



UNICAMP



1150057290



IQ

T/UNICAMP Sa59c

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

**"CARACTERIZAÇÃO DAS REAÇÕES DO
NITROPRUSSIATO DE SÓDIO COM TIÓIS E
OXIHEMOGLOBINA"**

2004103214

Laís Calixto Santos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Professor Associado- Departamento de Físico-Química

Setembro 2003

JNIDADE ICH
Nº CHAMADA UNICAMP
Sa59c
V EX
TOMBO BCI 54290
PROC 10111104
C D
PREÇO 41,48
DATA 7/3/03
Nº CPD

66-10 311522

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

Sa59c

Santos, Laís Calixto.

Caracterização das reações do nitroprussiato de sódio com tióis e oxihemoglobina. / Laís Calixto Santos. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Marcelo G. de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Óxido nítrico. 2. Nitroprussiato de sódio.
3. Tióis. 4. Oxihemoglobina. I. Oliveira, Marcelo G de. II. Universidade Estadual de Campinas.
III. Título.

Aos meus pais Clélia e Antonio,
ao meu irmão Breno,
e ao Érico,
com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Marcelo pela orientação,
- Ao pessoal do laboratório I-114: Dea, Fernanda, Vanessa, Melissa, Anna, Rodrigo, Rogério, Juliana, Evandro, Luciana, Nara e, principalmente, à Priscilla pela atenção, paciência e colaboração em todos os momentos,
- À Mika, não só pelas discussões científicas mas, também, pelo apoio constante,
- Às minhas amigas: Cassiana, Fabiana, Gisele, Greice, Larissa, Luciana, Osana e Telma,
- Aos funcionários do IQ-UNICAMP, especialmente Cláudia Martelli, André, Bel, Rodrigo, Celi e Nelson.

CURRÍCULO ACADÊMICO

DADOS PESSOAIS:

Nome: Laís Calixto Santos

Endereço: R. Com. Pedro Morganti, 1509/42 CEP 14801-395 Araraquara - SP

Data de nascimento: 15 de março de 1978, Araraquara - SP

e-mail: lais@iqm.unicamp.br

FORMAÇÃO:

SUPERIOR

Universidade Estadual de Campinas – Campinas – SP

Curso: Bacharelado em Química

Conclusão: 2001

ATIVIDADES ACADÊMICAS:

Auxiliar didática

Disciplinas: Química Geral (QG 109) - 1º semestre 2003

Química Geral (QG 102) - 1º semestre 2001

ATIVIDADES CIENTÍFICAS:

1. Mestrado

Departamento de Físico-Química – IQ – UNICAMP

Projeto: “Caracterização das reações do nitroprussiato de sódio com tióis e oxihemoglobina”.

Bolsa concedida pelo CNPq.

Período: setembro de 2001 a outubro de 2003.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

2. Estágio no exterior

Departamento de Química Orgânica – ICTOS – TUGraz – Graz – Áustria

Projeto: “Polimerização utilizando catalisadores de Ru para produção de material dentário”

Bolsa concedida pela TUGraz.

Período: agosto a novembro de 2001.

Orientador: Prof. Dr. Franz Stelzer

Co-orientador: Dr. Peter Preishuber-Pflügl

3. Iniciação científica

Departamento de Química Orgânica – IQ – UNICAMP

Projeto: “Reduções biocatalíticas de cetonas cíclicas”

Bolsa concedida pelo SAE / UNICAMP para o período de agosto de 1999 a julho de 2000.

Período: agosto de 1998 a julho de 2000.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto R. Rodrigues

Co-orientadora: Dra. Roseli Maria de Conti Lourenço

4. Resumos publicados em Anais de Congressos

- Santos, L.C., de Oliveira, M.G.; “*Caracterização das reações do nitroprussiato de sódio com tióis e oxihemoglobina em condições fisiológicas*”; 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Poços de Caldas- MG; maio de 2003.
- Santos, L.C., Shishido, S.M., de Oliveira, M.G.; “*Efeito da irradiação com luz visível na cinética das reações da oxihemoglobina com doadores de óxido nítrico*”; Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações; São Pedro – SP; novembro de 2002.
- Santos, L.C., de Oliveira, M.G.; “*Redução do nitroprussiato de sódio por tióis: evidências cinéticas e espectroscópicas da formação do aduto $[Fe(CN)_5N(O)SR]^{3-}$* ”; 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Poços de Caldas- MG; maio de 2002.
- Santos, L.C., Lourenço, R.M. de C., Rodrigues, J.A.R.; “*Reduções biocatalíticas de cetonas cíclicas*”; 8^o Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP; Campinas – SP; setembro de 2000.

5. Artigos científicos

Santos, L.C., Ricardo, K.F.S., Krieger, M.H., and de Oliveira, M.G. “Simultaneous Administration of Sodium Nitroprusside and Primary Thiols Potentiates the Vasodilation Effect in Normotensive and Hypertensive Rats”. Em preparação.

RESUMO

Título: “Caracterização das reações do nitroprussiato de sódio com tióis e oxihemoglobina”

Autora: Laís Calixto Santos. **Orientador:** Prof. Marcelo G. de Oliveira

Palavras chave: óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, tióis, oxihemoglobina

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira sintetizada pelos mamíferos e desempenha um grande número de funções biológicas, entre elas o controle da pressão arterial, a neurotransmissão e a inibição da agregação plaquetária. O nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$, NPS) é um complexo metálico doador de NO, utilizado clinicamente há mais de 70 anos no controle de crises de hipertensão. Apesar de seu uso amplo, o mecanismo de vasorelaxamento do NPS não está ainda elucidado e se considera que a etapa primária do mesmo é a redução do íon central. O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar as reações de redução do NPS por peptídeos que contem o grupo tiol (-SH) encontrados endogenamente e com a oxihemoglobina (HbO_2), para a obtenção de dados cinéticos e espectroscópicos que possam contribuir para a elucidação de seu mecanismo de ação. Através da análise das variações espectrais em função do tempo nas regiões do infravermelho e do UV/VIS, verificou-se que o NPS reage com a L-cisteína (CiSH), a N-acetil-L-cisteína (NAC) e a glutatona (GSH) em solução aquosa em pH 7,4. Reações conduzidas em pH 10, permitiram a detecção de um aduto intermediário $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$ nestas reações, com bandas de absorção em 550 nm e 2073 cm^{-1} . A caracterização espectroscópica das reações demonstrou que os principais produtos da decomposição do intermediário são as espécies $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{3-}$ e $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, sendo que a formação da última implica na liberação do NO como NO livre ou como o nitrosotiol (RSNO) correspondente. Além disso, o acompanhamento cinético das reações mostrou que a velocidade de decomposição do intermediário depende da natureza química do peptídeo e segue a ordem: $\text{CiSH} > \text{NAC} > \text{GSH}$. Verificou-se que o NPS também reage rapidamente com a HbO_2 , oxidando-a a metahemoglobina e nitrato. Na presença de tióis livres, observou-se que a velocidade desta reação é aumentada, o que indica um aumento na reatividade do NPS frente à HbO_2 . Testes *in vivo*, na administração simultânea de NPS e dos tióis em um modelo animal, demonstraram um efeito potencializador nos três casos. Este conjunto de evidências indica que os principais candidatos à redução do NPS para a transferência de NO em mamíferos são os tióis livres do plasma ou os tióis de membrana das células endoteliais.

ABSTRACT

Title: “Characterization of the reactions of sodium nitroprusside with thiols and oxyhemoglobin”

Author: Laís Calixto Santos. **Advisor:** Prof. Marcelo G. de Oliveira

Key words: nitric oxide, sodium nitroprusside, thiols and oxyhemoglobin

Nitric oxide (NO) is a messenger molecule synthesized by mammals and plays a large number of biological roles, including the control of arterial pressure, neurotransmission and the inhibition of platelet aggregation. Sodium nitroprusside ($[\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$, SNP) is an NO donor metal complex used clinically for over 70 years in the control of hypertension crisis. Although the use of SNP is widely diffused, its vasodilation mechanism is not fully understood, the first step of it, being considered to be the reduction of the central ion. The main aim of this work was to characterize the reduction reactions of SNP by peptides containing the thiol group (-SH) found endogenously and with oxyhemoglobin (HbO_2), in order to obtain kinetics and spectroscopic data which can contribute to the elucidation of its mechanism of action. Through the analysis of spectral changes with time in the IR and UV/VIS ranges, it was found that SNP reacts with L-cysteine (CySH), N-acetyl-L-cysteine (NAC) and glutathione (GSH) in aqueous solution at pH 7,4. Reactions at pH 10 allowed the detection of an intermediate adduct ($[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$), with absorption bands at 521 nm and 2073 cm^{-1} . The spectroscopic characterization of the reactions have show that the main products resulting from the decomposition of the intermediate are $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{3-}$ and $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ species, the formation of the last implying in the release of NO, as free NO or as the corresponding nitrosothiol (RSNO). In addition the kinetic monitoring of the reactions showed that the rate of decomposition of the intermediate adduct depends on the nature of the peptide and follows the order: $\text{CySH} > \text{NAC} > \text{GSH}$. SNP was also found to react with HbO_2 oxidating it to methemoglobin and nitrate. In the presence of free thiols, the rate of the reaction was found to be increased, indicating a high reactivity of SNP toward HbO_2 . *In vivo* tests in an animal model, were SNP and thiols were administered simultaneously have shown a potentiating effect in the three cases. These evidences indicate that the main candidates for the *in vivo* reduction of SNP whit NO transfer in mammals, are free thiols present in the plasma or in the membrane of endothelial cells.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Óxido nítrico	1
1.2. Propriedades físico-químicas do NO	3
1.3. Óxido nítrico como ligante	6
1.4. Papel do óxido nítrico no controle da pressão arterial	8
1.5. Nitrovasodilatadores no controle da pressão arterial.....	9
1.6. Nitroprussiato de sódio.....	11
2. OBJETIVOS	18
3. PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1. Reagentes	19
3.2. Preparação das soluções de tióis e NPS	19
3.3. Preparação das soluções de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ e $K_3Fe(CN)_6$	20
3.4. Preparação e diálise da solução de oxihemoglobina	20
3.5. Acompanhamento cinético das reações – UV/Visível	21
3.6. Ajuste exponencial das curvas	22
3.7. Acompanhamento cinético das reações – Infravermelho.....	22
3.8 Testes <i>in vivo</i> da influência da administração simultânea de tióis na capacidade vasodilatadora do NPS	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Análises espectroscópicas das reações do NPS com tióis em meio tamponado (pH 7,4).....	24
4.2. Análises espectroscópicas das reações do NPS com tióis em pH 10,0, no UV/Visível.....	28

4.3. Análises espectroscópicas das reações do NPS com o ânion hidroxila, no UV/Visível.....	34
4.4. Análises espectroscópicas das reações do NPS com ditionito de sódio, no UV/Visível.....	35
4.5. Análises espectroscópicas das reações do NPS com ácido ascórbico, no UV/Visível.....	37
4.6. Acompanhamentos cinéticos com diferentes proporções NPS : tiol.....	39
4.6.1. Proporção NPS : tiol 2 : 1.....	39
4.6.2. Proporção NPS : tiol 1 : 2.....	43
4.7. Análises espectroscópicas das reações do NPS, em pH 10,0, no Infravermelho.....	49
4.8. Proposta de mecanismo para reação de redução do NPS pelos tióis.....	56
4.9. Análises espectroscópicas das reações do NPS com oxihemoglobina em meio tamponado (pH 7,4).....	58
4.10. Análises espectroscópicas das reações do NPS com a oxihemoglobina na presença de tióis, em meio tamponado (pH 7,4).....	63
4.11. Testes <i>in vivo</i> da influência da administração simultânea de tióis na capacidade vasodilatadora do NPS	64
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS	70

ABREVIACÕES

NO, óxido nítrico; Ach, acetilcolina; Hb, hemoglobina; SNOHb, nitrosohemoglobina; RSNO, nitrosotiol; NOHb, nitrosilhemoglobina; metHb, metahemoglobina; EDRF, fator de relaxação derivado do endotélio; C-NOS, NO-sintase constitutiva; GC, guanilato ciclase; GTP, guanosina trifosfato; cGMP, guanosina monofosfato cíclica; TNG, trinitroglicerina; NPS, nitroprussiato de sódio; RSH, tiol; CiSH, L-cisteína; GSH, glutathiona; NAC, N-Acetil-L-cisteína; H₂A, ácido ascórbico; HbO₂, oxihemoglobina.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido nítrico

O óxido nítrico (monóxido de nitrogênio, NO) é uma das 10 menores moléculas que são estáveis existentes na natureza. Embora seja uma molécula potencialmente tóxica, descobriu-se na última década, que ela está envolvida em uma série de funções biológicas importantes. O NO é uma molécula sinalizadora que se difunde rapidamente através de membranas celulares, modulando uma série de processos fisiológicos, dentre eles a regulação genética, a apoptose, citostase, a função plaquetária, a relaxação de células vasculares musculares lisas, a neurotransmissão, a memória e a estimulação do sistema imunológico^{1,2}. Por apresentar um papel multifuncional no corpo humano, uma disfunção no mecanismo de regulação do metabolismo de NO pode implicar em diversas patologias, incluindo hipertensão, diabetes, artrite, inflamação, epilepsia e choque séptico. As cinco últimas disfunções citadas são causadas pela produção excessiva de NO, uma vez que uma grande concentração desta espécie pode ser tóxica ao organismo^{3,4}.

A função de neurotransmissor desempenhada pelo NO foi descoberta em 1988. Os principais neurotransmissores no sistema nervoso periférico são acetilcolina (ACh) e a noradrenalina, que atuam como mensageiros nas junções nervo/nervo e nervo/músculo. No entanto, existem alguns nervos periféricos que não utilizam noradrenalina nem a ACh e são denominados nervos não adrenérgicos/não colinérgicos (NANC). Esses nervos NANC são encontrados no trato gastrointestinal, no sistema respiratório, no músculo cardiovascular e no

sistema urogenital, sendo que o neurotransmissor utilizado por esses nervos é o NO^{4,5}.

Um estudo sobre resposta imunológica (resposta do organismo em defesa a um ataque de organismos desconhecidos como bactérias, vírus e células tumorais) levou à descoberta de mais um papel desempenhado pelo NO. Sabia-se que a eliminação de nitrito e nitrato (produtos finais da oxidação do NO) aumentava durante crises de infecção. Foi demonstrado que o mecanismo pelo qual os macrófagos (células que são encontradas em quase todos os órgãos e tecidos, que têm como uma das suas finalidades realizar a fagocitose e eliminar micróbios e material não reconhecido pelo organismo) destruíam as células alvo através de ferro intracelular. Esse efeito depende da presença de L-arginina, mas podia ser reproduzido pelo NO. Logo se concluiu que os macrófagos estavam usando NO para matar as células alvo^{4,5}.

Durante a realização de experimentos sobre as propriedades de vasorelaxamento do NO, Mellion⁶ *et al.* perceberam que o NO também inibia a agregação plaquetária. Quando uma veia sangüínea é danificada, a agregação plaquetária previne o sangramento excessivo, aderindo às paredes do vaso⁵. O mecanismo pelo qual a agregação plaquetária era inibida era idêntico ao que produzia o vasorelaxamento: através da ação do NO. Em 1986, Azuma⁷ *et al.* descobriram que o EDRF (até então não se sabia que era o NO) também inibia a agregação plaquetária. O papel do NO nessa área parece ser um mecanismo de “feedback”, compensando o efeito de substâncias produzidas pelo organismo com a finalidade de promover a agregação plaquetária, após um ferimento. O NO utilizado pelas plaquetas é derivado das células endoteliais que estão em contato com as plaquetas, mas também existe um sistema de enzimas nas plaquetas que atua na arginina para produzir NO⁵.

O NO pode atuar também como agente citotóxico contra células tumorais e também como agente antiparasita, pois é tóxico a bactérias e também a parasitas não bacterianos⁵. Além das propriedades fisiológicas já citadas, o NO também é um potente vasorelaxador e essa característica será discutida separadamente no próximo item.

Estas descobertas revigoraram a pesquisa sobre as propriedades químicas fundamentais do NO e levaram a revista Science a eleger o NO como a molécula do ano em 1992^{4,8}.

1.2. Propriedades físico-químicas do NO

A molécula de NO pode ser encontrada na forma do cátion nitrosônio (NO^+), óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) ou ânion nitroxil (NO^-) sendo que essas três espécies possuem características distintas. O $\text{NO}^\bullet$ é um gás incolor à temperatura ambiente, possui número de oxidação 2+, e comprimento de ligação 1,15 Å; sua frequência de estiramento no infravermelho é de 1875 cm^{-1} e no UV/VIS apresenta bandas em 224, 213 e 203 nm. Sua solubilidade em água é de $1,9\text{ mmol. L}^{-1}\text{ atm}^{-1}$ a 25°C e $1,4\text{ mmol.L}^{-1}\text{ atm}^{-1}$ a 37°C ^{9,25}.

A configuração eletrônica do $\text{NO}^\bullet$ é $\sigma^2 \sigma^{*2}, \sigma^2 \pi^4 \pi^*$ (Fig.1), com um elétron desemparelhado no seu orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) π^* , o que confere a essa molécula o caráter de radical. A ordem de ligação do NO é 2,5, o que desfavorece a formação do dímero N_2O_2 , pois a dimerização leva a um abaixamento pequeno da energia de Gibbs e a ordem de ligação do dímero é 5, o que corresponde a duas moléculas de NO separadas. A entalpia de dimerização é de $-2,6\text{ kcal.mol}^{-1}$ e esse pequeno valor é compensado pela diminuição no valor da

entropia, pois o dímero é mais organizado que dois monômeros separados. A 300°C e 1 atm, o valor de $-T\Delta S$ é + 4,3 kcal.mol⁻¹ sendo, assim, desfavorável a dimerização do NO¹.

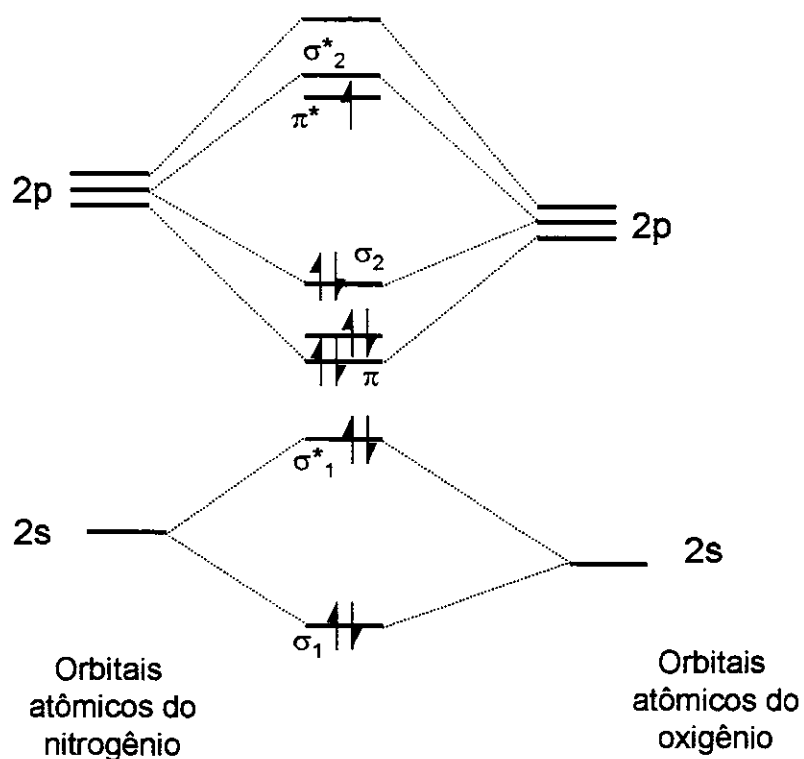


Figura 1. Orbitais moleculares do NO[•].

O momento de dipolo do NO é pequeno e isso o torna solúvel em diferentes tipos de solventes e permite sua rápida difusão através de membranas celulares. Os coeficientes de partição entre o solvente e a fase gasosa, para espécie, a 1 atm são : metanol 0,36, benzeno 0,30, pentano 0,25 e água 0,07. A difusão do NO através de membranas celulares é favorecida assim como em meio aquoso^{3,10}.

As reações do NO com O₂ e com o superóxido estão representadas nas equações (1) e (2):

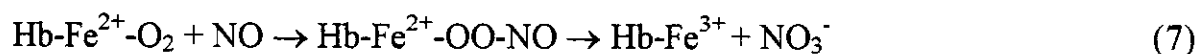


Na presença de O₂, o NO pode ser oxidado a NO₂, que reage com outra molécula de NO e forma N₂O₃, que é um poderoso agente nitrosante, que reage com tióis, que são espécies que possuem o grupo –SH, formando nitrosotióis (RSNOs) (Eq. 3-6), que podem servir como carregadores de NO¹¹.



A hemoglobina (Hb) é um tetrâmero composto de duas subunidades α e duas subunidades β. Na Hb humana, cada subunidade contém um grupo heme e nas subunidades β existem tióis altamente reativos, entre eles a CysH 93 que podem ser nitrosados na presença do NO, formando a nitrosohemoglobina (SNOHb). O mecanismo de formação da SNOHb *in vivo* ainda não é conhecido, mas sabe-se que o NO não reage diretamente com o tiol formando RSNOs. Existe a hipótese de que o NO é oxidado pelo O₂ dos pulmões a N₂O₃ que atuaria como agente nitrosante. Alguns autores também propõem que o NO pode reagir com o Fe da Hb formando a nitrosilhemoglobina (NOHb) que numa transferência intramolecular desloca o NO do Fe para o tiol¹²⁻¹⁷.

Na reação do NO com a oxihemoglobina (Eq. 7) ocorre a formação de metahemoglobina (metHb) e nitrato. Essa reação é usada da detecção de NO livre e também é uma das responsáveis pelo consumo de NO livre em mamíferos.^{12,13, 18-24}.

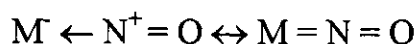


1.3. Óxido nítrico como ligante

A reação do NO com outros radicais é rápida, mas ele não é um oxidante nem um redutor forte. Em complexos com centros metálicos, o NO pode se ligar como cátion nitrosil (NO^+), formando um ângulo M- N- O $\sim 180^\circ$ ou como ânion nitroxil (NO^-) formando um ângulo de $\sim 120^\circ$ ^{9,25}.

O NO pode se ligar a metais de transição formando complexos das seguintes maneiras:

- doando dois elétrons do NO neutro (complexos paramagnéticos $\text{M} \leftarrow \text{N} = \text{O}$),
- doando elétrons conforme citado acima, porém emparelhando os elétrons desemparelhados do NO com elétrons desemparelhados d do metal formando uma ligação π . Pode-se considerar esse tipo de ligação como uma transferência de um elétron do NO para o metal, seguido da doação de dois elétrons formando o íon NO^+ . Nesse caso tem-se as formas



- através da transferência de um elétron do metal para o NO e doação de dois elétrons formando o íon NO^- ,
- através de sua ligação ao íon metálico em um ângulo M-N-O diferente de 180° ,
- através da formação de pontes entre íons metálicos (a natureza dessa ligação não está bem estabelecida e os complexos estudados formam pontes com mais de um grupo NO^{26}).

Complexos contendo NO podem apresentar estrutura linear, como na Fig. 2 e nesses casos, a coordenação do NO é análoga à coordenação de metais com CO^{27} .

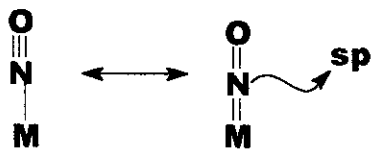


Figura 2. Estruturas de ressonância de complexos metal-NO.

