**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Renata Zachi de Osti

**Nitrosilos Complexos de Rutênio.
Equilíbrio Químico, Envolvimento em Sistemas Vegetais
e Citotoxicidades em Modelos de Câncer.**

São Carlos
Fevereiro / 2008

Renata Zachi de Osti

**Nitrosilos Complexos de Rutênio.
Equilíbrio Químico, Envolvimento em Sistemas Vegetais
e Citotoxicidades em Modelos de Câncer.**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, para a obtenção do Título de
Doutora em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof.Dr. Douglas Wagner Franco

São Carlos
Fevereiro / 2008

"Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria."

(Santo Agostinho)

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

(Julio Verne)

Dedicatória

**A Deus e a minha família.
Força, apoio e amor.**

Agradecimentos

A Deus.

Ao professor Douglas W. Franco pela orientação, discussões científicas e acompanhamento durante estes anos de jornada.

À CNPQ pela bolsa concedida.

Especial agradecimento aos professores Dr. Luiz R. Travassos e Dr^a. Elaine G. Rodrigues da Unidade de Oncologia Experimental (Universidade Federal de São Paulo). Agradeço a ótima recepção e constante disposição para que o trabalho fosse realizado, fatores fundamentais ao andamento de meu Doutorado.

À aluna de Doutorado Fabiana Serrano da Unidade de Oncologia Experimental da Unifesp pela constante ajuda, amizade e discussões necessárias.

Aos demais alunos da UNONEX pela forma com que me receberam e respeito com que sempre me trataram.

À professora Dr^a. Eny Iochet Segal Floh, do Laboratório de Biologia Celular de Plantas (IB/USP) pela disposição em me acolher como integrante do Laboratório, e pela oportunidade para que eu pudesse desenvolver parte do meu Doutorado, agradeço ao constante auxílio e atenção.

À Pós-doutoranda Dr^a. Claudete Santa-Catarina, pela amizade, atenção e apoio científico, ajuda valiosa.

A todo o grupo do BIOCEL, novos amigos.

Ao professor Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/Ribeirão Preto e à aluna de iniciação científica Patrícia H. Ribeiro pela ajuda.

A minha família, por todo apoio, paciência, compreensão e amor a mim dedicados.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Química Inorgânica e Analítica do IQSC, presentes ou não. Obrigada pelo carinho, apoio e amizade com que sempre me trataram.

Às secretárias, Veroneide e Cláudia, pela ajuda e amizade.

Aos demais funcionários do IQSC, sempre dispostos a ajudar.

Agradeço ao IQSC/USP pela oportunidade de fazer parte deste Instituto, e a todos que me ajudaram de alguma forma durante a execução deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	viii
Lista de Esquemas	X
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. Introdução	01
1.1. Nitrosilo Complexos de Rutênio	03
1.2. Compostos de Rutênio em Sistemas Biológicos	07
1.2.1. Câncer	07
1.2.1.1. Complexos de coordenação na medicina	07
1.2.2. Óxido Nítrico em Vegetais	12
1.2.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. angustifolia</i>	16
2. Justificativas e Objetivos	20
3. Material e Métodos	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Sínteses dos complexos	23
3.2.1. $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{SO}_4)]^+ \text{ }^{(121)}$	23
3.2.2. $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+} \text{ }^{(27,28)}$	23
3.2.3. $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3](\text{PF}_6)_3 \text{ }^{(122)}$	24

3.2.4. trans-[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ (NO ₂)](PF ₆) ^(123,124)	24
3.2.5. [Ru(NO)Hedta] ⁽¹²⁵⁾	25
3.3. Equilíbrios no Sistema trans-[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ (H ₂ O)] ²⁺ / trans-[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ (NO ₂)] ⁺	25
3.3.1. Cinética de Reação de Substituição	26
3.4. Avaliação da Atividade Anti-tumoral dos compostos	28
3.4.1. Culturas de Células Tumorais	28
3.4.1.1. Linhagem Tumoral B16F10-Nex2	28
3.4.2. Ensaio citotóxicos <i>in vitro</i>	29
3.4.2.1. Método do MTT ⁽¹²⁷⁾	29
3.4.2.2. Método de exclusão do Azul de Trypan	31
3.4.3. Testes <i>In Vivo</i> com camundongos C57Bl/6	31
3.4.4. Extração de DNA de Células Tratadas com Complexos de Rutênio	32
3.4.5. Cálculos para Avaliação da Atividade Anti-tumoral dos Complexos	34
3.5. Estudos em Sistema Vegetal	36
3.5.1. Material Vegetal	36
3.5.2. Suspensões Celulares	36
3.5.3. Efeito do Óxido Nítrico no Crescimento Celular em Suspensão Celular	36
3.5.4. Determinação de Poliaminas	37
3.5.5. Curvas de Crescimento ⁽¹¹²⁾	39
3.5.6. Determinações de Óxido Nítrico	40
3.5.6.1. Método Eletroquímico	40
3.5.6.2. Método Fluorimétrico	41
3.5.6.3. Microscopia de fluorescência	42

3.5.7. Análises morfológicas	43
4. Resultados	45
4.1. Reatividade Química	45
4.2. Atividade Antitumoral de Nitrosilo de Rutênio	62
4.3. Efeito dos compostos doadores de NO em Sistema Vegetal	93
5. Conclusões	118
6. Referências Bibliográficas	121
Anexo A	139
Anexo B	141

Lista de Figuras

Figura 1	- Fórmula molecular das três principais poliaminas encontradas em plantas: putrescina, espermidina e espermina.	14
Figura 2	- Efeito das poliaminas espermidina e espermina na via de diferenciação (A) e da putrescina e NO na via de multiplicação (B) em culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> ⁽¹⁰⁴⁾ .	15
Figura 3	- Curva típica de crescimento em suspensões celulares ⁽¹¹²⁾ .	18
Figura 4	- Estruturas dos compostos utilizados na verificação da citotoxicidade dos complexos de rutênio, em diferentes células cancerosas. (A) MTT; (B) Azul de trypan.	29
Figura 5	- Frasco erlenmeyer adaptado para determinação das curvas de crescimento pelo volume celular sedimentado.	40
Figura 6	- Estrutura do composto DAR-4M	41
Figura 7	- Estrutura do composto DAR-4M AM	42
Figura 8	- Comportamento do espectro de solução tampão contendo a espécie <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ NO ₂](PF ₆). C _{Ru} = 6,2 x 10 ⁻⁴ mol.l ⁻¹ ; pH = 4,0; μ = 0,3 mol.l ⁻¹ (NaCF ₃ COO); 25 °C; t = 60 minutos; intervalo entre as leituras = 2 minutos ⁽¹²³⁾ . Espectro inicial corresponde ao complexo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ NO ₂](PF ₆) e o final ao <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃](PF ₆) ₃ .	47

- Figura 9 - Curva de absorvância contra tempo nos experimentos de “stopped-flow” para a reação entre o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e íons nitrito. C_{Ru} = 4,0 x 10⁻⁴ mol.l⁻¹; C_{NO₂⁻} = 1,0 x 10⁻² mol.l⁻¹; pH = 10; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); 25 °C; 330 nm ⁽¹²³⁾. 48
- Figura 10 - Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem variando com a concentração de nitrito. C_{Ru} = 4,0 x 10⁻⁴ mol.l⁻¹; pH 11; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); T = 25 °C, 330 nm; Primeira etapa ⁽¹²³⁾. 50
- Figura 11 - Espectros primeira etapa da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e íons nitrito obtidos através de espectrofotometria de Stopped-flow. C_{Ru} = 4,0 x 10⁻⁴ mol.l⁻¹; C_{NO₂⁻} = 1,0 x 10⁻² mol.l⁻¹; pH = 10; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); 25 °C; t₁ = 0 s (A); t₂ = 0,05 s (B); t₃ = 0,01 s (C); t₄ = 0,02 s (D); t₅ = 0,08 s (E). 51
- Figura 12 - Variação das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem, k_{obs3}, em função da concentração de nitrito. C_{Ru} = 4,0 x 10⁻⁴ mol.l⁻¹; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); pH = 11; T = 25 °C, λ = 330 nm. 54
- Figura 13 - Espectro obtido da solução do produto obtido através da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e íons nitrito. C_{Ru} = 6,5 x 10⁻⁴ mol.l⁻¹; C_{NO₂⁻} = 1,0 x 10⁻² mol.l⁻¹; pH = 10. 55
- Figura 14 - Curva de absorvância em função do tempo para aquação do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺ na presença de pirazina. C_{Ru} = 1,4 x 10⁻⁴ mol.l⁻¹; C_{pz} = 1,0 mol.l⁻¹; pH = 11; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); T = 25 °C; 366 nm. 57
- Figura 15 - Citotoxicidade *in vitro* de nitrosilos compostos de rutênio sobre células de Leucemia Humana (Jurkat). A = *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py]³⁺; B = *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄4-pic]³⁺. 65

- Figura 16 - Citotoxicidade *in vitro* do composto *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_4]^{3+}$ sobre células Jurkat. 66
- Figura 17 - Citotoxicidade *in vitro* dos complexos **(A)** *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}]^{3+}$ e **(B)** *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{isn}]^{3+}$ sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2. 72
- Figura 18 - Citotoxicidade *in vitro* do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{imN}(\text{SO}_4)]^{3+}$ sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2. 74
- Figura 19 - Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}](\text{BF}_4)_3$** . Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5×10^4 células B16F10-Nex2. Tratamento com **50 nmol.kg⁻¹** do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados por 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume tumoral foi medido a cada 3 dias, e a sobrevida observada diariamente. **(A)** desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio. 81
- Figura 20 - Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}](\text{BF}_4)_3$** . Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5×10^4 células B16F10-Nex2. Tratamento com **100 nmol.kg⁻¹** do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados por 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume tumoral foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento Tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = 82

complexo de Rutênio.

- Figura 21 - Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*-[Ru(NH₃)₄imNSO₄]Cl**. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com **50 nmol.kg⁻¹** do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio. 83
- Figura 22 - Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*-[Ru(NH₃)₄imNSO₄]Cl**. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com **100 nmol.kg⁻¹** do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio. 84
- Figura 23 - Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃**. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com **10 nmol.kg⁻¹** do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados durante 3 dias por semana, em dias 85

intercalados, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

- Figura 24 - Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃**. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com **100 nmol.kg⁻¹** do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados durante 3 dias por semana, em dias intercalados, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio. 86
- Figura 25 - Degradação de DNA provocada por complexos de Rutênio que foram efetivos em experimentos *in vivo* com células de Melanoma Murino B16F10-Nex2. Células B16F10-NEX2 foram tratadas *in vitro* por 24 h com: **(2)** sem tratamento; **(3)** *t*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺; **(4)** *t*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺ + **Z-vad**; **(5)** *t*-[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺; **(6)** *t*-[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺ + **Z-vad**; **(7)** Camptotecina; **(8)** Camptotecina + **Z-vad**. C_{RuNO} = 180 μmol.l⁻¹; C_{RuSO₄} = 1700 μmol.l⁻¹. **(1)** Padrão de peso molecular. 89
- Figura 26 - Comportamento eletroquímico dos compostos **(A)** [Ru(NO)Hedta] e **(B)** SNP adicionados ao meio de cultura BM. C_{complexos} = 2 mmol.l⁻¹; T = 25 °C; tempo = 4 horas. 94

- Figura 27 - Efeito dos compostos doadores de NO no crescimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, após 21 dias de cultivo. (A) SNP; (B) Ru = [Ru(NO)Hedta]; Valores entre parênteses correspondem às concentrações em $\mu\text{mol.l}^{-1}$; Massa inicial de células = 40 mg (2 ml de meio BM), n = 3; MF = massa fresca; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz. 97
- Figura 28 - Efeito dos doadores de NO e do seqüestrador, PTIO, nas curvas de crescimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. (A) Quadrado = controle; triângulo = [SNP] (100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$); círculo = [SNP] (100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) + PTIO (200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$); (B) Quadrado = controle; triângulo = [Ru(NO)Hedta] (100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$); círculo = [Ru(NO)Hedta] (100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) + PTIO (200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). 120 mg de células em 6 ml de meio BM; 30 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz. 104
- Figura 29 - Efeito de diferentes doadores de NO, do inibidor AET e do seqüestrador PTIO no conteúdo endógeno de PAs livres em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. A) SNP; B) RuNO = [Ru(NO)(Hedta)]; Os valores entre parênteses correspondem às concentrações em $\mu\text{mol.l}^{-1}$; n=3; Put = putrescina; Spd = espermidina; Spm = espermina.; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; AET = 2-aminoetil-2-tiopseudoureia; PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-óxido; n=3. 108
- Figura 30 - Morfologia de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. 110

- Figura 31 - Morfologia das células de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* após 21 dias de cultivo nos diferentes doadores de NO, combinados ou não com o sequestrador PTIO. Massa fresca inicial = 40 mg de células para 2 ml de meio de cultura BM. Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz. 111
- Figura 32 - Efeito da adição exógena de SNP, na presença e ausência de sequestrador (PTIO), sobre a biossíntese intracelular de NO em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. SNP = 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; PTIO = 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; tempo incubação_{DAR-4M AM} = 2h; Concentração_{DAR-4M AM} = 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz. 113
- Figura 33 - Efeito da adição exógena de [Ru(NO)Hedta], na presença e ausência de sequestrador (PTIO), sobre a biossíntese intracelular de NO em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. [Ru(NO)Hedta] = 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; PTIO = 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; tempo de incubação_{DAR-4M AM} = 2h; Concentração_{DAR-4M AM} = 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz. 114
- Figura 34 - Efeitos de diferentes doadores de NO e do sequestrador PTIO na liberação de NO em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, após 21 dias de cultivo. SNP = nitroprussiato de sódio (100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$); RuNO = [Ru(NO)Hedta] (100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$); PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-oxido (200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$); Unidade relativa de fluorescência; tempo de incubação_{DAR-4M} = 2h; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de DAR-4M.. 116

Lista de Tabelas

Tabela 1	- Constantes de velocidade específica de dissociação do NO, k_{NO} , para os complexos tipo <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L](X) ₃ , SNP e [Ru(NO)Hedta] e os respectivos potenciais de oxi-redução, NO ⁺ /NO ⁰ (23,24,25,84,144).	4
Tabela 2	- Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs2}) para o primeira etapa da reação entre <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ H ₂ O] ²⁺ e íons nitrito.	49
Tabela 3	- Valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs3}) par a segunda etapa da reação entre <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ H ₂ O] ²⁺ e íons nitrito.	53
Tabela 4	- Citotoxicidade <i>in vitro</i> de compostos de Rutênio sobre células de Leucemia Humana (Jurkat).	62
Tabela 5	- Valores de IC ₅₀ (em $\mu\text{mol.l}^{-1}$) calculados para os compostos que apresentaram atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre culturas de células de Leucemia Humana (Jurkat) e células V79.	67
Tabela 6	- Efeito antitumoral <i>in vitro</i> dos nitrosilo complexos de Rutênio sobre células B16F10-Nex2, de melanoma murino.	69
Tabela 7	- Efeito antitumoral <i>in vitro</i> dos complexos de Rutênio tipo <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (L)SO ₄] ⁿ⁺ sobre células B16F10-Nex2, de melanoma murino.	73

Tabela 8	- Valores de IC_{50} (em $\mu\text{mol.l}^{-1}$) calculados para os compostos que apresentaram atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre culturas de células de melanoma murino B16F10-Nex2 e células V79.	75
Tabela 9	- Efeito antitumoral <i>in vitro</i> dos compostos nitrosilados de Rutênio sobre células de carcinoma mamário humano, MCF-7.	77
Tabela 10	- Efeito de diferentes doadores de NO no crescimento, em percentagem de massa fresca em relação ao controle, de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> , após 21 dias de cultivo.	96
Tabela 11	- Efeito de diferentes compostos que não liberam NO no crescimento de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> , após 21 dias de cultivo.	102
Tabela 12	- Efeito dos compostos doadores de NO e do seqüestrado PTIO nas curvas de crescimento de culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> , através do volume celular sedimentado em ml.	103
Tabela 13	- Conteúdo ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca) de poliaminas livres em culturas embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> , após 21 dias de cultivo.	107

Lista de Esquemas

Esquema 1	- Reação de formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina catalisada por enzimas NOS. NOHA = N ^G -hidroxi-L-arginina.	1
Esquema 2	- Reação de quebra do anel tetrazólico no MTT	30
Esquema 3	- Ciclo catalítico proposto para conversão de NO ₂ ⁻ em NO ⁺ por complexos Ru ^{II} (27).	60
Esquema 4	- Esquema simplificado da biossíntese de poliaminas e de óxido nítrico. ODC = ornitina decarboxilase; ADC = arginina decarboxilase; NOS = óxido nítrico sintase.	100

Abreviaturas

NOS:	Óxido nítrico sintase
nNOS:	Óxido nítrico sintase neural
eNOS:	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível
NADPH:	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NR:	Enzima Nitrato redutase
DETA-NO:	Dietilenotriamina/óxido nítrico
SNP:	Nitroprussiato de sódio
L-arg:	L-arginina
P(OMe) ₃ :	Trimetil fosfito
P(OEt) ₃ :	Trietil fosfito
P(OPr) ₃ :	Tripropil fosfito
P(O <i>i</i> -Pr) ₃ :	tri-isopropil fosfito
P(O <i>t</i> -Bu) ₃ :	tri-tercbutil fosfito
py:	piridina
4-pic:	4-picolina
pz:	pirazina
isn:	isonicotinamida
nic:	nicotinamida
L-his:	L-histidina
imN:	imidazol
GSH:	glutathione
cys:	cisteína

IC ₅₀ :	concentração inibitória de 50%
LD ₅₀ :	dose letal de 50%
cGMP:	guanosina monofosfato cíclica
cADPR:	ADP-ribose cíclica
2,4-D:	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
PAs:	poliaminas
Put:	putrescina
Spd:	espermidina
Spm:	espermina
HBF ₄ :	ácido fluobórico
NH ₄ PF ₆ :	hexafluorofosfato de amônio
EDTA:	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
MTT:	3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo
SDS:	dodecil sulfato de sódio
BA:	benziladenina
Kin:	cinetina
AET:	(2-aminoetil)-2-tiopseudoureia
PTIO:	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-óxido
MF:	massa fresca
DAH:	1,7-diaminoheptano
DAR-4M:	Diaminorodamina - 4M
DAR-4M AM:	diaminorodamina – 4M acetoximetil éster
SO ₃ ⁼ :	sulfito
CN ⁻ :	cianeto
ADC:	enzima arginina-descarboxilase
ODC:	enzima ornitina descarboxilase

Resumo

O produto formado a partir da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e íons nitrito é dependente da concentração hidrogeniônica do meio. Em pH acima de 10, o composto final formado é o *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺ (1,1 x 10³ M⁻¹.s⁻¹), o qual é convertido quantitativamente em pH 4 ao correspondente nitrosilo (2,2 x 10⁻³ s⁻¹). Esta reação em meio alcalino ocorre em duas etapas com constantes de velocidades distintas, sendo a primeira etapa mais rápida que a segunda. Esta etapa foi atribuída à formação dos isômeros, *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃ONO]⁺ (1,1 x 10³ M⁻¹.s⁻¹; pH 11). A etapa mais lenta foi atribuída à isomerização do nitrito composto, nitrito ligado pelo oxigênio, para o nitro composto, ligado pelo nitrogênio e que apresenta maior estabilidade (6,9 x 10² M⁻¹.s⁻¹; pH 11).

Através de estudos *in vitro* foi efetuada a avaliação da citotoxicidade de nitrosilos complexos de rutênio tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄L(SO₄)]⁺ em culturas de células de diferentes modelos de câncer. Verificou-se que estes compostos apresentaram resultados efetivos em células de leucemia Humana (Jurkat) e Melanoma Murino (B16F10-Nex2). Os compostos acima também se mostraram citotóxicos frente a células de câncer de Mama Humana (MCF-7). Estudos *in vivo* com células B16F10-Nex2 envolvendo nitrosilo complexos e seus análogos sulfatos indicaram que a aplicação intraperitoneal destes compostos retardou o desenvolvimento dos tumores e aumentou a sobrevivência dos camundongos. Os resultados também indicam que a morte celular promovida pelos complexos provavelmente não é dependente de caspases.

A aplicação dos nitrosilos, SNP e [Ru(NO)Hedta], em culturas celulares embriogênicas de *Araucaria angustifolia* induziram um aumento na massa fresca

das culturas em relação ao controle, após 21 dias. Este efeito foi inibido quando PTIO, captador de NO, foi adicionado às amostras em conjunto com os doadores de NO. Observou-se também, que após 21 dias, as amostras preparadas com os compostos apresentaram maior concentração de óxido nítrico, tanto intra quanto extracelular. As morfologias das células também foram influenciadas pela adição dos nitrosilos, observando-se um acréscimo no número de células embriogênicas em relação ao controle, acréscimo este que ocorreu de forma desorganizada.

Abstract

The product of the reaction of $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ with nitrite ions depends on the hydrogenionic concentration of the medium. In solutions with $\text{pH} > 10$, the final compound is the $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}_2]^+$ ($1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), which is quantitatively converted into the $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}]^{3+}$ in acid solutions ($\text{C}_{\text{H}^+} > 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $k_{\text{obs}} = 2.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ at $\text{pH} 4$). This reaction presents two different steps with distinct rate constants, being the first step faster than the second. Then, the first process was attributed to the formation of both the isomers, $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}_2]^+$ and $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{ONO}]^+$ ($1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $\text{pH} 11$). The slowest step was then attributed to the isomerization of the nitrito compound, O-bonded, to the nitro compound, N-bonded, which presents more stability ($6.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $\text{pH} 11$).

In vitro studies were used to evaluate the cytotoxicity of some nitrosyl ruthenium compounds type $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+}$ and $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{SO}_4)]^+$ against some cancer cells models. The compounds showed significant results against human leukemia (Jurkat) and murine melanoma (B16F10-Nex2). The compounds also showed cytotoxicity against human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7), however the compounds were less active in this culture. *In vivo* studies with B16F10-Nex2 and the ruthenium compounds suggests that intraperitoneally applications of the complexes delays tumor growth and prolongs animal survival rate. The results also indicates that the compounds should induce a caspase-independent death of the tumor cell.

The application of the nitrosyls, SNP and $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$, in embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* promotes an increase at the fresh mass percent comparing with the control samples. This effect was inhibited when the compound PTIO, a NO scavenger, was added to the samples prepared with

NO donors. After 21 days of cellular culture, fluorimetric methods for NO detection showed that the samples prepared with SNP and [Ru(NO)Hedta] presents higher intra and extracellular NO concentrations than control. Morphological organization of embryogenic suspension cultures of *A. angustifolia* were also influenced by the addition of NO, the cultures with the donors showed increased embriogenic cells numbers relating to the control.

1. Introdução

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso e altamente difusível, descrito como um mensageiro intra e intercelular em vários processos biológicos em animais e plantas ⁽¹⁻⁶⁾. Os processos em que esta molécula está envolvida são analisados considerando tanto o NO resultante de produção endógena ^(7,8), quanto de fontes exógenas ^(9,10). Nos animais, o NO endógeno é produzido pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) que converte L-arginina, na presença de NADPH e oxigênio, em L-citrulina e NO (Esquema 1).

Esquema 1. Reação de formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina catalisada por enzimas NOS. NOHA = N^G-hidroxi-L-arginina.

Existem três diferentes isoformas da NOS que são mais conhecidas, sendo duas delas constitutivas, nNOS neural e eNOS endotelial, que produzem NO em baixas concentrações ($\sim \text{nmol.l}^{-1}$) e uma outra isoforma induzível, iNOS, expressa após estimulação de macrófagos durante uma resposta imunológica. Esta última produz quantidades superiores de NO ($\sim \text{mmol.l}^{-1}$) se comparado com as duas formas constitutivas ⁽¹¹⁾. Recentemente uma nova isoforma foi isolada de mitocôndrias de fígado de ratos, e apresenta algumas similaridades com a iNOS ^(12,13).

