

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de nanodispersões de fase líquido-cristalina para a liberação cutânea da associação de complexo nitrosilo de rutênio e protoporfirina IX na terapia fotodinâmica do câncer de pele**

Aline Regina Hellmann Carollo

Ribeirão Preto  
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de nanodispersões de fase líquido-cristalina para a liberação cutânea da associação de complexo nitrosilo de rutênio e protoporfirina IX na terapia fotodinâmica do câncer de pele**

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Aline Regina Hellmann Carollo  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Vitória Lopes Badra Bentley

RIBEIRÃO PRETO – SP  
2011

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

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Carollo, Aline Regina Hellmann

Desenvolvimento de nanodispersões de fase líquido-cristalina para a liberação cutânea da associação de complexo nitrosilo de rutênio e protoporfirina IX na terapia fotodinâmica do câncer de pele. Ribeirão Preto, 2011.  
138 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos  
Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. Complexos nitrosilos de rutênio. 2. Óxido nítrico. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Protoporfirina IX. 5. Nanodispersões de cristal líquido.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Regina Hellmann Carollo.

Desenvolvimento de nanodispersões de fase líquido-cristalina para a liberação cutânea da associação de complexo nitrosilo de rutênio e protoporfirina IX na terapia fotodinâmica do câncer de pele

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Ilze, exemplo de vida pessoal e profissional, pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão e por sempre ter uma palavra de conforto nos momentos de dificuldade.

Ao meu pai, Arno, que mesmo com a distância nunca deixou de se preocupar comigo e me apoiar em minhas decisões.

Ao meu marido e grande amigo Carlos Alexandre, meu eterno Namorado, pelo carinho, por acreditar no meu potencial, pelas discussões científicas e até pelos puxões de orelha! Obrigada por estar comigo em todos os momentos, bons e ruins, mesmo quando estávamos fisicamente tão longe.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Vitória Lopes Badra Bentley, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de trabalho, pela confiança em mim depositada e pelo seu papel fundamental em meu crescimento intelectual e acadêmico.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, por me fornecer o composto utilizado neste trabalho e disponibilizar os equipamentos de seu laboratório e pelas valiosas discussões dos resultados obtidos.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, em especial Denise, Rose e Thais, pelos momentos de descontração e por tornarem a estada aqui muito mais agradável!

Aos meus companheiros de bancada do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial à Fábria, Samantha, Marina, Lívia B., Lívia D. e Dani, pelo carinho, a ajuda e pelas risadas!

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Márcia C. Fantini do Instituto de Física da USP e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela execução das medidas de difração de raios X e auxílio na interpretação dos resultados.

Aos funcionários do laboratório, Henrique e Fabíola, pelo apoio prestado e pela amizade.

Ao Zé Orestes pelas análises de tamanho de partícula.

À técnica Juliana Moraes, do Laboratório de Química Inorgânica, pelo auxílio nos experimentos de liberação de NO e ao técnico Clóvis Júnior pela obtenção do espectro de infravermelho.

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior e à técnica Vanessa Souza, do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, pela quantificação das amostras de rutênio por ICP-MS.

Ao Dr. Daniel Callejon, pelos experimentos de cultura de células, juntamente com seus ajudantes, Maicon, Rogério e Ana Paula. E ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, por nos ceder seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, pelo serviço prestado.

À FAPESP pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos (Processo n<sup>o</sup> 2007/03460-1).

A todos aqueles que, de alguma forma, participaram da execução deste trabalho, tornando possível sua realização.

## RESUMO

CAROLLO, A.R.H. **Desenvolvimento de nanodispersões de fase líquido-cristalina para a liberação cutânea da associação de complexo nitrosilo de rutênio e protoporfirina IX na terapia fotodinâmica do câncer de pele.** 2011. 138 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O óxido nítrico (NO) é um versátil agente biológico, atuando em diversas partes do organismo, tais como cérebro, artérias, sistema imunológico, fígado e pulmões. Sua natureza radicalar lhe confere grande reatividade e versatilidade, tornando o entendimento de sua bioquímica um desafio. A molécula de NO tende a reagir rapidamente com alguns metais de transição, formando compostos estáveis denominados complexos nitrosilos, os quais podem ser utilizados como fonte geradora de óxido nítrico. A liberação de NO a partir de complexos nitrosilos pode ocorrer por redução química, eletroquímica e fotoquímica. No presente trabalho foi estudada a obtenção, caracterização e permeação cutânea de um complexo nitrosilo de rutênio, o *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]Cl<sub>2</sub> (cyclam-NO), que associado ao fotossensibilizador protoporfirina IX, possui a peculiaridade de absorver na região do visível, podendo então ser aplicados na terapia fotodinâmica (TFD) para tratamento de câncer de pele. A mistura dos compostos foi incorporada em nanodispersões de cristais líquidos, de fase cúbica (DFC) e de fase hexagonal (DFH), e sua penetração/permeação *in vitro* em pele de modelo animal foi avaliada, assim como o comportamento fotoquímico do sistema, no que se refere à liberação de NO, visando uma futura aplicação em TFD. A atividade citotóxica dos compostos isolados e em mistura foi avaliada frente às linhagens B16F10 e Melan-A, na ausência e presença de luz, mostrando maior atividade da mistura dos compostos quando irradiados em 630 nm. Foram construídos diagramas de fase binário e ternário e, a partir destes, foram escolhidas as formulações a serem estudadas. Estas formulações foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada e difração de raios-X e foram avaliados o tamanho médio de partícula e o índice de polidispersividade das nanodispersões obtidas e sua estabilidade por turbidimetria. Também foi analisada a liberação de oxigênio singlete e de NO a partir dos compostos em solução e destes incorporados nas formulações. Foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação simultânea dos compostos nos experimentos. A liberação dos compostos a partir das formulações usando membrana de acetato de celulose também foi avaliada, sendo possível detectar apenas o cyclam-NO. O estudo da eficiência de encapsulação mostrou que cerca de 70% da quantidade adicionada dos compostos foi incorporado na DFC e cerca de 80% na DFH. Os experimentos *in vitro* de permeação e retenção dos compostos em pele de orelha de porco mostraram aumento significativo da concentração dos compostos, comparado a controles contendo os mesmos em PEG. A DFH promoveu um aumento na concentração de PpIX no estrato córneo (EC) de 2,6 vezes e na epiderme+derme se EC ([E+D]) de 3,4 vezes, e para o cyclam-NO de 2,7 vezes no EC e 2,4 vezes na [E+D]. Já a DFC aumentou em 1,6 vezes a quantidade de PpIX no EC e 1,9 vezes na [E+D] e em 4,6 vezes a quantidade de cyclam-NO no EC e em 2,0 vezes na [E+D]. Os resultados obtidos permitem sugerir que estes sistemas são adequados para utilização como potenciais carreadores para a associação cyclam-NO e PpIX na TFD do câncer de pele e que esta associação apresentou efeito sinérgico, sendo mais eficiente que a utilização de apenas um dos compostos.

**Palavras-chave:** complexos nitrosilos de rutênio; óxido nítrico; terapia fotodinâmica; protoporfirina IX; nanodispersões de cristal líquido.

## ABSTRACT

CAROLLO, A.R.H. **Development of liquid-crystalline nanodispersions for topical delivery of the association of nitrosyl ruthenium complex and protoporphyrin IX in photodynamic therapy of skin cancer.** 2011. 138 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Nitric oxide (NO) is a versatile biological agent, acting in several parts of the body such as brain, arteries, immune system, liver and lungs. Its radical nature gives great versatility and reactivity, making the understanding of its biochemical a challenge. The NO molecule tends to react quickly with some transition metals, forming stable compounds called nitrosyl complexes, which can be used as a source of nitric oxide. NO release from nitrosyl complexes can occur by chemical, electrochemical or photochemical reduction. In this work, the acquisition, characterization and permeation of a nitrosyl ruthenium complex, *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]Cl<sub>2</sub> (cyclam-NO), which associated with the photosensitizer protoporphyrin IX, has the peculiarity of absorbing in the visible region, and could then be applied in photodynamic therapy (PDT) for treatment of skin cancer, were studied. The mixture of compounds was incorporated into liquid crystal nanodispersions, cubic (DFC) and hexagonal (DFH) phases, and its penetration/permeation *in vitro* in an animal model skin was evaluated, as well as the photochemical behavior of the system, with regard to NO release, seeking a future application in PDT. The cytotoxic activity of the compounds alone and in combination was evaluated against the B16F10 and Melan-A cell lines, in the absence and in the presence of light. Binary and ternary phase diagrams were constructed, and from these, the formulations to be studied were chosen. These formulations were characterized by polarized light microscopy and X-ray diffraction and were evaluated for particle size and polydispersity index of nanodispersions obtained and their stability by turbidimetry. Also, the release of singlet oxygen and NO from the compounds in solution and incorporated in the formulations was discussed. An analytical method using high efficiency liquid chromatography was developed and validated for simultaneous quantification of compounds in the experiments. The release of compounds from formulations using cellulose acetate membrane was evaluated, and only the cyclam-NO could be detect. The study of the encapsulation efficiency showed that about 70% of the added amount of the compounds was incorporated in the DFC and approximately 80% in DFH. *In vitro* permeation and retention experiments of the compounds in pig ear skin were performed, showing a significant increase in the concentration of the compounds in the skin layers, compared to controls containing compounds in polyethylene glycol. The DFH promoted an increase in the concentration of PpIX in the stratum corneum (EC) of 2.6 times and in the epidermis + dermis without EC ([E + D]) of 3.4 times, and the cyclam-NO by 2.7 times for EC and 2.4 times in the [E + D]. DFC already increased by 1.6 times the amount of PpIX in EC and 1.9 times at the [E+D] and 4.6 times the amount of cyclam-NO in EC and 2.0 times in the [E + D]. The results may suggest that these systems are suitable for use as potential carriers for the association of cyclam-NO and PpIX for use in skin cancer PDT and that this association showed a synergistic effect, being more efficient than the use of only one of the compounds.

**Key words:** nitrosyl ruthenium complexes, nitric oxide, photodynamic therapy, protoporphyrin IX; liquid crystal nanodispersions.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura do tegumento (<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>)... 5
- Figura 2** - Rotas de permeação através do estrato córneo (redesenhado de Barry (1987))..... 6
- Figura 3** - Representação esquemática das diferentes fases formadas pela monoleína em presença de água. Adaptado de Qiu & Caffrey (2000)..... 13
- Figura 4** – Estrutura molecular da monoleína..... 14
- Figura 5** – Estrutura do *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]Cl<sub>2</sub>.
- Figura 6** - Esquema da reação de conversão do sal de MTT em formazan, no experimento de cultura de células.
- Figura 7** – Sistema de irradiação com leds de alta potência
- Figura 8** – Sistema de irradiação com leds de alta potência
- Figura 9** - Esquema para análise de liberação de NO das amostras .
- Figura 10**- Representação da reação do DPBF com oxigênio singlete e formação de endoperóxido
- Figura 11** – Filtro Amicon Ultra<sup>®</sup>
- Figura 12** - Célula de Franz modificada (<http://www.permegear.com/cellstand.htm>)
- Figura 13** - Espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, do complexo *trans*-[RuCl(cyclam)NO]Cl<sub>2</sub>.
- Figura 14** - Espectro de absorção do cyclam-NO em MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1 (linha contínua) e em acetonitrila (linha tracejada), na concentração de 2,5 X 10<sup>-4</sup> M .
- Figura 15** - Representação da estrutura da PpIX
- Figura 16** - Liberação de óxido nítrico registrada pelo eletrodo ISO-NO durante irradiação do cyclam-NO na concentração de 10X10<sup>-4</sup> M. (0-200 segundos: sem irradiação; 200-400 segundos: irradiação com filtro na região do vermelho; a partir de 400 segundos: irradiação com luz branca)
- Figura 17** - Liberação de óxido nítrico registrada pelo eletrodo ISO-NO durante irradiação do complexo cyclam-NO misturado ao fotossensibilizador PpIX, na concentração de 10X10<sup>-4</sup> M (irradiação em 660 nm)
- Figura 18** - Placa de cultura tratada com MTT
- Figura 19** - Viabilidade celular de células da linhagem Melan-A após incubação com os fármacos em diferentes concentrações (1, 3 e 10 μM) e irradiação com luz vermelha
- Figura 20** - Viabilidade celular de células da linhagem B16/F10 após incubação com os fármacos em diferentes concentrações (1, 3 e 10 μM) e irradiação com luz vermelha
- Figura 21**- Diagrama de fases binário MO/água. Visualização das misturas MO/água ao microscópio de luz polarizada na temperatura de 25 a 90 °C e aumento de 20 x
- Figura 22**- Diagrama de fase pseudo-ternário MO/AO/água. Visualização das misturas MO/AO/água ao microscópio de luz polarizada na temperatura de 37°C e aumento de 20 x
- Figura 23**- Fotomicrografias obtidas utilizando microscopia de luz polarizada. (A) fase cúbica, formulação composta de MO/água (10/90), obtida a temperatura de 25°

C; (B) fase cúbica passando para hexagonal com o aquecimento a 70° C, formulação composta de MO/água (10/90); (C) fase hexagonal, geometria estriada, formulação composta de MO/AO/água, obtida a temperatura de 25°C; (D) fase hexagonal, placas assimétricas, formulação composta de MO/AO/água, obtida a temperatura de 25°C. Aumento: 10X

**Figura 24** - Diâmetro médio das dispersões de fase cúbica obtidas com monoleínas das marcas Caravan (vermelho) e Kerry (azul).