Outra reação bastante conhecida é a ligação do NO ao Fe do grupo heme da Hb, formando a nitrosilhemoglobina (NOHb) (Eq.8).



1.4. Papel do óxido nítrico no controle da pressão arterial

Existem três tipos de músculos que podem ser classificados de acordo com sua estrutura fisiológica e suas propriedades e mecanismos de contração: esquelético, liso e cardíaco. Camadas de músculos lisos envolvem todas as cavidades dos órgãos internos em especial as paredes internas dos vasos sanguíneos (veias, artérias e arteríolas). A contração da musculatura lisa é um dos múltiplos fatores que controlam a resistência ao fluxo sanguíneo no sistema arterial. Na ausência de mecanismos de compensação, uma contração prolongada pode levar a uma pressão sanguínea elevada (hipertensão)⁵.

O endotélio é uma monocamada de células que envolvem todos os vasos sanguíneos de mamíferos. Em 1980 Furchgott e Zawadzinski²⁸ constataram que os efeitos da Ach dependiam da presença do endotélio íntegro e que havia uma substância responsável pelo relaxamento da musculatura vascular. Como não sabiam qual era essa substância, nomearam-na de Fator de Relaxação Derivado do Endotélio (“endothelium-derived relaxing factor”, EDRF). Em um estudo independente, em 1986, Ignarro^{29,30} *et al.* anunciaram que o EDRF poderia ser o NO. Em 1989 esta hipótese foi confirmada^{1,4,10,31,32}.

O mecanismo endógeno de vasorelaxação do NO inicia-se quando a Ach se liga a um receptor na superfície da célula endotelial, que irá ativar o canal iônico de Ca^{2+} , aumentando a concentração de Ca^{2+} no interior das células endoteliais. O aumento da concentração de Ca^{2+} dentro das células endoteliais, ativa a enzima NO-sintase (C-NOS) que irá promover a produção de L-citrulina e NO a partir de L-arginina e O_2 . O NO produzido se difunde rapidamente para as células musculares, onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC) que converte a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP). A cGMP desencadeia

uma série de processos que levam à relaxação das células musculares lisas e ao vasorelaxamento conforme representado na Fig. 3⁴:

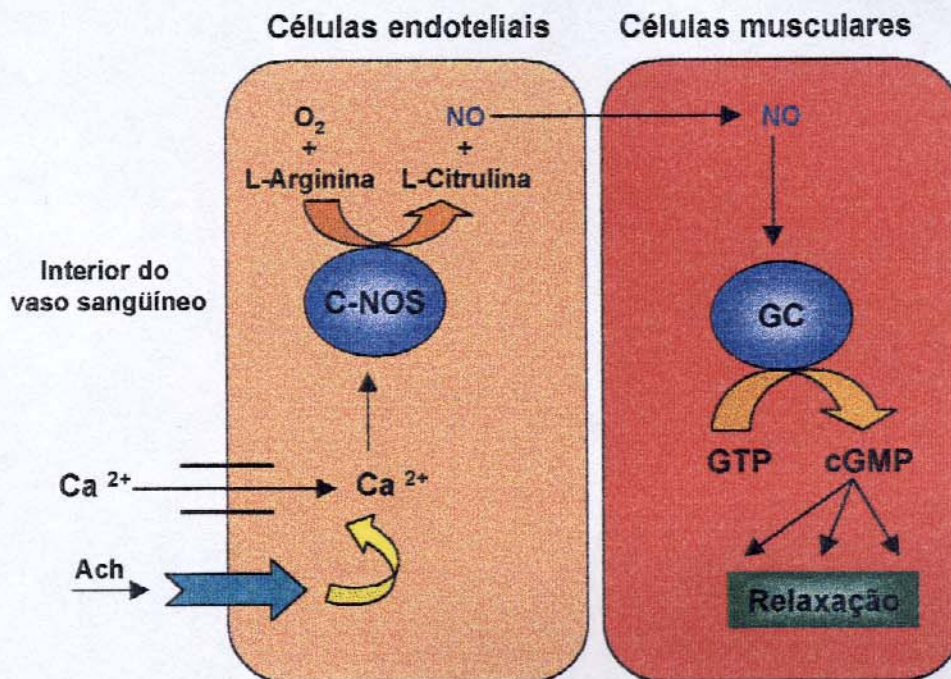


Figura 3. Esquema simplificado de um corte transversal de um vaso sanguíneo, ilustrando o processo de vasorelaxamento promovido pelo NO endógeno.

1.5. Nitrovasodilatadores no controle da pressão arterial

Existem várias classes de nitrovasodilatadores que são usados para controlar a pressão arterial. Entre os clássicos, podemos citar os complexos contendo o grupo metal-NO, nitrito de sódio ($NaNO_2$), nitrito de amila ($Amil-NO_2$), ésteres de nitrito e nitrato, dinitrato de isosorbida, 5-mononitrato de isosorbida e nicorandil, que são utilizados há muitos anos no controle de doenças cardíacas^{2,33}. O mecanismo de vasorelaxamento promovido pelo NO exógeno está representado na Fig. 4:

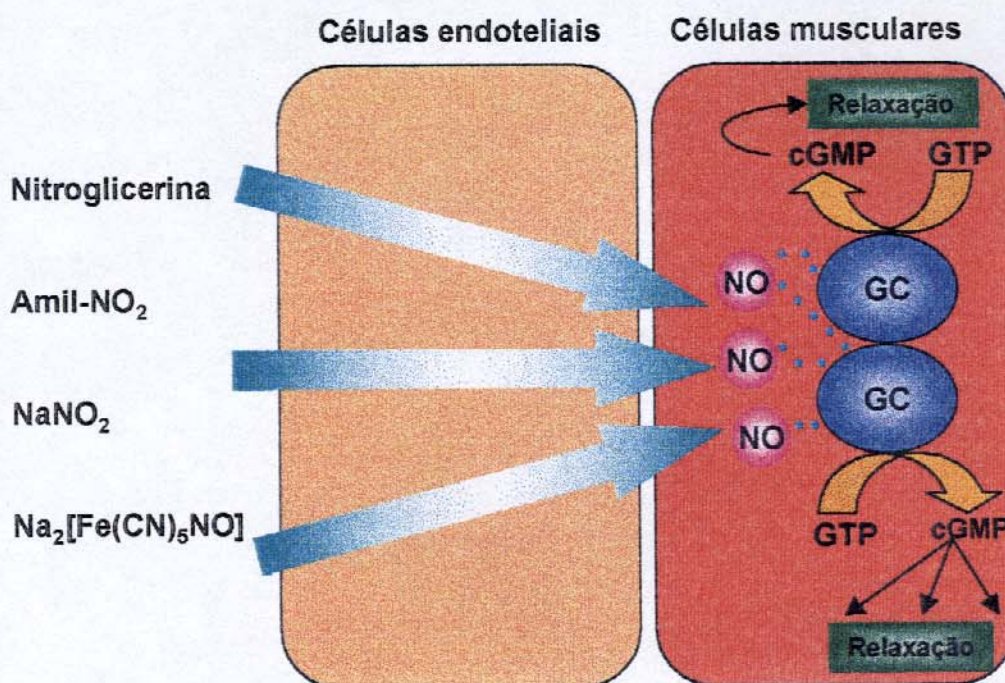


Figura 4. Esquema simplificado de um corte transversal de vaso sanguíneo ilustrando o vasorelaxamento causado por fontes exógenas de NO.

A trinitroglicerina (TNG) está incluída na classe de nitrovasodilatadores denominada ésteres de nitrito. A TNG foi sintetizada por Ascanio Sobrero e seu efeito antianginal foi descoberto por volta de 1860, quando trabalhadores de uma fábrica de dinamite reclamavam de dores de cabeça na segunda-feira durante a manhã, porém ela desaparecia durante os finais de semana. Empregados que sofriam de angina relatavam o desaparecimento da dor no peito durante a semana. Esses efeitos foram atribuídos aos efeitos vasodilatadores da TNG, até então usada somente na fabricação de dinamite. Por volta de 1970-1980 descobriu-se que o efeito vasodilatador da TNG era causado pelo NO. A desvantagem no uso da TNG é a tolerância desenvolvida após o uso continuado³⁴.

1.6. Nitroprussiato de sódio

Dentre os diferentes doadores de NO utilizados, o pentacianonitrosilferrato de sódio (comumente chamado de nitroprussiato de sódio ($(\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})])$, (NPS)), é o único complexo metal-nitrosila usado clinicamente em emergências cardíacas. Comercialmente é conhecido como Nipride ® ou Nitropress ®^{37,38}.

Seu uso clínico como agente hipotensor é conhecido há mais de 70 anos e sua capacidade hipotensiva é conhecida desde 1929^{33,39}. Desde 1945 já foram publicados mais de 7620 artigos científicos sobre o uso do NPS em experimentos médicos, fisiológicos e químicos (dados do ISI/Web of Science-Agosto/2003). Um dos fatores que despertam interesse na pesquisa com o NPS é a sua alta eficiência como agente hipotensor, porém com poucos efeitos colaterais⁴⁰.

O uso do NPS foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration-EUA) em 1974, sendo indicada sua aplicação para a indução de hipotensão intraoperativa, no tratamento de hipertensão crônica, em cirurgias cardíacas e da aorta, em emergências hipertensivas e no controle do infarto do miocárdio entre outras cardiopatias. Apesar das controvérsias envolvendo a toxicidade do NPS, seu uso está amplamente difundido e em 1993, movimentou mais de US\$ 2 milhões, somente nos EUA^{39,41,42}.

O ânion nitroprussiato é composto de um íon central de Fe, contendo cinco ligantes CN e um NO formando uma estrutura cristalina ortorrômbica com simetria aproximadamente C_{4v} (Fig. 5).

O ângulo das ligações Fe-N-O é de 180°, enquanto o ângulo entre as ligações $\text{N}_{(\text{NO})}\text{-Fe-C}_{\text{equatorial}}$ é de 96°, um pouco maior que o esperado que seria 90°⁴³⁻⁴⁵. Os comprimentos das ligações entre os átomos que compõe o ânion nitroprussiato estão listados na Tabela 1:

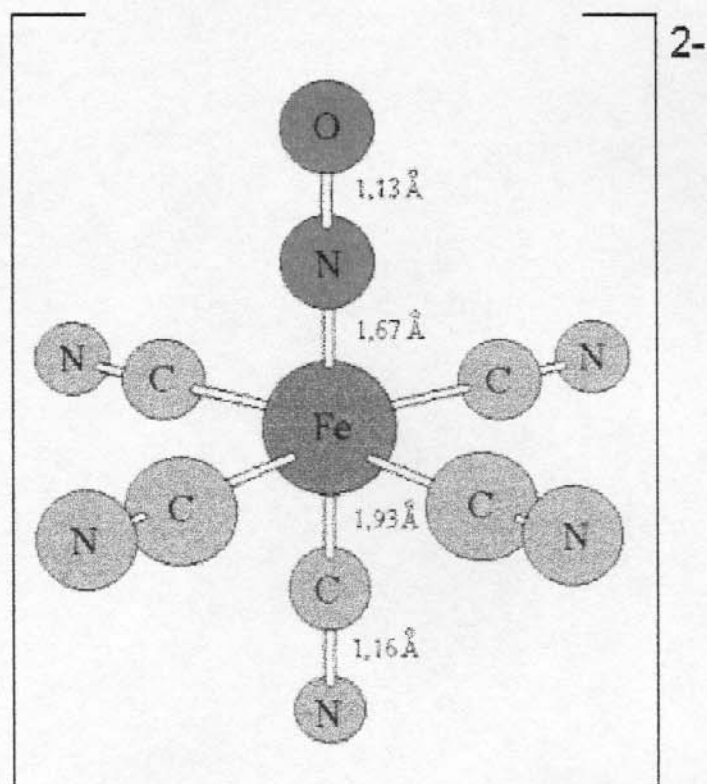


Figura 5. Estrutura do íon nitroprussiato.

Tabela 1: Comprimentos de ligação (Å) entre os átomos que compõe o ânion nitroprussiato⁴³⁻⁴⁵.

Átomos da ligação	Distância entre os átomos
Fe-N	1,63
Fe-C	1,90
C-N	1,16
N-O	1,13

A pequena distância Fe-N é característica de complexos NO-metais de transição e indica que a estrutura eletrônica da ligação Fe-N possui o caráter de

ligação tripla sendo composta de uma ligação σ , que usa um orbital d vazio do metal e o par de elétrons não compartilhados do N, e de duas ligações π que usam o orbital vazio π^* do NO e os orbitais d preenchidos do metal; esse arranjo leva a um ângulo Fe-N-O de 180° , que é observado experimentalmente. O NO está fortemente ligado ao metal e domina a estrutura eletrônica do íon nitroprussiato^{43,44}. A configuração eletrônica do Fe no nitroprussiato é $3d^6$ e o NPS formalmente contém Fe^{2+} e NO^+ , o que torna consistente a observação de caráter diamagnético apresentado pelo NPS⁴³.

O espectro eletrônico de absorção do NPS no UV/VIS (Fig. 6) apresenta duas bandas de baixa energia, relativas à transição do orbital d do metal para π^* do NO na região do visível, com máximo em 498 nm ($\epsilon \sim 8 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) e 394 nm ($\epsilon \sim 25 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$); três ombros na parte de baixa energia em 330, 265 e 238 nm atribuídos à transições d-d e uma banda intensa na região do ultravioleta, relativa à transição do orbital d do metal para o π^* do CN, em 198 nm. Na Tabela 2 estão apresentadas as atribuições das bandas na região do UV/VIS⁴⁴.

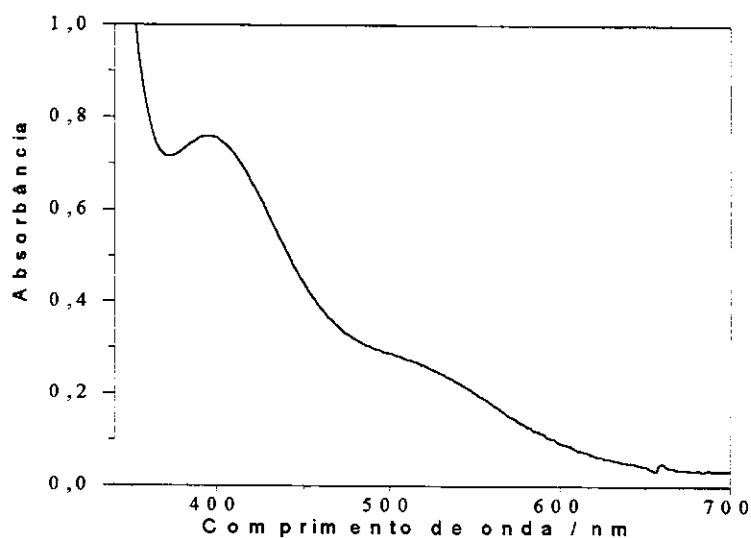


Figura 6. Espectro eletrônico de absorção do nitroprussiato de sódio na região do UV/VIS.

Tabela 2: Atribuição das bandas de absorção no UV/VIS do NPS no estado sólido⁴⁴.

Comprimento de onda (nm)	$\epsilon_{\max}$ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	Atribuição
498	8	$d_{xy} \rightarrow \pi^*(NO)$ $2b_2 \rightarrow 7e$
394	25	$d_{xz,yz} \rightarrow \pi^*(NO)$ $6e \rightarrow 7e$
330	40	$d_{xy} \rightarrow d_x^2 - y^2$ $2b_2 \rightarrow 3b_1$
265	900	$d_{xy} \rightarrow d_z^2$ $2b_2 \rightarrow 5a_1$
238	700	$d_{xy,yz} \rightarrow d_x^2 - y^2$ $6e \rightarrow 3b_1$
200	24000	$d_{xy} \rightarrow \pi^*(CN)$ $2b_2 \rightarrow 8e$

No infravermelho (IV), a frequência de estiramento do grupo NO no NPS aparece em 1937 cm⁻¹, já que o NO ligado a um íon metálico sofre um abaixamento no valor de frequência de estiramento quando comparado ao NO livre^{26,43}. Wilkinson²⁶ *et al.* concluíram que se a frequência de estiramento N-O ligado ao Fe está entre 1650 e 2000 cm⁻¹, então o NO pode ser considerado formalmente coordenado como NO⁺. A frequência de estiramento CN também ocorre em uma região de alta energia sendo que sua vibração de estiramento característica ocorre em 2142 cm⁻¹^{43,45}. As posições e atribuições das bandas de absorção do NPS sólido no IV se encontram na Tabela 3.

Tabela 3: Atribuições das bandas de absorção no IV do NPS no estado sólido⁴⁴.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1937	ν N -O
2142	ν C-N

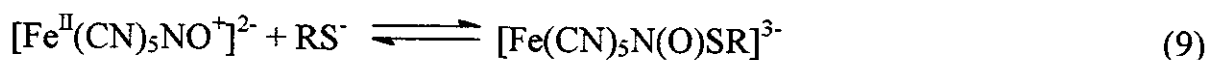
Soluções de NPS são termicamente estáveis porém, podem liberar cianeto sob irradiação com luz com $\lambda > 480 \text{ nm}$ ⁴⁶ no entanto, a toxicidade do NPS devido aos ligantes cianetos deve ser considerada em casos de uso prolongado e excessivo (doses superiores a $30 - 120 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de soluções de NPS⁴¹.

A liberação de CN^- *in vivo* não está comprovada e ainda é uma controvérsia; alguns autores defendem que a liberação de CN^- livre não é favorecida, uma vez que a constante de formação de complexos cianoferrato é alta; varia entre de 10^{35} a 10^{43} ⁴⁷. Um estudo em que se acompanhou a cinética de liberação de CN^- utilizando-se a técnica de RMN de ^{13}C não detectou a presença de cianeto quando o NPS foi colocado na presença de sangue, no escuro, mesmo após 14h de incubação⁴⁸. Alguns autores, no entanto, consideram que o metabolismo do NPS envolve a eliminação dos ligantes cianeto e também da cianohemoglobina que é formada na sua reação com a hemoglobina. A cianohemoglobina permanece em um equilíbrio dinâmico com o cianeto livre e é considerada atóxica. Os radicais CN^- restantes são convertidos, no fígado, a tiocianatos pela enzima rodanase, na presença de tiosulfato (que atua como doador de enxofre); o tiocianato é, então, metabolizado nos rins e eliminado através da urina^{36,41,46,47}.

Sabe-se que o NPS induz uma resposta fisiológica de vasodilatação muito rápida, que fica evidente após alguns segundos da administração; sendo que o efeito de vasorelaxação é atribuído à liberação de NO do complexo. O NPS pode

reagir com vários compostos presentes nas células de mamíferos, porém, muitos desses processos são lentos demais. O único processo rápido o suficiente para ser responsável por uma ação vasodilatadora tão rápida é a reação entre o complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ e um ânion tiolato que pode estar ligado à membrana da parede celular ou estar livre no plasma sanguíneo⁴⁹⁻⁵¹. Vários componentes do meio celular contêm grupos tióis (RSH), sendo os mais importantes a L-cisteína (CiSH), a homocisteína e a glutathione (GSH).

Apesar das reações entre o NPS e os tióis terem sido extensamente estudadas, o mecanismo envolvido ainda não está completamente elucidado^{52,53}. É bem conhecido que o NPS, na presença de um ânion tiolato, é transformado em um complexo S-nitrosotiolato através de um ataque nucleofílico do ânion tiolato ao NO, já que é considerado que o NO coordenado ao complexo possui uma carga parcial positiva^{49, 50, 52-59} (Eq. 9).



Os complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$ são gerados em um período de tempo inferior a 1,0 s, após a mistura das soluções de NPS e tiol. A reação é acompanhada por uma mudança de cor de incolor a rosa correspondente à banda de absorção do complexo em $\lambda_{\text{max}} = 521\text{-}526$ nm. Na maioria dos casos estudados, a decomposição é o próximo passo, acompanhada de uma mudança de cor da solução rosa a castanho claro e a formação de cianocomplexos de Fe e disulfeto^{52,54,55}.

As estruturas da CiSH e a GSH, tióis encontrados endogenamente e a N-acetilcisteína (NAC), um produto endógeno da CiSH, estão apresentadas na Figura 7. Estes tióis são os melhores candidatos a reagir com o NPS *in vivo*, podendo atuar como transportadores de NO, aumentando assim sua meia vida e preservando sua

atividade biológica. As diferentes estruturas desses tióis apresentam diferentes reatividade frente ao NPS, afetando a cinética de liberação de NO^{52,60}.

Além desses tióis, a presença da oxihemoglobina (HbO₂) também deve ser considerada, pois essa espécie é encontrada endogenamente em abundância e reage com o NPS formando metahemoglobina (metHb) e nitrato portanto, a investigação do mecanismo desta reação é muito importante⁶¹.

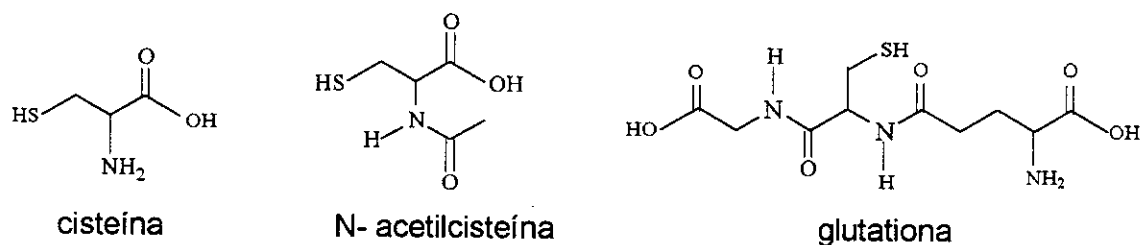


Figura 7. Estruturas dos tióis empregados na investigação das reações do NPS.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos desse projeto foram:

- Caracterizar e monitorar as reações de transferência de NO do NPS aos tióis cisteína, N-acetilcisteína e glutathione e à oxihemoglobina, através de técnicas espectroscópicas e cinéticas, para a elaboração de um mecanismo de reação.
- Analisar as diferenças de reatividade dos três tióis utilizados, frente ao nitroprussiato de sódio em pH fisiológico e em pH 10.
- Estabelecer correlações entre o comportamento cinético das reações e o efeito fisiológico, obtido na administração simultânea de NPS e tióis, em um modelo animal.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Tampão fosfato (PBS pH 7,4), nitroprussiato de sódio, L-cisteína, glutationa, N-acetil-L-cisteína, hemoglobina, membrana de celulose e $K_3Fe(CN)_6$ foram adquiridos da Sigma. Ditionito de sódio foi adquirido da QM, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, H_2SO_4 foram adquiridos da VETEC, ácido ascórbico e NaOH foram adquiridos da Merck. Os reagentes são de pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia. Foi utilizada água desionizada Milli-Q com resistividade de 18,2 Mohm.cm a 25° C, condutividade elétrica específica menor que 0,1 mS/cm.

3.2. Preparação das soluções de tióis e NPS

As soluções de NPS e dos tióis foram preparadas em água desionizada ou tampão fosfato, com concentrações variando de $2 \cdot 10^{-5}$ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram preparadas separadamente em balões volumétricos e foram previamente termostatizadas por 30 minutos antes da realização das medidas. As soluções em meio básico foram preparadas em água desionizada e posteriormente basificadas adicionando-se uma solução NaOH $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Preparação das soluções de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

As soluções de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, foram preparadas em água desionizada. As concentrações variaram de 0,2 a 1,0 mol L⁻¹.