A via de síntese representada no Esquema 1 necessita de oxigênio molecular (O_2) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH), além de alguns cofatores ^(14,15). Entretanto, se alguma dessas substâncias não estiver em quantia suficiente, a produção de NO a partir de NOS diminui. Por exemplo, em situações de hipoxia ou de stress oxidativo, que causa oxidação dos cofatores, este processo fica comprometido. Nestes casos, uma das alternativas do organismo para manter a produção de NO seria através da ação de outra enzima, a nitrato redutase (NR), que promove a redução de íons nitrato a íons nitrito, e posterior redução de NO_2^- a NO ^(16,17). Existem ainda outros mecanismos de formação endógena de NO que não dependem da enzima NOS ⁽¹⁸⁾. Como exemplo, pode-se citar a redução de nitrito pela enzima xantina oxidase ⁽¹⁹⁾ ou por proteínas que contenham grupos heme com o ferro no estado de oxidação Fe(II) ⁽¹⁶⁾.

Existem relatos sobre compostos que possam atuar como fontes exógenas de óxido nítrico ^(9,20). Neste grupo há compostos não metálicos, como por exemplo, DETA-NO, e complexos inorgânicos, dentre os quais podemos citar o nitroprussiato de sódio (SNP), que é utilizado como vasodilatador desde 1928 nos casos de hipertensão em humanos ⁽²¹⁾. Assim, o doador a ser utilizado em um experimento deve ser escolhido de acordo com as características desejadas, tais como solubilidade no meio utilizado, de acordo com o mecanismo de ação, se conhecido, e um dos fatores mais relevantes, levando-se em conta as diferentes velocidades de liberação da molécula de NO.

1.1. Nitrosilo Complexos de Rutênio

Uma série de compostos amplamente estudada é a de aminas de rutênio, as quais possuem características interessantes para serem utilizadas em estudos biológicos ⁽²²⁻³²⁾. Compostos tipo *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄(L)]³⁺ (L = py, isn, nic, L-his, 4-pic, imN, P(OR)₃; R = metil, etil, propil, isopropil e butil), por exemplo, são solúveis em água, estáveis à presença de oxigênio e a exposição à luz visível, liberam o óxido nítrico coordenado após redução monoelétrica. As aminas em posição equatorial (X,Y) são estáveis em relação a reações de substituição e oxirredução ^(22,23) e portanto, as reações podem ser observadas ao longo do eixo z.

Considerando-se entre outros fatores, os valores de frequência vibracional na região do infravermelho ($1600\text{ cm}^{-1} < \nu_{\text{NO}} < 1950\text{ cm}^{-1}$) e os ângulos da ligação Ru – N – O (próximo a 180°) para este grupo de compostos, considera-se que o NO está coordenado na forma de íons nitrosônio (NO⁺) ⁽³³⁾ e o rutênio é mais bem descrito como sendo Ru(II) (d⁶, baixo spin). O íon Ru(II) tem afinidade por NO⁺, que é um forte ácido- π , e a liberação de NO nestes complexos é resultado de redução monoelétrica, que ocorre no ligante óxido nítrico, formando NO⁰, e populando os orbitais π^* do NO⁰ e portanto enfraquecendo a ligação $4d\pi \rightarrow 2p\pi^*$ entre Ru^{II} – NO⁰. Assim, o ligante NO⁰, que possui baixa afinidade por Ru(II) é facilmente dissociado (Equações 1 e 2). Esta redução ocorre por via eletroquímica e/ou química, sendo acessível aos redutores presentes no meio biológico, como por exemplo, glutathione (GSH) e cisteína (cys) ^(34,35).

Conforme já mencionado, estes compostos possuem ligantes NH_3 bastante estáveis em posição equatorial, o que permite que a densidade eletrônica sobre o NO, e por consequência as características dos complexos, possam ser moduladas em função da variação dos ligantes em posição *trans* ao NO ⁽²²⁻²⁴⁾. Estes ligantes, por exemplo, exercem diferente efeito e influência-*trans*, o que faz com que a reatividade dos complexos possa variar de forma controlada em função da natureza de L ^(24,26). A partir da escolha do ligante varia-se também o potencial de redução do NO^+ e por consequência a velocidade de dissociação do ligante NO^0 (Tabela 1) ^(23,27,28).

Tabela 1. Constantes de velocidade específica de dissociação do NO, k_{NO} , para os complexos tipo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}](\text{X})_3$, SNP e $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ e os respectivos potenciais de oxi-redução, NO^+/NO^0 ^(26-28,36,37).

Complexo	$E^0_{(\text{NO}^+/\text{NO})}$ (V vs NHE)*	k_{NO} (s^{-1})**
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)(\text{PF}_6)_3]$	0,140	0,980
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}](\text{BF}_4)_3$	- 0,118	0,160
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}](\text{BF}_4)_3$	- 0,32	4
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L-hist})](\text{BF}_4)_3$	- 0,108	0,140
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})](\text{BF}_4)_3$	- 0,008	0,070
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{pz})](\text{BF}_4)_3$	0,112	0,070
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{py})](\text{BF}_4)_3$	0,012	0,060
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{isn})](\text{BF}_4)_3$	0,052	0,043
<i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{nic})](\text{BF}_4)_3$	0,072	0,025
SNP	-0,195	ND
$[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$	- 0,098	0,002

* $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^+)(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^0)(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{2+}$;

** $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^0)(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{2+} \rightarrow \text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(\text{L})\text{H}_2\text{O}]^{2+} + \text{NO}$.

ND = não determinado.

A redução do óxido nítrico (Equação 1) é uma etapa importante para a liberação do NO nesta classe de compostos, e o composto resultante após a dissociação de NO^0 é o correspondente aquo Ru(II): $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (Equação 2). Este aquo complexo pode, por outro lado, atuar como seqüestrador de NO ou NO_2^- ^(29,38). Esta capacidade de doar NO de forma controlada, somada a possibilidade de captarem NO ou íons nitrito, aumentam as possibilidades de utilização destes compostos em sistemas biológicos ^(23,25,30-32).

Dentre os complexos que tiveram suas atividades biológicas avaliadas em nosso Laboratório, o composto $\text{trans}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^+)(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3]^{3+}$ foi o que se mostrou bastante promissor ^(25,26,30,31). Este composto apresenta constante de velocidade específica de segunda ordem para a liberação de NO, k_{NO} , relativamente superior aos demais compostos (Tabela 1). Em experimentos *in vitro* com anéis de aorta pré-contraídos e sem endotélio e em estudos *in vivo* ^(25,30,31), demonstrou capacidade vasodilatadora, semelhante à do nitroprussiato de sódio (SNP). Entretanto, exibiu menor citotoxicidade ($\text{IC}_{50} > 2,0 \text{ mmol.l}^{-1}$; $\text{LD} = 257,5 \mu\text{mol.kg}^{-1}$) do que o SNP, reconhecido vasodilatador ($\text{IC}_{50} > 0,06 \text{ mmol.l}^{-1}$; $\text{LD}_{50} = 15 \mu\text{mol.kg}^{-1}$) ⁽³⁰⁾. Este composto e os demais da série $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{L}]^{n+}$ também demonstraram atividade tripanomicidas quando testados em modelos *in vitro* e *in vivo* de *Trypanossoma cruzi* ⁽³²⁾ e de *Leishmania* ⁽³⁹⁾.

Uma das reações eletrofílicas mais simples envolvendo NO coordenado são as que ocorrem tendo OH^- como nucleófilo ^(33,40) (Equação 3). Este tipo de reação também foi observada em aminas de rutênio tipo $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+}$ ⁽⁴¹⁾. Uma vez em solução, estes nitrosilo complexos podem sofrer ataques nucleofílicos por OH^- , resultando em equilíbrio entre as espécies $\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}$ e

$\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}_2$ em proporções que dependem da concentração hidrogeniônica da solução ⁽²⁶⁾.

A reatividade eletrofílica do NO ligado ao metal foi também associada com os valores de frequência vibracional na região do infravermelho, ν_{NO} , assim como com características dos ligantes *trans* ao NO ^(33,40,41). O conhecimento dessas características é importante, pois permite um maior controle das espécies presentes em solução em função das variações das condições experimentais.

1.2. Compostos de Rutênio em Sistemas Biológicos

1.2.1. Câncer

O Câncer se caracteriza pela multiplicação incontrolável e crescimento desregrado de células transformadas, apresentando diferentes tipos que possuem características clínicas e biológicas específicas. Diferentes tumores apresentam diferentes sensibilidades aos quimioterápicos utilizados atualmente, observando-se também diferenças individuais, o que dificulta sobremaneira o tratamento dessa doença. Fatores que explicam o grande número de pesquisas em desenvolvimento nesta área ⁽⁴²⁻⁴⁷⁾. Apesar da qualidade e eficácia de alguns métodos de diagnósticos e tratamentos disponíveis, estes ainda estão longe de serem considerados ideais, o que justifica a busca de novas alternativas terapêuticas contra o câncer.

Anualmente, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) divulga previsões sobre a ocorrência de novos casos para o ano seguinte ⁽⁴⁸⁾. Isto é importante para o estabelecimento de diretrizes de políticas públicas e planejamento de ações preventivas. De acordo com estas estatísticas, a incidência de casos aumenta ano após ano, situação que coloca o câncer entre as doenças que maior atenção recebe dos órgãos de saúde em diferentes países.

1.2.1.1. Complexos de coordenação na medicina

Uma das maneiras de se evitar o desenvolvimento do câncer é impedir a multiplicação não controlada das células transformadas, o que torna a molécula de DNA um dos alvos principais de ação de drogas ^(44,49,50). Dentre os compostos com ação Anti-tumoral descritos na literatura, a cisplatina (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]; *cis*-Pt) ocupa posição de destaque ⁽⁴⁷⁾. Este composto foi preparado pela primeira vez

em 1844, mas apenas em 1964 sua atividade contra o câncer foi acidentalmente observada quando Rosenberg examinava a influência da aplicação de campo elétrico no crescimento da bactéria *Escherichia coli* ⁽⁵¹⁾. Em 1978, a *cis*-Pt foi oficialmente aprovada como agente anti-câncer pela FDA (Food and Drug Administration) ⁽⁵²⁾ e liberada para uso médico nos Estados Unidos, sendo assim a primeira droga Anti-tumoral conhecida contendo íons de metal em sua estrutura.

Quando a *cis*-Pt começou a ser utilizada, as informações a respeito do desenvolvimento tumoral eram relativamente escassas, o que diminuía as possibilidades de procura por drogas com atividades mais seletivas. Em geral, as drogas antitumorais clássicas, como a *cis*-Pt, têm o DNA como um dos principais alvos devido ao seu papel na replicação celular e este mecanismo de ação normalmente não é muito seletivo, aumentando a citotoxicidade decorrente do uso destes compostos ^(47,53,54).

Além disso, os compostos de platina são efetivos apenas em um número limitado de tumores ^(47,55,56), que normalmente não são os de maior incidência. Estes compostos podem ainda apresentar alguns inconvenientes no seu uso, como a seleção *in vivo* de subpopulações resistentes ao quimioterápico e efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes, tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade ⁽⁵⁴⁾. Com o aumento de informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos no câncer, a busca por compostos que tenham atividades mais seletivas foi facilitada, pois novos possíveis alvos foram reconhecidos ^(53,56).

Estes fatores favoreceram a avaliação de compostos com outros centros metálicos além da platina, e dentre os quais se utilizou o rutênio ^(49,57-60), que possui algumas características que favorecem seu uso. Por exemplo, este metal apresenta dois estados de oxidação estáveis em soluções fisiológicas, Ru(II) d⁶,

diamagnético, e Ru(III) d^5 , paramagnético. Dentre os compostos de rutênio conhecidos, as aminas de rutênio, por exemplo, têm as propriedades químicas consideravelmente bem estabelecidas, bem como as vias de síntese de seus compostos. Estas são vantagens da utilização deste grupo de compostos, o que explica o número cada vez maior de informações a respeito de seus efeitos em sistemas biológicos ^(22-25,26-29,30-32).

O mecanismo de ação dos compostos deve variar de acordo com suas estruturas e ligantes presentes. Complexos de Ru(III), por exemplo, podem ser reduzidos *in vivo* a Ru(II), que devido ao menor estado de oxidação do rutênio pode torná-lo mais ativo em relação às reações de substituição. Assim, ligantes π -doadores que se ligam firmemente ao Ru(III) não tem a mesma afinidade por Ru(II), que possui os orbitais t_{2g} completos, e são mais facilmente substituídos, permitindo assim que o complexo se ligue mais facilmente a biomoléculas ⁽⁴⁹⁾. Existem alguns redutores biológicos que podem reduzir Ru(III) a Ru(II), dentre os quais podemos citar a glutathione (GSH) e cisteína (cys) ^(49,61).

Outra característica importante a ser salientada é a de que células tumorais, assim como as células normais, necessitam de oxigênio e nutrientes para sua multiplicação e desenvolvimento, mas células tumorais dependem estreitamente do estabelecimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) nesse novo tecido tumoral. Muitas vezes, nesse tecido tumoral ocorre uma diminuição na concentração de O_2 (hipóxia), comparativamente às células normais ^(49,62). Dessa forma, células transformadas dependem mais da glicólise para obter energia, o que gera excesso de ácido lático, diminuindo o pH das mesmas. Estes fatores tornam o microambiente tumoral mais redutor, principalmente na região central do tumor, o que favorece a presença de Ru(II)

em relação à Ru(III). Já foi demonstrado, por exemplo, que esta situação de hipóxia aumenta a toxicidade de alguns compostos em células HeLa ⁽⁶³⁾.

Dentre os diversos ligantes presentes na esfera de coordenação, um dos que vem recebendo especial atenção é o NO ^(64,65). Porém, apesar do grande número de publicações a respeito desta molécula, ainda existem dúvidas sobre as suas funções. Alguns estudos demonstram que em algumas situações, a presença do NO benéfica para o organismo, auxiliando inclusive no sistema imunológico, enquanto que em outras circunstâncias, esta molécula aparentemente ajuda a promover o desenvolvimento de determinadas doenças ^(66,67).

Existem relatos ^(64,65) demonstrando que em algumas situações, por exemplo, durante resposta do sistema imunológico, a presença do NO é benéfica para o organismo ⁽⁶⁸⁾, enquanto que em outras circunstâncias, a presença desta molécula aparentemente ajuda a promover o desenvolvimento de determinadas doenças ^(66,67,69). Há evidências, por exemplo, de que o NO está envolvido no processo de angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e por esta razão, é provável que o NO por consequência, participe do processo de favorecimento de desenvolvimento do câncer ⁽⁷⁰⁾.

Por outro lado, se ocorrer um processo inflamatório durante o desenvolvimento tumoral, a exposição das células por um longo período a altas concentrações de NO produzido pela atividade da enzima iNOS nos macrófagos ativados, pode ter efeito contrário no crescimento tumoral, uma vez que já foi anteriormente observado que a indução de iNOS por citocinas em macrófagos induz apoptose nas células tumorais *in vivo* e *in vitro* ⁽⁷¹⁾. Estas atividades distintas

do NO são, provavelmente, decorrentes das diferenças nas concentrações locais desta molécula e dos tipos de células presentes.

O efeito do NO pode ser ainda indireto, ou seja, decorrente de substâncias geradas pela reação do NO com as demais moléculas presentes no organismo ^(72,73). Um exemplo bastante conhecido é a formação, a partir da reação do NO com ânions superóxido (O_2^-), do íon peroxinitrito ($ONOO^-$), espécie altamente reativa e que pode desencadear reações de oxidação, nitração ou nitrosação ^(65,72,73).

1.2.2. Óxido Nítrico em Vegetais

Até recentemente, as pesquisas relacionadas com óxidos de nitrogênio, tais como NO e NO₂, em plantas eram focadas apenas no sentido do controle de poluentes ambientais. Porém, por volta de 1990, as descobertas da produção enzimática de NO com NADPH e L-arginina, ampliaram o enfoque das pesquisas envolvendo NO como sendo uma molécula sinalizadora em vegetais, similarmente ao observado para os animais ^(74,75,5). Trabalhos demonstram que esta molécula atue em diferentes processos, dentre os quais em mecanismos de defesa ^(76,77), durante resposta ao estresse abiótico ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾ e regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, como germinação ⁽⁸¹⁻⁸³⁾, expansão foliar ⁽⁸⁴⁾, senescência ⁽⁸⁵⁾, morte celular programada ⁽⁸⁶⁾ e organogênese ⁽⁸⁷⁾.

A formação de NO, nos vegetais, está diretamente relacionada com a assimilação e metabolismo do nitrogênio, pois este é produzido a partir de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. O nitrogênio é um nutriente mineral bastante necessário para as plantas e é geralmente o fator limitante de crescimento e produtividade. Para a maioria dos vegetais, o nitrato é a fonte de nitrogênio inorgânico disponível para as raízes. Uma vez absorvido pelas raízes, o nitrato pode ser reduzido a nitrito no citosol, reservado no vacúolo, ou transportado para as gemas ⁽⁸⁸⁾. A incorporação do nitrato em biomoléculas como aminoácidos e moléculas derivadas de aminoácidos, envolve a redução do nitrato, pela nitrato redutase, no citosol. Em condições normais de crescimento, o nitrito resultante é posteriormente reduzido à amônia nos plastídios pela nitrito redutase.

Em plantas, enzimas iguais às NOS conhecidas em animais ainda não foram identificadas, apesar das evidências de sua existência ^(89,90), como por exemplo, a inibição da produção de NO em vegetais por inibidores da NOS

animal. No entanto, embora essas enzimas não tenham ainda sido descritas, algumas proteínas vegetais com significativa similaridade bioquímica às NOS conhecidas foram recentemente caracterizadas em *Arabidopsis* e tabaco ^(89,90). Além da possibilidade de síntese de NO em vegetais por enzimas tipo NOS, outras fontes endógenas já estão relativamente descritas. A produção de NO pode ser decorrente, por exemplo, da redução de nitrato a nitrito pela enzima nitrato redutase (NR), com subsequente redução do nitrito pela mesma enzima NR formando NO ⁽⁹¹⁻⁹³⁾. Outra via, porém não enzimática, seria a conversão química de NO_2^- em NO em condições de pH ácido ($< 2,9$) ⁽⁹²⁾.

A interação da sinalização do NO envolvido na regulação do ciclo de divisão celular e diferenciação em células animais já está bem estabelecido ⁽⁹⁴⁾. Em células vegetais, entretanto, ainda não foi inteiramente elucidado o envolvimento direto ou indireto do NO nos eventos de transdução de sinais relacionados ao ciclo de divisão celular ⁽⁹⁵⁾. Foi demonstrado, por exemplo, que o NO modula a rota de transdução de sinais em células vegetais afetando o nível de mensageiros secundários tais como a guanosina monofosfato cíclica (cGMP), ADP-ribose cíclica (cADPR) ou Ca^{2+} ^(76,77,87,95), além de ativação da cascata de kinases ⁽⁹⁵⁾. O NO também pode atuar na transdução dos sinais de citocininas em culturas celulares de *Arabidopsis*, salsa (*Petroselinum crispum*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) ⁽⁹⁶⁾.

Recentemente, Ötvös utilizando culturas derivadas de protoplastos de folha de alfafa, propuseram que o NO pode estimular a ativação da divisão celular e a formação de células embriogênicas na presença de uma auxina, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ⁽⁹⁷⁾. Neste trabalho foi demonstrado que vários doadores de NO promoveram a divisão celular dependente de auxina,

aumentando a ocorrência de células viáveis ⁽⁹⁷⁾. Adicionalmente estes doadores inibiram o alongamento celular, favorecendo a formação de células esféricas com citoplasma denso, exibindo competência para embriogênese ⁽⁹⁷⁾. A aplicação do doador nitroprussiato de sódio (SNP) em combinação com uma concentração menor de 2,4-D promove a formação de células com características embriogênicas, enquanto a aplicação de seqüestradores ou inibidores da biossíntese de NO inibiram o processo ⁽⁹⁷⁾. Assim, foi proposto que o NO pode alterar a sensibilidade das células à auxina, e que estaria envolvido na cascata de sinalização que leva a desdiferenciação e divisão celular.

As poliaminas (PAs) são consideradas uma nova classe de hormônios, e atuam como moduladores de diversos processos relacionados ao crescimento e respostas a estresses, senescência, amadurecimento de frutos, floração e embriogênese em plantas ⁽⁹⁸⁻¹⁰¹⁾. São três as PAs mais estudadas: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (Figura 1).

Figura 1. Fórmula molecular das três principais poliaminas encontradas em plantas: putrescina, espermidina e espermina.

Recentemente, foi demonstrada pela primeira vez que as PAs interferem na síntese de NO nas plantas, mais especificamente em *Arabidopsis* ⁽¹⁰²⁾, e que interferem também na morfologia e síntese de NO em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* ⁽¹⁰³⁾. Verificou-se que as poliaminas espermidina (Spd) e espermina (Spm) reduzem o crescimento celular e promovem a evolução

morfológica das culturas embriogênicas concomitantemente a redução na síntese de NO (Figura 2A). Por outro lado, a putrescina (Put) não reduz o crescimento, não promove a evolução morfológica e aumenta a síntese de NO nestas culturas embriogênicas (Figura 2B) ⁽¹⁰³⁾. Estes resultados sugerem uma possível correlação entre a produção de NO, induzida ou não pelas PAs, e a aquisição para a competência embriogênica.

Figura 2. Efeito das poliaminas espermidina e espermina na via de diferenciação (A) e da putrescina e NO na via de multiplicação (B) em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* ⁽¹⁰⁴⁾.

Foi demonstrado que a adição exógena de PAs, principalmente espermidina (Spd) e espermina (Spm), induzem a biossíntese e rápida liberação de NO em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, especialmente na ponta da raiz ⁽¹⁰²⁾. Resultados semelhantes foram observados em culturas celulares de tabaco e embriões somáticos de *O. catharinensis* ⁽¹⁰⁵⁾. Foi observado também que células embriogênicas de *A. angustifolia* acumularam mais NO do que as células alongadas do suspensor ⁽¹⁰³⁾. Esta biossíntese de NO pode estar relacionada com

a manutenção da polaridade células embriogênicas – suspensor ⁽¹⁰³⁾. Entretanto, ainda não estão bem estabelecidos os mecanismos pelos quais as PAs influenciam a biossíntese de NO nas culturas embriogênicas, e em quais processos estão envolvidos.

1.2.2.1. Cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*

Neste sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos visando verificar o efeito do NO no processo de embriogênese somática em *A. angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze, a única conífera nativa do Brasil. Devido ao grande interesse comercial em relação à sua madeira, esta espécie foi intensamente explorada nas décadas de 50 e 60 e encontra-se atualmente ameaçada de extinção. As florestas de araucária ocupavam uma grande extensão do território brasileiro, principalmente na Floresta Ombrófila Mista ou Mata de Araucária, no sul do país, com ocorrências menores em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Estima-se que atualmente no Brasil, menos de 2% de área inicial ocupada por *A. angustifolia* ainda exista.

A técnica de cultura de tecidos *in vitro* pode ser uma alternativa para a propagação e conservação desta espécie ⁽¹⁰⁶⁾. Até o presente, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de estudar os aspectos fisiológicos e bioquímicos durante o desenvolvimento da embriogênese em *A. angustifolia* ⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁹⁾. A embriogênese zigótica tem sido amplamente estudada em gimnospermas e angiospermas ^(104,106,109), constituindo uma rota de desenvolvimento complexa que inicia o ciclo de vida das plantas superiores. A embriogênese somática, por outro lado, é o processo pelo qual, através da técnica de cultivo *in vitro*, células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões somáticos,

num processo morfogenético que se aproxima da seqüência de eventos representativos da embriogênese zigótica ⁽¹⁰⁶⁾.

