



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS**

**Instituto de Química
Departamento de Físico-Química**

Dissertação de Mestrado



**DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA E FOTOQUÍMICA DA
S-NITROSOGLUTATIONA COM LIBERAÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO (NO[•]): EFEITO DA MATRIZ DE POLI(ETILENO
GLICOL)/ÁGUA E DOS ÍONS Cu²⁺**

Autora: Amedea Barozzi Seabra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Campinas

Fevereiro de 2001.



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcelo pela orientação, pela atenção dedicada durante o trabalho, pela consideração e paciência.

À Mika, minha amiga especial, pela colaboração e atenção, e acima de tudo, pela amizade .

Ao pessoal do laboratório: Priscilla, Rodrigo, Luiz, Josias, Vascão, Marcão, Gaúcho, Eduardo, Nara, Ritinha, Melissa, Karol, Pilha, Juliana e Amarildo.

Aos professores Watson Loh e Edvaldo Sabadini.

Ao Prof. Munir Salomão Skaf pela ajuda quando entrei na Unicamp.

Ao Prof. Nelson Morgon pelas discussões e cálculos teóricos da S-nitrosoglutationa.

Ao Prof. Marco Aurélio De Paoli pelo empréstimo do radiômetro.

À todos os funcionários do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Bel e André da secretaria de pós graduação, e ao Nelson da biblioteca.

À CAPES pelo suporte financeiro.

A Perfeição

**O que me tranqüiliza
é que tudo o que existe,
existe com uma precisão absoluta.**

**O que for do tamanho de uma cabeça de
alfinete
não transborda nem uma fração de
milímetro
além do tamanho de uma cabeça de
alfinete.**

**Tudo o que existe é de uma grande
exatidão.
Pena é que a maior parte do que existe
com essa exatidão
nos é tecnicamente invisível.**

**O bom é que a verdade chega a nós
como um sentido secreto das coisas.**

**Nós terminamos adivinhando, confusos,
a perfeição.**

**Clarice Lispector
e
Antônio Damázio**

“Nenhum vento sopra a favor de quem não sabe para onde ir.”

Sêneca

“Não me falem de experiência enquanto ainda pretendo errar um pouco.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Título: DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA E FOTOQUÍMICA DA S-NITROSOGLUTATIONA COM LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO[•]): EFEITO DA MATRIZ DE POLI (ETILENO GLICOL)/ÁGUA E DOS ÍONS Cu²⁺

Autora: Amedea Barozzi Seabra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Departamento de Físico-Química- Instituto de Química- UNICAMP.

Palavras chave: óxido nítrico, S-nitrosoglutationa, poli(etileno glicol), fotoquímica

A molécula de óxido nítrico (NO[•]) está envolvida em processos fisiológicos fundamentais, como a modulação da neurotransmissão, as reações imunológicas, a vasodilatação e a inibição da agregação plaquetária. Devido à alta reatividade do NO[•] livre *in vivo*, foi sugerido que tióis atuam como carregadores e liberadores de NO[•], estabilizando-o; entre eles a S-nitrosoglutationa (GSNO), que é biologicamente ativa e mais estável que o próprio NO[•]. Nesse trabalho a GSNO foi sintetizada através da S-nitrosação da glutatona (GSH). A liberação térmica e fotoquímica de NO[•] a partir da GSNO foi monitorada em solução aquosa e em matriz de poli(etileno glicol)/água (PEG/H₂O), através das variações espectrais na região do UV/vis. A matriz de PEG/H₂O levou a uma redução nas velocidades iniciais de decomposição térmica e fotoquímica da GSNO em relação às soluções aquosas. Em irradiações com $\lambda = 333$ nm observou-se uma redução do rendimento quântico de fotodecomposição da GSNO de $\phi = 0,80 \pm 0,01$ em solução aquosa, para $\phi = 0,30 \pm 0,01$, em matriz de PEG/H₂O. Esses resultados foram atribuídos ao efeito gaiola da matriz de PEG/H₂O que ocasiona um aumento da taxa de recombinação dos pares de radicais geminados formados nos processos de quebra homolítica da ligação S-N, em relação à água. Esses resultados indicam que a matriz de PEG/H₂O pode ser usada no controle da liberação térmica e fotoquímica de NO[•], a partir da GSNO. Verificou-se que a adição de íons Cu²⁺ catalisa a oxidação aeróbica tanto da GSH como da GSNO em glutatona oxidada (GSSG), envolvendo um mecanismo de oxidação-redução dos íons Cu²⁺, evidenciado espectroscopicamente pela formação do complexo Cu⁺-neocuproína. Estudos cinéticos mostraram que a reação de oxidação da GSH pelos íons Cu²⁺ é de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes e que a extensão dessa reação é limitada pela formação do complexo [GSSG-Cu]²⁺. O papel dos íons Cu²⁺ na decomposição térmica da GSNO está de acordo com um mecanismo que envolve a quebra heterolítica da ligação S-N, seguida da redução dos íons Cu²⁺ pelo ânion GS⁻. Esses resultados ilustraram a importância da mediação de íons Cu²⁺ na liberação de NO[•] a partir da GSNO e nos processos de oxidação de tióis.

ABSTRACT

Title: THERMAL AND PHOTOCHEMICAL DECOMPOSITION OF S-NITROSOGLUTATHIONE WITH NITRIC OXIDE (NO[•]) RELEASE: EFFECT OF POLY(ETHYLENE GLYCOL) MATRIX AND Cu²⁺ IONS.

Author: Amedea Barozzi Seabra

Advisor: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Departamento de Físico-Química – Instituto de Química – UNICAMP

Key words: nitric oxide, S-nitrosoglutathione, poly(ethylene glycol), photochemistry.

The nitric oxide molecule (NO[•]) is involved in important physiologic processes, such as the modulation of neurotransmission, immunological reactions, vasodilatation and the inhibition of platelet aggregation. Due to the high reactivity of free NO[•] *in vivo*, it was suggested that NO[•] is stabilized by reduced thiols species, such as S-nitrosoglutathione (GSNO), a carrier molecule that prolongs the half-life of NO[•] *in vivo* and also preserves its biological activity. In this work, GSNO was synthesized by the direct S-nitrosation reaction of glutathione (GSH). The thermal and photochemical decomposition of GSNO, in aqueous and in poly(ethylene glycol)/water (PEG/H₂O) matrix, with consequent NO[•] release, was kinetically monitored by the changes in the absorption bands of GSNO in the UV/vis region. The PEG/H₂O matrix was responsible for a reduction in the initial rates of thermal and photochemical GSNO decomposition, relative to the aqueous solution. Under irradiation with $\lambda = 333$ nm it was observed a decrease of the quantum yield of photodecomposition of GSNO from $\phi = 0,80 \pm 0,01$ in aqueous solution to $\phi = 0,30 \pm 0,01$ in PEG/H₂O matrix. This increased stability of GSNO incorporated in PEG/H₂O matrix was assigned to the cage effect promoted by the PEG microenvironment that increases the rate of geminate radical pair recombination in the homolytic S-N bond cleavage process. These results suggest that the PEG/H₂O matrix could be used as a potential controller for the delivery of NO[•] from GSNO. It was also verified that the addition of Cu²⁺ ions catalyses the aerobic oxidation of GSH and GSNO to oxidized glutathione (GSSG), and involves an oxidation-reduction process of the Cu²⁺ ions, which was characterized spectroscopically by the formation of Cu⁺ - neocuproine complex. Kinetic studies showed that the oxidation reaction of GSH by Cu²⁺ ions is first order with respect to each component, and that the reaction extension is limited by the formation of the complex [GSSG-Cu]²⁺. The role of Cu²⁺ ions in the thermal decomposition of GSNO is in accordance with a mechanism which involves the heterolytic cleavage of the S-N bond, followed by the Cu²⁺ reduction by the GS⁻ anion. These results illustrate the importance of copper ions mediation in the NO[•] release from GSNO and in the oxidation processes of thiols.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Amedea Barozzi Seabra

Nacionalidade: Brasileira

Data de nascimento: 13 de dezembro de 1975, Campinas-SP

Endereço: Rua Antônio Cesarino, 745 apto. 102- Campinas-SP

CEP: 13015-291

e-mail: amedeaa@iqm.unicamp.br

FORMAÇÃO:

1º Grau

Externato Madre Cecília- Campinas- SP

Conclusão: 1990.

2º Grau

Colégio de Aplicação Pio XII- Campinas-SP

Conclusão: 1993.

Graduação

Universidade de São Paulo- FFCLRP- Ribeirão Preto- SP

Curso: Bacharelado em Química

Conclusão: 1998.

Pós-Graduação

Mestrado

Departamento de Físico-Química- IQ- UNICAMP

Projeto: "Decomposição térmica e fotoquímica da S-nitrosoglutationa com liberação de óxido nítrico (NO^{*}): efeito da matriz de poli(etileno glicol)/água e dos íons Cu²⁺".

Bolsa concedida pela CAPES

Período: março de 1999 a fevereiro de 2001.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

ATIVIDADES CIENTÍFICAS

1-Iniciação Científica

Laboratório de Fotoquímica Orgânica- FFCLRP- USP

Projeto: "Uso de microesferas biodegradáveis com agentes carregadores de drogas ativas na Terapia Fotodinâmica".

Bolsa concedida pelo: PIBIC.

Período: agosto de 1996 a setembro de 1998.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco.

2- Participação em reuniões científicas

1. Seabra, A.B., Bonilha, J.B.S. e Tedesco, A.C., "Uso de microesferas biodegradáveis com agentes carregadores de drogas ativas na Terapia Fotodinâmica". Anais do VI Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, outubro/novembro de 1998.
2. Seabra, A.B., Shishido, S.M. e de Oliveira, M.G., "Photochemical and thermal release of nitric oxide from aqueous S-nitrosoglutathione solutions". Anais do VI Encontro Latino-Americano de Fotoquímica e Fotobiologia, Teresópolis, RJ, setembro de 1999.
3. Seabra, A.B., Shishido, S.M. e de Oliveira, M.G., " Liberação fotoquímica de óxido nítrico a partir da S-nitrosoglutathione em solução aquosa e em poli(etileno glicol)". Anais da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, maio de 2000.
4. Shishido, S.M., Seabra, A.B., e de Oliveira, M.G., "Chemical and photochemical modulation of the nitric oxide release from S-nitrosothiols". Proceedings, First International Conference: Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, São Francisco, CA, EUA, julho de 2000.
5. de Oliveira, M.G., Shishido, S.M. e Seabra, A.B., "Effect of poly(ethylene glycol) matrices on the photochemical release of nitric oxide donors" a ser apresentado na: The Twelfth Conference of the Inter-American Photochemical Society, Córdoba, Argentina, maio de 2001.
6. Seabra, A.B.; Shishido, S.M.; Morgon, N.; de Oliveira, M.G. "S-nitrosotióis doadores de NO[•]: relação entre cálculos teóricos e estabilidade térmica e fotoquímica" a ser apresentado na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, maio de 2001.

4- Patentes

1. de Oliveira, M.G., Shishido, S.M. e Seabra, A.B., "Formulações de S-nitrosotióis doadores de óxido nítrico incorporados em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol, e metodologia para incorporação de S-nitrosotióis em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/ etileno glicol". Patente requerida nº 4.238-2 de 06/09/2000 (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).
2. de Oliveria, M.G., Shishido, S.M. e Seabra, A.B., "Sistema de nitrosação baseado no borbulhamento de uma mistura gasosa de óxido nítrico e ar, para a nitrosação de tióis e outros substratos". Patente requerida nº 447 de 09/02/2001 (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

ÍNDICE

INFORMAÇÕES INTRODUTÓRIAS	1
A bioquímica do óxido nítrico	1
Propriedades físico-químicas do NO [•]	3
Carregadores e liberadores de NO [•] <i>in vivo</i>	5
Propriedades físico-químicas do grupo C-S-N=O	7
Objetivos do trabalho	12

PRIMEIRA PARTE. Efeito da matriz de poli(etileno glicol)/água na decomposição térmica e fotoquímica da S-nitrosoglutationa com liberação de óxido nítrico (NO[•])

1. Introdução	13
2. Parte experimental	17
2.1. Materiais	17
2.2. Métodos	17
2.2.1. Síntese da S-nitrosoglutationa em solução aquosa e em matriz de poli (etileno glicol)/água	18
2.2.2. Sistema de irradiação e monitoramento da liberação de NO [•]	20
2.2.3. Cálculo do rendimento quântico	22
2.2.4. Medidas cinéticas	25
2.2.5. Extensão da decomposição da S-nitrosoglutationa	26
2.2.6. Obtenção do espectro infra-vermelho	26
3. Resultados e discussão	27
3.1. Atribuição das bandas do espectro UV/vis da S-nitrosoglutationa	27
3.2. Caracterização da reação de S-nitrosação	29

3.3. Monitoramento da decomposição da S-nitrosoglutationa	34
3.4. Decomposição térmica da S-nitrosoglutationa	34
3.5. Decomposição fotoquímica da S-nitrosoglutationa	36
4. Interpretação do efeito de estabilização obtido na matriz de poli(etileno glicol)/água	44
5. Conclusões	47

SEGUNDA PARTE. Efeito da adição de íons Cu^{2+} na oxidação da glutatona e da S-nitrosoglutationa

1. Introdução	48
1.1. Importância biológica da glutatona	48
1.2. Efeito dos íons Cu^{2+} na oxidação da glutatona	51
1.3. Efeito dos íons Cu^{2+} na oxidação da S-nitrosoglutationa	51
2. Parte experimental	52
2.1. Preparação das soluções	52
2.2. Acompanhamento cinético	53
3. Resultados e discussão	54
3.1. Oxidação da glutatona por íons Cu^{2+}	54
3.2. Oxidação da S-nitrosoglutationa pela adição de íons Cu^{2+}	65
4. Conclusões	70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
----------------------------	----

INFORMAÇÕES INTRODUTÓRIAS

A bioquímica do óxido nítrico

“Just say NO”. Com este título de capa a revista *Science* em 1992 elegeu a molécula de óxido nítrico (NO[•])¹ como a “Molécula do Ano”: uma molécula simples que unifica a neurociência, a fisiologia e a imunologia e revoluciona o conceito dos cientistas sobre a comunicação e a defesa das células (Culotta e Koshland, 1992). Inicialmente, o interesse na molécula de NO[•] esteve associado aos seus efeitos nocivos. Sendo uma molécula diatômica, pequena, relativamente instável, o NO[•] foi identificado na atmosfera como sendo um dos gases tóxicos resultantes da exaustão dos motores de combustão interna. Uma análise rápida de algumas de suas propriedades pode ser um pouco alarmante: o NO[•] é um radical livre e atua como um poderoso agente oxidante, liga-se às enzimas responsáveis pela respiração e provavelmente destrói as células por impedir que elas respirem (Vasu, 1967). Entretanto, o grande interesse na molécula de NO[•] não se deve aos fatores tóxicos, mas sim à descoberta de que o NO[•] é um mensageiro químico endógeno, encontrado entre as células dos animais superiores, incluindo os humanos (Williams, 1996).

Seguindo-se uma ordem cronológica nas descobertas das funções bioquímicas do NO[•], em 1980 Furchgott e Zawadzki constataram que a vasodilatação de veias e artérias era causada pela ação da acetilcolina (ACh) sobre receptores de células endoteliais que, sendo estimuladas, induziam a síntese de uma substância denominada de Fator de Relaxação Derivado do Endotélio (EDRF). Posteriormente, em 1986, descobriu-se que o EDRF também possui função de inibição da agregação plaquetária e da adesão de trombócitos ao endotélio de vasos (Radomski *et al.*, 1987 (a) e (b)).

¹Devido à predominância do termo óxido nítrico (ao invés de monóxido de nitrogênio, de acordo com as regras de nomenclatura da IUPAC) na literatura bioquímica e fisiológica, será mantida nesse trabalho essa nomenclatura usual.

Em 1987-88 Ignarro e Palmer demonstraram que o EDRF é a molécula de NO[•]. A pressão sanguínea é regulada pela produção de NO[•] nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. As veias e artérias liberam NO[•] que, sendo lipofílico, penetra com certa facilidade nas células musculares lisas, onde ativa a enzima guanilato ciclase, causando um aumento nos níveis de monofosfato de guanosina cíclica, que leva a um decréscimo na concentração de Ca²⁺ livre na célula muscular, ocasionando a relaxação do músculo (Ignarro *et al.*, 1987). Nessa mesma época, Mocada *et al.* (1989) demonstraram que as células endoteliais sintetizavam a molécula de NO[•] a partir de átomos de nitrogênio da terminação guanidino da L-arginina levando à formação de citrulina, sendo essa reação mediada pela enzima solúvel NO-sintase constitutiva (NOSc).

Em 1998, os pesquisadores Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott e Ferid Murad ganharam o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina pelas descobertas de que o NO[•] é uma molécula sinalizadora no sistema cardiovascular. Desde então, o interesse bioquímico na molécula de NO[•] é crescente. A natureza difusiva do NO[•] permite que ele tenha uma capacidade única de participação na comunicação transcelular, difundindo-se livremente em todas as direções a partir de seu sítio de origem. Dessa forma, o NO[•] liberado localmente no endotélio vascular pode se comunicar com células adjacentes que contenham guanilato-ciclase, levando-as a atuar em um conjunto de respostas fisiológicas. O curto tempo de vida do NO[•] possibilita que ele atue como neurotransmissor, difundindo-se para fora dos neurônios logo após sua síntese (Snyder, 1992). Dessa forma, o NO[•] atua no sistema nervoso central e periférico, incluindo os sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo e urogenital (Borges e Gomes, 1997). A atuação dessa molécula no sistema nervoso central indica que o NO[•] seja uma das moléculas relacionadas com a memória (Williams, 1996). Além de regular essas funções fisiológicas, o NO[•] desempenha uma função crítica em respostas anti-patogênicas e tumorícidas no sistema imunológico. Os macrófagos e neutrófilos, células de defesa, sintetizam e liberam NO[•], o qual desempenha atividade citotóxica contra tumores (Kilbourn *et al.*, 1991; Yim *et al.*, 1993; Jagannath *et al.*, 2000; Bedioui, 2000). A citotoxicidade se deve a uma alta concentração localizada de NO[•], podendo causar danos a proteínas que contenham ferro, ocasionando a ruptura das funções celulares. Nessas altas concentrações de NO[•] pode ocorrer a reação com o ânion superóxido (O₂⁻) levando à formação de um ânion altamente oxidante; o peroxinitrito (ONOO⁻),

que é considerado uma das espécies tóxicas produzidas em processos patológicos (Matheis *et al.*, 1992; Muligian *et al.*, 1991 e 1992; Nowicki *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 2000).

Além da molécula de NO[•] ser extremamente versátil, regulando a pressão sangüínea, atuando como neurotransmissor e como agente citotóxico, ela aparentemente desempenha também um papel crucial no processo de fertilização. Estudos desse processo em um invertebrado marítimo (Kuo *et al.*, 2000) revelaram que a molécula de NO[•] pode ser essencial na fertilização do óvulo, e que alguns casos de infertilidade masculina podem ser explicados pela insuficiente produção de NO[•] no esperma.

A gama completa de todas as ações bioquímicas do NO[•] não é totalmente conhecida até o momento, e novas funções fisiológicas continuam sendo descobertas. O volume de trabalhos publicados sobre o comportamento químico e bioquímico do NO[•] é cada vez maior, da mesma forma o interesse médico nas aplicações fisiológicas dessa molécula é grandemente explorado (First International Conference: Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2000). Em 1997 foi criada a Sociedade do Óxido Nítrico, com simpósios científicos a cada dois anos, envolvendo a participação de químicos, bioquímicos, farmacêuticos e médicos, e o periódico científico *Nitric Oxide* que reúne artigos das principais áreas de pesquisa a respeito do NO[•]. Dessa forma, o estudo da molécula de NO[•] se tornou um campo promissor, e qualquer composto capaz de gerar NO[•] termicamente ou fotoquimicamente se torna interessante em vista da possibilidade de sua utilização na geração de NO[•] *in vivo*.

Propriedades físico-químicas do NO[•]

A molécula de NO[•] tem a configuração eletrônica $(\sigma_s)^2 (\sigma_s^*)^2 (\pi_{XY})^4 (\sigma_z)^2 (\pi_{XY}^*)^1$ (Fig. 1), com um elétron desemparelhado no orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) π^* , podendo ser descrita como um radical livre. O átomo de nitrogênio contém cinco elétrons na camada de valência e o átomo de oxigênio contém seis elétrons de valência. A

molécula de NO^\bullet contém, portanto, um total de onze elétrons de valência, com ordem de ligação de 2,5; consistente com a distância interatômica de 1,15 Å (Wilkinson *et al.*, 1987).

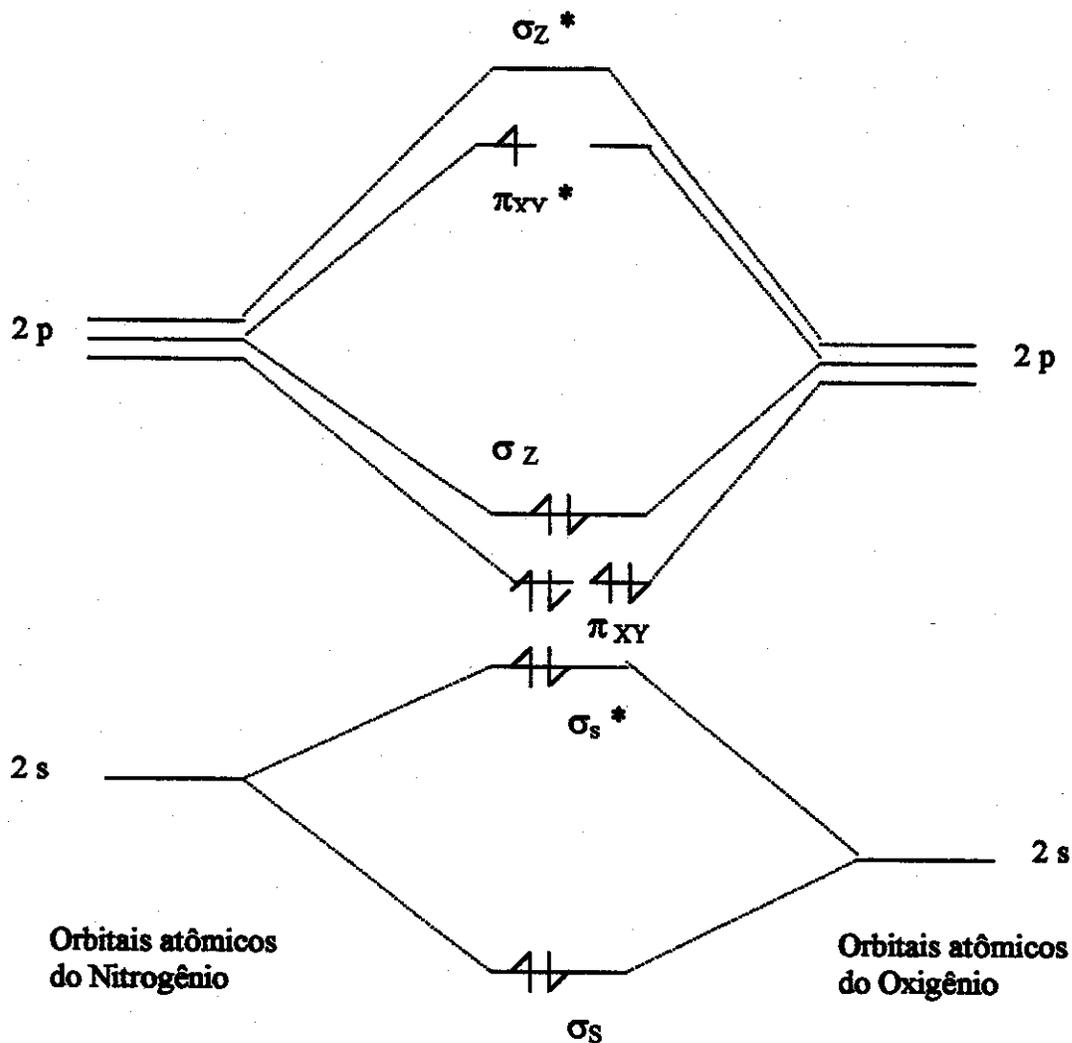


Figura 1. Orbitais moleculares do NO^\bullet (Wilkinson *et al.*, 1987).

A dimerização da molécula de NO^\bullet em N_2O_2 é termodinamicamente desfavorável à temperatura e pressão ambiente. O dímero N_2O_2 tem uma ordem de ligação global 5,0 que é o mesmo valor da soma da ordem de ligação de duas moléculas separadas de NO^\bullet . Além disso,

a energia livre de Gibbs da dimerização é negligenciável, sendo a energia liberada de apenas $- 2,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Ragsdale, 1973). E evidentemente, na dimerização ocorre o decréscimo de entropia. Portanto, esses fatores tornam a dimerização desfavorável, a não ser em altas concentrações de NO^\bullet no estado sólido e na temperatura do nitrogênio líquido. A fraca ligação N-N do dímero N_2O_2 é facilmente quebrada pela energia térmica presente à temperatura ambiente, formando assim dois radicais NO^\bullet (Lancaster, 1996).

O NO^\bullet é um gás incolor e se decompõe em N_2 e O_2 em altas temperaturas (Jones, 1973). Seu baixo momento de dipolo (0,15 D) indica que ele é relativamente lipofílico, difundindo-se facilmente através das membranas celulares para interiores hidrofóbicos de proteínas (Williams, 1996). A sua solubilidade em água é comparável à do O_2 e CO_2 (Fontecave e Pierre, 1994). O elétron desemparelhado no orbital π^* pode ser facilmente removido (potencial de ionização de 9,23 eV) ocorrendo a formação do cátion nitrosônio (NO^+).

O NO^\bullet pode ser reduzido formando o ânion nitroxila (NO^-) e também pode sofrer reações de desproporcionamento produzindo N_2O e NO_2 (Clarke e Gaul, 1993; Richter e Legzdins, 1992). Em meio aquoso aerado, ele é rapidamente oxidado pelo O_2 formando a espécie NO_2^\bullet , que por hidrólise origina nitritos e nitratos. Entretanto, em solução aquosa desaerada e em baixa concentração, o NO^\bullet pode sobreviver por um tempo considerável (Clarke e Gaul, 1993).

O NO^\bullet reage com metais de transição originando complexos metálicos de nitrosilo. Nos organismos vivos, ele reage com as hemoproteínas, tais como a hemoglobina, mioglobina, citocromo C e guanilato ciclase. Reage também com enzimas que contêm o centro ferro-enxofre (Feldman *et al.*, 1993; Lancaster, 1996) desempenhando funções fisiológicas vitais.