3.4. Preparação e diálise da solução de oxihemoglobina

A solução de HbO_2 foi preparada a partir de uma solução 1,1 mmol L⁻¹ de hemoglobina (Hb), à qual foi adicionado um excesso molar de três vezes de ditionito de sódio. Nesta solução, foi borbulhado ar sintético (Air Liquid S.A., SP, Br) por aproximadamente 15 minutos. Diluiu-se na proporção 1:300 (v/v) essa solução e a partir do valor da absorbância em 415 nm obtida para a solução diluída, calculou-se a concentração da HbO_2 usando-se o seu coeficiente de absorção molar em 415 nm ($\epsilon_{415} = 131 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)⁶², conforme Eq. 10:

$$[\text{HbO}_2] = A_{415} \times 300 (\text{fator de diluição}) / \epsilon_{415} \quad (10)$$

em que A_{415} é a absorbância da solução em 415 nm, para um caminho óptico de 1,0 cm.

Para remover o excesso de ditionito de sódio adicionado à solução de HbO_2 , montou-se um sistema de diálise. Foi necessário tratar a membrana de celulose utilizada na diálise; inicialmente removeu-se a glicerina dessa membrana através de uma lavagem com água corrente por 3 horas. Em seguida os componentes sulfurosos foram removidos através do tratamento com uma solução de dissulfito de sódio 0,3% (m/v) a 80°C por um minuto. Lavou-se a membrana com água

quente (60°C) por dois minutos, e em seguida, a membrana foi tratada com uma solução de ácido sulfúrico 0,2% (v/v). Finalmente, realizou-se uma nova lavagem com água quente para remoção do ácido. Após o tratamento da membrana de celulose, esta foi preenchida com a solução de HbO₂ e acondicionada em um recipiente escuro contendo solução tampão na proporção oxihemoglobina:solução tampão 1:200 (v/v), a 4°C em um banho termostatizado. A solução tampão foi trocada a cada 6 horas, durante 24 horas¹⁸.

3.5. Acompanhamento cinético das reações – UV/Visível

A caracterização espectroscópica na região do UV/VIS foi feita utilizando-se um espectrofotômetro com arranjo de diodos Hewlett Packard modelo 8453, com agitação magnética e suporte de cubeta termostatizado. As cinéticas de reação foram caracterizadas através do monitoramento das variações espectrais na faixa de 200-900 nm, durante as reações. Os intervalos de leitura variaram de 2 a 250 s. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Adicionou-se 1,0 mL de NPS à 1,0 mL da solução de tiol previamente basificada já na cubeta. A concentração das soluções variou entre $2 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹. A homogeneização foi feita manualmente através de duas inversões rápidas na cubeta que foi então posicionada imediatamente no espectrofotômetro para iniciar as medidas. Acompanharam-se as cinéticas das reações dos tióis com o NPS em meio básico, pH~10, a 25° C. O alto valor do pH foi obtido usando uma solução de NaOH 3,0 mol L⁻¹. O pH foi medido utilizando um pH-metro Orion 410 A. As reações em meio tamponado foram realizadas a 37°C.

3.6. Ajuste exponencial das curvas

Os ajustes de equações de decaimento (Eq. 11) e crescimento (Eq.12) exponencial de primeira ordem aos dados experimentais foram feitos usando-se o programa Origin 5.0.

$$[[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^3]_t = [[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^3]_i (e^{-kt}) \quad (11)$$

$$[[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^3]_t = [[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^3]_f \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (12)$$

em que $[[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^3]_i$ e $[[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^3]_t$ são, respectivamente, a concentração inicial e concentração em um tempo t , da espécie intermediária com banda em 521 nm; $[[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^3]_t$ e $[[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^3]_f$ são, respectivamente, a concentração no tempo t e a concentração final do complexo com banda em 338 nm.

3.7. Acompanhamento cinético das reações – Infravermelho

As medidas na região do IV foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR Nicolet 502, com intervalos de leitura de 60 s. Misturou-se volumes iguais das soluções equimolares (da ordem de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em um béquer e com o auxílio de uma micropipeta colocou-se uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ dessa mistura entre duas janelas de CaF_2 , formando um filme. As janelas foram acondicionadas em um suporte adaptado para esta finalidade e então se iniciou a tomada das medidas. A coleta do primeiro espectro foi feita cerca de 20 s após a mistura das soluções.

3.8 Testes *in vivo* da influência da administração simultânea de tióis na capacidade vasodilatadora do NPS

Os experimentos *in vivo* foram realizados pelo grupo de pesquisa da Prof^a Marta Helena Krieger do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp, mais especificamente pela aluna de doutorado Kelly Fabiane S. Ricardo.

Para os estudos *in vivo* foram utilizados ratos Wistar adultos (linhagem C57 BL6 x CBA) machos, pesando em média 250-300 g, sob criação no “Centro de Bioterismo” – CEMIB – UNICAMP.

O efeito hipotensor dos tióis e do NPS foi verificado através do acompanhamento da pressão arterial pulsátil e média (PAM) registrada via interface analógico digital (CODAS) com frequência de 1500 Hz.

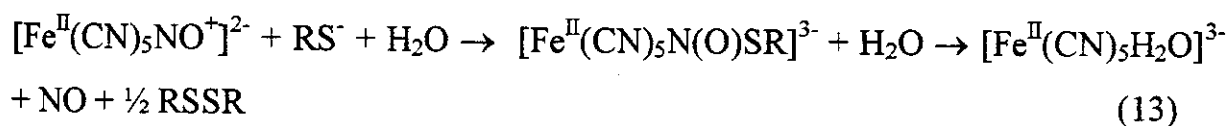
Os animais foram cateterizados com 24 h de antecedência sob anestesia Rompun -Kelatar (6 e 40 mg/kg). Foram ministradas doses de $51,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/kg}$ em ratos normotensos e acordados. O NO endógeno foi drasticamente reduzido através da administração aguda de L-NAME (3mg/kg, i.v.), o que induziu hipertensão agudas nesses animais⁶³.

Todos os procedimentos utilizados nos experimentos com animais foram aprovados pelo "Institutional Animal Care and Use Committee" e conduzidos conforme o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" do "Institute of Laboratory Animal Resources", US National Academy of Sciences.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises espectroscópicas das reações do NPS com tióis em meio tamponado (pH 7,4)

Os experimentos em meio tamponado foram realizados em tampão fosfato (pH 7,4), e a 37°C, com a finalidade de investigar essas reações em condições próximas às fisiológicas. As reações do NPS com a NAC e a GSH, em meio tamponado, não apresentaram variações espectrais significativas no UV/VIS. Conforme se nota na Fig.8, a reação da CiSH com o NPS apresentou uma variação espectral discreta. Observa-se somente o crescimento de uma banda na região de 340 nm, indicando que há a formação de um produto a partir da reação do NPS com a CiSH em meio tamponado. A região de 340 nm é característica de cianocomplexos de Fe^{II} , assim, foi possível propor uma reação de formação desse produto a partir de NPS e tiol, conforme apresentado na Eq. 13:



O acompanhamento espectral dos produtos da reação em meio tamponado, no IV, também só apresentou variação espectral significativa quando o tiol utilizado foi a CiSH. As variações estão apresentadas na Fig. 9.

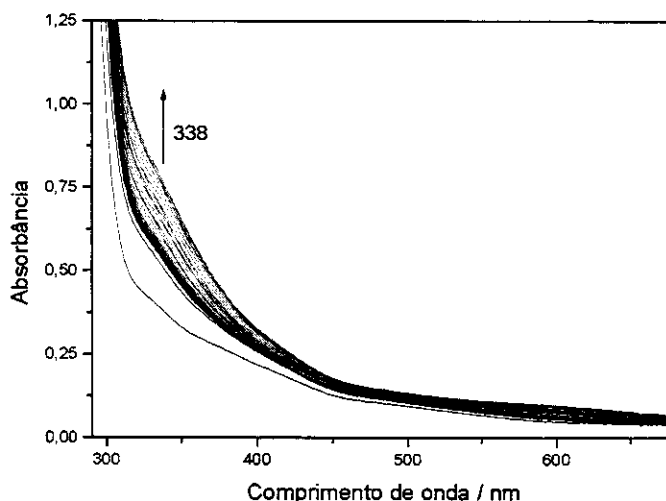


Figura 8. Variações espectrais correspondentes à reação da CiSH com o NPS em meio tamponado, pH 7,4. Soluções equimolares $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo total da análise: 3 h; intervalo entre os espectros: 5 min.

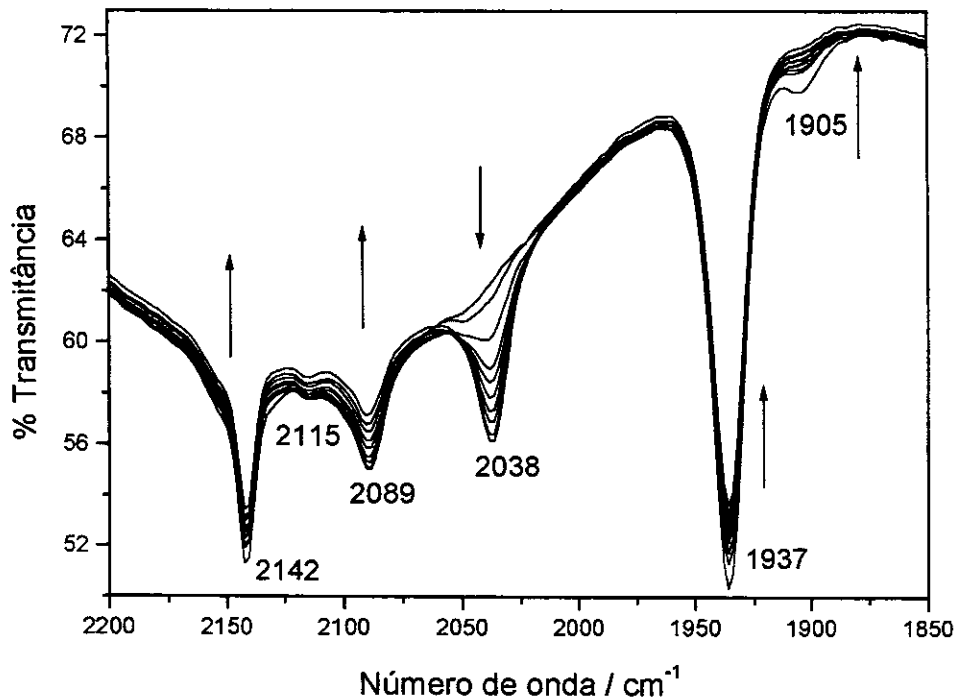


Figura 9. Variações espectrais na região do IV, correspondentes à reação da CiSH com o NPS em meio tamponado. Soluções equimolares $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; intervalo entre

os espectros 60 s. O espectro foi obtido após cerca de 15 s após a mistura dos reagentes.

Na Fig. 9 observa-se a diminuição da intensidade das bandas em 2142 e 1937 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento C-N do cianeto ligado ao Fe e N-O da nitrosila ligada ao Fe, do NPS, respectivamente^{26,43,45}.

Szacilowski⁵² e Ashby⁶⁴ atribuem a banda em 2089 cm^{-1} à vibração de estiramento do C-N do NPS reduzido ($[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$), que pode ser oxidado de volta a NPS pela presença de oxigênio conforme afirmam Butler^{40,58} e Sieklucka⁵¹.

O NPS reduzido pode ser formado a partir da redução do NPS pelo íon tiolato (que está presente na solução tamponada, porém em baixa concentração), conforme a equação 14⁶⁵:



Ashby⁶⁴ atribui também uma banda em 1648 cm^{-1} à vibração de estiramento N-O do NPS reduzido, porém, no espectro da Fig.8, nessa região, há uma banda muita intensa e larga resultante da vibração de estiramento O-H da água (não mostrada), já que a medida foi realizada em solução aquosa. No entanto, nesse mesmo espectro existe uma banda em 1905 cm^{-1} , que se encontra na região de vibração de estiramento de NO^{26} e por essa razão foi atribuída ao NO do NPS reduzido.

O desaparecimento da banda em 1905 cm^{-1} está associado à diminuição de intensidade da banda em 2089 cm^{-1} e ao aparecimento da banda em 2038 cm^{-1} . Sabe-se que a banda em 2038 cm^{-1} corresponde a espécie aquapentacianoferrato (II) (contendo Fe^{II}) e está associada ao produto formado a partir da reação do NPS

com um tiol, mais especificamente a CiSH, ou seja, a decomposição do NPS reduzido leva à formação do produto final com banda em 2038 cm⁻¹.

De acordo McCleverty⁹, as reações de tióis com NPS apresentam evidências visuais, como mudança de cor da solução de tiol imediatamente após a adição do NPS, além de variações espectrais bastante significativas. No entanto, essas evidências não foram notadas quando as reações foram realizadas em pH 7,4.

Considerando os valores de pK_a dos tióis, listados na Tabela 4, nota-se que em pH 7,4, os tióis estão predominantemente na forma protonada, sendo quase insignificante a concentração de íons tiolato livres no equilíbrio. Em pH > 10, o equilíbrio de dissociação dos tióis (Eq. 15) está deslocado para a direita, ou seja, há maior concentração de íons tiolato livres.



Tabela 4: Valores de pK_a para os tióis utilizados⁵⁵.

Tiol	pK _a
CiSH	8,4
NAC	8,8
GSH	9,5

Por essa razão decidiu-se realizar as reações nas mesmas condições que aquelas em meio tamponado, no entanto, optou-se por basificar as soluções de tiol utilizando uma solução de NaOH, antes de iniciar as reações.

4.2. Análises espectroscópicas das reações do NPS com tióis em meio básico, no UV/Visível

Nas reações realizadas em pH 10,0, observou-se uma coloração rosa intensa logo após a adição do NPS à solução de tiolato, que corresponde ao aparecimento de uma banda transiente em 521 nm (Fig. 10-11). Até o final do experimento (cerca de 1h) a solução foi perdendo a cor até adquirir uma coloração castanha.

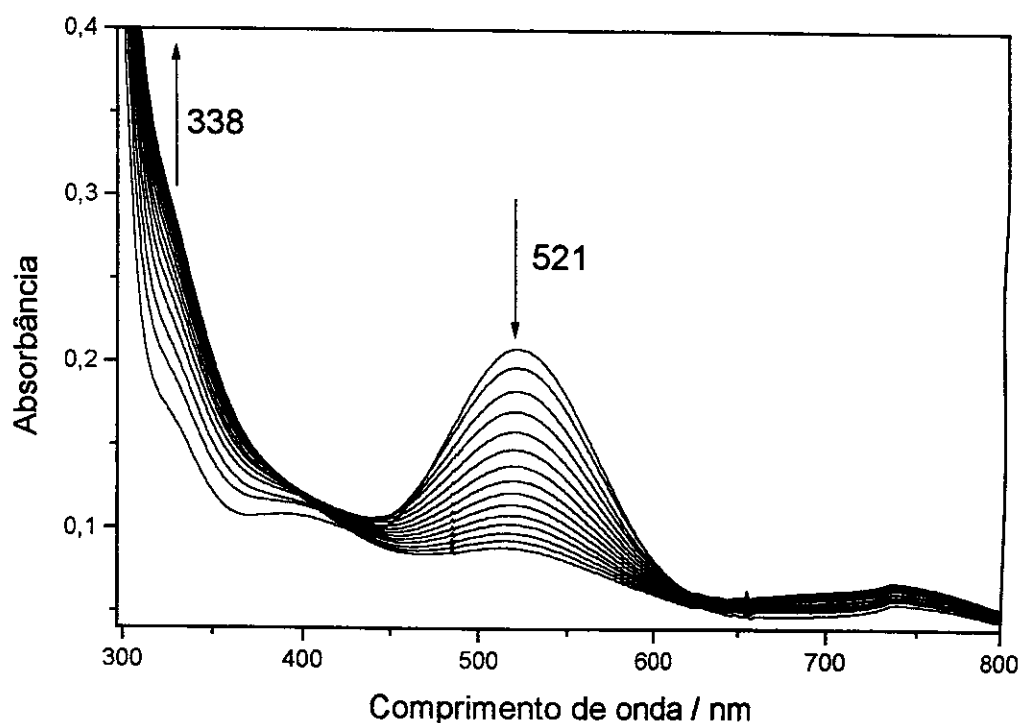


Figura 10. Variações espectrais na região do UV/VIS, da reação do NPS com a CiSH em pH 10,0. Soluções equimolares $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo da análise 4000 s; intervalo entre os espectros 250 s. Temperatura = 25°C .

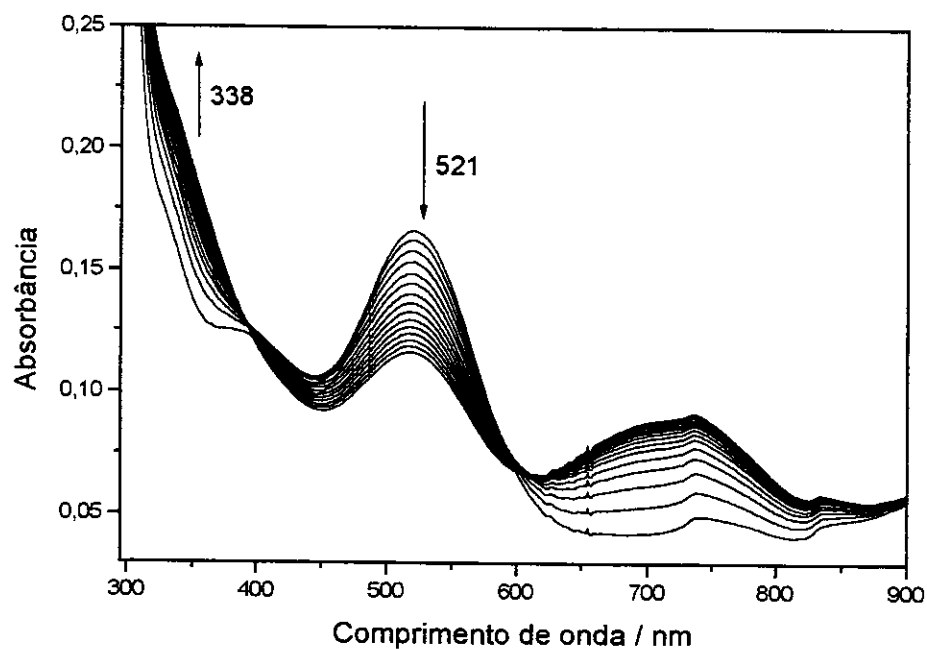


Figura 11. Variações espectrais na região do UV/VIS, da reação do NPS com a NAC em pH 10,0. Soluções equimolares $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo da análise 4000 s; intervalo entre os espectros 250 s. Temperatura = 25°C .

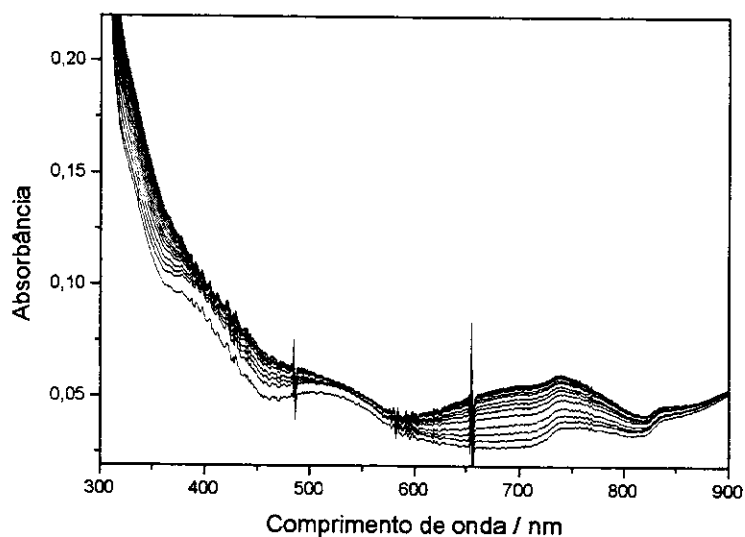
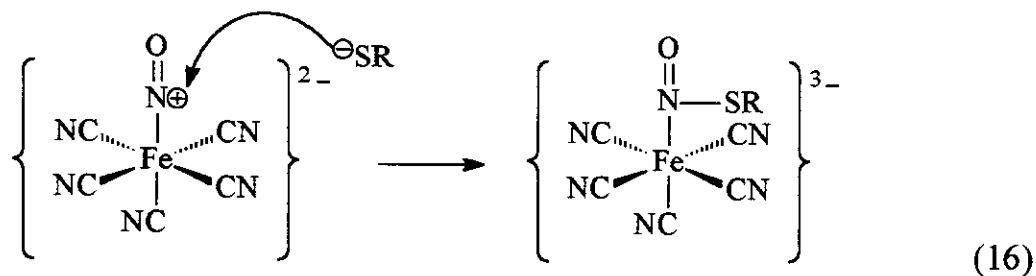


Figura 12. Variações espectrais na região do UV/VIS, da reação do NPS com a GSH em pH 10,0. Soluções equimolares $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo da análise 4000 s; intervalo entre os espectros 250 s. Temperatura = 25°C .

Na Figura 13 está apresentado o acompanhamento dessa cinética através das variações espectrais no UV/VIS para a reação com a CiSH, a NAC e a GSH. O desaparecimento dessa banda está associado ao aparecimento de uma banda em 338 nm. Estas variações espectrais são observadas principalmente nas reações da CiSH e da NAC (Fig. 10 e 11) com o NPS em meio básico, a GSH (Fig. 12) não apresentou variação espectral significativa.

A banda transiente em 521 nm pode ser associada a um aduto intermediário, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$, formado a partir do ataque nucleofílico do íon tiolato ao ligante NO do ânion nitroprussiato, que possui uma carga parcial positiva (Eq. 16)^{25,52,54-56}.

Sabe-se que os nitrosotióis apresentam duas bandas de absorção características: em 336 e 550 nm⁶³. A banda em 336 nm é atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e a banda em 550 nm é atribuída a uma transição $n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$. A observação da banda do aduto em 521e não em 550 nm, é uma evidência de que o NO do grupo RSNO está ainda coordenado ao ferro do ânion nitroprussiato. Com esta coordenação, espera-se uma alteração nos níveis de energia da transição $n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$ que, no caso, mostra um aumento no “gap” de energia, correspondente ao deslocamento hipsocrômico observado.



O produto com absorbância em 338 nm pode ser atribuído à formação de um aquacianocomplexo de Fe^{2+} em que o grupo RSNO foi substituído por uma molécula de H_2O , conforme a Eq.12^{25,64,66}. Nota-se que sua formação está associada ao desaparecimento da banda em 521 nm e ao aparecimento da banda em 338 nm, como pode ser visto nas curvas cinéticas de acompanhamento dessas duas bandas, na Fig. 13.

O ajuste das curvas cinéticas foi feito usando uma equação integrada de primeira ordem (representado pelas curvas sobre os pontos experimentais), pois o decaimento da banda em 521 nm corresponde à decomposição da espécie intermediária, tratando-se de um processo unimolecular. A formação do produto com banda em 338 nm depende da decomposição do intermediário sendo, também, um processo unimolecular e, portanto, ajustável à uma equação de crescimento exponencial de primeira ordem.

O excesso de hidroxila presente na solução pode reagir com o NPS. As reações são bem conhecidas, e formam um complexo contendo o grupo nitro ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5 \text{NO}_2]^{4-}$) (Eq. 17-18). Esse complexo pode liberar o ânion nitrito (NO_2^-) e formar um complexo aquapentacianoferrato (III) (contendo Fe^{3+}), de acordo com o equilíbrio da Eq. 19^{33,37,9,68-69}.

