atmosfera de argônio, por 24 h. Após o resfriamento da solução, formou-se um sólido azul, que foi coletado por filtração a vácuo. O volume do filtrado foi reduzido através da evaporação do solvente à pressão reduzida, e outra porção de sólido se formou. A purificação do sólido azul foi efetuada pela lavagem deste com solução acidificada (ácido sulfúrico e água 2:1) e filtrado a vácuo, houve rendimento ao redor de 65,0 %.

III.2.1.2 Síntese do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]

A síntese do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foi preparada por meio de duas rotas sintéticas diferentes.

A primeira rota sintética foi preparada como descrita na literatura (ROCHA et al. 2008). Dissolveu-se 0,1000 g (1,63 x 10^{-1} mol) do precursor [Rupc] em 32 mL da mistura de solvente $CHCl_3$/etanol/água (1:5:0,4) desaerada e aquecida a 55,0 ^{o}C. Após 30 minutos, 0.3500 g (5.07 x 10^{-3} mol) de $NaNO_2$ dissolvidos em 5 ml de etanol/H_2O (1:1) foram adicionados à solução do complexo de rutênio e a mistura resultante foi mantida sob agitação, fluxo contínuo de argônio a 55,0 ^{o}C por 24 h. Durante o período da reação, foram acrescentados, de 4 a 5 vezes, 5 mL de $CHCl_3$ desaerados. Após o período de 24 horas, deixou-se o $CHCl_3$ evaporar e ocorreu a formação de um sólido verde, que foi coletado por filtração à pressão reduzida. O sólido verde foi purificado em coluna cromatográfica com alumina neutra e eluída com $CHCl_3$. Houve rendimento ao redor de 36,0 %.

A segunda rota sintética foi preparada a partir da reação de [Rupc] na presença do gás NO. Pesou-se 0.1000 g (1,63 x 10^{-1} mol) do precursor [Rupc], dissolvendo-o em 32 mL de uma mistura de solvente $CHCl_3$/etanol/água (1:5:0,4) desaerada. Após este procedimento, o argônio foi removido, iniciando-se imediatamente o borbulhamento de NO (ver item 3.2.2). Repetiu-se o mesmo procedimento de borbulhamento por quatro vezes, durante 48 h. O complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foi obtido. Houve rendimento ao redor de 87,0 %

III.2.2. Borbulhamento de NO

O gás NO foi gerado por uma solução de ácido nítrico 50%, sobre pastilhas de cobre metálico (Cu^0) (Equação 1).

$3Cu_{(S)} + 8H^+_{(aq.)} + 8NO^-_{(aq.)} \rightarrow 2NO_{(g)} + 3Cu^{2+}_{(aq.)} + 6NO^{3-}_{(aq.)} + 4H_2O_{(l)}$ (Equação 1)

Antes de borbulhar a solução padrão, o gás passou por uma solução de hidróxido de potássio (KOH)~10M, para remover possíveis traços de NO_2 presentes na mistura gasosa (Figura 8).

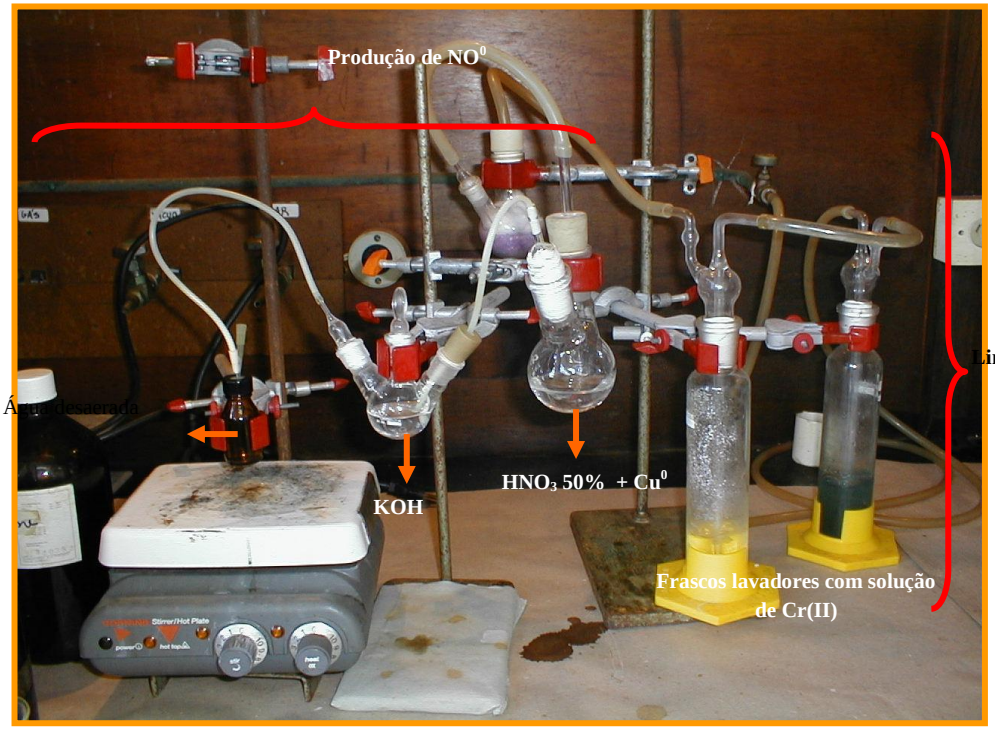


Figura 8: Aparato montado em capela para geração de óxido nítrico gasoso.

III.2.3. Preparação Solução Tampão para solubilizar complexo [Ru(NO)(ONO)pc]

Devido à baixa solubilidade do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], foi preparada uma solução estoque do complexo em DMSO e Etanol na proporção de (1:1). Após preparar a solução estoque, alíquotas foram retiradas e diluídas em tampão fosfato pH = 7,4 a fim de obter complexo em meio aquoso nas concentrações desejadas.

III.2.4. Análise Elementar

Os resultados de análise elementar dos complexos foram obtidos pelo aparelho Elemental Analizers CE Instruments Carlo Erba modelo 1110 CHNS-O, situado no Departamento de Química Universidade Federal de São Carlos.

III.2.5. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com Espectrofotômetro IR Prestige-21 Schimazur 02190 (Figura 9). As amostras foram feitas no estado sólido, utilizando pastilha de brometo de potássio (KBr).

Figura 9: Espectrofotômetro IR Prestige-21 Schimazur 02190.

III.2.6. Espectroscopia na região do ultravioleta–visível

A caracterização por espectroscopia na região UV-visível dos complexos foi realizada em um espectrofotômetro UV-visível-NIR Hitachi modelo U-3501 (Figura 10). Quantidades estabelecidas dos complexos foram dissolvidas em clorofórmio, solução tampão (conforme descrito no item 3.2.4). Após preparações das amostras, ambas foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 800 a 200 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absortividade molar (ε).

Figura 10: Espectrofotômetro UV-visível-NIR Hitachi modelo U-3501.

III.2.7. Espectroscopia de Luminescência

Os espectros de excitação e emissão do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foram realizados, em Clorofórmio, solução tampão e lipossoma, à temperatura de 20,0 ^{o}C no espectrofluorômetro RF-3501PC (Figura 11). Utilizou-se para tanto uma cubeta triangular de quarzo de 1,0000 cm de caminho óptico.

Figura 11: Espectrofotômetro de Luminescência**.**

III.2.8. Procedimento para a fotólise

Nos experimentos de fotólise, foi utilizado laser de diodo marca Colibri da Quantum tech. Para o composto [Ru(NO)(ONO)pc] estudado, utilizou-se laser na região do UV (377 nm) e na região do visível (660 nm). Foram preparadas soluções pela dissolução de massa adequada do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], de modo a resultar em uma concentração final de 10^{-4} mol. L^{-1} em clorofórmio, solução tampão e lipossoma. As soluções foram fotolizadas em atmosfera de oxigênio e de argônio. Uma alíquota de 2,5 mL da solução contendo o complexo de nitrosilo foi colocada numa cela espectroscópica e irradiada em diferentes tempos. Para as medidas na ausência de oxigênio a solução foi desaerada por cerca de 10 minutos, diretamente em um frasco de Zwickell (Figura 12), adequado para experimentos em atmosfera desaerada. As alterações ocorridas durante a fotólise a 377 nm e 660 nm foram monitoradas através do perfil dos espectros na região do UV - visível e NOmeter.

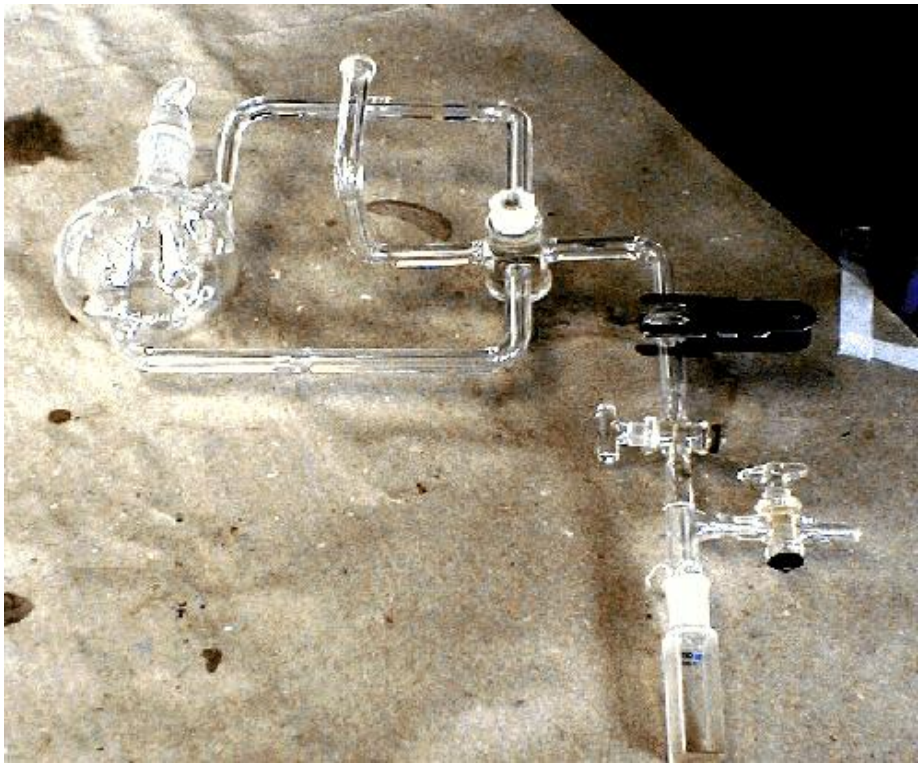


Figura 12: Frasco de Zwickell.

III.2.9. Calibração do NOmeter

A calibração do NOmeter foi realizada através de uma solução tampão padrão de NO gasoso (KUDO et al, 1998). Em 10,0 mL de água borbulhou-se argônio por 30 min, a fim de remover todo o oxigênio presente no meio. O gás NO foi gerado por uma solução de ácido nítrico 50%, na qual mergulharam-se pedaços de cobre metálico (Cu^0) (Equação 1). Antes de borbulhar a solução padrão, o gás passou por uma solução de KOH, para remover possíveis traços de NO_2 presentes na mistura gasosa (Figura 6).

O óxido nítrico gasoso foi borbulhado por 1 hora, tempo suficiente para saturar a solução tampão. Admitiu-se que o valor da concentração dessa solução saturada de óxido nítrico foi 2,1 x 10^{-3} mol L^{-1}, conforme descrito na literatura (MORI; BERTOTTI, 2000). Assim, a partir dessa solução padrão de concentração, conhecida como NO gasoso, calibrou-se o aparelho. Acoplou-se o NOmeter em 10,0 mL de tampão, após borbulhar argônio por 30 min, ajustou-se o aparelho no zero. Este tampão deve necessariamente ter o mesmo pH do tampão que será utilizado para dissolver o complexo no momento da fotólise. A seguir, gerou-se uma concentração conhecida por NO na solução, pela adição de um volume específico da solução padrão de NO. Após alguns segundos, quando o valor da corrente de NO na solução permaneceu constante, adicionou-se uma nova quantidade da mesma solução padrão. O aumento observado de corrente mostrou-se proporcional à concentração de NO.

III.2.10. Determinação qualitativa de Oxigênio Singlete - $^1O_2$

A detecção de oxigênio singlete foi feita diretamente por meio de emissão de fosforescência a 1270 nm, utilizando-se um detector de germânio da North Coast Scientific Coorporation, modelo 823 A. O sinal do transiente para o oxigênio singlete foi detectado por um osciloscópio digital (Teltronic modelo TDS 340A), disponível nos laboratórios de Fotoquímica e Fotobiologia, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco. Neste estudo, foi determinado o rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_Δ) gerado pelos complexos ftalocianina de rutênio, estudados em meio orgânico ($CHCl_3$) e meio heterogêneo (lipossomal). Os valores de Φ_Δ foram obtidos relativamente ao $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ em etanol (Φ_Δ = 0,80) e solução tampão (Φ_Δ = 0,77)(FRESNADILLO et al, 2004). As concentrações preparadas para este estudo foram feitas de modo a assegurar que a absorbância em 532 nm (o comprimento de onda de excitação) fosse da ordem de 0,3. As soluções de complexos ftalocianina de rutênio e $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ foram saturadas com O_2 durante 30 minutos em cubetas de quartzo para fluorescência em meio orgânico e heterogêneo,

respectivamente. Em seguida, determinou-se o tempo de vida do oxigênio singlete gerado pelos complexos. Na experiência cinética utilizada para determinar o tempo de vida do oxigênio singlete gerado, a janela de tempo utilizada foi de 1 μs para todas as soluções estudadas. Como resposta do sistema de laser computadorizado, obteve-se um gráfico da variação de intensidade de fosforescência em 1270 nm em função do tempo, bem como a curva teórica que melhor simulava o decaimento observado.

III.2.11. Determinação indireta de Oxigênio Singlete - $^1O_2$

Neste estudo, a detecção do oxigênio singlete foi realizada por um método espectrofotométrico de forma indireta, utilizando 1,3-difenil-iso-benzofurano (DPBF) como sonda (TADA et al, 2007). O DPBF reage irreversivelmente com $^1O_2$, o que provoca uma diminuição na intensidade da banda de absorção deste em 400 nm. Para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete, utilizou-se 1,3-difenil-iso-benzofurano (DPBF), em soluções contendo complexos [Rupc] e [Ru(NO)(ONO)pc] à temperatura de 20,0° C em solução tampão. As amostras foram imediatamente preparadas antes da sua utilização, através da transferência de 40,0 µl DPBF solução estoque (8,0 x 10^{-3} M) em 2,0 ml da solução de [Rupc] ou [Ru(ONO)(NO)pc], e foram irradiados ambos em um comprimento de onda de 660 nm, em uma cubeta de quartzo. Os experimentos foram realizados por irradiação de amostras com 660 nm utilizando o laser de diodo marca Colibri da Quantum tech, enquanto espectros de absorção foram obtidos após intervalos de tempo em um espectrofotômetro UV-visível-NIR Hitachi modelo U-3501.

III.2.12. Variação da concentração de oxigênio em meio biológico utilizando-se eletrodo de Clark

O consumo de oxigênio em meio biológico foi medido utilizando-se eletrodo de oxigênio tipo Clark (Instruments - Hansatech) equipado com agitação magnética, a 28,0°C (Figura 13). O oxigênio molecular mensurado foi avaliado após adição do precursor [Rupc] e do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], em meio de células B16/F10, na presença e na ausência de irradiação.

Figura 13: Eletrodo de oxigênio tipo Clark (Instruments - Hansatech).

III.3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Os ensaios farmacológicos foram conduzidos, sob a co-orientação da Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack (FCFRP-USP).

Os experimentos foram realizados em anéis de aorta de ratos normotensos. Os ratos foram sacrificados por decapitação, suas aortas isoladas e dissecadas de tecidos conjuntivos. Foram retirados anéis com 4 mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente, para evitar a interferência do NO endógeno sobre o efeito dos doadores de NO, e a efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento com a acetilcolina (1 mmol/L) em aorta pré-contraída com a EC_{50} da fenilefrina (100 nmol/L).

Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão em uma cuba de órgãos isolados (Figura 14). Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável, e o outro, a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado, contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado, com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $CaCl_2$ 1,6; $MgSO_4$ 1,2; $NaHCO_3$ 14,9; glicose 5,5 em pH 7,4, sob aeração com mistura de carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos, sob tensão basal (pré-determinada pela curva de tensão com KCl) constante de 1,5 g,

para estabilização. As artérias foram estimuladas com fenilefrina (100 nmol/L) até que as contrações fossem reproduzidas e, a seguir, iniciamos os protocolos específicos, descritos abaixo. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor conectado ao polígrafo. Foram realizadas curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas para o doador de NO, [Ru(NO)(ONO)pc].

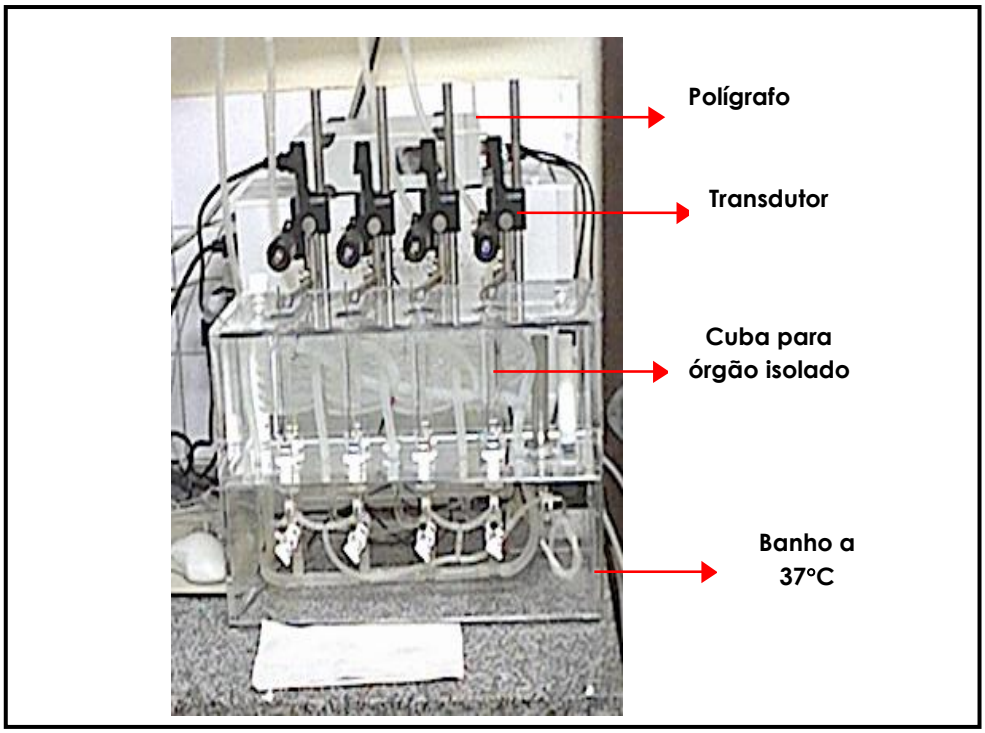


Figura 14: Cuba utilizada para o estudo farmacológico com aortas de ratos.

III.4. ENSAIOS FARMACOTÉCNICOS

Os ensaios farmacotécnicos foram conduzidos sob a co-orientação da Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco (FFCLRP-USP).

III.4.1. Preparação dos lipossomos de DOPC pelo método de injeção etanólica

Os lipossomos foram preparados pelo método de injeção etanólica conforme descrito por Kremer e colaboradores (1977). Prepararam-se lipossomos unilamelares de Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) através de uma solução contendo 360 μL etanol, 0,01g do fosfolipídio DOPC e 30 μL do tensoativo Tween 20 (de LIMA et al, 2008). Esta solução foi

colocada em uma seringa de 400 μL, que foi, posteriormente, conectada a uma jaqueta de vidro termostatizada contendo 5 mL de uma solução tampão fosfato pH = 7,4.

A injeção etanólica é feita por uma bomba peristáltica (World Precision Instruments (WPI modelo SP 100i) de adição controlada (Figura 15). As injeções foram realizadas a 40,0^{o}C, sob agitação magnética, na ausência de luz e a uma velocidade de 1,0 μL.s^{-1} (360 μL.h^{-1} na bomba).

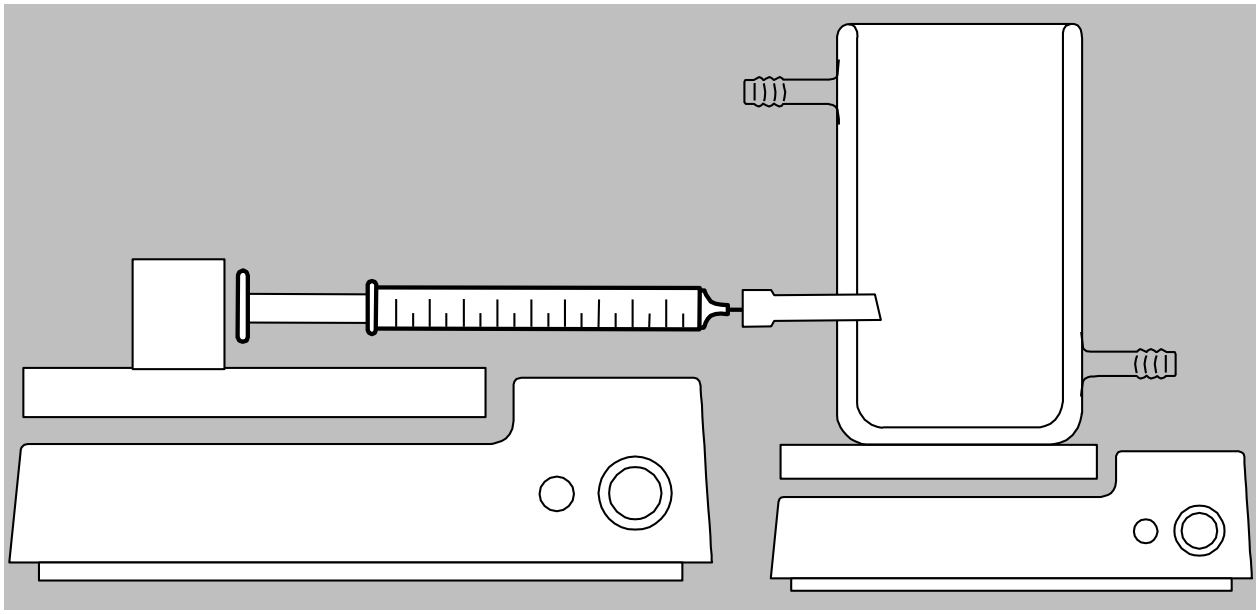


Figura 15: Aparato para obtenção de sistema lipossomais.

A solução tampão permaneceu contida em um recipiente cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro e a injeção foi realizada a aproximadamente 2,5 cm abaixo da superfície líquida.

Para preparação do lipossoma [Rupc] e [Ru(NO)(ONO)pc], um volume adequado do fármaco (complexos dissolvidos em DMSO, a fim de se obter uma concentração final 10,0 μM), foi adicionado à solução etanólica com fosfolipídio e tensoativo. Após cada preparação lipossomal foi registrado espectro de absorção dos complexos associados ao sistema lipossomal, a fim de se verificar a eficiência da incorporação e ausência de formação de agregados.

III.4.2. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial de superfície (Zeta) da formulação lipossomal

A determinação do tamanho de partículas e polidispersividade das vesículas lipossomais foi realizada no laboratório da Dr^{a}. Maria Vitória Badra Bentley, na faculdade de Ciências Farmacêuticas, através da técnica de medidas de espalhamento dinâmico, utilizando-

se o equipamento Zetaisizer Nano System ZS (Malvern-UK). As amostras foram colocadas em uma cela de quartzo de um cm de caminho óptico, e as medidas foram feitas à temperatura (20^oC). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4.0 mW, operando em um comprimento de onda de 633 nm, e realiza as medições não invasivas por "backscatter optics" (NIBS). As medidas foram feitas em um ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza, em média, 12 determinações para cada análise. A carga de superfície (potencial Zeta) foi determinada pela mobilidade eletroforética da formulação, utilizando o mesmo sistema descrito acima.

III.5. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios citotóxicos foram conduzidos sob a co-orientação do Prof. Dr. Carlos Curti (FCFRP-USP).

III.5.1. Cultura e tratamento de células da linhagem neoplásica de melanoma B16/F10

Células de Melanoma Murino B16-F10 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem celular foi cultivada em meio DMEN, com 10% definido suplemento de soro fetal bovino e 100 UI /ml de penicilina G, 100 mg / ml de estreptomicina e 1 lg / ml anfotericina, a 37 °C, em ambiente contendo 5% de CO_2.

Para os tratamentos, as células foram semeadas por 24 horas em placas (NUNC MICROWELL^{TM} PLATES) de 96 poços, para estudo de viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Foram plaqueadas $2x10^4$ células por poço, em meio DMEM, com 3% definido suplemento de soro fetal bovino sem fenol. Concentrações (10^{-9} – 10^{-6} M) do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foram incubadas por 3 horas (confluência 75 - 90%). Após este período, os poços foram irradiados em 660 nm. utilizando-se laser diodo (4 $J.cm^{-2}$) e então a viabilidade celular foi avaliada em 3, 8 e 24 h após irradiação.

III.5.2. Espectroscopia de absorção atômica em células B16/F10

A inserção do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] nas células de melanoma B16/F10 foi quantificada pela presença de átomos do íon metálico rutênio, através de espectroscopia de absorção atômica (ELAN DRC II – PerkinElmer) com plasma indutivamente acoplado. As células foram incubadas por 3 e 24 horas (6×10^{-4} células/poço em placas de 12 poços) com o complexo [Ru(NO)(ONO)pc], tripsinizadas, lisadas (CelLytivtmM Cell-sigma) e

centrifugadas (1200 rpm) a fim de se obter a fração citosólica. No momento da análise, as amostras foram diluídas (1:50) em HNO_3 (1%).

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

IV. RESULTADO E DISCUSSÕES

IV.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

IV.1.1.Síntese dos complexos de rutênio

O precursor [Rupc] foi obtido através da reação entre o $RuCl_3.3H_2O$ e 1,2 dicianobenzeno que em condições adequadas, na presença de 1,8 Diazabicyclo [5.4.0] undec-7 ene (DBU) e refluxo a 140°C, propicia a hidrólise do dicianobenzeno e a sua reação de ciclização, levando-se ao complexo desejado.

A primeira rota sintética na preparação do [Ru(NO)(NO_2)pc] foi feita através da reação do nitrito de sódio com precursor [Rupc], como descrito na literatura (Rocha et al. 2008). O rendimento obtido em nossos trabalhos foi ao redor de 60,0 % para o composto sem purificação.

A segunda rota sintética foi preparada a partir da reação de [Rupc] na presença do gás NO. Sabe-se que complexo de rutênio contendo NO na esfera de coordenação do metal pode ser obtida pelo borbulhamento do óxido nítrico gasoso em um precursor que contenha o fragmento Ru-(H_2O). Neste caso o rendimento fora ao redor de 87,0 % para o composto purificado.

