UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Avaliação da sublocalização celular e citotoxicidade por microscopia fluorescente de complexos de rutênio como agentes liberadores de óxido nítrico. Aspectos químicos, cinéticos e biológicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em 14 de março de 2018 para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientada: Renata Bortoleto da Silveira

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 14/03/2018. A versão original está disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

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.

da Silveira, R. B.

Avaliação da sublocalização celular e citotoxicidade por microscopia fluorescente de complexos de rutênio como agentes liberadores de óxido nítrico. Aspectos químicos, cinéticos e biológicos. Ribeirão Preto, 2018.

134 p.; 30 cm.

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

Orientador: da Silva, Roberto Santana.

1. Complexo de rutênio. 2. Liberação de óxido nítrico.
3. Alaranjado de Acridina. 4. Sublocalização celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Bortoleto da Silveira

Avaliação da sublocalização celular e citotoxicidade por microscopia fluorescente de complexos de rutênio como agentes liberadores de óxido nítrico. Aspectos químicos, cinéticos e biológicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus, pela coragem.

“Por isso não tema, pois estou com você;

Não tenha medo, pois sou o seu Deus.

Eu o fortalecerei e o ajudarei;

Eu o segurarei

Com a minha mão vitoriosa”.

Isaías 41:10

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida maravilhosa e cheia de significado.

“Descobri que não há nada melhor para o homem do que ser feliz e praticar o bem enquanto vive”.

Eclesiastes 3:12

Aos meus pais, Edson da Silveira e Rosana Cristina Bortoleto da Silveira, por terem dedicado a mim o bem mais precioso da humanidade: o tempo e me ensinado, com todo o carinho, que são nas simples coisas que nos tornamos grandiosos. Obrigada por abdicarem de muitos de seus sonhos para viverem os meus. Obrigada por abdicarem de seus dias para tornarem os meus dias especiais. Obrigada por, apesar do medo, deixar-me voar. A vocês, dedico todos os meus esforços, inclusive, mais esta conquista.

Ao meu irmão, Gustavo Bortoleto da Silveira, meu primeiro grande amigo, pela cumplicidade e parceria, por ouvir meus desabafos e por sempre ter bons conselhos. Obrigada por dividir comigo, não somente um quarto, mas uma vida de alegrias. Quando você nasceu, nasceu também uma “irmãe”.

A todas às famílias Bortoleto, Silveira, Rosário e Prado, minha grande família, que me apoia em todas as circunstâncias e torce incansavelmente pelo meu sucesso. Obrigada pela compreensão dos momentos em que me ausentei, sempre estudando, e por se alegrarem com cada pequena conquista. Com vocês, realmente, sinto que sou especial no mundo.

Ao meu noivo, Anderson Rosário Prado, pelos noves anos em que você foi o melhor Anderson que poderia ser, com suas surpresas, seu jeito carinhoso, paciente e companheiro. Obrigada por me incentivar e me dar suporte, por me levantar e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre arrancar o meu melhor sorriso. Obrigada pela aventura.

“Prometo estar com você, te dando coragem sempre que precisar, mesmo que nada dê certo no final. Fazendo-te ficar melhor quando se sentir sozinho. Contando

os meus mais loucos segredos e planos. Até quando o meu coração não mais aguentar, e parar de bater".

Up, Altas Aventuras

Aos "Amigos de Batalha":

"Amizade não se compra nem se vende. É uma benção".

Thor

Obrigada por todo carinho, paciência e compreensão. Por cada "jogatina", cada "pizzada", cada momento de riso e de descontração. Por sempre ouvirem minhas inquietações e me ajudarem nas minhas lutas diárias. Quando um guerreiro cai, todos caem e quando um obtém uma conquista, a glória é de todos, portanto, hoje conseguimos mais uma vitória.

Ao Núcleo de Apoio ao Vestibulando (NAV), que acreditou no meu trabalho e que, por cinquenta minutos semanais, faz-me sentir a pessoa mais realizada do mundo como professora voluntária. Agradeço aos alunos e professores, pois com vocês, eu mais aprendo que ensino. Meu coração é repleto de gratidão.

A minha psicóloga Natália Chiappini Danelucci, pela paciência e pelas palavras de apoio que me sustentaram de pé durante o Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, "o chefe", pelo carinho que sempre teve comigo, pela paciência, calma e ternura que sempre tratou a todos em seu laboratório, demonstrando o quanto é importante o respeito pelas pessoas e a difusão do conhecimento com humildade. Pela confiança no meu trabalho e, principalmente, pelas oportunidades que me deu.

Aos Profs. Drs. Fernando Lucas Primo, Gilberto Úbida Leite Braga e toda banca de qualificação, que trouxeram inúmeras contribuições para este trabalho final.

Aos Profs. Drs. Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos, Pedro Viana Baptista e José Armando Luísa da Silva pela hospitalidade em seus laboratórios em minha estadia em Portugal durante as atividades de Iniciação Científica e pelas inúmeras discussões e contribuições para concretização desse trabalho.

Aos Profs. Drs. Flávio da Silva Emery e Sofia Nikolaou pelas discussões químicas, pelas colaborações e pela disponibilidade de sempre.

Aos amigos Laila, Murilo, Carol, Agnaldo, Profs. Jonas, Alessandra e seus alunos e também aos alunos dos Profs. Flávio, Lorena, Renata Lopez, Sofia e a todo laboratório do Prof. Zeki por todos os bons momentos, risadas e por me fazerem "continuar a nadar", afinal "a vida é muito importante para ser levada tão a sério".

Aos amigos da turma 09, especialmente às queridas Dis, Veri e Marcinha pela amizade forte e sincera.

À Juliana Cristina Biazzotto Moraes, técnica de laboratório, mas também minha "mãe" e minha amiga. Obrigada por ser, muitas vezes, o "meu remédio", "meu calmante", o que eu precisava ouvir para continuar. Minha quase coorientadora, meu braço esquerdo e direito. Sofreu comigo e estava sempre pronta a ajudar, como uma boa mãe. Sem você esse Mestrado não seria possível. Muito obrigada.

Às amigas de laboratório Laísa Bonafim Negri, Laena Pernomian, Jacqueline Querino Alves, Ana Paula Segantin Gaspari, Ana Beatriz Dantas Silva, Tássia Joi e Kelly Castro, que me ajudaram direta e incansavelmente durante todo o projeto, seja com dicas, discussões, correções ou simplesmente ouvindo meus medos e angústias. Não tenho palavras para agradecer e todo meu esforço será pequeno para retribuir todo o bem que me fizeram.

"Se alguém, já lhe deu a mão e não pediu mais nada em troca, pense bem, hoje é um dia especial".

Tiago Iorc - Dia Especial

À querida Loyanne Carla Barbosa Ramos, obrigada, por tudo!

"Quem tem muitos amigos, pode chegar à ruína, mas existe amigo mais apegado que um irmão".

Provérbios 18:24

Ao meu amigo e técnico de laboratório, Clóvis Júnior, por todo suporte técnico, emocional e "nutricional".

A todo o grupo do Prof. Dr. Roberto e também aos que já passaram pelo grupo, pelo apoio, amizade e carinho de sempre. Pela disponibilidade, discussões experimentais, parceria, torcidas pela Acridina e pela alegria em trabalhar em um ambiente de respeito e harmonia.

Aos profissionais da Pós-Graduação, principalmente à Eleni Angeli Passos e Rafael Braga Poggi, pela paciência e atenção.

A toda família FCFRP pelos 8 anos de convívio quase diário. A todos os profissionais capacitados, professores e pesquisadores que tornam esta instituição uma das melhores do Brasil e do mundo e que fizeram deste lugar um lar para mim.

“Ohana significa família. Família significa nunca abandonar ou esquecer”.

Stitch - Lilo & Stitch

À CAPES e à FAPESP (processo: 2016/04833-5) pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida durante a execução do projeto.

A todos que participaram e contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho, que me incentivaram e que torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

“Não deve haver limites para o esforço humano. Somos todos diferentes. Por pior que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso. Enquanto houver vida, haverá esperança”.

Stephen Hawking

RESUMO

da SILVEIRA, R.B. **Avaliação da sublocalização celular e citotoxicidade por microscopia fluorescente de complexos de rutênio como agentes liberadores de óxido nítrico. Aspectos químicos, cinéticos e biológicos.** 2018. 134 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O óxido nítrico (NO) é biossintetizado em diferentes células do organismo animal, relacionando-se com inúmeros processos fisiológicos. Existe, aparentemente, uma relação entre os efeitos mediados pelo NO e o microambiente celular. Desta forma, a resposta observada depende da localização da molécula radicalar, da duração da exposição e da sua concentração. Assim, observa-se um efeito antagônico do NO no que tange a biologia de tumores, admitindo-se que baixas concentrações de NO estimulam a proliferação de células tumorais e altas concentrações propiciam a atividade tumoricida. Nesse sentido, o presente trabalho visou ao desenvolvimento de um novo complexo de rutênio doador de óxido nítrico coordenado ao ligante fluorescente Alaranjado de Acridina. A coordenação do rutênio ao ligante heterocíclico de nitrogênio permitiu a obtenção do composto fluorescente $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$, em que bpy = 2,2'bipiridina e AO = Alaranjado de Acridina. O complexo foi caracterizado por UV-vis, FITR e espectrometria de massas. Experimentos fotoquímicos revelaram que o complexo $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$ apresentou um valor de rendimento quântico de fluorescência em etanol inferior ao do ligante livre. No entanto, o rendimento quântico de produção de oxigênio singleto em água foi maior em relação ao Alaranjado de Acridina. Avaliações de fotoestabilidade por espectroscopia de emissão e absorção no UV-vis demonstraram que $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$ é mais fotoestável nas condições avaliadas e a fluorescência apresenta menor redução, quando irradiado em 470 nm comparado ao Alaranjado de Acridina. Ensaios de avaliação do potencial citotóxico dos compostos com irradiação em 470 nm, na dose de 5 J cm^{-2}, demonstraram que o corante Alaranjado de Acridina apresenta maior citotoxicidade frente à linhagem celular tumoral metastática estudada (B16/F10). Isso se relaciona, possivelmente, ao fato de o Alaranjado de Acridina livre direcionar-se para o núcleo e promover intercalação com os pares de base do DNA. A avaliação por microscopia de fluorescência revelou a predileção do complexo $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)$ pelo núcleo. Os dados obtidos enfatizam a importância do grupo ligante para a localização do complexo, bem como para a atividade antitumoral do mesmo.

Palavras-chave: Complexo de rutênio; Liberação de óxido nítrico; Alaranjado de Acridina; Sublocalização celular.

ABSTRACT

da SILVEIRA, R.B. **Evaluation of cellular localization and cytotoxicity by fluorescence microscopy of ruthenium complexes as nitric oxide deliver agents. Studies of Chemical, kinetic and biological aspects.** 2018. 135 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Nitric Oxide is biosynthesized in different cells of the animal organism. It is related to numerous physiological processes. There is apparently a relationship between the effects mediated by NO and the microenvironment. Thus, the cellular response observed depends on the location of the radical molecule, the duration of exposure and its concentration. Thus, an antagonistic effect of NO is observed with respect to the biology of tumors, admitting that low concentrations of NO stimulate the proliferation of tumor cells and high concentrations promote the tumoricidal activity. In this sense, the present work aimed the development of a new ruthenium complex donor of nitric oxide coordinated to the fluorescent ligand of Acridine. The coordination of Ruthenium to the nitrogen heterocyclic ligand allowed to obtain the fluorescent compound $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$, where bpy = 2,2' bipyridine and AO = Acridine Orange, which was characterized by UV-Vis, FITR and mass spectrometry. Photochemical experiments revealed that the $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$ complex presented a fluorescence quantum yield value, in ethanol, about 20 % lower than the free binder. However, the quantum yield of singlet oxygen in water was approximately 40 % higher compared to Acridine Orange. UV-vis emission spectroscopy and UV-vis absorption spectroscopy have shown that $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$ is apparently more photostable and suffers less fluorescence suppression when irradiated at 470 nm compared with Acridine Orange. Cell cytotoxicity assays with irradiation using dose of 5 J cm^{-2} demonstrated that the coordination of Acridine Orange dye to the complex decreases its cytotoxicity against the metastatic tumor cell line studied, possibly by preventing the mechanism of intercalation of the planar ligand to DNA. Monitoring by fluorescence microscopy revealed the preferential localization of the compound $[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)$ by the cell nucleus possibly due to coordinated Acridine Orange, which has a tropism by DNA. These results emphasize the importance of the ligand group for the localization of the complex, as well as for the cytotoxic activity of the same.

Keywords: Ruthenium complex; Release of nitric oxide; Acridine Orange; Cellular localization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação de compostos de rutênio.....30

Figura 2 - Os marcadores do câncer.....33

Figura 3 - Influência da exposição a agentes iniciadores e promotores no desenvolvimento de câncer em função do tempo 35

Figura 4 - Perfil de mortalidade por câncer por sexo no Brasil.....36

Figura 5 - Ilustração esquemática do princípio da TFD incluindo o Diagrama de Jablonski 40

Figura 6 - Exemplos de metais empregados em terapia e diagnóstico de doenças humanas.....41

Figura 7 - Estruturas de compostos metálicos antitumorais baseados em platina(II): cisplatina; carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.....43

Figura 8 - Compostos de coordenação baseados em outros centros metálicos com propriedades antitumorais.....43

Figura 9 - Biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina catalisada pela enzima NO-sintase.....45

Figura 10 - Representação esquemática do Diagrama de Orbital Molecular do NO.....46

Figura 11 - Representação esquemática dos orbitais moleculares envolvidos na ligação entre um metal e um ligante nitrosil.....47

Figura 12 - Representação esquemática do Diagrama de Jablonski.....50

Figura 13 - Principais sondas reativas para conjugação a macromoléculas.....53

Figura 14 - Fórmula estrutural da Acridina.....54

Figura 15 – Fórmula estrutural do corante Alaranjado de Acridina.....55

Figura 16 - Equilíbrio químico entre as formas do Alaranjado de Acridina.....56

Figura 17 - Aplicação de fluoróforos na terapia antitumoral.....57

Figura 18 - Fórmula estrutural do complexo almejado: *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)NO](PF_6)$_2$.....64

Figura 19 - Sistema extrator soxhlet.....69

Figura 20 - Representação esquemática da rota sintética para obtenção do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$.....71

Figura 21 - Conjunto de LED's distribuídos uniformemente em formato de placa de cultura. λ_{em} = 470 nm; irradiância = 0,038 mW cm^{-2}.....74

Figura 22 - Conversão do sal de MTT (hidrossolúvel) em sal de formazan (lipossolúvel).....81

Figura 23 – Representação esquemática da rota sintética para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)(AO)$_2$(NO)](PF_6)$_2$.....84

Figura 24 - Espectro vibracional na região do infravermelho para AO (preto) e para *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ (vermelho).....88

Figura 25 - Espectro de massas obtido por técnica MALDI-TOF/TOF-MS para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$.....90

Figura 26 - Espectro ampliado do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ na região de razão m/z 1120 a 1200.....91

Figura 27 - Representação esquemática de diagrama de orbital molecular simplificado para ilustrar as transições eletrônicas de um complexo octaédrico.....92

Figura 28 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para AO (preto) e para o complexo *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(DMSO)$_2$] (vermelho), em acetonitrila, a 25,0 °C, (1,00 x 10^{-4} mol L^{-1}).....93

Figura 29 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(DMSO)$_2$] (preto) e para *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(bpy)] (vermelho), em acetonitrila a 25,0 °C, (1,00 x 10^{-4} mol L^{-1}).....94

Figura 30 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para *cis*-[Ru(Cl)2(AO)2(DMSO)2] (preto) e para *cis*-[Ru(Cl)2(AO)2(bpy)] (vermelho), em acetonitrila a 25,0 °C, (1,00 x 10-4 mol L^{-1}).....95

Figura 31 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis em água para AO (preto) (3,00 x10^{-5} mol L^{-1}) e para *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)NO](PF_6)$_2$ (vermelho) (2,50 x 10^{-5} mol L^{-1}) a 25,0 °C.....96

Figura 32 - Espectro eletrônico de emissão qualitativo em água do AO (preto) e do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ (vermelho) a 25,0 °C.....99

Figura 33 - Espectro eletrônico de absorção no UV-vis para o padrão Fluoresceína em etanol a 25,0 °C (2,00 x 10^{-7} mol L^{-1}).....101

Figura 34 - Espectro eletrônico de emissão no UV-vis para o padrão Fluoresceína em etanol a 25,0 °C.....101

Figura 35 - Gráfico de Volume de O_2 (ml) versus tempo (s) para Azul de metileno (círculos); *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ (quadrados) e AO (triângulos).....103

Figura 36 - Acompanhamento dos espectros eletrônicos de absorção para o ligante Alaranjado de Acridina em água, após sucessivas irradiações, a 25,0 °C (1,10 x 10^{-5} M).....105

Figura 37 - Acompanhamento dos espectros eletrônicos de absorção para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)($AO)_2$(bpy)(NO)]($PF_6)_2$ em água, após sucessivas irradiações, em 470 nm a 25,0 °C (1,70 x 10^{-5} M).....106

Figura 38 - Acompanhamento do espectro de emissão em água para Alaranjado de Acridina após sucessivas irradiações em 470 nm a 25,0 °C (1,10 x 10^{-5} M).....106

Figura 39 - Acompanhamento do espectro de emissão do complexo [Ru(NO_2)($AO)_2$(bpy)(NO)]($PF_6)_2$ em água, após sucessivas irradiações, em 470 nm a 25,0 °C (1,70 x 10^{-5} M).....107

Figura 40 - Liberação controlada de NO: estímulo eletroquímico ou fotoquímico.....108

Figura 41 - Perfil de liberação de NO em água para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)($AO)_2$(bpy)(NO)]($PF_6)_2$ após irradiação em 377 nm (2,00 x 10^{-5} mol L^{-1}).....109

Figura 42 - Perfil de variação do espectro no UV-vis do complexo *cis*-[Ru(NO_2)($AO)_2$(bpy)(NO)]($PF_6)_2$ em água. Antes (preto) e após (vermelho) a irradiação em 377 nm a 25,0 °C (2,00 x 10^{-5} mol L^{-1}).....109

Figura 43 - Perfil de liberação de NO em água para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)($AO)_2$(bpy)(NO)]($PF_6)_2$ após irradiação em 447 nm (2,50 x 10^{-5} mol L^{-1}).....110

Figura 44 - Perfil de variação do espectro no UV-vis do complexo *cis*-[Ru(NO_2)($AO)_2$(bpy)(NO)]($PF_6)_2$ em água. Antes (preto) e após (vermelho) a irradiação em 447 nm a 25,0 °C (2,50 X 10^{-5} mol L^{-1}).....110

Figura 45 - Efeito citotóxico do ligante Alaranjado de Acridina em modelos de células B16/F10 após 4 horas de incubação.....112

Figura 46 - Efeito citotóxico do ligante Alaranjado de Acridina em modelos de células L929 após 4 horas de incubação.....113

Figura 47 - Efeito citotóxico do complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ em modelos de células B16/F10 após 4 horas de incubação.....113

Figura 48 - Efeito citotóxico do complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ em modelos de células L929 após 4 horas de incubação.....114

Figura 49 - Controle experimental: células B16/F10 sem tratamento e sem irradiação.....116

Figura 50 - Microscopia de fluorescência de células B16/F10 tratadas com AO (7,50 µM) (Campo claro / Campo escuro).....117

Figura 51 - Microscopia de fluorescência de células B16/F10 tratadas com complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ (15 µM). a: Campo claro. b: Campo escuro.....117

Figura 52 - Microscopia de fluorescência confocal de células B16/F10 tratadas com complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ (15 µM). c: Campo claro (zoom 1,5X), d: Campo escuro (zoom 1,5X) e: Campo escuro (zoom 3,0X), f: Formação de corpúsculos circulares - campo claro (zoom 3,0X), g: Formação de corpúsculos circulares - Campo escuro (zoom 3,0X), h: Formação de corpúsculos circulares- Campo claro (zoom 3,0X), i: Formação de corpúsculos circulares- Campo escuro (zoom 3,0X).....118

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).....52

Equação 2 - Lei de Lambert Beer 73

Equação 3 - Determinação do Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).....74

Equação 4 - Oxigênio consumido.....75

Equação 5 - Intensidade de luz absorvida (I).....76

Equação 6 - Rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Φ_Δ).....76

Equação 7 - Porcentagem de viabilidade celular.....80

Equação 8 - Equilíbrio ácido-base.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades do Óxido Nítrico.....48

Tabela 2 - Tempo característico envolvido nos processos fotofísicos.....50

Tabela 3 - Lista de reagentes e solventes utilizados na síntese e caracterização dos complexos.....67

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$(NO)]$(PF_6)_2$ e do AO.....75

Tabela 5 - Atribuições às principais bandas observadas no espectro eletrônico de absorção na região do Infravermelho para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$]$(PF_6)_2$.....86

Tabela 6 - Frequência do estiramento N-O de complexos rutênio-nitrosilos.....87

Tabela *7* - Atribuição para as transições observadas para as bandas na região do UV-vis do composto *cis*-[Ru(bpy)$(AO)_2$(NO_2)NO]$(PF_6)_2$.....97

Tabela 8 - Coeficientes de extinção molar para Alaranjado de Acridina e *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$.....98

Tabela 9 - Parâmetros utilizados para aquisição dos espectros eletrônicos de emissão da Figura 32.....99

Tabela 10 a - Valores de absorbância.....103

Tabela 10 b - Valores de I ($I = 1\text{-}10^{-A}$).....104

Tabela 10 c - Valores de K (coeficiente angular da reta)).....104

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína Quinase B
ANOVA	Análise de Variância
AO	*Acridine Orange* (Alaranjado de Acridina)
BCRJ	Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro
bpy	2,2’ bipiridina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CI	Conversão Interna
CIS	Cruzamento Intersistema
CL	Campo ligante
CO_2	Dióxido de carbono
DAPI	4’,6-diamidino-2-fenolindol
DHB	Ácido 2,5 Dihidróxibenzóico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS-Cl	Cloreto de Dansyl
DPBF	1,3 - difenilisobenzofurano
DPH	Difenilhexatrieno
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	*Electrospray Ionization*

LISTA DE ABREVIATURAS

FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
HEPES	Ácido 2- [4 – (2 – hidroxietil) – piperazin – 1- il] - etanossulfônico
HIF-1-α	*Hipoxia Inducible Factor-1- α*
HOMO	*Highest Occupied Molecular Orbital*
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
IL	Ligantes insaturados
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LED	*Light-Emitting Diode*
LMMC	Laboratório de Microscopia Confocal
LUMO	*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*
MALDI	*Matrix-assisted laser desorption/ionization*
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neural
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indútivel
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato

LISTA DE ABREVIATURAS

pH	Potencial Hidrogeniônico
PIE	*Pulsed Ion Extraction*
PDB	*Protein Databank*
RCSB	*Research Colaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank*
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
TFD	Terapia Fotodinâmica
TLC	*Thin Layer Chromatography*
TCLM	Transferência de Carga Ligante Metal
TCML	Transferência de Carga Metal Ligante
TOF	*Time of flight*
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visível
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*

LISTA DE SÍMBOLOS

ε	Coeficiente de Absortividade Molar (mol cm^{-1} L^{-1})
λ	Comprimento de onda (nm)
ν(NO)	Frequência de onda de estiramento da ligação N-O na região do infravermelho (cm^{-1})
ν	Estiramento
π	Interação eletrônica
S_0	Estado Fundamental
S_1	Estado Excitado Singleto
T	Estado Tripleto
K	Constante de velocidade de consumo de O_2
$K_{padrão}$	Constante de velocidade de consumo de O_2 do padrão
A	Absorbância
I	Intensidade de luz absorvida
$I_{padrão}$	Intensidade de luz absorvida do padrão
$Grad_x$	coeficiente angular de um gráfico que relaciona a área sob a curva do espectro de fluorescência da amostra *versus* a absorbância da amostra
$Grad_p$	coeficiente angular de um gráfico que relaciona a área sob a curva do espectro de fluorescência do padrão *versus* a absorbância do padrão
n_x	Índice de refração do solvente da amostra
n_p	Índice de refração do solvente da solução padrão
ϕ_F	Rendimento quântico de fluorescência
ϕ_Δ	Rendimento quântico de oxigênio singleto
t_0	Tempo inicial
t_1	Tempo final

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE EQUAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1 Introdução.....29

1.1 Fluoróforos como ferramentas para sublocalização celular de compostos antitumorais.....29

2 Revisão da Literatura.....32

2.1 Câncer.....32

2.1.1 Conceitos gerais sobre câncer.....32

2.1.2 Tratamento do câncer.....38

2.1.3 Complexos metálicos e câncer.....40

2.1.4 Óxido nítrico e câncer.....44

2.2 Aplicação da fluorescência no câncer.....49

2.2.1 Introdução à fotoquímica.....49

2.2.2 Fluoróforos.....51

2.2.3 Alaranjado de Acridina.....54

3 Hipótese.....60

4 Justificativa.....62

5 Objetivos.....64

5.1 Objetivos Gerais.....64

5.2 Objetivos Específicos.....64

6 Materiais e Métodos.....67
6.1 Reagentes e solventes.....67
6.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$.....68
6.2.1 Síntese do complexo *cis*-[Ru(Cl)$_2$(DMSO)$_4$].....68
6.2.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(DMSO)$_2$].....68
6.2.3 Extração por Soxhlet.....69
6.2.4 Síntese do complexo *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(bpy)]......70
6.2.5 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO_2)$_2$(AO)$_2$(bpy)].....70
6.2.6 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$.....70
6.3 Caracterização do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ por técnicas espectroscópicas.....72
6.3.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....72
6.3.2 Espectrometria de massas.....72
6.3.3 Espectroscopia de absorção no UV-vis.....73
6.3.4 Determinação do coeficiente de Absortividade molar.....73
6.3.5 Espectroscopia de luminescência.....73
6.4 Estudos fotofísicos e fotoquímicos.....73
6.4.1 Irradiação das amostras.....73
6.4.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência ϕ_F.....74
6.4.3 Determinação Indireta do oxigênio singleto $^1O_2$.....75
6.4.4 Avaliação da fotoestabilidade dos compostos.....77
6.4.5 Determinação amperométrica de óxido nítrico liberado.....77
6.5 Ensaios biológicos.....77
6.5.1 Aquisição do material biológico.....77
6.5.2 Preparo do meio de cultura.....78
6.5.3 Manutenção das linhagens celulares.....78
6.5.4 Determinação do número de células.....79
6.6 Ensaios biológicos.....79
6.6.1 Ensaio do MTT.....79
6.6.2 Princípio do Ensaio do MTT.....80
6.6.3 Tratamento estatístico.....81
6.7 Avaliação da sublocalização celular por Microscopia de Fluorescência.....81

7 Resultados e discussão.....84
7.1 Síntese de *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$.....84
7.2 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....85
7.3 Espectrometria de massas.....88
7.4 Espectroscopia na região do UV-vis.....91
7.5 Espectroscopia de luminescência.....98
7.6 Rendimento quântico de fluorescência ϕ_F.....100
7.7 Rendimento quântico de oxigênio singleto ϕ_Δ.....102
7.8 Avaliação da fotoestabilidade.....105
7.9 Avaliação qualitativa da liberação de óxido nítrico.....108
7.10 Avaliação da viabilidade celular.....112
7.11 Avaliação da sublocalização celular por Microscopia de Fluorescência.....115

8 Considerações finais.....122

9 Referências.....124

Introdução

1.1 Introdução

1.1 Fluoróforos como ferramentas para sublocalização celular de compostos antitumorais

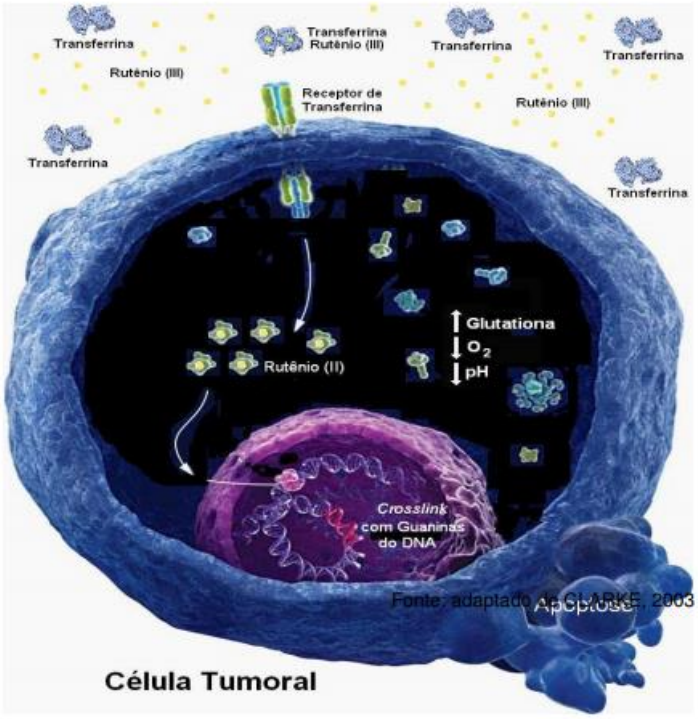
Atualmente, compostos baseados em rutênio vêm ganhando destaque e apresentando boas perspectivas de aplicação clínica. Um exemplo disso é o NAMI-A, complexo que se encontra em triagem clínica de fase II. Conquanto seja notória sua eficácia em processos metastáticos, o NAMI-A, a princípio, não demonstrou citotoxicidade *in vitro* (SAVA et al., 1995; HARTINGER et al., 2006).

Estudos sugerem que complexos de Ru(III) atuam como pró-fármacos, podendo ser convertidos à Ru(II) em decorrência das condições celulares citoplasmáticas das células tumorais. Esta espécie, permite a interação com sítios específicos do DNA com seletividade para células tumorais (CLARKE, 2003; JAKUPEC et al., 2008; BERGAMO et al., 2012; THANGAVEL; VISWANATH; KIM, 2017).

Embora o Ru seja capaz de interagir com nucleotídeos e, principalmente, com o N7 da guanina (como é o caso do NAMI-A) (KÜNG et al., 2001), estudos observaram que estes complexos de Ru(III) induzem outros mecanismos, nos quais, provavelmente o DNA não seja o principal alvo. Desta forma, o metabolismo do óxido nítrico, a interferência em processos de adesão e a capacidade de inibição de metaloproteases são mecanismos que ganham destaque como possíveis responsáveis pelo efeito antitumoral desta droga (PLUIM et al., 2004; MORBIDELLI et al., 2003; SAVA et al., 2003; PACOR et al., 2004).

Devido ao sucesso de drogas como o NAMI-A, grupos como o do Prof. Silva têm se empenhado no desenvolvimento de novos complexos de rutênio doadores de óxido nítrico, dentre os quais, muitos vêm apresentando potencial citotóxico interessante. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação envolvidos nas vias de morte celular destes principais compostos sintetizados (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismo de ação de compostos de rutênio



Fonte: CLARKE et al., 2003.

Com base nisso e, no intuito de compreender melhor a relação entre a sublocalização celular dos complexos de rutênio e o efeito citotóxico observado, uma das possibilidades iminentes a ser explorada é a imagem celular, por meio da microscopia de fluorescência. Assim, seria possível verificar a sublocalização celular de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e estabelecer relações com a atividade citotóxica promovida pelo composto. Nesse sentido, o Alaranjado de Acridina, enquanto fluoróforo, pode contribuir para a visualização dos eventos de acumulação de compostos e eventual distribuição da droga nas células, auxiliando na elucidação dos principais alvos biológicos envolvidos na destruição celular.

Deste modo, o presente trabalho visa a contribuir cientificamente, promovendo o desenvolvimento de um composto rutênio-nitrosilo com propriedades “teranósticas”, que permita a avaliação da sublocalização celular do mesmo, possibilitando colaborar com o conhecimento acerca dos possíveis mecanismos de ação deste complexo.

Revisão da Literatura

2 Revisão da Literatura

2.1 Câncer

2.1.1 Conceitos gerais sobre câncer

Na natureza, a manutenção da vida é assegurada por meio do processo de divisão celular, em que as células se multiplicam, originando células-filhas a partir de uma única célula progenitora. A capacidade de proliferação celular está estritamente relacionada com o tipo celular e com a sua função, havendo uma correlação inversamente proporcional entre as taxas de multiplicação e o grau de diferenciação da célula (FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2009). Dessa forma, existem células que estão em contínua divisão e células que nunca se dividem, como os neurônios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A atividade proliferativa das células está sob um rígido controle do organismo mediado por genes reguladores como os proto-oncogenes, que atuam de modo a manter o equilíbrio do ciclo celular. A soma de estímulos externos e internos, pode suscitar mutações nos proto-oncogenes, que se transformam em oncogenes. Estes são um dos responsáveis pela malignização (cancerização) das células sadias. Com isso, o equilíbrio do ciclo celular é perturbado e a proliferação celular ocorre de modo desordenado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2009).

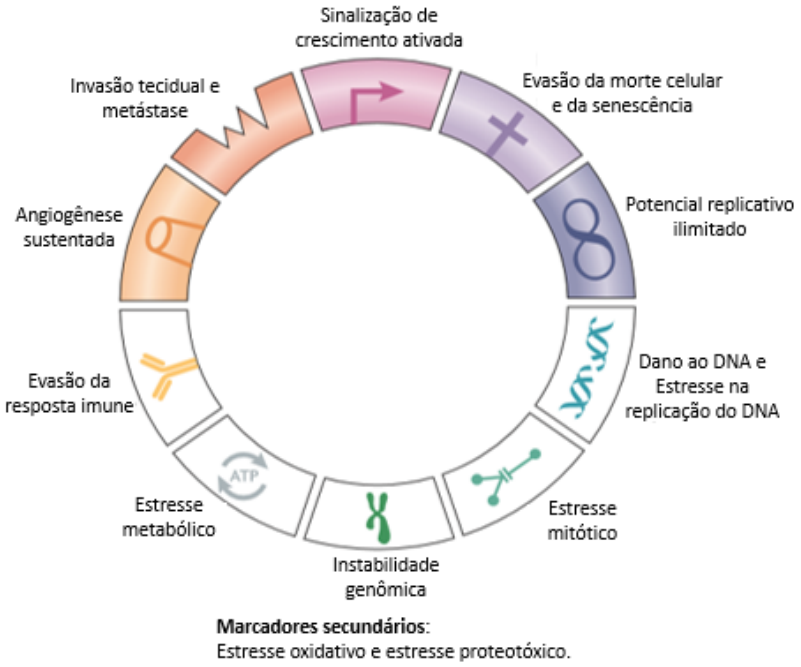
O termo câncer (do grego *karkinos*: crustáceo, caranguejo) foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates. Mais tarde, Galeno apropriou-se desta expressão para descrever uma patologia na qual veias superficiais da mama ficavam túrgidas e ramificadas como as patas de um caranguejo. Atualmente, este termo generalizou-se e é usado para definir qualquer tipo de neoplasia maligna (FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; WHO, 2017).