**Figura 25** - Diâmetro médio das dispersões de fase hexagonal obtidas com monoleínas das marcas Caravan (vermelho) e Kerry (azul).

**Figura 26** – Perfil das imagens obtidas a partir da difração de raios X das dispersões de fase hexagonal

**Figura 27** - Perfis de difração dos raios X resultantes da análise das dispersões de fase hexagonal feitas com as duas monoleínas, A) Kerry, B) Caravan, podendo conter hidroxietil celulose e/ou os fármacos estudados e tampão fosfato ou citrato

**Figura 28** – Representação esquemática da fase H<sub>II</sub> (hexagonal), ilustrando os canais aquosos, circundados pela camada lipídica (Libster et al., 2009)

**Figura 29** - Perfis de difração dos raios X resultantes da análise das dispersões de fase hexagonal contendo NMP obtidas com as monoleínas, A) Kerry, B) Caravan

**Figura 30**- Representação matemática dos três diferentes tipos de estrutura da fase cúbica, respectivamente, Diamante, Giróide e Primitiva: (A) representação da porção lipídica e (B) representação dos canais aquosos (Yang; Armitage; Marder, 2004)

**Figura 31** – Perfil das imagens obtidas a partir da difração de raios X das dispersões de fase cúbica

**Figura 32** – Padrão de difração das nanopartículas de fase cúbica compostas de MO e fase aquosa

**Figura 33** - Perfis de difração dos raios X resultantes da análise das dispersões de fase cúbica obtidas com as monoleínas A) Kerry, B) Caravan, podendo conter HEC e/ou os compostos estudados e tampão fosfato ou citrato

**Figura 34**- Perfis de difração dos raios X resultantes da análise das dispersões de fase hexagonal contendo NMP obtidas com as monoleínas A) Kerry, B) Caravan

**Figura 35** - Análise de tamanho médio (Z) e polidispersividade (PDI) das nanodispersões de fase cúbica (DFC), contendo (CF) ou não (SF) os compostos, por espalhamento dinâmico de luz em função do tempo (0-15 dias). Os resultados são expressos como média ( $n = 5$ )

**Figura 36** - Análise de tamanho médio (Z) e polidispersividade (PDI) das nanodispersões de fase hexagonal (DFH), contendo (CF) ou não (SF) os compostos, por espalhamento dinâmico de luz em função do tempo (0-15 dias). Os resultados são expressos como média ( $n = 5$ ).

**Figura 37**- Análise turbidimétrica das nanodispersões em função do tempo (0-360 horas): Fase hexagonal (DFH) sem os compostos (SF) ou com os compostos (CF). Os resultados são expressos como média ( $n = 3$ )

**Figura 38** - Análise turbidimétrica das nanodispersões em função do tempo (0-360 horas): Fase cúbica (DFC) sem os compostos (SF) ou com os compostos (CF). Os resultados são expressos como média ( $n = 3$ )

**Figura 39** - Liberação de óxido nítrico registrada pelo eletrodo ISO-NO durante irradiação da formulação de fase hexagonal contendo cyclam-NO e PpIX (irradiação com laser em 660 nm).

**Figura 40**- Espectro de absorção do DPBF na presença de (A) apenas PpIX e (B) mistura equimolar de PpIX e cyclam-NO, após diferentes tempos de irradiação com laser de 660 nm

**Figura 41**- Curva de decaimento da absorção do DPBF em 416 nm na presença de soluções de PpIX (quadrados pretos) ou PpIX+cyclam-NO (círculos vermelhos) em função do tempo de irradiação com laser de 660 nm

**Figura 42** - Diagrama de Jablonski modificado, ilustrando os diferentes processos fotofísicos que ocorrem a partir da irradiação de um fotossensibilizador na TFD (redesenhado a partir de Maiya (2000))

**Figura 43**- Curva de decaimento da absorção do DPBF em 416 nm na presença das dispersões de fase cúbica e hexagonal contendo ou não os fármacos, em função do tempo de irradiação com laser de 660 nm

**Figura 44** – Espectro de UV-visível da Protoporfirina IX em acetonitrila, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$

**Figura 45** – Espectro de UV-visível da mistura de PpIX, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , e cyclam-NO, com concentração variando de 1,5 a 16  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 46** – Espectro de fluorescência da PpIX, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$

**Figura 47** – Espectro de fluorescência da mistura de PpIX, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , e cyclam-NO, com concentração variando de 1,5 a 16  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 48** – Gráfico de Stern–Volmer para a diminuição da fluorescência da PpIX (4,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de cyclam-NO, monitorado em  $\lambda$  de excitação/emissão = 400/631 nm

**Figura 49** – Supermolécula que pode estar sendo formada da interação entre PpIX e cyclam-NO

**Figura 50** – Espectro de fluorescência da PpIX em MeOH:H<sub>2</sub>O, pH=3,0, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 51** – Espectro de UV-visível da PpIX em MeOH:H<sub>2</sub>O, pH=3,0, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 52** – Espectro de UV-visível da mistura de PpIX, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , e cyclam-NO, com concentração variando de 1,5 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , em MeOH:H<sub>2</sub>O, pH=3,0.

**Figura 53** – Espectro de fluorescência da mistura de PpIX, na concentração de 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , e cyclam-NO, com concentração variando de 1,5 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , em MeOH:H<sub>2</sub>O, pH=3,0.

**Figura 54** – Cromatograma do cyclam-NO por CLAE-DAD, coluna monolítica, fluxo = 1 mL/minuto, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,003% TFA, variando-se a quantidade de fase móvel B (MeOH) no início da corrida: A= 50% de fase B; B= 15% de fase B e C= 5% de fase B

**Figura 55** – Cromatograma da PpIX por CLAE-DAD, coluna monolítica, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,003% TFA, iniciando com 5% de fase B

**Figura 56** – Cromatograma do cyclam-NO por CLAE-DAD, coluna C18 fase normal, fluxo= 1 mL/min., fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,003% TFA, iniciando com 5% de fase B

**Figura 57** – Cromatograma do cyclam-NO por CLAE-DAD, coluna Phenyl, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,003% TFA, iniciando com 5% de fase B. A= fluxo de 1 mL/min., B= fluxo de 1,2mL/min

**Figura 58** – Cromatograma do cyclam-NO por CLAE-DAD, coluna C-8, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,003% TFA. A= fluxo de 1 mL/min., iniciando com 5% de fase B; B= fluxo de 0,8mL/min, iniciando com 3% de fase B

**Figura 59** – Cromatograma da PpIX por CLAE-DAD, coluna C-8, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,003% TFA, iniciando com 3% de fase B, fluxo de 0,8 mL/min

**Figura 60** – Cromatograma do cyclam-NO por CLAE-DAD, coluna C-18 Gemini

**Figura 61** – Cromatograma do cyclam-NO por CLAE-DAD, coluna Gemini, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,5% TFA, iniciando com 0% de fase móvel B e variando-se o fluxo: A= 1,2 mL/min.; B= 1,0 mL/min.e C= 0,8 mL/min

**Figura 62** – Cromatograma da PpIX por CLAE-DAD, coluna Gemini, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+0,5% TFA, iniciando com 0% de fase B, fluxo de 1,0 mL/min

**Figura 63** – Espectros de UV do cyclam-NO mostrando o deslocamento do pico quando o pH é diminuído de 2,5 (A) para 1,5 (B)

**Figura 64** – Cromatogramas dos fármacos, por CLAE-DAD. Pico correspondente ao cyclam-NO, com tempo de retenção de 4,1 minutos, acompanhado no comprimento de onda de 216 nm (verde) e pico correspondente à PpIX, com tempo de retenção de 13,2 minutos, no comprimento de onda de 400 nm (vermelho).

**Figura 65** – Espectro de UV do cyclam-NO, obtido através do detector de DAD

**Figura 66** – Espectro de UV-visível da PpIX, obtido através do detector de DAD

**Figura 67-** Curva analítica da PpIX em H<sub>2</sub>O+TFA 5%, contendo 20% de NMP.  $\lambda$  absorção = 400 nm. Equação da reta:  $y = 318605x + 55863$ ; coeficiente de correlação linear (R) = 0,9999

**Figura 68-** Curva analítica do cyclam-NO em H<sub>2</sub>O+TFA 5%, contendo 20% de NMP.  $\lambda$  absorção = 216 nm. Equação da reta:  $y = 6216,2x - 1475,2$ ; coeficiente de correlação linear (R) = 0,9999

**Figura 69** – Cromatograma da extração dos fármacos adicionados em pele de porco dermatomizada, por CLAE-DAD. Cyclam-NO, em TR= 4,1 min, acompanhado no comprimento de onda de 216 nm (verde) e PpIX, com TR= 13,2 min, no comprimento de onda de 400 nm (vermelho)

**Figura 70-** Perfil de liberação do cyclam-NO a partir das nanodispersões de fase hexagonal e cúbica

**Figura 71** - Curva analítica do Ru a partir de amostras de cyclam-NO, por ICP-MS. Equação da reta:  $y = 0,1345x - 0,6073$ ; coeficiente de correlação linear: (r) = 0,9980

**Figura 72** - Espectros de emissão da PpIX (2  $\mu$ g/mL) em NMP-H<sub>2</sub>O-TFA (20:76:4).  $\lambda$ excitação = 414 nm/  $\lambda$  emissão = 606; Fenda = 5/5

**Figura 73** – Curva analítica da PpIX em NMP-H<sub>2</sub>O-TFA (20:76:4).  $\lambda$ excitação = 414 nm/  $\lambda$  emissão = 606 nm; Fenda = 5/5. Equação da reta:  $y = 426,98x + 10,855$ ; coeficiente de correlação linear:  $(r) = 0,998$

**Figura 74-** Penetração cutânea in vitro do cyclam-NO a partir da DFH (A) e da DFC (B) e dos respectivos controles contendo a mesma concentração dos compostos, em PEG

**Figura 75** - Penetração cutânea in vitro do cyclam-NO nas camadas da pele: (A) EC; (B) [E+D] sem EC; comparado aos respectivos controles contendo a mesma concentração dos compostos, em PEG

**Figura 76-** Penetração cutânea in vitro da PpIX a partir da DFH (A) e da DFC (B) e dos respectivos controles contendo a mesma concentração dos compostos, em PEG

**Figura 77** - Penetração cutânea in vitro da PpIX nas camadas da pele: (A) EC; (B) [E+D] sem EC; comparado aos respectivos controles contendo a mesma concentração dos compostos, em PEG