A segunda rota sintética obtida foi proposta devido à dificuldade de reprodutibilidade e purificação do complexo obtido através da primeira rota sintética. Naquele caso técnica de cromatografia em coluna (alumina) fora utilizado, usando-se como eluente clorofórmio. Além de trabalho laborioso, o rendimento final era em torno de 36,0 %, sendo observado que a grande maioria do composto ficara retido na coluna. Desta feita, uma alternativa foi conseguida pelo processo descrito como a síntese de [Ru(NO)(ONO)pc].

IV.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

IV.2.1 Análise Elementar

Os resultados carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos de rutênio, apresentados na tabela 3, foram satisfatórios. Com isso, é possível inferir que a fórmula proposta é coerente com a descrição molecular obtida para os complexos.

Tabela 3: Resultados de análise elementar para os complexos de rutênio.

Complexo	%C Teor. Exp.	% N Teor. Exp.	%H Teor. Exp.
[Rupc] – $RuC_{32}N_8H_{16}$	62,33 /62,059	18,18 / 18,055	2,94 / 2,912
*[Ru(NO)(ONO)pc] - $RuC_{32}N_{10}H_{16}O_3$	55,49 / 54,998	20,32 / 19,851	2,62 / 2,600
**[Ru(NO)(NO_2)pc]- $RuC_{32}N_{10}H_{16}O_3$	55,49/ 55.089	20,23/ 19,902	2,62/ 2,612

* Síntese por borbulhamento de NO. ** Síntese através da adição de nitrito.

IV.2.2. Características espectroscópicas na região do ultravioleta-visível para a ftalocianina Base livre

Dentre os métodos mais utilizados para caracterizar as ftalocianinas, metalo-ftalocianinas e complexos nitrosilos está a espectroscopia eletrônica na região do UV-visível. A principal característica de ftalocianinas é presença de ligações π, alta conjugação e ciclos aromáticos. Compostos assim são caracterizados por apresentarem bandas de transição eletrônica atribuídas a $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. As transições envolvendo os elétrons livres são relativamente fracas, enquanto as transições envolvendo os elétrons π são bastante intensas.

As ftalocianinas exibem um comportamento aromático com uma alta densidade eletrônica, devido ao arranjo planar conjugado de 18 elétrons π do anel macrocíclico, que são responsáveis pelas características espectroscópicas deste composto. Ftalocianinas apresentam geralmente uma cor azul intensa, derivada de uma forte banda de absorção situada na região do vermelho no espectro eletromagnético. No espectro eletrônico, a ftalocianina apresenta uma banda em 670 nm referente à banda Q, com absortividade molar (ε) da ordem 10^5L. mol^{-1} cm^{-1}, que é atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e, em região de mais alta energia ,em torno de 350 nm, tem-se a chamada banda Soret (B), com uma absortividade molar (ε) da ordem 10^4L. mol^{-1} cm^{-1}, banda decorrente também de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (OUGH, 1994; KOZLOWSKI et al, 2006; GROBOSCH et al, 2010).

Devido à planaridade das moléculas e ao elevado grau de conjugação eletrônica, é bastante comum a ocorrência de interações hidrofóbicas entre os anéis, favorecendo a agregação molecular em solução. Esse efeito provoca um desdobramento das bandas Q devido à ocorrência de espécies monoméricas (670 nm) e diméricas (633 nm), com deslocamentos que têm sido interpretados através de um modelo de acoplamento excitonico

(Mi et al, 2003). De modo geral, as espécies monoméricas apresentam bandas Q mais finas, ao passo que as bandas mais largas indicam espécies associadas (TOMA; BONIFÁCIO; ANAISSI, 2005). A bandas B e Q decorrem de excitação eletrônica a partir dos Orbitais HOMO para orbitais LUMO. Devido a sua estrutura, a ftalocianina é um macrocíclico que contém átomos doadores de pares de elétrons que podem formar ligações coordenadas com o metal central. Desta forma, as ftalocianinas podem conter, no interior de seu macrociclo, diferentes metais, principalmente diamagnéticos e em estado de oxidação 2+, formando um complexo neutro. Ftalocianina contendo metal de transição em função da substituição dos átomos de hidrogênio na cavidade central é geralmente chamada de metaloftalocianinas (MPc). A coordenação da ftalocianina com o metal irá resultar em alteração da conformação molecular do complexo. De acordo com Kobayashi e colaboradores (1993), a formação de dímeros, a coordenação ao metal central com determinados ligantes e a ampliação de sistema π são os três fatores que dão origem ao efeito batocrômico ou hipsocrômico que acompanham as mudanças nos valores de máxima absorbância da banda Q e banda B.

IV.2.3. Espectroscopia na região do UV-Visível para complexos de rutênio e ligantes insaturados

Complexos de rutênio(II), com ligantes insaturados coordenados, apresentam geralmente bandas na região do visível, atribuídas a transições de campo ligante (CL) e de transferência de carga metal ligante (TCML), e bandas na região do ultravioleta, atribuídas a transições internas dos ligantes insaturados (IL) (LEVER, 1984). A figura 16 ilustra, de forma simplificada, o diagrama de orbitais moleculares de um complexo de rutênio(II) e suas possíveis transições eletrônicas.

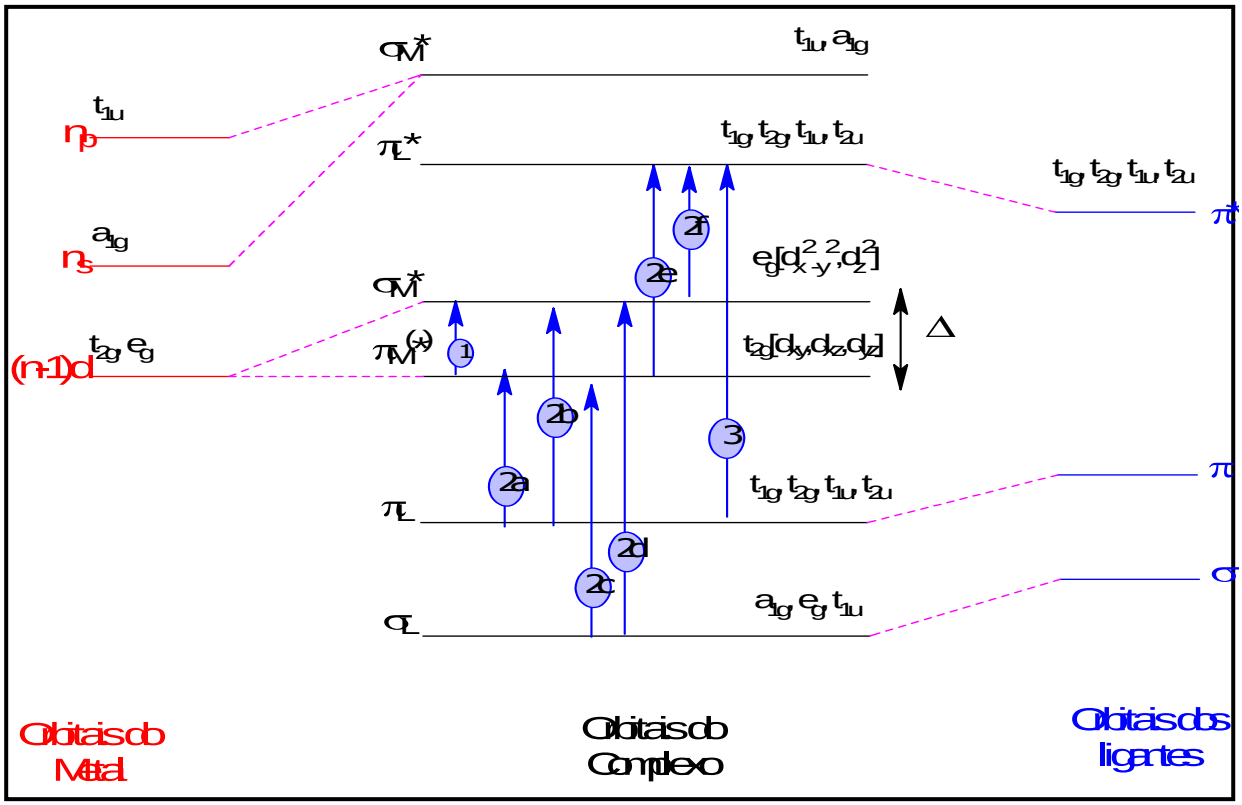


Figura 16: Diagrama simplificado de orbitais moleculares para representar os tipos de transições eletrônicas em complexos octaédricos. As linhas tracejadas ligam o orbital molecular ao orbital atômico que melhor o caracteriza (BALZANI; CARASSITE, 1970).

Desta forma, vale ressaltar que a transição de campo ligante CL (1) é observada entre níveis energéticos localizados no metal. As bandas são originadas pelo desdobramento das energias dos orbitais d (transições d → d), que, em um campo octaédrico, podem ser designados por t_{2g} e e_g. A transição de transferência de carga ou elétron do ligante para o metal- TCLM (2a, 2b, 2c, 2d) é: um tipo de transferência que é comum acontecer com íons metálicos em estado de oxidação mais alto. Por sua vez, transição de transferência de carga ou elétron do metal para o ligante TCML (2e, 2f) caracteriza-se por uma ligação π verificada nos compostos de metais com ligantes insaturados, acontece com íons metálicos em estado de oxidação mais baixo, como no caso do Ru(II). Essas bandas possuem coeficiente de máxima absortividade molar (ε) da ordem de 10^4 L mol^{-1} cm^{-1} e normalmente localizam-se na região do visível. A ocorrência dessas bandas depende da existência de orbitais de simetria adequada no metal e no ligante, com energias pouco diferentes e grau de recobrimento diferente de zero. Uma vez que os elétrons de valência do íon metálico se encontram em orbitais de simetria π e considerando que os orbitais desocupados dos ligantes de menor energia também possuam simetria π, a transição mais provável é, portanto, $d_\pi(M) \rightarrow \pi^*(L)$. A transição interna do

ligante IL (3) é semelhante às transições observadas nos ligantes insaturados não coordenados.

IV.2.4.Espectroscopia na região do UV-Visível para complexo ftalocianinarutênio(II)

Neste trabalho, o átomo de rutênio foi coordenado à ftalocianina, no seu estado de oxidação (II), desta forma, foi possível observar alterações no espectro UV-visível da ftalocianina decorrente da coordenação ao centro metálico.

Conforme exposto acima, espera-se que o complexo ftalocianinarutênio(II) e os complexos nitrosilo de rutênio estudados neste trabalho apresentem determinadas transições eletrônicas em seus espectros na região do UV-visível, como as bandas IL, CL e de TCML. As bandas de campo ligante (CL) não foram observadas no espectro UV-visível dos complexos [Rupc], provavelmente por estarem encobertas pelas bandas remanescentes.

Em relação à coordenação da ftalocianina ao centro metálico, observamos que há deslocamento hipsocrômico da banda Soret (B) de 350 nm para 318 nm e banda Q de 670 nm para 640 nm. Este aumento observado de energia pode ser atribuído à estabilização dos orbitais do estado fundamental, face à diminuição da densidade eletrônica do ligante, em razão da coordenação ao íon metálico (Figura 17). A banda soret (B) em 318 nm pode conter também componente de TCML, devido à transferência de elétron de um orbital predominante do metal para um orbital vazio π^* de mais alta energia do ligante aromático ftalocianina. Embora seja prevista contribuição do metal como componente da função de onda dos orbitais das ftalocianinas (V), provavelmente o deslocamento hipsocrômico observado neste trabalho é concernente do efeito do metal na estrutura do ligante macrocíclico. A conclusão leva em conta o deslocamento destas bandas para região de menor comprimento de onda, conforme observado com outros centros metálicos (Tabela 4).

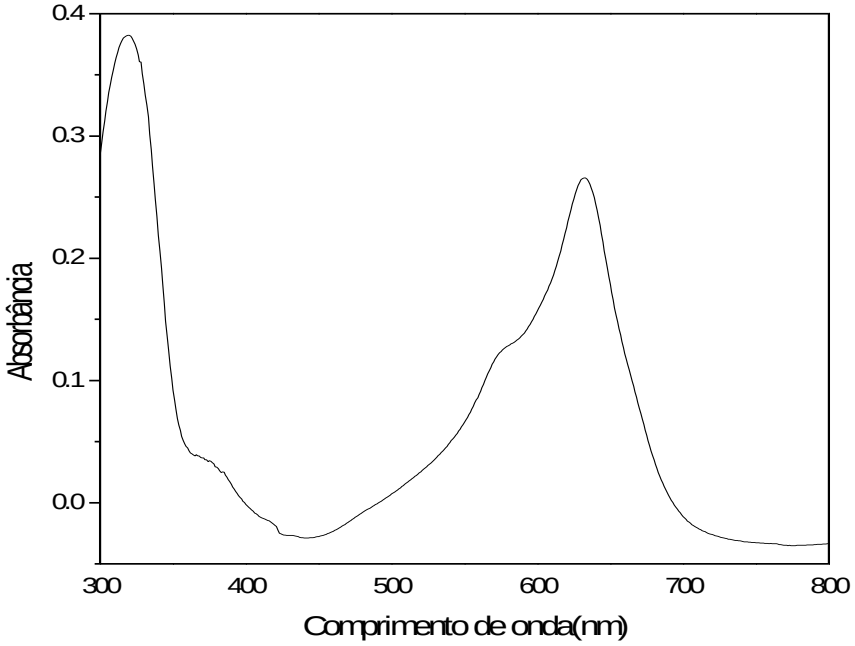


Figura 17: Espectro de absorção na região do UV- visível para [Rupc] em Clorofórmio, concentração 1,0 x 10^{-5} M. (Temperatura 20,0^{o}C).

Tabela 4: Dados do espectro eletrônico dos complexos com metaloftalocianina.

Complexos	**Bandas região do visível (λ/nm)**
Ftalocianina Livre	350 nm; 670nm
[Nipc][a]	630 nm
[Copc][a]	625 nm
[Mgpc][a]	615 nm
[Rupc]	640 nm

[a]Clarck; Yandle, 1972

IV.2.5. Espectroscopia na região do uv-visível para complexo ftalocianinanitrosilonitritorutênio(II)

As possíveis transições eletrônicas observadas com a coordenação dos ligantes NO e NO_2^- ao complexo ftalocianinarutenio(II) - [Rupc] - são CL, TCML (Ru→NO), TCML (Ru→pc), TCLL (pc→NO) e transições IL. Na figura 18, pode-se observar alteração espectral, devido à coordenação dos ligantes NO^+ e NO_2^- ao centro metálico, que resulta no deslocamento batocrômico (para região do vermelho) da banda Soret (B), de 318 nm para 355 nm, e da banda Q, de 640 nm para 682 nm. Considerando-se a forte retro-doação d_π - π^*(NO), geralmente designada para complexos nitrosilos de rutênio (GORELSKY et al, 2000; TFOUNI et al, 2003), a expectativa é de que houvesse um aumento de energia das bandas B e Q, haja vista maior estabilização dos orbitais moleculares do estado fundamental. Como a planaridade do complexo deve ter sido influenciada com a coordenação dos ligantes axiais, é lícito supor ter sido este o fator preponderante na alteração dos orbitais moleculares do macrocíclico, resultando em diminuição de energia. Uma segunda banda em 608 nm é mais pronunciada no complexo [Ru(NO(ONO)pc] (Figura 18) do que aquela similar para a espécie [Rupc] (Figura 17). Embora este comportamento também seja associado à ocorrência de espécies diméricas, no caso do composto [Ru(NO)(ONO)pc] parece estar ligado ao desdobramento de orbitais moleculares do ligante ftalocianina. A inferência diz respeito aos cálculos desenvolvidos para estes compostos, cujo espectro eletrônico calculado é semelhante àquele obtido experimentalmente, em termos de número de bandas e energia das mesmas (ver item V). Na tabela 5, encontram-se os valores do coeficiente de absortividade molar para o precursor [Rupc] e para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc].

Tabela 5: Dados do espectro eletrônico dos complexos com ftalocianina de rutênio em solução de CH_2Cl_2.

Complexo	λ, nm (log ε, mol^{-1} L cm^{-1})[a]
[Rupc]	318 nm (4,58); 570 nm (4,14); 640 nm (4,44)
[Ru(NO)(NO_2)pc]	350 nm (4,39); 608 nm (3,93); 682 nm (4,44).

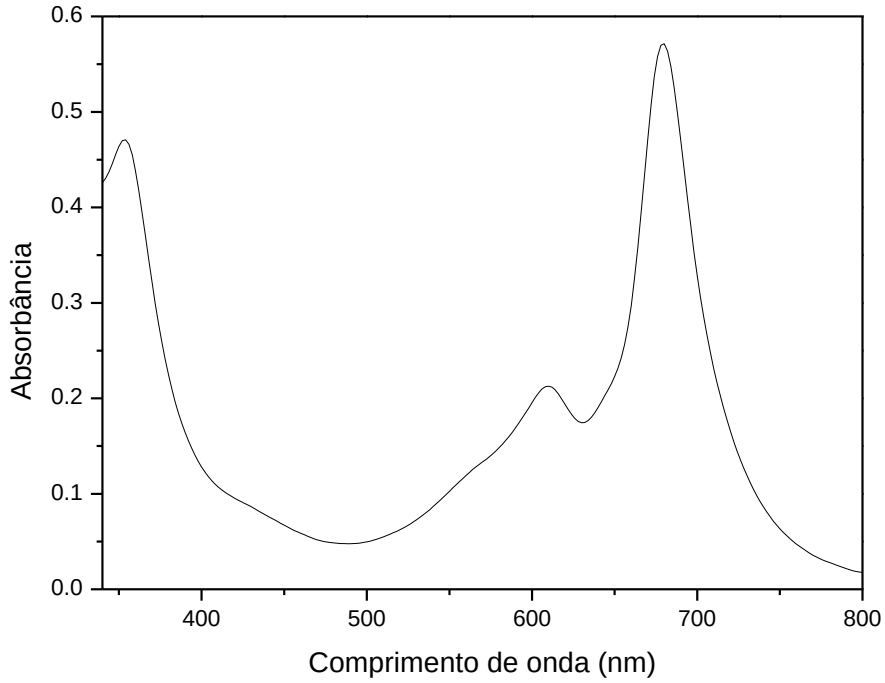


Figura 18: Espectro de absorção na região do UV- visível para [Ru(NO)(ONO)pc] em Clorofórmio, Concentração $2x10^{-5}$ M. (Temperatura 20,0^{o}C).

IV.2.6. A influência do solvente no processo de agregação do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]

Complexos de metalo-ftalocianinas geralmente tendem a formar agregados em solução (MARTIN et al, 1991). Alguns solventes são capazes de afetar o processo de agregação, por exemplo, os solventes orgânicos são responsáveis por reduzir o processo de agregação, enquanto soluções aquosas conduzem a complexos altamente agregados (SOMASHEKARAPPA; KESHAVAYYA, 2001, MAREE; KUZNETSOVA; NYOKONG, 2001). Em se tratando de ftalocianinas, é razoável considerarmos como provável a presença de algum tipo de agregação, quer seja sob a forma de dímeros, ou sob a forma de agregados de ordem superior. Os dímeros são considerados inativos e muito mais ineficientes do que os monômeros em relação à fotossensibilizadores (Ueno; Machado; Machado, 2009). A dimerização consiste em dois macrocíclicos planares mantidos face a face que podem existir em uma conformação empilhada (Stacked) ou escalonada (Staggered). A agregação das

moléculas da ftalocianina está associada a uma diminuição do coeficiente de absortividade molar e a um alargamento da banda Q. Esta propriedade é conferida essencialmente pela sua nuvem de elétrons π deslocalizados ao longo do anel central, de que resultam interações do tipo Van der Walls, ou seja, ligação de baixa energia, em que, devido à pequena distância, as moléculas encontram-se, muitas vezes, em situação de acoplamento eletrônico π-π. Estes acoplamentos podem alterar os espetros de absorção das espécies envolvidas. De fato, uma das principais maneiras de observar a presença de espécies agregadas em uma amostra de ftalocianina é analisando as propriedades espectroscópicas das amostras e verificando se há uma obediência à lei de Lambert-Beer. Desvios negativos a esta lei evidenciam uma provável presença de agregados. Os seus espectros de absorção também evidenciam diferenças no comprimento de onda dos máximos de absorção, bem como do próprio coeficiente de absortividade molar.

Como podemos observar, os espectros de UV-Visível para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em solventes apolares e em meio lipossomal (Figura 19 e 20) mostram uma intensa banda Q referente às espécies monoméricas, não apresentando alargamento da banda em 682 nm e surgimento de banda em 616 nm, comportamento típico de dímeros (Ueno; Machado; Machado, 2009). Porém, os espectros de UV-Visível para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em solventes polares (Figura 21) apresentam um desdobramento das bandas Q, em que a intensidade das espécies monoméricas na região de 670 - 690 nm é menor do que para as espécies diméricas 600 - 630 nm, esta mudança espectral pode ocorrer devido à presença de agregados ou devido `a interação do solvente com o complexo.

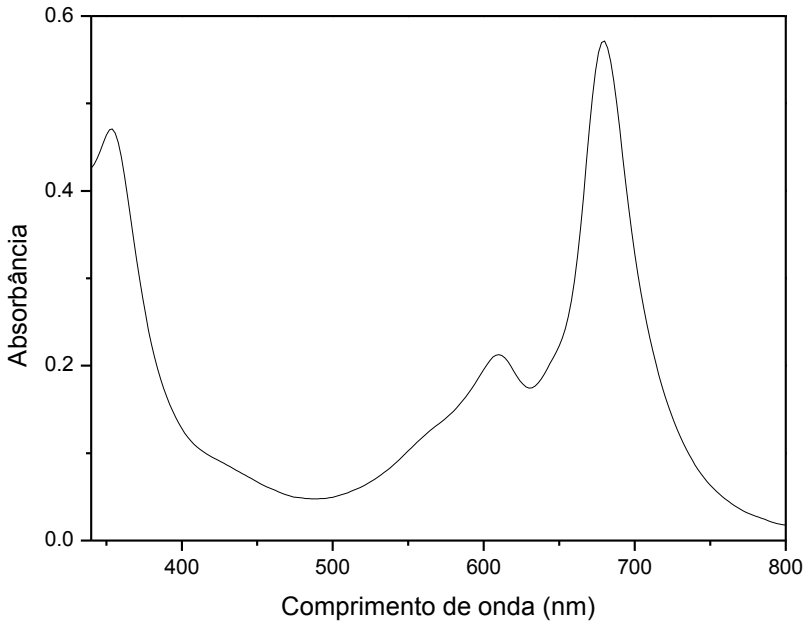


Figura 19: Espectro de absorção na região do UV- visível para [Ru(NO)(ONO)pc] em Clorofórmio (2,0 x 10^{-5} M). (Temperatura 20,0 ^{o}C).

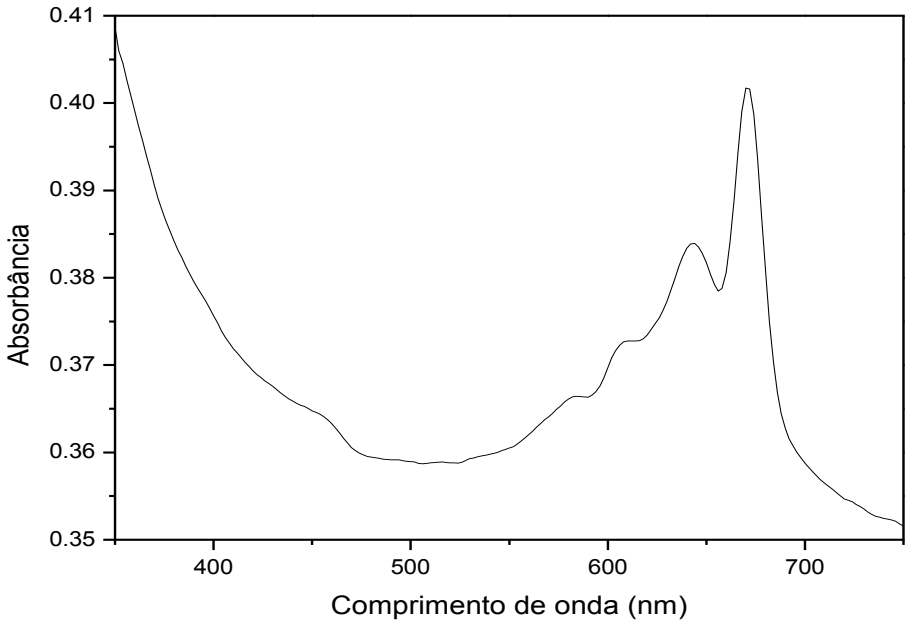


Figura 20: Espectro de absorção na região do UV- visível para [Ru(NO)(ONO)pc] em lipossoma (1,0 x 10^{-6} M). (Temperatura 20,0 ^{o}C).

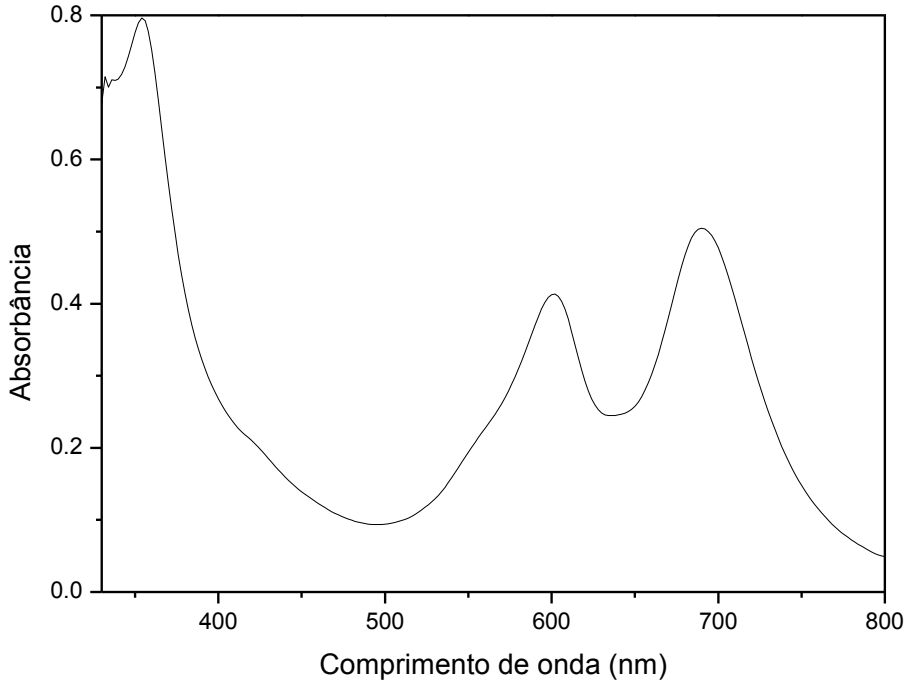


Figura 21: Espectro de absorção na região do UV- visível para [Ru(NO)(ONO)pc] em meio tampão pH = 7,4 na concentração de 2,0 x 10^{-5} M . (Temperatura 20,0 ^{o}C).