Cabe destacar que o crescimento anormal de células, por si só, não leva à formação de neoplasias malignas. A malignidade desse conjunto de células só ocorre quando aliada à invasão e colonização de regiões impróprias, ou seja, normalmente destinadas a outras células. Desde que as células neoplásicas não se tornem invasivas, o tumor é considerado benigno, sendo possível a remoção cirúrgica. A invasividade se faz perigosa por permitir que a célula cancerosa se desprenda do

tecido e, através da circulação sanguínea, atinja outras regiões do corpo, formando tumores secundários denominados metástases, comumente associadas à malignidade, difícil remissão e altas taxas de mortalidade (FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2009).

Um conjunto de características adicionais às células cancerosas foi determinado por HANAHAN & WEINBERG (2000), como marcadores do câncer, dos quais destacam-se a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade à fatores de crescimento, a capacidade de evasão de apoptose, a rápida multiplicação, a angiogênese sustentada, a invasão à tecidos e metástase, a alteração do metabolismo energético e a evasão da resposta imune. Posteriormente, NEGRINI et al. (2010), acrescentou a esta lista, novos marcadores característicos para o câncer, como danos ao DNA e os estresses oxidativos, mitótico, proteotóxico e metabólico (Figura 2) (HANAHAN & WEINBERG, 2000; NEGRINI; GOURGOULIS; HALANOZETIS, 2010).

Figura 2 - Os marcadores do câncer



Fonte: (Adaptado) HANAHAN & WEINBERG, 2000.

Existe uma infinidade de causas associadas ao desenvolvimento do câncer, acarretadas pela combinação de estímulos externos e internos ao organismo. Os

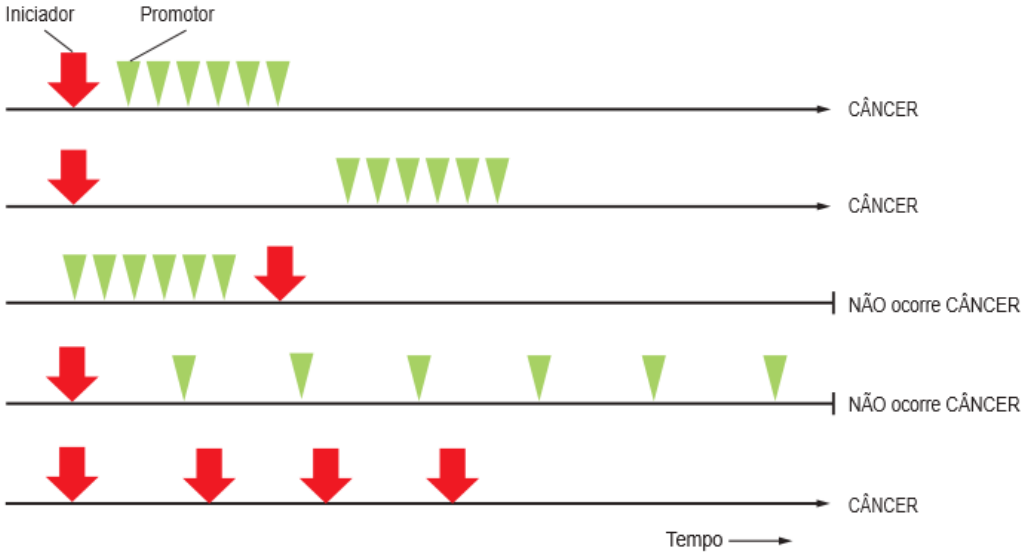
estímulos externos são oriundos da junção entre os fatores ambientais e os hábitos de vida de cada indivíduo, os quais estão associados às questões comportamentais, socioculturais e socioeconômicas. Já os estímulos internos, dependem da constituição genética do indivíduo (ALBERTS, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A grande maioria dos casos, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estão associados a fatores ambientais, também chamados de carcinógenos, que alteram a estrutura dos genes. A exposição ao tabaco e à radiação ultravioleta do sol são fatores conhecidamente associados ao câncer. Além disso, muitos estudos vêm sendo realizados de modo a comprovar a associação de componentes alimentares com certos tipos de tumores malignos (ALBERTS, 2010; INCA, 2017ª; WHO, 2017).

Como agentes mutagênicos, pode-se também citar os carcinógenos químicos e as radiações ionizantes. Estima-se que cerca de 15 % dos casos de câncer que surgem no mundo todo possam ser atribuídos a mecanismos promovidos por vírus, bactérias e outros parasitas, que ainda são difíceis de ser decifrados (ALBERTS, 2010).

Uma exposição única a um carcinógeno geralmente não leva à formação de um tumor. Entretanto, pode ser suficiente para gerar danos latentes ao DNA, que, quando acrescidos de outras exposições a carcinógenos, aumentam o risco de surgimento da doença. O carcinógeno que apresentou as “sementes” de um câncer, mas que, não necessariamente, levou à formação de uma neoplasia maligna, é denominado iniciador de tumor. Outros fatores, que não são mutagênicos, mas aumentam a propensão ao câncer após exposição ao iniciador, são chamados de agentes promotores de tumor (Figura 3). Assim, quanto maior a exposição aos fatores de risco, maior a probabilidade de aparecimento de neoplasias (ALBERTS, 2010).

Figura 3 - Influência da exposição a agentes iniciadores e promotores no desenvolvimento de câncer em função do tempo



Fonte: ALBERTS, 2010.

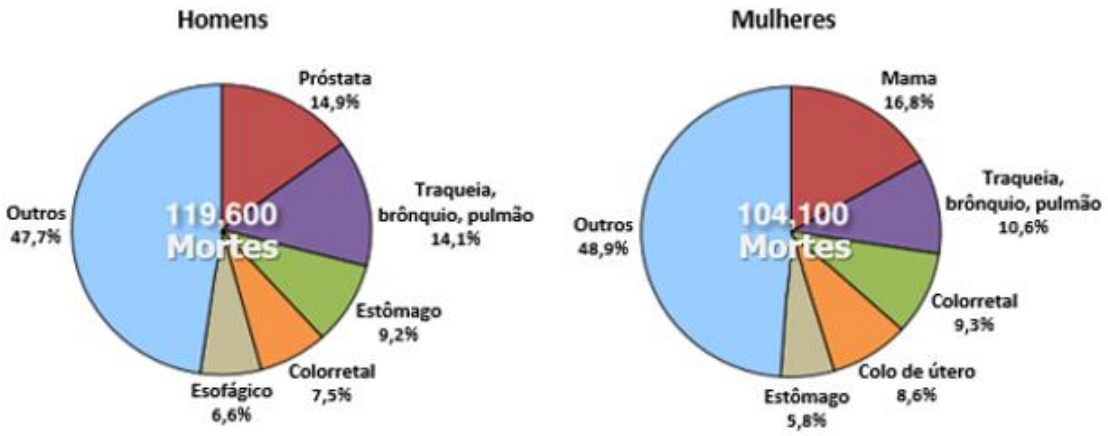
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, gerando um custo elevado para a economia. Dados estimam que, no ano de 2010, um custo total de 1,16 trilhões de dólares em produtividade perdida e seguros-saúde foram atribuídos somente a essa doença. Ainda, de acordo com a OMS, 30 a 50 % dos casos de câncer poderiam ser prevenidos com a adoção de hábitos de vida mais saudáveis e se evitando a exposição a fatores de risco.

Dados mundiais mais recentes apontam para um crescimento de 22 % das taxas de mortalidade associadas à doença em relação ao início do século XXI. No ano de 2015, a patologia foi responsável pela morte de 8,8 milhões de pessoas (cerca de 5 milhões de homens e 3,8 milhões de mulheres), o que equivale a uma em cada seis mortes que ocorreram no planeta. Destas, aproximadamente 70 % situavam-se em países de baixa e média renda. Estes altos índices podem ser atribuídos às políticas públicas deficientes no manejo e prevenção do câncer, bem como à falha no diagnóstico precoce da doença. Projeta-se, ainda, que nos próximos vinte anos, o número de novos casos aumente em aproximadamente 70 % (WHO, 2017).

No Brasil, o aumento da mortalidade em relação ao início do século foi ainda maior: 31 %. Segundo perfil elaborado pela OMS, no país, o tipo de câncer que apresenta o maior índice de mortalidade em homens é o de próstata, enquanto que

para as mulheres, o câncer de mama figura como o mais letal (Figura 4). Além disso, dados mostram que 65 % da incidência de câncer no Brasil se deve ao sedentarismo, à obesidade e ao tabaco. O registro e o estudo destes indicadores são instrumentos bastante úteis para a determinação da relação causal de neoplasias malignas e para a adoção de planos de ações (ALBERTS, 2010; WHO, 2017).

Figura 4 - Perfil de mortalidade por câncer por sexo no Brasil



Fonte: (Adaptado) WHO, 2017.

Dada a pluralidade de tipos celulares no organismo humano, existem mais de 100 tipos de câncer que podem variar de acordo com seus aspectos anatômicos e moleculares. Estes diferentes tipos podem distinguir-se por apresentar velocidades próprias de multiplicação e capacidades metastáticas distintas, exigindo, portanto, estratégias de manejo específicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer de pele é o tipo de maior incidência no Brasil para ambos os sexos. De acordo com dados da *Skin Cancer Foundation*, um em cada três diagnósticos de câncer no mundo é deste tipo. O melanoma é um tipo de câncer de pele cuja incidência tem experimentado um crescimento anual de 3 a 7 % no mundo todo. Embora represente apenas 4 % dos cânceres deste órgão, o melanoma apresenta uma taxa de mortalidade de 80 % devido ao seu grande poder metastático (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2017; DAVIDS & KLEEMAN, 2011).

Um dos principais fatores ambientais atribuídos ao melanoma é a exposição à radiação ultravioleta (UV) do sol. O aumento de sua taxa de incidência global pode, de certa forma, ser relacionado à redução da camada de ozônio, que recobre a Terra e a protege contra os raios UV.

Este subtipo de neoplasia consiste no fenótipo maligno de um melanócito, célula da pele especializada na produção de melanina, um pigmento que confere proteção contra a radiação solar (DAVIDS & KLEEMAN, 2011; WEINSTOCK et al., 1989; FORD et al., 1995; WHO, 2017).

Os mecanismos de malignização do melanócito envolvem danos ao DNA, acarretados por uma exposição intensa e aguda ao UV. Essas alterações genéticas são acompanhadas de mudanças subsequentes das características histológicas da célula, como bordas irregulares, cor alterada, e, geralmente, de reações alérgicas, fase denominada displásica (DAVIDS & KLEEMAN, 2011).

Gogas et al. (2007) atenta para a necessidade de mudanças na abordagem do tratamento do melanoma metastático, visto que, numerosos métodos de combate à doença não se mostraram eficientes. Dentre os variados métodos já testados incluem-se fármacos como a cisplatina e seus derivados, alcaloides da vinca, bem como a combinação com agentes hormonais e bioquimioterapias, aos quais as células cancerosas de melanoma tem se mostrado cada vez mais resistentes.

Além disso, a necessidade de novas abordagens advém de respostas insatisfatórias de alguns pacientes e também pelos efeitos colaterais, frequentemente observados em tais tratamentos, como a mielossupressão. Estes efeitos apresentam um impacto significativo na qualidade de vida desses pacientes e enfatizam a importância das pesquisas nessa área. Isto, aliado às altas taxas de mortalidade do melanoma, simbolizam a urgência pela demanda de agentes eficazes que, isolados ou combinados, tenham impacto significativo no seu tratamento (ZBYTEK et al., 2008; GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007; DAVIDS & KLEEMAN, 2011; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

Por esses motivos, escolheu-se as células de melanoma murino como modelo celular tumoral para estudo neste trabalho. Estas células apresentam crescimento rápido e expressivo e estão localizadas em um órgão de fácil acesso: a pele. Somado a isto, elas têm um alto poder metastático, facilitando os estudos que envolvem metástases.

2.1.2 Tratamento do câncer

Existem diferentes abordagens para o combate às neoplasias malignas. A adoção da terapia mais efetiva pode estar relacionada ao tipo de tumor e ao estágio em que ele se encontra no organismo (WHO, 2017). Dentre as terapias utilizadas atualmente, destacam-se a quimioterapia, a hormonioterapia, a radioterapia, a terapia fotodinâmica (TFD), a imunoterapia, anticorpos monoclonais e a remoção cirúrgica, ou, em alguns casos, a combinação de mais de uma modalidade de tratamento (INCA, 2017[b]).

A remoção cirúrgica dos tumores malignos pode ter finalidade curativa ou paliativa. No primeiro caso, a remoção é feita quando o tumor se encontra em estágios iniciais do seu desenvolvimento. Já o tratamento paliativo é feito com intuito de reduzir a população de células cancerosas e controlar sintomas que comprometam o bem-estar e a qualidade de vida do paciente (INCA, 2017[b]).

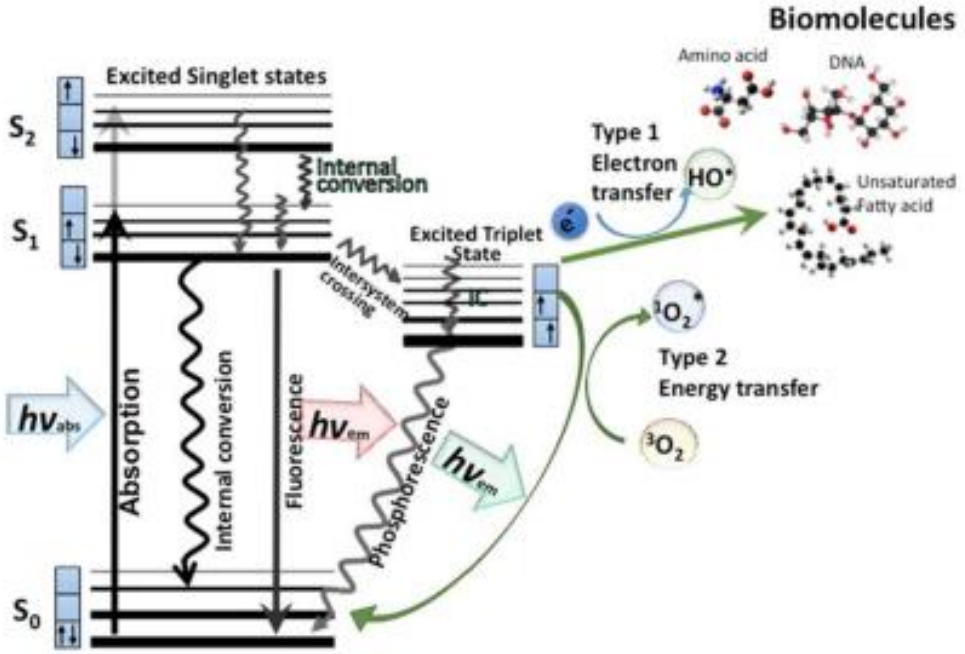
A quimioterapia consiste no uso de substâncias químicas, que são administradas por vias venosa, oral, intramuscular ou subcutânea. Esta terapia foi desenvolvida, principalmente, após a Segunda Guerra Mundial, a partir da observação de que o gás mostarda era responsável pela redução leucocitária em militares submetidos à exposição ao gás durante operações de guerra (BUSCHKE, 1971, apud SEO; LEE & KIM, 2016). Essas substâncias agem destruindo as células cancerosas e impedindo sua dispersão pelo organismo, podendo gerar, entretanto, reações adversas, como fraqueza, desconfortos, urticária, diarreia e enjoos. Outro ponto importante é que as altas taxas mutacionais, características das células cancerosas, e o ambiente com baixo conteúdo de oxigênio presente em tumores sólidos podem levar ao desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas na quimioterapia (GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007; KUSUZAKI et al., 2012; INCA, 2017[b]; ANGELOPOULOU et al., 2017).

A história da radioterapia tem como marco a descoberta dos raios-X por Roentgen em 1895 e a irradiação de um câncer de faringe realizada com sucesso por Dr. Voigt em 1896 (HOLSTI, 1995; GOODMAN, 1946 apud SEO; LEE; KIM, 2016). É um tratamento baseado na utilização de radiações para o combate aos tumores malignos. Essas radiações são indolores e podem ser usadas em combinação com outras modalidades de tratamento. A frequência das aplicações varia conforme a extensão e localização do tumor e o estado de saúde do paciente. Dentre as reações

adversas já relatadas, após a radioterapia estão coceiras na pele, vermelhidão, irritação e queimaduras. Além disso, a radioterapia pode ter um efeito altamente tóxico para as células vizinhas sadias. Com base nisso, têm-se empregado protetores de chumbo no momento do tratamento, de modo a proteger órgãos e tecidos sadios. Ressalta-se que a erradicação da totalidade das células cancerosas é bastante complicada, pois poucas células-tronco cancerosas que não tenham sido completamente eliminadas podem levar à regeneração do tumor maligno (ALBERTS, 2010; GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007; KUSUZAKI et al., 2012; INCA, 2017[b]).

Considerando as limitações apresentadas pelas terapias convencionais, frequentemente, associadas aos efeitos colaterais desencadeados pela atuação indiscriminada sob as células sadias, terapias alternativas têm ganhado destaque, como a Terapia fotodinâmica. A TFD foi desenvolvida a partir de observações de Raab (1900), que notou a eliminação de paramécios quando estes foram expostos ao Alaranjado de Acridina e à luz branca intensa. Logo depois, observou-se também a necessidade de oxigênio para a ocorrência de tal fenômeno. A TFD se baseia na combinação do uso de compostos que absorvem luz (fotossensibilizadores), que se acumulam preferencialmente em tecidos cancerosos, e radiação com luz visível de comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção do fotossensibilizador. A eliminação tecidual promovida pela TFD, além de requerer oxigênio molecular, envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (como o oxigênio singleto, radicais hidroxilo, superóxido, etc.), que, através de eventos moleculares e bioquímicos, levam à morte celular das células-alvo ou à destruição das células endoteliais vasculares (gerando a isquemia tumoral), dependendo da distribuição da droga no momento da irradiação (RAAB, 1900; WAINWRIGHT, 2003; DAVIDS & KLEEMAN, 2011; OCHSNER, 1997; ABRAHAMSE & HAMBLIN, 2016; AGOSTINIS, 2004) (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração esquemática do princípio da TFD incluindo o Diagrama de Jablonski



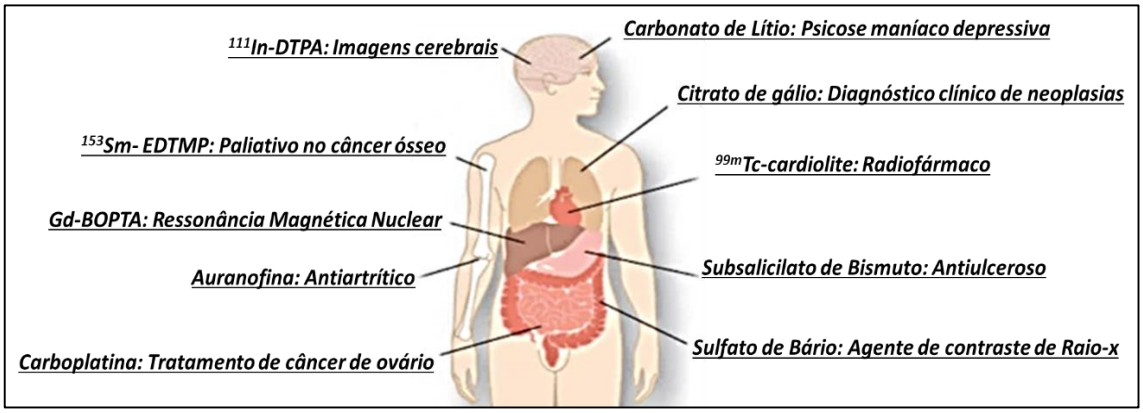
Fonte: ABRAHAMSE & HAMBLIN, 2016.

Esta modalidade de tratamento mostrou-se vantajosa pelo fato de ser minimamente invasiva e apresentar uma baixa toxicidade cumulativa sistêmica, além de possuir uma alta seletividade para a destruição de tumores malignos, o que garante a minimização dos danos às células vizinhas sadias.

2.1.3 Complexos Metálicos e câncer

Os complexos vêm sendo cada vez mais empregados na área médica, atuando desde o diagnóstico ao tratamento de inúmeras doenças, como artrite reumatoide, depressão e transtornos de humor, apresentando lugar de destaque no combate ao câncer (Figura 6) (ORVIG & ABRAMS, 1999).

Figura 6 - Exemplos de metais empregados em terapia e diagnóstico de doenças humanas



Fonte: (Adaptado) LIPPARD, 2006.

Desde a Antiguidade os metais eram utilizados para a terapia de reposição, quelação e no tratamento de distúrbios gástricos. O primeiro metal a ser descoberto foi o cobre, por volta de 35 a.c., o qual era utilizado pelos egípcios para esterilizar água. Séculos mais tarde, os mesmos exploraram as propriedades medicinais do ferro e do zinco no tratamento de feridas. Durante o período do renascimento, na Europa, outros aspectos do ferro ganharam importância, como o seu fator nutricional e, além disso, tornou-se conhecido o potencial diurético do cloreto de mercúrio (ORVIG & ABRAMS, 1999). Desta forma, é nítida a relevância terapêutica de compostos metálicos ao longo da História.

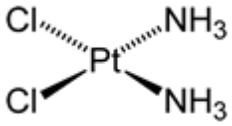
Os metais são elementos químicos que apresentam um conjunto de propriedades únicas, como brilho característico, condutividade térmica e elétrica, alta maleabilidade, elasticidade, ductilidade e resistência à tração. São sólidos à temperatura ambiente, com exceção do mercúrio, e possuem baixa energia de ionização e eletronegatividade (SHIRIVER & ATIKINS, 2003).

Estes elementos apresentam facilidade em perder elétrons, tornando-se cátions, solúveis no meio biológico. A presença de orbitais-d vazios e carga positiva os tornam aptos a interagir com biomoléculas ricas em elétrons (ORVIG & ABRAMS, 1999). Tais propriedades explicam, possivelmente, a relação que os mesmos possuem com muitas funções cruciais no organismo humano. Sabe-se que alguns metais são considerados essenciais para o homem e que a deficiência dos mesmos pode acarretar em desordens (LIPPARD,1994).

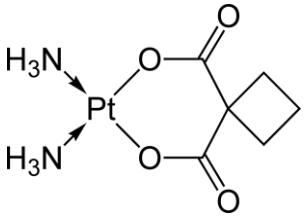
O metal pode atuar como um ácido de Lewis, capaz de receber elétrons e se combinar a outros átomos diretamente, que exercem a função de base de Lewis, doando elétrons (ligantes), formando compostos de coordenação. Esses tipos de compostos baseados em um átomo metálico central permitem planejar uma ampla gama de complexos com características particulares variáveis, como de estado de oxidação, polaridade, reatividade, carga, geometria, simetria, propriedades cinéticas e termodinâmicas que variam de acordo com a natureza do próprio metal e dos ligantes (MEGGERS, 2009). Assim, é possível promover alterações estruturais em um composto metálico a fim de que ele atinja o seu alvo biológico ou de torná-lo adaptável a um determinado objetivo.

A aplicação de compostos de coordenação na terapêutica antitumoral admite ter se iniciado a partir da descoberta ocasional da *cis*-diaminodicloroplatina(II) {cis-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$} por Barnet Rosenberg (1965). Esta molécula que fora inicialmente sintetizada por Peyrone (1844), apenas teve sua atividade biológica desvendada quase um século depois, quando Rosenberg e seus colaboradores estudavam o efeito da corrente elétrica para o crescimento de bactérias (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965). Assim, a cisplatina passou a ser utilizada no tratamento de diversos tipos de tumores (ovário, testículo, cabeça, pescoço, pequenas células de pulmão e não pequenas células de pulmão) (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965). No entanto, apesar do sucesso terapêutico, esta molécula não apresenta seletividade, o que é responsável pelos vários efeitos colaterais que são observados no decorrer do tratamento, que incluem neurotoxicidade, ototoxicidade, problemas renais e anemia, além da possibilidade da quimiorresistência. Neste contexto, novas drogas de platina de segunda e terceira geração foram projetadas visando minimizar estes inconvenientes (Figura 7) (KOSTOVA, 2006).

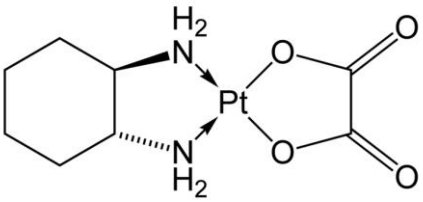
Figura 7 - Estruturas de compostos metálicos antitumorais baseados em platina(II): cisplatina; carboplatina; oxaliplatina; nedaplatina



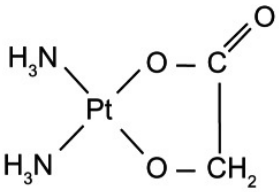
Cisplatina



Carboplatina



Oxaliplatina

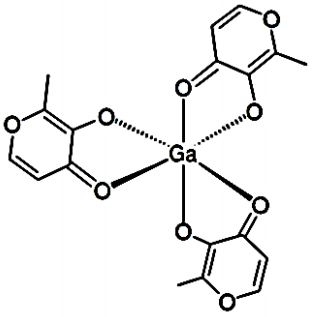


Nedaplatina

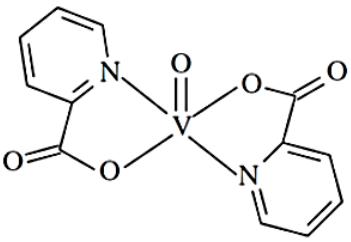
Fonte: (Adaptado) ALI et al, 2013.

Metalofármacos baseados em outros centros metálicos também foram explorados, podendo-se citar o Gáliomaltolato(III) (JAKUPEC, 2008), o Sulfato de Vanadil (AHMAD et al.,2006), bem como o NAMI-A (AIRD et al., 2002; HARTINGER et al, 2006), que apresenta o rutênio como metal central, que já se encontra na fase clínica II (Figura 8).

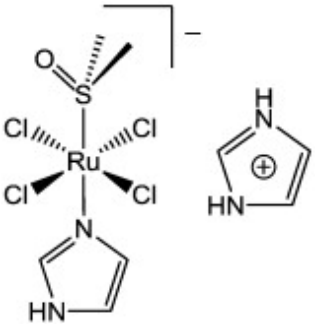
Figura 8 - Compostos de coordenação baseados em outros centros metálicos com propriedades antitumorais



Gáliomaltolato(III)



Sulfato de Vanadil



NAMI-A

Fonte: (Adaptado) PUBCHEM, 2017.

O rutênio se destaca entre os demais metais por possuir um conjunto de características interessantes para aplicação terapêutica, que incluem os seus

diversos estados de oxidação, sendo os mais comuns o Ru(II) e Ru(III). Possui alta seletividade para células malignas e mimetiza o ferro em algumas de suas propriedades, sendo capaz de se ligar à biomoléculas como a albumina e a transferrina (THANGAVEL; VISWANATH; KIM, 2017). Além disso, apresenta geometria de coordenação octaédrica, diferentemente da Platina(II), (quadrada planar), possibilitando a associação a um grande número de ligantes.

Ademais, os complexos de rutênio têm características fotofísicas e fotoquímicas que os tornam bons candidatos para a terapia fotodinâmica e podem ser menos tóxicos que a platina. Um dos motivos, deve-se ao fato de atuar como pró-droga, sendo ativado por redução em regiões de hipóxia, como as que são encontradas em tumores sólidos. O composto KP1019***,*** *trans*-[tetraclorobis(1H-indazol)rutenato(III)] de indazol, por exemplo, é um dos compostos de Ru que foi desenvolvido com resultados promissores e que se encontra em fase II de testes pré-clínicos (JAKUPEC et al., 2008; BERGAMO et al., 2012; THANGAVEL; VISWANATH; KIM, 2017).

O rutênio apresenta inúmeras propriedades que o tornam o metal mais promissor para substituir a platina em aplicações farmacêuticas e biológicas. No entanto, sua atividade depende da sua capacidade de internalização pela célula e da sua sublocalização celular. Portanto, para que se obtenha o sucesso da empregabilidade do metal na terapia do câncer ainda é preciso driblar o problema da baixa eficiência no transporte de suas espécies ativas para os alvos biológicos (THANGAVEL; VISWANATH; KIM, 2017). Algumas alterações possíveis são a utilização de sistemas de liberação, a associação das espécies à anticorpos e a realização de modificações estruturais ao complexo, que facilite a internalização do composto.

Assim, diversos ligantes são passíveis de serem coordenados a complexos de rutênio para garantir que o composto possua características de interesse. Dentre os ligantes permitidos, um que vem recebendo especial atenção é o Óxido Nítrico (NO), dadas as propriedades singulares que o mesmo apresenta.

2.1.4 Óxido Nítrico e câncer

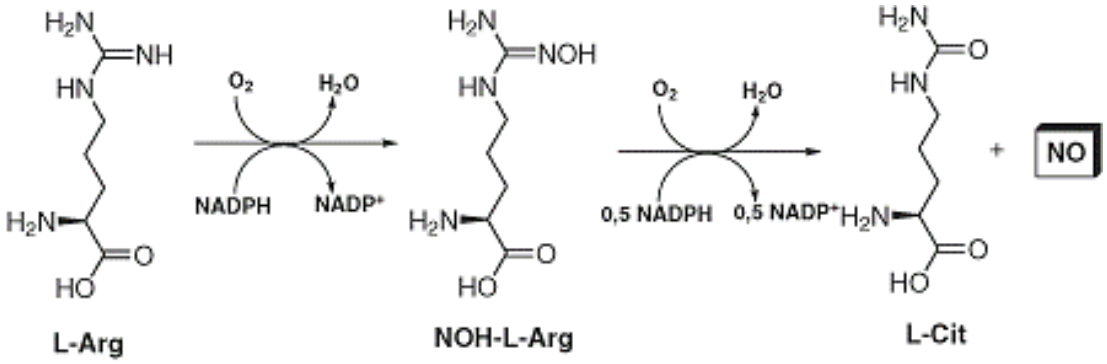
Na década de 80, estudos comprovaram que o Óxido Nítrico é biossintetizado em diferentes células do organismo animal, relacionando-se com inúmeros processos

fisiológicos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; NELLIN & HOFFMAN,1998). O NO é um mensageiro biológico que pode, por exemplo, promover vasodilatação (IGNARRO; 2002), controle cardiovascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI,1980), controle sob o fluxo sanguíneo cerebral (XU & LIU, 1998) e atuar como mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987).

Ele é produzido a partir da oxidação do aminoácido L-arginina catalisada pela enzima NO sintase, a qual se apresenta em três isoformas: constitutiva endotelial (eNOS), constitutiva neuronal (nNOS) e a isoforma induzível pelo sistema imunológico (iNOS) (CULOTTA & KOSHLAND, 1992; QUEIROZ & BATISTA, 1999; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). A reação de produção de NO ocorre em duas etapas. Tratam-se de heme-oxidações que envolvem cinco elétrons ao todo. Nestes processos há participação da forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), que atua como um doador de elétrons, além do oxigênio molecular e de outros cofatores. Contudo, é importante ressaltar a dependência de um cofator adicional para as enzimas nas isoformas constitutivas (eNOS e nNOS): a calmodulina, que sob altas concentrações de cálcio, se liga à enzima NOS e a ativa.

O resultado final é a conversão de L- arginina em L-citrulina e NO (Figura 9) (CULOTTA & KOSHLAND, 1992; QUEIROZ & BATISTA, 1999; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005; CHOUDHARI et al., 2013).

Figura 9 - Biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina catalisada pela NO-sintase

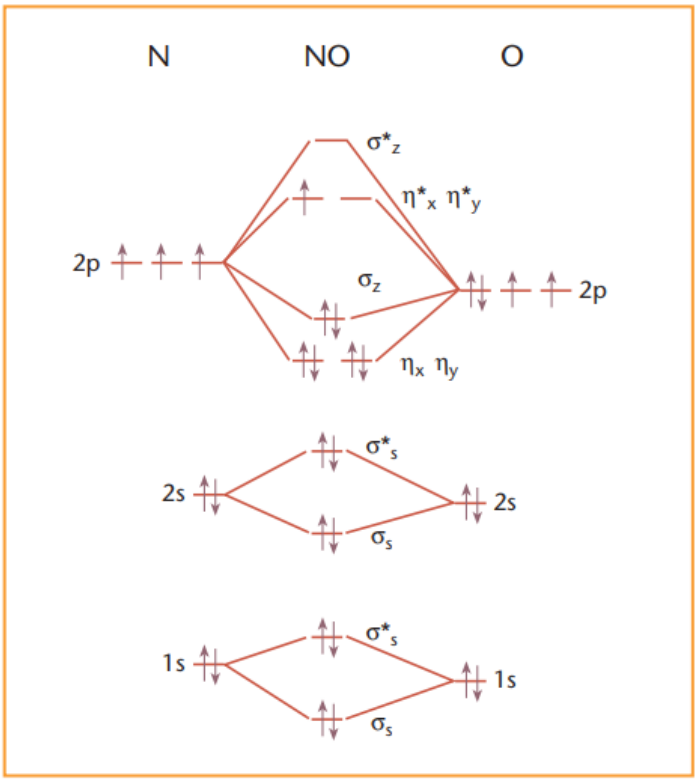


Fonte: (Adaptado) BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005.