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Solubilidade aproximada em  $\mu\text{g/mL}$  do cyclam-NO e da PpIX em diferentes solventes:

**Tabela 2** - Diâmetro médio das partículas das dispersões de fase cúbica e hexagonal contendo ou não a mistura dos compostos, feitas utilizando-se a MO da marca Kerry:

**Tabela 3** – Composição das diferentes dispersões, parâmetros de rede e FWHM das estruturas líquido-cristalinas obtidas utilizando-se a MO da marca Kerry

**Tabela 4** – Composição das diferentes dispersões, parâmetros de rede e FWHM das estruturas líquido-cristalinas obtidas utilizando-se a MO da marca Caravan

**Tabela 5** – Composição das diferentes dispersões, parâmetros de rede e FWHM das estruturas líquido-cristalinas obtidas quando se adicionou NMP às formulações

**Tabela 6-** Indexação das estruturas de fase cúbica e hexagonal de acordo com os índices de Miller (Lindblom; Rilfors, 1989)

**Tabela 7** – Composição das diferentes dispersões, parâmetros de rede, FWHM e razões entre os picos das estruturas líquido-cristalinas obtidas utilizando-se a monoleína da marca Kerry

**Tabela 8** – Composição das diferentes dispersões, parâmetros de rede, FWHM e razões entre os picos das estruturas líquido-cristalinas obtidas utilizando-se a monoleína da marca Caravan:

**Tabela 9** – Composição das diferentes dispersões, parâmetros de rede, FWHM e razões entre os picos das estruturas líquido-cristalinas obtidas quando se adicionou NMP às formulações:

**Tabela 10** – Variação no tamanho e na polidispersividade (Pdl) entre o período de 1 e 15 dias de avaliação, para as nanodispersões de fase hexagonal (DFH) e cúbica (DFC), com e sem os compostos, mantidas à temperatura ambiente (25°C)

**Tabela 11**- Teste de repetibilidade da PpIX e do cyclam-NO:

**Tabela 12**- Teste de precisão intermediária da PpIX e do cyclam-NO:

**Tabela 13**- Teste de exatidão da PpIX e do cyclam-NO

**Tabela 14** - Eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanodispersões, obtida por ultracentrifugação

**Tabela 15** - Avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio para a PpIX

**Tabela 16** - Avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio para a PpIX

**Tabela 17**- Percentagem de recuperação do cyclam-NO de amostras de pele

**Tabela 18**- Recuperação da PpIX de amostras de pele

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[E+D] – epiderme+derme

$^1\text{O}_2$  – oxigênio singlete

AO – ácido oléico

CCP – cloreto de cetil piridíneo

CLAE – cromatografia líquida de alta pressão

CV – controle de viabilidade

Cyclam-NO - *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]Cl<sub>2</sub>

DAD – detector por arranjo de diodos  
 DFC – dispersão de fase cúbica  
 DFH – dispersão de fase hexagonal  
 DMSO – dimetil sulfóxido  
 DPBF – 1,3-difenil-isobenzofurano  
 EC – estrato córneo  
 EE – eficiência de encapsulação  
 HEC – hidroxietilcelulose  
 ICP-MS – espectrometria de massas com plasma indutivo acoplado  
 LED – diodo emissor de luz  
 LOD – limite de detecção  
 LOQ – limite de quantificação  
 MeOH – metanol  
 MO – monoleína  
 MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)  
 NMP – N-metil-pirrolidona  
 NO – óxido nítrico  
 Pdl – índice de polidispersividade  
 PpIX – protoporfirina IX  
 SBF – soro bovino fetal  
 TFA – ácido trifluoroacético  
 TFD – terapia fotodinâmica  
 UV-vis – ultravioleta-visível  
 CCB – carcinoma de células basais  
 CCE – carcinoma de células escamosas

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b><i>i</i></b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b><i>ii</i></b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b><i>iii</i></b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b><i>vii</i></b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b><i>viii</i></b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b><i>ix</i></b>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Pele</b> .....	<b>4</b>

<b>1.2. Absorção cutânea de fármacos</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Câncer de pele</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Terapia fotodinâmica aplicada a tecidos neoplásicos</b>	<b>8</b>
<b>1.5. O óxido nítrico</b>	<b>8</b>
<b>1.6. Aplicações farmacêuticas de complexos metálicos</b>	<b>10</b>
<b>1.7. Complexos nitrosilos de rutênio</b>	<b>10</b>
<b>1.8. A protoporfirina IX</b>	<b>11</b>
<b>1.9. Nanodispersões de fase líquido cristalinas</b>	<b>12</b>

## **2- Objetivos**

### **2.1. Objetivos específicos**

## **3. Material e métodos**

### **3.1. Material**

3.1.1 Solventes, reagentes e matérias-primas:

3.1.2 Equipamentos e acessórios:

3.1.3- Pele

### **3.2. Métodos**

3.2.1. Síntese e caracterização do complexo nitrosilo de rutênio

3.2.2. Estudos *in vitro* em cultura de células

3.2.3. Construção de diagramas de fases binário e ternário

3.2.4. Caracterização por microscopia de luz polarizada dos sistemas obtidos nos diagramas de fases

3.2.5. Obtenção e caracterização de dispersões de fases líquido-cristalinas

3.2.6. Determinação da liberação de NO a partir dos compostos nas formulações

3.2.7. Determinação de liberação de  $^1\text{O}_2$  a partir dos compostos em solução e das formulações

3.2.8. Metodologia para quantificação dos fármacos por CLAE

3.2.9. Determinação da eficiência de encapsulação

3.2.10. Estudos *in vitro* de liberação dos compostos a partir das formulações

3.2.11. Quantificação por espectrofluorimetria e ICP-MS.

3.2.12. Avaliação da recuperação do Cyclam-NO e da PpIX extraídos de amostras de pele

3.2.13. Estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Síntese e caracterização do complexo nitrosilo de rutênio**



4.1.1. Síntese do composto *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]Cl<sub>2</sub> (cyclam-NO)

4.1.2. Avaliação da geração fotoquímica de NO a partir do complexo nitrosilo de rutênio

4.1.3. Avaliação do coeficiente de solubilidade dos compostos nos diferentes solventes

#### **4.2. Experimento em cultura de célula**

#### **4.3. Construção de diagramas de fases binário e pseudo-ternário**

#### **4.4. Caracterização dos sistemas**

4.4.1. Caracterização por microscopia de luz polarizada dos sistemas obtidos nos diagramas de fase binário e pseudo-ternário

#### **4.5. Obtenção e caracterização das dispersões de fase hexagonal e cúbica**

4.5.1. Caracterização e estabilidade dos sistemas após a dispersão .

#### **4.6. Liberação de NO a partir da formulação**

#### **4.7. Determinação de liberação de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a partir dos fármacos em solução e das formulações**

#### **4.8. Análise da interação entre os compostos**

#### **4.9. Testes com diferentes colunas cromatográficas para quantificação dos fármacos \_**

#### **4.10 Validação da metodologia analítica para quantificação dos fármacos**

#### **4.11. Determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas dispersões de cristais líquidos**

#### **4.12. Liberação**

#### **4.13. Quantificação por espectrofluorimetria e ICP-MS**

4.13.1. ICP-MS

4.13.2. Espectrofluorimetria

#### **4.14. Recuperação do cyclam-NO e da PpIX de amostras de [E+D] e EC**

#### **4.15. Estudo *in vitro* de permeação/retenção cutâneas dos compostos**

4.15.1. Estudo *in vitro* de permeação/retenção cutâneas do cyclam-NO .

4.15.2. Estudo *in vitro* de permeação/retenção cutâneas da PpIX

<b>5. Conclusões .....</b>	<b>17</b>
<b>6- Referências Bibliográficas* .....</b>	<b>20</b>



## **1- Introdução**

A radiação solar, especialmente a UVB, é reconhecidamente carcinogênica para o homem e constitui a principal causa do aparecimento de neoplasmas cutâneos (Green et al., 1999; Woodhead; Setlow; Tanaka, 1999).

Embora o câncer de pele seja o tipo de câncer mais freqüente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, quando detectado precocemente apresenta altos percentuais de cura. Como a pele é um órgão heterogêneo, esse tipo de câncer pode apresentar neoplasias de diferentes linhagens. Os mais freqüentes são o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide, também chamados de câncer de pele não melanoma. O câncer de pele com origem nos melanócitos é denominado de câncer de pele melanoma, e, embora seja o menos freqüente, é o tipo mais grave da doença, devido a sua alta probabilidade de metástase (Inca, 2010).

Um tratamento seletivo e não-invasivo, a Terapia Fotodinâmica (TFD), tem sido introduzido clinicamente, tanto para a visualização do tumor (fotodeteção), como para a destruição local de tumores malignos e lesões pré-malignas. A TFD pode ser utilizada na pele e em outros órgãos que possam ser alcançados pela luz.

A TFD consiste basicamente na administração intratumoral, sistêmica ou tópica de agentes fotossensibilizadores, que se acumulam no tecido tumoral. Aplica-se, então, luz em um comprimento de onda adequado, levando à necrose do tecido tumoral.

A TFD precisa de três elementos para seu sucesso: um agente fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular. A maior parte dos trabalhos desenvolvidos, tanto experimental como clinicamente, tem como objetivo garantir a existência de fotossensibilizador e de luz em quantidades suficientes no tecido alvo no momento do tratamento. Embora a TFD seja absolutamente dependente da presença de oxigênio, o controle de seus níveis é muito difícil (Van Den Akker, 2003). Assim, a procura por novos compostos capazes de liberar outras espécies reativas, como o óxido nítrico (NO), para uso na TFD, tem aumentado nos últimos anos.

Entre os efeitos benéficos relacionados para o NO estão a destruição de muitos agentes patógenos e de células tumorais (Nathan; Hibbs, 1991; Nathan, 1992). Polte e cols (1997) demonstraram que o NO também exerce efeito citoprotetor, mantendo a integridade da parede vascular, indicativo do potencial efeito anti-inflamatório e anti-aterogênico.

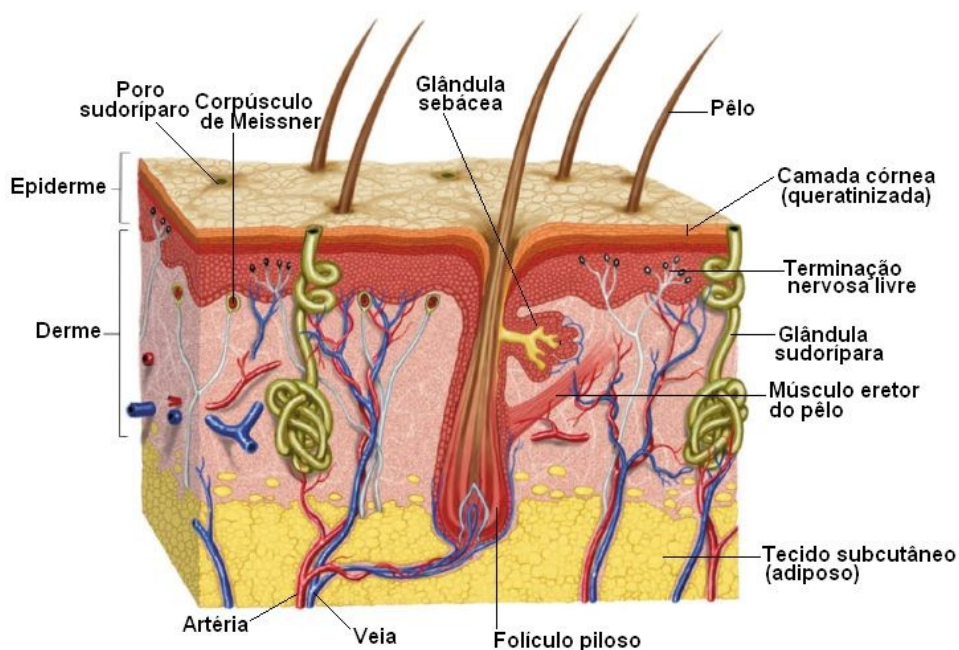
O uso concomitante de compostos liberadores de NO e fotossensibilizadores foi relatado por alguns autores (Cicillini et al., 2009; Maranhão et al., 2009), com resultados preliminares em culturas de células muito satisfatórios.