Medidas de absorbância de soluções do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] na faixa de 10^{-6} - 10^{-4} em tampão pH 7,4 foram obtidas e um gráfico de absorbância versus concentração foi plotado (Figura 22). Aparentemente, a lei de Lambert-Beer é obedecida, o que nos leva a conclusão de que, nestes limites de concentração, não há agregação. Acima desta concentração, a formação de precipitado é observada.

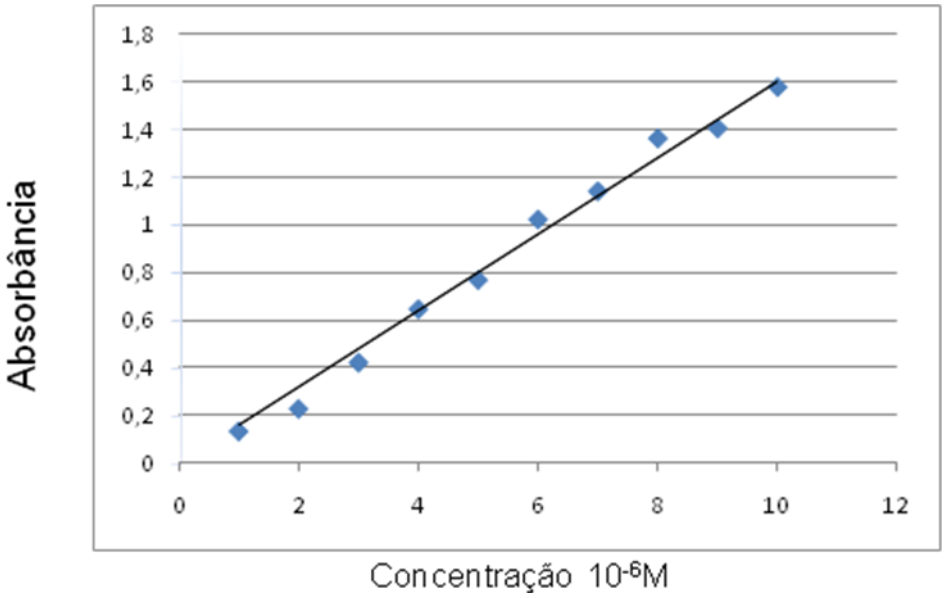


Figura 22: Variação da absorbância do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em função da concentração em meio tampão pH = 7,4, no comprimento de onda 696 nm para determinação de agregação.

IV.2.7. Solvatocromismo

Solvatocromismo ou deslocamento solvatocrômico é definido pela IUPAC como deslocamento sofrido na posição de banda de absorção ou emissão eletrônica de uma molécula, em função de mudanças na polaridade do solvente (McNaught; Wilkinson, 1997). Este deslocamento espectral é resultado da diferença de energia de solvatação entre dois estados eletrônicos envolvidos na transição. Quando há deslocamento para região do azul, geralmente observado com o aumento da polaridade do solvente, tem-se um deslocamento hipsocrômico ou solvatocromismo negativo. Quando há deslocamento para região do vermelho, tem-se deslocamento batocrômico ou solvatocromismo positivo. Entretanto, o efeito do solvente no espectro eletrônico pode interferir ainda no alargamento da linha espectral ou das bandas e na mudança de intensidade. Deslocamentos solvatocrômicos causam alterações espectrais devido às interações específicas ou não específicas entre o soluto e o solvente. As interações não específicas são dependentes da polaridade do solvente, como, por exemplo, momento íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo induzido-dipolo e as específicas são ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio são um tipo de ligação fraca que desempenha um importante papel como componente de ligação entre moléculas orgânicas. As ligações de hidrogênio contribuem para deslocamento solvatocrômico, principalmente em

sistemas próticos entre moléculas capazes de receber e doar estas ligações. Desta forma, as ligações de hidrogênio têm uma enorme influência na formação de agregados, como dímeros.

Com o intuito de analisar o deslocamento solvatocrômico nas bandas UV/Visível do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] e possibilidade de formação de agregado, o espectro eletrônico do composto foi obtido em diversos solventes. Exemplo na figura 23 para o espectro do complexo nitrosilo em etanol e acetona, além de que outros dados são apresentados na tabela 6 e gráfico (Figura 24)

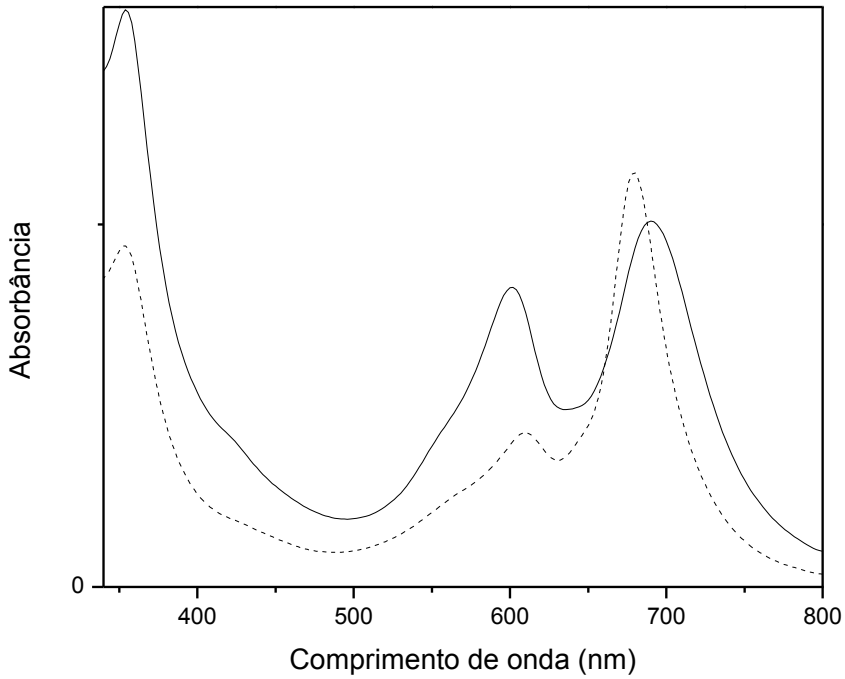


Figura 23: Espectros UV-Visível do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em etanol (linha cheia) e em acetona (pontilhado).

Tabela 6: Comportamentos solvatocrômicos em solventes de diferentes polaridades $\Delta\lambda_{max.}$

Solvente	**Energia cm^{-1}**	**$f(n^2)$***	**Solvente**	**Energia cm^{-1}**	**$f(n^2)$***
Etanol	**14684**	1,362	Etilenoglicol	**14450**	1,433
Metanol	**14834**	1,329	Diclorometano	**14662**	1,423

Isopropanol	**14534**	1,377	Acetonitrila	**14836**	1,344

*$f(n^2)$ = Função de índice de refração do solvente – equação de Osanger

A figura 24 mostra o gráfico do máximo da energia da banda-Q em função da polaridade do solvente, expresso pela equação de Onsanger (equação 1) (SUPPAN, 1990).

$$f(n^2) = 2(n^2-1)/2(n^2+1) \qquad (1)$$

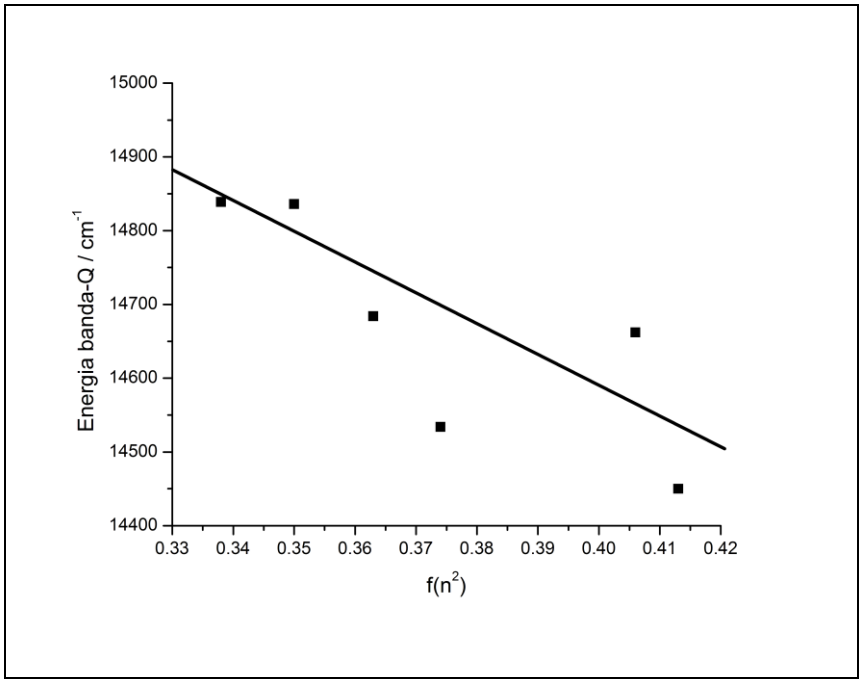


Figura 24: Gráfico representando o solvatocromismo da banda-Q em função da escala de polaridade do solvente representado pela equação de Osanger

Embora o solvatocromismo de bandas de transferência de carga metal-ligante e transferência de carga ligante-metal, em compostos de rutênio, fora anteriormente explorada para uma série de espécies (CURTIS; SULLIVAN; MEYER, 1983) em função do parâmetro "Donor Number (DN) ou Acceptor Number (AN)" do solvente, esta esperada correlação linear para o composto [Ru(NO)(ONO)pc] não fora observada utilizando-se estes fatores. Como naqueles casos a variação da energia da banda estava calcado na estabilização do estado excitado, dado ao rearranjo do solvente sobre a molécula excitada, para o composto [Ru(NO)(ONO)pc] isto parece não acontecer. A explicação mais plausível parece ser devido a natureza da excitação

eletrônica (banda-Q), caracterizada por uma transição tipo π- π* sobre o ligante macrocíclico. Outro fator que parece influenciar é o tamanho do soluto, que governa o número de moléculas ao redor do composto e consequentemente sofre influência direta da polaridade do solvente. Assim sendo utilizou-se a equação de Onsanger que estabelece relação direta com a polaridade do solvente em função do índice de refração. Semelhante observação fora feita para compostos similares (ISAGO; KAGAYA; MATSUSHITA, 2004).

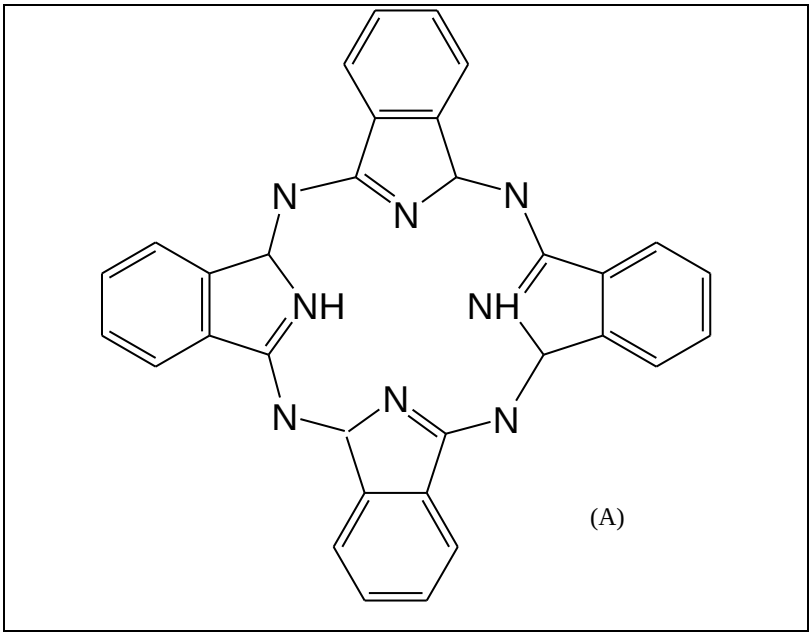
IV.2.8. Espectroscopias na região do infravermelho

Os compostos químicos, de uma forma em geral, absorvem radiação nas regiões do ultravioleta, do visível e também na região do Infravermelho, que corresponde à parte do espectro eletromagnético que vai da faixa 200 - 4000 cm^{-1}. A radiação infravermelha provoca diferentes modos de vibração e rotação de uma molécula. Estas vibrações ocorrem em torno das ligações químicas que unem os átomos, ou grupos de átomos. O Infravermelho não só pode ser usado para compostos orgânicos, como também para compostos inorgânicos, tais como complexos de coordenação, possibilitando assim verificar a presença de vários grupos funcionais. A análise de um espectro obtido por absorção no infravermelho é de muito valor para o estudo e a elucidação da estrutura química de uma substância.

As principais bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho e suas atribuições para o ligante ftalocianina, para o precursor [Rupc] e para os complexos [Ru(NO)(ONO)pc] e [Ru(NO)(NO_2)pc] estão apresentados nas tabelas 7 e 9.

As bandas características do ligante ftalocianina estão de acordo com os resultados descritos na literatura (ZIMINOV et al, 2006). O intuito destes espectros foi obter informações significativas sobre o sítio de coordenação do Ru(II) à ftalocianina. As principais atribuições das bandas observadas no espectro ftalocianina base livre (H_2Pc), e que foram utilizadas quando da coordenação deste ligante à ftalocianina, são as seguintes: - uma banda intensa em 1006 cm^{-1} e outra banda mais fraca em 3267 cm^{-1}, correspondentes à deformação simétrica no plano δ_{N-H}, característica de amina secundária; 1303 e 1335 cm^{-1}, referente à deformação do grupo pirrol e outra banda em 1505 cm^{-1} deformação C–N=C, observada em aminas secundárias aclicíclicas. Numa análise primária, a coordenação da ftalocianina ao íon Ru(II) ocasionaria o desaparecimento da banda intensa localizada em 1006 cm^{-1}, referente à ligação química em destaque na figura 25A, concernente à desprotonação do macrociclo. Esta desprotonação é condição *sine qua non* para a coordenação e formação de [Rupc] (Figura 25B). Espectro na região do infravermelho do ligante ftalocianina e [Rupc] estão

mostrados na figura 26.



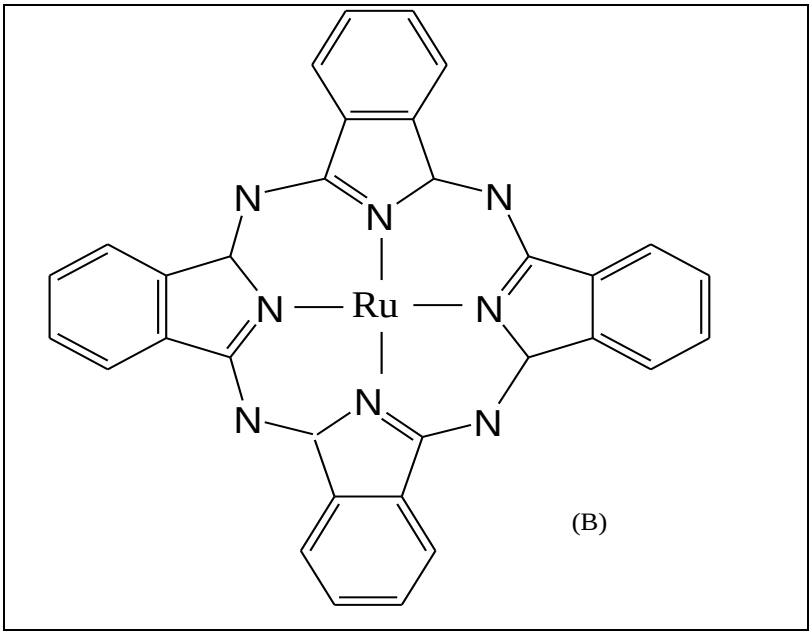


Figura 25: (A)- Estrutura química da ftalocianina base livre (H_2Pc) e (B)- ftalocianina metalada

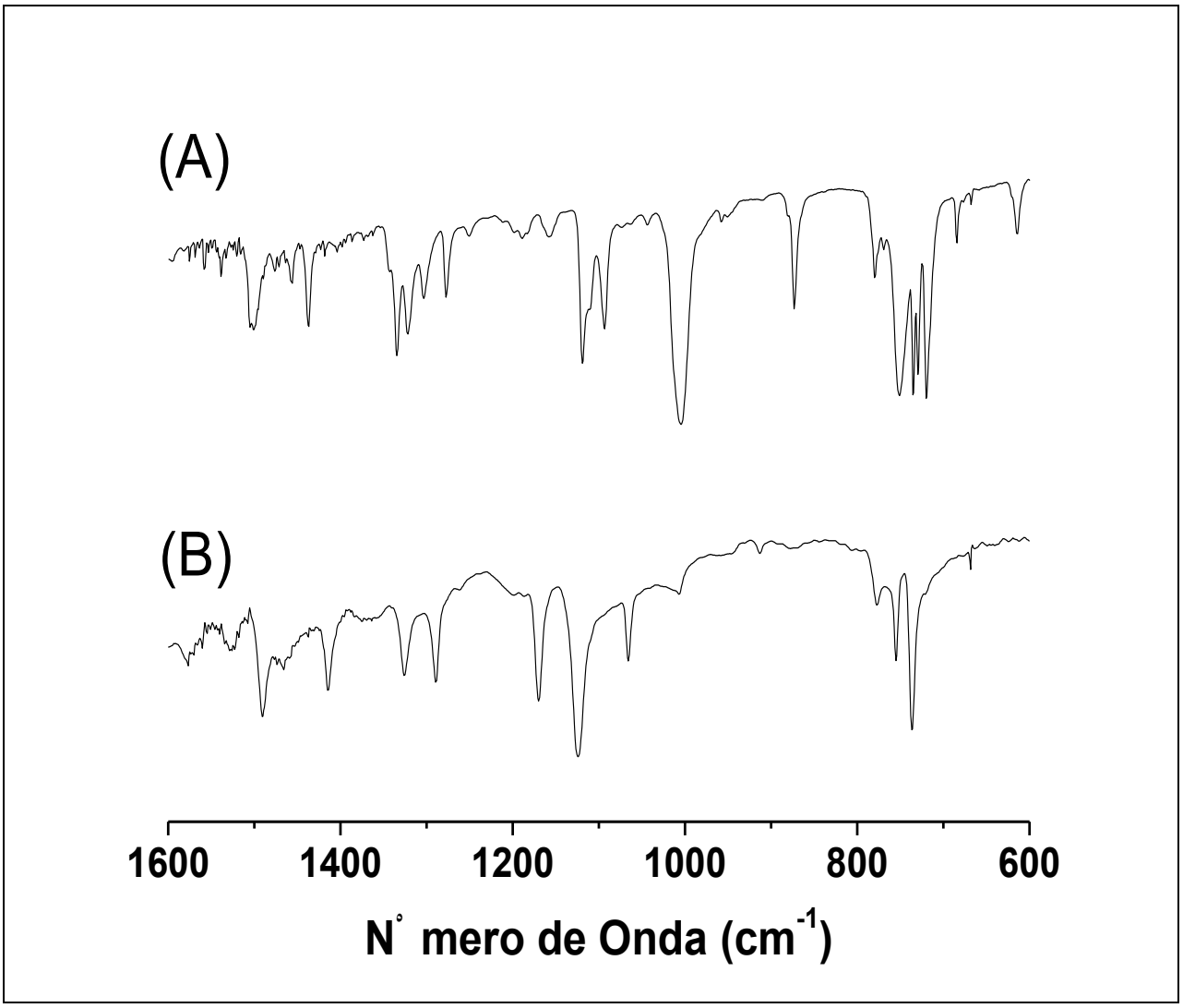


Figura 26: Espectros Vibracionais na região do infravermelho: (A) Ftalocianina – base livre, (B) Complexo [Rupc] em pastilha de KBr.

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho, de complexos tipo $[Mpc]^{n+}$, é tema constante na descrição de suas propriedades. Aparentemente, observa-se pouca ou nenhuma alteração concernente à variação dos modos vibracionais dos complexos, quando comparados com o ligante livre (Tabela 7). Talvez exceção possa ser feita aos modos vibracionais dependentes do sítio de ligação ao metal, os quais sofrem deslocamentos dependentes da característica de ligação da espécie M(II) – modos vibracionais relativos à ligação a - N =. Parte desta influência no deslocamento também pode ser atribuída à alteração estrutural do ligante livre e coordenado. O efeito global destes dois fatores pouco influencia no espectro infravermelho da ftalocianina, o que nos permite atribuir estes modos vibracionais comparativamente àqueles do ligante livre.

Tabela 7: Dados dos espectros vibracionais na região do infravermelho em (cm^{-1}) para compostos ftalocianina e metalo ftalocianina (Zn, Co, Ru e Mg) .

Número de ondas (cm^{-1})					Atribuições
Ftalocianina	[Rupc]	[Mgpc][a]	[Znpc]	[Copc][a]	
616	----	------	------	-----	RESPIRAÇÃO DO ANEL
759	755	752	753	781	δ C–H (FOR A DO PLANO)
873	913	888	887	874	δ (ISOINDOLE + NITROGÊNIO MESOÁTOMOS)
1006	-------	-----	------	-----	δ N–H NO PLANO
1044	1066	1059	1060	1033	δ C–H NO PLANO+ISOINDOL
1119	1120	1112	1120	1120	ISOINDOL SIMÉTRICO
1158	1168	1161	1164	1164	δ C–H NO PLANO+ISOINDOL
1303	1288	1281	1285	1289	GRUPO PIRROL
1335	1323	1331	1333	1332	GRUPO PIRROL
1459	1464	1482	1455	1470	ν ISOINDOL
1505	1490	1518	1490	1523	- N =

a) (ZIMINOV et al, 2006)

Um aspecto importante na análise de espectroscopia na região do infravermelho é relativa ao efeito da coordenação de ligantes óxido de nitrogênio ao Ru(II). Baseado na metodologia de síntese, duas espécies diferentes, com mesmo espectro UV-visível – ver item IV.1.4 – foram obtidas, utilizando-se fontes diferentes de ligante nitrosil. A indicação mais provável é a de que se trata dos complexos *trans*-[RuNO(NO_2)pc] e *trans*-[RuNO(ONO)pc]. Neste caso, a análise FTIR foi decisiva na atribuição da isomeria.

Complexos nitrosilos de rutênio são normalmente caracterizados na região do infravermelho através da banda de estiramento ν_{NO}. Este ligante nitrosil na esfera de coordenação do metal é geralmente descrito como Ru(II) e o ligante como NO^+ (BORGES et al, 1998). Pode-se observar, na tabela 8, a caracterização de complexo nitrosilo de rutênio, quanto ao fragmento {Ru^{II}-NO^+}, que geralmente apresenta intensas bandas de estiramentos na região de 1800 – 1970 cm^{-1} (SAUAIA et al, 2003, de LIMA et al, 2006). Para os complexos [Ru(NO)(ONO)pc] e [Ru(NO)(NO_2)pc], a frequência de estiramento ν NO foi observada em 1910 cm^{-1}e 1846 cm^{-1} (Figura 28 A-B e Tabela 8), respectivamente. A baixa

energia da banda de estiramento NO^+, nos complexos *trans*-[RuNO(NO_2)pc] e *trans*-[RuNO(ONO)pc], em comparação com outras espécies, é tomada como característica de uma forte retrodoação Ru(II) – NO^+ (Figura 27).

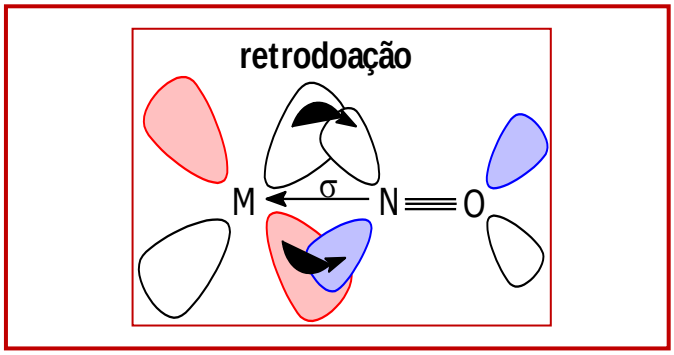


Figura 27: Esquema dos orbitais moleculares envolvidos na ligação de um metal com o ligante nitrosilo.

Tabela 8: Dados dos espectros vibracionais na região do infravermelho (em cm^{-1}) para os complexos que contêm NO^+ na esfera de coordenação.

Complexo	ν_{NO} (cm^{-1}) em KBr
[a]*cis*-[Ru(bpy)$_2$(pz)(NO)](PF$_6$)$_3$	1950
[a]*cis*-[Ru(bpy)$_2$(py)(NO)](PF$_6$)$_3$	1947
[a] [Ru(NH$_3$)$_4$(py)(pz)Ru(bpy)$_2$(NO)](PF$_6$)$_5$	1945
[a]*cis*-[Ru(4-pic)(bpy)$_2$(NO)](PF$_6$)$_3$	1944
[a] [Ru(4-acpy)(NH$_3$)$_4$(pz)Ru(bpy)$_2$(NO)](PF$_6$)$_5$	1943
[b]Trans – [Ru(NH$_3$)(pz)NO](BF$_4$)$_3$	1941
[c]Trans – [Ru(NH$_3$)$_4$(py)NO](BF$_4$)$_3$	1930
[Ru(NO)(NO$_2$)pc](Borbulhamento NO)	**1910**
[Ru(NO)(NO$_2$)pc](Nitrito Sódio)	**1846**

a) SAUAIA & da SILVA, 2003. b) ARMOR & HOFFMAN,1975. c) BORGES et al, 1998. MARCHESI et al,2008.

Como a ftalocianina possui características π–doadora, ela pode doar densidade eletrônica para o $Ru^{(II)}$ e quando o ligante nitrosilo é inserido na esfera de coordenação do complexo precursor [Rupc] este forma com rutênio(II) uma forte retrodoação, ocasionando aumento da densidade eletrônica dos orbitais π-antiligante do ligante nitrosil, causando uma

redistribuição da densidade em todo o complexo do ligante nitrosil. Sendo assim, como pode ser visto na tabela 9 e nas figuras 28 (A e B), a inserção do ligante nitrosil (NO) na esfera de coordenação do complexo precursor [Rupc] ocasionou significativos deslocamentos nas frequências de deformação de algumas bandas da ftalocianina próximos ao sítio de coordenação com o metal Ru(II).

A frequência δ C-H fora do plano em 735 cm^{-1} para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] apresentou-se deslocada para região de menor energia (menor frequência) ($\Delta \nu \sim 20$ cm^{-1}), se comparada com a mesma banda 755 cm^{-1} para o complexo [Rupc].

Tabela 9: Tentativas de atribuições das bandas dos complexos [Rupc] e complexos nitrosilos na região do infravermelho.