Carregadores e liberadores de NO^\bullet *in vivo*

Como visto anteriormente, o NO^\bullet produzido pela mediação da enzima NOSc é responsável pela vasodilatação. Essa função biológica do NO^\bullet implica no estímulo da guanilato ciclase, causando a relaxação da musculatura lisa. Isso significa que o NO^\bullet deve ser

transportado da NOSc até a guanilato ciclase. Entretanto, no meio celular e no plasma há muitas espécies capazes de desativar imediatamente o NO^\bullet , como por exemplo, O_2 , O_2^\bullet e grupos heme de proteínas. Dessa forma, o NO^\bullet *in vivo* apresenta uma meia vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 0,1 s, enquanto que a $t_{1/2}$ do EDRF é da ordem de alguns segundos. Portanto, o NO^\bullet deve ser estabilizado por uma molécula carregadora que prolonga a sua meia vida, mantendo sua atividade biológica (Stamler *et al.*, 1992). Tióis (RSHs) de baixo peso molecular, encontrados no plasma humano (Gaston *et al.*, 1993), representam uma importante classe de moléculas biológicas, sendo facilmente nitrosados e geram os nitrosotióis (RSNOs) que são mais estáveis que o NO^\bullet . Os RSNOs são metabólitos endógenos de NO^\bullet detectados no meio intra e extra celular e apresentam muitas das propriedades biológicas atribuídas ao NO^\bullet , como a vasodilatação de veias e artérias e a inibição da agregação plaquetária (Stuehr *et al.*, 1993), sendo até considerados como os próprios EDRF (Meyer *et al.*, 1994). RSHs e RSNOs são considerados espécies fundamentais no mecanismo de transferência de NO^\bullet , *in vivo* (Askew *et al.*, 1995).

A S-nitrosoglutationa (GSNO) (Clancy *et al.*, 1994) juntamente com S-nitrosoproteínas, (Belder *et al.*, 1995) e S-nitroso-derivados de hemoglobina (Dicks *et al.*, 1996) já foram identificados como compostos endógenos fundamentais no armazenamento e transporte de NO^\bullet (Belder *et al.*, 1995; Beloso e Williams, 1997). A GSNO, juntamente com outros RSNOs, já foi identificada nos eritrócitos, leucócitos, nos tecidos cerebrais e no plasma (Jia *et al.*, 1996; Giovannini *et al.*, 1997; Gaston *et al.*, 1998; Gordge *et al.*, 1996; Gordge *et al.*, 1998; Clancy *et al.*, 1994; Do *et al.*, 1996). A Figura 2 mostra a estrutura da GSNO.

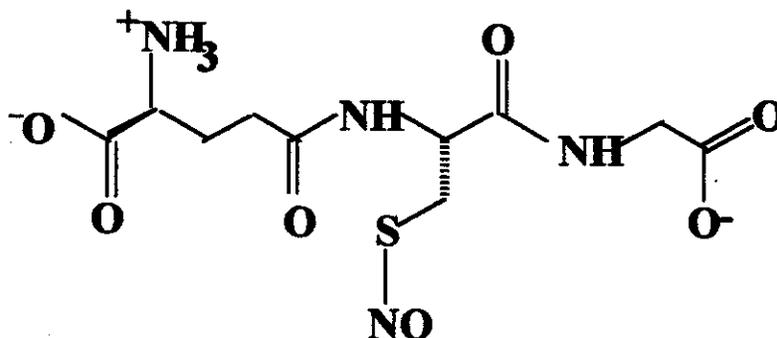


Figura 2. Estrutura da S-nitrosoglutationa (GSNO)

Pode-se observar que a molécula é um tripeptídio com o grupo SNO ligado ao resíduo da cisteína.

Os RSNOs apresentam um grande potencial de aplicação como drogas terapêuticas no tratamento de angina e outros problemas circulatórios, devido à sua habilidade de gerar NO*, *in vivo* (Askem *et al.*, 1995). Além de vasodilatadores, os RSNOs endógenos atuam como broncodilatadores (Barbier, 1994), e sua deficiência é observada em processos asmáticos (Gordge *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que a GSNO protege o epitélio pulmonar contra a oxidação (Gutierrez *et al.*, 1996), defendendo as células endoteliais contra os efeitos tóxicos de oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Struck *et al.*, 1995). De maneira geral, considera-se que os RSNOs protegem as células contra a toxicidade gerada nos processos de stress oxidativo (Rauhala *et al.*, 1996).

Propriedades físico-químicas do grupo C-S-N=O

O grupo C-S-N=O, presente em todos os RSNOs, assume uma geometria não linear e possui um plano de simetria (Feur, 1969, Arulsamy *et al.*, 1999). Nesse grupo, há dois pares de elétrons não ligantes no átomo de oxigênio, um par de elétrons não ligantes no átomo de nitrogênio e um par de elétrons não ligantes no átomo de enxofre. A ligação entre os átomos de nitrogênio e enxofre ocorre através da formação de um orbital molecular sigma (σ) entre o elétron desemparelhado do orbital π^* do átomo de nitrogênio e um elétron desemparelhado do orbital p do átomo de enxofre. A rotação livre em torno da ligação S-N resulta na existência de dois isômeros conformacionais, cis e trans, de acordo com a Fig. 3. A barreira de energia necessária para a interconversão desses isômeros calculadas para os nitrosoalcanos é de 11-12 Kcal mol⁻¹ (Bartberger, *et al.*, 2000, Arulsamy *et al.*, 1999) e está de acordo com o valor calculado para o nitrosotiol S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) que é de 13,7 Kcal mol⁻¹ (Seabra *et al.*, 2001). Para a maioria dos RSNOs, o grupo C-S-N=O adota a configuração trans preferencialmente em relação a configuração cis, e para o nitrosotiol

S-nitrosoacetil-D,L-penicilamina (SNAP), em sua forma cristalina, somente a conformação trans é observada (Arulsamy *et al.*, 1999).

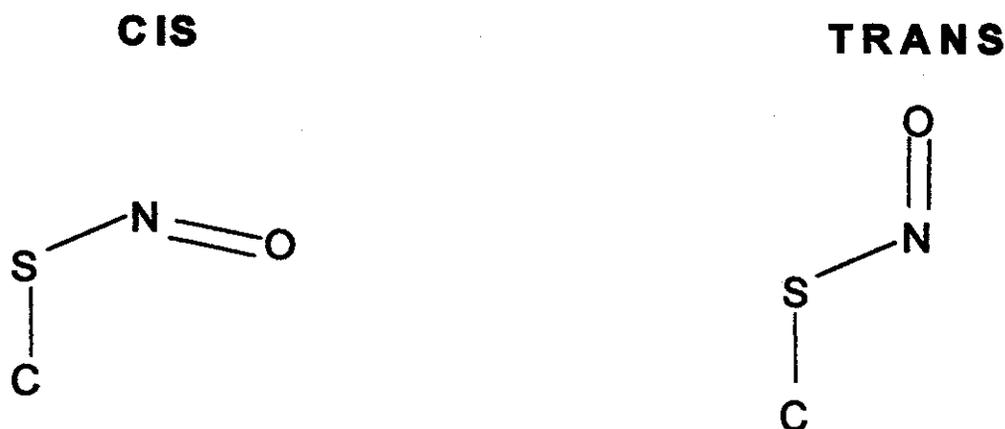


Figura 3. Estrutura plana dos isômeros cis e trans do grupo C-S-N=O.

A sobreposição dos orbitais não ligantes dos átomos de nitrogênio e oxigênio ocasiona o desdobramento dos orbitais n . A combinação antissimétrica dos orbitais fora de fase, resulta na formação do orbital molecular de mais alta energia, n (a); enquanto que a combinação simétrica dos orbitais em fase resulta no orbital de mais baixa energia, n (s). A atenção é focada nos três orbitais moleculares preenchidos de mais alta energia (HOMO), dos quais dois são σ , designados por n e n^* e um π . O orbital molecular não preenchido de mais baixa energia (LUMO) é denominado π^* (Feuer, 1969). A Figura 4 mostra esquematicamente a representação desse orbitais moleculares e as possíveis transições eletrônicas envolvidas.

Pode-se considerar que na formação da ligação σ entre os átomos de nitrogênio e enxofre dos RSNOs ocorra um deslocamento da densidade eletrônica do átomo de enxofre para o átomo de oxigênio, estabelecendo-se uma estrutura de ressonância entre os átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio. Esse deslocamento de densidade eletrônica resulta no aparecimento de cargas parciais positivas ao redor dos átomos de enxofre e nitrogênio e de uma carga parcial negativa ao redor do átomo de oxigênio, como indicado na Fig. 5. Essa distribuição de cargas está de acordo com os resultados de um estudo teórico da GSNO em solução aquosa (Tab. 1).

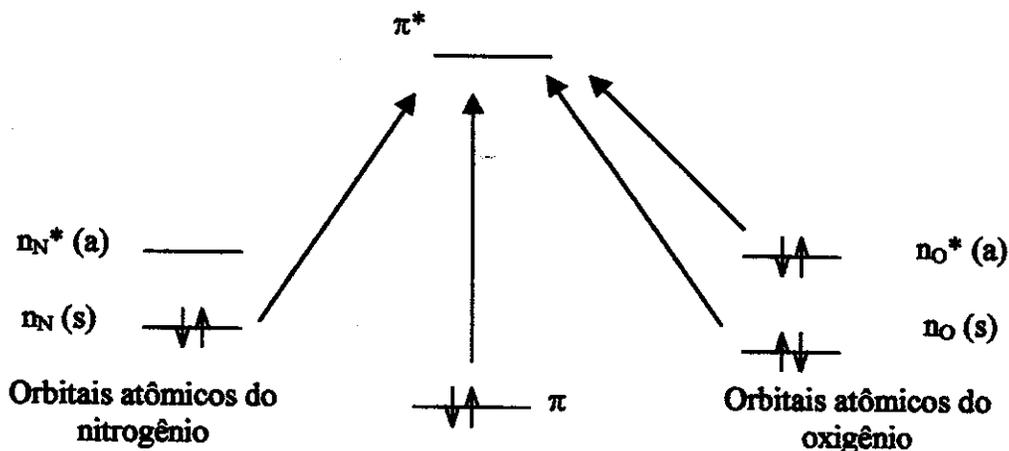


Figura 4. Diagrama qualitativo de níveis de energia do grupo GSNO (Feuer, 1969).

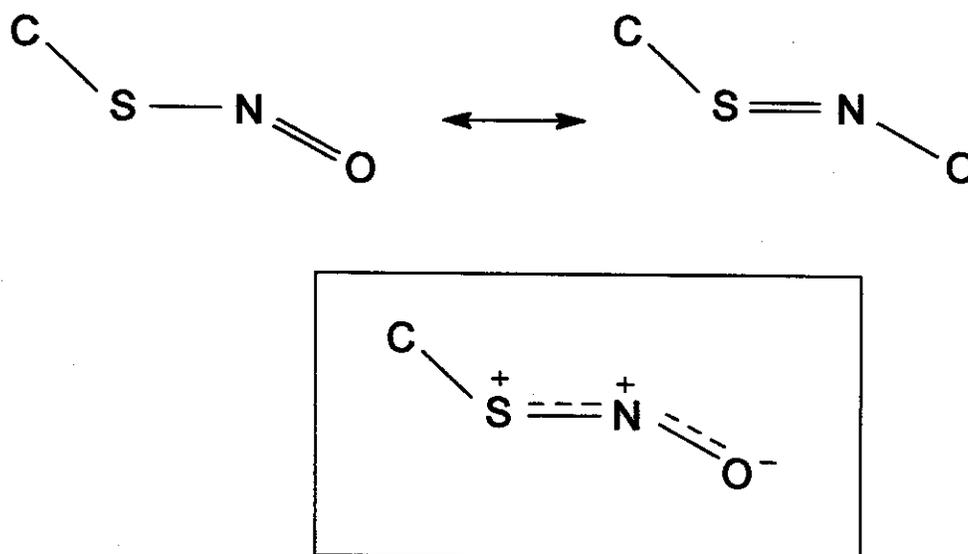


Figura 5. Estruturas de ressonância no grupo S-N-O dos RSNOs.

A estrutura de ressonância entre os átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio, mostrada na Fig. 5 resulta em uma força atrativa adicional entre os átomos de enxofre e nitrogênio, além da ligação σ existente entre esse átomos, devido à deslocalização dos elétrons nos orbitais moleculares π (Roy *et al.*, 1994).

Tabela 1. Propriedades eletrônicas obtidas por cálculo teórico da molécula de GSNO em solução aquosa (Seabra *et al.*, 2001)².

Centro	Densidade de carga
S	+ 0,0466
N	+ 0,1241
O	- 0,1511

Em analogia ao grupo dos nitrosoalcanos, as possíveis transições eletrônicas dos RSNOs são mostradas na Tabela 2. Atualmente, existe uma controvérsia em relação à atribuição da banda de absorção dos RSNOs em 333 nm. Essa banda no UV já foi atribuída como uma transição eletrônica $n_O \rightarrow \pi^*$ (Williams, 1999) e também como $\pi \rightarrow \pi^*$ (Bartberger *et al.*, 2000).

Tabela 2. Atribuições das bandas de absorção dos RSNOs (Feuer, 1969; Barrett *et al.*, 1965).

Posição do máximo da banda	Atribuição da transição eletrônica
220 nm	$\pi \rightarrow \pi^*$
333 nm	$\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n_O \rightarrow \pi^*$
515 nm (ombro)	$n_N \rightarrow \pi^*$ (cis)
545 nm	$n_{N(s)} \rightarrow \pi^*$ (trans)

²Nesta metodologia de cálculo otimizou-se a geometria da molécula de GSNO isolada e em água utilizando-se o método semi-empírico AM1 (Dewar e Reynolds, 1986). Efetuou-se a construção de uma caixa de solvatação (3x3x3) a partir das estruturas otimizadas, nas quais o solvente central foi substituído pelo soluto. Finalmente, otimizou-se a estrutura obtida anteriormente no modelo ONIOM (AM1:DREIDING) (Mayo *et al.*, 1990), no qual o soluto é definido pelo método AM1, e o solvente pelo campo de força da mecânica molecular DREIDING.

A Figura 6 mostra as bandas de absorção da GSNO com as respectivas atribuições das transições eletrônicas apresentadas na Tabela 2.

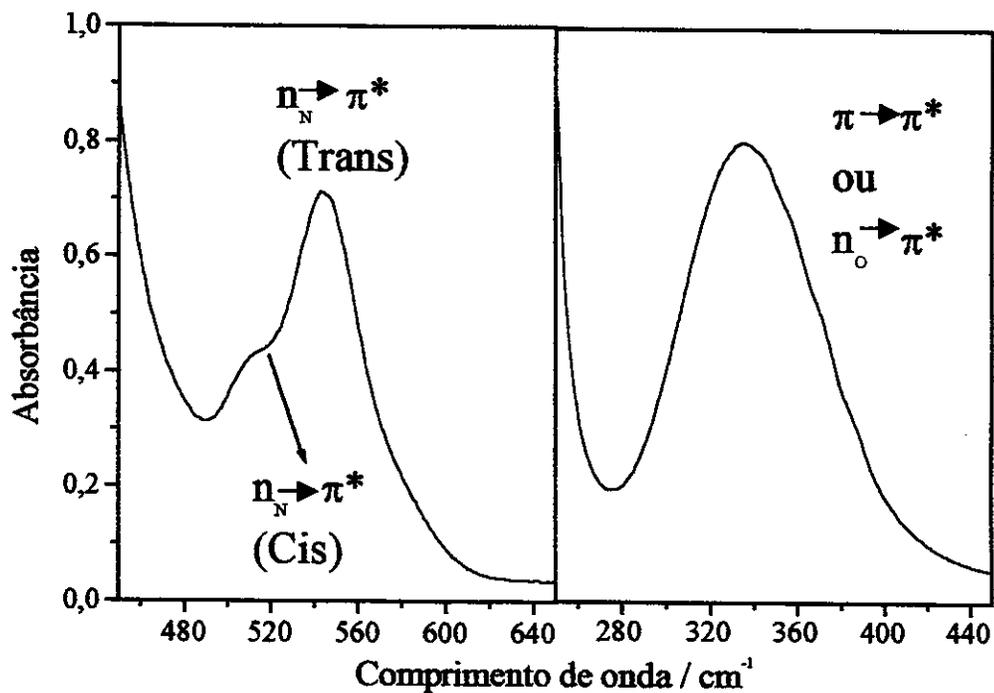


Figura 6. Espectro de absorção da GSNO em solução aquosa, indicando as transições eletrônicas das bandas de absorção.

NOTA DE ESCLARECIMENTO

Este trabalho está dividido em duas partes: na primeira parte, estudou-se o efeito da matriz de poli(etileno glicol)/água na liberação térmica e fotoquímica de NO^\bullet da S-nitrosoglutationa. Como a liberação de NO^\bullet a partir da S-nitrosoglutationa também é catalizada por íons Cu^{2+} , num mecanismo de oxidação-redução, na segunda parte, estudou-se a ação catalítica dos íons Cu^{2+} nas cinéticas de oxidação da glutatona e da S-nitrosoglutationa.

OBJETIVOS DA PRIMEIRA PARTE:

Sintetizar a S-nitrosoglutationa a partir da S-nitrosação controlada da glutatona em solução aquosa e em matriz de poli(etileno glicol)/água (PEG/ H_2O);

Caracterizar o efeito da matriz de poli(etileno glicol)/água nas cinéticas de liberação térmica e fotoquímica de NO^\bullet a partir da S-nitrosoglutationa.

OBJETIVOS DA SEGUNDA PARTE:

Analisar o efeito da adição de íons Cu^{2+} nas cinéticas de oxidação da glutatona e da S-nitrosoglutationa;

Elaborar uma proposta de mecanismo para o efeito dos íons Cu^{2+} nas reações de oxidação da glutatona e da S-nitrosoglutationa.

PRIMEIRA PARTE

EFEITO DA MATRIZ DE POLI(ETILENO GLICOL)/ÁGUA NA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA E FOTOQUÍMICA DA S-NITROSOGLUTATIONA COM LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO[•])

1. Introdução

A decomposição dos RSNOs, em especial da GSNO, pode ocorrer termicamente ou fotoquimicamente com liberação de NO[•] e formação do dímero GS-SG, glutationa oxidada, de acordo com a equação abaixo (Askew *et al.*, 1995).



A reação de decomposição térmica e fotoquímica dos RSNOs, liberando NO[•] e formando o dímero RSSR, já foi caracterizada na literatura em vários trabalhos (Roy *et al.*, 1994). Atualmente, a melhor maneira de detectar o NO[•] é através do eletrodo seletivo ao NO[•]. Este eletrodo já foi usado para caracterizar a liberação de NO[•] a partir da GSNO (Daren *et al.*, 1999), mostrando que os produtos da decomposição da GSNO são NO[•] e GSSG, de acordo com a Eq. 1.

A clivagem da ligação S-NO ocorre homoliticamente (Williams, 1999) embora já tenha sido sugerida a possibilidade da formação das espécies NO⁺ e NO⁻ através da clivagem heterolítica dos RSNOs (Arnelle e Stamler, 1995). A formação destas espécies pode ser responsável por determinadas atividades biológicas que se mostraram independentes da presença

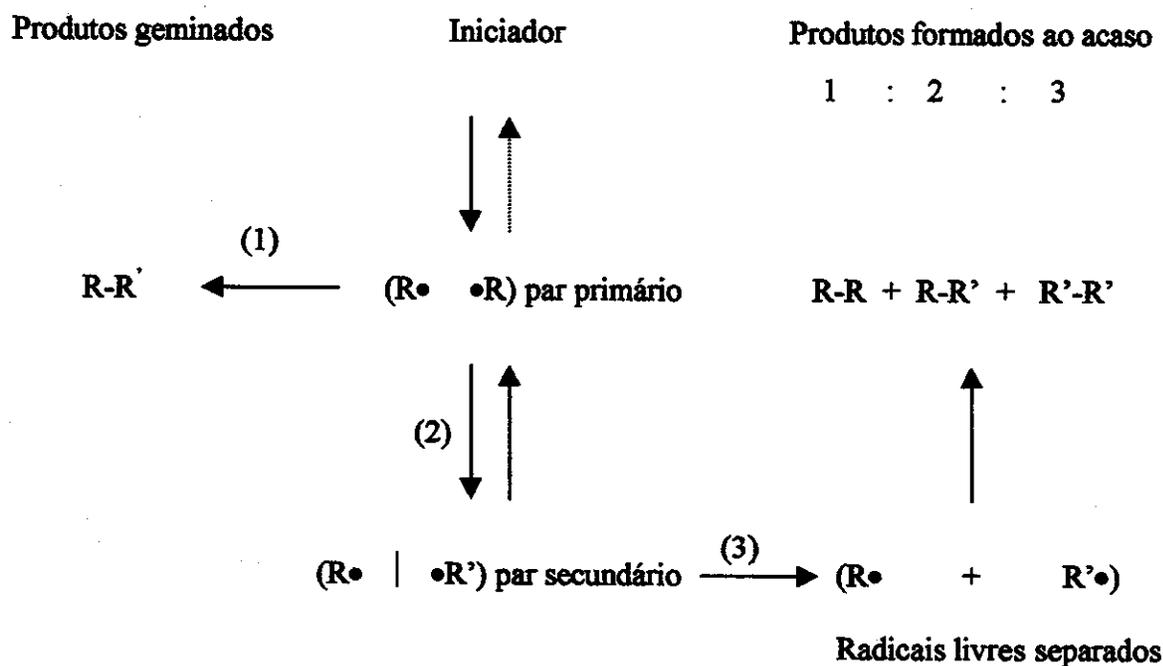
de NO[•].

Devido ao fato dos RSNOs serem importantes no armazenamento e transporte de NO[•] em sistemas biológicos, eles apresentam um grande potencial de uso como drogas carregadoras e liberadoras de NO[•]. Portanto, existe um grande interesse no desenvolvimento de drogas que atuem como carregadores de NO[•] *in vivo* para certas áreas específicas como os tumores, onde o NO[•] possa atuar como agente citotóxico. O grande potencial fotoativo da GSNO como agente citotóxico já foi demonstrado em outros trabalhos (Sexton *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1996). Drogas que liberam NO[•] fotoquimicamente causam inibição da agregação plaquetária (Makings e Tsien, 1994) e estão relacionadas com o fenômeno de fotorelaxação vascular das células musculares lisas (Furchgott e Jothianadan, 1991; Matsunaga e Furchgott, 1989). A decomposição térmica da GSNO em solução aquosa dificulta o uso desse composto como agente fotoquimioterapêutico (Wood *et al.*, 1996). Um agente fotoquimioterapêutico deve possuir decomposição térmica negligenciável na liberação de NO[•], assim, qualquer mecanismo capaz de reduzir a decomposição térmica de um nitrosotiol fotoativo é de grande interesse neste tipo de aplicação.

Soluções de matrizes viscosas podem ser usadas com a finalidade de estabilizar a decomposição térmica e fotoquímica de um determinado composto em relação às soluções aquosas (Kochi, 1973). Sabe-se que a viscosidade do solvente desempenha um papel fundamental nos processos de liberação controlada de determinadas moléculas (Jo e Park, 1999; Barichello *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 1999). A gaiola do solvente representa uma peça fundamental no processo de recombinação de pares radicalares gerados na decomposição de um determinado composto (efeito gaiola). Esse fenômeno foi constatado primeiramente por Frank e Rabinovich (1934) os quais mostraram que o rendimento quântico do processo de fotodissociação em solução é reduzido em comparação à fase gasosa devido ao aumento do número de colisões entre o par de radicais formados. Esse aumento do número de colisões se deve à redução da probabilidade das partículas do soluto escaparem da gaiola imposta pelo solvente. O papel mecânico do solvente atuando como uma gaiola é de fundamental importância nos processos de recombinação de pares de radicais recém formados por processos térmicos ou fotoquímicos.

O termo “efeito gaiola” já é frequentemente usado na literatura, e foi sugerido primeiramente por Noyes (1955). O mecanismo proposto por Noyes para esse fenômeno

reconhece que há três processos distintos para a formação do dímero (R-R') em solução (Esquema 1). Estes processos são os seguintes: (1) a partir de pares primários (R• •R) que não chegam a ser separados; (2) a partir de pares secundários que foram separados em certa extensão e recombinaram; (3) a partir dos radicais livres que atingiram sua separação estatística em solução. Os processos 1 e 2 resultam exclusivamente no produto formado pela combinação de fragmentos da mesma molécula iniciadora, enquanto que o processo 3 leva a uma mistura ao acaso de dímeros simétricos e assimétricos. Noyes sugeriu que a soma dos processos 1 e 2 fosse designada como combinações geminadas, distinguindo-a dos eventos ao acaso, os quais levam à formação dos mesmo produtos. Atualmente, há vários trabalhos que refletem a existência do efeito gaiola, por exemplo, a reação de foto-oxidação do nitroprussiato de sódio $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ com liberação de NO^\bullet livre, (Eq. 2) foi estudada por Stochel (Stochel, 1992 e 1997) que evidenciou que o processo fotoquímico, é significativamente afetado pelas propriedades do solvente e a viscosidade do meio.



Esquema 1. Mecanismo de recombinação radicalar denominado “efeito gaiola” (Kochi, 1973).



Nesse caso, o rendimento quântico da Eq. 2 diminui com o aumento da viscosidade do solvente.

A vitamina B₁₂ (cianocobalamina) sendo fotoliticamente instável produz pares de radicais sob a ação da luz. A presença dessa vitamina em um solvente de alta viscosidade, como o glicerol, estabiliza sua fotodecomposição devido a uma maior recombinação dos pares radiculares presos na gaiola do solvente viscoso (Butler *et al.*, 1986).

Já foi demonstrado (Shishido e de Oliveira, 2000) que matriz de poli(etileno glicol)(PEG) estabiliza a decomposição do nitrosotiol S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) em relação à solução aquosa, devido ao efeito gaiola. Dentre as soluções viscosas que podem ser utilizadas para estabilizar um nitrosotiol, a matriz de PEG apresenta um série de propriedades que tornam o seu uso viável em várias aplicações farmacêuticas (Davidson, 1980). PEGs são polímeros sintéticos constituídos por unidades de óxido de etileno com grupos hidroxilas nas extremidades (Fig. 7).

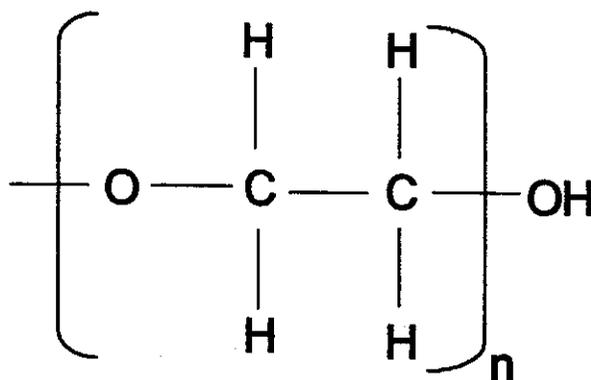


Figura 7. Estrutura do Poli(etileno glicol) (PEG).