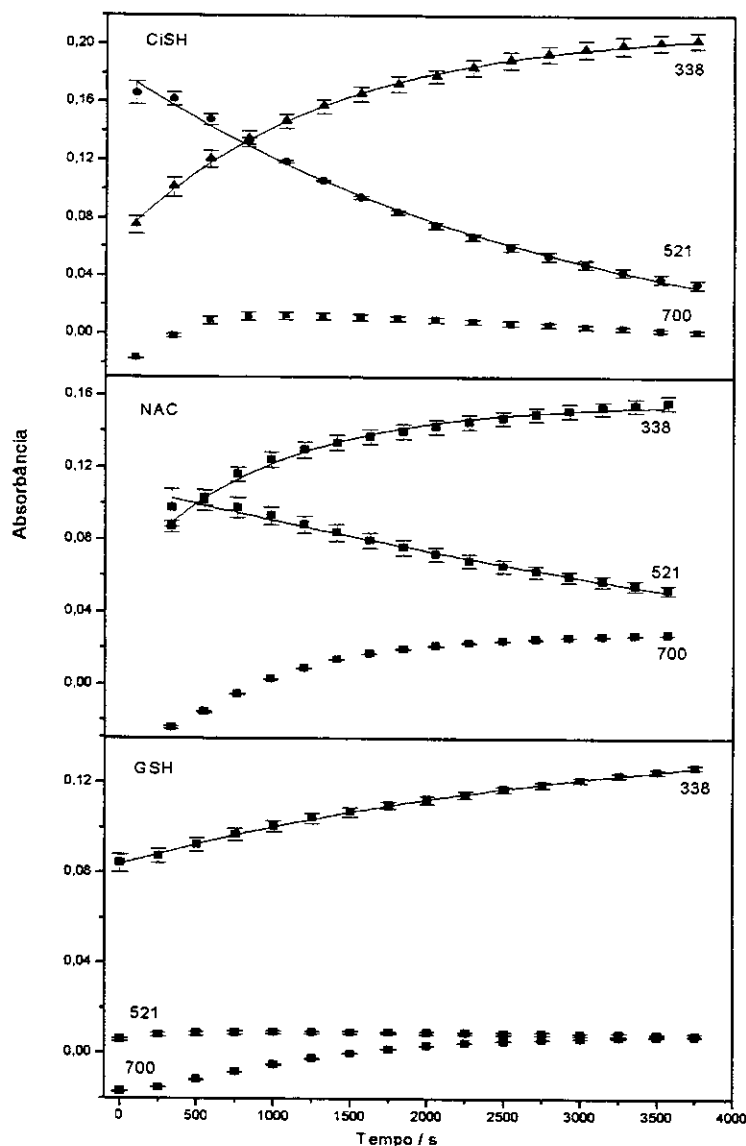
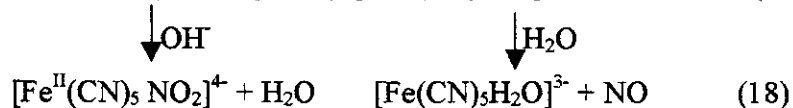
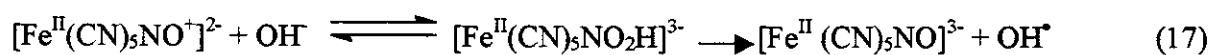


Figura 13. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 338, 521 e 700 nm, para as reações do NPS com CiSH, NAC e GSH, em pH 10. Intervalo de tempo entre os espectros = 250 s. NPS e tióis em concentrações equimolares de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Temperatura = 25°C . As curvas de ajuste de crescimento e decaimento exponenciais estão apresentadas para mostrar a qualidade do ajuste. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.



O complexo aquapentacianoferrato (III) pode reagir com um complexo aquapentacianoferrato (II) formado de acordo com a Eq.19, formando complexos de valência mista $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, como o azul da Prússia ($\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)⁷⁰. A banda com absorção na região de 700 nm foi atribuída a essa espécie^{71,72}.

Em meio básico, o decaimento da banda em 521 nm segue uma cinética de primeira ordem nas reações do NPS com CiSH e NAC. Os valores das constantes de velocidade obtidos a partir das curvas cinéticas estão apresentados na Fig. 14. No caso da reação com a GSH, a variação espectral foi muito pequena e não permitiu ajuste de curva.

O crescimento da banda em 338 nm permitiu o ajuste de uma equação de crescimento exponencial, porém os valores de k encontrados para o crescimento dessa banda são maiores que os valores de k de decaimento da banda em 521 nm. Isso indica que o crescimento da banda com absorção em 338 nm não está relacionado somente à decomposição do complexo intermediário com absorção em 521 nm. Deve haver outra espécie presente no meio que também absorve na região do UV. Para verificar a contribuição da absorção de outros produtos nesta região, foi realizado um experimento de redução do NPS com hidroxila.

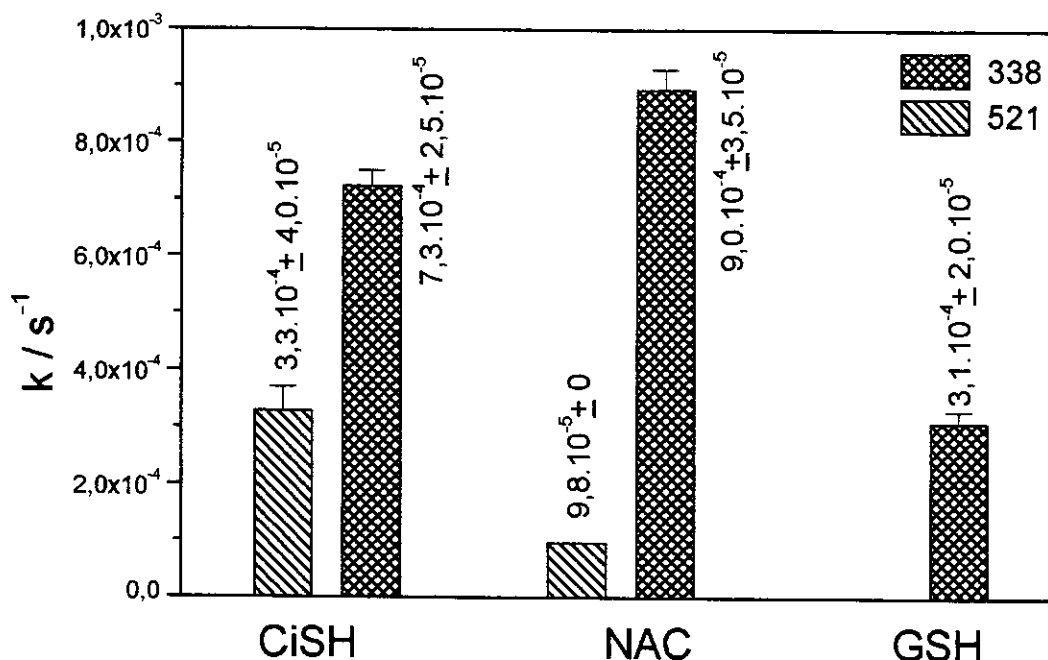


Figura 14. Constantes de velocidade de decaimento de primeira ordem da banda do intermediário (521 nm) e de crescimento da banda do complexo aquapentacianoferrato (II) (338nm) para as reações do NPS com os tióis, soluções equimolares 2,0 mmol L⁻¹, pH 10,0, Temperatura = 25°C. A curva relativa ao decaimento da banda em 521 nm da GSH não permitiu ajuste. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.

4.3. Análises espectroscópicas das reações do NPS com o ânion hidroxila, no UV/Visível

Na Fig.15, nota-se a formação de uma banda com λ próximo à 420 nm, referente à redução do NPS em meio básico. Esta banda foi atribuída ao produto

formado a partir da reação do NPS com o NaOH, à espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2]^{3-}$ (Eq. 17).

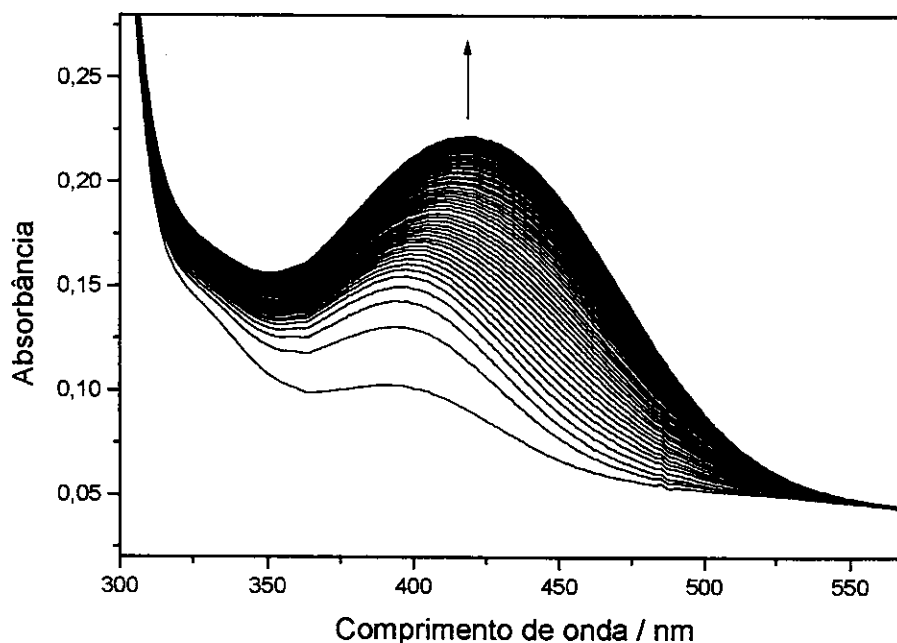
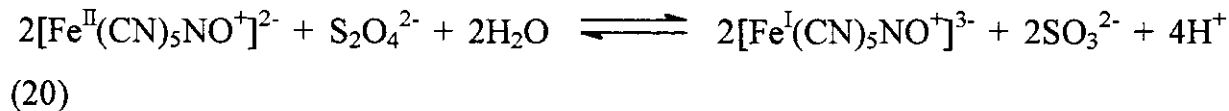


Figura 15. Variações espectrais na região do UV/VIS na redução do NPS pela hidroxila. Soluções equimolares $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo da análise = 1800 s, intervalo 30s. Temperatura = 25°C .

4.4. Análises espectroscópicas das reações do NPS com ditionito de sódio, no UV/Visível

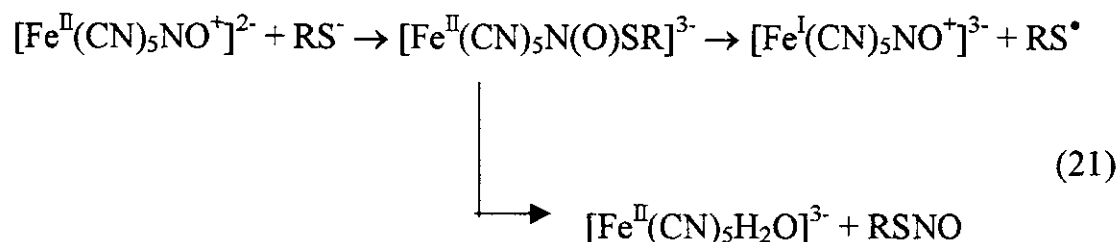
Para caracterizar outras espécies formadas na redução do NPS, foi acompanhada a reação de redução do NPS pelo ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), que é um agente redutor clássico, e que pode ser representada conforme a Eq.20:



O objetivo de reagir o NPS com outros agentes redutores (além do ditionito de sódio, a hidroxila e o ácido ascórbico) é somente de caráter exploratório, uma vez que estes agentes redutores não existem em meio fisiológico.

A Fig. 16 mostra o surgimento de três bandas novas em 349, 430 e 618 nm atribuídas à espécie $[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{NO}^+]^{3-}$ (NPS reduzido)⁵². Portanto, é possível dizer que os valores maiores das constantes de velocidade de decomposição do produto com banda em 338 em relação à banda 521nm se devem ao aparecimento de duas bandas sobrepostas, na região de 300-400 nm, resultantes de processos diferentes e que ocorrem paralelamente.

Isso indica que a decomposição do intermediário pode gerar dois produtos. Um deles é o complexo aquapentacianoferrato (II), com liberação de NO, e o outro, formado paralelamente, é o NPS reduzido pelo tiolato, em que o NO se mantém coordenado (Eq.21).



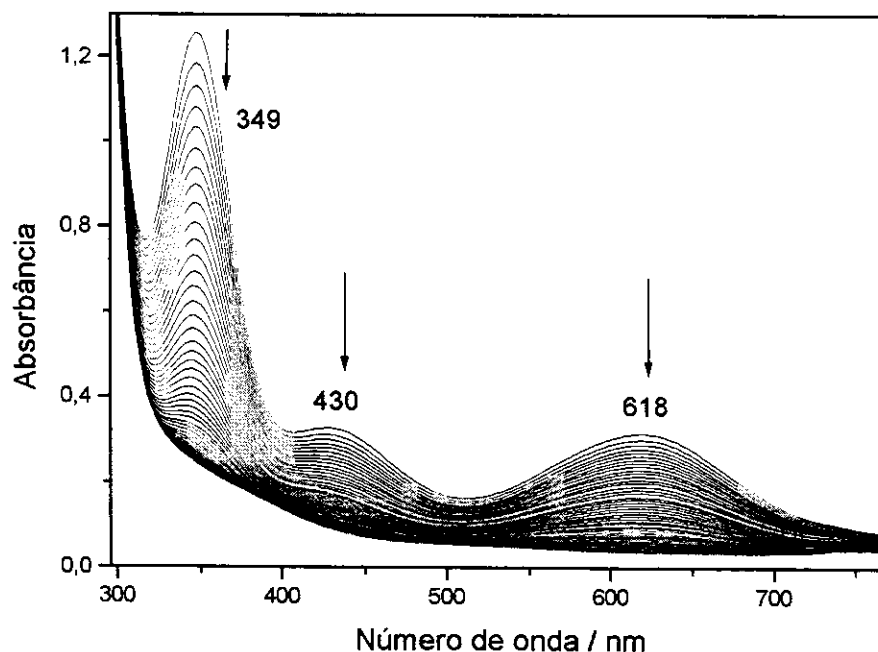
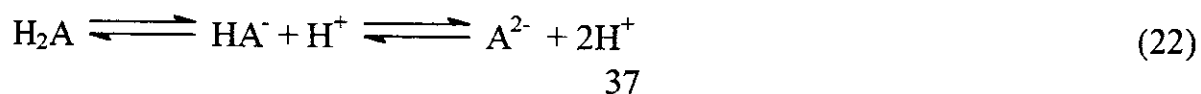


Figura 16. Variações espectrais na região do UV/VIS na reação do NPS com o ditionito de sódio. Soluções equimolares $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$; intervalo entre os espectros 60 s; tempo de análise 3600 s. Temperatura = 25°C .

4.5. Análises espectroscópicas das reações do NPS com ácido ascórbico, no UV/Visível

O ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)(H_2A) também é um conhecido agente redutor e pode ser encontrado em condições fisiológicas. A reação foi realizada em pH 10,0 (Fig. 17) garantindo, assim a presença de uma alta concentração de ânions A^{2-} no equilíbrio (Eq.22) pois as reações em pH 7,4 mais uma vez não apresentaram variações espectrais significativas.



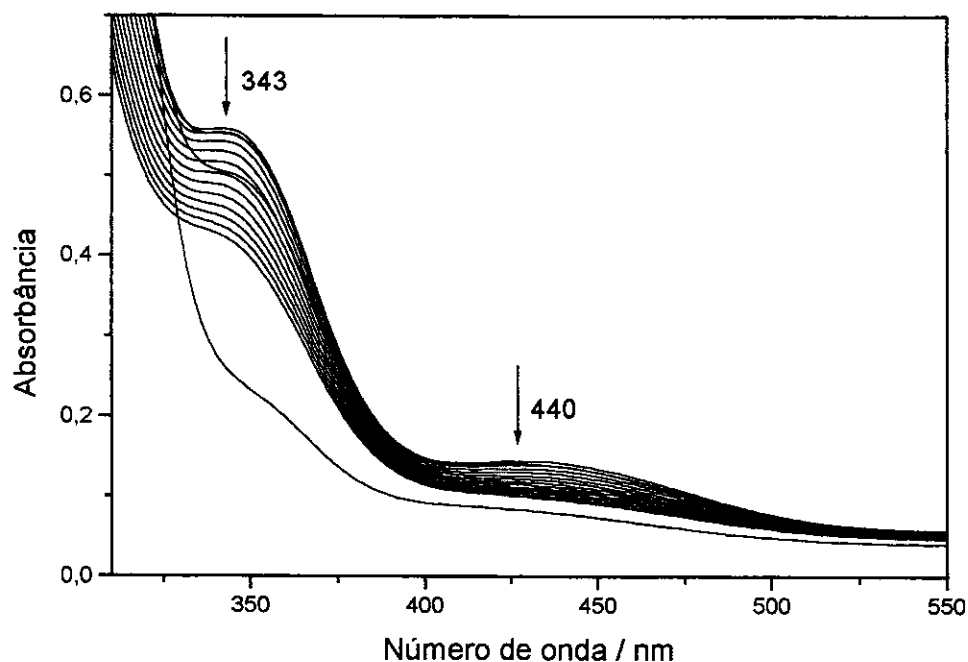


Figura 17. Variações espectrais na região do UV/VIS na reação do NPS com o ácido ascórbico. Soluções equimolares $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$; intervalo entre os espectros 250 s; tempo de análise 3600 s. Temperatura = 25°C .

Smith⁷³ *et al.* afirmam que nessa redução há a liberação de NO livre, no entanto, em pH elevado, há a formação de $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO}_2)]^{2-}$ que diminui a liberação de NO livre. Nas análises feitas por esses autores, após realizar as reações em diferentes valores de pH, concluiu-se que as reações do NPS com a hidroxila predominam em relação às reações do NPS com o ascorbato. Mulvey⁵⁰ *et al.* reagiram NPS com ácido ascórbico em pH 10,0 e relataram o aparecimento da banda na região de 340-355 nm.

Dessa forma pode-se dizer que a variação espectral na região de 400 nm pode ser atribuída à reação do NPS com a hidroxila, porém, a variação espectral na região de 300 nm pode ser atribuída ao NPS reduzido, como também foi observada na reação com o ditionito de sódio.

4.6. Acompanhamentos cinéticos com diferentes proporções NPS : tiol

4.6.1. Proporção NPS : tiol 2 : 1

As Fig. 18-20 mostra mais uma vez que as variações espectrais mais significativas ocorreram quando o tiol utilizado foi a CiSH.

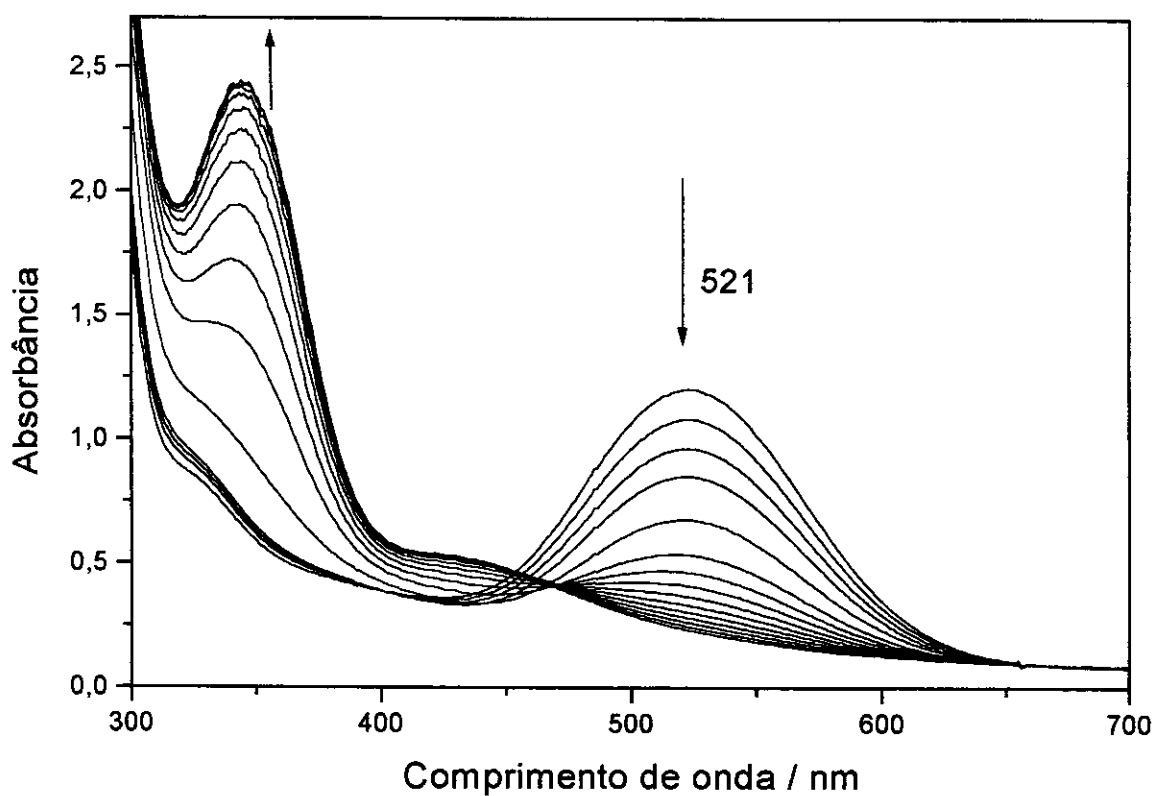


Figura 18. Variação espectral na região do UV/VIS, da reação do NPS com a CiSH em pH 10,0. Proporção NPS : tiol 2 : 1. Intervalo de tempo entre os espectros = 250 s. Tempo total da análise = 3750 s. Temperatura = 25°C.

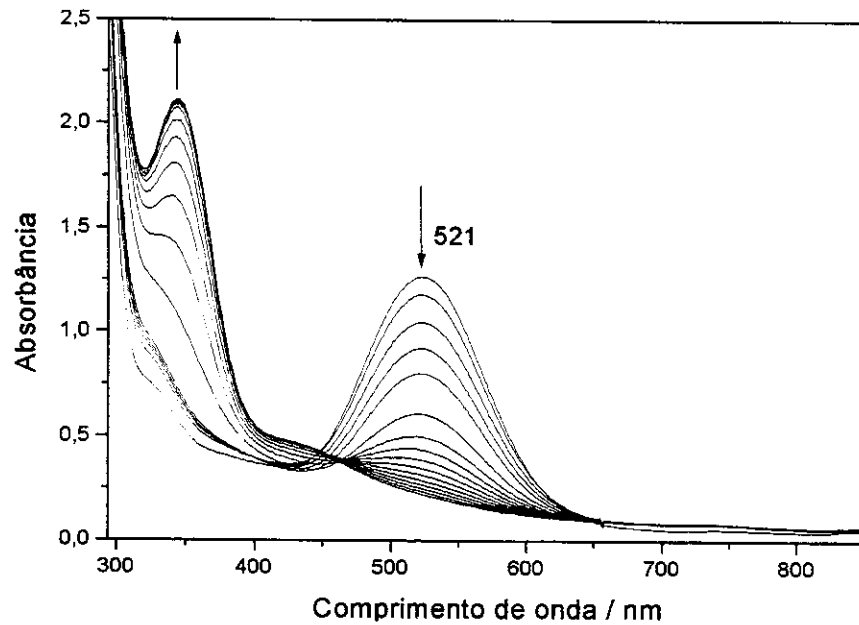


Figura 19. Variação espectral na região do UV/VIS, da reação do NPS com a NAC em pH 10,0. Proporção NPS : tiol 2 :1. Intervalo de tempo entre os espectros = 250 s. Tempo total da análise = 3750 s. Temperatura = 25°C.