[Rupc]	[Ru(NO)(ONO)pc]	[Ru(NO)(NO_2)pc]	Atribuições
755	735	716	δ C–H (FOR A DO PLANO)
1066	1060	1094	δ C–H NO PLANO+ISOINDOL
1168	1124	---------	δ C–H NO PLANO+ISOINDOL
1288	1287	1306	GRUPO PIRROL
1324	---------	1376	GRUPO PIRROL
1464	1464	---------	ν ISOINDOL
1505	----------	--------	- N =
--------	1610/1660	1647	
---------	---------	1730	
--------	1910	1846	NO^+

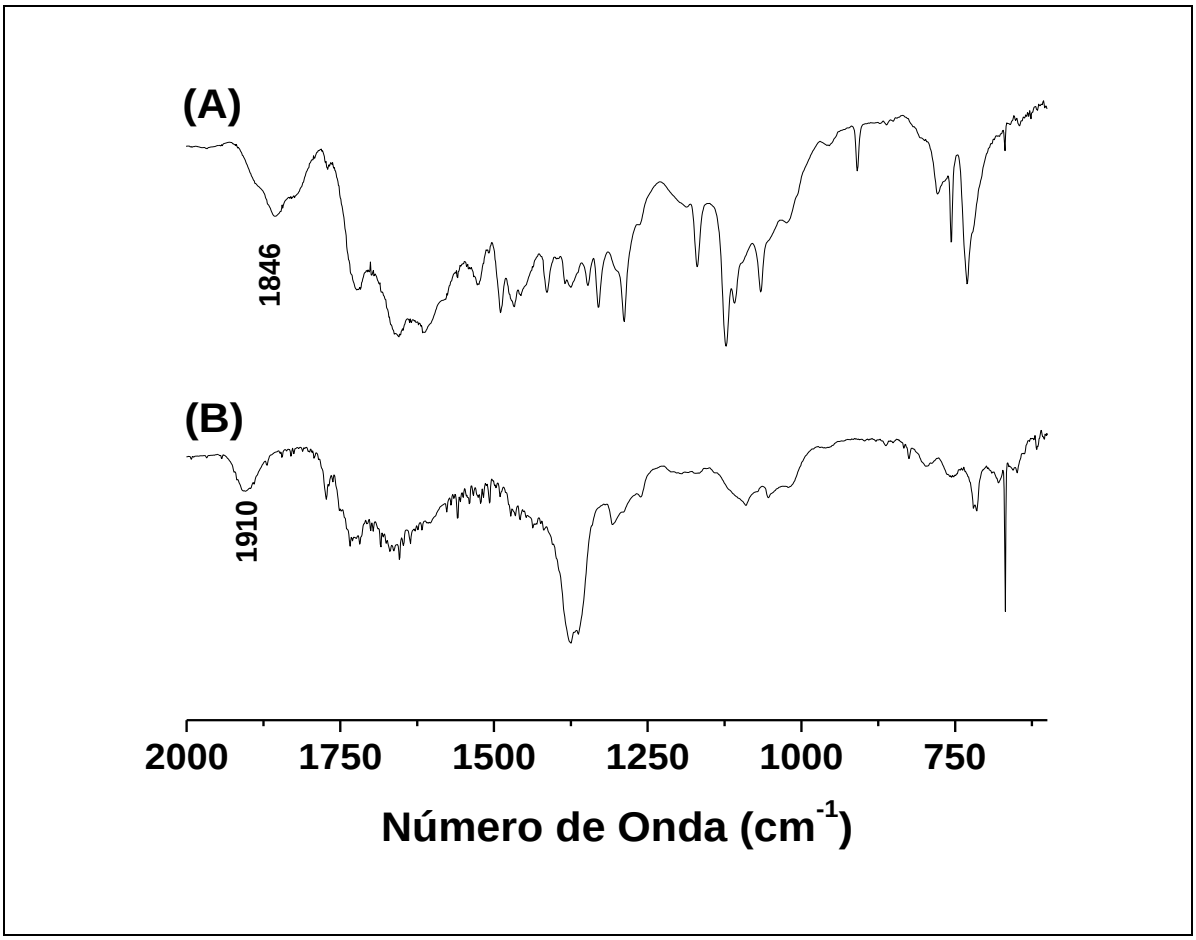


Figura 28: Espectros Vibracionais na região do infravermelho: (A) Complexo [Ru(NO)(NO_2)pc] e (B) complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em pastilha de KBr.

Claramente observa-se uma diferença acentuada na energia de estiramento do ligante nitrosil entre as duas espécies sintetizadas, como pode ser observado na tabela 8. Haja vista a semelhança nos dados de análise elementar e espectroscopia de massas para as duas espécies sintetizadas – ver item correspondentes –, a interpretação mais obvia é a de se tratar de isômeros, tal como experimentalmente fora atribuída anteriormente, ou seja, *trans*-[RuNO(NO_2)pc] e *trans*-[RuNO(ONO)pc].

A rota de preparação do complexo nitrosilo de rutênio, através do borbulhamento de NO (III.2.1.2) pode ter resultado na coordenação do NO_2^- através de átomo de "**O**" nos eixos axiais de [Rupc], sendo que um dos nitritos se converte a NO, o espectro eletrônico do complexo [RuNO(ONO)pc], assim como infrvermelho, são semelhantes aquele sintetizado e descrito por Weideman e colaboradores cujo complexo mostra bandas de absorção em 616 nm e 700 nm e a frequência de estiramento do NO em 1910 cm^{-1} (WEIDEMANN; HUCKSTADT; HOMBORG, 1998). Entretanto, a rota de preparação do complexo nitrosilo

de rutênio, através da adição de nitrito de sódio, pode ter resultado na coordenação do NO_2^- através de átomo de "N" nos eixos axiais de [Rupc], visto que a frequência de estiramento do NO para este complexo foi observada em 1836 cm^{-1} (Figura 17 B) e a existência da banda em 1280 cm^{-1} e em 1331 cm^{-1} , no espectro de infravermelho do complexo são consistentes com a coordenação através do átomo de "N". Esses resultados são semelhantes aos dados do complexo *bis*-(tetra(*n*-butill)amonio)bisnitroftalocianinatorutenato(II) $(Bu_4N_2)_2$ $[Ru(NO_2)_2pc]$, no entanto essa atribuição pode apresentar equívoco devido às contribuições das vibrações da ftalocianina, que ocorre na região dos modos vibracionais do NO_2^- (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Portanto, para avaliar a forma como o NO está coordenado ao rutênio no complexo $[Ru(NO)(NO_2)pc]$, utilizou-se o marcador isotópico (^{15}N).

A rota sintética para o complexo $[Ru(^{15}NO)(^{15}NO_2)pc]$ foi conduzida da mesma forma como descrito no item (III.2.2), porém, utilizando-se nitrito de sódio com nitrogênio marcado (^{15}N). Duas bandas se destacam nesta comparação, observadas no complexo $[Ru(^{15}NO)(^{15}NO_2)pc]$. Aquelas em 1803 cm^{-1} e 1458 cm^{-1}, que, pela região, foram atribuídas a ν_{NO} e $\nu_{ONO,}$ respectivamente, e que aparecem no espectro infravermelho do complexo não marcado em 1846 e 1612 cm^{-1}. As demais bandas não sofreram alterações significativas (Tabela 6).

Quando se compara o espectro do composto obtido pelo borbulhamento de NO com aquele obtido pela adição de nitrito de sódio (Figura 28), observa-se claramente diferença entre os espectros, como era de ser esperado, visto que o complexo contendo o grupamento NO_2 coordenado ao metal pode interagir de dois modos diferentes, conforme esquema 1, abaixo:

Esquema 1: Estrutura espacial para a formação de complexo: A) NO_2^- coordenado como ligante nitrito ou B) coordenado como ligante nitro.

(A) (B)

O modo de coordenação reflete as bandas que aparecem no espectro da região do infravermelho (NAKAMOTO, 2009). Conforme descrição, as duas bandas devem ser observadas quando a coordenação se dá pelo nitrogênio chamado $\nu_{assimétrico}$ e $\nu_{simétrico}$, que

devem aparecer na região de 1270 cm^{-1} e 1337 cm^{-1}, respectivamente.

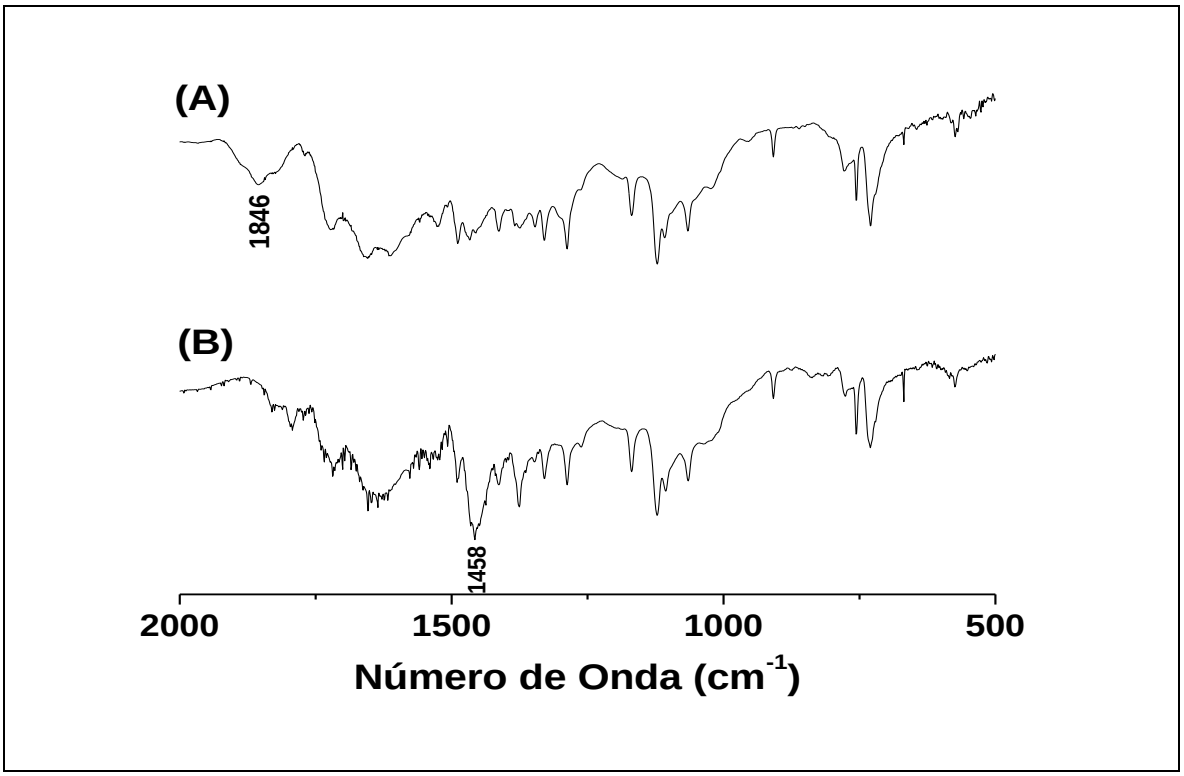


Figura 29: Espectros Vibracionais na região do infravermelho: (A) Complexo [Ru(NO)(ONO)pc] através de Nitrito de sódio, (B) Complexo [Ru(NO)(ONO)pc] através de adição de Nitrito com nitrogênio marcado (^{15}N) em pastilha de KBr.

Tabela 10: Atribuições tentativas das bandas na região do infravermelho para os complexos [Ru(NO)($^{14}NO_2$)pc] e [Ru(NO)($^{15}NO_2$)pc].

[Ru(NO)(ONO)pc] Rota sintética I	[Ru(NO)(ONO)pc] Rota sintética I (^{15}N)	Atribuições
735	756	δ C–H (FOR A DO PLANO)
1060	1060	δ C–H NO PLANO + ISOINDALE
1287	1280	GRUPO PIRROL
1464	1358	- N =
1610	1630	
1846	1458	NO^+

IV.2.9. Processos fotofísicos

Em condições normais, a maior parte das moléculas se encontra no nível energético vibracional de mais baixo estado eletrônico S_0 (estado fundamental). No estado eletrônico fundamental para um sistema diamagnético, os elétrons encontram-se "emparelhados", ou seja, os elétrons possuem spin opostos. A absorção de um quantum de luz promove a passagem dos elétrons a níveis de maior energia (Sn). Porém, quando o elétron é excitado a um nível eletrônico de maior energia, duas situações distintas podem ocorrer: na primeira situação, o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original (estado excitado singleto); na segunda situação, a excitação do elétron ocorre mediante alteração do seu spin original, ou seja, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado triplete).

Entretanto, o elétron, quando excitado, não passa diretamente de seu estado fundamental para seu estado excitado tripleto, mas pode atingir o estado tripleto mediante a inversão do spin do elétron singleto, sendo chamado de cruzamento intersistema (Diagrama de energia de Perrin-Jablonski, Figura 5 do item I.4). Esta molécula no estado excitado é energeticamente instável em relação ao seu estado fundamental. Se a molécula não sofrer rearranjo ou se fragmentar (processo químico), ela será desativada, ou seja, de alguma forma perderá energia para retornar ao estado fundamental (processo físico). Durante o retorno ao estado fundamental, uma parte da energia absorvida é reemitida, sendo este fenômeno conhecido como luminescência. O fenômeno de luminescência pode ser dividido em fluorescência e fosforescência. Se a energia é reemitida a partir do primeiro estado excitado singleto (S_1), o fenômeno corresponde à fluorescência (SIERRA; GIOVANELA, 1995). Por outro lado, na fosforescência, a energia é reemitida a partir do estado excitado tripleto. Em consequência da retenção da orientação original, o retorno da molécula do estado excitado singleto para o estado fundamental (que tem caráter singlete) é permitido e ocorre muito rapidamente (tempo de vida na ordem de ns). A fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples. Na figura 30 estão representados o estado fundamental e os estados excitados singleto e triplete.

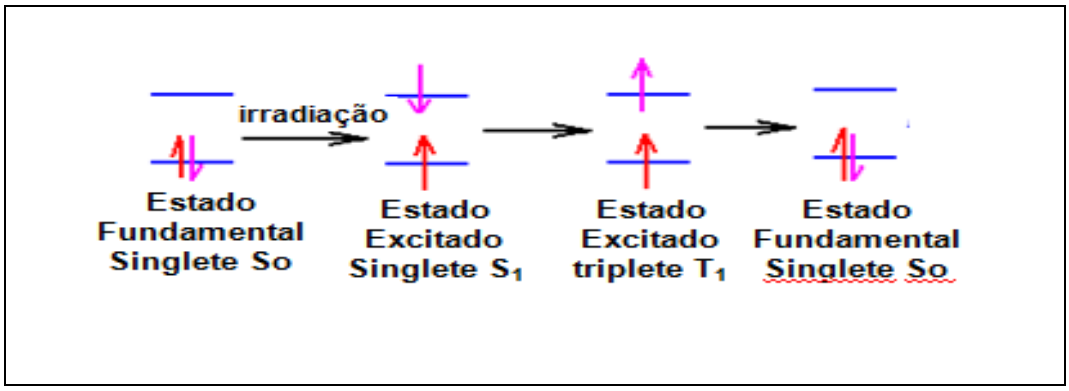


Figura 30: Representação do estado fundamental e excitados

Os espectros de emissão do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foram feitos em clorofórmio, solução tampão e lipossoma e são mostrados nas figuras 31 a 36. Podemos observar que o espectro de emissão do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em clorofórmio (Figura 31) e em lipossoma (Figura 32) e o complexo em tampão fosfato (Figura 33) são similares, apresentando uma banda de emissão: ~ 425 nm quando excitado em 325 nm. Este fenômeno é atribuído à luminescência . Já quando se excita em 600 nm ou 660 nm, observa-se que o complexo, tanto em clorofórmio (Figura 34) quanto em lipossoma (Figura 35), apresentam banda de emissão em 690 nm. Nenhuma emissão, para o complexo em solução tampão (Figura 36), é observada, provavelmente devido às interações hidrogeniônicas com a água ou com fosfato.

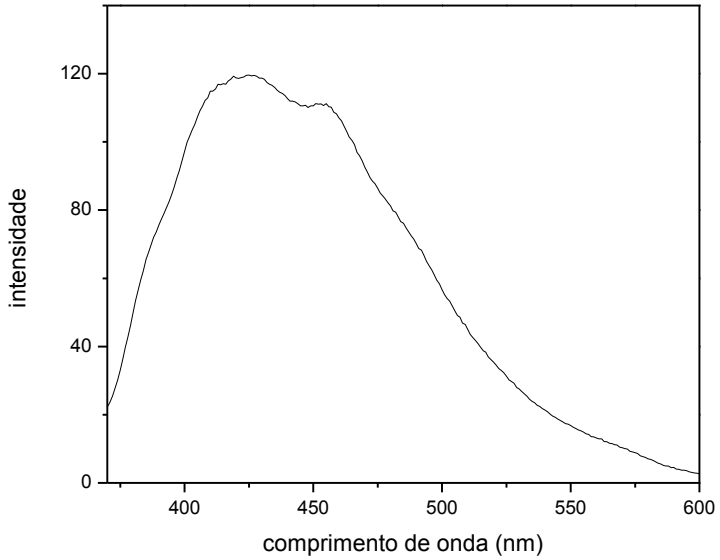


Figura 31: Espectro de emissão para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em $CHCl_3$ (2,0 x 10^{-6} M), λ_{ex} = 325 nm e λ_{em} = 425 nm , Temperatura 20,0 ^{o}C.

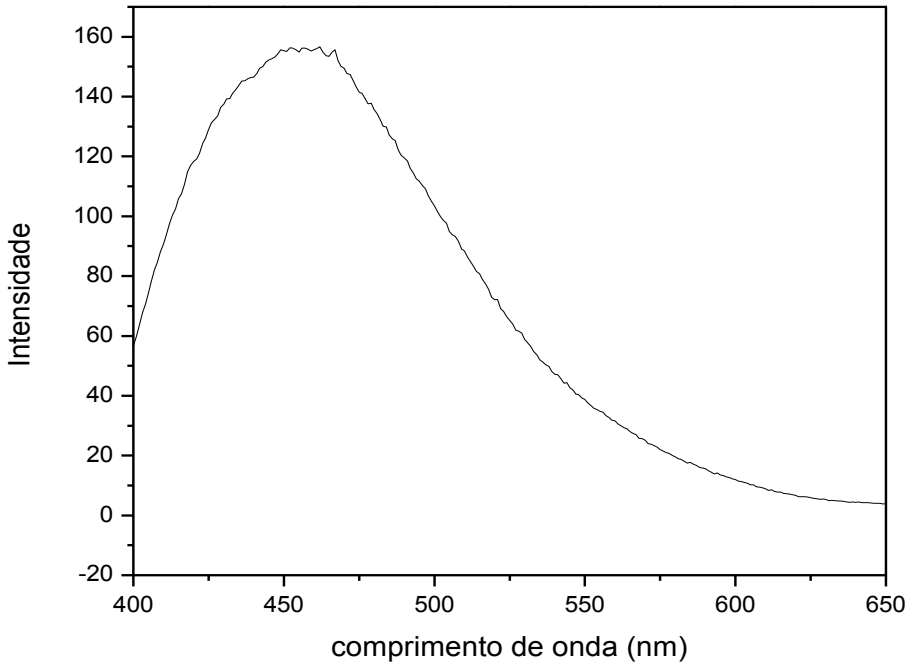


Figura 32: Espectro de emissão para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em lipossoma (2,0 x 10^{-6} M), , λ_{ex} = 325 nm e λ_{em} = 425 nm. Temperatura 20,0 ^{o}C.

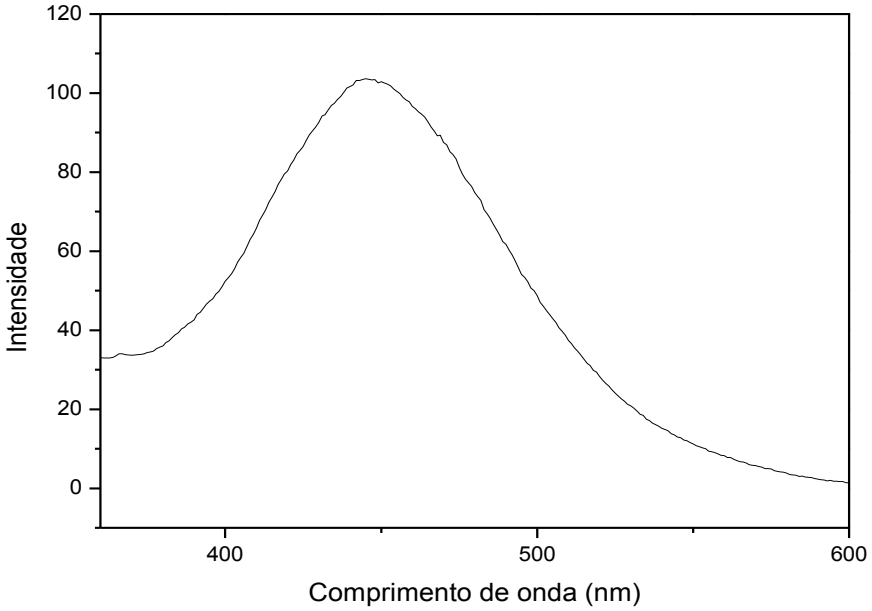


Figura 33: Espectro de emissão para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em solução tampão (2,0 x 10^{-6} M), λ_{ex} = 325 nm e λ_{em} = 445 nm. Temperatura 20,0 ^{o}C.

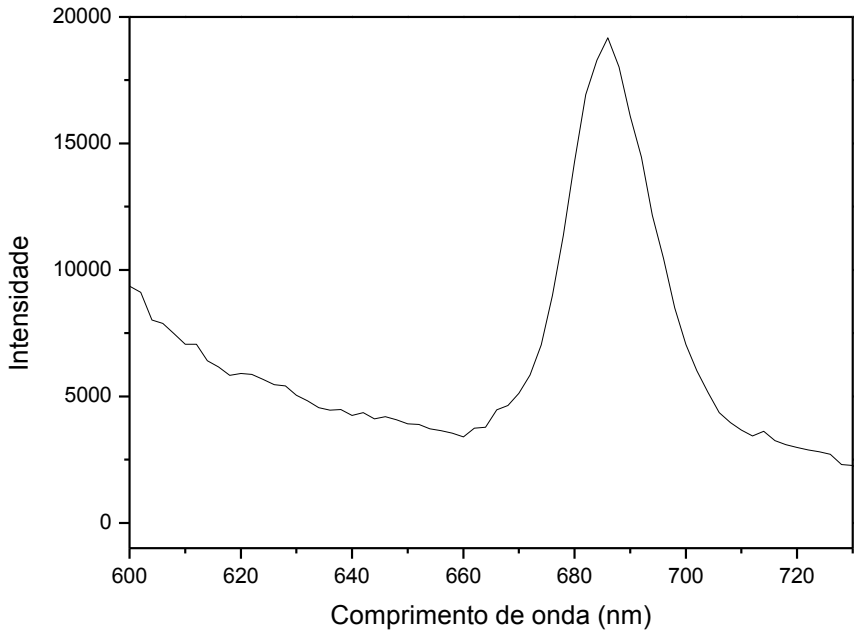


Figura 34: Espectro de emissão para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em $CHCl_3$ (2,0 x 10^{-6} M), λ_{ex}= 600 nm e λ_{em} = 686. Temperatura 20,0 ^{o}C.

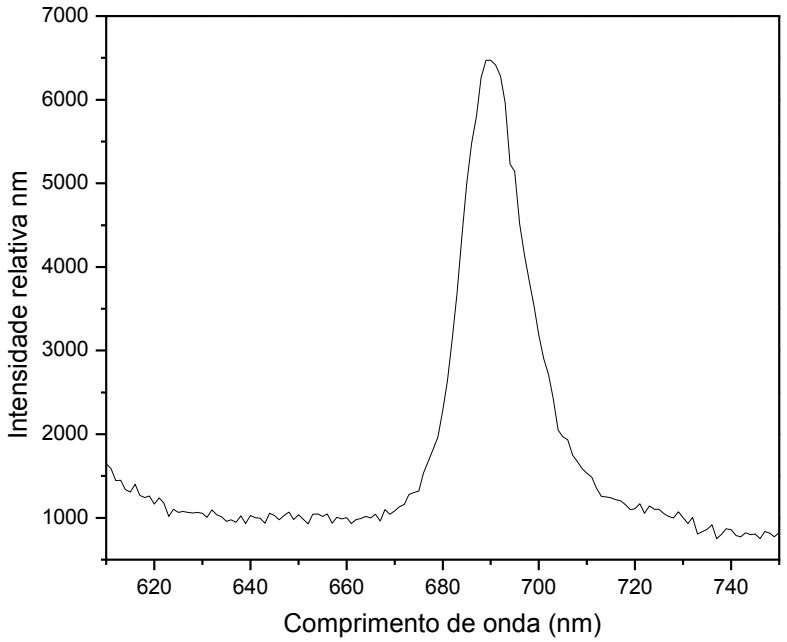


Figura 35: Espectro de emissão para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em lipossoma (2,0 x 10^{-6} M), λ_{ex}= 600 nm e λ_{em} = 686. Temperatura 20,0 ^{o}C.

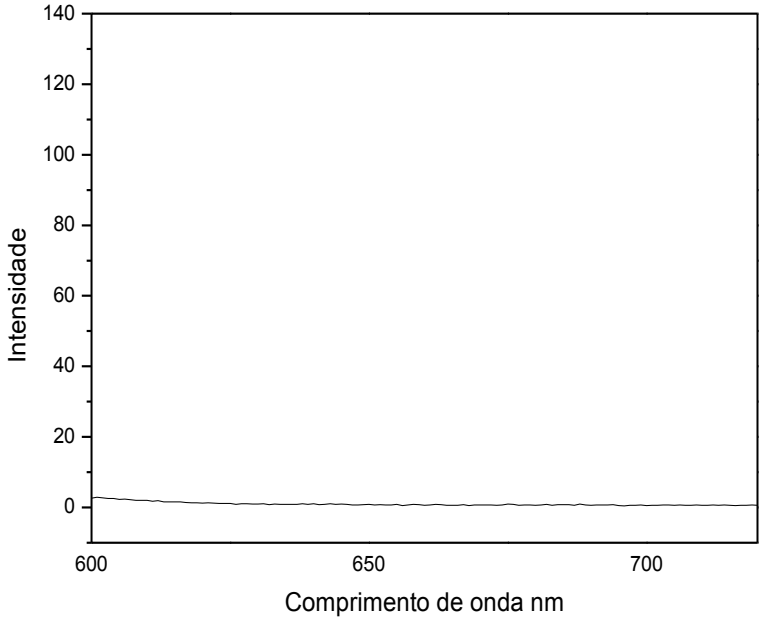


Figura 36: Espectro de emissão para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em solução tampão (2,0 x 10^{-6} M), λ_{ex}= 600 nm, não houve emissão. Temperatura 20,0 ^{o}C.

A região onde foi observada a banda de emissão pode ser correlacionada, aproximadamente, com as correspondentes bandas de absorção *B* e *Q*, respectivamente (CLARISSE, RIOU, 1987). A banda em 690 nm pode ser atribuída à emissão dos estados excitados, que correspondem ao pico de absorção da banda *Q*. A baixa intensidade de luminescência deve-se a outras vias de desativação de energia do estado excitado, uma vez que o complexo apresenta uma banda de coeficiente de absortividade molar na ordem 10^4L. mol^{-1} cm^{-1} (Banda B) e 10^5L. mol^{-1} cm^{-1} (Banda Q), que são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$.