Este processo morfogenético, além de permitir o estudo dos aspectos básicos da embriogênese, tem contribuído para garantir a propagação de espécies lenhosas, de difícil propagação por métodos convencionais. Esta estratégia possui o potencial de ser utilizada de forma eficiente na produção de mudas, para programas de reflorestamento e restauração de áreas degradadas, como também em programas de melhoramento genético, pela facilidade de aplicação de técnicas de transformação genética, e em programas de conservação de germoplasma de árvores tropicais e subtropicais ⁽¹⁰⁸⁾. Os sistemas de embriogênese somática apresentam inúmeras vantagens sobre outros sistemas de propagação *in vitro*, destacando-se as altas taxas de multiplicação clonal a baixo custo, a possibilidade de produção em larga escala e a produção de sementes sintéticas ^(108,109). Entretanto, a principal limitação deste sistema, desenvolvido para várias espécies lenhosas, é a pequena taxa de indução da embriogênese e a baixa taxa de conversão de embriões somáticos em plantas completas ⁽¹⁰⁶⁾. Por isso, a identificação de marcadores bioquímicos envolvidos no processo de embriogênese é de fundamental importância para aprimorar os protocolos de indução da embriogênese somática, e sua utilização como alternativa de propagação nesta espécie.

A técnica de cultivo *in vitro* de células em suspensões tem sido empregada para a multiplicação e manutenção de culturas embriogênicas em coníferas ⁽¹⁰⁸⁾. Nesta técnica, células livres e/ou aglomeradas crescem em meio de cultura líquida e sob agitação contínua ⁽¹⁰⁴⁾. Nestas suspensões, o crescimento e o metabolismo celular dependem da disponibilidade de nutrientes e de

fitorreguladores presentes no meio de cultura, que podem modificar a morfologia e fisiologia das células ^(110,111).

As suspensões celulares em geral exibem um padrão de crescimento que segue o formato de uma curva sigmoidal ⁽¹¹²⁾ formada por diferentes fases de crescimento (Figura 3). A fase de crescimento inicial, ou fase lag, é caracterizada por um período de adaptação das culturas ao ambiente de cultivo, durante a qual as células assimilam nutrientes disponíveis no meio de cultura, utilizando-os para sustentar uma intensa atividade de biossíntese celular. Esta atividade declina com o início da fase exponencial, que é caracterizada por um período de intensa divisão celular. Ocorre, em seguida, uma fase linear, e nela, a taxa de crescimento celular declina uniformemente com o tempo, até alcançar a fase estacionária ou de desaceleração de crescimento, momento em que já ocorreu o aumento máximo no número de células ^(113,114).

Figura 3. Curva típica de crescimento em suspensões celulares ⁽¹¹²⁾.

Diversos parâmetros podem ser utilizados para medir o crescimento das culturas embriogênicas em sistema de suspensões celulares, e dentre eles estão o volume celular sedimentado, peso fresco e peso seco ⁽¹¹⁵⁾.

2. Justificativas e Objetivos

O Laboratório de Química Inorgânica e Analítica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP/São Carlos) desenvolve um amplo estudo na química de compostos de rutênio com capacidade de liberarem NO sob redução monoelétrica ^(23,24). A maioria dos compostos estudados é do tipo *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄(L)]³⁺ (sendo L = piridina, isonicotinamida, nicotinamida, imidazol, L-histidina, 4-picolina, L-histidina e pirazina), nos quais as tetraaminas em posição equatorial são inertes em relação à reação de oxidação e substituição, propriedades que permitem com que as características da molécula de NO coordenada sejam moldadas em função dos ligantes situados em posição *trans* ao NO ^(27,28).

Além das tetraaminas, também é objeto de estudo o [Ru(NO)Hedta] ^(25,36). Este sob redução libera a molécula de NO mais lentamente ($k_{\text{NO}} = 2,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) do que os complexos *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄(L)]³⁺, cujas constantes de velocidade de liberação de NO (k_{NO}) variam entre 0,02 s⁻¹ para L = 4-Pic e 0,98 s⁻¹ para L = P(OEt)₃ (ver Tabela 1).

Estes compostos vêm sendo avaliados como doadores de NO há algum tempo e, muitas informações foram obtidas: são compostos que apresentam baixa citotoxicidade, boa solubilidade em meio aquoso e não são fotossensíveis a luz visível, características importantes para aplicação em diferentes sistemas biológicos. Este acúmulo de conhecimento ao longo dos anos é muito relevante, pois permite que características dos compostos possam ser moduladas de forma controlada.

Diante dos aspectos apontados, este trabalho tem como objetivos gerais:

1 – Contribuir para o melhor conhecimento sobre equilíbrios químicos, do ponto de vista cinético e termodinâmico, em sistemas $[\text{Ru} - \text{H}_2\text{O}]^{2+} / [\text{Ru} - \text{NO}_2]^+ / [\text{Ru} - \text{NO}]^{3+}$, tendo como modelo o íon *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$. A escolha deste íon complexo em particular se justifica em função de suas propriedades anteriormente descritas neste trabalho.

2 – Considerando-se a condição de hipoxia que ocorre em tumores, contribuir para o conhecimento do potencial de emprego de nitrosilo complexos de rutênio na terapêutica do câncer, verificando a capacidade anti-tumoral *in vitro* e *in vivo* dos compostos sobre as seguintes linhagens tumorais: B16F10 (Melanoma Murino); JURKAT (leucemia humana); MCF-7 (Adenocarcinoma de Mama Humano).

3 – Avaliar o efeito de doadores de NO, com diferentes características e velocidades de liberação desta molécula em sistema vegetal. Verificar a influência dos compostos doadores no crescimento, morfologia celular e biossíntese de NO e poliaminas em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Este trabalho teve como intuito inicial averiguar se o efeito provocado por PAs, especialmente putrescina, nestas culturas celulares era direto ou indireto, por exemplo através do NO. Para estes experimentos serão utilizados como doadores os compostos: nitroprussiato de sódio (SNP - $t_{1/2} \approx 1 \text{ min}$)⁽⁹⁾ e $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ ($t_{1/2}$ em torno de 5 minutos)⁽³⁶⁾.

3. Material e Métodos

Os estudos prévios *in vitro* da atividade dos nitrosilo complexos de rutênio, tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ (L = py, isn, nic, L-his, imN e 4-pic), em diferentes modelos tumorais, foram realizados inicialmente nos Laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Campus Ribeirão Preto, sob a supervisão do professor Dr. Auro Nomizo e com a colaboração da aluna de iniciação científica Patrícia H. Ribeiro, e depois, de forma sistemática e em maior profundidade na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob supervisão dos professores Dr. Luiz R. Travassos e Dr^a. Elaine G. Rodrigues, com a colaboração da doutoranda Fabiana S. Serrano.

Os experimentos para verificação do efeito de doadores de NO em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* foram realizados no Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), do Departamento de Botânica - IB/USP, sob a supervisão da professora Dr^a. Eny lochevet Segal Floh e com colaboração da Pós-doutoranda Dr^a. Claudete Santa-Catarina.

3.1. Reagentes

Todos os reagentes e solventes usados foram de pureza analítica e foram utilizados conforme adquiridos. Os compostos utilizados nos experimentos com vegetais, ácido etilenodiamintetracético (Hedta/Acros), nitrito de potássio (KNO₂/Merck), e o nitroprussiato de sódio (SNP/Na₂[Fe(CN)₅NO].H₂O/Aldrich), da mesma forma, foram utilizados sem qualquer tratamento prévio.

3.2. Sínteses dos complexos

Os compostos de partida para as sínteses dos nitrosilos complexos de rutênio, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}](\text{Cl})_2$ ⁽¹¹⁶⁾, *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2\text{Cl}]\text{Cl}$ ^(117,118), *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OEt})_3)_2](\text{PF}_6)_2$ ⁽¹¹⁹⁾ e $\text{K}[\text{Ru}(\text{Hedta})\text{Cl}]$ ⁽¹²⁰⁾, foram preparados seguindo procedimentos descritos na literatura.

3.2.1. *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{SO}_4)]^+$ ⁽¹²¹⁾

Os compostos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{SO}_4)]^+$ (L: py = piridina; 4-pic = 4-picolina; isn = isonicotinamida; nic = nicotinamida; ImN = imidazol; L-his = L-histidina) foram preparados dissolvendo-se 100 mg do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2\text{Cl}]\text{Cl}$ em 3,5 ml de solução de NaHCO_3 10^{-2} mol.l⁻¹ previamente desaerada, e em seguida excesso de 10 vezes do ligante L foi adicionado (2 vezes para a L-his). A mistura permaneceu em reação sob atmosfera de argônio durante 20 minutos. Em seguida, 1 ml de HCl 6 mol.l⁻¹ e 2,5 ml de H_2O_2 30% foram adicionados. Acetona (aproximadamente 70 ml) foi acrescentada, e a mistura permaneceu em refrigerador por 12 horas. O sólido foi coletado por filtração, lavado com acetona, seco e estocado sob vácuo e na ausência de luz.

3.2.2. *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+}$ ^(27,28)

Os compostos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+}$ (L: py = piridina; 4-pic = 4-picolina; isn = isonicotinamida; nic = nicotinamida; ImN = imidazol; L-his = L-histidina) foram preparados a partir dos respectivos complexos do tipo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_4\text{L}]\text{Cl}$. Inicialmente, 100 mg dos sulfatos compostos são dissolvidos em 3 ml de solução de HCF_3COO pH 5,4 desaerada, e reduzidos com amálgama de zinco por 30 minutos (50 minutos para complexo com piridina) para gerar

trans-[Ru(NH₃)₄L(H₂O)]²⁺. A esta solução foram adicionados 0,10 g de NaNO₂ e 1,3 ml de solução desoxigenada de HBF₄ 5 mol.l⁻¹. A solução resultante foi mantida sob atmosfera de argônio por 1 hora, após este período 100 ml de etanol desoxigenado foram adicionados. O sólido foi coletado por filtração, lavado com etanol, seco e estocado sob vácuo e na ausência de luz.

3.2.3. *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ ⁽¹²²⁾

Dissolveram-se 0,20 g de *trans*-[Ru(NH₃)₄(P(OEt)₃)₂](PF₆)₂ em 200 ml de solução desoxigenada de CF₃COOH 0,001 mol.l⁻¹. A mistura permaneceu em reação por 6 horas sob fluxo de argônio, a 40 °C. Acompanhou-se a formação da banda em 316 nm ($\epsilon = 650 \text{ M}^{-1}$) por UV-visível. Evaporou-se o excesso de solvente em evaporador rotatório (a 40 °C) até volume de aproximadamente 3,0 mL, transferiu-se para 2,0 mL de uma solução 2,0 mol.l⁻¹ de CF₃COOH, previamente desoxigenada. Adicionaram-se 0,200 g de NaNO₂. A solução adquiriu uma coloração rósea. Acrescentaram-se 0,300 g de NH₄PF₆ e deixou-se no refrigerador até a formação de sólido cristalino róseo. Coletou-se por filtração, lavando-se com éter. O complexo foi seco e estocado a vácuo e ao abrigo da luz.

3.2.4. *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO₂)](PF₆) ^(123,124)

Dissolveram-se 0,20 g de *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(H₂O)]²⁺ em 3,0 ml de água destilada previamente desoxigenada. Adicionaram-se 0,25 g de NaNO₂. A mistura permaneceu sob agitação durante 30 minutos sob fluxo de argônio. Acrescentaram-se 0,20 g de NH₄PF₆, deixou-se no refrigerador até a formação de precipitado de coloração amarelo forte. Coletou-se o produto por filtração lavando-

se com éter (1,0 ml). O complexo foi seco e estocado em vácuo e ao abrigo da luz.

3.2.5. **[Ru(NO)Hedta]** ⁽¹²⁵⁾

O complexo [Ru(NO)Hedta] foi preparado dissolvendo-se 500 mg de K[Ru(Hedta)Cl] em 20 ml de uma solução 10^{-2} mol.l⁻¹ de HCl em balão de fundo redondo. O balão foi tampado e permaneceu sob atmosfera de argônio durante 30 minutos. Após este tempo, NO e argônio foram borbulhados na solução durante 3 horas e 30 minutos. Etanol foi adicionado à mistura e o nitrosilo composto formado precipitado na forma de um sólido de cor lilás o qual foi então isolado, seco e armazenado sob vácuo e protegido da luz.

3.3. **Equilíbrios no Sistema *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(H₂O)]²⁺ / *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO₂)]⁺**

A constante de velocidade específica de aquação dos íons nitrito no *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO₂)]⁺ foi determinada usando pirazina como ligante auxiliar (Equações 4 e 5). Estas medidas foram realizadas em pH 10,9 ($\mu = 0,3$ mol.l⁻¹ NaCF₃COO e (25 ± 0,2) °C), para assegurar que a única espécie presente fosse o nitro composto. Os experimentos foram realizados adicionando-se *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO₂)](PF₆) sólido a soluções contendo grande excesso de pirazina (≥ 3600), a mistura foi rapidamente homogeneizada e as variações de absorbância acompanhadas em 380 nm. Os valores das constantes de velocidade específicas foram calculadas através dos gráficos de $\ln(A_{\infty} - A_t)$ em função do tempo e o valor expresso corresponde a média de cinco experimentos independentes.

sendo:

3.3.1. Cinética de Reação de Substituição

Os experimentos cinéticos da reação entre $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ e íons nitrito foram realizados sob atmosfera de argônio e em pH 11 (μ 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO)). As medidas de aumento ou diminuição da absorbância foram obtidas em comprimento de onda previamente selecionado (330 nm) de acordo com a reação estudada. Os estudos cinéticos foram feitos em condições de pseudo primeira ordem, mantendo-se a concentração de um dos reagentes (no caso o NO₂⁻) em excesso de pelo menos dez vezes em relação ao aqua complexo. A temperatura foi mantida constante em 25 (± 0,3) °C. As constantes de velocidade de pseudo primeira ordem foram determinadas a partir dos gráficos de ln(A_∞ - A_t) versus tempo (Equação 6).

$$\ln(A_\infty - A_t) = k_{\text{obs}} \cdot t \quad (6)$$

Onde:

A_{∞} = absorvância no final da reação

A_t = absorvância em cada tempo de reação

k_{obs} = constante de velocidade de pseudo primeira ordem

Foram feitas medidas em diversas concentrações do ligante (nitrito), resultando em diferentes valores de k_{obs} . Os gráficos $\ln(A_{\infty} - A_t)$ contra tempo foram lineares em pelo três meias vidas, confirmando as condições de pseudo primeira ordem aplicadas. As constantes de velocidade específicas (k_2 e k_{-2} ; k_3 e k_{-3}) foram obtidas através do gráfico k_{obs} *versus* a concentração de NO_2^- (Equação 7).

$$k_{obs} = k_x \cdot [\text{NO}_2^-] + k_{-x} \quad (7)$$

3.4. Avaliação da Atividade Anti-tumoral dos compostos

3.4.1. Culturas de Células Tumerais

As linhagens celulares utilizadas foram as Jurkat (leucemia humana), B16F10-Nex2 (melanoma murino) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano). As células foram cultivadas e mantidas em meio RPMI - 1640 (Anexo A) suplementado com 10 mmol.l⁻¹ de HEPES, 24 mmol.l⁻¹ de bicarbonato de sódio, 40 mg.ml⁻¹ de gentamicina e 10% de soro fetal bovino, todos reagentes INVITROGEN (pH 7,4, a temperatura de 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂). Previamente a sua manipulação, células aderentes foram lavadas com PBS e tratadas com PBS contendo 0,02% EDTA. As células que com o tratamento se soltaram da superfície plástica de cultura foram recolhidas, lavadas com meio RPMI não suplementado e resuspendidas em meio completo para contagem das células viáveis em presença do corante Azul de Trypan.

3.4.1.1. Linhagem Tumoral B16F10-Nex2

A linhagem tumoral murina B16 foi isolada de um melanoma espontâneo em animais C57Bl/6. Fidler ⁽¹²⁶⁾ obteve linhagens gradativamente mais agressivas e invasivas após sucessivas passagens *in vivo*, numerando-as de F1 a F10. A linhagem mais agressiva é a B16F10. Na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX) foram selecionadas sublinhagens da B16F10, que são Nex1 a 6, com diferentes propriedades fenotípicas e apresentando graus distintos de agressividade ou virulência. A sub-linhagem B16F10-Nex2 é a que mais se aproxima da linhagem original, apresentando baixa imunogenicidade e moderada virulência, desenvolvendo tumores subcutâneos que não metastizam para os

pulmões, mas são capazes de formar numerosos nódulos pulmonares quando inoculada endovenosamente.

3.4.2. Ensaios citotóxicos *in vitro*

Os efeitos dos complexos doadores de NO foram avaliados primeiramente quanto à sua citotoxicidade *in vitro* sobre culturas de células tumorais. Após tratamento da cultura com os diferentes compostos, a viabilidade celular foi avaliada através de dois diferentes métodos: pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio) (Figura 4A) ⁽¹²⁷⁾ ou pela exclusão do corante azul de Trypan (Figura 4B).

Figura 4. Estruturas dos compostos utilizados na verificação da citotoxicidade dos complexos de rutênio, em diferentes células cancerosas. (A) MTT; (B) Azul de trypan.

3.4.2.1. Método do MTT ⁽¹²⁷⁾

Este método é baseado na determinação da atividade de enzimas em células viáveis, que possuem a habilidade de romper o anel tetrazólio do MTT (amarelo) e formar cristais azuis escuros que são impermeáveis a membranas

celulares, resultando em acúmulo dentro de células saudáveis (Esquema 2). As células são rompidas e os cristais solubilizados pela adição de detergente (dodecil sulfato de sódio, SDS). Dessa forma, o número de células viáveis após o tratamento é diretamente proporcional aos cristais formados e é determinado por método colorimétrico ⁽¹²⁷⁾.

As células tumorais foram preparadas em placas de 96 orifícios ($2,0 \times 10^5$ células por poço), em volume final de 100 μL . Os compostos foram adicionados (em concentrações de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $3,8 \text{ mmol.L}^{-1}$) e as placas mantidas durante 24h à temperatura de 37°C e sob atmosfera de 5% de CO_2 . Após incubação, foram adicionados 10 μL de MTT (5 mg.mL^{-1}) a cada orifício, e a placa encubada por mais 4 horas nas mesmas condições. Foram então adicionados 200 μL de tampão fosfato (PBS) contendo 20% de SDS. A placa foi protegida da luz e permaneceu 37°C por mais 12 h. As absorbâncias foram então medidas em 570 nm usando-se um leitor de ELISA (BenchMark, Biorad) e filtro de referência de 630 nm. Como controle negativo, utilizou-se células não tratadas com os compostos. O controle positivo utilizado para comparação foi a vincristina, um alcalóide natural derivado da planta *Catharanthus roseus*, que é utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer.

Esquema 2. Reação de quebra do anel tetrazólico no MTT.

3.4.2.2. Método de exclusão do Azul de Trypan

Neste método, as células viáveis, que possuem membranas intactas, não absorvem o corante Azul de trypan. Por outro lado, este corante penetra em células mortas tornando-as azuis e assim podem ser diferenciadas das viáveis através de observação em microscópio óptico.

As células foram preparadas em placas de 96 orifícios e cada orifício contendo 5×10^4 células por poço em 200 μ l de meio. Os compostos foram adicionados e após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C e sob atmosfera de 5% de CO₂, as células viáveis foram coletadas com tripsina, diluídas 1:1 em solução de Azul de Trypan 0,1 % (em solução salina 0,9 %) e contadas em câmara de Neubauer. Este método foi usado para analisar o efeito dos compostos sobre a linhagem de Melanoma murino (B16F10).

3.4.3. Testes In Vivo com camundongos C57Bl/6

Camundongos C57Bl/6 machos, com idade entre 6 e 8 semanas e em média 25 g, foram adquiridos no CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimental) da Unifesp. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp sob número CEP UNIFESP 0316/06. Os animais foram injetados subcutaneamente com 10^5 células B16F10-Nex2 viáveis. Estas células foram lavadas e diluídas em PBS antes de serem injetadas. As soluções dos compostos foram preparadas em PBS minutos antes de serem injetadas (100 μ l) nas concentrações de 10 e 100 μ mol.kg⁻¹ para (*trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃), 50, 100 e 500 μ mol.kg⁻¹ para (*trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃) e 50, 100 e 500 μ mol.kg⁻¹ para (*trans*-[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]Cl). Os tratamentos com os compostos se iniciaram 4 dias após a aplicação das células nos camundongos, e foram

realizados intraperitonealmente. Para os complexos contendo o ligante imN nos 5 primeiros dias foram aplicadas injeções diárias e a partir do 6º dia, as drogas foram injetadas 3 vezes por semana, em dias alternados. Para o complexo contendo isn, as aplicações foram 3 vezes por semana, em dias alternados, desde o início.

O crescimento (volume) tumoral e a sobrevivência dos animais foram acompanhados nos mesmos dias de inoculação dos compostos. O volume tumoral foi determinado usando a Equação 8.

$$\text{Volume} = \left(\frac{4\pi (R1 \times R2 \times R3)}{3} \right) \quad (8)$$

Onde R1, R2 e R3 representam os diâmetros da massa tumoral, considerada como um cilindro. Considerando-se os diâmetros menores $R1 = R2$, o volume é mais facilmente calculado pela Equação 9.

$$\text{Volume} = 0,52 \times D1^2 \times D3 \quad (9)$$

D1 e D3 representam os diâmetros menor e maior, respectivamente. Os compostos foram injetados durante 2 semanas, e o volume máximo aceito antes de os animais serem sacrificados era de 3 cm³.

3.4.4. Extração de DNA de Células Tratadas com Complexos de Rutênio

Placas de cultura de 6 orifícios foram preparadas contendo células B16F10 (7×10^6 células/poço/5 ml de meio) e, após 24 h, os compostos *trans*-

[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ (180 μmol.l⁻¹) e *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₄imN]Cl (1.700 μmol.l⁻¹) foram adicionados. Para inibição das caspases envolvidas na morte celular foi utilizado em alguns poços o peptídeo inibidor de pan-caspase Z-vad. Como controle positivo foi utilizado Camptotensina (10 μg.ml⁻¹). As placas permaneceram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 h e 5% CO₂. Em seguida, as células que estavam no sobrenadante ou que foram liberadas da superfície plástica após tratamento com EDTA foram recolhidas e centrifugadas. As células do “pellet” foram lisadas com 500 μl de tampão TELT (Tris-HCl 50 mmol.l⁻¹ pH 8; TRITON X-100 0,4 %; EDTA 2,5 mmol.l⁻¹ pH 9 e LiCl 2,5 mol.l⁻¹) e o lisado foi centrifugado durante 10 minutos, a 12.000 *g* e 4 °C. Fenol-tamponado (INVITROGEN) foi adicionado ao sobrenadante (1:1, v/v), e em seguida a mistura foi homogeneizada e centrifugada (30 minutos a 12.000g, 4°C). Clorofórmio (1:1, v/v) foi adicionado à fase aquosa, homogeneizado e a mistura centrifugada (15 minutos a 12.000 *g*, 4 °C). O DNA na fase aquosa foi precipitado com acetato de sódio 3 mol.l⁻¹, pH 7, e etanol absoluto (1 : 0,1 : 2,5, v/v/v). A mistura foi incubada a – 80 °C durante 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 μl de etanol 70 %, e em seguida a mistura foi centrifugada por 15 minutos, a 12.000 *g* e 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o tubo permaneceu a temperatura ambiente para secagem do precipitado, que foi então ressuspendido em água contendo RNase A (50 μg.μl⁻¹). O DNA resultante foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2 % e fotografado com câmera digital.

3.4.5. Cálculos para Avaliação da Atividade Anti-tumoral dos Complexos

Quando a viabilidade celular após tratamento com os compostos foi avaliada pelo método do MTT, a citotoxicidade desses compostos foi calculada utilizando-se a Equação 10.

$$\% \text{ de Citotoxicidade} = 100 - \left(\frac{(A_{Ru}) * (100)}{A_{controle}} \right) \quad (10)$$

Sendo:

A_{Ru} = absorbância das amostras contendo os complexos;

$A_{controle}$ = absorbância da amostra sem a adição de complexos.