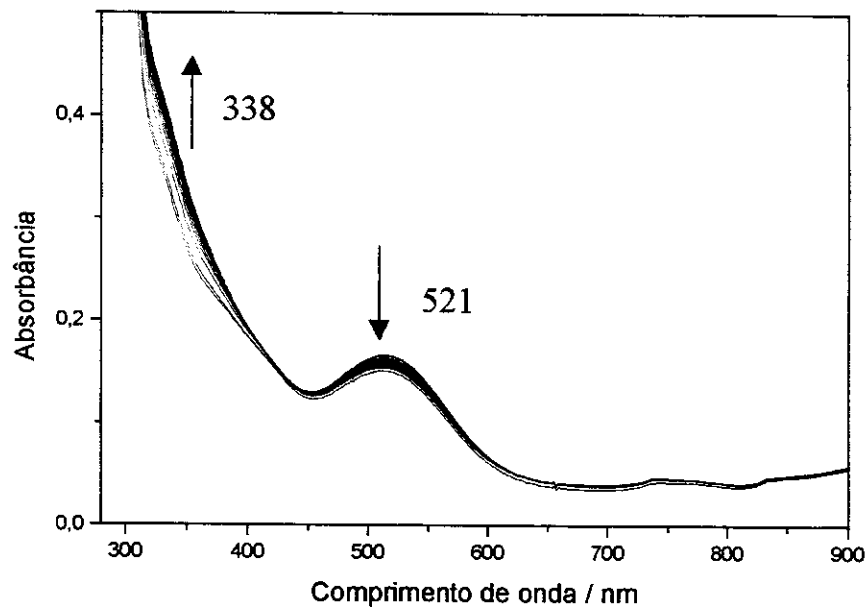


Figura 20. Variação espectral na região do UV/VIS, da reação do NPS com a GSH em pH 10,0. Proporção NPS : tiol 2 :1. Intervalo de tempo entre os espectros = 250 s. Tempo total da análise = 3750 s. Temperatura = 25°C.

É importante ressaltar que pela primeira vez foi observada a banda do aduto intermediário na reação com a GSH (Fig. 20), na proporção 1:1 esta banda não foi observada. Isso confirma que a reação da GSH com o NPS também ocorre através de um mecanismo que passa pela formação do aduto intermediário.

A presença da banda em 521 nm indica que a reação também envolve a espécie intermediária $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$. É possível notar que a reação ocorre em duas etapas; na primeira, a formação do produto em 338 nm é lenta e está associada com a decomposição do intermediário (banda em 521 nm). Na segunda etapa, quando praticamente não há mais intermediário a ser decomposto, inicia-se o crescimento da banda em 338nm. Esse comportamento é facilmente observado nas curvas de acompanhamento cinético das bandas (Fig.21).

Na primeira etapa, em que há a decomposição do intermediário, o processo que ocorre é o mesmo descrito anteriormente, ou seja, a decomposição do intermediário levando à formação do complexo aquapentacianoferrato (II), que absorve na região de 338 nm. Assim, observa-se o desaparecimento da banda em 521 nm e um crescimento pequeno da banda em 338 nm.

Na segunda etapa, todo o tiolato presente na solução já foi consumido e ainda resta um excesso de NPS que foi adicionado à solução; esse NPS excedente é reduzido pela hidroxila que também está presente na solução, formando o complexo com ligante nitrito, que absorve na região de 400 nm. No espectro, esse comportamento é refletido através de uma queda quase insignificante da banda em 521 nm e um crescimento acentuado na região de 300-400nm.

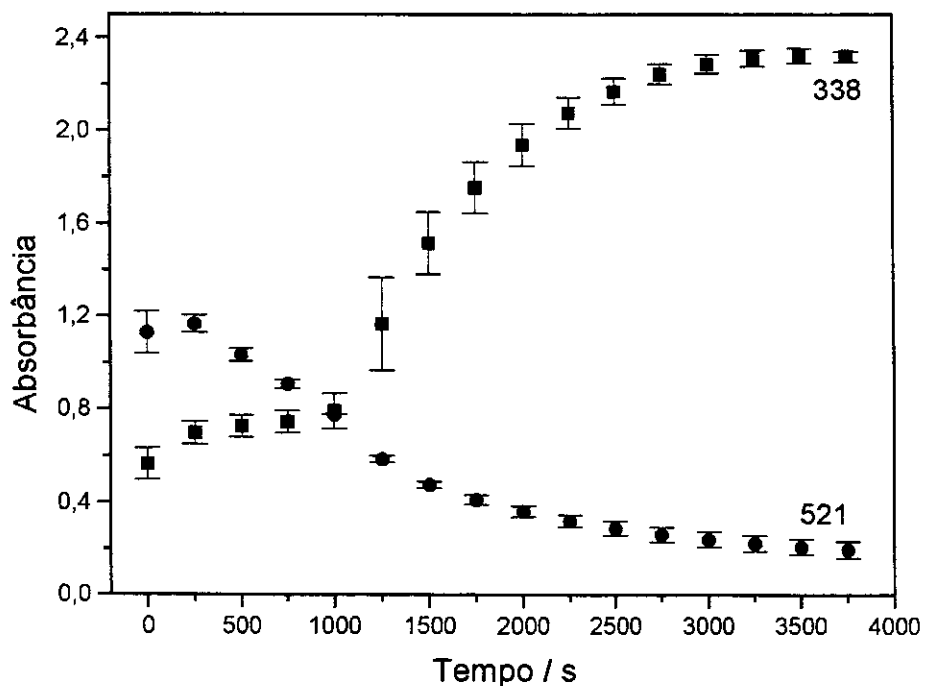


Figura 21. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 338 e 521 nm, para a reação do NPS com a CiSH, em pH 10,0 e proporção NPS: tiol = 2:1. Intervalo de tempo entre os espectros = 250 s. Temperatura = 25°C. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.

Comparando a velocidade de queda da banda correspondente ao intermediário nas variações espectrais dos dois outros tióis (não mostradas), observa-se que o intermediário mais estável é aquele formado pelo NPS ligado à GSH, com velocidade de decomposição bastante baixa quando comparada às outras (Fig. 22).

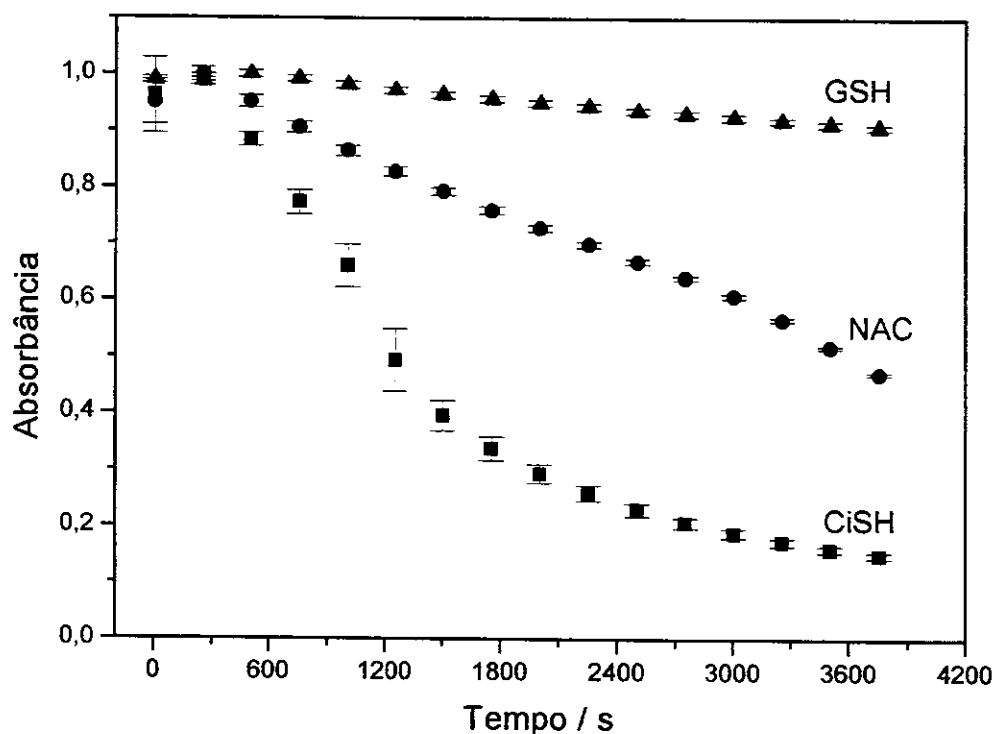


Figura 22. Comparação da velocidade de desaparecimento da banda do intermediário nas reações NPS : tiol = 2 : 1. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.

4.6.2. Proporção NPS : tiol 1 : 2

Na reação em que a proporção NPS : tiol foi invertida para 1:2, a variação espectral mais significativa foi obtida novamente na reação com a CiSH (Fig. 23). Nas reações com a NAC (Fig. 24) e a GSH, observou-se apenas a banda do intermediário que ficou constante durante o tempo em que a reação foi acompanhada.

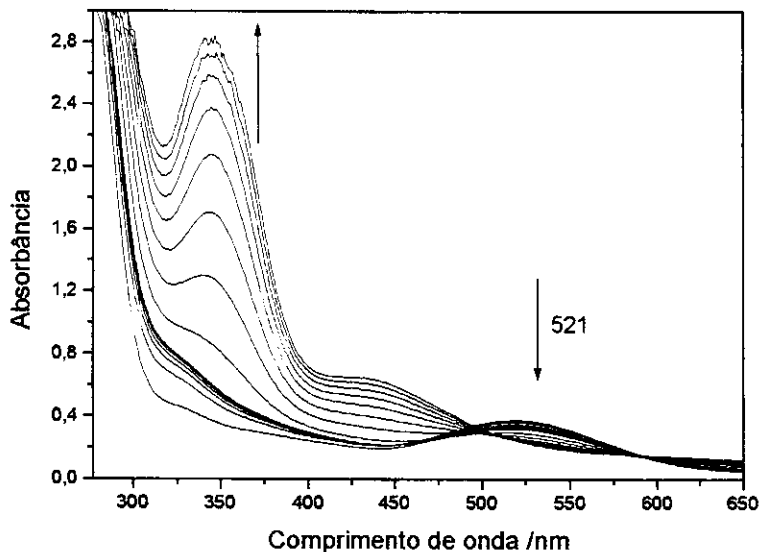


Figura 23. Variação espectral na região do UV/VIS, da reação do NPS com a CysH em pH 10,0. Proporção NPS : tiol 2 :1. Intervalo entre os espectros = 250 s. Tempo total da análise = 3750 s. Temperatura = 25°C.

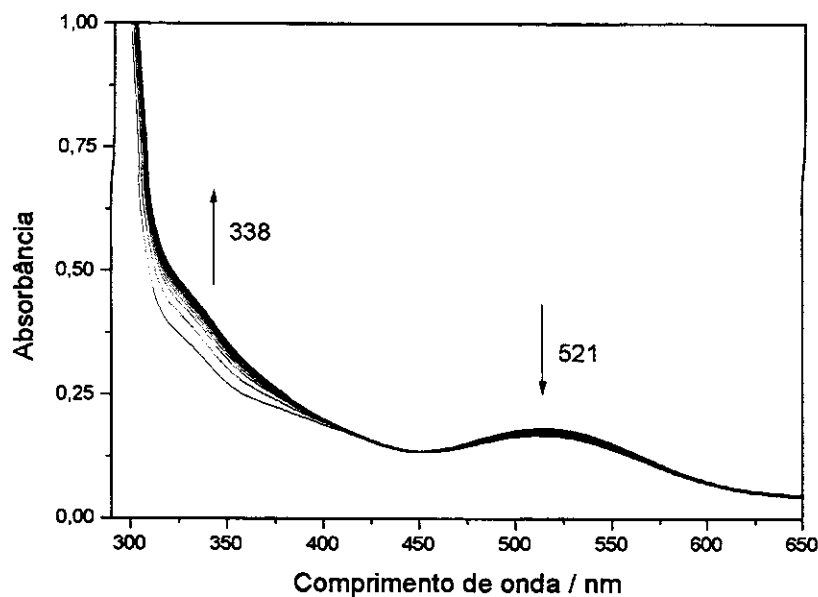


Figura 24. Variação espectral na região do UV/VIS, da reação do NPS com a NAC em pH 10,0. Proporção NPS : tiol 2 :1. Intervalo entre os espectros = 250 s. Tempo total da análise = 3750 s. Temperatura = 25°C.

Observa-se que a análise da variação espectral da redução do NPS pela CiSH também apresenta um mecanismo em duas etapas (Fig. 23 e 25). A primeira consiste na queda da banda do intermediário e formação da banda em 338 nm, e a segunda ocorre quando a banda do intermediário desapareceu completamente e só o crescimento acentuado da banda na região de 340 nm é observado.

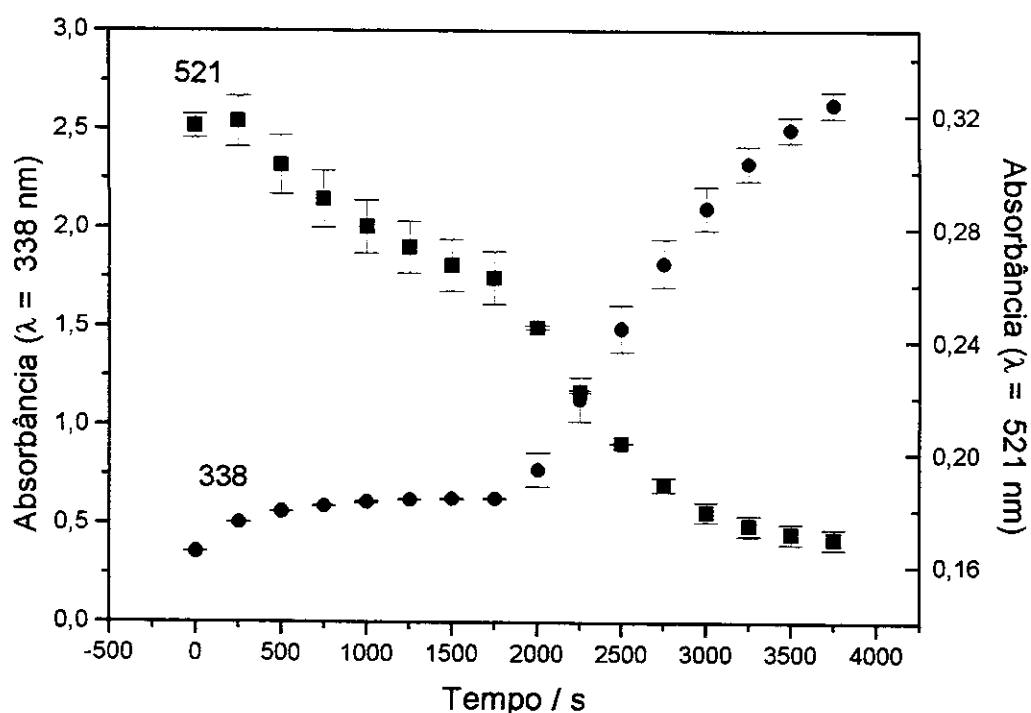


Figura 25. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 338 e 521 nm, para a reação do NPS com a CiSH, em pH 10 e proporção NPS: tiol = 1:2. Intervalo de tempo entre os espectros = 250 s. Temperatura = 25° C. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.

Szacilowski⁵² *et al.* propõe que quando um excesso de tiol é adicionado, a redução do ferro é mais rápida e que ocorre através de um mecanismo autocatalítico. A reação é iniciada por radicais sulfeto ($RS^{\bullet}$) produzidos a partir da decomposição espontânea do $[Fe(CN)_5N(O)SR]^{3-}$ que são sequestrados pelo tiolato

e transformados em $\text{RSSR}^\bullet$ (Eq. 23). Esses autores observam, também, que a reação ocorre mais rápido para os radicais de CiSH quando comparados aos de GSH.

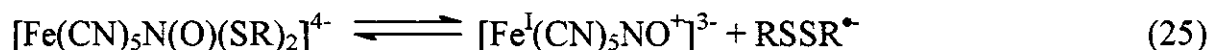


Os radicais $\text{RSSR}^\bullet$ são redutores e nucleofílicos e podem reagir com o intermediário, cuja reação é responsável pela propagação da reação em cadeia e com o NPS, sendo responsável pela terminação da reação em cadeia.

A reação com o intermediário formará uma espécie contendo dois tióis e é resultante do ataque nucleofílico do radical ao fragmento S-N-O do intermediário (Eq.24).



Esse intermediário contendo dois tióis pode se decompor, dando origem ao NPS reduzido, com Fe^{I} (Eq.25):

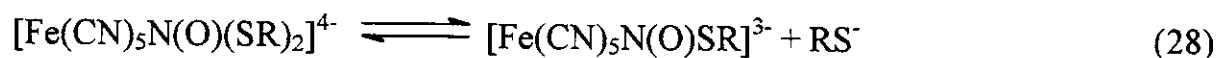


Essa sequência de reações gera quantidades adicionais de radicais $\text{RSSR}^\bullet$ que é responsável pela reação em cadeia da decomposição do intermediário por essa espécie.

A reação entre o NPS e o radical $\text{RSSR}^\bullet$ termina o mecanismo, consumindo o radical e produzindo NPS reduzido (Eq. 26) :



A recombinação dos radicais sulfeto (Eq. 27) e a decomposição heterolítica do intermediário (Eq. 28) com dois tióis também contribuem para a finalização do processo.



Comparando a velocidade de queda da banda correspondente ao intermediário (Fig. 26), observa-se novamente que o intermediário mais instável é aquele formado pelo NPS ligado à CiSH, com velocidade de decomposição maior quando comparada aos outros.

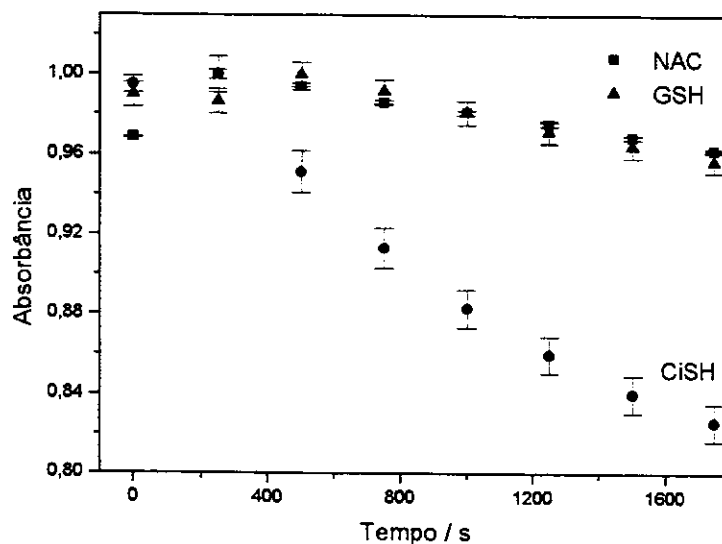


Figura 26. Comparação da velocidade de desaparecimento da banda do intermediário nas reações NPS : tiol = 1 :2. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.

Na Fig. 27, comparam-se os valores das velocidades iniciais de decomposição do intermediário para os três tióis, nas proporções 2:1 ($V_{\text{NPS}} : \text{tiol} = 2:1$) e 1:2 ($V_{\text{NPS}} : \text{tiol} = 1:2$) e, também, as constantes de velocidade de desaparecimento da banda em 521 nm, nas reações em pH 10,0, na proporção NPS : tiol = 1:1. Nos casos em que há excesso de NPS, para a CiSH e a NAC, os valores das velocidades de decomposição são maiores quando comparados ao caso em que há excesso de tiol.

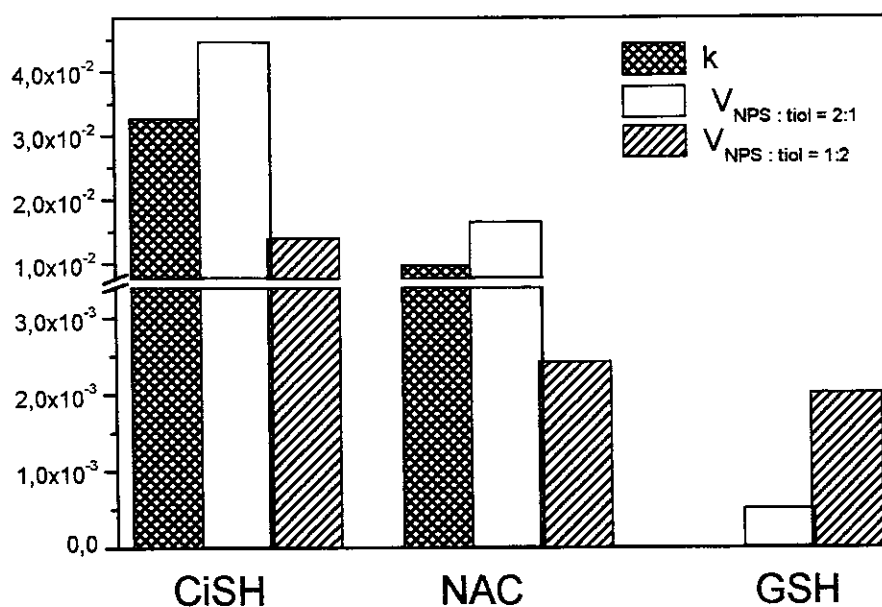


Figura 27. Valores das constantes de velocidade (s^{-1}) de decaimento da banda em 521 nm, nas reações em pH 10,0 e proporção NPS : tiol = 1:1. Velocidades iniciais (s^{-1}) de decomposição do intermediário nas reações nas proporções NPS : tiol = 2:1 e 1:2.

Mais uma vez nota-se que a CiSH é o tiol mais reativo e que forma o intermediário mais instável. Aravindakumar⁶⁵ *et al.* reagiram em meio des aerado o NPS com a CiSH e a GSH e concluíram que a CiSH também é mais reativa.

Relacionaram a maior constante de velocidade da CiSH ao seu grau de ionização. A constante de velocidade da GSH é bem menor que a da CiSH, em mesmo pH e isso também foi atribuído ao seu pK_a ; concluem, também, que, aparentemente, o efeito estérico não afeta a reatividade da GSH.

4.7. Análises espectroscópicas das reações do NPS, em meio básico, no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi outra técnica utilizada neste trabalho para investigar a cinética das reações do NPS com os tióis em meio básico. Na Fig. 28 são observadas as variações espectrais no IV da reação do NPS com a CiSH, NAC e GSH na presença de NaOH. Nos três casos, observa-se a diminuição de intensidade das bandas associadas aos estiramentos do NPS em 1937 cm^{-1} ($\nu\text{ NO}$) e 2142 cm^{-1} ($\nu\text{ CN}$) e o aparecimento de duas bandas transientes em 2048 e 2073 cm^{-1} . A banda em 2048 cm^{-1} foi identificada experimentalmente (mostrada na Fig. 30) e atribuída à espécie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{NO}_2]^{3-}$ formada na reação paralela do NPS com o OH^- de acordo com as Eq. 17-18^{53,54}. A banda em 2073 cm^{-1} pode ser atribuída à espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$, formada a partir do ataque do tiolato ao NPS, como mostra a Eq. 15⁵².

O desaparecimento destas bandas está associado ao aparecimento de duas bandas novas em 2089 cm^{-1} e 2038 cm^{-1} . A banda em 2089 cm^{-1} , foi atribuída ao NPS reduzido ($[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$) com base na variação espectral no IV obtida na redução do NPS pelo ditionito (Fig. 31)⁵². A banda em 2038 cm^{-1} , foi atribuída ao ânion aquapentacianoferrato (II) ($[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$)⁵⁵.