Assim, o desenvolvimento de formulações que melhorem a penetração tópica e transdérmica do fármaco no tecido alvo e a utilização de compostos capazes de liberar novas espécies reativas além do oxigênio singlete, constituem estratégias interessantes para a otimização da TFD tópica do câncer de pele.

## 1.1. Pele

A pele constitui uma via potencial de aplicação de fármacos devido a seu fácil acesso e sua grande superfície. Representa o órgão mais extenso do corpo, cobrindo uma superfície de aproximadamente  $1,73\text{m}^2$  sendo irrigada por 1/3 do sangue, além de corresponder a 5% do peso corporal (Barry, 1983; Chien, 1992).

A pele é composta principalmente de duas partes: a face externa, que corresponde à epiderme, e a face interna, à derme (Figura 1). A derme possui espessura média de 2 a 4 mm, sendo constituída de uma matriz de proteínas fibrosas imersas num tecido coloidal amorfo. Apresenta-se rica em capilares sanguíneos, canais linfáticos e terminações nervosas, além de conter os segmentos inferiores das glândulas sebáceas e folículos pilosos. A epiderme tem uma estrutura multilamelar, que representa os diferentes estágios de diferenciação celular. A epiderme viável é subdividida em quatro partes: estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso e estrato germinativo e contém queratinócitos em vários estágios de diferenciação, assim como melanócitos, células de Langerhans (importantes no reconhecimento de antígenos e resposta imune) e células de Merkel (envolvidas na percepção sensorial) (Asbill; Michniak, 2000). Subindo a partir da camada basal proliferativa para a camada mais externa, as células mudam de uma forma ordenada, de células metabolicamente ativas e que se multiplicam para células densas, mortas funcionalmente e queratinizadas, isto é, corneócitos. Estas últimas células são envolvidas por bicamadas lipídicas multilamelares e constituem a camada mais externa da epiderme, de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , chamada estrato córneo (EC) (Barry, 1983)



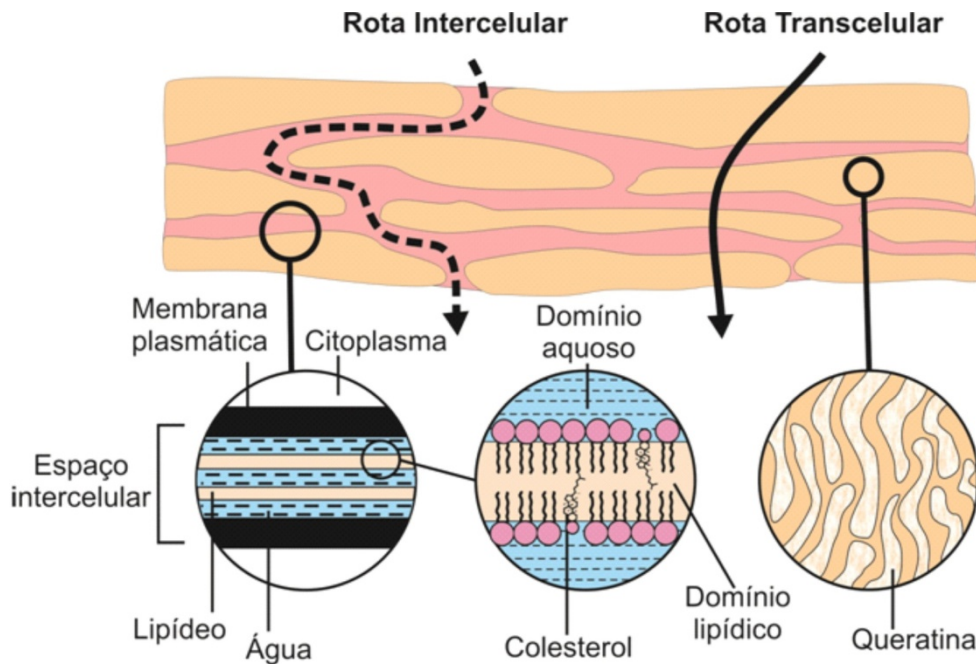
**Figura 1** - Estrutura do tegumento (<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>)

A pele serve como uma barreira física e química, protegendo o organismo da invasão de microorganismos, da perda de água e da radiação solar, além de ser responsável pelo tato, pela regulação da temperatura corporal e pela produção de vitamina D. Consequentemente, a pele, em particular, a camada córnea, forma uma barreira efetiva para a permeação de fármacos (Asbill; Michniak, 2000). Uma simples demonstração disto ocorre quando a camada mais externa é retirada com fita adesiva: a permeabilidade para água e outros compostos aumenta drasticamente (Scheuplein; Blank, 1971). As propriedades de barreira são baseadas na composição dos lipídeos do EC e, em particular, no excepcional arranjo estrutural da matriz lipídica intercelular e no envelope lipídico que envolve as células (Potts; Francoeur, 1991). Os lipídeos intercelulares são principalmente ceramidas, colesterol e seus ésteres, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol (Grubauer et al., 1989).

## 1.2. Absorção cutânea de fármacos

As rotas de permeação de fármacos através da pele incluem a difusão através do estrato córneo e através dos apêndices da pele, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Entretanto, estes apêndices ocupam apenas 0,1% do total da superfície de pele humana e sua contribuição para a permeação é muito pequena

(Moser et al., 2001). Dois caminhos podem ser identificados através do EC: um caminho intercelular, onde o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica, e outro transcelular, passando através dos corneócitos (Figura 2) (Abraham; Chadha; Mitchell, 1995).



**Figura 2** - Rotas de permeação através do estrato córneo (redesenhado de Barry (1987))

Devido às propriedades de barreira, poucos fármacos estão aptos a difundir passivamente através do EC. Assim, a liberação de fármacos a partir da maioria das formulações tópicas é complexa e afetada por muitas variáveis, como suas propriedades cinéticas (p.e., difusão e permeabilidade) e termodinâmicas (p.e., solubilidade e partição) (Ghosh; Pfister, 1997; Moser et al., 2001). As estratégias para aumentar a permeação cutânea incluem tanto métodos químicos, como promotores de absorção e novos sistemas de veículos, quanto métodos físicos, como iontoforese, sonoforese e eletroporação (Bronaugh; Maibach, 1999).

### 1.3. Câncer de pele

Os tumores cutâneos malignos não-pigmentados, representados principalmente por dois tipos de alteração do epitélio, o carcinoma de células basais (CCB) e o carcinoma de células escamosas (CCE), representam a mais comum e



grave dentre as neoplasias, ocorrendo principalmente em populações de pele branca (Grossman; Leffell, 1997; Bastiaens et al., 1998). A incidência deste tipo de câncer tem aumentado muito nos últimos anos e sua principal causa é atribuída à radiação solar, especialmente a radiação UVB, que é reconhecidamente carcinogênica para o homem (Green et al., 1999).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde, anualmente são registrados de 90 a 100 mil novos casos de câncer de pele no Brasil, predominantemente CCB e CCE. Para o ano de 2010, o número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimados foi de 53.410 casos em homens e de 60.440 em mulheres, de acordo com as Estimativas de Incidência de Câncer publicadas pelo INCA. Estes valores correspondem a um risco estimado de 56 casos novos a cada 100 mil homens e 61 para cada 100 mil mulheres (Inca, 2010).

Vários fatores podem ser citados para este tipo de câncer de pele, entre eles: fatores fenotípicos, tais como cor da pele, do cabelo e dos olhos, a tendência a se queimar ou bronzear, a presença de sardas e histórico familiar de câncer de pele (Cummings; Tripp; Herrmann, 1997); exposição ocupacional ao sol; e exposição à radiação ultravioleta, radiação ionizante ou ao arsênico (Gottlober et al., 1999; Baron; Greenberg, 2000). Dentre estes fatores, a exposição acumulativa ao sol é, provavelmente, o mais importante para o desenvolvimento do câncer, embora a predisposição genética seja igualmente destacada.

O tratamento convencional dos tumores malignos não pigmentados é feito através de cirurgia, aplicação de laser, eletrodissecação, criocirurgia, quimioterapia tópica (5-fluoracil e podofilina) e radioterapia. Estas terapias podem apresentar taxa de recorrência de 5 a 10% e normalmente deixam cicatrizes e/ou hipo ou hiperpigmentação, além de efeitos colaterais como dor, inflamação grave e irritação, que podem permanecer durante semanas (Wagnieres et al., 1998; De Rosa; Bentley, 2000). Assim, é necessário o desenvolvimento de formas de tratamento mais eficientes, menos destrutivas e que apresentem resultados estéticos melhores, especialmente em pacientes imunodeficientes e naqueles com várias lesões (Peng et al., 1995; Stender; Wulf, 1996; Szeimies et al., 1996; Wennberg et al., 1996; Zeitouni; Shieh; Oseroff, 2001).

## 1.4. Terapia fotodinâmica aplicada a tecidos neoplásicos

A TFD é uma modalidade médica de terapia de neoplasias que emprega uma combinação de luz e fármaco a fim de se obter um efeito citotóxico ou um efeito modificador ao câncer ou qualquer outro tecido indesejável (Dougherty et al., 1978; Dougherty, 1984; 1995). Assim, um fármaco fotossensibilizante e de baixa toxicidade é administrado ao organismo. Quando este se acumula nos tecidos lesados, uma dose de luz regulada na faixa de 600 a 850 nm (janela terapêutica) é incidida sobre o tecido lesado, ativando o fármaco e induzindo sua ação tóxica.

Sucintamente, a base da TFD consiste nos processos fotofísicos dos fotossensibilizadores presentes nos tecidos celulares. Após absorverem luz, ocorre a produção de espécies reativas excitadas que, na presença de oxigênio, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), definidas como EROs. Estas espécies atacam centros específicos, como lipídeos, proteínas e DNA, e desencadeiam a morte de tecidos por necrose ou apoptose celular.

Em vários centros de pesquisa, 80% dos estudos sobre TFD são baseados na utilização do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) como espécie reativa (De Rosa; Crutchley, 2002). No entanto, o tratamento usando TFD não obtém sucesso em neoplasias de grande porte, devido à característica hipóxica destas lesões (Robertson; Evans; Abrahamse, 2009). Esforços têm sido feitos para superar este problema, com a hiperoxigenação dos tecidos, utilizando câmara hiperbárica (Chen et al., 2002) ou o uso de irradiação com luz fracionada, alternando períodos de claro e escuro (Curnow; Haller; Bown, 2000). Entre essas tentativas, é grande a procura por outras espécies úteis, como radicais livres derivados dos fotossensibilizadores utilizados, bem como outras espécies radicalares independentes de oxigênio. Uma possibilidade é utilizar compostos que liberem fotoquimicamente NO, conhecido por ser um agente anti-tumoral (Gomes et al., 2008; Maksimovic-Ivanic et al., 2009; De Araujo et al., 2010). O NO, além de possuir uma natureza radicalar, reage com o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) presente no meio e forma  $\text{ONOO}^-$ , e  $\text{N}_2\text{O}_3$ , que são chamados de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs).

## 1.5. O óxido nítrico

O óxido nítrico (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. Ela possui ação na regulação da pressão sanguínea, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (Culotta; Koshland, 1992; Stamler; Singel; Loscalzo, 1992; Feldman, Paul L.; Griffith, Owen W.; Stuehr, Dennis J., 1993; Ainscough; Brodie, 1995; Wink, David A. et al., 1996; Ignarro, 2000; Richter-Addo; Legzdins; Burstyn, 2002).