Quando a viabilidade celular após tratamento com os compostos foi avaliada pelo método de exclusão do Azul de Trypan, a citotoxicidade desses compostos foi calculada utilizando-se a Equação 11.

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \left(\frac{(NC_{Ru} \times 10^4) * (100)}{NC_{controle} \times 10^4} \right) \quad (11)$$

Sendo:

NC_{Ru} = número de células ($\times 10^4$) das amostras contendo os complexos;

$NC_{controle}$ = número de células ($\times 10^4$) da amostra sem a adição de complexos.

Os valores das concentrações inibitórias de 50 % (IC_{50}), que correspondem a concentração responsável por 50 % da citotoxicidade dos compostos nos experimentos *in vitro*, foram determinados utilizando-se o programa GraphPad

Prism 4.0 for Windows. Os resultados apresentados são referentes à pelo menos três experimentos independentes.

3.5. Estudos em Sistema Vegetal

3.5.1. Material Vegetal

Para os estudos realizados com as células vegetais foram utilizadas culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* mantidas no Laboratório BIOCEL do Departamento de Botânica - IB/USP.

3.5.2. Suspensões Celulares

Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* foram multiplicadas em sistemas de suspensão celulares em frascos “erlenmeyer” contendo 65 ml do meio de cultura líquido BM ⁽¹²⁸⁾, suplementado com 30 g.l⁻¹ de sacarose, 0,5 g.l⁻¹ de caseína hidrolisada, 1,0 g.l⁻¹ de L-glutamina, 0,1 g.l⁻¹ de mio-inositol, 2 µmol.l⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético), 0,5 µmol.l⁻¹ de BA (benziladenina) e 0,5 µmol.l⁻¹ de Kin (cinetina). O pH do meio de cultura foi ajustado para $\approx 5,7$ antes de sua autoclavagem a 121 °C por um período de 15 min.

Após a transferência das células, os frascos de cultura foram mantidos no escuro, em agitador horizontal orbital (50 rpm) à temperatura de (25 ± 1) °C.

No 15º dia de cultivo, os frascos contendo as culturas embriogênicas foram vertidos em câmara de fluxo laminar, sobre uma peneira de dissociação celular (Sigma® S-1145) autoclavada (malha com 150 µm). A cultura embriogênica remanescente sobre a peneira foi homogeneizada com o auxílio de uma pinça e utilizada como material inicial nos experimentos.

3.5.3. Efeito do Óxido Nítrico no Crescimento Celular em Suspensão Celular

Para verificar o efeito do NO no crescimento celular, células de *A. angustifolia* foram inoculadas em meio de cultura BM líquido (conforme descrito

no item 3.5.2.), contendo diferentes compostos, como o SNP (25 – 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ (25 – 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), $[\text{RuHedtaCl}]^{2+}$ (25 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), Hedta (25 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), KNO_2 (25 – 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). O AET ((2-aminoetil)-2-tiopseudoureia) (200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), um inibidor da NOS animal, e o PTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-oxido) (200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), um seqüestrador de NO, também foram utilizados, sendo que esta concentração de PTIO foi utilizada em combinação com 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de cada doador de NO. O meio BM sem a suplementação de compostos foi utilizado como tratamento controle.

Todos estes compostos foram adicionados utilizando filtro-esterilização, em câmara de fluxo laminar, ao meio de cultura BM previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

Este experimento foi realizado em placas de cultura celular de 12 poços, utilizando-se uma relação de 40 mg de células para 2 ml de meio de cultura BM por poço. Após a montagem do experimento, com a transferência das células e adição de compostos em câmara de fluxo laminar, as placas foram vedadas e mantidas no escuro, a 25 ± 1 °C e sob agitação (50 rpm) por 21 dias.

Após 21 dias de cultivo, foi avaliado o crescimento em massa fresca (MF (g)) das culturas mantidas nos diferentes tratamentos, e foram coletadas amostras para as determinações bioquímicas de PAs. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Os resultados correspondem a uma média de três experimentos independentes.

3.5.4.Determinação de Poliaminas

A metodologia utilizada para a determinação de PAs foi descrita por Silveira ⁽¹⁰⁰⁾. As amostras foram maceradas com 1,6 ml de ácido perclórico 5%

(v/v), e mantidas no gelo por 1 hora, sendo posteriormente centrifugadas a 20.000 g durante 20 minutos, a 4 °C. O sedimento foi ressuspendido em 200 µl de ácido perclórico 5%, centrifugado novamente, e os dois sobrenadantes, que contêm as PAs livres e conjugadas solúveis, foram combinados e homogeneizados. As PAs conjugadas foram extraídas destas amostras pela hidrólise ácida de 200 µl do sobrenadante em igual volume de HCl 12 N, por 18 h a 110 °C. Posteriormente, as amostras foram secas a 40 °C sob jato de nitrogênio e ressuspendidas em 200 µl de ácido perclórico 5 %.

As PAs livres e conjugadas foram em seguida derivatizadas. Na derivatização, 40 µl da amostra contendo PAs foram misturados com 100 µl de cloreto de dansil (5 mg.ml⁻¹ em acetona), 50 µl de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO₃) e 20 µl de 1,7-diaminoheptano (DAH), que foi utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µl de prolina (100 mg.ml⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µl de tolueno, e a fase apolar (tolueno), que contém as PAs, foi coletada (175 µl), seca sob jato de nitrogênio, e ressuspendida em 175 µl de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação à acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 10 min; de 65

a 100%, entre 10 e 13 min; e 100% até 22 min; com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a 40°C . O detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 340 nm e emissão em 510 nm. Foram injetados 20 μL da solução derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada poliamina foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH (padrão interno).

3.5.5. Curvas de Crescimento ⁽¹¹²⁾

As curvas de crescimento das células de *A. angustifolia* foram determinadas para os tratamentos contendo os compostos doadores de NO, o [Ru(NO)Hedta] ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e o SNP ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), com e sem a presença de seqüestrador de NO, o PTIO ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Os ensaios foram realizados transferindo-se células para frascos erlenmeyer adaptados para a análise do crescimento através do volume celular sedimentado (Figura 5). Foi utilizada uma relação de 120 mg de células para 6 mL de meio de cultura BM. Todos os compostos foram adicionados ao meio de cultura contendo as células por filtro-esterilizado em câmara de fluxo laminar. Após a montagem do ensaio, os frascos foram vedados e mantidos no escuro, sob agitação (50 rpm) e à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As medidas foram acompanhadas em intervalos de 2 dias durante um período de 29 dias, obtendo-se o volume celular sedimentado, ou seja, o volume ocupado pelas células após a inversão dos frascos por 15 minutos, conforme demonstrado na Figura 5. O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 5. Frasco erlenmeyer adaptado para determinação das curvas de crescimento pelo volume celular sedimentado.

3.5.6. Determinações de Óxido Nítrico

A liberação de óxido nítrico foi determinada por metodologias eletroquímica e fluorimétrica, enquanto a produção intracelular de NO foi determinada por microscopia de fluorescência.

3.5.6.1. Método Eletroquímico

A detecção eletroquímica de NO foi realizada utilizando-se um eletrodo seletivo para NO (modelo amiNO – 700, Nitric Oxide Sensor, Innovative Instruments Inc.).

As análises foram realizadas dissolvendo-se 1 mg de cada um dos compostos doadores de NO (SNP e [Ru(NO)Hedta]) em 10 ml do meio de cultura BM. As variações nos amperogramas foram acompanhadas durante 4 horas, período escolhido considerando-se as velocidades de liberação do NO por estes compostos (k_{NO}). As medidas foram realizadas no escuro quando o composto analisado era o SNP, um complexo bastante fotossensível, e na ausência e presença de luz para o composto [Ru(NO)Hedta]. O branco utilizado nos experimentos foi o meio de cultura BM.

3.5.6.2. Método Fluorimétrico

A quantificação extracelular de NO foi realizada por Fluorescência, usando-se como fluoróforo o composto DAR-4M (Diaminorodamina - 4M; marca Calbiochem®; Figura 6), impermeável à membrana celular ⁽¹²⁹⁾. A reação de DAR-4M com o NO na presença de oxigênio resulta em um derivado triazol que promove um aumento na fluorescência.

Figura 6. Estrutura do composto DAR-4M.

As amostras foram preparadas transferindo-se 100 mg de MF de células de araucária para placas de cultura contendo 1 ml de meio de cultura BM, seguido da adição dos compostos doadores de NO cujas atividades foram avaliadas, o SNP e [Ru(NO)Hedta], ambos na concentração de 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, o do sequestrador PTIO (200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) e 2,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de DAR-4M. As placas foram vedadas e permaneceram no escuro, sob agitação (50 rpm) durante um período de 2 horas. Em seguida, 200 μl dos sobrenadantes sem as células foram transferidos para placa de 96 poços e a leitura das fluorescências relativas foram realizadas em fluorímetro Victor 3TM, Marca PerkinElmer, com excitação em 560 nm e emissão em 575 nm.

Culturas de células encubadas em água com DAR-4M ($2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) foram usadas como controle positivo, e sem DAR-4M como controle negativo.

3.5.6.3. Microscopia de fluorescência

A detecção de NO intracelular foi realizada através de Microscopia de Fluorescência (Microscópio Axioscop – Zeiss; excitação em 560 nm; emissão em 575 nm) usando como fluoróforo o composto permeável à membrana celular, o DAR-4M AM (diaminorodamina – 4M acetoximetil éster; Marca Calbiochem®; Figura 7) ⁽¹²⁹⁾. Similar ao que ocorre com o DAR-4M impermeável a membrana plasmática, na presença de NO e O_2 , este composto forma derivado triazol, aumentando a fluorescência.

Figura 7. Estrutura do composto DAR-4M AM.

Este experimento foi realizado em culturas celulares com 21 dias de cultivo em suspensão celular. Nestas análises, 100 mg de células (MF) foram adicionadas em 2 ml de meio de cultura BM, acrescidas de $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ dos compostos SNP, $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ e $[\text{RuHedtaCl}]$, isoladamente ou em combinação com PTIO ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$), e com $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de DAR-4M AM.

As amostras foram mantidas no escuro, sob agitação (50 rpm), a 25 °C. Após 2 horas, a fluorescência foi analisada nas células mantidas nas diferentes condições.

3.5.7. Análises morfológicas

A morfologia das células mantidas nas diferentes amostras foi analisada por microscopia óptica, utilizando-se um Microscópio da Marca Leica.

Os reagentes utilizados para a preparação das amostras para as análises foram o azul de Evans 0,1 % (solvente água) e carmim acético 2 % (solvente ácido acético) ⁽¹³⁰⁾. A solução de azul de Evans foi preparada dissolvendo-se 50 mg deste composto em 50 ml de água destilada. A outra solução foi preparada dissolvendo-se 2 g de carmim acético em 100 ml de ácido acético e esta mistura permaneceu em refluxo durante 3 horas. Após resfriada, a mistura foi filtrada e armazenada em recipiente fechado.

Culturas celulares de *A. angustifolia* mantidas durante 21 dias de cultivo em placas de culturas de 12 poços contendo 40 mg de células em 2 mL de meio BM e contendo os compostos SNP, [Ru(NO)Hedta] e [RuHedtaCl]²⁻ na concentração de 100 µmol.l⁻¹, isoladamente ou em combinação com PTIO (200 µmol.l⁻¹). As placas foram mantidas no escuro, sob agitação (50 rpm) e temperatura de 25 ± 1 °C.

As amostras foram preparadas transferindo cuidadosamente as células das culturas para vidros de relógio com auxílio de micropipeta. Retirou-se cuidadosamente o meio de cultura das amostras com auxílio de uma micropipeta. Adicionou-se a solução de azul de Evans 0,1 % em volume necessário para cobrir as células e a mistura permaneceu em repouso durante 5 minutos. Após este

tempo, o líquido foi retirado e a solução de carmim acético 2 % foi imediatamente adicionada. Após 30 segundos, o líquido foi novamente retirado e as células foram lavadas com água Milli-Q até a retirada do excesso do corante. As células foram mantidas em água Milli-Q até o momento de serem analisadas no microscópio.

4. Resultados

4.1. Reatividade Química

A coordenação de ligantes tipo $P(OR)_3$ (R = metil, etil, butil, propil e isopropil) a complexos metálicos foi e continua sendo bastante estudada tanto em relação à sua reatividade química quanto às implicações em modelos biológicos (26,30,31,119,124). As tetraaminas de $Ru(II)$ e $Ru(III)$ são um importante grupo dentre estes compostos (26,119,131-135). Em reações envolvendo complexos tipo *trans*- $[Ru(NH_3)_4P(OR)_3(L)]^{n+}$, o ligante trietil fosfito desempenha um papel de destaque na definição das propriedades do centro metálico. O $P(III)$ possui orbitais $3s$ preenchidos, favoráveis às ligações do tipo σ , e orbitais $3d_\pi$ vazios, disponíveis para retro-doação, o que confere a esses ligantes caráter bifílico (136), ou seja, eles podem atuar tanto como bases- σ , assim como ácidos- π . É conhecido também que ligantes $P(OR)_3$ coordenados ao metal rutênio em complexos *trans*- $[Ru(NH_3)_4P(OR)_3(L)]^{n+}$ modulam a labilização dos ligantes L através de efeito e de influência-*trans*. O efeito *trans* é definido como o efeito que um grupo coordenado exerce sobre a velocidade de substituição do ligante em posição *trans* a este grupo, e a influência-*trans*, o efeito sobre o enfraquecimento da ligação entre o centro metálico e o ligante em posição *trans* a ele na esfera de coordenação (26,136).

Um dos ésteres de fósforo mais estudado deste grupo é o trietil fosfito (26,29-31). Por exemplo, podemos citar a extensa série de reações de substituição da molécula de água no complexo *trans*- $[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3H_2O]^{2+}$ por ligantes com características distintas. Observou-se que dependendo do ligante, a reação apresenta características distintas (119). Assim, em reações entre o aquo complexo e ligantes que possuem caráter eletrofílicos tais como py , nic e pz ($k = 0,79 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

para py, $3,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para nic e $3,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para pz), as constantes de velocidades específicas são cerca de uma ordem de grandeza inferiores às que envolvem ligantes nucleofílicos, tais como os íons SO_3^- , CN^- e NO_2^- ($k = 5,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para SO_3^- , $3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para CN^- e $6,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para NO_2^-)^(29,119,123,136).

Apesar do volume de conhecimento acumulado até o momento, existem ainda algumas indefinições sobre o mecanismo desta reação e toda nova informação é importante, uma vez que o nitrosilo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3]^{3+}$ é, dentre as aminas de rutênio avaliadas, uma das que apresentou resultados bastante interessantes em estudos biológicos⁽³⁰⁻³²⁾. O nitrosilo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3]^{3+}$ foi avaliado por exemplo em estudos de vasodilatação *in vivo*⁽³⁰⁾ e *in vitro*⁽³¹⁾ e de Doença de Chagas⁽³²⁾. Apesar dos resultados terem sido animadores e devido ao fato de ser pouco citotóxico, o uso deste composto fica comprometido devido à sua instabilidade em soluções onde $C_{\text{H}^+} \leq 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ ^(26,123).

A reação entre *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e íons nitrito dependendo da concentração hidrogeniônica do meio, pode resultar na formação do íon complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3]^{3+}$ ou *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}_2]^+$ ^(26,124). Uma vez que o *pK* para a reação representada na Equação 12 foi estimado como sendo 8,6⁽²⁶⁾, pode-se ajustar as condições experimentais para prever qual a espécie existirá em maior proporção em uma solução em função da concentração hidrogeniônica do meio.

A interconversão nitro – nitrosil também já foi avaliada ^(29,123). Em soluções onde $C_{H^+} \approx 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, por exemplo, o nitro complexo é quantitativamente convertido no correspondente nitrosilo em minutos ($k_{\text{obs}1} = 2,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; Equação 13 e Figura 8).

Figura 8. Comportamento do espectro de solução tampão contendo a espécie *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂](PF₆). $C_{\text{Ru}} = 6,2 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; pH = 4,0; $\mu = 0,3 \text{ (NaCF}_3\text{COO)}$; 25 °C; $t = 60$ minutos; intervalo entre as leituras = 2 minutos ⁽¹²³⁾. Espectro inicial corresponde ao complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂](PF₆) e o final ao *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃.

Quando $C_{H^+} \approx 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, esta conversão também é observada, porém, nesta concentração hidrogeniônica, a formação do nitrosilo é mais lenta que em pH 4, demonstrando a relevância da concentração hidrogeniônica neste equilíbrio.

A substituição da água por íons nitrito foi avaliada em pH alcalino, em $C_{H^+} < 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$ para assegurar o nitro composto como espécie predominante. Acompanhando a reação pela técnica espectrofotométrica de Stopped-flow, observou-se que esta ocorre em duas etapas com constantes de velocidades distintas, sendo a primeira etapa mais rápida que a segunda, segue como exemplificado na Figura 9.

Figura 9. Curva de absorbância contra tempo nos experimentos de “stopped-flow” para a reação entre o complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e íons nitrito. $C_{\text{Ru}} = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; $C_{\text{NO}_2^-} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$; pH = 10; $\mu = 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ (NaCF_3COO); 25 °C; 330 nm ⁽¹²³⁾.

A primeira etapa é caracterizada por um aumento nos valores de absorbância em função do tempo e a segunda por um decréscimo de absorbância. A partir das curvas de absorbância *versus* tempo os valores de $k_{\text{obs}2}$ foram calculados. Não se observou evidências de saturação nas curvas de $k_{\text{obs}2}$ em função da concentração de íons nitrito estudada, pelo menos na faixa de concentração de NO_2^- (0,005 – 0,075 mol.l⁻¹) (Tabela 2; Figura 10). Considerando que nitrito é um nucleófilo, com base no conhecimento acumulado sobre reações de substituição envolvendo o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O](PF₆)₂, mesmo em $C_{\text{NO}_2^-} > 0,10$ mol.l⁻¹ não se observe desvio da linearidade nos gráficos de $k_{\text{obs}2}$ em função da $C_{\text{NO}_2^-}$, similarmente ao observado para substituição com $\text{SO}_3^{=}$ (24,119,136).

Tabela 2. Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ($k_{\text{obs}2}$) para o primeira etapa da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e íons nitrito.

$[\text{NO}_2^-]$ (mol.l ⁻¹)	$k_{\text{obs}2}$ (s ⁻¹)
0,0050	54,2
0,0100	63,3
0,0200	81,4
0,0400	98,4
0,0500	108,8
0,0750	132,5

$C_{\text{Ru}} = 4.0 \times 10^{-4}$ mol.l⁻¹; pH = 11.0; $\mu = 0.3$ mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); $\lambda = 330$ nm, 25 °C.

Figura 10. Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem variando com a concentração de nitrito. $C_{Ru} = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; pH 11; $\mu = 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ ($NaCF_3COO$); $T = 25^\circ\text{C}$, 330 nm; Primeira etapa ⁽¹²³⁾.

Os gráficos de k_{obs2} em função da concentração de nitrito conforme ilustrado na Figura 10, não interceptam a origem, sugerindo a possibilidade de estar ocorrendo reação de dissociação.

Os valores de absorbância em função do tempo (t) e do comprimento de onda (λ) para a primeira etapa da reação deram origem às curvas estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11. Espectros primeira etapa da reação entre $trans\text{-}[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3H_2O]^{2+}$ e íons nitrito obtidos através de espectrofotometria “stopped-flow”. $C_{Ru} = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; $C_{NO_2^-} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$; pH = 10; $\mu = 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ ($NaCF_3COO$); $25^\circ C$; $t_1 = 0 \text{ s}$ (A); $t_2 = 0,05 \text{ s}$ (B); $t_3 = 0,01 \text{ s}$ (C); $t_4 = 0,02 \text{ s}$ (D); $t_5 = 0,08 \text{ s}$ (E).

A Figura 11 sugere que no início da reação existem em solução duas espécies distintas, que seriam provavelmente $trans\text{-}[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3H_2O]^{2+}$ e íons nitrito. Com o decorrer da reação, os valores de absorbância aumentam e a distinção de bandas não é mais evidente.

Por analogia a sistemas semelhantes ^(137,138), esta primeira etapa foi atribuída à formação dos isômeros nitro, $trans\text{-}[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3NO_2]^+$, e nitrito, $trans\text{-}[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3ONO]^+$ (Equação 14). A constante de velocidade específica, k_2 , calculada a partir de $k_{obs2} = k_2 [NO_2^-] + k_{-2}$, é, portanto uma

constante mista (Equação 15) e foi calculada como sendo $1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH 11; 25 °C).

$$k_2 = k_O + k_N \quad (15)$$

Este tipo de isomerização foi descrita para compostos com diferentes metais, como Co(III), Rh(III), Ir(III), Pt(IV) e Ru(II), no estado sólido e em solução ⁽¹³⁹⁻¹⁴⁰⁾. Como citado, a constante mista de velocidade específica para a reação entre nitrito e *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ é comparável aos valores de velocidades relatadas para outros ligantes nucleofílicos ^(120,123,136). Quando esta reação ocorre com ligantes que exibem caráter eletrofílico, como piridina, nicotinamida e pirazina, os valores numéricos das constantes de velocidade específica são consideravelmente inferiores que as envolvendo ligantes nucleofílicos (ver página 44).

A segunda etapa da reação foi analisada de maneira similar à utilizada para a primeira etapa. A Tabela 3 apresenta os valores de $k_{\text{obs}3}$ obtidos.

Tabela 3. Valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ($k_{\text{obs}3}$) par a segunda etapa da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e íons nitrito.

$[\text{NO}_2]^- \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{obs}3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
0,0050	4,8
0,0100	5,7
0,0200	17,2
0,0250	18,5
0,0500	31,6
0,0600	42,2
0,0750	54,0

$C_{\text{Ru}} = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; $\mu = 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ (NaCF₃COO); pH 11; T = 25 °C; $\lambda = 330 \text{ nm}$.

Usando os valores de $k_{\text{obs}3}$ expostos na Tabela 3, a constante cinética, k_3 , foi calculada (Figura 12).

Figura 12. Variação das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem, k_{obs3} , em função da concentração de nitrito. $C_{\text{Ru}} = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; $\mu = 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ (NaCF_3COO); pH = 11; $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda = 330 \text{ nm}$.

Como pode ser observado na Figura 12, k_{obs3} varia linearmente com a concentração de nitrito e k_3 foi calculada a partir da equação 7, como sendo $6,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH 11; 25°C ; Equação 4.5). As curvas interceptaram o eixo das ordenadas bem próximo a origem. Por analogia a sistemas similares^(137,138), esta segunda etapa foi atribuída à isomerização do composto nitrito para nitro (*trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO}_2)]^+$), que é provavelmente mais estável (Equação 16).

Esta proposição é reforçada pela observação de que o espectro eletrônico na região do UV-visível da solução resultante da reação entre o aquo composto e nitrito é coincidente com o espectro do íon $trans-[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3NO_2]^+$ ($\lambda = 334$ nm; $\epsilon = 1,8 \times 10^3 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, Figura 13).

Figura 13. Espectro obtido da solução do produto obtido através da reação entre $trans-[Ru(NH_3)_4P(OEt)_3H_2O]^{2+}$ e íons nitrito. $C_{Ru} = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$; $C_{NO_2^-} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$; pH = 10.

A maior estabilidade conferida ao nitro composto em relação ao nitrito pode ser consequência da habilidade do nitro isômero (ligado pelo nitrogênio) de receber densidade eletrônica- π ⁽¹³⁹⁾ do metal (retro-doação), enquanto que o isômero nitrito (ligado pelo oxigênio) não tem esta característica.

A reação de aquação do íon nitrito no composto *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂](PF₆) foi também investigada. Para isso, como descrito na parte experimental, acompanhamos as variações no espectro eletrônico resultante da reação entre o nitro composto *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂](PF₆) na presença de excesso do ligante pirazina (Equações 17 e 18).

sendo $k_{\text{pz}} = 3,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ⁽¹¹⁹⁾.