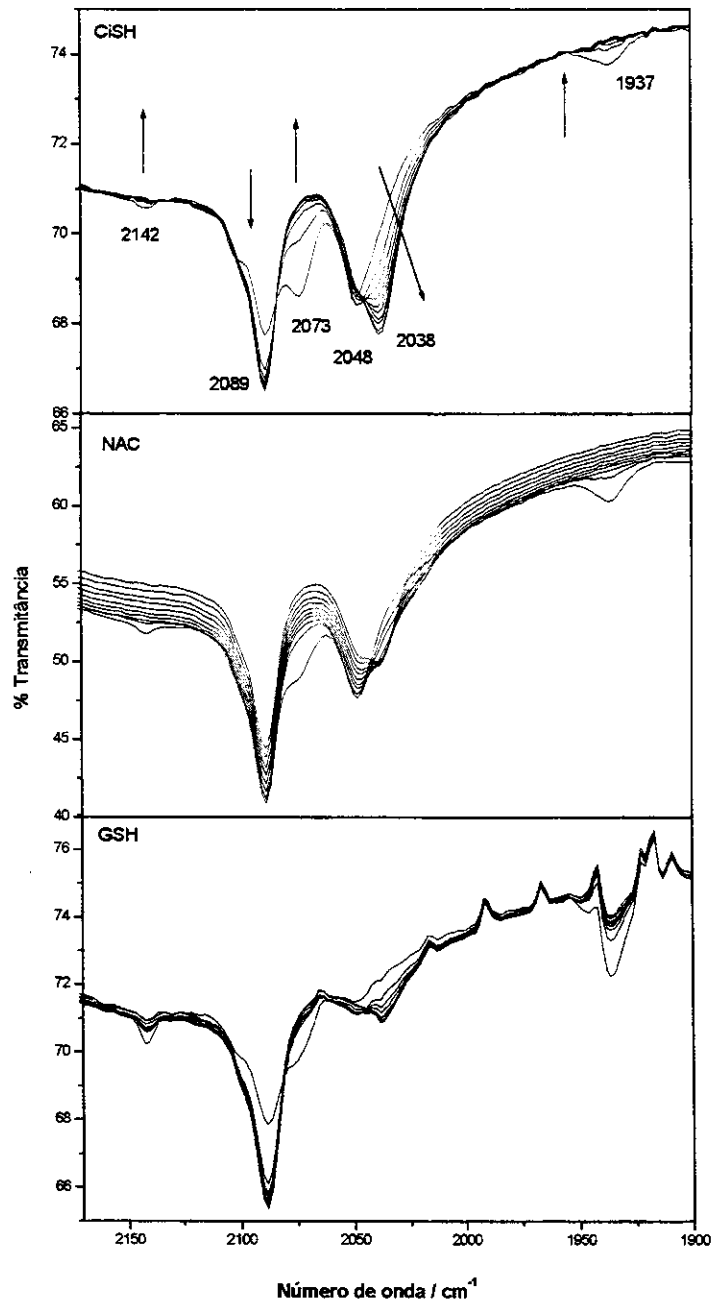


Figura 28. Variações espectrais na região do IV, para as reações do NPS com a CiSH, NAC e GSH, respectivamente. Soluções equimolares de 0,2 mol L⁻¹, pH 10,0, espectros obtidos a cada 60 s. Tempo total da análise = 600s. Temperatura = 25° C. O primeiro espectro foi obtido cerca de 15 s após a mistura dos reagentes.

Na Fig. 29 é feita uma comparação entre espectros de solução de NPS em água, complexos pentacianoferrato (II) e (III) e uma variação espectral da reação do NPS com tiol. A partir desta comparação pode-se confirmar que a espécie que aparece em 2038 cm^{-1} é um complexo pentacianoferrato (II).

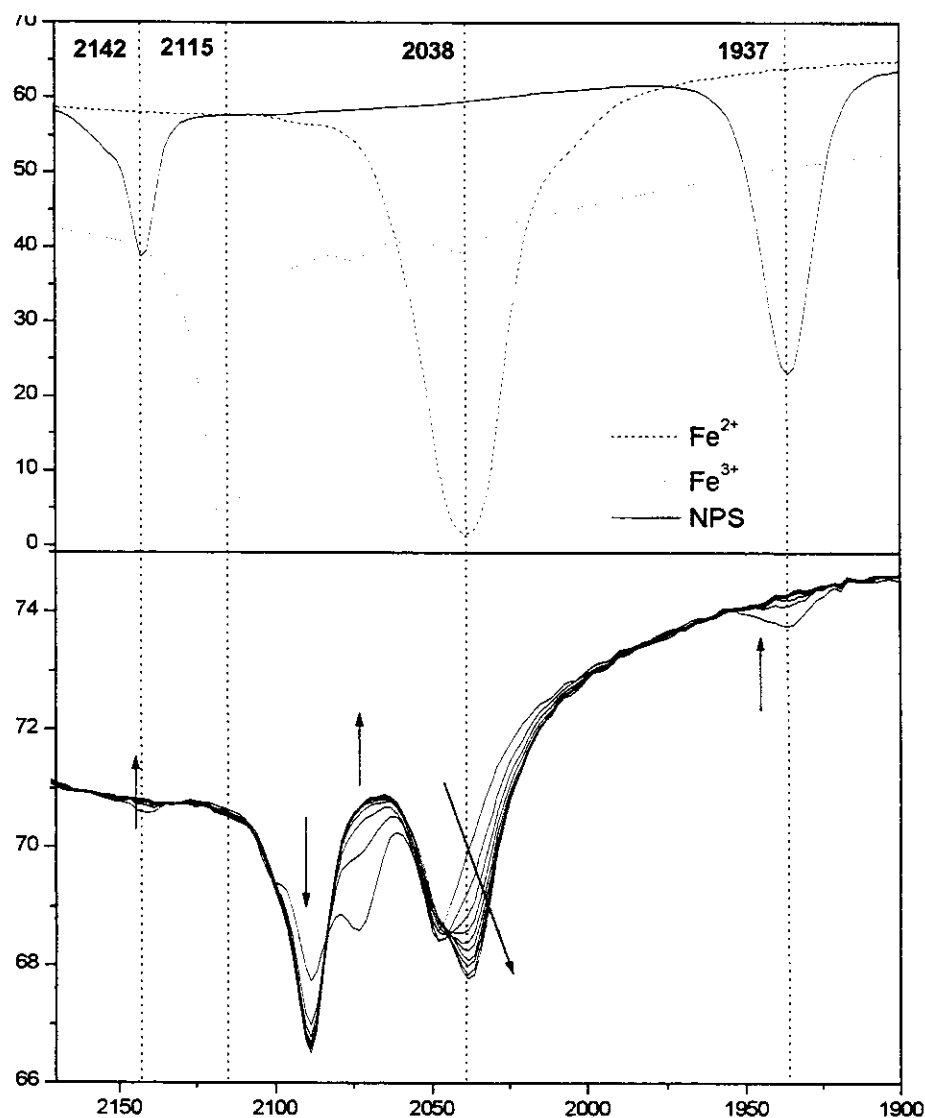


Figura 29. Espectros de absorção do NPS, complexos pentacianoferrato (II) e (III) e variação espectral correspondente à reação do NPS com a CiSH em pH 10,0.

Soluções equimolares $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Intervalo entre os espectros = 60s. Tempo total da análise = 600s. Temperatura = 25° C .

A Fig. 30, em que se acompanhou a redução do NPS pelo ânion hidroxila no IV, apresenta a banda relativa ao produto gerado a partir da decomposição do intermediário: em 2089 cm^{-1} . Como estas bandas estão em posições distintas, foi possível confirmar que há a formação simultânea dos dois produtos gerados paralelamente na redução do NPS pelos tióis; o NPS reduzido e o complexo aquapentacianoferrato (II), já que no UV/VIS não é possível chegar a essa conclusão, uma vez que as bandas estão sobrepostas na região de 300-400 nm.

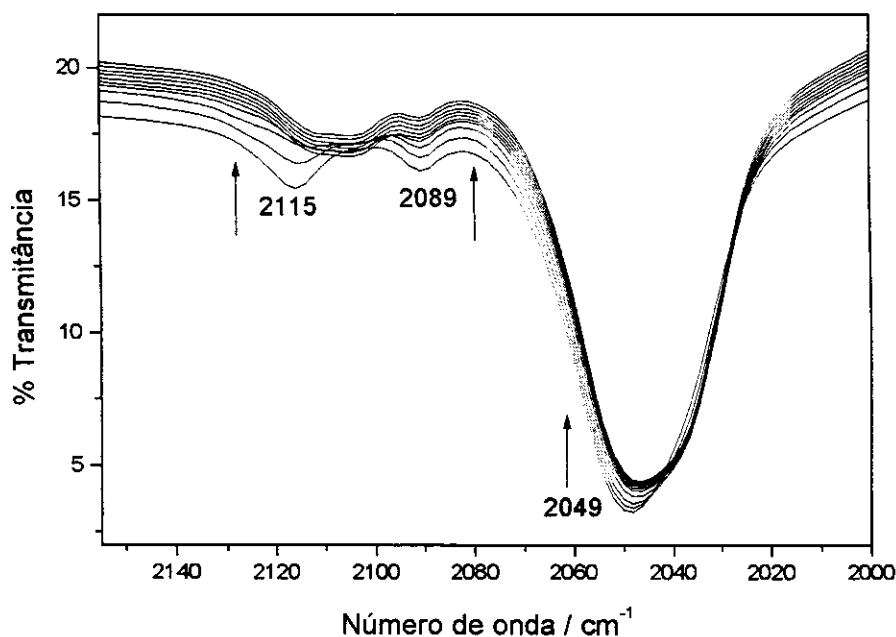


Figura 30. Variação espectral na região do IV para a redução do NPS pela hidroxila, soluções equimolares $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Espectros registrados a cada 60 s. Tempo total da análise = 600s. Temperatura = 25° C .

Os espectros dos produtos da reação do NPS com o ditionito no IV (Fig. 31) apresentam bandas novas em 2115, 2089 e 1800 cm^{-1} , sendo a última associada à vibração de estiramento do NO livre²⁵. Este resultado confirma que a redução do NPS pode levar à liberação de NO.

A queda na intensidade das bandas em 2142 e 1937 cm^{-1} corresponde ao consumo do NPS, enquanto a banda em 2089 cm^{-1} está novamente associada ao NPS reduzido. A banda em 2115 cm^{-1} , característica de complexos aquapentacianoferratos (III), contendo Fe^{III} , surge da sequência de reações mostradas nas Eq. 17-19, uma vez que na presença de ditionito de sódio o meio estará alcalino e levará à formação de complexos contendo Fe^{III} .

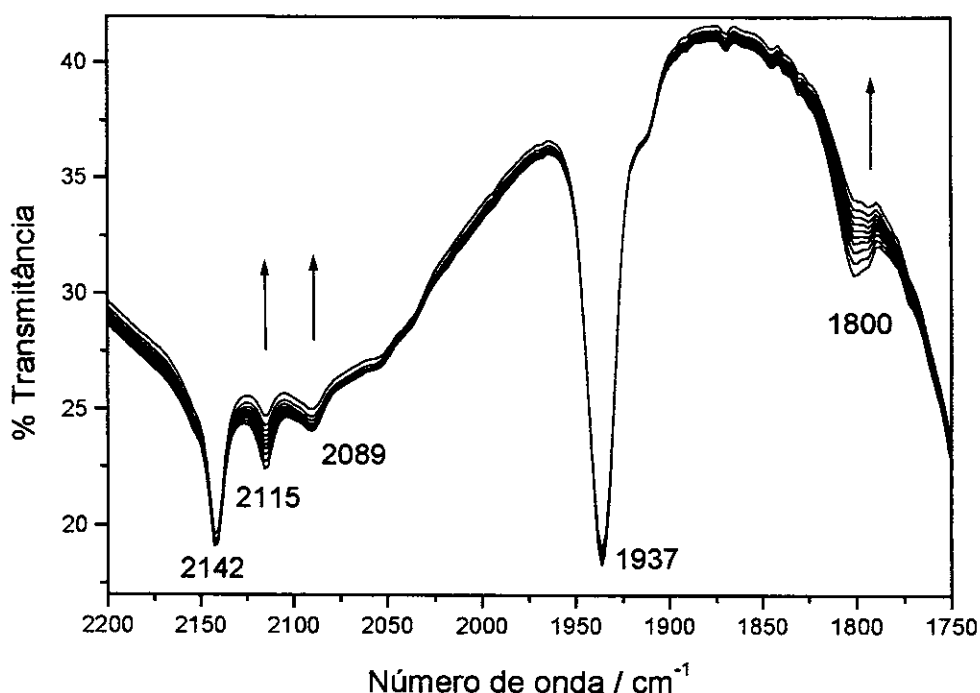


Figura 31. Acompanhamento da variação espectral da redução do NPS pelo ditionito de sódio. Soluções equimolares 0,2 mol L^{-1} ; intervalo entre os espectros de 60 s. Tempo total da análise = 600s. Temperatura = 25° C.

Foi feito um acompanhamento das bandas em 2073 e 2038 cm^{-1} da Fig. 28 (caso da CiSH) e as curvas cinéticas estão representadas na Fig. 32. Percebe-se uma queda mais acentuada da banda em 2073 cm^{-1} , associada ao intermediário. Simultaneamente, há um aumento na intensidade da banda em 2038 cm^{-1} , relativa ao produto estável. Estas curvas confirmam que a decomposição do intermediário leva à formação de dois produtos: o complexo aquapentacianoferrato (II), com absorbância em 338 nm e o NPS reduzido, com absorbância em 349 nm.

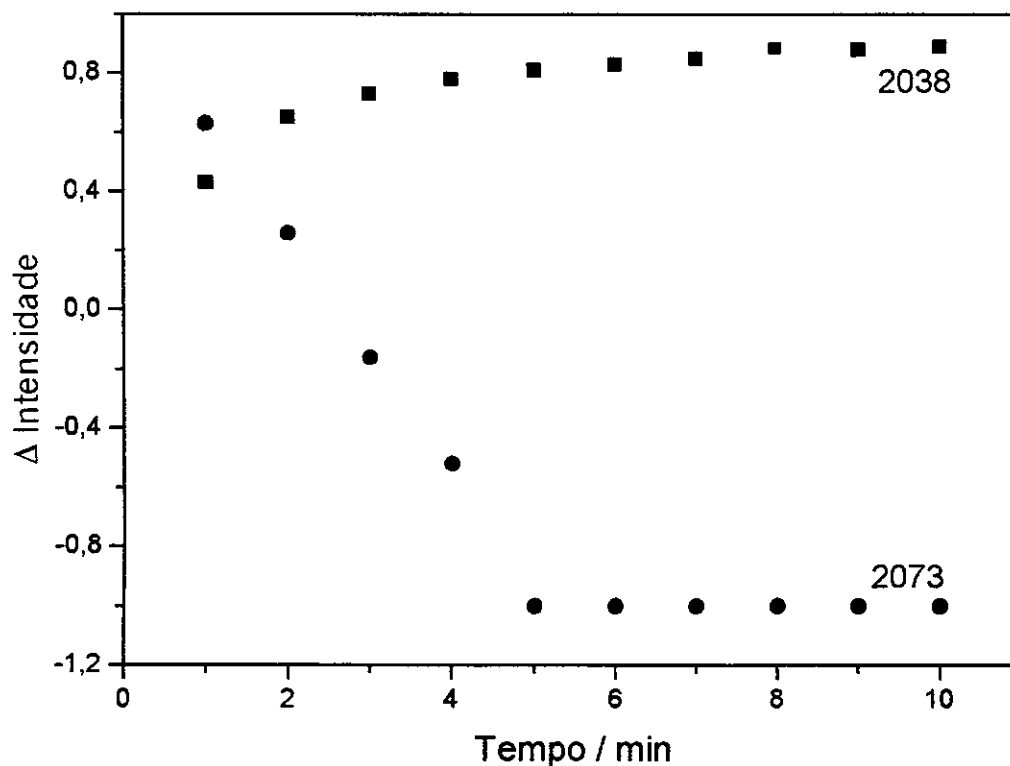


Figura 32. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 2038 e 2073 cm^{-1} , para a reação do NPS com CiSH em pH 10. Intervalo de tempo entre os espectros = 60 s. Tempo total da análise = 600s. NPS e tióis em concentrações equimolares de 0,2 mol L^{-1} .

Na Fig. 32, a velocidade de decomposição do intermediário é maior que a de formação do complexo aquapentacianoferrato (II), pois o intermediário decompõe formando além do complexo aquapentacianoferrato (II), o NPS reduzido.

Comparando os dados obtidos para as reações em meio tamponado com aqueles das reações em pH 10,0, conclui-se que as reações tamponadas, embora realizadas em temperatura mais alta, ocorrem de forma mais lenta que aquelas em pH 10,0. Em pH 10,0, há maior concentração de íons tiolato proporcionada pelo deslocamento do equilíbrio da Eq. 14. Nesse caso, a velocidade de formação do intermediário (V_f) é muito maior que a sua velocidade de decomposição (V_d) (Fig. 33a) desse modo, há um acúmulo do aduto intermediário na solução, que possibilita a visualização de suas bandas de absorção no UV/VIS e no IV, em 521 nm e 2073 cm^{-1} , respectivamente.

A aproximação do estado estacionário assume que após o período de indução, em que a concentração da espécie intermediária passa a ser diferente de zero, a variação da concentração da espécie intermediária durante maior parte da reação é tão pequena que pode ser considerada zero⁷⁴. No caso das reações em meio tamponado, a concentração de íons tiolato é menor, tornando a velocidade de formação do intermediário menor, Fig. 33b. A velocidade de decomposição é maior ou igual a velocidade de formação e dessa forma a espécie intermediária não pode ser detectada pelo instrumento. Dessa forma não é possível observar as bandas características do aduto intermediário quando as reações são feitas em meio tamponado. No entanto, sabe-se que essa reação ocorre, pois através dos espectros de IV nota-se a formação dos mesmos produtos finais que são formados quando a reação é realizada em pH 10,0.

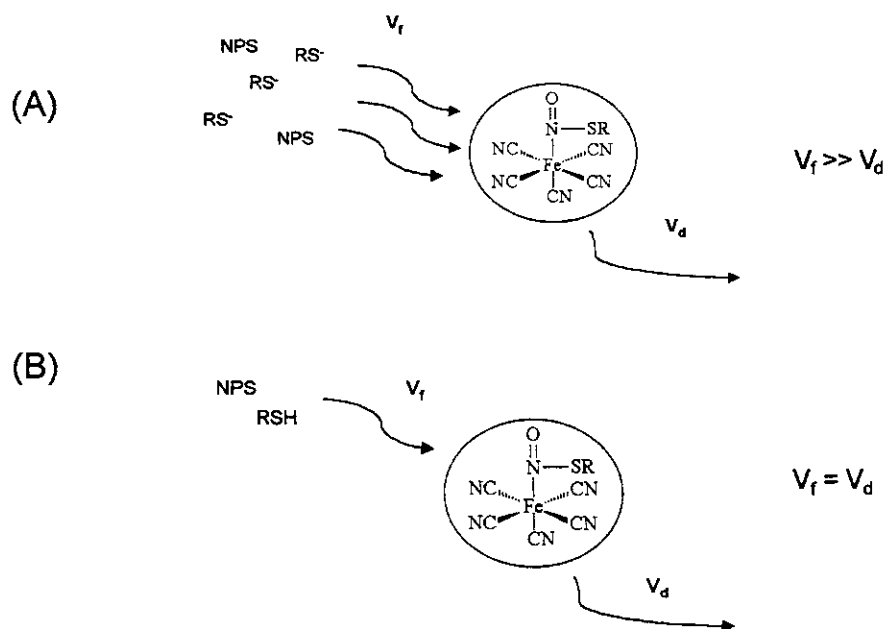


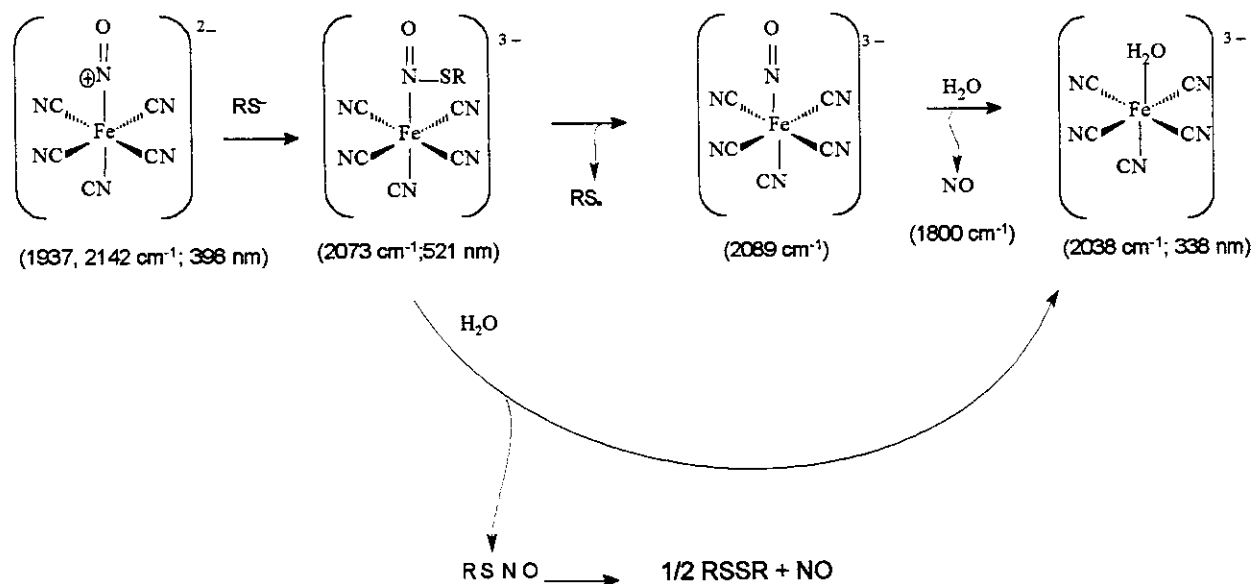
Figura 33. Representação da velocidade de formação do aduto intermediário a partir da reação do NPS com os íons tiolato. (A) reação realizada em pH ~ 10 ; (B) reação realizada em solução tampão, pH 7,4.

4.8. Proposta de mecanismo para reação de redução do NPS pelos tióis

Analisando os resultados obtidos nas reações em pH 10,0 e comparando os mesmos com alguns dados da literatura^{40,49,50,52,55,56,64}, foi possível propor um mecanismo de formação e decomposição do aduto intermediário (Esquema 1). Na elaboração desse mecanismo, foi importante considerar a presença de NO livre já que essa espécie foi detectada, após a redução do NPS pelo tiol, em experimento exploratório no INCOR – SP, utilizando um detector de NO por quimiluminescência.

No mecanismo proposto, inicialmente ocorre o ataque do tiolato ao NPS formando o aduto intermediário, que perde um radical sulfeto gerando NPS reduzido. Em seguida, o NO do aduto é substituído por uma molécula de água, gerando assim NO livre e o complexo aquapentacianoferrato (II).

Stasicka⁵² e col. propuseram que o intermediário se decompõe a NPS reduzido, $[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CN})_5\text{NO}^+]^{3-}$, perdendo um radical sulfeto que posteriormente formará um disulfeto. No mecanismo proposto por esses autores, em nenhuma etapa observa-se a liberação de NO livre.



Esquema 1. Proposta de mecanismo de formação e decomposição do intermediário formado a partir do ataque nucleofílico do íon tiolato ao NPS.

Pode existir, ainda, uma etapa alternativa ao mecanismo de liberação do NO: o intermediário pode sofrer uma quebra homolítica liberando um nitrosotiol que após sofrer uma quebra homolítica formará um radical sulfeto e liberará um NO livre.