A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro biológico. Nessa função, não depende de transportadores específicos nem de canais de passagem intracelulares. Ela 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, Paul L.; Griffith, Owen W.; Stuehr, Dennis J., 1993). Atribui-se a riqueza da bioquímica do óxido nítrico à diversidade de suas espécies, ou seja, a espécie  $\text{NO}^+$  (íon nitrosônio), que é formada pela retirada do elétron desemparelhado no orbital  $\pi^*$ , e a espécie  $\text{NO}^-$  (ânion nitróxido), que é formada pela adição de um elétron ao orbital.

Green e colaboradores (1981), pesquisando a toxicologia de nitroaminas, demonstraram que óxidos de nitrogênio eram produzidos em quantidade significativa pelo metabolismo de mamíferos e que sua concentração aumentava em condições inflamatórias. Heck e colaboradores, em 1992, descobriram evidências de que o NO é produzido endogenamente pelas células da pele humana. Cals-Grierson e Ormerod (2004) viram que o NO possui papel vital na resposta da pele a certos estímulos externos como calor, irradiação ultravioleta, infecção e cicatrização.

Observou-se que o NO possui efeito tumoricida quando no meio celular existe uma elevada concentração de NO (Ignarro, 2000). Esta atividade do NO inclui inibição da proliferação de células tumorais, da promoção e da diferenciação celular.

Baseando-se nos fatos de que a deficiência de NO pode acarretar várias disfunções e de que em altas doses o NO possui ação antitumoral, o uso de compostos doadores de NO em tratamentos clínicos parece bastante promissor. Dentre estes compostos, os complexos metálicos são peculiares por serem bastante estáveis e susceptíveis à ação de certos estímulos, como luz e redução eletroquímica, que podem promover a liberação de NO de forma controlada.

## 1.6. Aplicações farmacêuticas de complexos metálicos

Diversos complexos metálicos são utilizados para fins farmacológicos, entre eles, os compostos de platina, utilizados no tratamento de câncer, assim como os compostos de ouro no tratamento de artrite reumatóide, os de prata usados como agentes antimicrobianos e os de mercúrio utilizados como diuréticos (Berners-Price; Sadler, 1996; Bakhtiar; Ochiai, 1999; Allardyce; Dyson, 2001). O nitroprussiato de sódio ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) possui o ligante NO e é utilizado como vasodilatador no controle da pressão arterial (Szczepura; Takeuchi, 1990; Moncada; Palmer; Higgs, 1991; Stochel et al., 1998). Porém, esse composto possui a desvantagem de ter reações secundárias indesejadas, como a liberação de  $\text{CN}^-$ .

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. Uma vez que 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).

Lembrando que a toxicidade do metal também está relacionada com o seu estado de oxidação, pode-se afirmar que outro fator da baixa toxicidade do rutênio é sua habilidade de atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico. Provavelmente, isto ocorra devido às reações redox causadas pela enzima citocromo oxidase, ou pela glutadiona ou pelo ascorbato (Allardyce; Dyson, 2001). As características de complexos nitrosilos de rutênio tornam esses compostos propícios para a busca de novas substâncias que funcionem como agentes liberadores de NO.

## 1.7. Complexos nitrosilos de rutênio

A procura de métodos capazes de liberar óxido nítrico nos organismos a partir de complexos nitrosilos de rutênio é bastante intensa. Uma maneira é submeter estes complexos a um estímulo eletroquímico, que pode provocar a liberação do

ligante nitrosil. Fundamentado nisto, alguns pesquisadores estudaram a ação biológica de vários tipos de complexos nitrosilos de rutênio hidrossolúveis (Wieraszkowski et al., 2001; Marcondes et al., 2002).

Outra estratégia é utilizar compostos que sejam termicamente estáveis e fotoquimicamente ativos, ou seja, liberam NO quando submetidos a algum tipo de indução fotoquímica. Visando esta perspectiva, Ford e colaboradores (1998) sintetizaram e estudaram compostos do tipo  $[\text{Ru}(\text{P})(\text{ONO})(\text{NO})]$ , onde P é um anel porfirínico e mais recentemente compostos do tipo  $[\text{RuCl}(\text{salen})(\text{NO})]$ , onde o ligante salen é um derivado do diânion N, N'-bis(salicilidina)etilenodiamina (Works; Ford, 2000; Works; Jocher; Ford, 2001). Da mesma forma, foi constatada a liberação de NO em meio aquoso a partir de complexos do tipo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)_n$ , onde bpy é 2, 2'-bipiridina e L é Cl<sup>-</sup>, 4-pic (4-picolina), py e 4-acpy (4-acetilpiridina) (Togniolo; Da Silva; Tedesco, 2001; Sauaia et al., 2003).

Para aumentar a possibilidade da utilização destes complexos como agentes terapêuticos, é preciso conhecer mais sobre seu comportamento em sistemas biológicos, como a interação de complexos nitrosilos de rutênio com a pele, sua reatividade e o controle da liberação de NO por processo fotoquímico. Esta fotorreatividade pode prover um novo agente terapêutico para utilização clínica na Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer de pele.

## 1.8. A protoporfirina IX

O fotossensibilizador ideal deve possuir algumas propriedades: pureza química, seletividade para tecidos tumorais, rápido acúmulo no tecido tumoral e rápido *clearance*, estabilidade química e física, ativação pela luz, boa penetração tecidual, alto coeficiente de absorção e ser atóxico na ausência de luz (Lopez et al., 2004; Nowis et al., 2005). Até o momento, nenhum destes agentes apresentou todas estas características. Uma revisão sobre os diversos fotossensibilizadores existentes e seus prováveis mecanismos de ação foi apresentada por De Rosa & Bentley (2000).

Os fotossensibilizadores mais amplamente estudados são as porfirinas, que foram identificadas há 150 anos. Uma de suas qualidades é a toxicidade mínima na ausência de luz e a falta de interações farmacológicas com outros fármacos, fazendo

da TFD um procedimento seguro em tratamentos oncológicos combinados (Nowis et al., 2005). No entanto, estas têm a desvantagem de fotossensibilizar a pele por um período prolongado (Dougherty; Cooper; Mang, 1990), expondo os pacientes a riscos de reações fototóxicas acidentais durante o tratamento.

A hematoporfirina e seu derivado purificado, a porfirina sódica, quando utilizadas sistemicamente, possuem o inconveniente da fotossensibilização prolongada da pele. Além disso, sua utilização tópica não é indicada, pois ambas são moléculas de alta massa molecular, que dificilmente penetram na pele, reduzindo assim a eficácia do tratamento (Kennedy; Pottier; Pross, 1990).

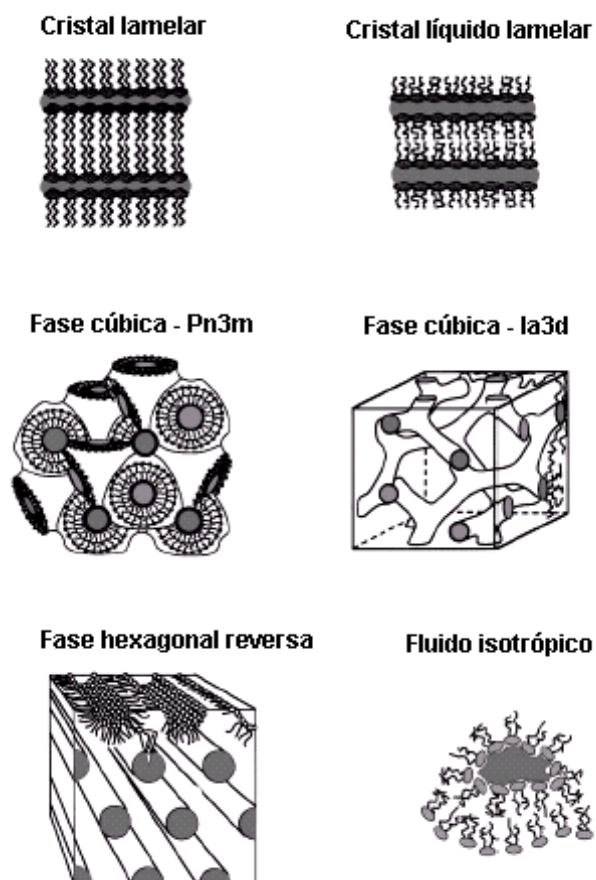
A PpIX, considerada um fotossensibilizador endógeno por ser induzida endogenamente pelo 5-ALA, pode ser usada na TFD para destruir células tumorais, com efeitos colaterais reduzidos se comparado aos fotossensibilizadores exógenos, devido a sua rápida degradação em tecidos normais, levando a um curto período de sensibilização (Kennedy; Pottier; Pross, 1990). Além disso, a PpIX possui um caráter anfifílico, o que permite uma melhor penetração cutânea, quando comparado a moléculas hidrofílicas e carregadas, sendo que o emprego de sistemas de liberação para a sua veiculação tópica garantiria a sua eficácia na TFD do câncer de pele.

## **1.9. Nanodispersões de fase líquido cristalinas**

Atualmente, vários trabalhos relatam que alguns sistemas lipídicos são capazes de alterar a solubilidade e/ou a difusibilidade de fármacos através do estrato córneo. Mais especificamente, estes sistemas lipídicos, também conhecidos como sistemas líquidos cristalinos, possuem a capacidade de atuar através das três vias que envolvem a permeação de fármaco através da pele, ou seja, modificando a interação pele-fármaco-veículo (Shah; Sadhale; Chilukuri, 2001).

Lipídeos polares anfifílicos como os fosfolipídeos, quando colocados em água, formam espontaneamente bicamadas lipídicas termodinamicamente estáveis, as quais podem assumir várias estruturas e formas geométricas (Engstrom; Norden; Nyquist, 1999; Shah; Sadhale; Chilukuri, 2001). Esta reorganização pode resultar em estruturas tridimensionais, como bicamadas lipídicas formando uma fase micelar reversa ( $L_2$ ) e três tipos de fases lipídicas cristalinas (lamelar, hexagonal reversa e cúbica) dependendo da temperatura e da quantidade de água do sistema (Figura 3).

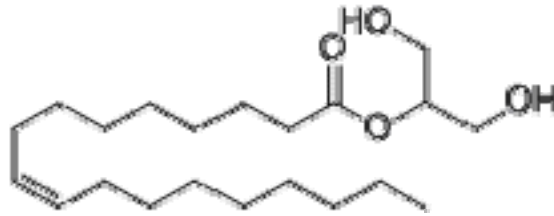
A fase lamelar ( $L_{\alpha}$ ) consiste em uma disposição linear alternando bicamadas lipídicas e canais de água. A fase hexagonal reversa ( $H_{II}$ ) consiste em hastes infinitas de água dispostas em redes entrelaçadas bidimensionalmente e separadas por bicamadas lipídicas. A fase cúbica é usualmente observada entre a fase lamelar e a hexagonal reversa. As estruturas destas fases são semelhantes a membranas biológicas, sendo uma propriedade das fases cúbica e hexagonal reversa que estas coexistem em equilíbrio com excesso de água (Engstrom; Norden; Nyquist, 1999; Sato; Ueno; Yano, 1999; Shah; Sadhale; Chilukuri, 2001; Ferreira et al., 2006).



**Figura 3** - Representação esquemática das diferentes fases formadas pela monoleína em presença de água. Adaptado de Qiu & Caffrey (2000)

A monoleína (MO), ou monooleato de glicerila, é um monoglicerídeo composto por uma mistura de glicerídeos do ácido oléico e outros ácidos graxos. É um material atóxico, biodegradável e biocompatível, e está incluso no Guia de Ingredientes Inativos do FDA (*Food and Drug Administration*) (Ganem-Quintanar; Quintanar-Guerrero; Buri, 2000). Vários trabalhos têm demonstrado que a MO forma sistemas líquidos cristalinos estáveis quando colocada em meio aquoso, dependendo da

composição, temperatura e condições de agitação dos sistemas (Engstrom; Norden; Nyquist, 1999; Ganem-Quintanar; Quintanar-Guerrero; Buri, 2000; Shah; Sadhale; Chilukuri, 2001).