IV.2.10.O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) dos complexos em estudo foi determinado através do método relativo, utilizando-se o violeta de cresila, em metanol, como padrão, conforme descrito por (CROSBY; DEMAS, 1971).

$$\Phi_F = (A_x/A_{(p)}).(DO_{(p)}/DO_x).(n_{(p)}^2/n_x^2).\ \Phi_{F\,(p)} \qquad (1)$$

Onde Φ é o rendimento quântico, Área é a integral sobre a banda de emissão e n é o índice de refração do solvente (CROSBY, DEMAS, 1971). Consideraram-se os valores de n para metanol (1,326), clorofórmio (1,444) e lipossoma (1,333). O padrão é geralmente escolhido de acordo com a região de onde a espécie estudada emite (MACHADO; MACHADO, 2001). Uma molécula será significativamente fluorescente se sua eficiência quântica tiver magnitude considerável (entre 0,1 e 1). Na tabela 11, encontram-se os valores Φ_F para os complexos [Rupc] e [Ru(NO)(ONO)pc].

Tabela 11: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) dos compostos meio homogênio e lipossomal.

Complexos	Rendimento quântico de fluorescência- Φ_F	
	Homogêneo	Lipossomal
[ZnPc]	0,28 ± 0,01 [a, c]	O,09 ± 0,01 [d]
[Rupc]	0,03 ± 0,01 [b]	0,03 ± 0,01
[Ru(NO)(ONO)pc]	0,04 ± 0,01[b]	0,08 ± 0,01

a: solvente C_2H_4OH; b: solvente $CHCl_3$; c: Oliveira et al, 2005; d: Oliveira et al, 2006.

Nesses estudos, observou-se que a presença do átomo de rutênio é responsável por suprimir ainda mais o tempo de vida de fluorescência e diminuir o rendimento quântico de fluorescência, visto que o rendimento quântico de fluorescência para ftalocianina livre é aproximadamente 0,6 (OWENS; ROBINS, 2001). Portanto, o efeito do átomo pesado sobre o acoplamento spin-órbita deve ser tomado como responsável pela diminuição do Φ_F. Esse efeito tende a favorecer outros processos de desativação da espécie excitada, provavelmente com a geração de estado tripleto (OWENS; ROBINS, 2001). Metais de transição, geralmente, aumentam a velocidade de cruzamento intersistema ao estado tripleto e, por possuir elevado número de níveis de energia, facilitam a desativação por conversão interna. Desta forma, deve-se ressaltar que fotossensibilizadores com baixo rendimento quântico de fluorescência apresentam maior probabilidade de decaimentos não radiativos, possibilitando um aumento de rendimento quântico do estado triplete. Decaimentos não radiativos por conversão interna transferem energia do fotossensibilizador do estado triplete excitado para $^3O_2$, o que leva à formação de oxigênio singlete, sendo esta uma espécie reativa de interesse para TFD.

IV.2.11. Fotólise do complexo [RU(NO)(ONO)pc]

Algumas alternativas para o controle da liberação seletiva de NO, a partir de um composto de coordenação, são viáveis clinicamente, como a indução luminosa (terapia fotodinâmica) e a redução eletroquímica do NO^+ coordenado. Ambas as técnicas levam em consideração a baixa afinidade observada entre o ligante NO^0 e alguns íons metálicos. Estudos fotoquímicos foram realizados para prever quais seriam os comportamentos dos ligantes ao redor do centro metálico hexacoordenado quando submetidos à luz. Esses estudos levaram a investigações dos processos que ocorrem nos estados excitados, tais como as reações de transferência de elétrons e de energia. O complexo [Ru(NO)(ONO)pc] apresenta bandas de absorção intensas referentes à transferência de carga metal ligante (TCML), que são observadas nos espectros eletrônicos na região de 350 nm banda B e 660 nm banda Q. Desta forma, os estudos fotoquímicos foram realizados em meio de tampão fosfato pH = 7,4 e clorofórmio, utilizando o laser em dois comprimentos de onda de irradiação: 377 nm e 660 nm. A razão da escolha do comprimento de onda de irradiação recai sobre as linhas de energia disponível no equipamento (laser), bem como pela avaliação dos espectros UV-visível do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]. As variações espectrais na região UV-visível para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] dissolvido em clorofórmio e em solução tampão durante a fotólise são mostrados nas figuras 37 e 38, respectivamente. Estes espectros foram relatados tanto em atmosfera de oxigênio quanto em atmosfera desaerada. Quando irradiado em 377 nm, com uma dose de 4 j/cm^2, observou-se o desaparecimento das bandas de absorção Q da ftalocianina em 690 nm e das de transferência de carga $d\pi$ {(Ru(II))} $\rightarrow$ π^*(NO) em 350 nm, com simultâneo aparecimento de bandas em 640 nm e 310 nm (Figura 37). A irradiação em 377 nm pode induzir processos fotoquímicos consistentes com a formulação dos estados de TCML, levando à fotooxidação de Ru(II) a Ru(III), com formação simultânea de NO^+ para NO^o.

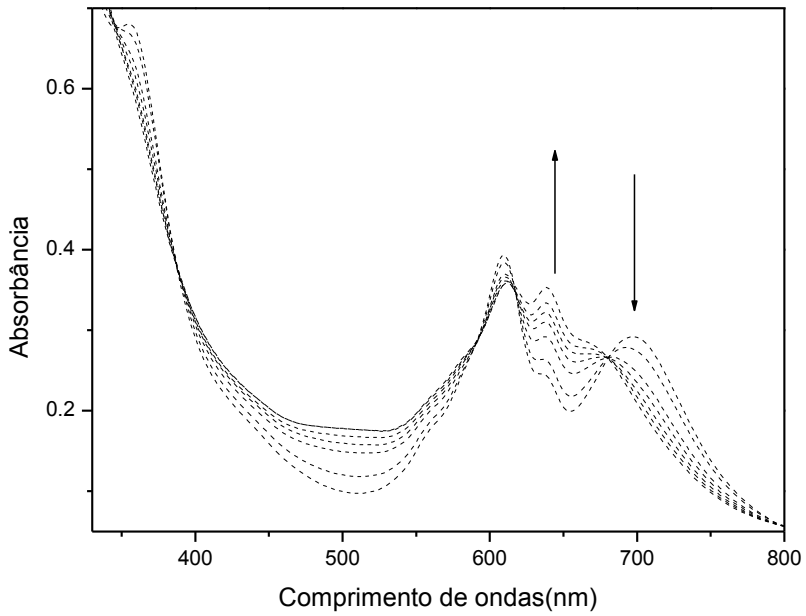


Figura 37: Fotólise do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] na concentração 5,2 x 10^{-6} M em 377 nm em clorofórmio.

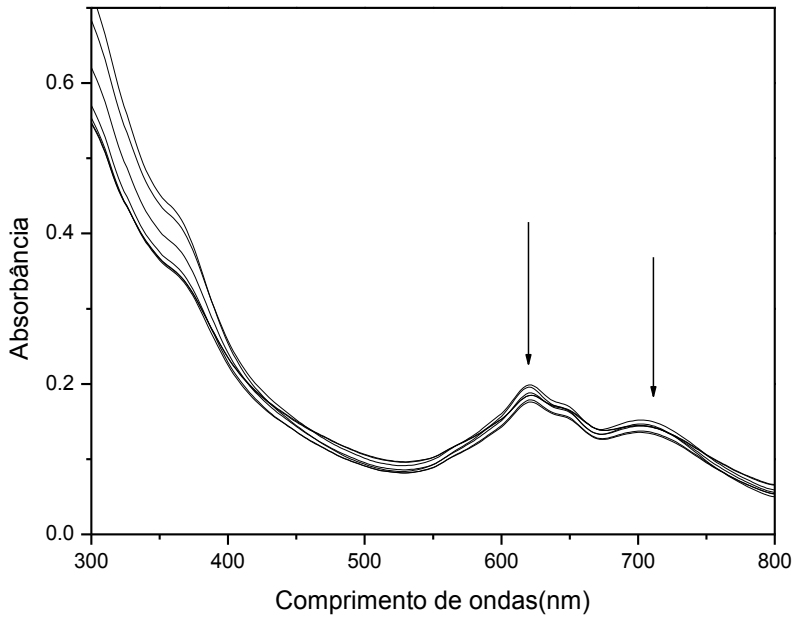
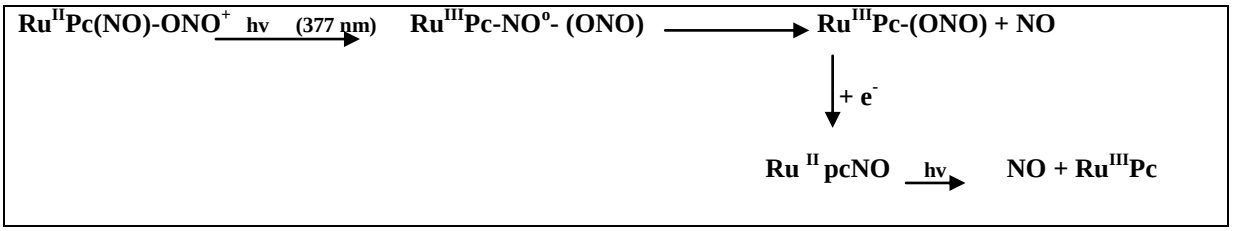


Figura 38: Fotólise do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] na concentração 5,2 x 10^{-6} M em 377 nm em meio tampão pH = 7,4.

Para a irradiação em solução de clorofórmio, verifica-se a existência de pontos isosbésticos em 660 e 360 nm, o que indica que não há alteração do espectro eletrônico que possa ser atribuído à formação de intermediários, bem como a inexistência de fotoreações secundárias, que possam levar a uma alteração espectral. A comparação espectroscópica com a espécie sintetizada [Rupc] (Figura 17) leva-nos a caracterizar o foto-produto de [Ru(NO)(ONO)pc] como sendo o espectro final do complexo [Rupc] (Figura 37), precursor do complexo nitrosilo, o que é indicativo da liberação de NO. Já as variações espectrais na região UV-visível para a solução tampão contendo [Ru(NO)(ONO)pc], tanto em atmosfera de oxigênio quanto em atmosfera desaerada, quando irradiada em 377 nm, mostrou a diminuição da intensidade de todas as bandas (Figura 38). O resultado é consistente com o efeito do solvente na fotorreatividade de complexos de coordenação. O processo de transferência de elétrons e alterações dos níveis de energia de orbitais moleculares pode ser tomado como argumento na explanação de diferença de reatividade. O esquema 2 representa o mecanismo fotoquímico envolvido neste processo.



Esquema 2: Mecanismo fotoquímico envolvido quando irradiado em 377 nm.

As variações espectrais na região UV-visível para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em clorofórmio e solução tampão, tanto em atmosfera de oxigênio quanto em atmosfera de argônio, quando irradiado em 660 nm, apresenta comportamento similares àquele observado quando da irradiação em 377 nm. Porém, para que ocorra este comportamento similar, a energia de irradiação necessária é de 24 j/cm^2. Provavelmente a diferença de fotorreatividade, quando irradiado em 660 nm, é devida à transferência eletrônica fotoinduzida, em que este mecanismo fotorreacional (esquema 3) também leva à liberação do NO (Figura 39 e 40).

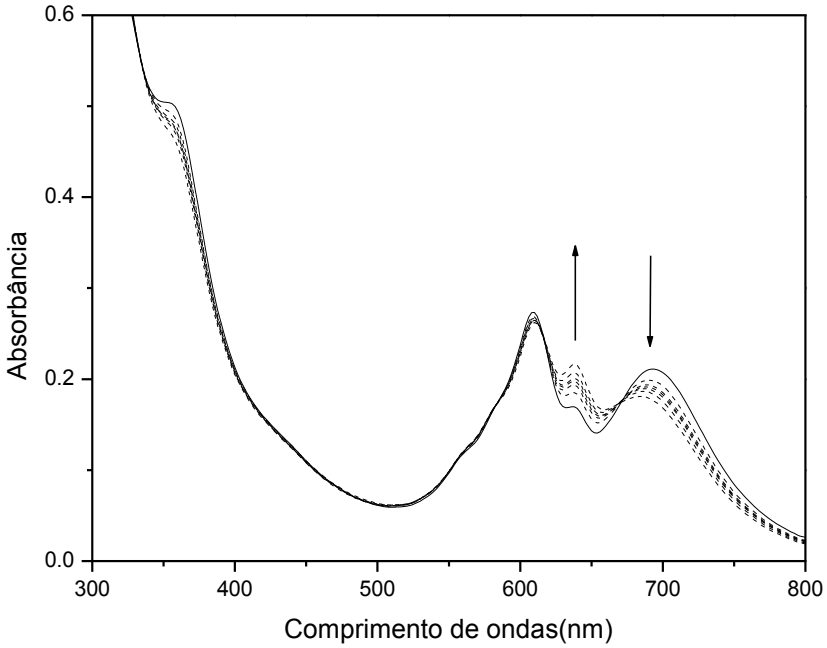


Figura 39: Fotólise do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] na concentração 1,0 x 10^{-6} M em 660 nm em Clorofórmio.

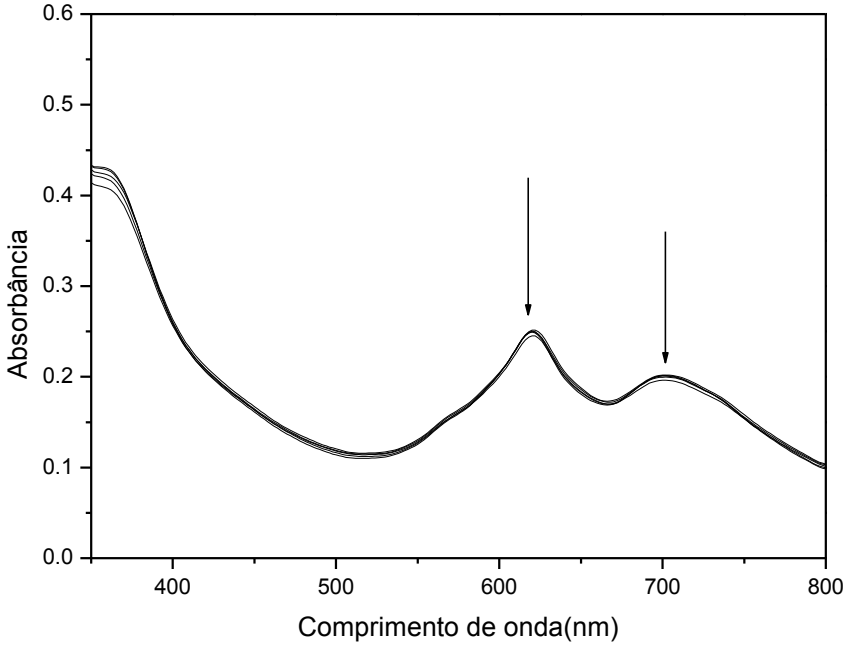
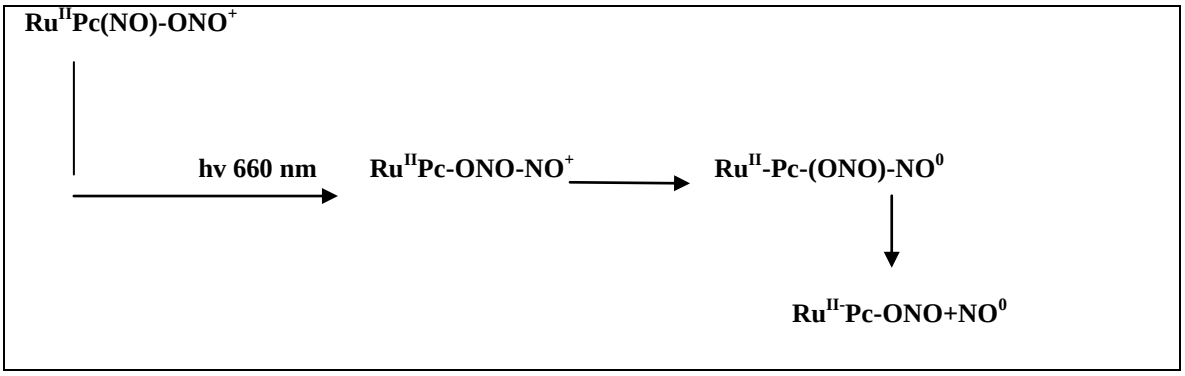


Figura 40: Fotólise do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] na concentração 1,0 x 10^{-6} M em 660 nm em meio tampão pH = 7,4.



Esquema 3: Mecanismo fotoquímico envolvido quando irradiado em 660 nm.

O complexo [Ru(ONO)(NO)pc] foi capaz de liberar NO^0 quando irradiado em 377 nm e em 660 nm (Figura 41 e 42) e os mecanismos fotoquímicos foram baseados na variação espectral na região do UV-visível e nos perfis de corrente registrados no NOmeter. O monitoramento *in situ* de NO durante a fotólise é uma maneira indutível de provar a geração fotoquímica de óxido nítrico (KUDO et al, 1997). O sinal gravado pelo sensor de NO gasoso aumenta rapidamente quando a fotólise é iniciada e diminui quando o feixe de luz é interrompido. Experimentos similares foram realizados com uma solução "branco" (tampão sem o complexo). A ausência de sinal mostra que os resultados observados são consistentes com a liberação de NO.

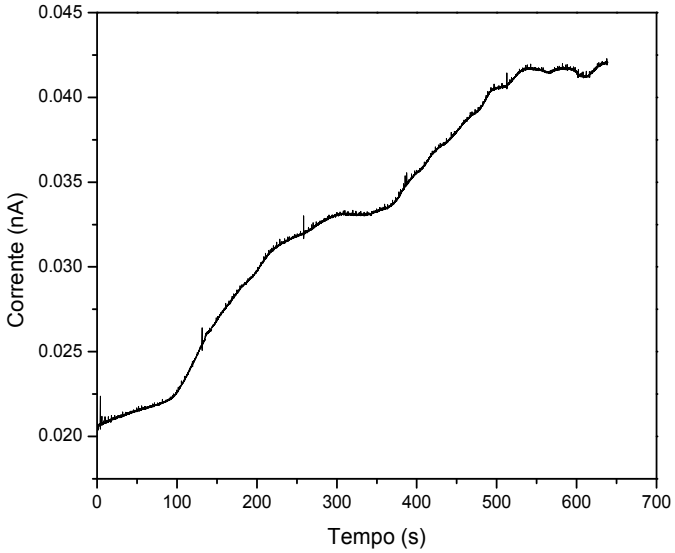


Figura 41: Cronoamperograma do complexo [Ru(ONO)(NO)pc], quando submetido à irradiação. Irradiação em 377 nm. Dados em solução tampão pH 7,4. Concentração do complexo 1,0 x 10^{-4} M.

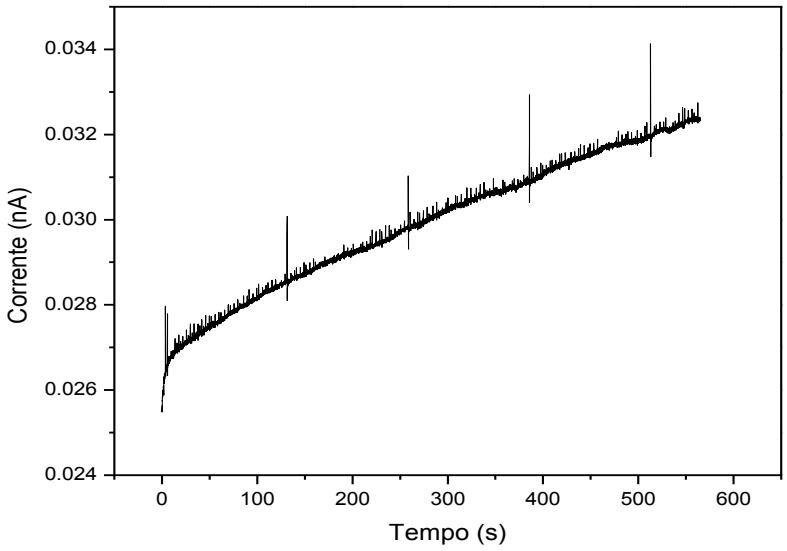


Figura 42: Cronoamperograma do complexo [Ru(ONO)(NO)(pc)], quando submetido à irradiação. Irradiação em 660 nm. Dados em solução tampão pH 7,4. Concentração do complexo 1,0 x 10^{-4} M.

A quantidade de NO liberada do complexo de rutênio, quando este foi submetido à irradiação em 377 nm e 660 nm, foi obtida através da curva de calibração (Figura 43), e os dados se encontram na tabela 12.

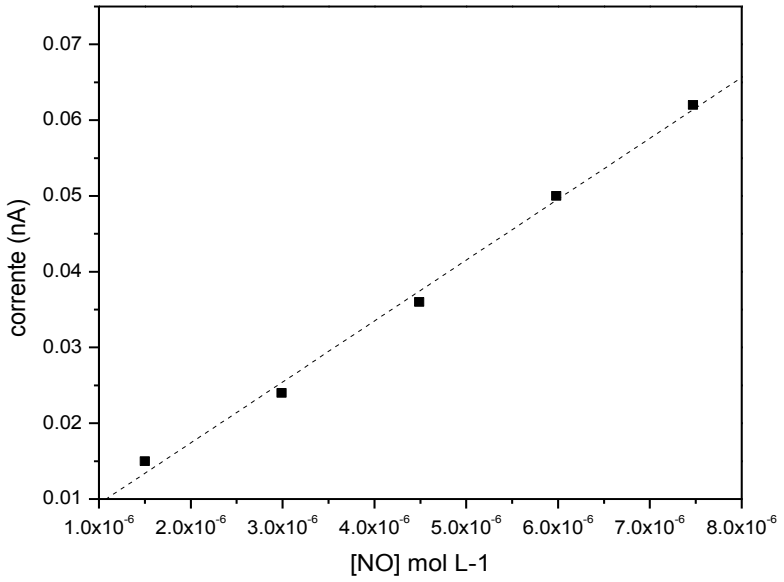


Figura 43: Curva de calibração para NO em solução tampão, obtida conforme descrito no item III.2.10.

Tabela 12: Quantificação de Óxido Nítrico liberado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)pc], quando submetido à irradiação. Dados em solução tampão pH 7,4. Concentração do complexo 1,0 x 10^{-4} M.

Comprimento de onda de irradiação	**[NO]** M
377 nm (tempo de irradiação 150 s)	8,66 x 10^{-6}
660 nm (tempo de irradiação 600 s)	2,60 x 10^{-7}

Desta forma, pode-se inferir que o mecanismo envolvido no processo fotoquímico em 377 nm é associado com a irradiação de luz específica na banda de transferência de carga metal-ligante (TCML), centrado na transição Ru^{II}-NO^{+} (Esquema 1) (2005; SAUAIA et al, 2005, SAUAIA et al, 2003). Neste caso, pode-se atribuir o estado excitado à formação da espécie $\{Ru^{III}\text{-}NO^{0}\}^{*}$, no qual o NO^{0} é lábil. Na irradiação em 660 nm, o processo é melhor descrito como transferência eletrônica fotoinduzida. Este sistema de transferência de elétron envolve uma espécie que absorve luz na região do visível e apresenta forte característica redutora no estado excitado, e uma espécie receptora, com característica oxidante. No sistema estudado, o estado excitado poderia ser descrito como $\{Ru(pc^{-})NO^{+}(ONO)\}^{*}$, no qual o NO é labilizado após processo de transferência eletrônica do fragmento ftalocianina, como demonstrado no esquema 2.

IV.2.12. Detecção de oxigênio singlete $_{-}{}^{1}O_{2}$

Oxigênio pode usualmente ser detectado por vários métodos, que podem ser reunidos em duas classes: diretos e indiretos. Os métodos diretos envolvem as medidas resolvidas no tempo, enquanto os indiretos se baseiam em medidas de consumo de um substrato oxidável, realizadas em estado estacionário (Wu et al, 2011).

Em nosso trabalho, foi utilizado o método direto para qualificar a presença do oxigênio singlete (Figura 44 e 45), no entanto, optamos pelo procedimento quantitativo do método indireto, em razão de limitação experimental daquele equipamento, nas condições necessárias para análise.

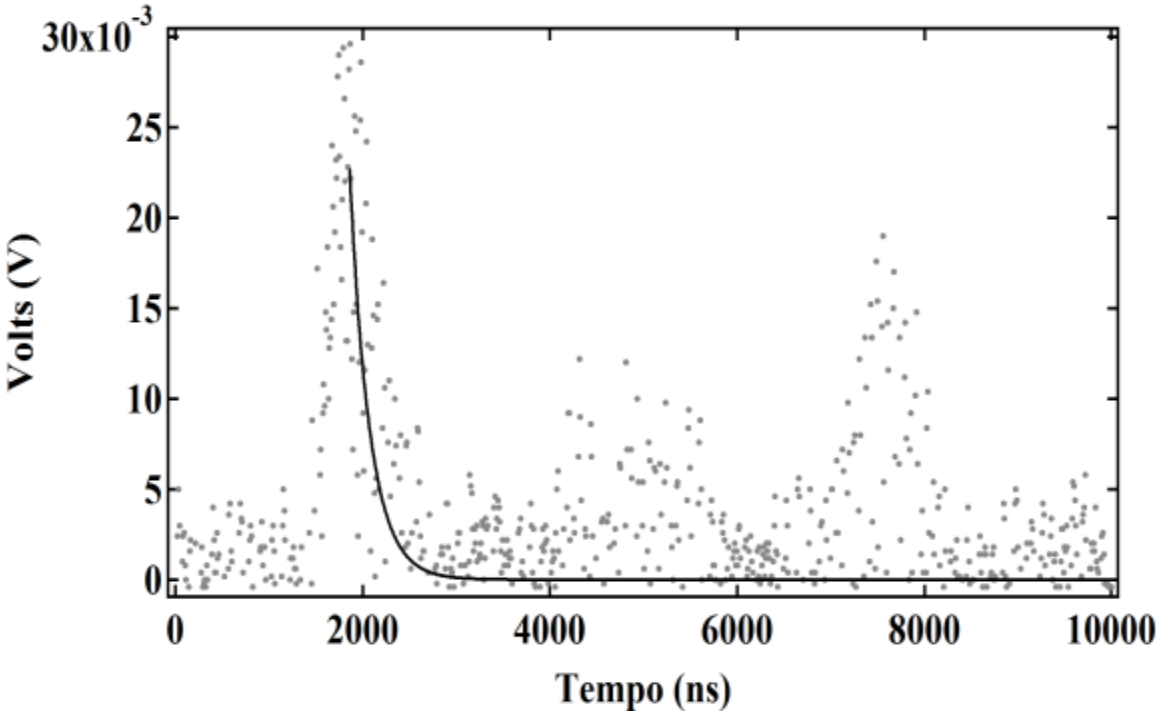


Figura 44: Emissões transientes em 1270 nm**,** obtidos após a foto excitação do complexo [Ru(ONO)(NO)pc] em 532 nm em clorofórmio. Temperatura 20,0 ^{o}C.