4.9. Análises espectroscópicas das reações do NPS com oxihemoglobina em meio tamponado (pH 7,4)

Há um consenso sobre a origem e destino do NO no organismo: ele vem das células endoteliais e tem como alvo as células musculares lisas, no entanto, os caminhos percorridos e as formas químicas que o NO assume para percorrer esse trajeto ainda não estão esclarecidas. Já foi provado que o NO não se difunde aleatoriamente através das células vermelhas, sua movimentação segue uma série de eventos coordenados¹⁶. A difusão aleatória do NO levaria à total transferência de NO para o interior das hemácias através da membrana celular que transforma a HbO₂ em metahemoglobina (metHb) e nitrato, inativando o NO. Isso sugere que todo o NO será consumido pelo sangue, não restando nenhum para o controle da pressão arterial. Essa reação é muito rápida e leva ao questionamento de como a função do NO pode ser mantida na presença de tanta oxihemoglobina contida no sangue^{14,24}. Esse assunto cuja resposta ainda não foi encontrada, desperta bastante interesse e muita controvérsia. Muitos autores acreditam que na presença de NO a Hb é transformada em nitrosilhemoglobina (HbNO)^{23,24} em que o NO está ligado ao Fe do grupo heme.

Outro modelo alternativo proposto por alguns autores^{15-17,75} sugere que o NO é transportado na circulação de mamíferos através da SNOHb, que consiste na S-nitrosação da cisteína residual na posição 93 da cadeia β da hemoglobina. A proposta é que a SNOHb promove a vasorelaxação através da transnitrosação com tióis de baixo peso molecular. Dessa forma evita-se que o NO seja inativado pela HbO₂¹². Há ainda aqueles que defendem a captura do NO pelo Fe²⁺ da Hb formando a NOHb ($k \approx 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (estrutura tensa, T) seguido de um rearranjo

intramolecular e o NO se liga a grupo tiol residual da cisteína, formando a SNOHb (estrutura relaxada, R)^{14,15,76}.

O espectro da HbO₂ é caracterizado por uma banda intensa com máximo em 415 nm, conhecida como banda Soret (ou γ), com $\epsilon = 131 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e duas bandas com absorção mais fraca, em 542 e 577 nm (bandas β e α) ($\epsilon = 14,4$ e $15,4 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A metHb (Fe³⁺) possui banda com máximo em 406 nm ($\epsilon = 162 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e as bandas β e α só são detectadas em meio alcalino e em 540 e 575 nm^{62,77}. Dados da literatura⁷⁸ reportam para a hemoglobina (Fe²⁺) (Hb) uma banda com máximo em torno de 425 nm, no entanto, o espectro obtido experimentalmente mostra uma banda em 409 nm (Fig. 34). A HbO₂ foi sintetizada várias vezes no laboratório e algumas vezes observou-se um pequeno deslocamento do máximo de absorção da banda Soret para 412 nm.

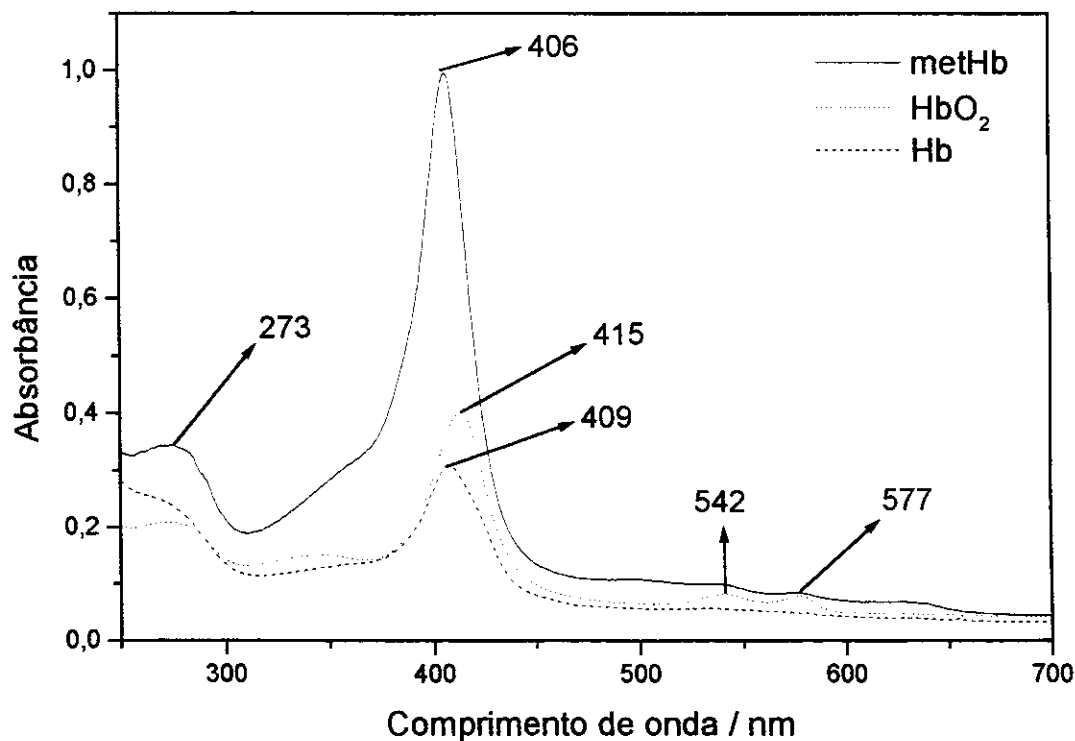


Figura 34. Espectros na região do UV/VIS de soluções de HbO₂, metHb e Hb, obtidos experimentalmente.

A oxidação da HbO₂ a metHb está bem caracterizada no UV/VIS, devido ao deslocamento da banda Soret de 415 para 406 nm, conforme a Eq.6^{18-21,62,64}. Esse deslocamento foi acompanhado, na oxidação promovida pelo NPS, como pode ser visto na Fig. 35.

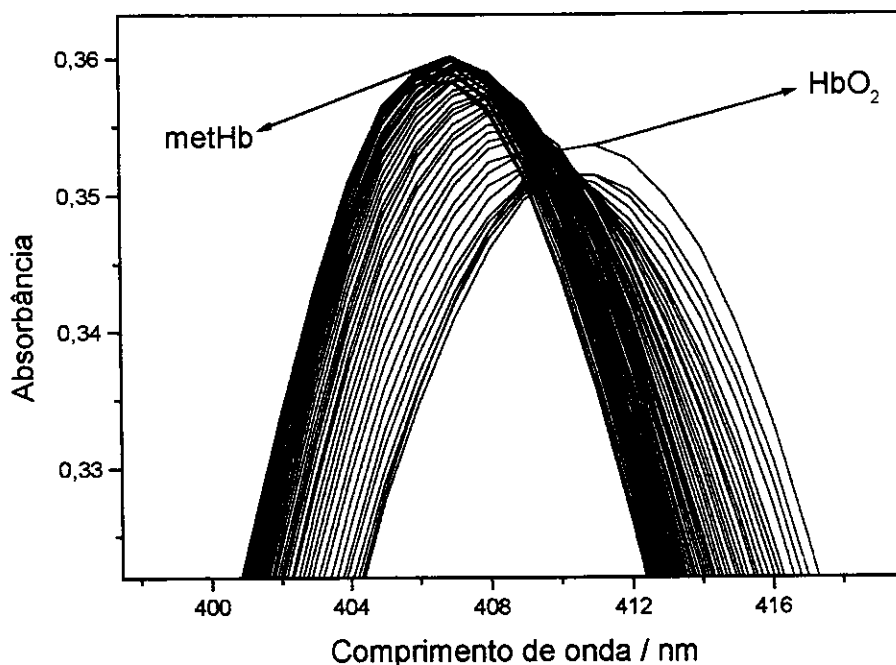
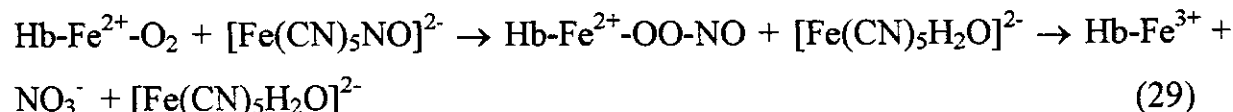


Figura 35. Variação espectral representativa na região de 400 nm do UV/VIS, obtida durante as reações do NPS com oxihemoglobina em meio tamponado. Soluções equimolares $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; tempo de análise 3600 s; intervalo entre os espectros 75 s; $T = 37^\circ \text{ C}$.

A oxidação da HbO₂ envolve um mecanismo em que há a formação de um intermediário Hb-Fe²⁺-OO-NO, que se decompõe originando a metHb e o nitrato^{21,76} (Eq. 29).



A decomposição do intermediário $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{-OO-NO}$ poderia ser realizada através do acompanhamento da banda em 407 nm, já que Herold^{21,79} *et al.* afirmam ser essa a região de absorção de uma espécie intermediária. No entanto, é bastante complicado seguir essa banda, pois a decomposição da espécie intermediária gera a metHb, que absorve em 406 nm, o que inviabiliza esse acompanhamento, já que não se observará um deslocamento significativo da banda e sim uma sobreposição de bandas. Optou-se, então, por se acompanhar a decomposição da espécie $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-OO-NO}$, através do desaparecimento da banda em 577 nm, referentes à HbO_2 . Acompanhar o deslocamento da banda em 415 ou 406 nm é desfavorável, já que há sobreposição de bandas nessa região e a banda em 577 nm é a mais indicada para realizar esse acompanhamento. As curvas cinéticas atribuídas ao desaparecimento da banda em 577 nm para a reação da HbO_2 com o NPS na presença de tióis (Fig. 36) puderam ser ajustadas a uma cinética de primeira ordem.

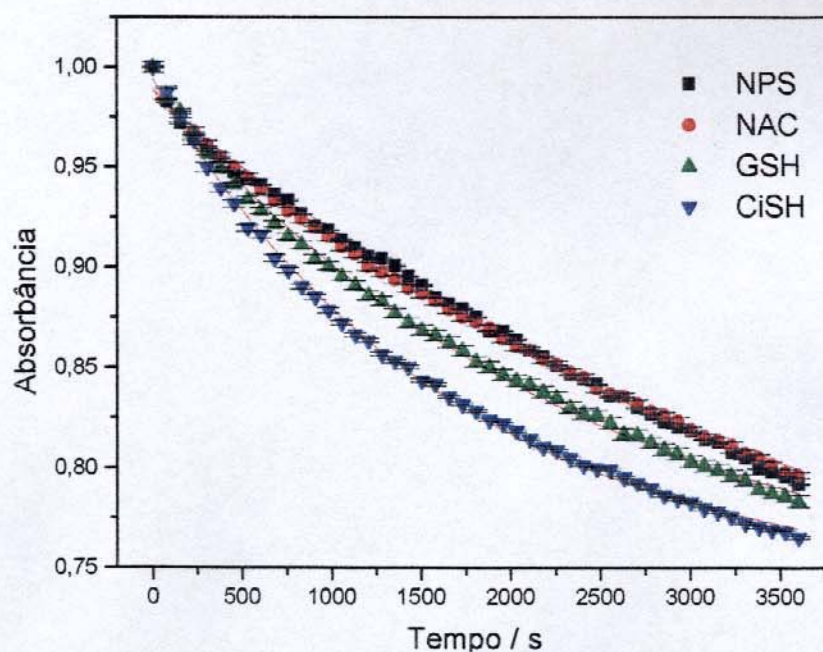


Figura 36. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais da banda em 577 nm, para a reação do NPS com a HbO_2 , na presença de tióis. Intervalo de

tempo entre os espectros = 250 s. Temperatura = 37° C. As barras de erro correspondem às estimativas do desvio padrão de duplicatas.

A oxidação da HbO₂ foi comprovada não só pelo deslocamento da banda em 415 nm, mas, também, pelo desaparecimento de outras duas bandas características: 542 e 577 nm (Fig. 37).

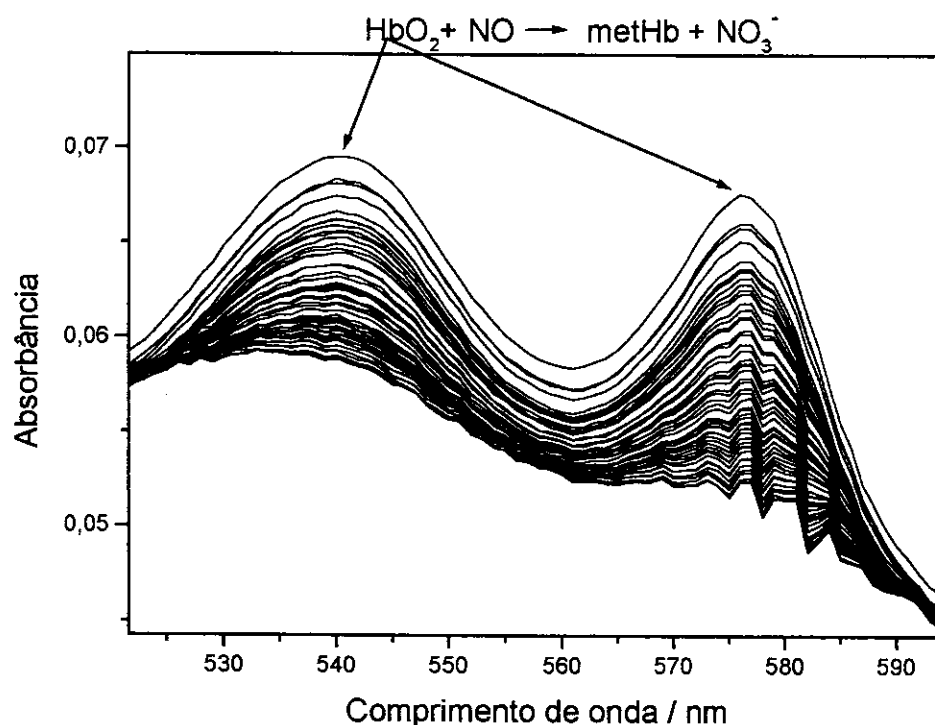


Figura 37. Variação espectral representativa na região de 500 nm do UV/VIS, obtida durante as reações do NPS com HbO₂ em meio tamponado. Soluções equimolares $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; tempo de análise 3600 s; intervalo entre os espectros 75 s; T = 37° C.

Foram realizados experimentos em que somente a HbO₂, na mesma concentração utilizada nas outras reações, foi exposta às condições de irradiação do espectrofotômetro. A finalidade deste experimento era testar a fotodecomposição

da HbO₂ que poderia ser causada pela incidência de luz durante o monitoramento das reações. Esses testes demonstraram que a fotodecomposição sofrida pela HbO₂, causada pela luz do espectrofotômetro é desprezível e, portanto, pode ser desconsiderada.

4.10. Análises espectroscópicas das reações do NPS com a oxihemoglobina na presença de tióis, em meio tamponado (pH 7,4)

Nesta etapa utilizou-se soluções equimolares de HbO₂, NPS e de um dos tióis. Foi possível observar a oxidação da HbO₂ a metHb, no entanto a velocidade de conversão foi menor.

A Fig. 38 mostra os valores das constantes de velocidade de desaparecimento da banda em 577 nm da HbO₂ obtidos para as reações do NPS com a HbO₂ na presença de um dos tióis, comparados ao valor da constante de velocidade da reação realizada somente com NPS, sem o tiol.

Na reação em que foi adicionado o tiol, a oxidação da HbO₂ foi mais rápida quando comparada à reação do NPS com a HbO₂ sem a adição de tiol. Estes resultados indicam que a reação do NPS com o tiol aumenta a sua reatividade frente à HbO₂. O NO que reage com a HbO₂ pode ser um NO livre, liberado a partir da reação do NPS com o tiol; um RSNO, também proveniente da reação do NPS com o tiol ou ainda a espécie intermediária.

Estes resultados indicam que os tióis endógenos podem ser os captadores primários de NO livre, ou NO transferido de doadores, no plasma. Novamente a CiSH mostrou ser o tiol mais reativo.

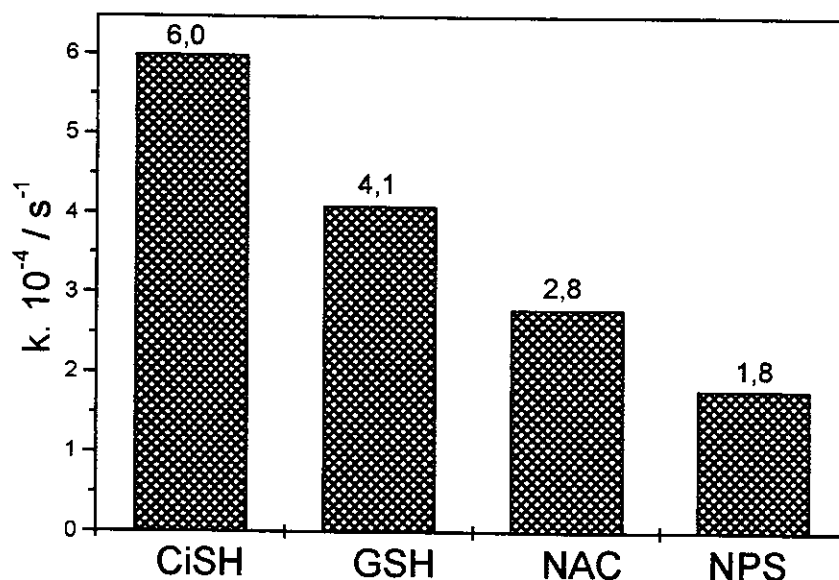


Figura 38. Constantes de velocidade (s^{-1}) de decaimento de primeira ordem da banda em 577 nm da HbO_2 para as reações do NPS com a HbO_2 na presença de tióis comparadas ao valor do NPS sozinho. Soluções equimolares $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Temperatura = 37° C .

4.11. Testes *in vivo* da influência da administração simultânea de tióis na capacidade vasodilatadora do NPS

As Fig. 39 - 41 ilustram os efeitos hipotensores obtidos pela administração de NPS e NPS-tiol em ratos normotensos e hipertensos acordados.

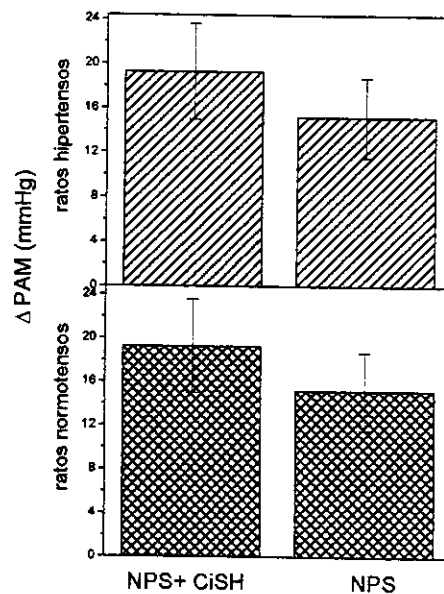


Figura 39. Efeito hipotensor do NPS e NPS-CiSH administrados, i.v. em ratos acordados normotensos e hipertensos (agudos tratados com L-NAME). Cada coluna representa uma média de 6 ratos e o erro padrão da média (SEM). Dose = $51,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/kg}$.

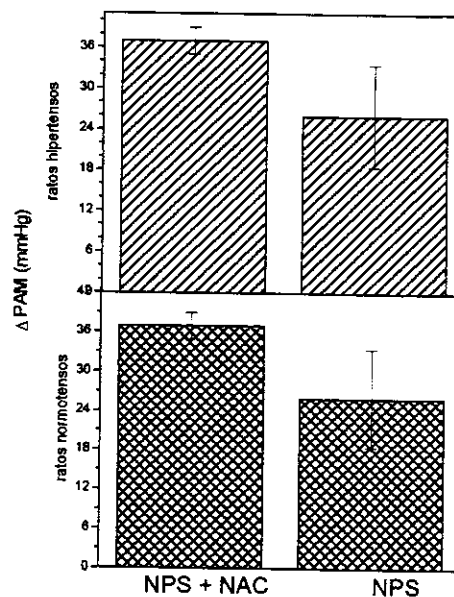


Figura 40. Efeito hipotensor do NPS e NPS-NAC administrados, i.v. em ratos acordados normotensos e hipertensos (agudos tratados com L-NAME). Cada

coluna representa uma média de 6 ratos e o erro padrão da média (SEM). Dose = $51,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/kg}$.

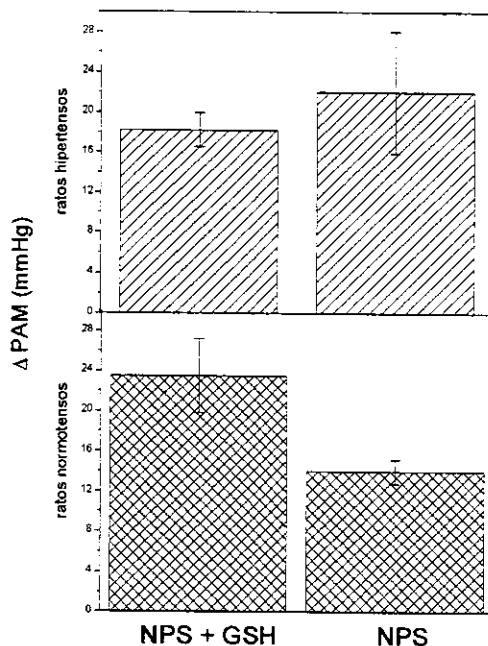


Figura 41. Efeito hipotensor do NPS e NPS-GSH administrados, i.v. em ratos acordados normotensos e hipertensos (agudos tratados com L-NAME). Cada coluna representa uma média de 6 ratos e o erro padrão da média (SEM). Dose = $51,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/kg}$.

Pode-se observar que a administração simultânea de tióis e NPS levou a uma potencialização do efeito do NPS, quando comparado ao efeito do NPS isolado, para todos os tióis, nos animais normotensos. A potencialização foi cerca de 20, 30 e 40 % na adição de CiSH, NAC e GSH, respectivamente.

Nos animais hipertensos a adição de CiSH e NAC também potencializou o efeito do NPS enquanto na administração de GSH, as reduções nos valores de ΔPAM obtidas não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa.

Observa-se que o efeito potencializador na administração simultânea de tióis obedece à seguinte ordem: GSH > NAC > CiSH; esta seqüência é inversamente proporcional aos valores das constantes de velocidade de decomposição do intermediário observada nas reações em pH 10,0 (Fig. 42). Desta forma, pode-se estabelecer uma comparação do efeito hipotensor dos tióis com a velocidade de decomposição do intermediário.

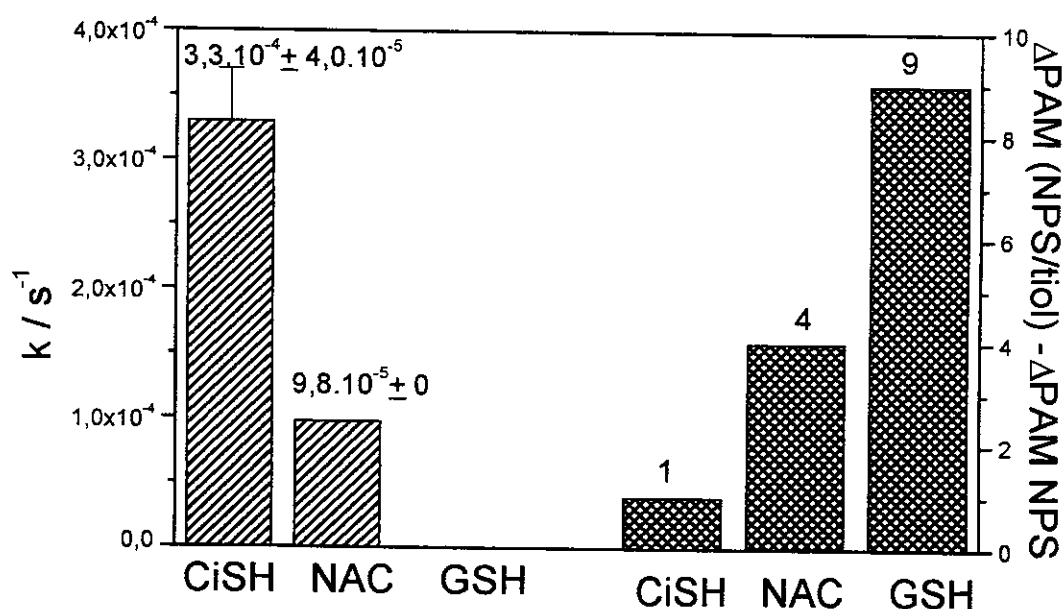


Figura 42. Valores das constantes de velocidade de decomposição da banda em 521 nm nas reações em pH 10,0 comparados aos valores de ΔPAM da administração simultânea de NPS-tiol – efeito da administração de NPS.