**Figura 4** – Estrutura molecular da monoleína

No sentido de atuar como um sistema de liberação, as fases cúbica e hexagonal podem dissolver ou dispersar fármacos de diversas polaridades, de baixas a altas concentrações. O fator limitante da incorporação está no fato de que o fármaco não pode romper a formação da estrutura cristalina (He; Craig, 1999; Caboi et al., 2001b; Murgia; Caboi; Monduzzi, 2001).

De modo geral, a preparação de dispersões de fase cúbica ou hexagonal de dimensões nanométricas depende da composição da mistura de MO/tensoativo/água, além das condições de agitação, como sonicação ou microfluidização, e alta temperatura (Um et al., 2003). Entretanto, muitos fármacos não suportam alta temperatura e pressão, e desse modo são desestabilizados durante o processo. Para solucionar problemas relacionados ao processo de preparação, Kim e colaboradores (2000) desenvolveram um tipo de formulação precursora que pode ser dispersa em água através de simples agitação em temperatura ambiente. Esta formulação precursora compreende um sistema de MO, tensoativo, solvente e fármaco, e também é capaz de produzir partículas coloidais, as quais são altamente eficazes na encapsulação de fármacos. É sabido que o processo de preparação determina o tipo de partícula produzida, mesmo se uma mistura idêntica é usada como ponto de partida (Gustafsson et al., 1999; Geil et al., 2000; Siekmann et al., 2002). Além disso, se uma fase cúbica constituída de MO, tensoativo e água é sonicada ao invés de ser microfluidizada, partículas pequenas podem ser formadas inicialmente, e somente determinada proporção destas partículas poderão formar, lentamente, partículas de dimensões coloidais (Borne; Nylander; Khan, 2003; Um et al., 2003).



Uma vez que algumas fases líquido cristalinas são estáveis em excesso de água e podem ser dispersas em soluções apropriadas contendo tensoativos, dispersões coloidais de dimensões nanométricas de estruturas destas fases têm sido propostas como sistemas de liberação parenteral sustentada, especialmente para peptídeos e proteínas (Bojrup et al., 1996; Sheikh et al., 1999). Assume-se que as redes com estrutura coloidal são preservadas em nanopartículas, e desse modo, as características vantajosas da fase cúbica são mantidas, além de reduzir a alta viscosidade da mesma, que pode ser indesejada em alguns casos devido à lenta liberação de fármacos (Engstrom; Norden; Nyquist, 1999; Ganem-Quintanar; Quintanar-Guerrero; Buri, 2000; Shah; Sathale; Chilukuri, 2001).

Diversos métodos podem ser utilizados para caracterizar fases líquido-cristalinas, sendo a difração de raios X uma das mais utilizadas. A difração é um fenômeno de interferência causado por um objeto no caminho de ondas eletromagnéticas. A difração ocorre quando as dimensões deste objeto são comparáveis ao comprimento de onda da radiação. Os raios X têm comprimento de onda comparável ao espaçamento entre grupamentos formadores dos cristais, por isso a técnica pode ser utilizada para identificação de fases líquido-cristalinas (Atkins, 1998). Um feixe de raios X incide sobre um conjunto de planos cristalinos, cuja distância interplanar é  $d$ . O ângulo de incidência é  $\theta$ . Os feixes refletidos por dois planos subseqüentes apresentarão o fenômeno da difração. Isto é, se a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimentos de onda, haverá superposição construtiva (um feixe de raios X será observado); caso contrário, haverá superposição destrutiva, ou seja, não se observará qualquer sinal de raios X. A difração ocorre por reflexões em sucessivos planos do cristal. Para haver reflexão, as ondas devem estar em fase, ou seja, sua interferência deve ser construtiva. Quando a diferença de caminho ótico entre dois feixes é igual a um número inteiro de comprimentos de onda, isto significa que as ondas estão “em fase”, ou dito de outra forma, os máximos e mínimos de uma onda coincidem com os máximos e mínimos da outra. Esta condição é descrita pela lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta,$$

onde  $n$  é um número inteiro,  $\lambda$  é o comprimento de ondas da radiação,  $d$  é a distância interplanar e  $\theta$  é o ângulo de reflexão.

A análise dos ângulos de reflexão obtidos pela técnica permite obter informações sobre a dimensão do conjunto de planos responsável pela reflexão e sobre a estrutura do sistema.

Considerando-se o exposto e que as funções no organismo relacionadas ao NO são definidas por sua localização e cinética de liberação, a sua aplicação tópica, no local de ação necessário para seu uso no tratamento do câncer de pele, pode evitar o aparecimento de possíveis efeitos colaterais. Como o composto nitrosilo doador de NO, *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]Cl<sub>2</sub> (cyclam-NO), não absorve luz na região do visível, propôs-se neste trabalho a utilização concomitante deste com o fotossensibilizador PpIX, baseado na premissa de que ocorre uma transferência eletrônica fotoinduzida entre os compostos (Da Silva et al., 2007), possibilitando a excitação do cyclam-NO e consequente liberação do NO, quando a mistura é irradiada no comprimento de onda de máxima absorção da PpIX. Assim, estuda-se a possibilidade de um efeito sinérgico entre a liberação de NO no meio, conhecido agente antitumoral, e a TFD empregando a PpIX como agente fotossensibilizador. Uma vez que o alto peso molecular dos compostos em questão e a presença de carga residual no cyclam-NO dificultam sua penetração passiva através da pele, uma estratégia interessante foi a incorporação dos compostos em sistemas de liberação, capazes de aumentar a penetração cutânea dos compostos.

## **5. Conclusões**

Os resultados obtidos nos permitiram concluir que:

- ✓ A síntese do complexo proposto teve rendimento satisfatório, sendo possível confirmar a presença da banda relativa ao NO por espectroscopia de infravermelho;
- ✓ Foi possível visualizar a liberação de NO pela mistura equimolar de cyclam-NO e PpIX em solução quando estes foram irradiados com laser em 660 nm, sugerindo um efeito de transferência eletrônica fotoinduzida;
- ✓ Experimentos com cultura de células B16F10 e Melan-A mostraram que a mistura dos compostos, quando submetida à irradiação, foi mais eficaz na morte celular do que os compostos isoladamente, sugerindo um efeito sinérgico dos compostos quando usados concomitantemente;
- ✓ Os diagramas de fase binário e pseudo-ternário permitiram a escolha dos sistemas mais adequados para a incorporação dos compostos. Os sistemas escolhidos foram: DFC – MO/NMP/fase aquosa 10/6,7/83,3, sendo a fase aquosa composta de tampão contendo 1,0% de poloxamer; DFH – MO/AO/NMP/fase aquosa 8/2/5,3/84,7, sendo a fase aquosa composta de tampão contendo 1,5% de poloxamer;
- ✓ Através da microscopia de luz polarizada e da difração de raios X foi possível a caracterização dos géis e das nanodispersões, respectivamente, como sendo de fase cúbica e hexagonal. Com o uso da microscopia também foi possível observar a manutenção dos sistemas durante um período de 90 dias. A manutenção dos sistemas após a adição dos compostos e de adjuvantes (HEC, NMP) foi visualizada por difração de raios-X;
- ✓ A MO da marca Kerry permitiu a obtenção de partículas de tamanho menor e menor Pdl, por este motivo foi escolhida para ser utilizada no trabalho;
- ✓ O acompanhamento do tamanho médio das partículas e do Pdl demonstrou que para as DFH, não houve aumento significativo de nenhum dos parâmetros durante o tempo estudado. Já para as DFC, o sistema sem adição dos compostos se mostrou mais estável, sem aumento de Z e Pdl, enquanto a formulação contendo os compostos teve aumento de ambos os parâmetros;
- ✓ Quando as formulações foram testadas quanto à liberação de NO, foi possível ver pequena alteração na corrente do sensor ISO-NO, no entanto, este aumento é pequeno devido à liberação controlada dos compostos proporcionada pelas formulações;

- ✓ Foi possível visualizar a liberação de oxigênio singlete utilizando-se um teste específico, com DPBF, quando a PpIX ou a mistura dos compostos em solução foi irradiado com laser em 660 nm. A liberação foi mais pronunciada quando a mistura dos compostos foi utilizada, sugerindo um aumento no tempo de  $\frac{1}{2}$  vida no estado triplete da PpIX, que pode estar ocorrendo pela formação de uma supermolécula pela reação entre os compostos. Também foi possível detectar a liberação de  $^1\text{O}_2$  a partir das formulações contendo a mistura dos compostos;
- ✓ A análise da interação entre os compostos quando em meio de acetonitrila mostrou que esta ocorre e que obedece a uma relação de Stern-Volmer, o que condiz com os resultados obtidos no experimento com DPBF;
- ✓ Foi possível o desenvolvimento de uma metodologia analítica por CLAE para a quantificação simultânea (na mesma corrida) da PpIX e do cyclam-NO. Este método foi validado, apresentando valores de precisão, exatidão e linearidade compatíveis com os estabelecidos pela ANVISA. No entanto, esta metodologia não se mostrou adequada para a quantificação de amostras provenientes dos experimentos de permeação e retenção cutâneos, por sua baixa sensibilidade. Assim, nova metodologia foi desenvolvida para quantificação do cyclam-NO por ICP-MS e da PpIX por espectrofluorimetria;
- ✓ A eficiência de encapsulação dos compostos nas formulações pode ser considerada boa, com valores superiores a 68% para a PpIX e a 75% para o cyclam-NO;
- ✓ Nos estudos *in vitro* de liberação dos compostos através de membrana de acetato de celulose só foi possível quantificar o cyclam-NO, mostrando que há uma liberação lenta dos compostos quando veiculados nas nanodispersões em comparação com o controle PEG, atuando como sistemas de liberação controlada;
- ✓ Os experimentos de recuperação dos compostos da pele apresentaram bons resultados, com eficiência de recuperação superior a 90% para ambos;
- ✓ Nos experimentos de permeação/retenção cutânea *in vitro*, a utilização das nanodispersões contendo os compostos levou a um aumento na concentração dos compostos nas camadas da pele, em comparação com os controles em PEG, o que permite sugerir as nanodispersões de fase líquido cristalina com potenciais carreadores para a associação cyclam-NO e PpIX na TFD do câncer de pele.

## **6- Referências Bibliográficas\***

\* As Referências Bibliográficas estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ABRAHAM, M. H.; CHADHA, H. S.; MITCHELL, R. C. The factors that influence skin penetration of solutes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 8-16, 1995.

AI, X.; CAFFREY, M. Membrane protein crystallization in lipidic mesophases: Detergent effects. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 1, p. 394-405, 2000.

AINSCOUGH, E. W.; BRODIE, A. M. Nitric-Oxide - Some Old and New Perspectives. **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 8, p. 686-692, 1995.

ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; NARDIN, G.; ATTIA, W. M.; CALLIGARIS, M.; SAVA, G.; ZORZET, S. Cis-Dihalotetrakis(Dimethyl Sulfoxide)Ruthenium(II) and Trans-Dihalotetrakis(Dimethyl Sulfoxide)Ruthenium(II) Complexes ( $RuX_2(DMSO)_4$ , X = Cl, Br) - Synthesis, Structure, and Antitumor-Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 23, p. 4099-4106, 1988.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Met. Rev.**, v. 45, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 62-69, 2001.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of nutraceuticals into reverse hexagonal mesophases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 33, p. 10171-10180, 2008.

AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; BEN SHOSHAN, E.; DANINO, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 3637-3645, 2007.

ANGGARD, E. Nitric-Oxide - Mediator, Murderer, and Medicine. **Lancet**, v. 343, n. 8907, p. 1199-1206, 1994.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília. 899 2003.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000.

ATKINS, P. W. Diffraction techniques. In: ATKINS, P. W. (Ed.). **Physical chemistry**: Oxford University Press, 1998. p.p. 619-646.

BAKHTIAR, R.; OCHIAI, E. I. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, v. 32, n. 5, p. 525-540, 1999.