O NO é um gás que apresenta baixa solubilidade em água (1,90 mM) a 25 ºC. Com massa molecular 30,0000 g mol^{-1}, é a menor e mais leve molécula conhecida a atuar como mensageiro biológico em mamíferos (CULOTTA; KOSHLAND, 1992).

Trata-se de uma molécula neutra paramagnética, ou seja, apresenta uma configuração eletrônica com um elétron desemparelhado em um orbital pi antiligante (π*): $(\sigma 2s)^2$ $(\sigma 2s^*)^2$ $(\sigma 2pz)^2$ $(\pi 2p)^4$ $(\pi 2p^*)^1$ (Figura 10). Devido a esse elétron desemparelhado, o NO apresenta ordem de ligação correspondente a 2,5 ligações e comprimento de ligação de 1,15 Å, o valor intermediário entre uma ligação dupla e uma ligação tripla. Por isso o NO tem facilidade em reagir de maneira bastante rápida com moléculas paramagnéticas, tais como o oxigênio molecular (O_2) e o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) ou se complexar a metais visando estabilizar o elétron desemparelhado (QUEIROZ & BATISTA, 1999; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

Figura 10 - Representação esquemática do Diagrama de Orbital Molecular do NO

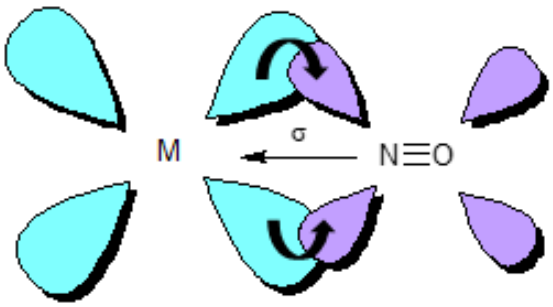


Fonte: CENTELLES, J.J.; ESTEBAN, C.; IMPERIAL S., 2004.

O óxido nítrico se liga de maneira estável ao metal devido à doação de densidade eletrônica do NO para o metal envolvendo orbitais do tipo σ. Eventualmente, dependendo do íon metálico, há doação de densidade eletrônica do orbital dπ do metal para o orbital π* do NO (dπ (M) → π* (NO)), caracterizando uma retrodoação (Figura 11). A intensidade da retrodoação pode ser afetada pela estrutura do complexo e pelo efeito eletrônico dos coligantes.

Em geral, a ligação do NO ao metal pode ser feita através do átomo de nitrogênio (M-NO) (forma nitrosil). No entanto existe uma segunda forma menos comum (forma isonitrosil) pela qual o NO se liga ao metal pelo átomo de oxigênio (M-ON) (MCCLEVERTY et al., 2004).

Figura 11 - Representação esquemática dos orbitais moleculares envolvidos na ligação entre um metal e um ligante nitrosil



Fonte: (Adaptado) RICTHER-ADDO; 1992.

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica normalmente utilizada para caracterizar complexos nitrosilos através da banda de estiramento NO [ν(NO)] (MCCLEVERTY et al., 2004).

Como pode ser observado na Tabela 1, a frequência do estiramento NO é aproximadamente 1870 cm^{-1}, mas essa energia vibracional pode ser influenciada pela intensidade da retrodoação, da carga do complexo, da natureza dos coligantes e pela estereoquímica, que pode ser linear ou *bent*. Geralmente, complexos com ligações entre (M-N-O) lineares apresentam uma frequência de estiramento entre 1950-1450 cm^{-1} e os com ligação *bent*, entre 1720-1400 cm^{-1} (BATISTA et al.,1997; FORD et al.,1998).

Tabela 1 - Propriedades do Óxido Nítrico

Molécula	Número de oxidação do N	Comprimento da ligação	Estiramento NO ν(NO) (cm^{-1})
Cátion Nitrosônio (NO^+)	+ 3	1,06	2377
Óxido nítrico ($NO^{\cdot}$)	+ 2	1,15	1875
Ânion nitróxido (NO^-)	+ 1	1,26	1470

Fonte: (Adaptado) BECKMAN & KOPPENOL, 1996.

Suas funções, bem como toxicidade podem ser explicadas devido ao seu elétron desemparelhado (FUKUTO & IGNARRO,1997).

Existe, aparentemente, uma relação entre os efeitos mediados pelo NO e o microambiente. Deste modo, observa-se um efeito antagônico do NO no que tange a biologia de tumores, admitindo-se que baixas concentrações de NO estimulam a proliferação de células tumorais e altas concentrações propiciam a atividade tumoricida (RIDNOUR et al., 2006). Desta forma, cabe destacar que a resposta celular observada, depende da localização da molécula radicalar, da duração da exposição e da sua concentração (RIDNOUR et al., 2008; THOMAS *et al*, 2008).

Estudos sugerem que, concentrações de NO entre 1 e 30 nM estão relacionadas a efeitos diretos, em que ocorre a promoção da angiogênese e proliferação de células endoteliais. Em concentrações entre 30 e 100 nM ocorre um aumento acentuado da proteína quinase B, (Akt), que fosforila enzimas relacionadas ao processo apoptótico, dentre as quais encontra-se as enzimas quinases reguladas por sinal extracelular, (ERK), do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Kinases*, que sinaliza para uma resposta proliferativa e anti-apoptótica em células tumorais. Por volta de 100 nM, o Fator Induzido por hipóxia-1-α, (HIF-1-α), do inglês, *Hipoxia Inducible Factor-1-α*, é estabilizado aumentando assim o fator de crescimento do endotélio vascular, (VEGF), do inglês, *Vascular Endotelial Growth Fator*, ocasionando proliferação celular. Assim, nestes três níveis de concentração de NO, observa-se proliferação e proteção das células tumorais (RIDNOUR et al., 2008). Por outro lado, altas concentrações de NO, acima de 300 nM podem aumentar a fosforilação do gene supressor tumoral p53 e, assim, desencadear efeitos citostáticos ou apoptóticos (THOMAS et al; 2004). Isso ressalta a importância da modulação de parâmetros como

concentração, velocidade e local de liberação para que se possa observar o efeito de interesse quanto à aplicação desta molécula em terapias antitumorais.

Assim, compostos podem ser desenhados a fim de promover a liberação de NO de maneira controlada e no sítio de interesse, minimizando a ocorrência de efeitos indesejáveis comumente evidenciados. Compostos de coordenação são bastante promissores devido a sua elevada estabilidade. Dentre estes compostos, destacam-se os complexos rutênio-nitrosilos. Eles possuem características interessantes capazes de promover a liberação de NO mediante estímulo eletroquímico ou fotoquímico (TFOUNI et al., 2012). Complexos dessa natureza, geralmente possuem potencial citotóxico relevante, mas ainda, apresentam espaço restrito na literatura em relação às estruturas celulares às quais se associam, o que revela a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisa nesse sentido.

Com o propósito de possibilitar uma maior compreensão acerca destas questões, uma das técnicas que se tem explorado é a microscopia. Para entender a bioquímica e os processos envolvidos nos diferentes eventos celulares, como a apoptose, a necrose e as neoplasias, é muito importante visibilizar as estruturas e compartimentos subcelulares abrangidos. Mas, apenas sob à luz da microscopia não é possível fazer uma detecção direta de compartimentos subcelulares (AZZAZY; MANSOUR; KAZMIERCZAK, 2006). Assim, com os avanços obtidos na microscopia de fluorescência, bem como o desenvolvimento de sondas e marcadores de proteínas fluorescentes foi possível a compreensão do funcionamento da dinâmica celular (MICHALET et al., 2005).

2.2 Aplicação da Fluorescência no câncer

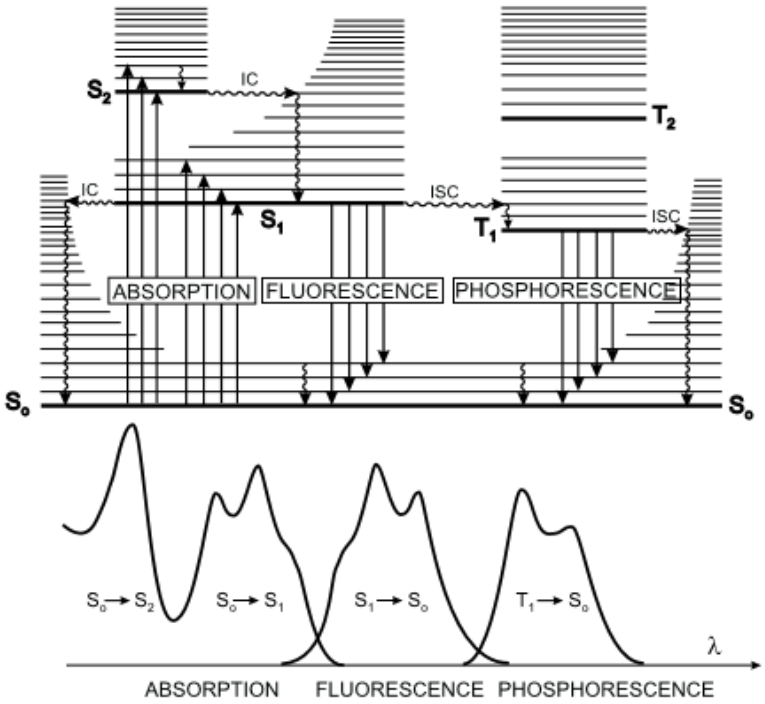
2.2.1 Introdução à Fotoquímica

Luminescência é a emissão de fótons por substâncias que foram eletronicamente excitadas. Também conhecida como luz fria em oposição ao processo de incandescência, ela pode ser de vários tipos, de acordo com a fonte de excitação: radioluminescência, catodoluminescência, eletroluminescência, termoluminescência, quimioluminescência, triboluminescência, sonoluminescência e fotoluminescência. Quando a espécie atinge um estado eletrônico excitado pela absorção de um fóton, acompanhado pela desativação e emissão de luz, constitui-se

um caso particular da luminescência, a Fotoluminescência (VALEUR, 2012). Dependendo da natureza do estado excitado, ela pode se subdividir em fluorescência ou fosforescência.

Para explicar a diferença na natureza destes processos, recorre-se novamente ao diagrama de Jablonski (Figura 12), uma ferramenta que ilustra os mecanismos envolvidos na absorção e emissão de luz (Tabela 2) (JABLONSKI et al., 1933).

Figura 12 - Representação esquemática do Diagrama de Jablonski



Fonte: VALEUR, 2012.

Tabela 2 - Tempo característico envolvido nos processos fotofísicos

Processo	Tempo característico (s)
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	10^{-12} - 10^{-10}
Tempo de vida no estado excitado S1	10^{-10} - 10^{-7}
Cruzamento intersistema	10^{-10} - 10^{-8}
Conversão interna	10^{-11} - 10^{-9}
Tempo de vida do estado excitado T1	10^{-6} - 10^{0}

Fonte: VALEUR, 2012.

O processo em que uma molécula no estado fundamental (S_0) absorve um fóton e é excitada para um estado de nível vibracional mais energético (S1, S2,...,Sn) é chamado absorção. Esse processo geralmente ocorre rapidamente e dura cerca de 10^{-15} s. Os subsequentes caminhos de desativação possíveis são: a relaxação vibracional, a conversão interna (CI), a fluorescência, o cruzamento intersistema (CIS), a fosforescência, a fluorescência atrasada e as transições tripleto-tripleto (VALEUR, 2012). Esses processos podem ser divididos em radiativos e não radiativos. Entre os não radiativos, inclui-se a relaxação vibracional, na qual a desativação pode ocorrer através de colisões entre a molécula excitada e o solvente. Os processos isoenergéticos não radiativos que ocorrem entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin são conhecidos por conversão interna (CI). Por outro lado, aqueles que ocorrem com inversão do spin eletrônico são chamados de cruzamento intersistema (CIS) (LAKOWICZ, 2013).

Como citado anteriormente, a fotoluminescência é um processo radiativo que contempla a fluorescência e a fosforescência. Na fluorescência, um elétron ao ser excitado é promovido para um estado excitado singleto (Sn) de nível mais energético. Durante o processo de desativação há perda de energia, voltando para o estado fundamental (S_0), sem inversão de spin e com um tempo de vida médio de nanossegundos (10^{-9} s) (VALEUR, 2012). A fosforescência, em contrapartida, é um processo em que a emissão de um fóton provém do retorno do elétron do estado excitado tripleto (T_1, T_2,...,T_n) para o estado fundamental singleto, havendo, portanto, alteração na orientação do spin. Parte da energia gasta é para esta finalidade, por conseguinte, a fosforescência tem uma ordem de emissão que varia de milissegundos a segundos (10^3 a 10^2 s), sendo mais lenta que a fluorescência. Essa disparidade esclarece a dissemelhança entre fluorescência e fosforescência: na fluorescência, a emissão de luz, desaparece com o fim da excitação. Comparativamente, na fosforescência, a emissão persiste, mesmo após o fim da excitação. (WINNISCHOFER, 2010; VALEUR, 2012; LAKOWICZ, 2013).

2.2.2 Fluoróforos

Fluoróforos são substâncias que apresentam fluorescência. Esta propriedade se relaciona à insaturações em sistemas planares que formam longos sistemas π conjugados (MIKHEEV; GUSEVA; ERSHOV, 2010; LAKOWICZ, 2013). Alguns

exemplos de fluoróforos comuns são os metais Tb^{3+} e Eu^{3+} (RICHARDSON,1982), as cumarinas, (SETHNA & SHAH, 1945), as cianinas (DOJA, 1931), o naftaleno, (STRYER, 1945); os poliaromáticos cíclicos (RODRÍGUEZ & SANZ, 2000), a fluoresceína e a rodamina B. A quinina, um composto presente na água tônica, foi o primeiro fluoróforo a ser estudado e foi crucial para o desenvolvimento dos primeiros espectrofluorímetros em 1950 (LAKOWICZ, 2013).

Os principais parâmetros calculados de um fluoróforo são o tempo de vida e o rendimento quântico de fluorescência. O tempo de vida de um fluoróforo é a média de tempo que ele passa no seu estado excitado antes de retornar ao seu estado fundamental. Como as transições radiativas podem competir com as não radiativas, os fótons que foram absorvidos podem não resultar em emissão, por isso o parâmetro rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F), relaciona o número de fótons que são emitidos e o número de fótons que são absorvidos por uma substância (Equação 1). Quanto maior é o valor desta razão, ou seja, mais próximo de um (1,0), mais brilhante é o fluoróforo (VALEUR, 2012; LAKOWICZ, 2013).

$$\phi_F = \frac{\text{número de fótons}_{\text{emitidos}}}{\text{número de fótons}_{\text{absorvidos}}} \quad (1)$$

Contudo, agentes supressores podem influenciar a fluorescência e sua intensidade pode ser reduzida através de supressões dinâmicas ou estáticas. Na supressão dinâmica ou colisional, as moléculas do supressor colidem com as moléculas fluorescentes no estado excitado, resultando em desativação por uma via não radiativa. Aminas, halogênios e o oxigênio, por exemplo, podem atuar como supressores dinâmicos. Nesse tipo de supressão não ocorre reação fotoquímica. Na supressão estática, no entanto, um complexo não fluorescente no estado fundamental é formado entre o agente supressor e a molécula do fluoróforo (LAKOWICZY, 2013).

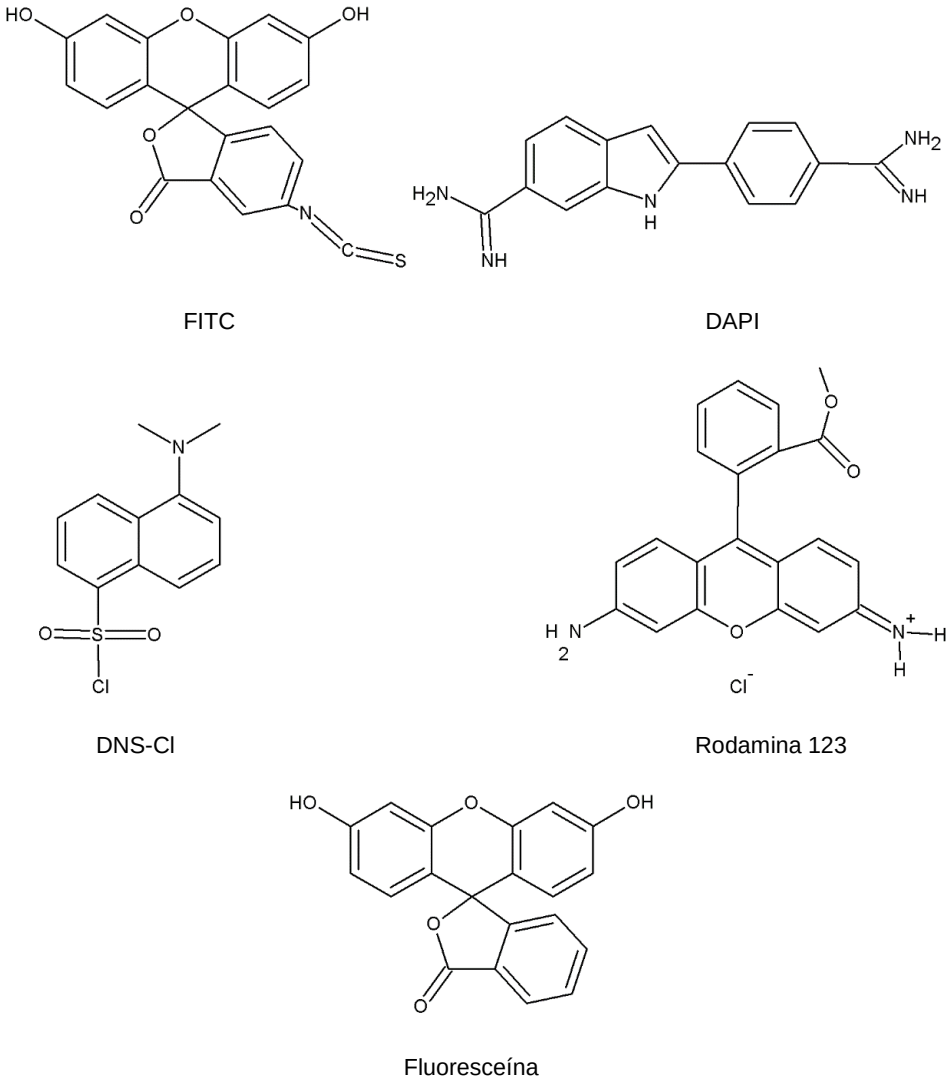
Os fluoróforos podem ser classificados em intrínsecos ou extrínsecos. Intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente, como o caso do aminoácido triptofano. (LAKOWICZ, 2013). Os fluoróforos extrínsecos exercem função de sonda, sendo aplicados a uma amostra com a intenção de lhe atribuir propriedades espectrais desejadas.

Existe uma infinidade de moléculas particularmente interessantes que atuam como sondas fluorescentes. A Tetrametil rodamina, a Rodamina 123, o *Mitotracker*

Red e o *Mitotracker Deep Red*, por exemplo, são sondas úteis no acompanhamento de eventos apoptóticos pela via intrínseca, através da abertura dos poros de transição mitocondriais. O DPH (difenilhexatrieno), um marcador de membrana, e o DAPI (4',6-diamidino-2-fenolindol), um marcador de núcleo, também são muito utilizados em práticas laboratoriais. O Cloreto de Dansyl DNS-Cl (cloreto de 1-dimetilamino-5-naftilsulfonilo) e o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), por sua vez, são uma das sondas mais conhecidas e utilizadas (Figura 13).

A utilização de sondas viabiliza o acompanhamento de eventos celulares, bem como a localização de estruturas intracelulares e a internalização de compostos em sítios específicos (LAKOWICZ, 2013).

Figura 13 - Principais sondas reativas para conjugação com macromoléculas



Fonte: (Adaptado) PUBCHEM, 2017.

Para microscopia de fluorescência, a principal característica desejada no fluoróforo é a fotoestabilidade. A maioria dos fluoróforos, como a fluoresceína, sofrem fotobranqueamento, ou seja, perda na intensidade de emissão da fluorescência sob irradiação contínua. Ressalta-se que a fotoestabilidade pode sofrer influências do ambiente. A remoção de átomos de oxigênio, por exemplo, pode acarretar em aumento, diminuição ou não afetar a fotoestabilidade. (LAKOWICZ., 2013).

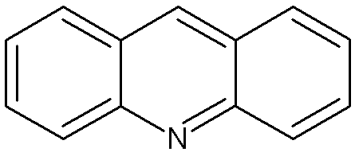
A fluorescência pode ser uma ferramenta útil em muitas áreas e vem sendo extensivamente explorada em citometria de fluxo, biotecnologia, sequenciamento de DNA, análise genética e em diagnósticos médicos. É uma técnica com alta sensibilidade, que atualmente experimentou grande crescimento para obtenção de imagens celulares e moleculares. A imagem de fluorescência pode permitir, ainda, revelar a localização e as medidas de moléculas intracelulares, às vezes com um grau de detalhamento a nível de detecção de uma única molécula (LAKOWICZ, 2013).

Dentre os fluoróforos existentes, um de grande destaque que vem sendo estudado, desde o início do século XX, é o Alaranjado de Acridina (AO) (MANCINI & D'ANTUONO, 1955; KUSUZAKI et al., 2017; KUSUZAKI et al., 2018).

2.2.3 Alaranjado de Acridina

A Acridina (Figura 14) é um composto heteroaromático que foi descoberto em 1870 por Graebe e Caro.

Figura 14 - Fórmula estrutural da Acridina



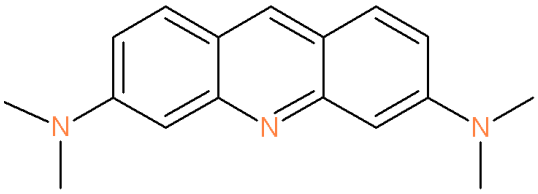
Fonte: (Adaptado) PUBCHEM, 2017.

O composto é uma das frações aromáticas do alcatrão do carvão. Esta impureza contendo um anel antraceno fora nomeada Acridina, devido ao seu efeito cortante sobre a pele. Atualmente, as Acridinas constituem um grande grupo de cerca de 48 estruturas, de acordo com a RCSB PDB (Research Colaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank, 2015), que apresentam em comum o esqueleto de

Acridina (2,3 benzoquinolina). Algumas destas estruturas se relacionam com diversas propriedades medicinais como antineoplásicas, antimaláricas e antissépticas. (JEŽEK; HLAVÁČEK; ŠEBESTÍK, 2017).

O Alaranjado de Acridina (AO) (Figura 15), cuja nomenclatura preferencial da IUPAC é N, N, N', N'-Tetrametil 1-3,6-acridinadiamina, de massa molecular 265,3500 g mol^{-1}, é um composto heterocíclico da família das acridinas (IARC MONOGRAPH, 1978).

Figura 15 - Estrutura do corante Alaranjado de Acridina



Fonte: (Adaptado) PUBCHEM, 2017.

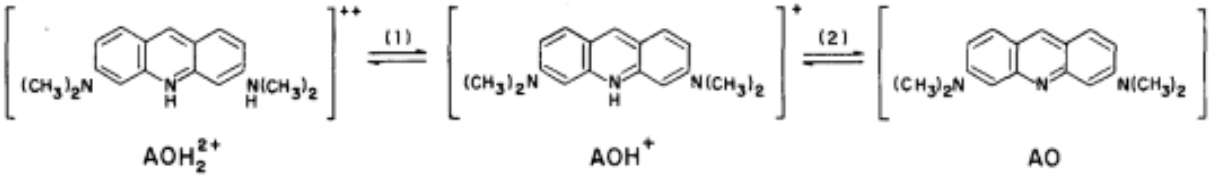
Descoberto na Alemanha, no século XIX (ACHESON, 1973; IARC MONOGRAPH,1978; KUSUZAKI et al., 2017), foi muito utilizado como corante de tecidos (NEUMANN & TIERA, 1993); gorduras, ceras e óleos (IARC MONOGRAPH, 1978).

Um dos métodos empregados para obtenção do corante consiste na reação de nitração de 4,4'-metileno bis- (N, N-dimetilanilina) para obtenção de 4,4'-metileno bis- (N, N-dimetil-1-3-nitroanilina), seguida pela redução, ciclização e oxidação da molécula (IARC MONOGRAPH, 1978).

O nitrogênio que a molécula apresenta atua como um forte potencial sítio de ligação para coordenação a metais. Isso pode ser útil na elaboração de complexos octaédricos que atuem como metalointercaladores e que apresentem atividade citotóxica aprimorada frente a linhagens celulares neoplásicas (CRISPINI et al., 2003).

Quanto às propriedades físico-químicas, o AO é um corante catiônico que atua como uma base fraca (KORGAONKAR & SUKHATANKAR, 1963; FALCONE et al., 2002). Dois valores de constantes de equilíbrio foram determinados para o Alaranjado de Acridina a 20 ºC: $pK_1 = 1,26$; $pK_2 = 10,45$ (SABADINI et al.,1994) (Figura 16).

Figura 16 - Equilíbrio químico entre as formas do Alaranjado de Acridina



Fonte: (Adaptado) Sabadini et al., 1994.

Outra característica que torna o AO ainda mais atrativo para os estudos biológicos é a metacromasia, ou seja, a propriedade de alterar a cor emitida dependendo de qual estrutura celular o composto está ligado (KAPUCINSK; DARZYNICIEWICZ; MELAMED, 1983). Sendo assim, quando ligado ao RNA (KAPUSCINSKI; DARZYNICIEWICZ, 1984; VON BERTALANFFY; MASIN; MASIN, 1958) e lisossomos, o AO emite fluorescência em tons de vermelho e laranja (KUSUZAKI et al., 2017) e quando ligado ao DNA nuclear, nucléolo, fibrilas de tecido conjuntivo e estruturas epiteliais cornificadas, apresenta fluorescência verde (VON BERTALANFFY; MASIN; MASIN, 1958). Estudos revelam que o AO não se liga a outras organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático ou complexo de Golgi (KUSUZAKI et al., 2017).

A metacromasia para muitos corantes orgânicos é produto da redistribuição das cargas através do sistema cromóforo. No entanto, a concentração do corante também é um fator determinante na produção de novas cores. A solução aquosa do AO é monocatiônica quando diluída e contém apenas monômeros, mas à medida que a concentração de AO é aumentada, é possível observar o aparecimento de agregados: dímeros, trímeros e oligômeros (PALMGREN, 1991). Monômeros de AO exibem fluorescência verde, enquanto dímeros exibem fluorescência laranja (KUSUZAKI et al., 2017).

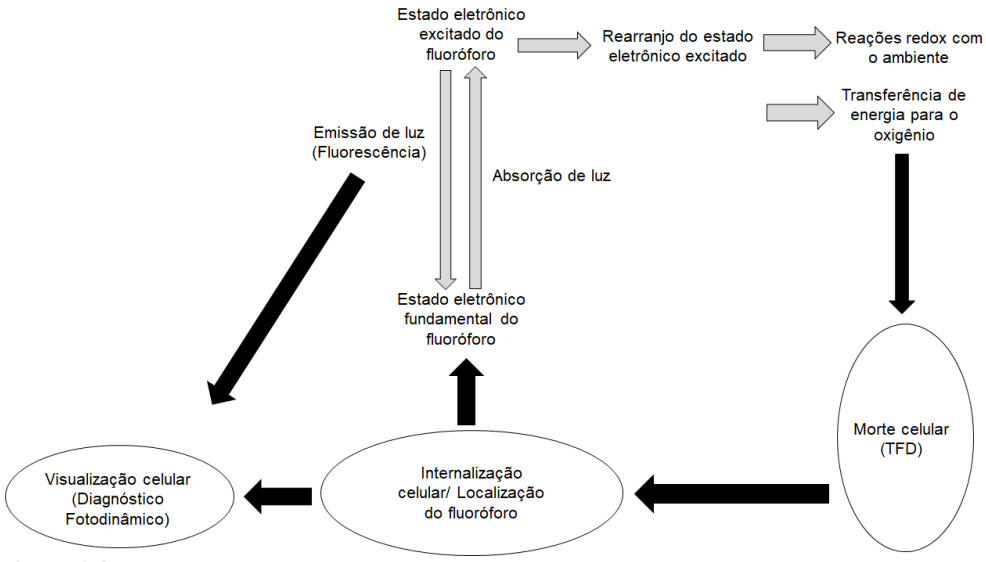
Quanto à sua utilização, o Alaranjado de Acridina começou a ser explorado inicialmente em materiais histológicos por Strugger (VON BERTALANFFY; MASIN; MASIN, 1958). No entanto, devido às suas características particulares interessantes, em pouco tempo seu uso ampliou-se para diversas áreas da biologia e da medicina. Algumas das aplicações relevantes deste fluorocromo são: a detecção de micro-organismos em espécimes clínicos (GIORGIO et al.,1989); contagem diferencial de células (MELAMED, 1972); avaliação da atividade espermática (KUSUZAKI et al., 2017); utilização para verificação da atividade clastogênica de compostos químicos

ambientais (teste do micronúcleo) (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE; 1983) e realização de medidas de gradiente de pH através da membrana (PALMGREN, 1991; KUSUZAKI et al., 2017).

Essa espécie planar consegue se intercalar com o DNA (SHCRERER, 2000; LAKOWICZ, 2013) e por isso, também pode ser usada como sonda fluorescente, possuindo alta afinidade por DNA e RNA (CAO et al, 1998; BI et al., 2006). Apresenta atividade antitumoral e potencialmente teranóstica, penetrando rapidamente nas células e se localizando preferencialmente em sítios e compartimentos ácidos como as células tumorais, tornando-se uma droga mais seletiva às células malignas (KORGAONKAR & SUKHATANKAR, 1963; KUSUZAKI et al., 2012; KUSUZAKI et al., 2017).

Na terapia contra o câncer, uma das possibilidades iminentes é a associação entre a ação terapêutica de um fluoróforo e a alta capacidade fluorescente exibida pelo mesmo, possibilitando, não somente, a delimitação da lesão, bem como o tratamento da mesma (efeito teranóstico). A capacidade de promover a ativação do fluoróforo por meio do estímulo luminoso juntamente com a tendência apresentada pelos mesmos de atuar sob componentes celulares específicos tornam esses compostos extremamente atrativos para que se alcance terapias cada vez mais específicas e efetivas, ampliando as chances de sucesso terapêutico (WAINWRIGHT, 2003) (Figura 17).

Figura 17 - Aplicação de fluoróforos na terapia antitumoral



Fonte: (Adaptado) WAINWRIGHT, 2003.

Um estudo realizado pelo grupo de KUSUZAKI et al. (2007), demonstra que o AO apresenta aplicabilidade como um fotossensibilizador na terapia fotodinâmica quando excitada com luz azul e na terapia com raios-X. O estudo revelou acúmulo seletivo de composto em células de sarcomas músculos esqueléticos humanos, especialmente em lisossomos. A fluorovisualização apresentada é uma ferramenta útil para a detecção de tumores em processos cirúrgicos e, além disso, a terapia foi suficiente para inibir o tumor local, sendo um fotossensibilizador mais econômico e eficiente que outros disponíveis atualmente, como a Hematoporfirina, por exemplo (KUSUZAKI et al., 2007; KUSUZAKI et al., 2012).

É preciso considerar o conhecido potencial mutagênico do AO (ZAMPIER & GREENBERG, 1965; KAPUSCINSKI; DARZYNICIEWICZ; MELAMED, 1983; KUSUZAKI et al., 2012; AMADO et al., 2017), no entanto, ainda há dúvidas acerca da sua carcinogenicidade. A IARC, Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, classifica o AO no grupo 3, ou seja, grupo ao qual as substâncias pertencentes não possuem carcinogenicidade classificável para humanos (IARC, 2017). Os estudos realizados em animais foram inconclusivos e insuficientes para avaliação da carcinogenicidade do composto. (IARC MONOGRAPH, 1978).

Com base na relevância desse fluoróforo, considerou-se pertinente utilizá-lo para a obtenção de um complexo de rutênio com propriedades teranósticas.

Hipótese

3 HIPÓTESE

O novo complexo desenvolvido seria um potencial foto-quimioterápico, além de permitir a avaliação da sublocalização celular por imagem. Esta espécie baseada em um composto de rutênio apresentaria, em geral, baixa toxicidade e propriedades fotoquímicas interessantes, possibilitando a sua utilização como foto-fármaco.

Justificativa

4 JUSTIFICATIVA

Como observado, o NO exibe capacidade de mediar múltiplos processos fisiológicos distintos, podendo influenciar na diminuição do crescimento tumoral, de maneira dose-dependente (RIDNOUR et al., 2008). Por consequência, é grande a busca por complexos que possam atuar como agentes doadores de NO. Compostos rutênio-nitrosilos, sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Silva, tiveram suas propriedades citotóxicas avaliadas e descritas. O controle da liberação de NO é conseguido principalmente por ação redutimétrica de agentes exógenos.

O papel exercido pelo ligante bipiridina na cinética de liberação de NO em espécies do tipo *cis*-$[Ru(bpy)_2(L)(NO)]^{+3}$ foi extensivamente estudado. Estas pesquisas mostraram que o efeito citotóxico observado parece ser dependente da estrutura molecular (CARNEIRO et al, 2011). Baseado nesta relação, é que se aventou a possibilidade de modificação estrutural do complexo rutênio-nitrosilo visando maior atuação do mesmo nas linhagens de células tumorais em estudo.

Ademais, um dos principais objetivos iminentes em terapia anticancerígena consiste no desenvolvimento de compostos que possam, ao mesmo tempo, ter ação citotóxica e emitir imagem celular. Certamente, isto permitiria o acompanhamento da sublocalização celular do composto e, consequentemente, ter um parecer em tempo real da eficiência da técnica.