Comparando os valores de velocidade inicial de decomposição da banda em 521 nm ($V_{NPS : tiol} = 2:1$) com os valores de k do desaparecimento da banda em 521 nm e também o efeito potencializador promovido pelo tiol, quando administrado simultaneamente com o NPS (Fig. 43), evidencia-se mais uma vez a instabilidade

do intermediário formado pela CiSH e o maior efeito hipotensor proporcionado pela GSH. Observa-se uma correlação inversa entre a estabilidade do intermediário formado e o efeito hipotensor gerado pelo tiol.

A CiSH é o tiol mais reativo e deve formar um intermediário menos estável, pois decompõe rapidamente, e seu efeito hipotensor é o menor observado entre os três tióis. As causas desta correlação e suas implicações fisiológicas se encontram ainda sob investigação e deverão ser esclarecidas em trabalhos futuros.

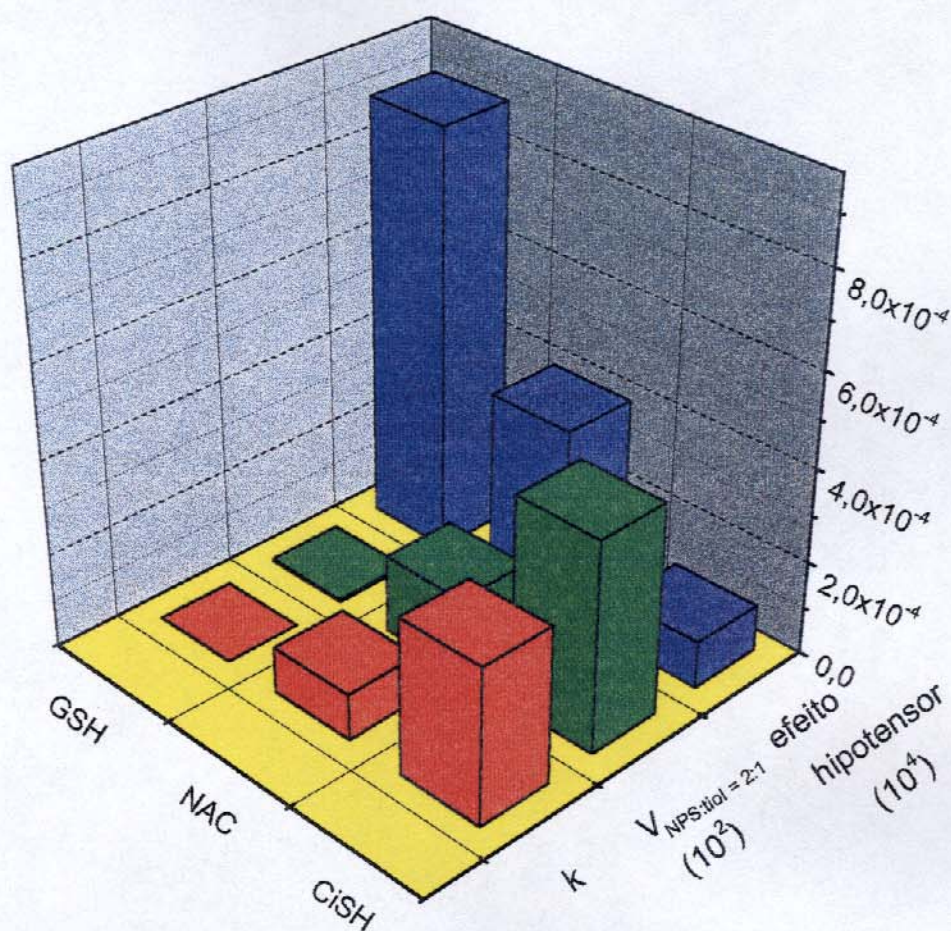


Figura 43. Valores de velocidade de decomposição (s^{-1}) do intermediário na proporção NPS : tiol = 2:1, constante de velocidade (s^{-1}) de decaimento da banda do intermediário em 521 nm e efeito hipotensor observado na administração simultânea de NPS e um tiol.

5. CONCLUSÕES

A redução do NPS pelos tióis ocorre através da formação de um intermediário com banda em 2089 cm^{-1} e 521 nm . A decomposição desse intermediário forma dois produtos: o NPS reduzido e um complexo aquapentacianoferrato (II). Posteriormente, o NO do NPS reduzido é substituído por uma molécula de H_2O levando à formação do complexo aquapentacianoferrato (II).

A velocidade de decomposição do intermediário está relacionada ao tiol que reagiu com o NPS. Em meio básico, a velocidade de decomposição segue a ordem: $\text{CiSH} > \text{NAC} > \text{GSH}$. Em meio tamponado, o único tiol que apresentou variação espectral significativa foi a CiSH.

O pH é um fator determinante nessa reação pois, em meio básico, a velocidade de formação do aduto é muito maior que a de decomposição assim, é possível observar o intermediário através das alterações espectrais no UV/VIS e no IV.

A oxidação da HbO_2 pelo NO ocorre através de um mecanismo em que há a formação do intermediário $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-OO-NO}$ que se decompõe originando metHb e nitrato. Na presença de tióis livres, observou-se que a velocidade desta reação é aumentada, o que indica um aumento na reatividade do NPS frente à HbO_2 .

A adição simultânea de NPS e um tiol potencializa o efeito hipotensor do NPS, principalmente no modelo animal de ratos normotensos. O efeito hipotensor está inversamente relacionado à reatividade do tiol, indicando que deve haver uma correlação entre a estrutura do tiol e o efeito hipotensor gerado.

6. REFERÊNCIAS

1. Lancaster Jr., J.; *"Nitric Oxide: Principles and Actions"*; Academic Press Inc.; 1996.
2. Napoli, C., Ignarro, L.J.; *"Nitric Oxide - Releasing Drugs"*; Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.; **43**; 97; 2003.
3. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J.; *"Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms"*; Science; **258**; 1898; 1992.
4. Fricker, S.P.; *"Ruthenium, Nitric Oxide and Disease: a Novel Inorganic Chemistry Approach to Drug Design"*; Platinum Metals Rev.; **39**; 250; 1995.
5. Butler, A.R., Williams, D.L.H.; *"The Physiological Role of Nitric Oxide"*; Chem. Soc. Rev.; **22**; 233; 1993.
6. Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein E.H., Pontecorvo, E.G., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J.; *"Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-Induced Human Platelet Aggregation in the Presence of Nitric Oxide and Related Vasodilators"*; Blood; **57**; 946; 1981.
7. Azuma, H., Ishikawa, M., Sekizaki, S.; *"Endothelium-Dependent Inhibition of Platelet Aggregation"*; Br. J. Pharmacol.; **88**; 411; 1986.
8. Richter-Addo, G.B., Legzdins, P., Burstyn, J.; *"Introduction: Nitric Oxide Chemistry"*; Chem. Rev.; **102**; 857; 2002.
9. Mc Cleverty, J.A.; *"Reactions of Nitric Oxide Coordinated to Transition Metals"*; Chem. Rev.; **79**; 53; 1979.
10. Williams, R.J.P.; *"Nitric Oxide in Biology: Its Role as a Ligand"*; Chem. Soc. Rev.; **25**; 77; 1996.
11. Shishido, S.M., de Oliveira, M.G.; *"Polyethylene Glycol Matrix Reduces the Rates of Photochemical and Thermal Release of Nitric Oxide from S-nitroso- N-acetylcysteine"*; Photochem. Photobiol.; **71**; 273; 2000.
12. Hobbs, A.J., Gladwin, M.T., Patel, R.P., Williams, D.L.H., Butler, A. R.; *"Haemoglobin: NO Transporter, NO Inactivator or NOne of the Above?"*; Trends Pharmacol. Sci.; **23**; 2002.
13. Gladwin, M.T., Ognibene, F.P., Shelhamer, J.H., Pease-Fye, M.E., Noguchi, C.T., Rodgers, G.P., Schechter, A.N., *"Nitric Oxide Transport on Sickle Cell Hemoglobin: Where Does it Bind?"*; Free Rad. Res.; **35**; 175; 2001.
14. Gross, S.S.; *"Targeted Delivery of Nitric Oxide"*; Nature, **409**; 577; 2001.
15. Gow, A.J., Stamler J.S.; *"Reactions Between Nitric Oxide and Haemoglobin Under Physiological Conditions"*; Nature; **391**; 169; 1998.
16. Pawloski, J.R., Hess, D.T., Stamler, J.S.; *"Export by Red Blood Cells of Nitric Oxide Bioactivity"*; Nature; **409**; 622; 2001.

17. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Stamler, J.S.; "*S'-nitrosohaemoglobin: a Dynamic Activity of Blood Involved in Vascular Control*"; *Nature*; **380**; 221; 1996.
18. Tabrizi-Fard, M.A., Lee, W.I., Fung, H.L.; "*Differential Interactions of Nitric Oxide Donors with Rat Oxyhemoglobin*"; *Biochem. Pharmacol.*; **58**; 671; 1999.
19. Herold, S.; "*Kinetic and Spectroscopic Characterization of an Intermediate Peroxynitrite Complex in the Nitrogen Monoxide Induced Oxidation of Oxyhemoglobin*"; *FEBS Lett.*; **439**; 85; 1998.
20. Cooper, C.E.; "*Nitric Oxide and Iron Proteins*"; *BBA-Bioenergetics*; **1411**; 290; 1999.
21. Herold, S., Exner, M., Nauser, T.; "*Kinetic and Mechanistic Studies of the NO[•]-Mediated Oxidation of Oxymyoglobin and Oxyhemoglobin*"; *Biochemistry*; **40**; 3385; 2001.
22. Tabrizi-Fard, M.A., Lee, W.I., Fung, H.L.; "*Differential Interactions of Nitric Oxide Donors with Rat Oxyhemoglobin*"; *Biochem. Pharmacol.*; **58**; 671; 1999.
23. Kosaka, H.; "*Nitric Oxide and Hemoglobin Interactions in the Vasculature*"; *BBA-Bioenergetics*; **1411**; 370; 1999.
24. Huang, Z., Louderback, J.G., Goyal, M., Azizi, F., King, S.B., Kim-Shapiro, D.B.; "*Nitric Oxide Binding to Oxygenated Hemoglobin Under Physiological Conditions*"; *BBA-Gen. Subjects*; **1568**; 252; 2001.
25. Ford, P.C., Lorkovic, I.M.; "*Mechanistic Aspects of the Reactions of Nitric Oxide with Transition-Metal Complexes*"; *Chem. Rev.*; **102**; 993; 2002.
26. Lewis, J., Irving, R.J., Wilkinson, G.; "*Infrared Spectra of Transition Metal-Nitric Oxide Complexes – I*"; *J. Inorg. Nucl. Chem.*; **7**; 32; 1958.
27. Eisenberg, R., Meyer, C.D.; "*The Coordination Chemistry of Nitric Oxide*"; *Accounts Chem. Res.*; **8**; 26; 1975.
28. Furchgott, R.F., Zawadzinski J.V.; "*The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine*"; *Nature*; **288**; 373; 1980.
29. Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Woods, K.S.; "*Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) Released From Artery and Vein Appears to Be Nitric Oxide (NO) or a Closely Related Radical Species*"; *FASEB J.*; **46**; 644; 1987.
30. Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Woods, K.S.; "*Pharmacological and Biochemical Properties of Endothelium Derived Relaxant Factor (EDRF)- Evidence that EDRF is Closely Related to Nitric Oxide (NO) Radical*"; *Circulation*; **74**; 287; 1986.
31. Moncada, S., Radomski M.W., Palmer R.M.J.; "*Endothelium-Derived Relation Factor: Identification as Nitric Oxide and Role in Control of Vascular Tone and Platelet Function*"; *Biochem. Pharmacol.*; **37**; 2495; 1988.

32. Ignarro, L.J.; *"Biological Actions and Properties of Endothelium-Derived Nitric Oxide Formed and Released From Artery and Vein"*; Circ. Res.; **65**; 1; 1989.
33. Wang, P.G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T., Janczuk, A.J.; *"Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications"*; Chem. Rev.; **102**; 1091; 2002.
34. Ignarro, L.J.; *"After 130 Years, the Molecular Mechanism of Action of Nitroglycerin is Revealed"*; Proc. Natl. Acad. Sci.; **99**; 7816; 2002.
35. Ignarro, L.J., Napoli, C., Loscalzo, J.; *"Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide"*; Circ. Res.; **90**; 21; 2002.
36. Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra Jr, R., Harrison, D.G.; *"Nitric Oxide Generation From Nitroprusside by Vascular Tissue. Evidence That Reduction of the Nitroprusside Anion and Cyanide Loss are Required"*; Biochem. Pharmacol.; **42**; 5157; 1991.
37. Oszajca, J., Stochel, G., Wasielewska E., Stasicka, Z., Gryglewski, R.J., Jakubowski, A., Cieslik, K.; *"Cyanonitrosylmetallates as Potential NO-Donors"*; J. Inorg. Biochem.; **69**; 121; 1998.
38. Clarke, M.J., Gaul, J.B.; *"Chemistry Relevant to the Biological Effects of Nitric Oxide and Metallonitrosyls"*; Struct. Bond.; **81**; 147; 1993.
39. Manoharan, P.T., Hamilton, W.C.; *"The Crystal Structure of Sodium Nitroprusside"*; Inorg. Chem.; **2**; 1043; 1963.
40. Butler, A.R., Megson, I.L.; *"Non-Heme Iron Nitrosyls in Biology"*; Chem. Rev.; **102**; 1155; 2002.
41. Friederich, J.A., Butterworth, J.F.; *"Sodium Nitroprusside: Twenty Years and Counting"*; Anesth. Analg.; **81**; 152-162; 1995.
42. Tinker, J.H., Michenfelder, J.D.; *"Sodium Nitroprusside: Pharmacology, Toxicology and Therapeutics"*; Anesthesiology; **45**; 340; 1976.
43. Swinehart, J.H.; *"The Nitroprusside Ion"*; Coordin. Chem. Rev.; **2**; 385; 1967.
44. Manoharan, P.T., Gray, H.B.; *"Electronic Structure of Nitroprusside Ion"*; J. Am. Chem. Soc.; **87**; 3340; 1965.
45. Manoharan, P.T., Gray, H.B.; *"Electronic Structures of Metal Pentacyanonitrosyls"*; Inorg. Chem.; **5**; 823; 1966.
46. Shishido, S.M., de Oliveira, M.G.; *"Photosensitivity of Aqueous Sodium Nitroprusside Solutions: Nitric Oxide Versus Cyanide Toxicity"*; Prog. React. Kinet. Mech.; **26**; 239; 2001.
47. Butler, A.R., Glidewell, C.; *"Recent Chemical Studies of Sodium Nitroprusside Relevant to its Hypotensive Action"*; **16**; 361; 1987.

48. Butler, A.R., Glidewell, C., McGinnis, J., Bisset, W.I.K., "Further Investigations Regarding the Toxicity of Sodium Nitroprusside"; Clin.Chem.; **33**; 490; 1987.
49. Morando, P.J., Borghi, E.B., de Schteingart, L.M., Blesa, M.A.; "The Reaction of Cysteine with the Pentacyanonitrosylferrate(2-) Ion"; J. Chem. Soc. Dalton; **2**; 435; 1981.
50. Mulvey, D., Waters, W.A.; "Reduction of Alkaline Aqueous Disodium Pentacyanonitrosylferrate(2-) and Kinetic Features of its Colour Reaction with Thiols"; J. Chem. Soc. Dalton; **10**; 951; 1975.
51. Sieklucka, B.; "Thermal and Photochemical Reactions of Cyano Complexes of the Transition Metals"; Prog. React. Kinet; **15**; 175; 1989.
52. Szacilowski, K., Wanat, A., Barbieri, A., Wasielewska, E., Witko, M., Stochel, G., Stasicka, Z.; "Reactions of the $[Fe(CN)_5NO]^{2-}$ Complex with Biologically Relevant Thiols"; New J. Chem.; **26**; 1495; 2002.
53. Maraj, S.R., Khan, S., Cui, X., Cammack, R., Joannou, C.L., Hughes, M.N.; "Interactions of Nitric Oxide and Redox-Related Species with Biological Targets"; Analyst; **120**; 699; 1995.
54. Szacilowski, K., Oszejka, J., Barbieri, A., Karocki, A., Sojka, Z., Sostero, S., Boaretto, R., Stasicka Z.; "Photochemistry of the $[Fe(CN)_5N(O)SR]^{3-}$ Complex: a Mechanistic Study"; J. Photochem. Photobiol. A; **143**; 99; 2001.
55. Szacilowski, K., Stochel, G., Stasicka Z.; "Reaction of Sodium Pentacyanonitrosylferrate(2-) with Aliphatic Thiolates. Synthesis and Properties of the $[Fe(CN)_5N(O)SR]^{3-}$ Products"; New J. Chem.; **21**; 893; 1997.
56. Johnson, M.D., Wilkins, R.G.; "Kinetics of the Primary Interaction of Pentacyanonitrosylferrate (2-) with Aliphatic Thiols"; Inorg. Chem.; **23**; 231; 1984.
57. Szacilowski, K., Stasicka Z.; "Molecular Switches Based on Cyanoferrate Complexes"; Coordin. Chem. Rev.; **229**; 17; 2002.
58. Butler, A.R., Calsy-Harrison, A.M., Glidewell, C.; "The Pentacyanonitrosylferrate Ion- V. The Course of the Reactions of Nitroprusside With a Range of Thiols"; Polyhedron; **7**; 1988.
59. Rock, P.A., Swinehart, J.H.; "The Kinetics of the Aqueous Hydrogen Sulfide-Nitroprusside System"; Inorg. Chem.; **5**; 1078; 1966.
60. de Oliveira, M.G., Shishido, S.M., Seabra, A.B., Morgon, N.H.; "Thermal Stability of Primary S-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release"; J. Phys. Chem.A; **106**; 8963; 2002.

61. Hoshino, M., Ozawa, K., Seki, H., Ford, P.C.; "Photochemistry of Nitric Oxide Adducts of Water Soluble Iron (III) Porphyrin and Ferrihemoproteins Studied by Nanosecond Laser Photolysis"; *J. Am. Chem. Soc.*; **115**; 9568; 1993.
62. Radi, R., Rubbo, H.; "Protocol 9: Nitric Oxide Detection (Laboratory IV) International Training Course on Plant Polyphenol Antioxidants in the Biology and Pathology of Free Radicals"; Santiago, Chile; 1999.
63. Ricardo, K.F.S., Shishido, S.M., de Oliveira, M.G., Krieger, M.H.; "Characterization of the Hypotensive Effect of S-Nitroso-N-Acetylcysteine in Normotensive and Hypertensive Conscious Rats"; *Nitric Oxide*; **7**; 57; 2002.
64. Schwane, J. D., Ashby, M.T.; "FTIR Investigation of the Intermediates Formed in the Reaction of Nitroprusside and Thiolates"; *J. Am. Chem. Soc.*; **124**; 6822; 2002.
65. Aravindakumar, C.T., Ley, M.D., Ceulemans, J.; "Kinetics of the Anaerobic Reaction of Nitric Oxide with Cysteine, Glutathione and Cysteine Containing Proteins: Implications for in Vivo S-Nitrosation"; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*; **2**; 663; 2002.
66. Butler, A.R., Flitney, F.W., Williams, D.L.H.; "NO, Nitrosonium Ions, Nitroxide Ions, Nitrosothiols and Iron Nitrosyls in Biology: a Chemist's Perspective"; *Trends Pharmacol. Sci.*; **16**; 18; 1995.
67. Roncaroli, F., Ruggiero, M.E., Franco, D.W., Estiú, G.L., Olabe, J.A.; "Kinetic, Mechanistic and DFT Study of the Electrophilic Reactions of Nitrosyl Complexes with Hydroxide"; *Inorg. Chem.*; **41**; 5760; 2002.
68. Swinehart, J.H., Rock, P.A.; "The Equilibrium and Kinetic Properties of the Aqueous Hydroxide-Nitroprusside System"; *Inorg. Chem.*; **5**; 573; 1966.
69. Masák, J., Wendt, H.; "Kinetic Studies of the Nitroprusside Acid-Base Equilibria"; *Inorg. Chim. Acta*; **3**; 455; 1969.
70. de Oliveira, M.G., Langley, J.G., Rest, A.J.; "Photolysis of the $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ Ion in Water and Poly(vinyl alcohol) Films: Evidence for Cyano Radical, Cyanide Ion and Nitric Oxide Loss and Redox Pathways"; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*; **12**; 2013; 1995.
71. Brateman, P.S.; "Charge Transfer Phenomena in Some Inorganic Complexes. Part III. Ultraviolet Spectra of Transition-Metal Derivatives of Iron Group Cyanide Complex Anions"; *Inorg. Phys. Theor.*; **10**; 1471; 1966.
72. Ellis, D., Eckhoff, M., Neff, V.D.; "Electrochromism in the Mixed-Valence Hexacyanides. 1. Voltametric and Spectral Studies of the Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue"; *J. Phys. Chem.*; **85**; 1225; 1981.
73. Smith, J.N., Dasgupta, T.P.; "Mechanisms of Nitric Oxide Release from Nitrovasodilators in Aqueous Solution: Reaction of the Nitroprusside ion With L-Ascorbic Acid"; *J. Inorg. Biochem.*; **87**; 165; 2001.

74. Atkins, P.W.; *"Physical Chemistry"*; Oxford University Press; **6th** edition; 458; 1998.
75. Stamler, J.S., Jia, L., Eu, J.P., McMahon, T.J., Demchenko, I.T., Bonaventura, J., Gernet, K., Piantadosi, C.A.; *"Blood Flow Regulation by S-Nitrosohemoglobin in the Physiological Oxygen Gradient"*; Science; **276**; 2034; 1997.
76. McMahon, T.J., Stone, A.E., Bonaventura, J., Singel, D.J., Stamler, J.S.; *"Functional Coupling of Oxygen Binding and Vasoactivity in S-Nitrosohemoglobin"*; J. Biol. Chem.; **275**; 16738; 2000.
77. Zijlstra, W.G., Buursma, A.; *"Spectrophotometry of Hemoglobin: Absorption Spectra of Bovine Oxyhemoglobin, Deoxyhemoglobin, Carboxyhemoglobin, and Methemoglobin"*; Comp. Biochem. Physiol.; **118**; 743; 1997.
78. Hoshino, M., Ozawa, K., Seki, H., Ford, P.C.; *"Photochemistry of Nitric Oxide Adducts of Water-Soluble Iron (III) Porphyrin and Ferrihemoproteins Studied by Nanosecond Laser Photolysis"*; J. Am. Chem. Soc.; **115**; 9568; 1993.
79. Herold, S.; *"Kinetic and Spectroscopic Characterization of an Intermediate Peroxynitrite in the Nitrogen Monoxide Induced Oxidation of Oxyhemoglobin"*; FEBS Lett.; **443**; 81; 1999.