BARON, J. A.; GREENBERG, E. R. Prevention of nonmelanoma skin cancer. **Archives of Dermatology**, v. 136, n. 2, p. 245-246, 2000.

BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. 1. New York: Marcel Dekker, 1983. 480.

\_\_\_\_\_. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, n. 1, p. 85-97, 1987.

BASTIAENS, M. T.; HOEFNAGEL, J. J.; BRUIJN, J. A.; WESTENDORP, R. G. J.; VERMEER, B. J.; BAVINCK, J. N. B. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinomas indicate different types of tumors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 6, p. 880-884, 1998.

BATISTA, A. A.; CORDEIRO, L. A. C.; OLIVA, G.; NASCIMENTO, O. R. Ru(II) complexes with the ligand 1,2-cis(diphenylphosphino)ethylene: Chemical and electrochemical synthesis, characterization and X-ray structure. **Inorganica Chimica Acta**, v. 258, n. 2, p. 131-137, 1997.

BERNERS-PRICE, S. J.; SADLER, P. J. Coordination chemistry of metallodrugs: Insights into biological speciation from NMR spectroscopy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 151, p. 1-40, 1996.

BOJRUP, M.; QI, Z.; BJÖRKMAN, S.; ÖSTRAAT, Ö.; LANDIN, B.; LJUSBERG-WAHREN, H.; EKBERG, H. Bioavailability of cyclosporine in rats after intragastric administration: a comparative study of the L2-phase and two other lipid-based vehicles. **Transplant Immunology**, v. 4, n. 4, p. 313-317, 1996.

BORNE, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Phase behavior and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid. **Langmuir**, v. 17, n. 25, p. 7742-7751, 2001.

\_\_\_\_\_. Vesicle formation and other structures in aqueous dispersions of monoolein and sodium oleate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 257, n. 2, p. 310-320, 2003.

BOURRE, L.; ROUSSET, N.; THIBAUT, S.; ELEOUET, S.; LAJAT, Y.; PATRICE, T. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. **Apoptosis**, v. 7, n. 3, p. 221-230, 2002.

BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology, Third Edition, Revised and Expanded.** [In: **Drugs Pharm. Sci.**, 1999; 97]. Dekker, 1999. 955 pp.

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

CABOI, F.; AMICO, G. S.; PITZALIS, P.; MONDUZZI, M.; NYLANDER, T.; LARSSON, K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behavior. **Chem. Phys. Lipids**, v. 109, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 47-62, 2001a.

\_\_\_\_\_. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behavior. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 109, n. 1, p. 47-62, 2001b.



CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 179-193, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 1, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 279-293, 2005.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.

CHEN, Q.; HUANG, Z.; CHEN, H.; SHAPIRO, H.; BECKERS, J.; HETZEL, F. W. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 197-203, 2002.

CHIEN, Y. W. **Novel drug delivery systems**. 2. New York: Marcel Dekker, 1992. 797.

CICILLINI, S. A.; PRAZIAS, A. C. L.; TEDESCO, A. C.; SERRA, O. A.; DA SILVA, R. S. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, n. 13, p. 2766-2770, 2009.

CULOTTA, E.; KOSHLAND, D. E. No News Is Good-News. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1862-1865, 1992.

CUMMINGS, S. R.; TRIPP, M. K.; HERRMANN, N. B. Approaches to the prevention and control of skin cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 16, n. 3-4, p. 309-327, 1997.

CURNOW, A.; HALLER, J. C.; BOWN, S. G. Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon - Comparison of continuous and fractionated light regimes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 58, n. 2-3, p. 149-155, 2000.

DA SILVA, R. S.; MARCHESI, M. S. P.; KHIN, C.; LUNARDI, C. N.; BENDHACK, L. M.; FORD, P. C. Photoinduced electron transfer between the cationic complexes Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>pz(2+) and trans-RuCl([15]aneN(4))NO<sub>2</sub><sup>+</sup> mediated by phosphate ion: Visible light generation of nitric oxide for biological targets. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 24, p. 6962-6968, 2007.

DE ARAUJO, M. P.; GOLFETO, C. C.; VON POELHSITZ, G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; LOPES, L. G. L.; MOREIRA, I. S.; BATISTA, A. A. Synthesis, characterization and cytotoxic activities of the [RuCl(2)(NO)(dppp)(L)]PF(6) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 5, p. 489-495, 2010.

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

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

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

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy (Pdt) of Malignant-Tumors. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83-116, 1984.

\_\_\_\_\_. Photodynamic Therapy .2. Foreword. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 11, n. 5, p. 333-334, 1995.

DOUGHERTY, T. J.; COOPER, M. T.; MANG, T. S. Cutaneous Phototoxic Occurrences in Patients Receiving Photofrin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 10, n. 5, p. 485-488, 1990.

DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors. **Cancer Research**, v. 38, n. 8, p. 2628-2635, 1978.

EICH, R. F.; LI, T. S.; LEMON, D. D.; DOHERTY, D. H.; CURRY, S. R.; AITKEN, J. F.; MATHEWS, A. J.; JOHNSON, K. A.; SMITH, R. D.; PHILLIPS, G. N.; OLSON, J. S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. **Biochemistry**, v. 35, n. 22, p. 6976-6983, 1996.

ENGSTROM, S.; NORDEN, T. P.; NYQUIST, H. Cubic phases for studies of drug partition into lipid bilayers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 4, p. 243-254, 1999.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. The Surprising Life of Nitric-Oxide. **Chemical & Engineering News**, v. 71, n. 51, p. 26-38, 1993.

\_\_\_\_\_. The surprising life of nitric oxide. **Chem. Eng. News**, v. 71, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 26-38, 1993.

FERREIRA, D. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM investigation of phase behaviour and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, n. 1-2, p. 203-212, 2006.

FORD, P. C.; BOURASSA, J.; MIRANDA, K.; LEE, B.; LORKOVIC, I.; BOGGS, S.; KUDO, S.; LAVERMAN, L. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 171, p. 185-202, 1998.

FRITSCH, C.; BATZ, J.; BOLSEN, K.; SCHULTE, K. W.; ZUMDICK, M.; RUZICKA, T.; GOERZ, G. Ex vivo application of delta-aminolevulinic acid induces high and specific porphyrin levels in human skin tumors: Possible basis for selective photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, n. 1, p. 114-118, 1997.

GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; BURI, P. Monoolein: A review of the pharmaceutical applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 8, p. 809-820, 2000.

GEIL, B.; FEIWEIER, T.; POSPIECH, E. M.; EISENBLATTER, J.; FUJARA, F.; WINTER, R. Relating structure and translational dynamics in aqueous dispersions of monoolein. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, n. 2, p. 115-126, 2000.

GERRITSEN, M. J. P.; SMITS, T.; KLEINPENNING, M. M.; VAN DE KERKHOF, P. C. M.; VAN ERP, P. E. J. Pretreatment to Enhance Protoporphyrin IX Accumulation in Photodynamic Therapy. **Dermatology**, v. 218, n. 3, p. 193-202, 2009.

GHOSH, T. K.; PFISTER, W. R. **Transdermal and Topical Drug Delivery Systems**. Interpharm Press, Inc., 1997. 713 pp.

GOMES, A. J.; BARBOUGLI, P. A.; ESPREAFICO, E. M.; TFOUNI, E. trans-[Ru(NO)(NH<sub>3</sub>)(4)(py)](BF<sub>4</sub>)(3)center dot H<sub>2</sub>O encapsulated in PLGA microparticles for delivery of nitric oxide to B16-F10 cells: Cytotoxicity and phototoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 757-766, 2008.

GOTTLOBER, P.; KRAHN, G.; BEZOLD, G.; PETER, R. U. Basal cell carcinomas occurring after accidental exposure to ionizing radiation. **British Journal of Dermatology**, v. 141, n. 2, p. 383-385, 1999.

GREEN, A.; WHITEMAN, D.; FROST, C.; BATTISTUTTA, D. Sun exposure, skin cancers and related skin conditions. **J Epidemiol**, v. 9, n. Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine., p. S7-13, 1999.

GREEN, L. C.; DELUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate Biosynthesis in Man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GROESSL, M.; HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J.; KEPPLER, B. K. CZE-ICP-MS as a tool for studying the hydrolysis of ruthenium anticancer drug candidates and their reactivity towards the DNA model compound dGMP. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 5-6, p. 1060-1065, 2008.

GROSSMAN, D.; LEFFELL, D. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer - New understanding. **Archives of Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 1263-1270, 1997.

GRUBAUER, G.; FEINGOLD, K. R.; HARRIS, R. M.; ELIAS, P. M. Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. **Journal of Lipid**

**Research**, v. 30, n. 1, p. 89-96, 1989.

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Cubic Lipid-Water Phase Dispersed into Submicron Particles. **Langmuir**, v. 12, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 4611-4613, 1996.

\_\_\_\_\_. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by a nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, v. 13, n. 26, p. 6964-6971, 1997.

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERGWAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Cubic lipid-water phase dispersed into submicron particles. **Langmuir**, v. 12, n. 20, p. 4611-4613, 1996.

GUSTAFSSON, J.; NYLANDER, T.; ALMGREN, M.; LJUSBERG-WAHREN, H. Phase behavior and aggregate structure in aqueous mixtures of sodium cholate and glycerol monooleate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 211, n. 2, p. 326-335, 1999.

HADDAD, R.; KAPLAN, O.; GREENBERG, R.; SIEGAL, A.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Photodynamic therapy of murine colon cancer and melanoma using systemic aminolevulinic acid as a photosensitizer. **Int J Surg Investig**, v. 2, n. Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine., p. 171-8, 2000.

HE, R. R.; CRAIG, D. Q. M. Characterization of the effects of drug addition on the structure of glyceryl monoolein water gel systems using low frequency dielectric spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 6, p. 635-639, 1999.

IGNARRO, L. J. **Nitric oxide: Biology and Pathobiology**. Academic, 2000. 1003 pp.

INCA. Estimativa 2010 de incidência de câncer no Brasil. 2010. Acesso em: acessado em: 22 de novembro de 2010.

JUZENAS, P.; JUZENIENE, A.; STAKLAND, S.; IANI, V.; MOAN, J. Photosensitizing effect of protoporphyrin IX in pigmented melanoma of mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 297, n. 3, p. 468-472, 2002.

KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILAND, R.; EDITORS. **The Porphyrin Handbook: Volume 17 / Phthalocyanines: Properties and Materials**. Academic Press, 2003. 289 pp.

KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic Therapy with Endogenous Protoporphyrin .9. Basic Principles and Present Clinical-Experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 6, n. 1-2, p. 143-148, 1990.

KIM, J. S.; CHUNG, H.; SOHN, Y. T.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Drug formulations that form a dispersed cubic phase when mixed with water. The International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 2000. Paris, France.

KIM, S. H.; HAIMOVICH-CASPI, L.; OMER, L.; YU, C. M.; TALMON, Y.; WANG, N. H. L.; FRANCES, E. I. Stability and state of aggregation of aqueous fibrinogen and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid vesicles. **Langmuir**, v. 23, n. 10, p. 5657-5664, 2007.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric-Oxide as a Signal in Blood-Vessels. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 399-402, 1992.

KRAMMER, B.; UBERRIEGLER, K. In-vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 36, n. 2, p. 121-126, 1996.

KUDO, S.; BOURASSA, J. L.; BOGGS, S. E.; SATO, Y.; FORD, P. C. In situ nitric oxide (NO) measurement by modified electrodes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes. **Analytical Biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 193-202, 1997.

LANG, D. R.; DAVIS, J. A.; LOPES, L. G. F.; FERRO, A. A.; VASCONCELLOS, L. C. G.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; WIERASZKO, A.; CLARKE, M. J. A controlled NO-releasing compound: Synthesis, molecular structure, spectroscopy, electrochemistry, and chemical reactivity of R,R,S,S-trans-[RuCl(NO)(cyclam)](2+)(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane). **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2294-2300, 2000.