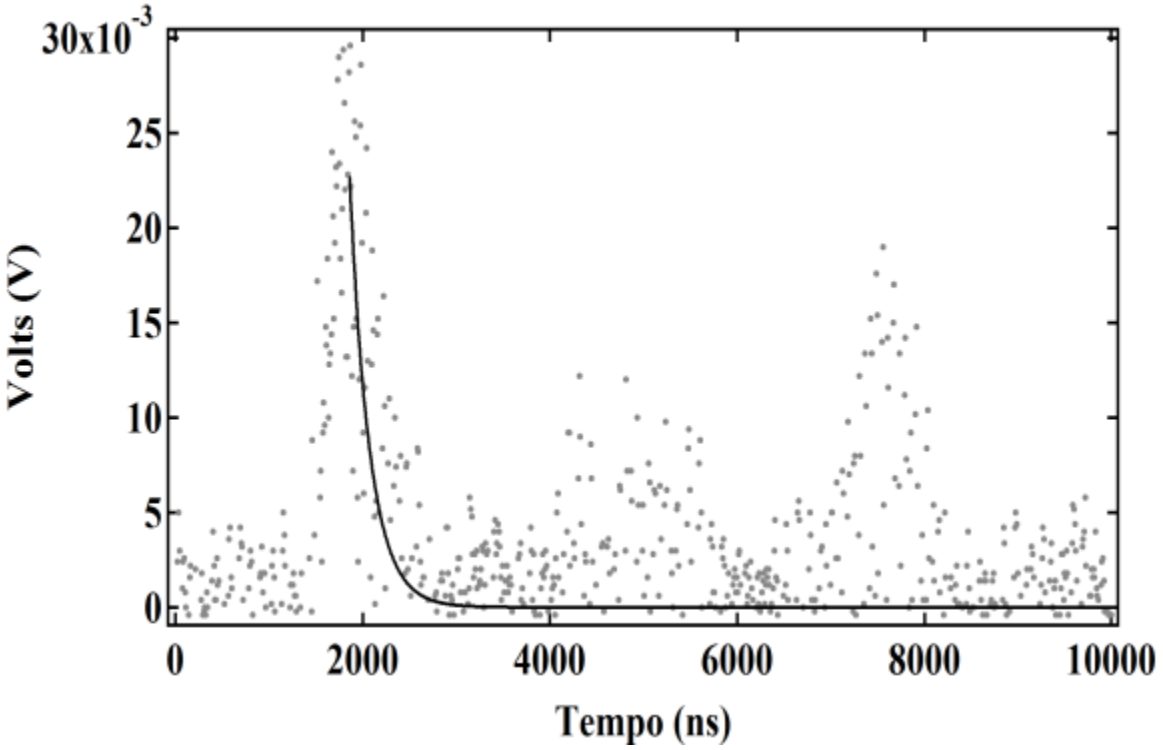
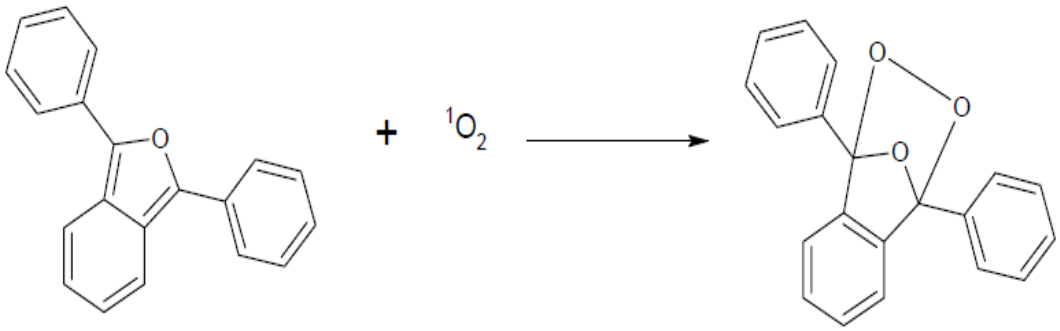


Figura 45: Emissões transientes em 1270 nm**,** obtidos após a foto excitação do complexo Ru(ONO)(NO)pc] em 532 nm em lipossoma. Temperatura 20,0 ^{o}C.

Claramente se observa o decaimento exponencial da fluorescência do transiente em 1270 nm, consistente com a formação de $^1O_2$. Em ambos os solventes, clorofórmio (Figura 42) e Lipossoma (Figura 43), foi observado o decaimento da fluorescência. Isto nos permite concluir que, em meio lipossomal, as características do fotossensibilizador de produzir $^1O_2$ são mantidas.

IV.2.13. Medida de rendimento quântico de oxigênio singlete

Em complementação ao experimento anterior, o método indireto de medida do rendimento quântico de $^1O_2$ utilizado neste trabalho, envolve a oxidação do substrato 1,3-difenil-iso-benzofurano (DPBF). O DPBF apresenta banda de absorção bastante intensa (ε = em etanol), em torno de 417 nm, que desaparece quando este reage com $^1O_2$, devido à formação do endoperóxido (Esquema 4).



Esquema 4: Representação da reação do DPBF com oxigênio singlete e formação de endoperóxido.

Nos experimentos utilizados em nosso trabalho, uma alíquota de 2 mL do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], solubilizada em solução tampão, foi acrescida de uma solução de DPBF (vide parte experimental III.2.11.) e submetida à irradiação em diferentes tempos, Esquematicamente e considerando-se o diagrama de Jablonski (Figura 46), pode-se representar esta reatividade, conforme esquema 4.

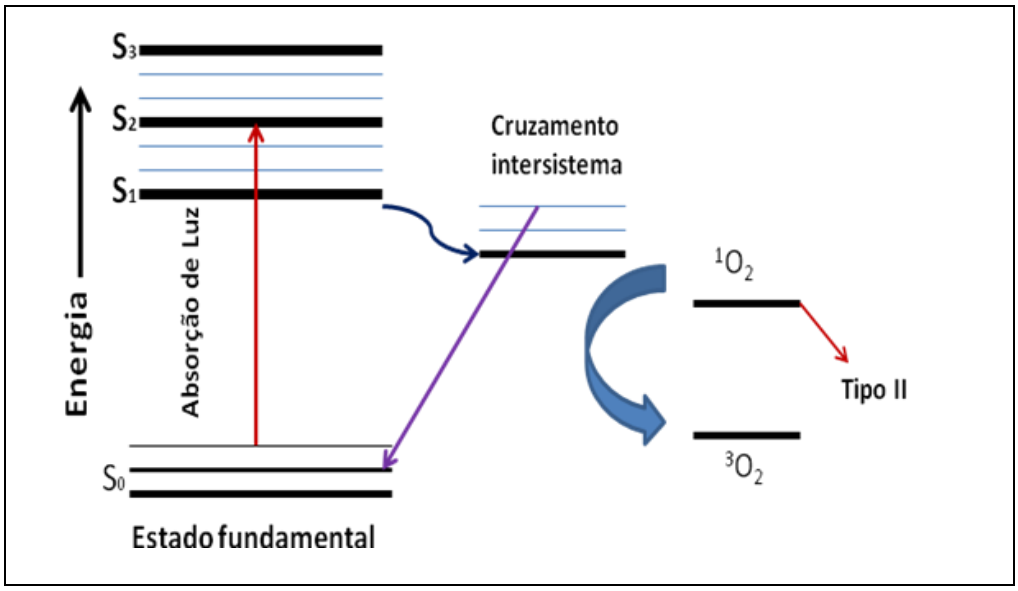


Figura 46: Diagrama de Jablonski, representação da conversão intersistema**,** que pode levar a formação de $^1O_2$.

Após a absorção de um fóton de luz, o fotossensibilizador passa a popular um estado eletrônico excitado singlete mais energético (Sn), podendo retornar ao seu estado fundamental (S0) através de quatro caminhos de desativação, como já discutido no item I. 4.

A ação fotodinâmica é dependente do processo de cruzamento intersistemas, responsável pela formação do estado energético triplete. Os fotossensibilizadores mais eficientes em TFD devem possuir necessariamente um alto rendimento quântico de conversão para o estado eletrônico excitado triplete. A partir do estado excitado triplete, o fotossensibilizador pode transferir energia para o oxigênio molecular a partir da configuração eletrônica triplete do fotossensibilizador, induzindo à formação de $^1O_2$. O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa, que interage de forma a oxidar vários substratos. Assim, quando o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] é irradiado, o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] sai do seu estado fundamental (1S0) e passa a popular um estado eletrônico sinlgete (1S*). A presença do íon metálico central na esfera de coordenação do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] favorece a conversão intersistema (1S* $\longrightarrow$ 3S*) com tempo de vida mais longo. Assim, o complexo pode transferir energia para oxigênio molecular, levando à formação de $^1O_2$. O oxigênio singlete reage prontamente com DPBF, de forma irreversível, levando à formação de endoperóxido (esquema 5).

Desta forma, como Kd é a constante de desativação do $^1O_2$ pelo solvente e k_r é a constante de velocidade de consumo do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], pela reação com o endoperóxido formado. Como Kd é da ordem de 8,3 x 10^4 s^{-1} e Kr é 3,8 x 10^4 M^{-1} s^{-1} (MOJZISOVA, 2009) pode-se inferir que essencialmente a reação bimolecular entre $^1O_2$ e DPBF é favorável.

$$^1S_0 \xrightarrow[I_a]{h\nu} {}^1S^*$$

$$^1S^* \xrightarrow{k_{isc}} {}^3S^*$$

$$^3S^* + {}^3O_2 \xrightarrow{k_\Delta} {}^1S_0 + {}^1O_2$$

$$^1O_2 \xrightarrow{k_d} {}^3O_2$$

$$^1O_2 + DPBF \xrightarrow{k_r} DPBF.O_2$$

Esquema 5: Mecanismo fotoquímico envolvido no consumo de oxigênio singlete pelo DPBF [TADA, 2007].

Desta maneira, $^1O_2$ gerado pela fotoexcitação dos complexos [Rupc] e [Ru(NO)(ONO)pc], na presença de DPBF, puderam ser monitorados espectrofotometricamente pela variação da absorbância na faixa de 417 nm em função do tempo de irradiação (Figura 47). Essas medidas foram feitas em cubetas de quartzo, em soluções aeradas, sob agitação, e em ambiente livre da luz externa. As amostras foram irradiadas em um laser de diodo em 660 nm e intensidade de luz ajustada para 1.05 x 10^{17} $J.cm^{-1}$. O consumo de DPBF foi monitorado em diferentes tempos de fotólise (0 a 1 min) pela medida da absorvância do DPBF a 417 nm. O gráfico de absorbância versus tempo de irradiação foi plotado (Figura 48). O tempo de decaimento (t) do DPBF foi calculado através do ajuste exponencial de primeira ordem para comprimento de onda escolhido, sendo este

inversamente proporcional à taxa de reação com $^1O_2$ (K_r, em s^{-1}). Assim, utilizando uma solução padrão com rendimento quântico e o tempo de decaimento conhecido, após a obtenção do tempo de decaimento do DPBF obtido para complexos [Rupc] e [Ru(NO)(ONO)pc], pode-se calcular a eficiência de geração de oxigênio singlete (K_r). Para este experimento, utilizou-se como padrão o azul de metileno em etanol (Φ_Δ = 0,52) (DeRosa; Robert, 2002). O valor de rendimento quântico de formação de $^1O_2$ foi calculado considerando a fórmula matemática abaixo:

$$\Phi\Delta = \Phi_\Delta^P \; \frac{K_r}{(1-t)} \; \frac{(1-t)^P}{(K_r)^P} \; \left(\frac{n_a}{n_p}\right)^2$$

Onde k_r e $(k_r)^p$ são, respectivamente, as taxas de consumo do DPBF estimadas, considerando-se uma cinética de primeira ordem, n_a é o índice de refração da amostra e n_p, do padrão, (1-t) e $(1-t)^p$ representam a razão entre a intensidade de radiação absorvida pela amostra e pelo padrão. Como por definição, $T = I_T/I_0$, onde I_T é a intensidade de radiação transmitida e I_0 é a intensidade de radiação incidente, tem-se, por conseguinte, que $1-t \equiv I_{abs}/I_0$. Desta forma, o rendimento quântico encontrado para os complexos [Rupc] e [Ru(NO)(ONO)pc], em solução tampão, foi igual a 0.39 e 0.22 mol.eistein^{-1}, respectivamente.

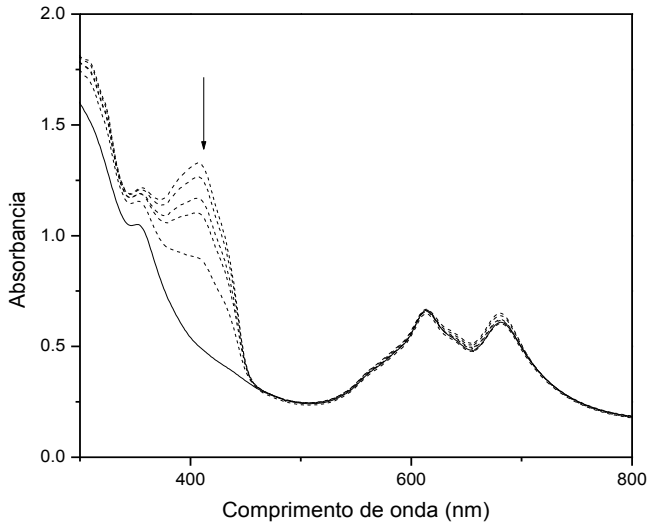


Figura 47: A) Espectro de absorção dos complexos [Ru(NO)(ONO)pc], na presença de DPBF, após diferentes tempo de irradiação com laser de diodo em 660 nm. Linha sólida, espectro do complexo de rutênio.

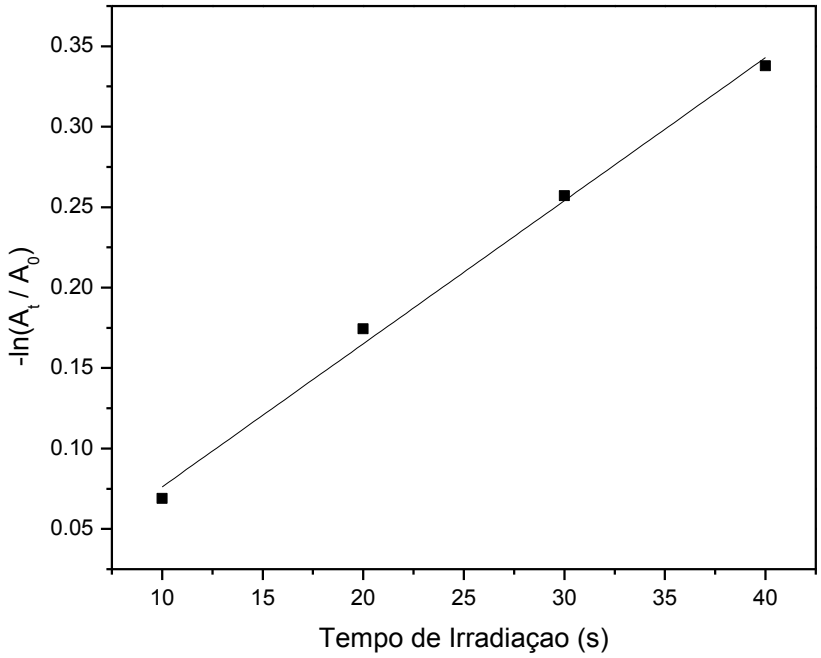


Figura 48: Gráfico de primeira ordem $-\ln(A_t / A_0)$ vs tempo de irradiação em segundos para a decomposição do DPBF. Temperatura 20,0 ^{o}C .

IV.2.14. Relação entre irradiação e variação da concentração de oxigênio em meio celular

A geração de oxigênio singlete, dependente de oxigênio molecular em meio biológico, foi avaliada indiretamente, mediante quantificação de O_2 (Figura 49). Sob irradiação, na presença de [Ru(NO)(ONO)pc], 6,1 nmol O_2/ml/min foram consumidos na geração do oxigênio singlete, enquanto ~ 3,5 nmol O_2/ml/min foi o consumo padrão (somente célula). Quando [Ru(NO)(ONO)pc] foi adicionado, sem irradiar, ~ 2,0 nmol O_2/ml/min foram consumidos. Esta redução na velocidade de consumo do oxigênio (nmolO_2/mL/min), comparando-se ao consumo padrão, pode ter ocorrido devido à inibição da citocromo c oxidase (complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) pelo NO liberado pelo [Ru(NO)(ONO)pc]. No entanto, o aumento da velocidade após a irradiação pode ter sido resultante do consumo do oxigênio associado à formação do oxigênio singlete quando o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foi irradiado na janela terapêutica (660 nm).

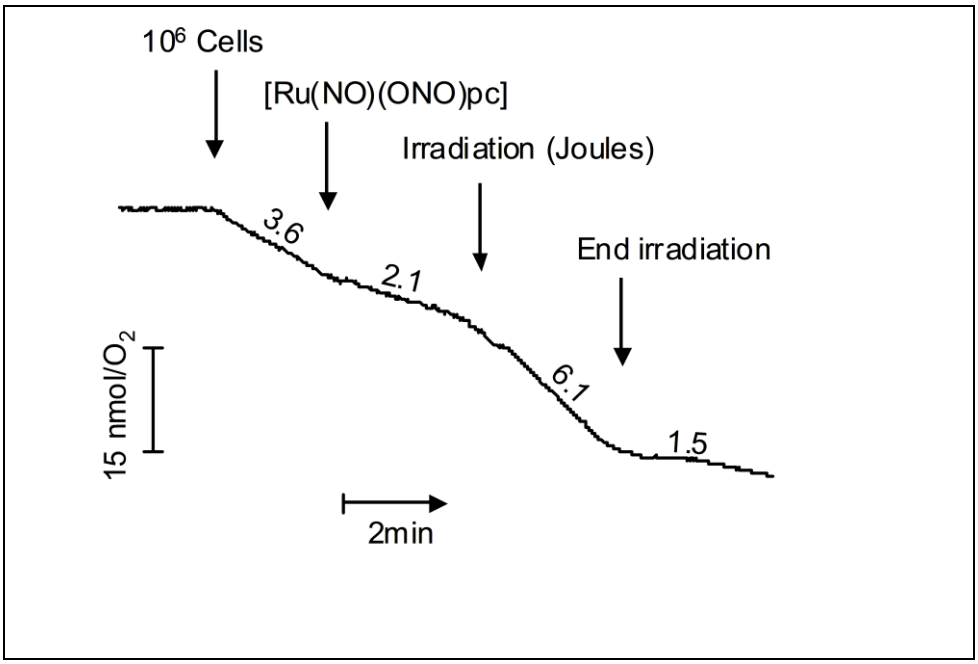


Figura 49: Determinação da velocidade de consumo de oxigênio em função do tempo ($nmolO_2$/mL/min), em células B16/F10 na presença e na ausência de irradiação. A suspensão celular (10^6) foi incubada com 2,0 x 10^{-6} M de [Ru(NO)(ONO)pc], conforme demonstrado na figura acima pelas setas em volume final de 1 mL.

Os dados obtidos mostram que o complexo nitrosilo adicionado exerce efeito considerável no processo bioquímico em nível celular, provavelmente atuando inicialmente na mitocôndria celular. O efeito mostrado na figura 49 é relativo ao processo relacionado à respiração ocasionado, neste caso, pelo NO liberado do complexo e, sob irradiação, pelo $^1O_2$.

IV. 3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Uma das principais funções do NO está relacionado o seu efeito vasodilatador. Esta propriedade tem sido extensivamente explorada nos trabalhos do grupo envolvendo complexos doadores de NO (BONAVENTURA et. al., 2004; GAITANI et. al. 2009) e servem de certa forma como sonda relativa à capacidade de uma substância liberar esta molécula e ter ação biológica. Portanto, avaliou-se o comportamento da musculatura lisa vascular perante o NO liberado pelo complexo [Ru(NO)(ONO)pc] por reações fotoquímicas e redutimétricas.

A resposta vasodilatadora do doador [Ru(NO)(ONO)pc] foram medidas a partir do platô de contração da fenilefrina (PHE) e foi exposto como porcentagem reversa da pré-contração da fenilefrina. Os resultados foram expressos com o ± SEM. Em cada experimento, n indica a quantidade de ratos utilizados nos estudos.

Dois parâmetros farmacológicos, efeito máximo (Emáx) e pD2, obtidos a partir da curva de dose resposta para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foram analisados.

Nos estudos realizados com o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] como vasodilatador na ausência de irradiação luminosa, utilizou-se a fenilefrina (PHE) como agente contrátil. Sabe-se que a fenilefrina é um agente de contração de vaso, e esta apresenta características redutoras em alguns complexos nitrosilos (SAUAIA et. al. 2003). Desta forma, utilizou também um agente de contração de vaso que não apresentasse característica redutora, desta forma utilizou-se a prostaglandina (PGF2α).

Para experimentos com irradiação, utilizou-se o mesmo protocolo experimental, e foi utilizado como agente contrátil somente a prostaglandina para assegurar que o No liberado neste experimento ocorresse por reções fotoquímicas. Ao se adicionar o complexo, iniciou o processo de irradiação com uma lâmpada a fim de promover a liberação do NO da esfera de coordenação.

Porém para todos os experimentos realizados, a vasodilatação máxima observada correspondeu a concentração de 10^{-7} M (Figura 1 do apêndice), o que é semelhante ao processo descrito para o nitroprussiato de sódio um complexo utilizado em terapia clínica. Aparentemente o mecanismo envolvendo o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] é independente de luz, pois o processo vasodilatador conduzido na presença e na ausência de irradiação luminosa, refletiu no mesmo efeito. Para os ensaios farmacológicos conduzidos com PHE e PGF2α como agente de contração, sendo o primeiro redutor e o segundo não, tiveram o mesmo efeito na vasodilatação.

A figura 1 do apêndice mostra o perfil de relaxamento do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], o resultado pra todos os experimento é o mesmo. Baseado nestes resultados, pode-se inferir que o mecanismo de vasodilatação se deve a cinética entre o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] e células endoteliais.

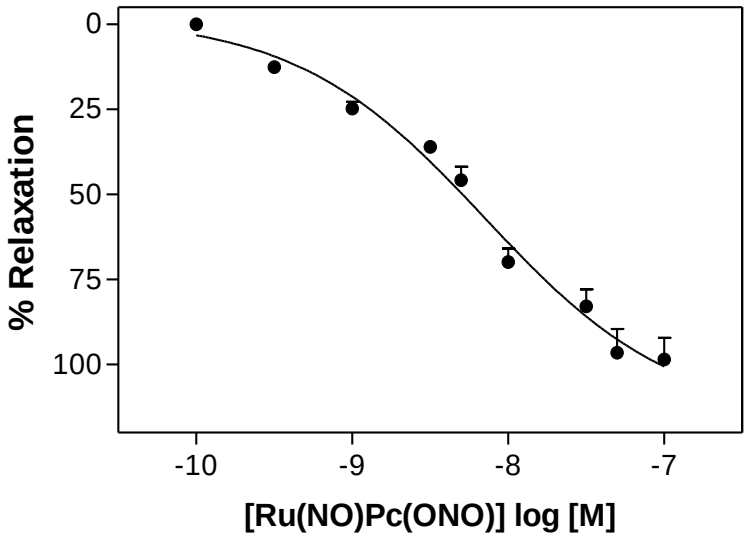


Figura 1: Relaxamento induzido pelo doador de NO [Ru(NO)(ONO)pc] em aorta de ratos normotensos. A curva concentração-efeito ilustra o relaxamento induzido pelo doador de NO em aorta de ratos contraídas com PHE. Cada ponto representa a média ± EPM obtido em cinco experimentos independentes.

IV.4. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA LIPOSSOMAL POR MEIO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS, POLIDISPERSIVIDADE, POTENCIAL ZETA E ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA UV-VISÍVEL.

Carreadores lipossômicos têm sido aceitos clinicamente no tratamento do câncer, visto que eles alteram a farmacocinética e biodistribuição dos fármacos antineoplásicos (MAMOT et al, 2003). Neste trabalho, foram manipulados lipossomas deformáveis, que também são chamados de lipossomas flexíveis ou transferssomas. São como lipossomas convencionais, mas suas membranas são constituídas de um fosfolipídeo (DOPC) e de um tensoativo de cadeia simples com alto raio de curvatura (tween 20), capaz de diminuir a interação entre as cadeias carbônicas, aumentar a fluidez e dar flexibilidade à membrana lamelar. Os lipossomas foram realizados como descrito no item 3.4.2, e a caracterização do sistema lipossomal por meio do tamanho de partículas, polidispersividade, potencial zeta foram feitas para os lipossomas “vazios” e para as preparações lipossomais do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]. Como pode ser observado (Tabela 13), os lipossomas vazios e contendo complexo [Ru(NO)(ONO)pc] apresentaram tamanhos 98,0 e 99,2 nm, dentro da faixa esperada para este tipo de vesículas, o índice de polidispersividade (Pdl) encontrado foi 0,178 ± 0,010 e 0, 230 e o potencial zeta (ξ) encontrado foi -5,55 ± 2,90 e -3,56 mV, respectivamente. A obtenção de lipossomas com diâmetro compreendido entre 50 e 150 nm é

um meio termo entre a eficiência de encapsulação (aumenta de acordo com o aumento do diâmetro) e a estabilidade do lipossoma (diminui com o aumento do diâmetro acima da faixa ótima de 80-200 nm) (LASIC, 1993; SCARPA et al, 1998), e a distribuição homogênea das vesículas são importantes fatores para a garantia da estabilidade dessa forma farmacêutica (KULKAMP et al, 2009).

Tabela 13: Tamanho de partículas (nm), índice polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (ξ)

Lipossoma	Diâmetro (nm)	Pdl	ζ (mV)
Vazio	98,3nm ± 1,9	0,178 ± 0,01	-5,55 ± 2,9
[Ru(NO)(ONO)pc]	99,2nm ± 2,1	0, 230 ± 0,06	-3,56 ± 1,6

Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão (n = 5).

Os resultados obtidos mostram um diâmetro médio de 99 nm para os lipossomas contendo o complexo [Ru(NO)(ONO)pc], o que significa que a inserção do complexo não alterou significativamente o tamanho das vesículas. A inserção do complexo pode ser observada avaliando-se o espectro UV-visível dos lipossomas e comparando-o com o espectro do complexo em solução (Figura 51).

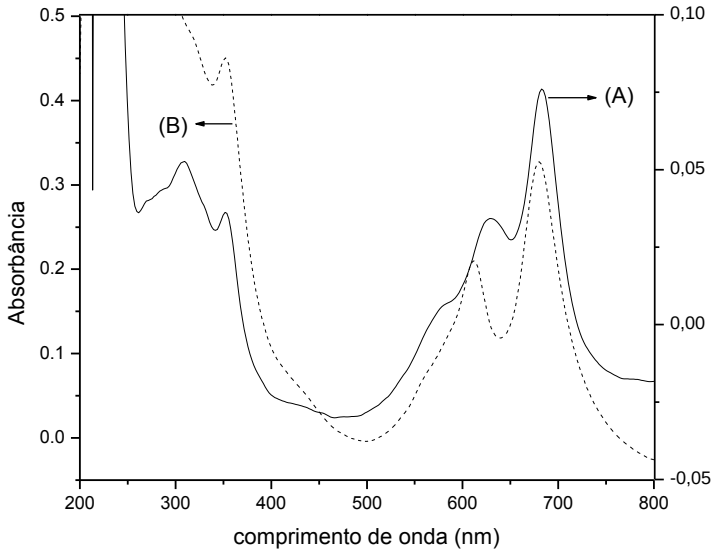


Figura 51: Espectro de absorção do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] em clorofórmio (A) e encapsulado em um lipossoma (B) ambos na concentração de 1,0 x 10^{-6} M.