Esses polímeros vão desde líquidos viscosos até sólidos a temperatura ambiente, dependendo da massa molar. Os PEGs são solúveis em água, atóxicos, não voláteis e disponíveis comercialmente em uma ampla faixa de massas molares (Davidson, 1980). Os PEGs já são usados em alimentos, pomadas, cremes cosméticos e loções. Soluções de PEGs estão sendo usadas como carregadoras de drogas e princípios ativos em injeções intramusculares (Sánchez-Soto *et al.*, 1990) e como veículos de drogas em supositórios (Kodera *et al.*, 1998).

Como a maioria dos nitrosotíóis é termicamente instável, uma boa alternativa para viabilizar o manuseio desses compostos é a sua incorporação em matriz de PEG ((b) de Oliveira *et al.*, 2000). Dessa forma, a possibilidade de síntese de RSNOs diretamente em matriz de PEG e em solução de PEG/H₂O representa uma possibilidade de controle do armazenamento e liberação de NO[•]. Portanto, é de grande interesse o estudo do efeito dessa matriz no comportamento térmico e fotoquímico de compostos doadores de NO[•].

Nesta parte do trabalho, foi realizada a síntese da GSNO a partir da GSH em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O (1,00:0,086 m/m). A estabilidade fotoquímica e térmica da GSNO em PEG-200/H₂O e em solução aquosa foi investigada com o uso de técnicas espectroscópicas e cinéticas.

2-Parte experimental

2.1-Materiais

Soluções aquosas de glutathiona (GSH) (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) (Glu-Cys-Glu) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em tampão fosfato (PBS 10 mM; pH 7,4, Sigma) e água desionizada. As concentrações iniciais das soluções de GSH em água e em PEG-200/H₂O foram de 46,5 mmol L⁻¹. Soluções de GSH em PEG-200/H₂O (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA) foram preparadas após a dissolução prévia de GSH em água desionizada e subsequente diluição em PEG-200 atingindo a fração em massa PEG-200:H₂O = 1,00:0,086 m/m.

2.2-Métodos

2.2.1- Síntese da S-nitrosoglutathiona em solução aquosa e em matriz de poli(etileno glicol)/água

A S-nitrosação da GSH em solução aquosa e em solução de PEG-200/H₂O foi realizada através do borbulhamento de uma mistura gasosa NO[•]/O₂ diretamente na solução de GSH (46,5 mmol L⁻¹), de acordo com o sistema mostrado na Fig. 8. A reação de S-nitrosação foi considerada estequiométrica, produzindo portanto soluções de GSNO de concentração 46,5 mmol L⁻¹. NO[•] puro proveniente de um cilindro de gás (White Martins S. A.) foi misturado com O₂ proveniente de um cilindro de ar sintético (N₂/O₂, 79:21 v/v, H₂O < 2 ppm, hidrocarbonetos totais, CO + CO₂ < 0.3 ppm), (Air Liquid Brasil S. A.) antes de ser borbulhado na solução de GSH. Os cilindros utilizados possuíam válvulas reguladoras e foram conectados a fluxômetros (Aldrich) a fim de permitir uma mistura de proporção conhecida de NO[•]/O₂. A proporção de NO[•]:O₂ borbulhada nas soluções de GSH foi de 1:1 vol/vol em fluxos de 5,6 : 5,6 mL/min. Os condutos usados foram de mangueiras de polietileno com conexões de Teflon. Os gases passaram por um misturador de vidro e foram liberados no frasco de reação através de um sistema automatizado composto por uma válvula solenóide com dispositivo eletrônico dosador/controlador, sendo possível o controle do número de pulsos gasosos e de sua duração. Ao sistema de nitrosação foi acoplado um espectrofotômetro (Hewlett Packard modelo 8453, Palo Alto, CA, EUA). As reações foram realizadas em uma cubeta de quartzo termostaticada, coberta com uma tampa de Teflon, atravessada por um tubo de polipropileno, que tem a função de conduzir a mistura gasosa nitrosante ao interior da cubeta. A automação deste sistema permitiu o controle da nitrosação de GSH em solução aquosa e em PEG-200/H₂O sendo o mesmo patenteado ((a) de Oliveira *et al.*, 2000). A reação de S-nitrosação foi monitorada espectroscopicamente através da formação e crescimento da banda de absorção característica dos RSNOs em 545 nm (Williams, 1999; Wink *et al.*, 1994; Sexton *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1996). O sistema mostrado na Fig. 8 foi previamente lavado com N₂(g). O frasco de descarte contendo KMNO₄ tem a finalidade de oxidar o excesso de NO[•].

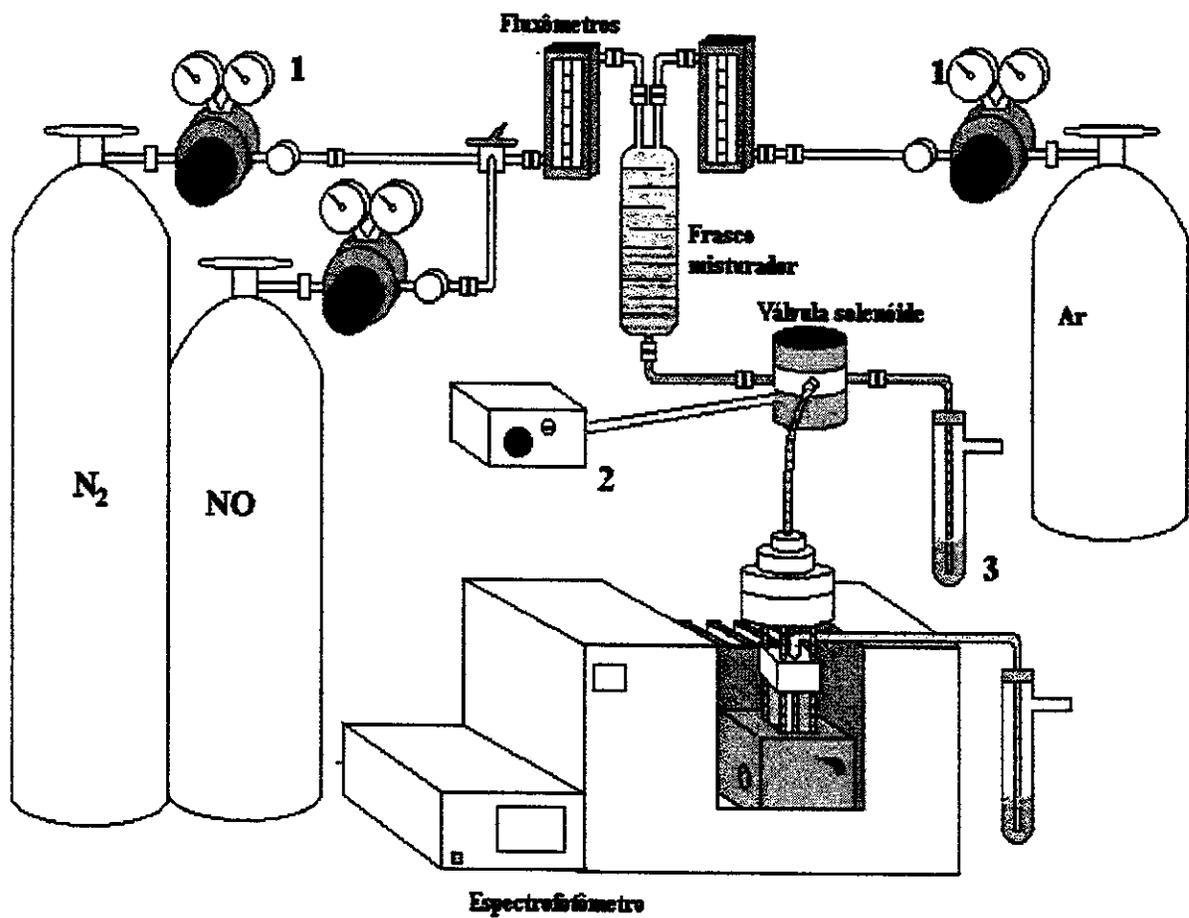


Figura 8. Desenho do sistema utilizado para a nitroação de GSH, com acompanhamento espectrofotométrico, (Shishido, S.M., 1999) onde:

- (1) Válvulas reguladoras dos cilindros;
- (2) Controlador da válvula solenóide;
- (3) Frasco de descarte contendo $KMNO_4$

2.2.2- Sistema de irradiação e monitoramento da liberação de NO[•]

A Figura 9 mostra o sistema de irradiação utilizado nos acompanhamentos cinéticos das reações de fotólise da GSNO em água e em PEG-200/H₂O na região do UV/vis. Nesse sistema, foi usada uma lâmpada de vapor de mercúrio (125 W Philips, São Paulo, Brasil) acoplada a um monocromador prismático (Carl Zeiss M4-QIII, Oberkochen, Alemanha) para irradiações com $\lambda_{IRR} = 333$ nm. O monocromador foi substituído por um filtro óptico de vidro (GG 475 - Schott Optical Glass Inc. - Duryea, PA, EUA) para irradiações com $\lambda_{IRR} > 480$ nm. A luz da lâmpada foi filtrada em uma cela de água refrigerada (Oriel) e colimada na entrada de um guia líquido de luz (Oriel). As soluções foram irradiadas através do guia líquido de luz, diretamente no interior do espectrofotômetro. O espectro de emissão da lâmpada foi obtido com o uso de um radiômetro (Newport 1830-C Optical Power Meter, Irvine, CA, EUA), (Fig.10).

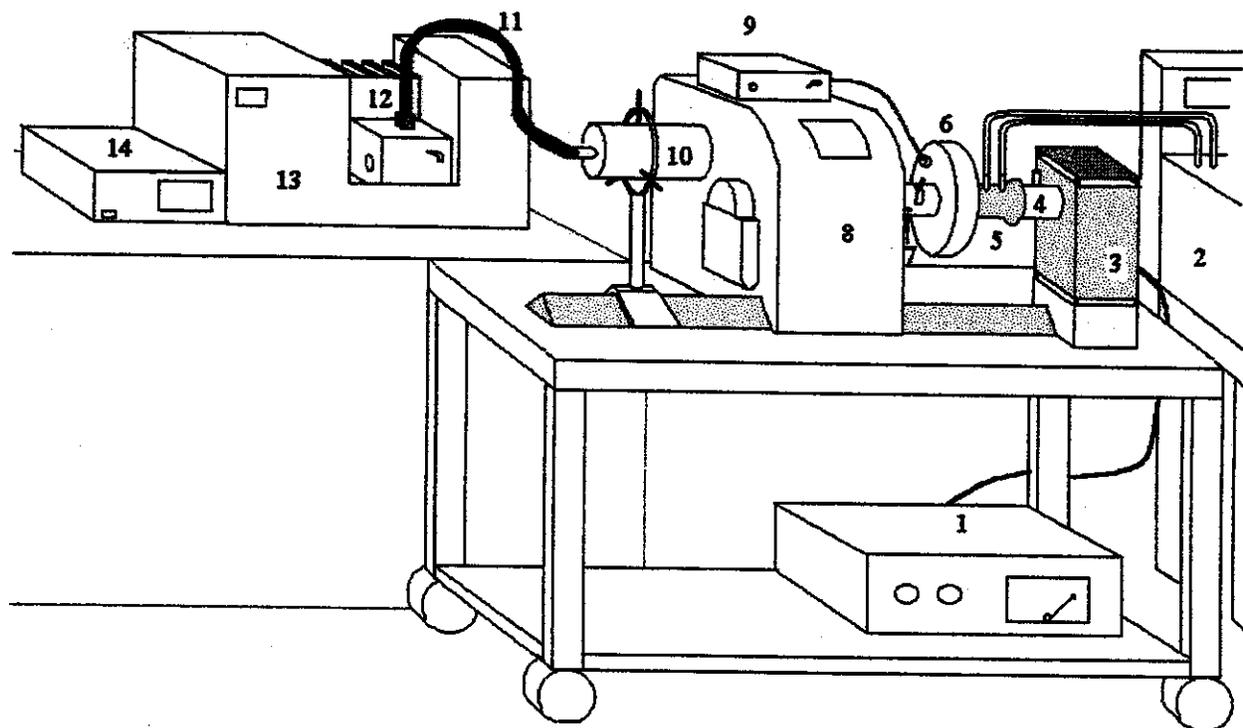


Figura 9. Sistema de irradiação utilizado nos experimentos de fotólise, (Shishido, S.M., 1999),- onde:

- 1- Fonte de alimentação da lâmpada
- 2- Banho temostatizado
- 3- Lâmpada de vapor de mercúrio 125 W
- 4- Colimador de feixe de saída da lâmpada
- 5- Filtro de água com camisa de água temostatizada
- 6- Obturador eletromecânico
- 7- Íris
- 8- Monocromador prismático
- 9- Controlador do obturador eletromecânico
- 10- Colimador do feixe de entrada do guia de luz
- 11- Guia líquido de luz
- 12- Suporte temostatizado por sistema Peltier
- 13- Espectrofotômetro
- 14- Controlador de temperatura do suporte de cubeta

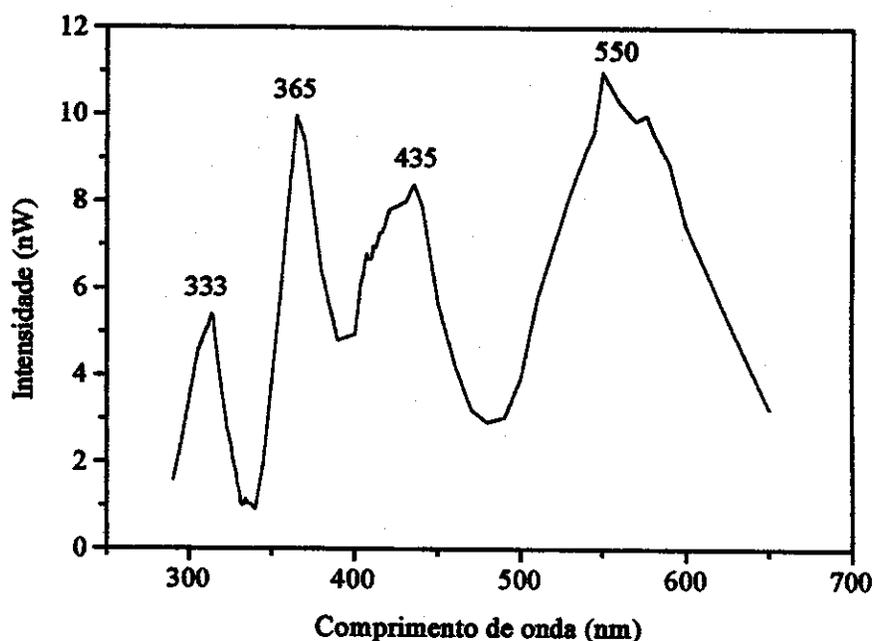


Figura 10. Espectro de emissão da lâmpada a vapor de mercúrio de 125 W utilizada nas irradiações, na região de 300 a 650 nm, obtido com um radiômetro.

2.2.3- Cálculo do rendimento quântico

O rendimento quântico da fotodecomposição das soluções de GSNO, irradiadas em $\lambda_{IRR} = 333$ nm, (selecionado através do monocromador), foi determinado por actinometria de comparação utilizando-se o anidrido (E)- α -(2,5-dimetil-3-furil-etilideno)(isopropilideno) succínico (AB) (Aberchromics, Ltd., Cardiff, UK) empregado como referência (Heller e Langan, 1981). A vantagem do uso da actinometria química, ao invés dos métodos físicos, é a irradiação do actinômetro nas mesmas condições da reação fotoquímica estudada. Com isso, eliminam-se correções devido a não uniformidade da luz incidente. O Aberchrome é um actinômetro químico

de fácil uso para reações fotoquímicas nas regiões espectrais entre 310-370 nm e 435-545 nm (Heller e Langan, 1981). Sob irradiação em solução de tolueno na região de 310-370 nm, este composto fotocromático sofre uma ruptura conrotatória do anel formando uma solução vermelha intensa de anidrido 7,7[a]-diidro-2,4,7,7a-penta-metilbenzo[b]furano-5,6-dicarboxílico (DHBF) (Fig. 11).

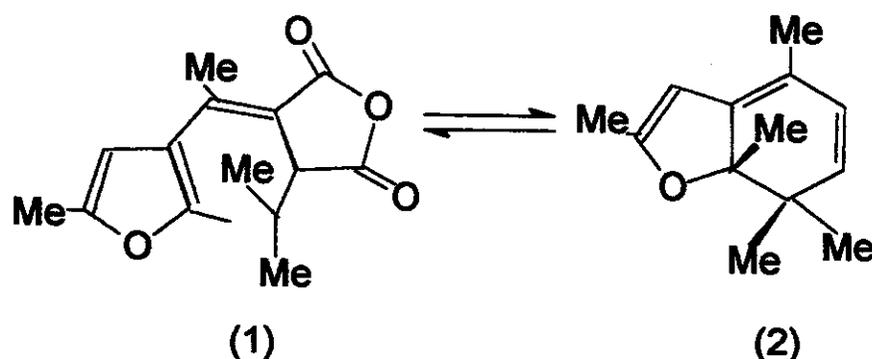


Figura 11. Efeito da irradiação do Aberchrome em solução de tolueno na região de 310-370 nm, mostrando a ruptura conrotatória reversível do anel.

Após a irradiação ($\lambda_{IRR} = 333$ nm) da solução de Aberchrome em tolueno ocorre a conversão da forma (1) na forma (2) (Fig. 11) a qual é evidenciada pela formação e crescimento da banda de absorção em 494 nm. A Figura 12 mostra as variações espectrais em 494 nm obtidas na irradiação de uma solução de Aberchrome em tolueno. A forma 2 mostrada na Fig. 11 é termodinamicamente estável, porém, o processo pode ser revertido fotoquimicamente por irradiação da banda de absorção em 494 nm.

O rendimento quântico de fotocoloração, do Aberchrome (ϕ_{AB}) é de 0,20, na faixa de 313-366 nm, e o coeficiente de absorção molar (ϵ_{DHBF}) é de $8.200 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ em 494 nm (Matsunaga e Furchgott, 1989). Um volume conhecido (V) de solução de Aberchrome em tolueno na concentração de $4,80 \text{ mmol L}^{-1}$, foi irradiado em 333 nm durante um tempo (t) e o aumento de absorbância (ΔA) em 494 nm foi determinado. O fluxo de irradiação da lâmpada (I) obtido, foi de $3,30 \times 10^{14}$ fótons s^{-1} , a partir da Eq. 3, onde N é o número de Avogadro:

$$I = \frac{\Delta A V N}{\phi_{AB} \epsilon_{DHEBF} t} \quad (3)$$

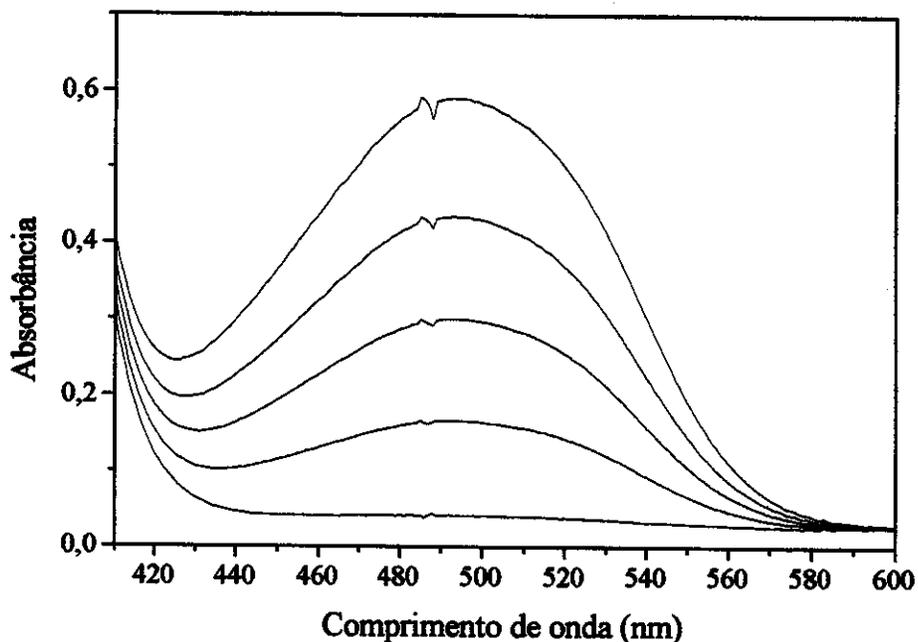


Figura 12. Variações espectrais em 494 obtidas durante a irradiação ($\lambda_{IRR} = 333 \text{ nm}$) de uma solução de Aberchrome ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em tolueno. Intervalo entre os espectro = 300 s.

O rendimento quântico de fotodecomposição da GSNO (ϕ_{GSNO}) foi determinado de acordo com a equação 4:

$$\phi_{GSNO} = \phi_{AB} \left[\frac{\Delta A_{GSNO} \epsilon_{AB} V_{GSNO} t_{AB}}{\Delta A_{AB} \epsilon_{GSNO} V_{AB} t_{GSNO}} \right] \quad (4)$$

2.2.4- Medidas cinéticas

O espectrofotômetro UV/vis, descrito anteriormente, acoplado a um controlador de temperatura (HP 89090 A) foi usado no monitoramento das variações espectrais na região de 220-1100 nm no escuro e sob irradiação, tanto na síntese como na decomposição das soluções de GSNO. As cinéticas de decomposição foram monitoradas em 545 nm com intervalos de 10 minutos entre os espectros. Os espectros das soluções de GSNO em água e em PEG-200/H₂O foram obtidos em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, tomando-se como referência o ar. Todos os experimentos foram feitos sob agitação magnética a 900 rpm. Todas as curvas cinéticas foram obtidas a partir de uma concentração inicial de 46,5 mmol L⁻¹ de GSNO em soluções aquosas ou em matriz de PEG-200/H₂O 1,00:0,086 m/m. As velocidades iniciais da decomposição térmica e fotoquímica da GSNO (V_i) foram obtidas através do coeficiente angular das curvas de absorção *versus* tempo linearizadas na parte inicial da reação (menos de 10% de reação), de acordo com a Eq.:

$$V_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (5)$$

onde, ΔA e Δt são a variações de absorbância e o correspondente intervalo de tempo, respectivamente. A fim de eliminar pequenas diferenças nas concentrações iniciais das soluções, ou seja, nos valores de V_i , as curvas de absorbância *versus* tempo em 545 nm foram normalizadas de acordo com a Eq. 6:

$$A_N = \frac{A_t - A_i}{A_f - A_i} \quad (6)$$

onde A_0 , A_i e A_f são as absorbâncias no tempo t , inicial e final, respectivamente e A_N é a absorbância normalizada. Cada ponto das curvas cinéticas representa a média de dois experimentos, com as barras de erro nos valores de absorbância correspondentes à estimativa do desvio padrão.

2.2.5.- Extensão de decomposição da S-nitrosoglutationa

A extensão de decomposição da GSNO em um período de aproximadamente 5 horas foi calculada baseando-se na redução da intensidade da banda de absorção em 545nm, de acordo com a equação. 7:

$$\text{Ext (\%)} = [1 - (I_t / I_0)] \times 100 \quad (7)$$

Onde I_t e I_0 são as intensidades de absorbância em 545 nm no tempo t e no tempo zero, respectivamente, medidas através do método da linha-base.

2.2.6- Obtenção do espectro infravermelho

A mistura gasosa de NO^* e O_2 (1:1 V/V) foi caracterizada através de seu espectro roto-vibacional utilizando-se um espectrofotômetro FTIR (Bomem, modelo B-100, Hartmann & Braun, Baptiste, Quebec, CA). Para isso, a mistura gasosa de NO^*/O_2 , na mesma proporção usada nas reações de S-nitrosação da GSH, foi passada para o interior de uma cela de gás com janelas de fluoreto de cálcio (Aldrich) e analisada no espectrofotômetro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Atribuição das bandas do espectro UV/vis da S-nitrosoglutationa

A formação da GSNO através da S-nitrosação de soluções de GSH foi caracterizada espectroscopicamente, em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O, através do aparecimento de bandas de absorção características da GSNO e outros RSNOs, descritos anteriormente (Williams, 1999; Wink *et al.*, 1994; Sexton *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1996). Essas bandas de absorção apresentam um máximo de intensidade em 333 nm e em 545 nm, em solução aquosa. Os valores de $\epsilon_{333} = 837,6 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e $\epsilon_{545} = 14,8 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ para as soluções aquosas de GSNO foram determinados experimentalmente e estão de acordo com os valores encontrados na literatura (770 e $15 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$, respectivamente) (Meyer *et al.*, 1994). Valores de $\epsilon_{333} = 815,4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e $\epsilon_{545} = 18,3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ foram obtidos experimentalmente para as soluções de PEG-200/H₂O. A Figura 13 mostra as variações espectrais observadas durante a síntese da GSNO.

Para examinar a controvérsia existente em relação à banda da GSNO em 333 nm, foi feita uma comparação da posição da banda em PEG-200/H₂O e em água. Verificou-se que essa banda apresenta um máximo de intensidade de absorção em 333 nm tanto em água quanto em PEG-200/H₂O (Fig. 14-A). Ou seja, apesar da mudança de polaridade do solvente (de água para PEG-200/H₂O) não houve deslocamento do máximo de absorção da banda, o que indica que esta é uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$. A Figura 14-B apresenta a banda de absorção da GSNO na região espectral do visível. Neste caso, observa-se um deslocamento da banda de 549 para 545 nm, mudando-se de PEG-200/H₂O para água, o que está de acordo com o deslocamento para o azul ("blue shift") esperado para uma transição eletrônica $n_N \rightarrow \pi^*$ (Brealey e Kasha, 1955; Feuer, 1969).

Portanto, as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n_N \rightarrow \pi^*$ correspondentes às bandas de absorção no UV e no visível, respectivamente, serão adotadas no presente trabalho. As posições das bandas de absorção em 333 e em 545 nm da GSNO em solução aquosa estão de acordo com

os valores das posições esperadas na literatura (Williams, 1999; Wink *et al.*, 1994; Sexton *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1996). A Figura 14-B mostra que também houve um deslocamento na posição do máximo de intensidade do ombro de 517 para 513 nm, mudando-se de PEG-200/H₂O para H₂O, indicando que a transição eletrônica correspondente a esse ombro é também do tipo $n_N \rightarrow \pi^*$, o que está de acordo com a sua atribuição ao isômero cis da GSNO (Barrett *et al.*, 1965).