Objetivos

5 Objetivos

5.1 Objetivos gerais

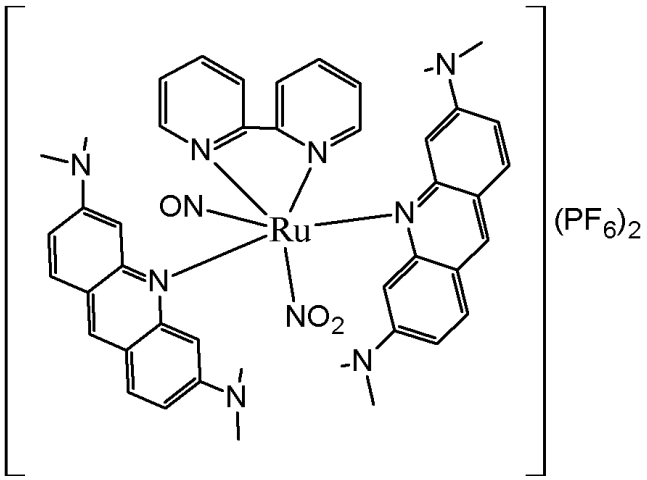
Com base nas considerações realizadas, o presente projeto tem como objetivo geral desenvolver um composto doador de óxido nítrico com a propriedade de emitir luminescência. Também serão abordados aspectos relacionados ao potencial citotóxico deste tipo de composto doador de NO acompanhado por microscopia de fluorescência.

5.2 Objetivos Específicos

Aspectos Químicos:

- Síntese e purificação do complexo rutênio-nitrosilo: *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$ (Figura 18);

Figura 18 - Estrutura do complexo proposto *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$



Fonte: Autora.

- Caracterização espectroscópica do composto *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$ por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta Visível (UV-vis), espectroscopia vibracional na região do infravermelho e espectrometria de massas;

- Estudo das propriedades fotoquímicas e fotofísicas do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$: Avaliação do perfil de liberação de NO e da capacidade de produção de oxigênio singleto a partir de fotoestímulo;
- Cálculo dos parâmetros relativos à fluorescência, como o rendimento quântico de fluorescência e fotoestabilidade para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)$ e para o AO.

Aspectos Biológicos em células de melanoma murino (B16/F10) e fibroblasto murino (L929):

- Avaliação do potencial citotóxico *in vitro* do composto *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$ e do ligante AO: Análise da influência da concentração e da irradiação nos resultados de viabilidade celular.
- Análise da sublocalização celular do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$ e do ligante AO por microscopia de fluorescência e por microscopia confocal.

Materiais e Métodos

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Reagentes e solventes

A Tabela 3 apresenta os reagentes e solventes utilizados na etapa de síntese e caracterização dos complexos.

Tabela 3 - Lista de reagentes e solventes utilizados na síntese e caracterização dos complexos

REAGENTE / SOLVENTE	PUREZA	MARCA
Acetona	99,5 %	Synth
Acetonitrila	99,5 %	Synth
Ácido Hexafluorofosfórico	~65,0 %	Sigma Aldrich
Alaranjado de Acridina	75,0 %	Sigma Aldrich
Argônio	99,9 %	White Martins
Azida de Sódio	99,0 %	Sigma Aldrich
Cloreto de rutênio(III)	99,9 %	Strem Chemicals
1,2 Dicloroetano	99,0 %	Synth
2,2’ Dipiridil	99,0 %	Acrós Organics
Dimetilsulfóxido (DMSO)	99,7 %	Synth
Etanol	99,5 %	Synth
Éter etílico	---	Synth
Metanol	99,0 %	Synth
Nitrito de sódio	99,4 %	Sigma Aldrich
N,N-Dimetilformamida (DMF)	99,8%	Sigma Aldrich

Fonte: Autora.

Os solventes foram secos de acordo com método padrão. Água destilada foi obtida por Sistema MiliQ (Milipore Corp).

6.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$

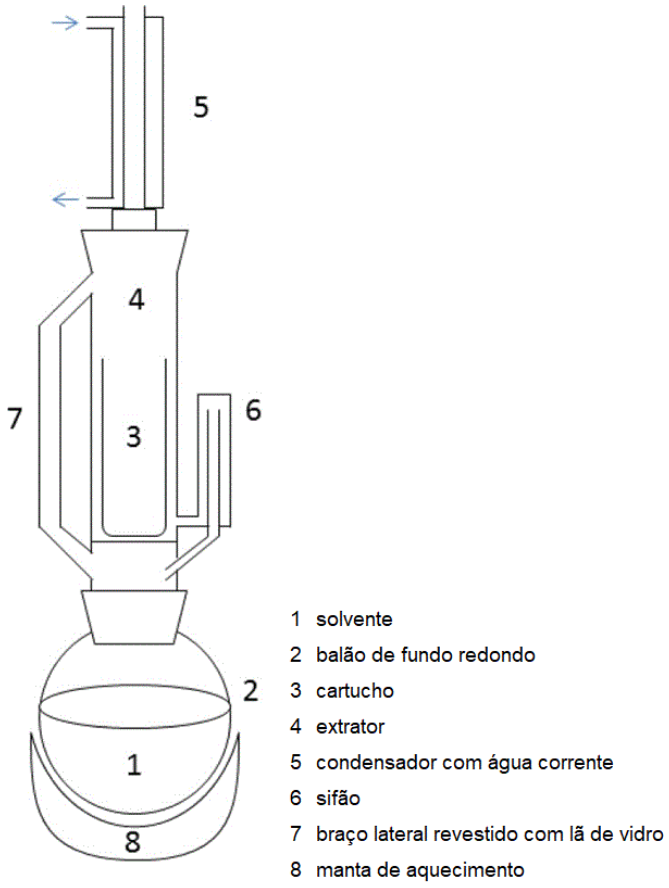
6.2.1 Síntese do complexo *cis*-[Ru(Cl)$_2$(DMSO)$_4$] MM= 484,51 g mol^{-1}

O composto *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)NO](PF_6)$_2$, inédito na literatura, foi sintetizado por meio de quatro etapas reacionais. A primeira etapa consiste na obtenção do precursor *cis*-[$RuCl_2$(DMSO)$_4$]. Este precursor foi sintetizado conforme proposto na literatura (EVANS; SPENCER; WILKINSON, 1973). Adicionou-se 1,4000 g (0,0053 mol) de $RuCl_3 \cdot n\ H_2O$ a um balão de 25,0 ml de 3 bocas com 10,0 ml de DMSO sob atmosfera de argônio. Manteve-se a mistura sob refluxo a 160,0 °C por 15 minutos. Ao final da reação, filtrou-se o produto obtido, lavando-se com porções de acetona. Obteve-se o sólido amarelo *cis*-[$RuCl_2$(DMSO)$_4$]. Rendimento: 84,1 %; 2,2000 g (0,0045 mol), $\lambda_{máx}$ = 314; 360 nm.

6.2.2 Síntese do complexo *cis*-[$RuCl_2$(AO)$_2$(DMSO)$_2$] MM= 858,95 g mol^{-1}

Adicionou-se 0,5000 g (0,0010 mol) de *cis*-[$RuCl_2$ (DMSO)$_4$] a um balão de 3 bocas de 100,0 ml com 60,0 ml de 1,2 dicloroetano. Após total solubilização do precursor, adicionou-se 0,6800 g (0,0025 mol) de Alaranjado de Acridina. Manteve-se a mistura sob refluxo e atmosfera inerte por 3 horas e, em seguida, por mais 24 horas a 55 ºC. Após a reação, adicionou-se éter até se observar turvação. Reservou-se em geladeira até precipitar e realizou-se a filtração, obtendo-se o sólido *cis*-[$RuCl_2$(AO)$_2$(DMSO)$_2$]. Submeteu-se o sólido ao sistema de purificação em soxhlet (Figura 19) com éter etílico por 48 horas para eliminar parte do excesso de Alaranjado de Acridina.

Figura 19 - Sistema extrator soxhlet



Fonte: (Adaptado) REDFERN, J. et al.; 2014.

6.2.3 Extração por soxhlet

Essa técnica de extração é ideal para o recolhimento de impurezas que se solubilizam em um solvente onde o composto tem solubilidade limitada. Para a remoção do excesso de AO, todo o complexo *cis*-[$Ru(Cl)_2(AO)_2(DMSO)_2$] obtido foi colocado em um papel de filtro e posicionado sobre compartimento correspondente a um dedal (3). O solvente éter etílico foi adicionado a um balão de fundo redondo (1) e levemente aquecido com uma manta térmica (8). O vapor do solvente atingiu o braço de destilação (7) e encontrou o composto que estava no cartucho, solubilizando o excesso de AO. Quando a câmara se acumulou de solvente, este escorreu pelo sifão (6) e retornou para o balão de destilação. Após 48 horas de extração, o cartucho contendo o composto foi retirado e deixado secando à vácuo no dessecador. Em seguida, pesou-se a massa obtida. Rendimento: 81,8 %; 0,5000 g (0,00059 mol).

6.2.4 Síntese do complexo *cis*-[$RuCl_2(AO)_2$(bpy)] MM= 858,86 g mol^{-1}

Adicionou-se 0,2400 g (0,00028mol) do sólido *cis*-[$RuCl_2(AO)_2(DMSO)_2$] a um balão de 3 bocas de 50,0 ml com 30,0 ml de DMF e 0,2200 g (0,0014 mol) de 2,2' bipiridina. Deixou-se a reação em refluxo, sob agitação por 2 horas. Em seguida, obteve-se o produto sólido *cis*-[$RuCl_2(AO)_2$(bpy)]. Rendimento: 72,8 %; 0,1700 g (0,00020 mol).

6.2.5 Síntese do complexo *cis*-[$Ru(NO_2)_2(AO)_2$(bpy)] MM= 879,97 g mol^{-1}

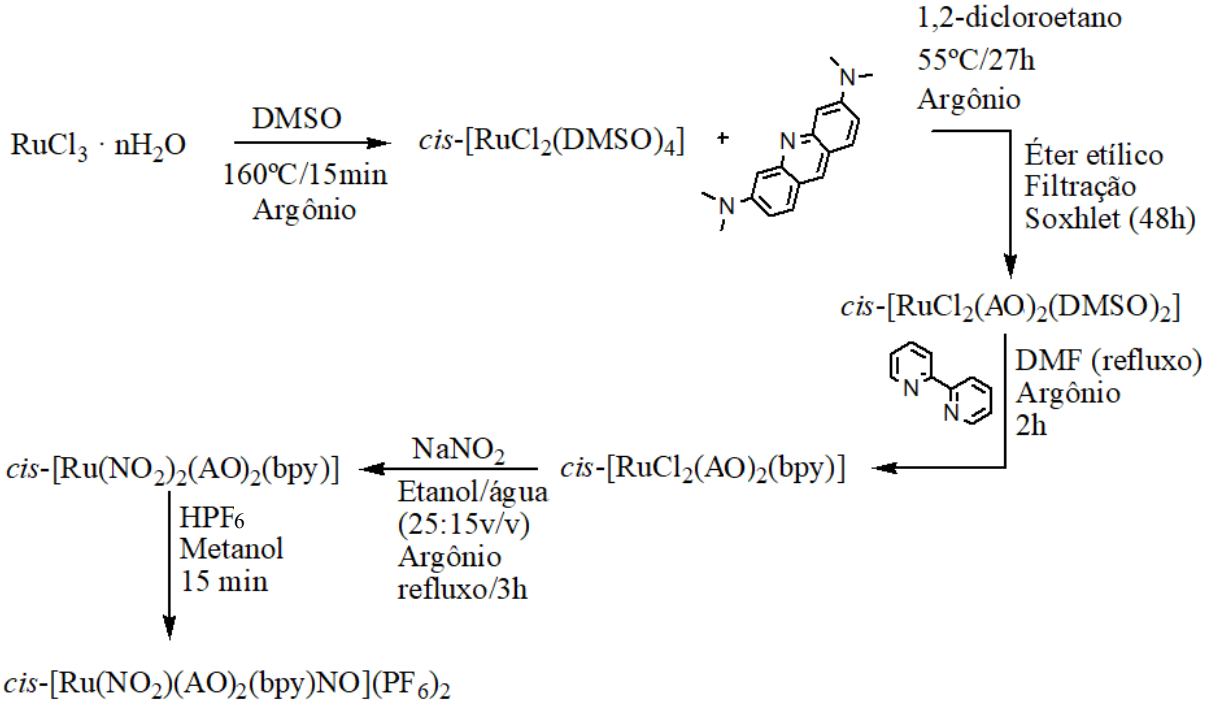
Solubilizou-se 0,1100 g (0,00012 mol) do complexo, *cis*-[$RuCl_2(AO)_2$(bpy)], em um balão de 3 bocas de 100,0 ml com 40,0 ml de uma mistura dos solventes água: etanol na proporção (1,6:1) (v/v). Manteve-se a solução em refluxo por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 0,0800 g (0,0012 mol) de nitrito de sódio previamente solubilizado em 1,0 ml de água destilada. A reação prosseguiu por mais duas horas em refluxo, sob agitação em atmosfera inerte. Em seguida, reduziu-se cerca de 80 % do volume da solução por rotaevaporação. Reservou-se a solução em geladeira e filtrou-se, lavando com pequenas porções de etanol. Rendimento: 71,8 %; 0,0700 g (0,000086 mol).

6.2.6 Síntese do complexo *cis*-[$Ru(NO_2)(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ MM= 1153,9 g mol^{-1}

Solubilizou-se 0,0700 g (0,000086 mol) do complexo *cis*-[$Ru(NO_2)_2(AO)_2$(bpy)], em 30,0 ml de metanol e adicionou-se aproximadamente 2,0 ml de ácido hexafluorofosfórico (HPF_6) sob agitação em temperatura ambiente. Deixou-se reagir por 15 minutos, observando-se a formação do precipitado *cis*-[$Ru(NO_2)(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$, o qual foi centrifugado, lavado com metanol e deixado secar. Rendimento final: 38,0 %; 0,0400 g (0,00032 mol).

Um resumo de todas as etapas reacionais encontra-se representado no esquema abaixo (Figura 20).

Figura 20 - Representação esquemática da rota sintética para obtenção do complexo *cis*-[Ru(NO$_2$)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF$_6$)$_2$



Fonte: Autora.

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de 0,25 mm de alumina pré-revestidas (Whatman). O produto final foi purificado através de cromatografia em coluna clássica, utilizando como fase estacionária, óxido de alumínio (ativado, neutro, Brockmann I, 150,00 µm de tamanho e 58,00 µm de tamanho de poro) e com eluição gradiente com acetonitrila e metanol. O composto de interesse eluiu na primeira fração de metanol.

Após purificação, o mesmo foi caracterizado por diferentes técnicas espectroscópicas como FTIR, espectrometria de massas, espectroscopia de absorção no UV-vis e emissão.

6.3 Caracterização do complexo *cis*- [Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$(NO)[$(PF_6)_2$ por técnicas espectroscópicas

6.3.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram adquiridos no espectrofotômetro por Transformada de Fourier (FTIR) Prestige-21 Shimadzu. As amostras foram analisadas em estado sólido e, para seu preparo, utilizou-se pastilhas de Brometo de Potássio (KBr).

6.3.2 Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no equipamento MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme Bruker Daltonics. A matriz utilizada foi o ácido 2,5 dihidroxibenzóico (DHB) (Bruker Daltonics) na concentração de 20,00 mg ml^{-1} em acetonitrila (grau HPLC da marca JT Baker) e água deionizada contendo 0,1 % de ácido trifluoroacético na proporção de 3:7 (v/v). A amostra foi diluída em acetonitrila : água e acetonitrila : água ± 0.1 % TFA (grau HPLC JT Baker). Posteriormente, 1,0 µL de amostra foi misturada com 1,0 µL de matriz e 1,0 µL da preparação foi aplicada na placa de MALDI para análise.

Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros foram: 500 lasers shots por espectro, PIE (*Pulsed Ion Extraction*) de 120 ns, modo positivo, frequência de laser de 1000 Hz. A voltagem de IS1 (*Ion Source 1*) e IS2 aplicadas foram de 25.00 kV e 23.05 kV, respectivamente. O modo refletor foi utilizado, sendo aplicado a voltagem em RV1 (*Reflector*) e RV2 de 26.60 kV e 13.30 kV, respectivamente. Para a calibração externa e do equipamento foi utilizado uma mistura de peptídeos da Bruker (*Peptide Calibration Standard II*).

6.3.3 Espectroscopia de absorção no UV-vis

A caracterização por espectroscopia eletrônica de absorção na região do Ultravioleta-visível foi realizada em um espectrofotômetro Agilent- modelo 8453, com varredura na região de 200 nm a 800 nm. Para as análises, utilizou-se como material cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

6.3.4 Determinação do coeficiente de Absortividade molar

O coeficiente de absortividade (extinção) molar foi determinado segundo a Lei de Lambert-Beer (Equação 2) (VALEUR, 2012).

$$A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)} \cdot b \cdot c \qquad (2)$$

Onde A é a absorbância da solução em unidades arbitrárias; ε é o coeficiente de absortividade molar do composto em L mol^{-1} cm^{-1}; b é o caminho óptico em centímetros e c é a concentração do composto em mol L^{-1}.

O experimento foi realizado à temperatura ambiente, utilizando água destilada como solvente. Foram realizadas três medidas independentes e os valores obtidos, foram expressos, como média ± desvio.

6.3.5 Espectroscopia de luminescência

Os espectros de emissão e excitação foram obtidos no espectrofluorímetro RF 5301 PC Shimadzu. Para aquisição dos dados, utilizou-se cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, com as quatro faces polidas.

6.4 Estudos fotofísicos e fotoquímicos

6.4.1 Irradiação das amostras

Para a irradiação das amostras em 470 nm, utilizou-se um irradiador de diodo emissor de luz, mais conhecido por *LED*, do inglês, *(Light-Emitting Diode)* (Figura 21). Este irradiador é constituído por um conjunto de *LED's* distribuídos uniformemente no

formato da placa de cultura cuja intensidade de irradiação foi determinada pelo radiômetro USB4000 (*Ocean Optics*, USA), no Laboratório de Radiometria Ótica e Dosimetria do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto. A irradiância calculada para o comprimento de onda de 470 nm foi igual a 0.038 J cm^{-2}.

Figura 21 - Conjunto de LED's distribuídos uniformemente em formato de placa de cultura. λ_{em} = 470 nm; irradiância = 0,038 mW cm^{-2}

Fonte: (Adaptado) RAMOS, 2016.

6.4.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2(NO)](PF_6)_2$ foi calculado pelo método relativo (DEMAS & CROSBY,1971), a partir da Equação 3:

$$\Phi_{F\,(x)} = (Grad_{(x)}/Grad_{(p)}).(n_{(p)}^2/n_{(x)}^2).\Phi_{F\,(p)} \quad (3)$$

Assim, $\Phi_{F\,(x)}$ é o rendimento quântico de fluorescência da amostra, $\Phi_{F\,(p)}$ é o rendimento quântico de fluorescência do padrão, $Grad_x$ é o coeficiente angular de um gráfico que relaciona a área sob a curva do espectro de fluorescência da amostra *versus* a absorbância da amostra; $Grad_{(p)}$ é o coeficiente angular de um gráfico que relaciona a área sob a curva do espectro de fluorescência para o padrão *versus* a absorbância para o padrão; n_x é o índice de refração do solvente utilizado para o preparo das soluções de complexos e $n_{(p)}$ é o índice de refração do solvente utilizado para o preparo da solução padrão.

Utilizou-se como padrão a fluoresceína em solução etanólica (Φ_F = 0,79) (KELOGG & BENNETT, 1964). Ela é um padrão comumente utilizado, que apresenta solubilidade no mesmo solvente dos compostos que serão estudados, não sendo necessária a aplicação de correção de índice de refração. Seu rendimento de fluorescência é constante à excitação gama de 250 a 530 nm. Dessa forma, a fluoresceína é um bom padrão a ser empregado em regiões de excitação de 400 a 500 nm (DEMAS & CROSBY, 1971).

Para aquisição das medidas no espectrofluorímetro, utilizou-se os parâmetros reunidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2(NO)](PF_6)_2$ e do AO

$\lambda_{excitação}$ (nm)	470
Varredura (nm)	480 a 700
Fenda de emissão	1,5
Fenda de excitação	3,0

Fonte: Autora.

6.4.3 Determinação indireta de Oxigênio Singleto ($^1O_2$)

O rendimento quântico de $^1O_2$ (Φ_Δ) foi calculado utilizando o método comparativo com o padrão azul de metileno (WILKINSON, 1993). Este método é uma forma indireta de detecção de $^1O_2$ que consiste em uma modificação do modelo descrito na literatura e se baseia no consumo do oxigênio dissolvido (TANIELIAN; WOLFF; ESCH, 1996). O fotossenssibilizador, quando fotoestimulado, gera $^1O_2$, que reage com o receptor (álcool furfurílico).

Para a determinação do rendimento quântico de $^1O_2$, obteve-se, inicialmente, a concentração de oxigênio $[O_2]$ consumido pela Equação 4:

$$[O_2]_{consumido} = [O_2]_{inicial} \times (t_0) - [O_2]_{final} \times (t) \quad (4)$$

Em seguida, converteu-se a quantidade de O_2 encontrada em ppm para ml. Realizou-se o mesmo procedimento para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$, para o AO e para o padrão Azul de metileno.

Os valores encontrados foram distribuídos em um gráfico de Volume de O_2 (ml) *versus* tempo (s). Dessa forma, o valor de K (constante de velocidade de consumo de oxigênio) foi calculado a partir dos coeficientes angulares, obtidos graficamente. Ainda, procedeu-se a realização de leituras de absorbância da amostra e do padrão, que permitiram encontrar a intensidade de luz absorvida (I), por meio da Equação 5:

$$I = 1-(10^{-A}) \quad (5)$$

Em que A é a Absorbância do padrão ou da amostra em u.a.

Dessa maneira, é possível relacionar as velocidades entre o consumo de oxigênio dissolvido e a produção de $^1O_2$ e calcular os valores de rendimento quântico de produção de oxigênio singleto para os compostos por meio da Equação 6.

$$\Phi_\Delta = \Phi_{\Delta padrão} . \frac{K}{Kpadrão} . \frac{Ipadrão}{I} \quad (6)$$

Desta relação, tem-se que K é a constante de velocidade de consumo de oxigênio referente ao fotossensibilizador; $K_{padrão}$ é a constante de velocidade de consumo de oxigênio referente ao padrão; I é intensidade de luz absorvida pelo sensibilizador e $I_{padrão}$ é a intensidade de luz absorvida pelo padrão.

Para obtenção dos dados, em uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, contendo 3,0 ml de uma solução aquosa de álcool furfurílico 0,099 mol L^{-1}, adicionou-se um determinado volume (de 10,0 a 100,0 µl) das soluções de *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2NO](PF_6)_2$ e AO, de modo a obter valores de absorbância no comprimento de onda de irradiação que atingissem no máximo 0,3 u.a. Procedeu-se da mesma forma para o padrão azul de metileno (Φ = 0.52).

O complexo rutênio-nitrosilo e o ligante AO foram irradiados com a placa de LED com λ_{exc} = 470 nm e o padrão com o laser de λ_{exc} = 660 nm. Desta forma, colocou-se a cubeta sobre a placa de LED e, em seguida, posicionou-se o eletrodo na cubeta. Após a estabilização do valor de concentração de O_2 (medida em ppm), sob agitação lenta, iniciou-se a irradiação com tempos constantes. Anotou-se o valor da

concentração de oxigênio em ppm no tempo 0 e a cada ciclo de irradiação. Para o padrão, a cubeta foi colocada sobre o agitador e a fibra óptica posicionada na lateral da cubeta com distância de 1,00 cm.

Para a medida eletroquímica da concentração de oxigênio dissolvido, utilizou-se um sensor de oxigênio de 2,00 mm de diâmetro acoplado ao detector de oxigênio *in* O_2 *Dissolved Oxygen Meter* (*Innovative Instruments Inc.*). O resultado foi expresso em ppm. O eletrodo foi previamente calibrado utilizando inicialmente água deionizada desaerada com argônio e, em seguida, água deionizada a 21 ^{o}C, considerando o valor padrão de oxigênio dissolvido na água igual a 8,10 ppm.

6.4.4 Avaliação da fotoestabilidade dos compostos

Acompanhou-se a fotoestabilidade do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)NO](PF_6)_2$ e do Alaranjado de Acridina, através de espectros de emissão e de absorção no UV-vis/Visível. Para tanto, ambos os compostos foram solubilizados em 5,0 ml de água, à temperatura ambiente, conservados em ambiente na ausência de luz e submetidos à irradiação com *LED* em 470 nm por intervalos de tempo aperiódicos. Ao final de cada irradiação, os espectros de emissão e de absorção foram verificados. As amostras foram mantidas sob agitação e foram fotoestimuladas por um tempo total de 600 segundos.

6.4.5 Determinação amperométrica de Óxido Nítrico liberado

A liberação fotoinduzida de óxido nítrico foi avaliada por meio do equipamento *in* NO-T acoplado a um sensor seletivo para NO modelo amiNO-700 (*Innovative Instruments*, Tampa, FL, USA), com sensibilidade na faixa de 150 a 250 pA nM^{-1} a 20 mM.

6.5 Ensaios biológicos

6.5.1 Aquisição do material biológico

Os ensaios biológicos foram realizados com as linhagens celulares B16/F10 (*Mus musculus*; melanoma murino) e L929 (*Mus musculus*; fibroblasto murino),

obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ) Lotes: 001384 e 00826, respectivamente. Desta forma, trabalhou-se com dois modelos distintos, a título de comparação: um modelo não-tumoral (L929) e um modelo tumoral metastático (B16/F10).

6.5.2 Preparo do meio de cultura

Para o cultivo das células utilizou-se o meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®), com 25 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, acrescido do indicador de pH vermelho de fenol.

O conteúdo do envelope foi solubilizado em cerca de 800,0 ml de água e a ele foram acrescentados 1,5000 g de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich). E, em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,4. O meio foi suplementado com 1 % de uma solução antibiótica (Sigma-Aldrich) composta pelos antibióticos Penicilina (10.000 UI) e Estreptomicina (10,00 mg ml^{-1}) e pelo antimicótico Anfotericina B (25,00 µg ml^{-1}). Também foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Sigma Aldrich), previamente inativado a 56,0 ºC por 30 minutos. O volume do meio foi completado para 1,0 L e o mesmo foi filtrado com filtro estéril (Millipore® com poro de 0,22 µm).

6.5.3 Manutenção das linhagens celulares

Os ensaios com as linhagens celulares foram conduzidos em bancada de fluxo laminar vertical Pachane Pa 300Eco, a qual foi previamente esterilizada a cada procedimento, com álcool 70º INPM (70 % p/p) e luz ultravioleta por 30 minutos.

Quando as células adquiriram cerca de 90 % de confluência foi realizada a repicagem, um procedimento que objetiva permitir a expansão celular.

Com uma pipeta sorológica de 10,0 ml (Bionaky), adicionou-se 5,0 ml de PBS 1X, realizando movimentos leves para lavagem e remoção de células mortas do meio. Em seguida, o PBS (Sigma Aldrich) 1X foi recolhido e descartado e 5,0 ml de uma solução de Tripsina 0,125 % EDTA 0,02 % (Gibco, USA) 1X foram adicionados e deixados incubando por 8 minutos em estufa (*Thermo Scientific* Serie II 3110 *Water-Jacketed* a 37 ºC, em atmosfera controlada a 5 % de CO_2 e 99 % de umidade relativa). Esse processo garante o desprendimento das células da superfície do frasco

de cultura. A solução foi recolhida e adicionada em um tubo cônico concêntrico de 15,0 ml (*high clarity propilene*, Bionaky), contendo 3,0 ml de meio de cultura. Além disso, foi centrifugada a 1200 rpm por 2 minutos, na centrífuga (KC4 Kindly), havendo a formação de um precipitado celular. A solução foi descartada e se ressuspendeu o precipitado celular em 1,0 ml de meio. Uma alíquota (cerca de 50,0 µl) desta solução foi adicionada a um novo frasco de cultura, contendo 13,0 ml de meio. Os frascos de cultura (75,00 cm^3 KASVI) foram armazenados na estufa sob às mesmas condições. As culturas celulares foram supervisionadas diariamente por microscopia óptica (Microscópio invertido binocular Quimis IRT Tracer 100) e a troca de meio ocorreu a cada dois dias.

6.5.4 Determinação do número de células

Foram diluídos 10,0 µl da suspensão celular obtida pelo método descrito anteriormente em 10,0 µl de azul de tripan (Sigma Aldrich) e 80,0 µl de meio de cultura. Adicionou-se 10,0 µl desta solução à Câmara de Neubauer (Hirschmann Eberstadt, Germany) a fim de se realizar a contagem do número de células para os experimentos de viabilidade celular.

6.6 Ensaios biológicos

6.6.1 Ensaio do MTT

Para a realização do ensaio, após a determinação do número de células, as mesmas foram aplicadas em placas de cultura de poliestireno de 96 poços (KASVI-K-12-096), de modo a se obter uma densidade de 2,00 x 10^4 células por poço. Elas foram mantidas em estufa por 24 horas para adesão e após esse período o meio foi retirado e um novo meio acrescentado. Adicionou-se aos poços o tratamento com o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)(bpy)NO](PF_6)_2$ e com a Alaranjado de Acridina em diferentes concentrações, totalizando cinco replicatas para cada concentração em cada N experimental. Após a adição, os complexos foram incubados por 4 horas. Posteriormente, o meio foi retirado e adicionou-se 200,0 µl de RPMI sem vermelho de fenol. As placas foram então submetidas à irradiação nas condições descritas anteriormente (λ_{em} = 470 nm; irradiância =0,038 mW cm^{-2}).

Vale ressaltar que para todos os experimentos foi feito um controle, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, para a avaliação dos compostos, na ausência de estímulo luminoso, nos quais as placas apesar de submetidas às mesmas condições não foram irradiadas.

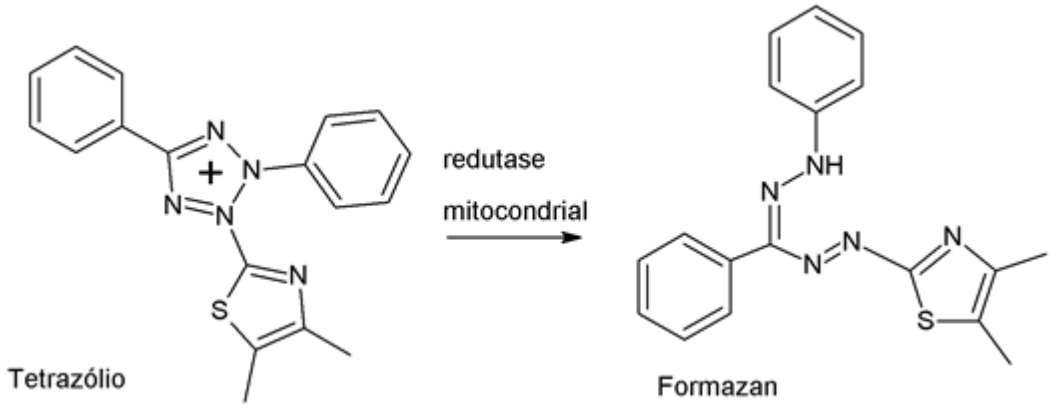
Logo em seguida à irradiação, as células foram tratadas com uma solução 10 % de MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)] (Sigma Aldrich), em meio RPMI incolor (sem vermelho de fenol) (Sigma Aldrich) (MOSMANN, 1983) a uma concentração final de 0,50 mg ml^{-1}. Assim, as placas seguiram por mais 3 horas de incubação em estufa. Depois, 200,0 µl de DMSO (Synth) foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em 492 nm no Leitor de Elisa (Thermo Plate TP-Reader) e os ensaios foram realizados em triplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com a Equação 7:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = (A_{experimental} / A_{controle}) \times 100\ \% \qquad (7)$$

6.6.2 Princípio do Ensaio do MTT

A análise da viabilidade celular dos compostos deste trabalho foi feita a partir do ensaio colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). O MTT faz parte de uma variedade de compostos de tetrazólio e tem como características ser um sólido hidrossolúvel e de coloração amarelada ($\lambda_{máx}$ = 600 nm). Este método se baseia no fato de que células metabolicamente ativas apresentam enzimas mitocondriais competentes na membrana interna, como a succinato desidrogenase (complexo II) e, portanto, são capazes de reduzir o MTT a formazan, um produto lipossolúvel de coloração violeta ($\lambda_{máx}$ = 470 nm) (Figura 22).

Figura 22 - Conversão do sal de MTT (hidrossolúvel) em sal de formazan (lipossolúvel)



Fonte: (Adaptado) SCUDIERO D.A., 1988.

Por consequência, quanto mais mitocôndrias competentes estiverem presentes no poço, mais sal de formazan será formado e maior será a absorbância encontrada, o que representa uma elevada viabilidade celular. Assim, é possível estabelecer uma relação de proporcionalidade direta entre a absorbância e a viabilidade celular.

6.6.3 Tratamento Estatístico

Para elaboração dos gráficos e tratamento dos dados referentes aos ensaios de viabilidade celular, utilizou-se o software estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados representam a média ± desvio (S.E.M.) de três experimentos realizados de forma independente. Os controles foram analisados pelo teste T-Student e a comparação entre os grupos tratados e não tratados e com e sem irradiação foi feita pelo método estatístico *Two-Way ANOVA* ($p \leq 0,05$).

6.7 Avaliação da sublocalização celular por Microscopia de Fluorescência

As imagens em microscopia confocal foram realizadas em uma replicata a fim de visibilizar a internalização e sublocalização celular do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2(NO)](PF_6)_2$ e compará-lo ao ligante livre AO.

Para este ensaio, as células foram cultivadas em monocamadas em placas de poliestireno para microscopia, com 8,80 cm² de área (KASVI) e então, incubadas com 15,0 µM do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)(bpy)NO](PF_6)$_2$ por 4 horas e com 7,50 µM do ligante AO por 4 horas. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS para remoção de composto não internalizado e se adicionou meio de cultura RPMI 1640 sem indicador de pH vermelho de fenol (Sigma-Aldrich).