A Figura 14 ilustra a curva de absorvância em função do tempo, observada para esta reação.

Figura 14. Curva de absorvância em função do tempo para aquação do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺ na presença de pirazina. C_{Ru} = 1,4 × 10⁻⁴ mol.l⁻¹; C_{pz} = 1,0 mol.l⁻¹; pH = 11; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); T = 25 °C; 366 nm.

A constante específica de velocidade de aquação do ligante NO₂⁻ no nitro complexo, k_{-N}, foi calculada através da curva de ln(A_∞ - A_t) em função do tempo, como sendo (1,2 ± 0,3) × 10⁻¹ s⁻¹ (pH 11; μ = 0,3 mol.l⁻¹ (NaCF₃COO); T = 25 °C), valor este que corresponde à média de cinco determinações independentes.

Considerando que o primeiro processo é decorrente da formação de ambas as espécies (*trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃ONO]⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺) as constantes calculadas a partir da Figura 10, k₂ e k₋₂, são:

$$k_2 = k_O + k_N = 1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (19)$$

e

$$k_{-2} = k_{-O} + k_{-N} = 54 \text{ s}^{-1} \quad (20)$$

como k_{-N} foi calculada como $1,2 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, é possível calcular $k_{-O} \approx 54 \text{ s}^{-1}$

A segunda etapa da reação entre *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e nitrito foi atribuída ao desaparecimento do nitrito complexo e concomitante formação da espécie nitro, *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺, mais estável. Desta forma, a constante k_3 , obtida através da Figura 12, é:

$$k_2 = k_N + k_{-O} = 6,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (21)$$

uma vez que o valor de k_{-O} foi estimado como sendo 54 s^{-1} ; a constante de velocidade específica de segunda ordem, k_N , para formação do isômero nitro pode ser calculada:

$$k_N = 6,9 \times 10^2 - 54 = 6,36 \times 10^2 \approx 6,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (22)$$

Sendo $k_N = 6,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $k_{-N} = 1,2 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, a constante de formação, K_{NO_2} , foi calculada a partir destes valores como sendo $5,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Este valor é bem próximo ao valor calculado para esta constante em experimentos em condições de equilíbrio ($5,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) ⁽¹²³⁾. Da mesma forma, através destas

constantes, a constante de formação para o nitrito complexo (*trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃ONO]⁺) pode ser estimada como sendo inferior a 10 M⁻¹, ou conforme estimada ≈ 8,5 M⁻¹. Este valor é consistente com a maior estabilidade termodinâmica do nitro composto em relação ao nitrito ^(123,138,139).

O valor de pK_a para a reação representada na Equação 23 ainda não é conhecido.

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que, em pH 11, a espécie *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃OH]⁺ possa estar envolvida na reação com íons nitrito (Equação 24). Assim, considerando esta hipótese, as constantes de velocidade correspondentes a esta reação devem ser influenciadas pela concentração hidrogeniônica do meio.

Uma vez que o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺ é mais estável no estado sólido do que o correspondente nitrosilo, é solúvel em água, e pode ser quantitativamente convertido no nitrosilo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃]³⁺ em meio biológico, a utilização do nitro pode ser uma alternativa viável ao uso do nitrosilo ^(17,140).

O uso deste composto pode ser relevante também em situações de hipoxia, quando a formação de NO a partir da NOS é inibida, já que esta via de síntese necessita de O₂. A produção endógena de NO passaria a ocorrer via mecanismo catalisado pela enzima nitrato redutase (NR). Esta enzima catalisa a

redução de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), e também tem capacidade de reduzir nitrito a NO ⁽¹⁷⁾. O correspondente fragmento, *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3]^{2+}$, formado após liberação do NO, pode reagir com íons nitrito e formar novamente o nitro complexo, gerando assim um ciclo catalítico para formação de nitrosilo (Esquema 3). Nesta condição, o complexo de Rutênio desempenharia o papel de catalisador na ativação do íon NO_2^- para a redução $\text{N(III)} \rightarrow \text{N(II)}$, convertendo-o na espécie mais reativa NO^+ .

Esquema 3. Ciclo catalítico proposto para conversão de NO_2^- em NO^+ por complexos Ru^{II} ⁽³⁸⁾.

Conforme já mencionado, situações de hipoxia ocorrem, por exemplo, durante o desenvolvimento de tumores. Nestas situações, as condições mais redutoras e acidez superior às observadas em condições fisiológicas normais são propícias à conversão do nitro ao nitrosilo e a posterior redução do NO

coordenado, necessário à sua liberação. Desta forma, estas condições favorecem o uso destes complexos, pois estes complexos não necessitam de oxigênio para produzirem o efeito desejado. Em tempo, nestas condições de hipoxia a NOS encontra-se inibida ⁽¹⁷⁾, e o ciclo apresentado no Esquema 3 pode representar uma alternativa para a formação de NO.

Evidências de que o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO₂]⁺ é ativo em sistemas biológicos foram obtidas quando este composto foi testado como vasodilatador em anéis de aorta sem endotélio ⁽¹⁴²⁾. Ele provocou vasodilatação nas aortas com efeito máximo observado de 68 % após 114 minutos de experimento, enquanto que o correspondente nitrosilo, *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]³⁺, após 15 minutos já provoca 56,4 % de vasodilatação e 100 % após 120 minutos de experimento ^(25,142).

4.2. Atividade Antitumoral de Nitrosilo de Rutênio

O efeito antitumoral de complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄(SO₄)(L)]⁺ foi avaliado em diferentes modelos de câncer.

A Tabela 4 apresenta a citotoxicidade *in vitro* (calculada como descrito em Materiais e Métodos) de diferentes compostos sobre células Jurkat, de leucemia humana.

Tabela 4. Citotoxicidade *in vitro* de compostos de Rutênio sobre células de leucemia humana (Jurkat).

Compostos	C (μmol.l ⁻¹)	% Citotoxicidade	DP
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃	3.710	99,2	1,2
	1.860	100,0	0,0
	186	58,3	8,9
	18,6	49,9	0,0
	1,86	9,4	0,0
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ L-his](BF ₄) ₃	3.250	100,0	0,0
	1.630	100,0	0,0
	163	48,2	8,2
	16,3	28,1	3,1
	1,6	-13,0	0,0
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	3.790	85,8	3,4
	1.890	97,6	4,8
	189	62,7	0,9
	18,9	38,2	8,0
	1,9	17,7	0,0

<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ isn](BF ₄) ₃	3.440	100,0	0,0
	1720	93,6	9,1
	172	73,4	7,4
	17,2	47,0	13,8
	1,7	24,0	0,9
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ 4-pic](BF ₄) ₃	3.520	100,0	0,0
	1.760	100,0	0,0
	176	58,2	6,6
	17,6	33,8	3,0
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ nic](BF ₄) ₃	3.440	100,0	0,0
	1.720	100,0	0,0
	172	50,0	10,7
	17,2	17,4	10,5
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ isn(SO ₄)]Cl	2.360	75,7	1,4
	236	25,6	3,0
	23,6	10,2	8,1
Vincristina *	1.210	96,1	6,7
	121	82,5	12,1
	12,1	15,9	0,0

* controle positivo; DP = desvio padrão. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT como descrito em Materiais e Métodos, tratando-se as células por 24h. Cada ponto foi realizado em triplicata ou quadruplicata.

Podemos verificar através dos resultados apresentados na Tabela 4, que todos os complexos foram citotóxicos para as culturas celulares da linhagem de Jurkat, de forma dose-dependente. Nota-se ainda na tabela que um dos compostos avaliados, *trans*-[Ru(NH₃)₄isn(SO₄)]Cl, que não tem como característica liberar NO, também se mostrou efetivo nos experimentos *in vitro*.

Este complexo é precursor na síntese do corresponde nitrosilo e foi a princípio utilizado para comparação com o composto com NO.

A Figura 15, construída com dados apresentados na Tabela 4, representa graficamente curvas de citotoxicidade de alguns compostos com respeito às células Jurkat *in vitro*.

Figura 15. Citotoxicidade *in vitro* de nitrosilos compostos de rutênio sobre células de leucemia humana (Jurkat). A = $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{py}]^{3+}$; B = $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{4-pic}]^{3+}$.

Como descrito, para verificar se a atividade dos compostos eram apenas decorrentes da liberação de óxido nítrico no meio de cultura, sulfatos complexos também foram testados *in vitro* em culturas de células Jurkat (Figura 16).

Figura 16. Citotoxicidade *in vitro* do composto $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_4\text{isn}]^+$ sobre células Jurkat.

Utilizando-se os dados apresentados na Tabela 4 foram também calculados os valores de IC_{50} para cada composto.

A Tabela 5 reúne os valores de IC_{50} dos compostos estudados sobre as células Jurkat de leucemia humana. Com o intuito de comparação, foram inseridos também valores de IC_{50} determinados anteriormente para estes mesmos compostos em experimentos com células V79 ⁽¹⁴³⁾, uma linhagem celular proveniente de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês. Estas representam células não transformadas, próximas de uma célula normal.

Tabela 5. Valores de IC₅₀ (em $\mu\text{mol.l}^{-1}$) calculados para os compostos que apresentaram atividade citotóxica *in vitro* sobre culturas de células de leucemia Humana (Jurkat) e células V79.

Compostos	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)		Margem Terapêutica ^c
	Jurkat	V79 ^b	
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ 4-pic](BF ₄) ₃	12	nd	nd
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃	21	930,5	44,3
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn](BF ₄) ₃	35	743,0	21,2
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	101	645,8	6,4
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic](BF ₄) ₃	172	645,5	3,8
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his](BF ₄) ₃	213	413,7	1,9
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ isnSO ₄](Cl)	610	nd	nd
Vincristina ^a	68	nd	nd

^a = controle positivo; ^b Valores obtidos da Ref. 143; ^c IC₅₀ (V79) / IC₅₀ (Jurkat). nd = não determinado.

Os resultados apresentados sugerem que todos os compostos de Rutênio aqui testados apresentam atividade citotóxica sobre células Jurkat *in vitro*. Três dos compostos estudados destacam-se dos demais: *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄4-pic]³⁺, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py]³⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn]³⁺, com IC₅₀ de 12, 21 e 35 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, respectivamente. Para os dois últimos compostos, as doses necessárias para eliminar 50% de células não transformadas foram, respectivamente, 44 e 21 vezes maiores do que as doses necessárias para eliminar células transformadas. Essa baixa susceptibilidade das células não transformadas *in vitro* sugere uma margem terapêutica bastante promissora para seu eventual uso *in vivo*. Os demais compostos apresentaram IC₅₀ superior a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ e margens

terapêuticas reduzidas (menores que 10), sugerindo uma possível toxicidade mais elevada *in vivo*. No entanto é importante lembrar que, testes *in vitro* com células não transformadas muitas vezes não refletem os resultados obtidos *in vivo*, sendo então necessário a avaliação desses compostos para o tratamento tumoral *in vivo*. Dentre os nitrosilos, o composto menos efetivo frente às células Jurkat foi o *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L-his]³⁺, com IC₅₀ de 213 µmol.l⁻¹. Este composto foi também o mais citotóxico para as células V79 (IC₅₀ de 413 µmol.l⁻¹) dentre os compostos avaliados.

Os resultados obtidos para o composto *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₄Isn]⁺, utilizado como controle, sugerem que a liberação do NO tem um papel importante para o efeito antitumoral apresentado pelos complexos analisados. Embora este composto tenha apresentado um efeito citotóxico *in vitro* sobre células Jurkat, esse efeito foi bastante discreto, representado pelo IC₅₀ de 610 µmol.l⁻¹, cerca de 17 vezes superior ao correspondente nitrosilo complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄Isn]³⁺. Além de não liberar NO, no sulfato complexo o metal está como Ru(III) e no complexo contendo o íon nitrosilo como Ru(II), sugerindo que o mecanismo de ação dos compostos deva ser diferente.

O complexo [Ru(NO)Hedta] também foi testado, porém não se mostrou citotóxico para esta linhagem tumoral de células na faixa de concentrações utilizada (2 – 3000 µmol.l⁻¹). Ao contrário, a adição deste composto às culturas resultou em aumento no número de células viáveis em relação ao controle (dados não apresentados).

O efeito antitumoral dos compostos testados neste trabalho, foi também analisado *in vitro* e *in vivo* sobre a linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.

Na Tabela 6 observa-se o efeito antitumoral *in vitro* dos nitrosilo complexos sintetizados para este trabalho, e estes resultados estão ilustrados na Figura 17.

Tabela 6. Efeito antitumoral *in vitro* dos nitrosilo complexos de Rutênio sobre células B16F10-Nex2, de melanoma murino.

Complexo	C ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	%	DP
Citotoxicidade			
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	1890	98,6	0,3
	948	100,0	0,0
	184	69,8	10,9
	95	52,9	5,1
	19	42,2	0,7
	9	29,3	3,1
	2	14,2	3,4
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ isn](BF ₄) ₃	1719	100,0	0,0
	900	100,0	0,0
	859	100,0	0,0
	86	71,1	9,3
	2	53,8	10,7
	0,17	46,6	2,4
	0,02	44,2	7,1
	0,002	30,8	3,6
	0,0002	8,8	1,4
<i>rans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃	1800	96,1	1,8
	1758	98,9	1,9
	980	98,8	1,8
	879	100,0	0,0

	180	73,1	20,5
	175	67,7	7,4
	88	50,4	3,4
	18	37,6	9,6
	9	21,0	2,3
	2	7,8	6,1
	0,2	3,7	5,3
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ nic](BF ₄) ₃	1800	96,2	1,6
	1719	98,1	1,9
	900	97,8	1,5
	180	94,7	1,5
	18	49,5	5,4
	17	15,1	4,0
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ 4-pic](BF ₄) ₃	1856	100	0,0
	928	100	0,0
	900	100	0,0
	185	85	2,8
	93	78,5	1,7
	9	63,9	8,6
	2	25,0	2,1
	0,18	23,5	6,4
	0,02	22,5	11,
	0,0002	16,5	2,2
<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₅](BF ₄) ₃	1800	99,2	1,1
	900	95,8	0,3
	18	48,6	4,4
	2	38,8	0,7

<i>trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃](PF ₆) ₃	2000	79,8	2,0
	1000	74,6	1,5
	800	70,9	1,5
	400	72,3	1,3
	100	60,1	3,5
	50	55,9	2,6
	10	41,8	1,6
	5	41,3	2,3
	0,05	30,5	1,3

DP = desvio padrão; A citotoxicidade foi avaliada pelo método de exclusão de Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos, tratando-se as células por 24h. Cada ponto foi realizado em triplicata.

Figura 17. Citotoxicidade *in vitro* dos complexos (A) $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4imN]^{3+}$ e (B) $trans-[Ru(NO)(NH_3)_4ish]^{3+}$ sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2.

Foi também avaliada a citotoxicidade *in vitro* de alguns íons complexos precursores do tipo $trans-[Ru(NH_3)_4(L)(SO_4)]^{n+}$, que não possuem em sua

estrutura o ligante óxido nítrico, sobre células B16F10-Nex2. Os resultados estão apresentados na Tabela 7, e na Figura 18 está representado graficamente os resultados obtidos para o íon *trans*-[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺.

Tabela 7. Efeito antitumoral *in vitro* dos complexos de Rutênio tipo *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)SO₄]ⁿ⁺ sobre células B16F10-Nex2, de melanoma murino.

Complexo	C (μmol.l ⁻¹)	%Citotoxicidade	DP
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ imN(SO ₄)]Cl	3600	95,9	3,81
	2711	83,3	2,46
	1800	78,8	10,60
	271	60,5	3,42
	180	44,4	12,28
	27	35,5	1,61
	18	32,8	14,17
	3	17,7	2,28
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ isn(SO ₄)]Cl	2	11,1	6,18
	2365	81,8	4,52
	236	56,1	3,72
	24	43,0	7,32
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ L-his(SO ₄)]Cl	2	26,0	8,37
	3600	99,1	1,6
	1800	82,4	11,1
	900	45,5	1,0
	180	34,5	6,5
	2	33,4	2,5

DP = desvio padrão; A citotoxicidade foi avaliada pelo método de exclusão de Azul de Trypan como descrito em Materiais e Métodos, tratando-se as células por 24h. Cada ponto foi realizado em triplicata.

Figura 18. Citotoxicidade *in vitro* do complexo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{imN}(\text{SO}_4)]^+$ sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2.

Na Tabela 8 estão reunidos os valores de IC_{50} dos compostos nitrosilos e seus precursores sulfatos estudados sobre as células B16F10-Nex2 de melanoma murino, comparados ao efeito sobre células V79.

Tabela 8. Valores de IC_{50} (em $\mu\text{mol.l}^{-1}$) calculados para os compostos que apresentaram atividade citotóxica *in vitro* sobre culturas de células de melanoma murino B16F10-Nex2 e células V79.

Compostos	IC_{50} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)		MT ^c
	B16F10-Nex2	V79 ^b	
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn](BF ₄) ₃	1	743,02	743,0
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ 4-pic](BF ₄) ₃	6	nd	nd
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic](BF ₄) ₃	20	645,46	32,3
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃](PF ₆) ₃	33	2260	68,5
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₅](BF ₄) ₃	44	nd	nd
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	74	645,75	8,7
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃	86	930,53	10,8
[Ru(NO)Hedta]	> 4000	nd	nd
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ isn(SO ₄)]Cl	137	nd	nd
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ imN(SO ₄)]Cl	444	nd	nd
<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ L-his(SO ₄)]Cl	1000	nd	nd

^a = controle positivo; ^b Valores obtidos da Ref. 143; ^c IC_{50} (V79) / IC_{50} (B16F10-Nex2). nd = não determinado. MT = Margem Terapêutica.

Assim como observado anteriormente com as células Jurkat, o complexo [Ru(NO)Hedta] não apresentou efeito citotóxico sobre células B16F10-Nex2. Dois dos compostos estudados foram particularmente efetivos *in vitro* para células B16F10-Nex2, com IC_{50} menores do que $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn]³⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄4-pic]³⁺. Os demais apresentaram efeito antitumoral *in vitro* mediano sobre as células do melanoma murino, com valores de IC_{50} que variaram entre 20 e $86 \mu\text{mol.l}^{-1}$. O complexo que possui em posição *trans* ao NO o ligante trietilfosfito também foi testado frente a esta linhagem celular, e podemos

observar pelo valor de IC_{50} que este complexo também considerou-se como citotóxico. Os sulfatos também se apresentaram efetivos nestes testes com valores de IC_{50} inferiores aos dos correspondentes nitrosilos, variando de 137 a $1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

O complexo nitrosilo de maior atividade *in vitro* sobre células B16F10-Nex2 foi o *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{isn}]^{3+}$. Este também apresenta um valor de IC_{50} bastante elevado para células não transformadas V79 ($743 \mu\text{mol.l}^{-1}$), sugerindo uma menor toxicidade *in vivo* sobre células normais. Os demais compostos nitrosilos apresentaram valores de IC_{50} para células não transformadas variando de 645 a $930 \mu\text{mol.l}^{-1}$, com valores intermediários de IC_{50} para células tumorais. Estes resultados sugerem que estes compostos são aparentemente mais citotóxicos para células transformadas que células V79. Estes resultados nos estimularam a testar o comportamento destes compostos também *in vivo*.

Além de células de leucemia humana (Jurkat) e de melanoma murino (B16F10-Nex2), os compostos foram também testados com células de carcinoma de mama humano, MCF-7 (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito antitumoral *in vitro* de compostos de Rutênio sobre células de carcinoma mamário humano, MCF-7.

Composto	C ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	% Citotoxicidade	DP
<i>Trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ Isn](BF ₄) ₃	1.720	20,6	4,0
	172	48,3	1,2
	17,2	34,0	0,4
<i>Trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃	1.860	58,7	0,4
	186	50,7	0,4
	18,6	42,0	0,5
<i>Trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ L-his](BF ₄) ₃	1.630	57,3	1,3
	163	41,5	1,3
	16,3	31,5	1,4
<i>Trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	1.890	60,5	8,5
	189	47,6	1,0
	18,9	34,3	1,8
<i>Trans</i> -[RuNO(NH ₃) ₄ -pic](BF ₄) ₃	1.760	67,1	3,6
	176	55,4	0,6
	17,6	44,2	4,8
Vincristina*	1210	58,2	0,5

* controle positivo; DP = desvio padrão. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT como descrito em Materiais e Métodos, tratando-se as células por 24h. Cada ponto foi realizado em duplicata.

Como podemos observar na tabela acima, as células MCF-7 são mais resistentes em relação às células avaliadas anteriormente, Jurkat e B16F10-Nex2, aos nitrosilos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ (L = Isn, py, L-his, imN e 4-pic). O composto mais ativo, *trans*-[RuNO(NH₃)₄-pic]³⁺, foi citotóxico para somente

67% das células tumorais e em concentração muito elevada para sua utilização *in vivo*, próxima a 2 mmol.l⁻¹.

Os valores de IC₅₀ determinados para as linhagens de células de leucemia humana (Jurkat) e de Melanoma murino (B16F10-Nex2) mostram que um dos compostos com maior atividade em ambas as linhagens é o composto *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄4-pic]³⁺. Outros íons complexos que também demonstraram considerável atividade antitumoral foram o *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py]³⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn]³⁺, para as células tumorais Jurkat e B16F10-Nex2, respectivamente, aliados à baixa citotoxicidade *in vitro* desses compostos sobre células V79.

Os resultados obtidos após o tratamento dessas células tumorais com os demais nitrosilos, entretanto, não devem ser desconsiderados, pois as diferenças observadas entre os IC₅₀ das células tumorais e das células não transformadas são bastante elevadas (5 a 40 vezes), sugerindo que esses compostos também possam apresentar uma baixa toxicidade para as células não transformadas *in vivo*.

O melanoma é um cancer de pele de baixa incidência, que, no entanto apresenta baixo índice de cura, alta frequência de metástases e alta mortalidade. Os tratamentos disponíveis até o momento apresentam baixa eficácia, principalmente pela resistência do melanoma aos quimioterápicos utilizados, o que motiva a busca por novas alternativas terapêuticas⁽¹⁴⁴⁾.

Assim, os resultados obtidos após tratamento *in vitro* das células de melanoma murino B16F10-Nex2 com os compostos de Rutênio nos estimularam realizar experimentos *in vivo* com alguns desses compostos. Foram selecionados o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺, que apresentou alta atividade antitumoral

in vitro e seu correspondente sulfato. Outro composto avaliado *in vivo* foi o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn]³⁺, que apresentou o mais baixo valor de IC₅₀ com as células de melanoma murino, 1 µmol.l⁻¹.

O complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺ foi escolhido porque, além de ter apresentado acentuada citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais Jurkat e B16F10-Nex2, esse nitrosilo composto com imidazol foi o mais eficaz dentre os avaliados no controle *in vivo* da infecção murina com o *Trypanosoma cruzi* ⁽³²⁾. O tratamento dos animais com este complexo eliminou as formas intra e extracelulares do *Trypanosoma cruzi* da corrente sanguínea e aumentou em mais de 80% a taxa de sobrevivência dos camundongos infectados ⁽³²⁾. Neste estudo, os efeitos foram atribuídos à liberação da molécula de NO, visto que os correspondentes sulfatos não apresentaram citotoxicidade sobre o *Trypanosoma cruzi*.

Para análise do efeito antitumoral *in vivo* de alguns desses compostos de rutênio, utilizamos o modelo de melanoma murino B16F10-Nex2. A linhagem B16 foi isolada primeiramente de um melanoma subcutâneo espontâneo em camundongos C57Bl/6 por Fidler, em 1975. Adicionalmente, Fidler injetou essas células endovenosamente, isolando no pulmão as linhagens B16F1 a B16F10, esta última com maior capacidade metastática. Na Unidade de Oncologia Experimental (UNIFESP) foram isoladas várias sublinhagens da linhagem B16F10 (Nex1 a Nex7), sendo a sublinhagem Nex2 a que mais se assemelha à linhagem original. Ela é singeneica aos camundongos C57Bl/6, é altamente invasiva e induz uma baixa resposta imune protetora no animal inoculado. Optamos por primeiramente utilizar o modelo de desenvolvimento subcutâneo, que se assemelha ao tumor primário observado em humanos. Nesse modelo, células

tumorais viáveis são inoculadas subcutaneamente no flanco do animal, e diferentes protocolos de tratamento com os compostos podem ser tentativamente utilizados, como descrito na parte experimental. Optamos por iniciar o tratamento no 4º dia após a inoculação das células tumorais, por ser esta a fase crítica de implantação do tumor.