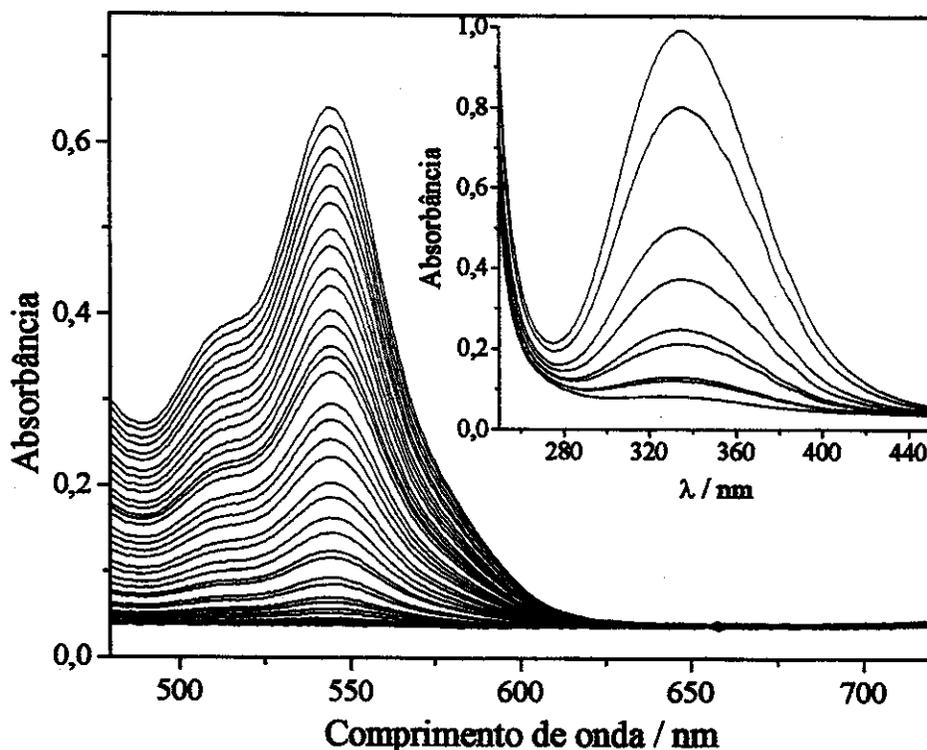


Figura 13. Variações espectrais observadas durante a síntese de GSNO a 25° C a partir do borbulhamento de uma solução aquosa de GSH 46,5 mmol L⁻¹ com a mistura nitrosante NO[•]/O₂, mostrando o aumento das bandas de absorção em 545 e 333 nm. Detalhe: [GSNO] = 3,60 mmol L⁻¹.

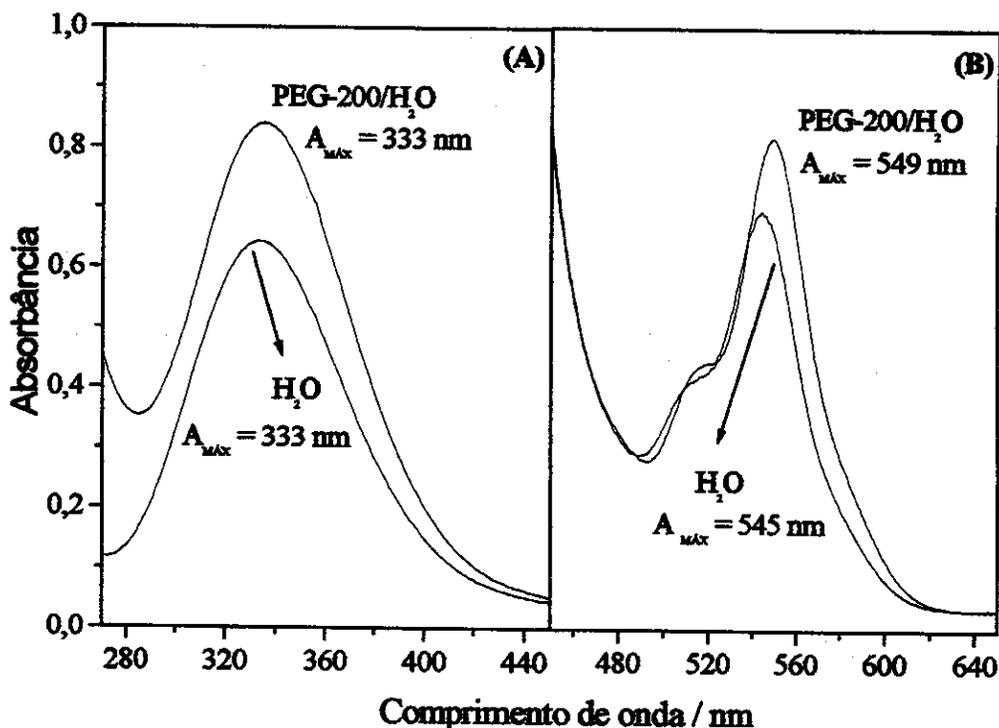


Figura 14. Espectros de absorção da GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O, como indicado na Figura, a 25° C .

3.2- Caracterização da reação de S-nitrosação

A banda na região visível (máximo em 545 nm) foi escolhida para o monitoramento cinético da formação e quebra homolítica da ligação S-N da GSNO em todos os experimentos. A Figura 15 mostra as curvas cinéticas correspondentes ao aumento de intensidade da banda de absorção em 545 nm , caracterizando a formação da ligação GS-NO, após sucessivos pulsos gasosos da mistura de $\text{NO}^\circ/\text{O}_2$ na solução de GSH.

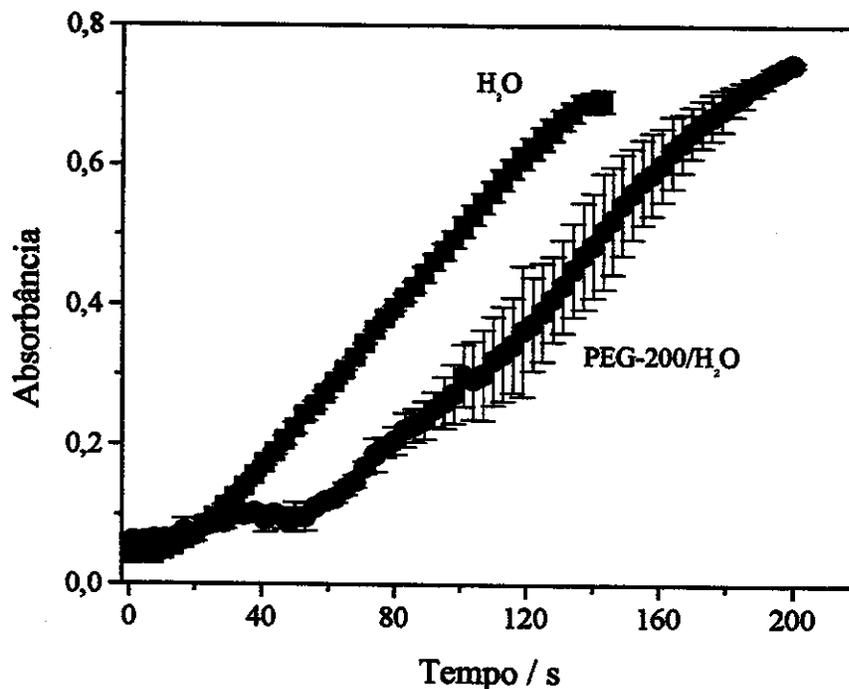
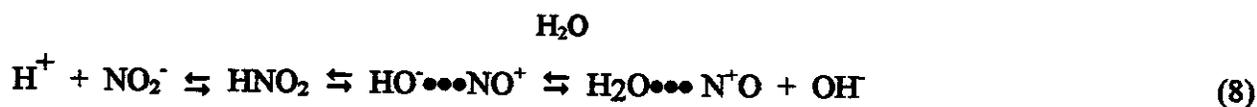


Figura 15. Monitoramento cinético da banda de absorção em 545 nm correspondente à formação da GSNO através da S-nitrosação de GSH ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em água e em matriz de PEG-200/H₂O (1,00:0,086 m/m).

Pode ser visto através da Fig. 15 que as velocidades de nitrosação são lentas somente nas partes iniciais das curvas (até *ca.* 20 s em água e 50 s em PEG-200/H₂O) e aumentam até o máximo ser atingido. A baixa velocidade de nitrosação nas partes iniciais das curvas de síntese se deve ao tempo necessário para se estabelecer um equilíbrio nas concentrações dos gases dissolvidos nas matrizes líquidas. Evidentemente, a velocidade inicial de nitrosação é menor na matriz de PEG-200/H₂O do que em solução aquosa, pois a matriz de PEG-200/H₂O apresenta uma maior viscosidade e portanto limita a difusão dos gases. O efeito da alta viscosidade da matriz de PEG-200/H₂O também causa uma maior barra de erro nas curvas de síntese, em relação à solução aquosa, devido ao maior espalhamento de luz causado pela presença de bolhas formadas dentro da cubeta, durante a aquisição dos espectros.

Sabe-se que os peptídeos e as proteínas que contêm o grupo sulfidril são nitrosados em soluções ácidas de nitrito de sódio (Hogg, 2000; Wink *et al.*, 1994) ou sob incubação de células endoteliais estimuladas a liberarem o EDRF (Ignarro *et al.*, 1987), ou diretamente com a NO-sintase na presença de substratos como L-arginina e cofatores (Williams, 1996; Pryor *et al.*, 1982).

O ácido nitroso em solução está em equilíbrio com um íon nitrosônio e um íon hidroxila. Em solução aquosa é mais razoável considerar o íon nitrosônio em sua forma hidratada H_2O-N^+O (Turney e Wright, 1959), (Eq. 8).



Dessa forma, soluções ácidas de nitrito são capazes de doar um cátion nitrosônio (NO^+) ocorrendo a S-nitrosação de RSHs de acordo com a Eq. 9:



Já foi demonstrado que em soluções anaeróbicas e neutras, o NO^+ não reage com grupos sulfidrílicos de RSHs (Kharitnov, 1995). A formação da ligação covalente entre os átomos de enxofre e nitrogênio requer um receptor de elétron (Williams, 1996.) A S-nitrosação de RSHs só ocorre na presença do oxigênio (O_2), sendo a reação de oxigênio com NO^+ o passo limitante da reação (Eq. 10). Soluções aquosas de GSH em água e em PEG-200/ H_2O foram S-nitrosadas utilizando-se o sistema de nitrosação descrito anteriormente. A reação de S-nitrosação pode ser representada pelas equações apresentadas abaixo (Kharitnov *et al.*, 1995). Na mistura gasosa de NO^+/O_2 , o NO^+ é oxidado pelo oxigênio a dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), um gás marrom característico (Guillory e Johnston, 1964) (Eq. 10).



Essa reação é termodinamicamente favorável à temperatura ambiente, com a energia livre de Gibbs a favor da formação da espécie $^{\bullet}NO_2$ (Ford *et al.*, 1993; Williams, 1996), e é

visualmente observada após a mistura de NO[•] com O₂ devido à formação imediata deste gás marrom. Dióxido de nitrogênio pode se associar formando tetróxido de nitrogênio, de acordo com a Eq. 11: (Guillory e Johnston, 1964).

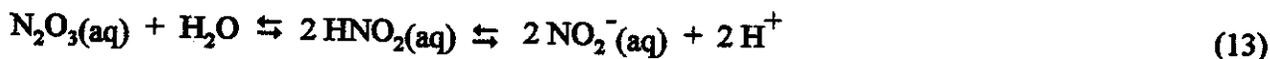


A molécula de NO[•] também pode compartilhar o elétron com a de [•]NO₂, formando a molécula planar de trióxido de dinitrogênio, N₂O₃: (Guillory e Johnston, 1964)

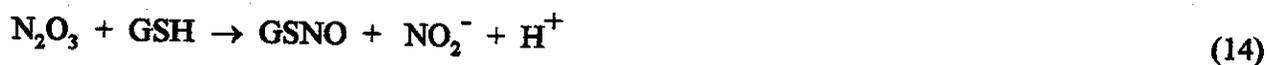


O N₂O₃ é considerado uma das espécies nitrosantes em várias reações de S-nitrosação (Stamler *et al.*, 1992; Wink *et al.*, 1994; Kharitnov *et al.*, 1995). A formação das espécies N₂O₄ e N₂O₃ na mistura gasosa de NO[•]/O₂ foi confirmada qualitativamente através do espectro roto-vibracional da mistura gasosa coletada na câmara de mistura, Fig.16. Esse espectro mostra que há NO[•] puro em equilíbrio com os outros óxidos presentes nas Eqs 10-12.

Quando a mistura gasosa é borbulhada em solução aquosa, a espécie N₂O₃ é hidratada formando ácido nitroso (HONO) o qual está em equilíbrio com sua base conjugada de nitrito (NO₂⁻):



Ácido nitroso também pode S-nitrosar a GSH, de acordo com a Eq. 9. Na ausência de água, a reação de S-nitrosação pode ser escrita de acordo com a Eq. 14:



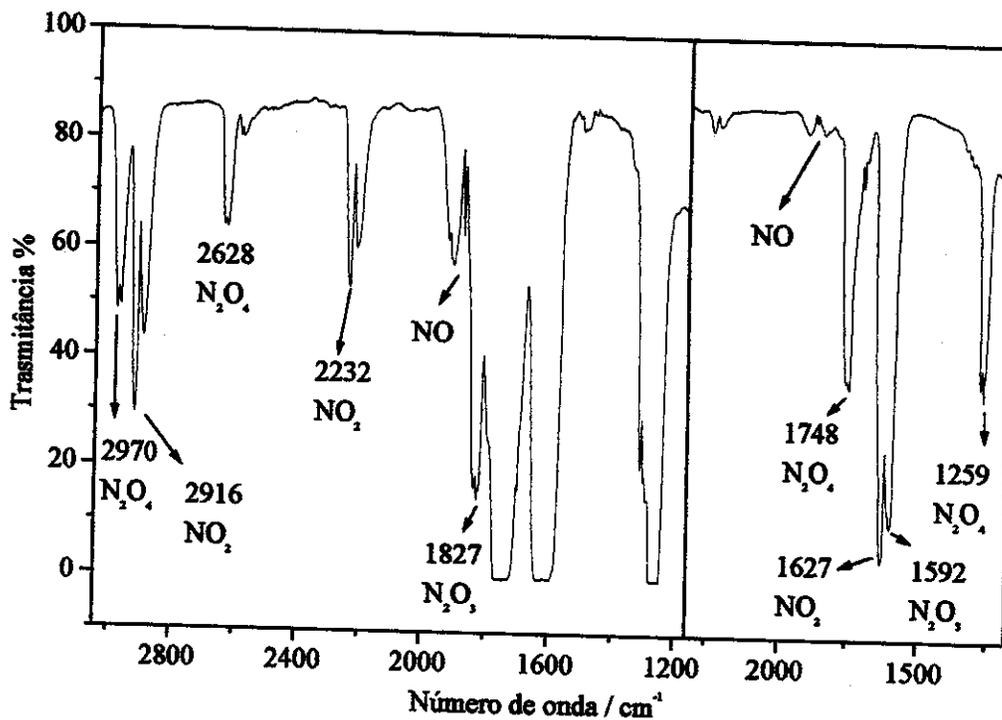


Figura 16. Espectro no Infravermelho das espécies nitrosantes formadas a partir da mistura NO^*/O_2 , mostrando as bandas características das espécies NO^* , N_2O_3 , N_2O_4 e NO_2 .

Para as reação de S-nitrosação da GSH em matriz de PEG-200/ H_2O pode-se considerar que a reação apresentada na Eq. 14 ocorre em paralelo com a nitrosação por HNO_2 , uma vez que a razão em massa do PEG em relação à água é 1,00:0,086, ou seja, a quantidade de água presente é muito pequena em relação ao PEG.

A concentração da espécie N_2O_3 é dependente do pH da solução. Como o pH da solução aquosa de GSNO é baixo (pH = 3,4 em meio não tamponado), o equilíbrio da Eq. 13 está deslocado para a esquerda, ou seja, no sentido de formação de N_2O_3 .

3.3- Monitoramento da decomposição da S-nitrosoglutationa

Após a síntese de GSNO em solução aquosa e em PEG-200/H₂O, a estabilidade desse nitrosotiol foi investigada sob três condições diferentes de irradiação ($\lambda_{IRR} = 333$ nm, $\lambda_{IRR} > 480$ nm e λ_{IRR} de 200 a 700 nm) e no escuro. Todos esses estudos foram cineticamente investigados pelo monitoramento das variações espectrais da banda de absorção em 545 nm devido à quebra homolítica da ligação S-N, e consequente liberação de NO[•] a partir da GSNO.

3.4 - Decomposição térmica da S-nitrosoglutationa

Após a sua formação, as soluções de GSNO em água e em PEG-200/H₂O apresentaram decomposição térmica contínua e proporcional ao aumento de temperatura, formando o dímero GS-SG e liberando NO[•], o qual na presença de oxigênio é oxidado a NO₂:



A reação global é:



A Figura 17 mostra as curvas cinéticas das variações espectrais em 545 nm para a

decomposição térmica da GSNO nas temperaturas de 25, 35 e 45° C em solução aquosa e em solução de PEG-200/H₂O.

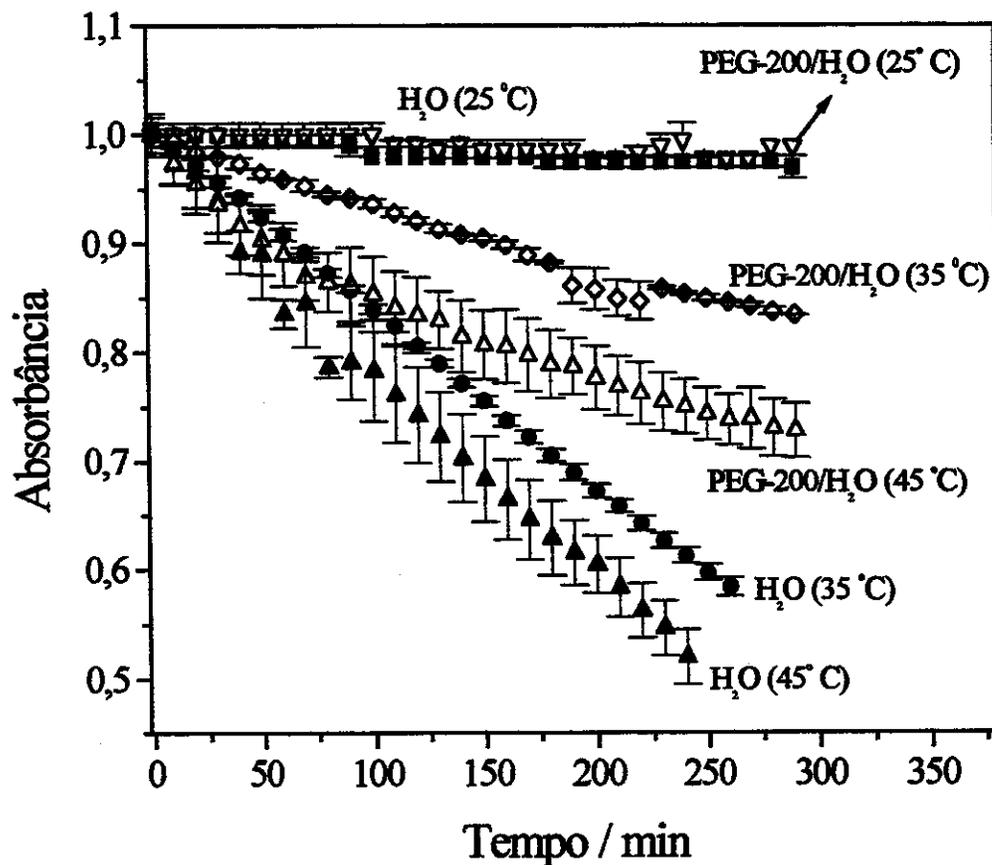


Figura 17. Curvas cinéticas das variações espectrais em 545 nm durante a decomposição térmica da GSNO (46,5 mmol L⁻¹) em solução aquosa e em solução de PEG-200/H₂O a 25, 35 e 45° C, como indicado na figura. As barras de erro correspondem a duplicatas. Intervalo entre as leituras = 10 min.

Pode-se observar que a decomposição da GSNO ocorre em ambas as soluções sendo

proporcional ao aumento de temperatura. Esse resultado mostra que a temperatura pode ser usada para modular a liberação de NO^{*} a partir da GSNO. A 25^o C a estabilidade da GSNO, em água e em PEG-200/H₂O, é muito maior que a 45^o C. Em 35^o C (próxima à temperatura fisiológica) a velocidade de decomposição é relativamente alta, sendo que nesse caso a GSNO pode ser usada como um doador espontâneo de NO^{*}. Pode-se observar que a GSNO é muito mais estável em PEG-200/H₂O do que em solução aquosa, para uma mesma temperatura. Em síntese, o aumento da temperatura acelera a reação de decomposição tanto em água quanto em PEG-200/H₂O, porém esse aumento de velocidade é significativamente menor na matriz de PEG-200/H₂O. Não foi possível evidenciar claramente o decaimento exponencial das curvas na Fig. 17 devido ao curto tempo da cinética observada.

A comparação da extensão das reações de decomposição térmica da GSNO em água e em PEG-200/H₂O também ilustra o efeito estabilizador que a matriz de PEG-200/H₂O confere à GSNO. As figuras 18A e 18B mostram as variações espectrais da banda em 545 nm num período de 5 horas a 35^o C. Após 5 horas, a extensão da reação de decomposição térmica de uma solução aquosa de GSNO (46,5 mmol L⁻¹) foi de 54% enquanto que a extensão de decomposição de uma solução de GSNO em PEG-200/H₂O, de mesma concentração, em foi de apenas 24 %. Da mesma forma, a velocidade inicial da decomposição térmica da GSNO em PEG-200/H₂O a 35^o C é significativamente reduzida em relação à solução aquosa: de $1,45 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ em solução aquosa para $6,69 \pm 0,47 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ em solução de PEG-200/H₂O.

3.5- Decomposição fotoquímica da S-nitrosoglutationa

Compostos que liberam fotoquimicamente a molécula de NO^{*} têm recebido considerável atenção recentemente (Valentin *et al.*, 1998). Já foi demonstrado (Singh *et al.*, 1999) que a irradiação dos RSNOs nos seus picos de máxima absorção (em 333 e 545 nm) promove a sua fotodecomposição originando os fragmentos GS^{*} e NO^{*} de acordo com a Eq. 19., (Roy *et al.*, 1994).



Dessa forma, tanto a irradiação da GSNO em $\lambda_{\text{IRR}} = 333 \text{ nm}$ ($\pi \rightarrow \pi^*$), obtida com o auxílio de um monocromador prismático, quanto a irradiação em $\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$ ($n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$) obtida com o auxílio do filtro, são responsáveis pela dissociação da ligação S-NO, e consequente liberação de NO^{\bullet} . A irradiação da GSNO em 333 nm promove a retirada de um elétron do orbital molecular ligante π , enfraquecendo a ligação S-N, tornando-a susceptível à ruptura com liberação de radicais GS^{\bullet} e NO^{\bullet} (Eq. 19). Além da ligação sigma entre os átomos de nitrogênio e enxofre, existe uma estrutura de ressonância entre os átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio (Fig. 5) resultando em uma força atrativa adicional entre esses átomos. A irradiação da GSNO em $\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$ é responsável pela transição eletrônica do par de elétrons do átomo de nitrogênio ao orbital molecular antiligante π , pode-se considerar que essa excitação causa um deslocamento de densidade eletrônica do átomo de nitrogênio resultando num enfraquecimento da estrutura de ressonância, e consequentemente, num enfraquecimento da ligação S-N, causando a liberação de NO^{\bullet} .

A Figura 19 apresenta as curvas cinéticas monitoradas em 545 nm da fotodecomposição da GSNO a 25° C em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O sob irradiação com $\lambda_{\text{IRR}} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$ e λ_{IRR} de 200 a 700 nm, comparadas com a decomposição térmica, na mesma temperatura. Essas curvas mostram que em solução aquosa, as três condições de irradiação da GSNO promovem uma eficiente fotólise em comparação à decomposição térmica. O efeito das diferentes condições de irradiação da GSNO proporciona resultados bem distintos. Apesar da banda de absorção da GSNO em 333 nm apresentar um coeficiente de absorção molar muito maior do que em 545 nm, a sua fotólise na região do visível, ou seja, com $\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$, é mais eficiente que a irradiação em 333 nm, pois o monocromador prismático reduz sensivelmente a intensidade da luz em $\lambda_{\text{IRR}} = 333 \text{ nm}$. Compostos que liberam NO^{\bullet} fotoliticamente, em especial sob ação da luz na região do visível são fortes candidatos a agentes fotoquimioterapêuticos (Sexton *et al.*, 1994). Obviamente, a fotólise da GSNO em toda a região do UV/vis com luz não filtrada (promoção das transições $n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) causa uma fotodecomposição mais eficiente. Essas diferenças de estabilidade da GSNO sob várias condições de irradiação indicam que tanto a intensidade quanto o

tipo de luz podem ser usados como ferramentas na modulação da liberação fotoquímica de NO^* a partir da GSNO.

As Figuras 18C e 18D mostram o efeito estabilizador que a matriz de PEG-200/ H_2O confere na extensão de fotodecomposição da GSNO, em relação à solução aquosa.

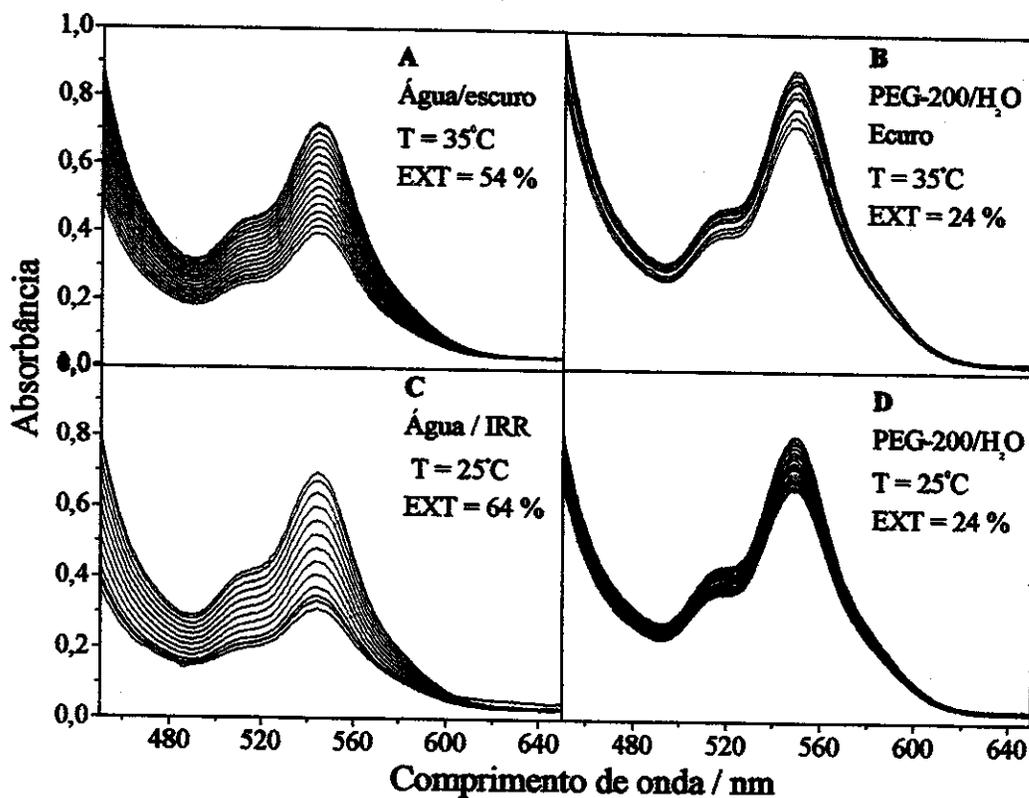


Figura 18. Variações espectrais monitoradas na banda de absorção em 545 nm durante a reação de liberação de NO^* a partir da GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em soluções aquosas e em PEG-200/ H_2O no escuro a 35°C (A,B) e sob irradiação ($\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$) a 25°C (C,D). Intervalo de tempo entre os espectros de 10 minutos. EXT = extensão média da reação de decomposição

Irradiando a GSNO com $\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$ a 25°C , a sua extensão de fotodecomposição, num

período de 5 horas, em solução aquosa é de 64% enquanto que em matriz de PEG-200/H₂O a extensão é reduzida a 24%.

