

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**

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

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

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientada: Renata Bortoleto da Silveira

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

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

Ribeirão Preto

2018

## RESUMO

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

O óxido nítrico (NO) é biossintetizado em diferentes células do organismo animal, relacionando-se com inúmeros processos fisiológicos. Existe, aparentemente, uma relação entre os efeitos mediados pelo NO e o microambiente celular. Desta forma, a resposta observada depende da localização da molécula radicalar, da duração da exposição e da sua concentração. Assim, observa-se um efeito antagônico do NO no que tange a biologia de tumores, admitindo-se que baixas concentrações de NO estimulam a proliferação de células tumorais e altas concentrações propiciam a atividade tumoricida. Nesse sentido, o presente trabalho visou ao desenvolvimento de um novo complexo de rutênio doador de óxido nítrico coordenado ao ligante fluorescente Alaranjado de Acridina. A coordenação do rutênio ao ligante heterocíclico de nitrogênio permitiu a obtenção do composto fluorescente  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})(\text{AO})_2\text{NO}](\text{PF}_6)_2$ , em que bpy = 2,2'-bipiridina e AO = Alaranjado de Acridina. O complexo foi caracterizado por UV-vis, FITR e espectrometria de massas. Experimentos fotoquímicos revelaram que o complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})(\text{AO})_2\text{NO}](\text{PF}_6)_2$  apresentou um valor de rendimento quântico de fluorescência em etanol inferior ao do ligante livre. No entanto, o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete em água foi maior em relação ao Alaranjado de Acridina. Avaliações de fotoestabilidade por espectroscopia de emissão e absorção no UV-vis demonstraram que  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})(\text{AO})_2\text{NO}](\text{PF}_6)_2$  é mais fotoestável nas condições avaliadas e a fluorescência apresenta menor redução, quando irradiado em 470 nm comparado ao Alaranjado de Acridina. Ensaios de avaliação do potencial citotóxico dos compostos com irradiação em 470 nm, na dose de  $5 \text{ J cm}^{-2}$ , demonstraram que o corante Alaranjado de Acridina apresenta maior citotoxicidade frente à linhagem celular tumoral metastática estudada (B16/F10). Isso se relaciona, possivelmente, ao fato de o Alaranjado de Acridina livre direcionar-se para o núcleo e promover intercalação com os pares de base do DNA. A avaliação por microscopia de fluorescência revelou a predileção do complexo  $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})(\text{AO})_2\text{NO}](\text{PF}_6)$  pelo núcleo. Os dados obtidos enfatizam a importância do grupo ligante para a localização do complexo, bem como para a atividade antitumoral do mesmo.

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

# Introdução

## 1.1 Introdução

### 1.1 Fluoróforos como ferramentas para sublocalização celular de compostos antitumorais

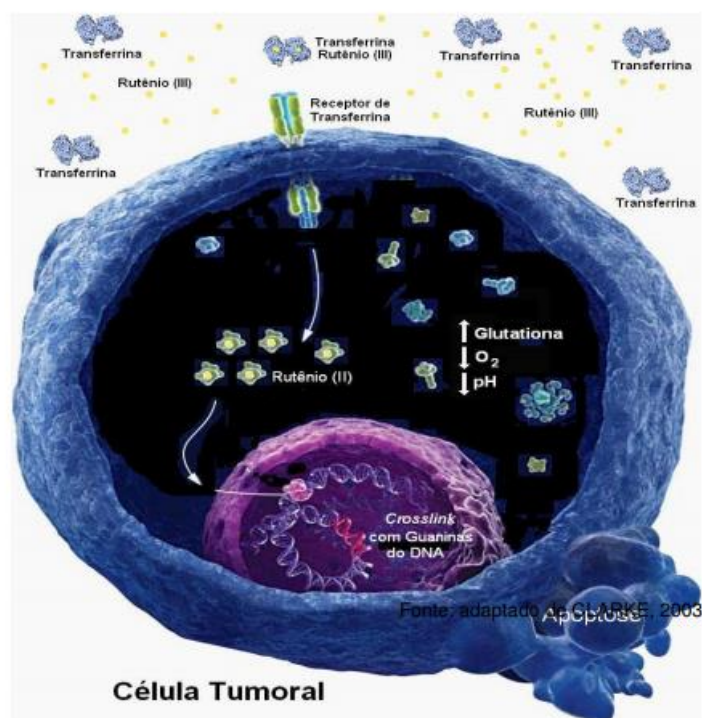
Atualmente, compostos baseados em rutênio vêm ganhando destaque e apresentando boas perspectivas de aplicação clínica. Um exemplo disso é o NAMI-A, complexo que se encontra em triagem clínica de fase II. Conquanto seja notória sua eficácia em processos metastáticos, o NAMI-A, a princípio, não demonstrou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

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

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

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

Figura 1 – Mecanismo de ação de compostos de rutênio



Fonte: CLARKE et al., 2003.

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

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

## **Considerações Finais**

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

Como perspectivas futuras, poderão ser realizados outros estudos no sentido de complementar os dados já obtidos. Dentre os quais destacam-se a determinação do rendimento quântico de óxido nítrico para o complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(AO)<sub>2</sub>(bpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, realização do estudo de interação com DNA, realização de estudos de tempo de vida, estudos cinéticos e de vias metabólicas envolvidas na morte celular, realização de estudos de microscopia de fluorescência variando a concentração e o tempo de incubação para complexo e AO, a fim de acompanhar o processo de internalização destes compostos, além de explorar o potencial citotóxico dos precursores elucidados neste trabalho.

## **Referências**



## 9 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ASSEFA, Z.; STANBURY, D. M. Oxidation of coordinated ammonia to nitrosyl in the reaction of aqueous chlorine with cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>]<sub>2</sub><sup>2+</sup>. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, p. 521-530, 1997.

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

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

BATISTA, A. A.; PEREIRA, C.; QUEIROZ, S. L.; DE OLIVEIRA, L. A. A.; SANTOS, R. H. D.; GAMBARDELLA, M. T. D. Nitrosyl ruthenium complexes with general formula  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{P-P})]$  ( $\text{P-P}=\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}$ ,  $n=1-3$  and  $\{\text{PPh}_2\text{-CH=CH-PPh}_2\}$ ). X-ray structure of  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2\}]$ . **Polyhedron**, v. 16, p. 927-931, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GIORGIO A.; RAMBALDI, M.; MACCARIO, P.; AMBROSONE, L.; MOLES, D. A. Detection of microorganisms in clinical specimens using slides prestained with acridine orange (AOS). **Microbiologica**, v.12, p. 97-100, 1989.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. The preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v.10, n.3, p.471-74, 1971.

GOGAS, H. J.; KIRKWOOD, J.M.; SONDAK, V.K.; Chemotherapy for methastatic melanoma. Time for a change? **American Cancer Society**, Athens, (Greece), v. 109, n. 3, p. 455-464, 2007.

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

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

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

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

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

IARC, Cancer, Disponível em:  
<[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> Acesso em: 13 set. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RAAB O. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Zeitschrift Fur Biologie**, v. 39, p. 524-536, 1900.

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W. **Química Inorgânica**. 3<sup>o</sup> edição. São Paulo (BRA): Bookman, p. 255-265, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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