Este sistema apresenta um tamanho dentro da faixa que permite uma interação celular maior e sua interiorização. Desta forma, fez-se o estudo de viabilidade celular em células de melanoma murino B16/F10, tanto em solução quanto em lipossoma, onde foi analisado o efeito citotóxico do complexo [Ru(NO)(ONO)pc].

IV.5. ESTUDOS *IN VITRO*

IV.5.1. Ensaios de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular (MTT) para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foram obtidos na ausência e na presença de estímulo luminoso. Estes ensaios foram feitos em linhagens de células de melanoma B16/F10. A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se concentrações de 10^{-9} - 10^{-6} M.

Conforme mostrado na figura 52, o complexo [Ru(NO)(ONO)pc], sem estímulo luminoso (barras pretas), não apresentou citotoxicidade. De fato, o que se observa é um aumento percentual da viabilidade celular, o qual, na concentração de 1,0 x 10^{-6} M, alcança o valor de 150%, em relação ao controle. Na verdade, a capacidade proliferativa de células tem sido amplamente discutida nos trabalhos do Wink e colaboradores (2008). Para estes autores, níveis fisiológicos de NO podem induzir proliferação celular. Desta forma, podemos inferir que uma quantidade menor do complexo de rutênio, administrado nos ensaios de citotoxicidade, propiciou a liberação de NO em níveis baixos e foi o responsável pelo efeito proliferativo das células B16/F10. A razão desta inferência deve-se a processos de liberação de NO, ocasionado provavelmente através da redução do complexo por biomoléculas redutoras. A porcentagem de complexo de rutênio que teve interação com a célula foi avaliada por espectroscopia de massa de absorção atômica (item 4.4.2).

O experimento de viabilidade celular (MTT) foi feito também sob irradiação luminosa, utilizando laser dentro da janela terapêutica (660 nm), com uma potência de 4 J/cm^2 (Figura 52). Observa-se, nestes resultados, que há uma tendência em diminuir a viabilidade celular conforme o aumento da concentração do complexo de rutênio (10^{-9} - 10^{-6}M). Na concentração de 1 x 10^{-6} M, há uma diminuição da viabilidade celular de 74% em relação à mesma concentração observada sem estímulo luminoso, assumindo-se que o controle seja aquele da curva em preto, na concentração de 1 x 10^{-6} M.

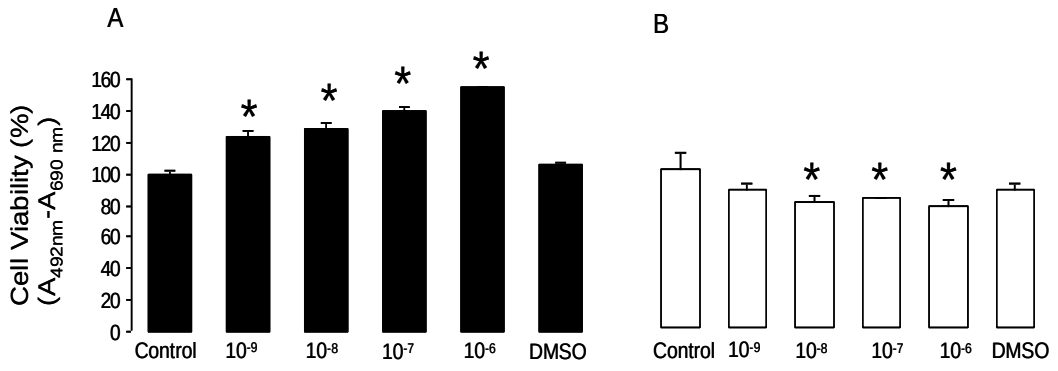


Figura 52: Viabilidade celular de B16/F10 obtidos por ensaios de MTT após tratamento com [Ru(NO)(ONO)pc], Células B16/F10 foram plaqueadas em Wells de 96 (2 x10^4 células/well) por 3 horas com concentração do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] de 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7} e 10^{-6} M. As barras escuras mostram percentuais de não irradiados de células viáveis e barras brancas, células irradiadas. p <0,05 vs respectivos controles. Potência do laser = 4,0 J/cm^2.

IV.5.2. Espectroscopia absorção atômica em células B16/F10

O complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foi avaliado quanto à ação citotóxica em ensaios *in vitro* com células B16/F10. Esta ação parece estar diretamente relacionada à cinética de interação do complexo de rutênio com as células de linhagem cancerígena utilizadas neste trabalho. Para avaliar a quantidade do complexo que, de fato, interagiu com a célula, ensaios de espectrofotometria de absorção atômica foram feitos. A técnica analítica é seletiva e constitui-se em uma forma precisa de se saber qual concentração do complexo foi responsável pelos efeitos observados. Análise da espectroscopia de absorção atômica (Tabela 14) mostra a quantidade de rutênio (%) no interior das células através de análises de ICP-MS. Na concentração 1 x 10^{-6} M, cerca de 5% do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] foi capturado pelas células B16/F10 após 3 h de incubação, enquanto, após 24 h, 12% do complexo penetrou nas células. Nos experimentos a seguir, utilizaram-se 3 horas de incubação, a fim de evitar proliferação celular durante a exposição ao complexo.

Tabela 14: Análise quantitativa de Rutênio (Ru) presente em células B16/F10 (12poços/105).

Complexo Rutênio Nitrosilo (M)	Tempo (h)	[complexo x 0] M	[complexo x 10^7] M	[complexo x 10^6] M	[complexo x 10^5] M
Rutênio detectado (%)	3 h	0	10,40	5,35	0,61
	24 h	0	30,25	12,12	6,02

Desempenho de ICP-MS: Potência (W) = 1100; Fluxo de gás (L min^{-1}) = 0.52; Replicatas = 3.

IV.4.3. Espectroscopia de fluorescência da incubação do complexo [Ru(NO)(ONO)pc]

Uma explicação para o crescimento celular na ausência de irradiação luminosa (Figura 52 barras escuras) pode ser atribuída ao NO liberado pelo complexo. A comprovação cinética foi feita através da espectrofluorimetria. Para tanto, células B16/F10 foram incubadas por 3 horas em uma concentração de 1 x 10^{-6} M de complexo [Ru(NO)(ONO)pc] (6 x 10^6 células em frasco 75 cm^2). Em seguida, foram tripsinizadas, lisadas (CelLytivtmM Cell-sigma) e centrifugadas (1200 rpm) a fim de obter a fração citosólica. Esta fração foi colocada em clorofórmio, a fim de obter espectros fluorimétricos. Em comparação aos espectros de fluorescência do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] e [Rupc] em clorofórmio, pode-se verificar que aquele espectro do meio celular é semelhante ao da [Rupc] (Figura 53). Assim sendo, pode-se inferir que houve sim liberação de NO e, desta forma, pode-se atribuir o crescimento celular ao NO. De certa forma, não é surpreendente, haja vista a discussão de Wink e colaboradores (2008).

Avaliando-se os resultados de citotoxicidade (Figura 52 barras brancas), pode-se observar que as células, quando irradiadas, após o tratamento com o complexo de rutênio, apresentam morte celular. Haja vista a discussão anterior, pressupõe-se que não há mais complexo nitrosilo no meio, ou seja, a irradiação deve ser pertinente ao complexo [Rupc]. Conforme mencionado anteriormente (Item 4.1.7), esta ação de diminuição da viabilidade celular deve-se ao oxigênio singlete gerado com estímulo luminoso.

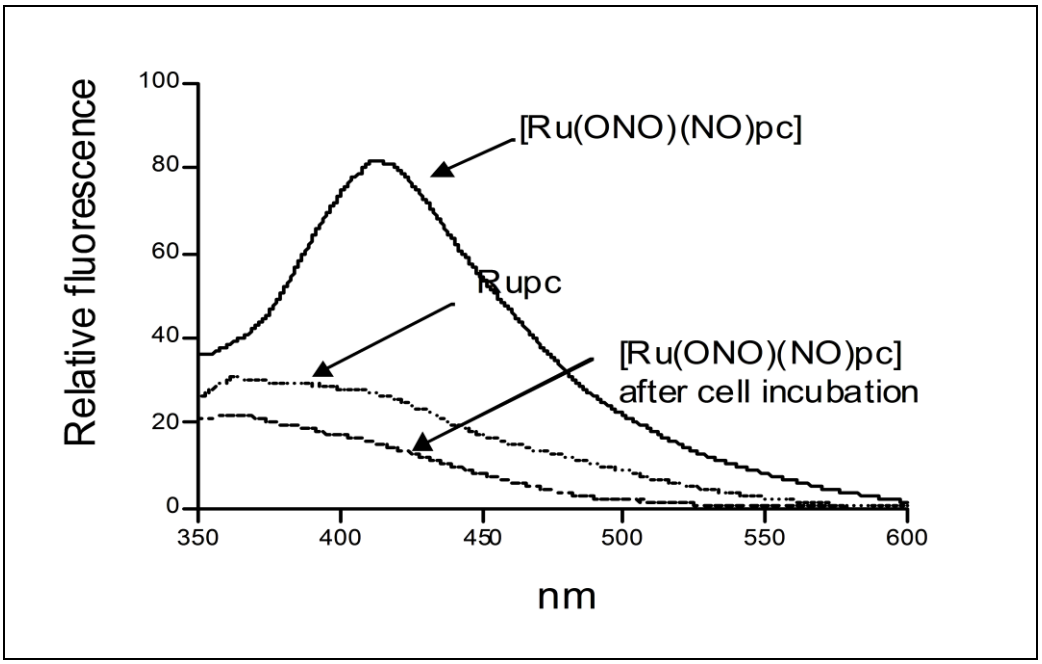


Figura 53: Espectro de emissão do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] e [Rupc] em $CHCl_3$, em comparação com produtos intracelulares originado provavelmente da redução do complexo após 3 h de incubação. λ_{ex} = 325 nm.

IV.5.4. Efeito do oxigênio singlete - $^1O_2$

A fim de caracterizar o efeito do oxigênio singlete na concentração 10^{-6} M, as células foram tratadas durante 3 horas, irradiadas com laser dentro da janela terapêutica (660 nm), com uma potência de 4 J/cm^2 e analisadas por ensaios de MTT em 3, 8, 24 e 48 horas (Figura 54). Observa-se, nestes resultados, que, após 3 horas e num tempo máximo de 24 horas pós-irradiação, houve diminuição considerável na viabilidade celular (~ 70% em comparação com o controle). Resultados demonstraram que o oxigênio singlete gerado sob irradiação é o responsável pela diminuição de células viáveis (compare a figura 54).

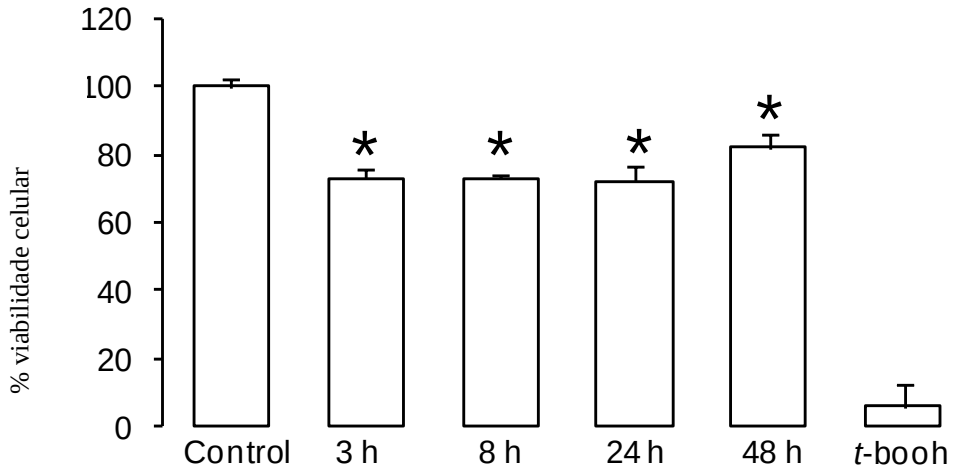


Figura 54: Viabilidade celular de B16/F10 obtidos por ensaios de MTT, após tratamento com [Ru(NO)(ONO)pc], Células B16/F10 foram plaqueadas em Wells de 96 (2,0 x 10^4 células/well) por 3 horas [Ru(NO)(ONO)pc] de 10^{-6} M. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS e irradiadas com laser na potência de 4,0 J/cm^2, a viabilidade celular foi determinada em 3, 8, 24 e 48 horas após remover o complexo.

IV.5.5. Efeito do lipossoma "vazio" e do complexo encapsulado em lipossoma

Os ensaios de citotoxicidade celular mostram que concentrações da ordem de µM propiciam morte significativa de células, determinada pela diminuição da viabilidade celular, porém precedida de proliferação celular. Isto foi atribuído a níveis fisiológicos de NO. Uma das maneiras de contornar este problema deve estar relacionada com a concentração deste radical no interior da célula. Como esta concentração depende do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], uma estratégia viável seria aumentar a concentração do complexo que se difunde pela membrana celular. Neste trabalho, utilizamos lipossoma ultraflexível para avaliar este efeito.

Para determinar se a formulação lipossomal era atóxico, as células foram incubadas por 3 horas com lipossoma vazio, ou seja, preparada sem o complexo. Os resultados são apresentados na figura 56 e mostram que as vesículas lipossomais são completamente inertes, do ponto de vista de toxicidade em células de melanoma B16/F10. Foram testadas concentrações de 25, 50, 75 e 100% de lipossoma "vazio" por poço.

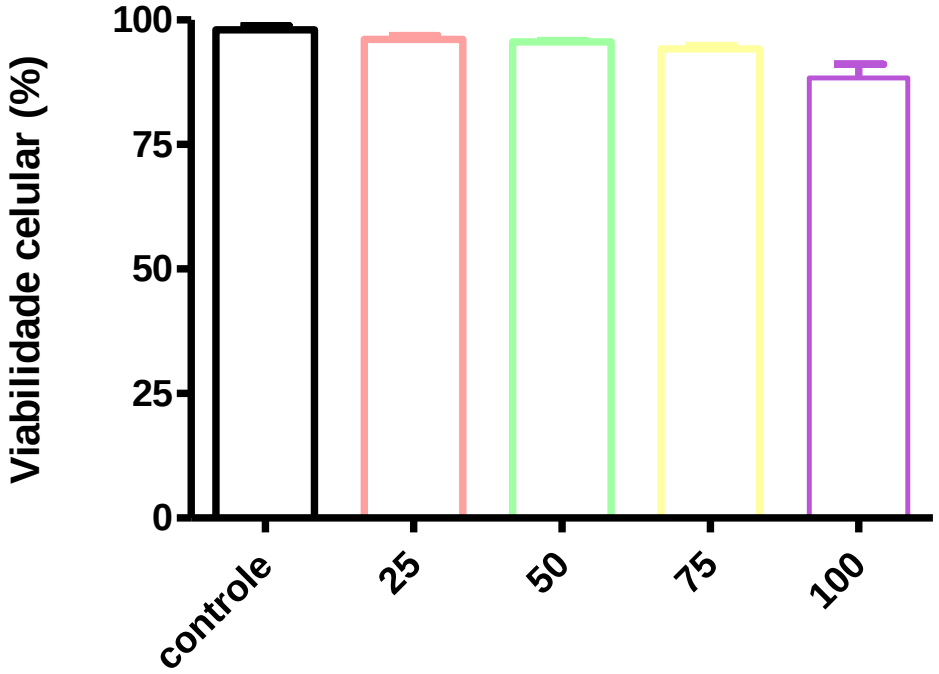


Figura 55: Porcentagem de viabilidade celular após incubação com a formulação lipossomal "vazia". Os experimentos foram realizados no escuro, ou seja, sem irradiação luminosa com as células de melanoma B16/F10.

Desta forma, a citotoxicidade do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma foi avaliado. Inicialmente a espectroscopia de absorção atômica foi realizada para quantificar a porcentagem de rutênio no interior das células da mesma forma, como descrito no item III.5.2. Em uma concentração 10^{-6} M, cerca de 25% do complexo encapsulado em lipossoma foi capturado pelas células B16/F10 após 3 h de incubação. Conforme mostrado na figura 55, o precursor [Rupc], quando encapsulado em lipossoma sem estímulo luminoso (barras pretas), não apresentou citotoxicidade. Porém, pode-se observar que o complexo [Ru(NO)(ONO)pc], quando encapsulado em lipossoma, não causa um aumento da viabilidade celular, como visto para os experimentos em solução (Figura 53 barra preta) na concentração de 1 x 10^{-6} M, quanto este não foi exposto à irradiação luminosa. Porém, em relação ao controle, há uma diminuição da viabilidade celular em torno de 15%, provavelmente isso ocorre devido ao aumento na quantidade de [Ru(NO)(ONO)pc], responsável pela liberação de NO no interior da célula, quando o complexo foi encapsulado. O experimento de viabilidade celular foi feito também sob irradiação luminosa, para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma, seguindo os mesmos parâmetros, como laser dentro da janela

terapêutica (660 nm) e potência de 4 J/cm^2 (Figura 53). Observa-se, nestes resultados, que a viabilidade celular diminuiu aproximadamente 35%. Este decréscimo é relativamente maior do que aquele observado em meio aquoso (Figura 53) para o mesmo experimento.

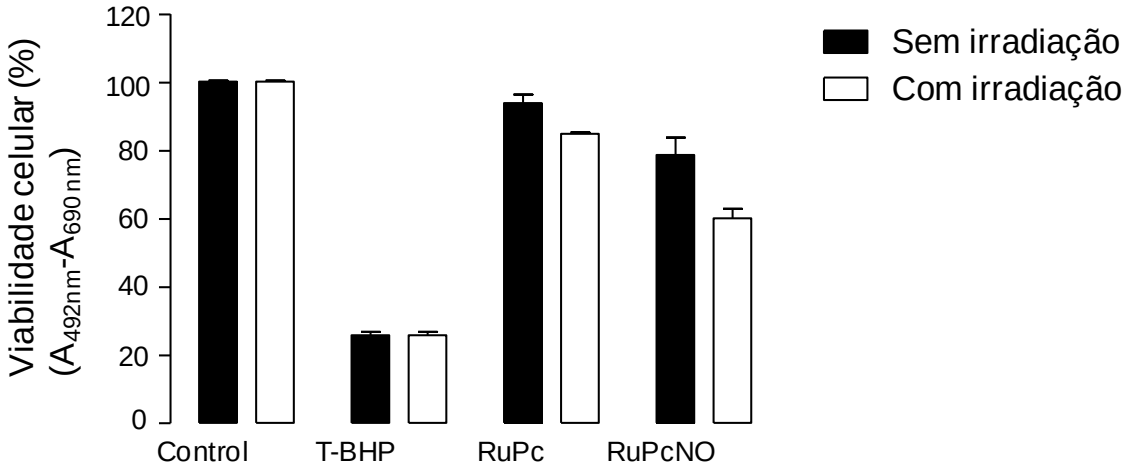


Figura 56: Viabilidade celular de B16/F10 obtidos por ensaios de MTT após tratamento com [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma, Células B16/F10 foram plaqueadas em Wells de 96 (2 x 10^4 células/well), por 3 horas, com concentração do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] 10^{-6} M. As barras escuras mostram percentuais de não irradiados de células viáveis e barras brancas, células irradiadas. $p < 0,05$ vs respectivos controles. Potência do laser = 4 J/cm^2

IV.5.6. Efeito da dose de irradiação em Joule/cm^2

Definidas as condições de tratamento, laser, tempo de encubação, concentração 10^{-6}M empregando a linhagem de melanoma murino B16/F10, realizaram-se ensaios com complexos [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma, agora utilizando diferentes doses de irradiação. Doses de 12, 23, 35 e 45 J/cm^2 foram testadas e, através do resultado obtido (Figura 57), avaliou-se a eficácia do tratamento *in vitro*. A maior taxa de morte foi obtida com a maior dose de irradiação, 45 J/cm^2, com a qual a viabilidade celular diminuiu em 70%.

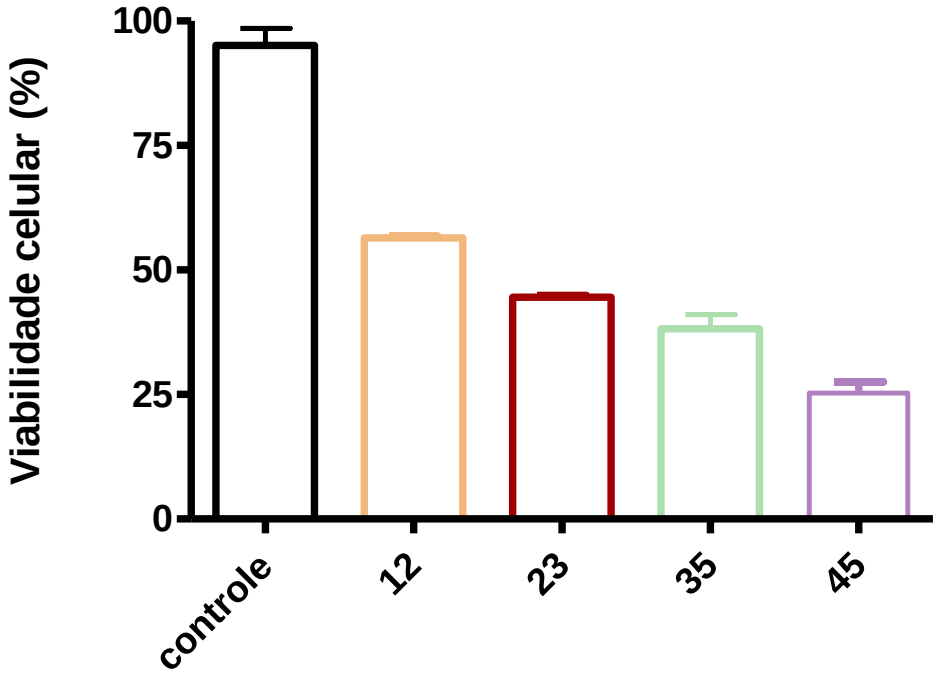


Figura 57: Viabilidade celular de B16/F10 obtidos por ensaios de MTT após tratamento com [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma, Células B16/F10 foram plaqueadas em Wells de 96 (2,0 x 10^4 células/well), por 3 horas, com concentração do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] 10^{-6} M. Após 3h de tratamento, as células foram irradiadas com doses de 12, 23, 35 and 45 j/cm^2.

IV.5.7. Mecanismo bioquímico relacionado a morte celular

Considerando os resultados obtidos promissores, iniciou a investigação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com complexo [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma. Desta forma, foram realizadas marcações *in vitro*, utilizando dois diferentes fluoróforo: anexina V e iodeto de propídio. A anexina V se liga especificamente ao resíduo de fosfatidilserina exposto na membrana plasmática após liberação do citocromo-C da mitocôndria, sendo um evento inicial de apoptose. Por outro lado, o iodeto de propídeo é um corante vital que se intercala no DNA genômico quebrado, processo este característico da necrose celular (LEIST; NICOTERA, 1997).

As células de melanoma B16/F10 foram tratadas com complexo [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma, irradiadas com 45 J/cm^2 e, após 24 horas, marcadas com anexina V e iodeto de propídeo. Como é possível observar na figura 58, as células tratadas

apresentaram marcação positiva para anexina V, indicando que, para esta linhagem, um dos processos de morte induzida pelo tratamento é a apoptose.

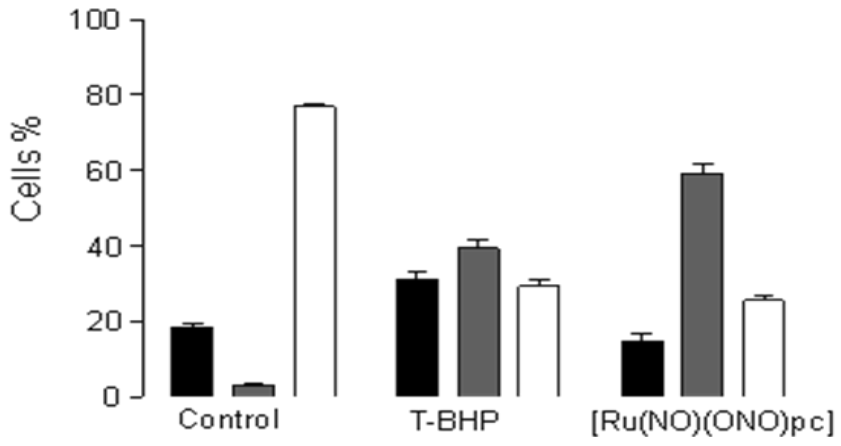


Figura 58: Células B16/F10 tratadas com complexo [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma 1 x 10^{-6} M e irradiadas com 45 J/$cm^{2.}$ Barras pretas representam processo de morte celular por necrose. Barras cinzas representam processo de morte celular por apoptose. Sendo n = 5, p <0.05

IV.5.8. Efeito citotóxico em linhagem de células Melan-A

A seletividade do tecido tumoral em relação ao tecido normal é importante consideração quando projetado pelo uso em TFD, para tratamento de câncer. O mesmo roteiro experimental foi desenvolvido, agora utilizando células Melan A, que é uma linhagem melanocítica não tumorigênica, presente na epiderme de mamíferos. O perfil citotóxico para complexo [Ru(NO)(ONO)pc] está apresentado na figura .

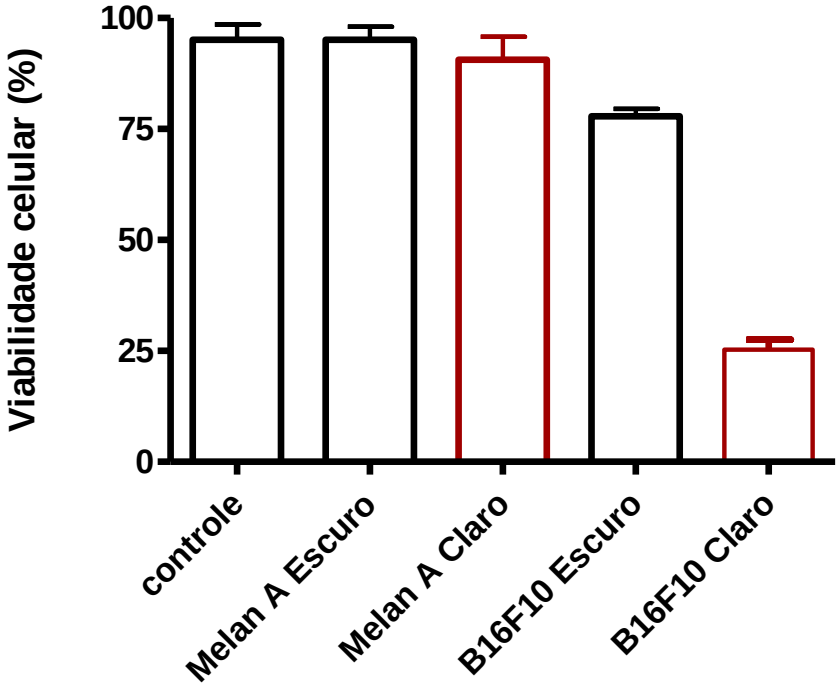


Figura 59: Complexo [Ru(NO)(ONO)pc] encapsulado em lipossoma 1 x 10^{-6} M aplicado em células B16/F10 e Melan A. Barras pretas representam experimentos realizados na ausência de luz. Barras cinzas representam células irradiadas com 45 J/$cm^{2.}$. Sendo n = 5, p <0.05.