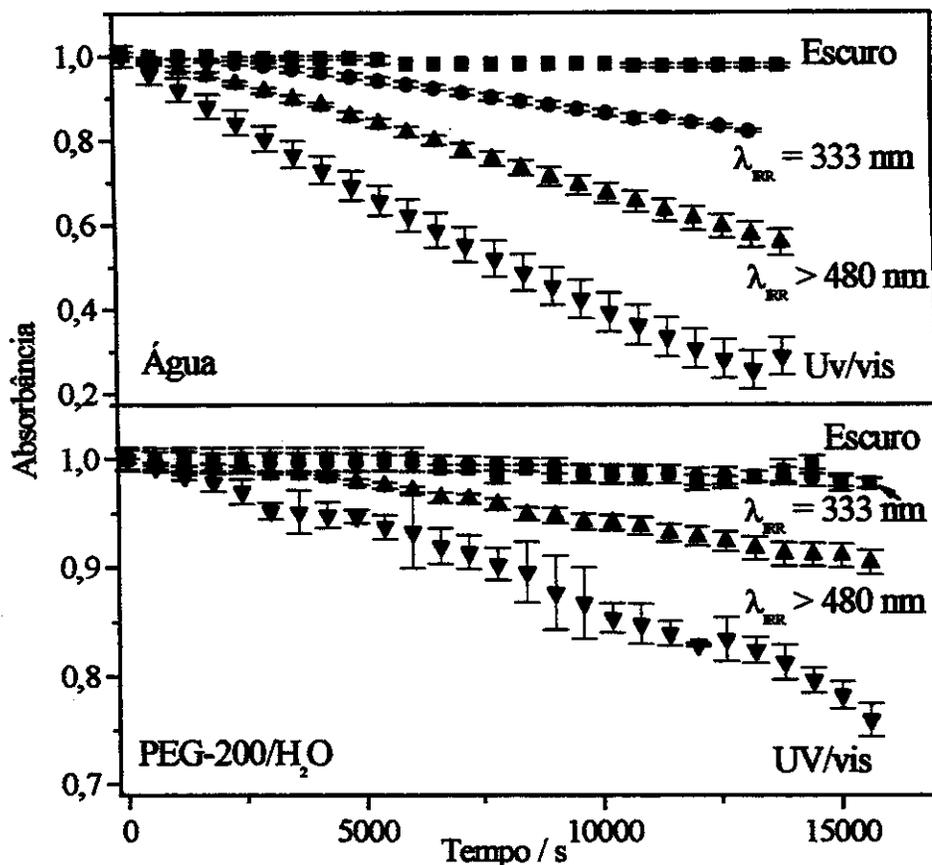


Figura 19. Curvas cinéticas monitoradas em 545 nm, correspondentes à decomposição da GSNO associada com a quebra homolítica da ligação S-N. Quadro superior: 25°C em solução aquosa (46,5 mmol L⁻¹) e em solução de PEG-200/H₂O no escuro. Quadro inferior: sob irradiação com $\lambda_{IRR} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{IRR} > 480 \text{ nm}$ e λ_{IRR} de 200 a 700 nm, conforme indicado na figura. As barras de erro correspondem a duplicatas.

A Figura 19 mostra ainda que em solução de PEG-200/H₂O não há diferença significativa entre a decomposição térmica da GSNO e a decomposição fotoquímica sob $\lambda_{IRR} = 333$ nm. Uma maior eficiência na fotodecomposição da GSNO em PEG-200/H₂O ocorre somente sob $\lambda_{IRR} > 480$ nm e em irradiação com luz UV/vis não filtrada. Comparando-se a fotodecomposição da GSNO em água e em PEG-200/H₂O na Fig. 19, percebe-se claramente o efeito estabilizador da matriz de PEG-200/H₂O na quebra homolítica da ligação S-NO.

Em síntese, as Figs 18 e 19 mostram que a irradiação acelera a decomposição da GSNO, tanto em água quanto em PEG-200/H₂O e que a matriz de PEG-200/H₂O aumenta a estabilidade fotoquímica da GSNO em relação à solução aquosa, nas três condições distintas de irradiação.

Esse efeito estabilizador da matriz de PEG-200/H₂O também é evidenciado no cálculo das velocidades iniciais de fotodecomposição da GSNO em solução aquosa e em PEG-200/H₂O, como se pode ver no gráfico de barras da Fig. 20. A velocidade inicial da reação de fotodecomposição da GSNO na matriz de PEG-200/H₂O é reduzida 2,6 e 1,9 vezes nas irradiações com $\lambda_{IRR} = 333$ nm e com $\lambda_{IRR} > 480$ nm, respectivamente em relação às soluções aquosas nas mesmas condições. Além de mostrar claramente o efeito estabilizador da matriz de PEG-200/H₂O nas velocidades iniciais de fotodecomposição da GSNO em relação às soluções aquosas, a Fig. 20 também mostra que, em ambas as soluções, a irradiação aumenta a velocidade inicial de decomposição da GSNO em relação a decomposição térmica. A Figura 20 também ilustra de maneira clara o efeito do tipo de irradiação nas velocidades de decomposição da GSNO para um mesmo solvente. O efeito estabilizador que a matriz de PEG-200/H₂O confere à GSNO também é evidente no cálculo do rendimento quântico determinado para a fotólise da GSNO sob $\lambda_{IRR} = 333$ nm que apresentou o valor de $\phi = 0,80 \pm 0,01$ em solução aquosa e $\phi = 0,30 \pm 0,01$ em solução de PEG-200/H₂O, isto é, uma redução de 2,7 vezes proporcionada pela matriz de PEG-200/H₂O (Fig. 21). O valor obtido no rendimento quântico de fotodecomposição da GSNO em solução aquosa está de acordo com o valor proposto por Wood *et al.* (1996).

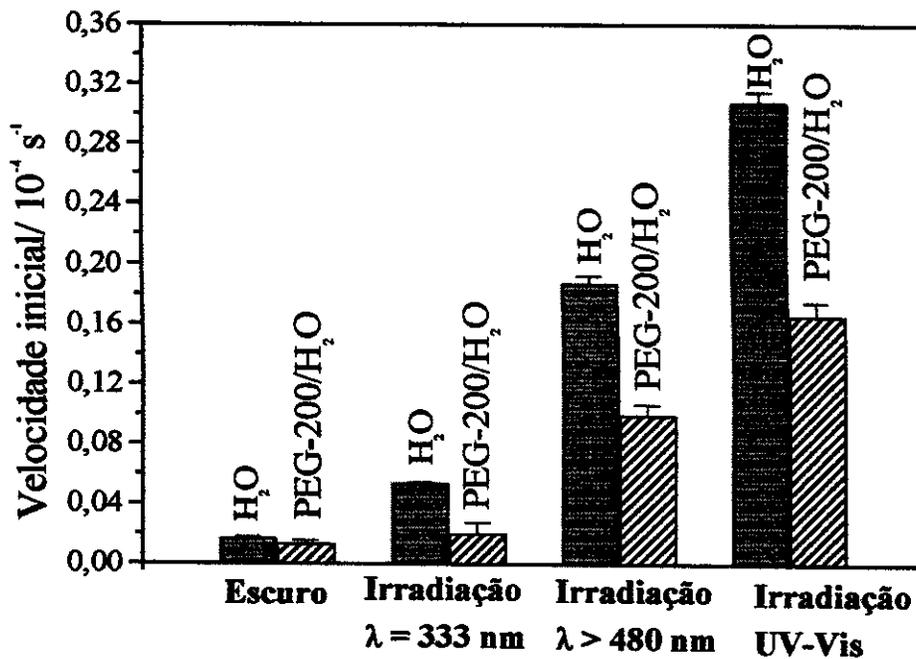


Figura 20. Velocidades iniciais de decomposição térmica e fotoquímica da GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) a 25° C em solução aquosa e em solução de PEG-200/ H_2O , como indicado na Figura.

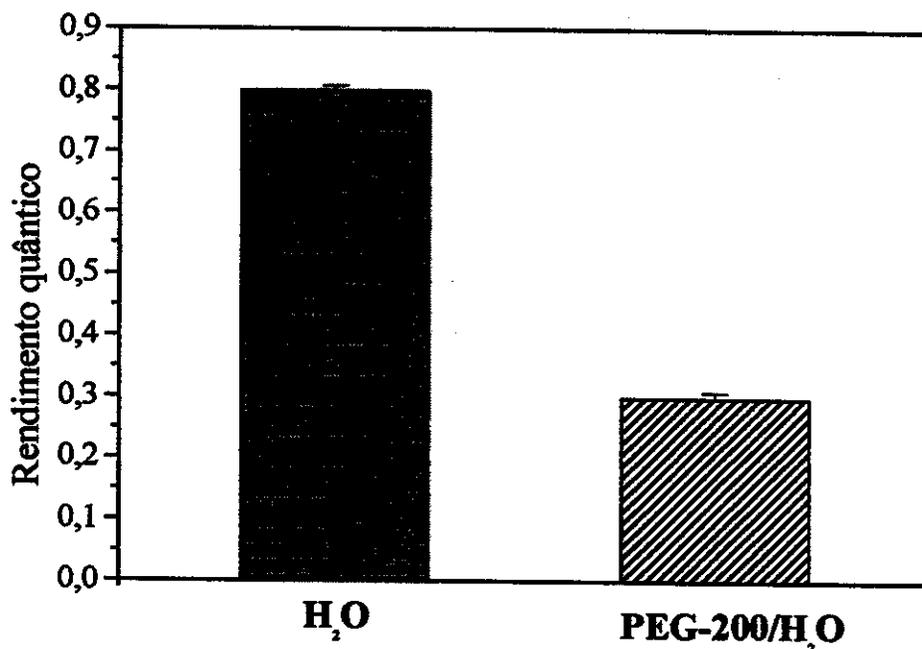


Figura 21. Rendimento quântico de fotólise da GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) sob irradiação com $\lambda_{\text{IRR}} = 333 \text{ nm}$ a 25° C , em solução aquosa e em solução de PEG-200/H₂O. Detalhe: ampliação da escala de ϕ_{GSNO} para visualização da barra.

Soluções aquosas de GSNO tamponadas em pH 7,4 apresentaram o mesmo comportamento térmico e fotoquímico de liberação de NO^\bullet que as soluções aquosas não tamponadas (pH = 3,4). A Figura 22 mostra as curvas cinéticas de decomposição térmica e fotoquímica da GSNO em soluções aquosas tamponadas e não tamponadas. Pode-se observar que o pH não interfere significativamente nas velocidades de decomposição térmica e fotoquímica da GSNO. Portanto, os íons H^+ não influenciam as etapas determinantes do mecanismo reacional de decomposição da GSNO.

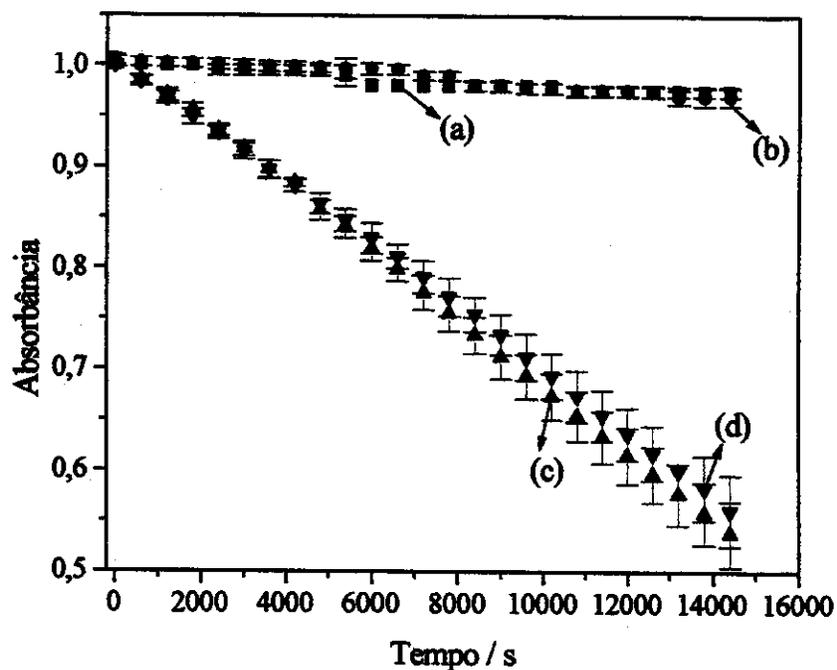


Figura 22. Curvas cinéticas monitoradas em 545 nm correspondentes à decomposição da GSNO em solução aquosa ($45,5 \text{ mmol L}^{-1}$) a 25°C , nas seguintes condições: (a) decomposição térmica em: solução aquosa não tamponada; (b) decomposição térmica em solução aquosa tamponada; (c) decomposição fotoquímica em solução aquosa não tamponada; (d) decomposição fotoquímica em solução aquosa tamponada. Intervalo entre as leituras 10 mim. Irradiações com $\lambda_{\text{IRR}} > 480 \text{ nm}$. As barras de erro correspondem a duplicatas.

4. Interpretação do efeito de estabilização obtido na matriz de poli(etileno glicol)-200/H₂O

Uma possível explicação para o efeito de estabilização da matriz de PEG-200/H₂O na decomposição da GSNO seria o efeito de solvatação que os diferentes solventes proporcionam na molécula de GSNO. A Figura 23 mostra a variação das velocidades iniciais de decomposição térmica da GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O, em função da temperatura.

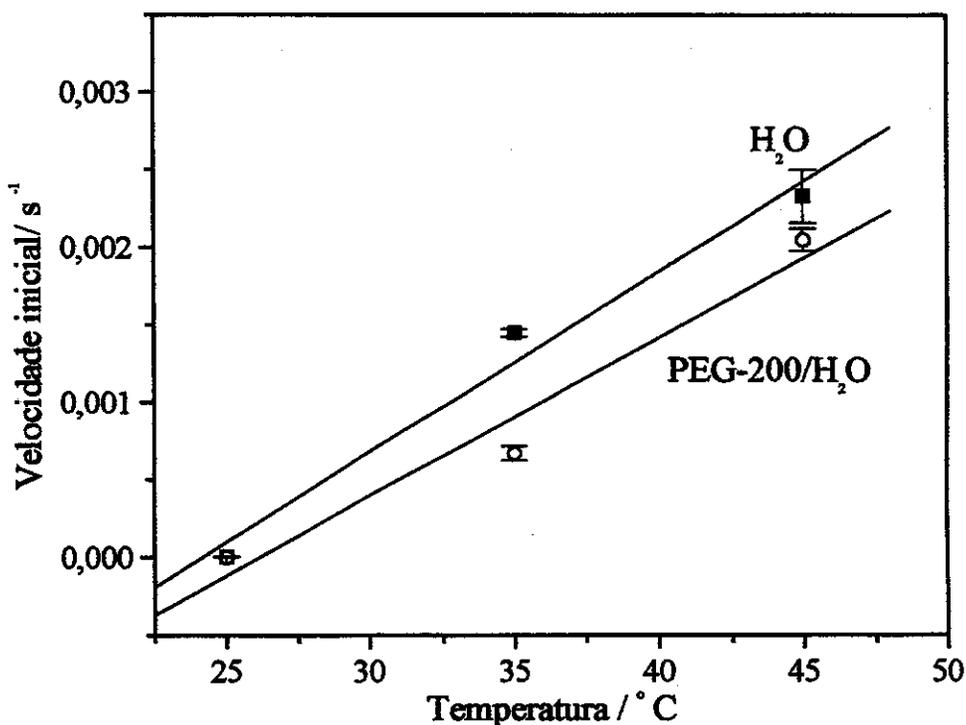


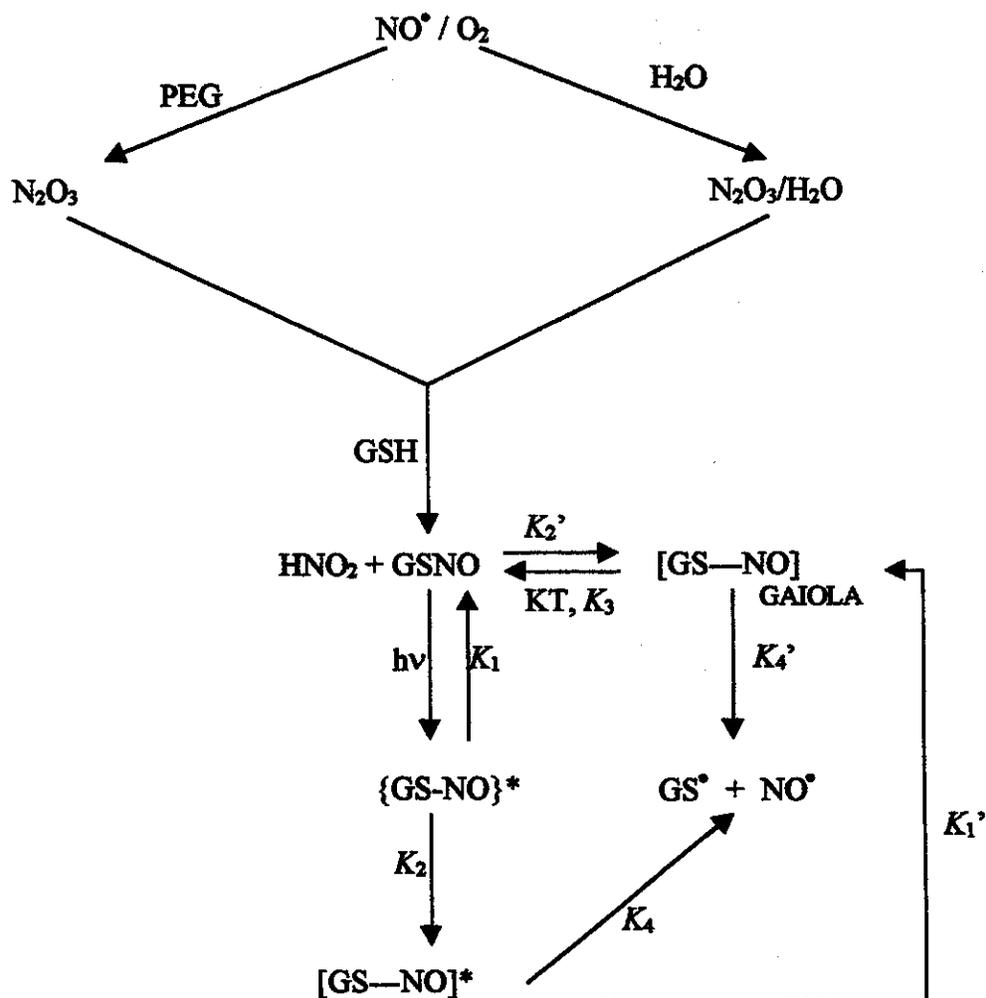
Figura 23. Variação das velocidades iniciais de decomposição térmica da GSNO (46,5 mmol L⁻¹) em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O, em função da temperatura. As barras de erro correspondem a duplicatas. As retas correspondem à regressão linear dos pontos.

Observa-se que a velocidade inicial da decomposição térmica da GSNO aumenta com a temperatura em ambos os solventes. O valor do coeficiente angular da curva de velocidade inicial *versus* temperatura para a solução aquosa é de $1,24 \times 10^{-4} \pm 1,21 \times 10^{-5}$, e em matriz de PEG-200/H₂O o valor é de $1,01 \times 10^{-4} \pm 2,06 \times 10^{-5}$. Esses valores são próximos, como se pode observar pelas curvas da Fig. 23. Apesar de não ter sido possível a construção de um gráfico de Arrhenius com base nas constantes de velocidade de primeira ordem, esses resultados indicam que as energias de ativação para a reação térmica de quebra homolítica da ligação S-N não sofrem uma mudança significativa em função dos solventes utilizados. Dessa forma, a diferença de solvatação entre H₂O e PEG-200/H₂O não deve afetar de forma significativa a barreira de energia de ativação para a decomposição da GSNO.

O efeito de estabilização pode ser interpretado considerando-se que a alta viscosidade da matriz de PEG-200/H₂O é responsável pelo efeito gaiola, descrito anteriormente, causando a redução da velocidade de dissociação da GSNO. Os radicais GS* e *NO, formados pela quebra homolítica da ligação GS-NO, podem sofrer dois destinos distintos: a recombinação radicalar regenerando GSNO ou podem escapar da gaiola do solvente havendo a decomposição da GSNO. A recombinação primária dos radicais geminados formados pela dissociação de uma molécula no estado eletrônico excitado ocorre na escala de pico segundos (recombinação geminada) (Wayne, 1988), e reduz significativamente o rendimento quântico do processo de dissociação, como mostrado na Fig. 21.

O esquema 2 apresenta as reações de síntese e decomposição da GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O. Neste esquema, K_1 e K_1' são constantes de velocidade de desativação não radiativa da GSNO, K_2 e K_2' são constantes de formação do par radicalar GS---NO, preso na gaiola do solvente, nos estados eletronicamente excitado e no estado fundamental, respectivamente. K_3 é a constante de velocidade de recombinação dos pares radicalares e conseqüente regeneração da molécula de GSNO. K_4 e K_4' são as constantes de velocidade de escape dos pares de radicais (GS* e NO*) da gaiola do solvente. Nesse mecanismo, a viscosidade do solvente é fundamental no processo de recombinação radicalar. De acordo com esse processo, K_4 deveria diminuir com o aumento da viscosidade. Em ambas as soluções, aquosa e polimérica, ocorre a formação de espécies radicalares dentro da gaiola do solvente. Devido à maior viscosidade da solução de PEG-200/H₂O em relação à solução aquosa, a velocidade de dissociação das espécies radicalares (K_4 e K_4') é reduzida na matriz de PEG-200/H₂O. Nesse

caso, existe uma grande probabilidade de regeneração do reagente (GSNO), através de recombinação primária dos radicais geminados, ao invés dos pares radicais escaparem da gaiola. Por outro lado, em solução aquosa, os pares de radicais escapam da gaiola do solvente preferencialmente à recombinação radicalar, causando velocidades de reação maiores nesse meio, de acordo com os resultados cinéticos apresentados.



Esquema 2. Reações de S-nitrosação da glutathiona (GSH) em solução aquosa e em PEG-200/ H_2O e subsequente decomposição térmica e fotoquímica ilustrando o mecanismo de recombinação radicalar na quebra homolítica da ligação S-NO (efeito gaiola).

5. Conclusões

Nesse trabalho foi possível sintetizar a GSNO a partir da S-nitrosação controlada da GSH em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O. A decomposição da GSNO foi cineticamente investigada pelo monitoramento das variações espectrais na região do UV/vis, associada à quebra homolítica da ligação S-N, e consequente liberação de NO[•]. Foi verificado que soluções de GSNO liberam espontaneamente NO[•] no escuro, e que a velocidade de decomposição térmica da GSNO aumenta com o aumento da temperatura. A matriz de PEG-200/H₂O reduziu a velocidade de decomposição térmica da GSNO em relação à solução aquosa. A irradiação da GSNO nos seus picos de máxima absorção (em 333 nm e em 545 nm correspondentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ n_N $\rightarrow \pi^*$, respectivamente) levou à fotodecomposição da GSNO liberando NO[•] e formando a GSSG. Também foi verificado que a irradiação da GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG-200/H₂O, com $\lambda_{IRR} = 333$ nm, $\lambda_{IRR} > 480$ nm e em toda a região do UV/vis, acelerou a velocidade de decomposição da GSNO, em relação à decomposição térmica, para uma mesma temperatura. Além disso, a matriz de PEG-200/H₂O levou a uma grande redução da velocidade de liberação fotoquímica de NO[•] a partir da GSNO, correspondente a uma redução de 2,7 vezes no rendimento quântico de fotodecomposição. O efeito estabilizador da matriz de PEG-200/H₂O pode ser atribuído à maior taxa de recombinação radicalar geminada dos fragmentos GS[•] e NO[•] na gaiola da matriz de PEG-200/H₂O em relação à matriz aquosa, sendo de grande importância para a modulação da liberação de NO[•] a partir da GSNO tanto termicamente quanto fotoquimicamente. Esses resultados indicam que a fotogeração de NO[•] a partir da GSNO apresenta potencial de uso terapêutico, devido às propriedades biológicas do NO[•].

SEGUNDA PARTE: EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS COBRE NA OXIDAÇÃO DA GLUTATIONA E DA S-NITROSOGLUTATIONA

1. Introdução

1.1- A importância biológica da glutathiona

O tripeptídeo glutathiona, (GSH) Fig. 24, é o tiol presente em maior quantidade no meio intracelular, estando envolvido direta e indiretamente em vários fenômenos biológicos de importância fundamental. As múltiplas funções da GSH se refletem no interesse crescente por essa molécula em diversas áreas de estudo como por exemplo as que envolvem mecanismos enzimáticos, biosíntese de macromoléculas e os sistemas imunológico e endócrino, entre outras.

A glutathiona atua como coenzima em várias reações, pois conjuga-se com compostos exógenos e com compostos gerados no metabolismo, como os estrógenos (Wood, 1970; Jakoby, 1980). Compostos com centros eletrofilicos podem se conjugar com a GSH, que é excretada com diferentes espécies (Jakoby, 1980). Da mesma forma, a atividade de várias enzimas é influenciada pela GSH e outros RSHs, o que reflete a importância fisiológica deste tiol.