As imagens de microscopia fluorescente foram adquiridas em parceria com a Dra. Laena Pernomian por meio de microscópio confocal SP5 (Leica TSC SP5; Laboratório de Microscopia Confocal – LMMC, departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP). O software de aquisição das imagens foi o Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 (Leica Microsystems, 1997-2010), no modo de aquisição TCS SP5, xyz, com objetiva de 63 x água, em velocidade de 200 Hz e formato 1024 x 1024, utilizando-se laser de Argônio com 30 % de potência, com comprimento de onda de excitação 488 nm e emissão 508 - 560 nm. As imagens de campo claro foram adquiridas como Scan-DIC (contraste de fase dicroico). Algumas imagens foram adquiridas com um aumento de três vezes.

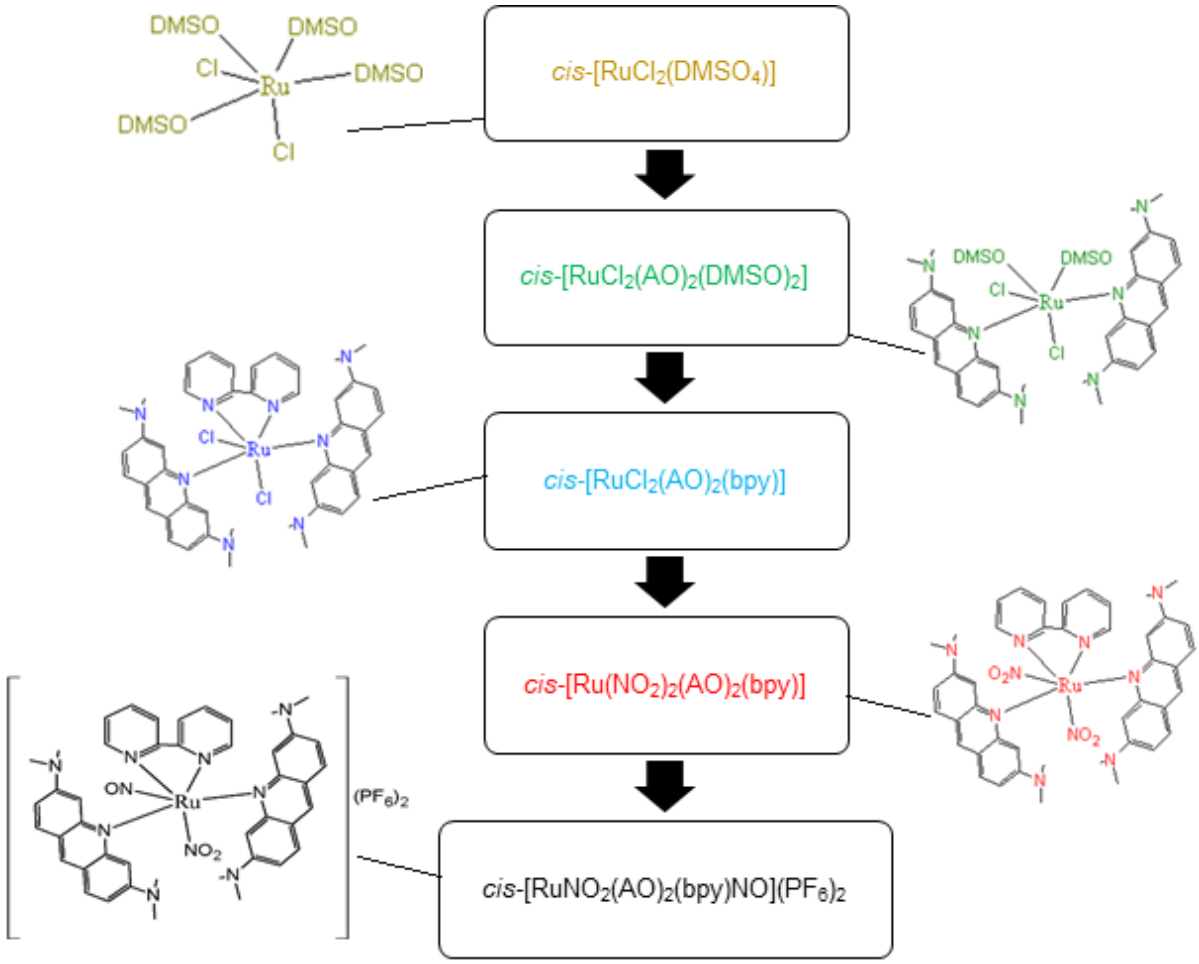
Resultados e Discussão

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Síntese de *cis*-[Ru(NO$_2$)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF$_6$)$_2$

A síntese proposta foi conduzida conforme a rota descrita no item 6.2 e está sumarizada na Figura 23, na qual estão presentes as estruturas moleculares dos complexos precursores e do produto final obtidos nas diferentes etapas.

Figura 23 - Esquema de rota sintética do complexo *cis*-[Ru(NO$_2$)(bpy)(AO)$_2$(NO)](PF$_6$)$_2$



Fonte: Autora.

Complexos do tipo Ru^{II}-NO^0 são de difícil obtenção, dada a baixa afinidade entre o metal e o ligante nestes estados de oxidação. Por isso, os complexos rutênio-nitrosilos normalmente apresentam um NO$^+$ ligado a um Ru(II). O Ru(II) (d$_6$, baixo

spin) (MCCLEVERTY et al., 2004), possui alta afinidade pelo NO^+, que é um ácido- π forte.

Dentre as distintas rotas possíveis para obtenção de complexos desta natureza, pode-se citar o método de borbulhamento de NO, no qual o precursor deve possuir um fragmento Ru^{III}-H_2O e o NO gasoso deve ser borbulhado em uma solução aquosa. Assim, o metal é reduzido, formando-se o fragmento Ru^{II}-NO^+. (CHENEY & ARMOR, 1977).

No entanto, como se partiu de uma espécie precursora que já possuía um ligante nitrosil, propôs-se a formação do complexo rutênio-nitrosilo através da adição de ácido ao nitro complexo de rutênio, *cis*-$[Ru(NO_2)_2(AO)_2(bpy)]$, valendo-se da premissa de que a reação de formação do complexo pode ser tratada como um equilíbrio ácido-base, o qual é reversível e dependente do pH (Equação 8) (GODWIN & MEYER, 1971; KEENE; ROSENBERG; LAZZARINI, 1977; PIPES & MEYER, 1984; ASSEFA & STANBURY, 1997).

$$cis\text{-}[Ru(NO_2)_2(AO)_2(bpy)] + 2\,H^+ \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} cis\text{-}[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)]^{2+} + H_2O \quad (8)$$

Quanto ao processo de síntese é preciso destacar que a maior dificuldade na obtenção do produto final é a etapa de purificação. O Alaranjado de Acridina é um precurso adquirido do fabricante com 75 % de pureza. Nesse sentido, visando facilitar a remoção do excesso de Alaranjado de Acridina, é realizada uma pré-purificação do complexo precursor *cis*-$[Ru(Cl)_2(AO)_2(DMSO)_2]$ por meio do uso do extrator soxhlet, conforme descrito no item 6.2.3. Esse sistema utiliza o refluxo do solvente, evitando gasto de grandes quantidades do mesmo.

Não obstante, o excesso de AO empregado na síntese e a etapa de purificação seguem como limitantes do rendimento da reação.

7.2 Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do Infravermelho tem sido utilizada como uma das técnicas para caracterização de complexos rutênio-nitrosilos e foi empregada a fim de se verificar aspectos da coordenação da molécula de NO^+ ao

Ru(II) no complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$]$(PF_6)_2$ (BATISTA et al*.,* 1997; FORD et al.,1998).

Como já citado, sabe-se que a ligação do NO^+ ao metal em compostos de coordenação produz, geralmente, bandas de estiramento ν(NO) entre 1800 cm^{-1} e 1970 cm^{-1}. No entanto, essa frequência apresenta variações em virtude dos coligantes, do estado de oxidação, da estereoquímica do NO e da intensidade do efeito de retrodoação. (BATISTA et al*.,* 1997; FORD et al.,1998)

O NO é mais eletronegativo que outras moléculas como o monóxido de carbono (CO), por exemplo, e atua como um bom receptor de elétrons. Desta forma, a força da ligação M-N é maior que a força de ligação entre N-O. Fatores como a estrutura do complexo e o efeito eletrônico dos ligantes podem influenciar na intensidade da retrodoação. Quanto maior é a retrodoação, por exemplo, menor é a força de ligação do NO, influenciando na frequência do estiramento observado, a qual deve ser menor (MCCLEVERTY et al*.*, 2004).

A Tabela 5, resume a atribuição das frequências dos estiramentos observados para as principais bandas do espectro vibracional do infravermelho para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$]$(PF_6)_2$.

Tabela 5 - Atribuições às principais bandas observadas no espectro eletrônico de absorção na região do Infravermelho para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$]$(PF_6)_2$

Estiramentos	Número de onda (cm^{-1})
ν PF_6	842
ν (C-N)	1319
CH (do CH_3 do AO)	1450
ν(NO_2)	1452
ν (C=C)	1606
ν (N-O)	1945

Fonte: Autora.

Atribuiu-se a banda em 1945 cm^{-1} ao estiramento N-O, comprovando que o processo de coordenação de NO^+ ao complexo fora efetivo. De fato, a frequência do estiramento observada é semelhante à relatada para outros complexos rutênio-

nitrosilos desenvolvidos pelo grupo que possuem o ligante nitrosil, assim como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Frequência do estiramento N-O de complexos rutênio-nitrosilos

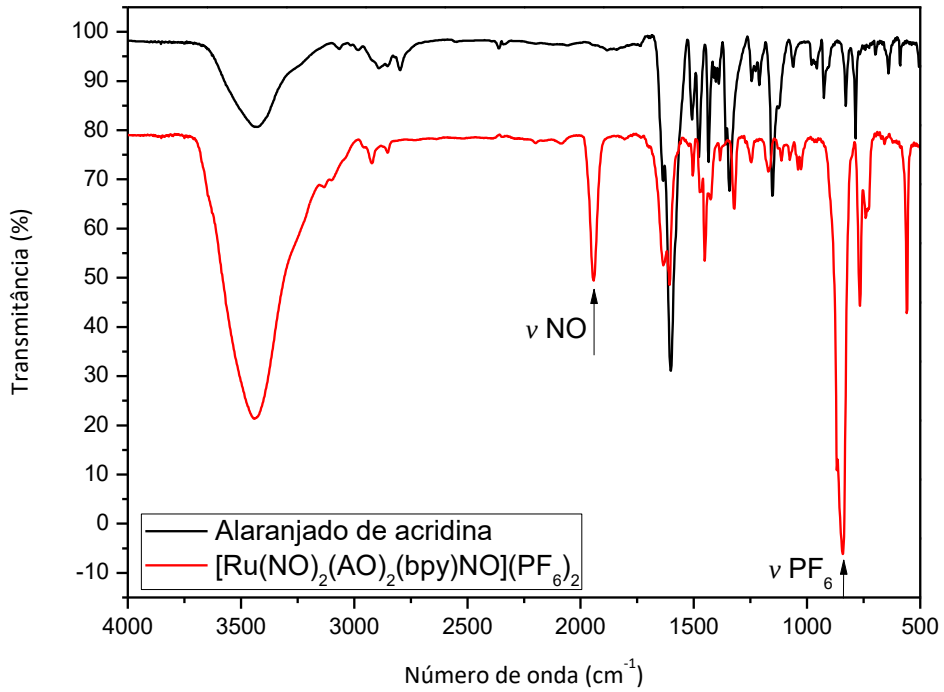
Complexos rutênio-nitrosilos	Frequência do estiramento N-O
cis-[Ru(4-acpy)(bpy)$_2$(NO)](PF$_6$)$_3$	1943 cm^{-1}
cis-[Ru(bpy)$_2$(4-pic)(NO)](PF$_6$)$_3$	1944 cm^{-1}
cis-[Ru(bpy)$_2$(py)(NO)](PF$_6$)$_3$	1947 cm^{-1}

Fonte: SAUAIA; da SILVA; 2003.

A banda em 1606 cm^{-1} foi atribuída a ligação dupla entre carbonos aromáticos. A banda em 1319 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C-N característico de aminas aromáticas e as bandas '*scissoring*' próximas a região de 1400 cm^{-1} são características de metilas simples como as encontradas no ligante Alaranjado de Acridina. O estiramento em 1452 cm^{-1} foi atribuído à deformação axial assimétrica do NO_2^-.

Tendo isto como base, a Figura 24 sobrepõe espectros vibracionais obtidos para o ligante Alaranjado de Acridina e para o complexo *cis*-[Ru(NO$_2$)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF$_6$)$_2$. Neste, estão destacados os estiramentos ν(NO) e ν(PF$_6$), evidenciando a coordenação dos ligantes.

Figura 24 - Espectro vibracional na região do infravermelho para AO (preto) e para *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ (vermelho)



Fonte: Autora.

A coordenação do ligante nitrosil permite inferir que o método proposto inicialmente (equilíbrio ácido-base) foi adequado.

7.3 Espectrometria de massas

A Espectrometria de Massas foi uma das técnicas utilizadas para auxiliar na caracterização do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$.

Embora haja muitos tipos de espectrômetros, o fundamento da técnica é bastante simples e é muito semelhante para os diferentes equipamentos.

Em relação às técnicas de ionização, destacam-se o ESI (*Electrospray Ionization*) e o MALDI (*Matriz- Assisted Laser Desorption/Ionization*), as quais possibilitaram um avanço nas análises de espectrometria de massas, com a determinação de relações *(m/z)* mais precisas.

Dentre distintas possibilidades de se analisar uma amostra por espectrometria de massas, optou-se em trabalhar com a técnica MALDI-TOF/TOF-MS. Entende-se

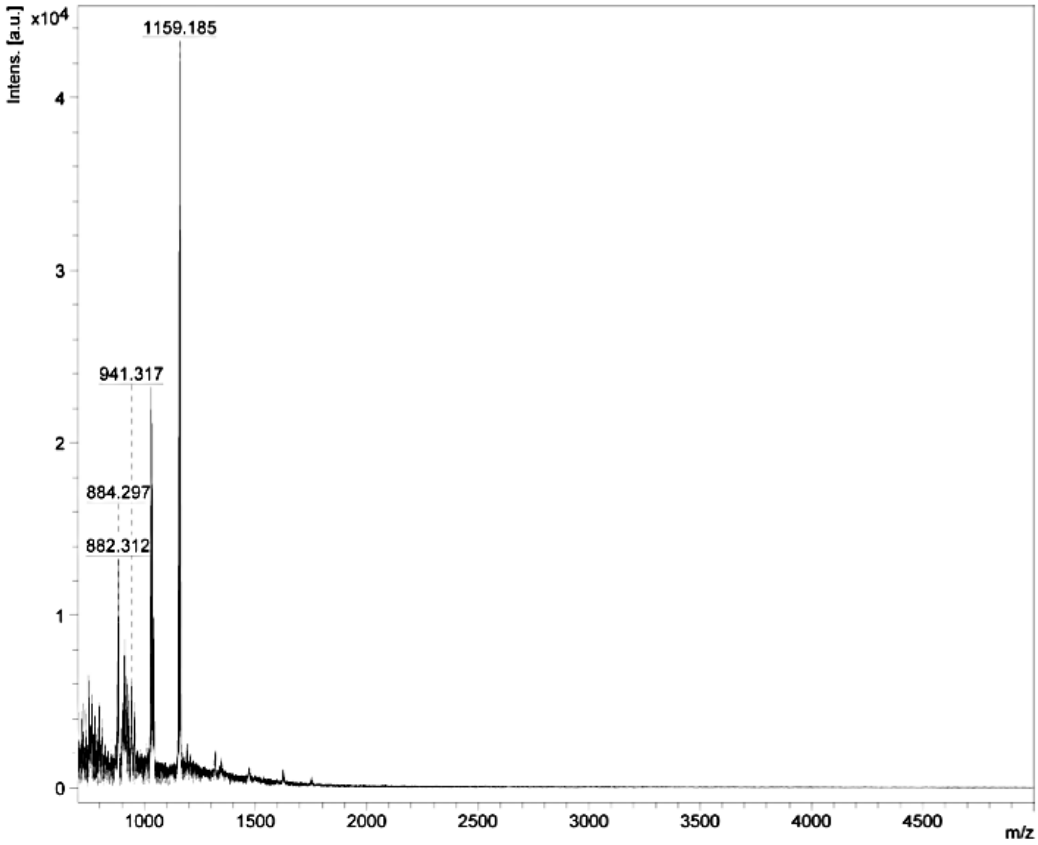
TOF por "*Time of Flight",* do inglês, tempo de voo, que corresponde ao tempo que íons de diferentes massas levam para percorrer uma distância definida.

Esta técnica foi considerada para o complexo em estudo devido à sua capacidade de gerar íons de moléculas grandes na forma intacta, além de possuir alta sensibilidade, boa resolução e ionização suave. Neste tipo de análise, a amostra é co-cristalizada a uma matriz orgânica, que absorve no comprimento de onda do laser. O analito é, então, excitado com pulsos de laser, provocando a vaporização da matriz cristalina. Assim, a amostra, na fase gasosa produz íons, os quais entram no analisador TOF e são detectados.

Outra observação relevante é que a energia utilizada nesta técnica é descrita como "*soft*", o que a torna, de certa forma, conveniente para a análise de compostos de coordenação, como o obtido neste estudo. Ainda assim, não se pode dizer que se trata de um padrão para todas as espécies com esta característica. Deve-se levar em consideração o composto e a dosagem utilizados. No entanto, qualquer energia fornecida a um composto poderá gerar certa reatividade dependendo da forma de excitação e do meio.

O resultado da análise de espectrometria de massas obtido para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ está representado na Figura 25.

Figura 25 - Espectro de massas obtido por técnica MALDI-TOF/TOF-MS para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$

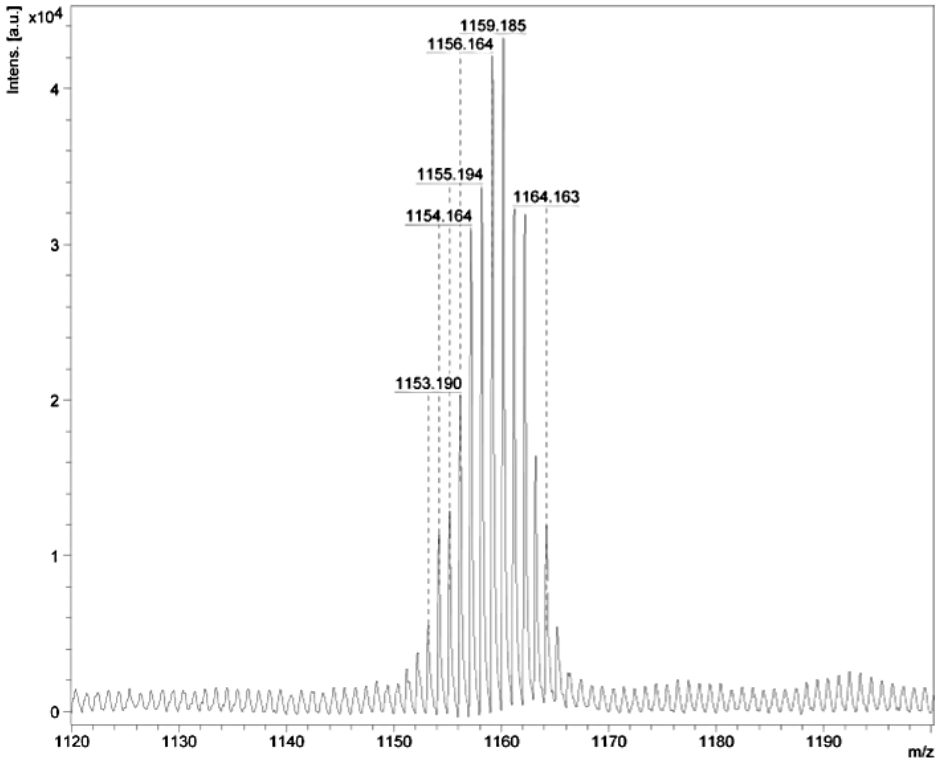


Fonte: Autora.

Observa-se no espectro de massas o pico com a relação *m/z* 1159,185, que corresponde ao pico do íon molecular do referido complexo. Outros picos são também observados, que podem ser advindos de interação com a matriz.

A massa molecular teórica calculada para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ foi 1153,900 g mol^{-1}. No espectro de massas ampliado na Figura 26, observa-se vários picos referentes às espécies isotópicas do rutênio. Nesta técnica, o espectro pode evidenciar o aparecimento de espécies constituídas por sete isótopos do metal (^{104}Ru, ^{102}Ru, ^{101}Ru, ^{100}Ru, ^{99}Ru, ^{98}Ru, ^{96}Ru) (SLOCIK, SOMAYAJULA, SHEPHERD, 2001). Nota-se um pico cuja relação *m/z* é 1153,190 que corresponde a um valor muito próximo da razão massa/carga *m/z* esperado para a espécie *cis*-$\{[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2H^+\}$. A princípio estes dados sustentam a expectativa de formação do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$.

Figura 26 - Espectro ampliado do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ na região de razão *m/z* 1120 a 1200



Fonte: Autora.

7.4 Espectroscopia na região do UV-vis

O complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ bem como os precursores sintetizados neste trabalho apresentam Ru(II) com ligantes insaturados na esfera de coordenação. Para esses complexos, a literatura reporta espectros na região do UV-vis que geralmente apresentam bandas atribuídas a transições de campo ligante (CL), transições de transferência de carga metal ligante (TCML) e transições internas dos ligantes insaturados (IL) (Figura 27) (LEVER, 1984).

Transições do tipo Campo Ligante são observadas entre os níveis energéticos do próprio metal. Essas bandas se originam do desdobramento de energias dos orbitais d (transições d $\rightarrow$ d) e estão representadas na Figura 27 pelo número 1.

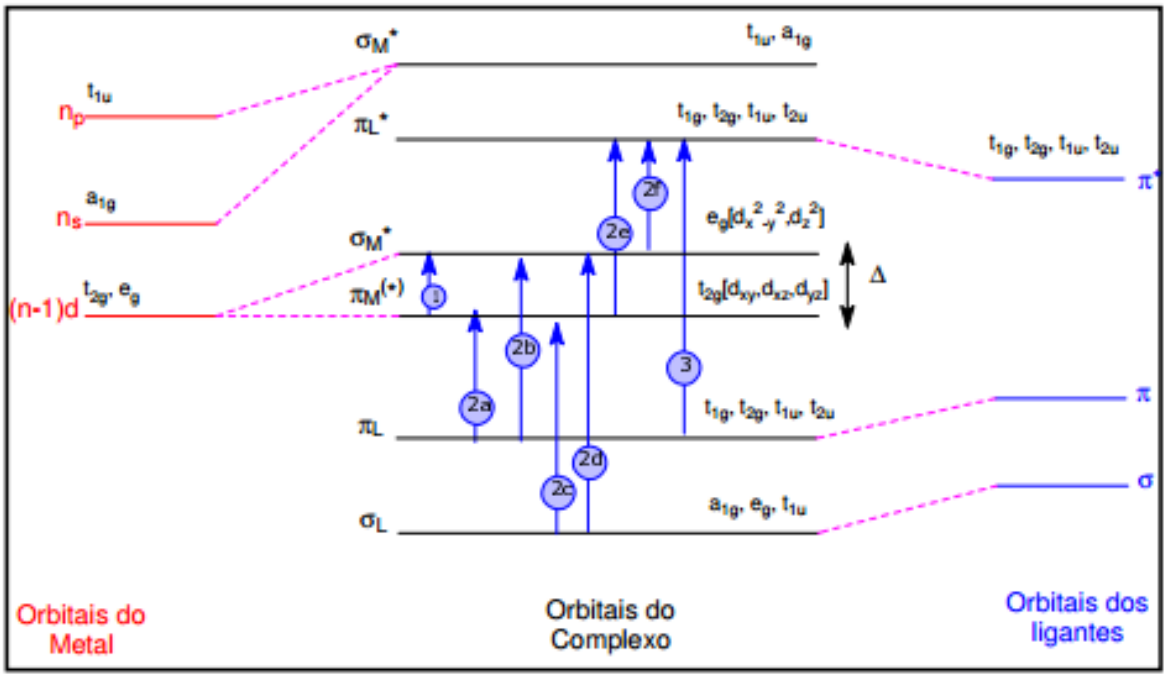
As transições representadas em 2a, 2b, 2c e 2d são transições relativas às transferências de carga ou elétron do ligante para o metal (TCLM). Essas

transferências normalmente se observam para íons metálicos mais oxidados e suas transições geram bandas na região do ultravioleta e do visível.

As setas 2e e 2f correspondem às transições de transferência de carga ou elétron do metal para o ligante (TCML). Elas apresentam ligações π e são observadas em complexos de rutênio com ligantes insaturados. Essas bandas localizam-se, geralmente, na região do visível e possuem um coeficiente de absortividade molar (ε) máximo da ordem de 10^4 L^{-1} mol^{-1} cm^{-1}.

Outro tipo de transição, a transição interna do ligante (IL) (3) é a que se observa em ligantes insaturados não coordenados. Essas transições, quando envolvem elétrons π são normalmente intensas e geram bandas de transição n→ π* e π→ π* na região do ultravioleta. Em contrapartida, transições envolvendo elétrons livres, ocorrem em comprimentos de onda maiores e são menos intensas.

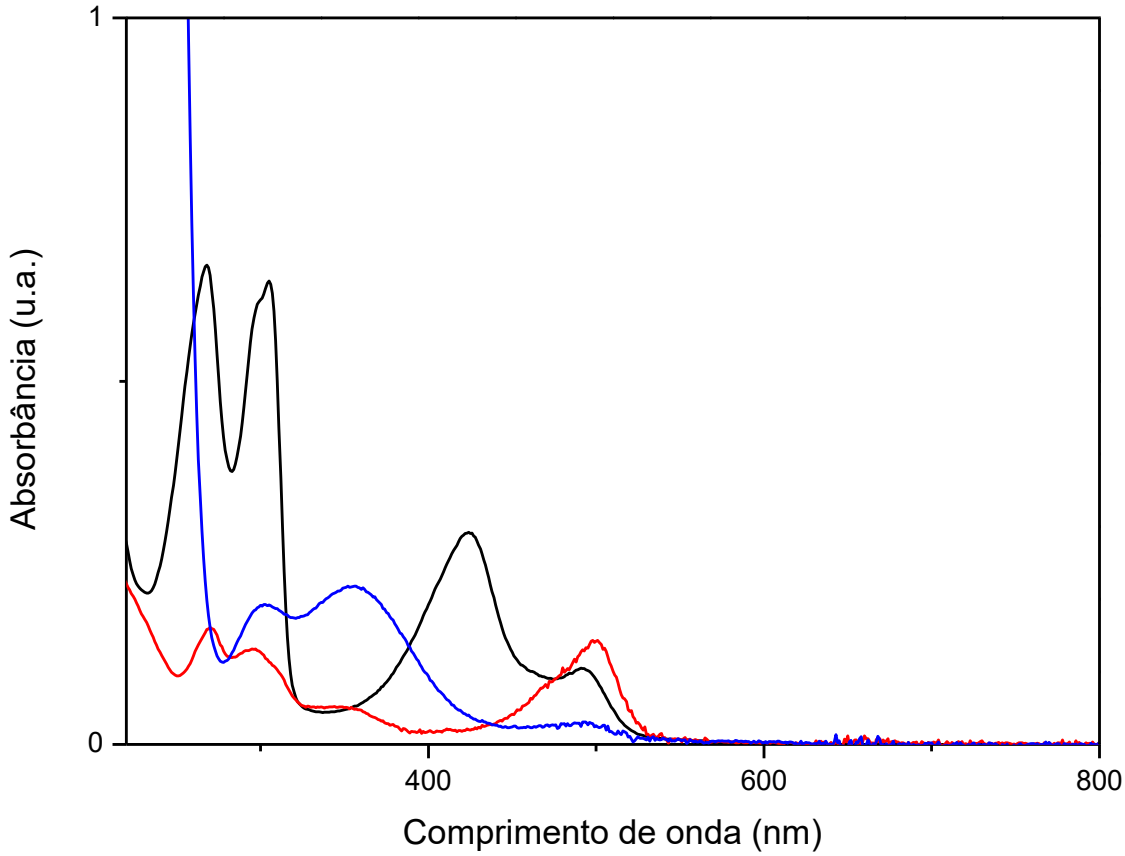
Figura 27 - Representação esquemática de diagrama de orbital molecular simplificado para ilustrar as transições eletrônicas de um complexo octaédrico



Fonte: BALZANI & CARASSITI; 1970.

A Figura 28 exemplifica a sobreposição espectral do ligante AO e do precursor *cis*-[Ru(Cl)$_2$(DMSO)$_2$(AO)$_2$]. Os espectros foram realizados em acetonitrila. Observa-se que houve a formação do complexo.

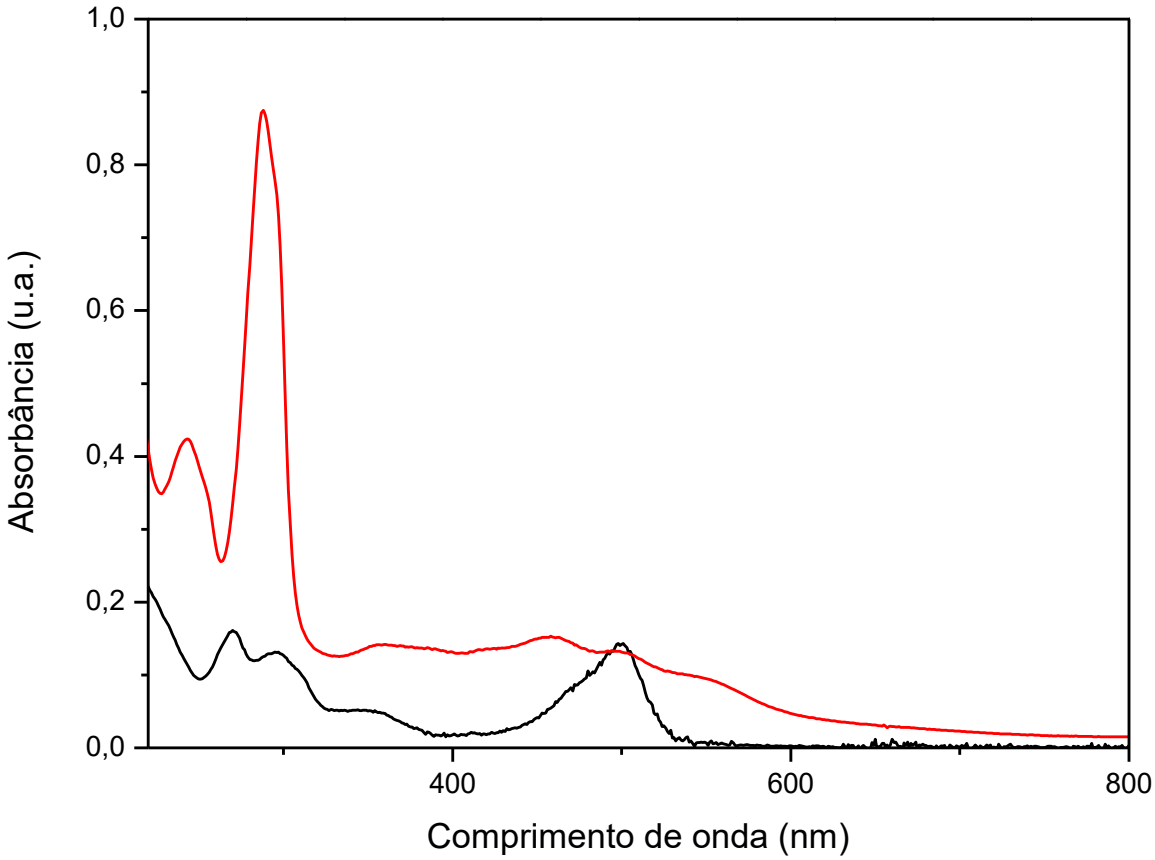
Figura 28 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para AO (preto), para o complexo *cis*-$[Ru(Cl)_2(AO)_2(DMSO)_2]$ (vermelho) e para o precursor $[Ru(Cl)_2(DMSO)_4]$ (azul) em acetonitrila, a 25,0 °C, (1,00 x 10^{-4} mol L^{-1})



Fonte: Autora.

A coordenação do ligante 2,2' bipiridina fica evidente com o aparecimento de bandas intensas na região do ultravioleta (243 e 286 nm), que são características da presença de transições internas ($\pi \rightarrow \pi^*$) do ligante insaturado (Figura 29).

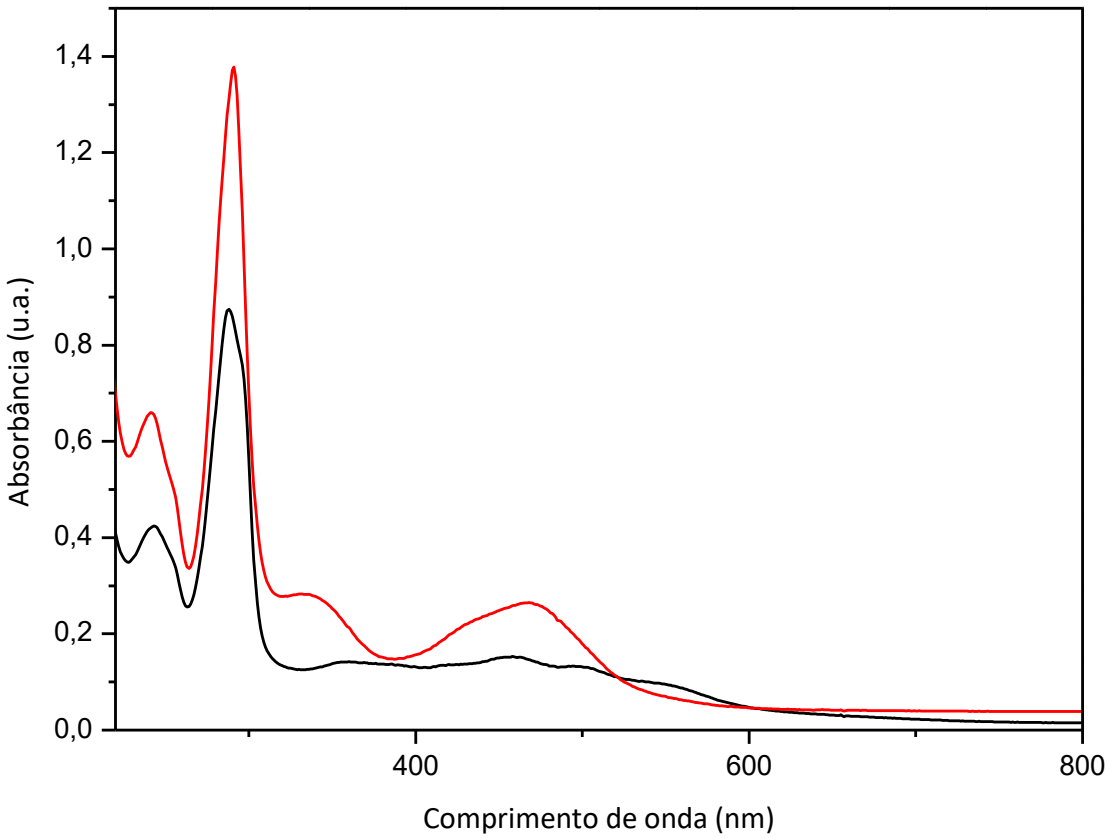
Figura 29 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(DMSO)$_2$] (preto) e para *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(bpy)] (vermelho), em acetonitrila a 25,0 °C,



Fonte: Autora.