As Figuras 19 a 24 apresentam os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺, *trans*-[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn]³⁺.

Figura 19. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com 50 nmol.kg⁻¹ do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados por 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume tumoral foi medido a cada 3 dias, e a sobrevida observada diariamente. **(A)** desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

Figura 20. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com 100 nmol.kg⁻¹ do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados por 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume tumoral foi medido a cada 3 dias e a sobrevivência observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento Tumoral. **(B)** Curva de sobrevivência. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

Figura 21. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄imNSO₄]Cl. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com 50 nmol.kg⁻¹ do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

Figura 22. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*-[Ru(NH₃)₄imNSO₄]Cl**. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5×10^4 células B16F10-Nex2. Tratamento com 100 nmol.kg^{-1} do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados 5 dias consecutivos, e depois durante 3 dias por semana, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

Figura 23. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo ***trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃**. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5×10^4 células B16F10-Nex2. Tratamento com 10 nmol.kg^{-1} do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados durante 3 dias por semana, em dias intercalados, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

Figura 24. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados (10 por grupo) subcutaneamente com 5x10⁴ células B16F10-Nex2. Tratamento com 100 nmol.kg⁻¹ do composto se iniciou 4 dias após a inoculação. Os animais foram tratados durante 3 dias por semana, em dias intercalados, por um período de duas semanas. Controles foram tratados com mesmo volume de PBS. O volume do tumor foi medido a cada 3 dias e a sobrevida observada diariamente. **(A)** Desenvolvimento tumoral. **(B)** Curva de sobrevida. Preto = controle; Vermelho = complexo de Rutênio.

Os resultados apresentados nas Figuras 19 a 24 sugerem que os compostos de Rutênio merecem atenção.

O complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, selecionado por sua capacidade de liberar NO livre em meio redutor como o encontrado no microambiente tumoral, foi utilizado em duas doses no protocolo escolhido, 50 e 100 nmol.kg⁻¹. Enquanto a dose de 50 nmol.kg⁻¹ levou a um leve retardo no desenvolvimento tumoral dos animais tratados (Figura 19A), a dose maior levou a significativos retardos no desenvolvimento tumoral e em aumento da sobrevida dos animais tratados (Figura 20).

Foi também testado o precursor *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄imN(SO₄)]Cl nas 2 doses descritas acima, 50 e 100 nmol.kg⁻¹ e com o mesmo protocolo de tratamento utilizado para o correspondente nitrosilo. Observou-se, para as duas doses utilizadas, um significativo retardo no desenvolvimento tumoral e um aumento da sobrevida dos animais tratados, mesmo com a menor dose, de 50 nmol.kg⁻¹, que resultou em proteção de 40% dos animais tratados.

O tratamento com o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, que *in vitro* foi o que apresentou o menor valor de IC₅₀, nas doses de 10 e 100 nmol.kg⁻¹ também promoveu uma proteção de 40 e 20% respectivamente dos animais tratados. Entretanto, observou-se uma maior toxicidade *in vivo* desse composto, com animais tratados morrendo com tumores menores que os animais controle até o 35º dia.

Embora ainda sejam preliminares, esses resultados sugerem que os complexos de rutênio apresentam um considerável efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* no modelo de melanoma murino B16F10-Nex2. Nesse modelo, a liberação de NO pelos complexos não levou a um aumento da resposta terapêutica. Ao

contrário, a liberação do NO nos camundongos C57Bl/6 onde o tumor estava implantado levou, em geral, a uma maior toxicidade *in vivo* desses compostos, mesmo em doses baixas. Conclui-se que as doses a serem testadas no futuro, para a determinação do protocolo ideal terapêutico, sejam cuidadosamente controladas.

Para melhor compreender a ação desses compostos de rutênio, alguns experimentos preliminares foram realizados. Analisou-se a presença de DNA degradado após o tratamento das células *in vitro* com alguns dos compostos. A Figura 25 apresenta a fotografia de gel de agarose contendo o DNA celular coletado após tratamento com os complexos. Em algumas amostras foi adicionado Z-VAD, um inibidor de pan-caspases, utilizado para facilitar a compreensão do papel dessas enzimas no processo de morte celular.

Figura 25. Degradação de DNA provocada por complexos de Rutênio que foram efetivos em experimentos *in vivo* com células de Melanoma Murino B16F10-Nex2. Células B16F10-Nex2 foram tratadas *in vitro* por 24 h com: **(2)** sem tratamento; **(3)** t -[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺; **(4)** t -[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺ + **Z-vad**; **(5)** t -[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺; **(6)** t -[Ru(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺ + **Z-vad**; **(7)** Camptotecina; **(8)** Camptotecina + **Z-vad**. $C_{RuNO} = 180 \mu\text{mol.l}^{-1}$; $C_{RuSO_4} = 1700 \mu\text{mol.l}^{-1}$. **(1)** Padrão de peso molecular.

Os resultados mostram que os complexos avaliados causaram degradação do DNA das células B16F10-Nex2 após tratamento com os compostos de rutênio. Camptotecina foi utilizado como um controle positivo, já que esse reagente leva a célula a apoptose, e conhecidamente o Z-VAD inibe esse processo por impedir a atividade das caspases nele envolvidas. Como pode ser observado na Figura 25, a degradação do DNA causada pelos compostos de rutênio nas células B16F10-Nex2 não foi inibida pela adição do Z-VAD, sugerindo que caspases não estejam envolvidas na morte celular provocada por esses compostos.

Esse resultado ainda não nos permite definir o tipo de morte celular provocado pelos compostos de rutênio sobre células de melanoma murino, pois a degradação do DNA pode ser observada tanto em processos apoptóticos como necróticos. Entretanto, existem evidências de que o mecanismo de morte celular seja independente de caspases.

Como mencionado acima, a forma pelas quais os compostos agem *in vitro* e *in vivo* ainda não estão esclarecidos, porém, sabe-se que compostos do tipo *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ liberam NO^o após redução de 1 elétron ^(23,24). Esta redução pode ser promovida pelos diferentes redutores existentes no meio biológico, tais como compostos tipo R-SH, por exemplo, a glutathiona (GSH), que está presente tanto no plasma (~ 5 – 25 μmol.l⁻¹) quanto no citosol das células (~ 10 mmol.l⁻¹) ⁽¹⁴⁵⁾.

Alguns compostos que não possuem como característica liberarem óxido nítrico foram efetivos em estudos com modelos de células de câncer ^(48,49,59). Alguns destes compostos apresentam o metal no estado de oxidação Ru(III), e uma das propostas relacionadas a atividade destes compostos seria estarem atuando como oxidantes, ou seja, redução a Ru(II). Em geral, como já mencionado, quando ocorre o desenvolvimento de tumores, há a necessidade das células transformadas por mais nutrientes, e este processo desencadeia mudanças no ambiente, tais como a formação de novos vasos sanguíneos, hipoxia e pequeno acréscimo na acidez do meio. Dessa forma, além da presença de moléculas que possam agir como redutores, o ambiente favoreceria a existência de Ru(II) em relação a Ru(III).

A reação da glutathiona e L-cisteína com os compostos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄-pic(H₂O)]²⁺ já foi anteriormente reportada ⁽¹⁴⁶⁾ e existem diferenças na estabilidade

dos produtos desta reação. Os compostos formados na reação com o complexo contendo o metal no estado de oxidação Ru(II), $trans-[Ru^{II}(NH_3)_4\text{-pic(LH)}]^{n+}$, apresentaram K_{eq} $1,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (cysSH) e $1,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (GSH), enquanto que para os compostos $trans-[Ru^{III}(NH_3)_4\text{-pic(LH)}]^{n+}$ formados as K_{eq} foram $8,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (cysSH) e $1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (GSH), demonstrando a estabilidade superior dos compostos de Ru(III) em relação aos de Ru(II).

Há evidências de que a transferrina, uma proteína responsável pelo transporte de ferro nas células, esteja envolvida no transporte de íons metálicos utilizados no combate ao desenvolvimento do câncer ⁽¹⁴⁷⁾. Dentre estes compostos, pode-se destacar alguns contendo como centro metálico o rutênio, como o complexo NAMI, $Na\{trans-[Cl_4(DMSO)(imN)Ru]\}$, que já entrou na fase de estudos clínicos ⁽¹⁴⁸⁾. O metal rutênio, devido à semelhança existente com o ferro, pode mimetizar suas ações. Assim acompanhando os resultados descritos no parágrafo anterior, o acompanhamento da reação entre complexos tipo $[Ru^{II}(NH_3)(H_2O)]^{2+}$, $[Ru^{III}(NH_3)_5Cl]^{2+}$, $cis-[Ru^{II}(NH_3)_4(H_2O)_2]^{2+}$ e $cis-[Ru^{III}(NH_3)_4Cl_2]^+$ com apotransferrina demonstraram que Ru(III) apresenta maior afinidade pelos sítios de ferro que o complexo Ru(II) ⁽¹⁴⁷⁾. Estas características podem ser um dos fatores responsáveis pelo efeito observado nos testes *in vivo* realizados com os sulfatos complexos de Ru(III).

Outro ponto discutido na literatura é a existência de correlações entre tumores e inflamação ⁽¹⁴⁹⁾. A inflamação em geral, é uma reação de proteção ao organismo, entretanto, existem evidências de que ela também possa estar envolvida com o desenvolvimento de algumas doenças, dentre as quais câncer. Aparentemente, a inflamação aguda teria um papel relacionado com a defesa ⁽⁴²⁾, enquanto que inflamações crônicas podem levar ao desenvolvimento de diabetes,

doenças cardiovasculares e câncer ^(42,150). Dessa forma, a atividade observada para o sulfato complexo *trans*-[Ru^{III}(NH₃)₄imN(SO₄)]⁺, pode também estar relacionada com a capacidade que esta classe de compostos de captarem o óxido nítrico (Equação 25), auxiliando assim, na diminuição de espécies ativas formadas durante a resposta inflamatória.

Os nitrosilos, entretanto, devem agir seguindo uma via diferente. As análises morfológicas das células após permanecerem com os complexos avaliados, por exemplo, indicaram que provavelmente as vias de atuação dos nitrosilos em relação aos sulfatos devam ser distintas (resultados não apresentados). Estes compostos, ao contrário dos sulfatos, podem estar favorecendo uma resposta inflamatória, uma vez são fontes de NO, um dos radicais gerados durante inflamação.

4.3. Efeito dos compostos doadores de NO em Sistema Vegetal

Os doadores de NO utilizados nos estudos realizados com culturas celulares de Araucária foram os compostos nitroprussiato de sódio (SNP) e [Ru(NO)Hedta]. Não é demais lembrar que o SNP é um dos mais utilizados na verificação dos efeitos do óxido nítrico em sistemas vegetais. De acordo com a literatura ^(9,21), o SNP libera NO rapidamente, com $t_{1/2}$ provavelmente em torno de 1 min, porém é fotossensível liberando íons cianeto, reconhecidamente tóxicos ⁽²¹⁾. Procurando utilizar um complexo que libere NO de forma mais controlada optou-se pelo complexo de [Ru(NO)Hedta], cujo $k_{-NO} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} \approx 5 \text{ min}$), e não apresenta o inconveniente de liberar íons CN^- ⁽³⁶⁾. A escolha por um composto que libere NO lentamente justifica-se, pois além de se averiguar o efeito do NO exógeno, também se investiga o efeito da velocidade desta liberação sobre os parâmetros avaliados.

Objetivando verificar se o meio de cultura BM utilizado nos experimentos tem capacidade para promover a liberação do óxido nítrico por estes complexos doadores, acompanhou-se via eletroquímica a variação na concentração de NO em soluções contendo os complexos dissolvidos no meio, durante 4 horas. A Figura 26 mostra os amperogramas obtidos para ambos os compostos.

Figura 26. Comportamento eletroquímico dos compostos (A) [Ru(NO)Hedta] e (B) SNP adicionados ao meio de cultura BM. $C_{\text{complexos}} = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; tempo = 4 horas.

Conforme a figura acima indica, durante o tempo no qual o experimento foi monitorado, não ocorreu liberação de NO para a solução contendo o complexo [Ru(NO)Hedta] (Figura 26A). Para a solução contendo o complexo SNP observou-se pequena variação no amperograma, indicando que houve liberação de óxido nítrico (Figura 26B). Porém, esta alteração na curva do SNP não foi considerada significativa, pois além da concentração de ambos os compostos serem superiores às utilizadas nos experimentos com as células vegetais. Quando a mesma leitura é realizada na presença de luz, que reconhecidamente promove liberação de NO pelo SNP ⁽²¹⁾, a corrente gerada é oito vezes superior. Estes resultados sugerem que a liberação de óxido nítrico por reação com o meio

utilizado, principalmente para o composto de rutênio, pode ser para os nossos objetivos considerada desprezível.

Já é bem estabelecido que o complexo [Ru(NO)Hedta] libera óxido nítrico após redução monoeletrônica ⁽³⁶⁾, entretanto, apesar de ter sido extensivamente estudado, o mecanismo pelo qual o SNP é ativado para liberação de NO ainda não está completamente elucidado ⁽²¹⁾. Duas são as propostas principais, uma delas seria similar à observada para o composto de rutênio, ou seja, através de redução sobre o ligante NO⁺, com subsequente liberação de NO e CN⁻. Uma segunda via prevê uma reação fotoquímica, ou seja, ativada pela luz ⁽²¹⁾. Não sabemos ainda a razão desta pequena liberação observada quando o SNP é dissolvido no meio.

A Tabela 10 e Figura 27 ilustram os efeitos dos compostos doadores de óxido nítrico no crescimento de culturas celulares de *Araucaria angustifolia* após 21 dias de cultivo. Os resultados estão expostos em percentagem de aumento de massa fresca em relação ao crescimento observado para a amostra controle.

Tabela 10. Efeito de diferentes doadores de NO no crescimento, em percentagem de massa fresca em relação ao controle, de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, após 21 dias de cultivo.

Tratamento	% de crescimento em relação ao controle (DP)
SNP 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	15,1 (5,6)
SNP 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	43,7 (1,0)
SNP 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	49,0 (10,0)
SNP 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	60,6 (8,3)
SNP 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	6,7 (1,7)
SNP 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	5,3 (7,8)
RuNO 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	41,5 (12,6)
RuNO 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	67,5 (0,4)
RuNO 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	68,3 (3,4)
RuNO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	61,5 (7,2)
RuNO 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	2,7 (3,0)
RuNO 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	- 5,8 (5,7)
AET 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	17,0 (0,8)
PTIO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	- 2,5 (7,2)

SNP = nitroprussiato de sódio; RuNO = [Ru(NO)Hedta]; AET = 2-aminoetil-2-tiopseudoureia; PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-oxido; Valores entre parênteses nos tratamentos correspondem ao desvio padrão (DP); massa inicial de células = 40 mg por 2 ml de meio BM; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz.

Figura 27. Efeito dos compostos doadores de NO no crescimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, após 21 dias de cultivo. (A) SNP; (B) Ru = [Ru(NO)Hedta]; Valores entre parênteses correspondem às concentrações em $\mu\text{mol.l}^{-1}$; Massa inicial de células = 40 mg (2 ml de meio BM), n = 3; MF = massa fresca; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz.

Nota-se que as culturas embriogênicas cultivadas com ambos os compostos doadores de NO apresentaram um aumento no crescimento celular após 21 dias de cultivo em comparação com o controle. Estes resultados corroboram com a idéia inicial de que o NO deve estar envolvido no processo de crescimento celular e não na via de diferenciação, conforme sugerido na Figura 2. Vários trabalhos relatam que o NO participa de um conjunto de reações importantes que ocorrem em plantas ^(75,89-91). Esta molécula pode ser um estímulo à ativação da divisão celular e na formação de células embriogênicas em células de protoplastos de alfafa ⁽⁸⁰⁾. No presente trabalho, observou-se que o resultado foi similar para os dois complexos doadores de NO utilizados, indicando que as diferenças existentes nas constantes de velocidades específicas de liberação do NO não são determinantes para este estímulo, e que provavelmente a presença de NO seja suficiente. Pode-se observar também que este efeito é dependente da concentração dos complexos, sendo que as maiores variações estão na faixa entre 50 e 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Nota-se ainda que acima de uma determinada concentração do doador este efeito não é mais visualizado, ou seja, os complexos não estimularam o aumento da divisão celular. Por exemplo, os tratamentos contendo 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ dos doadores apresentaram crescimento similar ao do controle. Até o momento, o motivo deste comportamento dose *versus* efeito não é conhecido. Entretanto este resultado pode ser um indício de que, acima de certa concentração exógena de NO, pode ocorrer um efeito inibitório sobre o crescimento celular por algum mecanismo celular ainda não conhecido.

Além dos experimentos conduzidos com os compostos doadores de NO, testes adicionais foram efetuados para verificar também o efeito da presença de composto sequestrador de óxido nítrico, neste caso, foi escolhido o PTIO. Este

composto foi testado isoladamente na concentração de $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$, ou em combinação com $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ do doador de NO. Analisando os resultados, observou-se que a presença de PTIO combinado com os doadores de NO inibiu o crescimento em massa fresca em comparação com os experimentos envolvendo os doadores nesta concentração ($50 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Por outro lado, a adição de PTIO ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$) isoladamente, na ausência dos doadores de NO, não reduziu o crescimento celular, apresentando portanto um resultado análogo ao do controle. Este resultado sugere que a esta concentração o PTIO por si só não apresenta qualquer efeito sobre o crescimento celular das culturas embriogênicas.

O efeito de um inibidor da NOS animal, o AET, também foi testado. Entretanto, diferente do esperado, este tratamento apresentou um aumento no crescimento celular superior ao do controle. Este resultado pode ser indicativo de que o principal mecanismo de síntese endógena de NO neste caso, não seja através de enzimas tipo NOS, mas provavelmente segundo outro mecanismo. Como relatado na literatura ⁽¹⁰²⁾, a adição de putrescina às culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* induz o aumento endógeno de NO, mas o mecanismo desta indução ainda não é conhecido. Sabe-se que em plantas, a poliamina putrescina é sintetizada a partir do aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima arginina-descarboxilase (ADC). O NO em plantas, assim como a putrescina, pode ser gerado a partir da L-arginina pela ação de enzimas tipo NO sintase ⁽⁸⁹⁾ (Esquema 4), mostrando que este aminoácido é um precursor comum para ambos, Put e NO.

Esquema 4. Esquema simplificado da biossíntese de poliaminas e de óxido nítrico. ODC = ornitina decarboxilase; ADC = arginina decarboxilase; NOS = óxido nítrico sintase.

A análise dos resultados obtidos com o tratamento com inibidor da NOS, AET, à luz do Esquema 4, sugere que a provável inibição da síntese de NO pela NOS, induza a um aumento na concentração de L-arginina disponível para a biossíntese de putrescina. Assim, uma vez que já foi demonstrado que esta poliamina induz a síntese endógena de NO ^(102,103), é possível que este efeito positivo do AET no crescimento celular seja decorrente do NO produzido a partir da poliamina putrescina. Entretanto, apesar de recentemente ter sido demonstrado a interação entre as PAs e NO em plantas ^(102,103), até o momento não existe estudos que demonstrem como esta interação ocorre. Neste sentido,

estudos relacionados com a inibição ou ativação das vias de síntese de NO e PAs em plantas devem ser desenvolvidos com o objetivo de elucidar estas interações.

Também foram realizados experimentos utilizando substâncias que não possuem capacidade de liberarem óxido nítrico, tais como o complexo $[\text{RuHedtaCl}]^{2-}$ e os ligantes Hedta e KNO_2 , e os resultados estão reunidos na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito de diferentes compostos que não liberam NO no crescimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, após 21 dias de cultivo.

Tratamento	% de crescimento em massa fresca em relação ao controle (DP)
RuCl 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-21,8 (5,2)
RuCl 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-12,3 (5,8)
RuCl 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-20,0 (2,7)
RuCl 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-36,9 (3,5)
RuCl 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + KNO_2 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-22,9 (2,4)
RuCl 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + KNO_2 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-8,5 (1,3)
Hedta 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-14,3 (7,4)
Hedta 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-21,3 (3,0)
Hedta 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-14,6 (7,4)
Hedta 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-35,6 (2,4)
KNO_2 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + Hedta 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-20,4 (6,3)
KNO_2 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-19,5 (3,9)
KNO_2 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-21,2 (2,8)
KNO_2 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-19,9 (6,1)
KNO_2 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	-23,4 (0,8)

RuCl = $[\text{RuHedtaCl}]$; Valores entre parênteses nos tratamentos correspondem ao desvio padrão (DP); Massa inicial de células = 40 mg para 2 ml de meio BM; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; n = 3.

Como esperado, diferente do comportamento observado para os experimentos realizados na presença de compostos liberadores de NO, as culturas celulares cultivadas com compostos que não liberam NO não apresentaram crescimentos superiores aos do controle, pelo contrário, observou-se um decréscimo no crescimento, indicando que o efeito deva ser decorrente da ausência de óxido nítrico.

Foram realizados experimentos para verificar o efeito dos nitrosilo complexos nas curvas de crescimento das culturas celulares de *Araucária* através do volume celular sedimentado. Os resultados obtidos nestes experimentos estão ilustrados na Tabela 12 e Figura 28.

Tabela 12. Efeito dos compostos doadores de NO e do sequestrado PTIO nas curvas de crescimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, através do volume celular sedimentado em ml.

Cultivo		SNP		[RuNO]	
(Dias)	Controle	SNP	+ PTIO	[RuNO]	+ PTIO
0	0,6 (0,1)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)	0,5 (0,0)	0,5 (0,0)
2	0,5 (0,0)	0,5 (0,0)	0,4 (0,1)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)
4	0,5 (0,0)	0,5 (0,1)	0,5 (0,1)	0,5 (0,0)	0,5 (0,1)
6	0,6 (0,1)	0,8 (0,0)	0,6 (0,1)	0,7 (0,1)	0,6 (0,0)
8	1,0 (0,0)	1,0 (0,1)	0,8 (0,0)	1,0 (0,0)	0,7 (0,1)
11	1,4 (0,0)	1,5 (0,0)	1,2 (0,2)	1,5 (0,0)	1,1 (0,1)
13	1,7 (0,1)	1,8 (0,1)	1,4 (0,1)	1,8 (0,1)	1,3 (0,1)
15	1,9 (0,1)	2,2 (0,2)	1,6 (0,2)	2,2 (0,1)	1,5 (0,1)
18	2,4 (0,0)	2,9 (0,1)	1,9 (0,2)	2,7 (0,1)	1,8 (0,1)
21	2,4 (0,1)	3,4 (0,3)	2,0 (0,1)	3,2 (0,2)	2,1 (0,1)
26	2,2 (0,0)	2,7 (0,6)	1,8 (0,2)	2,7 (0,1)	1,9 (0,1)
29	1,8 (0,2)	2,0 (0,3)	1,3 (0,1)	1,9 (0,4)	1,6 (0,1)

SNP = nitroprussiato de sódio; [RuNO] = [Ru(NO)Hedta]; $C_{\text{compostos}} = 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$; $C_{\text{PTIO}} = 200 \mu\text{mol.l}^{-1}$. 120 mg de células em 6 ml de meio BM; Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão; VCS = volume celular sedimentado; 30 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; n = 3.