O complexo [Ru(NO)(ONO)pc] não apresentou citotoxicidade celular na linhagem Melan A. Isto permite inferir que o complexo nitrosilo estudado neste trabalho, tem uma grande potencialidade de ser aplicado *in vivo*, com esperança de relativo sucesso.

V. MODELAGEM MOLECULAR

Otimizações de geometria por Teoria de Densidade Funcional (DFT) foram realizadas utilizando-se o software GAMESS, com um critério de convergência de 10^{-4} a.u. em um algoritmo de gradiente conjugado. O LANL2DZ foi usado como base para se obter os potenciais efetivos para o rutênio. Cálculos de DFT foram realizados usando o B3LYP. Os orbitais moleculares e os espectros simulados foram calculados pelo método ZINDO semiempírico, tal como implementado no programa HyperChem [HyperChem Professional 8.0, Hipercubo, Inc. 1115 NW 4 St. Gainesville, FL 32601, EUA], com a mesma metodologia previamente relatada (TOMA et al, 2005). O espectro eletrônico foi calculado com base em excitações simples em um espaço ativo envolvendo 40 orbitais moleculares (OMs) de

fronteira (20 maiores e os menores ocuparam 20 OMs desocupados) e o perfil de absorção simulada usando funções gaussianas assumindo-se meia-largura de banda de 4.000 cm^{-1}.

A determinação por DFT da geometria mais estável para os isômeros [Ru(NO)(NO_2)(pc)] levam à conclusão de que a ONO é preferida para a coordenação-NO_2^- e que o anel da ftalocianina é altamente planar, como esperado. A coordenação NO é planar (Ru-ângulo NO é 178.1^o) indicando que o $\{Ru^{II}\text{-}NO\}^+$é a forma predominante, de acordo com estruturas relatadas na literatura. O orbital molecular de mais alta energia ocupado (HOMO) e os respectivos níveis dos orbitais de mais baixa energia desocupado (LUMO) e a mistura fracionária orbitalar de 12 orbitais moleculares de fronteira, os quais são apresentados na tabela 15, enquanto os espectros teórico e experimental estão apresentados na tabela 16. Inspeção da tabela X mostra que o ligante NO^+ está influenciando fortemente a composição dos orbitais moleculares de fronteira, especialmente os vazios. Considerando o nível HOMO, isto pode ser atribuído como um orbital contendo grande fração do ligante ftalocianina, enquanto o nível LUMO mostra um certo grau de mistura com o sistema $\{Ru^{II}\text{-}NO\}^+$. Como a redução pode ser comparada à adição de elétrons no orbital LUMO, esses dados confirmam a atribuição teórica anterior, baseado na medida eletroquímica. Neste caso, o processo de redução observada em -0,30 V pode ser entendido como a redução do $\{Ru^{II}\text{-}NO\}^+$, dando origem a liberação de NO. Em relação a excitação eletrônica, a mistura de orbitais são de modo que as bandas B e Q não podem ser atribuídas a transições oriundas de orbitais puros e, de fato, os resultados mostram que um alto grau da transição pc $\rightarrow$ $\{Ru^{II}\text{-}NO\}^+$, que envolve de fato uma transferência de carga, tem de ser considerado para as bandas B e Q. Estes dados teóricos podem explicar porque a irradiação de amostras nas bandas B e Q propiciam a liberação de NO. Racionalizando sobre estes resultados teóricos observa-se que há um alto grau de transferência de carga em ambas as transições, e sendo assim, a irradiação em ambos os comprimentos de onda pode ser atribuída a uma mudança de $\{Ru^{II}\text{-}NO\}^+$ para $Ru^{III}\text{-}NO^0$ (Figura 60). O mesmo tipo de comportamento foi observado em sistemas $Ru^{II}NO$ similares (TOMA et al, 2005).

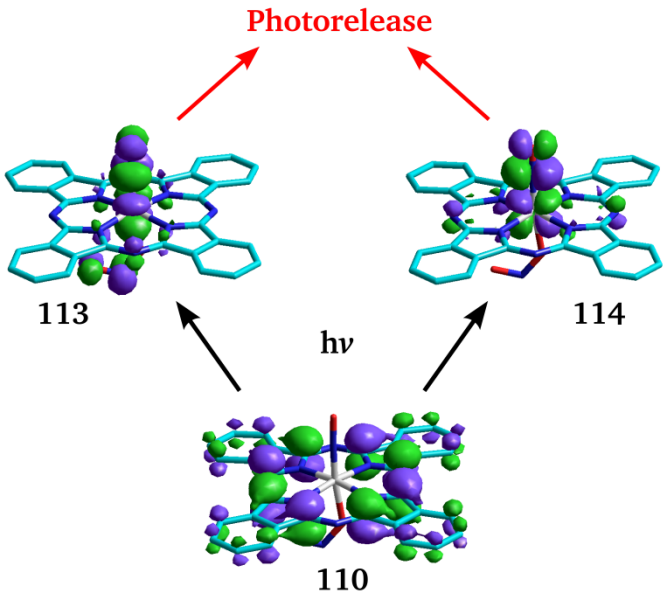


Figura 60: Transição eletrônica envolvida na banda B (110 → 113) e Q (110 → 114) calculado para o complex [Ru(NO)(ONO)pc] por DFT and ZINDO. *Evidência da contribuição do ligante nitrosilo em ambos estados excitados (B e Q).

Tabela 15: Energia dos orbitais moleculares e % de misturas destes orbitais, para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc], calculado por DFT e ZINDO.

Mol. Orbital	Energy / eV	Ru^{II}	Pc^{2-}	NO^{+}	NO_2^{-}
116	-0.02	4.69	11.92	3.99	79.40
115	-0.02	0.02	99.77	0.02	0.19
114	-0.04	31.90	15.96	51.62	0.51
113	-0.05	30.64	16.83	40.67	11.86
112	-0.08	0.92	88.57	10.42	0.09
111	**-0.08**	**1.85**	**87.18**	**10.60**	**0.37**
110	**-0.22**	**0.00**	**99.84**	**0.03**	**0.13**

109	-0.31	19.98	55.23	23.67	1.12
108	-0.31	18.27	50.66	28.55	2.52
107	-0.32	0.01	99.90	0.02	0.07
106	-0.33	0.19	99.04	0.05	0.73
105	-0.34	6.28	93.00	0.62	0.11
104	-0.34	1.12	97.73	0.87	0.27
103	-0.34	55.83	43.78	0.11	0.28

Tabela 16: Algumas das transições eletrônicas calculadas para o complexo [Ru(NO)(ONO)pc].

Observado[a]	Calculado	Força do oscilador	atribuição	
λ / nm			$MO_i \rightarrow MO_f$	
680	685	0.16	110→111	Q
			110→113	$Pc \rightarrow Ru^{II}NO^{+}$ CT
608	642	0.23	110→112	Q
			110→114	$Pc \rightarrow Ru^{II}NO^{+}$ CT
475	492	0.73	110→111	B
			110→113	$Pc \rightarrow Ru^{II}NO^{+}$ CT
	480	0.42	110→112	B
			110→114	$Pc \rightarrow Ru^{II}NO^{+}$ CT
	473	0.29	110→114	$Pc \rightarrow Ru^{II}NO^{+}$ CT
358	358	0.02	110→116	$Pc \rightarrow NO_2^{-}$ CT

[a]Espectro eletrônico em solução de clorofórmio.

CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstram que o efeito sinérgico de óxido nítrico e oxigênio singlete produzido pelo fotosensibilizador [Ru(NO)(ONO)pc] mostrou um grande benefício na diminuição da viabilidade celular da linhagem B16/F10, quando comparado com a espécie [Rupc], um complexo que produz somente oxigênio singlete quando irradiado. A atividade antiproliferativa do complexo [Ru(NO)(ONO)pc], observado na análise *in vitro*, passa a ser uma alternativa importante a ser considerada dentro da fotoquimioterapia, que pela primeira vez fora relatada num trabalho científico, cuja ação se deve ao sinergismo de dois radicais produzidos por um único composto. A relação entre quantidade de composto que atravessa a membrana celular e atividade citotóxica é inerente à diminuição da viabilidade celular. Fica evidente neste caso que é importante buscar alternativas para burlar o efeito de repulsão membrana-complexo, provavelmente devido à barreira eletrostática, que no caso de nosso trabalho fora conseguido com o uso de lipossomo ultraflexível. Neste trabalho verificamos um aumento de atividade citotóxica do complexo [Ru(NO)(ONO)pc] de cerca de 25%, quando o composto estava encapsulado, se comparado com o mesmo composto em solução de PBS.

Vale ainda ressaltar que o composto não apresentou citotoxicidade, no escuro, para células ditas “normais” (melan-A), até a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ M. Acrescenta-se ainda que foi, considerando-se unicamente o fator vasodilatação *in vitro*, este composto tão potente quanto um fármaco comumente usado em clínica médica para controle de pressão arterial – nitroprussiato de sódio – que apresenta efeitos colaterais danosos. Isto pode qualificar o composto [Ru(NO)(ONO)pc] para ensaios *in vivo* e quiçá explorá-lo para este fim, como um novo fármaco.

Os resultados obtidos e descritos neste trabalho permitem vislumbrar uma investigação mais aprofundada do [Ru(NO)(ONO)pc] como metalo-fármaco ou considerar estes achados na idealização de espécies que possam produzir NO e $^1O_2$ sinergicamente, em experimentos *in vivo*, com fins de aplicação clínica, como é o caso para Terapia Fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

VII. Referências

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

ALLEN, T. M.; CHENG, W. W.; HARE, J. I.; LAGINHA, K. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nano-particles in cancer. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 513, 2006.

ARMOR, J. N.; FURMAN, R.; HOFFMAN, M. Z. Reactivity of coordinated nitrosyls. V. Generation and characterization of a ruthenium(II) alkylnitroso complex**. Journal of the American Chemistry Society,** v. 97, p. 1737, 1975.

BALZANI, V.; CARASSITE, V. **Photochemistry of Coordination Compounds**. Academic Press. Cap. 1, p. 1-78, 1970.

BERNERS-PRICE, S.J.; BARNHAM, K.J.; FREY, U.; SADLER, P.J. Kinetic analysis of the stepwise platination of single- and double-stranded GG oligonucleotides with cisplatin and $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$. **Chemistry - A European Journal, v**. 2, p. 1283, 1996.

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

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

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; LIMA, R. G. ; SILVA, R. S.; BENDHACK, L.M. Endothelium modulates the vascular relaxation induced by the nitric oxide donor. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 38, 2008.

BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; TRAPANI, G.; FRANCO, M.; LISO, G. *In vitro* evaluation of N-acyllactam esters of indomethacin as dermal prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 45, 1995.

BORGES, S. D. S.; DAVANZO, C. V.; CASTELLANO, E. E.; Z-SCHPECTOR, J.; SILVA, S. C.; FRANCO, D. W. Ruthenium nitrosyl complexes with N-heterocyclic ligants. **Inorganic Chemistry**, v. 37, p. 260, 1998.

BUSCH, T.M.; HAHN, S.M.; GLATSTEIN, E.J.; EVANS, S.M.; KOCH, C.J. Depletion of Tumor Oxygenation during Photodynamic Therapy: Detection by the Hypoxia Marker EF3 [2-(2-Nitroimidazol-1[***H***]-yl)-***N***-(3,3,3-trifluoropropyl)acetamide] **Cancer Research,** v. 60, p. 2636, 2000.

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

CARLOS, R. M.; FERRO, A. A.; SILVA, A. S.; GOMES, M. G.; FORD, P. C.; FRANCO, D. W. Phochemistry reactions of trans-$[Ru(NH_3)_4L(NO)]^{3+}$ complexes. **Inorganica Chimica Acta.** v. 357, p.1381, 2004.

CASTANO A. P.; DEMIDOVA T. N.; HAMBLIN M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 1, 2005.

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.

CLARISSE, C.; RIOU, M.T. Synthesis and characterization of some lanthanide phthalocyanines. **Inorganica Chimica Acta,** v. 130**,** p. 139, 1987.

CEVC G.; BLUME G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochimica et Biophysica** *Acta,* v. 1104, p. 226, 1992.

CEVC G.; SCHATZLEIN A.; RICHARDSEN H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica & Biophysica Acta.** v. 1564 , p. 21, 2002.

CEVC, G., Lipid Vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 657, 2004.

CEVC, G.; VIERL, U**.** Nanotechnology and the transdermal route. Review article, **Journal of Controlled Release,** v. 141, p. 277, 2010.

CROSBY, G. A.; DEMAS, J. N. Quantum efficiencies on transition metal complexes. II. Charge-transfer luminescence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2841, 1971.

DEMAS, J. N. Photophisycal pathways in metal complexes. **Journal of Chemical Education,** v. 60, p. 803, 1983.

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. 2643, 2005.

de LIMA, R. G. ; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; BENDHACK, L. M.; DA SILVA, R. S. Influence of Ancillary Ligand L in the Nitric Oxide Photo-Release by the $[Ru(L)(tpy)NO]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359 p. 2543, 2006.

de LIMA, R. G.; TEDESCO, A. C.; da SILVA R. S.; LAWRENCE, M. J. . Development of ultradeformable liposome entrapped with nitrosyl ruthenium complex for PDT application. **Nitric Oxide-Biology Chemistry**, v. 19. p. S67, 2008.

de ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B.; Photodynamic Therapy of Skin Cancers: Sensitizers, Clinical Studies and Future Directives. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 1447, 2000.

deROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet Oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 351, 2002.

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

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

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

DOUGHERTY, T. J.; HENDERSON, B. W.; GOMER, C. J.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy (review). **Journal of the National Cancer Institute,** v. 90, p. 889, 1998.

EL MAGHARABY, G. M. M.; WILLIAMS, A.C. Skin delivery of 5-fluouracil from ultradeformable and standard liposomes *in vitro. Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1069, 2001.

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

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

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

FRESNADILLO, D. G.; GEORGIADOU, Y.; ORELLANA, G.; BRAUN, A. M., OLIVEROS, E.; **Helvetica Chimica Acta**, p.1222 , 2004.

GAITANI, C. M. ; LUNARDI, C. N.; OLIVEIRA, F. S.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide- Biology and Chemistry,** v. 20, p. 195, 2009.

GROBOSCH, M.; SCHMIDT, C.; NABER, W. J. M.; VAN DER WIEL, W. G.; KNUPFER, M. A photoemission study of interfaces between organic semiconductors and Co as well as Al_2O_3/Co contacts. **Synthetic Metals,** v.160, p. 238, 2010.

GORELSKY, S. I.; DA SILVA, S.C.; LEVER A.B.P, FRANCO, D. W. Electronic spectra of *trans*-$[Ru(NH_3)_4(L)NO]^{3+/2+}$ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 300, p. 698, 2000.

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

HALLE M, GABRIELSEN A, PAULSSON-BERNE G, GAHM C, AGARDH HE, 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.

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

HERAI, H.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. F. V. Iontophoretic delivery of doxorubicin effects of concentration and pH. **Proceedings of the International Symposium of controlled Release of Bioactive Materiais**. v. 31, p. 324, 2004.

HEROLD, S.; PUPPO, A. Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules. **Journal of Biological** *Inorganic Chemistry,* v. 10, p. 935, 2005.

HIRUTA, Y.; HATTORI, Y.; KAWANO, K.; OBATA Y.; MAITANI, Y. Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin. **Journal of the** *Controlled Release,* v. 113, p. 146, 2006.

HONEYWELL-NGUYEN P.L.; BOUWSTRA J.A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 67, 2005.

HUNTER, R. J. **Zeta Potencial in Colloid Science. Principles and Applications.** Academic Press, 1981.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3. ed. rev. Rio de Janeiro: **INCA**, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil).Coordenação de prevenção e vigilância de câncer. Estimativa 2008- Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro-**INCA,** 2007.

ISAGO; H.; KAGAYA; Y.; MATSUSHITA A. Solvatochromic Shift of Phthalocyanine Q-band Governed by a Single Solvent Parameter. **Chemistry Letters**, v. 33, p. 862, 2004.

ISSA, M. C. A; MANELA-AZULAY, M. Terapia Fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85 p. 4 2010.

JOSEFSEN L.B. AND BOYLE, R.W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? **British Journal of Pharmacology**, v. **154**, p. 1, 2008.

KREMER, J. M. H., VAN DER ESKER, M. W. J., PATHMANOHARAN, C., WIERSEMA, P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. **Biochemistry**, v. 16, p. 3932, 1977.

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

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

KUBLER, A. C. Photodynamic Therapy. **Medical Laser Application**, v. 20, p. 37, 2005.

KUDO, S.; BOURASSA, J. L.; BOGGS, S. E. SATO, Y.; FORD, P. C. *In situ* nitric oxide (NO) measurement by modified eletrocdes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 193, 1997.

KULKAMP, I. C., PAESE, K., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Quimica Nova,** v. 32, p. 2078, 2009.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes**. Trends in Biotechnology**, v.16, p. 307, 1998.

LAUGEL, C.; CHAMINADE, P.; BAILLET, A.; SEILLER, M.; FERRIER, D. Moisturizing substance entrapped in w/o/ w emulsion: analitycal methodology for formulation, stability and release studies. **Journal of Controlled Release**, v. 38, p. 59, 1996.

LEEUW, J.; VIJLDER, H. C.; BJERRING, P.; NEUMANN, H. A. M. Liposomes in dermatology today. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology,** v. 23, p. 505, 2009.

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

LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 311, 2001.

LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; SALOMON, D.; van den BERGH, H.; LANGE, N.; GUY, R. H. Enhanced delivery of 5-Aminolevulinic Acid Esters by iontophoresis *in vitro*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, p. 304, 2003a.

LOPEZ, R . Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, v. 88, p. 65, 2003b.

LOPEZ, R. F. V. ; LANGE, N. ; GUY, R. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic Therapy of Skin Cancer: Controlled Drug Delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 77, 2004.

MACDONALD, I.J.; DOUGHERTY, T.J. Basic principles of photodynamic therapy **Journal Porphyryns Phthalocyanines,** *v.* 5, p. 105, 2001.

MACHADO, C; MACHADO, V. G. An easy and versatile experiment to demonstrate solvent polarity using solvatochromic dyes**.** *Journal* **of Chemical** *Education*, v. 78, p. 649, 2001.

MARCHESI, M. S. P.; BERTOLINI, W. L. H. M.; CICILLINI, S. A.; BONAVENTURA, D.; BENDHACK, L. M.; LOPEZ, R. F. V.; da SILVA, R. S. Evaluation of Nitrosyl Ruthenium Complexes Entrapped in an Oil-In-Water Emulsion as Vasodilator Agents. **The Open Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2, p. 121, 2008.

MARANHO, D. S.; de LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; da SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced Nitric Oxide and Singlet Oxygen Release from ZnPC Liposome Vehicle Associated with the Nitrosyl Ruthenium Complex: Synergistic Effects in Photodynamic Therapy Application. **Photochemistry and Photobiology,** v. 85, p. 705, 2009.

MARTIN, P. C., GOUTERMAN, M., PEPICH, B. V., RENZONI, G. E., SCHINDELE, D.C. Effects of ligands, solvent, and variable sulfonation on dimer formation of aluminum and zinc phthalocyaninesulfonates. **Inorganic Chemistry**, v. 30, p. 3305, 1991.

MAREE, M.D., KUZNETSOVA, N., NYOKONG, T. Silicon octaphenoxyphthalocyanines: Photostability and singlet oxygen quantum yields. **Journal of Photochemistry and Photobiology,** v. 140, p. 117, 2001.

MAZIÈRE, J.C.; MORLIÈRE, P.; SANTUS, R. The role of low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of** *Photochemistry* **and** *Photobiology B*: *Biology*, ***v.*** 8, p. 351, 1991.

MCNAUGHT A. D.; WILKINSON, A. **IUPAC. Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

MI, J.; GUO, L.; LIU, Y.; LIU, W.; YOU, G.; QIAN, S. Excited-state dynamics of magnesium phthalocyanine thin film. **Physics Letters A**, v. 310, p. 486, 2003.

MIRANDA K. M., PAOLOCCI N, KATORI T, THOMAS D. D., FORD E, BARTBERGER M. D., ESPEY M. G., KASS D. A., FEELISCH, M., FUKUTO J. M., WINK D. A. A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 9196, 2003.

MOJZISOVA, H.; BONNEAU, S.; MAILLARD, P.; BERG, K.; BRAULT. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, p. 778, 2009.

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

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

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

MÜLLER-GOYMANN, C. C.; MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 139, 2004.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B**, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry**, 6th edn, Wiley, 2009.

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

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

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.

OLIVEIRA, F. S.; FERREIRA, K. Q.; BONAVENTURA, D.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A. C.; MACHADO, S. P. ; TFOUNI, E.; da SILVA, R. S. The Macrocyclic Effect and Vasodilation Response Based on the Photoinduced Nitric Oxide Release from Trans-[RuCl(tetraazamacrocycle)NO]$^{2+}$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, P. 313, 2007.

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

OWENS, J. W.; ROBINS, M. Phthalocyanine photophysics and photosensitizer efficiency on human embryonic lung fibroblasts. **Journal Porphyrins Phthalocyanines**, v. 5, p. 460, 2001.

PANDEY, R.; Long wavelength photosensitizers to chlorins and bacteriochlorin class with amphiphilic properties. **Journal of the Chemistry Society Perkin Transactions**, p.1377, 1992.

PENNACCHIETTI, S.; MICHIELI, P.; GALLUZZO, M.; MAZZONE, M.; GIORDANO, S.; COMOGLIO, P. M. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. **Cancer Cell**, v**.** 3, p.347, 2003.

PERLIS, C.; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **The Oncologist**, v. 9, p. 182, 2004.

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. A. M.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; In vitro studies of cutaneous retentions of magnetic nanoemulsions loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**,v. 320, p. 211, 2008.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. Oxford University. **Metal Nitrosyls.** Press: New York, 1992.

PENNACCHIETTI, S. 2003. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the Met protooncogene. **Cancer Cell**, v. 3, p. 347-361.

PORTER, G. B. Introduction to inorganic photochemistry. **Journal of the Chemical Education**, v. 60, p. 785, 1983.

REDDI, E.; ZHOU, C.; BIOLO, R.; MENEGALDO, E.; JORI, G. Liposome- or LDL-administered Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency, *British Journal of Cancer*, v. 61 , p. 407, 1990.

RIBEIRO J. N., JORGE R. A., FLORES A. V., SILVA A. R., RONCHI L. M. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano**. Eclética Química**, v. 32, p.7, 2007.

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. **Inorganic. Chemistry Communcations**, v. 11, p. 7370, 2008.

SADLER, M. Peripheral Neuropathy with Nucleoside Antiretrovirals: Risk Factors, Incidence and Management. **Drug Safety**, v. 19, p. 6, **1998.**

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

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

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

SCARPA, M. V., OLIVEIRA, A. G., CARDILHO, J. A., WANCZINSKI, B. J., ARNÓBIO, A. S., JÚNIOR, A. A. S. Studies on the controlled drug delivery and drug targenting through liposomes. **Revista Brasileira de Medicina**, p. 238, 1998.

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

SHARMAN, W.M. ALLEN, C.M. VAN, LIER, J.E., Role of activated oxygen species in photodynamic. **Therapy Methods in Enzymology**, v. 319, p. 376, 2000.

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

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 7th ed., John Wiley & Sons, 2005.,

SILVA, S. R. **Assitencia de Enfermagem em Quimioterapia Antineoplasica.** Rio de Janeiro. EPUB, p. 1, 2001.

SOFFIATTI, N.R.T. Consulta de enfermagem em ambulatorio de quimioterapia: enfase nas ações educativas. **Cogitari enfermagem**, v. 5, p. 62, 2000.

SOMASHEKARAPPA, M. P.; KESHAVAYYA, J. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, v. 31, p. 811, 2001.

SPILLER, W.; Kliesch, H.; Wohrele, D.; Hackbarth, S.; Roder, B.; Schnurpfeil. Singlet Oxygen Quantum Yields of different photosensitizers in polar Solvents and Micellar solution**.** **Journal of Porphyrins and Phtalocyanine**. v. 2, p. 145, 1998.

SUPPAN, P. Solvatochromic shifts: the influence of the medium on the energy of electronic states. **Journal of Photochemical and Photobiology A**, v. 50, (1990), p. 293.

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

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. Segunda Edição: Neoplasia, 79. Rio de Janeiro: Editora Manole Ltda, 2002.

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 Carrier 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.

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

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

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

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

TOMA, H. E. ; BONIFACIO, L. S. ; ANAISSI, F. J. From colors to inexistent colors: A reflection on electronic spectra and chromatic effects. **Química Nova**, v. 28, p. 897, 2005.

TOMA H . E.; ALEXIOU A.D.P.; FORMIGA, A. L. B.; NAKAMURA; M.; DOVIDAUSKAS, S.; EBERLIN M. N.; TOMAZELA D. M. A nitric oxide releaser based on the mu-oxo-hexaacetate-bis(4-methylpyridine)trirutheniumnitrosyl. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 2891, 2005.

UENO, L. T.**;** MACHADO, A. E. H.; MACHADO, F. B. C. Theoretical studies of zinc phthalocyanine monomer, dimer and trimer forms. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 899, p.71, 2009.

VIANNA R. F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; RIBEIRO, G.; CARVALHO, F. S.; NETO, A. F.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; COLLETT, J. H. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. *International Journal of* **Pharmaceutics**, v. 167, p. 205, 1998.

VITTAR, N. B. R.; AWRUCH, J.; AZIZUDDIN, K.; RIVAROLA, V. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine**.** *International Journal of Biochemistry* & *Cell Biology***, *v.*** 42, p. 1123, 2010.

WEIDEMANN, M.; HUCKSTADT, H.; HOMBORG, H. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie,** v. 624, p. 846, 1998.

.

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

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

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

WONGSAGONSUP, R., SHOBSNGOB, S., OONKHANOND, B., VARAVINIT, S. Zeta Potencial Analysis for the Determination of protein Content in Rice Flour. **Starch/Starke,** v. 57, 25, 2005.

WU, H;_SONG, Q.; RAN, G.; LU, X.; XU, B. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 133, 2011.

ZAAFARANY, G., M. E. L.; GEHANNE A. S.; AWAD S. M.; MORTADA, D. H. N. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, p. 164, 2010.

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.