LEE, J.; KELLAWAY, I. W. Combined effect of oleic acid and polyethylene glycol 200 on buccal permeation of [D-Ala(2), D-Leu(5)]enkephalin from a cubic phase of glyceryl monooleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 204, n. 1-2, p. 137-144, 2000.

LIBSTER, D.; BEN ISHAI, P.; ASERIN, A.; SHOHAM, G.; GARTI, N. Molecular interactions in reverse hexagonal mesophase in the presence of Cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 115-126, 2009.

LINDBLOM, G.; RILFORS, L. Cubic Phases and Isotropic Structures Formed by Membrane-Lipids - Possible Biological Relevance. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 988, n. 2, p. 221-256, 1989.

LOPEZ, R. F. V.; LANGE, N.; GUY, R.; 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, n. 1, p. 77-94, 2004.

LOWENSTEIN, C. J.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann. Intern. Med.**, v. 120, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 227-37, 1994.

MAIYA, B. G. Photodynamic therapy (PDT) - basic principles. **Resonance**, v. 5, n. 4, p. 6-18, 2000.

MAKSIMOVIC-IVANIC, D.; MIJATOVIC, S.; MILJKOVIC, D.; HARHAJI-TRAJKOVIC, L.; TIMOTIJEVIC, G.; MOJIC, M.; DABIDEEN, D.; CHENG, K. F.; MCCUBREY, J.

A.; MANGANO, K.; AL-ABED, Y.; LIBRA, M.; GAROTTA, G.; STOSIC-GRUJICIC, S.; NICOLETTI, F. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 1169-1178, 2009.

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, n. 3, p. 705-713, 2009.

MARCONDES, F. G.; FERRO, A. A.; SOUZA-TORSONI, A.; SUMITANI, M.; CLARKE, M. J.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; KRIEGER, M. H. In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. **Life Sciences**, v. 70, n. 23, p. 2735-2752, 2002.

MERKEL, P. B.; KEARNS, D. R. Comment Regarding Rate Constant for Reaction between 1,3-Diphenylisobenzofuran and Singlet Oxygen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 2, p. 462-463, 1975.

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

MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standardisation by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. **Analyst**, v. 125, n. 9, p. 1629-1632, 2000.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine., p. 55-63, 1983.

MURGIA, S.; CABOI, F.; MONDUZZI, M. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system II - C-13 NMR relaxation study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 110, n. 1, p. 11-17, 2001.

NAKANO, M.; TESHIGAWARA, T.; SUGITA, A.; LEESAJAKUL, W.; TANIGUCHI, A.; KAMO, T.; MATSUOKA, H.; HANDA, T. Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/Pluronic F127 system. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9283-9288, 2002.

NATHAN, C. Nitric-Oxide as a Secretory Product of Mammalian-Cells. **Faseb Journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of Nitric-Oxide Synthesis in Macrophage Antimicrobial Activity. **Current Opinion in Immunology**, v. 3, n. 1, p. 65-70, 1991.

NIELSEN, C. B. **The development of efficient two-photon singlet oxygen sensitizers**. 2005. 266 pp. (PhD). Department of Chemistry, University of Aarhus, Denmark.

NOVAK, E. M.; METZGER, M.; CHAMMAS, R.; DA COSTA, M.; DANTAS, K.; MANABE, C.; PIRES, J.; DE OLIVEIRA, A. C.; BYDLOWSKI, S. P. Downregulation of TNF-alpha and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. **Gene Therapy**, v. 10, n. 23, p. 1992-1997, 2003.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

OLIVEIRA, A. S.; LICSandRU, D.; BOScENCu, R.; SOCOTEANU, R.; NACEA, V.; FERREIRA, L. F. V. A Singlet Oxygen Photogeneration and Luminescence Study of Unsymmetrically Substituted Mesoporphyrinic Compounds. **International Journal of Photoenergy**, p. -, 2009.

PENG, Q. A.; WARLOE, T.; MOAN, J.; HEYERDAHL, H.; STEEN, H. B.; NESLAND, J. M.; GIERCKSKY, K. E. Distribution of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Porphyrins in Noduloulcerative Basal-Cell Carcinoma. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, n. 5, p. 906-913, 1995.

PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R.; GRANCHI, D.; LUCIA. Cell culture methods for testing Biocompatibility. **Clinical Materials**, v. 15, n. 3, p. 173-180, 1994.

POLEC-PAWLAK, K.; ABRAMSKI, J. K.; SEMENOVA, O.; HARTINGER, C. G.; TIMERBAEV, A. R.; KEPPLER, B. K.; JAROSZ, M. Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins. **Electrophoresis**, v. 27, n. 5-6, p. 1128-1135, 2006.

POLTE, T.; OBERLE, S.; SCHRODER, H. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha mediated cytotoxicity: Possible involvement of cyclic GMP. **Febs Letters**, v. 409, n. 1, p. 46-48, 1997.

PORTUGAL, R. J.; MARLETTA, A.; SILVA, R. A.; BARBOSA NETO, N. M. Estudo da absorção não linear em tetrapiridil porfirina base livre tetrarutenada. **Horizonte Científico**, v. 1, p. 8, 2008.

POST, G. J.; MCCUSKEY, B. M. Metastatic Melanoma to the Bladder. **West Virginia Medical Journal**, v. 76, n. 1, p. 7-8, 1980.

POTTS, R. O.; FRANCOEUR, M. L. The influence of stratum-corneum morphology on water permeability. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 96, n. 4, p. 495-499, 1991.

PRENDERGAST, F. G.; LU, J.; CALLAHAN, P. J. Oxygen Quenching of Sensitized Terbium Luminescence in Complexes of Terbium with Small Organic-Ligands and Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 7, p. 4075-4078, 1983.

QIU, H.; CAFFREY, M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. **Biomaterials**, v. 21, n. 3, p. 223-234, 2000.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P.; BURSTYN, J. Introduction: Nitric oxide chemistry. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 857-859, 2002.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. H.; MARINEZ, C. H. **Técnicas básicas de cultura celular**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1983.

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

ROSSETTI, F. C.; FANTINI, M. C. A.; CAROLLO, A. R. H.; TEDESCO, A. C.; LOPES BADRA BENTLEY, M. V. Analysis of liquid crystalline nanoparticles by small angle X-ray diffraction: Evaluation of drug and pharmaceutical additives influence on the internal structure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. n/a-n/a, 2011.

SATO, K.; UENO, S.; YANO, J. Molecular interactions and kinetic properties of fats. **Progress in Lipid Research**, v. 38, n. 1, p. 91-116, 1999.

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

SCHEUPLEIN, R. J.; BLANK, I. H. Permeability of skin. **Physiological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 702-747, 1971.

SCOLARO, L. M.; CASTRICIANO, M.; ROMEO, A.; PATANE, S.; CEFALI, E.; ALLEGRINI, M. Aggregation behavior of protoporphyrin IX in aqueous solutions: Clear evidence of vesicle formation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 10, p. 2453-2459, 2002.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.

SHAIKH, K. A.; PATIL, S. D.; DEVKHILE, A. B. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride and azithromycin in tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 5, p. 1481-1484, 2008.

SHEIKH, N. A.; RAJANANTHANAN, P.; ATTARD, G. S.; MORROW, W. J. W. Generation of antigen specific CD8(+) cytotoxic T cells following immunization with soluble protein formulated with novel glycoside adjuvants. **Vaccine**, v. 17, n. 23-24, p. 2974-2982, 1999.



SIEKMANN, B.; BUNJES, H.; KOCH, M. M. H.; WESTESEN, K. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride-water phases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1-2, p. 33-43, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W.; EDITORS. **Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition**. John Wiley & Sons, Inc., 2010. 912 pp.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WOHRLE, D.; HACKBARTH, S.; RODER, B.; SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, v. 2, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 145-158, 1998.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of Nitric-Oxide and Its Redox-Activated Forms. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1898-1902, 1992.

STENDER, I. M.; WULF, H. C. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis. **British Journal of Dermatology**, v. 135, n. 3, p. 454-456, 1996.

STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and metal complexes in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 171, p. 203-220, 1998.

SZCZEPURA, L. F.; TAKEUCHI, K. J. Synthesis and Characterization of Novel (Cyclopentadienyl)Nitroruthenium Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1772-1777, 1990.

SZEIMIES, R. M.; KARRER, S.; SAUERWALD, A.; LANDTHALER, M. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: An initial clinical study. **Dermatology**, v. 192, n. 3, p. 246-251, 1996.

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, n. 3-4, p. 405-418, 2005.

THATCHER, G. R. J. An introduction to NO-related therapeutic agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 597-601, 2005.

TIMERBAEV, A. R.; ALEKSENKO, K. S.; POLEC-PAWLAK, K.; RUZIK, R.; SEMENOVA, O.; HARTINGER, C. G.; OSZWALDOWSKI, S.; GALANSKI, M.; JAROSZ, M.; KEPPLER, B. K. Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. **Electrophoresis**, v. 25, n. 13, p. 1988-1995, 2004.

TOGNILOLO, V.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photo-induced nitric oxide

release from chlorobis(2,2'-bipyridine)nitrosylruthenium(II) in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v. 316, n. 1-2, p. 7-12, 2001.

TORSONI, A. S.; DE BARROS, B. F.; TOLEDO, J. C.; HAUN, M.; KRIEGER, M. H.; TFOUNI, E.; FRANCO, D. W. Hypotensive properties and acute toxicity of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>P(OEt)<sub>3</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, a new nitric oxide donor. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 247-254, 2002.

TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. (Ed.). **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**. New York: VCH Publishers, 1989. p.p. 125-162.

UM, J. Y.; CHUNG, H. S.; KIM, K. S.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. In vitro cellular interaction and absorption of dispersed cubic particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, n. 1-2, p. 71-80, 2003.

VAN DEN AKKER, J. T. H. M. **In vivo and in vitro studies on the localisation and kinetics of porphyrin related drugs for fotodetection and photodynamic therapy**. 2003. 157 pp. (Tese de Doutorado). Erasmus Universiteit, Rotterdam.

WAGNIERES, G.; HADJUR, C.; GROSJEAN, P.; BRAICHOTTE, D.; SAVARY, J. F.; MONNIER, P.; VAN DEN BERGH, H. Clinical evaluation of the cutaneous phototoxicity of 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 3, p. 382-387, 1998.

WELLER, R.; BOARD, E. Nitric oxide donors and the skin: useful therapeutic agents? **Clinical Science**, v. 105, n. 5, p. 533-535, 2003.

WENBERG, A. M.; LINDHOLM, L. E.; ALPSTEN, M.; LARKO, O. Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta-aminolaevulinic acid and a filtered xenon lamp. **Archives of Dermatological Research**, v. 288, n. 10, p. 561-564, 1996.

WIERASZKO, A.; CLARKE, M. J.; LANG, D. R.; LOPES, L. G. F.; FRANCO, D. W. The influence of NO-containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. **Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 1535-1544, 2001.

WINK, D. A.; GRISHAM, M. B.; MITCHELL, J. B.; FORD, P. C. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, p. 12-31, 1996.

\_\_\_\_\_. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 268, 1996. p.12-31.

WOODHEAD, A. D.; SETLOW, R. B.; TANAKA, M. Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. **J Epidemiol**, v. 9, n. Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine., p. S102-14, 1999.

WORKS, C. F.; FORD, P. C. Photoreactivity of the ruthenium nitrosyl complex,

Ru(salen)(Cl)(NO). Solvent effects on the back reaction of NO with the Lewis acid Ru-III(salen)(Cl). **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 31, p. 7592-7593, 2000.

WORKS, C. F.; JOCHER, C.; FORD, P. C. Synthesis, characterization, and photophysical studies of some ruthenium salen nitrosyl compounds: Potential NO delivery agents and mechanistic insights in catalytic behavior. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 221, p. U745-U745, 2001.

YANG, D.; ARMITAGE, B.; MARDER, S. R. Cubic liquid-crystalline nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 34, p. 4402-4409, 2004.

ZEITOUNI, N. C.; SHIEH, S.; OSEROFF, A. R. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 328-338, 2001.