A Figura 30, relaciona os espectros dos precursores *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(bpy)] e *cis*-[Ru(NO$_2$)$_2$(AO)$_2$(bpy)].

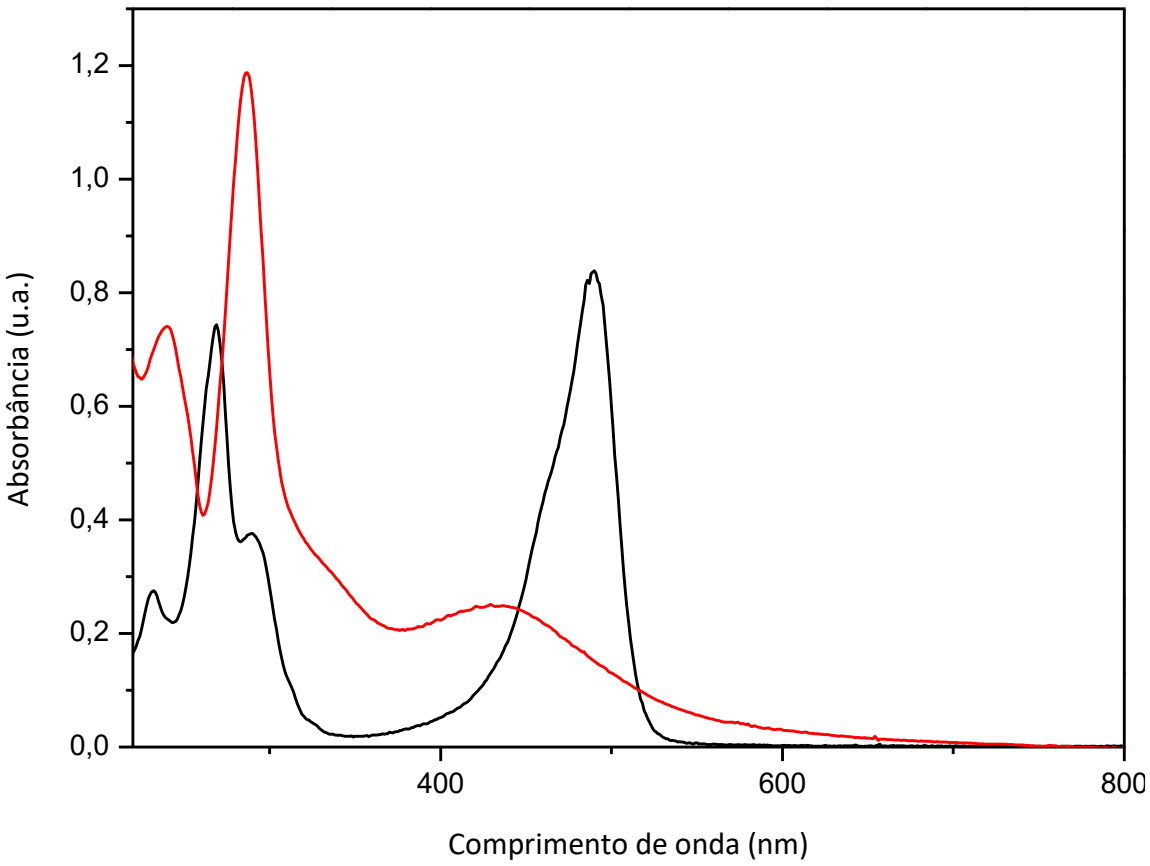
Figura 30 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para *cis*-[Ru(Cl)$_2$(AO)$_2$(bpy)] (preto) e para *cis*-[Ru(NO$_2$)$_2$(AO)$_2$(bpy)] (vermelho), em acetonitrila a 25,0 °C, espectro qualitativo.



Fonte: Autora.

O espectro na região do visível do ligante Alaranjado de Acridina e do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(bpy)$(AO)_2$NO]$(PF_6)_2$ estão representados na Figura 31. Os espectros foram realizados em meio prótico (metanol).

Figura 31 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis em água para AO (preto) (3,00 x10^{-5} mol L^{-1}) e para *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)NO]$(PF_6)_2$ (vermelho) (2,50 x 10^{-5} mol L^{-1}) a 25,0 °C



Fonte: Autora.

Com base nos dados reportados na literatura para as espécies *cis*-[Ru(NO_2)$(bpy)_2$(L)](PF_6), (L = Cl^-, NO^{2-}, OH^-, NH_3, py, 4-acpy e 4-pic) (CALLAHAN & MEYER, 1977; ASSEFA & STANBURY, 1997; GODWIN & MEYER, 1971), pode-se relacionar as bandas na região do UV-vis/vis do complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ às suas prováveis transições (Tabela 7).

Tabela 7 - Atribuição para as transições observadas para as bandas na região do UV-vis do composto *cis*-$[Ru(bpy)(AO)_2(NO_2)NO](PF_6)_2$

Bandas (nm)	Atribuições
243	Transições IL π- π* do ligante bipiridina
286	Transições IL π- π* do ligante bipiridina
337	Transição de Transferência de Carga Metal-Ligante (TCML) $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO)$
436	Transição (TCML) $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bpy)$

Fonte: Autora.

A banda de baixa intensidade que se nota em 337 nm (log ε = 3,98) é atribuída à transferência de carga metal ligante (TCML) que ocorre pela transição $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO^+)$, com possíveis contribuições de transições $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bpy)$; $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(AO)$ e transferência de carga ligante metal (TCLM) $\pi(NO^+) \rightarrow d\pi^*(Ru^{II})$. A banda em 436 nm, por sua vez, foi atribuída à transições TCML $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bpy)$ com contribuição $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(AO)$.

Os coeficientes de absortividade molar para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$, em água, foram determinados para cada banda (Tabela 8).

Tabela 8 - Coeficientes de extinção molar para Alaranjado de Acridina e *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$

Composto	Solvente	λ_{nm}, (log ε L mol^{-1} cm^{-1} ± desvio)	Referência
Alaranjado de Acridina	Água	489 (4,49)	MAKAROV; KUZNETSOVA; KALIYA, 2006.
cis-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$	Água	243 (4,43 ± 0,01); 286 (4,71 ± 0,03); 337 (3,98 ± 0,02); 436 (4,00 ± 0,01).	Este trabalho

Fonte: Autora.

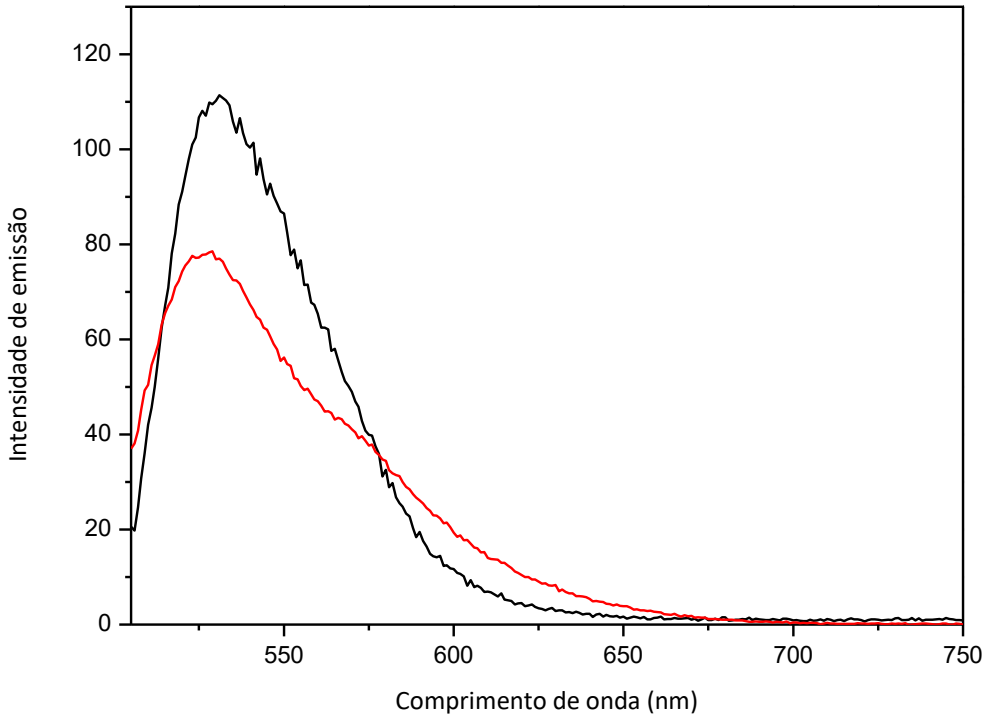
Como discutido anteriormente, existem transições permitidas de alta intensidade, como as transições internas de ligantes insaturados envolvendo elétrons π e outras, como as TCML, que apresentam coeficiente de absortividade molar da ordem de até 10^4. Fundamentado nestes conceitos, os valores encontrados são condizentes com a intensidade dos sinais observados no espectro eletrônico e com os tipos de transições atribuídas.

7.5 Espectroscopia de luminescência

O objetivo principal do presente trabalho é o desenvolvimento de um composto rutênio-nitrosilo com propriedades luminescentes. Portanto, para viabilizar os estudos de sublocalização celular, a fluorescência foi uma ferramenta intensamente explorada.

Os espectros, representados pela Figura 32, ilustram o ligante AO e o complexo sintetizado e purificado, *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$, em solução etanólica.

Figura 32 - Espectro eletrônico de emissão em água do AO (preto) e do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ (vermelho) a 25,0 °C (1,00 X10^{-7} M)



Fonte: Autora.

Os espectros foram adquiridos nas condições descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros utilizados para aquisição dos espectros eletrônicos de emissão da Figura 32

$\lambda_{excitação}$ (nm)	485
Varredura (nm)	505 a 750
Fenda de excitação (nm)	3,0
Fenda de emissão (nm)	3,0

Fonte: Autora.

Observa-se que o comprimento de onda de emissão para o corante AO é 531 nm e para o composto desenvolvido é 529 nm. No entanto, apesar de notar-se que não houve diferença significativa no comprimento de onda de emissão, após a formação do complexo, é possível perceber o aparecimento de um ombro característico que não está presente no ligante AO.

Sabe-se, como foi dito, que uma espécie, ao ser excitada, é promovida a um estado excitado de maior energia e pode voltar ao estado fundamental dissipando tal energia por processos radiativos ou não-radiativos. Nota-se que, para os compostos analisados à mesma concentração, (1,00 x 10^{-7} mol L^{-1}) se obtém diferentes intensidades de fluorescência. Isto significa que houve um favorecimento de perda de energia por outros mecanismos de desativação além da fluorescência. A princípio, o cruzamento entre estados de multiplicidade diferente de spins é proibido, mas isto pode ser facilitado dependendo do favorecimento do acoplamento spin-órbita. Átomos pesados como Br, Pb, e o Ru, favorecem o acoplamento spin-órbita e, portanto, facilitam o cruzamento intersistema, levando a perdas por outras vias de desativação.

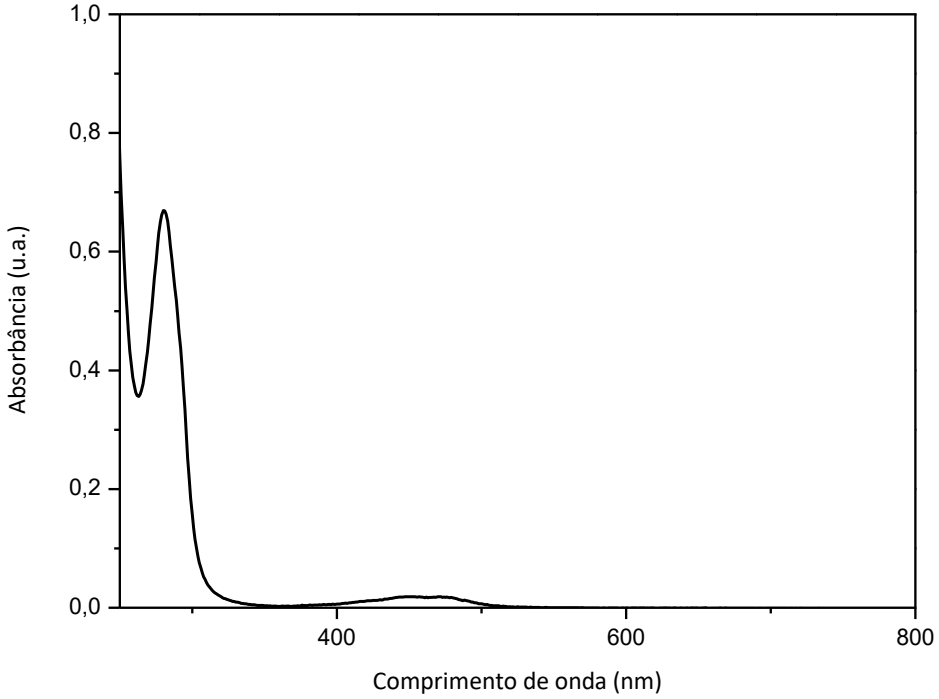
Este resultado sugere fortemente um valor de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) mais baixo para o complexo do que para o AO. Por essa razão, investigações neste sentido foram realizadas.

7.6 Rendimento quântico de fluorescência

A razão entre o número de fótons emitidos a partir do estado excitado singleto pelo processo radiativo (fluorescência) e o número total de fótons absorvidos, define um parâmetro fotofísico denominado rendimento quântico de fluorescência (Φ_F). Este parâmetro foi determinado conforme discutido anteriormente na seção 6.4.2. Para a realização desses estudos, utilizou-se, a fluoresceína como padrão, uma vez que a mesma apresenta características apropriadas para uma comparação adequada ao complexo obtido, conforme outrora exposto. Este padrão é melhor utilizado quando a excitação é feita entre 400 e 500 nm (λ_{em} = 515 nm) (DEMAS & CROSBY, 1971).

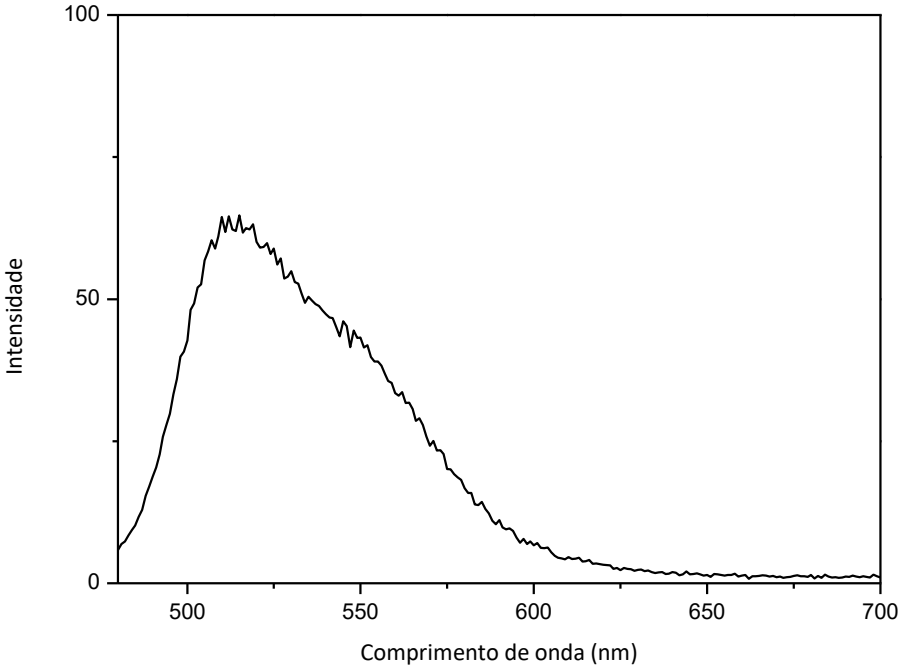
O perfil dos espectros de absorção e emissão para a fluoresceína em etanol estão apresentados nas Figuras 33 e 34, respectivamente, que correspondem aos espectros utilizados para determinação do valor do rendimento quântico de fluorescência do complexo.

Figura 33 - Espectro eletrônico de absorção no UV-vis para o padrão Fluoresceína em etanol a 25,0 °C (2,00 x 10^{-7} mol L^{-1})



Fonte: Autora.

Figura 34 - Espectro eletrônico de emissão no UV-vis para o padrão Fluoresceína em etanol a 25,0 °C



Fonte: Autora.

O Alaranjado de Acridina apresenta um rendimento quântico de fluorescência em etanol, descrito na literatura igual a Φ_F = 0,20 (SOEP et al., 1972). O valor determinado pela técnica discorrida para o AO em etanol foi ϕ_F = 0,26 ± 0,01 e para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)NO]$(PF_6)_2$ em etanol foi ϕ_F= 0,15 ± 0,02. O valor obtido para o complexo parece pequeno quando comparado a outros compostos descritos na literatura, tais como a Fluoresceína em etanol (ϕ_F= 0,79) (KELOGG & BENNETT, 1964); a Rodamina 6G em etanol (ϕ_F= 0,79) (KUBIN & FLETCHER, 1982) e Azul do Nilo em etanol (ϕ_F= 0, 27) (SENS & DREXHAGE, 1981) o rendimento quântico do complexo parece pequeno. No entanto, comparado a compostos como a oxacarbocianina (C3) (ϕ_F= 0,05) (WAGGONER et al., 1989), o rendimento quântico encontrado parece ser alto. Além disso, foi suficiente para que houvesse emissão e que os experiementos de imagem celular pudessem ser conduzidos.

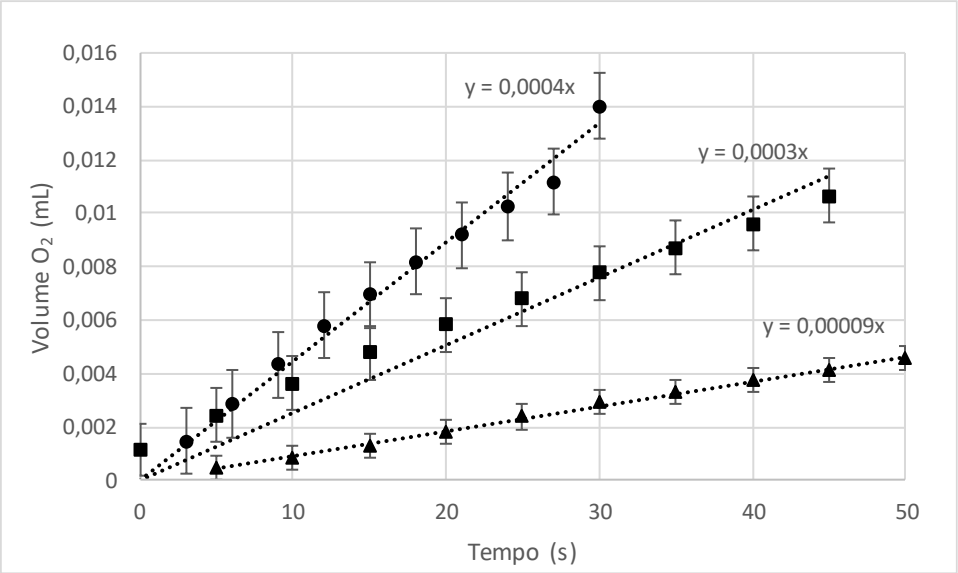
Por outro lado, a diminuição do rendimento quântico de fluorescência observado para o complexo, reitera positivamente a tratativa dos dados versados anteriormente, de que metais pesados, como o rutênio, podem favorecer outros processos de desativação através do acoplamento spin-órbita favorecendo o cruzamento intersistema, levando a perdas por outros caminhos de desativação. Um dos caminhos de desativação possíveis seria através da formação de oxigênio singleto (ABRAHAMSE & HAMBLIN, 2016; AGOSTINIS et al., 2004).

7.7 Rendimento quântico de Oxigênio Singleto (ϕ_Δ)

Conforme abordado na seção 6.4.3, a determinação do rendimento quântico de $^1O_2$ (ϕ_Δ) para os compostos foi realizada a partir do método indireto de detecção de oxigênio dissolvido. A técnica foi escolhida em detrimento da técnica na qual a detecção é feita a partir do uso da sonda DPBF (1,3-difenilisobenzofurano) devido ao comprimento de onda de irradiação utilizado (470 nm). Neste comprimento de onda observou-se degradação da sonda e aumento na intensidade da absorbância no espectro eletrônico de absorção mediante à irradiação. Diante dos fatos, não seria possível detectar a produção de $^1O_2$ por esta técnica, optando-se pelo método proposto por Tanielian et al. (1996).

Assim, através da Equação 4, obteve-se as concentrações de oxigênio consumidas pelos compostos em função do tempo, que estão apresentadas no gráfico da (Figura 35).

Figura 35 - Gráfico de Volume de O_2 (ml) *versus* tempo (s) para Azul de metileno (círculos); *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ (quadrados) e AO (triângulos)



Fonte: Autora.

Por meio do gráfico delineado, extraiu-se os coeficientes angulares das retas, possibilitando o cálculo da constante de velocidade de consumo de O_2 (K). Foram feitas medidas de absorbância (A) para o padrão e para a amostra e os valores resultantes foram relacionados para encontrar a intensidade de luz absorvida (I). Assim os resultados foram organizados nas Tabelas 10 a, 10 b e 10 c, dispostas abaixo.

Tabela 10 a - Valores de absorbância

	Medida 1	Medida 2	Medida 3
$[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$	0.1980	0.2098	0,1812
Alaranjado de Acridina	0.1362	0.1655	0.1542
Azul de Metileno	0.1846	0.2723	0,1438

Fonte: Autora.

Tabela 10 b - Valores de I ($I = 1-10^{-A}$)

	Medida 1	Medida 2	Medida 3
$[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$	0.3661	0.3831	0,3411
Alaranjado de Acridina	0.2683	0.3169	0.2988
Azul de Metileno	0.3462	0.4658	0.2819

Fonte: Autora.

Tabela 10 c - Valores de K (coeficiente angular da reta)

	Medida 1	Medida 2	Medida 3
$[Ru(NO_2)(bpy)(AO)_2NO](PF_6)_2$	2.46×10^{-4}	1.68×10^{-4}	2.09×10^{-4}
Alaranjado de Acridina	1.05×10^{-4}	8.38×10^{-5}	9.17×10^{-5}
Azul de Metileno	4.95×10^{-4}	4.19×10^{-4}	3.27×10^{-4}

Fonte: Autora.

Deste modo, com estes valores, foi possível calcular as respectivas médias e, assim, obter o parâmetro rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) para os compostos através da Equação 6, proposta no mesmo item.

Já é bem estabelecido que o Alaranjado de Acridina é produtor de $^1O_2$, sendo um dos primeiros fotossensibilizadores utilizados (RAAB, 1900; KUSUZAKI et al., 2007; KUSUZAKI et al., 2012). Neste estudo, realizado em triplicata, o corante AO em meio aquoso apresentou um rendimento quântico de produção de $^1O_2$ singleto igual a $\Phi_\Delta = 0,16$ e o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$, $\Phi_\Delta = 0,26$. Os valores determinados estão em concordância com os valores reportados de rendimento quântico de fluorescência, corroborando para as afirmativas realizadas anteriormente.

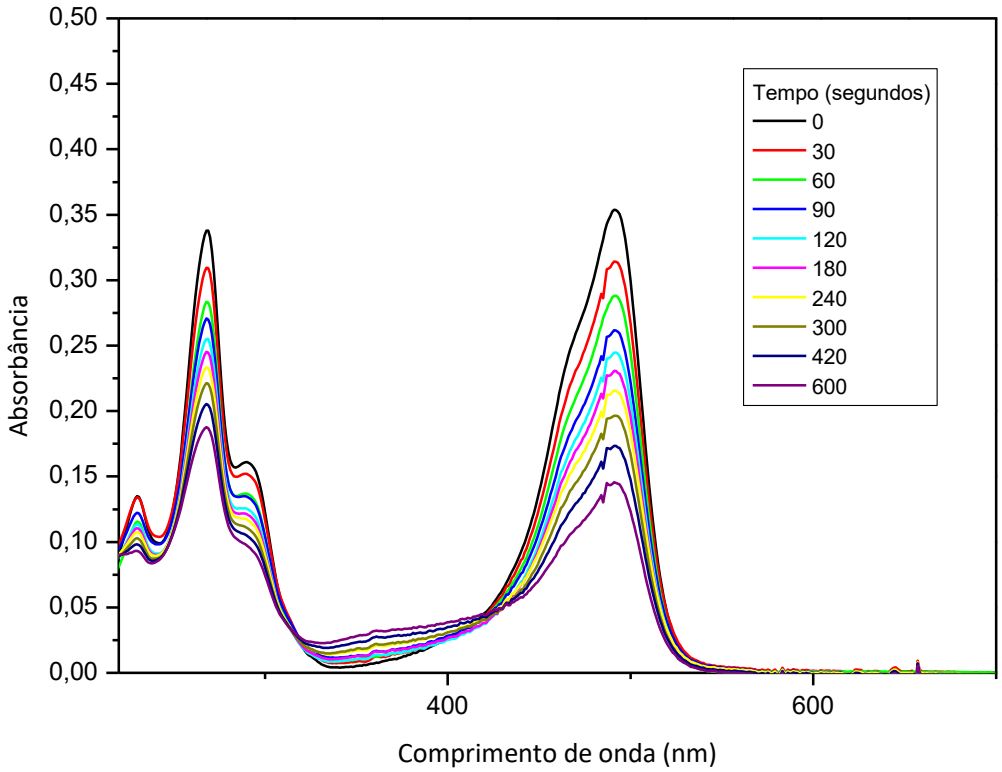
Por conseguinte, os dados demonstram que com o favorecimento do processo de cruzamento intersistema, a redução da fluorescência pode ter levado à perda de energia por outros caminhos de desativação e um deles possivelmente é a produção de oxigênio singleto, que se encontra mais pronunciada para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$. Este resultado pode ser útil para a terapia luminosa, outrossim, para ação sinérgica entre óxido nítrico e oxigênio singleto na terapia anticancerígena, haja visto que o ambiente celular tumoral é um ambiente hipóxico e

que o mecanismo de ação de muitos compostos antitumorais se baseia na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SILVEIRA-LACERDA et al., 2010).

7.8 Avaliação da fotoestabilidade

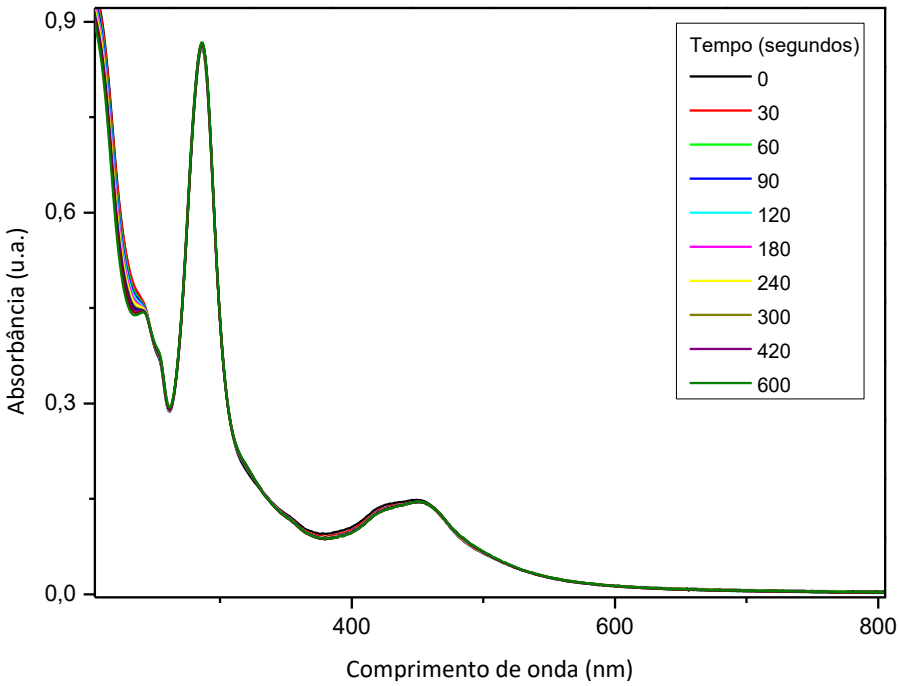
Avaliou-se a fotoestabilidade do AO e do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ em água, sob irradiação a 470 nm por intervalos de tempo aperiódicos em um tempo total de 600 segundos a 25,0 °C (Figuras 36, 37, 38 e 39). O ensaio foi realizado em triplicata. Conforme se observa nas Figuras 36 e 38, o Alaranjado de Acridina apresenta alterações nos espectros de absorção e emissão em função do estímulo luminoso.

Figura 36 - Acompanhamento dos espectros eletrônicos de absorção para o ligante Alaranjado de Acridina em água, após sucessivas irradiações, a 25,0 °C ($1,10 \times 10^{-5}$ M)



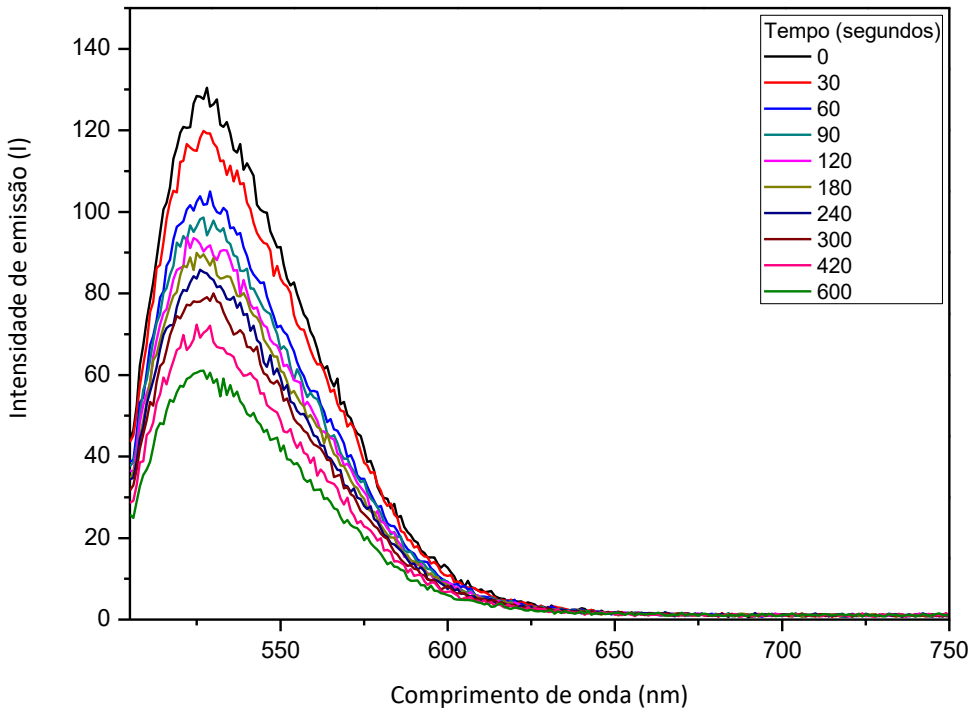
Fonte: Autora.

Figura 37 - Acompanhamento dos espectros eletrônicos de absorção para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ em água, após sucessivas irradiações, em 470 nm a 25,0 °C (1,70 x 10^{-5} M)



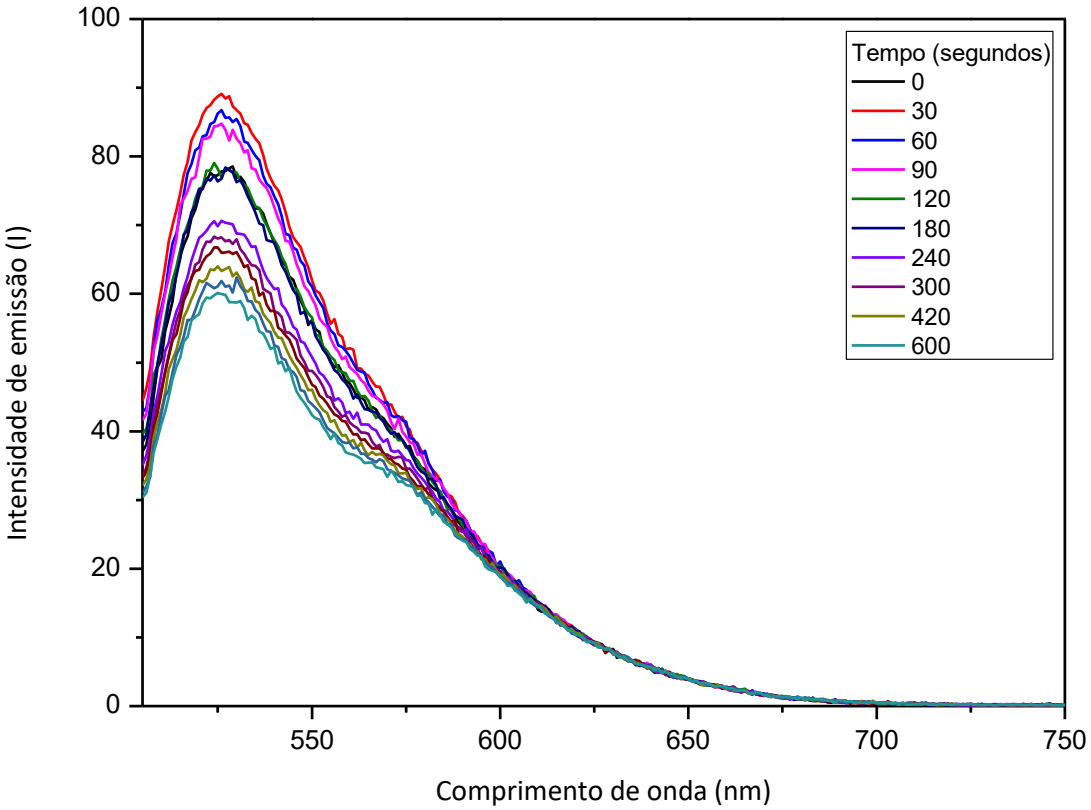
Fonte: Autora.