Existe também uma estreita conexão entre GSH e certas doenças, como o câncer (Meister e Griffith, 1979; Cameron *et al.*, 1978, Boyd *et al.*, 1979; Novi, 1981). A administração de certas substâncias carcinogênicas aumenta os níveis de GSH e de γ - glutamiltranspeptidase (Meister e Griffith, 1979). Novi (1981) tratou tumores no fígados de ratos com doses de GSH introduzida via oral, e constatou uma regressão significativa dos tumores.

Várias doenças humanas são associadas à deficiência de enzimas específicas no metabolismo da GSH. Deficiências significativas de GSH levam, por exemplo, a um aumento da concentração sanguínea de 5-oxoprolina, podendo levar a hemólise (Meister e Anderson, 1983). De maneira geral, as observações de doenças humanas associadas com a deficiência de GSH

indicam que esse tiol é essencial para a saúde normal.

A GSH é sintetizada no meio intracelular pela ação consecutiva das enzimas γ -glutamilcisteína-sintetase e GSH-sintetase, e é transportada para o exterior das membranas celulares por interação com a enzima γ -glutamil-transpeptidase, servindo como um dos mecanismos de transporte de amino ácidos (Meister e Anderson, 1983). A concentração intracelular de GSH nas células de mamíferos é da ordem de $0,5-10 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto que concentrações micromolares de GSH são encontradas no plasma sanguíneo (Meister Anderson, 1983). Foi revelado (Meister Anderson, 1983) que os RSHs são facilmente oxidados formando dímeros com pontes de enxofre. Neste processo, a GSH intracelular é convertida em glutathiona oxidada (GSSG) pela ação da enzima GSH peroxidase, a qual catalisa a redução da H_2O_2 e de outros peróxidos. A GSH também é convertida a GSSG por trans-hidrogenação mediada pela enzima GSH transidrogenase, a qual apresenta funções relacionadas à síntese e degradação de proteínas. É sabido que traços de metais e compostos que contém o grupo heme, como várias metaloproteínas, podem oxidar rapidamente os RSHs. A reação de íons Cu^{2+} com GSH também é capaz de oxidar rapidamente a GSH em GSSG (Scrivens *et al.*, 1995). O interesse na reação entre cobre e tiol reflete a importância biológica das interações cobre-enxofre. Existe uma grande participação de íons Cu^{2+} na ação biológica da GSH, pois átomos de nitrogênio e enxofre são ligantes efetivos para o cobre em complexos covalentes, formados *in vivo*, com diferentes estequiometrias, dependendo do pH da solução (Blumberg *et al.*, 1968).

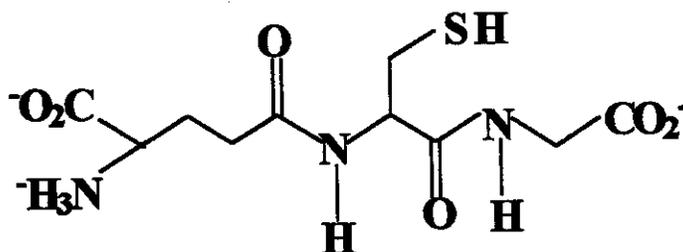


Figura 24. Fórmula estrutural da glutathiona (γ -Glu-Cys-Glu) (GSH).

Já a redução de GSSG a GSH ocorre no meio extracelular, requerendo oxigênio e

formando H_2O_2 . Uma outra via de conversão de GSSG a GSH é mediada pela enzima glutathione peroxidase e GSSG redutase. A primeira, presente em um grande número de tecidos, catalisa a redução de H_2O_2 nos eritrócitos na presença de GSH, envolvendo nesse processo a oxidação de glucose-6-monofosfato e 6-fosfogluconato, os quais fornecem uma molécula de NADPH para a redução de GSSG pela GSSG redutase (Meister, 1975). Esse processo é um dos mais importantes caminhos metabólicos do H_2O_2 em muitas células, sendo um mecanismo de proteção das membranas lipídicas contra oxidação. Intermediários como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são extensivamente formados nos sistemas biológicos. O aumento da concentração de oxigênio causa uma aceleração na formação de espécies reativas resultando no aumento da formação e liberação de GSSG (Chance *et al.*, 1978). Essas espécies reativas também podem causar outros efeitos prejudiciais no sistema biológico, como a mutagênese.

Similarmente, a irradiação de tecidos biológicos com radiação ultravioleta produz uma diminuição da concentração celular de GSH levando a um aumento da concentração de GSSG. Verificou-se que a administração de vários tióis protege as células contra os efeitos nocivos de radiações ionizantes, e que a sensibilidade das células à radiação depende dos níveis intracelulares de tióis (Meister, 1983). Esse efeito de proteção da GSH pode ser explicado considerando-se a competição entre tiol e O_2 pelos produtos de irradiação (Meister e Anderson, 1983). A radiação pode abstrair um hidrogênio da molécula em questão, tornando-a um radical; a molécula de tiol reage com o radical formado reduzindo-o e inativando-o. Dessa forma, formam-se os radicais tiolato, RS^{\cdot} , os quais reagem entre si formando o dímero RSSR, e conseqüentemente, a reação de propagação radicalar cessa. Entretanto, se os radicais RS^{\cdot} reagem com oxigênio molecular, O_2 , ocorre a formação de radicais superóxido, os quais oxidam outras moléculas, formando outros radicais no meio celular. Dessa forma, a reação se propaga e existe uma grande possibilidade de destruição de várias moléculas, incluindo o material genético. Assim, as células produzem espécies reativas de oxigênios, que são constantemente destruídas por reação com GSH (Kosower *et al.*, 1974). Conseqüentemente, nessas condições de toxicidade ou "stress" oxidativo, a taxa de GSSG intracelular aumenta substancialmente (Sies, 1974). Atualmente, a relação GSH/GSSG é usada para se avaliar o grau de "stress" oxidativo nas células.

Dessa forma, o estudo da oxidação de tióis é de grande importância para se entender os mecanismos de defesa da GSH em sistemas biológicos.

1.2 - Efeito dos íons Cu^{2+} na oxidação da glutathiona

Uma maneira de se estudar o processo de oxidação da GSH *in vitro*, é através da adição de íons Cu^{2+} em soluções de GSH. Sabe-se que íons Cu^{2+} reagem com GSH promovendo a sua oxidação a GSSG a qual apresenta uma banda característica em 294 nm (Gorren *et al.*, 1996).

Íons Cu^{2+} são essenciais para o desenvolvimento dos organismos aeróbicos, entretanto, o seu excesso causa efeitos tóxicos nas células (Ohta *et al.*, 2000). Essa toxicidade se deve, em parte, à reação de Cu^+ com peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , formando o radical hidroxila (OH^\bullet), que é uma espécie reativa que pode causar danos a lipídios, proteínas, e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 1990). A GSH também atua como antioxidante nos sistemas biológicos através da complexação com íons cobre, formando o complexo $[\text{GS}^-\text{Cu}^+]$ e inibindo a auto oxidação do ácido ascórbico, catalizada por cobre (Ohta *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que átomos de nitrogênio e enxofre são ligantes importantes para cobre em vários complexos covalentes de estequiometrias variadas, dependendo do pH da solução (Blumberg *et al.*, 1968).

Apesar da importância biológica da conversão tiol-disulfeto, poucos trabalhos foram realizados no estudo desta reação. A função de íons cobre envolvidos neste mecanismo bioquímico de reação redox com GSH, ainda não está completamente entendida, justificando-se que mais estudos sejam feitos

1.3 – Efeito de íons Cu^{2+} na oxidação da S-nitrosoglutationa

Já foi demonstrado (Williams, 1999; Scrivens *et al.*, 1995) que à temperatura ambiente e na ausência de luz, a liberação de NO^\bullet a partir dos RSNOs é catalisada pela presença de íons Cu^{2+} , formando o dímero, RSSR, de acordo com a Eq. 20:



A adição de um agente complexante dos íons cobre, como o EDTA, causa a diminuição da velocidade de liberação de NO[•] a partir de vários RSNOs (Scrivens *et al.*, 1995). Em outros trabalhos, não foi verificado o efeito catalítico de outros metais, como íons Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cr²⁺ ou Fe⁺³, na decomposição dos RSNOs, apesar de existir alguma indicação de um pequeno efeito catalítico de íons Fe²⁺ (Askew *et al.*, 1995).

Íons Cu²⁺ participam de um processo redox com o RSNO, catalisando a liberação de NO[•] e oxidando o nitrosotiol ao dímero. O mecanismo proposto para essa reação ainda não está totalmente esclarecido, embora haja evidências da formação de complexos entre [RS-Cu^I] (Gorren *et al.*, 1996) e [RSSR-Cu^{II}]²⁺ (Noble *et al.*, 1999).

A presença de íons Cu²⁺ representa uma outra ferramenta importante para a modulação da liberação de NO[•] a partir da GSNO. Nesse sentido, já foi demonstrado que Cu²⁺ ligado a peptídeos e proteínas pode ser reduzido da mesma maneira que os íons Cu²⁺ livres, possibilitando que a liberação de NO[•] a partir dos RSNOs ocorra *in vivo* (Sean e Frei, 1997).

2. Parte experimental

2.1- Preparação das soluções

Soluções aquosas de cloreto cúprico (CuCl₂) (Chimie Test, Indaiatuba, SP, Brasil), neocuproína (118 µmol L⁻¹) (Aldrich) e GSH foram preparadas diretamente em água desionizada. Soluções estoque de CuCl₂ (na faixa de 10⁻² a 10⁻³ mol L⁻¹, dependendo das condições de cada cinética) foram preparadas e diluídas antes dos experimentos. Primeiramente, foram realizadas cinéticas nas quais a concentração das soluções aquosas de GSH foi mantida constante em 300 µmol L⁻¹ e as concentrações das soluções aquosas de CuCl₂ variaram de 0,90 µmol L⁻¹ a 0,10 mmolL⁻¹ em incrementos de 20 µmol L⁻¹. Nesses experimentos, 1,50 mL da solução de GSH foi colocada na cubeta de quartzo, dentro do espectrofotômetro, homogeneizada sob agitação

magnética a 900 rpm e termostalizada a 30° C. Nessa solução de GSH foi adicionado 0,50 mL de solução aquosa de CuCl₂, com o auxílio de uma pipeta automática e iniciado o acompanhamento cinético. Em outro experimento, a concentração das soluções de CuCl₂ manteve-se fixa em 5000 μmol L⁻¹, enquanto que a concentração de GSH variou de 65 a 80 μmol L⁻¹. A formação do complexo Cu⁺-neocuproína foi observada através do aparecimento e crescimento de sua banda de absorção característica em 453 nm. Para tanto, em uma cubeta de quartzo foram adicionados 1,5 mL de uma solução aquosa de GSH, 0,25 mL de solução aquosa de neocuproína e 0,25 mL de solução aquosa de CuCl₂, dessa forma as concentrações finais de cada reagente foram 300, 118 e 590 μmol L⁻¹, respectivamente. Esta solução final foi homogeneizada a 900 rpm e termostalizada a 30° C para o acompanhamento cinético.

As cinéticas de decomposição da GSNO na presença de íons Cu²⁺ e um excesso de GSH foram realizadas após a reação de S-nitrosação controlada de 1,50 mL de uma solução aquosa de GSH (6,20 x 10⁻² mol L⁻¹), como descrito na Parte 1. Neste caso, imediatamente após a síntese da GSNO, foram adicionados na cubeta 0,25 mL de uma solução aquosa de Cu²⁺ e 0,25 mL de uma solução aquosa de GSH de concentrações finais 9,95 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ e 7,71 x 10⁻³ mol L⁻¹, respectivamente. A solução final foi homogeneizada a 900 rpm e termostalizada a 25° C para o acompanhamento cinético.

2.2- Acompanhamento cinético

A reação de oxidação da GSH por íons Cu²⁺ foi acompanhada espectrofotometricamente imediatamente após a mistura das soluções aquosas de GSH e de Cu²⁺ em uma cubeta de quartzo termostalizada a 30° C por um controlador de temperatura (HP 89090 A). Utilizou-se o espectrofotômetro de absorção HP- 8453, descrito na Parte 1. A oxidação da GSH a GSSG pelos íons Cu²⁺ foi monitorada através das variações espectrais na banda de absorção característica da GSSG em 294 nm. O intervalo de tempo entre os espectros foi de 10 segundos. Primeiramente, as soluções de GSH (1,50 mL) foram acondicionadas na cubeta de quartzo, termostalizadas a 25 ou

30° C, dependendo do experimento, e homogêneas sob agitação magnética a 900 rpm. Soluções aquosas de CuCl₂ (0,50 mL) foram adicionadas dentro da cubeta que contém a solução de GSH com o auxílio de uma pipeta automática, e a cinética foi imediatamente iniciada. Um programa de acompanhamento cinético do espectrofotômetro foi utilizado nos estudos cinéticos. As velocidades iniciais da oxidação da GSH foram calculadas através do coeficiente angular obtido da regressão linear do trecho inicial da curva (menos de 10% de reação) de absorvância *versus* tempo.

As reações de decomposição da GSNO pela ação dos íons cobre foram monitoradas pelas variações espectrais da GSNO em 545 nm, com intervalo entre os espectros de 5 minutos, a 25° C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Oxidação da glutatona por íons Cu²⁺

A Figura 25 mostra as variações espectrais monitoradas em 294 nm, correspondentes à formação da GSSG, obtidas na reação de oxidação de uma solução aquosa de GSH na presença de íons Cu²⁺.

A Figura 26 mostra as curvas cinéticas acompanhadas em 294 nm nas reações de oxidação da GSH por íons Cu²⁺ numa condição em que a concentração de GSH foi mantida constante enquanto que as concentrações de Cu²⁺ foram aumentadas em cada curva cinética, mantendo-se um excesso de GSH em relação aos íons Cu²⁺. Pode-se observar que a uma concentração fixa de GSH a absorvância máxima de GS-SG formada em 294 nm aumenta conforme aumenta a concentração de íons Cu²⁺ adicionados.

A Figura 27 mostra as curvas cinéticas monitoradas em 294 nm obtidas mantendo-se a concentração de íons Cu²⁺ fixa em 5000 µmol L⁻¹ enquanto que a concentração de GSH foi

aumentada de $65 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pode-se verificar que a quantidade de GS-SG formada é dependente da concentração de GSH presente.

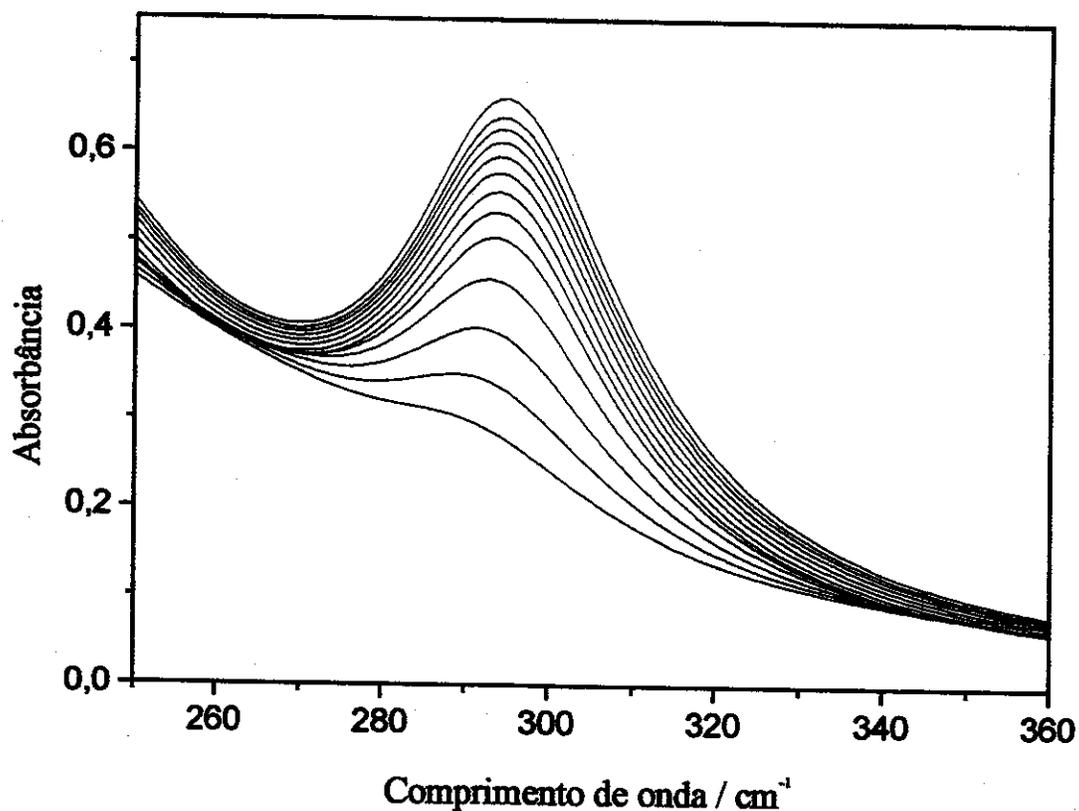


Figura 25. Variações espectrais em 294 nm observadas na reação de oxidação de uma solução aquosa de GSH ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de íons Cu^{2+} ($79 \mu\text{mol L}^{-1}$) em meio aquoso não tamponado. Intervalos entre os espectros = 10 s.

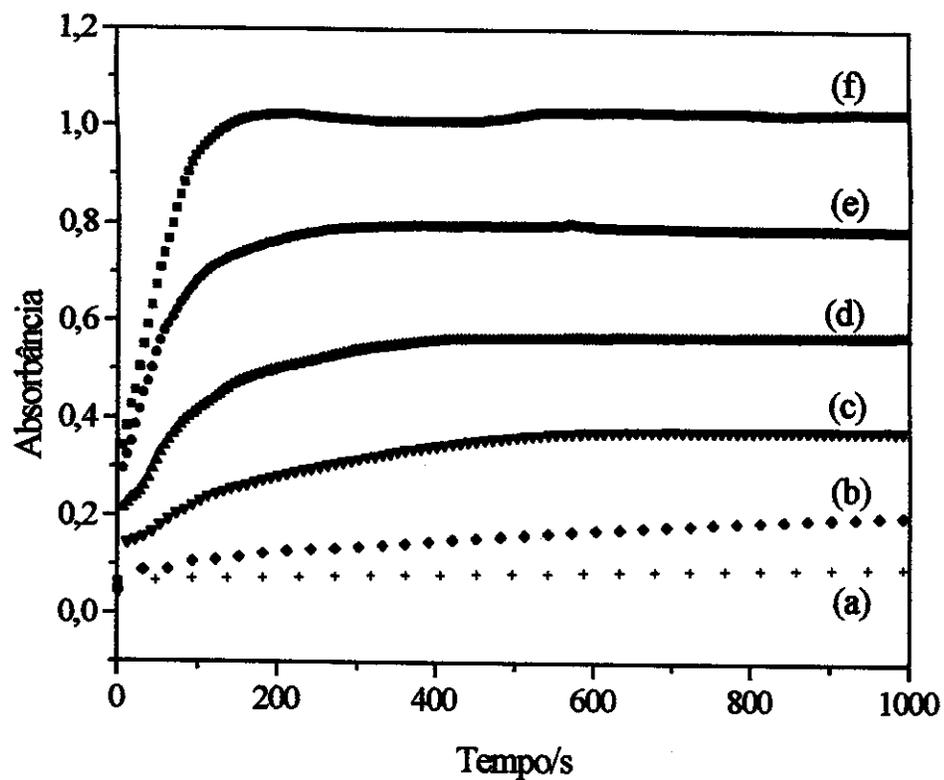


Figura 26. Curvas cinéticas baseadas no aumento de absorção em 294 nm (correspondente à formação de GS-SG) na reação de oxidação de solução aquosa não tamponada de GSH ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) com várias concentrações de íons Cu^{2+} adicionados: (a) $[\text{Cu}^{2+}] = 0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$; (b) $[\text{Cu}^{2+}] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$; (c) $[\text{Cu}^{2+}] = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$; (d) $[\text{Cu}^{2+}] = 59 \mu\text{mol L}^{-1}$; (e) $[\text{Cu}^{2+}] = 79 \mu\text{mol L}^{-1}$; (f) $[\text{Cu}^{2+}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Todos os dados foram coletados a 30°C . Intervalo de tempo entre as leituras = 10 s.

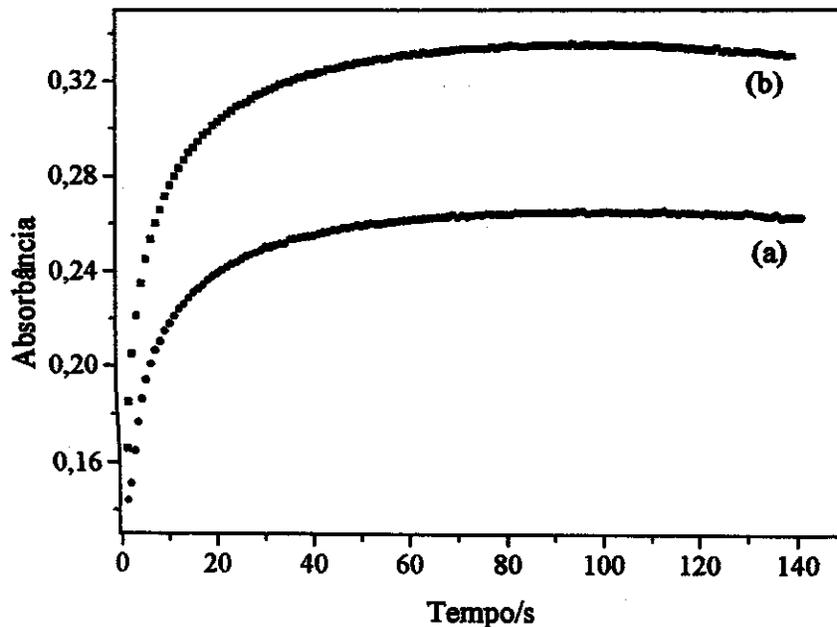


Figura 27. Curvas cinéticas baseadas no aumento de absorção em 294 nm (correspondente à formação de GS-SG) na reação de oxidação de solução aquosa não tamponada de GSH por íons Cu^{2+} ($5000 \mu\text{mol L}^{-1}$) (a) $[\text{GSH}] = 65 \mu\text{mol L}^{-1}$; (b) $[\text{GSH}] = 80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Temperatura = 30°C . Intervalo entre os espectros = 10s.

Utilizando-se o método da velocidade inicial (V_i) (Cox, 1994), foi possível estimar a ordem da reação em relação aos íons Cu^{2+} e em relação a GSH a partir dos coeficientes angulares das curvas de $\log V_i \times \log[\text{Cu}^{2+}]$ e $\log V_i \times \log[\text{GSH}]$, respectivamente. Os valores dos coeficientes angulares obtidos foram de $1,02 \pm 0,01$ e $1,13$, indicando que a reação é de primeira ordem em relação aos íons Cu^{2+} e a GSH, respectivamente. Portanto, a equação de velocidade da reação global de oxidação da GSH por íons cobre pode ser escrita de acordo com a Eq. 21.



No mecanismo de oxidação da GSH por íons Cu^{2+} , Smith *et al.* propuseram que a GSH é oxidada pelos íons Cu^{2+} resultando na redução do Cu^{2+} a Cu^+ . Usando-se a neocuproína, um quelante específico para íons Cu^+ (Dicks *et al.*, 1996; Dicks *et al.*, 1997) (Fig. 28), foi possível detectar, no presente trabalho, que o cobre é reduzido ao estado de oxidação (I) durante a reação de oxidação da GSH.

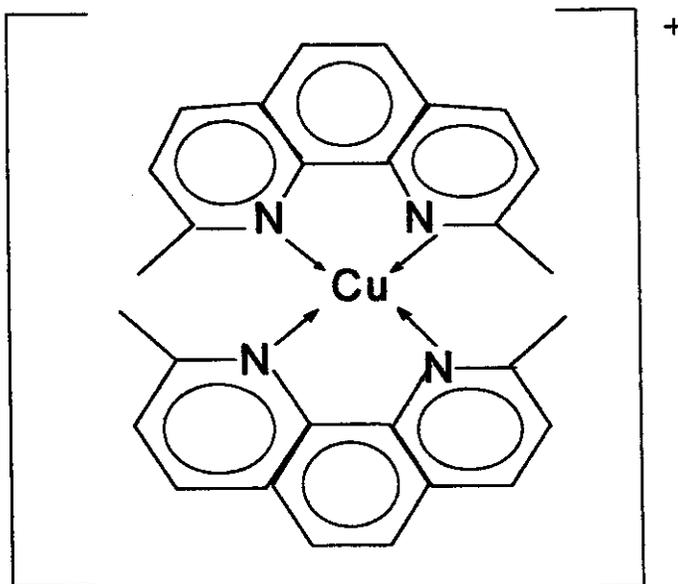


Figura 28. Estrutura do complexo Cu^+ -neocuproína. (Williams, 1996).

Quando uma solução de neocuproína foi adicionada a uma solução de CuCl_2 , não foram observadas variações espectrais na região do UV/vis. Entretanto, quando uma solução de CuCl_2 foi adicionada a uma solução de GSH que contém neocuproína observou-se imediatamente o aparecimento de uma coloração amarela na solução, correspondente a uma banda de absorção em 453 nm devido à formação do complexo Cu(I) -neocuproína (Fig. 29).

Pode-se considerar portanto, que os íons Cu^{2+} são reduzidos ao estado de oxidação (I) pelos íons glutionato, GS^- , da GSH, confirmando-se a proposta de Smith *et al.*.

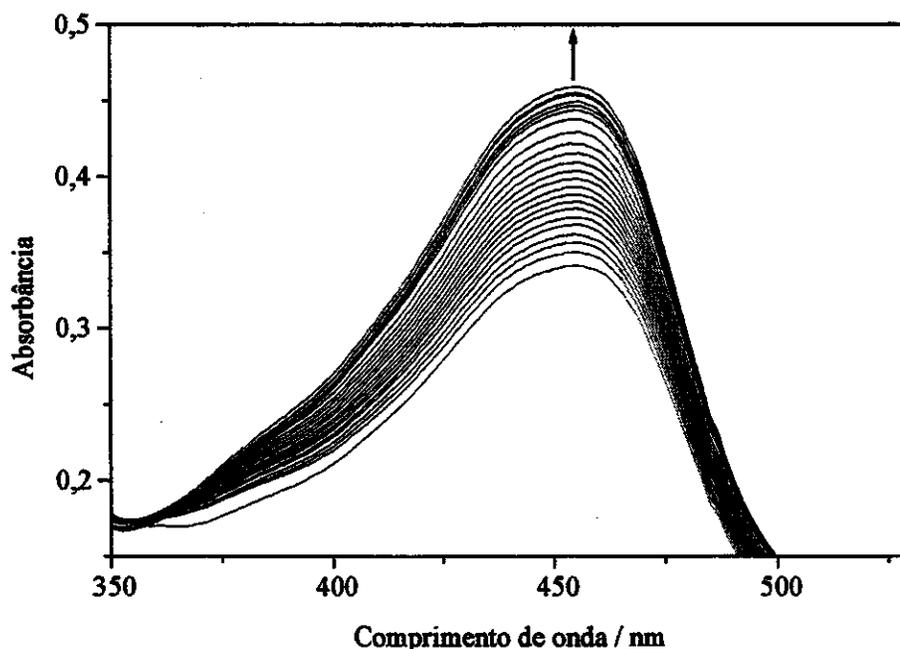


Figura 29. Detecção da formação do complexo Cu^+ -neocuproína em 453 nm em uma solução aquosa de GSH $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e neocuproína $118 \mu\text{mol L}^{-1}$ após a adição de uma solução de CuCl_2 $590 \mu\text{mol L}^{-1}$, a 30°C . Intervalo entre os espectros = 10s.