Figura 28. Efeito dos doadores de NO e do sequestrador, PTIO, nas curvas de crescimento de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. (A) Quadrado = controle; triângulo = [SNP] ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$); círculo = [SNP] ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + PTIO ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$); (B) Quadrado = controle; triângulo = [Ru(NO)Hedta] ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$); círculo = [Ru(NO)Hedta] ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) + PTIO ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$). 120 mg de células em 6 ml de meio BM; 30 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz.

Podemos notar pelos gráficos da Figura 28 que os compostos doadores de NO e o seqüestrador PTIO modulam o crescimento celular das culturas embriogênicas ao longo do cultivo *in vitro*. Comparando-se com os resultados descritos anteriormente na Figura 27, aos 30 dias de cultivo, verifica-se que a curva de crescimento contendo os dois compostos doadores de NO apresentou o comportamento esperado. Pode-se observar que as diferenças no crescimento celular, entre os compostos doadores de NO e o controle, iniciaram-se a partir do 15º dia de cultivo, na fase exponencial de crescimento, tornando-se mais evidentes na fase estacionária, ou seja, aos 21 dias de cultivo. De forma semelhante aos resultados anteriores, mostrados na Figura 27, a adição de um composto que seja seqüestrador de óxido nítrico em combinação com os compostos doadores de NO conduziu a inibição deste aumento no crescimento celular. Este efeito foi observado a partir do 8º dia de cultivo, ou seja, no início da fase exponencial de crescimento.

Como já mencionado, há relatos ⁽¹⁰⁵⁾ que indicam que a adição de poliaminas (PAs) em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, especialmente espermidina e espermina, afeta negativamente o crescimento celular. No entanto, é também conhecido que a suplementação com essas duas PAs permite que ocorra simultaneamente a evolução morfogênética das culturas embriogênicas e provocando uma redução na biossíntese de NO em relação a amostra controle ⁽¹⁰⁵⁾. O tratamento com putrescina, por outro lado, diferentemente do observado para espermidina e espermina, resultou em crescimento celular semelhante ao do controle e a um aumento da síntese de NO endógeno. Assim, aparentemente nas culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, as poliaminas espermidina e espermina estariam talvez mais

envolvidas na via de diferenciação celular, promovendo a progressão da evolução morfogénica (Figura 2A), enquanto a putrescina talvez esteja envolvida não só na multiplicação celular, mas também provocando um aumento na biossíntese de NO^(102,103).

Neste sentido, os resultados deste trabalho estão de acordo com a hipótese de que o NO esteja envolvido no crescimento celular⁽¹⁰³⁾. Considerando que a adição da poliamina putrescina aumenta a produção endógena de óxido nítrico, ela pode indiretamente também estar envolvida na via de multiplicação celular, sem, entretanto, favorecer a evolução morfogénica das culturas embriogénicas, conforme sugerido na Figura 2B.

O efeito dos doadores de NO sobre os conteúdos endógenos destas PAs também foram avaliados. A Tabela 13 e a Figura 29 ilustram os teores endógenos destas poliaminas para as diferentes culturas embriogénicas cultivadas nos diferentes doadores de NO.

Tabela 13. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca) de poliaminas livres em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, após 21 dias de cultivo.

Tratamento	Put	Spd	Spm
	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Controle	93,4 (1,1)	8,9 (1,1)	3,0 (0,6)
RuNO 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	74,7 (6,4)	9,9 (0,5)	2,9 (0,2)
RuNO 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	70,2 (9,8)	9,4 (2,6)	2,2 (0,4)
RuNO 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	62,7 (1,3)	7,4 (0,6)	2,3 (0,2)
RuNO 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	71,5 (2,2)	7,3 (0,2)	2,1 (0,1)
RuNO 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	47,6 (7,4)	5,5 (5,5)	1,3 (0,1)
SNP 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	93,5 (10,8)	10,7 (0,9)	3,5 (0,6)
SNP 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	99,6 (9,0)	9,2 (1,2)	2,7 (0,4)
SNP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	87,2 (2,0)	6,3 (0,4)	2,8 (1,0)
SNP 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	68,6 (3,5)	5,7 (0,4)	1,6 (0,2)
SNP 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ + PTIO 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	72,0 (2,8)	9,2 (0,2)	1,9 (0,1)
AET 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	114,4 (7,1)	10,7 (1,2)	4,9 (0,2)
PTIO 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	108,4 (10,8)	10,8 (2,0)	2,8 (0,5)

Entre parênteses estão os valores de desvio padrão; RuNO = [Ru(NO)Hedta]; Put = putrescina; Spd = espermidina; Spm = espermina; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; AET = 2-aminoetil-2-tiopseudoureia; PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-óxido; n = 3.

Figura 29. Efeito de diferentes doadores de NO, do inibidor AET e do sequestrador PTIO no conteúdo endógeno de PAs livres em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. A) SNP; B) RuNO = [Ru(NO)(Hedta)]; Os valores entre parênteses correspondem às concentrações em $\mu\text{mol.l}^{-1}$; n=3; Put = putrescina; Spd = espermidina; Spm = espermina.; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; AET = 2-aminoetil-2-tiopseudoureia; PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-óxido; n=3.

A poliamina encontrada em maiores teores nas culturas embriogênicas foi a putrescina, precursora da espermidina e espermina. Os resultados mostram que o nitrosilo de rutênio ([Ru(NO)Hedta]) promoveu uma diminuição na produção endógena de putrescina, e esse decréscimo foi em torno de 25 % para a faixa de concentração entre 25 – 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ do complexo de Ru. O complexo SNP, no entanto, só apresentou influência na concentração de Put quando comparado ao controle na concentração de 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Até a concentração de 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ os experimentos com SNP não conduziram a qualquer variação na concentração endógena de putrescina. Os experimentos efetuados na presença do inibidor de NOS animal (AET) e do seqüestrador de NO (PTIO) aumentaram as concentrações de putrescina em relação ao controle, enquanto os experimentos realizados com PTIO combinado com os complexos doadores de NO, houve diminuição nas concentrações de putrescina. Para compreender melhor estes resultados é interessante lembrar as vias de sínteses das poliaminas em questão exposto no Esquema 4. Além da síntese a partir do aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pela enzima arginina-descarboxilase, a síntese de putrescina pode também acontecer a partir do aminoácido L-ornitina, que é descarboxilado pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) ⁽¹⁵¹⁾. Já foi demonstrado que em animais, o NO pode inibir a atividade da enzima ODC ⁽¹⁵²⁾. Desta forma, se considerarmos que pelo menos parte da putrescina seja sintetizada a partir da L-ornitina, pode-se sugerir que a inibição da enzima ODC pelo NO adicionado ao meio de cultura provocaria uma diminuição nos teores de Put nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia* preparadas com doadores de NO. Entretanto, como anteriormente mencionado, para plantas ainda não existe trabalhos publicados até o momento que demonstrem esta relação.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados com AET, por outro lado, podem ser interpretados considerando-se que este inibidor da NOS possa aumentar a disponibilidade do precursor L-arginina para a síntese L-ornitina/agmatina, facilitando assim a síntese de Put. Entretanto, não encontramos até o momento explicação para justificar o efeito do sequestrador PTIO e do inibidor de NOS animal AET no aumento na síntese desta poliamina.

Outro parâmetro avaliado neste estudo foi em relação à morfologia das culturas embriogênicas. É interessante salientar que as culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* apresentam pró-embriões com dois tipos celulares característicos: células embriogênicas, isodiamétricas e com citoplasma denso, e células do suspensor, que são alongadas e vacuoladas, como pode ser observado na Figura 30 ⁽¹⁰³⁾.

Figura 30. Morfologia de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*.

A Figura 31 ilustra as imagens obtidas em microscópio óptico correspondentes aos experimentos realizados.

Figura 31. Morfologia das células de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* após 21 dias de cultivo nos diferentes doadores de NO, combinados ou não com o sequestrador PTIO. Massa fresca inicial = 40 mg de células para 2 ml de meio de cultura BM. Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz.

Os resultados apresentados na Figura 31 sugerem que na ausência de PTIO, e após 21 dias de cultivo, os experimentos realizados com doadores de NO provocaram um aumento no número de células embriogênicas em relação ao

controle. Nestes mesmos experimentos aparentemente houve uma diminuição de células do suspensor. Entretanto, este acréscimo no número de células embriogênicas ocorre de forma desorganizada, não sendo observada a manutenção da polaridade nas culturas embriogênicas. Este fator que pode ser determinante para que não ocorra a evolução morfogenética quando as culturas são cultivadas com adição exógena de NO. Similarmente ao observado para o NO, a adição exógena de putrescina também resultou numa menor evolução morfogenética das culturas embriogênicas, e esta resposta pode ser decorrente do aumento endógeno de NO provocado pela adição desta poliamina ⁽¹⁰²⁾.

Quando os tratamentos foram efetuados na presença de doadores de NO em conjunto com o seqüestrador PTIO, a morfologia das células foi similar às do controle. Ou seja, observou-se uma diminuição nas células embriogênicas e aparentemente houve aumento na quantidade de células de suspensores, sugerindo que o PTIO ao inibir o efeito dos doadores de NO, inibe também o efeito do NO na morfologia das células. Os resultados observados neste trabalho estão de acordo com resultado já descrito ⁽⁹⁷⁾, que demonstrou que em células de protoplasto de alfafa o NO pode estimular a ativação do ciclo de divisão celular e a formação de células embriogênicas na presença de auxina. Foi demonstrado também que a aplicação do seqüestrador de NO (PTIO) ou do inibidor da NOS inibem este efeito ⁽⁹⁷⁾.

Os teores endógenos intra e extracelular de NO foram avaliados após 21 dias de cultivo nas diferentes amostras realizadas. As Figuras 32 e 33 mostram os resultados obtidos para as avaliações das concentrações intracelulares de NO nas culturas embriogênicas.

Figura 32. Efeito da adição exógena de SNP, na presença e ausência de sequestrador (PTIO), sobre a biossíntese intracelular de NO em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. SNP = 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; PTIO = 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; tempo incubação_{DAR-4M AM} = 2h; Concentração_{DAR-4M AM} = 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz.

Figura 33. Efeito da adição exógena de [Ru(NO)Hedta], na presença e ausência de sequestrador (PTIO), sobre a biossíntese intracelular de NO em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. [Ru(NO)Hedta] = 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; PTIO = 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; tempo de incubação_{DAR-4M AM} = 2h; Concentração_{DAR-4M AM} = 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz.

Podemos observar que as culturas embriogênicas que apresentaram fluorescências mais intensas, e consequentemente maiores teores de NO intracelular, foram as que se desenvolveram na presença dos doadores de óxido nítrico. Consideramos que esta fluorescência seja decorrente da presença de NO endógeno, pois quando este experimento foi avaliado, já haviam se passado 21 dias da adição dos compostos e a capacidade doadora dos mesmos estariam completamente exauridas. Aparentemente, a suplementação inicial das culturas embriogênicas com óxido nítrico desencadearia algum processo que conduziria a um aumento na produção endógena desta molécula. Acredita-se que este aumento no conteúdo endógeno de NO após 21 dias de cultivo possa estar relacionado com a manutenção do crescimento celular induzido pelo NO exógeno, sugerindo que este acúmulo endógeno de NO é fundamental para manter o crescimento celular destas culturas embriogênicas.

Este efeito observado na presença de doador de NO foi anteriormente relatado em experimentos sobre tolerância de vegetais à seca em trigo ⁽⁸⁰⁾. Nestes, mesmo após 15 dias de aplicação de SNP, a planta manteve coloração verde, mesmo sem adição de água. Este efeito é relevante, pois a planta cultivada na amostra controle, isto é, sem SNP, após este período estava morta ⁽⁸⁰⁾. No presente trabalho foi observado que as intensidades de fluorescência diminuíram para as amostras em que ocorreu a adição de PTIO durante o cultivo das culturas. As Figuras 32 e 33 mostram que a maior concentração do NO está localizada nas células embriogênicas quando comparado com as células do suspensor, conforme já demonstrado previamente por Silveira, também em células de embriogênicas de *A. angustifolia* ⁽¹⁰³⁾.

Após 21 dias de cultivo, determinou-se também o conteúdo endógeno de NO no meio extracelular e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 34.

Figura 34. Efeitos de diferentes doadores de NO e do seqüestrador PTIO na liberação de NO em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, após 21 dias de cultivo. SNP = nitroprussiato de sódio ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$); RuNO = $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Hedta}]$ ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$); PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1,1-oxi-3-oxido ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$); Unidade relativa de fluorescência; tempo de incubação_{DAR 4M} = 2h; 21 dias; Agitação a 50 rpm; T = 25 °C; pH 5,7; Ausência de luz; $2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de DAR-4M..

De forma semelhante aos resultados observados para os experimentos intracelulares, a Figura 34 indica que as amostras tratadas com doadores de NO conduzem a um aumento na concentração deste composto quando comparado com o controle. Este aumento observado nos níveis de NO pode sugerir que esta produção seja necessária para a manutenção do crescimento celular das culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*.

Nesta parte do trabalho foram identificados os efeitos dos doadores de NO sobre o crescimento, análise morfogênética, conteúdo endógeno de NO e PAs em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. Ressalta-se que a embriogênese somática desta espécie apresenta-se como um sistema modelo interessante para os estudos com NO, pois estas culturas contêm células embriogênicas e do suspensor, que diferem na sua morfologia em resposta aos diferentes compostos adicionados. Adicionalmente, a presença de um suspensor permite o desenvolvimento de estudos futuros relacionados como o metabolismo de óxido nítrico e morte celular programada (apoptose) ⁽¹⁵³⁾.

5. Conclusões

A reação entre a espécie $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e íons nitrito é dependente da concentração hidrogeniônica do meio reacional. Em pH acima de 10, o composto final formado é o $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO}_2]^+$ ($1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), que é convertido quantitativamente em pH 4 ao correspondente nitrosilo ($2,2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$). Verificou-se também, através de estudos cinéticos realizados utilizando-se um espectrofotômetro de “stopped-flow”, que esta reação em meio alcalino ocorre por duas etapas que possuem constantes de velocidades distintas, sendo a primeira etapa mais rápida que a segunda. A primeira etapa foi estudada em condições de pseudo-primeira ordem, e foi atribuída por comparação a outros sistemas à formação dos isômeros, $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO}_2]^+$ e $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{ONO}]^+$. A etapa mais lenta foi atribuída à isomerização do nitrito composto, que tem o ligante nitrito coordenado pelo oxigênio, para o nitro composto, mais estável e no qual o nitrito está ligado ao metal pelo nitrogênio.

Considerando as constantes de velocidade específica determinadas para a aquação do ligante nitrito no nitro composto, a constante mista de formação dos isômeros $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO}_2]^+$ e $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{ONO}]^+$, a constante de isomerização para a formação do nitro, e a constante de formação do nitro composto, pode-se calcular as demais. Dessa forma, estimou-se a constante específica de velocidade de formação da espécie nitro como sendo $6,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, resultado comparável aos observados para a reação do $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ com ligantes nucleofílicos, tais como SO_3^- ($k = 5,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Também foi estimada a constante de formação do nitrito complexo ($K_{\text{ONO}} \approx 8,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), a qual é inferior à determinada para a espécie nitro.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nitrosilos complexos de rutênio tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e *trans*-[Ru(NH₃)₄L(SO₄)]⁺ em diferentes modelos de câncer indicou que estes compostos são efetivos em células de leucemia humana (Jurkat) e melanoma murino (B16F10-Nex2). Os nitrosilos apresentaram valores de IC₅₀ inferiores aos observados para os correspondentes sulfatos. Os nitrosilos também foram testados em células de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7), e os resultados observados para estas células não foram tão significativos quanto aos obtidos para os demais modelos de câncer.

Experimentos *in vivo* com células B16F10-Nex2 e complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](PF₆)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](PF₆)₃ e *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₄imN]Cl indicaram que a aplicação intraperitoneal destes compostos retarda o desenvolvimento dos tumores e aumenta a sobrevivência dos camundongos. A forma de ação destes compostos ainda não é conhecida, mas experimentos sugerem que provavelmente os compostos não devem agir por mecanismo de morte celular dependente de caspases.

Efetou-se também a aplicação dos nitrosilos, SNP e [Ru(NO)Hedta], em culturas celulares embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. Os resultados observados após 21 dias de experimento indicaram que as amostras preparadas com os doadores de NO promoveram um aumento na percentagem de massa fresca em relação às amostras controle. Observou-se também que este efeito foi inibido quando PTIO, um captador de NO, foi adicionado à amostra em conjunto com os doadores de NO. Notou-se que, após os 21 dias de cultura, as amostras preparadas com os nitrosilos, sem a presença de PTIO, apresentaram maior concentração de NO, tanto intra como extracelular. A princípio acredita-se

que de alguma forma, a adição inicial de NO exógeno estimule alguma via de síntese endógena desta molécula.

As amostras preparadas com os compostos doadores apresentaram maior número de células embriogênicas em relação às amostras controle. Entretanto observou-se que este acréscimo ocorre de forma desorganizada, não sendo observada a manutenção da polaridade nas culturas embriogênicas. Como mencionado, este fator pode ser determinante para que não ocorra a evolução morfogênética quando as culturas são cultivadas com fontes exógenas de NO.

6. Referências Bibliográficas

1. 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.
2. MONCADA, S.; HIGGS, E.A.; The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S193–S201, 2006.
3. PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L.; Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.
4. SAAVEDRA, J.E.; KEEFER, L.K.; Versatile Nitric Oxide-Releasing Compounds, **Journal of Chemical Education**, v. 79, n. 12, p. 1427 – 1434, 2002.
5. ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses, **Plant Science**, v. 172, p. 876 – 887, 2007.
6. SHI, Q.; DING, F.; WANG, X.; WEI, M.; Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 542 – 550, 2007.
7. BELTRÁN, B.; QUINTERO, M.; GARCÍA-ZARAGOZÁ, E.; O'CONNOR, E.; ESPLUGUES, J.V.; MONCADA, S.; Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 13, p. 8892 – 8897, 2002.
8. BOO, Y.C.; KIM, H.J.; SONG, H.; FULTON, D.; SESSA, W.; JO, H.; Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 144 – 153, 2006.
9. YAMAMOTO, T.; BING, R.J.; Nitric Oxide Donors, **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, p. 200 – 206, 2000.

10. HYDUKE, D.R.; LIAO, J.C.; Analysis of nitric oxide donor effectiveness in resistance vessels, **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p. H2390 – H2399, 2005.
11. QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A.; Funções Biológicas do Óxido Nítrico, **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584 – 590, 1999.
12. IGNARRO, L.J.; Heart mtNOS, a key mediator of oxidative injury in ischemia/reperfusion, **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, n. 4, p. 409 – 410, 2007.
13. GHAFOURIFAR, P.; COLTON, C.A.; Mitochondria and Nitric Oxide, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 3, p. 249 – 250, 2003.
14. STUEHR, D.J.; GRIFFITH, O.W.; Mammalian Nitric Oxide Synthases, **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, v.65, p. 287, 1992.
15. 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.
16. BRYAN, N.S.; Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 691 – 701, 2006.
17. LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T.; The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics, **Nature Reviews Drug Discovery**, published online 2 January 2008. doi: 10.1038/nrd2466.
18. SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J.L.; Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 357, p. 1 – 7, 1998.
19. LI, H.; SAMOUILOV, A.; LIU, X.; ZWEIER, J.L.; Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction.

- Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues, **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 24482 – 24489, 2001.
20. MURGIA, I.; PINTO M.C.; DELLEDONNE, M.; SOAVE, C.; GARA, L.;
Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation,
programmed cell death, and cell redox state in plant cells, **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 777 – 783, 2004.
21. FRIEDERICH, J.A.; BUTTERWORTH, J.F.; Sodium Nitroprusside: Twenty
Years and Counting, **Anesthesia & Analgesia**, v. 81, p. 152 – 162, 1995.
22. TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.R.; FRANCO, D.W.; Structure,
chemical and photochemical reactivity and biological activity of some
ruthenium amine nitrosyl complexes, **Coordination Chemistry Reviews**, v.
236, p. 57 – 69, 2003.
23. TOLEDO, J.C.; SILVA, H.A.S.; SCARPELLINI, M.; MORI, V.; CAMARGO,
A.J.; BERTOTTI, M.; FRANCO, D.W.; Ruthenium Tetraammines as a
Model of Nitric Oxide Donor Compounds, **The European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 9, p. 1879 – 1885, 2004.
24. TOLEDO, J.C.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W.; Mutual effects in the
chemical properties of the ruthenium metal center and ancillary ligands
upon coordination, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 419 –
431, 2005.
25. ZANICHELLI, P.G.; ESTRELA, H.F.G.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.;
GRASSI-KASSISSE, D.M.; FRANCO, D.W.; The effects of ruthenium
tetraammine compounds on vascular smooth muscle, **Nitric Oxide**, v. 16,
n. 2, p. 189 – 196, 2007.
26. LOPES, L.G.F.; CASTELLANO, E.E.; FERREIRA, A.G.; DAVANZO, C.U.;
CLARKE, M.J.; FRANCO, D.W.; Reactivity of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]X₃
(X = PF₆⁻, CF₃COO⁻): modulation of the release of NO by the *trans*-effect,
Inorganica Chimica Acta, v. 358, p. 2883 – 2890, 2005.

27. BORGES, S.S.S.; DAVANZO, C.U.; CASTELLANO, E.E.; SCHPECTOR, J.Z.; SILVA, S.C.; FRANCO, D.W.; Ruthenium Nitrosyl Complexes with N-Heterocyclic Ligands, **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2670 – 2677, 1998.
28. GOMES, M.G.; DAVANZO, C.U.; SILVA, S.C.; LOPES, L.G.F.; SANTOS, P.S.; FRANCO, D.W.; *Cis*- and *trans*-nitrosyltetraammineruthenium(II). Spectral and electrochemical properties and reactivity, **Journal of Chemical Society, Dalton Transactions**, p. 601 – 607, 1998.
29. OSTI, R.Z.; FRANCO, D.W.; Aspects of nitrite association with *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺, **Polyhedron**, v. 26, p. 4746 – 4750, 2007.
30. TORSONI, A.S.; BARROS, B.F.; TOLEDO-JR, J.C.; HAUN, M.; KRIEGER, M.H.; TFOUNI, E.; FRANCO, D.W.; Hypotensive Properties and Acute Toxicity of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃ a New Nitric Oxide Donor, **Nitric Oxide**, v. 6, n. 3, p. 247 – 254, 2002.
31. BARROS, B.F.; TOLEDO-JR, J.C.; FRANCO, D.W.; TFOUNI, E.; KRIEGER, M.H.; A new inorganic vasodilator, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃: hypotensive effect of endothelium-dependent and -independent vasodilators in different hypertensive animals models, **Nitric Oxide**, v. 7, n. 1, p. 50 – 56, 2002.
32. SILVA, J.J.N.; OSAKABE, A.L.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.S.; FRANCO, D.W.; *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors, **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 112 – 121, 2007.
33. BOTTOMLEY, F.; Electrophilic Behavior of Coordinated Nitric Oxide, **Accounts of Chemical Research**, v. 11, p. 158 – 163, 1978.
34. IWATSUKI, M.K.; YAMAGUCHI, M.; INOUE, M.; Role of ascorbic acid in the metabolism of S-nitroso-glutathione, **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 389, p. 149 – 152, 1996.