Figura 38 - Acompanhamento do espectro de emissão em água para Alaranjado de Acridina após sucessivas irradiações em 470 nm a 25,0 °C (1,10 x 10^{-5} M)



Fonte: Autora.

Figura 39 - Acompanhamento do espectro de emissão do complexo $[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ em água, após sucessivas irradiações, em 470 nm a 25,0 °C (1,70 x 10^{-5} M)



Fonte: Autora.

Consoante à literatura, o AO sofre fotodegradação sob luz visível e a velocidade deste processo depende da sua concentração e da presença de oxigênio molecular. Estudos permitem afirmar que o fotobranqueamento do AO é mais rápido quando a concentração da solução é menor (SILVA & BORISSEVITCH, 2010). Este efeito se relaciona à possibilidade de formação de agregados de AO em altas concentrações, os quais podem resultar na dissipação da energia absorvida por processos não-radiativos, competindo com o processo de fototransformação. Quando as soluções estão em baixas concentrações, os monômeros presentes, transformam-se sob ação da luz, permitindo que haja redução na concentração e diminuição na intensidade da banda observada (SILVA & BORISSEVITCH, 2010).

O sistema de conjugação π do AO é destruído independentemente da presença de O_2 molecular, mas o processo pode ser acelerado na presença desta molécula. Com a formação do estado tripleto do AO, sob ação da luz, a energia pode ser

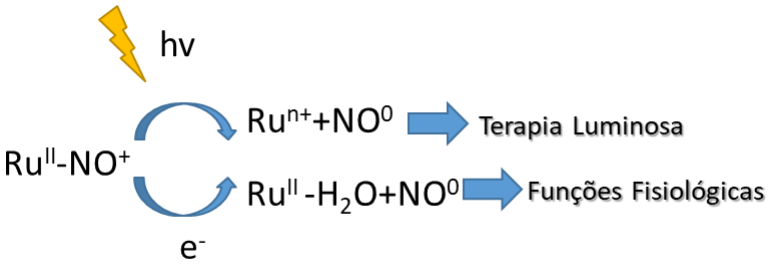
transferida para o oxigênio, formando oxigênio singleto, que pode atacar ligações duplas, destruindo o sistema de conjugação π. (SILVA & BORISSEVITCH, 2010).

Como foram avaliadas concentrações da mesma ordem para ambas as espécies, sugere-se que nas condições apresentadas, o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ seja mais fotoestável que o AO, como pode ser acompanhado graficamente. Essa característica é uma vantagem interessante quando se trata de um fluoróforo que será utilizado como marcador celular em microscopia de fluorescência, como já fora discutido no item 2.2.2.

7.9 Avaliação qualitativa da liberação de Óxido Nítrico

Considerando a relevância do óxido nítrico para a terapia atitumoral é grande o interesse no desenvolvimento de compostos que possam atuar como agentes doadores de NO. Nesse sentido são importantes os estudos relacionados à busca por complexos que possibilitem uma liberação controlada do NO seja através do estímulo eletroquímico ou fotoquímico (TFOUNI et al., 2012) (Figura 40).

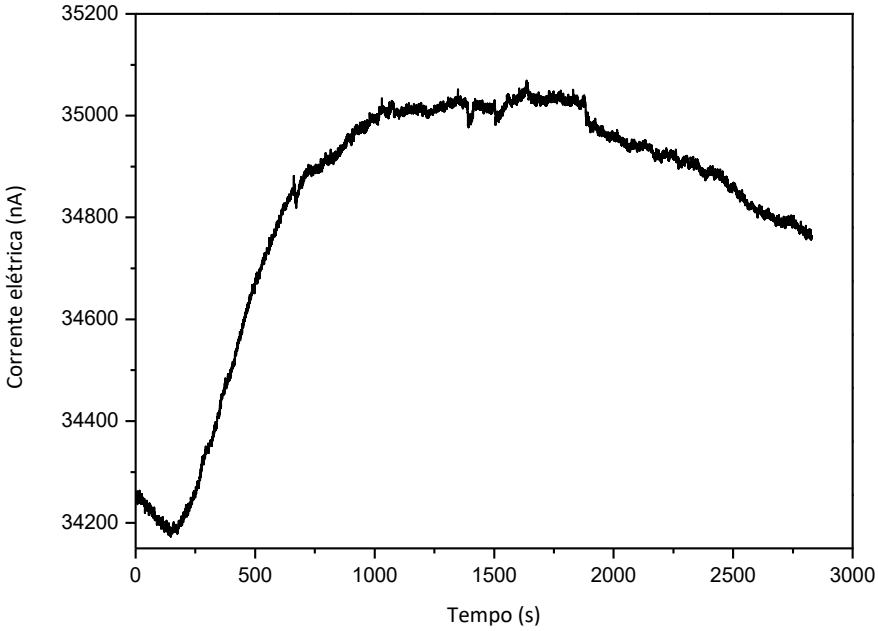
Figura 40 - Liberação controlada de NO: estímulo eletroquímico ou fotoquímico



Fonte: Autora.

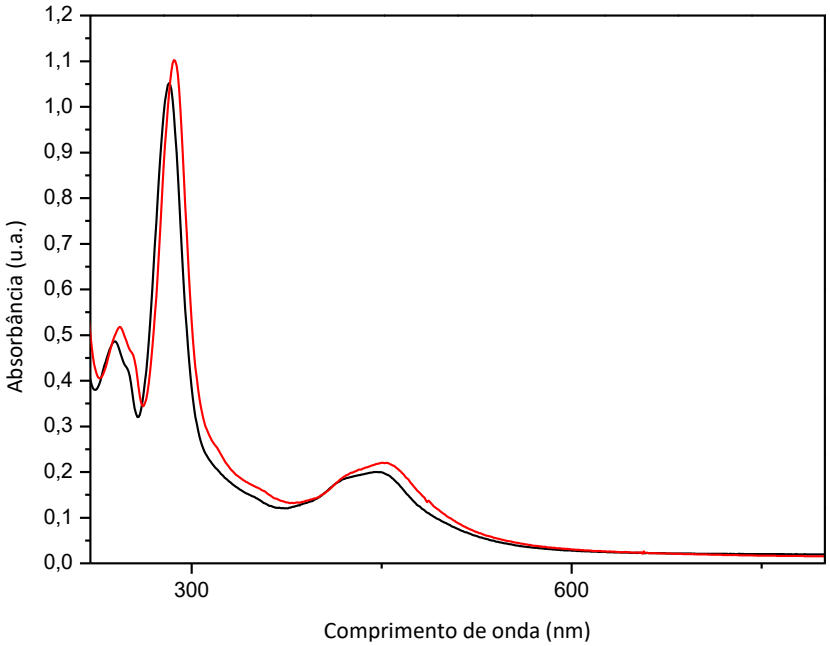
Com base no exposto, a fim de se verificar se o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ produz NO em solução aquosa, irradiou-se soluções de concentrações aproximadas de 2,00 x 10^{-5} mol L^{-1} e 2,50 x 10^{-5} mol L^{-1} com laser em 377 nm e 447 nm, respectivamente. Essa região apresenta um caráter de contribuição maior do ligante NO na composição dos orbitais moleculares para esse complexo. A variação espectroscópica tal como o cronoamperograma registrado para os dois comprimentos de onda testados encontram-se abaixo, nas Figuras 41, 42, 43 e 44.

Figura 41 - Perfil de liberação de NO em água para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ após irradiação em 377 nm (2,00 x 10^{-5} mol L^{-1})



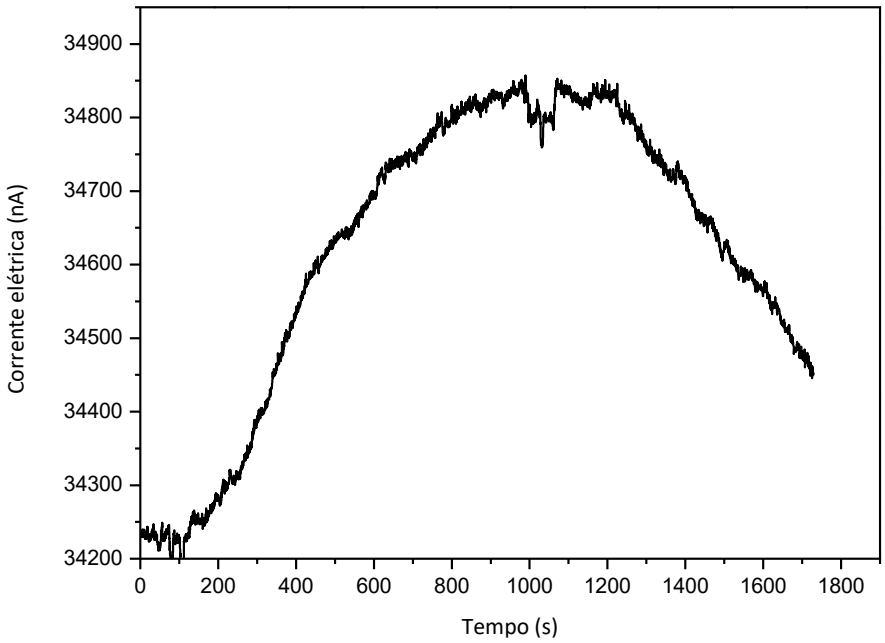
Fonte: Autora.

Figura 42 - Perfil de variação do espectro no UV-vis do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ em água. Antes (preto) e após (vermelho) a irradiação em 377 nm a 25,0 °C (2,00 x 10^{-5} mol L^{-1})



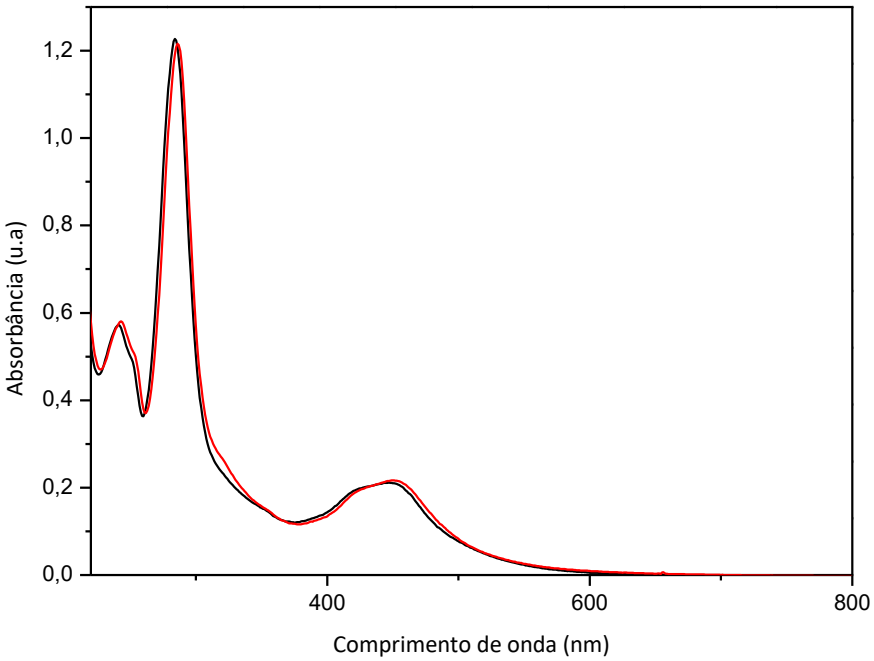
Fonte: Autora.

Figura 43 - Perfil de liberação de NO em água para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ após irradiação em 447 nm (2,50 x 10^{-5} mol L^{-1})



Fonte: Autora.

Figura 44 - Perfil de variação do espectro no UV-vis do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ em água. Antes (preto) e após (vermelho) a irradiação em 447 nm a 25,0 °C (2,50 X 10^{-5} mol L^{-1})



Fonte: Autora.

Embora qualitativos, os resultados obtidos são bastante significativos dado que a partir das alterações espectrofotométricas e dos registros cronoamperométricos é possível verificar que o complexo obtido apresenta, de fato, a capacidade de liberar o NO quando fotoestimulado e, ainda, que o perfil de liberação está relacionado ao comprimento de irradiação escolhido. Observa-se que ao se irradiar em 447 nm, parece haver uma pronta liberação de NO, já quando irradiado em 377 nm essa liberação de NO parece ocorrer de maneira prolongada. Isso permite que se criem estratégias que levem à escolha de determinados comprimentos de onda de irradiação para complexos rutênio-nitrosilos em função do objetivo terapêutico proposto, ampliando as possibilidades de uso de sistemas dessa natureza na clínica.

Essas observações devem-se à presença das bandas de Transição de Transferência de Carga Metal Ligante (TCML) que ocorrem em 337 nm e 436 nm. A banda em 337 nm corresponde à transição (TCML) $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO^+)$ (log ε = 4,71) e a banda em 436 nm corresponde à transição TCML $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bpy)$ com (log ε = 4,00). Isto explica o perfil de liberação de NO encontrado.

O Ru(II) tem afinidade pelo NO^+ que é um ácido-π forte. Assim, espera-se que para complexos rutênio-nitrosilos haja uma possível retroação $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO^+)$. A irradiação em 337 nm promove fotoxidação e formação da espécie *cis*-$\{[Ru(III)(NO_2)(AO)_2(bpy)NO^0]^{3+}\}^*$ no estado excitado. O ligante NO^0 é um ligante que possui fraca atração pelo Ru(III) e, desta forma, é liberado da esfera de coordenação do metal.

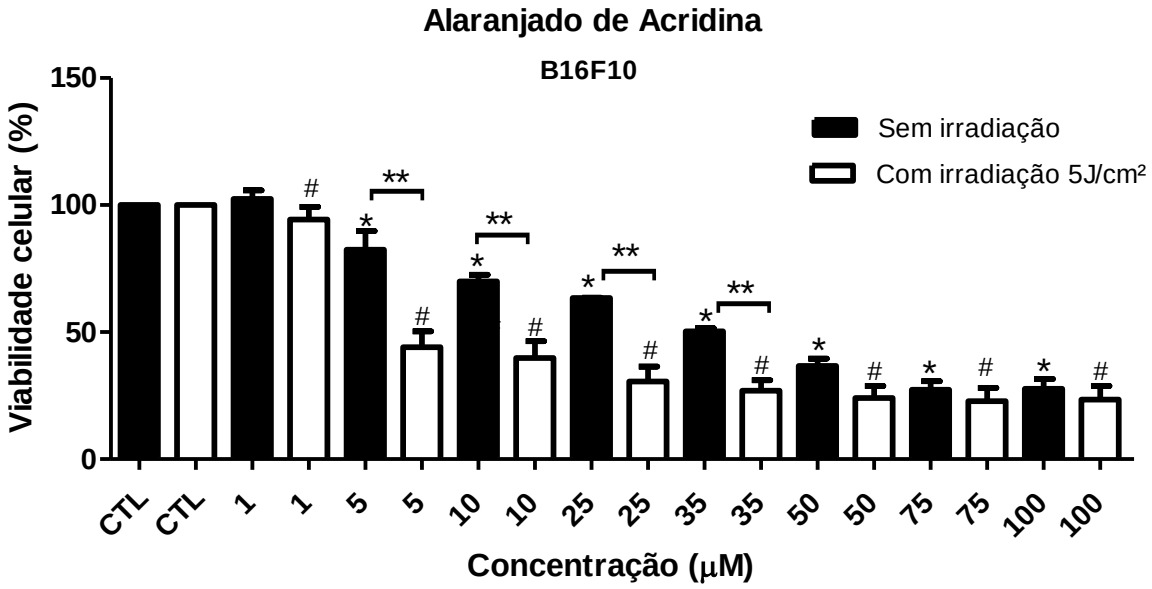
Ao irradiar em 436 nm, inicialmente ocorre a excitação da banda de transferência de carga $d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(bpy)$, a qual, no estado excitado, transfere um elétron para o NO^+, espécie altamente eletrofílica, sendo então, reduzido para NO^0 e labilizado.

A partir dos resultados obtidos por meio dessa técnica, optou-se pelo comprimento de onda de irradiação de 470 nm para a condução dos ensaios biológicos voltados á determinação do potencial citotóxico do novo complexo nitrosilo, considerando à região da janela fototerapêutica.

7.10 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade por meio da análise de viabilidade celular para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ e ligante Alaranjado de Acridina foi conduzida por meio da metodologia descrita no item 6.6.1 em modelos celulares sadios (L929) e neoplásicos (B16/10). Os ensaios avaliaram a influência da concentração dos compostos de 1 a 100 µM e da irradiação à dose de 5 J cm^{-2}, por 4 horas de incubação. Os dados representam as médias ± desvio (S.E.M.) de três experimentos realizados de forma independente.

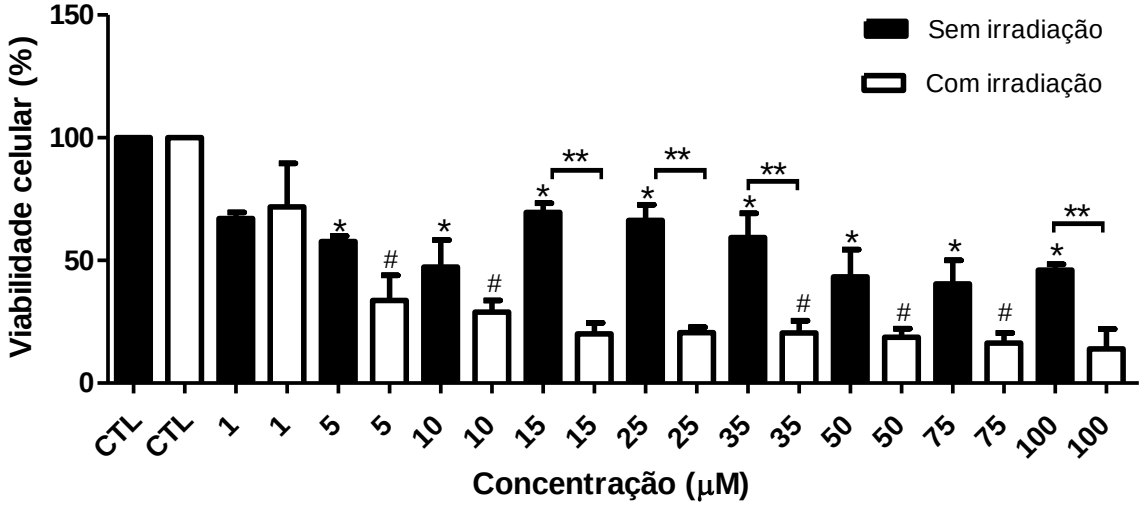
Figura 45 - Efeito citotóxico do ligante Alaranjado de Acridina em modelos de células B16/F10 após 4 horas de incubação



Fonte: Autora.

*Existe diferença entre o grupo e o grupo controle não irradiado ($p \leq 0,05$); # existe diferença entre o grupo e o grupo controle irradiado ($p \leq 0,05$); ** existe diferença estatística entre os grupos. Não foi detectada diferença estatística entre os controles por teste T-Student ($p \geq 0,05$). CTL = controle.

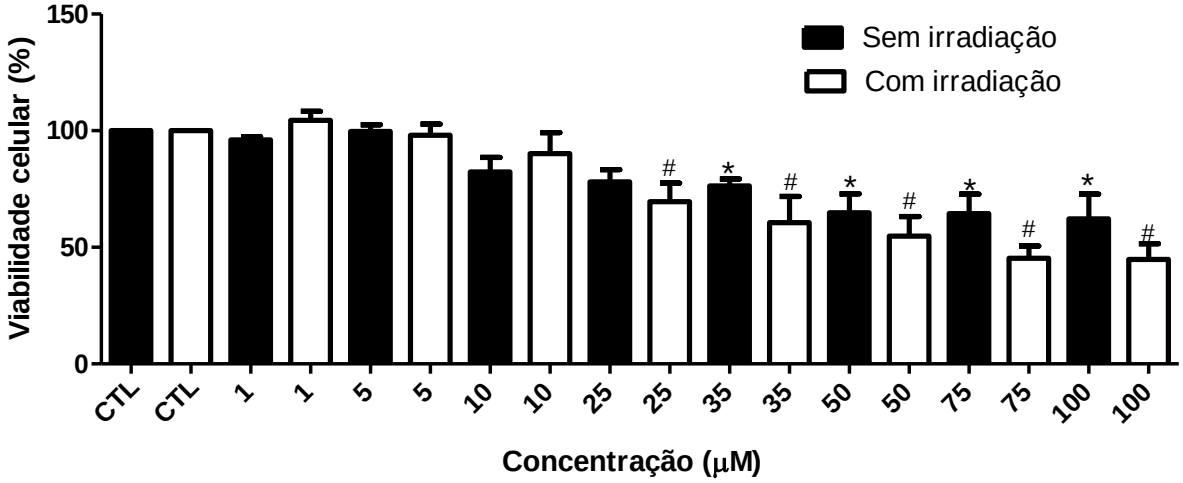
Figura 46 - Efeito citotóxico do ligante Alaranjado de Acridina em modelos de células L929 após 4 horas de incubação



Fonte: Autora.

*Existe diferença entre o grupo e o grupo controle não irradiado ($p \leq 0,05$); # existe diferença entre o grupo e o grupo controle irradiado ($p \leq 0,05$); ** existe diferença estatística entre os grupos. Não foi detectada diferença estatística entre os controles por teste T-Student ($p \geq 0,05$). CTL = controle.

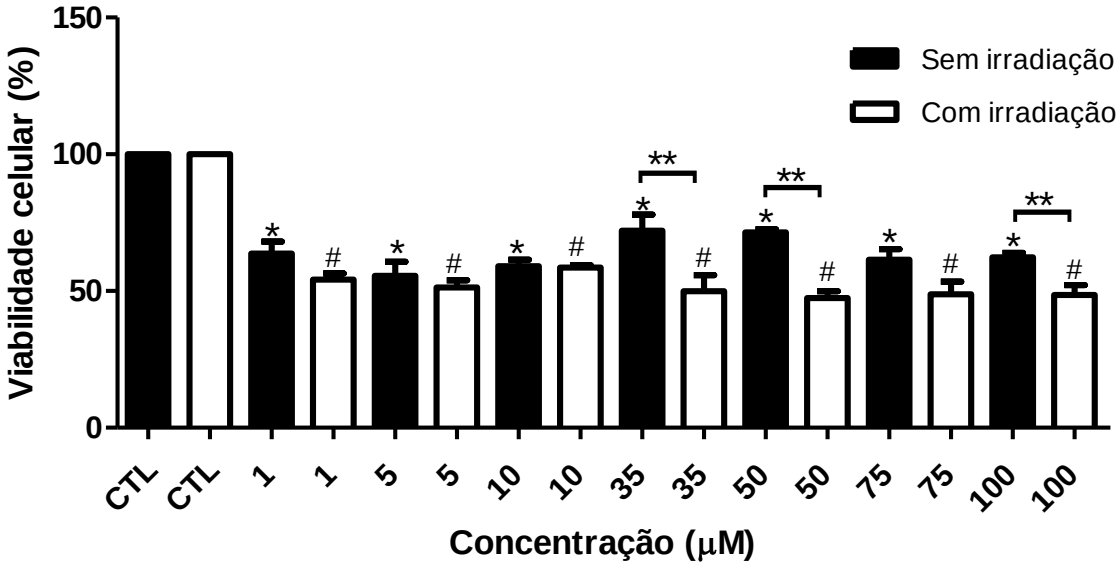
Figura 47 - Efeito citotóxico do complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ em modelos de células B16/F10 após 4 horas de incubação



Fonte: Autora.

*Existe diferença entre o grupo e o grupo controle não irradiado ($p \leq 0,05$); # existe diferença entre o grupo e o grupo controle irradiado ($p \leq 0,05$); ** existe diferença estatística entre os grupos. Não foi detectada diferença estatística entre os controles por teste T-Student ($p \geq 0,05$). CTL = controle.

Figura 48 - Efeito citotóxico do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ em modelos de células L929 após 4 horas de incubação



Fonte: Autora.

*Existe diferença entre o grupo e o grupo controle não irradiado ($p \leq 0,05$); # existe diferença entre o grupo e o grupo controle irradiado ($p \leq 0,05$); ** existe diferença estatística entre os grupos. Não foi detectada diferença estatística entre os controles por teste T-Student ($p \geq 0,05$). CTL = controle.

Os resultados de viabilidade celular demonstram que o corante Alaranjado de Acridina apresentou atividade citotóxica maior que o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ e, ainda, que o potencial citotóxico do ligante é aprimorado na presença do estímulo luminoso.

As análises estatísticas revelam, por exemplo, que há diferença significativa entre grupos irradiados e não irradiados tratados com AO para modelos celulares B16/F10 a partir de 35 μM, sendo que há redução na viabilidade celular de cerca de 75 % com o fotoestímulo nesta concentração. É preciso destacar que o Alaranjado de Acridina como exposto na seção 2.2.3 é um agente intercalante de DNA e também é capaz de produzir oxigênio singleto sob irradiação em comprimento de onda adequado, o que justifica a natureza destas observações experimentais, corroborando com o que é descrito na literatura para tal composto (RAAB, 1900; SHCRERER, 2000; LACOKWICZ, 2006).

Já para o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$, observou-se uma redução de cerca de 50 % da viabilidade celular na concentração máxima testada

para os modelos tumorais. Quando avaliado sob a linhagem metastática B16/F10, o complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ demostrou ser citotóxico na ausência de irradiação para as concentrações superiores a 35 µM, para a linhagem L929 esse efeito foi ainda mais evidente com uma redução significativa (30 %) já na concentração de 1 µM. Os dados obtidos possibilitam inferir que na linhagem não-tumoral a estimulação luminosa parece exercer um efeito mais significativo quanto à viabilidade, já que em todas as concentrações testadas existe diferença entre os grupos irradiado e não-irradiado, embora seja interessante ressaltar que essa diferença fora mais relevante para as concentrações maiores (35 a 100 µM). Para a linhagem tumoral a diferença decorrente da irradiação é observada somente a partir da concentração de 25 µM. A análise estatística demonstra que, de fato, a irradiação não foi significativa para as células da linhagem B16/F10, mas para a L929, a partir de 50 µM, houve um efeito importante na redução da viabilidade celular.

Tendo em vista a capacidade intercaladora ao da molécula AO ao DNA, (ZAMPIERI & GREENBERG et al., 1965; KAPUSCINSKI; DARZYNICIEWICZ; MELAMED, 1983; KUSUZAKI et al., 2012; AMADO et al., 2017) sugere-se que, o potencial citotóxico menor do complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ em relação ao do AO seja devido a uma possível alteração na capacidade de intercalação ao DNA do AO quando este se cordena ao metal. Além disso, cabe destacar que a espécie sintetizada, ainda, é produtora de óxido nítrico e oxigênio singleto, que, juntos, sugerem um efeito sinérgico com potencial antitumoral, no entanto, deve-se levar em conta que este efeito pode ser minimizado por enzimas redutoras e que a espécie sintetizada pode não ter efeito tão proeminente no alvo biológico em que se localizou majoritariamente, ou que ainda, a a molécula radicalar NO encontre-se em concentrações adequadas para exercer efeitos proliferativos.

7.11 Avaliação da sublocalização celular por Microscopia de Fluorescência

O objetivo inicial do projeto era desenvolver um complexo rutênio nitrosilo que além de atividade anticancerígena, apresentasse propriedades que permitissem inferir informações acerca da sublocalização celular através de microscopia de fluorescência, possibilitando visibilizar quais os possíveis compartimentos

relacionados às respostas celulares observadas, bem como correlacionar esses dados com os resultados de citotoxicidade obtidos. Nesse contexto, em função da natureza fluorescente do composto sintetizado, *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$, realizou-se um ensaio comparativo entre o complexo e o corante AO, no modelo celular tumoral B16/F10.

Foram testadas as concentrações de 15 µM do complexo *cis*-[Ru(NO_2)$(AO)_2$(bpy)(NO)]$(PF_6)_2$ e 7,50 µM de AO. As amostras foram incubadas sem irradiação por 4 horas e ambos os compostos aparecem nas imagens abaixo (Figuras 49, 50, 51 e 52) com fluorescência em verde, que se sobrepõem às células, indicando internalização.