O mecanismo proposto na literatura para a oxidação de GSH por íons Cu^{2+} se processa via complexos $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}]^+$, $[\text{GS-Cu}^{\text{I}}]$ (Gorren *et al.*, 1996, Wood, *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 1994) e via complexo diglutationato-cobre $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}\text{-SG}]$ (Cavallini *et al.*, 1969, Birker e Freeman, 1977), dependendo da proporção $\text{GSH}:\text{Cu}^{2+}$ presente em solução. Gorren *et al.* estudaram a redução de Cu^{2+} por GSH espectrofotometricamente usando a técnica de “stopped flow” e observaram, através da banda de absorção em 355 nm, que um complexo intermediário entre GSH e Cu^{2+} , $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}]^+$ é formado em menos de 200 ms. Essa banda de absorção é atribuída à transição eletrônica de transferência de carga $\text{S} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ (McAninly *et al.*, 1993).

Dicks *et al.* (1997) propuseram que em condições nas quais a concentração de GSH em solução é igual ou superior ao dobro da concentração dos íons Cu^{2+} (como nas

concentrações expressas na Fig. 27), ocorre a formação do complexo diglutationato-cobre. Esse complexo já foi identificado através de técnicas espectroscópicas e por ressonância paramagnética de elétrons (Cavallini *et al.*, 1969; Davis *et al.*, 1983) e apresenta a estrutura mostrada na Fig. 30. Em sistemas vivos, este complexo desempenha um papel biológico de importância fundamental, pois a GSH ao se complexar com íons Cu^{2+} evita a oxidação da oxihemoglobina por estes íons (Smith e Reed, 2000).

A velocidade de formação do complexo $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}\text{-SG}]$ é rápida sendo calculada em 70 ms pela técnica do “stopped flow” (Cavalli *et al.*, 1969). O complexo se dissocia liberando Cu^+ e GS^\bullet , sendo que o Cu^+ é oxidado a Cu^{2+} e o radical GS^\bullet sofre dimerização. Nesse caso, a oxidação da GSH não ocorre através de íons Cu^{2+} livres em solução, mas através de íons Cu^{2+} ligados a duas moléculas de GS^- , ilustrando que os íons Cu^{2+} ligados a peptídios e proteínas podem ser capazes de oxidar os tióis nos sistemas biológicos.

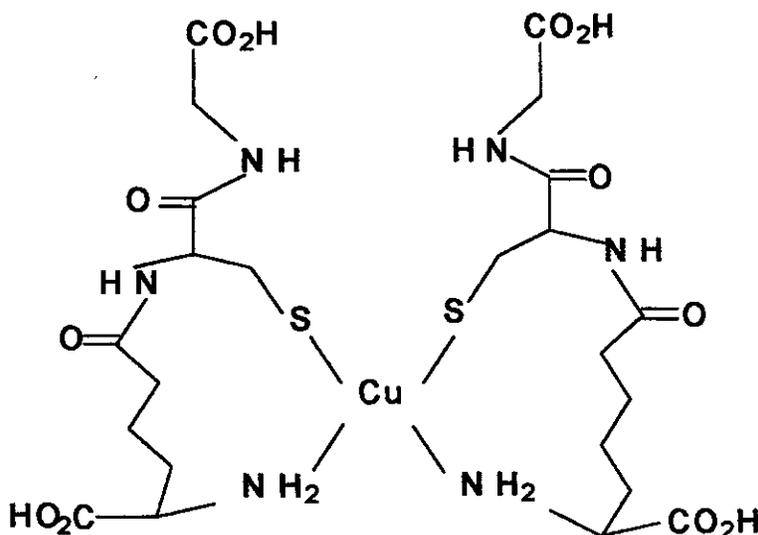


Figura 30. Estrutura do complexo diglutationato-cobre (Cavallini *et al.*, 1969; Davis *et al.*, 1983).

Numa condição de excesso de GSH em relação aos íons Cu^{2+} , não ocorre a imediata oxidação da GSH à GSSG e consequente redução dos íons Cu^{2+} a Cu^+ , mas ocorre

primeiramente a formação do complexo diglutationato-cobre [GS-Cu^{II}-SG]. Os íons Cu²⁺ podem ser diretamente reduzidos pela GSH, ou essa redução pode ocorrer a partir do complexo [GS-Cu^{II}-SG], dependendo da proporção GSH:Cu²⁺. Essas duas vias de reação são ilustradas na Fig. 31 que mostra a formação do complexo Cu⁺ - neocuproína nos dois casos.

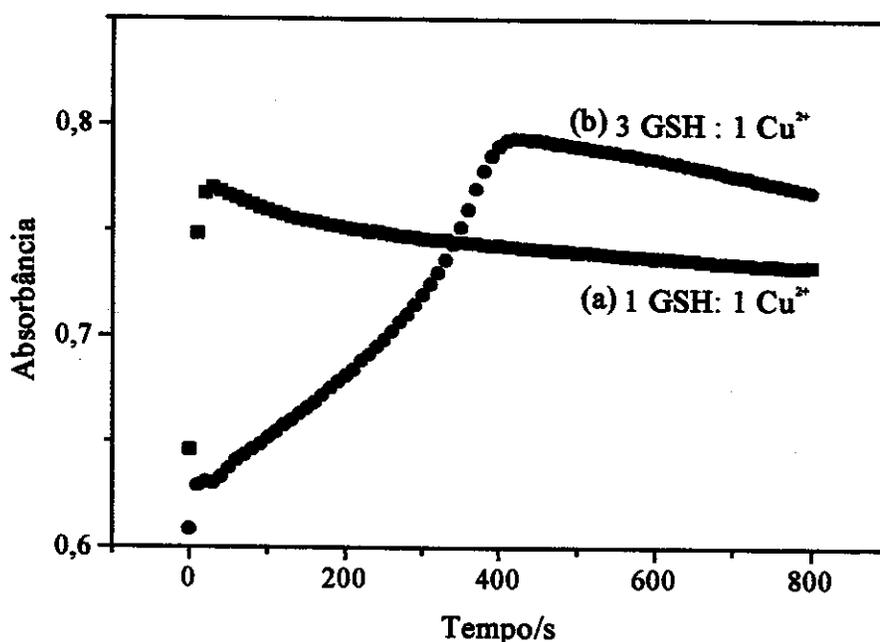


Figura 31. Curvas cinéticas monitoradas em 543 nm correspondentes à formação do complexo Cu⁺-neocuproína nas condições: (a) soluções aquosas de: $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de GSH, $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cu²⁺ e $2,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de neocuproína; (b) soluções aquosas de: $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de GSH, $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cu²⁺ e $2,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de neocuproína.

A Figura 31 mostra as curvas cinéticas de absorbância em função do tempo monitoradas em 543 nm, correspondentes à formação do complexo Cu⁺-neocuproína, a partir de soluções aquosas de GSH, íons Cu²⁺ e neocuproína, em duas condições distintas: (a) 1 GSH : 1 Cu²⁺ e (b) 3 GSH : 1 Cu²⁺. Na curva (a) da Fig. 31, observa-se claramente que

houve a imediata redução dos íons Cu^{2+} pelo GS^- e conseqüente complexação com a neocuproína, pois nessa condição os íons GS^- agem como agentes redutores do cobre. Entretanto, na curva (b) da Fig. 31, devido ao excesso de íons GS^- em relação a íons Cu^{2+} , ocorre primeiramente a formação do complexo $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}-\text{SG}]$, o qual se dissocia liberando os íons Cu^+ . Os íons cobre são reduzidos ao estado de oxidação I pelo GS^- à partir da dissociação do complexo $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}-\text{SG}]$, retardando a velocidade de reação de complexação Cu^+ -neocuproína, como mostrado na curva b da Fig. 31. Dessa forma, tanto a velocidade inicial como a extensão de reação de oxidação da GSH por íons Cu^{2+} depende diretamente da proporção $\text{GSH}:\text{Cu}^{2+}$.

Considera-se que os íons Cu^{2+} atuam como reagente catalítico na oxidação da GSH, pois são constantemente regenerados na presença de O_2 . Entretanto, a Fig. 26 mostra que para uma concentração fixa em excesso de GSH ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) e variando-se a concentração de íons Cu^{2+} adicionados (de $0,90$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$), a extensão da reação, ou seja, a quantidade de GSSG formada, aumenta com o aumento da concentração de íons Cu^{2+} adicionados na solução de GSH. Se os íons Cu^{2+} atuam como reagente catalítico, a extensão da reação de oxidação da GSH não deveria depender da concentração de íons Cu^{2+} adicionados. A explicação para esse resultado aparentemente contraditório, pode ser dada considerando-se a possibilidade de formação de um complexo entre o produto de oxidação (GSSG) e os íons Cu^{2+} . Complexos de GSSG e Cu^{2+} na proporção 1:1 já foram identificados (Noble *et al.*, 1999) e apresentam a estrutura mostrada na Fig. 32.

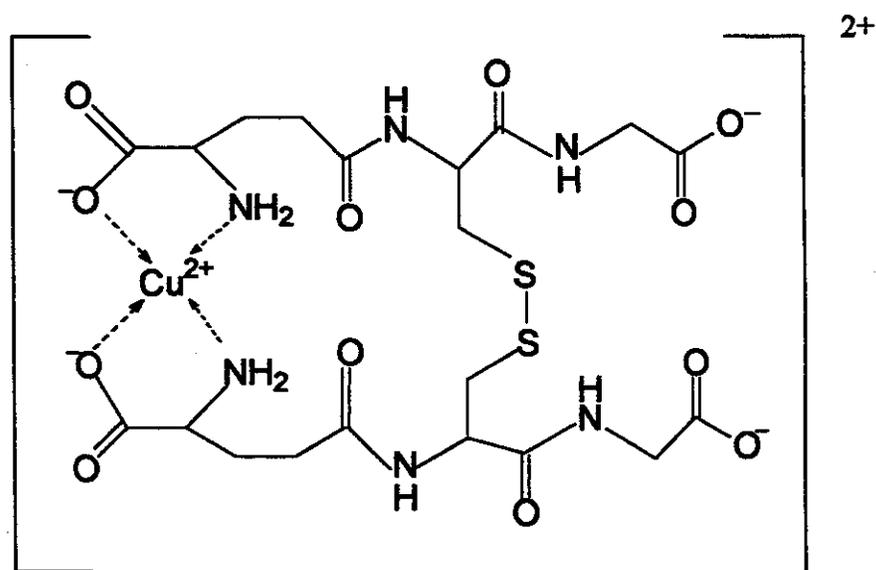


Figura 32. Estrutura do complexo $[\text{GSSG} - \text{Cu}^{\text{II}}]^{2+}$ (Noble *et al.*, 1999).

A formação do complexo $[\text{GSSG} - \text{Cu}^{\text{II}}]^{2+}$ explica os resultados obtidos na Fig. 26. O produto de reação, GSSG, atua como complexante dos íons Cu^{2+} , reduzindo a concentração de íons Cu^{2+} livres em solução. Dessa forma, pequenas concentrações de Cu^{2+} adicionados na solução de GSH resultam em uma menor extensão de reação, pois à medida que GSSG é formada, ocorre a complexação dos íons Cu^{2+} , e dessa forma, a concentração de íons Cu^{2+} livre em solução é reduzida, e conseqüentemente, a reação de oxidação da GSH atinge uma baixa extensão.

A adição de íons Cu^{2+} em concentrações maiores resulta numa maior extensão da reação após o atingimento do equilíbrio. Como a velocidade de reação de oxidação da GSH depende da concentração de íons Cu^{2+} presentes em solução (Eq. 21) a adição de íons Cu^{2+} em concentrações maiores também aumentará a velocidade de oxidação da GSH.

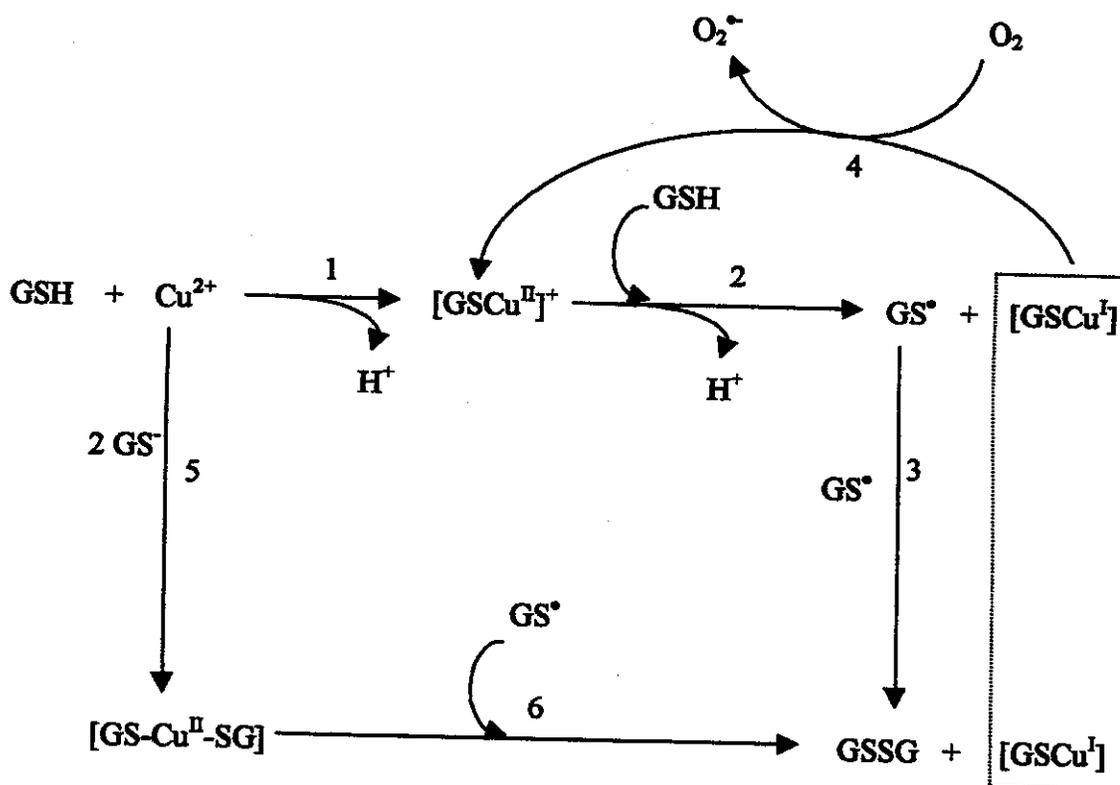
A extensão de reação de oxidação de GSH por íons Cu^{2+} mostrada na Fig. 27 apresenta valores diferentes em função da concentração de GSH adicionada, para uma mesma concentração de íons Cu^{2+} presentes. Nesse caso, é a concentração de GSH (reagente limitante) que determina a extensão de formação da GSSG.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho e nas informações da literatura, é possível propor que a oxidação da GSH na presença de íons Cu^{2+} ocorre de acordo com o mecanismo do esquema 3. Primeiramente os íons Cu^{2+} reagem com a GSH e formam o complexo $[\text{GS} - \text{Cu}^{\text{II}}]^+$ (reação 1). À partir deste complexo formado na reação 1, um elétron é transferido do GS^- para os íons Cu^{2+} formando GS^\bullet , e na presença de outra molécula de GSH, o íon Cu^{2+} é reduzido a Cu^+ formando o complexo $[\text{GSCu}^{\text{I}}]$ (reação 2). Dois radicais GS^\bullet formam o dímero GSSG (reação 3). O íon Cu^+ presente no complexo $[\text{GSCu}^{\text{I}}]$ é oxidado pelo O_2 regenerando Cu^{2+} no complexo $[\text{GSCu}^{\text{II}}]$ (reação 4).

Numa condição de excesso de GSH em relação aos íons Cu^{2+} ($\text{GSH}/\text{Cu}^{2+} \geq 2$) ocorrerá a formação do intermediário $[\text{GS} - \text{Cu}^{\text{II}} - \text{SG}]$ (reação 5), o qual na presença de GS^\bullet se dissocia formando GSSG e $[\text{GSCu}^{\text{I}}]$ (reação 6).

Em meio aeróbico, os íons Cu^+ presentes no composto intermediário $[\text{GSCu}^{\text{I}}]$ do esquema 3 são oxidados pelo oxigênio dissolvido, formando o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$). A reação global desta etapa é:

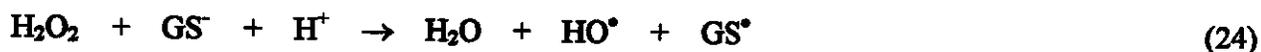




Esquema 3. Proposta de mecanismo para a reação de oxidação da GSH por íons Cu²⁺ e oxigênio.

Já foi demonstrado que as reações de oxidação de RSHs por Cu²⁺ produzem o radical superóxido (Sean e Frei, 1997). Nos passos seguintes, a molécula de oxigênio é reduzida em etapas sucessivas de transferência de elétron (Eqs. 23-26) (Boveris, 1998; Michaelis, 1946). Nessas etapas ocorre a formação de intermediários como peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, sendo este último um dos mais reativos radicais químicos. Apesar do peróxido de hidrogênio não ser um radical livre e ser quimicamente estável, em sistemas biológicos o H₂O₂ é facilmente clivado homoliticamente por metais de transição produzindo o radical hidroxila.





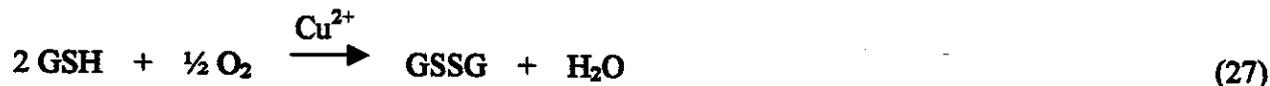
Finalmente, o último produto de redução do oxigênio é a água:



Os radicais GS^\bullet se combinam formando o dímero:



A reação global pode ser escrita como:



Em experimentos de oxidação de uma solução aquosa de GSH pelo oxigênio, através do borbulhamento de ar diretamente na solução de GSH, sem a adição de íons Cu^{2+} , não foi possível observar a formação da GSSG. Da mesma forma, não foi possível observar a oxidação da GSH através da adição de H_2O_2 e elevação da temperatura a 50°C por um período de aproximadamente 4 horas, sem a adição de íons Cu^{2+} . Portanto, as reações mostradas no esquema 3, envolvendo necessariamente a presença de Cu^{2+} , são fundamentais na oxidação dos RSHs.

3.2- Oxidação da S-nitrosoglutationa pela adição de íons Cu^{2+}

A Figura 33 mostra o efeito da adição de íons Cu^{2+} em uma solução aquosa de GSNO a 25°C , através do monitoramento das variações espectrais da banda de absorção em 545 nm da GSNO.

Pode-se observar que a adição de íons Cu^{2+} aumenta a velocidade inicial de decomposição térmica da GSNO. A ação de íons Cu^{2+} na estabilidade de RSNOs pode ser, portanto, usada para modular a liberação de NO^{\bullet} a partir da GSNO.

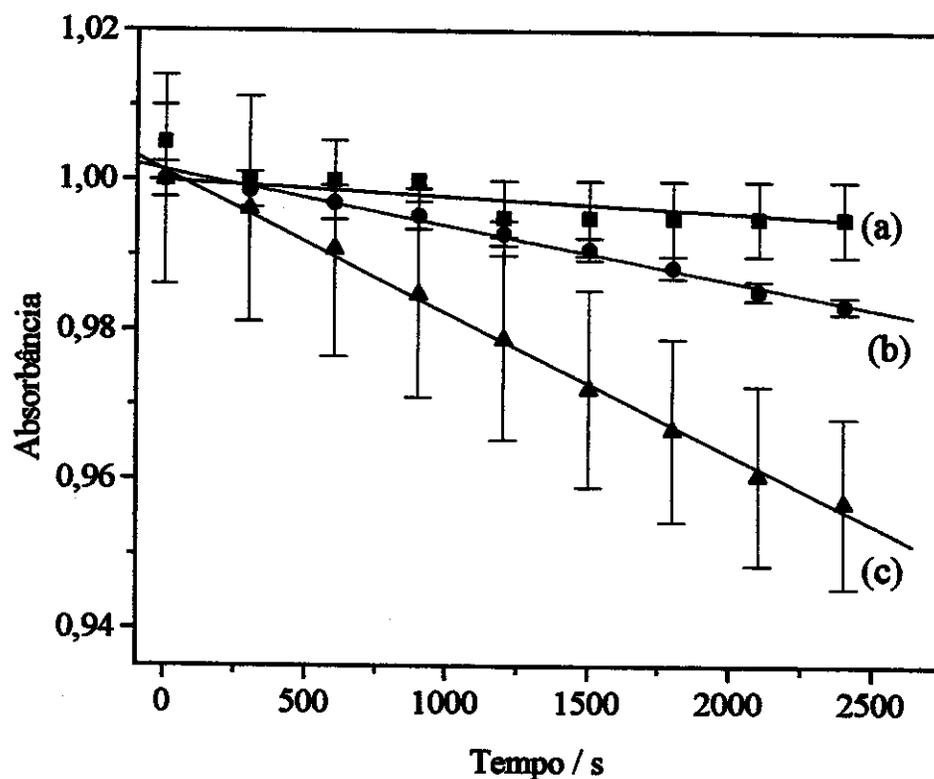


Figura 33. Curvas cinéticas monitoradas em 545 nm correspondentes à decomposição de soluções aquosas de GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) a 25°C . (a) sem adição de íons Cu^{2+} ; (b) adição de solução aquosa não tamponada de $\text{Cu}^{2+} 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (c) adição de solução aquosa não tamponada de $\text{Cu}^{2+} 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os traços nas curvas correspondem à regressão linear dos pontos.

A Figura 34 mostra o gráfico de barras das velocidades iniciais de decomposição térmica

da GSNO na presença e ausência de íons Cu^{2+} . Pode-se observar que à medida que se aumenta a concentração de íons Cu^{2+} adicionados à solução de GSNO aumenta a velocidade inicial de decomposição térmica da mesma.

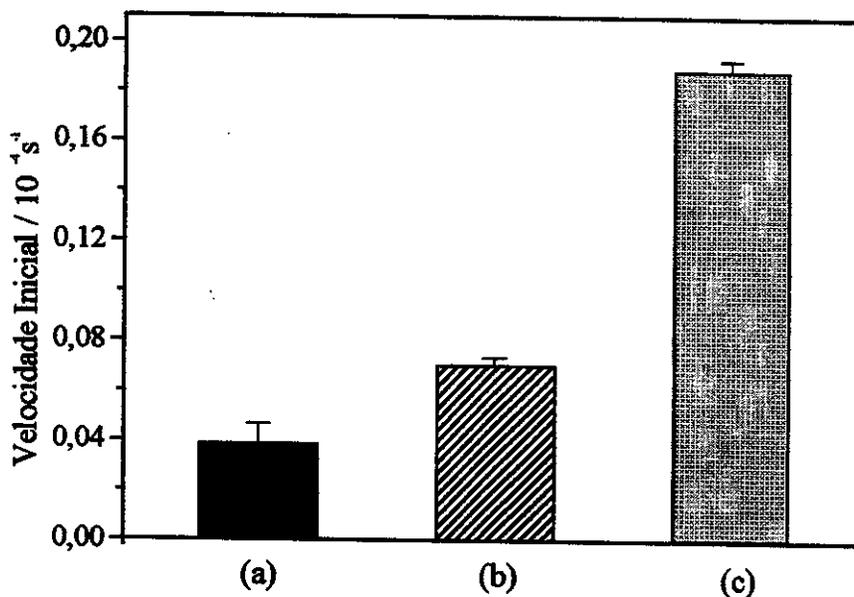


Figura 34. Velocidades iniciais de decomposição da GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) a 25° C nas seguintes condições: (a) sem adição de íons cobre, (b) $[\text{Cu}^{2+}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $[\text{Cu}^{2+}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Com base nesses resultados, é possível propor o mecanismo apresentado no esquema 4. Neste mecanismo, os íons Cu^{2+} presentes na solução favorecem a via heterolítica de decomposição da GSNO. Askew *et al.* (1995) constataram que a reação de decomposição de RSNOs pela adição de íons Cu^{2+} é dependente do pH da solução: à medida que o pH aumenta as velocidades de decomposição dos RSNOs aumentam significativamente, com um máximo na região de pH 7. Esse resultado está de acordo com um mecanismo que envolve a oxidação do ânions GS^- presentes no equilíbrio de dissociação heterolítica da ligação S-N (Eq.28).

pelos íons GS^- , estudou-se a decomposição da GSNO por íons Cu^{2+} na presença de um excesso de GSH. A Figura 35 mostra as curvas cinéticas de decomposição da GSNO, monitoradas em 545 nm, para uma solução aquosa de GSNO na presença de íons Cu^{2+} (curva a) e para uma solução aquosa de GSNO na qual foram adicionadas soluções aquosas de GSH e de íons Cu^{2+} (curva b).