35. HOGG, N.; SINGH, R.J.; KALYANARAMAN, B.; The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide, **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 382, p. 223 – 228, 1996.
36. ZANICHELLI, P.G.; MIOTTO, A.M.; ESTRELA, H.F.G.; SOARES, F.R.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; CASTELLANO, E.E.; RONCAROLI, F.; PARISE, A.R.; OLABE, J.A.; BRITO, A.R.M.S.; FRANCO, D.W.; The $[\text{Ru}(\text{Hedta})\text{NO}]^{0,1-}$ system: structure, chemical reactivity and biological assays, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1921 – 1932, 2004.
37. LOPES, L.G.F.; WIERASZKO, A.; EL-SHERIF, Y.; CLARKE, M.; The translabilization of nitric oxide in Ru^{II} complexes by C-bound imidazoles, **Inorganica Chimica Acta**, v. 312, p. 15 – 22, 2001.
38. ZANICHELLI, P.G.; SERNAGLIA, R.L.; FRANCO, D.W.; Immobilization of the $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{edta})\text{NO}^+]$ Ion on the Surface of Functionalized Silica Gel, **Langmuir**, v. 22, p. 203 – 208, 2006.
39. PEREIRA, J.C.M.; FRANCO, D.W.; Resultado não publicado.
40. McCLEVERTY, J.A.; Reactions of Nitric Oxide Coordinated to Transition Metals, **Chemical Reviews**, v. 79, n. 1, p. 53 – 76, 1979.
41. RONCAROLI, F.; RUGGIERO, M.E.; FRANCO, D.W.; ESTIU, G.L.; OLABE, J.A.; Kinetic, Mechanistic, and DFT Study of the Electrophilic Reactions of Nitrosyl Complexes with Hydroxide, **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 22, p. 5760 – 5769, 2002.
42. AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G.; Inflammation and cancer: How hot is the link?, **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605 – 1621, 2006.
43. KASHFI, K.; RIGAS, B.; The Mechanism Of Action Of Nitric Oxide-Donating Aspirin, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 4, p. 1096 – 1101, 2007.

44. BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O.; DNA Binding Mode Of Ruthenium Complexes And Relationship To Tumor Cell Toxicity, **Drug Resistance Updates**, v. 9, p. 111 – 122, 2006.
45. CORBI, P.P.; MASSABNI, A.C.; COSTA-NETO, C.M.; Synthesis, characterization and initial biological studies of a new platinum(II) complex with deoxyalliin, **Journal of Coordination Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 1101 – 1106, 2006.
46. VELDERS, A.H.; BERGAMO, A.; ALESSIO, E.; ZANGRANDO, E.; HAASNOOT, J.G.; CASARSA, C.; COCCHIETTO, M.; ZORZET, S.; SAVA, G.; Synthesis and Chemical-Pharmacological Characterization of the Antimetastatic Nami-A, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1110 – 1121, 2004.
47. LEBWOHL D.; CANETTA, R.; Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update, **European Journal of Cancer**, v. 34, p. 1522 – 1534, 1998.
48. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>, Acessado em Janeiro de 2008.
49. CLARKE, M.J.; Ruthenium Metallopharmaceuticals, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 209 – 233, 2003.
50. YANG, M.; PANG, R.; JIA, X.; LI, Q.; WANG, K.; Dna Interaction Of Dioxycyclobutenedione-(1,2-Cyclohexanediamine) Platinum(II) Complex With Potential Anticancer Activity, **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 376 – 382, 2005.
51. ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSCO, J.E.; MANSOUR, V.H.; Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents, **Nature**, v. 222, p. 385 – 386, 1969.
52. <http://www.fda.gov> acessado em janeiro de 2008.
53. SCHWIETERT, C.W.; McCUE, J.P.; Coordination compounds in medicinal chemistry, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 184, p. 67 – 89, 1999.

54. KELLAND, L.; The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, **Nature Reviews**, v. 7, p. 573 – 584, 2007.
55. STORDAL, B.; PAVLAKIS, N.; DAVEY, R.; Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: A systematic review, **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, p. 347 – 357, 2007.
56. LEBWOHL, D.; CANETTA, R.; Clinical Development of Platinum Complexes in Câncer Therapy: an Historical Perspective and an Update, **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 10, p. 1522 – 1534, 1998.
57. MAZUMDER, U.K.; GUPTA, M.; KARKI, S.S.; BHATTACHARYA, S.; RATHINASAMY, S.; SIVAKUMAR, T.; Synthesis and pharmacological activities of some mononuclear Ru(II) complexes, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5766 – 5773, 2005.
58. GUICHARD, S.M.; ELSE, R.; REID, E.; ZEITLIN, B.; AIRD, R.; MUIR, M.; DODDS, M.; FIEBIG, H.; SADLER, P.J.; JODRELL, D.I.; Anti-tumour activity in non-small cell lung cancer models and toxicity profiles for novel ruthenium(II) based organo-metallic compounds, **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 408 – 415, 2006.
59. BERGAMO, A.; SAVA, G.; Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy, **Journal of Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 13, p. 1267 – 1272, 2007.
60. BRASTOS, I.; JEDNER, S.; GIANFERRARA, T.; ALESSIO, E.; Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations, **Chimia**, v. 61, n. 11, p. 692 – 697, 2007.
61. ROVER-JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T.; Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathiona Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo, **Química Nova**, v. 24, p. 112 – 119, 2001.
62. BROWN, J.M.; A Target for Selective Cancer Therapy, **Cancer Research**, v. 59, p. 5863 – 5870, 1999.

63. FRASCA, D.; CIAMPA, J.; EMERSON, J.; UMANS, R.S.; CLARKE, M.J.; Effects of Hypoxia and Transferrin on Toxicity and DNA Binding of Ruthenium Antitumor Agents in Hela Cells, **Metal-Based Drugs**, v. 3, p. 197 – 209, 1996.
64. 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.
65. PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L.; Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.
66. LALA, P.K.; CHAKRABORTY, C.; Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression, **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 149 – 156, 2001.
67. WINK, D.A.; MITCHELL, J.B.; Nitric Oxide and Cancer: An Introduction, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 8, p. 951 – 954, 2003.
68. BONAVIDA, B.; KHINECHE, S.; YEPEZ, S.H.; Garbán, H.; Therapeutic potential of nitric oxide in cancer, **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 3, p. 157 – 173, 2006.
69. FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K.; The role of nitric oxide in tumour Progression, **Nature Reviews, Cancer**, v. 6, 521 – 534, 2006.
70. GATTIA, G.; SIMSEKA, S.; ZURRIDA, S.; KURNEC, A.; GIANNETTI, I.; DEMIRERD, S.; SMEETSA, A.; CALDARELLA, P.; VENTO, A.R.; GIRALDOF, A.; LUINI, A.; Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature, **The Breast**, v. 13, p. 1 – 6, 2004.
71. XU, W.; LIU, L.Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I.G.; The role of nitric oxide in cancer, **Cell Research**, v. 12, p. 311 – 320, 2002.
72. KOPPENOL, W.H.; The Chemistry of Peroxynitrite, a Biological Toxin, **Química Nova**, v. 21, p. 326 – 331, 1998.

73. KOPPENOL, W.H.; The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, p. 385 – 391, 1998.
74. QU, Y.; FENG, H.; WANG, Y.; ZHANG, M.; CHENG, J.; WANG, X.; NA, L.; Nitric oxide functions as a signal in ultraviolet-B induced inhibition of pea stems elongation, **Plant Science**, v. 170, p. 994 – 1000, 2006.
75. WILDT, J.; KLEY, D.; ROCKEL, A.; ROCKEL, P.; SEGSCHEIDER, H.J.; Emission of NO from several higher plant species, **Journal of Geophysical Research**, v. 102, p. 5919 – 5927, 1997.
76. DELLEDONNE, M.; XIA, Y.J.; DIXON, R.A.; LAMB, C.; Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, **Nature**, v. 394, p. 585–588, 1998.
77. DURNER, J.; KLESSIG, D.F.; Nitric oxide as a signal in plants, **Current Opinion in Plant Biology**, 2:369–374, 1999.
78. GOULD, K.S.; LAMOTTE, O.; KLINGUER, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D.; Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 1851 – 1862, 2003.
79. MACKERNESS, S.A.H.; JOHN, C.F.; JORDAN, B.; THOMAS, B.; Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide, **FEBS Letters**, v. 489, p. 237 – 242, 2001.
80. MATA, C.G.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, **Plant Physiology**, v. 126, p. 1196 – 1204, 2001.
81. BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants, **Planta**, v. 210, p. 215 – 221, 2000.
82. LESHEM, Y.Y.; PINCHASOV, Y.; Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria anannasa* (Duch.)

- and avocados *Persea americana* (Mill.), **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1471 – 1473, 2000.
83. SEREGÉLYES, C.; BARNA, B.; HENNIG, J.; KONOPKA, D.; PASTERNAK, T.P.; LUKÁCS, N.; FEHÉR, A.; HORVÁTH, G.V.; DUDITS, D.; Phytoglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. **Plant Science**, v. 165, p. 541 – 550, 2003.
 84. ZHANG, M.; AN, L.; FENG, H.; CHEN, T.; CHEN, K.; LIU, Y.; TANG, H.; CHANG, J.; WANG, X.; The cascade mechanisms of nitric oxide as a second messenger of ultraviolet B in inhibiting mesocotyl elongations, **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, p. 219 – 225, 2003.
 85. LESHEM, Y.Y.; HARAMATY, E.; The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage, **Journal of Plant Physiology**, v. 148, p. 258 – 263, 1996.
 86. CLARKE, A.; DESIKAN, R.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J.; NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures, **Plant Journal**, v. 24, p. 667 – 677, 2000.
 87. CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato, **Planta**, v. 218, p. 900 – 905, 2004.
 88. CARVALHO, P.G.; AIDAR, M.P.M.; ZAIDAN, L.B.P.; CARVALHO, M.A.M.; Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas a diferentes fontes de nitrogênio, **Hoehnea**, v. 33, n. 1, p. 89 – 97, 2006.
 89. GUO, F.-Q.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N.M.; Identification of a Plant Nitric Oxide Synthase Gene Involved in Hormonal Signaling, **Science**, v. 302, p. 100 – 103, 2003.

90. GUO, F.-Q.; CRAWFORD, N.M.; Arabidopsis Nitric Oxide Synthase1 Is Targeted to Mitochondria and Protects against Oxidative Damage and Dark-Induced Senescence, **The Plant Cell**, v. 17, p. 3436 – 3450, 2005.
91. IGAMBERDIEV, A.U.; HILL, R.D.; Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways, **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2473 – 2482, 2004.
92. GUO, F.-Q.; CRAWFORD, N.M.; New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions, **TRENDS in Plant Science**, v. 10, n. 4, p. 195 – 200, 2005.
93. YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species, **FEBS Letters**, v. 468, p. 89 – 92, 2000.
94. PEUNOVA, N.; KUZIN, B.; ROBERTS, I.; OKANE, C.; ENIKOLOPOV, G.; Nitric oxide, cell multiplication, and cell survival, **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v. 61, p. 417 – 426, 1996.
95. PAGNUSSAT, G.C.; LANTERI, M.L.; LOMBARDO, M.C.; LAMATTINA, L.; Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development, **Plant Physiology**, v. 135, p. 279 – 286, 2004.
96. TUN, N.N.; HOLK, A.; SCHERER, G.F.E.; Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin, **FEBS Letters**, v. 509, p. 174 – 176, 2001.
97. ÖTVÖS, K.; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZÜCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHÉR, A.; Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures, **Plant Journal**, v. 43, p. 849 – 860, 2005.

98. MINOCHA, R.; DALE, R.S.; CATHIE, R.; STEELE, K.D.; MINOCHA, S.C.;
Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos
of *Pinus radiata*, **Physiol Plant**, v. 105, p. 155 – 164, 1999.
99. KAKKAR, R.K.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S.; RAI, V.K.; Polyamines and plant
morphogenesis, **Physiol Plant**, v. 43, p 1 – 11, 2000.
100. SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P.; Effect of plant
growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein,
starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*,
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 69, p. 233 – 249, 2004.
101. SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.;
FLOH, E.I.S.; SERK gene homolog expression, polyamines and amino
acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea*
catharinensis Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.
79, p. 53 – 61, 2004.
102. TUN, N.N.; SANTA-CATARINA, C.; BEGUM, T.; SILVEIRA, V.; HANDRO,
W.; FLOH, E.I.S.; SCHERER, G.F.E.; Polyamines induce rapid biosynthesis
of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings, **Plant Cell**
Physiology, v. 47, p. 346 – 354, 2006.
103. SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N.N.; SCHERER, G.F.E.;
HANDRO, W.; GUERRA, M.P.; Floh, E.I.S.; Polyamine effects on the
endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and
differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Ktze., **Plant Science**, v. 171, p. 91 – 98, 2006.
104. STEINER, N. **Parâmetros Fisiológicos e Bioquímicos durante a**
Embriogênese Zigótica e Somática de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O.
Kuntze. Florianópolis, 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade
Federal de Santa Catarina.

105. SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; VIANA, A.M.; ESTELITA, M.E.M.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*, **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 237 – 247, 2006.
106. TAUTHORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I.; Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873 – 1899, 1991.
107. STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P.; Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 55 – 62, 2007.
108. VIANA, A.M.; MAZZA, M.C.; MANTELL, S.H.; Plant Conservation Biotechnology: Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian rain forest. In: Benson E. Plant conservation and biotechnology. Dundee: University of Abertay, p. 277 – 299, 1999.
109. JAIN, S.M.; ISHII, K.; Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: Mantell SH, Bruns S, Tragardh C, Viana AM. Recent advances in biotechnology for conservation and management, v.5., Stockholm:International Foundation for Science; p.214 – 231, 1999.
110. BONNER C.A.; JENSEN R.A.; Recognition of specific patterns of amino acid inhibition of growth in higher plants, uncomplicated by glutamine-reversible 'general amino acid inhibition, **Plant Science**, v. 130, p. 133 – 143, 1997.
111. KEVERS, C.; NATHALIE, L.G.; MONTEIRO, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T.; Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways, **Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 209 – 214, 2000.
112. KROGSTROP, P.; Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*, **Plant Science**, v. 72, p. 115 – 123, 1990.

113. GREY, D.; SARKISSIAN, G.S.; FOWLER, M.W.; Biochemistry of forest tree species in culture, In: J.M. Bonga e D.J. Durzan (eds.), **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, v. 2, p. 31 – 60, n. 129, 1987.
114. GEORGE, E.F.; **Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology**, Exegetics Limited, Edington. v. 1, n. 574, p. 130, 1993.
115. LULSDORF, M.M.; TAUORUS, T.E.; KIKCIO, S.I.; DUNSTAN, D.I.; Growth parameters of embryogenic suspension culture of Interior spruce (*Picea glauca–engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.), **Plant Science**, v. 82, n. 131, p. 227 – 234, 1992.
116. J.N. Armor, Tese (Doutorado) – Stanford University, 1976.
117. GLEU, K.; BREUEL, W.; REHM, K.Z.; Sulfito-Ammine des zweiwertigen Rutheniums Tetrammino-Reihe (Ruthen-Ammine. II.), **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie**, v. 235, p. 201 – 208, 1938.
118. VOGT, L. H.; KATZ, J. L.; WIBERLEY, S. E.; The Crystal and Molecular Structure of Ruthenium-Sulfur Dioxide Coordination Compounds. I. Chlorotetraammine(sulfur dioxide)ruthenium (II) Chloride, **Inorganic Chemistry**, v. 4, p. 1157 – 1163, 1965.
119. FRANCO, D.W.; TAUBE, H. Triethyl Phosphite as a Ligand on Ruthenium (II). **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 571 – 578, 1978.
120. Bajaj, H.C.; van Eldik, R.; Kinetics and mechanism of the ligand substitution reactions of ethylenediaminetetraacetate complexes of ruthenium(III) in aqueous solution, **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 4052 – 4055, 1988.
121. SILVA, H.A.S.; MCGARVEY, B.R.; SANTOS, R.H.A.; BERTOTTI, M.; MORI, V.; FRANCO, D.W.; Sulfate as a Ligand in Ruthenium (II) and (III) Ammines. **Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie**, v. 79, n. 5/6, p. 679 – 687, 2001.

122. LOPEZ, L. G. F. **Controle da Reatividade do Ligante NO Coordenado ao Trans-Tetraaminotrietilfosfitonitrosilrutênio(II)**. São Carlos, 1997. 93 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
123. OSTI, R.Z. **Sobre a Reação entre a espécie *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ e Íons Nitrito**. São Carlos, 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 89
124. CARLOS, R.M.; CARDOSO, D.R.; CASTELLANO, E.E.; OSTI, R.Z.; CAMARGO, A.J.; MACEDO, L.G.; FRANCO, D.W.; Reactivity of Radicals Generated on Irradiation of *trans*-[Ru(NH₃)₄(NO₂)P(OEt)₃](PF₆), **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 2546 – 2555, 2004.
125. DIAMANTIS, A.A.; DUBRAWISKI, J.V.; Preparation and structure of ethylenediaminetetraacetate complexes of ruthenium(II) with dinitrogen, carbon monoxide, and other π -acceptor ligands, **Inorganic Chemistry**, v. 20, p. 1142 – 1150, 1981.
126. FIDLER, I.J.; Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival *inVivo*, **Cancer Research**, v. 35, p. 218 – 224, 1975.
127. MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.
128. GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.S.;. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. US patent., v. 5, p. 036 – 007, 1991. 91
129. KOJIMA, H.; HIROTANI, M.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; URANO, Y.; HIGUCHI, T.; HIRATA, Y.; NAGANO, T.; Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on the Rhodamine Chromophore, **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1967 – 1973, 2001.

130. RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A.; A new procedure to asses pollen viability, **Sex Plant Reproduction**, v.12, p. 241 – 244, 2000
131. FRANCO , D.W.; Synthesis of Phosphite Complexes of Ruthenium(II), **Inorganica Chimica Acta**, v. 32, p. 273 – 277, 1979.
132. FRANCO, D.W.; The Aquation and *Trans*-Influence of Phosphites in Complexes of Ruthenium(II), **Inorganica Chimica Acta**, v. 48, p. 1 – 7, 1981.
133. NASCIMENTO-FILHO, J.C.; FRANCO, D.W.; Isonicotinamide as Entering Ligand on *trans*-[Ru(NH₃)₄(OR)₃(H₂O)]²⁺, (R = Me, Pr, ⁱPr and Bu), **Inorganica Chimica Acta**, v. 113, p. 55 – 60, 1986.
134. REZENDE, N.M.S.; MARTINS, S.C.; MARINHO, L.A.; SANTOS, J.A.V.; TABAK, M.; PERUSSI, J.R.; FRANCO, D.W.; Triethyl phosphite as a ligand on Ru(III). Synthesis, characterization and properties of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(H₂O)](CF₃SO₃)₃, **Inorganica Chimica Acta**, v. 182, p. 87 – 92, 1991.
135. MAZZETTO, S.E.; RODRIGUES, E.; FRANCO, D.W.; Synthesis, Characterization and Reactivity of *trans*-[Ru(NH₃)₄{P(OEt)₃}₂]³⁺ Ions, **Polyhedron**, v. 12, p. 971 – 975, 1993.
136. FRANCO, D.W.; Ruthenium Ammine Complexes of Group VB Donor Ligands, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 119, p. 119 – 225, 1992.
137. ALMARAZ, A.E.; GENTIL, L.A.; OLABE, J.A.; Kinetics of Formation, Dissociation, and Isomerization Reactions in Complexes of Cyanopyridines and Benzonitrile with Pentacyanoruthenate(II). **Journal of Chemical Society, Dalton Transcription**, p. 1973-1977, 1989.
138. BOZOGLIÁN, F.; QUEIROLO, M.; SIENRA, B.; Spontaneous and Base-catalyzed Nitrito to Nitro Linkage Isomerization of *Trans*-[Co(NH₃)₄(NH₂CH₃)ONO]²⁺ Complex. **Polyhedron**, v.17, n.20, p. 3551-3556, 1998.

139. CHEVALIER, A.A.; GENTIL, L.A.; OLABE, J.A. Nitrosyl-Nitrite Interconversion in Pentacyanoruthenate(II) Complexes. **Journal of Chemical Society, Dalton Transaction**, p. 1959-1963, 1991.
140. SAMOUILOV, A.; WOLDMAN, Y.Y.; ZWEIER, J.L.; KHRAMTSOV, V.V.; Magnetic resonance study of the transmembrane nitrite diffusion, **Nitric Oxide**, v. 16, p. 362 – 370, 2007.
141. SOUZA, D.R.C. **Aproveitamento Analítico da Oxidação Catalítica de Íons Iodeto por Ácido Nitroso**. São Carlos, 2000. 73 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.
142. ZANICHELLI, P.G.; ESTRELA, H.F.G.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; FRANCO, D.W.; Resultado não publicado.
143. Torsoni, A.S.; Efeito hipotensor e estudos toxicológicos do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃, Dissertação de Mestrado, Unicamp, 1999. 137.
144. GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R.; Melanoma biology and new targeted therapy, **Nature**, v. 445, p. 851 – 857, 2007.
145. Neil Hogg, Ravinder J. Singh, B. Kalyanaraman, The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide, **FEBS Letters**, v. 382, p. 223 – 228, 1996.
146. OLIVEIRA-FILHO, J.R.; SILVA, W.C.; PEREIRA, J.C.M.; FRANCO, D.W.; Binding of cysteine and glutathione to Ru(II) and Ru(III) centers, **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 2888 – 2895, 2006.
147. FRASCA, D.R.; GEHRIG, L.E.; CLARKE, M.J.; **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 83, p. 139 – 149, 2001.
148. RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; VAN DEN BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M.; A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-*trans*-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent, **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 3717 – 3727, 2004.

149. STUEHR, D.J.; GRIFFITH, O.W.; **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, v.65, p. 287, 1992.
150. Krishnamoorthy, S.; Honn, K.V.; Inflammation and disease progression, **Cancer Metastasis Reviews**, v. 25, p. 481 – 491, 2006.
151. BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J.; Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, p. 103 – 125, 1999.
152. Bauer, P.M.; Buga, G.M.; Fukuto, J.M.; Pegg, A.E.; Ignarro, L.J., Nitric Oxide Inhibits Ornithine Decarboxylase via S-Nitrosylation of Cysteine 360 in the Active Site of the Enzyme, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34458 – 34464, 2001.
153. LI, C.Q.; WOGAN, G.N.; Nitric oxide as a modulator of apoptosis, **Cancer Letters**, v. 226, p. 1 – 15, 2005.

Anexo A**Composição do meio RPMI-1640**

Aminoácidos	mg.l⁻¹
L-Arginina HCl	200
L-Asparagina	50
L-Ácido Aspártico	20
L-Cistina 2HCl	65,15
L-Ácido Glutâmico	20
L-Glutamina	300
Glicina	10
L-Histidina	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-Lisina HCl	40
L-metionina	15
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	20
L-Serina	30
L-Treonina	20
L-Triptofano	5
L-Tirosina 2Na.2H ₂ O	28,83
L-Valina	20
SAIS INORGÂNICOS	mg.l⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100
KCl	400
MgSO ₄ (anidro)	48,84
NaCl	6.000
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	800
VITAMINAS	mg.l⁻¹
d-Biotina	0,2
D-Ca Pantotenato	0,25
Cloreto de Colina	3
Ácido Fólico	1
Mio-Inositol	35
Niacinamida	1

Piridoxina HCl	1
Riboflavina	0,2
Tiamina HCl	1
Vitamina B12	0,005
OUTROS COMPONENTES	mg.l⁻¹
D-glicose	2.000
Ácido para-Aminoenzólico (PABA)	1
Glutathiona (reduzida)	1
Vermelho de fenol (sódio)	5,3
NaHCO ₃	2.000
HEPES	5,95

Anexo B**Meio de Cultura BM.**

Tipo de Solução	Constituinte	Concentração (mg.l⁻¹)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	150
	KNO ₃	909,9
	KH ₂ PO ₄	136,1
	CaCl ₂ .2H ₂ O	40
	MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5
	Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	256,5
	MgCl ₂ .6H ₂ O	50
Solução N	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,2
Solução Ferro (MS)	Na ₂ EDTA	18,65
	FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9
Micronutrientes	ZnSO ₄ .7H ₂ O	14,4
	H ₂ BO ₃	15,5
	KI	4,15
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,125
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,125
	MnSO ₄ .H ₂ O	7,957
Vitaminas	Tiamina HCl	1
	Piridoxina HCl	0,5
	Ac. Nicotínico	0,5
	Glicina	2
Outros	Caseína Hidrolisada	500
	L-Glutamina	1000
	Mio Inositol	100
	Sacarose/maltose	30000
	Phytigel®	2000

pH = 5,70.