Figura 49 - Controle experimental: células B16/F10 sem tratamento e sem irradiação

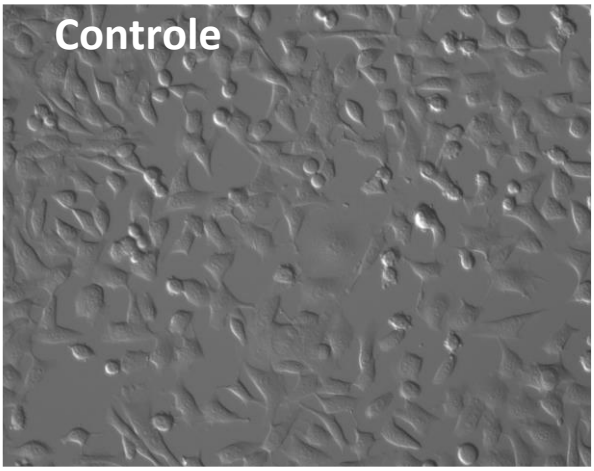


Figura 50 - Microscopia de fluorescência de células B16/F10 tratadas com AO (7,50 µM) (Campo claro / Campo escuro)

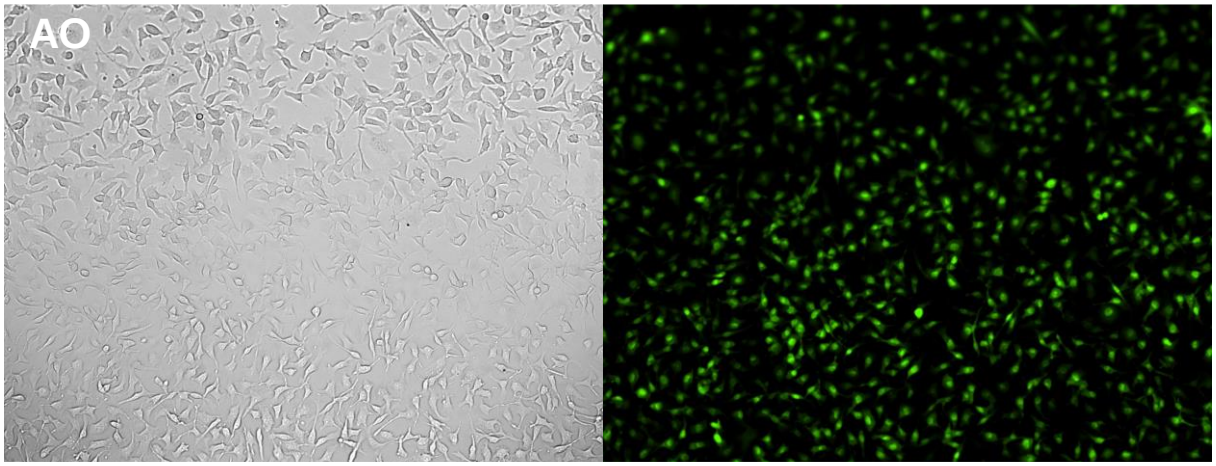


Figura 51 - Microscopia de fluorescência de células B16/F10 tratadas com complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$ (15 µM). a: Campo claro. b: Campo escuro

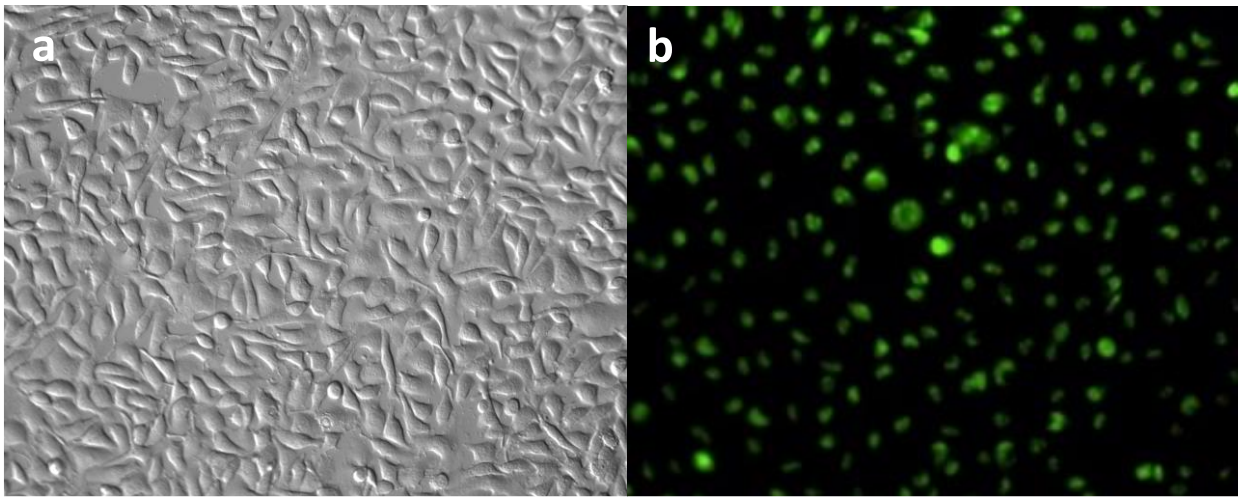
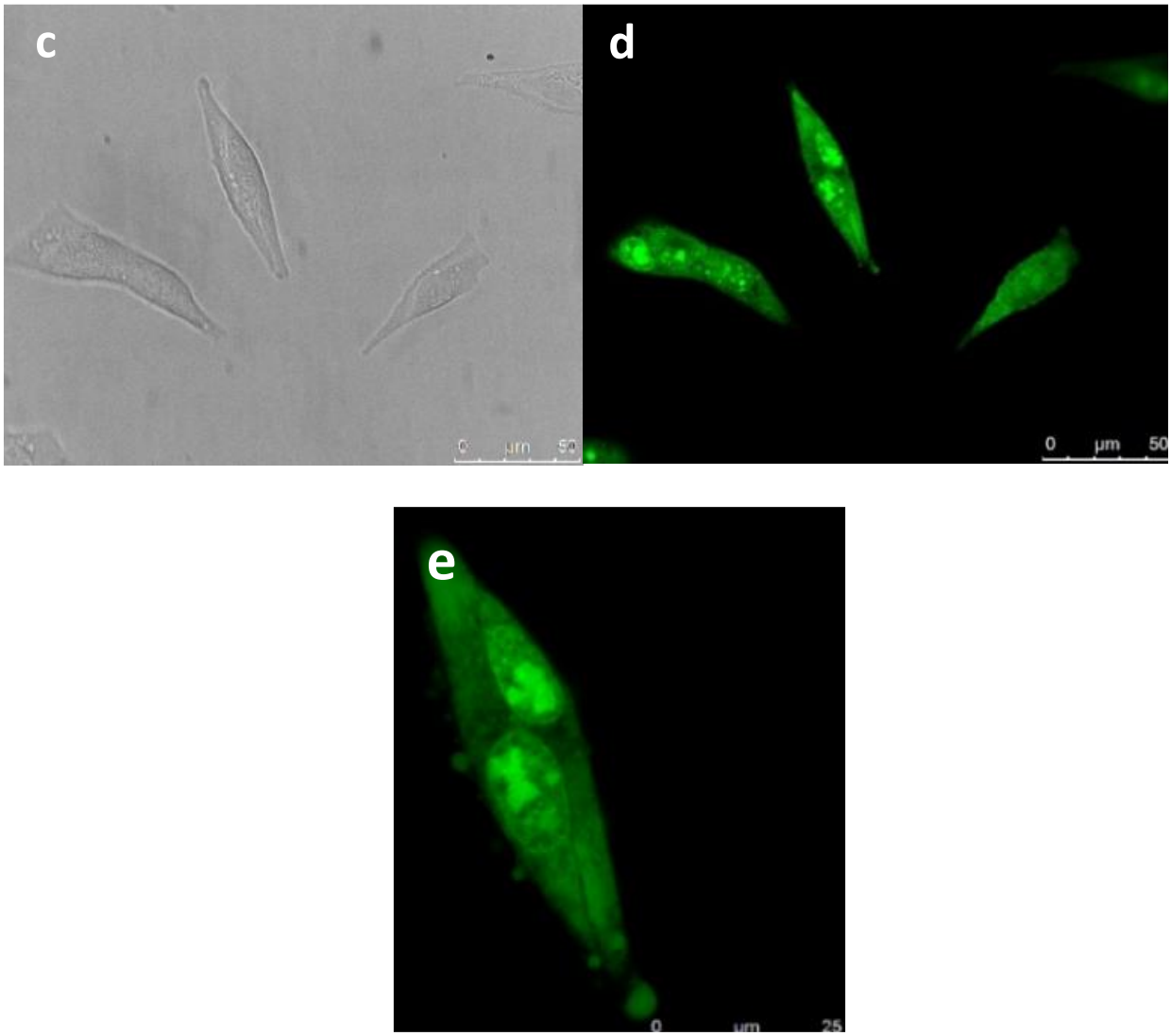
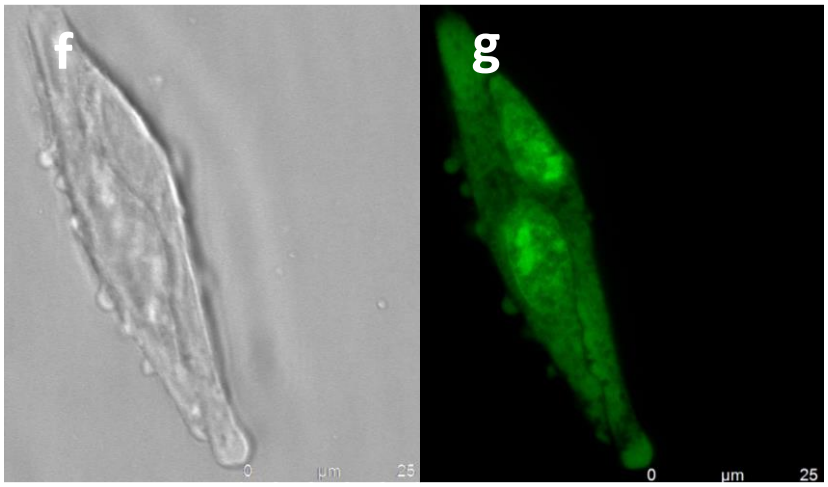


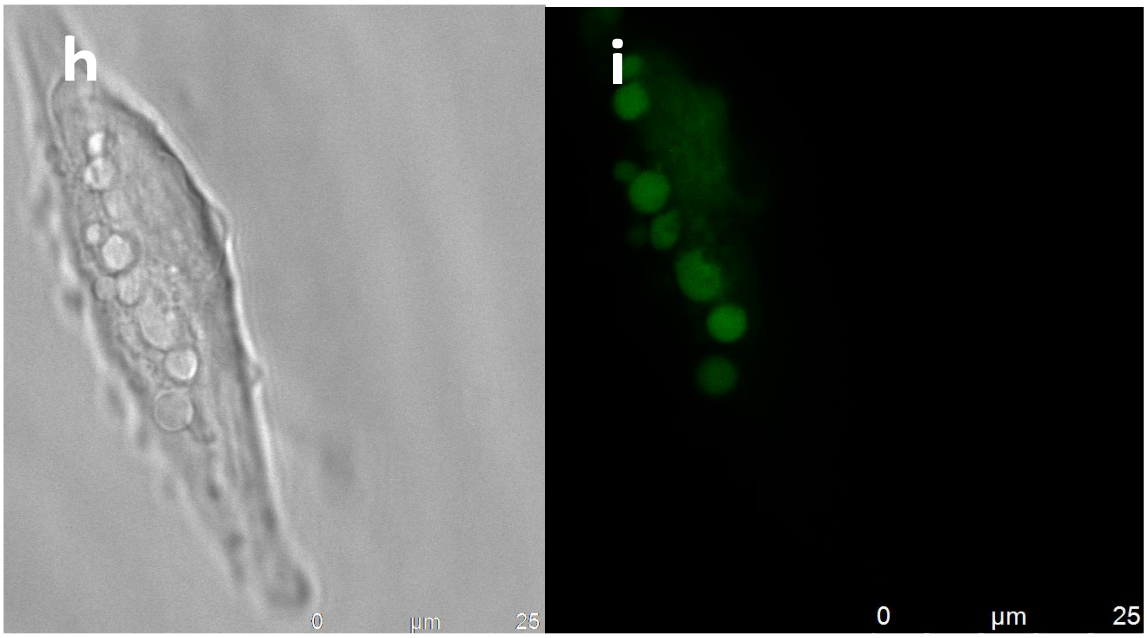
Figura 52 - Microscopia de fluorescência confocal de células B16/F10 tratadas com complexo *cis*-[Ru(NO_2)(AO)$_2$(bpy)(NO)](PF_6)$_2$ (15 µM). c: Campo claro (zoom 1,5X), d: Campo escuro (zoom 1,5X) e: Campo escuro (zoom 3,0X), f: Formação de corpúsculos circulares - campo claro (zoom 3,0X), g: Formação de corpúsculos circulares - Campo escuro (zoom 3,0X), h: Formação de corpúsculos circulares- Campo claro (zoom 3,0X), i: Formação de corpúsculos circulares- Campo escuro (zoom 3,0X)



Fonte: Autora.



Fonte: Autora.



Fonte: Autora.

A literatura reporta a capacidade inerente de o AO fluir rapidamente pelo citoplasma e atravessar com facilidade a membrana celular, apresentando tropismo pelo núcleo (ROBBINS & MARCUS, 1963; SHAW & PAL, 2007). Isto posto, infere-se que as imagens obtidas por microscopia de fluorescência para o corante AO estão coerentes: nota-se que para o período de 4 horas de incubação o composto foi internalizado pelas células B16/F10 e se localizou preferencialmente no núcleo celular.

Quanto ao complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$, o estudo por imagens realizado oferece indícios de que o composto é internalizado pelas células no tempo avaliado, com predileção pelo núcleo (Figura 52). Nota-se ainda a presença

de estruturas circulares (Figuras h e i), as quais estariam associadas a vesículas exocíticas ou ainda a corpos apoptóticos, o que será posteriormente avaliado.

Apesar de ambos se localizarem na mesma estrutura celular, as respostas citotóxicas foram distintas. Supõe-se que isso esteja relacionado a diferentes mecanismos de ação envolvidos na morte celular. Como mencionado, o AO é uma molécula intercaladora de DNA que, provavelmente, ao ser coordenada apresenta uma alteração nessa capacidade e, portanto, há uma variação no potencial genotóxico.

Embora preliminares, tais observações são importantes para a condução de estudos futuros, nos quais serão utilizados marcadores específicos, contribuindo para a definição da localização mais precisa desses complexos. Esses dados, juntamente com a avaliação de outros parâmetros como, a concentração do complexo e a dose do fotoestímulo empregado, fornecerão subsídios para a compreensão dos mecanismos de citotoxicidade associados ao novo complexo sintetizado.

Considerações Finais

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em razão de sua natureza fluorescente, foi possível avaliar a internalização e a sublocalização celular preferencial do novo complexo, bem como comparar a do ligante livre. Destacando que ambos se localizam majoritariamente no núcleo celular, dado esse relevante para a compreensão dos resultados de viabilidade e futuras avaliações envolvendo os mecanismos de morte celular. Tais observações serão importantes para o delineamento de novos estudos com outros marcadores específicos e microscopia confocal que poderão ser realizados posteriormente para que se defina a localização específica desse complexo. Assim maiores considerações poderão ser feitas acerca da relação existente entre a estrutura, internalização, localização celular e os mecanismos de citotoxicidade.

Com base nesse exposto, as características do complexo poderão ser modificadas em função dos coligantes possibilitando a modulação das propriedades físico-químicas e biológicas, contribuindo assim para o aprimoramento do potencial citotóxico observado e por conseguinte para aplicação do mesmo na terapia do câncer.

Como perspectivas futuras, poderão ser realizados outros estudos no sentido de complementar os dados já obtidos. Dentre os quais destacam-se a determinação do rendimento quântico de óxido nítrico para o complexo *cis*-$[Ru(NO_2)(AO)_2(bpy)(NO)](PF_6)_2$, realização do estudo de interação com DNA, realização de estudos de tempo de vida, estudos cinéticos e de vias metabólicas envolvidas na morte celular, realização de estudos de microscopia de fluorescência variando a concentração e o tempo de incubação para complexo e AO, a fim de acompanhar o processo de internalização destes compostos, além de explorar o potencial citotóxico dos precursores elucidados neste trabalho.

Referências

9 REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 15; n. 473(4), p. 347–364, 2016.

ACHESON, R.M. **The chemistry of heterociclic compounds: 9. Acridines.** Interscience. New York, p. 26-34, 1973.

AGOSTINIS, P.; BUYTAERT, E.; BREYSSENS, H.; HENDRICKX, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, p. 721–729, 2004.

AHMAD, S.; ISAB, A. A.; ALI, S.; AL-ARFAJ, A. R. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. **Polyhedron**, v. 25, p. 1633-45, 2006.

AIRD, R. E.; CUMMINQS, A. A.; RITCHIE, M. M.; MORRIS, R. E.; CHEN, H.; SADLER, P. J.; JODREL, D. I. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel Ruthenium(II) organometallic arene complexes in human ovarian câncer. **British Journal of Cancer,** v. 86, p. 1652, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da célula.** Ed. Porto Alegre (BRA): Artmed, 2010.

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

AMADO, A. M.; PAZIN, W. M.; ITO, A. S.; KUZMIN, V. A.; BORISSEVITCH, I. E. Acridine Orange interaction with DNA: Effect of ionic strenght. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 900-909, 2017.

ANGELOPOULOU, A.; VOULGARI, E.; KOLOKITHAS-NTOUKAS A.; BAKANDRITSOS, A.; AVGOUSTAKIS, K. Magnetic Nanoparticles for the Delivery of Dapagliflozin to Hypoxic Tumors: Physicochemical Characterization and Cell Studies. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, 2017. doi:10.1208/s12249-017-0874-2.

ASSEFA, Z.; STANBURY, D. M. Oxidation of coordinated ammonia to nitrosyl in the reaction of aqueous chlorine with cis-$[Ru(bpy)_2NH_3)_2]^{2+}$. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, p. 521-530, 1997.

AZZAZY, H. M. E.; MANSOUR, M. M. H.; KAZMIERCZAK, S.C. Nanodiagnostics: A New Frontier for Clinical Laboratory Medicine. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 7 p. 1238–1246, 2006.

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

BATISTA, A. A.; PEREIRA, C.; QUEIROZ, S. L.; DE OLIVEIRA, L. A. A.; SANTOS, R. H. D.; GAMBARDELLA, M. T. D. Nitrosyl ruthenium complexes with general formula [$RuCl_3(NO)(P\text{-}P)$] (P-P={$PPh_2(CH_2)_nPPh_2$}, n=1-3 and {PPh_2-CH=CH-PPh_2}). X-ray structure of [$RuCl_3(NO)\{PPh_2(CH_2)_3PPh_2\}$. **Polyhedron**, v. 16, p. 927-931, 1997.

BECKMAN J.S., KOPPENOL, W.H. Nitric Oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. **American Journal of Physiology**., v. 271, p. 1424-1437, 1996.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, M.; SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry,** v. 106, p. 90–99, 2012.

BI, S.; QIAO, C.; SONG, D.; TIAN, Y.; GAO, D.; SUN, Y.; ZHANG, H. Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe. **Sensors and actuators B**, v. 119, p. 199-208; 2006.

CALLAHAN, R. W.; MEYER, T. J. Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry,** v. 16, p. 574-581, 1977.

CAO, Y.; HE; X.; GAO, Z.; PENG, L. Human augmenter of liver regeneration is importante for hepatoma cell viability and resistance to radiation-induced oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1057-1066, 2009.

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

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

CHELOPO, M. P.; PAWAR, S. A.; SOKHELA, M. K.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G.; MAGUIRE, G. E. M. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 407–414, 2013.

CHENEY, R.P.; ARMOR, J.N.; Reactivity of Coordinated Nitrosyls. 6. Preparation, Characterization, and Reduction of Nitrosylpentaaquoruthenium(3+) and Reduction of Various Ruthenium Ammine Nitrosyls. **Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 3338-3344, 1977.

CHOUDHARI, S.K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 118, p. 1-11, 2013.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemical Reviews**, v. 236, p. 209-233, 2003.

CRISPINI, A.; PUCCI, D.; SESSA, S.; CATALDI, A.; NAPOLI, A.; VALENTINI, A.; GHEDINIA, M. Synthesis and characterization of new transition metal complexes containing DNA intercalators of the acridine family. **New Journal of Chemistry**, v. 27, p. 1497–150, 2003.

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

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

DEMAS, J. N.; CROSBY, G. A. The measurement of photoluminescence quantum yields. A Review. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 991-1024, 1971.

DENIS, T. G. S.; HAMBLIN, M. R. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. **Bioanalysis**, v. 5, n. 9, p. 1099–1114, 2013.

EVANS, I. P.; SPENCER, A.; WILKINSON, G. Dichlorotetrakis (Dimethyl Sulphoxide) Ruthenium(II) and its use as a source material for some new Ruthenium(II) complexes. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions,** v. 2, p. 204-209, 1973.

FALCONE, R. D.; CORREA, N. M.; BIASUTTI, M. A.; SILBER, J. J. Acid-base and agreggation processes of Acridine Orange Base in n-Heptane/AOT/Water Reverse Water Reverse Micelles. **Langmuir**, v. 18, p. 2039-2047, 2002.

FILHO, G. B.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. **Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares.** In: FILHO G, B. Bogliolo-Patologia Geral, 4º edição. Rio de Janeiro (BRA): Guanabara Koogan, p. 226-281, 2009.

FORD, D.; BLISS, J. M.; SWERDLOW, A. J.; ARMSTRONG, B. K.; FRANCESCHI, S.; GREEN, A.; HOLLY, E. A.; MACK, T.; MACKIE; R. M.; OSTERLIND, A. et al. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). **International Journal of Cancer,** v. 62, p. 377-81, 1995.

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 Chemical Reviews**, v. 171, p. 185-202, 1998.

FUKUTO, J. M.; IGNARRO, L. J. In vivo aspects of nitric oxide (NO) chemistry: Does peroxynitrite ($^{-}$OONO) play a major role in cytotoxicity? **Accounts of Chemical Research,** v. 30, p. 149-152, 1997.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.
GIORGIO A.; RAMBALDI, M.; MACCARIO, P.; AMBROSONE, L.; MOLES, D. A. Detection of microorganisms in clinical specimens using slides prestained with acridine orange (AOS). **Microbiologica**, v.12, p. 97-100, 1989.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. The preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2,2′-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v.10, n.3, p.471-74, 1971.
GOGAS, H. J; KIRKWOOD, J.M.; SONDAK, V.K.; Chemotherapy for methastatic melanoma. Time for a change? **American Cancer Society**, Athens, (Greece), v. 109, n. 3, p. 455-464, 2007.

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

HARTINGER, C. G.; ZORBAS SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 891-904, 2006.

HAYASHI, M.; SOFUNI T.; ISHIDATE M. J. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research**, Tokyo, v. 120, p. 241-247, 1983.

HIBBS, J. B. JR, TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.

HOLSTI L.R. Development of clinical radiotherapy since 1896, **Acta Oncologica,** vol. 34, n. 8, p. 995-1003, 1995.

IARC, Cancer, Disponível em: <**http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx**> Acesso em: 13 set. 2017.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of Physiology an Pharmacology,** v. 53, p. 503-14, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, Cancer. Disponível em: **<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/prevencao-fatores-de-risco>** Acesso em: 13 set. 2017 a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, Cancer. Disponível em: **<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=98>** Acesso em: 20 set. 2017 b.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Aromatics Amines and Related Nitro compounds- Hair Dyes, Colouring Agents and Miscellaneous Industrial Chemicals,** v. 16, p. 145-152, 1978

JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations, **Dalton Transactions**, v. 2, p. 183-194, 2008.

JABLONSKI, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. **Nature,** v. 131, p. 839-840, 1933.

JEŽEK, J.; HLAVÁČEK, J; ŠEBESTÍK, J.; **Biomedical applications of Acridines. Derivatives, Syntheses, Properties and Biological Activities with a Focus on Neurodegenerative Diseases.** Praga: Springer, p.1-4, 2017.

KAPUSCINSKI, J. DARZYNICIEWICZ, Z., MELAMED, M. R., Interactions Of Acridine Orange with Nucleic Acids. Properties of Complexes of Acridine Orange with Single Stranded Ribonucleic Acid, **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 24, p. 3679-3694, 1983.

KAPUSCINSKI, J. DARZYNICIEWICZ, Z. Denaturation of Nucleic Acids Induced by Intercalating Agents. Biochemical and Biophysical Properties of Acridine Orange-DNA Complexes. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 1, n. 6, p. 1485-1499, 1984.

KEENE, J. D.; ROSENBERG, M.; LAZZARINI, R. A. Characterisation of the 3'-terminus of RNA isolated from vesicular stomatitis vírus and from its defective interfering particles. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 74, p. 1353-1357, 1977.

KELOGG, R.E.; BENNETT, R.G. **Radiationless Intermolecular Energy Transfer. III. Determination of phosphorescence Efficiences. The Journal of Chemical Physics** v. 41, p. 3042, 1964.

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

KORGAONKAR, K. S.; SUKHATANKAR J. V. Anti-Tumour Activity of The Fluorescent Dye, Acridine Orange, on Yoshida Sarcoma (Ascites). **British Journal of Cancer**, v. 17, n. 3, p. 471-473, 1963.

KOWALSKI, L.A.; LAITINEN, A. M.; MORTAZAVI-ASL, B.; WEE, R. K.-H.; ERB, H. E.; ASSI, K. P.; MADDEN, Z. In Vitro Determination of Carcinogenicity of Sixty-Four Compounds Using a Bovine Papillomavirus DNA-Carrying C3H/10T1⁄2 Cell Line. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v.35, p. 300–311, 2000.

KUBIN, R. F.; FLETCHER., A. N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. **Journal of Luminescence**, v. 27, p. 455-462, 1982.

KÜNG, A.; PIEPER, T.; KEPPLER, B.K. Investigations into the interaction between tumor-inhibiting Ruthenium(III) complexes and nucleotides by capillary electrophoresis. **Journal of Chomatography B,** v. 759, p. 81-89, 2001.

KUSUZAKI, K.; MURATA, H.; MATSUBARA, T.; SATONAKA, H.; WAKABAYASHI, T.; MATSUMINE, A.; UCHIDA, A. Acridine Orange could be an Innovative Anticancer Agent under Photon Energy. **In Vivo**, v. 21, p. 205-214; 2007.

KUSUZAKI, K.; HOSOGI, S.; ASHIHARA, E.; MATSUBARA, T.; SATONAKA, H.; NAKAMURA, T.; MATSUMINE, A.; SUDO, A.; UCHIDA, A.; MURATA, H.; BALDINI, N.; FAIS, S.; MARUNAKA, Y. Translational Research of Photodynamic Therapy with Acridine Orange which Targets Cancer Acidity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 1414-1420, 2012.

KUSUZAKI, K.; MATSUBARA, T.; MURATA, H.; LOGOZZI, M.; IESSI, E.; DI RAIMO, R.; CARTA, F.; SUPURAN, C. T.; FAIS, S. Natural extracellular nanovesicles and photodynamic molecules: is there a future for drug delivery? **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry,** v. 32, n. 1, p. 908–916, 2017.

KUSUZAKI, K.; TAKAI, T.; YOSHIMURA, H.; INOUE, K.; TAKAI, S.; BALDINI, N. Clinical trial of radiotherapy after intravenous injection of acridine orange for patients with cancer. **Anticancer Research**, v. 38, p. 481-489, 2018.

LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Science & Business Media, 2013.

LEVER, A. B. P. Inorganic Eletronic Spectroscopy, 2nd ed, **Elsevier Science Publishers B. V**., Amsterdam, The Netherlands, 1984.

LIPPARD S. J.; **Metals in Medicine**. In: BERTINI, I. et al. (Orgs); *Bioinorganic chemistry*. California, USA: Unniversity Science Books, p. 505-506, 1994.

MAKAROV, D. A.; KUZNETSOVA, N. A.; KALIYA, O. L. Regularities of the photodestruction of acridine dyes in aqueous media. **Russian Journal of Physical Chemistry** v. 80, n. 2, p. 268-274, 2006.

MANCINI, A. M.; D'ANTUONO, G. Fluorescence microscopy in hematology. I. Theoretical and practical bases for the application of vital staining with acridine orange in the study of blood cells. **Haematologica**, v. 39, n. 7, p. 501-514, 1955.

MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chemical communications (Camb).**, v. 7, n. 9, p. 1001-1010, 2009.

MELAMED, M. R. Acridine Orange Metachromasia for Characterization of Leukocytes in Leukemia, Lymphoma, and other Neoplasms. **Cancer**, v. 29, p. 1361-1368,1972.

METZLER-NOLTE, N. Labeling of Biomolecules for Medicinal Applications-Bioorganometallic Chemistry at Its Best. **Angewandte Chemie** v. 40, n. 6, p. 1040-1043, 2001.

MCCLEVERTY; J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. **Chemical Reviews** v. 104, p. 403−418, 2004.

MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L.A.; TSAY, J.M; DOOSE, S. LLI, J.J. SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S.S.; WEISS, S. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. **Science**, v. 307, p. 538-544, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). ABC do Câncer. **Abordagens básicas para controle do câncer. Rio de Janeiro** (BRA), p. 17-46, 2011.

MIKHEEV, Y. A.; GUSEVA, L. N.; ERSHOV. Y. A. The Nature of Chromaticity of Triphenylmethane, Xanthene, Phthalocyanine, and Thiazine Dyes. **Photochemistry and Magnetochemistry**, v. 84, n. 10, p. 1949–1963, 2010.

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

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; FILIPPI, S.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ORIOLI, P.; SAVA, G.; ZICHE, M. Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 9, p. 1484-1491, 2003

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

NEGRINI, S.; GOURGOULIS, V. G.; HALANOZETIS, T. Genomic instability- na envolving hallmak of cancer. **Nature**, v. 11, p. 220-228, 2010.

NELLIN, L. D.; HOFFMAN, G. M. The use of inhaled nitric oxide in a wide variety of clinical problems. **Pediatric Clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 531-548, 1998.

NEUMANN, M.G.; TIERA, M. The use of basic dyes as photochemical probes. **Química Nova**, v. 16, n. 4, p. 280-287, 1993.

OPEN CHEMISTRY DATA BASE. Q Disponível em: **<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>** Acesso em nov. 2017.

ORVIG, C.; ABRAMS, M.J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews,** Vancouver, v. 99, n. 9, p. 2201-2203, 1999.

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

PACOR, S.; ZORZET, S.; COCCHIETTO, M.; BACAC, M.; VADORI, M.; TURRIN, C.; GAVA, B.; CASTELLARIN, A.; SAVA, G. Intratumoral NAMI-A Treatment Triggers

Metastasis Reduction, Which Correlates to CD44 Regulation and Tumor Infiltrating Lymphocyte Recruitment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 737-744, 2004.

PALMGREN, M.G. Acridine Orange as a probe for measuring pH Gradients across Membranes: Mechanisms and Limitations. **Analytical Biochemitry**, v. 192, p. 316-321, 1991.

PIPES, D. W.; MEYER, T. J. Comparisons between polypyridyl nitrosyl complexes of osmium(II) and ruthenium(II). **Inorganic Chemistry,** v. 23, n. 16, p. 2466-2472, 1984.

PLUIM, D.; VAN WAARDENBURG, R. C. A. M.; BEIJNEN, J. H.; SHELLENS, J. H. M. Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug NAMI-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell line. **Cancer Chemotherapy Pharmacology,** v. 54, n. 1, p. 71-78, 2004.

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

RAAB O. Ueber diewirkung fluoreszierender stoffe auf infusori. **Zeitschrift Fur Biologie**, v. 39, p. 524–536, 1900.

RAMOS, L. C. B. **Avaliação do efeito sinérgico de óxido nítrico e oxigênio singleto produzidos por complexo rutênio-ftalocianina em células tumorais**. Estudos fotoquímicos, fotofísicos e medida de atividade citotóxica in vitro. 2013. 204 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

REDFERN, J.; KINNINMONTH, M.; BURDASS, D.; VERRAN, J. Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties. Journal of **Microbiology & Biology Education,** v. 15, n. 1, p. 45-46, 2014.

RICHARDSON, F. Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems. **Chemical Reviews**, v. 82, n. 5, p. 541-552, 1982.

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

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

ROBBINS, E.; MARCUS, P. I. Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. Interrelationships of acridine Orange particles and cytoplasmic reddening. **The Journal of Cell Biology.** v. 18, n. 2, p. 237-250, 1963.

RODRÍGUEZ, J. J. S., SANZ, C. P. Fluorescence techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine environment: an overview. **Luminescence Spectroscopy**, v. 28, n. 8, p. 710-717, 2000.

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

SABADINI, E; BARICATTI, R.A.; PESSINE, F.B.T.; ATVARS, T.D.Z. Determinação do conteúdo de água em solventes orgânicos por método espectrofotométrico. **Química Nova**, v. 17, n. 1., p. 27-30, 1994.

SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, p. 254-259, 2003.

SAVA, G.; CAPOZZI, I.; CLERICI, V.; GAGLIARDI, G.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 16, p. 371-379, 1998.

SAVA, G.; ZORZET, S.; TURRIN, C.; VITA, F.; SORANZO, M.; ZABUCCHI, G.; COCCHIETTO, M.; BERGAMO, A.; DiGIOVANE, S.; PEZZONI, G.; SARTOR, L.; GABISA, A. Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis: Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1898-1905, 2003.

SCHEHRER, L.; REGAN J.D.; WESTENDORF J. UDS induction by an array of standard carcinogens in human and rodent hepatocytes: effect of cryopreservation. **Toxicology**, v. 147, p. 177-191, 2000.

SCUDIERO D.A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A., TIERNEY, S.; NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D.; BOYD, M. R. Evaluation of soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v. 48, n. 17, p. 4827-4833, 1988.

SENS, R.; DREXHAGE K. H. Fluorescence quantum yield of oxazine and carbazine laser dyes. **Journal of Luminescence**, v. 24, p. 709-712, 1981.

SEO, B. Y.; LEE, C. O., KIM, J. Changes in the management and survival rates of patients with oral cancer: a 30-year single-institution study. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons,** v. 42, n. 1, p. 31-37, 2016.

SETHNA, S., SHAH, N. M. The chemistry of coumarins. **Chemical Reviews**, v. 36, p. 1-62, 1945.

SILVA, É. R.; BORISSEVITCH, I. Estudo da cinética de fototransformação do acridina laranja na interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 2, p. 75-78, 2010.

SILVEIRA-LACERDA, E. P.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; PEREIRA, F. C.; HAMAGUCHI, A.; GOULART, L. R.; HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; PAVANIN, L.

A.; DOS SANTOS, W. B.; SOARES, A. M.; NOMIZO, A. The Ruthenium Complex cis(Dichloro)tetraamminerutheniumIII) Chloride Presents Selective Cytotoxicity Against Murine B Cell Lymphoma (A-20), Murine Ascitic Sarcoma 180 (S-180), Human Breast Adenocarcinoma (SK-BR-3), and Human T Cell Leukemia (Jurkat) Tumor Cell Lines. **Biological Trace Element Research,** v. 135, n. 1, p. 98-111, 2010.

SHAW, A. K.; PAL, S. K. Fluorescence relaxation dynamics of acridine Orange in nanosized micellar systems and DNA. **Journal of Physical Chemistry B.** v. 111, n. 16, p. 4189-4199, 2007.

SHIRIVER, D.F.; ATIKINS, P.W. **Química Inorgânica.** 3º edição. São Paulo (BRA): Bookman, p. 255-265, 2003.

SOEP, B.; KELLMANN, A.; MARTIN, M.; LINDQVIST, L. Study of triplet quantum yields using a tunable dye laser. **Chemical Physics Letters,** v. 13, p. 241-244, 1972.

TANIELIAN, C.; WOLFF, C.; ESCH, M. Singlet oxygen production in water: aggregation and charge-transfer effects. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 16, p. 6555-6560, 1996.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D. R.; TAVARES, A.; GOMES, A. J.; FIGUEIREDO, L. E.; FRANCO, D. W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.

THANGAVEL, P.; VISWANATH, B.; KIM S. Recent developments in the nanostructured materials functionalized with ruthenium complexes for targeted drug delivery to tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2749-2759, 2017.

THOMAS, D. D.; ESPEY, M. G.; RIDNOUR, L. A.; HOFSETH, L. J.; MANCARDI, D.; HARRIS, C. C.; WINK, D. A. Hypoxic inducible factor 1a, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 8894-8899, 2004.

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

THOMPSON, J.F.; SCOLYER R.A.; KEFFORD, R.F. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, p. 687-701, 2005.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** 2nd ed. John Wiley & Sons, (USA), 2012.

VON BERTALANFFY, F.; MASIN M.; MASIN F. A new and rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy. **Cancer**, v. 11, n. 5, p. 873-887, 1958.

WAINWRIGHT; T, M. The use of dyes in modern biomedicine. **Biotechnic and Histochemistry,** v. 78, n. 3-4, p. 147-155, 2003.

WAGGONER, A.; DEBIASIO, R.; CONRAD, P.; BRIGHT, G. R.; ERNST, L.; RYAN, K.; NEDERLOF, M.; TAYLOR, D. Multiple spectral parameter imaging. **Methods in Cell Biology**, v. 30, p. 449-478, 1989.

WEINSTOCK M. A.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; BRONSTEIN, B. R.; MIHM MC, JR.; SPEIZER, F. E. Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. **Pediatrics.**; v. 84, p. 199-204, 1989.

WINNISCHOFER, H.; ARAÚJO, M. P.; JÚNIOR, L. C. D.; NOVO, J. B. M. Simulação Monte Carlo no Ensino de Luminescência e Cinética de Decaimento de Estados Excitados. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 225-228, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Cancer. Disponível em: **< http://www.who.int/topics/cancer/en/>** Acesso em: 16 set. 2017.

XU, W.; LIU, L. Nitric Oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. **Cell Research**, v. 8, p. 251-258, 1998.

YAN, Y. K.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P. J. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. **Chemical Communications**, v. 38, p. 4764–4776, 2005.

ZAMPIERI, A, GREENBERG, J. Mutagenesis by acridine orange and proflavine in Escherichia coli strain S. **Mutation Research,** v. 2, p. 552-556, 1965.

ZBYTEK, B.; CARLSON, J. A.; GRANESE, J.; ROSS JEFFREY; MIHM, M; SLOMINSKI, A. Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Review of Dermatology**, v. 3, n. 5, p. 569-585, 2008.

[1]As referências foram organizadas de acordo com o sistema autor-data da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT NBR 6023).