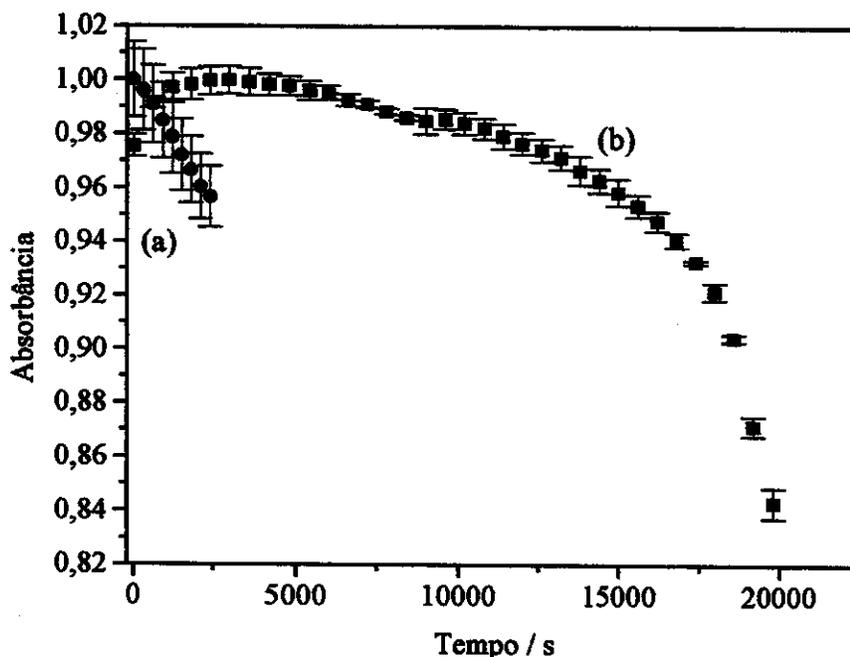


Figura 35. Curvas cinéticas monitoradas em 545 nm para uma solução aquosa de GSNO ($46,5 \text{ mmol L}^{-1}$) a 25°C nas seguintes condições: (a) sem adição de íons Cu^{2+} e GSH, (b) com adição de soluções aquosas não tamponadas de Cu^{2+} ($9,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e GSH ($7,71 \text{ mmol L}^{-1}$). Intervalo entre os espectros = 10 min.

A curva b da Fig. 35 mostra que existe um período inicial de indução (até aproximadamente *ca.* 10 000 s), a partir do qual ocorre a decomposição da GSNO. Dicks *et al.* (1997) mostraram resultados semelhantes na decomposição de cinco RSNOs, entre eles a GSNO, pela adição de

Cu^{2+} e RSH.

Pode-se considerar que o período inicial de indução na curva b da Fig. 35 ocorre devido a formação do complexo de diglutationato-cobre $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}\text{-SG}]$, em função do excesso de GSH presente em solução, de acordo com a reação 5 do esquema 3. Esta complexação dos íons Cu^{2+} com os íons GS^- , provenientes do excesso de GSH, torna os íons Cu^{2+} menos disponíveis para a oxidação dos íons GS^- provenientes da GSNO (reações 4 e 5 do esquema 4) retardando a decomposição da GSNO, justificando o período inicial de indução na curva b da Fig. 35.

Dessa forma, os íons GS^- em excesso (curva b) formam o complexo $[\text{GS-Cu}^{\text{II}}\text{-SG}]$, o qual se dissocia formando a GSSG e liberando os íons Cu^+ , de acordo com as reações 5 e 6 do esquema 3. Os íons Cu^+ assim formados são oxidados a Cu^{2+} pelo oxigênio dissolvido (Eq. 22), e catalisam a decomposição da GSNO, de acordo com as reações 4 e 5 do esquema 4. Na curva (a) da Fig. 35 não existe o período inicial de indução, pois não há excesso de GSH presente em solução, e nesse caso, ocorre a decomposição da GSNO através da oxidação dos íons GS^- provenientes da dissociação heterolítica da GSNO (reações 4 e 5 do esquema 4).

4. Conclusões

Nesta parte do trabalho, foi possível demonstrar, através do método da velocidade inicial, que a reação de oxidação da GSH por íons Cu^{2+} segue uma cinética de primeira ordem em relação à GSH e aos íons Cu^{2+} . Através da adição de neocuproína, complexante específico dos íons Cu^+ , foi possível verificar que os íons Cu^{2+} são reduzidos a Cu^+ e conseqüentemente, a GSH é oxidada ao seu dímero GSSG. Nesse processo de oxidação-redução, apesar dos íons Cu^{2+} atuarem como reagente catalítico, pois são constantemente regenerados pelo oxigênio dissolvido em solução, a extensão da reação de oxidação da GSH depende da concentração de íons Cu^{2+} em solução. Isso ocorre devido à formação do complexo $[\text{GSSG-Cu}]^{2+}$, o qual sequestra os íons Cu^{2+} livres em solução, limitando a extensão de reação de oxidação da GSH.

Foi demonstrado, através da cinética de formação do complexo Cu^+ -neocuproína, que a

proporção $\text{GSH}:\text{Cu}^{2+}$ é determinante da velocidade de redução dos íons Cu^{2+} a Cu^+ , e consequentemente da extensão de oxidação da GSH a GSSG. Em condições de excesso de íons Cu^{2+} em relação a GSH, ocorre a imediata redução dos íons Cu^{2+} com consequente oxidação da GSH. Em condições de excesso de GSH em relação aos íons Cu^{2+} , não há a imediata redução dos íons Cu^{2+} a Cu^+ . Nesse caso, ocorre a formação do complexo diglutationato-cobre $[\text{GS}-\text{Cu}^{\text{II}}-\text{SG}]$, como descrito na literatura.

Os íons Cu^{2+} também se mostraram eficientes na decomposição térmica da GSNO com liberação de NO° . Os resultados obtidos estão de acordo com um mecanismo que envolve a quebra heterolítica da ligação S-N. Nesse caso, a adição de um excesso de GSH causa um período inicial de indução, a partir do qual ocorre a decomposição da GSNO catalisada pelos íons Cu^{2+} . Esse período inicial de indução ocorre devido à formação do complexo $[\text{GS}-\text{Cu}^{\text{II}}-\text{SG}]$, formado pelos íons GS^- provenientes do excesso de GSH, retardando a decomposição da GSNO.

Esses resultados possibilitaram a elaboração de um mecanismo para a reação de oxidação de GSH e GSNO mediada por íons Cu^{2+} , ilustrando a importância das reações cobre-enxofre nos sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnelle, D.R.; Stamler, J.S., NO⁺, NO^o and NO^r donation by S-nitrosothiols: Implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1995), **318**, 279-285.
- Arulsamy, N.; Bohle, D.S.; J.A.; Irvine, G.J.; Jordan, P.A.; Sagan, E., Interrelationships between conformational dynamics and redox chemistry of S-nitrosothiols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1995), **4**, 741-745.
- Askew, S.C.; Barnett, D.J.; McAnilt, J.; Williams, D.L.H., Catalysis by Cu²⁺ of nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1995), **4**, 741-745.
- Barbier, A.J.; Lefebvre, R.A., Influence of S-nitrosothiols and nitrate tolerance in the rat gastrite fundus. *Br. J. Pharmacol.*, (1994), **111**, 1280-1286.
- Barichello, J.M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Naggai, T., Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int. J. Pharm.*, (1999), **184**, 189-198.
- Barrett, J.; Debenham, D.F.; Glauser, J., Electronic spectrum and photolysis of S-nitrosotoluene- α -thiol. *Chem. Comm.*, (1965), **12**, 248-249.
- Bartberger, M.; Houk, K.N.; Powell, S.C.; Mannion, J.D.; Lo, K.Y.; Stamler, J.S.; Toone, E.J., Theory, spectroscopy, and crystallographic analysis of S-nitrosothiols: conformational distribution dictates spectroscopic behavior. *J. Am. Chem. Soc.*, (2000), **122**, 5889-5900.
- Bedioui, F., Characterization of nitric oxide and superoxide in biological systems-foreword. *Analisis*, (2000), **28**, 443-444.
- Belder, A.; Less, C.; Martin, J.; Moncada, S., Treatment of hellp- syndrome with nitric oxide. *Lancet*, (1995), **345**, 124-128.
- Beloso, P.H.; Williams, D.H.L., Reversibility of S-nitrosothiol formation. *Chem. Comm.*, (1997), **1**, 89-92.
- Benson, A.M.; Batzinger, R.P.; Ou, S.Y.L.; Bueding, E.; Cha, Y.; Talalay, P., *Cancer Res.*, (1978), **38**, 4486-4495. (Citado em Meister, 1983).
- Birker, P.J.M.W.; Freeman, H.C., Structure, properties, and function of a copper(I)-copper(II) complex of D-penicillamine: pentathallium(I) μ_8 -chloro-dodeca(D-penicillaminato)-octacuprate(I)hexacuprate(II) n-hydrate. *J. Am. Chem. Soc.*, (1977), **99**, 6890-6899.
- Blumberg, W.E.; Peisach, J., Bis (thiosemi carbazone) and other nitrogens and sulfur ligated complexes of copper (2). *J. Chem. Phys.*, (1968), **49**, 1793-1797.

- Borges, S.S.S.; M.G. Gomes., Óxido Nítrico: A molécula da década. *Anais Assoc. Bras. Quím.*, (1997), **46**, 242-249.
- Boveris, A., Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues., Shock 1998: oxygen, nitric oxide and therapeutic perspectives, International Symposium, Academeia Nacional de Medicina, Buenos Aires, (1998).
- Boyd, S.C.; Sasame, H.A.; Boyd, M.R., *Science*, (1979), **205**, 1010-1012. (Citado em Meister, 1983).
- Brealey, G.J.; Kasha, M., The role of hydrogen bonding in the $n \rightarrow \pi^*$ Blue-shift phenomenon. *J. Am. Chem. Soc.*, (1955), **77**, 4462-4468.
- Butler, A.R.; Glidewell, C.; McIntosh, A.S.; Reed, D.; Sadler, I.H., C-12 NMR study of the binding of nitroprusside and hexacyanoferrate (II) to aquocobalamin, vitamin-B12A. *Inorg. Chem.*, (1986), **25**, 970-973.
- Cameron, R.; Kellen, J.; Kolin, A.; Malkin, A.; Farber, E., *Cancer Res.*, (1978), **38**, 823-829. (Citado em Meister, 1983).
- Cavallini, D.; de Marco, Carlo; Duprê, S.; Rotilio, G., The copper catalyzed oxidation of cysteine to cystine. *Archs. Biochem. Biophys.*, (1969), **130**, 354-361.
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A., *Physiol. Chem.*, (1978), **359**, 1035-1045. (Citado em Meister, 1983).
- Clancy, R.; Levartovsky, D.; Leszczynska-Piziak, J; Yegudin, J.; Abramson, S., Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1994), **91**, 3680-3684.
- Clarke, M.J.; Gaul, J.B., em "Chemistry revelant to biological effects of nitric oxide and metallanitrosyls: Structure and bonding." Springer-Veriag, New York, Vol. 81,1993.
- Cox, B.G., em "Modern liquid phase kinetics", Oxford science publications, Oxford, 1994.
- Cullota, E.; Koshland, D.E.Jr., The molecule of the year. *Science*, (1992), **258**, 1861-1865.
- Davidson, R.L., 'Handbook of water-soluble gums and resins", 1st ed.; McGraw-Hill; New York, 1980, pp. 18-2, 18-14.
- Davis, F.J.; Gilbert, B.C.; Norman, R.O.C., electron spin resonance studies. Part 66. Characterization of copper(II) complexes in the oxidation of D-penicillamine, L-cysteine, and related sulphur-containing compounds. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1983), **11**, 1763-1771.
- (a) De Oliveira, M.G.O.; Shishido, S.M.; Seabra, A.B., "Sistema de nitrosação baseado no borulhamento de uma mistura gasosa de óxido nítrico e ar para a nitrosação de tióis e outros

- substratos”, patente requerida nº 447 de 09/02/2001 (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).
- (b) De Oliveira, M.G.O.; Shishido, S.M.; Seabra, A.B., “Formulações de S-nitrosotióis doadores de óxido nítrico incorporados em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol, e metodologia para incorporação de S-nitrosotióis em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol”, patente requerida nº. 4.238-2 de 06/09/2000 (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).
- Dewar, M.J.S.; Reynolds, C.H., Amino/3 study of ethylene dication . *Theochem J. Mol Struct.*, (1986), **29**, 209-214.
- Dicks, A.P.; Beloso, P.H.; Williams, D.L.H., Decomposition of S-nitrosothiols: the effects of added thiols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1997), **8**, 1429-1434.
- Dicks, A.P.; Swift, H.R.; Williams, D.L.H.; Butler, A.R.; Al-Sadoni, H.H.; Cox, B.G., Identification of Cu⁺ as the effective reagent in the nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1996), **4**, 481-487.
- Do, K.; Benz, B.; Grima, G.; Gutteck-Amsler, U.; Kluge, I.; Salt, T., Nitric oxide precursor argininnine and S-nitrosoglutathione in synaptic and glial function. *Neurochem. Int.*, (1996), **29**, 213-224.
- Feldaman, P.L.; Griffith, O.W.; Hong, H.; Stwehr, D.J., Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric-oxide synthase by L-N(G)-methylarginine requires NADPH-dependence by hidroxylation. *J. Med. Chem.*, (1993), **36**, 491-492.
- Feuer, H., em “The chemistry of the nitro and nitroso groups” Interscience publishers, New York, 1969, pp. 10-14.
- First International Conference: Biology, Chemistry and Terapeutic Applications of Nitric Oxide, 3-7 Junho de 2000, São Francisco, Califórnia, EUA.
- Fishman, W.H. ed., Wood, J.L. em: “In Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis”, New York: Academic., 1970, pp- 261-299. (Citado em Meister, 1983).
- Fontecave, M; Pierre, J.L., The basic chemistry of nitric oxide and its possible biological reactions. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1994), **131**, 620-631.
- Ford, P.C.; Wink, D.A.; Stambury, D.M., Autoxidation kinetics of aqueous nitric-oxide. *FEBS Lett.*, (1993), **326**, 1-3.
- Frank, J.; Rabinowitch, E., *Trans. Faraday Soc.*, (1934), **30**, 120 (citado em Kochi, 1973).
- Furchgott, R.F.; Jothianadan, D., Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation involving cyclic-GMP-relaxation induced by nitric-oxide, carbon-monoxide and light. *Blood Vessels*, (1991), **269**, 6282-6286.

Gaston, B.; Reilly, J.; Drazen, J.M.; Fackler, J.; Ramdev, P.; Arnelle, D.; Mullins, M.E.; Sugarbaker, D.J.; Chee, C.; Singel, D.J.; Loscalzo, J.; Stamler, J.S., Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1993), **90**, 10957-10961.

Gaston, B.; Sears, J.; Woods, J.; Hunt, J.; McMahon, T.; Stamler, J., Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet*, (1998), **351**, 1317-1319.

Giovanni, G.; Land, J.; Keir, G.; Thompson, E.; Heales, S., Adaption of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrite levels. *Ann. Clin. Biochem.*, (1997), **34**, 193-198.

Gordge, M.P.; Addis, P.; Noronha-Dutra, A.; Hothersall, J., Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione. *Biochem. Pharmacol.*, (1998), **55**, 657-665.

Gordge, M.P.; Hothersall, J.S.; Neil, G.H.; Dutra, A.A.N., Role of a copper (I)-dependence enzyme in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br. Pharmacol. J.*, (1996), **119**, 533-538.

Gordge, M.P.; Hothersall, J.S.; Noronhadutra, A.A., Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br. J. Pharmacol.*, (1998), **124**, 141-148.

Gorren, A.C.F.; Schrammel, A.; Schmidt, K.; Mayer, B., Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996), **330**, 219-228.

Greenberg, D.M. ed.; Meister, A., em: "Metabolism of sulfur compounds, metabolic pathways", New York: Academic. 3rd ed., 1975, pp. 101-188. (Citado em Meisters, 1983).

Guillory, W.A.; Johnston, H.S., *J. Chem. Phys.*, (1964), **42**, 2457-2461. (Citado em Lancaster, 1996.)

Gutierrez, H.H.; Nieves, B.; Chumley, P.; Rivera, A.; Freeman, B.A., Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: oxidant-protective reactions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, (1996), **21**, 43-52.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., *Methods Enzymol.*, (1990), **186**, 1-85. (Citado em Ohta, 2000).

Heller, H.G.; Langan, J.R., Photochromic heterocyclic fulgides. Part 3. The use of (E)-alpha-(2,5-dimethyl-3-furyl)ethylidene) (isopropylidene) succinic anhydride as a simple convenient chemical actinometer. *J. Chem. Soc. Perkin 2*, (1981), **2**, 341-343.

Hogg, N., Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Rad. Bio. Med.*, (2000), **28**, 1478-1486.

Ignarro, L.J.; Buga, G.M.; Wood, K.S.; Byrns, S., Endothelium-derived relaxing factor produced from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1987), **84**, 9265-9269.

- Ignarro, L.J.; Byrns, R.E.; Wood, K.S., Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity nitric oxide radical. Em "Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium" New York, Raven Press, 1988, pp. 427-436.
- Jagannath, C.; Sepulveda, E.; Actor, J.K.; Luxem, F.; Hunter, R.L., Effect of poloxamer CRL-1071 on drug uptake and nitric-oxide mediated killing of mycobacterium avium by macrophages. *Immunopharmacology*, (2000), **48**, 185-197.
- Jakoby, W.B., em: "Enzymatic basis of detoxication", Academic Press, New York, 1980, Vol. 2. (Citado em Meister, 1983).
- Jeong, B.; Choi, Y.K.; Bae, Y.H.; Zentner, G.; Kim, S.W., New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *J. Control. Release*, (1999), **62**, 109-114.
- Jia, L.; Bonaventura, J.; Stamler, J.S., S-Nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, (1996), **380**, 21-25.
- Jo, S.; Park, K., Novel poly(ethylene glycol) hydrogels from silylated PEGs. *J. Bioact. Compat. Pol.*, (1999), **14**, 457-473.
- Jones, K. em : "Comprehensive Inorganic Chemistry" Pergaman, Oxford, 1973.
- Kharitnov, V.G.; Sundauist, A.R.; Sharma, V.S., Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 28158-28164.
- Kilbourn, L.M.; Adams, R.G.; Fidler, I.J., Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.*, (1991), **51**, 2531-2535.
- Kochi, J.K. ed.; Koenig, T.; Fischer, H., "Free radicals", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1973, vol. 1, pp. 157-189.
- Kodera, Y.; Matsushima, A.; Hiroto, M.; Nishimura, H.; Ishii, A.; Ueno, T.; Inada, Y., Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. *Prog. Polym. Sci.*, (1998), **23**, 1233-2171.
- Kosower, E.M.; Kosower, N.S.; Kenethylo, H., *Biochem. Biophy. Res. Comum.*, (1974), **59**, 347-351. (Citado em Meister, 1983)
- Kuo, R.K.; Baxter, G.T.; Thompson, S.H.; Stricker, S.A.; Bonaventura, J.; Epel, D., NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*, (2000), **406**, 633-636.
- Lancaster, J.Jr., "Nitric Oxide – Principles and Actions", Academic Press, London, 1996, pp. 3-5.
- Lewis, R.S.; Tannenbaum, S.R.; Deen, W.M., Kinetics of N-nitrosation in oxygenated nitric oxide solutions at physiological pH: role of nitrous anhydride and effects of phosphate and chloride. *J. Am. Chem. Soc.*, (1995), **117**, 3933-3939.

- Makings, L.R.; Tsien, R.Y., Caged nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 6282-6285.
- Matheis, G.; Sherman, M.P.; Buckberg, G.D.; Haybron, D.M.; Young, H.H.; Ignarro, J.L., Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.*, (1992), **262**, 616-620.
- Matsunaga, K.; Furchgott, R.F., Interactions of light and sodium-nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1989), **248**, 687-695.
- McAninly, J.; Williams, D.L.H.; Askew, S.C.; Butler, A.R.; Russell, C., Metal-ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, (1993), **23**, 1758-11759.
- Meister, A.; Anderson, M.E., Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, (1983), **52**, 711-760.
- Meister, A.; Griffith, O.W., *Cancer Treat. Rep.*, (1979), **63**, 1115-11121. (Citado em Meister, 1983).
- Meyer, D.J.; Kramer, N.; Ozer, B.; Ketterer, B., Kinetics and equilibria os S-nitrosothiol-thiol exchange between glutathione, cysteine, penicillamines and serum albumin. *FEBS Lett.*, (1994), **345**, 177-180.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A., Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, (1989), **38**, 1709-1715.
- Mulligan, M.S.; Hevel, J.M.; Marletta, M.A.; Ward, P.A., Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1991), **88**, 6338-6342.
- Mulligan, M.S.; Moncada, S.; Ward, P.A., Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. *Br. J. Pharmacol.*, (1992), **107**, 1159-1162.
- Noble, D.R.; Swift, H.R.; Williams, D.L.H., Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO). *Chem. Commun.*, (1999), **22**, 2317-2318.
- Novi, A.M., *Science*, (1981), **212**, 541-542. (Citado em Meister, 1983)
- Nowicki, J.P.; Duval, D.; Poignet, H; Sactton, B., Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, (1991), **204**, 339-340.
- Noyes, R.M., *J. Am. Chem. Soc.*, (1955), **77**, 2042 (citado em Kochi, 1973).
- Ohta, Y.; Shiraishi, N.; Nishikawa, T.; Morimitsu, N., Copper-catalyzed autoxidations of GSH and L-ascorbic acid: mutual inhibition of the respective oxidations by their coexistence. *Biochim. Biophys. Acta*, (2000), **1474**, 378-382.
- Pryor, W.A.; Church, D.F.; Govindam, C.K.; Crank, G., Oxidation of thiols by nitric-oxide

- and nitrogen-dioxide-synthetic utility and toxicologic implications. *J. Org. Chem.*, (1982), **47**, 156-159.
- (a) Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S., Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.*, (1987), **92**, 181-187.
- (b) Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S., Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, (1987), **2**, 1057-1058.
- Ragsdale, R.O., em; "Reactions of nitrogen (II) oxide: developments in inorganic nitrogen chemistry". Elsevier, Amsterdam, 1973.
- Rauhala, P.; Mohanakumar, K.P.; Sziraki, I.; Lin, A.M.; Chiuch, C.C., S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress in vivo. *Synapse*, (1996), **23**, 58-60.
- Richter-Aaddo, G.B.; Legzdins, P., em "Metal nitrosyls." Oxford University Press, New York, 1992.
- Roy, B.; Hardemare, A.M.; Fontecave, M., New thionitrites: synthesis, stability, and nitric oxide generation. *J. Org. Chem.*, (1994), **59**, 7019-7026.
- Sánchez-Soto, P.J.; Ginés, J.M.; Rabasco, A.M.; Justo, A.; Rodríguez, J.L.P., Thermal study of diazepam-poly(ethylene glycol) 6000 solid dispersions. *Thermochim. Acta*, (1990), **158**, 225-234.
- Schmid, K.; Pfeiffer, S.; Mayer, B., Reaction of peroxynitrite with hepes or mops results in the formation of nitric oxide donors. *Free Rad. Biol. Med.*, (1998), **24**, 859-862.
- Scrivens, G.; Gilbert, B.C.; Lee, T.C.P., EPR studies of copper-catalysed oxidation of thiols with peroxides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, (1995), **5**, 955-963.
- Seabra, A.B.; Shishido, S.M.; Morgon, N.; de Oliveira, M.G., "S-nitrosotiois doadores de NO[•]: relação entre cálculos teóricos e estabilidade térmica e fotoquímica". Trabalho a ser apresentado na 24^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, a ser realizada em maio de 2001 em Poços de Caldas, MG.
- Sean, M.L.; Frei, B., Physiological thiol compounds exert pro- and anti-oxidant effects, respectively, on iron- and copper-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, (1997), **1345**, 215-221.
- Sexton, D.J.; Muruganandam, A.; McKenney, D.J.; Mutus, B., Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.*, (1994), **59**, 463-467.
- Shishido, S.M. (1999). Figuras cedidas pela aluna de doutorado Silvia Mika Shishido do IQ/UNICAMP.

- Sies, H., Biochemistry of peroxisome in liver-cell. *Angew Chem. Int. Edit.*, (1974), **13**, 706-718.
- Singh, R.J.; Hogg, N.; Goss, S.P.A.; Antholine, W.E.; Kalyanaraman, B., Mechanism of superoxide dismutase/H₂O₂- mediated nitric oxide release from S-nitrosoglutathione-role of glutamate. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1999), **372**, 8-15.
- Shishido, S.M.; Oliveira, M.G., Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochem. Photobiol.*, (2000), **71**, 273-280.
- Smith, R.C.; Reed, V.D., Inhibition by thiols of copper(II)-Induced oxidation of oxyhemoglobin. *Chem. Biol. Interactions*, (1992), **82**, 209-217.
- Snyder, S.H., Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science*, (1992), **257**, 494-496.
- Stamler, J.S.; Simon, D.I.; Osborne, J.A.; Mullins, M.E.; Jaraki, O.; Michel, T.; Singel, D.J.; Loscalzo, J., S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1992), **89**, 444-448.
- Stochel G., High-pressure mechanistic studies on thermal and photochemical reactions of pentacyanoferrate complexes. *Coord. Chem. Rev.*, (1992), **114**, 269-295.
- Stochel, G.; Eldik, R.V., Photochemical behaviour of metal complexes. Pressure effect versus mechanism. *Coord. Chem. Rev.*, (1997), **159**, 153-170.
- Struck, A.T.; Hogg, N.; Thomas, J.P.; Kalyanaraman, B., Nitric oxide donor compounds inhibit the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to endothelial cells. *FEBS Lett.*, (1995), **361**, 291-294.
- Stuehr, D.J.; Feldaman, P.L.; Griffith, O.W., The surprising life of Nitric Oxide. *Chem. Eng. News*, (1993), **20**, 26-37.
- Turnery, T.A.; Wright, G.A., *Chem. Rev.*, (1959), **59**, 497-513 (Citado em Lancaster, 1996)
- Trujillo, M.; Naviliat, M.; Alvarez, M.N.; Peluffo, G.; Radi, R., Peroxynitrite biochemistry: formation, reactions and detection. *Analisis*, (2000), **28**, 518-527.
- Valentin, R.Z.; Gee, K.R.; Godwin, D.W., Control of NO concentration in solutions of nitrosothiol compounds by light. *Photochem. Photobiol.*, (1998), **67**, 282-288.
- Vasu, K.I., em "Mellor's Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical chemistry", Lagmano, London, 1967, Vol. 8, Supl. 2, parte 2, pp. 628.
- Wilkinson, G.; Gillard, R.D.; McCleverty, J.A., em "Comprehensive coordination chemistry-The synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds" Great Britain, Pergamon Press, 1987, pp. 102.

- Williams, D.L.H., The chemistry of S-nitrosothiols. *Acc. Chem. Res.*, (1999), **32**, 869-876.
- Williams, R.J.P., Nitric Oxide in biology: Its role as a ligand. *Chem. Soc. Rev.*, (1996), **2**, 77-83.
- Wink, D.A.; Nims, R.W.; Darbyshire, J.F.; Chirstodoulou, D.; Hanbauer, I.; Cox, G.W.; Laval, F.; Laval, J.; Cook, J.A.; Krishna, M.C.; DeGraff, W.G.; Mitchell, J.B., Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol.*, (1994), **7**, 519-525.
- Wood, P.D.; Mutus, B.; Redmond, R.W., The mechanism of photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione. *Photochem. Photobiol.*, (1996), **64**, 518-524.
- Yim, C.Y.; Bastian, N.R.; Smith, J.C.; Hibbs, J.B.; Samlowski, W., Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine skin cancers. *Cancer Res.*, (1993), **53**, 5507-5511.